

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05012

研究課題名(和文)酸化亜鉛ナノ粒子を用いた第2高調波プローブの開発

研究課題名(英文)The development of SHG probes using ZnO nanoparticles

研究代表者

藤田 恭久(FUJITA, YASUHISA)

島根大学・学術研究院理工学系・教授

研究者番号：10314618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外レーザーを用いた2光子顕微鏡では、生体深部のin vivoイメージングなどに有用であるが、高い励起密度が必要なため生体への影響が問題となっている。本研究では、酸化亜鉛ナノ粒子を用いたバイオイメージング用の第2高調波(SHG)プローブについて、ナノ粒子の生成条件の最適化や局在表面プラズモン効果による高効率化とナノ粒子表面のシリカコートによる生体親和性付与に取り組んだ。その結果、低出力の1064 nmのフェムト秒レーザーを用いた場合でも従来の粒子に比べ約1000倍のSHG光の増大に成功した。この結果から高効率なバイオイメージング用SHGプローブの実現が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低出力のフェムト秒レーザーを用いても蛍光に匹敵するSHG強度が得られる酸化亜鉛ナノ粒子SHGプローブを実現した。これをバイオイメージングに用いることにより、2光子顕微鏡に比べ、生体への熱的な影響の低減とイメージングの高速化、装置の低価格化が可能となる。これにより生体深部の高分解能3次元観察などの分野の研究の幅が広がり、医生物分野の研究の進展に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Two photon microscopes using near IR laser is useful for the in vivo imaging of deep tissue, however, it has an issue of the influence of high excitation density. In this study, preparation condition of ZnO nanoparticles and localized surface plasmon resonance effect for high efficient SHG probe had been optimized and silica coating of ZnO nanoparticles have been performed to improve the biological affinity. About 1000 times improvement in SHG intensity compared to previous one was observed even the low power femto-second laser with 1064 nm was used. These results are promising to realize the high efficient SHG probe for bio-imaging.

研究分野：半導体工学

キーワード：酸化亜鉛 第2高調波発生 局在表面プラズモン共鳴 バイオイメージング シリカコート 非線形光学効果 SHG ナノ粒子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 光子励起顕微鏡は、近赤外光を用いるために生体の透過性が良く、散乱も少ないため生体深部の観察が可能ことからマウスの脳神経の *in vivo* イメージングなど最先端の研究に利用されている[1]。しかし、励起用のレーザーには数 W の Ti サファイアレーザー (ピークパワー数 100kW) が用いられ、回折限界の照射スポットでは GW/cm^2 オーダーの光照射密度が必要で生体への熱の影響や高価なレーザーシステムが必要などの問題がある。

一方、非線形光学結晶を用いてレーザー光を2倍の周波数に変換する技術である第2高調波発生(Second Harmonic Generation; SHG)は、イメージングに用いた場合、2光子励起と同等な効果を期待できるが、これまで十分活用されてこなかった。申請者達は、酸化亜鉛(ZnO)ナノ粒子が高効率な SHG を発生でき、2光子励起より高効率なことを見出した[2]。この技術を更に改善すれば高性能な *in vivo* イメージング用プローブとして期待できる。

2. 研究の目的

以下の研究を行い、酸化亜鉛ナノ粒子による SHG プローブを開発するため

- ・ SHG 効率向上のため酸化亜鉛ナノ粒子の生成条件の最適化
- ・ SHG 効率の一桁向上
- ・ 生体親和性改善のためのシリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の SHG プローブの開発
- ・ 抗体修飾による生体のイメージング

3. 研究の方法

本研究においては、Fig.1 に示す減圧空气中でアークプラズマにより亜鉛を蒸発させるガス中蒸発法を用いて酸化亜鉛ナノ粒子を生成し、フェムト秒レーザーを用いて SHG 光を発生させた。SHG 光は蛍光分光光度計 (堀場製作所 FluoroMax-4) を用いて計測した。

本研究で新たに導入したフェムト秒レーザーは EKSPLA 社製 Light Wire FF200 である。このレーザーは波長 1064 nm、パルス幅 130 fsec.、パルスエネルギー 5 nJ、繰り返し周波数 40 MHz であり、ピーク出力 38 kW、平均出力 200 mW と一般的に用いられる Ti サファイアレーザーに比べて1桁程度出力は小さい。

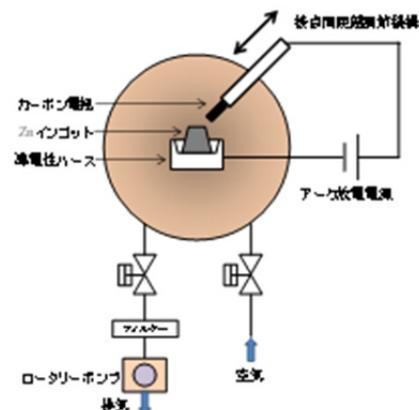


Fig. 1 ガス中蒸発法装置図。

① SHG 効率向上のため酸化亜鉛ナノ粒子の生成条件の最適化

件最適化

ガス中蒸発法における酸化亜鉛ナノ粒子の作製条件 (チャンバー内圧力、導入ガス種、およびガス流量) を制御することにより、酸化亜鉛結晶に欠陥を積極的に導入し、SHG 効率の高いナノ粒子の作製を試みた。評価は、フェムト秒レーザーを蛍光分光光度計に取り付け、SHG 光の強度を測定することにより行った。



Fig. 2 今回導入したフェムト秒レーザー。

② SHG 効率の1桁向上

酸化亜鉛ナノ粒子の SHG 光を増強するため、局在表面プラズモン共鳴や粒子の熱処理の効果を調べた。

③ 生体親和性改善のためのシリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の SHG プローブの開発

酸化亜鉛ナノ粒子をアルコール系溶媒に分散させ、テトラエトキシシランの加水分解によりシリカコート酸化亜鉛ナノ粒子を作製した。

④ 抗体修飾による生体のイメージング

シリカコート酸化亜鉛ナノ粒子にアミノ基を修飾することにより、抗体修飾シリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の前駆体を作製し、SHG プローブを用いてバイオイメージングのデモンストレーションを行う。

4. 研究成果

① SHG 効率向上のため酸化亜鉛ナノ粒子の生成条件の最適化

従来は Ti サファイアレーザーを光源としてガス中蒸発法により大気圧付近で生成した酸化亜鉛ナノ粒子を用いて集光しなくてもバイオイメージングが可能な高効率な SHG を示すこと

を報告されていた[2]. 本研究においてチャンパー内圧力, アーク電流等を最適化した. その結果, 100 Torr, 50 A の条件で従来の約 275 倍の SHG 光を得ることに成功した (Fig. 3).

② SHG 効率の 1 桁向上

更に SHG の発生効率を高めるためにメタルナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴効果を検討した. 532 nm の SHG 光に共鳴する金ナノ粒子と 1064 nm のレーザー光に共鳴する金ナノロッドを酸化亜鉛ナノ粒子に混合したところ, SHG に共鳴する場合は効果が得られなかったが, レーザー光に共鳴する場合は約 1.4 倍の増強を確認できた. 次に酸化亜鉛ナノ粒子の欠陥準位との SHG の共鳴を考慮し, 欠陥を制御するために大気中における熱処理を行った. その結果, ①の粒子で熱処理条件を検討し, 300 °C, 30 min.の時に熱処理なしの粒子の 2.75 倍の SHG 強度を得ることができた. また, Fig.4 に示すように, SHG の波長におけるフォトルミネッセンス(PL)強度との相関がみられた. フォトルミネッセンス強度は必ずしも欠陥密度に比例するわけではないが, 欠陥準位と SHG の共鳴による効率の増加が起こっている可能性が考えられる. これを総合すると従来の大気圧付近で生成した粒子に比べ約 1000 倍の強度の増強可能なことがわかった.

③ 生体親和性改善のためのシリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の SHG プロープの開発

酸化亜鉛ナノ粒子をアルコール系溶媒に分散させ, テトラエトキシシランの加水分解条件(反応温度, 反応時間, 原料配合比) 制御し, 酸化亜鉛を完全に被覆した SHG プロープを作製した (Fig.5).

④ 抗体修飾による生体のイメージング

SHG プロープを用いてバイオイメージングのデモンストレーションについては, フェムト秒レーザーの故障により研究期間内に実験を行うことができなかった.

5. まとめ

本研究では酸化亜鉛ナノ粒子を用いた SHG プロープについて, ナノ粒子の生成条件と熱処理条件の最適化により, 目標の 1 桁を上回る 3 桁の増強を達成した. この SHG 強度はピーク

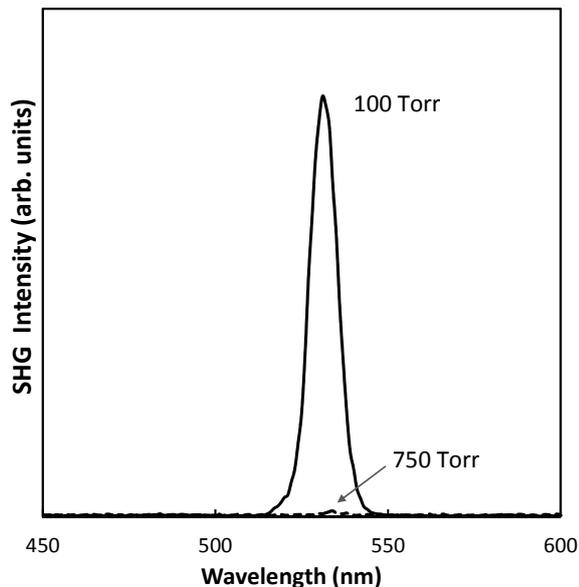


Fig. 3 SHG 光のスペクトル (アーク電流 50A, 生成圧力 100Torr, 750Torr).

③ 生体親和性改善のためのシリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の SHG プロープの開発

酸化亜鉛ナノ粒子をアルコール系溶媒に分散させ, テトラエトキシシランの加水分解条件(反応温度, 反応時間, 原料配合比) 制御し, 酸化亜鉛を完全に被覆した SHG プロープを作製した (Fig.5).

④ 抗体修飾による生体のイメージング

SHG プロープを用いてバイオイメージングのデモンストレーションについては, フェムト秒レーザーの故障により研究期間内に実験を行うことができなかった.

5. まとめ

本研究では酸化亜鉛ナノ粒子を用いた SHG プロープについて, ナノ粒子の生成条件と熱処理条件の最適化により, 目標の 1 桁を上回る 3 桁の増強を達成した. この SHG 強度はピーク

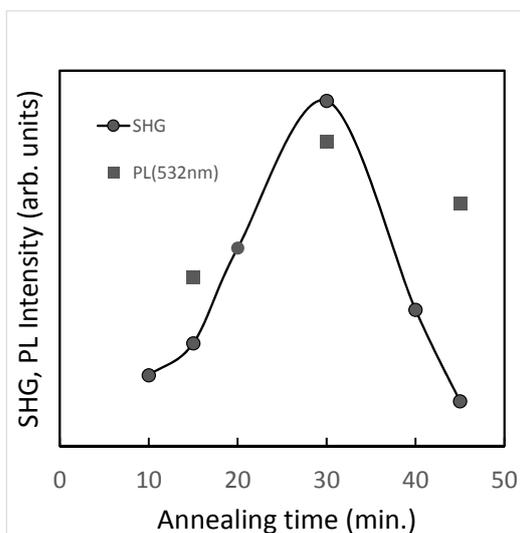


Fig. 4 SHG 強度と PL (532 nm) 強度の熱処理時間依存性 (300°C).

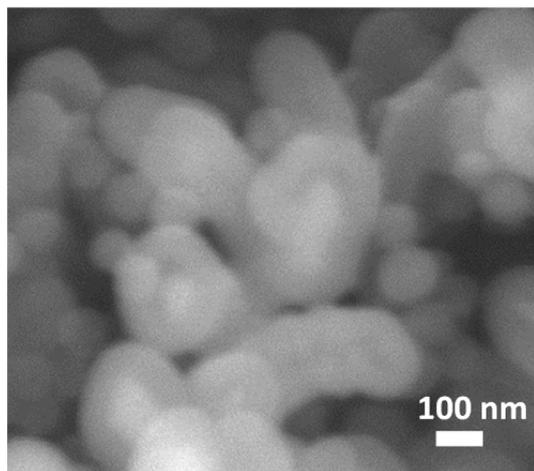


Fig.5 シリカコート酸化亜鉛ナノ粒子の SEM 像.

強度が一般に用いられる Ti サファイアレーザーより 1 桁低いレーザーを用いているにもかかわらず同じ蛍光分光光度計（励起光源はキセノンランプ）で測定した蛍光と同等の強度をもっており、従来の 2 光子励起などのプローブに比べはるかに高効率である。

本研究の成果はバイオイメージングに用いた際に生体への熱的な影響の低減とイメージングの高速化、装置の低価格化が可能となる。これにより生体深部の高分解能 3 次元観察などの分野の研究の幅が広がり、医生物分野の研究の進展に役立つことが期待できる。

<引用文献>

1. Ryosuke Kawakami et al., *Biomed Opt Express*, 6(3), 891–901 (2015).
2. Ben Urban et al., *Optical Materials Express*, 1(4), 658-669 (2011).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1 . 発表者名 J. Lin, Y. Oyama, Y. Fujita
2 . 発表標題 Optimize ZnO nanoparticles synthesis for high Second harmonic generation properties
3 . 学会等名 The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 J. Lin, Y. Oyama, Y. Fujita
2 . 発表標題 ZnO nanoparticle based Second harmonic generation with 1064nm excitation
3 . 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 J. Lin, H. Tanada , K. Odawara, Y. Fujita
2 . 発表標題 Second harmonic generation properties for silica coated ZnO particles
3 . 学会等名 The 5th China-Japan Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Yasuhisa Fujita, Jie Lin, Junko Fujihara, Haruo Takeshita, Ryousuke Tanino, Takeshi Isobe and Tatsuyuki. Yamamoto
2 . 発表標題 Versatile properties of ZnO films and nanoparticles useful in nanomedical applications
3 . 学会等名 11th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Jie Lin, B. Urban, H. Tanada, K. Odawara, Y. Fujita, A. Neogi
2. 発表標題 Localized plasmonic nanostructures application in bio-imaging
3. 学会等名 11th International Symposium on Nanomedicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	Lin Jie (Lin Jie) (70756345)	島根大学・学術研究院理工学系・助教 (15201)	