

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間： 2007年 ～ 2008年
 課題番号：19300178
 研究課題名（和文） メディカルフォトンクスのための近赤外励起発光の応用
 研究課題名（英文） Application of Near-Infrared Fluorescence for Medical Photonics
 研究代表者 曾我公平（ソガコウヘイ）
 東京理科大学基礎工学部材料工学科・准教授
 研究者番号：50272399

研究成果の概要：

生体へのダメージが少なく、散乱が弱いために生体深部へ到達可能な近赤外光を励起光とした蛍光イムノアッセイ(LIA)とフォトダイナミックセラピー(PDT)のための材料開発を目指し、LIAのための UC 発光粒子の合成と表面修飾による粒子の分散安定性の付与、PEG-b-PAAc とストレプトアビジンの共固定による特異的吸着性の付与、PDTのための UC 発光粒子表面のシランカップリング剤による修飾とポルフィリン色素の導入およびチタン含有相の形成に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：アップコンバージョン、近赤外、フォトダイナミックセラピー、蛍光イムノアッセイ、希土類

1. 研究開始当初の背景

医療におけるフォトンクスの応用は、細胞や組織のイメージングをはじめとして診断や治療に渡って、近年その重要性の認識が高まっている。一般に医療に用いられるフォトンクスは、タンパクや蛍光色素といった有機系発光体を用いるために、紫外光から可視光において応用が進められており、特に励起光源としては紫外線が用いられることが多い。しかし、紫外線は波長が短いために散乱を起こしやすいばかりでなく、フォトンとして大き

なエネルギーを持つため、発光体そのものの光分解による退色や生体へのダメージなど、大きな問題をもたらす。我々は「蛍光バイオイメージング」を課題として、希土類含有無機発光微粒子と生体機能高分子を複合化(REC-PBP: Rare-Earth Doped Ceramic Phosphors Modified with Biofunctional Polymers)することにより、散乱が少ない、退色しない、バイオシステムにダメージを与えない近赤外励起蛍光バイオイメージングプローブの創成においてこれまで実績を上

げてきた。希土類イオンの離散的な準位を利用すると、近赤外(NIR)光で励起して可視光を発生することができるアップコンバージョン (UC) 発光や、高効率で発光する NIR 発光を得ることができる。また、発光体そのものは無機系のセラミックスであるため、長時間光照射を行っても退色することが無い。無機系発光体そのものは、バイオシステムで必要な標的への特異吸着性、非標的への非特異吸着の回避、生体液中での分散安定性の三要素を備えていない。従ってこれらの機能は、生体機能高分子による表面修飾により発光体に付与する必要がある。現在退色しにくい無機発光体としては量子ドットが主に用いられているが、この場合も紫外線を中心とする短波長光を励起光として照射するため、粒子の化学的耐久性を付与するための保護高分子と、上記の生体機能高分子が励起光により分解し、数十分で発光が損なわれてしまう。また、毒性の強い Cd を中心とした化合物が使用されていること、サイズにより発光波長が決まるため、極めて厳密な粒径と粒径分布の制御が必要なこと、表面の欠陥により簡単に退色してしまうことなどの様々な問題を抱えている。従って、REC-PBP を医療フォトニクスに応用し、発光のための励起光を、現在用いられている紫外・可視光から NIR 光にシフトすることにより、システムへの光毒性を排除し、医療における診断や治療へのフォトニクス応用において飛躍的に効率が向上することが期待される。また REC-PBP はでは発光体自体が局在系発光体なので上記の量子ドットが抱える様々な問題が一挙に解決することになる。本研究が対象とする医療フォトニクスは、蛍光免疫アッセイ (LIA) とフォトダイナミックセラピー (PDT) である。

これらの LIA や PDT をはじめとする医療フォトニクスにおいては、いずれも励起光として用いる紫外線や可視光の光毒性や強い散乱が問題となる。一方、近赤外域、特に 800nm~1500nm の領域は「生体の窓」と呼ばれ、水やヘモグロビンをはじめとする各種の有色物質などの生体中物質による光吸収が少ない波長域として知られている。近赤外線は紫外線や可視光に対して波長が長いために散乱されにくく、光子としてのエネルギーが小さいために物質へのダメージが少ない。従って、医療フォトニクスの励起光として近赤外光を用いることができれば、診断や治療における光毒性を軽減し、また退色を抑制できるために長時間の治療や診断が可能になる。

希土類イオンは種々の特徴的な発光が得られることから、これまでにレーザーや光通信における光増幅器などさまざまな近赤外発光に応用されてきている。研究代表者は長

年にわたり希土類含有蛍光体の研究に従事しており、近年は特に近赤外励起による可視光発光現象であるアップコンバージョン (UC) 発光や、近赤外励起による高効率近赤外発光の、バイオイメージングや三次元ディスプレイなどのイメージングデバイスへの応用を積極的に図っている。バイオイメージング応用においては希土類含有 UC 発光体に研究分担者と共同で高分子修飾を施し、生体環境での化学的耐久性と分散性の向上をもたせる実績を上げている。また研究分担者は、長年にわたっての生体機能性高分子の研究を、医療における診断に応用する研究において多くの実績がある。従って、本研究では研究代表者の近赤外励起蛍光体微粒子の設計と合成に関する研究実績と、研究分担者の生体高分子の医療応用の実績を融合することにより、医療フォトニクスへの近赤外励起蛍光の応用が実現することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では希土類含有セラミック微粒子発光体を生体機能高分子と複合化することにより、近赤外励起光を用いた LIA と PDT を実現することを目的とする。LIA については、希土類含有セラミック微粒子発光体を合成し、表面処理により生体環境での化学的耐久性と分散性と、抗体の導入による標識抗体としての機能付与を行った後、基板上に固定化した抗体に、抗原を反応させ、蛍光検出を行うことにより、UC による近赤外励起発光と近赤外通常蛍光を用いた LIA としての性能を評価する。また、PDT に関しては、UC を示す発光微粒子上にポルフィリンを結合させ、近赤外光照射による活性酸素の発生能を評価するとともに、生体機能高分子によるポルフィリン毒性の抑制効果について知見を得る。また、活性酸素発生源としてチタニア膜を UC を示す発光微粒子上に形成し、ポルフィリン毒性の心配の無い新たな PDT エージェントの開拓に取り組む。

3. 研究の方法

(1) LIA のための UC 発光粒子の合成と表面修飾

高い発光強度を示す希土類濃度を決定することを目的として種々の濃度で Er および Yb を共ドープした Y_2O_3 UC 発光粒子を作製し、980 nmLD 励起の UC スペクトルを測定し、発光強度を評価した。

さらに、 Y_2O_3 UC 発光粒子の生理環境下における化学的耐久性と分散安定性に対する高分子二重層形成の効果、塩酸性における粒子分散溶液の pH の時間変化と、疑似生理環境水溶液中における粒子の沈降測定により評価した。

(2) LIA のための UC 発光粒子表面への PEG-b-PAAc とストレプトアビジンの共固定

PEG-b-PAAc による Y_2O_3 UC 発光粒子への分散安定性の付与と、ストレプトアビジンのビオチンとの特異的相互作用の発現を目的として、PEG-b-PAAc とストレプトアビジンを共固定した Y_2O_3 UC 発光粒子を作製し、生理環境疑似水溶液における分散安定性、濃度を変化させたビオチンプレート上での粒子の UC 発光強度の変化を評価した (図 1)。

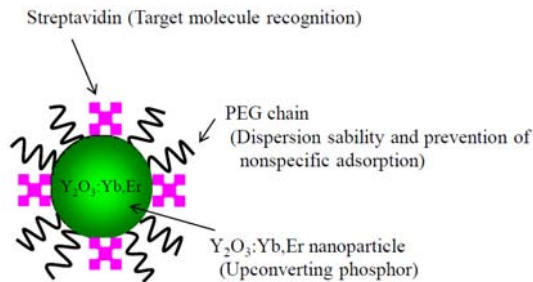


図 1. Y_2O_3 UC 場への PEG-b-PAAc とストレプトアビジンの共固定。

(3) PDT のための UC 発光粒子表面のシランカップリング剤による修飾とポルフィリン色素の導入

PDT において癌患部への集積と活性酸素の放出のために用いられるポルフィリンのうち、カルボキシル基を有する Ce6 を Y_2O_3 UC 発光粒子上にアミド結合により導入した。 Y_2O_3 UC 発光粒子上へのアミンの導入にはシランカップリング剤である APTES を用いた。得られた粒子について 980 nm 励起の UC 発光スペクトルとこれに基づく Ce6 の蛍光スペクトルを測定した。

(4) PDT のための UC 発光粒子表面へのチタン含有層の形成

TALH と PDPA の交互積層法により Y_2O_3 UC 発光粒子上へチタン含有層の形成を試み、光吸収スペクトルによりこれを評価した。

4. 研究成果

(1) LIA のための UC 発光粒子の合成と表面修飾

図 2 に Yb, Er ドープ Y_2O_3 UC 発光粒子の希土類濃度最適化実験の結果を示す。これにより

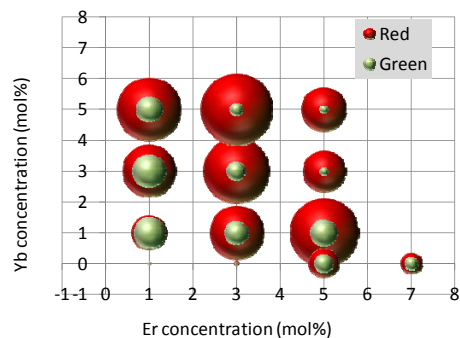


図 2. Yb, Er ドープ Y_2O_3 UC 発光粒子の希土類濃度最適化

3mol%Yb-1mol%Er において最も高い緑色発光強度が得られることがわかる。

Y_2O_3 UC 発光粒子への生理環境下での分散安定性と耐酸性の付与を狙った PAAc/PEG-b-PAMA による高分子二重層表面修飾の結果を図 3、図 4 に示す。

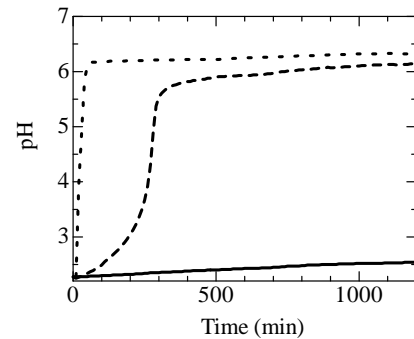


図 3. 3 mL の 0.05 M 塩酸投入後の pH の変化。点線は未修飾粒子、波線はポリマクリル酸修飾、実線は高分子二重層による修飾の場合。

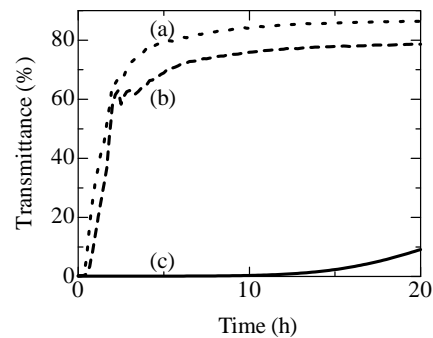


図 4. Y_2O_3 ナノ粒子を分散した疑似生理溶液における粒子沈降測定の結果。(a)は未修飾粒子、(b)はポリマクリル酸修飾、(c)は高分子二重層による修飾の場合(10 mM Tris buffer / 0.15 M NaCl, pH=7.4)。

図 3 から、塩酸性において溶解してしまう Y_2O_3 UC 発光粒子の耐酸性が高分子二重層の形成により大きく改善し、20 時間以上まったく溶解していないことが分かる。また、図 4 から高分子修飾を施さない Y_2O_3 UC 発光粒子は瞬時に凝集沈降するのに対し、高分子二重層修飾を施した粒子では、10 時間以上に渡ってイオン強度の高い生理疑似環境下で分散安定化していることが分かる。これらの結果より、PAAc/PEG-b-PAMA による高分子二重層表面修飾により、 Y_2O_3 UC 発光粒子の LIA や PDC への応用における必須条件である、化学的耐久性と分散安定性を高分子二重層表面修飾により実現することに成功した。

(2) LIA のための UC 発光粒子表面への PEG-b-PAAc とストレプトアビジンの共固定

図 5 に共固定を行った Y_2O_3 UC 発光粒子の SEM 観察結果を示す。修飾を行わない場合は

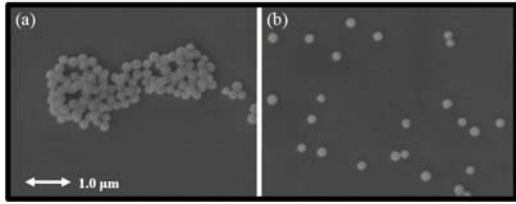
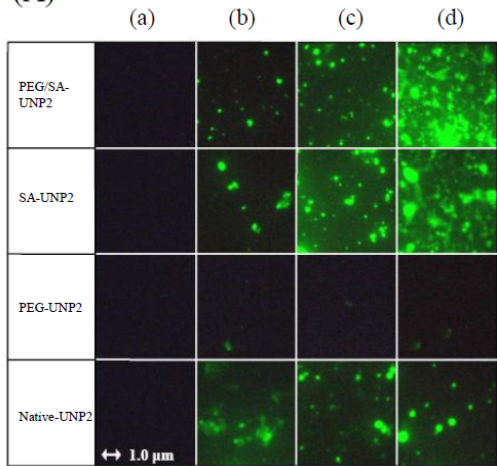


図5. 未修飾粒子と PEG-b-PAAc 修飾を施した粒子の SEM 像。

Biotinylated antibody plate

(A)



(C)

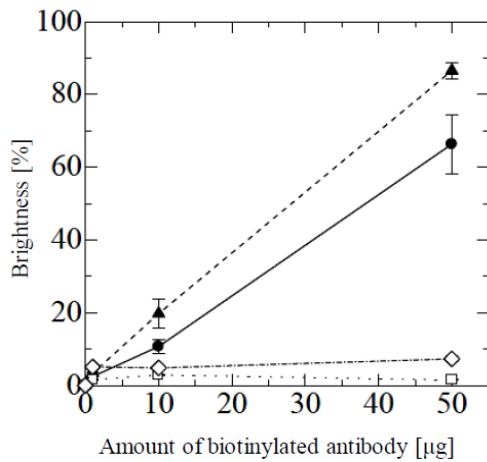


図6. PEG-b-PAAc とストレプトアビジンを共固定した Y_2O_3 UC 発光粒子の UC 蛍光プレートアッセイ。

粒子が互いに凝集しているのに対し、共固定を行った粒子では良好な粒子の分散状態が得られていることがわかる。また、図6に示した UC 蛍光プレートアッセイ実験では、固定したストレプトアビジンの効果により、プレート上に導入したビオチン量に比例した UC 発光強度が得られることと、共固定した粒子はほかのタンパク質を導入したプレート

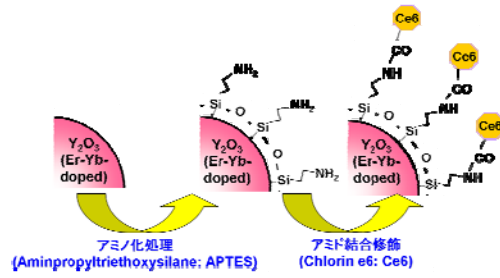


図7. ポルフィリンの UC 発光粒子上への修飾スキーム。

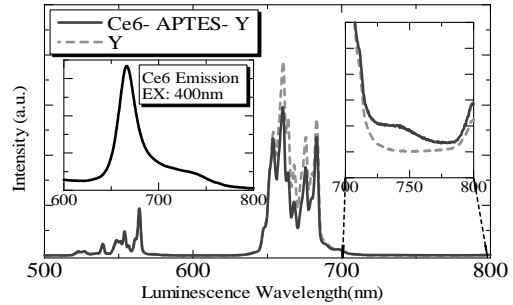


図8. Ce6 を導入した Er ドープ Y_2O_3 UC 発光粒子の 980 nm 励起発光スペクトル。

やブランクプレートには非特異的な相互作用を示さないことが分かった。

(3) PDT のための UC 発光粒子表面のシランカップリング剤による修飾とポルフィリン色素の導入

図7に示すように、アミノ基を有するシランカップリング剤である APTES とカルボキシル基を有するポルフィリンである Ce6 を順次修飾することにより、 Y_2O_3 UC 発光粒子上にポルフィリン色素を導入することに成功した。図8に示したのは、この粒子の 980 nm 励起の発光スペクトルである。UC 発光スペクトルに加え 980 nm 励起光で直接的に励起することができない Ce6 の発光が観測されており、これにより近赤外光により間接的に粒子上

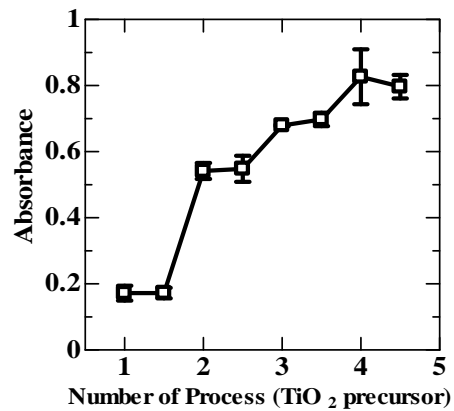


図9. TALH と PDDA の交互積層に伴う粒子分散液の 265nm 級光度の変化。

のポルフィリン分子である Ce6 を励起することに成功したと言える。

(4) PDT のための UC 発光粒子表面へのチタン含有層の形成

図 9 に TALH と PDDA の交互積層に伴う級光度の変化を示す。TALH の積層においては級光度が段階的に増大するのに対し、PDDA の積層では吸光度が増大しないことから、チタン含有層である TALH を段階的に Y_2O_3 UC 発光粒子に形成することに成功したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) 曾我公平・上村真生・長崎幸夫, "希土類含有セラミックスナノ粒子によるアップコンバージョン現象を利用した近赤外励起バイオイメージング," *応用物理*, **77** (2008) 1458-1461.
- 2) M. Kamimura, D. Miyamoto, Y. Saito, K. Soga, Y. Nagasaki, "Preparation of PEGylated upconversion nanophosphors with high dispersion stability under physiological conditions for near-infrared bioimaging," *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **33** (2008) 795-798.
- 3) Y. Saito, K. Shimizu, M. Kamimura, H. Furusho, K. Soga and Y. Nagasaki, "Plate assay by UC emission from Y_2O_3 : Er under near infrared excitation," *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **33** (2008) 803-806.
- 4) Tamotsu Zako, Hiroyasu Nagata, Naofumi Terada, Masafumi Sakono, Kohei Soga, Mizuo Maeda, "Improvement of dispersion stability and characterization of upconversion nanophosphors covalently modified with PEG as a fluorescence bioimaging probe," *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE*, **45** (2008) 5325-5330.
- 5) Masao Kamimura, Daisuke Miyamoto, Yu Saito, Kohei Soga and Yukio Nagasaki, "Preparation of PEG and Protein Co-immobilized Upconversion Nanophosphors as Near-infrared Biolabeling Materials," *JOURNAL OF PHOTOPOLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY*, **21** (2008) 183-187.
- 6) Masao Kamimura, Daisuke Miyamoto, Yu Saito, Kohei Soga and Yukio Nagasaki, "Design of Poly(ethylene glycol)/Streptavidin Coimmobilized Upconversion Nanophosphors and Their Application to Fluorescence Biolabeling," *LANGMUIR*, **24** (2008) 8864-8870.
- 7) Kohei Soga, Yu Saito, Kazuaki Shimizu, Yoshihito Okumura and Tomoya Konishi, "Application of Rare-Earth Doped Ceramic

Nanophosphors for Bioimaging under NIR Excitation," *Proceedings of Materials Science and Technology 2007*, (2007) 617-621.

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 【招待講演】曾我公平, '希土類含有セラミックスナノ粒子を用いた近赤外励起バイオイメージング,' 電気化学会第 76 回大会 (京都府京都市・京都大学, 2009 年 3 月 29 日~3 月 31 日).
- 2) 【ポスター】Yoshihito OKUMURA, Kosuke TSUJI, Nallusamy VENKATACHALAM, Kohei SOGA, 'Use of Phosphate Salt as a Sintering Inhibitor on Synthesis of Y_2O_3 Nanoparticles for Bioimaging,' 3rd International Symposium on Atomic Technology (ISAT-3)/3rd Polyscale Technology Workshop (PTW-3) (東京都江東区・国際交流館, 2009 年 3 月 5 日~3 月 6 日).
- 3) 【一般講演】奥村承士, 齋藤悠, 清水和明, 小西智也, 曾我公平, 'バイオイメージング用酸化イットリウムナノ粒子作製におけるリン酸塩の添加効果,' 第 47 回セラミックス基礎科学討論会 (大阪府大阪市・大阪国際会議場, 2009 年 1 月 8 日~1 月 9 日).
- 4) 【一般講演】Kohei Soga, Kimikazu Tokuzen, Yoshihito Okumura, Masao Kamimura and Yukio Nagasaki, 'Development of Nanophosphors for NIR Fluorescence Bioimaging,' 2008 MRS Fall Meeting (Boston, MA, USA, 2008 年 12 月 1 日~12 月 5 日).
- 5) 【ポスター】Y. Okumura, K. Tokuzen, N. Venkatachalam and K. Soga, 'Application of Rare-Earth Doped Ceramic Nanophosphors for NIR Biophotonics,' Kashiwa Symposium on Cancer Biology 2008 (Kashiwa, Chiba, Japan, 2008 年 11 月 14 日~11 月 14 日).
- 6) 【招待講演】曾我公平, '近赤外励起蛍光バイオイメージング用発光マーカーの開発ー生体にやさしいバイオイメージングを目指してー,' 第 57 回高分子討論会 (Osaka, Osaka, 2008 年 9 月 24 日~9 月 26 日).
- 7) 【一般講演】曾我公平, 奥村承士, 齋藤悠, 上村真生, 長崎幸夫, '希土類含有セラミックスナノ粒子による近赤外励起バイオイメージング,' 日本セラミックス協会第 21 回秋季シンポジウム (Kitakyushu, Fukuoka, Japan, 2008 年 9 月 17 日~9 月 19 日).
- 8) 【招待講演】Kohei SOGA, 'NIR Biophotonics by Rare-Earth Doped Nanophosphors Compositated with Biofunctional Polymer,' Materials Science and Engineering 2008 (MSE 08) (Nurnberg, Germany, 2008 年 9 月 1 日~9 月 4 日).

9) 【一般講演】Yoshihito OKUMURA, Yu SAITO, Kazuaki SHIMIZU, Ryunosuke KUNINOBU, Masao KAMIMURA, Kohei SOGA and Yukio NAGASAKI, 'Application of Rare-Earth Doped Yttrium Oxide for Fluorescence Bioimaging under NIR excitation,' The 15th International Conference on Luminescence and Optical Spectroscopy of Condensed Matter (ICL '08) (Lyon, France, 2008年7月7日~7月11日).

10) 【ポスター】K. Soga, Y. Saito, M. Kamimura and Y. Nagasaki, 'Ceramic Nanophosphors for Upconversion Bioimaging,' Nanotech2008 (Boston, MA, USA, 2008年6月1日~6月5日).

11) 【一般講演】曾我公平、奥村承士、齋藤悠、清水和明、永田浩康、座古保、前田瑞夫、上村真生、古性均、長崎幸夫, '希土類含有セラミックナノ粒子を用いた近赤外励起バイオフォトニクスインターフェースの開拓,' 第18回日本MRS学術シンポジウム(東京, 2007年12月7日~12月9日).

12) 【ポスター】齋藤悠, 清水和明, 曾我公平, 上村真生, 古性均, 長崎幸夫, ' $Y_2O_3:Er^{3+}$ の近赤外励起アップコンバージョン発光を利用した新規プレートアッセイ,' 第18回日本MRS学術シンポジウム(東京, 2007年12月7日~12月9日).

13) 【ポスター】上村真生、宮本大輔、長崎幸夫、齋藤悠、曾我公平, '蛍光バイオイメージングを目指した水中分散安定性の高いPEG 化アップコンバージョン発光ナノ粒子の調製,' 第18回日本MRS学術シンポジウム(東京, 2007年12月7日~12月9日).

14) 【招待講演】曾我公平, '近赤外光の蛍光バイオイメージングへの応用,' 第16回日本バイオイメージング学会学術集会(千葉県野田市・東京理科大, 2007年10月31日~11月2日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我 公平 (SOGA KOHEI)
東京理科大学・基礎工学部・准教授
研究者番号: 50272399

(2) 研究分担者

長崎 幸夫 (NAGASAKI YUKIO)
筑波大学・数理物質科学研究所・教授
研究者番号: 90198309

(3) 連携研究者

なし