

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310081

研究課題名(和文) 生体親和性蛍光ナノ粒子複合ビーズの創製と評価

研究課題名(英文) Preparation and characterization of biocompatible composite beads with fluorescent nanoparticles

研究代表者

磯部 徹彦 (ISOBE, Tetsuhiko)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：30212971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：SPG膜乳化法と架橋剤であるトリポリリン酸イオンとの静電的相互作用による架橋法を組み合わせて、キトサンビーズを作製する条件を検討した。次に、緑色に発光するYAG:Ce³⁺ナノ粒子および赤色に発光するEu³⁺ドーパアパタイトナノ粒子を、キトサンビーズに複合化することを検討した。また、Eu³⁺ドーパアパタイトナノ粒子とシリカビーズとの複合化と、YAG:Ce³⁺ナノ粒子とアルギン酸ビーズとの複合化も検討した。

研究成果の概要(英文)：Preparation of chitosan beads by cross-linking method through electrostatic interaction with tripolyphosphate ions, combined with emulsification method using SPG membrane was studied. Next, hybridizations between green-emitting YAG:Ce³⁺ nanoparticles and chitosan beads, and between red-emitting Eu³⁺-doped apatite nanoparticles and chitosan beads were studied. Hybridizations between Eu³⁺-doped apatite nanoparticles and silica beads, and between YAG:Ce³⁺ nanoparticles and alginate beads were also studied.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：蛍光ナノ粒子 生体親和性 複合ビーズ

1. 研究開始当初の背景

CCD カメラの高感度化・高速化の普及に伴い、生化学研究や医療の分野において、『蛍光』を検出端とした分析方法が急速に注目されている。蛍光顕微鏡の進歩が進む一方、蛍光物質は従来の蛍光有機色素が用いられているが、励起光の連続照射により色素が光分解して蛍光が著しく減衰すること、励起・蛍光のスペクトルの大きな重なりのために、励起光の迷光を蛍光として検出しやすいことなどが、蛍光有機色素の問題点と挙げられている。

1990年代後半から蛍光無機ナノ粒子を生化学分野へ応用する手法に関する研究が米国で開始された。とりわけ、CdSe/ZnS コア/シェル型半導体ナノ粒子(量子ドット)が重点的に検討された結果、①高い耐光性、②シャープな蛍光スペクトル、③単一波長励起による多波長の蛍光などの特性が生化学分野で優位であることが示された。量子ドットの特徴を活かした例としては、オタマジャクシ胚の長期間にわたる細胞分裂を蛍光で追跡観察した研究(B. Dubertert et al. *Science* 298 1759-1762 (2002))や、異なった蛍光波長を持つ量子ドットプローブを利用して、各波長の蛍光強度から複数の毒素を同時に定量した研究(E. R. Goldman et al. *Anal. Chem.* 76 684-688 (2004))があげられる。また、マトリックス粒子中に量子ドットを分散させ、蛍光強度をオプティカルコードとして利用する手法(M. Han et al., *Nature Biotechnol.*, 19, 631-635 (2001))が開発された。これらは蛍光ナノ粒子を用いた生体分子のイメージングやセンシングの分野を切り開いた。量子ドットは販売され、生化学の分野で利用されるようになってきたが、一方で構成元素であるCdの溶出が懸念されるため、ポリマーやシリカなどで表面を被覆し低毒化を図っている。しかし、Cdは毒物に指定されているため、実験後の後処理が問題となる。これを解決するために、CuInS₂ (K. Nose et al., *Chem. Mater.*, 21, 2607-2613 (2009))やZnS-AgInS₂固溶体(T. Torimoto et al., *Chem. Commun.*, 46, 2082-2084 (2010))などの半導体蛍光ナノ粒子の液相合成が検討されている。

上記の有機色素の問題点を解決するために、研究代表者は、青色発光ダイオードと組み合わせた白色固体照明へ応用実績のあるY₃Al₅O₁₂:Ce³⁺ (YAG:Ce³⁺)蛍光体に着目した。YAG:Ce³⁺は青色の可視光で励起でき、黄緑色の蛍光を発生し、毒物元素を含まないので、ナノサイズ化の合成手法と、生化学分野への応用を検討してきた(Kasuya et al., *J. Phys. Chem. B*, 109, 22126-22130 (2005); Kasuya et al., *J. Alloy. Compd.*, 408-412, 820-823 (2006); Asakura et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 1641-1647 (2006); Asakura et al., *J. Lumin.*, 127, 416-422 (2007))。通常、YAG:Ce³⁺は、工業的には、原料を混合し、

1000°C以上の高温で焼成して生産する。しかし、このような高温での固相法で粒子径をミクロンサイズ以下にすることは困難である。研究代表者の研究室では、压力容器を用いてグリコール溶媒中で300°Cという低温で液相合成するソルボサーマル法(グリコサーマル法)によって、粒子径約10nmのYAG:Ce³⁺ナノ粒子を合成することに成功した。YAG:Ce³⁺ナノ粒子の特徴として、励起と発光の過程は、発光イオンであるCe³⁺のd-f許容遷移であるために高発光効率であり、毒物元素を含まず、青色光で励起することができるため、紫外線による励起と比較して細胞に与えるダメージが少ないことがあげられる。多くの研究者が量子ドットの研究に集中する中で、研究代表者は独自の考えのもと、蛍光ナノ粒子を発展させてきた。

研究代表者は、自らによって開発したYAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子が正に帯電していることに着目し、静電的な引力を用いた交互吸着法によって、YAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子と負電荷を有するポリメタクル酸メチル(PMMA)マイクロビーズを複合化することを検討してきた(Asakura et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, 46, 5193-5195 (2007))。その成果により、YAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子を均一に複合化する手法を確立している。さらに、YAGナノ粒子をコアに用いるとYAGと同じガーネット構造を有するY₃Fe₅O₁₂(YIG)磁性ナノ粒子がシェルとしてグリコサーマル法によって合成できるので、同様の交互吸着法を適用してコア/シェル型(YAG/YIG)磁性ナノ粒子とYAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子を順次複合化させ、磁性と蛍光のデュアル機能を持ち合わせた複合ビーズを作製することに成功している。

2. 研究の目的

これまでのところ、有機色素の代替材料としてYAG:Ce³⁺無機ナノ蛍光体を用いて、静電的な相互作用によってPMMAマイクロビーズへ複合化させる手法で成果を上げてきた。一方、この手法の問題点として、ビーズ表面にしか蛍光ナノ粒子を導入できないことがあげられる。また、さらに蛍光ナノ粒子を複合化したビーズをバイオ応用へ広く展開していくためには、PMMAよりも生体親和性の高いマトリックス材料を利用することが求められる。このような点から、本研究ではマトリックス材料としてキトサンに着目した。その理由は、キトサンはカニやエビなどの甲殻類の外骨格から得られるキチンを濃アルカリ中での煮沸処理等により脱アセチル化して得られるので、つまり、生物資源由来の原料より生産されるため、資源の枯渇の心配がなく、医療分野にすでに応用され、形状の制御も可能であるからである。本研究では、キトサンからマイクロサイズのビーズを作製し、さらに、キトサンビーズと蛍光ナノ粒子を複合化させることを検討した。また、キトサン以外に、アルギン酸やシリカのビーズに関し

でも検討した。

生体親和性の高いビーズ原料と組み合わせる蛍光体材料についても毒性のきわめて低い材料を検討した。そして、上述の YAG:Ce³⁺ 以外に、人工骨として生体応用に実績があり、親水性の高いリン酸化合物であるアパタイトを取り扱った。

3. 研究の方法

(1) キトサンビーズの作製

5 wt%酢酸水溶液にキトサンを溶解させて種々の濃度のキトサン水溶液（水相）を作製した。一方、4 wt%の界面活性剤を含む流動パラフィンと石油エーテルの混合液（油相）を作製した。水相を窒素ガスで加圧して Shirasu porous glass (SPG) 膜を通して油相に押し出し、W/O エマルションを作製した。続いて W/O エマルションにトリポリリン酸ナトリウム (TPP) 水溶液を加えてキトサンビーズを得た。

(2) キトサンビーズと YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合化

①オートクレーブに酢酸イットリウム四水和物、酢酸セリウム一水和物およびアルミニウムイソプロポキシドを投入し、あらかじめ Ar ガスバブリングした 1,4-ブタンジオールとジエチレングリコール混合溶媒を加えた。その後、オートクレーブの装置内を Ar ガスで置換した。300 rpm 攪拌しながら、300°C まで昇温し、2 h 保持した。得られたコロイド溶液試料に、99%メタノール変性アルコールを加えて遠心分離と洗浄を 3 回行った。得られた試料を 50°C で一日送風乾燥した。

②次の 2 つの方法で YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子をキトサンビーズと複合化させた。キトサンビーズの作製過程において、TPP 水溶液を添加する前に YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子の水分散液を加えて複合ビーズ A を得た。また、作製したキトサンビーズを水に分散させ、YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子の水分散液を加えて複合ビーズ B を得た。

(3) キトサンビーズと HMP 被覆 Eu³⁺ ドープアパタイト (HAp:Eu³⁺) 蛍光ナノ粒子との複合化

硝酸カルシウム(II)四水和物、硝酸ユロピウム(III)六水和物を超純水に溶解させ、溶液 a とした。2-アミノエタノールリン酸(AEP)を超純水に溶解させ、溶液 b とした。リン酸水素二アンモニウムを超純水に溶解させ、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 c とした。溶液 a を溶液 b に加え、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 d とした。溶液 d を溶液 c に加え、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 e とした。溶液 e を室温で 15 min 攪拌した後 100°C、振動速度 60 回 min⁻¹ のインキュベーター内で 16 h 熟成させ、AEP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子分散液を得た。この分散液を透析により精製したのち、得られたゲ

ルをヘキサメタリン酸 (HMP) 水溶液に再分散させ、凍結乾燥して HMP 被覆 HAp:Eu³⁺ ナノ粒子粉末試料を得た。

石油エーテル、流動パラフィンおよび界面活性剤を含む連続相に、分散相となるキトサンの酢酸水溶液を、SPG 膜を通して加えて乳化させた。得られたエマルションに架橋剤として TPP 水溶液を滴下し、キトサンビーズを得た。キトサンビーズ作製時の TPP 水溶液に HMP 被覆 HAp:Eu³⁺ ナノ粒子粉末を加えて複合ビーズ C を得た。また、洗浄後のキトサンビーズに HMP 被覆 HAp:Eu³⁺ ナノ粒子分散液を添加して複合ビーズ D を得た。

(4) シリカビーズと AEP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合化

硝酸カルシウム(II)四水和物、硝酸ユロピウム(III)六水和物を超純水に溶解させ、溶液 a とした。2-アミノエタノールリン酸(AEP)を超純水に溶解させ、溶液 b とした。リン酸水素二アンモニウムを超純水に溶解させ、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 c とした。溶液 a を溶液 b に加え、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 d とした。溶液 d を溶液 c に加え、アンモニア水で pH 9.5 に調整し、溶液 e とした。溶液 e を室温で 15 min 攪拌した後 100°C、振動速度 60 回 min⁻¹ のインキュベーター内で 16 h 熟成させ、AEP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子分散液を得た。透析後、得られたゲル状の試料を凍結乾燥し、AEP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子粉体試料を得た。

シリカビーズは Stöber 法により合成した。エタノールにアンモニア水を加え、攪拌しながらテトラエトキシシラン (TEOS) を加え、さらに 30°C で 2 h 攪拌した。その後、遠心分離・洗浄の操作を 3 回行った。

HAp:Eu³⁺ ナノ粒子の合成過程にシリカビーズを導入し、複合粒子をその場合合成した。あらかじめ作製したシリカビーズを超純水に分散させ、pH 9 に調整した。硝酸カルシウム、硝酸ユロピウム(III)、リン酸水素二アンモニウム、AEP からなる HAp:Eu³⁺ 前駆体溶液をシリカビーズ分散液と混合し、室温で 15 min 攪拌したのち、100°C で 16 h 熟成させた。得られた溶液を遠心分離し、洗浄操作を 3 回行った。

続いて、あらかじめ作製した HAp:Eu³⁺ ナノ粒子とシリカビーズを静電的に吸着させて複合粒子を作製した。pH = 9 において、シリカビーズのゼータ電位は -18.9 mV、HAp:Eu³⁺ ナノ粒子のゼータ電位は +32.4 mV で、両者の符号は異なっていた。pH 9 に調整したシリカビーズ水分散液と HAp:Eu³⁺ ナノ粒子水分散液をマイクロチューブに加え、1 h 振とうした。得られた混合液を遠心分離し、洗浄操作を 3 回行った。なお、どちらの作製法に関しても、SiO₂ 1 mol に対し HAp:Eu³⁺ 投入量または理論生成量が 1.6~400 mmol となるように実験を行った。

(5) アルギン酸ビーズと YAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子との複合化

酢酸緩衝液にアルギン酸ナトリウムを溶解させた水溶液（水相）を作製した。一方、界面活性剤を含む流動パラフィンと石油エーテルの混合液（油相）を作製した。水相を窒素ガスで加圧して SPG 膜を通して油相に押し出し、W/O エマルションを作製した。続いてこのアルギン酸ナトリウムの W/O エマルションに、あらかじめ調製した塩化カルシウムの W/O エマルションを加えてアルギン酸ビーズを得た。また、アルギン酸ナトリウムの W/O エマルションに、あらかじめ調製した YAG:Ce³⁺ナノ粒子の W/O エマルションと塩化カルシウムの W/O エマルションを加えて複合ビーズを得た。

4. 研究成果

(1) キトサンビーズの作製

水相中のキトサン濃度を検討したところ、5 wt%で図 1 に示すような球状ビーズを作製することができた。5 wt%のキトサン濃度ではエマルションのサイズに近いビーズを得ることができ、図 2 に示すように、使用した SPG 膜の孔径サイズにしたがって、作製したビーズのサイズも変化した。TPP 添加量については、キトサンのアミノ基と TPP のリン酸基が 1:1 の比率で球状のビーズが得られ、TPP の割合が少ないと球状ではないビーズも生成した。

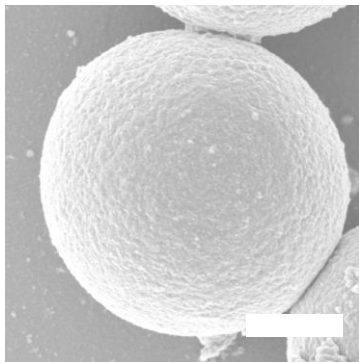


図 1 キトサンビーズの SEM 写真。（バーの長さ：5 μm）

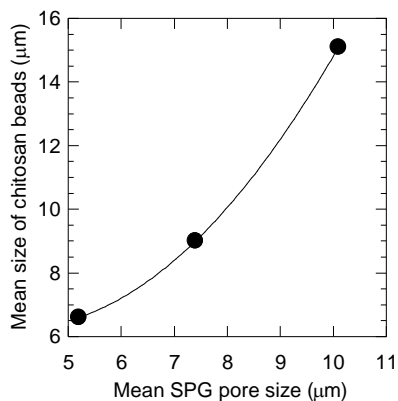


図 2 SPG 膜の孔径とキトサンビーズのサイズとの関係。

(2) キトサンビーズと YAG:Ce³⁺蛍光ナノ粒子との複合化

複合ビーズ A では、SEM 画像（図 3 (a)）から、キトサンビーズの表面に YAG:Ce³⁺ナノ粒子がまばらに被覆している様子が観察された。また、複合ビーズ A の断面の SEM 観察および元素マッピングから、ビーズ内部に YAG:Ce³⁺ナノ粒子が内包されていることが明らかにされた。

複合ビーズ B では、SEM 画像（図 3 (b)）から YAG:Ce³⁺ナノ粒子がキトサンビーズ表面を完全に被覆している様子が観察された。複合ビーズ B の断面の SEM 観察および元素マッピングから、ビーズ内部に YAG:Ce³⁺ナノ粒子は内包されていなかった。吸着時の pH におけるビーズおよびナノ粒子のゼータ電位は両者共に正の値を示すことから、両者は静電的な相互作用により吸着しているのではなく、ビーズを構成するキトサンの NH₂ 基が YAG:Ce³⁺の金属イオンに配位結合または吸着水を介して水素結合したものと推察される。

複合ビーズ A および B の蛍光顕微鏡観察より、YAG:Ce³⁺による緑色の蛍光が観測された。複合ビーズ A の蛍光は複合ビーズ B に比べて強かった。これは、複合ビーズ A では YAG:Ce³⁺ナノ粒子がビーズ表面と内部に含有しており、YAG:Ce³⁺含有量が多いことに起因する。これは、蛍光 X 線による元素分析の結果からも裏付けられた。

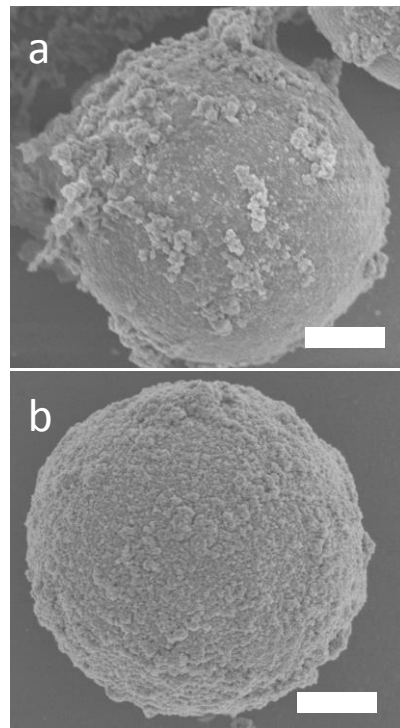


図 3 複合ビーズ A (a) と複合ビーズ B (b) の SEM 写真。（バーの長さ：5 μm）

複合ビーズ B では凝集した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の吸着も見られたが、正に帯電しているキトサンビーズに負に帯電している PSS (Poly(sodium 4-styrenesulfonate)) を被覆した後、正に帯電している YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を被覆させたところ、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子がより均一にキトサンビーズへ吸着することが明らかにされた。

(3) キトサンビーズと HMP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合化

HMP 被覆前後での HAp:Eu³⁺ ナノ粒子のゼータ電位の符号は正から負へ反転した。これはナノ粒子を被覆する AEP が HMP で被覆されたことを裏付ける。また、HMP 被覆 HAp:Eu³⁺ ナノ粒子は、凍結乾燥しても TPP 水溶液に再分散することができた。

光学顕微鏡画像より、複合ビーズ C、D ともに粒子径は、用いた SPG 膜の孔径に近いサイズであった。蛍光顕微鏡画像ではキトサンビーズ、複合ビーズともに同等の赤色蛍光が観察され、HAp:Eu³⁺ ナノ粒子の蛍光強度の増強などが今後の課題として残された。

(4) シリカビーズと AEP 被覆 HAp:Eu³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合化

シリカ粒子、HAp:Eu³⁺ ナノ粒子および複合粒子の XRD プロファイルより、どちらの複合方法でも SiO₂ による非晶質のハローと HAp による結晶ピークが観測され、SiO₂ と HAp の複合化を確認した。また、蛍光 X 線によって複合粒子の組成を調べたところ、HAp 投入量 1.6 ~ 80 mmol の範囲で、Ca/(Ca+Si) 比は HAp 投入量にほぼ比例して増加し、複合方法の違いによって HAp 複合量に差は見られなかった。

図 4 (a) に示すように、シリカビーズは粒子径 287 ± 18 nm の球状粒子であった。その場合成により作製した複合粒子を SEM 像で観察したところ、HAp 投入量 1.6 mmol の試料では、粒子径約 67 ± 12 nm の HAp:Eu³⁺ 球状粒子がシリカ表面を不均一に被覆していた。これより、シリカ表面の一部のみが核生成サイトとして機能したと推察される。この原因として、シリカ表面での HAp の核生成よりも、すでに生成した HAp 表面での結晶成長が優先的に起こるためと考えられる。HAp 投入量 160 mmol の試料(図 4 (b))では HAp が大きく成長し、シリカ同士を架橋して凝集した。

静電的な吸着によって作製した複合粒子の SEM 観察から、HAp 投入量 1.6 mmol の試料では、シリカ表面全体を HAp:Eu³⁺ ナノ粒子が均一に被覆した。また HAp 投入量を 160 mmol に増加しても(図 4 (c))、均一な被覆は維持され、凝集していなかった。静電的な相互作用による複合化を行っているため、シリカ表面の局所的な電荷を中和するように HAp がまんべんなく吸着し、シリカ表面全体に均一に被覆すると考えられる。

複合粒子は赤色の蛍光を示した。HAp にドープされた Eu³⁺ は ⁷F₀ → ⁵L₆ 遷移により波長 394

nm の光を吸収して ⁵D₀ → ⁷F₂ 遷移により波長 614 nm の赤色の光を発する。Eu³⁺ の遷移は禁制であり、その遷移による蛍光は弱い。HAp:Eu³⁺ ナノ粒子をシリカ表面に集積することによって総蛍光強度を増加させることができたものと考えられる。

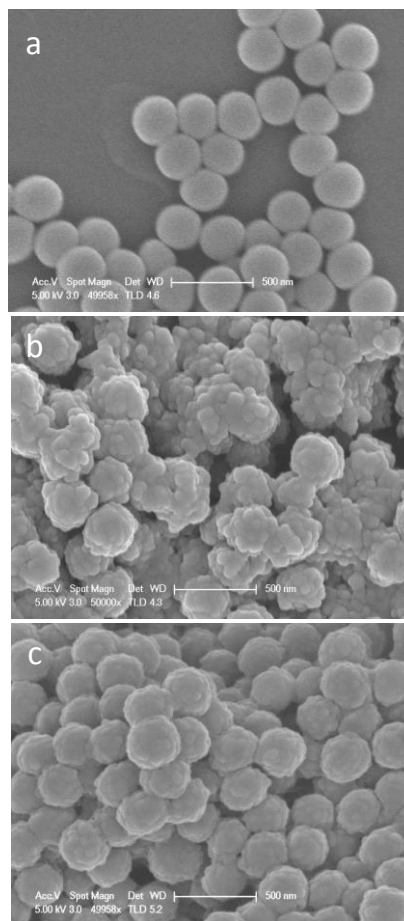


図 4 SEM 写真. (a) シリカビーズ, (b) その場合成複合ビーズ, (c) 静電的吸着複合ビーズ (バーの長さ: 500 nm)

(5) アルギン酸ビーズと YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合化

アルギン酸のカルボキシル基と Ca²⁺ イオンとの静電的な相互作用により、ゲル状のアルギン酸ビーズが得られた。アルギン酸ビーズの蛍光顕微鏡画像より、アルギン酸による自家蛍光は見られなかった。複合ビーズは YAG:Ce³⁺ からの蛍光を発することが観測された。すなわち、YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子はアルギン酸ビーズと複合化したことが示された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tetsuhiko Isobe, Satoru Takeshita, Preparation of Fluorescent Composite Beads with Nanophosphors, International Symposium for Phosphor

Materials & Crystal Growth (Phosphor Safari 2013) (招待講演), 2013 年 10 月 20 日, Jeju, Korea

- ② 木田亜矢子、竹下覚、磯部徹彦、キトサンと YAG:Ce³⁺ 蛍光ナノ粒子との複合形態のデザイン、第 51 回セラミックス基礎科学討論会、2013 年 1 月 10~11 日、仙台国際センター (宮城県)

[その他]

ホームページ

<http://www.applc.keio.ac.jp/~isobe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 徹彦 (ISOBE Tetsuhiko)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 30212971

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし