

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655138

研究課題名(和文) 蛍光画像法に利用する『発光色が可変可能な』ナノ粒子ライブラリーの構築

研究課題名(英文) Development of Non-toxic and Luminescent Nanoparticles for Bioimaging

研究代表者

白幡 直人 (Shirahata, Naoto)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：80421428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子間相互作用をリアルタイム観察するための『生体分子を接合した環境ナノ粒子ライブラリー』を世界に先駆けて創り出すことに成功した。ナノ粒子は蛍光およびリン光を放射するナノ粒子で、発光波長は300 - 2000nmの非常に広い波長域で発光色を連続的に制御することに成功した。これらナノ粒子の表面を有機単分子などの表面制御技術を通じて変性することで、油溶性および水溶性ナノ粒子を創りだし、生体内外での蛍光イメージングにも成功した。全てのナノ粒子は細胞毒性も低いという優れた特徴を有していた。また蛍光特性に加えドラッグデリバリー機能をもつマルチタスク型のナノ粒子合成にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We successfully synthesized luminescent and non-toxic nanoparticles for precise monitoring of biomolecular interaction events. The tuning range of emission covers over 300-2000 nm of NUV-VIS-NIR region by choosing the nanoparticles in which the structures (size, phase, composition) are carefully controlled. Control over the nanoparticle surfaces provides the water solubility, and subsequently leads to the success of in-vivo and in-vitro biomonitoring by taking advantage of luminescence from the nanoparticles. All of nanoparticles are non-toxic.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：生体ラベリング 蛍光標識 リン光標識 ドラッグデリバリー シリコン ゲルマニウム 蒼鉛 ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

医療・創薬の最先端研究において、in-vitro における試験研究はもとより、細胞や生体内をリアルタイムに観察することも、生命機能を理解するために重要な役割を担っている。もともと in-vivo イメージングは、遺伝子や蛋白質が生体内のどこで・どのように働いているかをモニタリングし、そして解析する「生体分子イメージング」技術の発展とともに急速に広まってきた画像化法である。生体分子の複雑な挙動を可視化するには蛍光を用いるイメージング技術が汎用的であり、とくに、生体透過性の高い近赤外光を利用したイメージング法は、生体深部の観察が可能のため、疾病研究や薬剤開発における in-vivo 画像化法の中核となりつつある。

発光素材としては、in-vitro 用には可視波長域で蛍光を示す有機色素や化合物半導体ナノ粒子、近赤外波長域では有機色素やレアアースイオンを内包した(シリカ)カプセル、カーボンナノチューブ、化合物半導体ナノ粒子が候補あるいは実際に使用されているが、有機物に特有の高退色性は長時間のモニタリングやトレース研究には不向きであり、カーボンナノチューブの「針状形状」がもたらす生体毒性の可能性は払拭できない。さらにレアアースの代替化は喫緊に解決すべき重要課題となっていた。

## 2. 研究の目的

このような研究背景に基づき、生体毒性のない元素で構成される発光ラベル材の開発が要求される。ラベル材への応用を考える際には、2つの波長域での使用を検討する必要がある。第1は、In-vitro および表皮近傍でのラベリングである。これには可視発光するラベル材が好適である。第2に外科的処置なく In-vivo イメージングを行うためには、生体組織による吸収および散乱が小さい波長域(=700-1500nm)で発光する材料が使用される。特に生体浅部では700-1000nmに発光ピークをもつラベル材でも用を足す。しかしながら生体深部で利用するには、1000-1500nmの近赤外域における高生体透過性が要求される。In-vivo におけるそれぞれの波長域を第1および第2の生体光学窓と呼ぶ。本研究では、これら3つの波長域でそれぞれ使用可能な発光体群を開発することを目的とした。各々について詳細を次に示す。

1) IV 属元素のなかでもシリコン(Silicon, Si) やゲルマニウム(Germanium, Ge)は、生体や環境にとって無毒である。そして炭素、窒素、酸素と化学結合を形成可能な(=有機物と親和性の高い希有な)無機素材である。それぞれのバルクバンドギャップ 1.1 eV および 0.7 eV を考慮すると、連続的に制御可能と考えられる波長域は、0.3 - 1 $\mu$ m 程度であるので、In-vitro や表皮(外科的処置を考慮すると生体浅部を含む)で利用できる蛍光体を提供できると期待される。

2) ビスマス(Bismuth, Bi)は、整腸剤などの医薬品の原料として広く使われる卑金属である。ビスマス化合物は、他の窒素族元素(ヒ素やアンチモン)の化合物で見られるような毒性がない点で、本研究を進める素材として適当である。ビスマスをイオンの状態で安定化させると近赤外波長域で発光することが知られているが、そのメカニズムや発光波長可変などはあまり深く研究されておらず、生体ラベルへの応用もない。Bi系化合物により、生体浅部-生体深部(波長にして1000-1500nm)で利用できる蛍光プローブを提供できると期待される。

本研究課題は、生体に無毒元素種で構成される画像診断技術に最適な発光体をこれらの元素を用いて開発し、さらにこれら素材に特定の蛋白質を選択的に認識する生体プローブを搭載した『近紫外-近赤外発光ナノ粒子ライブラリー』を提供することで、生命現象の解明と次世代医療の発展に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

IV 族ナノ粒子およびビスマス系ナノ粒子の合成と発光特性評価を中心に研究を進めた。これら合成研究と平行して、In-vitro および In-vivo 環境下における蛍光法画像診断プロセスの構築を行った。画像診断プロセスの構築は時間制約の都合により、あらかじめ発光特性が明らかになっているレアメタルドープ系の蛍光体をモデルに用いて行った。

### 3-1. IV 属ナノ粒子の合成・分析・解析

Si および Ge ナノ粒子の合成は、液相レーザアブレ-ションを用いて行った(特願2009-037746)。後述するが、この方法では近赤外発光するナノ粒子を作製できなかった。それゆえ近赤外波長域で発光するナノ粒子を作製するためには新しい方法を開発する必要があった。鋭意研究を進めたところ、Ge に関して新しい湿式合成方法を開発することに成功した。合成条件を精密化することで1280nm 付近の近赤外で発光する Ge ナノ粒子を作製することに成功した。これらのナノ粒子の構造を明らかにし、光吸収・放射特性を評価した。

### 3-2. Bi を内包するナノマテリアルの合成と近赤外発光特性

Bi クラスターを適切なフレームワーク中に内在、安定化することで第2の生体光学窓である1-1.5 $\mu$ m 域で発光を導ける。本研究では、フレームワークとしてゼオライト、テトラクロロアルミニウムアニオン、テトラクロロガリウムアニオンなどを用いた。ゼオライトフレームワークでは  $Bi_n$  ( $n=1-4$ ) のクラスター状態で内在させた。テトラクロロアルミニウムアニオンおよびテトラガリウムクロライドアニオンのフレームワーク内では、 $Bi_5^{3+}$  あるいは  $Bi_3^{3+}$  の状態で内在させた。これらのナノマテリアルの構造を明らかにし、光吸収・放射特性を評価した。

### 3-3. 細胞毒性分析

細胞毒性分析は In-vitro 環境で、MTT 試験を通じて行った。分析評価のモデルにはビスマスドープアルミノシリケート/シリカ コア/シェルナノ粒子およびメソポーラス  $Gd(OH)CO_3 \cdot H_2O:Eu$  を用いた。

### 3-3. 生体外バイオイメーシング

In-vitro イメーシングには、ヒトがん細胞のモデルとして有名な HeLa 細胞が用いられた。In-vitro イメーシングは2種類のサンプルで行った。メソポーラス  $Gd(OH)CO_3 \cdot H_2O:Eu$  および  $\beta-NaGdF_4/Nd^{3+}@NaGdF_4/Tm^{3+}-Yb^{3+}$  コア/シェルのナノ粒子が蛍光標識に使用された。特に後者を用いたイメーシングでは、ダウンコンバージョンに加えてアップコンバージョンのイメーシングも行われた。

### 3.4. 生体内バイオイメーシング

In-vivo イメーシングの標識としてはビスマスドープアルミノシリケート/シリカ コア/シェルナノ粒子を用いた。当該粒子溶液をマウスの頸部に皮下注射し、生体内イメーシングを行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. IV 属ナノ粒子<sup>1-3,5-6,8-9,12,16-18,22)</sup>

ゲルマニウムのナノ粒子構造を適切に制御することで、近紫外 - 可視 - 近赤外における蛍光発光を連続的に制御することに成功した。蛍光発光色を制御する上で最も重要な因子は粒子径であり、およそ 5nm のサイズをもつナノ粒子放射される蛍光の発光波長は 530nm の可視緑色であった。これより大きなサイズに粒子径を制御することで発光波長は、可視長波長 - 近赤外域として記述される 565 - 1250nm の間で連続的に制御することが可能であった。逆に、1 - 5nm の粒子径を精密に制御することで 350 - 500nm の近紫外 - 可視短波長に蛍光極大を有する発光を放射させることが可能であった。

シリコンのナノ粒子構造を精密に制御することで変調可能となる蛍光発光の波長は、300 - 1060nm であった。Ge に比べて粒子径制御範囲は狭く発光色のコントロールは容易でなかった。例えば、ダイヤモンド構造結晶で制御可能な発光色は、緑 - 近赤外域である波長にして 530 - 1060nm であったが、これを達成するには、粒子径を 1.5 - 4nm の間で精密に制御する必要があった。面白いことに近赤外の発光量子収率は Ge よりも格段に高かった。可視短波長域における発光色制御は、ナノ粒子のサイズと相に強く依存するので、合成時に創り分けることは容易でなく、合成後の精製過程において発光色ごとに分離する方が簡便であった。同じようなことがゲルマニウムについても言えた。

ナノ粒子表面へメチル基を導入することで油性、アミノ基やカルボキシル基を導入することで水溶性を付与できた。バイオアレイ上での生体分子認識にも成功した。

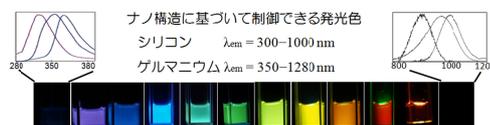


図 1. 連続的に制御可能な蛍光色の例

### 4-2. ビスマスドープナノ粒子<sup>4,10-11,13-15,21,25)</sup>

ビスマスクラスタを構成する Bi 原子数と価数、さらにクラスタを安定化させるフレームワークの構造により、発光波長を 1 - 2μm の範囲で制御できることが分かった。例えば、ゼオライトをフレームを持つ場合の発光波長は  $Bi^+ = 1050nm$ ,  $Bi_2^{2+} = 1135nm$ ,  $Bi_3^{3+} = 1145nm$ ,  $Bi_4^{4+} = 1240-1285nm$  であった。また、 $AlCl_4$  アニオン中に Bi クラスタカチオンを内在させた場合、 $Bi_8^{2+}(AlCl_4^-)_2$  は 1180nm に蛍光極大を有するが、 $Bi_5^{3+}(AlCl_4^-)_3$  のスペクトルはレッドシフトした。一方で、フレームワーク素材を  $GaCl_4$  アニオンに変えた場合、発光スペクトルは 1900nm にまで大きくレッドシフトした。また、 $(K-Crypt)_2Bi_2$  単結晶においては、1050 - 1350nm の範囲で発光を連続的に制御できた。

### 4-3. In-vitro バイオイメーシング<sup>7,19-20,23)</sup>

ランタノイド酸化物粒子  $Gd_2O_3$  に Eu をドープすることで蛍光標識機能を付与した。さらに  $Gd_2O_3:Eu$  ナノ粒子をメソポーラス化することでドラッグデリバリー機能を付与することに成功した。このナノ粒子はドラッグをがん細胞へリリースしている様子をモニタリングできるという特徴を提供する。

In-vivo モニタリングに向けては、水の吸

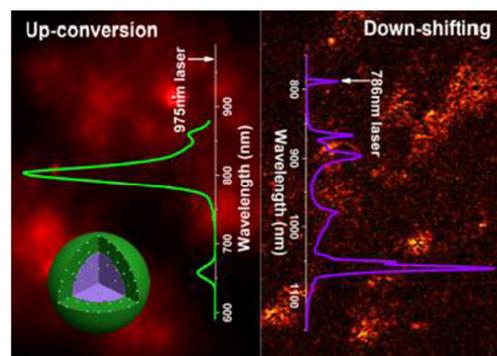


図 2. アップコンバージョンを利用した近赤外 - 近赤外イメーシングの実現

収波長である 1μm および NIR 波長域における生体の自己蛍光を避けることが重要である。そのような困難を解決するには、近赤外で励起して可視 / 近赤外境界の波長域で蛍光を導くアップコンバージョン特性を利用することが望ましく、本研究では、新しいラベル材である  $\beta-NaGdF_4/Nd^{3+}@NaGdF_4/Tm^{3+}-Yb^{3+}$  コア/シェルナノ粒子の合成に成功した。さらに、図 2 に示すように、当該ナノ粒子がアップコンバージョン特性を示すことを実証した。

### 4-4. In-vivo バイオイメーシング<sup>24)</sup>

ビスマスドーピングしたアルミノシリケート/シリカ コア/シェルナノ粒子を蛍光ラベル材にした。コロイド分散液にしてマウスの頸部に皮下注射した。ナノ粒子中の励起キャリア遷移のダイナミクスを時間分解分光により分析することで、本素材が生体内モニタリング用のラベル材として有用かどうか調べた。生体組織の自己蛍光は 1 $\mu$ sec 以下の非常に早い寿命で減衰するが、当該ナノ粒子の寿命はミリ秒オーダーと非常に長いために生体内での時間分解分光法適用に都合がよい。一般的に近赤外で利用できる色素や半導体量子ドットは希少であるが、その希少なラベル材においても蛍光寿命は生体組織と同じ 1 $\mu$ sec 以下であるため、ラベル材として好適と言えない。本研究で開発した msec オーダーの長寿命ラベル材は、生体内での時間分解分光を可能にした点が特徴的である。

#### 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 25 件)

1. B Ghosh, M Ogawara, Y Sakka, N Shirahata, “Reductant-Free Colloidal Synthesis of NIR Emitting Germanium Nanocrystals: Role of Primary Amine”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (2014) 2204-2210 <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.8546> 査読有
2. B. Ghosh, N. Shirahata, “Colloidal Silicon Quantum Dots: Synthesis and Tuning the Emission in the Ranging from near-UV through Visible to near-IR”, *Science and Technology of Advanced Materials* 15 (2014) 014207 (1-14) 査読有 [10.1088/1468-6996/15/1/014207](http://dx.doi.org/10.1088/1468-6996/15/1/014207)
3. N. Shirahata, “Monolayer Formation of Luminescent Germanium Nanoparticles on Silica Surface in Aqueous Buffer Solution”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (2014) 2640-2643 査読有 <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.8640>
4. H. T. Sun, Y. Sakka, N. Shirahata, Y. Matsushita, K. Deguchi, T. Shimizu, “NMR, ESR and Luminescence Characterization of Bismuth Embedded Zeolites Y”, *Journal of Physical Chemistry C* 117 (2013) 6399-6408 [10.1021/jp401861c](http://dx.doi.org/10.1021/jp401861c) 査読有
5. N. Shirahata, D. Hirakawa, Y. Masuda, Y. Sakka, “Size-Dependent Color-Tuning of Efficiently Luminescent Germanium Nanoparticles”, *Langmuir* 29 (2013) 7401-7410 査読有 [10.1021/la303482s](http://dx.doi.org/10.1021/la303482s)
6. B. Ghosh, Y. Sakka, N. Shirahata, “Efficiently Green-Luminescent Germanium Nanocrystals”, *Journal of Materials Chemistry A* 1 (2013) 3747-3751 査読有 [10.1039/c3ta01246h](http://dx.doi.org/10.1039/c3ta01246h)
7. J. Zhou, N. Shirahata, H. Sun, B. Ghosh, M. Ogawara, Y. Teng, S. Zhou, S. C. R. Gui, M. Fujii, J. Qiu, “Efficient Dual-Modal NIR-to-NIR Emission of Rare-earth Ions Co-doped Nanocrystals for Biological Fluorescence Imaging”, *Journal of Physical Chemistry Letters* 4 (2013) 402-408 査読有 [10.1021/jz302122a](http://dx.doi.org/10.1021/jz302122a)
8. N. Shirahata, “Emission Color Tuning of Ge Nanoparticles in the Ranging from UV through Visible to near-IR”, 査読有 MRS Symposium Proceedings 1551 (2013) 1-7 <http://dx.doi.org/10.1557/opl.2013.1020>
9. 白幡直人「環境低負荷型 LED 素子を指向したゲルマニウム蛍光体の調製」レーザー加工学会誌 Vol. 20, No. 3 (2013) 189-191 <http://yutori.neet-system.com/naid/40019916538> 査読有
10. H. Sun, Y. Sakka, N. Shirahata, M. Fujii, T. Yonezawa, “Near-Infrared Photoluminescence from Molecular Crystals Containing Tellurium”, *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 24792-24797 査読有 [10.1039/C2JM34988D](http://dx.doi.org/10.1039/C2JM34988D)
11. H. Sun, T. Yonezawa, M. M. Gillett-Kunnath, Y. Sakka, N. Shirahata, S. C. R. Gui, M. Fujii, S. C. Sevov, “Ultra-broad Near-infrared Photoluminescence from Crystalline (K-crypt)<sub>2</sub>Bi<sub>2</sub> Containing [Bi<sub>2</sub>]<sup>2-</sup> Dimers”, *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 20175-20178 査読有 [10.1039/c2jm34101h](http://dx.doi.org/10.1039/c2jm34101h)
12. B. Ghosh, M. Ogawara, Y. Sakka, N. Shirahata, “White-light Emitting Liquefiable Si Nanocrystals”, *Chemistry Letters* 41 (2012) 1157-1159 査読有 [10.1246/cl.2012.1157](http://dx.doi.org/10.1246/cl.2012.1157)
13. H. Sun, B. Xu, T. Yonezawa, Y. Sakka, N. Shirahata, M. Fujii, J. Qiu, H. Gao, “Photoluminescence from Bi<sub>5</sub>(GaCl<sub>4</sub>)<sub>3</sub> Molecular Crystal”, *Dalton Transactions* 41 (2012) 11055-11061 査読有 [10.1039/C2DT31167D](http://dx.doi.org/10.1039/C2DT31167D)
14. H. Sun, Y. Sakka, N. Shirahata, H. Gao, T. Yonezawa, “Experimental and Theoretical Studies of Photoluminescence from Bi<sub>8</sub><sup>2+</sup> and Bi<sub>5</sub><sup>3+</sup> stabilized by [AlCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in Molecular Crystals”, *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 12837-12841 査読有 [10.1039/C2JM30251A](http://dx.doi.org/10.1039/C2JM30251A)
15. H. Sun, Y. Matsushita, Y. Sakka, N. Shirahata, M. Tanaka, Y. Katsuya, H. Gao, K. Kobayashi, “Synchrotron X-ray, Photoluminescence and Quantum Chemistry Studies of Bismuth Embedded Dehydrated Zeolite Y”, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 2918-2921 [10.1021/ja211426b](http://dx.doi.org/10.1021/ja211426b) 査読有
16. N. Shirahata, “A New Family of Light Emitting Si Nanoparticles”, 査読有 MRS Symposium Proceedings 1437 (2012) 1-7



- 2012 [招待講演]
14. 白幡直人「ゲルマニウムナノ粒子の発光色制御技術」第77回レーザ加工学会講演会 大阪大学 大阪 2012. 5/24 - 25 [招待講演]
  15. N. Shirahata, "Efficient Light Emission from Group IV Nanoparticles", Australian/MANA workshop on "Nanoarchitectonics for Innovative Materials & Systems", National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan May 10-11, 2012 [招待講演]
  16. N. Shirahata, "Bandgap Engineering in Group IV Nanoparticles: Tuning the Color of Efficient Luminescence", 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan, January 24-27, 2012 [招待講演]
  17. N. Shirahata, "Colloidal Synthesis of Efficiently Luminescent Group IV Semiconductor Nanoparticles", International Association of Colloid and Interface Scientists 2012, Sendai International Center, Sendai, May 13-18, 2012
  18. N. Shirahata and Tooru Tsuruoka, "A New Family of Light Emitting Si Nanoparticles", 2012 MRS Spring Meeting, Moscone West Convention Center in San Francisco, CA, Apr. 9-13, 2012
  19. N. Shirahata, "Bandgap engineering: A new family of color-tunable light emitting Si nanocrystals with high quantum yields", MANA International Symposium 2012, Tsukuba International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Japan 29th Feb - 2nd Mar, 2012
  20. 白幡直人、平川大悟、目義雄「有機溶媒中でのレーザーアブレーションによるゲルマニウムナノ粒子の調製・高効率発光」日本セラミックス協会 2012 年 年会 京都大学 2012/03/19 - 21
  21. N. Shirahata, "Functional Surface Chemistry for Efficient Light Emission from Silicon", BIT's 1st Annual World Congress of Nano-S&T, World EXPO Center, Dalian, China, October 23-26, 2011 [招待講演]
  22. N. Shirahata, "Size Tunable Fluorescence Emission and Efficient Radiative Recombination in Group IV Nanoparticles", The Nineteenth Annual International Conference on COMPOSITES/NANO ENGINEERING (ICCE-19), Shanghai, China, July 24-30, 2011 [招待講演]
  23. 白幡直人、平川大悟、目義雄『レーザー化学合成法による高輝度 Ge ナノ粒子の調製』第60回高分子学会年次大会 大阪国際会議場 大阪 2011.05.25-27 [招待講演]
  24. 平川大悟、白幡直人、目義雄「紫外 - 可視で発光波長を可変可能な Ge ナノ粒子

- の調製」第63回コロイド及び界面化学討論会 京都大学 2011/09/07 - 09
25. 白幡直人、平川大悟、目義雄「環境低負荷型ナノ粒子からの高輝度発光」日本セラミックス協会第24回秋季シンポジウム 北海道大学 2011/09/07 - 09

〔図書〕(計 3 件)

1. 白幡直人他、丸善出版、油脂・脂質・界面活性剤データブック、2012、613-615 ISBN: 978-4-621-08611-7
2. Naoto Shirahata, et al., INTECH Nanofabrication, 2011, 217-242 ISBN 978-953-307-912-7
3. Naoto Shirahata, et al., American Scientific Publishers, Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology 2nd Edition Vol. 20, 2011, 369-378 ISBN: 1-58883-169-8

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

- 名称: ゲルマニウムナノ粒子蛍光体及びその製造方法  
 発明者: 白幡直人/平川大悟/目義雄  
 権利者: 物質・材料研究機構  
 種類: 特許  
 番号: 2011-239933  
 出願年月日: 平成 23 年 11 月 01 日  
 国内外の別: 国内

- 名称: 緑色発光ゲルマニウムナノ粒子及びその製造方法  
 発明者: 白幡直人  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 2013-018245  
 出願年月日: 平成 25 年 02 月 01 日  
 国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

- 名称: 有機分子膜被覆ナノ粒子の製造方法  
 発明者: 白幡直人/目義雄  
 権利者: 独立行政法人物質・材料研究機構  
 種類: 特許  
 番号: 特許登録第 5540307 号  
 取得年月日: 2014 年 5 月 16 日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕ホームページ等

[http://samurai.nims.go.jp/SHIRAHATA\\_Naoto-j.html](http://samurai.nims.go.jp/SHIRAHATA_Naoto-j.html)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 白幡 直人 (Shirahata, Naoto)  
 独立行政法人物質・材料研究機構  
 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・  
 独立研究者  
 研究者番号: 80421428
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし