

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360276

研究課題名(和文) バイオフォトンクスのためのセラミックス発光ナノ粒子の発光特性と生体内挙動評価

研究課題名(英文) Biodistribution and Luminescent Properties of Ceramic Nanoparticles for Biophotonics

研究代表者

曽我 公平 (SOGA, Kohei)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：50272399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：粒径制御を施したセラミックスナノ粒子に表面修飾を行い、OTN近赤外in vivoイメージングによる静脈注射後の粒子のマウス体内分布を解析した結果、血中単分散表面処理を施した60nmの粒子では24時間以上血中を滞留するのに対し、100nm以上の粒子は15秒程度で細網内皮系に捕獲されることがわかった。また、一部の粒子では15分程度は血中滞留するものの、1時間後には肝臓や脾臓に蓄積され始めることがわかった。これは、静脈投与当初は表面のPEGにより単分散していた粒子が、血中で高分子が離脱することにより徐々に凝集するためであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ceramic nanoparticles with size control were surface-modified with biofunctional polymers. The suspension of the particles was injected through tail vein to be observed by OTN-NIR in vivo imaging system to trace the behavior of the nanoparticles in mice body. The particles with 60 nm size circulated in the blood vessel for at least 24 hrs while those with more than 100 nm were trapped by RES within 15 sec. In some case, they can circulate for the 15 min, though eventually after 1 hr, they are trapped by the RES. In this case, initially well modified the biofunctional polymers on the particle surface eventually detached to cause the agglomeration of the particles. The results suggest that the next step of the research to form firmer surface modification is important.

研究分野：材料工学

キーワード：バイオイメージング 近赤外 蛍光 希土類 セラミックス ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

生体内における物質や細胞、組織の分布を動的に可視化する蛍光バイオイメージングは、バイオテクノロジー分野における研究ツールとして、また医療における予防・診断・治療において不可欠な技術である。これまでの蛍光バイオイメージングは、主に蛍光色素、蛍光タンパク質、量子ドットが蛍光体として、可視光領域の蛍光を用いて行われてきた。しかし可視蛍光を発するためには一般に励起光として紫外線や短波長可視光の照射が不可欠であり、その高い量子エネルギーにより色素が数秒で退色すること、短い波長により生体深部へ励起光が到達しないことが主な問題であった。これらの理由により近年の蛍光バイオイメージングは長波長化が進んでおり、現在市場化されているバイオイメージングシステムの最新のものではインドシアニングリーンや量子ドットを蛍光体とした900nm蛍光によるバイオイメージングが話題を呼んでいる。一方、生体内における光の透過性を考えると、1000nmを超える波長(over-1000-nm 近赤外: OTN-NIR)の蛍光を用いたほうがはるかに高い透過性を期待できる。この波長域は生体の窓と呼ばれ、その有用性は長年にわたり主張されてきたが、観察に用いる CCD カメラが約 1000 nm を限界とするシリコン CCD であったため実現されることがなかった。ところが近年、800 から 1700 nm の OTN-NIR 波長域で観察が可能な InGaAs-CCD が市場化され、話題を呼んでいる。申請者らは世界に先駆けて希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNP)を蛍光プローブ化することにより、980 nm の励起光による 1550 nm 蛍光を用いた OTN-NIR バイオイメージングに世界で初めて成功した。[曾我 公平, バイオマテリアル - 生体材料 -, 29 (2011) 95-103.; K. Soga et al., Proc. SPIE, 7598 (2010) 759807.]. 実際この波長では図 3 に示すように筋肉組織を通して 2 cm 以上の深部の観察が可能であり、その有用性の実証により OTN-NIR バイオイメージングは世界的な注目を集めつつある。

申請者らは蛍光プローブの開発とともに細胞や組織を観察するための OTN-NIR マイクロバイオイメージングシステムと、小動物を生きたまま観察する OTN-NIR in vivo 蛍光イメージング(IFBI)システムの開発を進め、後者は我が国初の最先端イメージング機器として島津製作所より申請者らとの共同開発成果として世界に先駆けて発売されることとなった。

申請者らは RED-CNP として Yb や Er をドープした Y₂O₃ について均一沈殿法、酵素を用いた沈殿法により 20~500 nm の範囲で粒径と形状を制御して合成する方法を確立し(N. Venkatachalam, K. Soga et al., J. Am. Ceram. Soc., 92 (2009) 1006.他)、また、凝集傾向の強い RED-CNP に対しポリアクリル酸ブロックポリエチレングリコール(PEG-b-PAAc)を修

飾することにより立体反発による分散と耐酸性を付与する方法;(T. Konishi, K. Soga et al., J. Photopolym. Sci. and Tech., 20 (2007) 11.他)、焼結せずに前駆体の熱処理を可能にする方法(K. Soga et al., J. of Phys. Conf. Ser., 191 (2009) 012003.), 高い塩濃度の水溶液中で分散状態で高分子を修飾する方法(特許願 JP2011/054976)を確立している。さらにはリポソームに包含した RED-CNP をマウスに投与し、その挙動の OTN-NIR-IFBI による観察を行った(K. Soga, H. Hyodo, H. Kishimoto et al., Eur. J. Inorg. Chem., 2010 (2010) 2673.). これら OTN-NIR バイオイメージングを我が国初の技術としてさらに普及させ、世界的なリードを維持するためには、蛍光体として用いている RED-CNP の発光特性制御、生体内挙動の解明が、形状と粒径が制御されたセラミックスナノ粒子の合成技術の開発とともに急務かつ不可欠である。しかし、セラミックスナノ粒子の発光強度と粒径の研究には、一般に圧粉体による発光強度測定が用いられ、この方法では粒径による充填密度の相違や光散乱の相違の影響を除去できず、各粒子の発光強度の評価を粒径に対して系統的に比較した検討例はこれまでに報告されていない。また、マウスの体内における RED-CNP の挙動の解析についても、同一の形状、同一の表面修飾状態で比較検討した例は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、RED-CNP として Yb/Er ドープ Y₂O₃ ナノ粒子をこれまでに申請者らが確立した合成法により 20~500 nm で作製し、PEG-b-PAAc 修飾により分散安定化した状態で蛍光顕微鏡下で粒子 1 個当たりの発光強度を観察するという独自の方法で RED-CNP の粒径と発光強度の系統的關係を明らかにするとともに、それぞれの分散安定化した RED-CNP をマウスに投与し、独自開発装置である OTN-NIR-IFBI 装置を用いて蛍光イメージングを行うことにより、RED-CNP のマウス体内における挙動を、系統的に変化させた粒径を軸として解析することを目標とした。

3. 研究の方法

3 年間の本研究において、初年度は比較的ハンドリングが容易な 100~500 nm の粒径において、その発光特性とマウス体内の動態についての評価方法を確立しつつ、100 nm 未満の粒径の RED-CNP 分散体の安定かつ高効率な合成プロセスの確立を行った。二年度目には前年度に確立した合成方法と評価方法を用いて 100 nm 未満の粒径の RED-CNP について発光特性の評価とマウス体内の動態観察を行った。三年度目には 20~500 nm の波長域において得られた発光特性とマウス動態の系統的な知見の学術的な解釈を目的として、イメージングの結果の解析を行った。

4. 研究成果

初年度は、これまでに作製方法が確立している 100 ~ 500 nm の粒径の希土類含有酸化イットリウム粒子を兵藤が中心となって合成し、曾我が蛍光強度と粒径の関係、岸本が粒径によるマウス体内の動態について解析を行った。この結果、蛍光波長である 1550 nm よりもはるかに小さいこの粒径の範囲では、蛍光強度は界面における光散乱や試料への光の侵入長の影響を受けず、ほぼ粒径の三乗、すなわち体積に比例する発光強度を示すことが明らかになった。これは我々独自の近赤外蛍光顕微鏡と FE-SEM の組み合わせを用いた粒径と蛍光強度の評価法により初めて明らかになった事実である。また、作製した粒子をマウスに尾静脈投与し、OTN-NIR in vivo イメージングシステムで観察したところ、200 nm 以上の粒径の粒子はマクロファージに強く認識されて 15 秒以内に肝臓や脾臓に蓄積されるのに対し、100 nm で表面修飾により単分散性を担保した粒子は、数時間以上マウスの血中を滞留することが明らかになった。

一方、これまでに作製方法は提案されつつも分散安定化した粒子が得られていなかった 20 ~ 100 nm の粒径の希土類含有酸化イットリウム粒子については、焼成温度と分散方法の工夫により、水溶液中での分散安定化に成功し、次年度の研究に備えることができた。さらに、近赤外顕微鏡観察システムの照明強度の増大を図った結果、50 nm 程度の蛍光強度の評価が可能なレベルでシステムを高感度化することができた。

二年度目には 100 nm 未満の粒径の RED-CNP として NaYF_4 を母材とするエルビウムドーパナノ粒子を一次粒径 20nm、二次粒径 60nm でリン酸バッファー中で単分散状態で得ることに成功した。この粒子をマウスの血中に投与して動態観察を行ったところ、粒子表面へホリン脂質 PEG の導入により血中滞留時間は伸びるが投与後細網内皮系に捕獲されることが分かった。一方、PEI をキャッピング剤として用い、表面にポリアクリル酸 PEG を導入した 60nm の粒子は数日間血中を滞留することから、上記リン脂質 PEG を用いたナノ粒子からは、導入した PEG が血中で脱離していると想定される。

最終年度にはセラミックナノ粒子である RED-CNP のマウス体内における挙動を総括した。まず、単分散状態を保證するために強固に PEG 修飾を行った RED-CNP では、60nm 以下の粒径では細網内皮系の認識を免れ、数日にわたって血中を滞留するのに対し、100nm 以上の場合は 15 秒以内に細網内皮系に捕獲され、肝臓、脾臓が明るい蛍光を示し、血管からの蛍光は観察されなくなることが分かった。60 ~ 100nm ではこの中間的な挙動を示す。一方、プローブ開発上の重要事項として、一般に安定と考えられている粒子表面修飾法を用いた場合でも、血中を滞留するうちにイオンやタンパク質と相互作用し、表面

修飾に用いた高分子が離脱することで凝集し、細網内皮系に捕獲されてしまうことが明らかになった。今後、表面高分子の離脱挙動の解明と離脱防止法の開拓が望まれる。

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 14 件)

- 1) 曾我公平, “セラミックナノ粒子を起点とした OTN 近赤外パイオイメージングシステムの開発,” *JOURNAL OF THE JAPAN SOCIETY OF COLOUR MATERIAL*, **88** (2015) 13-16(査読有)[<http://doi.org/10.4011/shikizai.88.13>]
- 2) Tamotsu Zako, Miya Yoshimoto, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto, Masaaki Ito, Kazuhiro Kaneko, Kohei Soga, Mizuo Maeda, “Cancer-targeted near infrared imaging using rare earth ion-doped ceramic nanoparticles,” *BIOMATERIALS SCIENCE*, **3** (2015) 59-64(査読有)[DOI: 10.1039/c4bm00232f]
- 3) Eva Hemmer, Fiorenzo Vetrone and Kohei Soga, “Lanthanide-based nanostructures for optical bioimaging: Small particles with large promise,” *MRS BULLETIN*, **39** (2014) 960-964(査読有)[DOI: 10.1557/mrs.2014.223]
- 4) Yoshinori Kondo, Hiroshi Takemura, Hiroshi Mizoguchi, Kohei Soga, Hidehiro Kishimoto, Kazuhiro Kaneko, “Development of Wide Wavelength Range Transparent Image Detection Device System by Head-Scanning Mechanism,” *Proceedings of The 9th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering*, (2014) 132-(査読有)[<http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-12262-5?no-access=true>]
- 5) Masayuki Watanabe, Hiroshi Takemura, Hiroshi Mizoguchi, Hiroshi Hyodo, Kohei Soga, Tamotsu Zako, Hidehiro Kishimoto, Masaaki Ito, Kazuhiro Kaneko, “Development of Novel Endoscope with NIR camera Using Real-time Composite Method,” *Proceedings of The 15th International Conference on Biomedical Engineering*, (2013) 123-131(査読有)[<http://www.springer.com/us/book/9783319029122>]
- 6) Nallusamy Venkatachalam, Tomoyoshi Yamano, Eva Hemmer, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto, Kohei Soga, 'Er³⁺-Doped Y₂O₃ Nanophosphors for Near-Infrared Fluorescence Bioimaging Applications,' *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, (2013) 1-7(査読有)[10.1111/jace.12476]
- 7) Eva Hemmer, Nallusamy Venkatachalam, Hiroshi Hyodo, Akito Hattori, Yoshie Ebina, Hidehiro Kishimoto and Kohei SOGA, 'Upconverting and NIR Emitting Rare Earth based Nanostructures for NIR-Bioimaging,'

NANOSCALE, 5 (2013) 11339-11361(査読有)[10.1039/C3NR02286B]

8) 曾我公平, “近赤外励起ナノ蛍光体のバイオメディカルイメージング応用,” *YAKUGAKU ZASSHI-JOURNAL OF THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN*, **133** (2013) 355-367(査読有)[<http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.12-00239-2>]

9) Eva Hemmer, Tomoyoshi Yamano, Hidehiro Kishimoto, Nallusamy Venkatachalam, Hiroshi Hyodo, Kohei Soga, “Cytotoxic aspects of gadolinium oxide nanostructures for up-conversion and NIR bioimaging,” *ACTA BIOMATERIALIA*, **9** (2013) 4734-4743(査読有)[<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.045>]

10) E. Hemmer, I. Kumakiri, N. Lecerf, R. Bredsen, S. Barth, J. Altmayer, N. Donia, C. Cavelius, K. Soga and S. Mathur, “Nanostructured ZrO₂ membranes prepared by liquid-injection chemical vapor deposition,” *MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS*, **163** (2012) 229-236(査読有)[<http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.06.057>]

11) 曾我公平, “バイオイメージングのためのセラミックスナノ粒子,” *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan*, **19** (2012) 493-499 (査読有) [<http://www.simj.jp/topics/search/frame.html>]

12) Eva Hemmer, Hiroyuki Takeshita, Tomoyoshi Yamano, Takanori Fujiki, Yvonne Kohl, Karin Low, Nallusamy Venkatachalam, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto and Kohei Soga, “*in vitro* and *in vivo* investigations of upconversion and NIR emitting Gd₂O₃:Er³⁺, Yb³⁺ nanostructures for biomedical applications,” *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE*, **23** (2012) 2399-2412(査読有) [10.1007/s10856-012-4671-x]

13) Kohei Soga, Kimikazu Tokuzen, Keisuke Fukuda, Hiroshi Hyodo, Eva Hemmer, Nallusamy Venkatachalam, Hidehiro Kishimoto, “Application of Ceramic/Polymer Conjugate Materials for Near Infrared Biophotonics,” *JOURNAL OF PHOTOPOLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY*, **25** (2012) 57-62(査読有) [<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/photopolymer>]

14) Nallusamy Venkatachalam, Eva Hemmer, Tomoyoshi Yamano, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto, Kohei Soga, “Synthesis and toxicity assay of ceramic nanophosphors for bioimaging with near-infrared excitation,” *PROGRESS IN CRYSTAL GROWTH AND CHARACTERIZATION OF MATERIALS*, **58** (2012) 121-134(査読有) [10.1016/j.pcrysgrow.2012.02.002]

〔学会発表〕(計 45 件)

国際学会招待講演

1) 【招待講演】Masao Kamimura, Kohei Soga, “Biofunctional polymer modification on ceramic nanophosphors for near-infrared biophotonics,” 39th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites (Hilton Daytona Beach Resort and Ocean Center, Daytona Beach, Florida, USA, 2015 年 1 月 25 日 ~ 1 月 30 日).

2) 【招待講演】Kohei SOGA, Nallusamy Venkatachalam, Masao Kamimura, “Materials Design for OTN (over 1000 nm) Near Infrared Biomedical Imaging as a Next Generation Deeper Small Animal Fluorescence Imaging,” XIII Annual Meeting of the Brazilian Materials Research Society (Jo?o Pessoa-PB, Brzil, 2014 年 9 月 28 日 ~ 10 月 2 日).

3) 【招待講演】Masao Kamimura, Kohei Soga, “Biofunctional Polymers for Application of Ceramic Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging,” 2014 Japan-Taiwan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2014) (Hsinchu, Taiwan, 2014 年 9 月 12 日 ~ 9 月 15 日).

4) 【招待講演】Kohei SOGA, Nallusamy VENKATACHALAM, Masao KAMIMURA, “OTN (over 1000 nm) NIR FLUORESCENCE BIOIMAGING PROBES BY USING RARE-EARTH DOPED CERAMIC NANOPARTICLES,” XXIII INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS 2014 (Cancun, Mexico, 2014 年 8 月 17 日 ~ 8 月 21 日).

5) 【招待講演】Kohei SOGA, Masao KAMIMURA, “Nano-Layered Structure on Rare-Earth Doped Ceramic Nanophosphors (RED-CNP) for Bioimaging,” The 7th International Conference on Technological Advances of Thin Films & Surface Coatings (Thin Films 2014) (Chongqing, China, 2014 年 7 月 15 日 ~ 7 月 18 日).

6) 【招待講演】Kohei SOGA, “Application of Ceramic Nanoparticles for OTN-NIR Fluorescence Bioimaging,” 7th International Powder Metallurgy Conference and Exhibition (Gazi University, Ankara, Turkey, 2014 年 6 月 24 日 ~ 6 月 28 日).

7) 【招待講演】Eva Hemmer, T. Yamano, H. Kishimoto, F. Vetrone, F. Logar, Kohei Soga, “Ln³⁺-Doped Gd₂O₃ Nanostructures for NIR-NIR Bioimaging,” 38th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites (ICEACC 2014) (Hilton Daytona Beach Resort and Ocean Center, Daytona Beach, Florida, USA, 2014 年 1 月 26 日 ~ 1 月 31 日).

8) 【招待講演】Kohei SOGA, N. Venkatachalam,

E. Hemmer, "Nanostructured Materials and Nanocomposites for OTN-NIR Small Animal Fluorescence Imaging," 38th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites (ICEACC 2014) (Hilton Daytona Beach Resort and Ocean Center, Daytona Beach, Florida, USA, 2014年1月26日~1月31日).

9) 【招待講演】Kohei SOGA, "Materials development for OTN-NIR small animal fluorescence bioimaging," International Conference in Asia - 2013 (IUMRS-ICA 2013) (Indian Institute of Science, Bangalore, India, 2013年12月16日~12月20日).

10) 【招待講演】Kohei SOGA, "Fluorescent probe development for over-1000-nm near infrared (OTN-NIR) fluorescence in-vivo bio imaging," International Conference on PROCESSING & MANUFACTURING OF ADVANCED MATERIALS (THERMEC"2013) (Rio Hotel, Las Vegas, NV, USA, 2013年12月2日~12月6日).

11) 【招待講演】Kohei SOGA, "Rare-earth Doped Ceramic Nanoparticles for NIR Biophotonics," Materials Science and Technology 2013 (MS&T"13) (Palais des congrès de Montreal, Montreal, Canada, 2013年10月27日~10月31日).

12) 【招待講演】Eva Hemmer, Kohei Soga, Hidehiro Kishimoto, Francois Logar, Fiorenzo Vetrone, "Upconverting and NIR-emitting Gadolinium-based Nanostructures for Bioimaging," Materials Science and Technology 2013 (MS&T"13) (Palais des congrès de Montreal, Montreal, Canada, 2013年10月27日~10月31日).

13) 【招待講演】Hiroshi Hyodo, Tamotsu Zako, Miya Yoshimoto, Hidehiro Kishimoto, Hiroshi, Takemura, Masaaki Ito, Kazuhiro Kaneko, Kohei Soga and Mizuo Maeda, "Development of new cancer therapy system using over-1000 nm near infrared (OTN-NIR) fluorescent nanophosphors," 2013 JAPAN-TAIWAN SYMPOSIUM ON POLYSCALE TECHNOLOGIES FOR BIOMEDICAL ENGINEERING AND ENVIRONMENTAL SCIENCES (PT-BMES 2013) (Oshamambe Campus, Tokyo University of Science, Oshamambe, Hokkaido, Japan, 2013年9月7日~9月10日).

14) 【招待講演】Kohei SOGA, "Fluorescent Agents for OTN-NIR Fluorescence Bioimaging," 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2013) (Suntec Singapore, Singapore, 2013年6月30日~7月5日).

15) 【招待講演】Kohei SOGA, "Biofunctional Nanostructures on the Surface of Ceramic Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging," 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2013) (Suntec

Singapore, Singapore, 2013年6月30日~7月5日).

16) 【招待講演】Kohei SOGA, "Application of Hydro- and Solvo-Thermally Processed Ceramic Nanoparticles for OTN-NIR Biomedical Imaging," The 3rd International Solvothermal and Hydrothermal Association Conference (ISHA 2013) (Austin, TX, USA, 2013年1月13日~1月17日).

17) 【招待講演】Kohei SOGA, "Ceramic-Based Nanomaterials for over-1000-nm (OTN) NIR Biomedical Imaging (Keynote)," SPIE Global Congress on Nanosystems in Engineering and Medicine (Incheon Songdo Convention Center, Incheon, Korea, 2012年9月10日~9月12日).

18) 【招待講演】Kohei SOGA, "Various Application of Rare-Earth Doped Ceramic Nanophosphors (RED-CNP) for Imaging Technologies," 12th International Meeting on Information Display (IMID 2012) (EXCO, Daegu, Korea, 2012年8月28日~8月31日).

19) 【招待講演】Kohei SOGA, Hiroshi HYODO, Hidehiro KISHIMOTO, "Over-1000-nm (OTN) NIR fluorescence bioimaging: System and material developments," The 244th ACS(The American Chemical Society) National Meeting (Philadelphia Convention Center, Philadelphia, PA, USA, 2012年8月19日~8月23日).

20) 【招待講演】Kohei SOGA, "Application of Ceramic/Polymer Conjugate Materials for Near Infrared Biophotonics," The 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology (Chiba University, Chiba, Japan, 2012年6月26日~6月29日).

〔図書〕(計1件)

1) 曾我公平, 先端バイオマテリアルハンドブック「第4章15節 次世代を担う近赤外蛍光イメージングと蛍光プローブ」(2012年、エヌティーエス、東京) pp. 482-485.

〔産業財産権〕 なし

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・教授)
研究者番号: 50272399

(2)研究分担者

岸本 英博 KISHIMOTO, Hidehiro
(琉球大学・医学研究科・教授)
研究者番号: 80251213

兵藤 宏 HIYODO, Hiroshi
(東京理科大学・基礎工学部・助教)
研究者番号: 30548863

(3)連携研究者

なし