

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390014

研究課題名(和文)液中レーザーアブレーションによる蛍光ナノ粒子形成の機構解明と医工学応用

研究課題名(英文)Elucidation of formation mechanism of luminescent nanoparticles prepared by laser ablation in liquid and their application in biomedical engineering

研究代表者

和田 裕之(Wada, Hiroyuki)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00422527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：水中の物質に集光パルスレーザー光を照射する「液中レーザーアブレーション」によりアップコンバージョンナノ粒子を作製し、がん細胞を用いた実験によりこのナノ粒子ががん治療に利用可能であることを示した。このがん治療法としては光線力学的療法を用いており、従来、この治療法では大きながんや深部のがんは治療できないが、アップコンバージョンナノ粒子と生体透過性の高い近赤外光を用いると、この問題を克服できる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Upconversion nanoparticles were prepared by laser ablation in liquid, which was irradiation with focused laser beam on material in water. Experiment using cancer cells indicated that they were useful for cancer therapy, which was photodynamic therapy (PDT). In the case of normal PDT, it is difficult to cure large or deep cancer. However, this study showed that PDT with using upconversion nanoparticles and near-infrared light, which is transparent for a living body, was likely to solve the problem.

研究分野：光材料化学

キーワード：アップコンバージョン 蛍光体 ナノ粒子 レーザー がん治療

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子分散溶液は多くの分野でその応用が期待されており、特に蛍光ナノ粒子の場合、イメージングやがん治療等のバイオメディカル分野での応用が注目されている。このナノ粒子分散溶液の作製方法の1つに、液中レーザーアブレーション法がある。これは溶液中のターゲット材料に集光したレーザー光を照射することにより、ナノ粒子分散溶液を得るもので、複雑な組成をもつ高結晶性ナノ粒子の分散溶液を簡単に作製することができる等の利点がある。当研究グループではこれまでに、各種蛍光体のナノ粒子化を行ってきている。

近年注目されている蛍光体の1つにアップコンバージョン材料がある。これは生体透過性の高い赤外光で励起できるもので、バイオイメージングにおける自家蛍光の低減や、光線力学療法と併用した低侵襲がん治療への利用が期待されている。

この低侵襲がん治療法としては光線力学的療法(PDT)が考えられている。従来のPDTは、図1(a)に示す様に、がん細胞に投与した光感受性物質に可視光を照射することによって活性酸素 1O_2 を発生させて、がん細胞を死滅させるものである。しかしながら、可視光は生体透過性が低いため、大きながんや深部のがんは治療できないことが課題となっている。これを解決するために、図1(b)に示す様に生体透過性の高い近赤外光照射とアップコンバージョンナノ粒子を組み合わせて活性酸素を発生させる研究がなされている。

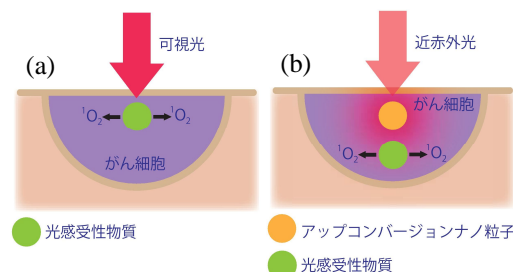


図1. がん治療(PDT)の概念図: (a)従来法, (b)ナノ粒子の応用。

2. 研究の目的

本研究では、アップコンバージョン蛍光体等のナノ粒子化に関する研究を飛躍的に進展させるために、「液中レーザーアブレーションによる蛍光体ナノ粒子の生成機構解明」と「生成ナノ粒子の医工学的応用」を目的とする。

3. 研究の方法

「液中レーザーアブレーションによる蛍光体ナノ粒子の生成機構解明」に関しては、ナノ粒子形成の過程を反映したナノ粒子の組成、形状を詳細に分析すると同時に、アブレーションルーム内の化学種等の分析を行う。生成ナノ粒子の形態と組成に

ついては粉末X線回折や電子顕微鏡観察等を用いる。光学特性評価はナノ粒子の発光スペクトル解析等を中心に行う。「生成ナノ粒子の医工学的応用」に関しては、培養細胞を利用したアップコンバージョンナノ粒子の光線力学的療法によるがん治療の検討を重点的に行う。

4. 研究成果

(1) アップコンバージョンナノ粒子 $Y_2O_3:Er,Yb$ の生成機構の解明

この液中レーザーアブレーションによるナノ粒子生成では、粒径が数十nm程度の微細ナノ粒子と数百nm程度の粗大ナノ粒子が生成する。

「微細ナノ粒子」としては、レーザーの照射強度が小さいときは粒状のものが生成するが、大きいときにはひも状のものが生成する。図2に粒状の(a)透過型電子顕微鏡写真像(TEM)、(b)走査透過型電子顕微鏡像(STEM)、(c)エネルギー分散型X線分析(EDX)を示す。TEM像の結晶格子縞から高い結晶性を有する Y_2O_3 を母体としたナノ粒子ができており、EDXのピークから付活剤であるErとYbがナノ粒子内に存在していることが分かる。これは、ターゲット材料にパルスレーザー光が照射されて、吸収により高温となって発生したアブレーションルームの冷却過程でナノ粒子が生成したと考えられる。この際、結晶化が進行すると同時に、光発光に寄与する付活剤はナノ粒子内にとどまっていることが分かった。

微細ナノ粒子のアップコンバージョン発光スペクトルは図3(b)のようになっており、

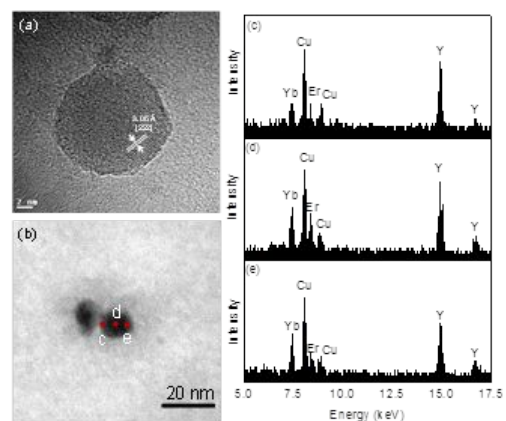


図2. ナノ粒子の(a)TEM像, (b)STEM像, (c)EDX スペクトル¹⁾。

パルクのもの(図3(a))とほぼ同じ Er^{3+} に起因したものであることが分かった。図4(b)に示す様にフォトンアバランシェ効果を示し、発光が2光子過程と3光子過程の混合したものであることが示唆された。

「粗大ナノ粒子」に関しては、1次粒子の形状と粒径が焼結体であるターゲット材料のものと同様であることから、原料であるターゲット材料が衝撃波や熱衝

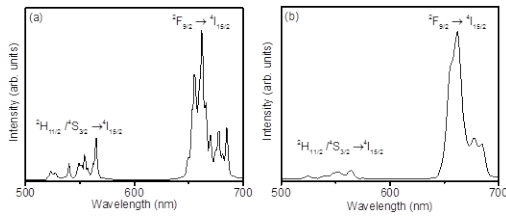


図3. (a)ターゲットと(b)ナノ粒子のアップコンバージョン発光スペクトル¹⁾.

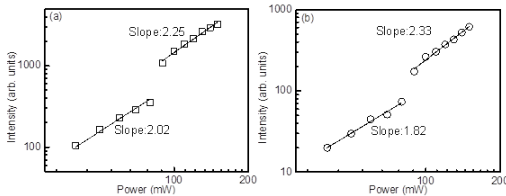


図4. (a)ターゲットと(b)ナノ粒子の発光強度の励起光強度依存性¹⁾.

撃によって断片化したものと推察できる。このEDX マッピングの結果を図5に示す。各構成元素が均一に分布しており、高温の熱過程の影響が少ないことが示唆される。

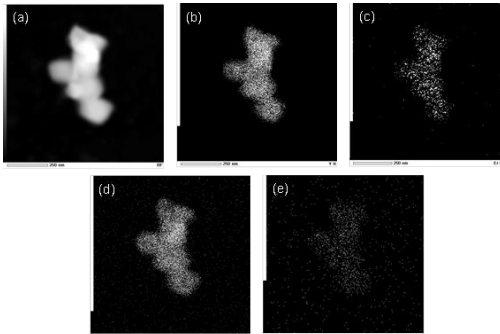


図5. (a)STEM 写真像, および, EDX マッピング像: (b)Y, (c)Er, (d)Yb, (e)O¹⁾.

(2) アップコンバージョンナノ粒子 $YVO_4:Er,Yb$ の作製と評価

研究成果を広く適用できるようにするためにいくつかの物質の検討を試みた。図6(a)は生成粒子の粉末X線回折パターンで、 $YVO_4:Er,Yb$ ナノ粒子が作製できたことが分かる。Scherrer の式から算出した結晶子径は 20 nm 程度であった。

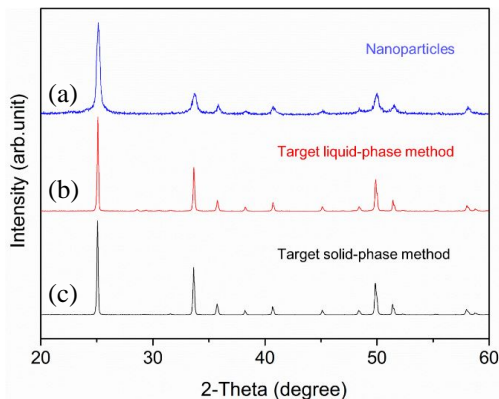


図6. XRD パターン: (a)ナノ粒子, ターゲット材料(b)共沈法, (c)固相法²⁾.

図7に原料であるターゲット材料と生成ナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真像(SEM)を示す。液中レーザーアブレーションによりナノ粒子が生成し、形状は長軸が 200 nm 程度の楕円体であった。ターゲット材料は固相法と共沈法で作製したが、ナノ粒子形状は作製方法には依存しなかった。

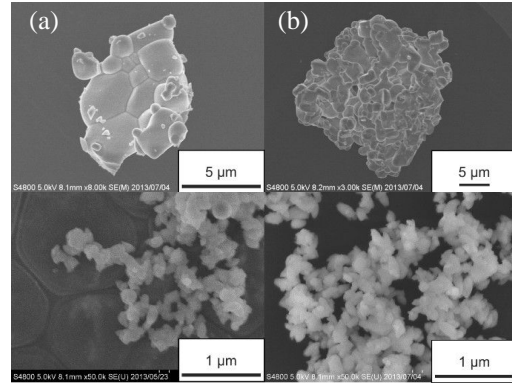


図7. SEM 写真像: ターゲット材料(a)固相法, (b)共沈法), ナノ粒子((c)固相法, (d)共沈法)²⁾.

(3) 生成ナノ粒子のがん治療への医工学的応用

液中レーザーアブレーション法によって作製したアップコンバージョンナノ粒子 $Y_2O_3:Er,Yb$ を用いた PDT によるがん治療を検討するため、活性酸素の生成を確認した結果を図8に示す。活性酸素の検出試薬である DPBF の 410 nm 付近のピークが近赤外光照射時間の増加と共に低下していることから、活性酸素の発生が確認できた。

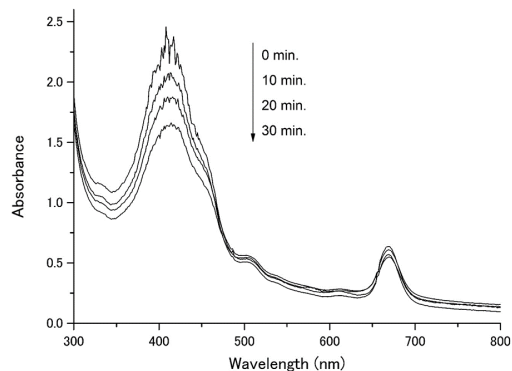


図8. 近赤外光照射による DPBF 溶液の吸光度変化³⁾.

細胞を用いた *in vitro* 実験を行うにあたり、生体毒性とナノ粒子濃度の関係を調べたところ図9に示す結果が得られた。この結果に基づき、肺がん細胞(A549)に対して毒性を示さないナノ粒子濃度 0.5 mg/ml で *in vitro* 実験を行った。図10(a)はがん細胞の光学顕微鏡写真像、図10(b)は蛍光顕微鏡写真像で、光感受性物質の発光からがん細胞への取り込みが確認できる。図11に細胞生存率を測定した MTT 試験の結果を示す。これより、アップコンバージョンナ

ノ粒子と光感受性物質に近赤外光を照射するとがん細胞数が減少することが分かり、がん治療の効果が確認された。

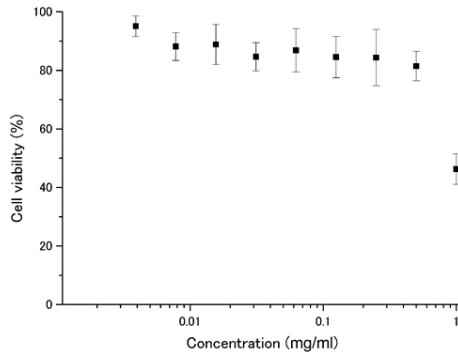


図 9. 細胞毒性のアップコンバージョンナノ粒子濃度依存性³⁾.

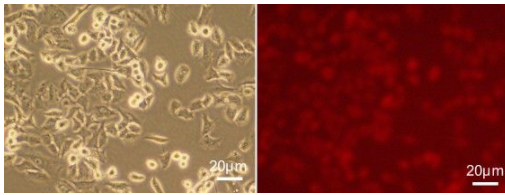


図 10. がん細胞の(a)光学顕微鏡写真像と(b)蛍光顕微鏡写真像³⁾.

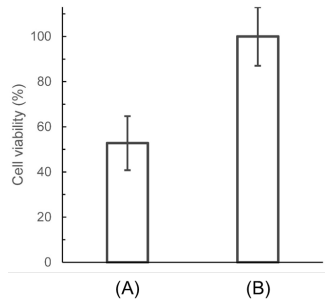


図 11. MTT 試験: (A)PDT 実験, (B) 対照実験³⁾.

(4)生成ナノ粒子のバイオイメージングへの医工学的応用

バイオイメージングに向けてフェムト秒レーザー励起のアップコンバージョンナノ粒子を光学顕微鏡観察した結果を図 12 に示す。発光を観察しているため実際のサイズより大きく見えているものと思われる。ピンホールを用いて測定した単一ナノ粒子レベルでの発光スペクトルを図 13 に示す。結晶性、粒径、表面状態等の違いのため強度のばらつきはあるが、緑色光と赤色光の割合はほぼ一定で赤色の強度が強かった。これはナノ粒子化による表面の無輻射緩和過程の増加に起因するものと思われる。

(5)有機/無機表面修飾による生体適合性の向上

ナノ粒子の生体適合性を向上させるためにポリエチレングリコール(PEG)によるコーティングが広く用いられており、アミド化反応による PEG コートを行ったナノ粒子の赤外吸収スペクトル(FTIR, 図 14)の

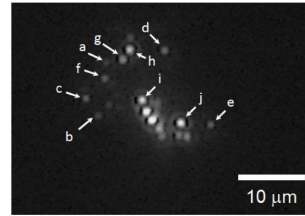


図 12. アップコンバージョンナノ粒子の光学顕微鏡写真像⁴⁾.

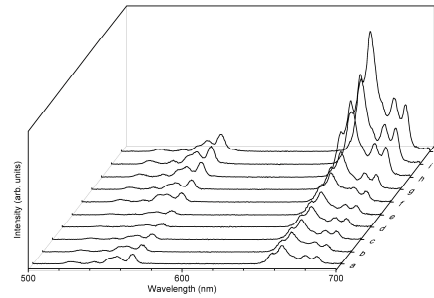


図 13. アップコンバージョンナノ粒子の発光スペクトル⁴⁾.

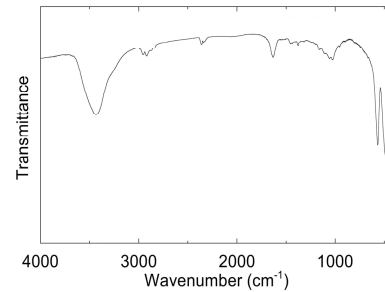


図 14. PEG コートアップコンバージョンナノ粒子の FTIR スペクトル⁵⁾.

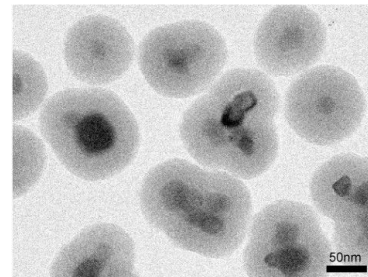


図 15. シリカコートアップコンバージョンナノ粒子の TEM 写真像⁶⁾.

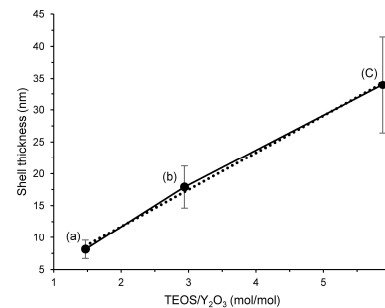


図 16. シリカコート厚の TEOS 濃度依存性⁶⁾.

PEG 起因のピークからナノ粒子がコートされていることが分かる。コートにより発光スペクトルが大きく変化することはない。

く、濁度により評価した分散安定性はコートにより大きく改善した。

シリカ(SiO₂)による表面コートも生体適合性向上に用いられるためポリビニルピロリドン(PVP)を介したシリカコートを行い、そのTEM写真像を図15に示す。シリカコート厚の原料であるテトラエトキシシラン(TEOS)濃度依存性を図16に示す。濃度によりコート厚が制御できることが分かる。

参考文献

- 1) T. Nunokawa et al. Mater. Res. Express, 1 (2014) 035043.
- 2) 森 一起 他, ケミカルエンジニアリング, 59 (2014) 365.
- 3) T. Ikehata et al. Appl. Surf. Sci. 348 (2015) 54.
- 4) T. Nunokawa et al. J. Ceram. Processing Res. 14 (2013) s1.
- 5) H. Kobayashi et al. Jpn. J. Appl. Phys. 53 (2014) 05FK04.
- 6) K. Fujii et al. J. Lumin. 156 (2014) 8.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

1. Noriyuki Tsuruoka, Takao Sasagawa, Tokuo Yodo, Mamoru Yoshimoto, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Springer Plus, 査読有, 5 (2016) 1-7.
2. Pattarin Chewchinda, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Chem, 査読有, 3 (2016) 81-86.
3. Haohao Wang, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Sci. Rep. 査読有, 6 (2016) 20507.
4. Haohao Wang, Touichirou Tomiya, Takashi Takeda, Naoto Hirosaki, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Appl. Phys. Express, 査読有, 8 (2015) 115001-3.
5. Yuhei Hasuike, Yoshitaka Kitamoto, Takeharu Tsuge, Masahiko Hara, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 査読有, 41 (2016) 67-70.
6. Takashi Akino, Anna V. Gubarevich, Yoshitaka Kitamoto, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 査読有, 40 (2015) 287-290.
7. Kosuke Kawasoe, Yoshie Ishikawa, Naoto Koshizaki, Tetsuji Yano, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Appl. Phys. B, 査読有, 119 (2015) 475-483.
8. Tomohiro Ikehata, Yuji Onodera, Takashi Nunokawa, Tomohisa Hirano, Shunichiro Ogura, Toshiaki Kamachi, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Appl. Surf. Sci. 査読有, 348 (2015) 54-59.
9. Takashi Nunokawa, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Mater. Res. Express, 査読有, 1 (2014) 035043.
10. Kunio Fujii, Yoshitaka Kitamoto,

Masahiko Hara, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, J. Lumin. 査読有, 156 (2014) 8-15.

11. 森 一起, 須藤 裕之, 神谷 格, 石川 善恵, 越崎 直人, 小田原 修, 和田 裕之, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 59 (2014) 365-368.
12. Hikaru Kobayashi, Kunio Fujii, Takashi Nunokawa, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Jpn. J. Appl. Phys. 査読有, 53 (2014) 05FK04.
13. Noriyuki Tsuruoka, Takao Katagiri, Yasunori Inoue, Takao Sasagawa, Michikazu Hara, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, Proc. 6th Int. Cong. Laser Adv. Mater. Processing (LAMP2013) 査読無, (2013) 13-071.
14. Takashi Nunokawa, Yuji Onodera, Kunio Fujii, Fumitaka Yoshimura, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, J. Jpn. Laser Processing Soc. (in Japanese) 査読無, 20 (2013) 38.
15. Takashi Nunokawa, Yuji Onodera, Hiroki Kobayashi, Tsuyoshi Asahi, Osamu Odawara, Hiroyuki Wada, J. Ceram. Processing Res. 査読有, 14 (2013) s1-s4.

[学会発表](計43件)

1. H. Wada, Photodynamic Therapy of Upconversion Nanoparticles Prepared by Laser Ablation in Liquid, Nanotechnol. Congr. Expo, invited talk, Frankfurt, Germany (2015/8/11).
2. H. Wada, Optical Properties of Afterglow Nanoparticles Sr₂MgSi₂O₇:Eu,Dy Prepared by Laser Ablation in Liquid, 2nd Int. Workshop Persistent Photostimulable Phosphors, invited talk, Guangzhou, China, (2013/11/19).
3. H. Wang, H. Wada et al. Facile and Chemically Pure Preparation of YVO₄:Eu Colloidal Nanoparticle via Laser Irradiation in Water, Int. Symp. Phosphor Mater. 2015, Niigata (2015/7/29).
4. P. Chewchinda, H. Wada et al. The effect of electrolyte concentration on silicon nanoparticles prepared by laser ablation in liquid, Int. Congr. Laser Adv. Mater. Processing 2015, Kitakyushu (2015/5/28).
5. H. Wang, H. Wada et al. Preparations of Ca-SiAlON:Eu²⁺ nanoparticles by laser ablation in water, ibid (2015/5/28).
6. H. Wada et al. Preparation of titanium nitride spherical particles by laser melting in water, ibid (2015/5/28).
7. H. Wada, et al. Preparation and Optical Properties of Y₂O₃:Er,Yb Nanoparticles Prepared by Laser Ablation in Liquid, Int. Conf. Photoexcited Processes Applications 9, Matsue (2014/10/1).
8. T. Akino, H. Wada et al. Preparation and Optical Properties of Y₂Si₂O₇:Ce,Tb

- Nanoparticles Prepared by Reverse Micelle Method, Int. Union Mater. Res. Soc.-Int. Conf. Asia 2014, Fukuoka (2014/8/26).
9. Y. Hasuike, H. Wada et al. Fabrication of Langmuir-Blodgett Film of Surface-Modified ZnO Prepared by Solution Process, *ibid* (2014/8/26).
 10. T. Ikehata, H. Wada et al. Preparation and Biomedical Application of Upconversion Nanoparticles Prepared by Laser Ablation in Liquid, *Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Laser in Liquids*, ANGEL2014, Matsuyama (2014/5/19).
 11. K. Kawasoe, H. Wada et al. Preparation of Titanium Nitride Spherical Particles by Laser Melting in Liquid, *ibid* (2014/5/19).
 12. P. Chewchinda, H. Wada et al. Promoting the Yield of Silicon Nanoparticles Prepared by Laser Ablation in Liquid, 12th Int. Conf. Laser Ablation, Ischia, Italy (2013/10/8).
 13. H. Wada et al. Preparation and Surface Modification of Upconversion Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid, *Jpn. Soc. Appl. Phys.-Mater. Res. Soc. Joint Symp. Kyotanabe* (2013/9/20).
 14. N. Tsuruoka, H. Wada et al. Preparation and Characterization of YAG:Ce Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid, *Int. Congr. Laser Adv. Mater. Processing 2013, HPL2013, Niigata* (2013/7/25).
 15. 和田, 液中レーザーアブレーション法による機能性無機ナノ粒子の作製と光学特性, 日本化学会第 95 春季年会, 招待講演, 船橋 (2015/3/29).
 16. 和田, ゾル-ゲル法と液中レーザーアブレーション法による高結晶性ナノ粒子分散溶液の作製, 日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム, 招待講演, 鹿児島 (2014/9/9).
 17. 和田, 液中レーザーアブレーションを用いたアップコンバージョンナノ粒子の作製と光学的应用, 第 353 回蛍光体同学会講演会, 招待講演, 東京 (2014/6/6).
 18. 和田, レーザー学会, 無機ナノ粒子分散溶液の液中レーザーアブレーションによる作製と光学的应用, 招待講演, 北九州 (2014/1/21).
 19. 和田, 液中レーザーアブレーションによる機能性無機ナノ粒子の作製と応用, 日本化学会 化学フェスタ, 招待講演, 東京 (2013/10/22).
 20. 和田, 液中レーザーアブレーションで作製した蛍光ナノ粒子の光学特性とバイオ応用, 2013 年光化学討論会, 招待講演, 松山 (2013/9/11).
 21. 王, 和田 他, 液中レーザーアブレーションによる YVO₄:Eu ナノ粒子の作製と評価, 電気化学会第 83 回大会, 大阪 (2016/3/29).
 22. 吉田, 和田 他, エタノール中での液中レ

- ーザー溶融法による窒化チタン球状の作製と評価, 同学会 (2016/3/29).
23. 八木, 和田 他, NaYF₄:Yb,Er の液中レーザーアブレーション法によるアップコンバージョンナノ粒子の作製と評価, 同学会 (2016/3/29).
 24. 山田, 和田 他, 液中レーザーアブレーション法によるリチウムイオン二次電池正極材料用 LiCoO₂ ナノ粒子の作製と評価, 同学会 (2016/3/29).
 25. 富谷, 和田 他, 液体窒素中でのレーザーアブレーションによるサイアロンを用いたナノ粒子の作製と評価, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 東京 (2016/3/20).
 26. 五十嵐, 和田 他, 液中レーザー照射による亜鉛フタロシアニンナノ粒子の作製と評価, 同学会 (2016/3/20).
 27. 鶴岡, 和田 他, 液中レーザーアブレーションによる YAG:Ce ナノ粒子の作製と発光特性, レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会, 名古屋 (2016/1/11).
 28. 王, 和田 他, Facile Synthesis of Nano-scale Ca-a-SiAlON:Eu²⁺ by Laser Ablation in Water, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋 (2015/9/16).
 29. 林, 和田 他, 液中レーザーアブレーションによるシリコンナノ粒子の作製, 同学会 (2015/9/14).

他 14 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: アップコンバージョン被覆粒子
 発明者: 藤井邦生、森一起、小田原修、和田裕之、大鷲圭吾、孫仁徳
 権利者: 東京工業大学、積水化学工業
 種類: 特許公開
 番号: 特開 2015-178602
 出願年月日: 平成 27 年 2 月 20 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wada.iem.titech.ac.jp/new/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 裕之 (WADA HIROYUKI)
 東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
 准教授
 研究者番号: 00422527

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし