マルチバイオイメージング用ナノ粒子プローブの開発

Preparation of Nanoparticle Probes for Multimodal Bio-imaging

06122

研究代表者 慶應義塾大学理工学部応用化学科

准教授 磯 部 徹 彦 Tetsuhiko Isobe

The nanoparticles of solid solutions between $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (YAG) and $\text{Gd}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (GAG) are synthesized from yttrium acetate tetrahydrate, gadolinium acetate tetrahydrate and aluminum isopropoxide at different Y/Gd atomic ratios in 1,4-butanediol by autoclave treatment at 300°C for 2 h, i.e., by the glycothermal reaction. On the other hand, Yb^{3+} doped $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (YAG: Yb^{3+}) nanoparticles are prepared from yttrium acetate tetrahydrate, ytterbium acetate tetrahydrate and aluminum isopropoxide in 1,4-butanediol by autoclave treatment at 300°C for 2 h. Moreover, Gd-YAG and Gd-YAG: Yb^{3+} nanoparticles are prepared from the mixture of gadolinium acetate tetrahydrate and either YAG or YAG: Yb^{3+} colloidal solution by the same autoclave treatment as YAG: Yb^{3+} . Properties of structure, near infrared photoluminescence and magnetic resonance contrast enhancement are characterized for as-prepared nanoparticles. The solid solutions between YAG and GAG work as T_2 contrast agent for magnetic resonance imaging, while Gd-YAG works as T_1 and T_2 contrast agents. Gd-YAG: Yb^{3+} nanoparticles work as T_1 and T_2 contrast agents like Gd-YAG nanoparticles, and show near infrared emission at 1030 nm due to the f-f transition of Yb^{3+} under the 940 nm excitation using near infrared laser diode.

研究目的

蛍光体のナノサイズ化によって、今までのミクロンサイズの蛍光体では利用されなかった応用分野が開拓されている。そのひとつが生化学分野への応用である。CdSe/ZnS量子ドットのような紫外光励起・可視光発光の蛍光体や、近赤外領域で励起や発光を行うナノ蛍光体を生体分子検出用蛍光プローブとして検討している。近赤外領域は「生体の窓」と呼ばれており、生体組織による吸収が少ないため、自家蛍光を抑制して検出感度を向上させることができる¹⁻²⁾。波長600~1200 nmの生体の光吸収が少ない領域を利用する近赤外蛍光画像法は大きな期待のある画像法のひとつである。

このような近赤外蛍光画像法に利用できるナノ粒子として、CdSe/ZnSよりもエネルギーギャップの小さな $\text{CdTe}_x\text{Se}_{1-x}/\text{CdS}$ ³⁾、シリカ被覆して近赤外蛍光を発するランタノイド (Ln) イオンをドープした $\text{LaF}_3:\text{Ln}^{2)}$ 、アップコンバージョンを利用した $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}^{4)}$ や $\text{LuPO}_4:\text{Yb}, \text{Tm}^{5)}$ などが研究されている。その他、ナノダイヤモンド⁶⁾ やSiナノ粒子⁷⁾ も近赤外発光蛍光粒子として検討されている。

一方、磁気共鳴画像法はプロトン (^1H) の磁気モーメントの緩和を測定して画像化を行う非侵襲の断層撮影法である。常磁性 Gd^{3+} イオンや超常磁性ナノ粒子は磁気共鳴造影剤として利用されている。磁気共鳴画像 (MRI) で得られる解像度はmm程度であり、より

詳細に観察するためには他の画像法と組み合わせることが有効である。このような複数の画像法を組み合わせるイメージングは、マルチモーダルイメージングと呼ばれる。例えば、蛍光と磁気共鳴 (MR) の両者のイメージングを用いる場合に、ひとつの試薬 (プローブ) を用いて観察すると相補的な画像を得ることができる⁸⁾。そのようなプローブとして、ナノ蛍光体にMRの機能を付与することが検討され始めている。例えば、量子ドットとGd錯体との組み合わせ⁹⁾⁻¹³⁾や、蛍光を付与したGd化合物ナノ粒子が検討されている¹⁴⁾。蛍光とMRの両者によって組織の情報を取得する方法は、X線や放射性元素を用いない安全性の高い方法である。

本研究では、近赤外蛍光および磁気共鳴 (MR) 造影能の二つの機能を併せ持つガーネット型構造を有するナノ粒子の作製を検討した。まず、MR造影能を有する母体を得るために、 T_1 造影剤として広く利用されている Gd^{3+} を含んだナノ粒子として (i) $Y_3Al_5O_{12}$ (YAG) および $Gd_3Al_5O_{12}$ (GAG) の全率固溶体 ((GY) AG) のナノ粒子、および (ii) 予め作製したYAGナノ粒子に Gd^{3+} を添加して作製したナノ粒子 (Gd-YAG) を作製し、それらのMR造影能を比較検討した。さらに、(iii) Yb^{3+} をドーピングしたYAG (YAG: Yb^{3+}) ナノ粒子に Gd^{3+} を添加して作製したナノ粒子 (Gd-YAG: Yb^{3+}) に関するMR造影能および近赤外蛍光を検討した。このほかに、 $Gd_3Ga_5O_{12}$ (GGG) および $Gd_3Ga_5O_{12}$: Yb^{3+} (GGG: Yb^{3+}) についても検討した。

研究成果の概要

1. 実験方法

1.1 (GY) AG固溶体ナノ粒子の作製

酢酸イットリウム 4 水和物 (酢酸Y), 酢酸ガドリニウム 4 水和物 (酢酸Gd) ($Gd/(Y+Gd) = 0-100\%$), アルミニウムイソプロポキシド (AIP) を1,4-ブタンジオール (1,4-BD) に投入し、オートクレーブにセットした。300 rpmで攪拌しながら室温から300℃まで90 minで昇温し、2 h保持した。室温まで空冷したコロイド溶液を、95%メタノール変性アルコールにより遠心洗浄を行い、50℃で1 day乾燥させ粉末状の (GY) AGナノ粒子を得た。

1.2 Gd-YAG (Gd-YAG: Yb^{3+}) ナノ粒子の作製

酢酸Yまたは酢酸Yと酢酸イッテルビウム 4 水和物 (酢酸Yb) ($Y:Yb=95:5$) とAIPを1,4-BDに投入し、同様の操作によりYAG (またはYAG: Yb^{3+}) コロイド溶液を得た。これに酢酸Gdと1,4-BDを加え再度オートクレーブ処理し、前述と同様の洗浄・乾燥を行うことでGd-YAG (またはGd-YAG: Yb^{3+}) ナノ粒子を得た。

1.3 GGGおよびGGG: Yb^{3+}

1.1に記載されたグリコサーマル法とほぼ同じ手法で合成を実施した。なお、原料には、酢酸Gd, 酢酸Ybおよびガリウムアセチルアセトナートを用いた。

2. 結果および考察

2.1 (GY) AG固溶体ナノ粒子

Fig. 1に (GY) AG (Gd25%) ナノ粒子およびGAG (Gd100%) ナノ粒子のSEM像を示す。それぞれの画像から算出した数平均粒子径は 64.6 ± 11.8 nmおよび 125.1 ± 19.7 nmであった。両試料のX線回折ピークは単相のガーネット構造に帰属された。また、Fig. 2に示すように、(GY) AG固溶体ではGd濃度の増加に伴い第一強線である (420) ピークは低角度側にシフトした。これは Y^{3+} よりもイオン半径の大きな Gd^{3+} の含有量が増加することによって面間隔が増大したことに起因する。

Fig. 1 SEM images of (GY) AG, YAG and Gd-YAG.

Fig. 2 X-ray diffraction profiles of solid-solution between YAG and GAG at different Gd concentrations.

Fig. 3にアガロースゲルに分散させたナノ粒子のMR造影画像を示す。 T_2 （陰性）画像ではGdの含有濃度に関わらず、粒子濃度が増大するに従って、画像はより暗くなった。しかし、 T_1 （陽性）画像では、粒子濃度が増大するに従い像が暗くなるという、従来のGd錯体の T_1 造影剤とは逆の傾向を示した。これには粒子中のGd含有量に応じた次の2つの原因が考えられる。①Gd含有量が低濃度の場合、粒子表面に存在するGdが僅かであり、水分子の ^1H と粒子表面 Gd^{3+} との双極子-双極子相互作用による磁気緩和が不十分である。②Gd含有量が高濃度の場合、 $(\text{GdY})\text{AG}$ 固溶体ナノ粒子の磁化率効果が大きく、 T_2 緩和の影響を大きく受けて正常な T_1 造影が行えなかった。

2.2 Gd-YAG (Gd-YAG:Yb^{3+}) ナノ粒子

Fig. 1にYAGナノ粒子およびGd-YAGナノ粒子のSEM像を示す。それぞれ粒径は 56.0 ± 10.0 nmおよび 55.5 ± 7.2 nmであり、両者の粒径の差異は見られない。両試料のX線回折ピークは単相のガーネット構造に帰属でき、Gdを後添加したことによる副生成物の生成は確認されなかった。また、第一強線である(420)ピークは、Gd添加により低角度側にシフトした。これはイオン半径の大きな Gd^{3+} が Y^{3+} と置換固溶し、面間隔が増大したためと考えられる。

Fig. 4にアガロースゲルに分散させたGd-YAGナノ粒子のMR造影画像を示す。これよりGd-YAGナノ粒

Fig. 3 MR images of (GY) AG.

Fig. 4 MR images of Gd-YAG.

子は T_1 および T_2 造影剤として機能することが確認され、単位Gd濃度あたりの緩和能 R_1 , R_2 はそれぞれ $R_1 = 6.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $R_2 = 56.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。 $(\text{GdY})\text{AG}$ 固溶体ナノ粒子の場合と異なり、Gd-YAGナノ粒子が T_1 造影剤として機能した理由は次のように考えられる。Gd-YAGでは、GdがYとイオン交換して固溶できるのは粒子表面近傍だけである。このため、表面近傍での $\text{Gd}^{3+} - ^1\text{H}$ 間の双極子-双極子相互作用が十分に行われ、またGd含有量が少ないため磁化率効果が小さいので T_2 緩和の影響が抑制され、その結果、 T_1 造影が正常に示されたものと考えられる。またGd-YAG: Yb^{3+} ナノ粒子についても同様に T_1 および T_2 造影能が確認され、Fig. 5に示すように、波長940nmの近赤外レーザーで励起すると、 Yb^{3+} の $^2\text{F}_{5/2} \rightarrow ^2\text{F}_{7/2}$ 遷移による波長1030 nmをピークとする近赤外蛍光が観測

Fig. 5 Near IR photoluminescence spectrum of Gd-YAG:Yb³⁺ under the excitation by the laser diode ($\lambda = 940$ nm).

された。また、GGGおよびGGG:Yb³⁺ナノ粒子に関しても、Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子と同様の結果が得られた。

3. 結論

グリコサーマル法により (GY) AG固溶体ナノ粒子およびGd-YAGナノ粒子を作製した。前者はT₂造影剤、後者はT₁造影剤として機能した。また、Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子はT₁造影剤として機能すると同時に、近赤外励起によりYb³⁺の²F_{5/2}→²F_{7/2}遷移による近赤外発光を示し、デュアルモードイメージングに応用できることが示された。

今後の研究の見通し

Gd-YAG:Yb³⁺およびGGG:Yb³⁺ナノ粒子がマルチモードイメージング用プローブとして機能することが確認されたので、今後さらにMRI画像の特性や近赤外蛍光特性を向上させるための合成方法の改善策を検討していく。さらに、生体分子イメージングのモデル実験を実施することを検討していく。

参考文献

1) V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V. Wang and R.

Weissleder, Nature Biotech. 23, 313 (2005).

- 2) S. Sivakumar, P. R. Diamente and F. C. J. M. van Veggel, Chem. Eur. J., 12, 5878 (2006).
- 3) W. Jiang, A. Singhal, J. Zheng, C. Wang and W.C.W. Chan, Chem. Mater, 18, 4845 (2006).
- 4) G. Yi, H. Lu, S. Zhao, Y. Ge, W. Yang, D. Chen and L.-H. Guo, Nano Lett., 4, 2191 (2004).
- 5) S. Heer, O. Lehmann, M. Haase and H.-U. Gudel, Angew. Chem. Int. Ed., 42, 3179 (2003).
- 6) S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang K.-M. Chen, and Y.-C. Yu, J. Am. Chem. Soc., 127, 17604 (2005).
- 7) 佐藤慶介, 平栗健二, 舟久保昭夫, 福井康裕, 樋上哲哉, 第54回応用物理学会関係連合講演会講演予稿集 No.3, 28p-ZK-15, p.1524 (2007).
- 8) W. J. Rieter, J. S. Kim, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, T. Tarrant and W. Lin, Angew. Chem. Int. Ed. 46, 3680 (2007).
- 9) H. Yang, S. Santra, G. A. Walter and P. H. Holloway, Adv. Mater. 18, 2890 (2006).
- 10) L. Prinzen, R. J. J. H. M. Miserus, A. Dirksen, T.M. Hackeng, N. Deckers, N. J. Bitsch, R. T. A. Megens, K. Douma, J. W. Heemskerk, M. E. Koo, P. M. Frederik, D. W. Slaaf, M. A. M. J. van Zandvoort and C. P. M. Reutelingsperger, Nano Lett. 7, 93 (2007).
- 11) R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki, H. Ohba, Y. Imai and I. Kanno, Anal. Chem., 78, 5925 (2006).
- 12) W. J. M. Mulder, R. Koole, R. J. Brandwijk, G. Storm, P. T. K. Chin, G. J. Strijkers, C. de Mello Donega, K. Nicolay and A. W. Griffioen, Nano Lett. 6, 1 (2006).
- 13) W.-B. Tan and Y. Zang, Adv. Mater. 17, 2375 (2005).
- 14) J. L. Bridot, A. C. Faure, S. Laurent, C. Riviere, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J. L. Coll, L. V. Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, J. Am. Chem. Soc. 129, 5076 (2007).

学会発表

- 1) Ryo Asakura, Hiroshi Sakane, Kunihiro Noda, Tetsuhiko Isobe, Masahito Morita, Toshiro Inubushi, "Fluorescent and magnetic resonance imaging by rare earth doped nanoparticles with garnet structure", 2007 MRS fall meeting (2007年11月, Boston)
- 2) 坂根宏志, 朝倉亮, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, "近赤外蛍光・MRデュアルイメージング用Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子に関する研究", 第25回希土類討論会プログラム (2008年5月, 東京).