14114

電子線励起バイオイメーキングのための 高輝度ナノ蛍光体創製

Synthesis of Nanophosphors for Bioimaging using Electron Beam Excitation

研究代表者 Research leader: 古川 太一 Taichi FURUKAWA

大阪大学ナノサイエンスデザイン教育研究センター 特任助教
Institute for NanoScience Design, Osaka University, Assistant Professor
E-mail: furukawa@insd.osaka-u.ac.jp

抄録

電子線で蛍光体を励起することで生じるカソードルミネッセンス (CL) を用いたバイオイメーキング法は、ナノスケールの空間分解能と分子種識別能を併せ持つイメージング手法である。この手法の実現のために最も重要なのが、タンパク質一分子と同程度のサイズかつ高い電子線発光輝度を持つ蛍光体の作製である。本研究では、レーザーアブレーション法と均一沈殿法を用いて CL バイオイメーキングのための蛍光体を作製した。レーザーアブレーション法によって作製した蛍光体は、粒径のコントロールが困難で、数十 nm 程度のサイズを持つ蛍光体の CL 輝度もイメージングに不十分であった。一方、均一沈殿法では、沈殿剤の尿素を高濃度に用いた場合 (720 mg/mL)、40 nm 程度の均一な粒径を持つ蛍光体の作製に成功し、単一粒子の CL イメージングに成功した。更に、添加希土類元素濃度、焼成温度、共添加元素を制御することで、より高輝度な蛍光体が作製可能であることを示した。

ABSTRACT

Cathodoluminescence (CL) microscopy, which is a combination of optical microscopy and electron microscopy, has the potential to realize multi-color bioimaging with nanoscale spatial resolution. To achieve this biological CL imaging, development of small nanophosphors with similar size to protein molecules and bright CL nanophosphors is indispensable. In this research, we developed nanophosphors for CL bioimaging using laser ablation method and homogeneous precipitation method. The size distribution of laser-ablated nanophosphors was large, and the CL intensity of single nanophosphor with size of a few tens nm was not enough to image. In homogeneous precipitation method, mono-dispersed nanophosphors with size of about 40 nm were obtained with small size distribution. Improvement of CL intensity was also achieved with varying concentration of rare-earth ions, calcination temperature, and addition of co-doping ions.

研究背景と目的

生命の基本単位である細胞は、様々な種類の生体分子が複雑に相互作用することによってその機能を発現している。そのため、これら生体分子種の局在を知ることは、生命機能の発現機序解明に不可欠であり、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた様々なイメージング手法が開発されてきた。

光学顕微鏡は生きたままの細胞を観察でき、蛍光分子や蛍光タンパク質などの蛍光プローブを可視化したい分子に標識することで生体分子種を蛍光の色によって見分けることができる。しかしながら、空間分解能は光の回折限界により波長の半分程度である 200 nm ~ 300 nm 程度に制限される。近年、STED, PALM, SIM などの光の回折限界を超えた空間分解能を持つ顕微手法 (Schermlle L. *et al.*, 2010) が開発されているものの、複数種の蛋白質を一分子スケールの空間分解能で見分けることは未だ容易とは言えない。

一方で、電子顕微鏡を用いた観察は空間分解能が高く、細胞内小器官等の微細構造をナノスケールで観察することが可能である。異なるサイズや異なる形状のプローブを用いて生体分子を染め分ければ、電子顕微鏡像からプローブのサイズや形状を読み取り、分子種を識別可能である (Wang B. L. *et al.*, 1985; Giepmans, B. N. G. *et al.*, 2005)。しかしながら、これらの手法はタンパク質に標識された粒子をサイズや形状で分類してタンパク質の種類を識別しなければなら

ず、蛍光顕微鏡のように直接カラー画像を得ることが難しい。

現在著者らは、電子線励起による発光であるカソードルミネッセンス (CL; Cathodoluminescence) を用いることで、電子顕微鏡の空間分解能を持ちつつ複数種の分子をカラーで識別可能なバイオイメーjing法を開発している (Niioka H. *et al.*, 2011; Furukawa T. *et al.*, 2015)。このイメージング法では、分子に標識された蛍光体を電子線によって励起し、その発光である CL を分光する。励起源が電子線のため、電子線をタンパク質一分子のサイズと同等の 10 nm 程度に集束可能であり、高い空間分解能が得られる。CL は物質によって発光波長が異なるために、蛍光顕微鏡のようにマルチカラーイメージングが可能となる (Fig. 1)。

CL を用いたバイオイメーjingで重要となるのが分子に標識するための蛍光体である。高い空間分解能で分子種を見分けるこのイメージング法では、蛍光体に以下のような条件が必要である。

1. タンパク質と同程度のサイズ
2. 高輝度な CL
3. 発光色のコントロール
4. 電子線耐性

これまでに著者らは、 Y_2O_3 に Eu, Tb, Tm などのフィールドエミッションディスプレイ用蛍光材料への応用が検討されていた物質に着目し、蛍光体を作製してきた。 Y_2O_3 に添加する希土類元素を変更することで 3 色以上のカラーイメージングが可能なること、電子線耐性に優れることを確認した。また、その蛍光体を用いたイメージングは電子顕微鏡に匹敵する空間分解能を持つことを示した。しかしながら、イメージングに用いた蛍光体は 100 nm 以上の大きい蛍光体であり、CL バイオイメーjingに応用するには大きすぎた。

本研究では、これまでに達成出来ていない、タンパク質一分子と同等のサイズを持つナノ蛍光体の作製とその高輝度化手法について検討した。

Fig. 1 Concept of nanobioimaging using electron beam excitation.

研 究 方 法

1. レーザーアブレーション法によるナノ蛍光体の作製

タンパク質一分子と同程度のサイズを持つナノ蛍光体を作製するために、液相レーザーアブレーション法によるナノ蛍光体の作製を試みた。この方法は、溶液中の試料に高強度のレーザーパルスを集光することで、焦点でアブレーションを発生させ、数 nm 程度の蛍光体を作製可能な方法である (Mafune F. *et al.*, 2013)。

レーザーアブレーションを行う前の蛍光体は以下の方法で作製した。硝酸イットリウム、硝酸ユウロピウムを水に溶かした後、ゲル化剤としてグルタミン酸を追加し、80°C で 1 h 攪拌した。続いて、ドライオープンにて水分を蒸発させることでゲル状の物質を得た。得られたゲルを電気炉にて 900°C、3 h の条件で大気焼成し、Y₂O₃:RE (RE は発光に寄与する添加希土類元素 Eu, Tb, Tm など) の蛍光体粉末を得た。

作製した Y₂O₃:RE 蛍光体を超純水中に分散させ、スターラーで攪拌しながら、レーザーパルスを照射した。光源はナノ秒 Nd:YAG レーザー (New wave research, Tempest) の 2 倍波 (532 nm, 10 Hz) を用い、単レンズ (f=100 mm) によりサンプルに集光することでアブレーションを行った。レーザーパルスの光強度は 10 ~ 20 mJ/pulse、照射時間は 0 ~ 3 h、液中の粒子濃度は 0.1 ~ 0.5 mg/mL の濃度で作製条件の検討を行った。

2. 均一沈殿法を用いたナノ蛍光体の作製

均一沈殿法は均一な粒径と形状のナノ蛍光体を作製するのに有効な方法である (Venkatachalam N. *et al.*, 2009)。この方法では、尿素の加水分解で生じるアンモニアによって溶液の pH を均一に上昇させ、希土類水酸化塩の沈殿を得る。

原料となる希土類硝酸塩 (160 μM ~ 7 mM) と尿素 (5 ~ 720 mg/mL) を溶解した原料水溶液を加熱しながら攪拌し、沈殿物を得た。原料溶液の加熱温度は 60 ~ 80°C、攪拌時間は

Table 1 Synthesis conditions of Y₂O₃:Eu(Zn) nano-phosphors.

Emitter Eu ³⁺	Calcination temp.	Emitter Zn ²⁺
1, 2, 5 mol%	900, 1200°C	0, 10, 20 mol%

30 min ~ 4 h の間で作製条件の検討を行った。得られた沈殿物を 900°C で大気焼成 (5 min ~ 3 h) し、酸化物ナノ蛍光体 Y₂O₃:RE を得た。

3. 添加元素の制御による高輝度ナノ蛍光体の作製

Y₂O₃:RE 蛍光体は、発光に寄与する希土類元素の濃度、焼成温度、共添加する元素によって CL 強度が影響を受けることが知られている。そこで、ナノ蛍光体の CL 輝度向上のために、Table 1 に示す通りの作製条件の検討を行った。今回共添加に用いた Zn は Y₂O₃ 中に Zn²⁺ の形で導入されることにより、本来導電性のない Y₂O₃ に導電性を付与することが可能である (Nagata T. *et al.*, 2007)。また、その影響で蛍光体の発光強度が向上することが知られている。

ナノ蛍光体一つ一つの CL 強度の定量評価には粒子の大きさが均一である必要があるため、蛍光体は上述の均一沈殿法で作製した粒子を用いた。

研 究 成 果

1. レーザーアブレーション法で作製したナノ蛍光体の形態と CL 発光

Fig. 2 に液相レーザーアブレーション処理前後のナノ蛍光体の TEM 像を示す。Fig. 2 (b), (c) の TEM 像から分かるように、レーザーアブレーション後の蛍光体は細かく分散している事が分かる。粒子は数 nm ~ 50 nm 程度で球形をしており、凝集も少ない事が分かる。レーザーパルスの照射強度が高いほど、細かい粒子が作製できたが、一方で大きな球形粒子も確認された。そのため、レーザーパルス強度としては、10 mJ/pulse 程度が適切と考えられる。しかし

Fig. 2 TEM images of $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Re}$ nanophosphors before (a) and after (b, c) laser ablation. Scale bar: 100 nm.

ながら、この方法では任意のサイズの蛍光体を高収率で得ることは難しく、生体イメージングのプロブとして確立するには課題を残す結果となった。また、本研究で作製したいサイズである数 nm ～数十 nm 程度の粒子からの発光を観察することが出来なかった。

2. 均一沈殿法で作製したナノ蛍光体の形態と CL 発光

Fig. 3 (a) ～ (d) に沈殿剤である尿素の濃度を変更した際の蛍光体前駆体の TEM 像を示す。尿素の濃度を極端に高くすることで、小さな粒子が作製されていることが分かる。Fig. 3 (e) に異なる尿素濃度での粒径のヒストグラム、Fig. 3 (f) に尿素濃度に対する平均粒径と粒径の標準偏差を示す。

これらの図からも、尿素の濃度を高くするほど平均粒径が小さくなっていることが分かる。最も高い尿素濃度 720 mg/mL のとき、粒径は 42.3 ± 11.8 nm であった（焼成すると更に 10 nm 程度小さくなる）。また、尿素の濃度を高くすることで、平均粒径だけでなく、粒径のばらつきも抑制可能であることが分かった [Fig. 3 (f)]。以上の事から、尿素の濃度を高くすると、大量の核が瞬間的に生成し、粒子の成長が抑制され、小さく、サイズの均一なナノ粒

子が沈殿したものと推察出来る。

また、均一沈殿法では、希土類イオンの溶解度の違いにより前駆体として析出する速度が異なる。そのため、発光に寄与する希土類元素を正確な濃度で粒子の中に入れることが難しかったが、高濃度の尿素で前駆体の析出を行うと、この問題を解決出来ることが分かった。Fig. 4 は尿素の添加量（横軸）に対して、沈殿物の希土類イオン濃度と出発原料溶液の希土類イオン濃度の割合（縦軸）をプロットしたものである。尿素濃度が高くなれば高くなるほど、沈殿物の希土類イオン濃度は所望の濃度（100%）に近づいていることが分かる。これは、溶液内の均一かつ急激な pH 上昇による多量の核生成が原因と考えられる。これにより、発光輝度に影響の出やすい添加希土類イオン濃度を正確に検討出来るようになり、発光効率の良い蛍光体を再現性良く作製できるようになった。

Fig. 5 (a) に高濃度の尿素を用いて作製した粒子の CL 像を示す。測定には STEM に CL を取得可能なミラーを取り付けた装置 (Furukawa T. *et al.*, 2015) を用いた。計測は加速電圧 80 kV、露光時間 10 ms/pixel の条件で行い、発光中心 Tm からの発光を光電子増倍管で取得した。約 50 nm 以下の粒子もイメージング出来ていることが確認出来る。また、この粒子の一点に電子線を 60 s 照射し続けても CL 強度の低下は見られず、長時間イメージングや複数回のイメージングが可能であることが分かった [Fig. 5 (b)]。

3. 添加元素濃度と CL 輝度

Table 2 に Eu 濃度、焼成温度、Zn 濃度と CL 輝度の関係を示す。ここでは、従来著者らが用いていた $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Eu}$ 蛍光体 (Eu 濃度 5 mol%, 焼成温度 900°C) の CL 輝度を 100% として比較した。

従来の蛍光体と比較して、Eu 添加濃度 2% のときに約 2.4 倍、焼成温度は 1200°C の時に約 2.4 倍、Zn 添加濃度 20% の時に約 1.8 倍の CL 輝度が得られた。また、これらの条件を組み合わせる事で、従来の蛍光体より約 4.5 倍明

Fig. 3 (a–d) TEM images of precursors synthesized with 40, 80, 320, and 640 mg/mL of urea. Scale bar: 1 μm . (e) Size distributions and (f) average diameter of precursors synthesized with various concentrations of urea. Error bars in (f) serve as standard deviations of particle sizes.

るい蛍光体を作製出来た。

4. まとめ

本研究では、電子線励起発光である CL を利

用したバイオイメージングを目指し、タンパク質一分子と同等のサイズを持つナノ蛍光体の作製とその高輝度化手法について検討した。

レーザーアブレーション法によって作製した

Table 2 Summary of the relative CL intensities of $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Eu(Zn)}$ nanophosphors.

Sample	Calcination temp. / °C	Relative CL intensity / arb. unit
Control condition		
Eu 5	900	100 ± 24%
Emitter varying		
Eu 1	900	159 ± 32%
Eu 2		273 ± 53%
Calcination temp.		
Eu 5	1200	241 ± 52%
Sensitizer varying		
Eu 5, Zn 10	900	162 ± 53%
Eu 5, Zn 20		184 ± 47%
Integrated condition		
Eu 2, Zn 20	1200	454 ± 80%

Fig. 4 Molar concentration ratio of co-dopant Tm^{3+} between precursors and starting solution.

蛍光体は数 nm ～数十 nm の幅広い粒径が得られた。しかしながら、任意の粒径での作製が困難であった。また、数 nm ～数十 nm の粒径で十分な発光強度が得られなかった。

沈殿剤の尿素を高濃度を用いた均一沈殿法によって、40 nm 程度の非常に小さい蛍光体の作製に成功した。この方法により、粒子の中に入る希土類元素の濃度を正確に制御することが可能となった。その結果として、CL 輝度の高い蛍光体の作製が容易になり、50 nm 以下の蛍光体の CL イメージングに成功した。

更に、添加希土類元素濃度、焼成温度、共添加元素を制御することで、より高輝度な蛍光体が作製可能であることを示した。

今後、10–20 nm 程度のよりタンパク質一分子のサイズに近い蛍光体の作製を行うべく、今回見出した尿素を高濃度を用いた均一沈殿法の改良を行う。同時に、CL 輝度を向上させる添加希土類元素濃度、焼成温度、共添加元素等の条件検討を行う予定である。

参考文献

- [1] Furukawa T., Fukushima S., Niioka H., Yamamoto N., Miyake J., Araki T., and Hashimoto M., Rare-earth-doped nanophosphors for multi-color cathodoluminescence nano-bioimaging using scanning transmission electron microscopy, *J. Biomed. Opt.*, 20 (2015) 056007-1-6.
- [2] Giepmans B. N. G., Deerinck T. J., Smarr B. L., Jones Y. Z., and Ellisman M. H., Correlated light and electron

Fig. 5 CL images (a) and stabilities of CL intensity (b) of nanophosphors synthesized by homogeneous precipitation method using excessive urea. Excitation source: electron beam. Acquisition wavelength: 450–500 nm (a, b); Acceleration voltage: 80 kV; Exposure time: 10 ms/pixel.

- microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots, *Nat. Methods*, 2 (2005) 743-749.
- [3] Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., and Sawabe H., Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution, *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 9111-9117.
- [4] Nagata T., Nakayama T., Murakami H., Low Voltage Cathodoluminescent Properties of Y_2O_3 -based Nano-Particle Phosphors, *SID Symposium Digest of Technical Papers*, 38 (2007) 1328.
- [5] Niioka H., Furukawa T., Ichimiya M., Ashida M., Araki T., and Hashimoto M., Multicolor cathodoluminescence microscopy for biological imaging with nanophosphors, *M., Appl. Phys. Express*, 4, (2011) 112402-112404.
- [6] Wang B. L., and Larsson L. I., Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining, *Histochemistry*, 83 (1985) 47-56.
- [7] Venkatachalam N., Saito Y., and Soga K., Synthesis of Er^{3+} doped Y_2O_3 nanophosphors, *J. Am. Ceram. Soc.*, 92 (2009) 1006-1100.

外部発表成果

論文発表

1. Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Ichimiya M., Sannomiya T., Miyake J., Ashida M., Araki T., and Hashimoto M., "Synthesis of Y_2O_3 nanophosphors by homogeneous precipitation method using excessive urea for cathodoluminescence and upconversion luminescence bioimaging", *Optical Materials Express*, 6 (2016) 831-843.
2. Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Ichimiya M., Sannomiya T., Tanaka N., Onoshima D., Yukawa H., Baba Y., Ashida M., Miyake J., Araki T., and Hashimoto M., "Correlative near-infrared light and cathodoluminescence microscopy using $Y_2O_3:Ln$, Yb ($Ln = Tm, Er$) nanophosphors for multi-scale, multi-colour bioimaging", *Scientific Reports*, 6 (2016) 25950.
3. Kanagawa, Apr. 22-24, 2015) Proceedings APBP 7-4.
2. 古川 太一, 福島 昌一郎, 新岡 宏彦, 一宮正義, 芦田 昌明, 三宅 淳, 橋本 守, "希土類添加蛍光体の電子線励起発光を用いた液中生体ナノイメージング", 日本機械学会第13回医用分光学研究会 (Tokyo, Dec. 3-4, 2015) 妙録集 17-18.
3. 古川 太一, 福島 昌一郎, 新岡 宏彦, 一宮正義, 芦田 昌明, 三宅 淳, 橋本 守, "カソードルミネッセンス顕微鏡を用いた液中ナノバイオイメージング", 第28回バイオエンジニアリング講演会 (Tokyo, Jan. 9-10, 2016) 1C11.
4. Fukushima S., Furukawa T., Nioka H., Ichimiya M., Sannomiya T., Ashida M., Miyake J., Araki T., and Hashimoto M., "Multi-scaled bioimaging with near-infrared luminescence and cathodoluminescence", 生体医用画像研究会第3回若手発表会, (Osaka, Mar. 12, 2016).
5. Dung D. T. K., Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Mori Y., Yoshioka Y., Hashimoto M., and Miyake J., "Imaging of 3D cellular spheroids by trimodalities CL-NIR-MRI", NFO-14 (Hamamatsu, Shizuoka, Sept. 4-8, 2016) We-14P-75.

口頭・ポスター発表

1. Furukawa T., Fukushima S., Niioka H., Ichimiya M., Miyake J., Ashida M., Araki T., Hashimoto M., "Biological high-resolution imaging in wet-condition using cathodoluminescence microscopy", OPIC2015 APBP'15 (Yokohama,