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

曾我公平

Application of Nanophosphors with Near Infrared Excitation for Biomedical Imaging

Kohei Soga

Department of Materials Science and Technology, Tokyo University of Science;
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan.

(Received August 3, 2012)

Fluorescence bioimaging is an inevitable method for biological, medical and pharmaceutical sciences to visualize substances in biological objects in a highly sensitive, multicolor and dynamic way. Recently, elongation of the fluorescence wavelength is a trend used in this imaging to suppress scattering, which limits the imaging depth to within several millimeters. It has been known that the so-called “biological window” with low loss for a biological tissue has been known to lie in the near-infrared (NIR) wavelength range between 1000 and 1700 nm. The use of fluorescence in the over-1000-nm (OTN) NIR can deepen the observation to several centimeters. The use of imaging devices based on semiconductor silicon has limited the wavelength of the fluorescence bioimaging to less than 1000 nm. However, the appearance of InGaAs CCD on the market, to allow for imaging of the OTN-NIR light, is now changing the situation. On the other hand, rare-earth doped ceramic nanophosphors (RED-CNP) can emit efficient fluorescence in the OTN-NIR wavelength range. The author's group has applied the RED-CNP to OTN-NIR fluorescence bioimaging by hybridizing the RED-CNP with various polymers or molecules. The present paper will review the development of the materials and systems for this OTN-NIR fluorescence bioimaging, together with some applications of the imaging method for biological research and a medical surgery.

Key words——bioimaging; fluorescence; near infrared; rare-earth; ceramic

1. はじめに

蛍光バイオイメージングは、高感度、多色で動態観察が可能な生体内の物質の可視化方法として、生物学、医学、薬学の研究や診断において不可欠な技術となっている。これまで用いられてきた波長域は主に紫外光を励起光とした可視蛍光であり、蛍光体の退色、生体への毒性、自家蛍光などの様々な問題を抱えている。¹⁾ 観察深度を浅くし、像にボケをもたらす光散乱は可視光近傍の波長域では短波長ほど強い。特に *in vivo* イメージングでは励起波長や蛍光波長が短いためにその観察深度は数 mm が限界とされてきた。近年ではこれらを鑑み、励起波長や蛍光波長の長波長化が1つのトレンドであり、indocyanine green (ICG)²⁾ や量子ドット³⁾などの優れた

た蛍光体の開発により 900 nm 付近の近赤外 (near infrared; NIR) 蛍光を用いた *in vivo* イメージングが実現している。しかし、上述のように光散乱の観点からはさらに長波長でのイメージングが望ましい。生体において透過率の高い「生体の窓」⁴⁾は 1000–1700 nm の波長域に存在し、1000 nm を超える波長の近赤外光 (over-1000-nm near infrared; OTN-NIR) のイメージングへの応用に期待が集まりつつある。最も一般的に用いられている Si の CCD カメラでは長波長限界は 1000 nm 付近であるが、近年 InGaAs CCD が実用化されてきており、上記の OTN-NIR における蛍光バイオイメージングが現実味を帯びてきた。筆者らは OTN-NIR 蛍光バイオイメージングに一早く着目し、希土類含有セラミックスナノ粒子 (rare-earth doped ceramic nanophosphor; RED-CNP) を蛍光体としたイメージングに世界に先駆けて成功している。本稿では、動物の皮下数 cm のイメージングが可能な OTN-NIR 蛍光バイオイメージングシステムとそのための材料の開発につ

The author declares no conflict of interest.

東京理科大学基礎工学部材料工学科 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)

e-mail: mail@ksoga.com

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S24 で発表したものを中心に記述したものである。

Fig. 1. Optical Loss of Human Skin and the Biological Window⁵⁾

The window is the valley of the spectrum formed by the tails of the scattering and infrared absorption. The window matches the detectable wavelength of InGaAs CCD.

いて総説する。

2. 「生体の窓」と OTN-NIR

物質の光損失は根本的には光散乱と光吸収で決まる。紫外～赤外に渡る領域では、紫外・可視で起こる電子励起による光吸収、一般に短波長ほど強い光散乱、長波長ほど強い分子内振動に伴う分極振動の励起による赤外吸収が考えられる。光散乱に関しては原子や分子、イオンによって起こるレイリー散乱と屈折率界面で起こるミー散乱が混在しているが、いずれにしてもたいていの生物試料で光散乱による損失は短波長に向けて急激に立ち上がってゆく。可視域での光損失はこの光散乱と色素による電子遷移吸収によって決定づけられ複雑である。しかし、これらの光散乱と光吸収は 800 nm 以上の NIR 波長域へ向けて急激に減少する。一方、長波長側の赤外吸収は 2000 nm 以上では非常に大きな損失寄与があるが、2000 nm から短波長側へ向けて急激に減少する。Figure 1 に典型的な例としてヒトの皮膚の光損失スペクトルを示す。⁵⁾ 筆者らが様々な生物試料に関して測定を行ってみると、NIR 域に関して短波長側の損失は概ね同様であるが、厳密には長波長側の赤外吸収は含水率の影響を受けて変化する。しかし多くの生体試料で Fig. 1 のような損失プロファイルであると考えてよい。上述のように現在の蛍光バイオイメージングは ICG や量子ドットを用いて 900 nm 付近の比較的損失の小さい波長域で行わ

れつつあるが、さらに長波長の 1000 nm 以上の近赤外 (over-1000-nm near infrared; OTN-NIR) に蛍光波長を移動し、縦軸が対数となっていることに注意すると、大幅な観察深度の増大が期待される。しかし、これまで用いられてきたカメラの多くが半導体シリコンを用いたものであり、シリコンのバンドギャップが 1100 nm に相当する 1.1 eV であることから観察波長域は約 1000 nm が限界である。それより長波長の蛍光を用いたバイオイメージングは筆者らが行った研究以前は行われることがなかった。近年、シリコンを用いた CCD に加え、InGaAs を用いた CCD が比較的容易に手に入るようになった。InGaAs CCD は、800–1700 nm の OTN-NIR におけるイメージングが可能であり、この CCD を用いて適切なイメージングシステムを開発すれば、従来のシステムを遥かにしのぐ深部の観察が可能なイメージングシステムが実現するとの期待が高まってきた。このためには、まず OTN-NIR 波長域において良好な発光を示す蛍光体プローブの開発が不可欠で

曾我公平

1995 年 3 月東京大学大学院工学系研究科材料科学専攻博士課程修了、博士 (工学) 取得。現在、東京理科大学基礎工学部材料工学科教授。同大学総合研究機構がん基盤科学技術研究センター VRG グループリーダー。希土類含有セラミックスの様々なフォトニクス応用とプロセスを手掛ける。

ある。

3. 希土類含有セラミックスと NIR 蛍光

3 価の希土類イオンを含有するセラミックスは、4f 電子遷移による蛍光を示すことが知られている。鉄や銅に代表される遷移金属イオンの電子遷移が最外殻の d 電子軌道内で起こるのに対し、希土類イオンで電子遷移が起こる 4f 電子軌道は、最もエネルギーが高いために部分的に空軌道を有するにもかかわらず最外殻ではなく、さらに外側に存在する充満した $5s^25p^6$ 軌道の電子により遮蔽されている。このため、スペクトルの広がりや準位のシフト、熱緩和をもたらす、外部のイオンや分子からの動的、静的な電場の影響は、典型的な遷移元素の場合よりも小さい。したがって、3 価の希土類イオンの 4f 電子遷移は固体中においてもエネルギー準位幅が原子スペクトル並みに狭く、励起準位寿命が長いことを特徴としている。^{6,7)} これらの特徴により 3 価の希土類イオンをドーブしたセラミックスは既に実用的に用いられている。例えば Nd^{3+} をドーブしたイットリウムアルミニウムガーネット (yttrium aluminum garnet; YAG) は 800 nm の NIR 光を励起光として 1064 nm の OTN-NIR 光を発する高出力固体レーザーの代表格として知られている。⁸⁾ また、 Er^{3+} をドーブした石英系ファイバーは 980 nm の NIR 光を励起光として 1550 nm の OTN-NIR 光を発することによる光ファイバー信号増幅器に用いられて長距離光ファイバー通信において活躍している。⁹⁾ さらに、狭い準位幅と離散的なエネルギー準位構造、比較的弱い熱緩和により、3 価の希土類イオンをドーブした特定のセラミックスは NIR 光を励起光として可視光を発するアップコンバージョン (upconversion; UC) 発光を示すことが知られている。Figure 2 に UC 発光のスキームを示す。¹⁰⁾ 上記の NIR 光を励起光とした NIR 発光では図中の (c) のように通常の蛍光スキームにより発光するが、UC 発光では (a) や (b) のように長い励起寿命のために電子が励起状態に留まっている間に 2 段階目、3 段階目の励起が起き、NIR 励起光よりもエネルギーが高く、波長が短い可視光や紫外光の発光が可能になる。^{11,12)} UC 発光では発光が可視発光であるため、励起光源を半導体レーザーに変更するだけで従来の可視光用の撮像システムが使えるメリットがある。励起光を紫外光や短波長可視光から NIR 光

Fig. 2. Excitation and Emission Processes for Visible Upconversion (a, b) and Normal NIR Emission (c) under NIR Excitation¹⁰⁾

に変更することにより励起光の光散乱、光毒性、色素の退色、自家蛍光など現在の蛍光バイオイメージングの様々な問題を解決することができるため、1990 年代後半よりバイオイメージングへの応用が検討され始めた。¹³⁾ しかし、励起光は NIR 光でも依然蛍光が可視光領域に存在するために強い散乱を受けること、多段階励起のために通常蛍光の NIR 発光よりは励起光率が低いことから、筆者らは NIR 励起 NIR 発光を用いた方が断然有利であることに着目し、蛍光プローブの開発と同時に InGaAs CCD カメラを搭載した蛍光バイオイメージングシステムの製作に着手した。

4. OTN-NIR 蛍光バイオイメージングシステム

現在の蛍光バイオイメージングのシステムには大別して細胞などを観察する顕微蛍光バイオイメージングシステムとマウスなどの小動物などを生きたまま観察する *in vivo* 蛍光イメージングシステムがある。いずれのシステムにおいても NIR 励起光として半導体レーザーを搭載することと、撮像器として InGaAs CCD カメラを搭載することが必要であるが、さらに光量を上げるためのレンズの反射防止コーティングの最適化、励起光を遮断する特殊フィルターの搭載が必要となる。Figure 3 に筆者らが製作した OTN-NIR 顕微蛍光バイオイメージングシステムによる世界初の OTN-NIR 蛍光バイオイメージ

Fig. 3. Bright Field (a) and NIR (1550 nm) Fluorescence (b) Images of *Caenorhabditis elegans* at 980 nm Excitation¹⁴⁾

Fig. 4. OTN-NIR Bioimaging Systems

OTN-NIR microscopic fluorescence bioimaging system (a) and OTN-NIR *in vivo* fluorescence bioimaging system (NIS-OPT, Shimadzu Co.) (b)¹⁰⁾

ングの例を示す。¹⁴⁾ RED-CNP として Er をドーブした YPO_4 を餌とともに食した線虫の消化管のイメージング像である。励起光として NIR 光を用いているため線虫は強い励起光の下でも生きたまま撮像でき、極めて明るい蛍光像が得られている。一方、*in vivo* 蛍光イメージングシステムについては NIS-OPT という装置を島津製作所と共同で開発した

(Fig. 4). イメージングの例としてマウスの脳幹に注射した RED-CNP (Er ドープ Y_2O_3) の OTN-NIR *in vivo* 蛍光イメージング像を Fig. 5 に示す。¹⁵⁾ 頭蓋を開かず、皮膚も切開せずに極めて明瞭に蛍光像が観察されている。別途行った実験では筋肉下 3 cm の蛍光体が観察可能であることが証明されており、現在の *in vivo* 蛍光イメージングの限界が数

Fig. 5. OTN-NIR Fluorescence Imaging of the Brain Stem of a Mouse
 Y_2O_3 : Er/Yb nanoparticles dispersed in PBS buffer were injected through palatine.¹⁵⁾

mmであることを考えると革新的な進歩であると言える。

5. バイオイメージング蛍光体としての RED-CNP

バイオイメージングのための蛍光体としての RED-CNP への要求の第一は、粒径が 10–500 nm 程度の単分散体であることである。バイオイメージングに用いるためには生理環境に相当する 0.15 mol/L 以上のイオン強度の水溶液中で、単分散状態を維持できる必要がある。粒径が 500 nm を超えると、ハンドリングの最中に粒子が沈降を起こし、分散状態を維持することが難しい。また、希土類イオンは水分子や有機分子と直接接触すると励起状態が緩和してしまうため、最低 5 nm 以上の厚さのセラミックスにおおわれている必要があり、これらの要件からまずは 10–500 nm 程度という条件が設定される。細胞の表面を染めたり、消化器官をイメージングする目的では数百 nm の粒径のものが分散安定性を得やすくハンドリングが容易だが、マウスの血中に滞留させたり、細胞にエンドサイトーシスで取り込ませたりするためには 100 nm 以下の粒径が必要となる。^{16,17)} また、粒子毎にほぼ均一な発光強度を示すために粒径の均一性も重要な要素となる。

筆者らは RED-CNP として良好な NIR 励起蛍光を示す Y_2O_3 について均一沈殿法や酵素沈殿法を用いることにより 20–500 nm の均一粒径の Y_2O_3 の作製が可能であることを報告している。¹⁸⁾ また、塩化物を出発原料としたコアシェル製法というユニークな作製方法により数十 nm の粒径の RED-CNP である LaOCl を作製できる。¹⁹⁾ UC 発光のバイオイメージングを目的として 10 nm 程度の粒径で作製が行われてきた NaYF_4 ナノ粒子も、OTN-NIR 蛍

光バイオイメージングで同様に用いることができる。^{15,20)}

6. バイオイメージングのための RED-CNP の生体機能化

6-1. RED-CNP の生体機能化の必要性 ほとんどのセラミックスナノ粒子は表面に正か負の電荷を持っており、純水中ではシングルナノで作製しても分散状態が得られる。しかし、生体環境に相当するイオン性の水溶液では、表面にイオンをまとうことで表面電荷が打ち消され、特に数百 nm 以下の粒径の粒子の場合はその大きな比表面積による表面エネルギーを減らすために凝集し、沈降してしまう。これを防ぐためには親水性高分子を表面に導入することにより高分子の立体反発を利用して分散状態を維持しなければならない。また、バイオイメージングでは標的とする物質のみに付着して蛍光性を持たせる必要がある。他の部位に粒子が付着して蛍光を発することは望ましくない。したがって非特異的に細胞や生体の各部に付着することがないように工夫する必要がある。さらには標的特異的な相互作用によって特定の細胞や組織に蛍光性を付与するためにはリガンド分子や抗体が機能し得る状態で粒子の表面に導入されなければならない。筆者らは立体反発による粒子の分散安定化と細胞や生体との非特異的な相互作用の抑制に効果があり、毒性が低いことで知られるポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) を粒子表面に様々な方法により導入している。血管造影などを目的とする場合は PEG の導入のみで十分であるが、さらに特異的な相互作用を付与するために有効な分子の導入も行っている。Figure 6 に RED-CNP の様々な表面修飾スキームをまとめる。^{21,22)} 以下にこれら各スキームを用いた

Fig. 6. Various Schemes for the Surface Modification of RED-CNP by Biofunctional Polymers and Ligand Molecules^{20,21)}

Fig. 7. Structural Formula of Biotinyl-PEG-*b*-PAMA¹⁴⁾

表面修飾について解説する。

6-2. アイオノマーと PEG のブロック共重合体を用いる方法 RED-CNP として最も粒径制御性が高く筆者らが様々な合成方法を検討してきた Y_2O_3 ナノ粒子の表面は中性条件では正に帯電することが知られている。一方, Fig. 7 に示した biotinyl-PEG-*b*-poly(2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate) (biotinyl-PEG-*b*-PAMA) は酸性では正に, アルカリ性では負に帯電し得るイオン性高分子 (アイオノマー) である PAMA 鎖と PEG のブロック共重合体であり, さらに PEG の末端にストレプトアビジンと相互作用するビオチンを有している。筆者らはまず Y_2O_3 ナノ粒子表面を負に帯電するカルボキシル基の連鎖からなるポリアクリル酸 (poly(acrylic acid); PAAc) で被覆し, この負の電荷と PAMA の正の電荷との相互作用により, PEG 末端にビオチンを有する表面修飾を施した Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子を作製した。Figure 6 ではスキーム

(a) に相当する。この修飾方法を用いると, 生理食塩水やバッファー中などの生体環境に相当するイオン強度の水溶液中で高い分散安定性を示すとともに, Fig. 8 に示すようにストレプトアビジンと選択性の高い相互作用を示すことが分かった。¹⁴⁾ この例では負に帯電した PAAc と正に帯電した PAMA の二重のアイオノマーで修飾しているが, さらに単純かつ簡便な修飾を行うために, 負に帯電する PAAc と PEG とのブロック共重合体である PEG-*b*-PAAc による Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子の直接的な表面修飾を試みた。この際, 特異的な相互作用を導入するため, 上記の例とは逆にストレプトアビジンを粒子表面に吸着させた。²³⁾ これは Fig. 6 ではスキーム (b) に相当する。Figure 9 に示すように, このような修飾スキームでも Y_2O_3 ナノ粒子は良好な分散安定性とビオチンとの特異的な相互作用を示すことが明らかになった。¹⁵⁾ 近年では PAAc とは異なる負に帯電するアイオノマーブロックとして poly(4-vinylben-

Fig. 8. Specific Interaction of Y_2O_3 Nanoparticles Modified with Biotinyl-PEG-*b*-PAMA

UC emission intensities from the blank, BSA and avidin plates soaked in sample suspension (a) Y, (b) YA and (c) YAPB. Fig. (d) shows the relation between the concentration of the avidin for preparing the avidin plate and the UC emission intensity. The UC emission was measured under 980-nm LD laser excitation by monitoring 550-nm UC emission with a fluorescent microscope. The protein plates (a)–(c) were prepared with 3 mg/mL protein solution.¹⁴⁾

zylphosphonate) (PVBP) と PEG とのブロック共重合体である PEG-*b*-PVBP の合成とその OTN-NIR *in vivo* バイオイメージングへの応用が報告されている。²⁴⁾ Figure 10 に PEG-*b*-PVBP により表面修飾を施した Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子を用いた, OTN-NIR *in vivo* 蛍光バイオイメージングの例を示す。

6-3. シランカップリング剤を用いる方法

Figure 6 のスキーム (c) では, Y_2O_3 ナノ粒子表面の Y-OH とアミノプロピル基を有するシランカップリング剤である 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTES) との脱水縮合により, 粒子表面にアミノ基を導入し, さらに片末端にアミド結合のための *N*-hydroxysuccinimide (NHS) を持ち, もう一方に RGD ペプチドを導入するためのマレイミド (maleimide; MA) を持つ PEG, NHS-PEG-MA を反応させることで, RGD ペプチドを末端に有する PEG を Y_2O_3 ナノ粒子表面に導入している。^{25,26)} この方法では粒子表面にアミノ基を導入するため, NHS-

Fig. 9. Specific Interaction of Y_2O_3 Nanoparticles Modified with PEG/Avidin

(A) Upconversion luminescence of surface-modified Y_2O_3 nanoparticles on a biotinylated antibody plate. (a–d) Biotinylated antibody plate containing 0, 1, 10, and 50 μg of antibody, respectively. (B) Upconversion luminescence of surface-modified particles on an unbiotinylated antibody plate. (a–d) Unbiotinylated antibody plate containing 0, 1, 10, and 50 μg of antibody, respectively. (C) Numeric analysis result of the upconversion luminescence of surface-modified UNP2s on the biotinylated antibody plate: (●) PEG/avidin, (▲) avidin, (□) PEG and (◇) native Y_2O_3 . (D) Numeric analysis result of the upconversion luminescence of surface-modified Y_2O_3 nanoparticles on the unbiotinylated antibody plate. (●) PEG/avidin, (▲) avidin, (□) PEG and (◇) native Y_2O_3 . (Fluorescence microscopy observation: excitation wavelength, 980 nm; laser strength, 580 mW; room temperature).²³⁾

PEG-MA のみならず様々な NHS 基を有する機能性分子の導入が可能である。こうして作られたプローブは Fig. 11 に示すように integrin $\alpha_v\beta_3$ を多く発現している U87MG 細胞に特異的に蛍光性を付与できることが示された。

6-4. リポソームへの RED-CNP の包含 Figure 6 のスキーム (d) に示したのは, リポソームに RED-CNP を包含するスキームである。リポソームはドラッグデリバリーなどにおいて既によく用いられている材料だが, 血中滞留性の高い蛍光プローブを作製する目的や, リポフェクションにより蛍光体を細胞内へ送り込む目的, さらにはドラッグデリバリーそのものの挙動を *in vivo* 蛍光イメージングにより追跡する目的でも RED-CNP を包含することで様々な応用が期待される。筆者らはまず, 粒径約 150 nm の Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子に分散安定性の付与を目的として PEG-*b*-PAAc による PEG 修飾を施

Fig. 10. *in vivo* Near-Infrared Imaging of Living Mouse with Intravenous Injection of PEG-YNPs

(a) Whole body and (b) various organs (emission measurement: room temperature; excitation wavelength, 980 nm; laser strength, 700 mW cm^{-2}).²⁴⁾

し、これを分散した HEPES バッファーを用いて water-in-oil (W/O) エマルジョンを作製し、さらに複合エマルジョン法でアニオン性、カチオン性、PEG 修飾の 3 種の RED-CNP 内包リポソームを作製した。²⁷⁾ Table 1 にリポソームの組成を、Fig. 12 には得られた RED-CNP 内包リポソームの SEM 画像を示す。Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子がリポソームに内包されていることがわかる。Figure 13 に示すように蛍光顕微鏡を用いると、リポソームから UC 発光、NIR 発光ともに良好な蛍光が観察された。PEG 化 (PEGylation) したリポソームを作製する際には、さらに DPPE-biotin を混合することでビオチンによるアビジンへの特異吸着性の付与を試みた。Figure 14 に Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子、PEG 化リポソーム、PEG 化リポソームにビオチンを導入したリポソームについて、アビジンプレートを用いたプレートアッセイにより特異吸着能を評価した結果を示す。Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子は、アビジンプレートとコントロールとして使用した BSA プレートに非特異的に吸着するのに対し、PEG 化のみを行ったリポソームではいずれとも相互作用しない。PEG とビオチンをリン脂質を用いてリポソーム表

Fig. 11. *in vitro* Staining of Human Glioblastoma U87MG (High Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression) and Human Breast Cancer MCF-7 (Integrin $\alpha_v\beta_3$ Negative) Using RGD-modified Nanoparticles (RGD-PEG-Er- Y_2O_3)

Staining of U87MG with unmodified PEG-Er- Y_2O_3 nanoparticles is also shown as a control. All fluorescence images were acquired under the same condition and displayed under the same scale. The nanoparticles were excited using an IR laser ($\lambda_{\text{ex}}=980$ nm) and an upconversion emission between 660 and 740 nm was observed. The scale bar represents 20 μm .²⁴⁾

Table 1. Composition of Solution for the Liposome Injected to Mouse (mol%)

Liposome	DPPC	Cholesterol	Additive	Amount
Anionic	40	40	DPPG	20
Cationic	40	40	Stearylamine	20
PEGylated	50	40	PEG-DSG	10

面に導入することにより、BSA プレートには吸着せず、アビジンプレートにのみ吸着する RED-CNP 内包リポソームが得られたことがわかる。

上記の方法で得られたリポソームのうちアニオン性表面のリポソームは負に帯電した細胞とは相互作用しないのに対し、カチオン性表面のリポソームを用いると負に帯電した細胞と融合し、リポフェクションにより Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子を細胞内部に送り込むことができる。²⁸⁾ Figure 15 は PEG 修飾を施した Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子と未修飾の Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子をそれぞれカチオン性リポソーム

Fig. 12. FE-SEM Images of Liposome Encapsulating $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}$ Nanoparticles

Accelerating voltages are (a) 1 kV and (b) 10 kV.²⁵⁾

に内包し、Huh-7細胞にリポフェクションした結果である。細胞を十分に洗浄した後も NIR 蛍光が観察されたことから Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子は細胞内部に取り込まれていると考えられ、今後細胞内部でのナノ粒子の挙動や、小動物体内での細胞の挙動の追跡に有用な蛍光性の細胞が得られたと考えられる。

現在報告されている方法で、多くの場合 Y_2O_3 ナノ粒子は親水性溶媒中に分散した状態で得られるのに対し、10 nm 程度の粒径の Er ドープ NaYF_4 は疎水性溶媒に分散した状態で得ることができる。²⁰⁾ 筆者らはこの性質を利用して、 Er ドープ NaYF_4 をリン脂質二重層の疎水性膜内に取り込むことで、脂質膜内に粒径約 10 nm の Er ドープ NaYF_4 を内包した粒径約 110 nm の PEG 化リポソームと、水層内に粒径約 140 nm の Er ドープ Y_2O_3 ナノ粒子を内包した粒径約 450 nm の PEG 化リポソームを作製し、マウス体内での挙動を OTN-NIR *in vivo* 蛍光

Fig. 13. Fluorescence Microscope Images of Liposome Encapsulating $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}$ Nanoparticles

Imaging schemes are (a) bright filed image, (b) UC fluorescence image, (c) (a) + (b) and (d) NIR fluorescence image.²⁵⁾

Fig. 14. Evaluation of the Specific Interaction of Liposome Encapsulating $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}$ Nanoparticles by Fluorescence Plate Assay on Strept Avidin and BSA Plates

Bare $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}$ nanoparticles, liposome, liposome modified with PEG, and liposome modified with PEG and biotin were compared.²⁵⁾

イメージングシステムで観察した。¹⁵⁾ Figure 16 にそれぞれの粒子と粒子内包リポソームの SEM 像を示す。得られたリポソームをマウスの尾静脈から注射した後、1 時間及び 24 時間の OTN-NIR *in vivo* 蛍光イメージング画像を Fig. 17 に示す。リポソームの粒径により経時的な肝臓への集積が異なっていることがわかる。

以上のように RED-CNP 内包リポソームは、粒径制御が可能で、リン脂質膜表面に様々な機能性の

Fig. 15. Detection of Lipo- Y_2O_3 in the Intracellular Region of Cancer Cells

Huh-7 cells were incubated with 0.05 mg/mL Lipo- Y_2O_3 or PEG- Y_2O_3 -CNP at 37°C for 6 h. The cells were examined under a fluorescence microscope equipped with a 980 nm laser diode for the NIR excitation source. Scale bars represent 30 μm .²⁶⁾

Fig. 16. FE-SEM Images of (a) Y_2O_3 : Er/Yb Nanoparticles, (b) NaYF_4 : Er/Yb Nanoparticles, (c) Y_2O_3 -Lipo and (d) NaYF_4 : Lipo¹⁵⁾

分子や高分子を導入することが可能なだけでなく、リポフェクションにより RED-CNP を細胞内に送達することが可能なため、バイオイメージングの様々なシーンにおいて有用な材料であると考えられる。

7. OTN-NIR 蛍光バイオイメージングの医療応用

これまでの研究で、OTN-NIR 蛍光を用いると、数 cm の動物組織を透過した蛍光イメージングが可

能であることが示された。²⁹⁾ 筆者らはこの高い生体透過性の医療への応用に取り組んでいる。硬性内視鏡である腹腔鏡を用いた手術は、患者に対し低侵襲な外科手術の方法として一般化しつつあるが、大腸がんの手術においては、軟性内視鏡を用いて大腸内部から患部をマーキングし、硬性内視鏡を用いて大腸外部の腹腔から患部を切除する手術が行われている。現在マーキングには墨汁が用いられている。墨

Fig. 17. *in vivo* OTN-NIR Fluorescence Images of Mice at 1 h or 24 h after Injection of Y₂O₃-Lipo and NaYF₄-Lipo
Excitation and emission wavelengths are 980 and 1550 nm, respectively.¹⁵⁾

Fig. 18. NIR Fluorescent Clips

Bright-field (1, 2) and NIR fluorescence (3, 4) images of Y₂O₃: YbEr-nanoparticle-coated clips (1, 3) and those set inside swine colon (2, 4). Observations of (2) and (4) are from outside of the colon. Hybrid image of the Y₂O₃: YbEr-nanoparticle-coated clips set in swine colon (5) is shown. Arrows in (2), (4) and (5) show the position of the clip inside swine colon.

は腸壁を拡散する性質があるために、大腸内部から軟性内視鏡を用いて注射すると患部が染色され、墨が大腸外部まで拡散するために腹腔鏡により大腸外部から患部の特定が可能である。しかし、これは墨

の腸壁における高い拡散能を利用している以上、患部周辺に広がりを持つことは避けようがなく、さらに小領域で視認性の高いマーキング方法の開発が望まれている。筆者らは OTN-NIR 蛍光を示す RED-

CNP を大腸がんのマーキング剤として用い、OTN-NIR の観察が可能な腹腔鏡を用いて患部を特定し、より正確で小領域の切除が可能な技術の開発に取り組んでいる。³⁰⁾ Figure 18 に示したのは内視鏡用のクリップに NIR 蛍光体を付与して豚の大腸内部に埋み、InGaAs CCD カメラで腸の外部からイメージングを行った例である。損失の少ない NIR 蛍光は大腸の外部からでも明瞭に観察することができ、今後新たな大腸がんのマーキングの手段としての更なる開発が期待される。

8. まとめ

生体試料で高い光透過性を持つ OTN-NIR 波長域における新たな蛍光バイオイメージングの、蛍光プローブとシステムの開発について紹介した。特に *in vivo* イメージングにおいては従来の数 mm を遙かに上回る数 cm の観察深度が達成され、次世代の蛍光イメージングの波長域として大いに期待される。また、この波長域における蛍光体として RED-CNP は有用であり、様々な表面修飾やリポソームへの包含により、生命、薬学研究領域や医療への応用が広がりつつある。

REFERENCES

- 1) “Application of Quantum Dot in Life Science,” ed. by Yamamoto S., CMC Publishing CO., LTD., Tokyo, 2007.
- 2) Schaafsma B. E., Sven J., Mieog D., Hutteman M., van der Vorst J. R., Kuppen P. J. K., Löwik C. W. G. M., Frangioni J. V., van de Velde C. J. H., Vahrmeijer A. L., *J. Surg. Oncol.*, **104**, 323–332 (2011).
- 3) Ma Q., Su X., *Analyst*, **135**, 1867–1877 (2010).
- 4) “Iyou Butsurigaku,” eds. by Iinuma T., Inaba S., Fujiwara H., Ishiyaku Publishers, Inc., Tokyo, 1998, p. 162.
- 5) Anderson R. R., Parrish P. A., *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 13–19 (1981).
- 6) Kushida T., “Hikari Bussei Butsurigaku,” Asakura Publishing Co., Ltd., Tokyo, 1991.
- 7) Soga K., “Nanostructured Materials for Bio-medical Applications,” eds. by Tan M. C., Chow G. M., Ren L., Transworld Research Network Publishers, New Delhi, 2009, pp. 223–241.
- 8) Powell R. C., “Physics of Solid State Laser Materials,” Springer, New York, 1998.
- 9) “Optical Fiber Amplifiers: Materials, Devices, and Applications,” ed. by Sudo S., Artech House Publishers, Norwood, 1997.
- 10) Soga K., *Dojin News*, **141**, 6–11 (2012).
- 11) Soga K., Kamimura M., Nagasaki Y., *Oyo Buturi*, **77**, 1458–1461 (2008).
- 12) Soga K., *Bunseki*, 37–44 (2012).
- 13) Zijlmans H. J. M. A. A., Bonnet J., Burton J., Kardos K., Vail T., Niedbala R. S., Tanke H. J., *Anal. Biochem.*, **267**, 30–36 (1999).
- 14) Soga K., *Bunseki Kagaku*, **58**, 461–471 (2009).
- 15) Soga K., Tokuzen K., Fukuda K., Hyodo H., Hemmer E., Venkatachalam N., Kishimoto H., *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **25**, 57–62 (2012).
- 16) Alexis F., Pridgen E., Molnar L. K., Farokhzad O. C., *Mol. Pharm.*, **5**, 505–515 (2008).
- 17) Nishiyama N., Kataoka K., *Adv. Polym. Sci.*, **193**, 67–101 (2006).
- 18) Venkatachalam N., Saito Y., Soga K., *J. Am. Ceram. Soc.*, **92**, 1006–1010 (2009).
- 19) Konishi T., Shimizu M., Kameyama Y., Soga K., *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, **18**, S183–S186 (2007).
- 20) Wang L., Li Y., *Chem. Mater.*, **19**, 727–738 (2007).
- 21) Soga K., *J. Jpn. Soc. Biomater.*, **29**, 95–103 (2011).
- 22) Soga K., “Encyclopedia of Advanced Biomaterials,” NTS Inc., Tokyo, 2012, pp. 482–485.
- 23) Kamimura M., Miyamoto D., Saito Y., Soga K., Nagasaki Y., *Langmuir*, **24**, 8864–8870 (2008).
- 24) Kamimura M., Kanayama N., Tokuzen K., Soga K., Nagasaki Y., *Nanoscale*, **3**, 3705–3713 (2011).
- 25) Zako T., Nagata H., Terada N., Sakono M., Soga K., Maeda M., *J. Mater. Sci.*, **45**, 5325–5330 (2008).
- 26) Zako T., Nagata H., Terada N., Utsumi A., Sakono M., Yohda M., Ueda H., Soga K., Maeda M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **381**, 54–58 (2009).
- 27) Soga K., Tokuzen K., Tsuji K., Yamano T., Hyodo H., Kishimoto H., *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2673–2677 (2010).

-
- 28) Akiyama H., Tokuzen K., Otsuka H., Soga K., Tashiro F., *J. Phys. Conf. Ser.*, **232**, 012001 (2010).
- 29) Soga K., Tokuzen K., Tsuji K., Yamano T., Venkatachalam N., Hyodo H., Kishimoto H., *Proc. SPIE*, **7598**, 759807–1–9 (2010).
- 30) Zako T., Hyodo H., Tsuji K., Tokuzen K., Kishimoto H., Ito M., Kaneko K., Maeda M., Soga K., *J. Nanomater.*, 1–8 (2010).