硬 X 線励起で可視光発光を示すプローブの開発

小阪田 泰子

The Development of Luminescent Nano-probes on Hard X-ray Irradiation

Yasuko Osakada

*The Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University;
Mihogaoka 8-1, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan.*

(Received August 4, 2015)

X-rays are widely used in imaging applications such as diffraction imaging of crystals and medical imaging. In particular, X-ray computed tomography (CT) is a critical tool for clinical and disease diagnostics. The principle of conventional CT is based on X-ray attenuation caused by photoelectric absorption and scattering. In addition to conventional CT, a number of novel methodologies are presently under development, including state-of-the-art instrument technologies and chemical probes to fulfill diagnosis criteria. Among these novel methodologies, we have utilized hard X-ray-excited optical luminescence (hXEOL) as a new methodology to enhance the contrast of the image. Herein, we explored the possibility of hXEOL *via* iridium-doped polymer nanoparticles and biomolecule-directed metal clusters and propose it as a potential platform for new X-ray imaging.

Key words—X-ray imaging; hard X-ray excited optical luminescence; nano-materials

はじめに

X 線は、工業応用や医療用のイメージングなど様々な分野で利用されている。¹⁾特に、後者の医療応用では、コンピュータ断層撮影 (computed tomography; CT) に代表されるように、その生体への透過性の高さから、イメージングのツールとして、臨床診断に重要な役割を果たしている。この通常の CT イメージングでは、作用原理として、主に硬 X 線の組織による吸収を利用し、その吸収の差をコントラストとして表すことで組織画像を取得する。しかしながら、吸収の差異が明瞭でない場合も多く、検体を、より明瞭に表すことのできる画像化手法の開発・高感度化が求められている。そんな中、近年、この CT の高感度化を目指し、特に、作用原理となる新規手法の提案がなされた。例えば、新規手法の 1 つとして、硬 X 線の関連する物理化学的素過程である、X 線蛍光や、X 線励起光学発光が着目されている。後者の X 線励起発光に着目

すると、その素過程自身は、X 線を検出するシンチレーターの動作原理として用いられている。ただし、固体状態での発光に関する研究が多く、2012 年の研究開始当時、生体イメージングを志向したものは、水溶性の低い無機のシンチレーター粒子等に限られていた。²⁾つまり、水溶液中で、生体適合性が高く、さらに硬 X 線照射でコントラストよく発光するプローブの研究例はあまりなく、新規なナノプローブの開発が望まれていた。そこで、筆者らは、硬 X 線励起発光に基づく新規プローブとして、金属錯体をドーピングしたポリマーナノ粒子 (P-dots) や、生体分子に内包された金属クラスター等のナノ材料が、硬 X 線励起発光を示す材料として有望であることを見い出したので報告する。

1. イリジウム錯体を含む P-dots での硬 X 線励起発光³⁾

生体透過性の高い硬 X 線を励起光源として、自在にナノプローブを光らせ、イメージングに応用することは可能であろうか？もし実現すれば、イメージングのみならず、発生した発光を光反応に利用するといった様々な応用展開が考えられる。しかしながら、硬 X 線発光に関する基礎的知見に乏しく、基礎的研究が必要であると考えた。そこで、ま

大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1)

e-mail: yosakada@sanken.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 135 年会シンポジウム S27 で発表した内容を中心に記述したものである。

ず、プローブの設計に当たり、X線との相互作用が可能な電子密度の比較的高い金属元素を利用すること、また、発光が可視光に顕著に現れることなどを条件とし、その候補として、比較的电子密度の高い遷移元素錯体の1つである、イリジウム錯体を用いることを考えた。

P-dots は、近年、生物イメージングに用いられ始めた、発光性ナノ粒子の総称である。このP-dots は、粒子内部に、金属錯体などの様々な分子をドープすることができ、その発光特性を制御することが可能である。さらに、ポリマー自身は、X線などを含む放射線を検出する、固体状態でのシンチレーター材料として用いられることが多い。このことから、われわれは、P-dots にイリジウム錯体をドープすることで、イリジウム錯体やポリマーがX線と相互作用し、最終的に硬X線励起発光が観察されると仮説し、実験を行った (Fig. 1)。

まず、P-dots にイリジウム錯体をドープし、イリジウム錯体含有の発光性のP-dots を作製した。作製方法には、有機溶媒中にポリマーとイリジウム錯体を溶解し、その有機溶媒を水中に分散させ合成する、沈殿法を用いた。また、P-dots の構成要素となるポリマーには、上記のポリビニルカルバゾールと、両親媒性のPEGポリマーを用い、最終的に生じるP-dots の水溶性を向上させた。最初に、透過型電子顕微鏡で、合成したP-dots のサイズを調べた。その結果、イリジウム錯体をドープしたP-dots は、およそ35 nm程度のサイズ分布を有することが分かり、また含有しないものと比較したときの像のコントラストの増強程度から、イリジウム錯体がP-dots に内包されていることが示唆された。次に、定常状態での発光スペクトルを調べたところ、510 nm付近に発光極大を有することが観察された。この発光強度を、同濃度でのイリジウム錯体のトルエン溶液と比較したところ、5倍程度、高強度に発光していることが明らかになった (Fig. 2)。また、蛍光寿命測定から、イリジウム含有P-dots 由来の発光寿命は酸素に依存しないことが分かり、上記の発光の増強は、酸素との消光が阻害されたためであると結論した。つまり、本研究で用いたイリジウム錯体の単体は、酸素で消光されるため、通常のイメージングには使うことができなかったが、ポリマーナノ粒子中にドープすることで、酸

Fig. 1. The Design of X-ray Induced Luminescence of P-dots Doped with a Cyclometalated Ir (III) Complex

Reproduced with permission, copyright 2013, Royal Society of Chemistry.³⁾

Fig. 2. UV-vis Absorption Spectra, and Emission Spectra of P-dots Excited at 400 nm

Samples were doped with the Ir (III) complex [0, 200, 300, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in THF solution for the synthesis]. Reproduced with permission, copyright 2013, Royal Society of Chemistry.³⁾

素の有無に関係なく発光を示すことが分かった。

この可視光領域に発光を示すP-dotsが、硬X線励起でも発光を示すか、実際に硬X線を照射し、発光をEM-CCDカメラで撮影することにより調べた。X線源としては、50 kVp, 30 mAの硬X線源を用いた。サンプルは、それぞれ、1.5 mLのチューブに水溶液を入れ、チューブラック上に設置した。X線を横方面から照射し、発光スペクトルを上部から観察することで、硬X線照射による発光イメージを測定した。コントロールのサンプルとして、1. 水、2. イリジウム錯体をドープしなかったP-dots、4. THF、5. ポリマーとイリジウム錯体の

小阪田泰子

大阪大学産業科学研究所 助教。2009年大阪大学工学研究科応用化学専攻博士後期課程修了、日本学術振興会海外特別研究員、科学技術振興機構・さきがけ研究者、京都大学物質・細胞統合システム拠点特定拠点助教を経て、2014年より現職。光と物質の相互作用を基盤とした材料・生物応用に関する研究を展開中。

Fig. 3. (a) Representative Image of X-ray Induced Luminescence (top) and Bright Field Image (bottom), (b) The Relative Radio-luminescence Yield of Samples Shown in (a), (c) Luminescence Spectrum of P-dots upon X-ray Irradiation

(a) 1; water, 2; non-doped P-dots, 3; Ir(III) complex-doped P-dots ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), 4; THF, 5; Ir(III) and polymers dissolved in THF (the same amount as P-dots, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Reproduced with permission, copyright 2013, Royal Society of Chemistry.³⁾

Fig. 4. X-ray Excited Optical Luminescence Was Characterized to Investigate the Hypothesis That Hard X-ray-induced Optical Luminescence Would Be Induced *via* ssDNA-, Lyz-, and BSA-directed Metal Clusters

Reproduced with permission, copyright 2014, Royal Society of Chemistry.⁴⁾

THF 溶液を用いたところ、それぞれ、X 線照射による明瞭なシグナルの増強は観察されなかった。一方、上記の 3. イリジウム錯体をドーピングした P-dots では、明瞭なコントラストが観察され、その程度はおよそ 10 倍程度であった。また、その X 線励起による発光スペクトルを測定したところ、硬 X 線励起発光スペクトルは、定常状態でのイリジウム錯体の発光に一致し、このイリジウム錯体をドーピング

Fig. 5. X-ray Excited Optical Imaging and Spectra in Solution

(a) Images upon X-ray irradiation. From left; blank, water, Ag_x-ssDNA, Au₈-Lyz and Au₂₅-BSA clusters. (b) Relative luminescence intensity upon X-ray irradiation. (c) X-ray excited optical luminescence spectra of Au₂₅-BSA clusters. Reproduced with permission, copyright 2014, Royal Society of Chemistry.⁴⁾

た P-dots は、確かに硬 X 線照射によって発光することが、実証された (Fig. 3)。以上から、このイリジウム錯体含有 P-dots は、水に溶解し生体適合性があることから、生体イメージングへの応用の可能性が示された。

2. 生体分子により内包された金クラスターでの硬 X 線励起発光⁴⁾

次に、硬 X 線を吸収し発光する分子の候補として、発光性の金属クラスターに着目した。特に、金属錯体と同様に、重原子を含み、可視光領域に発光を示す、生体適合性の高い生体分子により内包された金属クラスターが、硬 X 線励起発光を示すのではないかと考えた。本研究では、可視光励起で発光することが知られている一本鎖 DNA-銀クラスター (Ag_x-DNA)、リゾチーム-金クラスター (Au₈-Lyz) 及びウシ血清由来アルブミン-金クラスター (Au₂₅-BSA) において、硬 X 線励起で可視光領域の発光がみられるかどうかを、硬 X 線照射により調べた

(Fig. 4).

まず、紫外光 (365 nm) 照射による、定常状態での発光を調べた。365 nm の光照射によって、それぞれ可視光領域に明瞭な発光が観察された。それらの発光色は、目視で、Ag_x-DNA は赤白色、Au₈-Lyz は青色、及び Au₂₅-BSA は赤白色であった。また、定常状態の発光スペクトル測定から、それぞれの発光極大は、607, 421 及び、667 nm であった。さらに、発光量子収率測定から、Ag_x-DNA が、紫外・可視領域の光による励起によって、最も効率よく発光することが示された。

次に、これらの生体分子に内包された金属クラスターから硬 X 線励起発光が観察されるか、上記のイリジウムの系と同様の測定系で、発光観察実験を行った。その結果、Ag_x-DNA, Au₈-Lyz では目立った可視光領域の発光は確認されなかった。一方、Au₂₅-BSA では、明瞭なコントラストが確認された。また、この発光のスペクトル測定を行った結果、可視域の発光は、定常状態での発光と一致し、Au₂₅-BSA に由来することが示された。以上のことから、硬 X 線励起により、Au₂₅-BSA は可視光領域の発光を示すことが分かった。このことは、硬 X 線励起発光は、これまで光源に用いられてきた紫外線や可視光励起によってみられる発光とは、全く異なった挙動を示唆するものである (Fig. 5)。

これらの X 線励起によって、可視光領域にみられる発光のメカニズムは、多段階のカスケード反応を経ると考えられる。用いた硬 X 線のエネルギーは、内殻 L3 吸収端のエネルギー (イリジウム 約 11 keV, 金 約 12 keV) よりも高エネルギー側で、内殻電子をイオン化する。その後、イオン化によって形成されたホールは、浅い内殻電子や価電子により脱励起される。この脱励起過程放出されるエネルギーは、蛍光 X 線やオーージェ過程に使われ、さらに、重原子殻や金属含有分子の励起に使用される。多段階のカスケードを経て、最終的に、可視領域の発光へと至ると考察される。今後は、この詳細なメカニズムの直接観察などによる高効率化、多色化に向けた基礎的研究に加え、発光を利用した生体イメージング・操作法の開発を進める必要がある。

おわりに

本研究では、イリジウム錯体をドープした P-

dots や、生体分子に内包された金属クラスター等のナノ材料が、硬 X 線励起発光を示す材料として有望であることを見出した。最近の Lei らの研究によると、X 線励起発光の発光波長は可視域に限られるものではなく、1500 nm 程度の近赤領域においても観察されることが見いだされた。⁵⁾ また、この発光をエネルギードナーとして用い、光増感剤分子を光励起することで、一重項酸素を発生させる試みもなされている。⁶⁾ このことから、X 線励起発光は、イメージングのみならず、生体深部での光治療への応用の可能性も秘めている。今後、さらに医薬と異なる小分子を駆使し、X 線励起による発光に関する研究は、細胞機能のイメージングや操作方法へと展開していくことが期待される。

謝辞 本研究は、スタンフォード大学 Lei Xing 教授, Guillem Pratx 准教授との共同研究に基づきます。共同研究者の皆様に感謝申し上げます。なお本稿で紹介した研究は、JST さきがけ、及び、ATI 新世代研究所等の研究助成による下で行われました。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Chen H., Rogalski M. M., Anker J. N., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 13469–13486 (2012).
- 2) Sun C., Pratx G., Carpenter C. M., Liu H., Cheng Z., Gambhir S. S., Xing L., *Adv. Mater.*, **23**, H195–H199 (2011).
- 3) Osakada Y., Pratx G., Hanson L., Solomon P. E., Xing L., Cui B., *Chem. Commun.*, **49**, 4319–4321 (2013).
- 4) Osakada Y., Pratx G., Sun C., Sakamoto M., Ahmad M., Volotskova O., Ong Q., Teranishi T., Harada Y., Xing L., Cui B., *Chem. Commun.*, **50**, 3549–3551 (2014).
- 5) Naczynski D. J., Sun C., Turkcan S., Jenkins C., Koh A. L., Ikeda D., Pratx G., Xing L., *Nano Lett.*, **15**, 96–102 (2015).
- 6) Chen H., Wang G. D., Chuang Y.-J., Zhen Z., Chen X., Biddinger P., Hao Z., Liu F., Shen B., Pan Z., Xie J., *Nano Lett.*, **15**, 2249–2256 (2015).