レーザーアブレーションを用いた 希土類添加ナノバイオ蛍光プローブ作製

大阪大学 基礎工学研究科 助教 新岡宏彦 (平成 25 年度奨励研究助成 AF-2013217)

キーワード:細胞イメージング、蛍光プローブ、レーザーアブレーション

1. 研究の目的と背景

近年の蛍光顕微鏡技術の進歩は凄まじく、2 光子顕微鏡、 超解像顕微鏡、一分子イメージング等に代表されるよう、 生きた試料から生体分子や細胞の情報を引き出してきた。 蛍光プローブについても、蛍光蛋白質、量子ドット、金属 ナノクラスター等枚挙に暇が無く、多様化し、様々な現象 が見えるようになってきている。しかしながら、これらプ ローブの殆どは可視光を使った計測に限定される。そのた め、生体への透過性が低く、生体深部イメージングには適 さなかった。

近赤外光は生体の窓と呼ばれる波長域に属し、水や生体 分子によって引き起こされる光散乱や 吸収の影響が低く、 生体に対する透過性が非常に高い^{1).2)}。また、励起光によ って発生する自家蛍光の影響や光毒性も少ない(図 1)。私 のグループではこれまでに、酸化イットリウム(Y_2O_3)に希 土類イオンを導入した 3 種の希土類蛍光発光プローブ Y_2O_3 :Tm, Yb、 Y_2O_3 :Ho, Yb、 Y_2O_3 :Er, Yb(以下、蛍光体)の合成 を行なって来た経緯がある。980 nm の近赤外光励起によ りそれぞれ 800 nm、1200 nm、1550 nm 付近で発光するこ とを確認した(図 2)。

それぞれの蛍光体はゾルゲル法によって合成を行なっ たが、粒径が数 µm 程度と大きく細胞染色には不向きであ った。特に、細胞のエンドサイトーシス(食作用)を用いた 細胞への蛍光体導入では、粒径はおよそ 100 nm 以下であ ることが望ましい。従って本研究では、粒径 100 nm 以下 の蛍光体作製を目的とし、液相レーザーアブレーション (Liquid-phase Laser Ablation (LLA))法による蛍光体の 微細化を行なった。さらに、得られた蛍光体を用いて培養 細胞の近赤外イメージングを行なった。



図1 近赤外光による生体深部イメージング



図 2 三種の蛍光体それぞれの近赤外蛍光体の発光スペク トル (980 nm 励起)

2. 実験方法

2.1 蛍光体の合成

蛍光体の作製にはゾルゲル法を用いた。ゾルゲル法は原料 の入った溶液(ゾル)を高温で熱処理し、水分を蒸発させる ことでゲルとした後、さらに高温で熱処理することにより 酸化物を得る方法である。まず始めに、0.264gのグルタ ミン酸と希土類硝酸塩をアルミナるつぼ中で15 mlの超純 水に溶解させた。このとき、希土類硝酸塩中の希土類元素 が合計 0.09 mol となるように計量した (例えば Y₂0₃:Tm(0.2%),Yb(10%)を作製する場合、Y:Tm:Ybの mol 比 が 189.8:0.2:10 となるようにする。リチウムを加えると きも同様であり、リチウム硝酸塩を用いる)。80℃で1時 間加熱し、希土類硝酸塩とグルタミン酸を溶解した。その 後、120℃ 2 時間で溶液をゲル化させ、るつぼを電気炉へ 移し、900℃で3 時間大気焼成させることにより、蛍光体 の粉末を得た。

2.2 レーザーアブレーションによる蛍光体の微細化

蛍光体微細化のために、LLA 法を用いた。LLA 法は高強度 のパルスレーザーを集光した際に生じるプラズマや衝撃 波を用い、液中ナノ粒子の微細化/分散化を行なう手法で ある³⁾。図 3 はその光学系である。光源として、ナノ秒 Nd:YAG レーザー(繰り返し周波数 10 Hz, New wave research, Tempest)の2倍波を、ペランブロッカプリズム を用いて選択し、単レンズ(F=100 mm)により蛍光体試料へ 集光した。このとき、蛍光体試料は超純水中に分散させ、 スターラーで撹拌しながらレーザーを集光した。



図3 レーザーアブレーション光学系

2.3 近赤外蛍光顕微鏡観察

近赤外光励起可能なレーザー走査顕微鏡は市販されてい ないため、図4のような顕微鏡を作製した。励起光源とし て波長980 nmのレーザー(IRM980TR-500, Laser Century) を用いた。励起光は光電子増倍管(PMT)直前のバンドパス フィルターによってカットされ、発光のみが光電子増倍管 へ導かれる。光電子増倍管(H7844, 浜松ホトニクス)によ りY₂0₃:Tm,Yb 蛍光体からの800nm 付近の近赤外発光検出 を行なった。深部イメージング実験ではヒト皮膚と光散乱 特性が同様である生体模倣材料として2%イントラリピッ ド(2%IL)を用いた⁴⁾。図4に厚さ0.5 mmの2%ILの写真を 示す。0.5 mm 厚で既に可視光が殆ど透過しないことが分 かる。2%IL の厚さはシリコンゴムの厚さを変えることに より調整した。



図 4 近赤外顕微鏡光学系。左上の写真は、試料を上方から観察したもの。

3. 研究成果

3.1 高輝度蛍光体の作製

生体の奥深くの細胞・組織をイメージングするためには、 発光強度の高い蛍光体が必要である。 Y_2O_3 :Tm, Yb、 Y_2O_3 :Ho, Yb、 Y_2O_3 :Er, Yb に Li⁺をドープすることで、近赤外 蛍光強度の増強を試みた。

各近赤外蛍光体粉末をゾルゲル法によって作製した後、 粉末を圧縮することでペレットを作製した。励起には980 nm レーザー(IRM980TR-500, Laser Century)を集光照射し た。レーザー強度は100 mW とした。 Y_20_3 :Tm, Yb の場合は Li⁺濃度10 mol%で6.5倍、 Y_20_3 :Ho, Yb の場合はLi⁺濃度10 mol%で8.6倍、 Y_20_3 :Er, Yb の場合はLi⁺濃度20 mol%で1.6 倍の発光増強が確認された(図5)。

(a) Y_2O_3 : Tm(0.2%), Yb(2%)



(b) Y_2O_3 : Ho(5%), Yb(10%)



図5各Li⁺濃度における $Y_{2}O_{3}$ 蛍光体の近赤外蛍光スペクト ル。Li⁺濃度0mol%時の近赤外蛍光強度を1として規格化 した。それぞれ、(a) $Y_{2}O_{3}$:Tm, Yb、(b) $Y_{2}O_{3}$:Ho, Yb、(c) $Y_{2}O_{3}$:Er, Yb である。

3.2 微細化した蛍光体の粒径分布

LLA 処理により微小蛍光体の作製および分散化を行なっ た。 蛍 光 体 と し て、 ゾ ル ゲ ル 法 で 作 製 し た Y₂O₃:Tm(0.2%), Yb(2%), Li(10%)を用いた。レーザーエネル ギーは 10 mJ/pulse、処理時間は 2 時間であった。また、 粒子濃度は 0.5 mg/ml とし、水溶液には分散剤として 0.1wt%の PVP を加えた。図 6 に LLA 処理前後における蛍光 体の SEM 画像を示す。凝集していた蛍光体の微細化及び分 散化に成功した。さらに、LLA 処理後の蛍光体試料を TEM により観察し、粒径分布を計測した(図 7)。100 nm 以下の 粒子の作製に成功した。



図 6 蛍光体の SEM 像。(a)レーザーアブレーション処理前 および(b)処理後。



図 7 レーザーアブレーション処理後の蛍光体の TEM 像。 (a)低倍像、(b)高倍像、(c)粒径分布。

3.3 生体模倣材料を用いた近赤外深部細胞イメージン グ

培養 HeLa 細胞に LLA 処理を行なった蛍光体 (Y₂0₃:Tm(0.2%),Yb(2%),Li(10%))を導入し、図4の顕微鏡 を用いて近赤外イメージング行なった。蛍光体の導入には エンドサイトーシス(食作用)を用いた。培養液に蛍光体粒 子溶液を混ぜ、24 時間培養を行なった後4%パラホルムア ルデヒド固定し、試料とした。2%ILの厚さをそれぞれ、0、 0.5、1、1.5 mmに調整し、計測を行なった。

実験結果を図8に示す。2% ILの厚さが1.5 mmの場合 でも近赤外蛍光体からの発光を検出し、イメージングに成 功した。2% ILを用いる際は、透過像を取得する事は出来 ないため、同じ細胞を観察することは難しく、それぞれの 蛍光像で輝点の分布が異なる。図8(b)-(d)より1細胞を 区別可能な空間分解能があることがわかる。従って、今後、 生体深部での分子イメージングや、発光波長の異なる蛍光 体により細胞を染め分けることにより、組織内部の細胞分 布の可視化が可能であると考える。



図8HeLa細胞の透過像および近赤外蛍光像。

4. 結び

励起光と発光の波長が共に近赤外域にある蛍光体の作製 を行ない、液相レーザーアブレーション処理を用いること により粒径 100 nm 以下のナノ粒子蛍光体を得ることに成 功した。さらに、得られた蛍光体を用いて細胞の染色を行 ない、生体模倣材料(2%IL)を用いて1.5 nm 深部の近赤外 細胞イメージングに成功した。

深部イメージングする手法として2光子顕微鏡が知ら れているが、生体透過性の低い可視光発光を検出するため に1 mmの生体深部観察が限界と言われている。今後、よ り生体透過性の高い波長域での発光を示す Y₂0₃:Ho,Yb、 Y₂0₃:Er,Ybのナノ粒子を用いたイメージングや、更なる高 輝度化、微細化、抗体修飾による細胞染色を行い、生体深 部顕微鏡イメージング手法として確立することを目指す。 また、これらの蛍光体は電子線励起によっても発光を呈す るので、電子顕微鏡を用いたカラーイメージングへの応用 にも挑戦したい^{5),6)}。

謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人天田財団の平成25年度一 般研究開発助成によって行なわれました。ここに深く感謝 の意を表明致します。

参考文献

- A. M. Smith, M. C. Mancini and S. Nie, *Nature Nanotech.*,
 4, 710 (2009)
- K. Welsher, Z. Liu, S. P. Sherlock, J. T. Robinson,
 Z. Chen, D. Daranciang and H. Dai, *Nature Nanotech.*, 4,

773 (2009)

- M. Kawasaki and K. Masuda, J. Phys. Chem. B, 109, 9379 (2005)
- 4) A. M. De Grand, S. J. Lomnes, D. S. Lee, M. Pietrzykowski, S. Ohnishi, T. G. Morgan, A. Gogbashian, R. G. Laurence and J. V. Frangioni, *J. Biomed. Opt.*, **11**, 014007 (2006)
- S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, M, Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki and M. Hashimoto, *Micron*, 67, 90 (2014)
- 6) T. Furukawa, S. Fukushima, H. Niioka, N. Yamamoto, J. Miyake, T. Araki and M. Hashimoto, *J. Biomed. Opt.*, 20, 056007 (2015)