

整理番号	2020-J-089	報告者氏名	佃 諭志
------	------------	-------	------

研究課題名

生分解性近赤外バイオイメージング蛍光体の開発

<代表研究者> 機関名：東北大学多元物質科学研究所 職名：講師 氏名：佃 諭志

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

蛍光バイオイメージングは、生体内の物質を可視化する手法として生物学、医学の研究や診断において不可欠な技術となっている。従来利用されてきた可視光の蛍光バイオイメージングでは、自家蛍光や観察深度が浅い(数 nm)などの問題を抱えていた。近年、生体において光の透過率が高い波長 1000-1700 nm 領域を利用した近赤外蛍光が、深部組織観察、高い空間分解能を提供できることから、次世代のバイオイメージング技術として注目されている。Ag₂S 量子ドットは、量子サイズ効果によりその発光波長を近赤外領域 (1000~1350 nm) に調整可能な材料であり、高い生体適合性、非毒性から近赤外バイオイメージング用の蛍光体として有効な材料である。生体内に注入する際には、量子ドットをポリエチレングリコール(PEG)等の生体適合性ポリマーで覆いナノカプセル化することで、マクロファージなどの食食細胞による異物認識を阻害し、生体内の輸送を可能とする。また、EPR 効果による受動ターゲティングやナノカプセル表面にがん細胞などを認識する抗体を配位させ、標識し、イメージングを可能とする。一方で、蛍光プローブとして利用する蛍光体が、体外に排出されずに、体内に長期間に及び残留することが報告されており、人体へ悪影響が懸念される。実際の診断に用いるためには、使用した後に速やかに蛍光体が体外に排出される機能を付与することが必要となる。そこで本研究では、透過性の高い近赤外バイオイメージング用蛍光体である Ag₂S 量子ドットを生分解性のポリマーでカプセル化し、疾患部位での診断後、ポリマーの分解により、速やかに量子ドットを体外排出できるナノカプセル型蛍光体の開発を目的とした。

酢酸銀とチオ尿素誘導体を原料としたホットソープ法により Ag₂S 量子ドットの合成し、直径 3.0~6.2 nm のサイズに制御することで、発光波長を 800~1120 nm の領域で調整することに成功した。合成した Ag₂S 量子ドットを ZnS で表面を被覆した Ag₂S/ZnS コアシェル量子ドットを合成することで輝度の向上が観察された。Ag₂S/ZnS 量子ドットのサイズは、シェル被覆後でも 4.5 nm であり、腎臓からの排出が可能なサイズ (5 nm 以下) に調整することを達成した。また、Ga と S をシェル原料としたコアシェル量子ドットにおいても Ag₂S 量子ドットの輝度の向上が観察された。Ag₂S 量子ドットを高分子でカプセル化する手法として、ナノエマルジョン法を用いた PEG ゲルの合成を行った。水のミセル中で架橋反応を誘起することで、直径で 0.3~3 μm の PEG ゲル粒子を合成することに成功した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭発表

1. 近赤外バイオイメージング用 Ag_2S 量子ドットの高輝度化、牧野泰、佃諭志、小俣孝久、第13回資源・素材学会東北支部若手の会、オンライン開催、2021年1月28日

ポスター発表

1. 近赤外バイオイメージング用 Ag_2S 量子ドット蛍光体の高輝度化、佃諭志、牧野泰、喜多正雄、小俣孝久、日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム、オンライン開催、2021年9月1日

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

研究の目的

蛍光バイオイメージングは、生体内の物質を可視化する手法として生物学、医学の研究や診断において不可欠な技術となっている。近年、生体において光の透過率が高い波長 1000~1700 nm 領域を利用した近赤外(Near InfraRed:NIR)バイオイメージングが、注目されている。Ag₂S 量子ドットは、量子サイズ効果によりその発光波長を近赤外領域（1000~1350 nm）に調整可能な材料であり、高い生体適合性、非毒性から近赤外バイオイメージング用の蛍光体として有効な材料である。しかし、蛍光量子収率(PLQY)が低いため、輝度を上げイメージング感度を向上させることが必要である。また、生体内に注入する際には、量子ドットをポリエチレングリコール(PEG)等の生体適合性ポリマーで覆いナノカプセル化することで、マクロファージなどの貪食細胞による異物認識を阻害し、生体内の輸送を可能とする。EPR 効果による受動ターゲティングやナノカプセル表面にがん細胞などを認識する抗体を配位させ、標識し、イメージングを可能とする。一方で、蛍光プローブとして利用する蛍光体が、体外に排出されずに、体内に長期間に及び残留することが報告されており、人体へ悪影響が懸念される。実際の診断に用いるためには、使用した後に速やかに蛍光体が体外に排出される機能を付与することが必要となる。そこで本研究では、透過性の高い近赤外バイオイメージング用蛍光体である Ag₂S 量子ドットを生分解性のポリマーでカプセル化し、疾患部位での診断後、ポリマーの分解により、速やかに量子ドットを体外排出できるナノカプセル型蛍光体を開発する。

経過

Ag₂S 量子ドットは、酢酸銀とチオ尿素誘導体を原料とした低温でのホットソープ法により合成した(図 1)。N,N'-ジフェニルチオ尿素(DPTU) 0.25 mmol を、オレイン酸 5mmol を含むオクタデセン(ODE) 20 mL 溶液に加え Ar 雰囲気下で 120°C に加熱することで、DPTU を溶解させた。この溶液の温度を 90-120°C に調整した後、シリンジに装てんした調製済みの Ag 原料溶液(酢酸銀 0.5 mmol を含むオレイルアミン(OLA) 2.5mL と ODE 2.5mL の混合溶液)を素早く注入することで Ag₂S 量子ドットを合成した。反応溶液からの Ag₂S 量子ドットの抽出は、ヘキサンとエタノールを加えて遠心分離することで行った。合成した Ag₂S 量子ドットを ODE 20mL に再分散し、120°C で ZnS 原料溶液(酢酸亜鉛と 1-ドデカンチオールを含む OLA 溶液)を 0.2 ml/min の速度で滴下し、Ag₂S/ZnS コアシェル量子ドットを合成した。同様に合成した Ag₂S 量子ドットを OLA 10mL に再分散し、ガリウムアセチルセトナートと 1,3-ジメチルチオ尿素を加えた後、280°C まで加熱し、コアシェル量子ドットを合成した。反応後の溶液から遠心分離操作により、これら量子ドットを回収した。量子ドットの結晶相は XRD により分析し、コロイド溶液の光吸収および PL スペクトルを測定した。

PEG ナノゲル粒子の合成は、ナノエマルジョン法により行った。PEG 0.5 g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA) 0.1 g、ペルオキシ二硫酸アンモニウム 0.15 g を 10ml の水に溶解した。この溶液 1mL をラウリン酸 0.1 g を溶かしたシクロヘキサン溶液 15 mL 中に加え、攪拌および超音波処理を行うことで水のみセルを形成した。その後、NNN'-テトラメチルエチレンジアミン 70μL を加え、ミセル中での架橋反応を促進し、PEG ゲル粒子を形成した。合成した PEG 粒子は、エタノールを加えた後、遠心分離を行うことで回収した。回収した PEG 粒子をエタノール溶液中に再分散し、ガラス基板上に滴下・乾燥し、光学顕微鏡と原子間力顕微鏡(AFM)による観察を行った。

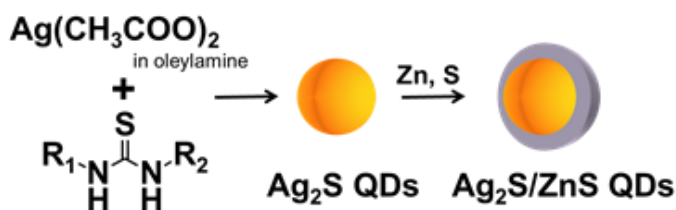


図1. チオ尿素誘導体を用いた低温Ag₂S/ZnS 量子ドットの合成スキーム。

結果と考察

酢酸銀とチオ尿素誘導体を原料とした低温でのホットソープ法により、粒子サイズが3.0~6.2 nmのAg₂S量子ドットを合成した。図2に粒子サイズ3.5, 3.8, 6.2 nmのAg₂S量子ドットの(a)光吸収スペクトルと(b)PLスペクトルを示す。光吸収スペクトルでは、吸収の立ち上がり、粒子サイズの増加に従い長波長にシフトした。PLスペクトルでは、近赤外領域で発光が観察され、その発光のピーク波長は、粒子サイズの増加に従って980 nmから1120 nmへ長波長シフトした。これらのことから、量子サイズ効果により発光波長を近赤外領域で調整できることが確認された。

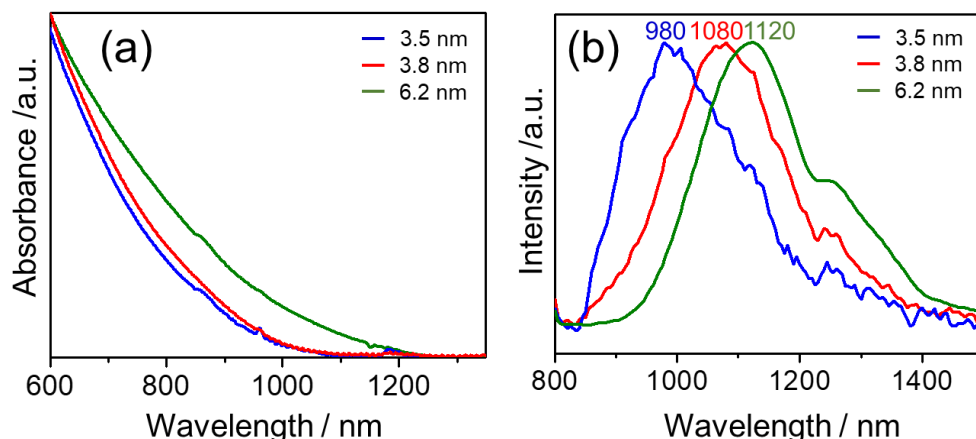


図2. (a)Ag₂S量子ドットの光吸収と(b)PLスペクトル。Ag₂S量子ドットの粒子サイズはそれぞれ3.5, 3.8, 6.2 nmであった。PLスペクトルは、励起波長805 nmで測定した。

PLQYを向上させるため、合成したAg₂S量子ドットの表面にZnSシェルの被覆を行った。図3(a)と(b)にZnS被覆前後のTEM像を示す。被覆操作前の粒子サイズが直径3.0 nmであるのに対し、被覆後の粒子サイズは、4.5 nmと増加した。また、XRD測定を行った結果、Ag₂Sの結晶構造パターンのみ観察され、不純物相は観察されなかった。図3(c)にZnS被覆前後のPLスペクトルを示す。被覆操作後、蛍光強度の増加が明確に観察され、Ag₂S表面がZnS層で被覆されたAg₂S/ZnSコアシェル量子ドットの形成が示された。強度の増加が観察されたが、発光ピーク波長は、被覆前は800 nmで観察されたのに対して、被覆操作後には、1120 nmと長波長に大きくシフトした。この結果より、ZnS被覆操作中にAg₂Sコアの粒成長が起きていることが示唆された。量子サイズ効果から見積もったAg₂S/ZnS量子ドットのコアサイズは3.7 nmであり、TEMの観察結果と合わせると0.4 nmの厚さのZnSが被覆されたと推測される。シェル被覆後においても平均粒子サイズは、4.5 nmであり、腎臓からの排出に適した5 nm以下のコアシェル量子ドットを合成することに成功した。一方で、被覆後のPLQYは、2.1%に留まった。

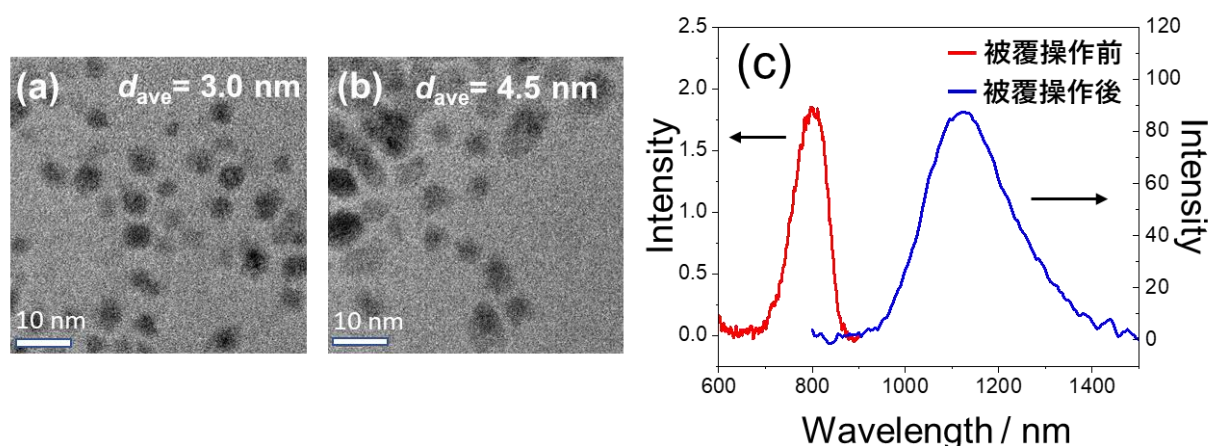


図3. ZnS被覆前(a)と被覆後(b)のAg₂S量子ドットTEM像。(c)ZnS被覆前後のAg₂S量子ドットのPLスペクトル。

Ga と S 原料を用いた Ag_2S 量子ドットの表面被覆についても検討を行った。図 4(a)に示した PL スペクトルでは、被覆操作後、発光強度の増加が観察された。図 4(b)の XRD パターンでは、被覆操作後に新たに AgGaS_2 に起因した回折ピークが観察され、 $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgGaS}_2$ のコアシェル量子ドットの形成が示唆された。PLQY は、被覆前後で 0.4 から 2.2% に増加しており、被覆条件を最適化することでさらなる PLQY の向上が見込める結果が得られた。しかし、 ZnS 被覆の時と同様に、発光波長のピークシフトが観察されていることから Ag_2S コアの粒成長も起きていることが示唆される。

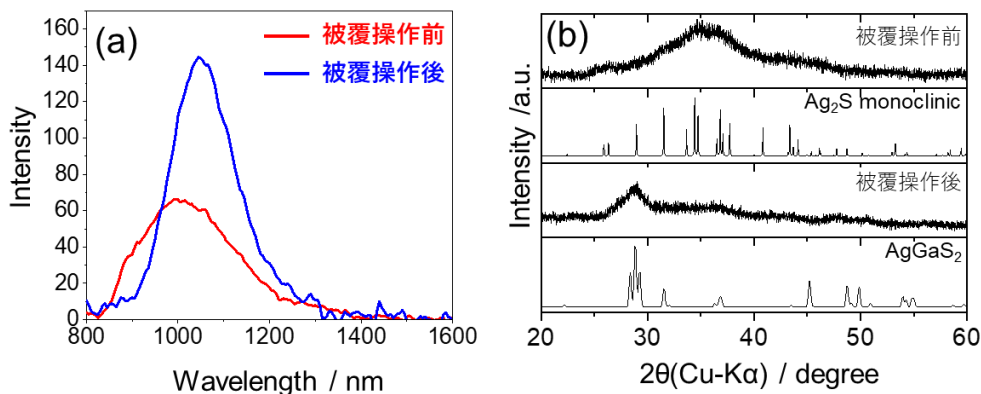


図 4. Ga, S 原料を用いた Ag_2S 被覆操作前後の(a)PL スペクトルと(b)XRD パターン。PL スペクトルは、励起波長 805 nm で測定した。

次に、 Ag_2S 量子ドットを高分子でカプセル化する手法としてナノエマルジョン法を検討した。ナノエマルジョン法により、PEG と架橋剤(MBA)を含んだ水のみセル中で架橋反応を誘起させることで PEG のゲル粒子が合成された。合成した PEG 粒子をガラス基板に転写し、光学顕微鏡像と AFM 像で観察した結果を図 5 に示す。PEG ゲル粒子が観察され、そのサイズは、0.3~3 μm であった。シクロヘキサンに加えるラウリン酸と PEG 水溶液の比率を調整することでミセルサイズを均一に制御し、PEG ナノゲル粒子のサイズと粒度分布を制御することが今後の課題である。

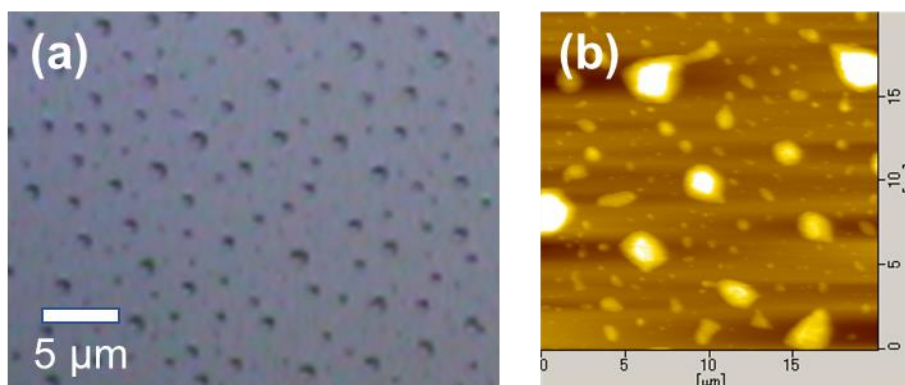


図 5. ナノエマルジョン法により合成した PEG ナノゲルの(a)光学顕微鏡像と(b)AFM 像。

本研究では、 Ag_2S 量子ドットを ZnS および AgGaS_2 で被覆したコアシェル構造にすることで PLQY が向上することを明らかにした。特に $\text{Ag}_2\text{S}/\text{ZnS}$ 量子ドットにおいては、近赤外光の発光と PLQY の向上に加え、腎臓から輩出できる 5 nm 以下のサイズへの調整も達成した。また、ナノエマルジョン法による PEG ゲル粒子の合成にも成功した。今後、分解機能を付与した PEG を用い Ag_2S 量子ドットをカプセル化することで、診断後に量子ドットを対外排出することが可能な蛍光プローブへの展開が期待できる。