

希土類ドーピング $Y_3Al_5O_{12}$ ナノ粒子のグリコサーマル合成と
生体分子検出への応用

2009年3月

朝倉 亮

目次

第1章 緒言

1.1 生体情報の画像化	1
1.2 蛍光を検出端とする生体分子検出	1
1.2.1 時間分解蛍光測定	2
1.2.2 蛍光共鳴エネルギー移動	2
1.2.3 蛍光相関分光	3
1.2.4 近赤外蛍光	3
1.3 生体分子検出に用いられる蛍光物質	3
1.3.1 有機色素	3
1.3.2 蛍光タンパク質	3
1.3.3 ランタノイド錯体	4
1.4 無機蛍光粒子の生体分子検出への応用	4
1.4.1 量子ドット	4
1.4.1.1 量子ドットの開発	4
1.4.1.2 生化学分野における量子ドットの利用	5
1.4.1.3 有機色素との比較	6
1.4.1.4 量子ドットの毒性	6
1.4.2 希土類ドーブ蛍光粒子	7
1.5 研究目的	7
第1章の参考文献	11

第2章 キャラクターゼーション

2.1 粉末 X 線回折 (XRD) による構造評価	19
2.1.1 結晶相の同定	19
2.1.2 Scherrer 法による結晶子径算出	19
2.1.3 Stokes-Wilson 法による格子歪み算出	19
2.2 蛍光 X 線分析 (XRF) による組成分析	20
2.3 フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) による有機物の解析	21
2.3.1 通常測定	21
2.3.2 真空測定	21
2.4 熱重量・示差熱分析 (TG-DTA)	21
2.5 電子顕微鏡による粒径および形態の観察	21
2.5.1 透過型電子顕微鏡 (FE-TEM) による像観察	22
2.5.2 走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による像観察	22
2.6 動的光散乱法 (DLS) を用いた粒度分布測定	22
2.7 光学特性評価	22
2.7.1 蛍光 (PL) および蛍光励起 (PLE) スペクトル測定	22

2.7.2	近赤外蛍光 (NIR-PL) スペクトル測定	22
2.7.3	紫外・可視・近赤外 (UV-vis-NIR) 吸収スペクトル測定	23
2.7.4	内部蛍光量子効率の算出	23
2.7.5	蛍光プレートリーダーによる蛍光強度測定	23
2.8	磁気特性評価	24
2.8.1	核磁気共鳴画像法 (MRI)	24
2.8.2	振動試料型磁力計 (VSM) による磁気測定	24
	付録 MRI の測定原理	25
	第 2 章の参考文献	33
第 3 章	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子のグリコサーマル合成条件の検討	
3.1	緒言	34
3.1.1	YAG 結晶とその合成法	34
3.1.2	YAG:Ce ³⁺ の発光機構	34
3.1.3	グリコサーマル法による YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	34
3.1.3.1	グリコサーマル法によるガーネット結晶の合成	34
3.1.3.2	グリコサーマル合成により得られた YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の特性	36
3.1.4	研究目的	36
3.2	実験方法	37
3.2.1	試薬	37
3.2.2	試料の合成方法	37
3.2.2.1	仕込み濃度を变化させた YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	37
3.2.2.2	クエン酸を添加した YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	37
3.2.3	試料の評価方法	38
3.3	結果と考察	38
3.3.1	仕込み濃度の与える影響	38
3.3.1.1	反応時間や仕込み濃度に対する圧力変化	38
3.3.1.2	GC-MS による反応終了時の溶媒の分析	38
3.3.1.3	FE-TEM による 1 次粒子径評価と DLS による粒度分布解析	38
3.3.1.4	反応メカニズムについての考察	39
3.3.2	クエン酸添加の効果	40
3.3.2.1	FE-TEM による 1 次粒子径の観察	40
3.3.2.2	XRD による結晶系の同定と格子定数の算出	40
3.3.2.3	FT-IR による表面有機物と Al-O 配位数の解析	41
3.3.2.4	UV-vis 吸収スペクトルと PL・PLE スペクトルによる光学特性評価	41
3.3.2.5	蛍光寿命測定	42
3.3.2.6	クエン酸の添加が粒子径に与える影響	42

3.3.2.7	クエン酸の添加が光学特性に与える影響	42
3.4	結論	60
	第3章の参考文献	61
第4章	ビオチン化 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の作製とその応用	
4.1	緒言	66
4.1.1	生体分子検出用の希土類ドーブ蛍光粒子	66
4.1.2	研究目的	67
4.2	実験方法	67
4.2.1	試薬	67
4.2.2	試料の合成方法	67
4.2.2.1	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	67
4.2.2.2	APTMS 処理	68
4.2.2.3	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子のビオチン化	68
4.2.2.4	ビオチン化 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子によるアビジン固定ビーズの標識	68
4.2.3	試料の評価方法	68
4.3	結果と考察	68
4.3.1	合成直後の YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子	68
4.3.2	APTMS 処理 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子	69
4.3.3	ビオチン化 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子	70
4.4	結論	79
	第4章の参考文献	80
第5章	ポリアクリル酸被覆 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子のプレートアッセイへの応用	
5.1	緒言	83
5.1.1	表面改質	83
5.1.2	研究目的	84
5.2	実験方法	85
5.2.1	試薬	85
5.2.2	試料の合成方法	85
5.2.2.1	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	85
5.2.2.2	PAA 被覆 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の調製	85
5.2.2.3	ストレプトアビジン固定 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の調製	86
5.2.2.4	プレートアッセイによる BSA の定量	86
5.2.3	試料の評価方法	86
5.3	結果と考察	86
5.3.1	PAA 被覆 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子	86

5.3.2	ストレプトアビジン固定 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子	87
5.3.3	プレートアッセイによる BSA の定量	88
5.4	結論	97
	第 5 章の参考文献	98
第 6 章	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子を複合化した PMMA ビーズの作製とフローサイトメトリーへの応用	
6.1	緒言	102
6.1.1	フローサイトメトリー	102
6.1.2	蛍光ビーズのフローサイトメトリーへの応用	102
6.1.3	蛍光ビーズの作製法	102
6.1.4	研究目的	104
6.2	実験方法	105
6.2.1	試薬	105
6.2.2	試料の合成方法	105
6.2.2.1	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子の合成	105
6.2.2.2	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子を複合化した PMMA ビーズの作製	105
6.2.2.3	YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子複合ビーズへの BSA の固定	106
6.2.2.4	BSA 固定 YAG:Ce ³⁺ ナノ粒子複合ビーズの色素による標識	106
6.2.3	試料の評価方法	106
6.3	結果と考察	107
6.3.1	ゼータ電位測定による反応時間の最適化	107
6.3.2	FE-SEM および蛍光顕微鏡による複合ビーズの観察	107
6.3.3	TG-DTA および蛍光プレートリーダーによる吸着量の定量的な評価	107
6.3.4	フローサイトメトリー解析	108
6.3.5	第 2 色素を用いたフローサイトメトリー解析のモデル実験	108
6.4	結論	119
	第 6 章の参考文献	120
第 7 章	近赤外発光 YAG:Yb ³⁺ ナノ粒子の作製と特性評価	
7.1	緒言	123
7.1.1	近赤外蛍光イメージング	123
7.1.2	イメージングに用いられている近赤外発光材料	123
7.1.3	研究目的	124
7.2	実験方法	124
7.2.1	試薬	124
7.2.2	試料の合成方法	124

7.2.3	試料の評価方法	125
7.3	結果と考察	125
7.3.1	FE-TEM および FE-SEM による粒子観察	125
7.3.2	XRD による結晶構造の同定	125
7.3.3	Stokes-Wilson 法による結晶子径と格子歪みの算出	126
7.3.4	FT-IR による表面有機物の解析	126
7.3.5	TG-DTA による熱質量挙動の解析	127
7.3.6	UV-vis-NIR 吸収スペクトル	127
7.3.7	PL スペクトル	127
7.3.8	プローブとしての特性評価	127
7.4	結論	137
	第 7 章の参考文献	138
第 8 章	マルチモーダルイメージング用 (Gd,Y) AG:Yb ³⁺ ナノ粒子の作製と特性評価	
8.1	緒言	141
8.1.1	マルチモーダルイメージングへの期待	141
8.1.2	蛍光 - 磁性マルチモーダルプローブの用途	141
8.1.3	蛍光 磁性マルチモーダルプローブの複合化による分類	142
8.1.4	研究目的	143
8.2	実験方法	144
8.2.1	試薬	144
8.2.2	試料の合成方法	144
8.2.2.1	GAG-YAG 固溶体ナノ粒子の合成	144
8.2.2.2	Gd-YAG ナノ粒子および Gd-YAG:Yb ³⁺ ナノ粒子の作製	144
8.2.3	試料の評価方法	145
8.3	結果と考察	145
8.3.1	GAG-YAG 固溶体ナノ粒子	145
8.3.1.1	FE-SEM による粒子径の算出と DLS による純水中での粒度分布測定	145
8.3.1.2	XRF による Gd 固溶量の定量	146
8.3.1.3	XRD による結晶構造の同定	146
8.3.1.4	MRI 測定による造影能評価	146
8.3.2	Gd-YAG ナノ粒子	148
8.3.2.1	FE-SEM による 1 次粒子の観察	148
8.3.2.2	XRD による結晶構造の同定	148
8.3.2.3	MRI 測定による造影能評価	148
8.3.3	Gd-YAG:Yb ³⁺ ナノ粒子	149

8.3.3.1	FE-TEM および FE-SEM による粒子観察	149
8.3.3.2	DLS による粒度分布測定	149
8.3.3.3	MRI 測定による造影能評価	149
8.3.3.4	近赤外レーザー励起による NIR-PL 測定	149
8.4	結論	165
	第 8 章の参考文献	166
第 9 章	総括と今後の展望	
9.1	本研究の総括	170
9.2	本研究で抽出された問題点とその対策	171
9.2.1	粒径	171
9.2.2	光学特性	172
9.2.3	磁気特性	172
9.2.4	表面修飾	173
9.2.5	生化学操作	173
9.2.6	蛍光ビーズ	174
	学術論文および学会発表	175
	謝辞	179

第 1 章 序論

1.1. 生体情報の画像化

「見えないものを見る」手法として顕微鏡が生物学の発展に大きく貢献して以降、研究や医療診断における画像化技術の重要性は今もなお高まり続けている。画像化の対象は形態情報に限定されず、組織中の物理量や化学量の分布および生理活性などの機能情報もその対象となる。また取得した多次元の情報画像処理によって低次元の情報へ変換し複雑な現象の直感的・包括的な理解に役立てることもできる。現在では Table 1-1 に示すように多岐にわたる物理現象が検出端として利用され、用途に応じて使い分けられている。これらの検出端のなかで「光」は非侵襲性の検出端であり、測定に必要な装置も比較的小型であるという利点がある。加えて CCD カメラの高感度化や光学系の改良が背景となり、高感度の検出端として近年着目されている。

Table 1-1 List of physical properties and imaging techniques.

光	光学顕微鏡 / 蛍光顕微鏡 近接場顕微鏡 光トモグラフィー
電子線	走査型電子顕微鏡 / 透過型電子顕微鏡
放射線	ラジオグラフィ ポジトロン放射断層撮影 単一光子放射断層撮影
X 線	X 線投影 X 線断層撮影
磁気	核磁気共鳴イメージング 脳磁計
超音波	超音波診断装置

1.2 蛍光を検出端とする生体分子検出

1955 年、Coons らは蛍光色素を標識した抗体を用いて形質細胞内の免疫グロブリン (IgG) の局在を初めて観察した [1-1]。この方法を蛍光抗体法と呼び、色素酵素や放射性同位体などにも応用され免疫組織化学の基礎となった。

蛍光には「発光強度」「発光波長」「蛍光寿命」などのパラメータがあり、これらの特性

は環境に依存して変化することもある。パラメータおよびその変化を利用して免疫標識による組織観察以外にも様々な分析が行われている。

1.2.1 時間分解蛍光測定

蛍光標識した生体分子に励起光を照射すると、組織から発生する自家蛍光や励起光の散乱がバックグラウンド蛍光として検出され、S/N比を低下させる原因となる[1-2]。時間分解蛍光測定は、組織の自家蛍光と蛍光物質との蛍光寿命の差を利用して目的化合物を選択的に検出する測定法である。例えば、自家蛍光の蛍光寿命は数 ns [1-3]であるのに対し、希土類錯体の蛍光寿命は 100 μ s 以上[1-4]である。このため、励起光を照射してから検出までの間に一定のタイムラグを置くことで自家蛍光を消光させ、蛍光物質からの発光のみを検出することができる。Tanらは、シリカやチタニアに Eu^{3+} 錯体を埋包したナノ粒子を用いて時間分解蛍光を行い、高感度の免疫測定を行った[1-5~7]。また、励起された蛍光物質の近傍にエネルギー移動が可能な分子が近接すること、あるいは蛍光物質の状態が変化することによっても蛍光寿命は変化する。この蛍光寿命の変化から分子間の相互作用の解析を試みる例もある[1-8]。

1.2.2 蛍光共鳴エネルギー移動

2種類の色素をドナー色素とアクセプター色素とすると、ドナー色素の発光スペクトルとアクセプター色素の励起スペクトルが重なり合い、かつ2つの色素が近距離にある場合、励起されたドナー色素のエネルギーは双極子-双極子相互作用により非放射的にアクセプター色素へと移動する。この現象を蛍光共鳴エネルギー移動(Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer, FRET)と呼ぶ[1-9]。ドナー色素からアクセプター色素へのエネルギーの移動効率 k_{DA} は Förster の式(Eq.1-1)のように求められる。

$$k_{DA} = \frac{B \times Q_D I}{\tau_D r^6} = \left(\frac{1}{\tau_D} \right) \times \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (\text{Eq. 1-1})$$

ここで τ_D はドナー色素の蛍光寿命、 R_0 は Förster 距離、 r はドナー色素とアクセプター色素間の距離である。 k_{DA} は距離の6乗に反比例するため、測定される蛍光特性は2つの色素間の距離の変化に対し敏感に反応する。この蛍光強度や蛍光寿命の変化を利用して、タンパク質の構造変化[1-10]、DNA鎖の切断[1-11]および分子間相互作用[1-12]など 10-80 Å 程度[1-13]の微小な距離スケールの変化を検出することができる。また、アクセプター分子にはクエンチャーと呼ばれる非発光性の材料がしばしば利用される。クエンチャーは励起されたドナー色素のエネルギーを奪い消光させる働きをする。LiuらはCy5.5が結合したDNAとクエンチャー-BHQ3が結合したDNAとをハイブリダイゼーションしてCy5.5の蛍光が抑制された塩基対プローブを調製し、蛍光強度の回復を利用してデハイブリダイゼーションを確認した[1-14]。

1.2.3 蛍光相関分光

蛍光相関分光法は溶液中に分散する蛍光物質の拡散定数と分子数を測定する手法である。レンズを使ってレーザー光を集光し体積にして約 10^{-16} L の微小領域の蛍光強度を測定すると、溶液中の蛍光物質の運動により蛍光強度に揺らぎが発生する。この揺らぎは蛍光物質の拡散定数や分子数に依存するため、解析によりこれらの値を求めることができる [1-15, 16]。Weidemann らは黄色タンパク質と結合したコアヒストン H2B を発現する HeLa クローンを利用して、細胞内のヌクレオソーム濃度の定量を行った [1-17]。

1.2.4 近赤外蛍光

波長 600-1300 nm の近赤外域はヘモグロビンや水分子による光吸収が少ないため、生体の分光学的窓と呼ばれている [1-18]。近赤外光による励起や発光は組織の自家蛍光を抑制し、検出感度を向上させることができる [1-19]。また近赤外光は組織に対する透過性が高いため、非侵襲な内部観察 [1-20] や蛍光断層撮影 [1-21] への応用が期待されている。

1.3 生体分子検出に用いられる蛍光物質

1.3.1 有機色素

有機色素の蛍光ラベリング剤としての歴史は古く、現在でも定常的に用いられている。フルオレセインは代表的な有機色素であり、これを水溶化したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) は高い吸光係数と高い量子効率を持つ緑黄色発光物質である [1-22]。波長 488 nm のアルゴンレーザーによる励起が可能であるため、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡やフローサイトメトリーなど、レーザーを利用する分析装置用の蛍光物質として利用されている。しかし、化学的安定性は低く励起光照射による退色を起こしやすい。また pH に対して敏感に光学特性が変化するため、高い定量性が必要な分析には不向きである。一方で、この光学特性の pH 依存性を利用して細胞内の pH を測定することもできる [1-23]。

Cy3 や Cy5 はシアニン系の有機色素であり、Cy3 は 565 nm を発光ピークとする橙色蛍光、Cy5 は 667 nm 発光ピークとする赤色蛍光を示す [1-24]。シアニン系の色素は直線状の分子構造をしており、分子長を伸長させることで蛍光波長を近赤外領域までシフトさせることができるが、このような構造変化は量子効率の低下を伴う [1-25]。また FITC と同様にシアニン系の色素も光照射により退色を示す [1-26]。

Alexa は芳香族系の比較的新しい色素である。従来の有機色素と比較して光や pH に対する安定性が高く、紫外域から近赤外域にわたる広範囲の波長を選択することができるため [1-27]、近年よく利用されている蛍光物質である。

1.3.2 蛍光タンパク質

蛍光タンパク質は、発光に基質を必要とするルシフェラーゼのような蛍光分子とは異なり、励起光の照射により単体で蛍光を示すタンパク質である。代表的な蛍光タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (GFP) は 1962 年に Shimomura らによってオワンクラゲから単離され [1-28]、1992 年に Prasher らによってその遺伝子配列が明らかとなった [1-29]。

蛍光タンパク質は、その遺伝配列を目的タンパク質の遺伝子に組み込むことで細胞内で蛍光物質を生産することができるため、細胞内のタンパク質の挙動を外部から色素を導入することなく観察することができる。現在では緑色のほかに、黄色、赤色の発光を示すタンパク質も開発され、タンパク質のトラッキング[1-30]、タンパク質 - タンパク質間の相互作用の解析[1-31]および遺伝子発現の検出[1-32]などに応用されている。

1.3.3 ランタノイド錯体

1942年に Weissman によって Eu^{3+} 錯体が紫外光を吸収して可視光を発することが報告され[1-33]、その後様々な 3 価ランタノイド錯体が蛍光材料として研究されてきた。3 価ランタノイドイオンの 4f-4f 遷移はパリティ禁制であるためランタノイドイオン単体では実用的な輝度を得ることができないが、錯体を形成させ、配位子からのエネルギー移動を利用することで高輝度の発光を得ることができる。

ランタノイド錯体はストークスシフトが大きく発光のスペクトル幅も狭い。また蛍光寿命は 100 μs 以上[1-4]と比較的長いため、有機色素の発光や組織の自家蛍光などの寿命の短い発光との蛍光寿命の差を利用して分解蛍光測定を行うことができる。

1.4 無機蛍光粒子の生体分子検出への応用

近年、有機色素などに替わる次世代の蛍光体として無機蛍光粒子が注目されている。無機蛍光粒子はディスプレイや固体照明など、高い耐久性を必要とされるデバイスへ応用されてきた蛍光体であり、有機色素の持つ光退色の問題を解決できると期待されている。

1.4.1 量子ドット

1.4.1.1 量子ドットの開発

量子ドットとは、粒径 1-10nm の II-VI 族および III-V 族半導体ナノ粒子の総称である。1982年にはすでに Efros[1-34]らや Ekimov[1-35]らによって CdS ナノ粒子の研究は行われていたが、得られた粒子の量子効率も低く粒径も不均一であった。しかし、1993年に Murray らによって高温配位溶媒を利用した CdSe ナノ粒子の合成法が報告され[1-36]、また 1994年に Bhargava らによって ZnS:Mn²⁺ ナノ粒子がバルクを超える 18%という量子効率を示すことが報告されて[1-37]以降、半導体ナノ粒子の研究は加速度的に発展した。

量子ドットは通常、トリオクチルフォスフィン (TOP) やトリオクチルフォスフィンオキシド (TOPO) などの高温配位溶媒中でアニオンとカチオンを反応させるホットソープ法により合成される[1-36, 38]。この方法により合成された量子ドットは 40%という高い量子効率、大きなストークスシフトおよび半値幅の狭い発光スペクトルを有し、励起光を照射してもほとんど退色を示さない。また、エネルギーギャップの大きさが粒径に依存するという量子サイズ効果を示すため、粒径をコントロールすることにより発光波長を変化させることができる[1-39]。

このように量子ドットは有機色素が抱える様々な問題を解決できるため、蛍光プローブとしての利用価値は高い。しかしホットソープ法で合成される量子ドットの表面は疎水性

であるため、生化学分野へ応用するためには親水化を行う必要がある。

1.4.1.2 生化学分野における量子ドットの利用

量子ドットを生化学分野へ最初に応用したのは Nie らと Alivisatos らであり、1998 年に Science 誌に同時に発表された[1-40, 41]。Nie らは CdSe/ZnS ナノ粒子表面の TOPO と 2-メルカプト酢酸とを配位子交換することで粒子にカルボキシル基を導入し親水化を行った。さらにこのカルボキシル基と免疫グロブリン G (IgG) の持つアミノ基とをアミド結合させ粒子表面に IgG を固定した。最後に抗原抗体反応を利用した凝集試験を行い、量子ドットの発光特性と粒子表面に固定した IgG の結合特異性が失われていないことを確認した[1-40]。一方、Alivisatos らはシリカで CdSe/ZnS ナノ粒子を被覆することで親水性を与え、さらにシランカップリング剤で表面を処理することで官能基が導入できることを示した[1-41]。

しかしこの報告から 2001 年までの 3 年の間、量子ドットを生体応用した報告は数件に留まった。その原因を Pinaud らは、親水化処理だけでは溶液中での凝集を十分に抑制することができなかつたためであると推察している[1-3]。この問題を解決するために、Mattoussi らはジヒドロリボ酸を量子ドットに配位させて表面にカルボキシル基を導入し、負に帯電した粒子表面と正に帯電したペプチド鎖を修飾したタンパク質とを静電的に吸着させ、タンパク質を粒子表面に導入する方法を提案した[1-42~45]。そのほか、ポリエチレングリコール[1-46~48]やデンドリマー[1-49]など様々な高分子が量子ドットの分散安定性の向上のために修飾された。これらの高分子は分散安定性の向上に寄与するだけでなく、静電的相互作用による非特異的な吸着を低減させ、in vivo 環境中での生体適合性を改善することができる[1-50]。

さらに、生体特異的な結合を利用したターゲティングのために、親水化処理に加えてターゲット分子となる生体分子の固定が行われた。調製された粒子の生体特異性は、まず in vitro な方法で確認された。Sun らは、抗ヒト IgG 抗体を CdSe/ZnS ナノ粒子表面に固定し、ガラス基板上に固定したヒト IgG との生体特異的な結合を利用して蛍光ドットパターンを作製した[1-51]。Mitchell らは CdSe ナノ粒子と金ナノ粒子に DNA 鎖を修飾し、両者をハイブリダイゼーションさせたのちに、電子顕微鏡で確認した[1-52]。

一方、ターゲット分子を修飾しない量子ドットも分析内容に応じて利用される。Jiang らはホスホロチアエート修飾 DNA とタンパク質の表面との相互作用を調べるために表面電荷の異なる CdS ナノ粒子を調製し、これをタンパク質のモデルと見立てて解析を行った[1-53]。また Daniel らは CdSe/ZnS ナノ粒子をマウスに静脈投与し、蛍光による血管造影を行った[1-54]。

これらの研究の成果により、量子ドットは有機色素とほぼ同等に扱うことができるようになり、現在ではプレートアッセイ[1-55~57]、細胞内タンパク質の観察[1-58]、癌細胞の標識[1-59~61]、細胞の追跡[1-46, 62]、リンパ節マッピング[1-63]などが行われている。また、フローサイトメトリー用の蛍光ビーズ[1-64]やマイクロアレイ[1-65]などへの応用も検討されており、生化学分野で量子ドットが利用される機会は年々増えつつある。

1.4.1.3 有機色素との比較

有機色素にはない量子ドット特有の性質は以下の5点である。まず1点目は複数色を同時に励起し、かつ、分離して検出できる点である。量子ドットはストークスシフトが大きく発光スペクトルも線対称でシャープであるため、このような多重検出が可能となる。Goldmanらは4種類の量子ドットで別々の毒素を標識し、それぞれの毒素の同時定量を行った[1-45]。またWuらやZhuらは複数色の量子ドットで免疫染色を行い、顕微鏡による多色同時観察を行った[1-66, 67]。

2点目は蛍光寿命である。量子ドットの蛍光寿命は10-100 nsであり、有機色素の蛍光寿命よりも長い。Dahanらはシリカ被覆したCdSe/ZnSナノ粒子を3T3細胞に取り込ませ、時間分解イメージングによりS/N比が通常観察よりも15倍改善されたことを報告した[1-68]。

3点目は発光波長を容易にコントロールできる点である。例えば、FRETはドナー色素の発光スペクトルとアクセプター色素の励起スペクトルの重なり合いが大きいほど効率よく行われるが、量子ドットはその蛍光波長を最適な位置に合わせこむことができるため、ドナー色素に適している。実際に量子ドットをFRETに応用した研究報告は非常に多い[1-69~71]。Maらはチトクロームcやヘモグロビンなどのヘム含有タンパク質がCdSe/CdSナノ粒子に対してクエンチャーとして働くことを利用してこれらのタンパク質の定量を行った[1-72]。SoらはルシフェラーゼとCdSe/ZnSナノ粒子の複合粒子を作製し、ルシフェラーゼからCdSe/ZnSナノ粒子へのエネルギー移動を利用して、励起光を照射することなく小動物イメージングを行った[1-73]。この方法は励起光の照射によるバックグラウンド蛍光が生じないため、感度よく蛍光を検出することができる。

4点目は長期的な観察が可能であるということである。量子ドットの光退色に対する耐性はAlexa488の380倍、FITCの3800倍と非常に高い[1-74]。そのため、通常の観察時に光退色を抑制できるだけでなく、Dubertretらが行ったように細胞分裂の様子を長期間にわたり追跡観察することも可能となる[1-46]。また一分子イメージング[1-75]では、光退色を起こさない量子ドットは理想的な蛍光材料である。

最後の1点は集積の必要がないことである。Chanらによると量子ドット1粒子あたりの発光強度はローダミン1分子の20倍である[1-40]。これは同程度の輝度を得るために必要な標識が20分の1であることを意味している。またマクロなスケールで蛍光物質の追跡を行う場合、有機色素はビーズなどに集積させて検出可能な大きさに調製する必要があるが、量子ドットは集積を行わなくとも粒子1つ1つを検出することができる。

1.4.1.4 量子ドットの毒性

量子ドットは毒性の強い元素であるCd[1-76]を含んでいるため、その毒性についての関心は高い。量子ドットの毒性については現在までにいくつかの報告が行われているが、量子ドットの合成環境、表面修飾、毒性試験の環境およびその方法が研究者により異なるため、統一された見解は未だなされていない。

Dubertretらはリン脂質でカプセル化したCdSe/ZnSナノ粒子をアフリカツメガエル胚

に投与して生存試験を行ったが、その生存率は何も投与しなかったコントロールと同じであったため、調整したナノ粒子は無毒であると結論付けている[1-46]。

DerfusらはCdSeナノ粒子がUV照射によって溶解しCd²⁺を放出すること、およびZnSの被覆によって毒性は著しく改善されるが、完全にはCd²⁺の溶出を抑制できないことを報告した[1-77]。またShioharaらは、メルカプトウンデカン酸とヤギ血清アルブミンで被覆したCdSe/ZnSナノ粒子を用いて細胞毒性試験を行い、Deufusらと同様にZnSの被覆によるCd²⁺の溶出抑制効果は充分でないことを指摘した[1-78]。Chenらは、CdSe/ZnSナノ粒子にシリカ被覆を行うことでその毒性が低減され、長期にわたる観察が可能であると報告した[1-79]。

また粒子表面の物理化学的な状態が毒性を変化させることも指摘されている。Hoshinoらはメルカプトウンデカン酸、シスタミンおよびチオグリセロールをそれぞれCdSe/ZnSナノ表面に導入して細胞毒性の比較を行い、メルカプトウンデカン酸修飾のナノ粒子がDNAを損傷することを報告した[1-80]。Kirchnerらは細胞への取り込まれ方にも着目し、量子ドットが細胞に取り込まれた場合はCd²⁺の溶出に敏感に反応してアポトーシスが誘発されること、および粒子の沈降によっても毒性を示すことを報告した[1-81]。

1.4.2 希土類ドーブ蛍光粒子

希土類ドーブ蛍光粒子は酸化物やフッ化物に、発光中心として働く希土類イオンをドーブして得られる蛍光体である。発光中心にはEu³⁺(赤)やTb³⁺(緑)のほか、Yb³⁺、Tm³⁺およびEr³⁺が近赤外光からのアップコンバージョンを目的とした発光中心として利用されている。希土類元素はCdやSeよりも毒性の低い元素であるため[1-82]、希土類ドーブ蛍光粒子は量子ドットよりも毒性の低いプローブとして期待されている。

酸化物や酸硫化物は一般に融点が高く、耐久性も高い。実際に、Y₂O₃[1-83]やY₂O₂S[1-84]に希土類イオンをドーブした蛍光体が生体分子検出へ応用されている。しかし、酸化物や酸硫化物をナノサイズで合成し、かつ、凝集を防いで溶媒中で安定に分散させることは困難である。例えば、酸化物粒子は固相法、スプレー熱分解法、共沈法およびゾルゲル法で合成されるが、固相法やスプレー熱分解法で得られる粒子はサブミクロンサイズであり、一方で、共沈法やゾルゲル法などの液相合成では粒子の結晶化や発光強度の改善に焼成を伴うため、1次粒子がナノサイズであっても2次的に凝集しミクロンサイズの凝集体を形成する。

LaPO₄[1-85]やYVO₄[1-86]などのポリ酸の結晶や、NaYF₄[1-87]やLaF₃[1-88]などのフッ化物の結晶に希土類イオンをドーブした蛍光体は、共沈法や溶媒熱合成法によりナノサイズの粒子を得ることができ、かつ、溶媒に安定に分散させることができる。しかし、合成後の粒子に生体分子をコンジュゲートし、特異性を利用した検出へ応用している報告は未だ少ない。

1.5 研究目的

本論文では、希土類蛍光体母体として複合酸化物であるイットリウムアルミニウムガー

ネット (YAG) に着目し、グリコサーマル法によって希土類イオンをドーブした YAG ナノ結晶を合成して生体分子検出への応用を検討した。

YAG は熱的・化学的に安定な材料であり、レーザーや波長変換膜へ応用されている光学結晶である。また溶媒熱合成法によりそのナノ結晶を得ることができ [1-89, 90]、なかでも 1,4-ブタンジオールを溶媒に用いた溶媒熱合成により得られる YAG ナノ粒子は一次粒子径が約 10 nm [1-91] であり、他の溶媒熱合成法と比較して小さいことが特徴である。また構成元素である Y、Al および希土類元素は Cd よりも毒性が低いいため、希土類ドーブ YAG ナノ粒子は安定で、かつ低毒性の無機ナノプローブとして期待できる。

固溶させる希土類イオンとして Ce^{3+} 、 Yb^{3+} および Gd^{3+} を検討した。 Ce^{3+} は 4f 軌道に電子を 1 つ持ち、この電子の 4f-5d 間の遷移により励起と発光を行うことができる。この遷移は許容遷移であるため、禁制遷移である 4f-4f 遷移を発光に利用する多くの希土類イオンに比べて高効率の発光が得られることが期待される。また Ce^{3+} の 5d 軌道の分裂の大きさは結晶場強度に依存するため 4f-5d 間のエネルギーギャップも Ce^{3+} がドーブされる母体材料により変化するが、YAG 結晶中に固溶した Ce^{3+} の $4f(^2F_J) \rightarrow 5d(^2A_{1g})$ の遷移エネルギーは約 2.72 eV [1-92] であり、青色光による励起が可能である。青色光は、フリーラジカルや活性酸素を誘発する紫外線 [1-93, 94] と比べて光毒性が低く、生体分子へのダメージを低減することができる。また蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーなど多くの生体分析機器は青色光による励起を標準装備しているため、既存の分析機器をそのまま用いることができる。

Yb^{3+} は近赤外レーザーの発光中心として用いられているイオンである。10,000 cm^{-1} 離れたただ 2 つの 4f 準位を持ち、他の希土類イオンに比べて交差緩和による濃度消光を起こしにくい [1-95]。また Y^{3+} と Yb^{3+} は完全固溶するため [1-96]、容易にその固溶量を変化させることができる。

Gd^{3+} は不対電子を 7 つ持つイオンである。 Gd^{3+} の電子スピンとプロトンの核スピンの相互作用によりプロトンの緩和時間を短縮することができるため、その錯体は MRI 造影剤としてすでに臨床に応用されている。

YAG: Ce^{3+} ナノ粒子の合成については、Kasuya らの先行研究により、1,4-ブタンジオールを溶媒として用いたグリコサーマル法により 1 次粒子径が約 10 nm の YAG: Ce^{3+} ナノ粒子が得られることが知られている [1-97, 98]。しかし、この方法で得られたナノ粒子は 2 次的に凝集し 40-50 nm の凝集粒子を形成する。蛍光プローブへの応用を考えると、巨大な粒子は立体障害による結合阻害や生体分子の運動や機能の低下の原因となるため、粒径はより小さな方が望ましい。

そこで第 3 章では、より小さな粒径の粒子を得ることを目的として、YAG: Ce^{3+} ナノ粒子のグリコサーマル合成における合成条件の検討を行った。検討した条件の 1 つは反応開始時に投入する原料濃度である。オートクレーブに投入する金属塩の量を変化させてグリコサーマル反応を行い、合成後の試料について TEM や DLS による粒径評価を行った。また、反応中の圧力変化や反応後の溶媒に含まれていたテトラヒドロフランの存在から反応機構を推察した。

もう1つの検討事項はクエン酸共存下での合成である。クエン酸は粒子の形態制御[1-99]や分散安定性[1-100]の向上に寄与することが報告されている分子であり、合成時に添加することで粒径に対して何らかの効果を与えると期待される。また、ポリエチレングリコール共存下でグリコサーマル合成した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は、ポリエチレングリコールのヒドロキシル基の配位により量子効率が增大することが報告されており[1-97]、クエン酸共存下でグリコサーマル合成を行った場合も粒子表面の金属イオンへクエン酸のカルボキシル基が配位し、YAG:Ce³⁺ 粒子の光学特性に変化を与えると予想される。そこで、クエン酸共存下で YAG:Ce³⁺ ナノ粒子のグリコサーマル合成を行い、クエン酸の添加が一次粒子径に与える影響を TEM 観察により評価した。また、FT-IR によってクエン酸の吸着量を定量的に評価した。さらに、XRF による Ce の定量、UV-vis、PL・PLE および時間分解蛍光測定を行い、クエン酸の添加が光学特性に与える影響について考察した。

第4章から第6章では、第3章で合成した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を実際に生体分子検出へ応用した。まず第4章では、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子に生体分子であるビオチンをコンジュゲートした。表面にシランカップリング剤を反応させてアミノ基を導入し、分散性や光学特性に影響を与えないことを確認した。さらに、アミノ反応性のビオチン化試薬を用いて YAG:Ce³⁺ ナノ粒子にビオチン分子を導入し、その生体特異性をアビジンビーズを免疫標識することにより確認した。

第4章で調製したビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は純水中では良好に分散したが、リン酸塩緩衝液など比較的塩濃度が高い溶液中では凝集した。これを解決するために、第5章ではポリアクリル酸を静電的に粒子表面に吸着させ、その分散安定性の向上を行った。ゼータ電位の変化と FT-IR により粒子表面へのポリアクリル酸の吸着を確認し、実際にリン酸緩衝液に分散させて分散安定性の向上を確認した。さらに、ポリアクリル酸の持つカルボキシル基を利用してタンパク質であるストレプトアビジンを固定した。これをプレートアッセイに応用してウシ血清アルブミンの定量を行い、蛍光プローブとしての可能性を検討した。

第6章では YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を粒径 5-15 μm のポリメタクリル酸メチルビーズに交互吸着させ、フローサイトメトリー用の蛍光ビーズを作製した。まずゼータ電位測定により交互吸着の様子を観察した。また YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の吸着回数を変化させ、吸着量の変化やビーズの発光強度の変化を FE-SEM、TG-DTA、蛍光顕微鏡および蛍光プレートリーダーを用いて定性的および定量的に評価した。さらに、粒径や発光強度の異なる複数のビーズを調製してフローサイトメトリーを行い、調製した蛍光ビーズがフローサイトメトリーで測定可能であること、およびそれぞれのビーズ群が互いに区別可能であることを確認した。

次に調製した蛍光ビーズの最外層にポリアクリル酸を吸着させ、ポリアクリル酸のカルボキシル基を利用してウシ血清アルブミンを固定した。固定されたウシ血清アルブミンを有機色素が修飾された抗体で免疫標識し、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリー測定によりその赤色発光を確認した。最後にフローサイトメトリー解析のモデル実験として、得られたデータをゲーティング解析して免疫標識したビーズの帰属を行った。

第 4 章から第 6 章までの結果よりグリコサーマル合成した YAG ナノ粒子が生体分子検出へ応用できることが確認されたため、第 7 章と第 8 章では Ce^{3+} 以外の希土類イオンをドーパントとして選択し、新しい機能を有するナノ材料の作製を試みた。

第 7 章では近赤外蛍光を得るために Yb^{3+} をドーパントとして選択し、YAG: Yb^{3+} ナノ粒子のグリコサーマル合成を行った。グリコサーマル法による YAG: Yb^{3+} ナノ粒子の合成は、筆者の知る限り未だ報告されていない。そこで、まず XRD による結晶系の同定と TEM による 1 次粒子の観察を行った。

また合成された試料を様々な温度で焼成し、その XRD プロファイルから結晶子サイズと格子歪みを算出した。さらに真空 FT-IR 測定により粒子に含まれる OH 基量を比較した。これらの結果と PL 強度との関係より、結晶性や OH 基の存在が発光強度に与える影響について考察した。

第 8 章では Yb^{3+} に加えて Gd^{3+} を共ドーブすることにより、近赤外蛍光と磁性という複数のモダリティを持つナノ粒子の作製を試みた。まず出発原料中のイットリウム塩とガドリニウム塩の割合を変化させてグリコサーマル合成を行い、GAG-YAG 固溶体ナノ粒子を作製した。得られた試料に対して XRD による結晶系の同定および SEM 観察を行った。さらに、これらの粒子を造影剤として用いて MRI を行い、Gd 含有量の違いが MR 造影能に与える影響について考察した。

一方で、粒子の最表面に Gd 原子を偏析させるため、あらかじめグリコサーマル合成した YAG ナノ粒子分散液にガドリニウム塩を投入し、再度グリコサーマル反応を行うという 2 段階での合成を行った。得られた粒子に対して XRD による結晶系の同定および TEM 観察を行った。さらに、この粒子を造影剤として用いて MRI を行い GAG-YAG 固溶体ナノ粒子との違いを考察した。

最後に第 7 章で得られた YAG: Yb^{3+} ナノ粒子分散液にガドリニウム塩を添加して 2 段階合成を行い、PL 測定と MRI の結果よりマルチモーダルプローブとしての可能性を検討した。

第1章の参考文献

- [1-1] A. H. Coons, E. H. Leduc, J. M. Connolly, "Studies on antibody production, I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application of the hyperimmune rabbit", *J. Exp. Med.*, **102** 49-60 (1999).
- [1-2] E. P. Diamondis, T. K. Christopolos, "Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays", *Anal. Chem.*, **62**, 1149A-1157A (1990).
- [1-3] F. Pinaud, X. Michalet, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Lyer, S. Weiss, "Advances in fluorescence imaging with quantum dot-bio-probes", *Biomaterials*, **27**, 1679-1687 (2006).
- [1-4] 山田一作, 松本和子, "希土類蛍光プローブを用いるバイオテクノロジー", *未来材料*, **2**, 17-21 (2002).
- [1-5] M. Tan, G. Wang, X. Hai, Z. Ye, J. Yuan, "Development of functionalized fluorescent europium nanoparticles for biolabeling and time-resolved fluorometric applications", *J. Mater. Chem.*, **14**, 2896-2901 (2004).
- [1-6] M. Tan, Z. Ye, G. Wang, J. Yuan, "Preparation and time-resolved fluorometric application of luminescent europium nanoparticles", *Chem. Mater.*, **16**, 2494-2498 (2004).
- [1-7] M. Tan, G. Wang, Z. Ye, J. Yuan, "Synthesis and characterization of titania-based monodisperse fluorescent europium nanoparticles for biolabeling", *J. Lumin.*, **117**, 20-28 (2006).
- [1-8] D. A. F. von Arnim, M. M. Tangredi, I. D. Peltan, B. M. Lee, M. C. Irizarry, A. Kinoshita, B. T. Hyman, "Demonstration of BACE (β -secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy", *J. Cell Sci.*, **117**, 5437-5445 (2004).
- [1-9] T. Förster, "10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation", *Discuss. Faraday Soc.*, **27**, 7-17 (1959).
- [1-10] T. Heyduk, "Measuring protein conformational changes by FRET/LRET", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 292-296 (2002).
- [1-11] R. Cill, I. Willner, I. Shweky, U. Banin, "Fluorescence resonance energy transfer in CdSe/ZnZ-DNA conjugates: probing hybridization and DNA cleavage", *J. Phys. Chem. B*, **109** 23715-23719 (2005).
- [1-12] S. Hohng, T. Ha, "Single-molecule quantum-dot fluorescence resonance energy transfer", *Chem. Phys. Chem.*, **6**, 956-960 (2005).
- [1-13] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, "Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6264-6268 (1996).
- [1-14] X. Liu, Y. Wang, K. Nakamura, G. Liu, S. Dou, A. Kubo, M. Rusckowski, D. J.

Hnatowich, "Optical antisense imaging of tumor with fluorescent DNA duplexes", *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1905-1911 (2007).

[1-15] 金城政孝, "蛍光相関分光法による 1 分子検出", *蛋白質 核酸 酵素*, **44**, 1431-1438 (1999).

[1-16] 金城政孝, "蛍光顕微鏡", *蛋白質 核酸 酵素*, **49**, 1576-1583 (2004).

[1-17] T. Weidemann, M. Wachsmuth, T. A. Knoch, G. Müller, W. Waldeck, J. Langowski, "Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging", *J. Mol. Biol.*, **334**, 229-340 (2003).

[1-18] F. F. Jobsis, "Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters", *Science*, **198**, 1264-1267 (1977).

[1-19] K. E. Adms, S. Ke, S. Kwon, F. Liang, Z. Fan, Y. Lu, K. Hirschi, M. E. Mawad, M. A. Barry, E. M. Sevic-Muraca, "Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer", *J. Biomed. Opt.*, **12**, 024017-1~024017-9 (2007)

[1-20] W. M. Leevy, S. T. Gammon, H. Jiang, J. R. Johnson, D. J. Maxwell, E. N. Jackson, M. Marquez, D. Piwnica-Worms, B. D. Smith, "Optical imaging of bacterial infection in living mice using a fluorescent near-infrared molecular probe" *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16476-16477 (2006).

[1-21] C. Wu, H. Barnhill, X. Liang, Q. Wang, H. Jiang, "A new probe using hybrid virus-dye nanoparticles for near-infrared fluorescence tomography", *Opt. Comm.*, **255**, 366-374 (2005).

[1-22] P. R. Banks, D. M. Paquette, "Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis", *Bioconjugate Chem.*, **6**, 447-458 (1995).

[1-23] E. Lanz, M. Gregor, J. Slavík, A. Kotyk, "Use of FITC as a fluorescent probe for intracellular pH measurement", *J. Fluoresc.*, **7**, 317-319 (1997).

[1-24] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, "Cyanine dye labeling reagents: sulfonocyanine succinimidyl esters", *Bioconjugate Chem.*, **4**, 105-111 (1993).

[1-25] A. A. Ishchenko, N. A. Derevyandko, V. A. Svidro, "Effect of polymethine-chain length on fluorescence-spectra of symmetrical cyanine dyes", *Opt. Spektrosk.*, **72**, 110-114 (1992)

[1-26] X. Zhou, J. Zhou, "Improving the signal sensitivity and photostability of DNA hybridization on microarrays by using dye-doped core-shell silica nanoparticles", *Anal. Chem.*, **76**, 5302-5312 (2004).

[1-27] N. Ranchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhargat, P. J. Millard, F. Mao, W. Leung, R. P. Haugland, "Alexadyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates", *J. Histchem. Cytochem.*, **47**, 1179-1188 (1999).

- [1-28] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*", *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223-239 (1962).
- [1-29] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier, "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein", *Gene*, **15**, 229-233 (1992).
- [1-30] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, "Studying protein dynamics in living cells", *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 444-456 (2001).
- [1-31] P. van Roessel, A. H. Brand, "Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins", *Nat. Cell. Biol.*, **3**, 906-918 (2002).
- [1-32] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression", *Science*, **263**, 802-805 (1994).
- [1-33] S. I. Weissman, "Intramolecular energy transfer, the fluorescence of complexes of europium", *J. Chem. Phys.*, **10**, 214-217 (1942).
- [1-34] A. L. Efros, A. L. Efros, "Interband absorption of light in a semiconductor sphere", *Sov. Phys. Semicond.*, **16**, 772-775 (1982).
- [1-35] A. I. Ekimov, A. A. Onushchenko, "Quantum size effect in the optical spectra of semiconductor microcrystals", *Sov. Phys. Semicond.*, **16**, 775-778 (1982).
- [1-36] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, "Synthesis and Characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystals", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8706-8015 (1993).
- [1-37] R. N. Bhargava, D. Gallagher, "Optical properties of manganese-nanocrystals of ZnS", *Phys. Rev. Lett.*, **72**, 416-419 (1994).
- [1-38] A. P. Alivisatos, "Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots", *Science*, **271**, 933-937 (1996).
- [1-39] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie, "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 40-47 (2002).
- [1-40] W. C. W. Chan, S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science*, **281**, 2016-2018 (1998).
- [1-41] B. Marcel Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, "Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels", *Science*, **281**, 2013-2016 (1998).
- [1-42] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sunder, F. V. Mikulec, M. G. Basendi, "Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12142-12150 (2000).
- [1-43] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, T. M. Green, G. P. Anderson, V. C. Sunder, M. G. Basendi, "Bioconjugation of highly luminescent colloidal CdSe-ZnS quantum dots with an engineered two-domain recombinant protein", *phys. status.*

soldi. B, **224**, 277-283 (2001).

[1-44] J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, "Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates", *Nat. Biotechnol.*, **21**, 47-51 (2003).

[1-45] E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, "Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents", *Anal. Chem.*, **76**, 684-688 (2004).

[1-46] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, "In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles", *Science*, **298**, 1759-1762 (2002).

[1-47] F. Boulmedais, P. Bauchat, M. J. Brienne, I. Arnal, F. Artzner, T. Gacoin, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, "Water-soluble pegylated quantum dots: from a fomite hexagonal phase to isolated micelles", *Langmuir*, **22**, 9797-9803 (2006).

[1-48] N. Travert-Branger, F. Dubois, O. Carion, G. Carrot, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris, C. Mioskowski, "Oligomeric PEG-phospholipids for solubilization and stabilization fluorescent nanocrystals in water", *Langmuir*, **24**, 3016-3019 (2004).

[1-49] W. Guo, J. J. Li, Y. A. Wang, X. Peng, "Conjugation chemistry and bioapplications of semiconductor box nanocrystals prepared via dendrimer bridging", *Chem. Mater.*, **15**, 3125-3133 (2003).

[1-50] G. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", *15 Modification with synthetic polymers*, Academic Press (1996).

[1-51] B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou, J. Cheng, "Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection", *J. Immunol. Methods*, **249**, 85-89 (2001).

[1-52] G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, "Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots" *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8122-8123 (1999).

[1-53] L. Jiang, B. Q. Yang, Y. D. Ma, Y. C. Liu, W. S. Yang, T. J. Li, C. C. Sun, "The binding of phosphorothioate oligonucleotides to CdS nanoparticles", *Chem. Phys. Lett.*, **380**, 29-33 (2003).

[1-54] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb, "Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo", *Science*, **300**, 1434-1436 (2003).

[1-55] E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, "Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates", *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6378-6382 (2002).

[1-56] E. R. Goldman, G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles, J. M. Mauro, "Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays", *Anal. Chem.*, **74**, 841-847 (2002).

- [1-57] C. Huang, H. Liu, C. Tsao, L. Yin, S. Chiu, T. Chen, "Plate-based biochemical assay using quantum dots as a fluorescent labeling agent", *Sens. Actuators B Chem.*, **108**, 713-720 (2005).
- [1-58] B. N. G. Giepmans, T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones, M. H. Ellisman, "Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using quantum dots", *Nat. Methods*, **2**, 743-749 (2005).
- [1-59] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots", *Nat. Biotechnol.*, **22**, 969-976 (2004).
- [1-60] M. Stroh, J. P. Zimmer, D. G. Duda, T. S. Levchenko, K. S. Cohen, E. B. Brown, D. T. Scadden, V. P. Torchilin, M. G. Bawendi, D. Fukumura, R. K. Jain, "Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu *in vivo*", *Nat. Med.*, **11**, 678-682 (2005).
- [1-61] K. C. Weng, C. O. Noble, B. Papahadjopoulos-Sternberg, F. F. Chen, D. C. Drummond, D. B. Kirpotin, D. Wang, Y. K. Hom, B. Hann, J. W. Park, "Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo", *Nano Lett.*, **8**, 2851-2857 (2008).
- [1-62] Z. Zhelev, H. Ohba, R. Bakalova, "Single quantum dot-micelles coated silica shell as potentially non-cytotoxic fluorescent cell tracers", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6324-6325 (2006).
- [1-63] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, "Near-infrared fluorescent type ii quantum dots for sentinel lymph node mapping", *Nat. Biotechnol.*, **22**, 93-97 (2004).
- [1-64] X. Gao, S. Nie, "Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity: rapid readout using flow cytometry", *Anal. Chem.*, **76**, 2406-2410 (2004).
- [1-65] M. Baeumle, D. Stamou, J-M. Segura, R. Hovius, H. Vogel, "Highly fluorescent streptavidin-coated nanoparticles: preparation in water, characterization, and micropatterning", *Langmuir*, **20**, 3828-3831 (2004).
- [1-66] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots", *Nat. Biotechnol.*, **21**, 41-46 (2003).
- [1-67] L. Zhu, S. Ang, W. Liu, "Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 610-612 (2004).
- [1-68] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, "Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots", *Opt. Lett.*, **26**, 825-827 (2001).
- [1-69] Y. Nagasaki, T. Ishii, Y. Sunaga, Y. Watanabe, H. Otsuka, K. Kataoka, "Novel molecular recognition via fluorescent resonance energy transfer using a

- biotin-PEG/polyamine stabilized CdS quantum dot”, *Langmuir*, **20**, 6396-6400 (2004).
- [1-70] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, “Förester resonance energy transfer investigations using quantum-dot fluorephors”, *Chem. Phys. Chem.*, **7**, 47-57 (2006).
- [1-71] A. Agrawl, C. Zhang, T. Byassee, R. A. Tripp, S. Nie, “Counting single native biomolecules and intact viruses with color-coded nanoparticles”, *Anal. Chem.*, **78**, 1061-1070 (2006).
- [1-72] Y. Ma, H. Bai, C. Yang, X. Yang, “A sensitive method for the detection of proteins by high-efficiency fluorescence quanting”, *Analyst*, **130**, 283-285 (2005).
- [1-73] M. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, “Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging”, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 339-343 (2006).
- [1-74] A. Sukhanova, L. Venteo, J. Devy, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, I. Nabiev, “Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of label for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections”, *Lab. Invest.*, **82**, 1259-1261 (2002).
- [1-75] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, “Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking”, *Science*, **302**, 442-445 (2003).
- [1-76] R. Nath, R. Prasad, V. K. Palinal, R. K. Chopra, “Molecular basis of cadmium toxicity”, *Prog. Food Nutr. Sci.*, **8**, 109-163 (1984).
- [1-77] A. M. Derfus, C.W. Warren, S. N. Bhatia, “Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots”, *Nano Lett.*, **4**, 11-18 (2003).
- [1-78] A. Shiohara, A. Hoshino, K. Hanaki, K. Yamamoto, K. Suzuki, “On the cyto-toxicity caused by quantum dots”, *Microbiol. Immunol.*, **48**, 669-75 (2004).
- [1-79] F. Chen, D. Gerion, “Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide for conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells”, *Nano Lett.*, **4**, 1827-1832 (2004).
- [1-80] A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, K. Yamamoto, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, “Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification”, *Nano Lett.*, **4**, 2163-2169 (2004).
- [1-81] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaub, W. J. Parak, S. Stoelzle, N. Fertig, “Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles”, *Nano Lett.*, **5**, 331-338 (2005).
- [1-82] 足立吟也編著, “希土類の科学”, *12 希土類イオンと生体*, 化学同人 (1999).
- [1-83] S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C. Tung, D. Tank, R. H. Austin, “In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*”, *Nano Lett.*, **6**, 169-172 (2006).
- [1-84] H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vali, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, “Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting

- phosphors: a new reporter technology”, *Anal. Biochem.*, **267**, 30-36 (1999).
- [1-85] F. Meiser, C. Cortez, F. Caruso, “Biofunctionalization of fluorescent rare-earth-doped lanthanum phosphate colloidal nanoparticles”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5954-5957 (2004).
- [1-86] E. Beaurepaire, V. Buissette, M. Sauviat, D. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, D. Casanova, A. Huignard, J. Martin, T. Gacoin, J. Boilot, A. Alexandrou, “Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level”, *Nano Lett.*, **4**, 2079-2083 (2004).
- [1-87] G. Yi, H. Lu, S. Zhao, Y. Ge, W. Yang, D. Chen, L. Guo, “Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₃:Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors”, *Nano Lett.*, **4**, 2191-2196 (2004).
- [1-88] F. Wang, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, “One-pot synthesis of chitosan/LaF₃:Eu³⁺ nanocrystals for bio-applications”, *Nanotechnology*, **17**, 1527-1532 (2006).
- [1-89] Y. Hakuta, K. Seino, H. Ura, T. Adshiri, H. Takizawa, K. Arai, “Production of phosphor (YAG:Tb) fine particles by hydrothermal synthesis in supercritical water”, *J. Mater. Chem.*, **9**, 2671-2674 (1999).
- [1-90] X. Li, H. Liu, J. Wang, H. Cui, F. Han, “Production of Nanosized YAG Powders with Spherical Morphology and Nonaggregation via a Solvothermal Method”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **12**, 2288-2290 (2004).
- [1-91] M. Inoue, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, “Synthesis of Yttrium Aluminum Garnet by the Glycothermal Method”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **74**, 1452-1454 (1991).
- [1-92] T. Tomoki, H. Akamine, M. Gushiken, Y. Kinjoh, M. Miyazato, T. Miyazato, N. Toyokawa, M. Hiraoka, N. Hirata, Y. Ganaha, T. Futemma, “Ce³⁺ centres in Y₃Al₅O₁₂ (YAG) single crystals”, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **60**, 2437-2445 (1991).
- [1-93] 小熊久美子, “バイオメディア 生物と紫外線”, *生物工学会誌*, **83**, 304 (2005).
- [1-94] 市橋正光, 佐々木政子編, “生物の光障害とその防御機構”, 共立出版 (2000).
- [1-95] D. Fagundes-Peters, N. Martynyuk, K. Lünstedt, V. Peters, K. Petermann, G. Huber, S. Basun, V. Laguta, A. Hofstaetter, “High quantum efficiency YbGA-crystals”, *J. Lumin.*, **125**, 238-247 (2007).
- [1-96] F. D. Patel, E. C. Honea, J. Speth, S. A. Payne, R. Hutcheson, R. Equall, “Laser demonstration of Yb₃Al₅O₁₂ (YbAG) and materials properties of highly doped Yb:YAG”, *IEEE J. Quantum Electron.*, **37**, 135-144 (2001).
- [1-97] R. Kasuya, T. Isobe, H. Kuma, J. Katano, “Photoluminescence enhancement of PEG-modified YAG:Ce³⁺ nanocrystal phosphor prepared by glycothermal method”, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 22126-22130 (2005).
- [1-98] R. Kasuya, T. Isobe, H. Kuma, “Glycothermal synthesis and photoluminescence of YAG:Ce³⁺ nanophosphors”, *J. Alloys Compd.*, **408-412**, 820-823 (2006).
- [1-99] E. E. Boakye, P. Mogilevsky, R. S. Hay, “Synthesis of Nanosized Spherical Rhabdophane Particles”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **88**, 2740-2746 (2005).

[1-100] Y. Hattori, T. Isobe, H. Takahashi, S. Itoh, "Luminescent properties of ZnS:Mn²⁺ nanocrystals/SiO₂ hybrid phosphor synthesized by in situ surface modification co-precipitation", *J. Lumin*, **113**, 69-78 (2005).

第2章 キャラクターゼーション

2.1 粉末 X 線回折 (XRD) による構造評価

2.1.1 結晶相の同定

試料の結晶相の分析を行うため、X 線回折装置 (理学電機, RINT 2200) を用いて XRD 測定を行った。測定条件を Table 2-1 に示す。2.1.3 の解析を行う場合は、測定する XRD ピークを選択し、より精密な測定を行った。

Table 2-1 Measurement conditions of XRD profiles.

	Normal	Precise
Target		Cu
Measurement region (2 θ /deg)	10 - 60	Selected peak
Scan step (deg)	0.05	0.01
Scan speed (deg \cdot min ⁻¹)	2	0.25
Receiving slit width (mm)		0.3
Current (mA)		30
Voltage (kV)		40

2.1.2 Scherrer 法による結晶子径算出

結晶が十分に大きく無歪であると仮定できる場合、回折プロファイルにおける線幅の広がりには結晶子の大きさのみ依存すると考えられる。さらに、結晶子の大きさが均一である場合、以下に示す Scherrer の式 (Eq.2-1) によって結晶子径を算出できる[2-1,2]。

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta_{\text{cryst}} \cos \theta} \quad (\text{Eq.2-1})$$

ここで D_{hkl} は(hkl)面に垂直な方向における結晶子径、 λ は X 線の波長、 β は結晶子のサイズ効果による線幅の広がり、 θ は Bragg の回折角、 k はシェラーの定数である。Eq.2-1 における β_{cryst} は結晶子の大きさによる線幅広がりであり、観測される回折ピーク線幅 B と装置の光学系に起因する線幅広がり係数 b を用いて Eq.2-2 のように表現される。

$$\beta = B - b \quad (\text{Eq.2-2})$$

このため格子歪が無視できるほど少なく、かつ結晶子径の充分大きい試料を外部標準として測定し、 $b (=B_0)$ を求めておく必要がある。

2.1.3 Stokes-Wilson 法による格子歪み算出

Scherrer 法では、結晶が完全であるという仮定のもとで結晶子径を算出できる。しかし、現実の結晶は格子欠陥や格子歪みなどを含んでおり、プロファイルの広がりにはこれらの影響を考慮する必要がある。Wilson らによれば、格子歪による回折線幅の広がり β_{lattice} は Eq.2-3 のように表せる [2-3]。

$$\beta_{\text{lattice}} = 4e \tan \theta \quad (\text{Eq.2-3})$$

ここで e は最大の格子歪みを表す。回折線幅の広がりが β_{cryst} と β_{lattice} によってもたらされる時、両方の因子に由来するプロファイル形状を近似する手法が用いられる。結晶子の大きさと格子歪みによるプロファイルの広がりが、ともに Cauchy(Lorentz)関数で近似できる場合、プロファイルに寄与する全ての因子を β_{total} とすると

$$\beta_{\text{total}} = \beta_{\text{cryst}} + \beta_{\text{lattice}} \quad (\text{Eq.2-4})$$

上式の単位をラジアン (2θ) から S 単位 ($S=2\sin\theta/\lambda$) に変換すると

$$d\beta_{\text{total}} = d\beta_{\text{cryst}} + d\beta_{\text{lattice}} \quad (\text{Eq.2-5})$$

Eq.2-3 と Scherrer の式 (Eq.2-1) についても、それぞれ同様に

$$d\beta_{\text{lattice}} = 2es \quad (\text{Eq.2-6})$$

$$D_{\text{hkl}} = \frac{k}{\frac{2\cos\theta}{\lambda} \times d\theta} = \frac{k}{d\beta_{\text{cryst}}} \quad (\text{Eq.2-7})$$

Eq.2-6 中の s は線幅広がりを S 単位で表したものである。これらを Eq.2-5 に代入すると

$$d\beta_{\text{total}} = \frac{k}{D_{\text{hkl}}} + 2es \quad (\text{Eq.2-8})$$

Eq.2-8 より、 $d\beta$ と s をプロットすると結晶子の大きさと格子歪みが算出できる。

2.2 蛍光 X 線分析 (XRF) による組成分析

合成した試料の元素分析を XRF (理学電機, ZSXmini II) によって行い、ファンダメンタルパラメータ法 [2-4] を用いて組成を決定した。第 3 章においては、 Y_2O_3 、 Al_2O_3 、 CeO_2 を $\text{Y}:\text{Ce}:\text{Al}=3(1-x):3x:5$ ($0 \leq x \leq 0.04$) の組成で混合し、Ce 濃度と Ce-L α 線強度についての検

量線を作製した。作製した検量線を Fig.2.1 に示す。

2.3 フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) による有機物の解析

2.3.1 通常測定

試料に吸着している有機物の同定と金属イオンの配位状態を検討するため、赤外分光光度計 (Bio-Rad, FTS-60A および日本分光, FT/IR-6100) を用いて拡散反射法による FT-IR スペクトルの測定を行った。測定条件を Table 2-2 に示す。

Table 2-2 Measurement conditions of FT-IR spectra.

	FTS-60A	FT/IR-6100
Matrix	KBr	CaF ₂
Measurement region (cm ⁻¹)	400 - 4000	800 - 2200
Resolution (cm ⁻¹)	2	2
Acquisition time	32	100

2.3.2 真空測定

試料中の OH 基量について評価するため、赤外分光光度計 (日本分光, FT/IR-6100) を用いて真空下で拡散反射法による FT-IR スペクトルの測定を行った。測定条件を Table 2-3 に示す。

Table 2-3 Measurement conditions of FT-IR spectra.

Matrix	CaF ₂
Measurement region (cm ⁻¹)	400 - 4000
Resolution (cm ⁻¹)	4
Acquisition time	128

2.4 熱重量・示差熱分析 (TG-DTA)

試料の熱挙動を解析するため、熱重量・示差熱分析装置 (理学電機, TG8120) を用いて TG-DTA プロファイルを測定した。ここでは試料とレファレンス用 α -Al₂O₃ をそれぞれ白金パンに添加して測定を行った。測定条件を Table 2-4 に示す。

Table 2-4 Measurement conditions of TG-DTA

Sample weight (mg)	10
Heating rate (K·min ⁻¹)	10
Maximum temperature (°C)	1300
Air flow (mL·min ⁻¹)	200

2.5 電子顕微鏡による粒径および形態の評価

2.5.1 透過型電子顕微鏡 (FE-TEM) による像観察

試料の粒径および形態を観察するため、FE-TEM (FEI, Tecnai F120) による像観察を行った。像観察に用いる検体は、試料をエタノール溶媒中に分散させて得られた分散液をコロジオン膜貼付メッシュ上に滴下し、乾燥することで作製した。

2.5.2 走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による像観察

試料の粒径および形態を観察するため、FE-SEM (日立, S-4700) による像観察を行った。検体はカーボンテープに試料を貼り付け、オスミウムを蒸着させることで作製した。

2.6 動的光散乱法 (DLS) を用いた粒度分布測定

分散液中での試料の凝集状態を評価するため、DLS (Malvern, HPPS) による粒度分布測定を行った。測定に用いる分散液は、3 mL の純水およびリン酸塩緩衝液に対し試料コロイドを 1 滴滴下することで調製した。測定に用いたパラメータを [Table 2-5](#) に示す。

Table 2-5 Measurement conditions of DLS.

Refractive index of water (-)	1.33
Refractive index of YAG (-)	1.82
Measurement temperature (°C)	25

2.7 光学特性評価

2.7.1 蛍光 (PL) および蛍光励起 (PLE) スペクトル測定

試料の光学特性評価を行うため、蛍光光度計 (日本分光, FP-6600) を用いて PL および PLE スペクトル測定を行った。測定条件を [Table 2-6](#) に示す。

Table 2-6 Measurement conditions of PL spectra.

	PL	PLE
Excitation or emission wavelength (nm)	450	530
Measurement region (nm)	475 - 800	300 - 500
Spectral slit width on excitation (nm)		3
Spectral slit width on emission (nm)		3
Response (s)		1
Sensitivity		Medium
Scan speed (nm·min ⁻¹)		200
Scan step (nm)		0.5

2.7.2 近赤外蛍光 (NIR-PL) スペクトル測定

近赤外領域の PL スペクトルについて、蛍光光度計 (日本分光, FP-6600) を用いて測定を行った。測定条件を [Table 2-7](#) に示す。励起光源には波長 940 nm の近赤外レーザー (B&K

TEK Inc, BWF2-940-1.5-100.0.22-SMA) を用いた。

Table 2-7 Measurement conditions of NIR-PL spectra.

Measurement region (nm)	960 – 1200
Spectral slit width on excitation (nm)	3
Spectral slit width on emission (nm)	2
Response (s)	1
PMT voltage (V)	550
Scan speed (nm·min ⁻¹)	200
Scan step	0.5

2.7.3 紫外・可視・近赤外 (UV-vis-NIR) 吸収スペクトル測定

試料の電子状態について調べるために紫外・可視・近赤外分光光度計 (日本分光, V570) を用いて UV-vis-NIR スペクトル測定を行った。測定は積分球ユニットを用いた拡散反射スペクトルによって行った。測定条件を Table 2-8 に示す。

Table 2-8 Measurement conditions of UV-vis-NIR spectra.

	UV-vis	NIR
Measurement region (nm)	200 - 850	850 - 1300
Spectral slit width (nm)	2	4
Sensitivity	Medium	
Scan speed (nm·min ⁻¹)	40	
Scan step (nm)	1	

2.7.4 内部蛍光量子効率の算出

YAG:Ce³⁺ ナノ粒子については、Eq.2-9 に従って内部蛍光量子効率 IQE_{sample} を算出した。

$$IQE_{sample} = IQE_{ref} \times \frac{F_{sample}}{F_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A_{sample}} \quad (\text{Eq.2-9})$$

ここで、 IQE_{ref} は市販(Y_{2.1},Gd_{0.9})A₅O₁₂:Ce³⁺粉末 (Kasei Optonix, P46-Y3) の内部量子効率 (= 72 %)、 F_{sample} は波長 450 nm で励起したときの合成試料の発光スペクトルの積分値、 F_{ref} は波長 470 nm で励起したときの市販(Gd, Y)AG:Ce³⁺粉末発光スペクトルの積分値、 A_{sample} は波長 450 nm における合成試料の吸光度、 A_{ref} は波長 470 nm における市販(Gd, Y)AG:Ce³⁺の吸光度を表す。

2.7.4 蛍光プレートリーダーによる蛍光強度測定

ウェルプレートに導入された試料の蛍光強度を評価するため、蛍光プレートリーダー（大日本住友製薬株式会社, Power scan HT）を用いて測定を行った。測定条件を [Table 2-9](#) に示す。

Table 2-9 Measurement conditions of fluorescent plate reader.

Excitation source	Xe flash lamp
Excitation filter (nm)	440 - 480
Emission filter (nm)	518 - 538
Sensitivity	100

2.8 磁気特性評価

2.8.1 核磁気共鳴画像法 (MRI)

試料の緩和能 R_1 , R_2 を評価するため、磁場強度 7T の核磁気共鳴装置 (Varian, INOVA) を用いてスピンエコー法により MRI を行った。検体は粉末試料を 1% のアガロースゲルに分散させて作製した。測定条件を [Table 2-10](#) に示す。

Table 2-10 Measurement conditions of MRI.

	T1-weighted	T2-weighted
Repetition time (ms)	300	3000
Echo time (ms)	30	100
Field of view (mm)	51.2 x 25.6	
Matrix (-)	512 x 256	256 x 128
Filp angle (°)	90	
Slice thickness (mm)	1	

2.8.2 振動試料型磁力計 (VSM) による磁気測定

試料の磁気特性を評価するために、振動試料型磁力計 (理研電子, BHV-5) を用いて磁気測定を行った。検体は内径 5.6mm の容器に 2.5mm まで試料を充填して作成した。測定条件を [Table 2-11](#) に示す。

Table 2-11 Measurement conditions of VSM.

Sample temperature (°C)	25
Max applied magnetic field (kOe)	15
Sweep speed (min/loop)	5

付録 MRI の測定原理

MRI は核スピンの磁気的な緩和を利用して画像化を行うイメージング技術である。核スピンを有する原子核は多数存在するが、検出感度や天然存在比の観点から、 ^1H の核スピンを検出端として利用するのが一般的である。

1) ^1H の核磁気モーメント

^1H の核磁気モーメントは、外部磁場が存在しない環境では Fig.2.1(a) に示すように自由に配向する。しかし、磁場にさらされた場合は、Fig.2.1(b) に示すように磁場に平行な状態 (α 状態とする) と反平行な状態 (β 状態とする) の 2 つの方向のみが許容され、Eq.2-10 に従い、磁場強度に応じた周波数の歳差運動をする。

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (\text{Eq.2-10})$$

ここで ω は角周波数、 γ は磁気回転比、 B_0 は磁場強度である。このとき、 α 状態と β 状態ではエネルギー状態が異なり、そのエネルギー差は Eq.2-11 で与えられる。

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (\text{Eq.2-11})$$

ここで $\hbar = h/(2\pi)$ であり、 h はプランク定数である。この 2 つのエネルギー状態にある磁気モーメントの相対的な分布は Eq.2-12 に示すボルツマン関数に従う。

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp \frac{\Delta E}{kT} = \exp \frac{\gamma \hbar B_0}{kT} \approx 1 + \frac{\gamma \hbar B_0}{kT} \quad (\text{Eq.2-12})$$

ここで k はボルツマン定数、 T は絶対温度である。例えば、 27°C で 1 T の磁場中に置かれた場合、 $N_\alpha/N_\beta = 1.000007$ であり、わずかに低エネルギー状態 (α 状態) にある磁気モーメントが多くなる。ここで、磁気モーメントに ΔE に相当するエネルギーの電磁波を照射すると、磁気モーメントは α 状態から β 状態へ遷移し、やがて α 状態と β 状態が同数の飽和状態に達する。

2) 共鳴

実際に MRI で観測できるのは個々の ^1H の磁気モーメントではなく、無数の ^1H の磁気モーメントの総和、すなわち巨視的磁化 M である。外部磁場が存在しない場合、個々の磁気モーメントは自由に配向しているため、そのベクトル和は 0 となる。

磁場 B_0 にさらされた場合、個々の磁気モーメントは ω_0 で歳差運動をする。Fig.2.2(a) のように磁場 B_0 の方向を Z 方向と仮定すると、X 軸、Y 軸方向のベクトル和は相殺され 0 となり、Z 軸方向に角周波数 ω_0 で回転する巨視的磁化 M を持つことになる。

さらにこの状態を Z 軸を中心として各周波数 ω で回転する座標系 (X', Y', Z) で表現し、X' 軸方向に磁場 B_1 を印加すると、Fig.2.2(b) に示すように巨視的磁化 M は Y' 軸方向に角速度 $\omega_1 = \gamma B_1$ で歳差運動を始める。通常の座標系 (X, Y, Z) においては、この回転磁場は角周波数 $\omega/2\pi$ の振動磁場に相当し、巨視的磁化 M は螺旋を描きながら Z 軸に対する角度を増加させる。この振動磁場はパルスと呼ばれ、Y' 方向に $\pi/2$ だけ回転させるパルスを 90° パルス、 π だけ回転させるパルスを 180° パルスと呼ぶ。また、巨視的磁化の Z 軸成分を縦磁化、XY 軸成分 (Y' 軸成分) を横磁化と呼ぶ。MRI では、Z 軸方向には強い静磁場がかかっているため縦磁化を直接観察することができない。そこで、90° パルスの照射などにより横磁化として観測を行う。

3) 縦緩和と横緩和

まず縦緩和に着目する。静磁場 B_0 に置かれた巨視的磁化 M は、パルスの照射によって Y' 軸方向に回転し縦磁化 M_z は減少するが、その後 Eq.2-13 に従って指数関数的に M_0 へ回復することが現象論的に確かめられている [5]。

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M}{T_1} \quad (\text{Eq.2-13})$$

この時定数 T_1 は縦緩和時間と呼ばれる。90° パルス照射後の縦緩和は Eq.2-14 で表される。

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{Eq.2-14})$$

一方、180° パルス照射後の縦緩和は、Eq.2-15 で表される。

$$M_z = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (\text{Eq.2-15})$$

縦緩和現象を個々の ^1H の磁気モーメントで考えると、パルスの照射により増加していた β 状態の磁気モーメントが準位間エネルギー ΔE を放出して α 状態へ戻ることに対応する。この放出される準位間エネルギーは、主に格子と呼ばれる原子間周囲に与えられる。このエネルギーの授受はスピン - 格子緩和と呼ばれ、格子が共鳴周波数で運動しているときのみ行われる [6]。

横磁化は個々の磁気モーメントの XY 成分のベクトル和である。個々の磁気モーメントの歳差運動の共鳴周波数が同じで、かつ位相が揃っていれば横磁化は保たれる。しかし実際には、周囲の磁気モーメントによる磁場のため磁気モーメント毎にわずかに異なった磁場を感じる。そのため、共鳴周波数に差が生じ、Fig.2.3 に示すように次第に位相が合わな

くなる。最終的には横磁化は消失する。この横磁化の減衰も縦磁化と同様、指数関数に従うことが現象論的に確かめられており、Eq.2-16 で表される。

$$\frac{dM_{XY}}{dt} = -\frac{M_{XY}}{T_2} \quad (\text{Eq.2-16})$$

この時定数 T_2 は横緩和時間と呼ばれる。90°パルス照射後の横緩和は Eq.2-17 で表される。

$$M_{XY} = M_{Y'} = M_0 e^{-t/T_2} \quad (\text{Eq.2-17})$$

4) T_1 強調画像と T_2 強調画像

90°パルスを照射した場合を考える。まず縦緩和に着目すると、Fig.2.4(a) に示すように T_1 の短い組織と T_1 の長い組織では TR 時間後の縦磁化の回復量が異なり、 T_1 の短い組織のシグナル強度がより増大する。 T_1 強調撮像ではこのような縦磁化の回復速度の違いを利用して画像化しており、 T_1 の短い (縦緩和の早い) 組織ほど白く強調される。

横緩和に着目すると、Fig.2.4(b) に示すように T_2 の短い組織と T_2 の長い組織では TE 時間後の横磁化の減衰量が異なり、 T_2 の短い組織のシグナル強度がより減少する。 T_2 強調撮像ではこのような横磁化の減衰速度の違いを利用して画像化しており、 T_2 の短い (緩和の早い) 組織ほど黒く強調される。

Fig.2.5 に示すようなパルスシーケンスにより MRI を行った場合、得られるシグナル強度 S は繰り返し時間 TR とエコー時間 TE との間に Eq.2-18 ような比例関係がある [6]。

$$S \propto M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right] \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (\text{Eq.2-18})$$

TR を長く設定した場合、[] 内が 1 に近づくため横緩和速度の差が強調された画像が得られる。逆に、TR を短く設定すると縦緩和速度の差が強調された画像が得られる。

5) 造影剤と緩和能

Gd^{3+} や Fe^{3+} など金属イオンやメラニンなどの常磁性物質は大きな磁気モーメントを持つ。そのため、 1H の磁気緩和を促進し、MRI におけるコントラストを向上させる物質として機能する。

例えば Gd - DOTA などの Gd 錯体は、水分子が配位できる配位座を有している。そこへ水分子が配位すると、水分子の 1H と Gd^{3+} の電子スピン間に接触相互作用と双極子双極子相互作用とが生じ、縦磁化の回復を促進する。このような効果を持つ造影剤を陽性造影

剤と呼ぶ。

一方、酸化鉄などは多数の電子スピンの強い相互作用で互いに結合しており、きわめて強い磁気モーメントを有する。そのため、周囲に非常に強い磁場勾配を与えるため、その近傍を通過する ^1H は不均一な磁場を感じることになり、スピンのコヒーレンスが速やかに失われる。このように横磁化の減少を促進させる効果を持つ造影剤を陰性造影剤と呼ぶ。

これらの造影剤の能力は緩和能 R_1, R_2 と呼ばれる値で評価され、Eqs.2-19, 20 で定義される。

$$R_1 = \frac{\frac{1}{T_{1p}} - \frac{1}{T_{10}}}{C} \quad (\text{Eq.2-19})$$

$$R_2 = \frac{\frac{1}{T_{2p}} - \frac{1}{T_{20}}}{C} \quad (\text{Eq.2-20})$$

ここで、 C は造影剤濃度、 T_{10}, T_{20} はそれぞれ造影剤投与前の縦緩和時間、横緩和時間、 T_{1p}, T_{2p} はそれぞれ造影剤投与後の縦緩和時間、横緩和時間を表す。緩和能が大きいほど少量の造影剤で大きな効果をもたらすことができる。Eqs.19, 20 を変形すると、

$$\frac{1}{T_{1p}} = R_1 C + \frac{1}{T_{10}} \quad (\text{Eq.2-21})$$

$$\frac{1}{T_{2p}} = R_2 C + \frac{1}{T_{20}} \quad (\text{Eq.2-22})$$

と表すことができる。つまり、造影剤濃度に対して緩和時間の逆数をプロットすると、その傾きから緩和能を求めることができる。

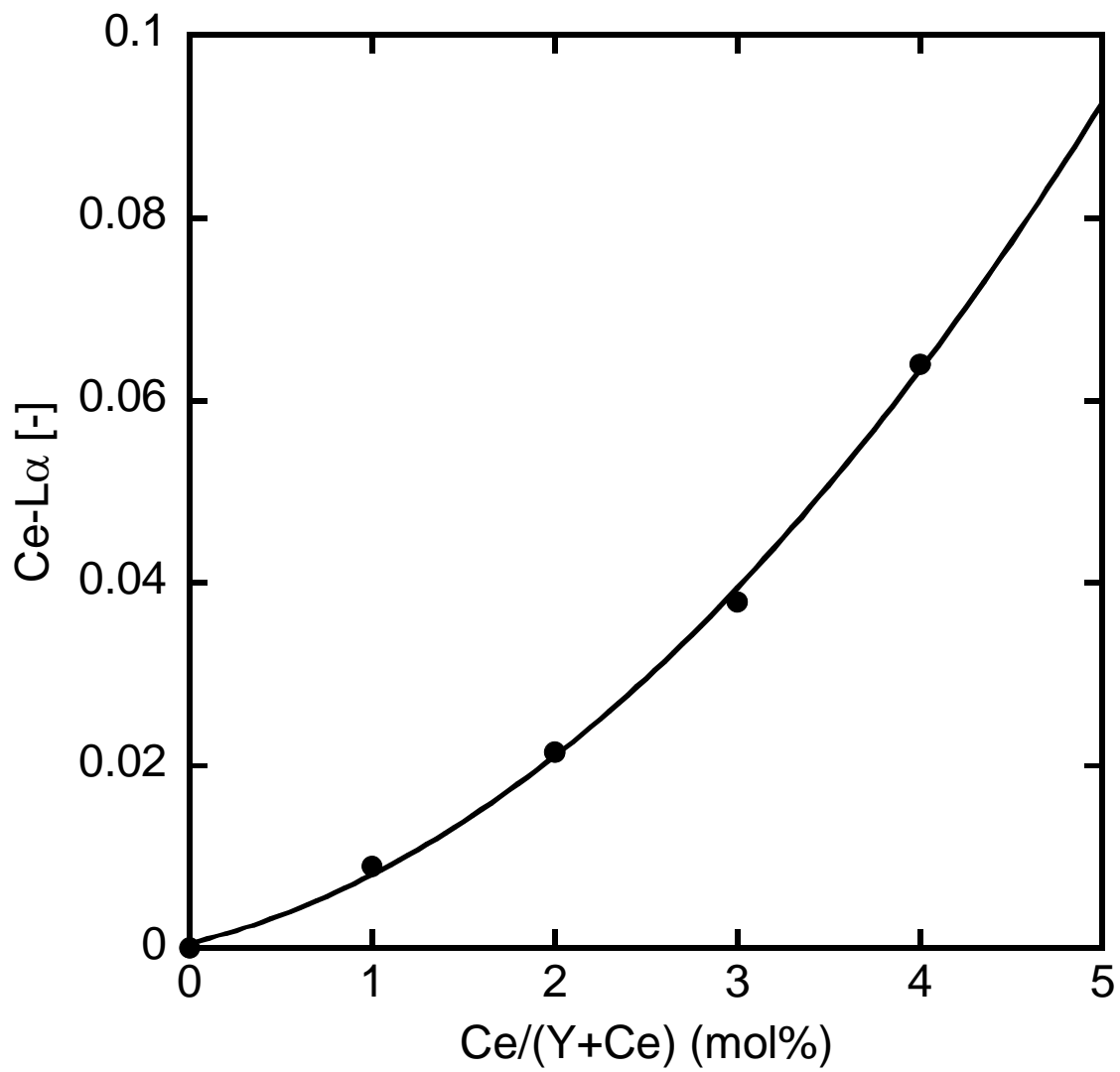


Fig.2.1 Calibration curve of Ce/(Y+Ce).

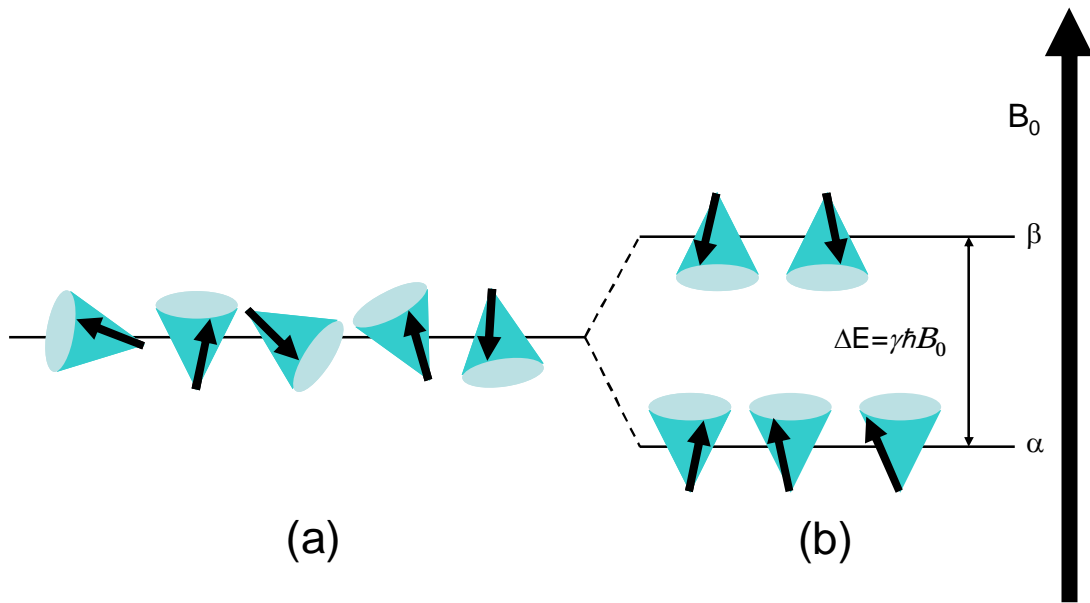


Fig.2.1 Illustration of the magnetic moments (a) without and (b) with magnetic field B_0 .

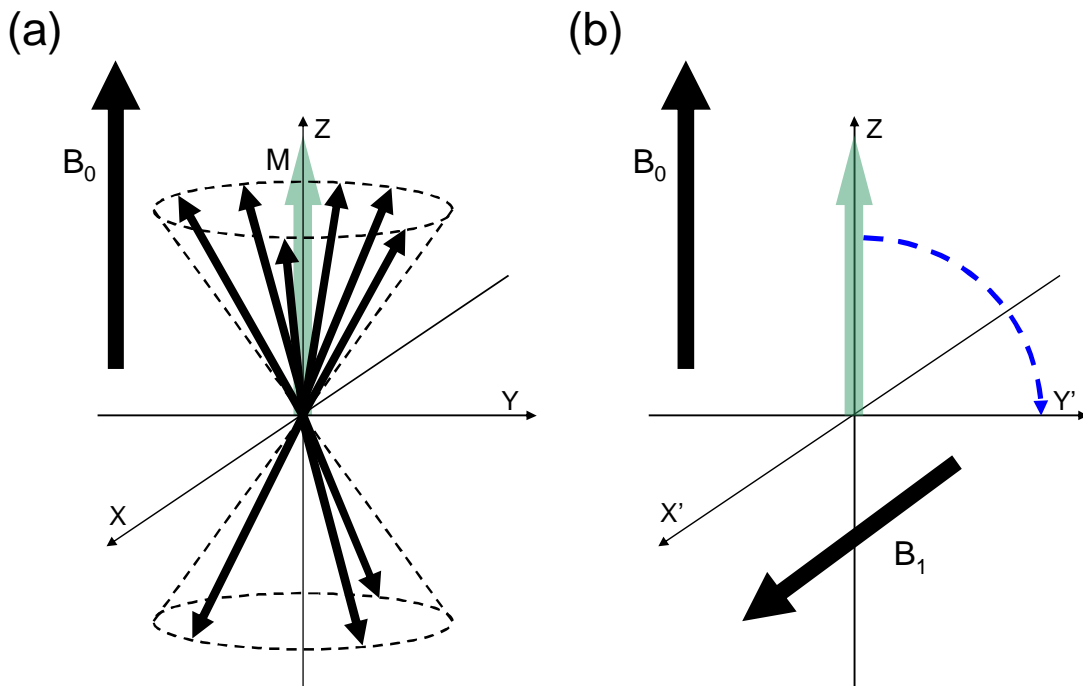


Fig.2.2 (a) Illustration of the integrated magnetic moments M in magnetic field B_0 . (b) Rotation of integrated magnetic moment M by irradiation of B_1 .

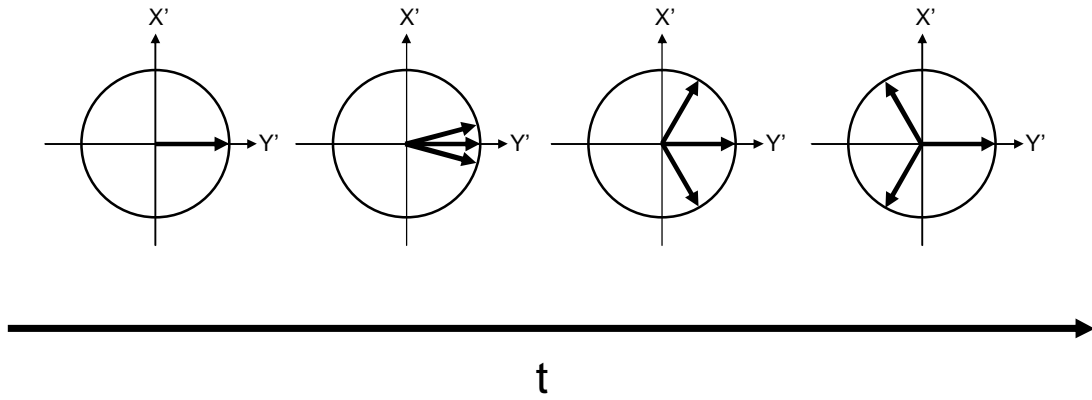


Fig.2.3 Illustration of dephasing of magnetic moments.

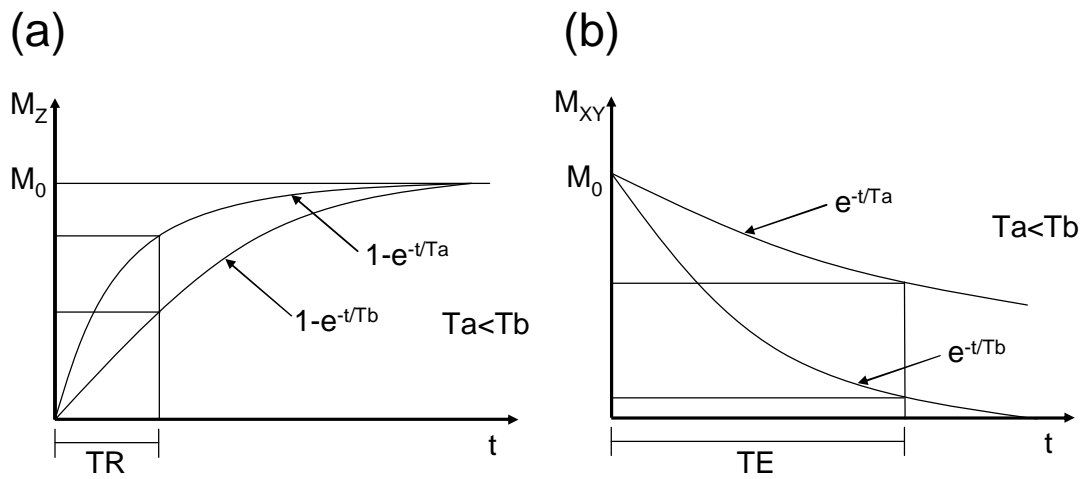


Fig.2.4 (a) Longitudinal relaxation vs. TR. (b) Transverse relaxation vs. TE.

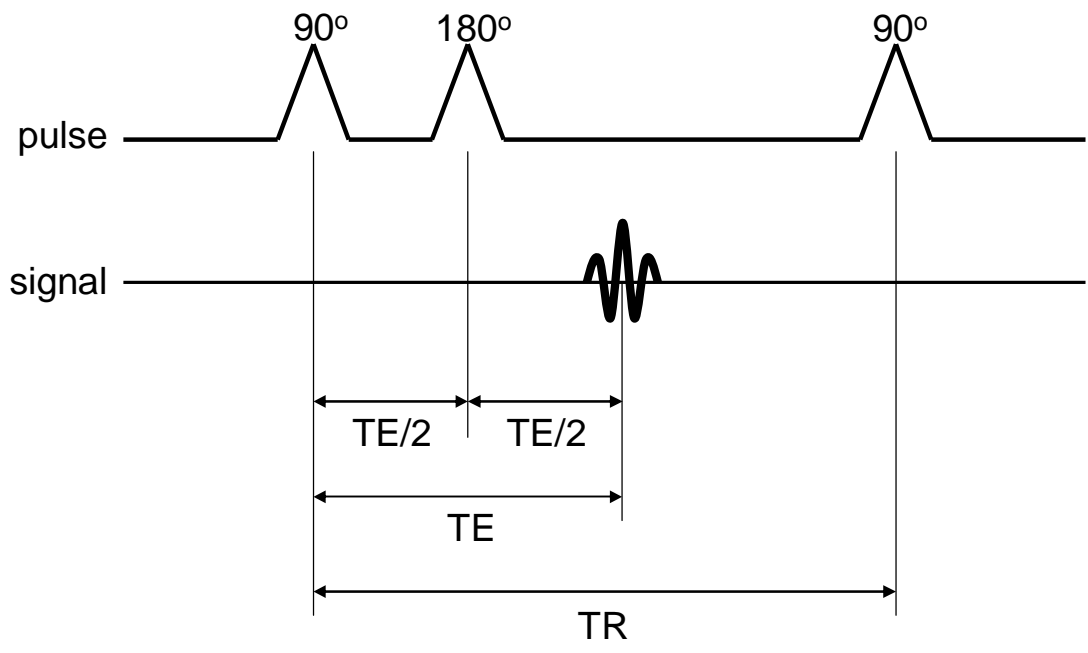


Fig.2.5 Pulse sequence of spin echo method.

第2章の参考文献

- [2-1] 理学電機株式会社分析センター編, “X線回折の手引 改訂第四版”, 第2章 [多結晶によるX線回折], 理学電機 (1986).
- [2-2] “RINT2000 シリーズ アプリケーションソフトウェア 結晶子の大きさ・格子歪の解析取扱説明書”, 2. [原理], 理学電機.
- [2-3] A. R. Stokes, A. J. C. Wilson, “A method of calculating the integral breadths of Debye-Scherrer lines”, *Proc. Camb. Phil. Soc.*, **38**, 313-322 (1942).
- [2-4] 大野勝美, 川瀬晃, 中村利廣著, “機器分析実技シリーズ X線分析法”, 6 [定量分析の基礎], 共立出版 (1987).
- [2-5] 日本磁気共鳴医学会教育委員会編, “MRI レクチャー 基礎から学ぶMRI”, インナービジョン (2001).
- [2-6] 荒木力著, “MRI「再」入門 臨床からみた基本原理”, 南江堂 (1999)

第3章 YAG:Ce³⁺ナノ粒子のグリコサーマル合成条件の検討

3.1 緒言

3.1.1 YAG 結晶とその合成法

イットリウムアルミニウムガーネット Y₃Al₅O₁₂ (YAG)は、ガーネット構造の複合酸化物である。1970 °C という高い融点[3-1]を有し、熱的・化学的に安定である。可視光領域で透明な結晶であるため、希土類元素を中心とする様々なドーパントを固溶させる光学結晶母体として用いられている[3-2~5]。特に、Nd³⁺を固溶させた YAG:Nd³⁺は代表的な近赤外レーザー材料であり、工業・通信・医療など多岐にわたる分野で重要な役割を果たしている。

YAG の合成方法は Czochralski 法[3-1]による単結晶合成法の他にも、固相法[3-6]、ゾルゲル法[3-7~9]、ペチニ法[3-10]、共沈法[3-11]、燃焼法[3-12]、スプレー熱分解法[3-13]、熱圧縮法[3-14]などが挙げられる。これらの合成法では結晶化を目的とした焼成が必要であり、YAlO₃ (YAP) や Y₄Al₂O₉ (YAM) などの副生成物の生成を回避するためには、700-1500 °C という高温が必要である。

一方で、焼成を必要としない YAG の合成法として溶媒熱合成法が提案されている。溶媒として水[3-15]を用いた水熱合成の他にも、水 - エタノールの混合溶媒[3-16~17]やグリコール[3-18~20]を用いた溶媒熱合成の報告例がある。たとえば、Liらはエタノール - 水の混合溶媒を用いた溶媒熱合成により、280 °C という低温で YAG 結晶を得ている[3-17]。

3.1.2 YAG:Ce³⁺の発光機構

YAG:Ce³⁺は YAG を母体とし、Y³⁺と置換して Ce³⁺が賦活されることによって得られる蛍光体で、1967 年に Blasse と Bril らによって発見され[3-21]、青色 LED と組み合わせた白色 LED[3-22~24]やγ線検出のシンチレータ材料[3-25,26]として応用されている材料である。

Fig.3.1 に、YAG に固溶した Ce³⁺の準位を示す[3-27]。4f 軌道はスピン - 軌道相互作用により基底状態で ²F_{5/2} と ²F_{7/2} の 2 つの準位に分裂する。一方で、5d 軌道は結晶場の影響を受け、5 つの準位に分裂する。YAG:Ce³⁺では、この 5d-4f 間の許容遷移を励起・発光に利用するため、4f-4f 間の禁制遷移を利用する他の希土類ドーパントと比較して高発光効率が期待できる。また、母体へのガドリニウムやガリウムの添加により Ce³⁺周辺の結晶場強度を変化させて 5d 軌道の分裂を操作し、励起波長や蛍光波長をコントロールすることができる[3-6,28]。

3.1.3 グリコサーマル法による YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

3.1.3.1 グリコサーマル法によるガーネット結晶の合成

グリコサーマル法とは、エチレングリコールや 1,4-ブタンジオールなどのグリコールを溶媒として用いる溶媒熱合成法の 1 つであり、ZrO₂-TiO₂[3-29]、Fe₃O₄[3-30]および希土類酸化物[3-31]などの酸化物ナノ粒子や ZnGa₂O₄[3-32]などの複合酸化物ナノ粒子のほか、

ホウ酸[3-33]、リン酸[3-34]およびタングステン酸[3-35]のようなポリ酸を含むナノ結晶の合成に利用されている。

Inoueらは、酢酸イットリウムとアルミニウムトリイソプロポキシドを金属原料に、1,4-ブタンジオールを溶媒に用いたグリコサーマル反応により YAG ナノ粒子を得ている[3-19]。水熱合成で YAG ナノ粒子を単相で得るには 350-600 °C という高温と 75-150 MPa という高圧が必要であるのに対し、1,4-ブタンジオールを用いたグリコサーマル合成では 280-300 °C、4-5 MPa という比較的ゆるやかな条件で合成することができる。

反応機構は以下のように考えられている。まず、アルミニウムトリイソプロポキシドのみをグリコール溶媒に投入してグリコサーマル処理を行うと、Fig.3-2 に示すようなベーマイト (AlOOH) の層間にグリコール分子が配位した誘導体を形成する[3-36~39]。グリコール分子の炭素数を増加させると生成するベーマイト誘導体の層間距離は増加する[3-38]。一方で、XRD プロファイルから算出される結晶子サイズは、グリコールを HO(CH₂)_nOH と表すと 2<3<6<4 の順に増大する。Inoueらは、結晶構造の発達のはやすさはグリコシド中間体の Al-O-C 結合の C-O ヘテロリティック開裂のはやすさに依存している[3-42]。炭素数が増加するに従い C-O ヘテロリティック開裂が起こりやすくなるが、n=4 の 1,4-ブタンジオールを溶媒に用いた場合は分子内の OH 基の隣接基関与により特異的に開裂を起こしやすい[3-40]。例えば、n=2 のエチレングリコールを溶媒として用いた場合は、C-O ヘテロリティック開裂が起こりにくいため、生成物は溶媒を多量に含むゲル状物質として得られる。

一方、希土類酢酸塩のみを 1,4-ブタンジオール中 300 °C で加熱すると酢酸基の一部が加水分解され、REO(OCOCH₃)、RE(OH)₂(OCOCH₃)、RE(OH)(OCOCH₃)₂ のいずれかが結晶化する[3-41]。生成する結晶相は希土類イオンの半径によって異なり、酢酸イットリウムの場合は YO(OCOCH₃) が結晶化する。酢酸イットリウムとアルミニウムトリイソプロポキシドを 1,4-ブタンジオールに投入し、300 °C よりも低温(250 °C)でグリコサーマル処理を行うと、YAG のほかにこの YO(OCOCH₃) に帰属される XRD ピークが出現する。反応時間の伸長によりこの YO(OCOCH₃) にされるピークは減少し、同時に YAG の収率が增大する。このことから、この中間体、あるいはこの中間体との平衡状態を経由して YAG が生成すると考えられる[3-19]。

同様の金属塩を用いて水熱合成を行うと結晶性の高いベーマイトが生成し、YAG はほとんど生成しない[3-19]。また、希土類水酸化物の安定性は希土類イオンの半径の増大に伴い増大するため、水熱合成によって Gd³⁺以上の半径を持つ希土類アルミニウムガーネットの作製は困難であった。しかし、グリコサーマル法では安定性の低いベーマイト誘導体を中間体として経路するため、全ての希土類イオンに対してガーネット構造を得ることができる[3-19]。

また、アルコキシドを原料とした水熱合成では原料の加水分解の状態が生成物に影響を与えるが、グリコサーマル反応では水酸化物とグリコシド誘導体は平衡状態にあるため、わずかな加水分解は生成物に影響を与えない[3-42]。グリコサーマル法は、ハンドリングが比較的容易な合成法といえる。

さらに、生成するガーネット結晶の単位格子が増大すると、核生成頻度が減少することが示唆されている。例えば、Al 源の代わりに Ga 源を用いると、ガリウムガーネットの単位格子はアルミニウムガーネットのそれよりも大きいため核生成速度が減少し、生成するナノ粒子の粒径は増大する[3-43, 44]。また、希土類酢酸塩と鉄アセチルアセトナートを用いてグリコサーマル合成を行っても $\text{RE}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$ を直接得ることはできない。Inoue らはこの理由を、単位格子の増大に伴い核生成が困難になったためであるとしている[3-45]。

3.1.3.2. グリコサーマル合成により得られた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の特性

グリコサーマル法は、モノクリニック相を経由する他の液相合成法とは異なり、直接ガーネット相が得られるドライビングフォースの強い反応である[3-46]。そのため、結晶中には多くの酸素欠陥やカチオン欠陥が生成すると考えられる。また水熱合成とは異なり、グリコサーマル合成では溶解 - 再析出の過程を伴わないため、生成した欠陥はそのまま残存する。グリコサーマル法によって合成した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子においても、これらの欠陥は発光キラーとして働き、発光効率を減少させる因子となっていると考えられる。

Kasuya らは、酢酸イットリウム、酢酸セリウムおよびアルミニウムトリイソプロポキシドを金属塩としてグリコサーマル合成を行い、300 °C で 1 h 以上熟成することにより 1 次粒子径が約 10nm の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を作製した[3-47~49]。保持時間が 0.5 h の場合、試料はアモルファス物質として得られるが、1 h 以上保持しても 1 次粒子径に変化はない[3-48]。これは、イオン溶液から核が生成、成長するプロセスとは異なり、中間体の分解によって YAG が生成しているためであると考えられる。また、炭素数 6 までのグリコールのうち、炭素数が 4 の 1,4-ブタンジオールを溶媒として用いたときに最も発光強度の高い試料が得られる[3-49]。さらに、1,4-ブタンジオールとポリエチレングリコールの混合溶媒を用いることで、1) 粒子表面の不動体化、2) Ce³⁺→Ce⁴⁺への酸化の抑制、3) YAG 結晶中への Ce³⁺の固溶促進、4) Ce³⁺周辺の歪みの緩和などが起こり、発光強度が増大する[47]。

3.1.4 研究目的

Kasuya らのグリコサーマル合成条件によって得られる YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は、1 次粒子径は約 10nm であるが、約 50nm の 2 次的な凝集体を形成していることが SEM 観察や DLS による粒度分布測定により推察されている。蛍光プローブへの応用を考えると、巨大な粒子は立体障害による結合阻害や生体分子の運動や機能の低下の原因となるため、流体力学半径はより小さい方が望ましい。そのため、1 次粒子径を減少させる、あるいは 2 次的な凝集を抑制する必要がある。

第 3 章では、この粒径の縮小を目的として、グリコサーマル合成条件の検討を行った。検討した条件の 1 つは反応開始時に系に投入する原料濃度、すなわち仕込み濃度である。この仕込み濃度の変化が粒子径に与える影響を検討した。

もう 1 つはクエン酸の添加である。クエン酸は、他の合成法において粒子の形態制御[3-50]や分散安定性の向上[3-51]に寄与することが報告されている分子である。また、クエン酸のカルボキシル基はポリエチレングリコールのヒドロキシル基よりも強く金属イオ

ンに配位すると考えられるため、光学特性についても何らかの影響を与えると予想される。そこでクエン酸共存下で YAG:Ce³⁺ナノ粒子のグリコサーマル合成を行い、粒子径や光学特性に与える影響を検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬

第3章で用いた試薬の一覧を Table 3-1 にまとめた。

Table 3-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
Aluminium isopropoxide	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Cerium(III) acetate monohydrate	>99.99%	335.26	Kanto Kagaku
Citric acid	>98.0%	192.18	Wako
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99%	338.10	Kanto Kagaku

3.2.2 試料の合成方法

3.2.2.1 仕込み濃度を变化させた YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4 水和物、酢酸セリウム(III)1 水和物、およびアルミニウムトリイソプロポキシドを Table 3-2 に従って加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。一連の手順を Fig.3.3 のフローチャートに示す。

Table 3-2 Quantity of reagents.

Sample	Yttrium acetate tetrahydrate (g)	Cerium acetate monohydrate (g)	Aluminium isopropoxide (g)	Theoretical yield of YAG (mmol)
YAG(0.5)	0.502	0.0050	0.511	0.5
YAG(1.25)	1.26	0.0126	1.28	1.25
YAG(2.5)	2.51	0.0251	2.55	2.5

3.2.2.2 クエン酸を添加した YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

オートクレーブに酢酸イットリウム 4 水和物 7.425 mmol (2.51 g)、酢酸セリウム(III)1 水和物 0.0075 mmol (0.0251 g)、アルミニウムトリイソプロポキシド 12.50 mmol (2.55 g) およびクエン酸を 0.25-12.5 mmol (0.048 - 0.240 g)加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。

得られた分散液を遠心沈殿管に注ぎ、95%メタノール変性アルコールを添加した。この

分散液を遠心分離(10000 rpm, 30 min)することで粒子を沈降させ、上澄みを除去した。この洗浄行程を合計 3 回行った後、送風乾燥(50 °C, 1 day)することで粉体試料を得た。一連の手順を Fig.3.4 のフローチャートに示す。

試料名は YAG の理論収量に対するクエン酸の添加量で示し、添加量の少ないものからそれぞれ 0mol%, 10mol%, 25mol%, 50mol%とした。

3.2.3 試料の評価方法

第 2 章で述べた評価のうち、仕込み濃度を変化させて合成した試料に関しては FE-TEM と DLS、クエン酸を添加して合成した試料については FE-TEM, XRD, XRF, UV-vis, PL, FT-IR および蛍光寿命測定を行った。また、得られた測定結果より内部量子効率 IQE を算出した。

3.3 結果と考察

3.3.1 仕込み濃度の与える影響

3.3.1.1 反応時間や仕込み濃度に対する圧力変化

Fig.3.5 に圧力の経時変化を示す。反応から 1.5 h 以降、温度一定であるにも関わらず時間の経過とともに圧力が增大するのは、後述のようにイソプロパノールやテトラヒドロフランなどの低沸点成分が生成するためである。反応終了時の圧力は、仕込み濃度の低い方からそれぞれ 0.85, 2.2, 4.3 MPa であり、仕込み濃度が高い試料ほど最終圧力は増大した。また、YAG(2.5)と YAG(1.25)では、系内の圧力が約 0.9 MPa に到達すると、圧力上昇の速度が増大した。これは低沸点成分の生成速度が増大したためであり、何らかの因子により反応が促進されたことを示唆する。

3.3.1.2 GC-MS による反応終了時の溶媒の分析

反応終了後の溶媒について GC-MS 測定を行った結果、イソプロパノールとテトラヒドロフランが 4.2 : 95.8 の体積比で含まれていた。イソプロパノールは原料であるアルミニウムトリイソプロポキシドが加水分解したあとの副生成物であり、テトラヒドロフランは 1,4-ブタンジオールが環化反応を起こして生成したと考えられる。

3.3.1.3 TEM による 1 次粒子径評価と DLS による粒度分布解析

Fig.3.6 に仕込み濃度を変化させて合成した試料の FE-TEM 像を示す。この TEM 像より算出した数平均 1 次粒子径と標準偏差を Table 3-3 に示す。これより、YAG(0.5)の 1 次粒子径は他の 2 つの試料よりも小さいことが確認された。

また、超純水に分散させた試料の粒度分布を DLS で測定した結果を Fig.3.7 に示す。その平均流体力学直径と標準偏差を Table 3-3 にまとめた。仕込み濃度による流体力学直径の系統的な変化は見られなかった。

Table 3-3 Particle size measured by TEM and hydrodynamic diameter measured by DLS in water of YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

	YAG(0.5)	YAG(1.25)	YAG(2.5)
Particle size (nm)	7.7 ± 2.1	10.8 ± 2.1	10.8 ± 2.4
Hydrodynamic diameter (nm)	40.4 ± 10.0	45.4 ± 9.2	43.4 ± 9.4

3.3.1.4 反応メカニズムについての考察

テトラヒドロフランの存在は 1,4-ブタンジオールの環化を示唆する[3-44]。グリコサーマル法による YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成において考えられる反応過程のひとつとして、Fig.3.8 に示す反応過程が考えられる。この反応過程は次の通りである。(1) 金属塩に 1,4-ブタンジオールが配位し、(2) 1,4-ブタンジオールが環化反応してテトラヒドロフランとして脱離すると同時に M-OH が生成し、(3) M-OH が別の金属 M' の誘導体と反応し、M-O-M' の結合が形成される。

また、熟成時間が短い場合、ゲル状のアモルファス試料が得られることから[3-47]、一旦金属塩が溶解したのちに金属-酸素のネットワークが形成することで前駆体ゲルが生成していると考えられる。Inoue らは、エチレングリコールを用いた YAG のグリコサーマル合成を行い、前駆体に結晶相が含まれている可能性は低く、金属イオンが均一に分布していることを示唆している[3-46]。

一方で、反応終了後に上澄みのみを乾燥した試料と、沈殿物を含めて乾燥した試料を作製し、それぞれの DTA プロファイルを測定した結果を Fig.3.9 に示す。沈殿物を含めて回収した試料では、458 と 490 °C に発熱ピークと吸熱ピークが観測されたが、上澄みのみを回収した試料ではこれらのピークは観測されなかった。この熱挙動は、ベーマイト誘導体からベーマイトが生成するときなどに観測される特徴的な熱挙動である[3-52]。また、Inoue らは、ベーマイト誘導体が YAG の生成に関与していることを指摘している[3-18]。これらに従うと、上澄みから回収した試料には前駆体成分が含まれていない、あるいは含まれていたとしてもその量はわずかである。すなわち、YAG:Ce³⁺ナノ粒子のグリコサーマル合成では、前駆体となる有形の物質が存在し、その前駆体が分子内縮重合などを起こすことにより YAG:Ce³⁺ナノ粒子が結晶化し、前駆体から系内に放出されると考えられる。

次に圧力に着目する。YAG:Ce³⁺ナノ粒子のグリコサーマル合成では、Fig.3.8 に示すように、反応の進行に伴いイソプロパノールやテトラヒドロフランなどの低沸点成分が生成することで圧力が増大する。Fig.3.7 に示すように、YAG(2.5)と YAG(1.25)では 0.9MPa 到達以降に圧力の増加が加速しており、これは核生成反応が誘発されているためであると考えられる。つまり、原料濃度が低い YAG(0.5)の場合は、Fig.3.10(a)に示すように、系内の平均的な前駆体濃度が低く核生成を起こしにくいのに対し、原料濃度の高い YAG(2.5)や YAG(1.25)の場合は、Fig.3.10(b)に示すように、系内の平均的な前駆体濃度が増加することで核生成が誘発されると考えられる。

これらの考察を踏まえ、FE-TEM で観察された 1 次粒子径について考察する。仕込み濃度の低い試料では、系内の前駆体濃度も低いため、同時に過飽和状態に到達する前駆体領

域は小さい。そのため、生成する1次粒子も小さくなる。一方で、仕込み濃度が高い試料では、系内の前駆体濃度が高いため、局所的な過飽和状態に到達する前駆体領域は大きい。そのため、生成する1次粒子も大きくなっていると考えられる。

またDLSによる粒度分布測定では、いずれの試料もFE-TEMで観察された1次粒子径よりも大きな粒子径を得た。これは、複数の1次粒子が2次的な凝集体を形成しているためであると考えられる。

このように、仕込み濃度の変化では2次的な凝集を抑制することはできなかったため、1次粒子の状態で分散させるには何らかの分散安定剤を用いて合成を行う必要があると考えられる。

3.3.2 クエン酸添加の効果

3.3.2.1 FE-TEMによる1次粒子径の観察

Fig.3.11 に合成した試料のFE-TEM像を示す。全ての合成条件で球状の粒子が得られた。また画像より算出した数平均1次粒子径をTable 3-4にまとめた。クエン酸添加量の増大に伴って1次粒子径は減少した。さらに、クエン酸無添加試料(Fig.3.10(e))と比較すると、クエン酸を添加した試料(Fig.3.10(f))はよく凝集した。

Table 3-4 Properties of YAG:Ce³⁺ nanoparticles prepared with and without citric acid.

Sample	Citric acid (mol%)	d _{av} ¹⁾ (nm)	Ce ²⁾	Absorbance ³⁾ (a.u.)	PL intensity ⁴⁾	IQE ⁵⁾ (%)
			Y+Ce			
Nanosize	0	10.2 ± 2.3	3.75	0.144	7690	22.0
	10	9.3 ± 3.1	3.50	0.121	8921	30.2
	25	5.9 ± 0.8	3.64	0.085	6113	29.5
	50	4.0 ± 0.8	3.71	0.078	7596	40.1
Reference	-	-	-	0.097	16933	72.0

1) the number average particle diameter.

2) the Ce/(Ce+Y) atomic ratio measured by XRF.

3) the absorbance at 450nm.

4) F_{sample} and F_{ref} values in Eq.2-9, i.e., the integrated PL intensity at 530nm.

5) IQE_{sample} value calculated by Eq.2-9.

3.3.2.2 XRDによる結晶系の同定と格子定数の算出

Fig.3.12 に合成した試料のXRDプロファイルを示す。全てのピークはYAGに帰属され、副生成物の生成は確認されなかった。また、Fig.3.13に(400)ピークについて精密測定したプロファイルを示し、Table 3-5にそれぞれのピーク位置と算出された格子定数をまとめた。

まず、ミクロンサイズの市販YAG:Ce³⁺ (Kasei Optnix, P46-Y1)とクエン酸の添加なしで合成したYAG:Ce³⁺ナノ粒子のピーク位置を比較する。グリコサーマル法で合成した

YAG:Ce³⁺ナノ粒子の(400)ピーク位置は市販品の(400)ピークよりも低角度側に位置しており、それに伴って算出される格子定数も増加した。これは、ナノサイズ化に伴って表面近傍の粒子の占める割合が増大することに伴う格子緩和（構造緩和）の影響であると考えられる。

次に、クエン酸の添加の有無で比較すると、クエン酸を添加して合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子の(400)ピークは、添加なしで合成したものよりも、低角度側へシフトし、格子定数は増大した。これは1次粒子径の減少に伴って格子緩和の影響が強く現れた結果だと考えられ、FE-TEMで観察された結果と一致する。

Table 3-5 Peak position of (400) plane and lattice constant calculated from interplanar spacing of (400).

	micron-sized YAG:Ce ³⁺	0mol%	50mol%
Peak position 2θ (°)	29.77	29.55	29.47
Lattice constant (Å)	12.004	12.091	12.148

3.3.2.3 FT-IR による表面有機物と Al-O 配位数の解析

Fig.3.14 に合成した試料の FT-IR スペクトルを示す。1430 cm⁻¹ および 1540 cm⁻¹ のピークはそれぞれ COO⁻ 対称、非対称伸縮振動に帰属[3-53]され、クエン酸のカルボキシル基が金属原子に配位していることを示唆する。また、1060 cm⁻¹ のピークは C-O 伸縮振動に帰属され、クエン酸や 1,4-ブタンジオールの存在を示唆する。クエン酸添加量の増加に伴い、C-O 伸縮振動ピークに対する COO⁻ 対称・非対称伸縮振動のピーク強度は増大しており、より多くのクエン酸が粒子に配位していることが確認された。

Fig.3.15 に低波数域の FT-IR スペクトルを示す。Peak1, 2 は 4 配位 Al-O 伸縮振動、Peak3 は 6 配位 Al-O 伸縮振動にそれぞれ帰属され[3-54]、クエン酸の添加量の増大に伴い、4 配位 Al に対する 6 配位 Al の割合が増大している。これらの結果は、金属イオンへ配位しているクエン酸量が増大していることを示唆する。

3.3.2.4 UV-vis 吸収スペクトルと PL・PLE スペクトルによる光学特性評価

Fig.3.17 に合成した試料の UV-vis 吸収スペクトルを示す。波長 450 nm をピークとする吸収は Ce³⁺の 4f(2F_J) → 5d(2A_{1g})に帰属される[3-8, 55]。クエン酸の添加量の増加に伴い、この波長 450 nm における吸光度は減少した。

Fig.3.14 に合成した試料の PL・PLE スペクトルを示す。波長 450 nm と 345 nm を中心とする励起ピークは、YAG に固溶した Ce³⁺の 4f(2F_J) → 5d(2A_{1g})遷移と 4f(2F_J) → 5d(2B_{1g})遷移にそれぞれ帰属される[3-8, 55]。発光スペクトルは、波長 530 nm と波長 570 nm を中心とするピークの重ね合わせとして得られ、それぞれ Ce³⁺の 5d(2B_{1g}) → 4f(2F_{5/2})遷移と 5d(2B_{1g}) → 4f(2F_{7/2})遷移に帰属される。クエン酸の添加量と発光強度との間に相関性はみられなかった。

Table 3-4 にそれぞれの試料の波長 450 nm における吸光度と発光ピーク面積、それら

と Eq.2-9 から求めた相対内部量子効率(IQE)をまとめた。クエン酸添加量の増加に伴い、IQE は増大する傾向が見られた。

3.3.2.5 蛍光寿命測定

Fig.3.18 に合成した試料の蛍光寿命測定の結果を示す。また、ミクロンサイズの市販 YAG:Ce³⁺については 1 次減衰、合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子は 2 次減衰のカーブフィッティングにより求めた各パラメータを Table 3-6 にまとめた。ミクロンサイズの YAG:Ce³⁺の蛍光寿命は $\tau = 57.3$ ns であった。一方で、グリコサーマル法によって合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子の発光の減衰は、寿命の短い成分($\tau_1 = 16\text{-}26$ ns)と寿命の長い成分($\tau_2 = 72\text{-}112$ ns)の、少なくとも 2 つの成分より構成されていた。

Table 3-6 PL decay parameters obtained by curve fitting.

Sample	Citric acid (mol%)	Time constant (ns)		Relative amplitude	
		τ_1	τ_2	A_1	A_2
Nanosize ¹⁾	0	16.1	74.2	35.5	64.5
	10	26.3	107.7	30.8	69.2
	25	24.5	115.0	28.5	71.5
	50	25.5	113.3	27.7	72.3
Microsize ²⁾		57.3	-	100	-

1) $I = I_0 + A_1(\exp(-t/\tau_1) + A_2\exp(-t/\tau_2))$

2) $I = I_0 + A_1(\exp(-t/\tau_1))$

3.3.2.6 クエン酸の添加が粒子径に与える影響

1 次粒子径はクエン酸の添加量の増加に伴い減少した。これは次のように説明できる。

3.3.1.4 で考察した通り、グリコサーマル法では Fig.3.8 のような反応過程を経て YAG:Ce³⁺ナノ粒子が生成する。クエン酸のカルボキシル基が金属イオンへ配位すると、1,4-ブタンジオールが配位したときのような C-O ヘテロリティック開裂は起こらない。その結果、前駆体として生成する金属 - 酸素ネットワークが細分化され、生成する核が縮小したと考えられる。Inoue らも、>Al-O の生成が抑制されるほど結晶子サイズが縮小することを報告しており [3-42]、この実験結果と対応する。

また、クエン酸の添加により凝集が促進された。Fig.3.19 に示すように、クエン酸の添加により粒子のゼータ電位は負方向へシフトし、50mol%ではほぼ 0 mV であった。このシフトは、クエン酸のカルボキシル基に由来すると考えられる。つまり、クエン酸の添加によりゼータ電位が減少し、静電的反発力による分散安定化が充分に得ることができないために凝集を起こしやすくなったと考えられる。

3.3.2.7 クエン酸の添加が光学特性に与える影響

クエン酸添加量の増大に伴い、Ce³⁺の 4f → 5d 遷移による吸収は減少した。Table 3-4 に

示すように、XRFによって測定した Ce/(Ce+Y)比はクエン酸の添加量に関わらず一定であることから、この減少は総 Ce 量の減少によるものではなく、Ce³⁺ → Ce⁴⁺への酸化によるものであると考えられる。クエン酸の添加量の増大に伴って Ce³⁺の酸化が促進された原因は、1次粒子径の減少による比表面積の増大により、酸化の影響を受けやすい粒子表面の Ce³⁺の割合が増加したためであると考えられる。実際に、グリコサーマル法で合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子には Ce³⁺と Ce⁴⁺が混在していることが、電子エネルギー損失分光法により確認されている[3-56]。

IQE はクエン酸の添加量の増大に伴って増加した。これはクエン酸のカルボキシル基が粒子表面の金属イオンに配位することで、発光キラーである表面欠陥がキャッピングされた結果であると考えられる。実際に、蛍光寿命測定ではクエン酸の添加により発光寿命は伸長しており、これは表面欠陥の減少を支持する。

最後に蛍光寿命について考察する。ミクロンサイズの市販 YAG:Ce³⁺の蛍光寿命は $\tau = 57.3$ ns であり、これは他で報告されている値とよく対応した[3-57, 58]。一方、グリコサーマル法により合成された YAG:Ce³⁺ナノ粒子は寿命の短い成分 τ_1 と長い成分 τ_2 の2つの成分により構成されていた。前者の短い成分 τ_1 は Alison らがグリコサーマル合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子にも観測されている[3-20]。Zhou らもゾルゲル法により合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子について、同様の蛍光寿命の短縮を観測しており、これを表面欠陥や有機物によるクエンチングの結果であるとしている[3-59]。これらの結果から考えると、グリコサーマル法により合成された YAG:Ce³⁺ナノ粒子においても、ナノサイズ化により表面欠陥が増大し、蛍光寿命が短縮されていると考えられる。一方、寿命の長い成分 τ_2 は、通常の蛍光寿命よりも長い。Aitasalo らも、ゾルゲル法によって作製した Ce³⁺ドープ Y₂SiO₅の蛍光寿命を測定し、通常の ns オーダーの緩和成分に加えて μ s オーダーの長い緩和成分を観測している[3-60, 61]。彼らはその原因を次のように説明している；還元雰囲気中で粒子を作製すると、格子中に酸素欠陥が生成する。この酸素欠陥は Ce³⁺から電子を奪って Ce⁴⁺ - 色中心対を形成する。Ce³⁺の励起を行うと、Ce³⁺から Ce⁴⁺ - 色中心へのエネルギー移動が起こり、その後電荷移動遷移により発光する。この電荷移動遷移による発光は Ce³⁺の 5d-4f 遷移よりも長い寿命を持ち、かつ、Ce³⁺の 5d-4f 遷移に重なり合って観測される。グリコサーマル反応も還元雰囲気の反応であるため[3-41]、グリコサーマル法で合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子中にも同様の Ce⁴⁺ - 色中心対が形成していると考えられる。蛍光寿命の長い成分は、これらの電荷移動遷移による発光に起因するものであると推察される。

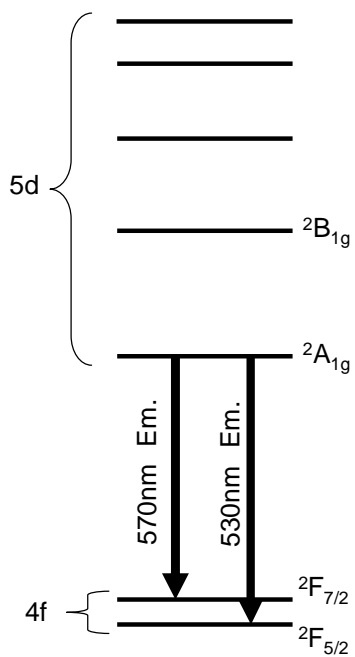


Fig.3.1 Energy diagram of Ce³⁺ incorporated in YAG.

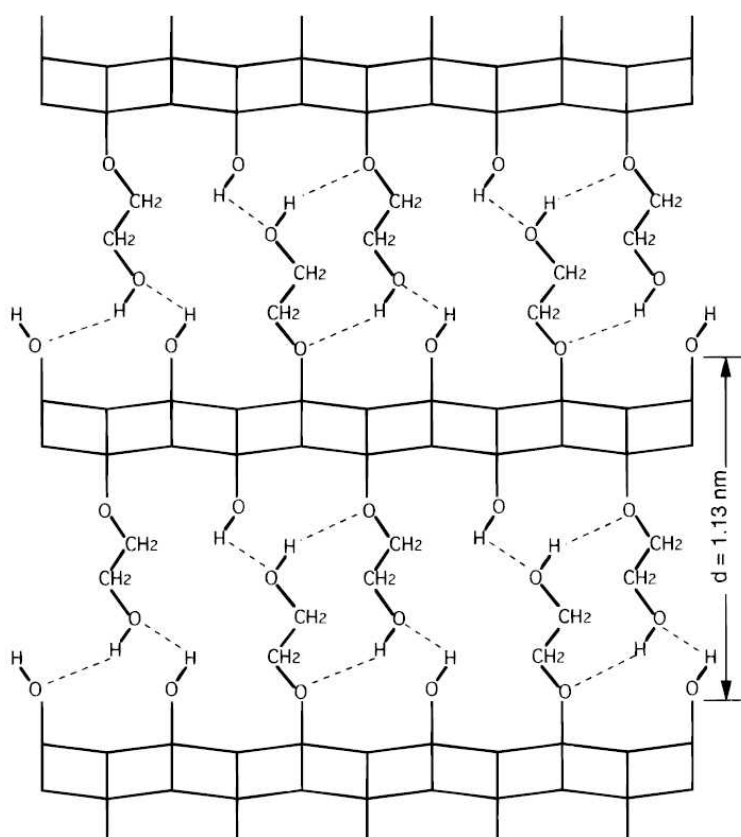


Fig.3.2 Proposed structure of the ethylene glycol derivative of boehmite [3-39].

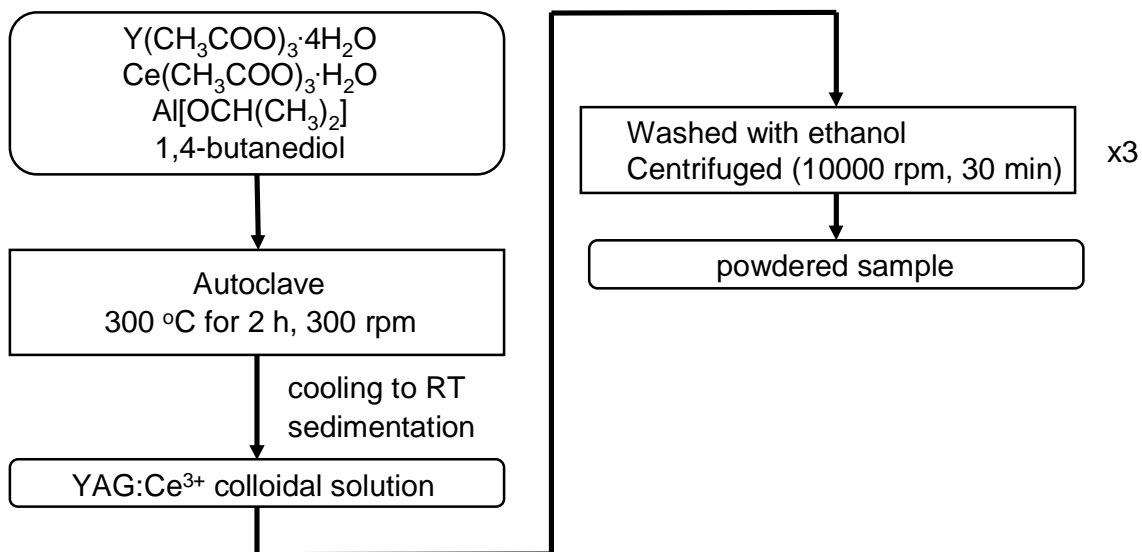


Fig.3.3 Schematic representation of the synthesis of YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

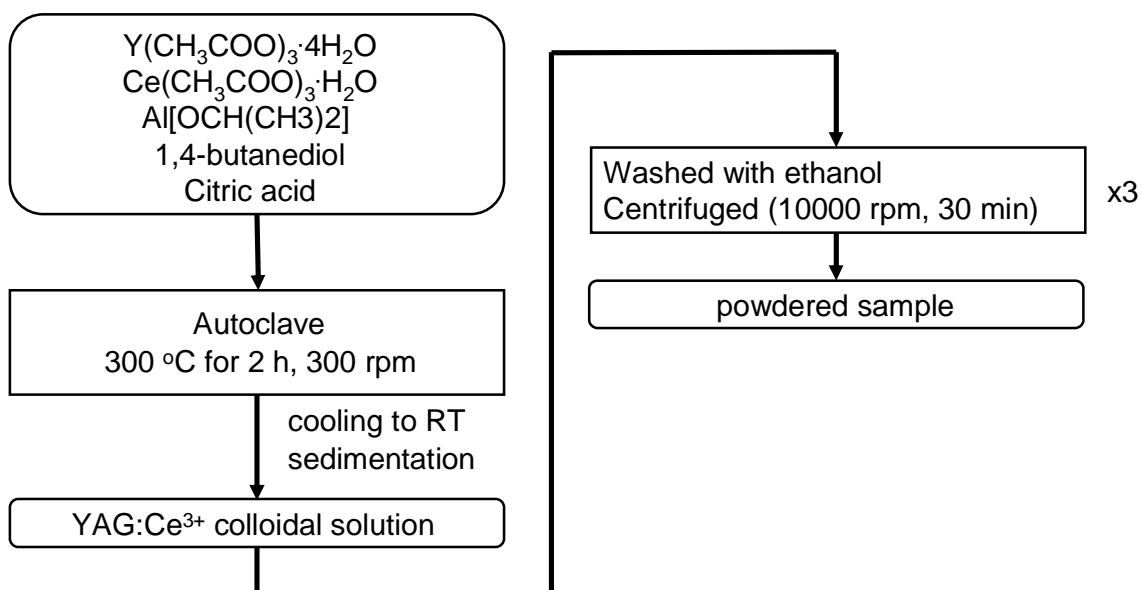


Fig.3.4 Schematic representation of the synthesis of YAG:Ce³⁺ nanoparticles with citric acid.

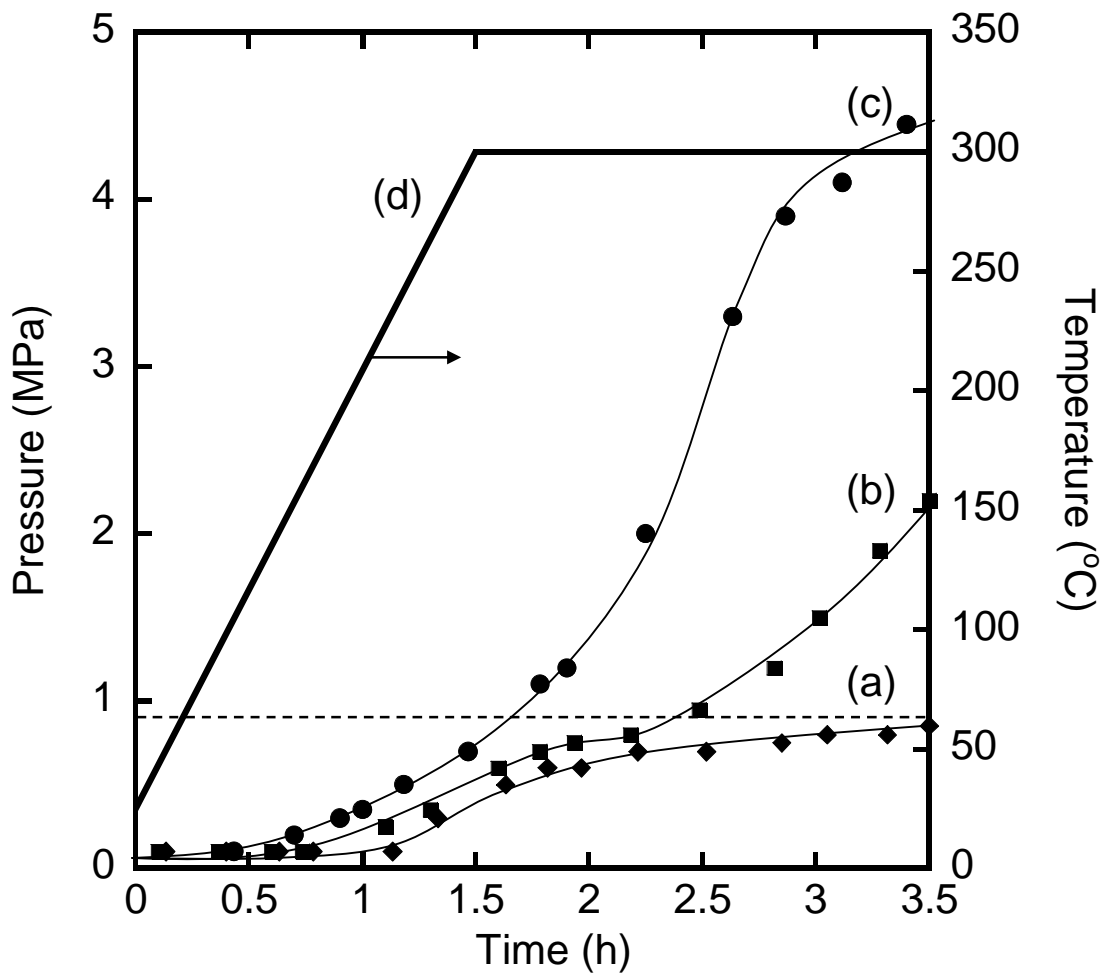


Fig.3.5 Change in pressure during glycothermal reaction: (a) YAG(0.5), (b) YAG(1.25), (c) YAG(2.5), (d) programmed temperature.

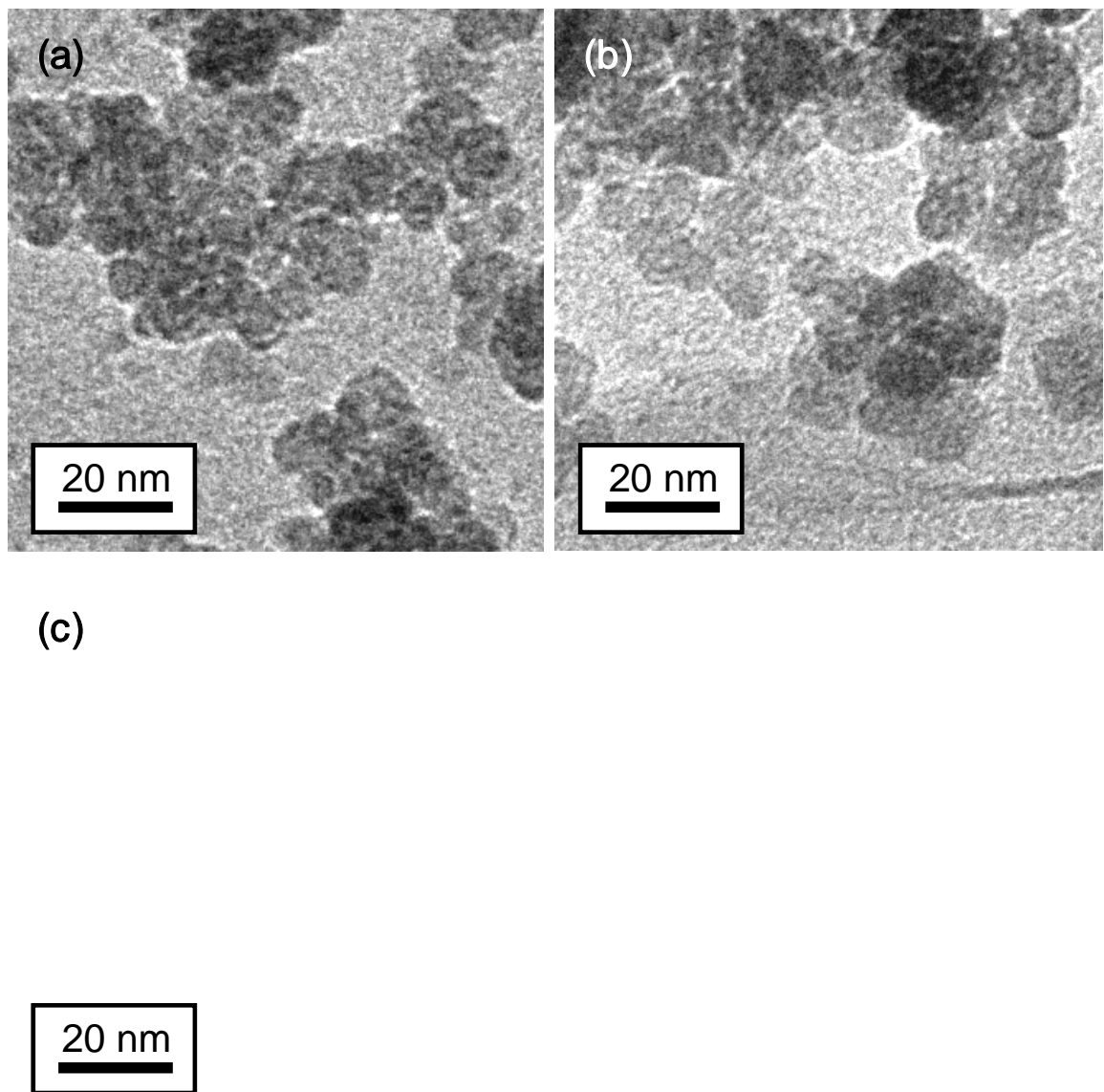


Fig.3.6 FE-TEM images of YAG:Ce³⁺ nanoparticles: (a) YAG(0.5), (b) YAG(1.25), (c) YAG(2.5).

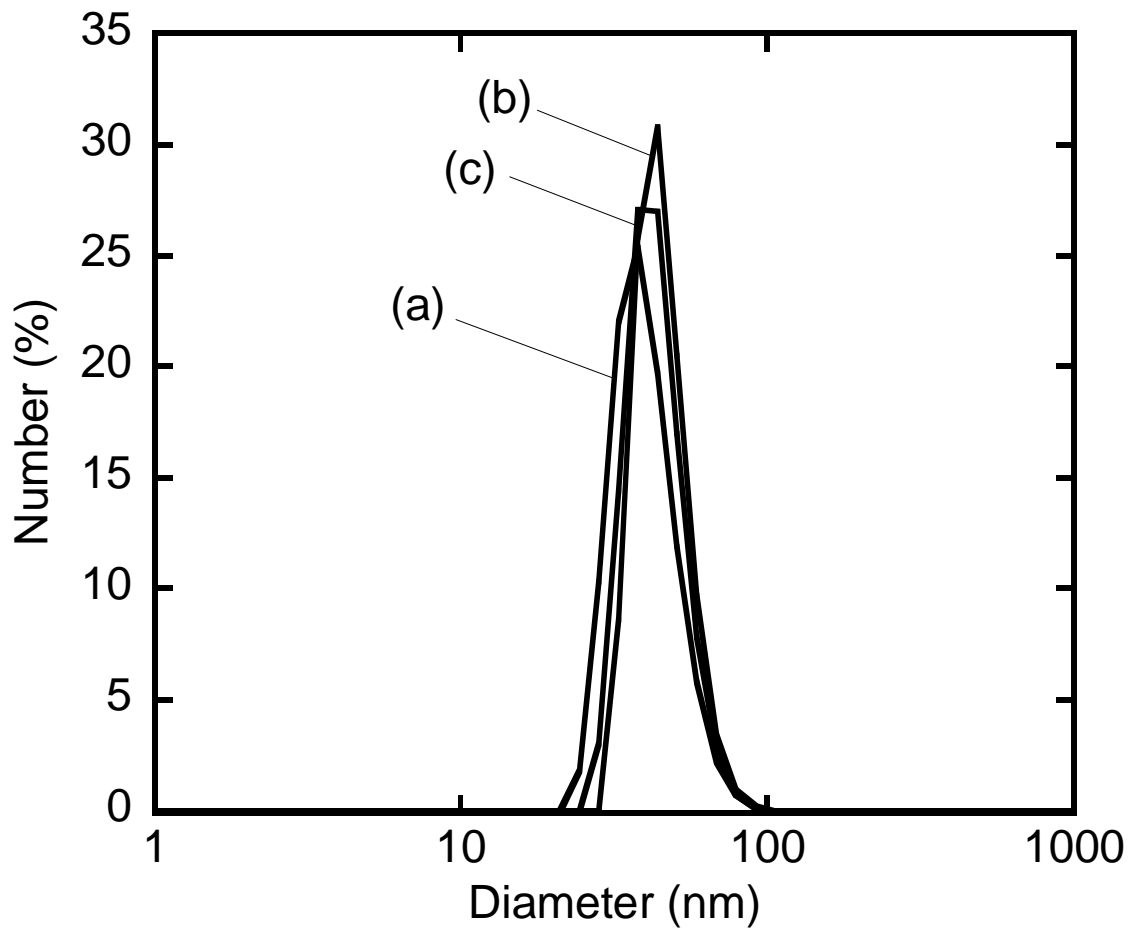


Fig.3.7 Particle size distribution measured by DLS for YAG:Ce³⁺ nanoparticles diluted in ultrapure water: (a) YAG(0.5), (b) YAG(1.25), (c) YAG(2.5).

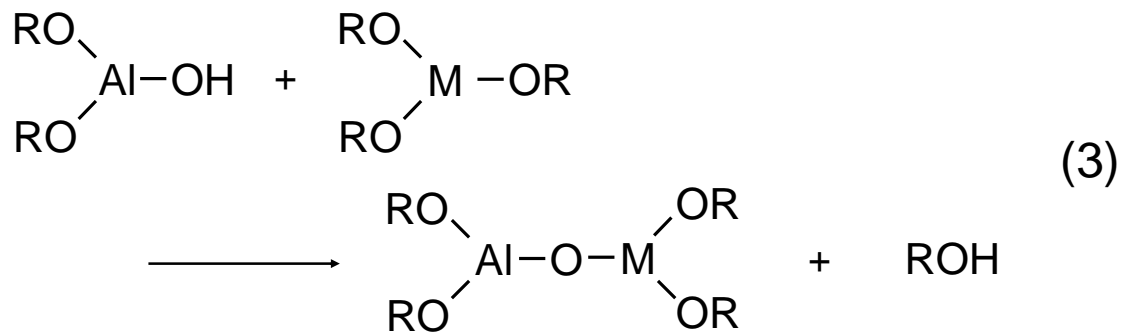
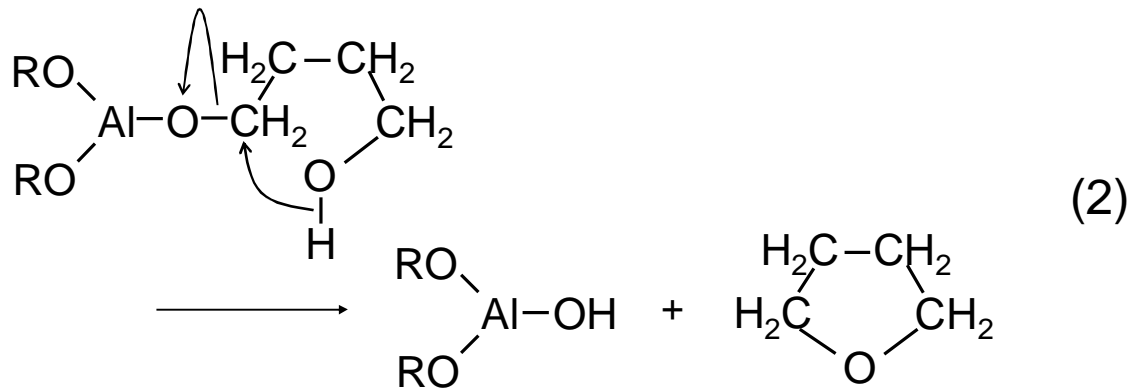
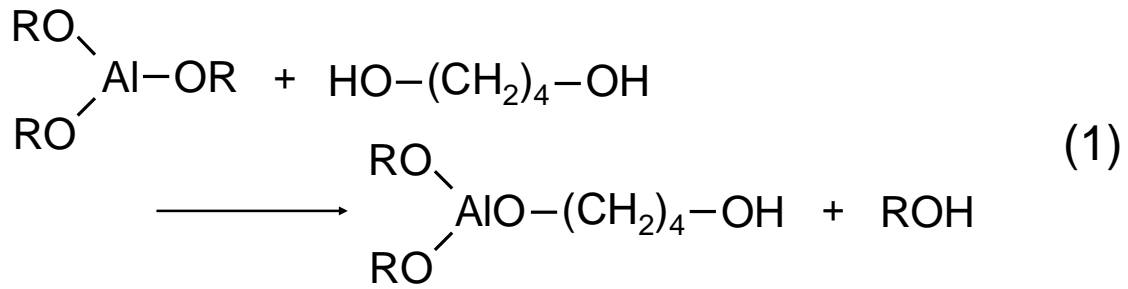


Fig.3.8 Formation of Al-O-M' (M = Al, Y or Ce) bond during glycothermal reaction.

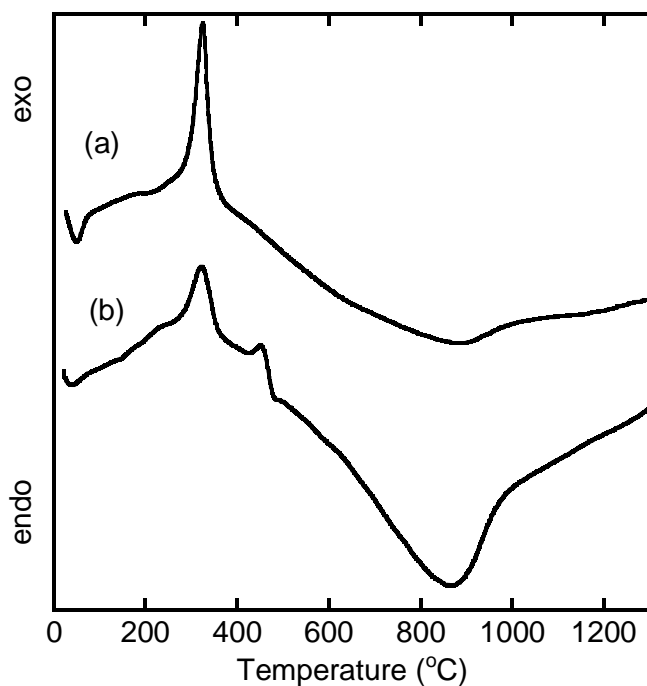


Fig.3.9 DTA profiles of (a) powder obtained from supernatant and (b) powder obtained from whole sample.

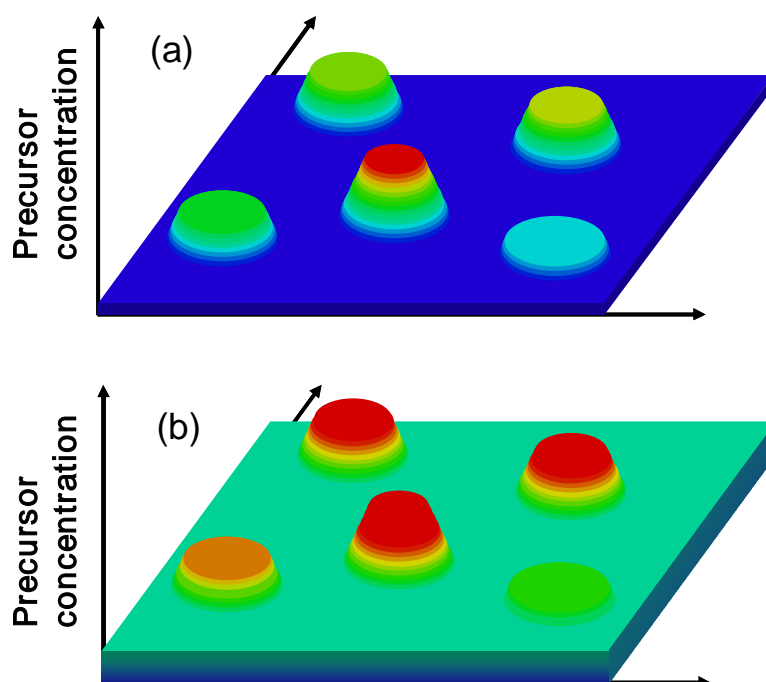


Fig.3.10 Illustration of the distribution of the precursor in glycothermal reaction. (a) low precursor concentration, (b) high precursor concentration.

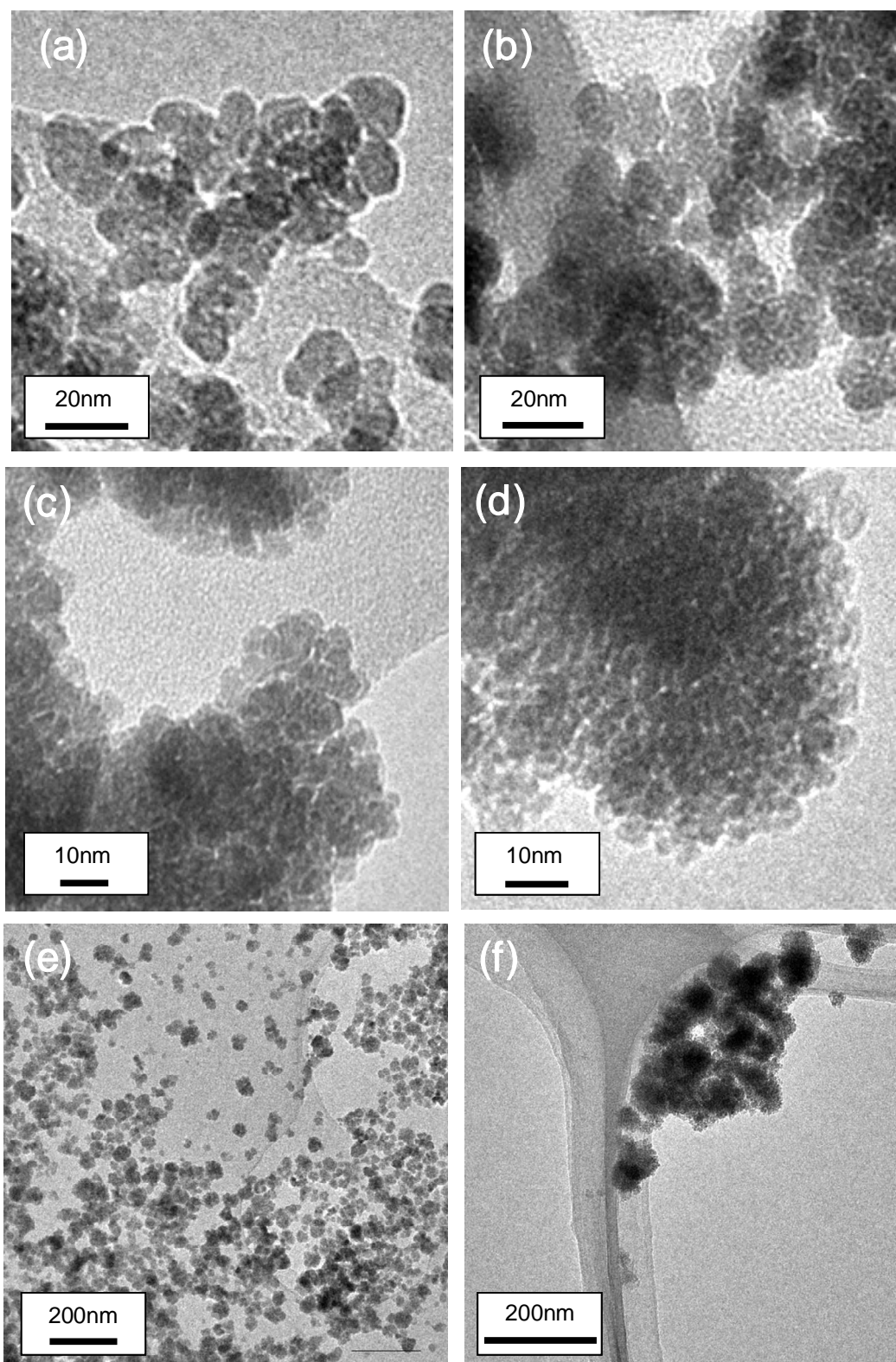


Fig.3.11 FE-TEM images of the samples prepared with and without citric acid. Nominal percentage of citric acid for the theoretical yield of YAG: (a), (e) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol% and (d), (f) 50mol%.

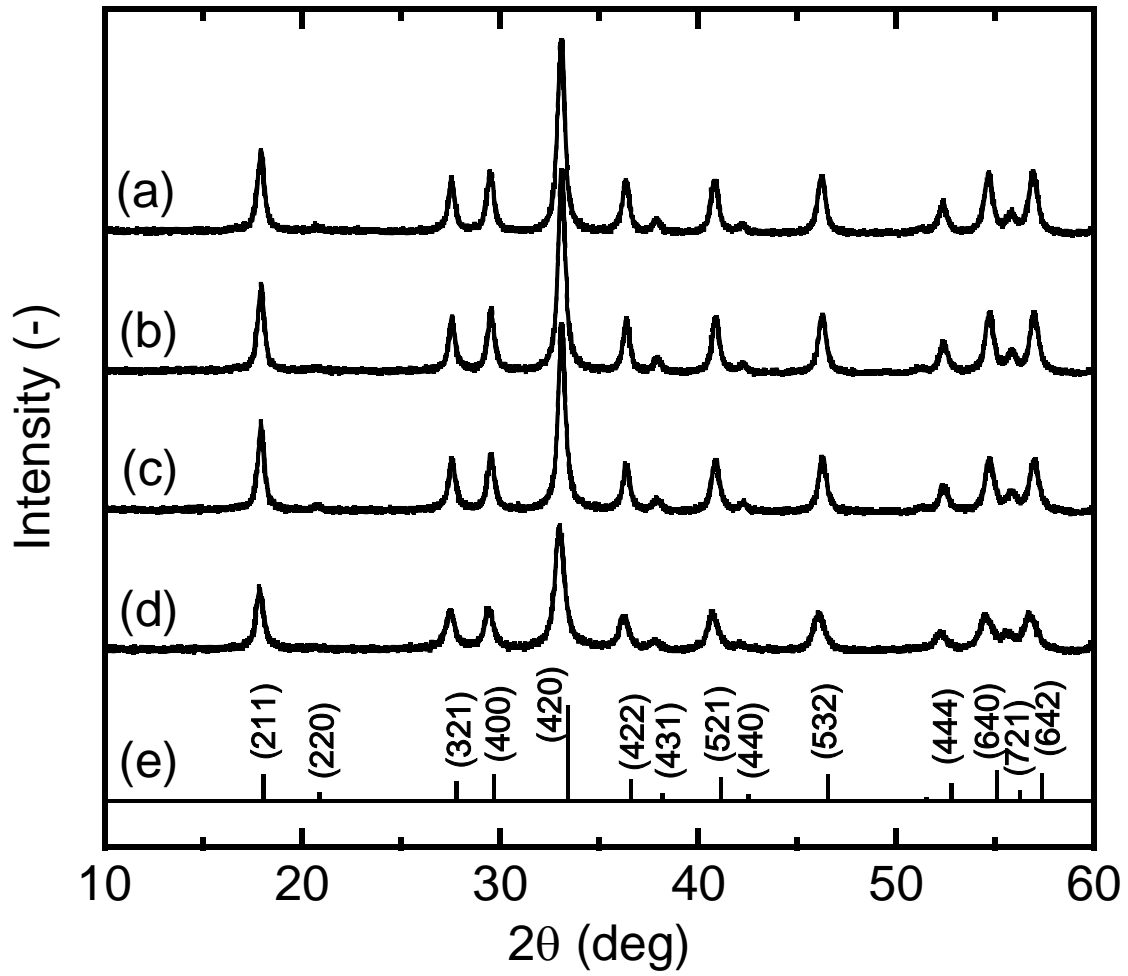


Fig.3.12 XRD profiles of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%, (e) $Y_3Al_5O_{12}$ JCPDS 33-40.

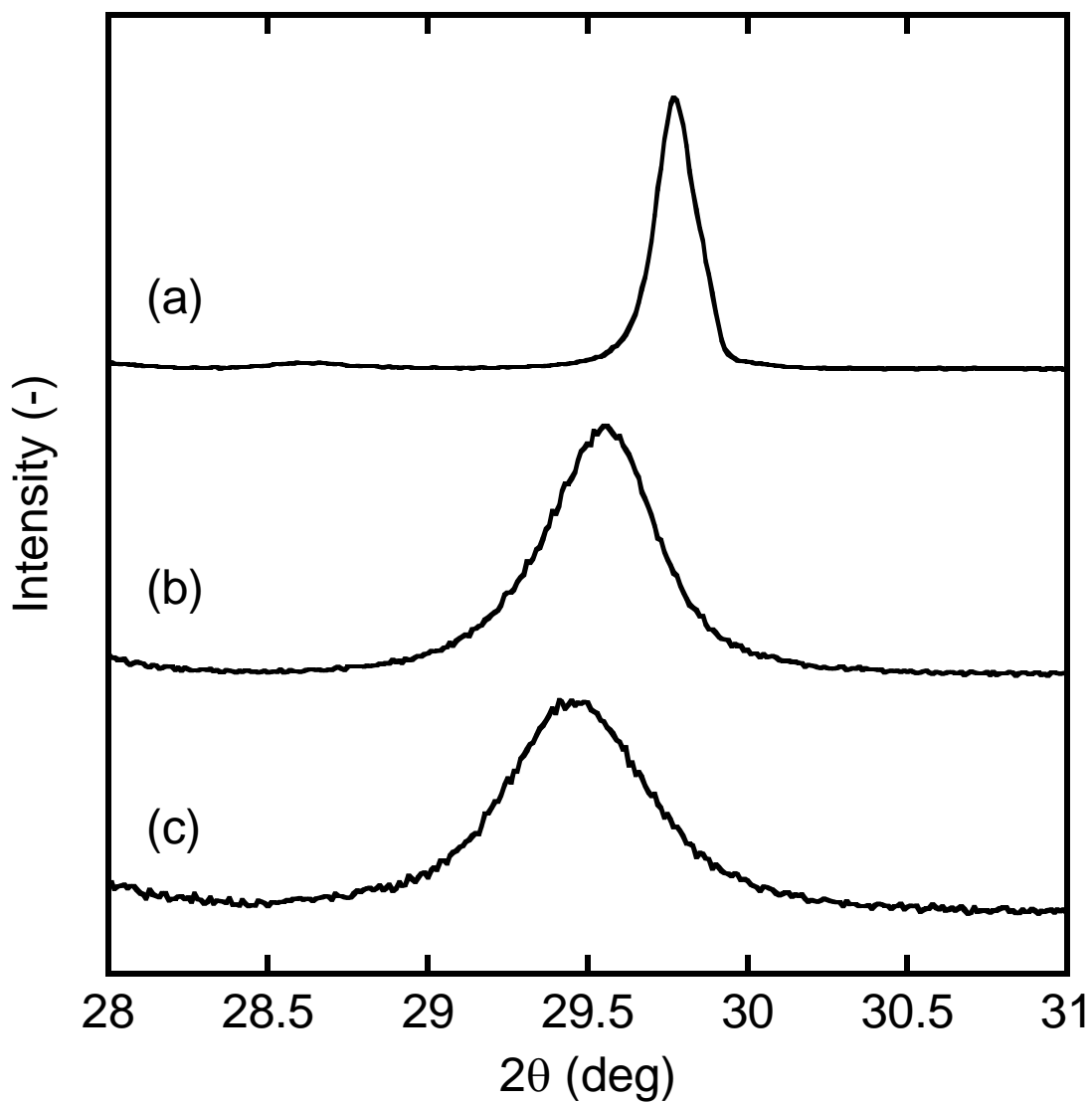


Fig.3.13 Precisely measured XRD peak of (400) plane: (a) micronized commercial YAG:Ce³⁺ bulk, (b) nanosized YAG:Ce³⁺ prepared without citric acid, (c) nanosized YAG:Ce³⁺ prepared with citric acid (50mol%).

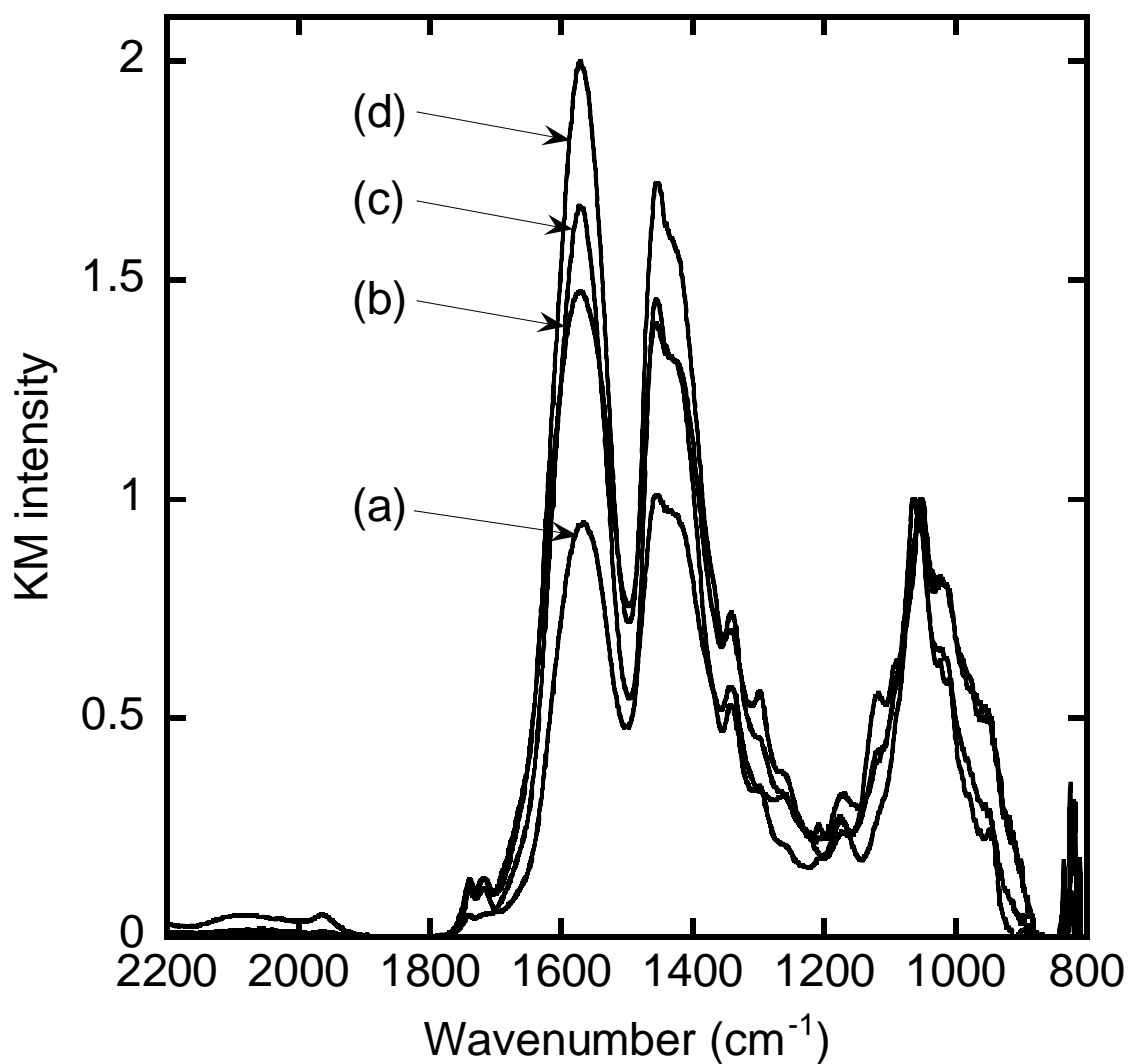


Fig.3.14 FT-IR spectra of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%. The Kubelka-Munk (KM) intensity relative to the peak at 1060cm⁻¹ corresponding to $\nu(\text{C-O})$ is shown in this figure.

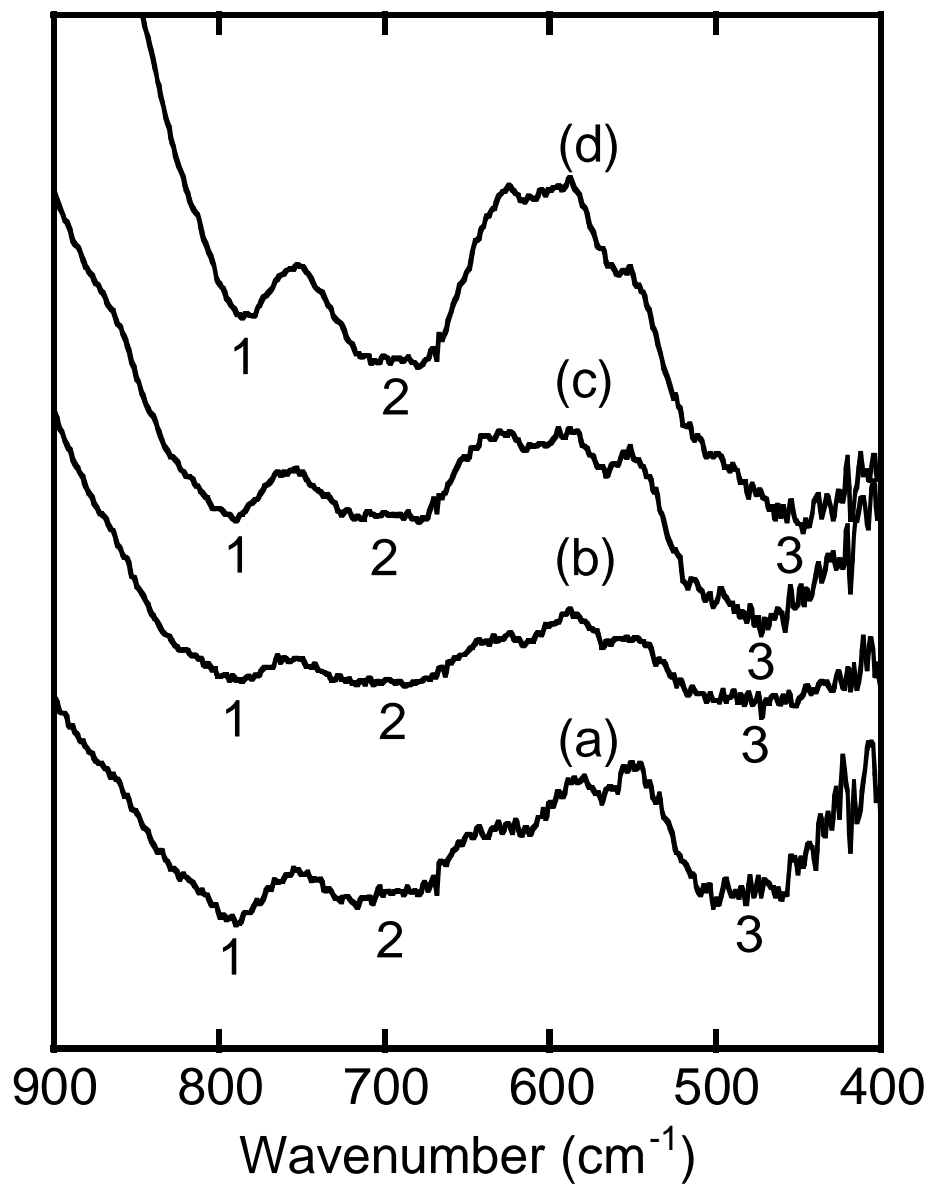


Fig.3.15 FT-IR spectra of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%.

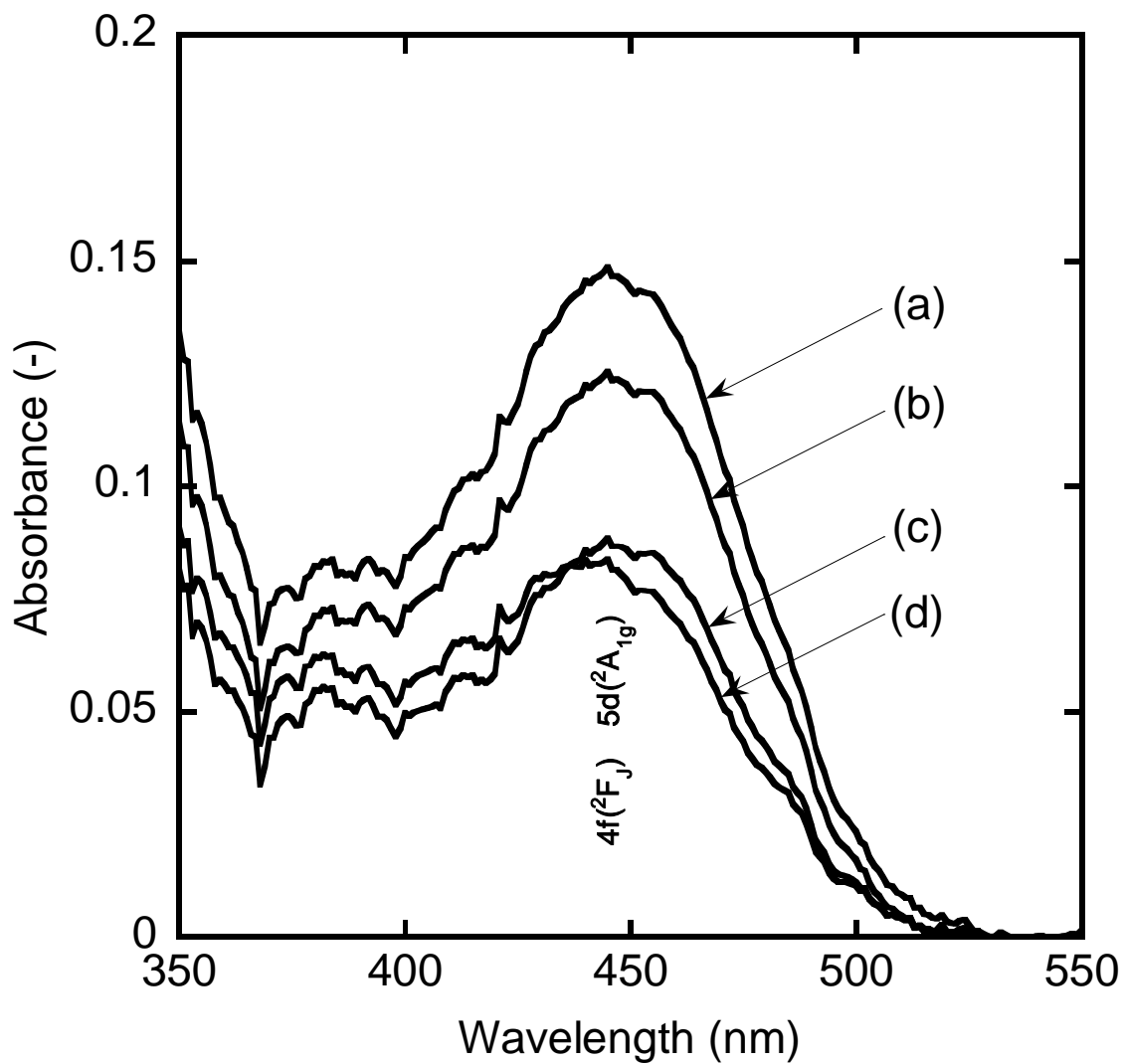


Fig.3.16 UV-vis absorption spectra of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%.

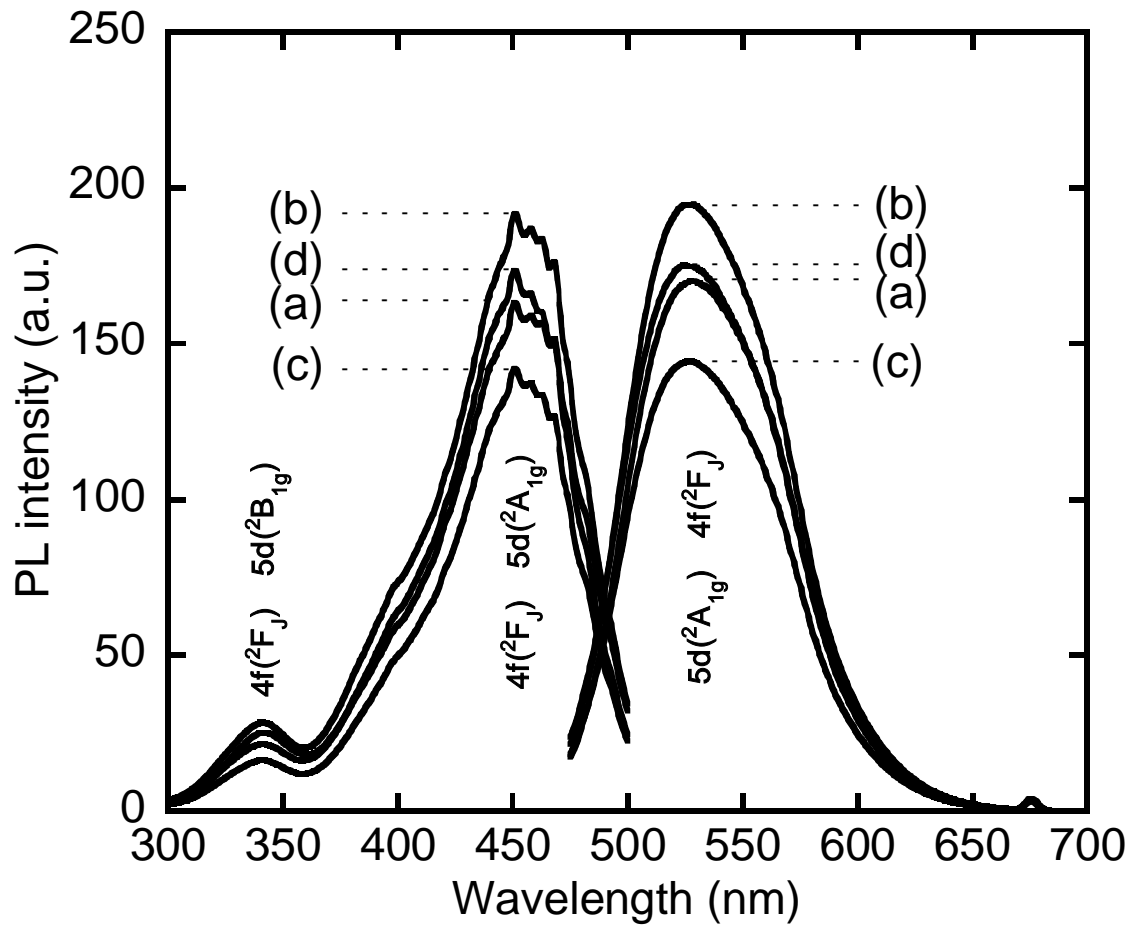


Fig.3.17 PL and PLE spectra of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%.

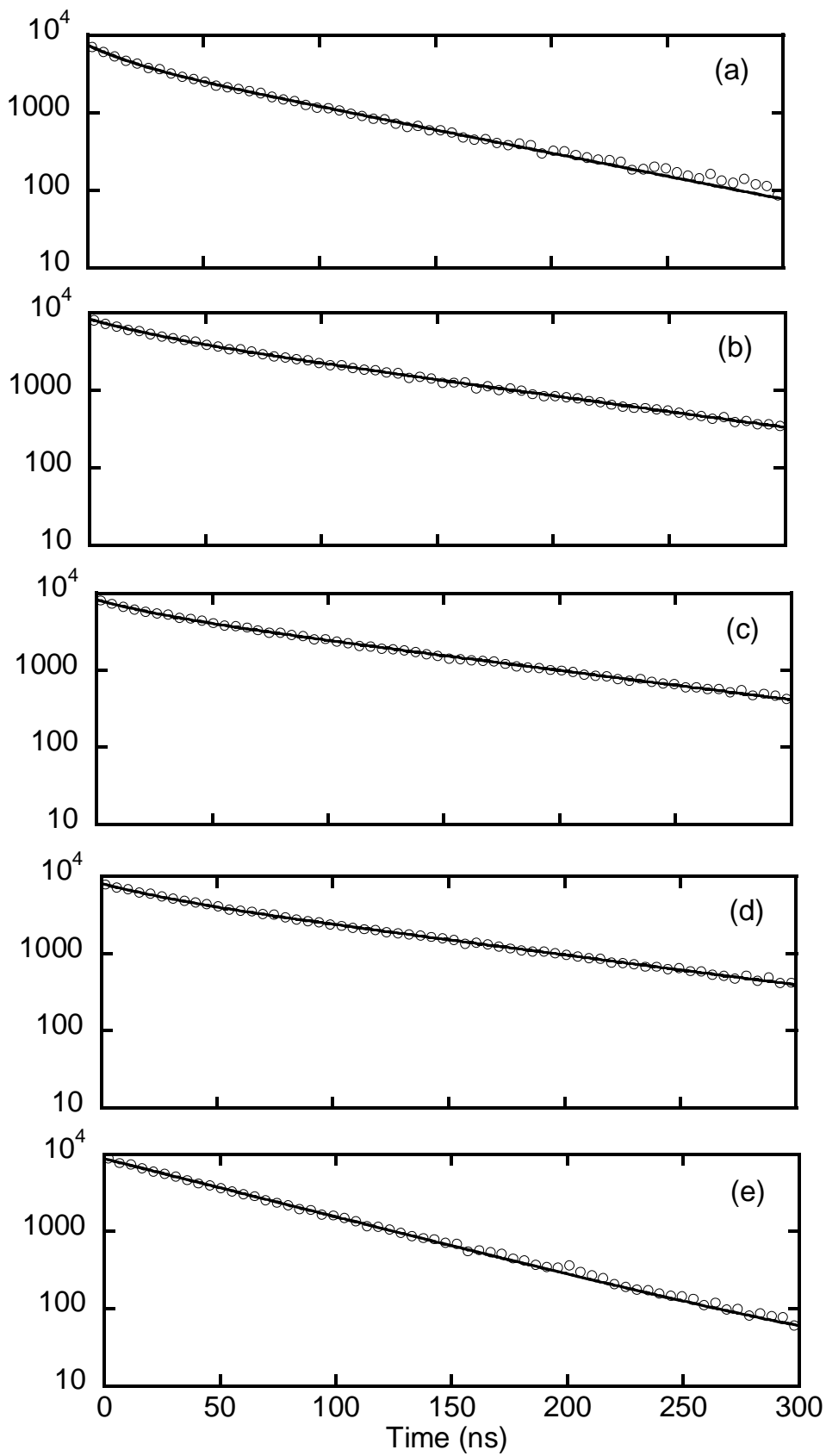


Fig.3.18 PL decay curves of YAG:Ce³⁺ nanoparticles prepared by without and with citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol% and (e) micronized commercial bulk. Lines are obtained by curve fitting.

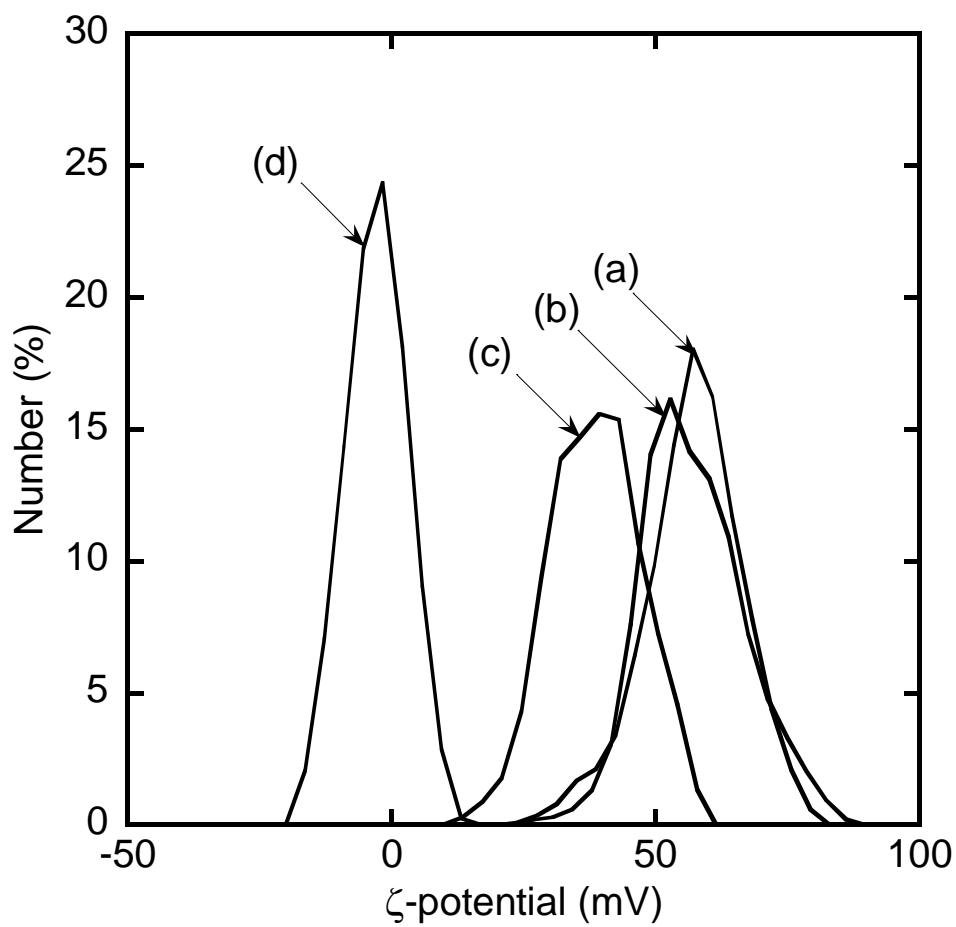


Fig.3-19 ζ -potential distribution of the samples prepared with and without citric acid: (a) 0mol%, (b) 10mol%, (c) 25mol%, (d) 50mol%.

3.4 結論

粒径の制御を目的として、グリコサーマル法による YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の合成における合成条件を検討した。仕込み濃度を変化させることによって、1 次粒子の数平均粒子径が 7.7 nm および 10.8nm の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を合成することができた。しかし、いずれの仕込み濃度においても、純水中に分散した際の流体力学直径は約 40nm であり、2 次的な凝集体の形成を示唆した。

クエン酸添加量の増大に伴って、1 次粒子径は減少する一方で、ゼータ電位の低下により粒子の凝集が促進された。また、クエン酸のカルボキシル基が表面欠陥をキャッピングすることにより、内部量子効率が増大した。蛍光寿命測定を行った結果、グリコサーマル法によって合成された YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の蛍光は、 $\tau_1 = 16 - 26 \text{ ns}$ と $\tau_2 = 72 - 112 \text{ ns}$ の少なくとも 2 つの成分により緩和した。

以上の結果より、仕込み濃度の変化やクエン酸の添加では 1 次粒子の 2 次的な凝集を抑制することができないため、流体力学直径を縮小させることができないことがわかった。しかし、2 次的な凝集を抑制することが可能となった場合には、これらの合成条件は粒径をコントロールする有効な手段となりうる。またクエン酸の添加による量子効率の増大や蛍光寿命の伸長は、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の光学的な特性の向上が可能であることを示唆した。これらの結果を踏まえて適切な分散安定剤を検討することにより、蛍光プローブとしての利用価値の高い YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を合成できると考えられる。

第3章の参考文献

- [3-1] J. Banerjee, K. Muralidhar, "Simulation of transport processes Czochralski growth of YAG crystals", *J. Cryst. Growth*, **286**, 350-364 (2006).
- [3-2] D. Ravichandran, R. Roy, A. G. Chakhovskoi, C. E. Hunt, W. B. White, S. Erdei, "Fabrication of Y₃Al₅O₁₂:Eu thin films and powders for field emission display applications", *J. Lumin.*, **71**, 291-297 (1997)
- [3-3] M. Kaczkan, Z. Frukacz, M. Malinowski, "Infra-red-to-visible wavelength upconversion in Sm³⁺-activated YAG crystals", *J. Alloys Compd.*, **323-324**, 736-739 (2001).
- [3-4] D. Hreniak, W. Strek, P. Mazur, R. Pazik, M. Ząbkowska-Waclawek, "Luminescence properties of Tb³⁺:Y₃Al₅O₁₂ nanocrystallites prepared by the sol-gel method", *Opt. Mater.*, **26**, 117-121 (2004).
- [3-5] G. Özen, O. Forte, B. Bartolo, "Downconversion and upconversion dynamics in Pr-doped Y₃Al₅O₁₂ crystals", *J. Appl. Phys.*, **97**, 013510-1~01351-5 (2005).
- [3-6] Y. Pan, M. Wu, Q. Su, "Tailored photoluminescence of YAG:Ce phosphor through various methods", *J. Phys. Chem. Solids*, **65**, 845-850 (2004).
- [3-7] M. Veith, S. Mathur, A. Kareiva, M. Jilavi, M. Zimmer, V. Huch, "Low temperature synthesis of nanocrystalline Y₃Al₅O₁₂ (YAG) and Ce-doped Y₃Al₅O₁₂ via different sol-gel methods", *J. Mater. Chem.*, **9**, 3069-3079 (1999).
- [3-8] C. Lu, H. Hong, R. Jagannathan, "Sol-gel synthesis and photoluminescent properties of cerium-ion doped yttrium aluminium garnet powders", *J. Mater. Chem.*, **12**, 2525-2530 (2002).
- [3-9] Z. Na, W. Dajian, L. Lan, M. Yanshuang, Z. Xiaosong, M. Nan, "YAG:Ce phosphors for WLED via nano-pseudoboehmite sol-gel route", *J. Rare Earths*, **24**, 294-297 (2006).
- [3-10] D. Hreniak, W. Strek, P. Gluchowski, M. Bettinelli, A. Speghini, "The influence of the specific surface of grains on the luminescence properties of Nd³⁺-doped Y₃Al₅O₁₂ nanopowders", *Appl. Phys. B*, **91**, 89-93 (2008).
- [3-11] E. Caponetti, M. L. Saladino, F. Serra, S. Enzo, "Co-precipitation synthesis of Nd:YAG nano-powders: the effect of Nd dopant addition with thermal treatment", *J. Mater. Sci.*, **42**, 4418-4427 (2007).
- [3-12] Y. Pan, M. Wu, Q. Su, "Comparative investigation of synthesis and photoluminescence of YAG:Ce phosphor", *Mater. Sci. Eng. B*, **106**, 251-6 (2004).
- [3-13] M. Nyman, J. Caruso, M. J. H. Smith, T. T. Kodas, "Comparison of solid-state and spray pyrolysis synthesis of yttrium aluminate powders", *J. Am. Ceram. Soc.*, **80**, 1231-1238 (1997).
- [3-14] E. Zych, C. Brecher, H. Lingertat, "Depletion of high-energy carriers in YAG optical ceramic materials", *Spectrochimica Acta Part A*, **54**, 1771-1777 (1998).
- [3-15] Y. Hakuta, K. Seino, H. Ura, T. Adshiri, H. Takizawa, K. Arai, "Production of

- phosphor (YAG:Tb) fine particles by hydrothermal synthesis in supercritical water”, *J. Mater. Chem.*, **9**, 2671-2674 (1999).
- [3-16] X. Li, H. Liu, J. Wang, H. Cui, F. Han, “Production of nanosized YAG powders with spherical morphology and nonaggregation via a solvothermal method”, *J. Am. Cerum. Soc.*, **12**, 2288-2290 (2004).
- [3-17] X. Li, H. Liu, J. Wang, H. Cui, F. Han, “YAG:Ce nano-sized phosphor particles prepared by a solvothermal method”, *Mater. Res. Bull.*, **39**, 1923-1930 (2004).
- [3-18] M. Inoue, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, “Synthesis of yttrium aluminum garnet by the glycothermal method”, *J. Am. Cerum. Soc.*, **74**, 1452-1454 (1991).
- [3-19] M. Inoue, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, “Glycothermal synthesis of rare earth aluminium garnets”, *J. Alloys Compd.*, **226**, 146-151 (1995).
- [3-20] S. W. Allison, G. T. Gillies, A. J. Rondinone, M. R. Cates, “Nanoscale thermometry via the fluorescence of YAG:Ce phosphor particles: measurements from 7 to 77 °C”, *Nanotechnology*, **14**, 859-863 (2003).
- [3-21] G. Blasse, A. Bril, “Investigation of some Ce³⁺-activated phosphors”, *J. Chem. Phys.*, **47**, 5139-5145 (1967).
- [3-22] S. Lee, S. Y. Seo, “Optimization of yttrium aluminum garnet:Ce³⁺ phosphors for white light-emitting diodes by combinatorial chemistry method”, *J. Electrochem. Soc.*, **149**, J85-J88 (2002).
- [3-23] R. Murota, T. Konbayashi, Y. Mita, “Solid state light source fabricated with YAG:Ce single crystal”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L887-L888 (2002).
- [3-24] R. Kasuya, A. Kawano, T. Isobe, H. Kuma, J. Katano, “Characteristic optical properties of transparent color conversion film prepared from YAG:Ce³⁺ nanoparticles”, *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 111916-1~111916-3 (2007).
- [3-25] I. Kandarakis, D. Cavouras, I. Sianoudis, D. Nikolopoulos, A. Episkopakis, N. Kalivas, G. Panayiotakis, N. Dimitropoulos, A. Louizi, “On the response of Y₃Al₅O₁₂:Ce (YAG:Ce) powder scintillating screens to medical imaging X-rays”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A*, **538**, 615-630 (2005).
- [3-26] D. Cavouras, I. Kandarakis, D. Nikolopoulos, I. Kalatzis, G. Kagadis, N. Kalivas, A. Episkopakis, D. Linardatos, M. Roussou, E. Nirgianaki, D. Margetis, I. Valais, I. Sianoudis, K. Kourkoutas, N. Dimitropoulos, A. Louizi, C. Nomicos, G. Panayiotakis, “Light emission efficiency and imaging performance of Y₃Al₅O₁₂:Ce (YAG:Ce) powder screens under diagnostic radiology conditions”, *Appl. Phys. B*, **80**, 923-933 (2005).
- [3-27] T. Tomiki, H. Akamine, M. Gushiken, Y. Kinjoh, M. Miyazato, T. Miyazato, N. Toyokawa, M. Hiraoka, N. Hirata, Y. Ganaha, T. Futemma, “Ce³⁺ Centres in Y₃Al₅O₁₂ (YAG) Single Crystals”, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **60**, 2437-2445 (1991).
- [3-28] K. Zhang, H. Liu, Y. Wu, W. Hu, “Synthesis of (Y, Gd)₃Al₅O₁₂:Ce nanophosphor by co-precipitation method and its luminescence behavior”, *J. Mater. Sci.*, **42**, 9200-9204 (2007).

- [3-29] K. Kubo, S. Hosokawa, S. Furukawa, S. Iwamoto, M. Inoue, "Synthesis of ZrO₂-TiO₂ solid solutions by various synthetic methods in the region of high zirconium contents", *J. Mater. Sci.*, **43**, 2198-2205 (2008).
- [3-30] S. Cho, J. Noh, S. Park, D. Lim, S. Choi, "Morphological control of Fe₃O₄ particles via glycothermal process", *J. Mater. Sci.*, **42**, 4877-4886 (2007).
- [3-31] S. Hosokawa, S. Iwamoto, M. Inoue, "Synthesis of nanocrystalline rare earth oxides by glycothermal method", *Mater. Res. Bull.*, **43**, 3140-3148 (2008).
- [3-32] M. Takesada, T. Isobe, H. Takahashi, S. Itoh, "Glycothermal synthesis of ZnGa₂O₄:Mn²⁺ nanophosphor and change in its photoluminescence intensity by heat-treatment", *J. Electrochem. Soc.*, **154**, J136-J140 (2007).
- [3-33] S. Hosokawa, Y. Tanaka, S. Iwamoto, M. Inoue, "Morphology and structure of rare earth borate (REBO₃) synthesized by glycothermal reaction", *J. Mater. Sci.*, **43**, 2776-2785 (2008).
- [3-34] T. Nakamura, T. Inui, M. Inoue, T. Miyake, "Glycothermal synthesis of vanadium(III) phosphate hydrates", *J. Mater. Sci.*, **41**, 4334-4341 (2006).
- [3-35] R. Kasuya, T. Isobe, S. Yamao, "Glycothermal synthesis of scheelite-type LiEuW₂O₈ nanophosphors and their structural characterization", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46**, 5879-5884 (2007).
- [3-36] M. Inoue, Y. Kondo, T. Inui, "An ethylene glycol derivative of boehmite", *Inorg. Chem.*, **27**, 215-221 (1988).
- [3-37] 井上正志, 近藤康彦, 古南博, 谷野浩一, 乾智行, "ジブサイトのグリコール中熱処理によるベーマイトのグリコール誘導体の生成 反応機構の検討", *日本化学会誌*, 1339-1345 (1991).
- [3-38] M. Inoue, H. Kominami, T. Inui, "Reaction of aluminium alkoxide with various glycols and the layer structure of their products", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3331-3336 (1991).
- [3-39] M. Inoue, H. Kominami, Y. Kondo, T. Inui, "Organic derivatives of layered inorganics having the second stage structure", *Chem. Mater.*, **9**, 1614-1619 (1997).
- [3-40] S. Winstein, E. Allred, R. Heck, R. Glick, "Neighboring methoxyl participation in solvolytic nucleophilic substitution", *Tetrahedron*, **3**, 1-13 (1958)
- [3-41] M. Inoue, T. Nishikawa, H. Kominami, T. Inui, "Reaction of rare earth acetate hydrates in glycols at high temperatures", *J. Mater. Sci.*, **35**, 1541-1547 (2000).
- [3-42] M. Inoue, "Glycothermal synthesis of metal oxides", *J. Phys. Condens. Matter.*, **16**, S1291-S1303 (2004).
- [3-43] M. Inoue, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, "Synthesis of submicron spherical crystals of gadolinium gallium garnets by the glycothermal method", *J. Mater. Sci. Lett.*, **14**, 1303-1305 (1995).
- [3-44] M. Inoue, T. Nishikawa, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, "Synthesis of rare-earth gallium garnets by the glycothermal method", *J. Am. Cerum. Soc.*, **81**, 1173-1183

(1998).

- [3-45] M. Inoue, T. Ishikawa, T. Inui, "Glycothermal synthesis of rare earth iron garnet", *J. Mater. Res.*, **13**, 856-860 (1998).
- [3-46] M. Inoue, T. Nishikawa, T. Inui, "Reactions of rare earth acetates with aluminum isopropoxide in ethylene glycol: synthesis of the garnet and monoclinic phases of rare earth aluminates", *J. Mater. Sci.*, **33**, 5835-5841 (1998).
- [3-47] R. Kasuya, T. Isobe, H. Kuma, J. Katano, "Photoluminescence enhancement of PEG-modified YAG:Ce³⁺ nanocrystal phosphor prepared by glycothermal method", *J. Phys. Chem. B*, **109**, 22126-22130 (2005).
- [3-48] R. Kasuya, T. Isobe, H. Kuma, "Glycothermal synthesis and photoluminescence of YAG:Ce³⁺ nanophosphors", *J. Alloys Compd.*, **408-412**, 820-823 (2006).
- [3-49] 粕谷亮, "色変換発光デバイス用ナノ蛍光体のグリコサーマル合成と特性評価", 慶應義塾大学, 博士論文 (2008).
- [3-50] E. E. Boakye, P. Mogilevsky, R. S. Hay, "Synthesis of nanosized spherical rhabdophane particles", *J. Am. Ceram. Soc.*, **88**, 2740-2746 (2005).
- [3-51] Y. Hattori, T. Isobe, H. Takahashi, S. Itoh, "Luminescent properties of ZnS:Mn²⁺ nanocrystals/SiO₂ hybrid phosphor synthesized by in situ surface modification co-precipitation", *J. Lumin.*, **113**, 69-78 (2005).
- [3-52] M. Inoue, M. Kimura, "Alkyl derivatives of boehmite having the second stage structure", *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **341**, 431-436 (2000).
- [3-53] V. D. Noto, V. Munchow, M. Vittadello, J. C. Collet, S. Lavina, "Synthesis and characterization of lithium and magnesium complexes based on [EDTA][PEG400]₂ and [EDTA]₃[PEG400]₇", *Macromol. Chem. Phys.*, **203**, 1211-1227 (2002).
- [3-54] O. Yamaguchi, K. Takeoka, K. Hirota, H. Takano, A. Hayashida, "Formation of alkoxy-derived yttrium aluminium oxides", *J. Mater. Sci.*, **27**, 1261-1264 (1992).
- [3-55] R. A. Rodríguez-Rojas, E. De la Rosa-Crus, L. A. Díaz-Torres, P. Salas, R. Meléndrez, M. Barboza-Flores, M. A. Meneses-Nava, O. Barbosa-García, "Preparation, photo- and thermo-luminescence characterization of Tb³⁺ and Ce³⁺ doped nanocrystalline Y₃Al₅O₁₂ exposed to UV-irradiation", *Opt. Mater.*, **25**, 285-293 (2004).
- [3-56] D. W. Coutts, A. J. S. McGonigle, "Cerium-Doped Fluoride Lasers", *IEEE J. Quantum Electron.*, **40**, 1430-1440 (2004).
- [3-57] M. Yamaga, N. Kodama, "Fluorescence of Ce³⁺ in fluorides and long-lasting phosphorescence of Ce³⁺ in oxides", *J. Alloys Compd.*, **408-412**, 706-710 (2006).
- [3-58] S. Zhou, Z. Fu, J. Zhang, S. Zhang, "Spectral properties of rare-earth ions in nanocrystalline YAG:Re (Re = Ce³⁺, Pr³⁺, Tb³⁺)", *J. Lumin.*, **118**, 179-185 (2006).
- [3-59] T. Aitasalo, J. Hölasä, M. Lastusaari, J. Ledendziewicz, J. Niittykoski, F. Pellé, "Delayed luminescence of Ce³⁺ doped Y₂SiO₅", *Opt. Mater.*, **26**, 107-112 (2004).
- [3-60] T. Aitasalo, J. Hölasä, M. Lastusaari, J. Ledendziewicz, J. Niittykoski, F. Pellé, "Delayed luminescence of Ce³⁺ doped X₁ form of Y₂SiO₅", *Opt. Mater.*, **27**, 1511-1515

(2005).

第4章 ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の作製とその応用

4.1 緒言

4.1.1 生体分子検出用の希土類ドーブ蛍光粒子

バイオイメージング用の蛍光体として利用されている有機色素は、光退色に対する耐性が低くストークスシフトが小さいといった欠点を有する。半導体量子ドットはこれらの問題を解決することができる一方で、Cd や Pb などの毒性の強い元素を含むため毒性が懸念されている。そのため、これらの元素を含まない無機蛍光体が低毒性の蛍光材料として着目されている。

主として研究されているのは、酸化物やフッ化物に希土類イオンを発光中心としてドーブした蛍光粒子である。これらは(1)低毒性であるほか、(2)様々な希土類イオンを発光中心に用いることで多色化が実現できる、(3)希土類イオンの f-f 遷移による発光は量子ドットのように粒径に依存しないため高度な粒径制御の必要がなく、低コストで合成できる、などの利点をもつ。また、ドーブする希土類イオンによっては近赤外光を照射してアップコンバージョンにより発光させることができるため、自家蛍光の抑制や組織内部からの蛍光の取得が期待できる。

Y₂O₃[4-1]や Eu₂O₃[4-2]などの酸化物や Y₂O₂S[4-3~7]などの酸硫化合物は安定性の高い蛍光体母体であり、最初に生化学検出への応用が検討された希土類ドーブ蛍光粒子である。Kuningas らはサブミクロンサイズの市販 La₂O₂S:Yb³⁺,Er³⁺ にポリアクリル酸を被覆して、さらに生体分子の固定を行い、プレートアッセイ[4-8,9]や色素へのエネルギー移動[4-10]から生体特異性を確認した。また、Nichkova らはスプレー熱分解法により合成した Gd₂O₃:Eu³⁺ ナノ粒子表面に抗体を固定し、抗原抗体反応を利用してマイクロアレイを行った[4-11,12]。しかし、現在生体分子検出に応用されている酸化物および酸硫化合物の蛍光粒子はいずれもサブミクロンサイズであり、今後の研究による粒径の縮小が望まれる。

一方、LaF₃[4-13~15]や NaYF₄[4-16]などのフッ化物は比較的小さな粒径のものが合成され、生体分子検出へ応用されている。これらは低フォノン振動の結晶であり、格子振動による消光の影響が抑制されるため、近赤外光励起によるアップコンバージョンの母体結晶として適している。Wang らは溶媒熱合成法により粒径約 20nm の NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ ナノ粒子を合成し、金ナノ粒子への FRET[4-17]や DNA の定量[4-18]に応用した。また Chatterjee らは、NaYF₄ ナノ粒子をマウスの皮下へ導入し、近赤外光の照射によるアップコンバージョン蛍光を非侵襲に確認した[4-19]。これらの粒子は酸化物ではないため、シランカップリング剤により直接官能基を導入することができない。そのため、シリカ被覆を行ってからシランカップリング剤を用いる[4-13, 16]、また、官能基を持つ分子を静電的に吸着させる[4-15]などの方法が採られている。

これらのほかにも、LaPO₄:Ce³⁺,Tb³⁺ ナノ粒子[4-20]、YVO₄:Eu³⁺ ナノ粒子[4-21]、Eu³⁺ ドーブアパタイト[4-22]などが生体分子検出用の蛍光材料として検討されている。

4.1.2 研究目的

第4章では、第3章で合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子に生体分子であるビオチンをコンジュゲートし、蛍光プローブの作製を試みた。YAG:Ce³⁺は量子ドットよりも毒性が低だけでなく、Ce³⁺の d-f 許容遷移を利用して励起と発光を行うため、f-f 遷移を発光に利用する多くの希土類蛍光体よりも高発光効率が期待できる。また、青色光で励起を行うため、紫外線による励起よりも光毒性が低い。

合成直後の YAG:Ce³⁺ナノ粒子は生体分子のコンジュゲートに有効な官能基を持たないため、まず、3-アミノプロピルトリメトキシシランによってアミノ基の導入を試みた。そして導入されたアミノ基を利用してビオチン化を行い、アビジンビーズを用いたイメージングのモデル実験により生体特異性を確認した。またマウスに対して YAG:Ce³⁺ナノ粒子の腹腔投与を行い、その毒性を確認した。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬

第4章で用いた試薬の一覧を Table 4-1 にまとめた。

Table 4-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS)	-	131.25	Chisso Chemical Division
Aluminium isopropoxide (AIP)	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Avidin immobilized agarose gel beads	-	-	Sigma
Avidin immobilized polystyrene-copolymer beads	-	-	Micromod Partikeltechnologie
Cerium(III) acetate monohydrate	>99.99%	335.26	Kanto Kagaku
Sulfosuccinimidyl-6(biotinamido) hexanoate biotiny agent	-	556.59	Pierce
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99%	338.10	Kanto Kagaku

4.2.2 試料の合成方法

4.2.2.1 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4 水和物 7.425 mmol (2.51 g)、酢酸セリウム(III)1 水和物 0.0075 mmol (0.0251 g)、およびアルミニウムトリイソプロポキシド 12.50 mmol (2.55 g)を加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温して同温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 週間静置して粗大粒子を沈降させ、その上澄みを以降の実験に用いた。

4.2.2.2 APTMS 処理

4.2.2.1 で合成した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子コロイド 5 mL と超純水 10 mL の混合溶液に、マグネティックスターラーによる攪拌のもと、APTMS 150 μ L を加えて 2 h 反応させた。反応終了後、遠心分離(10000 rpm, 20 min)により粒子を沈降させ、デカンテーションにより未反応の APTMS を除去し、超純水を 15 mL 加えて超音波を照射させて粒子を最分散させた。この洗浄操作を合計 3 回行った。この手順の概念図を Fig.4.2 の STEP 1,2 に示す。

解析のために粉末化が必要な場合は、最後の洗浄を行ったあとに 50 °C の送風乾燥機で 1 day 乾燥させることで粉末化を行った。

4.2.2.3 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子のビオチン化

4.2.2.2 で得られた分散液 10 mL をマグネティックスターラーで攪拌させながら、5 mg/mL sulfo-NHS-LC-biotin-PBS 溶液を 1 mL 加え、2 h 反応させた。反応終了後、遠心分離(10000 rpm, 20 min)により粒子を沈降させ、デカンテーションにより未反応の sulfo-NHS-LC-biotin を除去し、超純水を 15 mL 加えて超音波を照射させて粒子を再分散させた。この洗浄操作を合計 3 回行った。この手順の概念図を Fig.4.2 の STEP 3 に示す。

4.2.2.4 ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子によるアビジン固定ビーズの標識

アビジン固定アガロースゲルビーズ分散液 100 μ L もしくはアビジン固定ポリスチレン共重合体ビーズ 50 μ L を超純水 10 mL に分散させ、マグネティックスターラーによる攪拌のもと、4.2.2.3 で調製した分散液 100 μ L を加え、2 h 反応させた。反応終了後、マイクロチューブを用いた限外ろ過(pore size: 5.0 μ m)を行い、未反応のビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を除去した。一連の手順を Fig.4.1 のフローチャートに、アビジン固定ビーズ標識の概念図を Fig.4.2 に示す。標識コントロールとして、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の代わりに 4.2.2.1 で得られた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を用いた実験を行った。

4.2.3 試料の評価方法

第 2 章で述べた評価のうち、FE-TEM, FE-SEM, XRD, DLS, PL, PLE, FT-IR による評価を行った。また蛍光顕微鏡(Nicon, Eclipse, E600)による観察は Table 4-2 に示すフィルター条件で行った。

Table 4-2 Condition of filter block set.

Excitation wavelength	Dichroic wavelength	Emission wavelength
430 - 440 nm	505 nm	515 -555 nm

4.3 結果と考察

4.3.1 合成直後の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子

FE-TEM 像を Fig.4.3 に示す。FE-TEM 像より見積もった未処理の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子

の数平均1次粒子径は9.5 nm、標準偏差は1.2 nmであった。また、Fig.4.4 に示す XRD プロファイルにおいては全てのピークが YAG へ帰属され、ガーネット結晶が単相で合成されていることを確認した。また、DLS による粒度分布測定の結果を Fig.4.5 に示すが、合成直後の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の平均流体力学直径は46.8 nm、標準偏差は7.5 nm であった。DLS で得られた粒子径は TE-TEM 像から算出された数平均粒子径よりも大きい。これは、合成の段階で複数の1次粒子が凝集することで2次粒子を形成しているためであると考えられる。

Fig.4.6 に PL・PLE スペクトルを示す。PLE スペクトルにおける450 nm と波長345 nm に観測される2つのピークは、それぞれ Ce³⁺ の 4f(2F_J) 5d(2A_{1g}) および 4f(2F_J) 5d(2B_{1g}) に帰属される。PL スペクトルは波長530 nm および570 nm をそれぞれピークにするスペクトルの重なり合いとして観測され、それぞれ 5d₁(2A_{1g}) 4f(2F_{5/2}) および 5d₁(2A_{1g}) 4f(2F_{7/2}) に帰属される[4-23, 24]。

Fig.4.7 に 488nm の励起光を照射しながら測定した蛍光強度の時間変化を示す。FITC は90min の励起光照射により36%まで退色したが、純水に分散させた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は同条件下で約5%しか退色せず、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は FITC よりも光退色に対する耐性が高いことが示された。わずかな退色は、発光中心である Ce³⁺ が非発光中心である Ce⁴⁺ へ酸化されることが原因として考えられ、比表面積の大きなナノ粒子では表面近傍に存在する Ce³⁺ が多いため、その効果が顕著に現れたと考えられる。

FT-IR 吸収スペクトルを Fig.4.8 に、その帰属を Table 4-2 に示す。波数3500 cm⁻¹ に観測されるブロードなピークおよび波数2950 cm⁻¹ に観測される吸収ピークはそれぞれ OH 伸縮振動、CH 伸縮振動に帰属される。波数1558 cm⁻¹ および1436 cm⁻¹ に観測される吸収ピークはそれぞれ COO 非対称伸縮振動と COO 対称振動に帰属され、原料由来の酢酸イオンが YAG:Ce³⁺ ナノ粒子表面の金属イオンへ配位していることが示唆される。また、波数700 cm⁻¹ 付近の吸収は Al-O 非対称伸縮振動に帰属され、母体である YAG に起因する。

また、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の毒性を調査するため、12 mg/mL の濃度で純水に分散させた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子分散液をマウス(30g×5, 10g×6)に腹腔投与したが、全てのマウスは生存したため、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の毒性は低いと考えられる。

4.3.2 APTMS 処理 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子

APTMS 処理を行った後の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の粒度分布を DLS により測定した。その結果を Fig.4.5 に示す。算出された平均流体力学直径は41.3 nm、標準偏差は9.1 nm であり、合成直後の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の結果と大きな差は認められなかった。これは APTMS 処理によっても粒子径が増大しないこと、および YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の分散状態が変化しないことを示唆する。

APTMS 処理後の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の FT-IR スペクトルを Fig.4.8 に、その帰属を Table 4-2 に示す。APTMS 処理を施すことによって、波数3091 cm⁻¹ および1643 cm⁻¹ に新しくピークが観測された。これらの吸収ピークはそれぞれ N-H 伸縮振動と H-N-H 変角振動に帰属され、NH₂ 基の存在を示唆する。同様に、波数1176 cm⁻¹ および1067 cm⁻¹ に出現し

た吸収ピークは Si-O-X 伸縮振動(X = Al, Y, Ce, and C)に帰属され、Si 原子の存在を示唆する。これらの結果は、APTMS の存在を示唆する。また波数 3700 cm⁻¹ に観測される吸収ピークは粒子表面のフリー-OH 基に帰属されるが、この OH 基が APTMS と重縮合することで Fig.4.2 に示すように粒子表面に NH₂ 基が導入されると考えられる。

Table 4-2 Assignment of FT-IR spectra.

Peak number	APS modified YAG:Ce ³⁺	YAG:Ce ³⁺	Assignment	Ref.
1	~3700	~3700	v(OH)	[4-25]
2	~3400	~3400	v(OH)	[4-25]
3	3091		v(NH)	[4-26]
4		2950	v(CH)	[4-27]
5	~2370	~2370	v ^{as} (CO ₂)	[4-27]
6	2118		} combination tone or overtone of δ(NH ₂)	
7	1975			
8	1643		δ(NH ₂)	[4-26]
9	1551	1558	v ^{as} (COO)	[4-27, 28]
10		1458	δ ^s (CH ₂)	[4-27]
11		1436	v ^s (COO)	[4-27, 28]
12	1358	1352	ω(CH ₂)	[4-27]
13	1176		v ^{as} (Si-O-X)	[4-29]
14	1067		(X=Al, Y, Ce, C)	
15		1061	v(C-O)	[4-27]
16		1023	v(C-O)	[4-27]
17	~700	~700	v ^{as} (Al-O)	[4-30]

v, stretching; δ, bending; ω, wagging; as, asymmetric; s, symmetric

4.3.3 ビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子

アビジン固定アガロースゲルビーズの蛍光顕微鏡像を Fig.4.9 に示す。Fig.4.9 (c), (d)に示すように、未修飾 YAG:Ce³⁺ナノ粒子はアビジンビーズに対して不活性であり、ビーズ表面は標識されなかった。一方、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を標識に用いた場合、Fig.4.9(a), (b)に示すように YAG:Ce³⁺ナノ粒子の蛍光が明視野像と同じ位置に観察された。これは、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子がアビジン - ビオチン相互作用を通じてビーズ表面と生体特異的に反応したことを示しており、ビオチン分子の持つ生体特異性が YAG:Ce³⁺ナノ粒子とのコンジュゲート後も維持されていることが示唆される。

アビジン固定ポリスチレン共重合体ビーズの蛍光顕微鏡像および FE-SEM 像を Fig.4.10 に示す。Fig.4.10(a), (b)に示すように、アガロースゲルを用いたときと同様にし

てビオチン化 YAG:Ce³⁺によってビーズが標識された。FE-SEM による観察を行うと、未標識のビーズは Fig.4.10(c)に示すように表面が平滑であるが、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子標識後は Fig.4.10(d), (e)に示すようにビーズの表面一様に YAG:Ce³⁺ ナノ粒子が標識している様子が観察された。

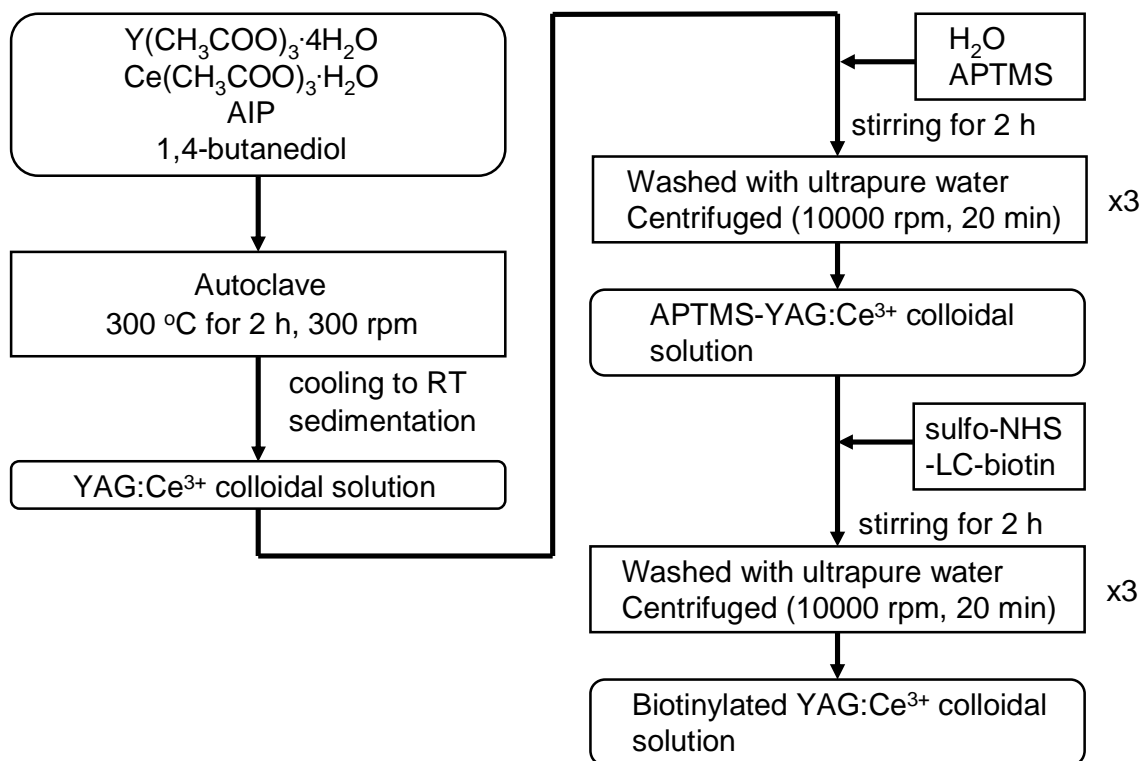


Fig.4.1 Schematic representation of the preparation of biotinylated YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

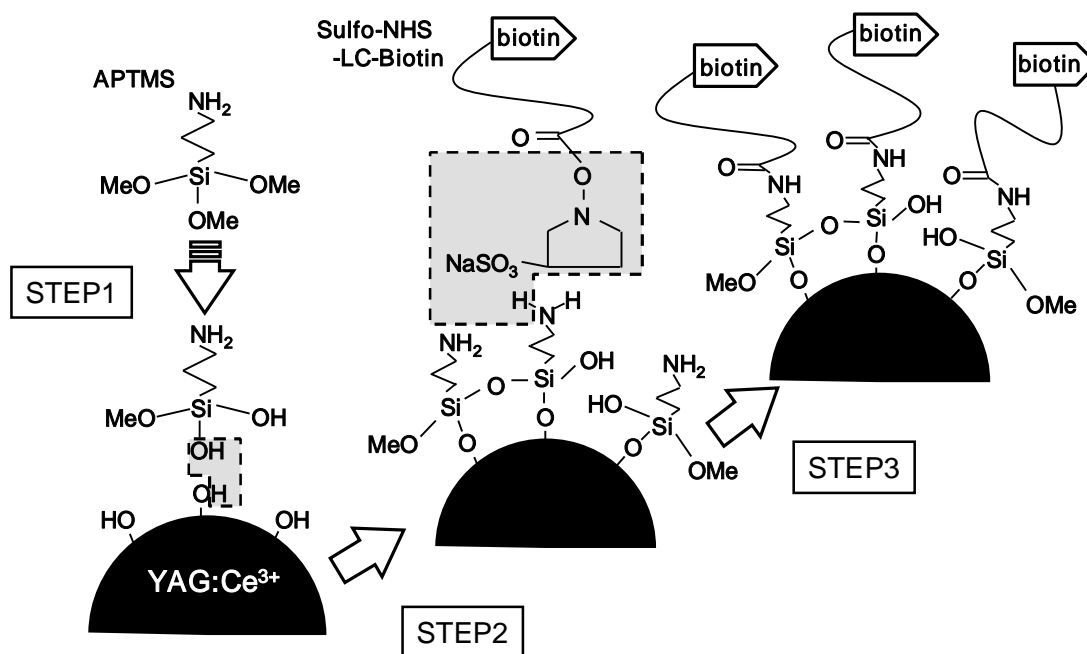


Fig.4.2 Illustration of the preparation of the biotinylated YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

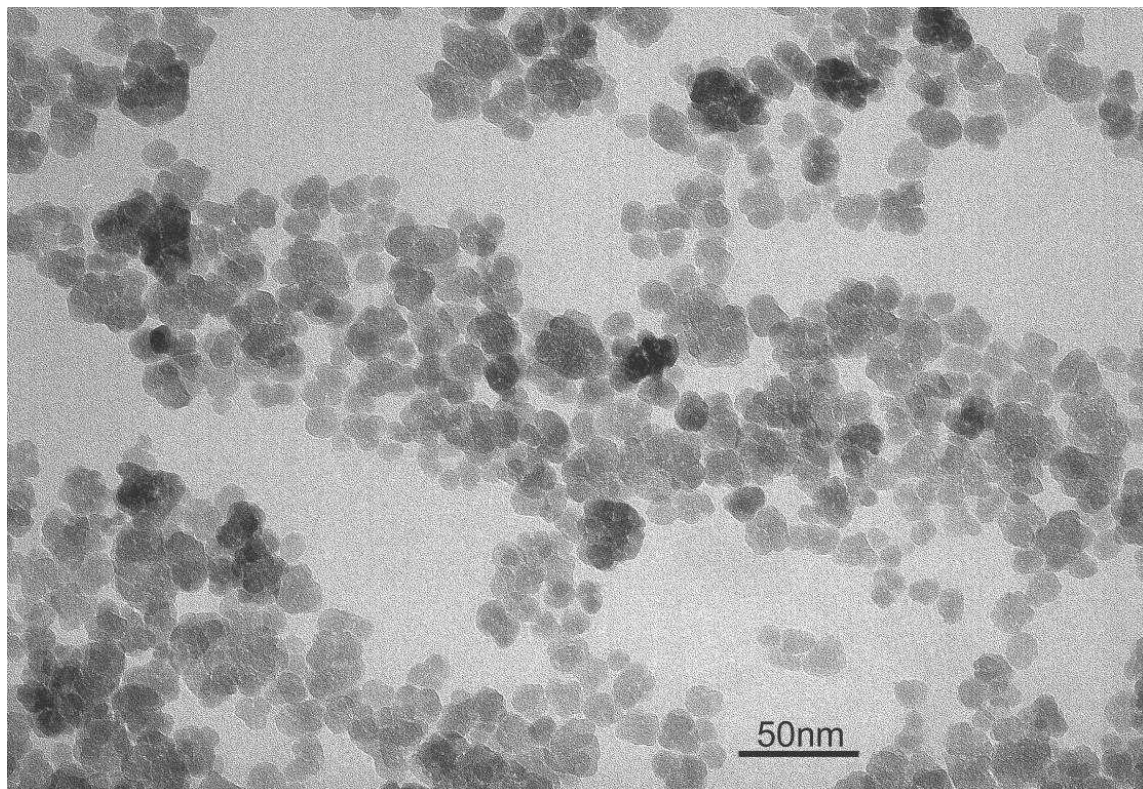


Fig.4.3 TEM micrograph of YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

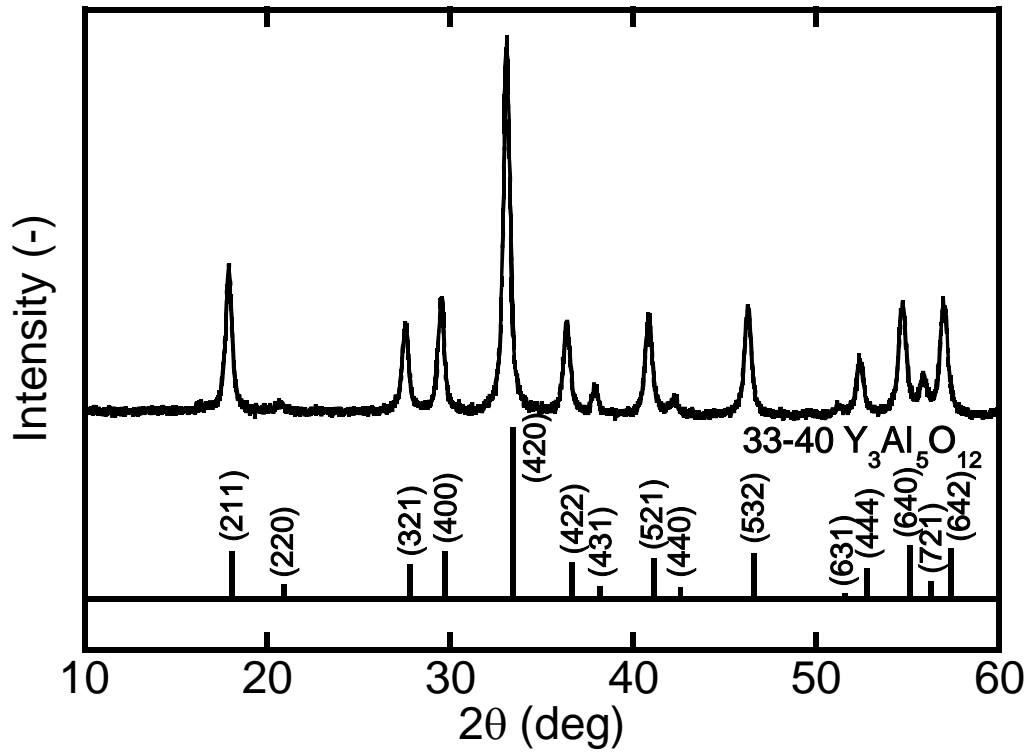


Fig.4.4 XRD profile of YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

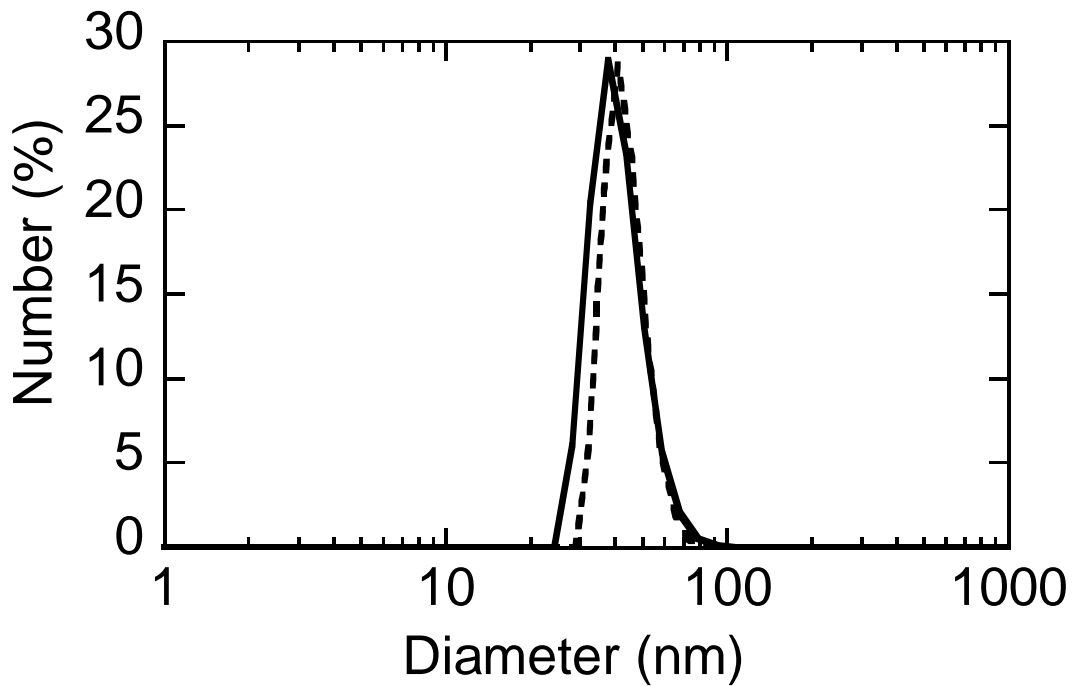


Fig.4.5 Particle-size distribution measured by DLS for YAG:Ce³⁺ nanoparticles diluted in ultrapure water (solid line) and APTMS-YAG:Ce³⁺ nanoparticles diluted in ultra purewater (broken line).

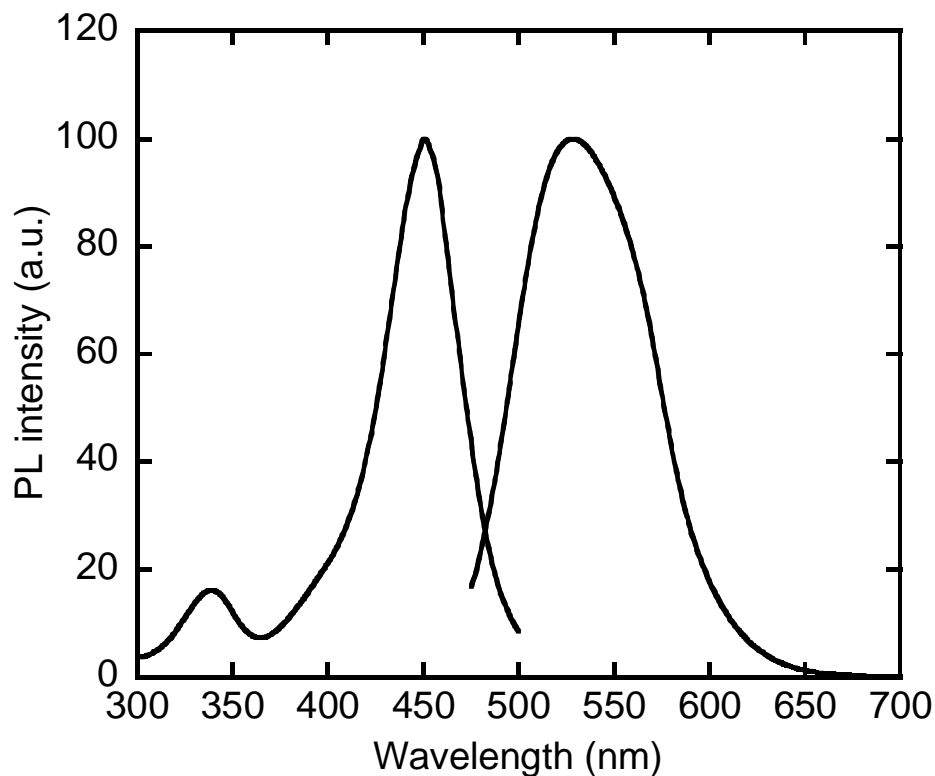


Fig.4.6 PL and PLE spectra of the YAG:Ce³⁺ nanoparticles dispersed in 1,4-butanediol.

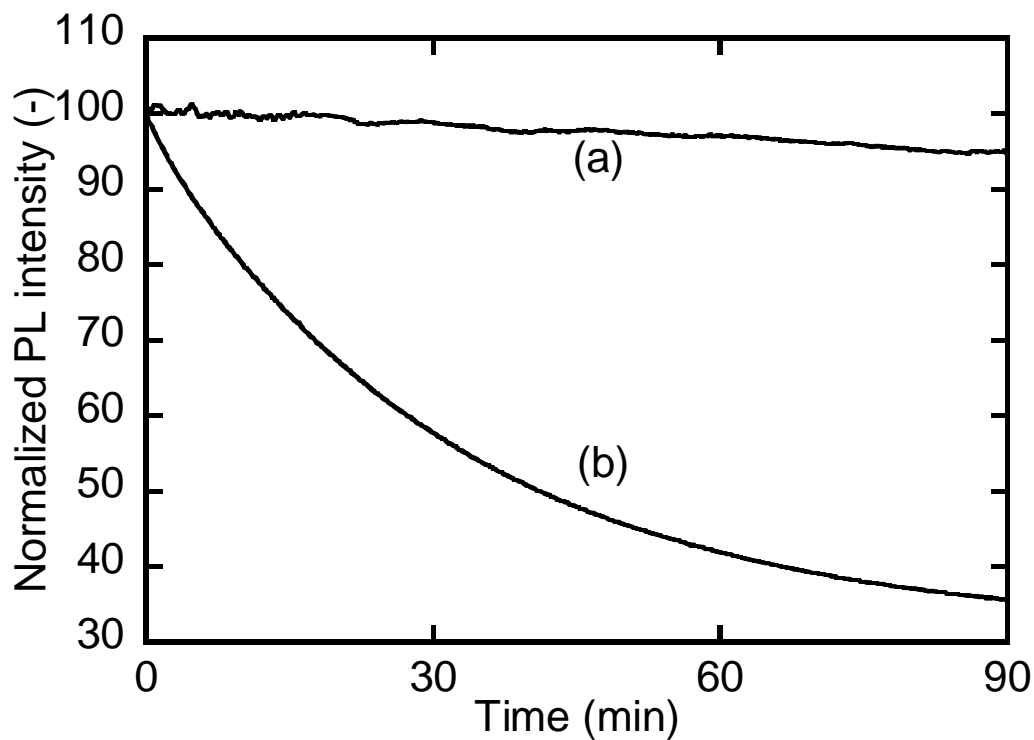


Fig.4.7 The change in the PL intensity with time under irradiation of 488 nm light. (a) YAG:Ce³⁺ nanoparticles dispersed in ultra purewater, (b) FITC dispersed in ultra purewater.

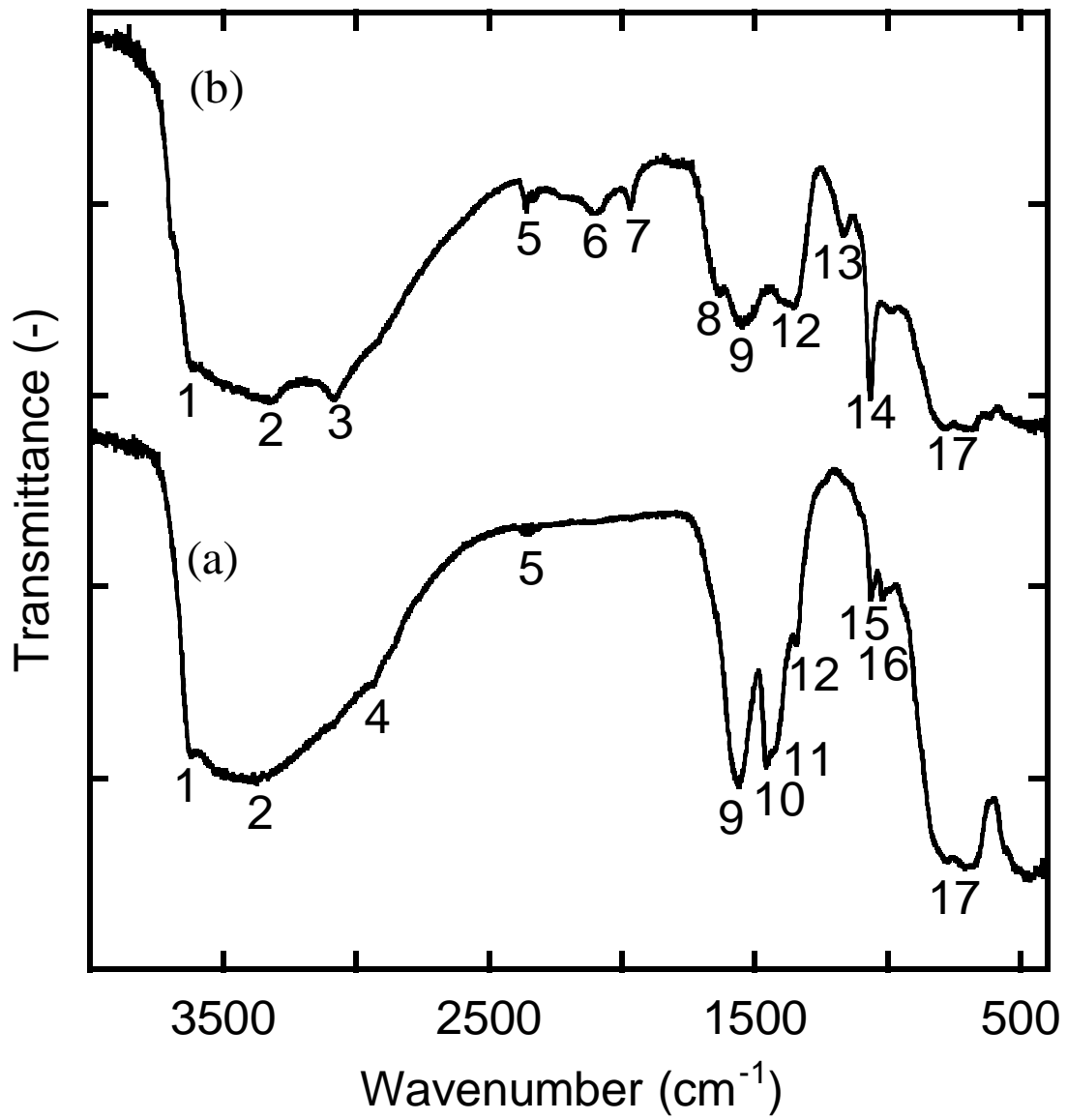


Fig.4.8 FT-IR spectra: (a) YAG:Ce³⁺ nanoparticles, (b) APTMS-YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

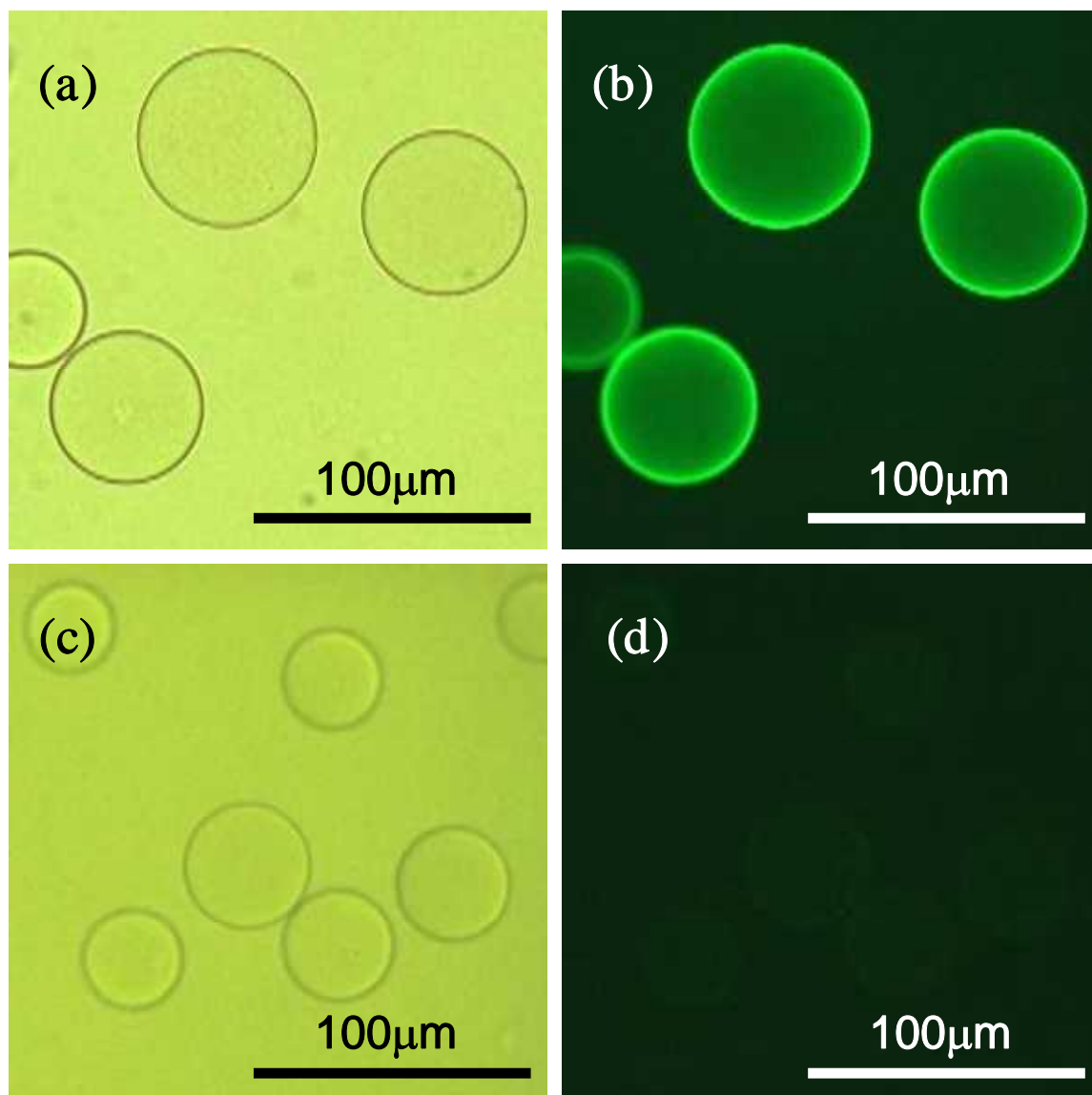


Fig.4.9 Microscopic images of avidin immobilized agarose gel beads. (a), (b): treated with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanoparticles; (c), (d): treated with YAG:Ce³⁺ nanoparticles without biotin. (a), (c): bright field image; (b), (d): fluorescent image.

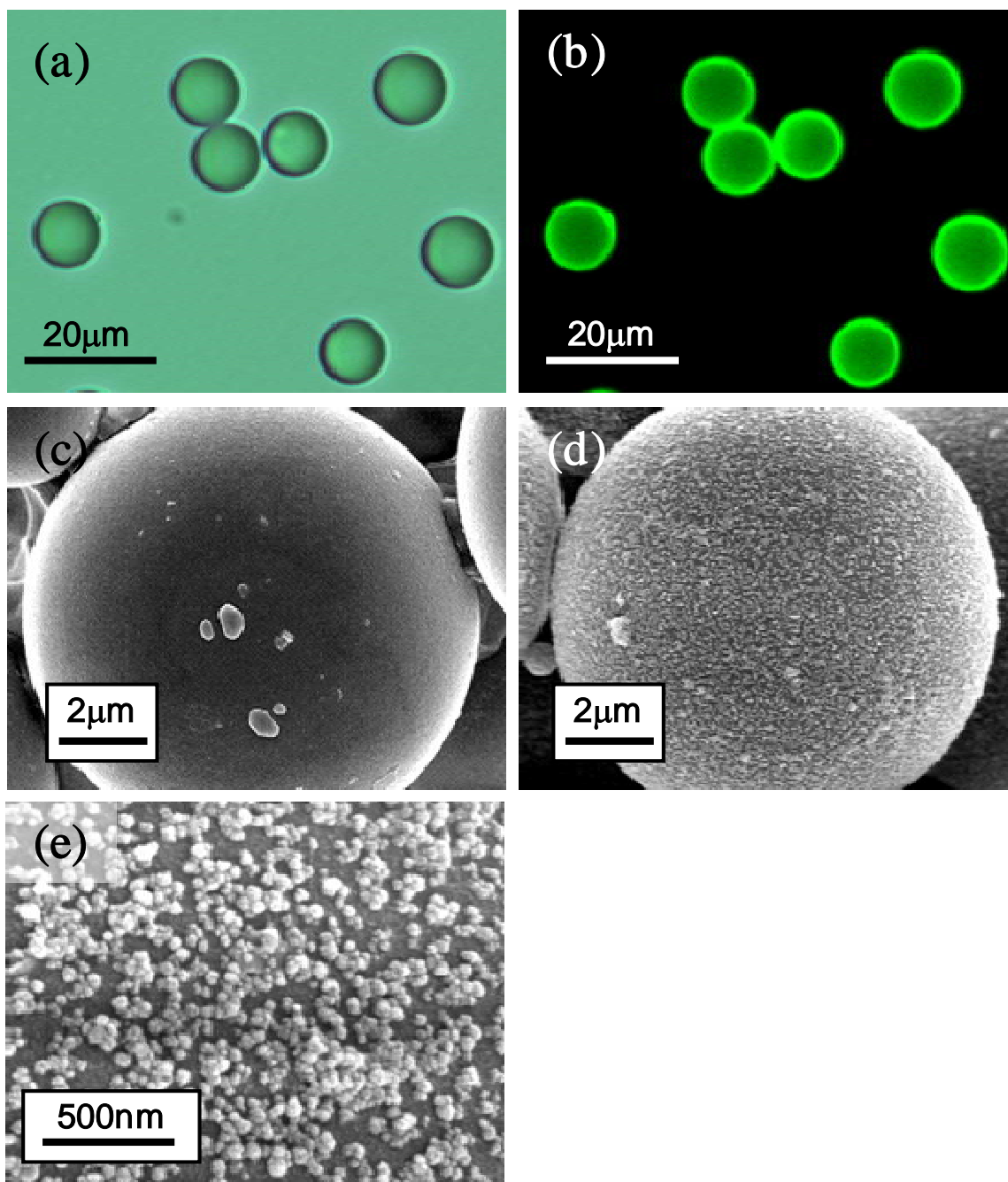


Fig. 4.10 Microscopic images of avidin immobilized polystyrene-copolymer beads. (a), (b), (d), (e): after treating with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanoparticles; (c): before treating with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanoparticles; (a): bright field image; (b): fluorescent image; (c)-(e): FE-SEM images.

4.4 結論

グリコサーマル法により 1 次粒子径が約 10nm の YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を合成した。合成された粒子は純水中でも安定に分散し、マウスへ腹腔投与しても顕著な毒性を示さないことが確認された。APTMS 処理により、純水に対する分散性や光学特性には影響を与えることなく、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子表面に生体分子とのコンジュゲートに利用可能なアミノ基を導入することができた。ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子はアビジン - ビオチン間の生体特異的な結合によりアビジン固定ポリマービーズを標識し、その蛍光を蛍光顕微鏡により観察することができた。この結果は、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子が、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の光学特性とビオチンの生体特異性を維持していることを示し、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の蛍光プローブとしての可能性を示唆する。

4.5 第4章の参考文献

- [4-1] S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C. Tung, D. Tank, R. H. Austin, "In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*", *Nano Lett.*, **6**, 169-172 (2006).
- [4-2] J. Feng, G. Shan, A. Maquieira, M. E. Koivunen, B. Guo, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, "Functionalized europium oxide nanoparticles used as a fluorescent label in an immunoassay for atrazine", *Anal. Chem.*, **75**, 5282-5286 (2003).
- [4-3] H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vali, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, "Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology", *Anal. Biochem.*, **267**, 30-36 (1999).
- [4-4] J. Hampl, M. Hall, N. A. Mufti, Y. M. Yao, D. B. MacQueen, W. H. Wright, D. E. Cooper, "Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays", *Anal. Biochem.*, **288**, 176-187 (2001).
- [4-5] F. van de Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vali, A. K. Raap, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, "Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays", *Nat. Biotechnol.*, **19**, 273-276 (2001).
- [4-6] R. S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vali, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo, "Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology", *Anal. Biochem.*, **293**, 22-30 (2001).
- [4-7] M. Zuiderwijk, H. J. Tanke, R. S. Niedbala, P. L. A. M. Corstjens, "An amplification-free hybridization-based DNA assay to detect *Streptococcus pneumoniae* utilizing the up-converting phosphor technology", *Clin. Biochem.*, **36**, 401-403 (2003).
- [4-8] K. Kuningas, T. Rantanen, U. Karhunen, T. Lvgren, T. Soukka, "Simultaneous use of time-resolved fluorescence and anti-stokes photoluminescence in a bioaffinity assay", *Anal. Chem.*, **77**, 2826-2834 (2005).
- [4-9] K. Kuningas, T. Tantanen, T. Lövgren, T. Soukka, "Enhanced photoluminescence of up-converting phosphors in a solid phase bioaffinity assay", *Anal. Chim. Acta*, **543**, 130-136 (2005).
- [4-10] K. Kuningas, T. Rantanen, T. Ukonaho, T. Lövgren, T. Soukka, "Homogeneous assay technology based on upconverting phosphors", *Anal. Chem.*, **77**, 7348-7355 (2005).
- [4-11] M. Nichkova, D. Dosev, S. J. Gee, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, "Microarray immunoassay for phenoxybenzoic acid using polymer encapsulated Eu:GdO nanoparticles as fluorescent labels", *Anal. Chem.*, **77**, 6864-6874 (2005).
- [4-12] M. Nichkova, D. Dosev, R. Perron, S. J. Gee, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, "Eu³⁺-doped Gd₂O₃ nanoparticles as reporters for optical detection and visualization of antibodies patterned by microcontact printing", *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 631-637 (2006).
- [4-13] S. Sivakumar, P. R. Diamente, F. C. J. M. van Veggel, "Silica-coated Ln³⁺-doped

- LaF₃ nanoparticles as robust down- and upconverting biolabels”, *Chem. Eur. J.*, **12**, 5878-5884 (2006).
- [4-14] F. Wang, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, “One-pot synthesis of chitosan/LaF₃:Eu³⁺ nanocrystals for bio-applications”, *Nanotechnology*, **17**, 1527-1532 (2006).
- [4-15] P. R. Diamente, R. D. Burke, F. C. J. M. van Veggel, “Bioconjugation of Ln-doped LaF nanoparticles to avidin”, *Langmuir*, **22**, 1782-1788 (2006).
- [4-16] G. Yi, H. Lu, S. Zhao, Y. Ge, W. Yang, D. Chen, L. Guo, “Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₄:Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors”, *Nano Lett.*, **4**, 2191-2196 (2004).
- [4-17] L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. Li, “Fluorescence resonance energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 6054-6057 (2005).
- [4-18] L. Wang, Y. Li, “Green upconversion nanocrystals for DNA detection”, *Chem. Comm.*, 2557-2559 (2006).
- [4-19] D. K. Chatterjee, A. J. Rufaihah, Y. Zhang, “Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals”, *Biomaterials*, **29**, 937-943 (2008).
- [4-20] F. Meiser, C. Cortez, F. Caruso, “Biofunctionalization of fluorescent rare-earth-doped lanthanum phosphate colloidal nanoparticles”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5954-5957 (2004).
- [4-21] E. Beaupaire, V. Buissette, M. Sauviat, D. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, D. Casanova, A. Huignard, J. Martin, T. Gacoin, J. Boilot, A. Alexandrou, “Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level”, *Nano Lett.*, **4**, 2079-2083 (2004).
- [4-22] A. Doat, M. Fanjul, F. Pellé, E. Hollange, A. Lebugle, “Europium-doped bioapatite: a new photostable probe, internalizable by human cells”, *Biomaterials*, **24**, 3365-3371 (2003).
- [4-23] C. Lu, H. Hong, R. Jagannathan, “Sol-gel synthesis and photoluminescent properties of cerium-ion doped yttrium aluminium garnet powders”, *J. Mater. Chem.*, **12**, 2525-2530 (2002).
- [4-24] R. A. Rodríguez-Rojas, E. De la Rosa-Crus, L. A. Díaz-Torres, P. Salas, R. Meléndrez, M. Barboza-Flores, M. A. Meneses-Nava, O. Barbosa-García, “Preparation, photo- and thermo-luminescence characterisation of Tb³⁺ and Ce³⁺ doped nanocrystalline Y₃Al₅O₁₂ exposed to UV-irradiation”, *Opt. Mater.*, **25**, 285-293 (2004).
- [4-25] J. Marchal, T. John, R. Baranwal, T. Hinklin, R. M. Laine, “Yttrium aluminium garnet nanopowders produced by liquid-feed flame spray pyrolysis (LF-FSP) of metalloorganic precursors”, *Chem. Mater.*, **16**, 822-831 (2004).
- [4-26] K. Uvdal, P. Bodo, A. His, B. Liedberg, W. R. Salaneck, “X-ray photoelectron and infrared spectroscopy of glycine adsorbed upon copper”, *J. Colloid Interface Sci.*, **140**,

207-216 (1990).

[4-27] D. Santhiya, S. Subramanian, K. A. Natarajan, S. G. Malghan, "Surface chemical studies on the competitive adsorption of poly(acrylic acid) and poly(vinyl alcohol) onto alumina", *J. Colloid Interface Sci.*, **216**, 143-153 (1999).

[4-28] J. Simon-Kutscher, A. Gericke, H. Hühnerfuss, "Effect of bivalent Ba, Cu, Ni, and Zn cations on the structure of octadecanoic acid monolayers at the air-water interface as determined by external infrared reflection-absorption spectroscopy", *Langmuir*, **12**, 1027-1034 (1996).

[4-29] S. Wang, Y. Hsu, T. C. K. Yang, C. Chang, Y. Chen, C. Huang, F. Yen, "Silica coating on ultrafine α -alumina particles", *Mater. Sci. Eng. A*, **395**, 148-152 (2005).

[4-30] O. Yamaguchi, K. Takeoka, K. Hirota, H. Takano, A. Hayashida, "Formation of alkoxy-derived yttrium aluminium oxides", *J. Mater. Sci.*, **27**, 1261-1264 (1992).

第 5 章 ポリアクリル酸被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子のプレートアッセイへの応用

5.1 緒言

第 4 章で作製したビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子は、純水中では良好に分散するがリン酸塩緩衝液 (PBS) 中では塩析を起こして凝集するという欠点を有する。抗原抗体反応は塩を含んだ溶液で行う必要があるため、塩濃度の高い溶液中でも安定に分散できるように粒子の表面を改質する必要がある。

5.1.1 表面改質

量子ドットは通常、トリオクチルフォスフィン (TOP) やトリオクチルフォスフィンオキシド (TOPO) を用いたホットソープ法[5-1~3]により合成されるが、このようにして作製された粒子は疎水性であるため、そのままでは水溶媒へ分散させることができない。そのため、親水化を目的として様々な表面改質が行われている。

その方法の 1 つは、配位子交換によるものである[5-4~19]。これは、親水化のための官能基を有する分子を、粒子表面に配位している TOP や TOPO と交換するようにして粒子表面に導入する方法である。配位させる分子は、メルカプト琥珀酸[5-5, 10]、メルカプトスルホン酸[5-11]、システイン[5-8]など、チオール基を末端に有する低分子が主として用いられる。例えば、Chan らはカルボキシル基とチオール基を有するメルカプト酢酸を用い、チオール基を粒子表面の金属イオンに配位させることで量子ドットにカルボキシル基を導入し、親水化を図った[5-4]。また、Mattoussi らは 1 分子内にチオール基を 2 つ有するジヒドロリポ酸分子を用い、粒子表面に 2 座配位させることで分子の脱離を抑制し、より安定な親水化量子ドットを作製した[5-12~15]。また、セロトニンや[5-16]ポリエチレングリコール (PEG) [5-17]、デンドリマー[5-18]など量子ドットに導入したい分子をあらかじめチオール化してから用いることもある。チオール基のほか、リン酸基によっても配位子交換が可能である。例えば Kim らは、カルボキシル基を有するオリゴマーフォスフィン粒子表面に多座配位させ親水化を行っている[5-19]。

もう 1 つの方法はミセルの利用である[5-20~26]。これは、両親媒性化合物の疎水部分を量子ドット表面の TOP や TOPO と相互作用させ、親水部分を外側にすることによって親水化を行う方法である。臭化セチルトリメチルアンモニウムなどの界面活性剤[5-20]のほか、リン脂質 - PEG ブロック共重合体[5-21, 22]やアルキルアミン - ポリアクリル酸 (PAA) グラフト共重合体[5-23, 24]が用いられている。Dubertret らは、リン脂質と PEG のブロック共重合体で量子ドットをカプセル化し、アフリカツメガエルの胚形成の長期的な追跡実験を行った[5-21]。

3 つ目の方法はシリカ[5-27~31]やポリマー[5-32~36]への埋包である。シリカに埋包す

る場合は、先に量子ドットに反応の足掛かりとなるようにシラン誘導体を導入したのちに Stöber 法などによってシリカシェルを形成することが多い。例えば Wolcott らは、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランで配位子交換を行い、粒子にシラノール基を導入したのちにケイ酸ガラスによるシリカ被覆を行っている [5-29]。

ポリマーに埋法する場合はポリスチレンがよく用いられ、スチレンモノマー重合中にアクリルアミド [5-34] やメタクリル酸 [5-35] を共存させることで、アミノ基やカルボキシル基などの官能基を導入している。また Chen らは、負に帯電したメルカプト琥珀酸被覆量子ドットと負に帯電したデキストランの混合溶液に、正に帯電したポリリジンを加えて凝集させ、さらにアミド結合で架橋することで量子ドットを含むグリコナノ球を合成している [5-36]。

このような表面改質は疎水性の粒子を親水化するだけでなく、生体分子のコンジュゲートに有効な官能基を導入する目的でも行われる。また、粒子表面からの金属イオンの溶出を抑制し、毒性を低減させる効果もある。

5.1.2 研究目的

YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の PBS 中での凝集を抑制するために、ポリアクリル酸 (PAA) を選択した。PAA は分散安定剤として広く用いられており、増粘剤や湿潤剤として食品や医療にも使用される毒性の低い材料である [5-37]。また、側鎖にカルボキシル基を有するため、生体分子とのコンジュゲートへの利用が期待できる。

第 5 章では、まず YAG:Ce³⁺ ナノ粒子に PAA を静電的に吸着させ PBS 中での分散安定化を確認した。さらに側鎖のカルボキシル基を利用してストレプトアビジンを共有結合的に PAA に固定化した。最後に、このように調製した粒子を用いてプレートアッセイを行い、ウシ血清アルブミン (BSA) の定量を試みた。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬

第5章で用いた試薬の一覧を Table 5-1 にまとめた。

Table 5-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) hydrochloride (EDC)	-	191.70	Pierce
Albumin bovine serum (BSA)	>99%	-	Sigma
Aluminium isopropoxide	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Cerium(III) acetate monohydrate	>99.99%	335.26	Kanto Kagaku
Goat anti-rabbit IgG conjugated with biotin	-	-	Sigma
Poly(acrylic acid) (PAA)	-	2000	Aldrich
Rabbit anti-bovine serum albumin (anti-BSA)	-	-	Sigma
Atreptavidin-FITC	-	-	Vector
Sulfo-N-hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS)	-	217.13	Pierce
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99	338.10	Kanto Kagaku

5.2.2 試料の合成方法

5.2.2.1 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4 水和物 7.425 mmol (2.51 g)、酢酸セリウム(III)1 水和物 0.0075 mmol (0.0251 g)、およびアルミニウムトリイソプロポキシド 12.50 mmol (2.55 g)を加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 週間静置して粗大粒子を沈降させ、その上澄みを以降の実験に用いた。

5.2.2.2 PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の調製

5.2.2.2-3 のスキームを Fig.5.1 に示す。1 wt%の PAA 水溶液を NaOH を用いて pH=7.0 に調製した。この PAA 溶液 45 mL に超音波を照射しながら 5.2.2.1 で合成した YAG:Ce³⁺コロイドを 15 mL 投入し、そのまま 2 h 攪拌した。遠心分離 (10000 rpm, 35 min) で粒子を沈降させ、上澄みに残存した未吸着の PAA をデカンテーションにより除去したのちに、PBS を加えて再分散した。この洗浄操作を計 3 回行い、全量が 60 mL になるように PBS を加えて再分散し、PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液を得た。

5.2.2.3 ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の調製

5.2.2.2 で調製した PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液 15 mL に、10 mg/mL Sulfo-NHS-PBS 溶液 1.5 mL と 20 mg/mL EDC-PBS 溶液 2.4 mL を投入し、2 h 攪拌した。遠心分離 (10000 rpm, 35 min) で粒子を沈降させ、上澄みに残存した未反応物質をデカンテーションにより除去したのちに、PBS を加えて再分散した。この洗浄操作を計 3 回行い、全量が 10 mL になるように PBS を加えて分散させた。

この溶液に 1 mg/mL ストレプトアビジン-PBS 溶液を 850 μ L 投入し、3 h 攪拌した。遠心分離 (10000 rpm, 35 min) で粒子を沈降させ、上澄みに残存した未反応物質をデカンテーションにより除去したのちに、PBS を加えて再分散した。この洗浄操作を計 3 回行い、全量が 10 mL になるように PBS を加えて再分散し、ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液を得た。

5.2.2.4 プレートアッセイによる BSA の定量

5.2.2.3 で調製したストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を用いて BSA の定量を行った。概略図を Fig.5.2 に示す。任意の濃度に調製した BSA-PBS 溶液 150 μ L を、96 穴ウェルプレートのウェルにそれぞれ投入し、1 day インキュベートした。その後、1 % のスキムミルク-PBS 溶液 150 μ L を全てのウェルに対して追加投入して 2 h インキュベートすることによりブロッキングを行った。さらに、rabbit IgG anti-BSA, ビオチン修飾 anti-rabbit IgG, ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液の順に、2 h のインキュベートと 0.05 % Tween 20-PBS 溶液による洗浄操作を 2 回ずつ行い、プレートを作製した。また、BSA を投入せずに同様の操作を行い、これをブランクとした。

5.2.3 試料の評価方法

第 2 章で述べた評価方法のうち、DLS、ゼータ電位測定、FT-IR、PL・PLE、UV-vis、蛍光プレートリーダーによる評価を行った。さらに、得られた測定結果より相対量子効率 IQE を算出した。

5.3 結果と考察

5.3.1 PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子

Fig.5.3 に YAG:Ce³⁺ナノ粒子を純水および PBS に分散させたときの外観および PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を PBS に分散させたときの外観を示す。PAA の被覆がない YAG:Ce³⁺ナノ粒子は、Fig.5.3(a) に示すように純水中ではよく分散したが、PBS 中では Fig.5.3(b) に示すように塩析を起こして凝集した。一方で、PAA 被覆を行った YAG:Ce³⁺ナノ粒子は、Fig.5.3(c) に示すように、PBS 中でも塩析を起こすことなく分散した。

Fig.5.4 に YAG:Ce³⁺ナノ粒子および PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を純水に分散させ、DLS により粒度分布測定を行った結果を示す。YAG:Ce³⁺ナノ粒子の平均粒径は 42.5 nm で標準偏差が 10.5 nm、PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の平均粒径は 45.4 nm で標準偏差が 14.0 nm であり、PAA 被覆による有意な粒径の増大は確認されなかった。仮に、PAA が

粒子表面から放射状に張り出しているとする、分子量 2,000 の PAA の分子長は 7.1 nm であるため[5-38]、DLS で測定される平均粒径は最大 14 nm の有意な増加として測定されるはずである。一方で Pettersson らの研究により、中性付近で PAA を α -アルミナ粒子に吸着させた場合、PAA 分子は分子内のカルボキシル基の静電的斥力により屈曲の少ない状態をとり、粒子表面に対してフラットに吸着することが報告されている[5-39]。これらの結果から、PAA は YAG:Ce³⁺ナノ粒子から張り出すことなく粒子表面に沿うように吸着していると考えられる。

Fig.5.5 にゼータ電位測定の結果を示す。PAA の被覆前後で、YAG:Ce³⁺ナノ粒子のゼータ電位は+43.7 mV から-40.1 mV に変化した。これは、PAA 側鎖のカルボキシル基が電離して COO⁻ となり、YAG:Ce³⁺ナノ粒子表面に吸着したことを示唆する。また、ゼータ電位の絶対値は 40 mV 以上であり、どちらの粒子も静電的斥力により安定に分散させることができる[5-39]。

Fig.5.6 に YAG:Ce³⁺ナノ粒子および PAA 被覆ナノ粒子の FT-IR スペクトルを示す。得られたピークの帰属を Table 5-2 にまとめた。PAA の被覆がない YAG:Ce³⁺ナノ粒子のスペクトル中の No.10 と 12 のピークはそれぞれ COO⁻ の対称、非対称伸縮振動に帰属される。これは出発原料として酢酸塩を用いたために、酢酸イオンが粒子表面の金属イオンに配位していることを示唆する。PAA 被覆後のスペクトルには、1756 cm⁻¹ に新しいピーク No.9 が出現した。これは C=O 伸縮振動に帰属され、導入された PAA の持つカルボキシル基の一部が粒子表面の金属イオンに配位せずに残存していることを示唆する。このようなフリーのカルボキシル基は生体分子とのコンジュゲートに利用できる可能性がある。

Fig.5.7 は PAA 被覆を行った YAG:Ce³⁺ナノ粒子の PL・PLE スペクトルである。PLE スペクトルにおける 450 nm と波長 345 nm に観測される 2 つのピークは、それぞれ Ce³⁺ の 4f(²F_J) 5d(²A_{1g}) および 4f(²F_J) 5d(²B_{1g}) に帰属される。PL スペクトルは波長 530 nm および 570 nm をそれぞれピークにするスペクトルの重なり合いとして観測され、それぞれ 5d(²A_{1g}) 4f(²F_{5/2}) および 5d(²A_{1g}) 4f(²F_{7/2}) に帰属される[5-45]。量子効率既知の市販 (Gd, Y)AG:Ce³⁺粉末を用いて求めた PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の内部蛍光量子効率は 23.3 % であり、PAA 被覆を行う前の YAG:Ce³⁺ナノ粒子の内部蛍光量子効率 22.0 % とほぼ同等であった。

5.3.2 ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子

Fig.5.4(c) に、DLS で測定した純水中のストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の粒度分布を示す。測定されたストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の平均流体力学直径は 52.5 nm、標準偏差が 13.9 nm であった。ストレプトアビジンを添加すると粒径が約 10 nm 増加しており、約 5 nm のストレプトアビジン[5-46]が PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子表面に固定されていることを示唆する。

Fig.5.5(c) にストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子のゼータ電位測定の結果を示す。測定されたゼータ電位は-40.1 mV であった。また、その分布はストレプトアビジンの固定化により先鋭化した。これは粒径が増大することにより粒子のブラウン運動が測定に与え

る影響が低減したためであると考えられる。

Table 5-2 Assignment of FT-IR peaks.

Peak No.	YAG:Ce ³⁺	PAA-YAG:Ce ³⁺	SA-PAA-YAG:Ce ³⁺	Assignment	Ref.
1	3631	3629	3628	v(OH)	40
2	3374	3320	3356	v(OH)	40
3			3102	v(NH)	41
4	2946	2957	2947	} v(CH)	42
5	2880	2884	2875		
6	2370	2365	2366	v ^{as} (CO ₂)	42
7			2109	} combination tone or overtone of δ(NH ₂)	
8			1977		
9		1756		v(C=O)	42
10	1575	1575	1575	v ^{as} (COO)	42, 43
11	1458	1463	1463	δ ^s (CH ₂)	42
12	1418	1422	1423	v ^s (COO)	42, 43
13	1346	1346	1346	v ^{as} (COC)	42
14	1180		1180	δ ^s (CH ₂)	42
15	1059	1055	1070	v(C-O)	42
16	793	793	793	} v(Al-O)	46
17	720	720	728		
18	474	470	478		

Fig.5.6(c)にストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の FT-IR スペクトルを示す。得られたピークの帰属を Table 5-2 にまとめた。PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子で観測された C=O 伸縮振動に帰属されるピーク No.9 が消失し、新たに 3102 cm⁻¹ に水素結合した N-H 伸縮振動に帰属されるピーク No.3 および 2109cm⁻¹ と 1977cm⁻¹ に NH₂ 結合音吸収帯に帰属されるピークが出現した。この結果は、PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子で示唆されたフリーのカルボキシル基がストレプトアビジンとのコンジュゲートに消費され、ストレプトアビジンが粒子表面に固定化されたことを示唆する。

5.3.3 プレートアッセイによる BSA の定量

調製したストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子をプレートアッセイに用いて BSA 濃度の定量を試みた。その結果、Fig.5.8(a)に示すように 6.4 ng/mL から 128 ng/mL の範囲で BSA 濃度と蛍光強度との間で相関が確認され、調製したストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を用いたプレートアッセイにより BSA が定量できることが示された。しかし、ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の代わりに Streptavidin -FITC を用いて同様のアッセイを行った結果と比較すると、Fig.5.8(b)に示すようにストレプトアビジ

ン固定 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を用いた場合は S/N 比が低く、また、BSA 濃度に応じて蛍光強度が変化する濃度範囲は狭い。S/N 比が低い原因として、粒子表面に導入されたストレプトアビジン量がわずかであったために、PAA 鎖による非特異的な吸着が抑制できなかったことが考えられる。また、測定のダイナミックレンジが狭くなった原因として、ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子がかさ高いために、Fig.5.9 に示すように粒子が標識したタンパク質の近傍に別のタンパク質が存在した場合、そのタンパク質への結合を立体的に阻害していることが考えられる。

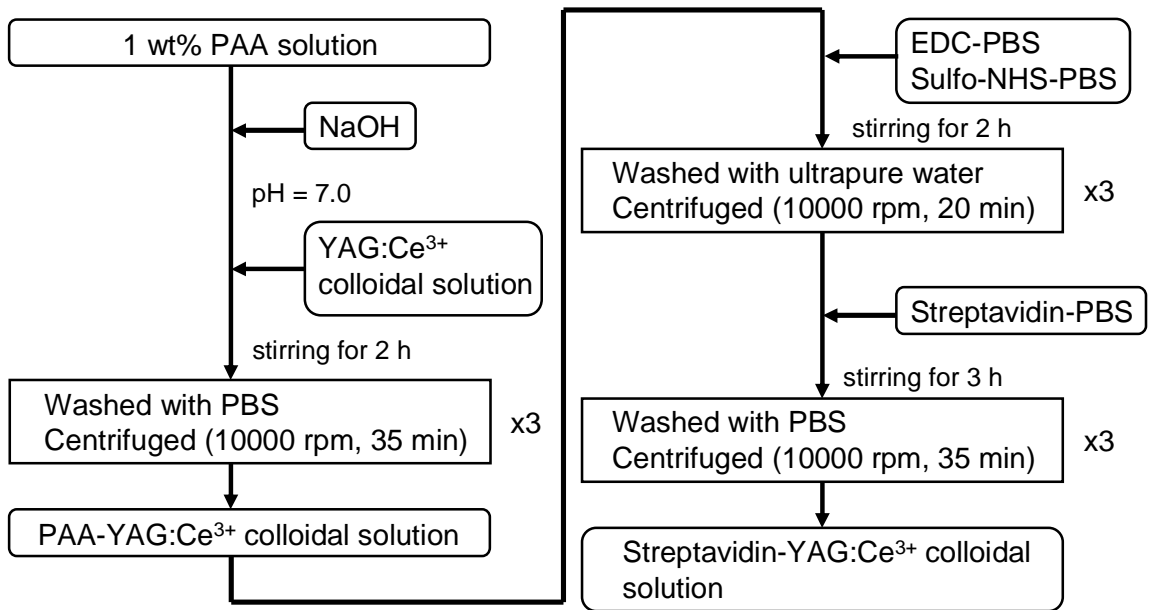


Fig.5.1 Schematic representation of the preparation of streptavidin-immobilized YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

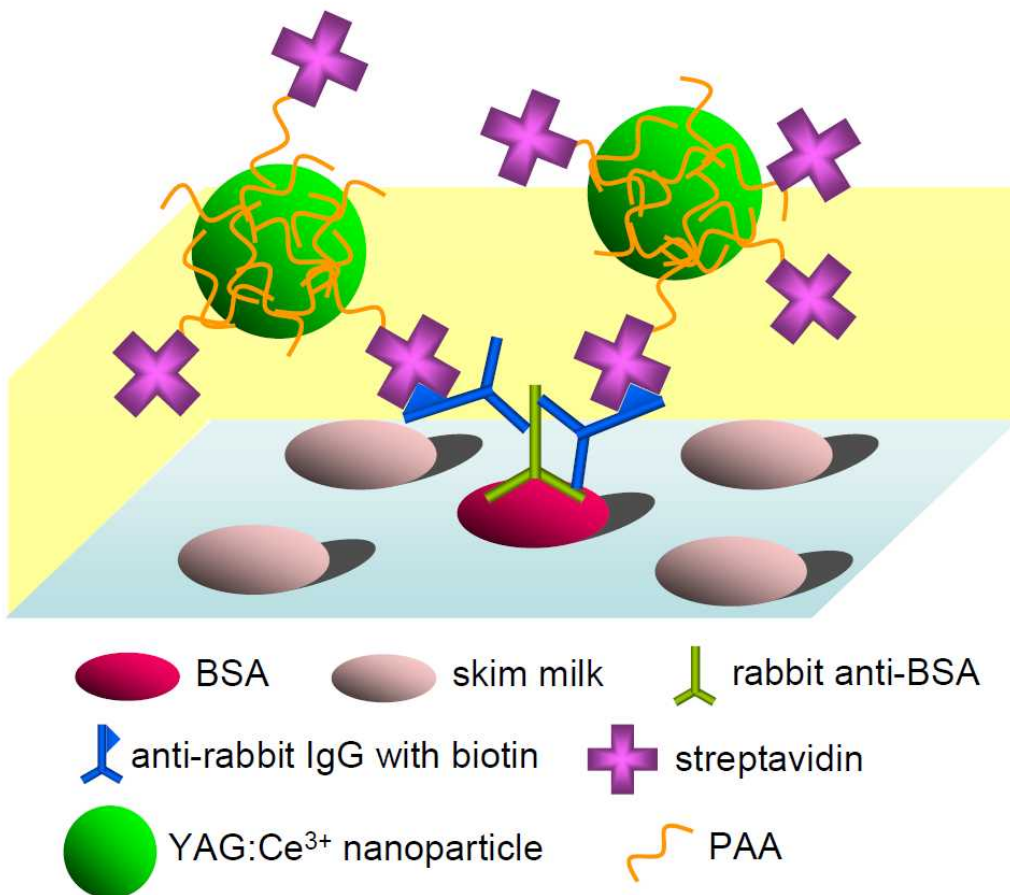


Fig.5.2 Illustration of plate assay for detecting BSA.

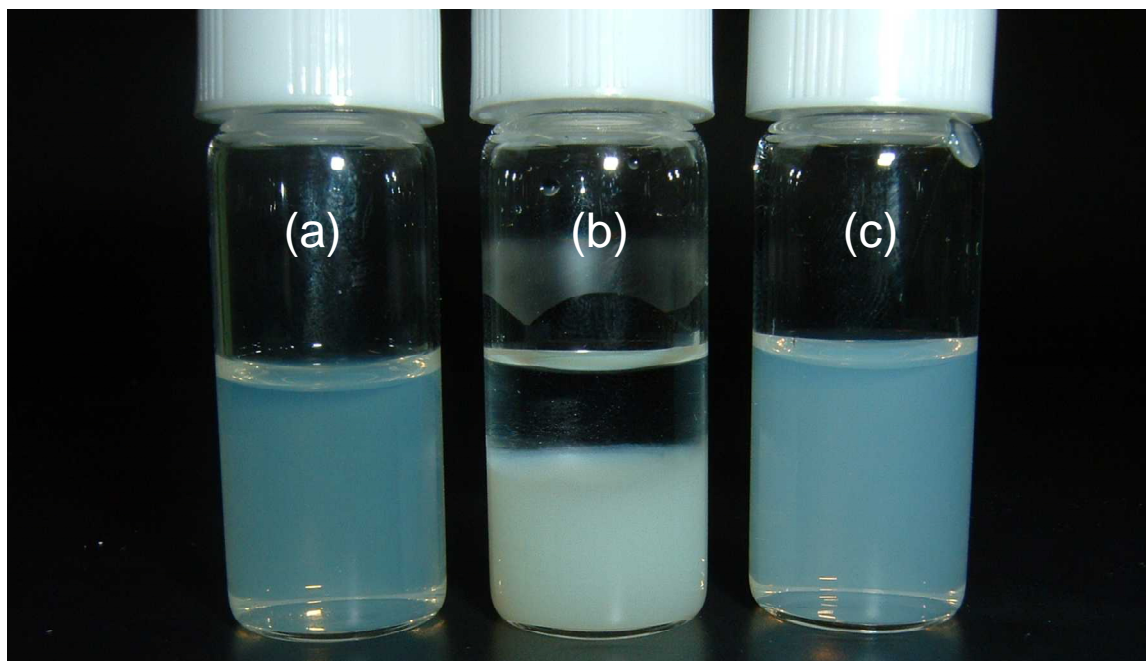


Fig.5.3 Photographs of YAG:Ce³⁺ nanoparticles dispersed in water (a) and PBS (b), and PAA-modified YAG:Ce³⁺ nanoparticles dispersed in PBS (c).

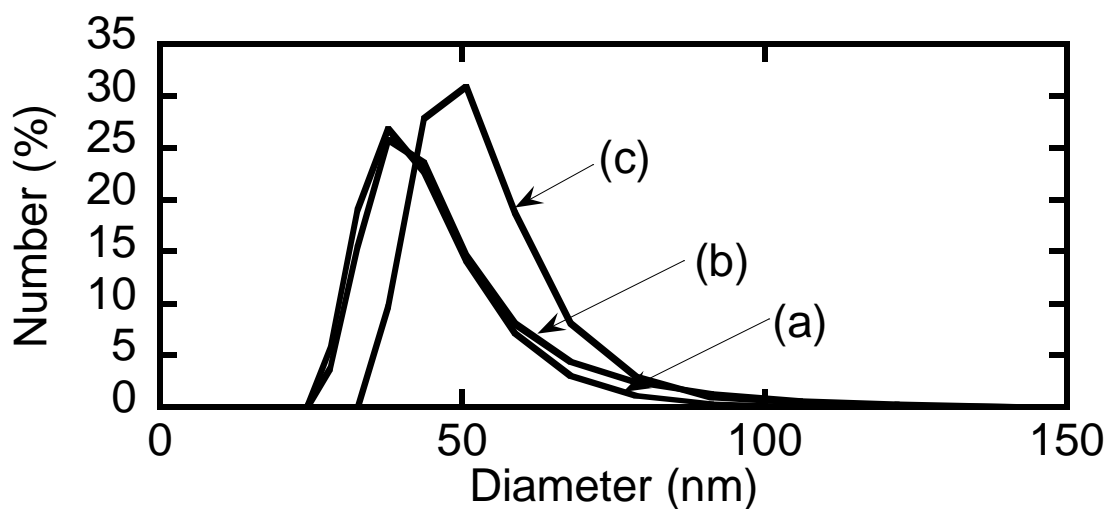


Fig.5.4 Particle size distribution in water measured by DLS. (a) YAG:Ce³⁺ nanoparticles, (b) PAA-modified YAG:Ce³⁺ nanoparticles, (c) streptavidin-immobilized YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

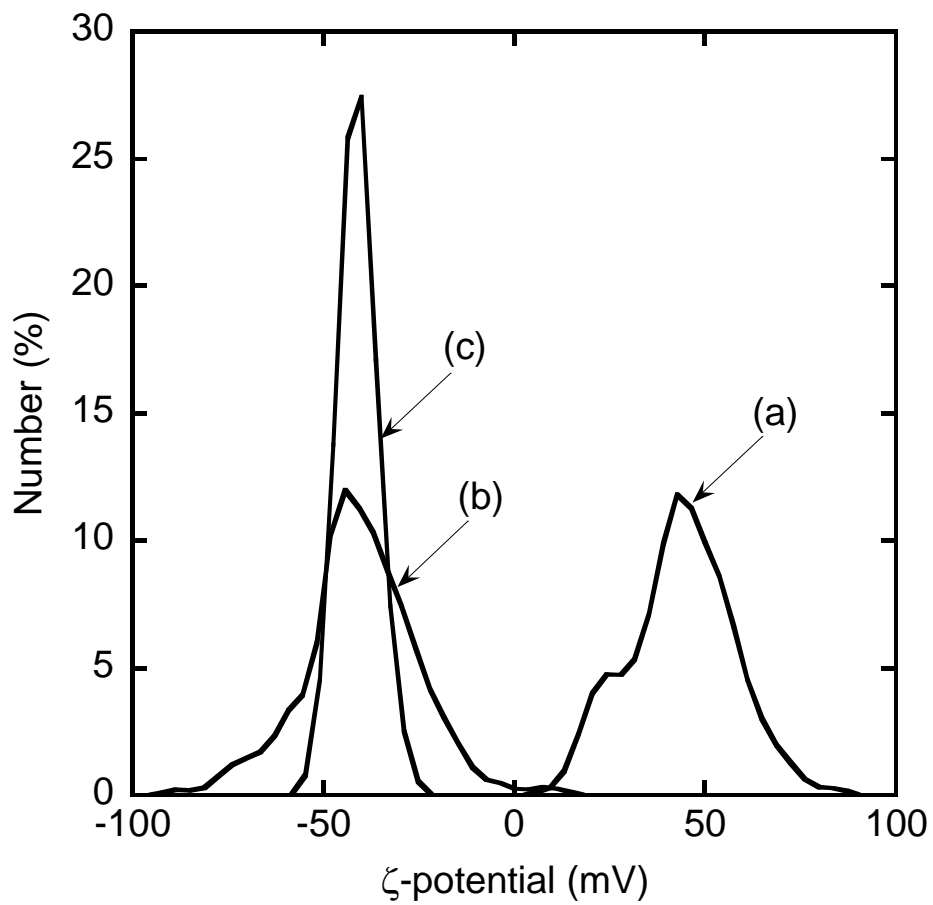


Fig.5.5 ζ -potential distribution of (a) YAG:Ce³⁺ nanoparticles, (b) PAA-modified YAG:Ce³⁺ nanoparticles and (c) streptavidin-immobilized YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

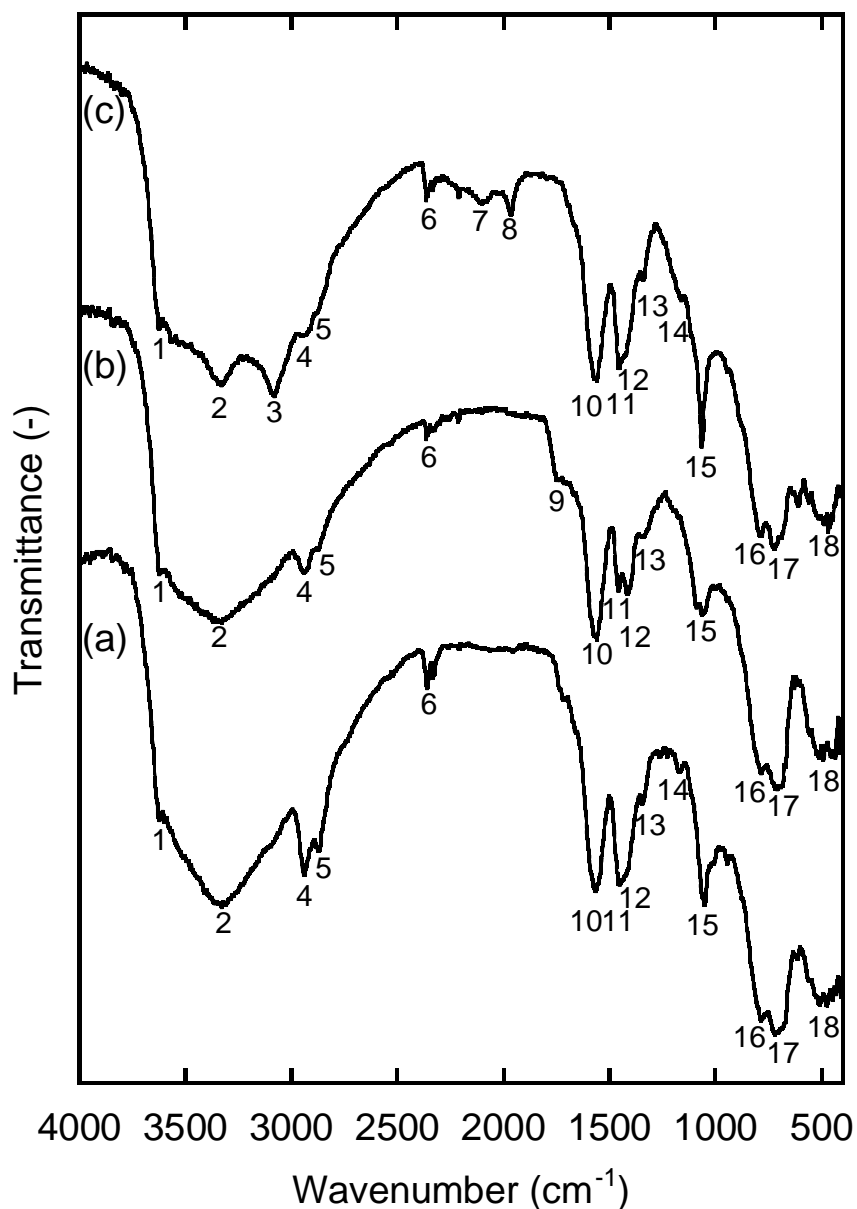


Fig.5.6 FT-IR spectra of (a) YAG:Ce³⁺ nanoparticles, (b) PAA-modified YAG:Ce³⁺ nanoparticles and (c) streptavidin-immobilized YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

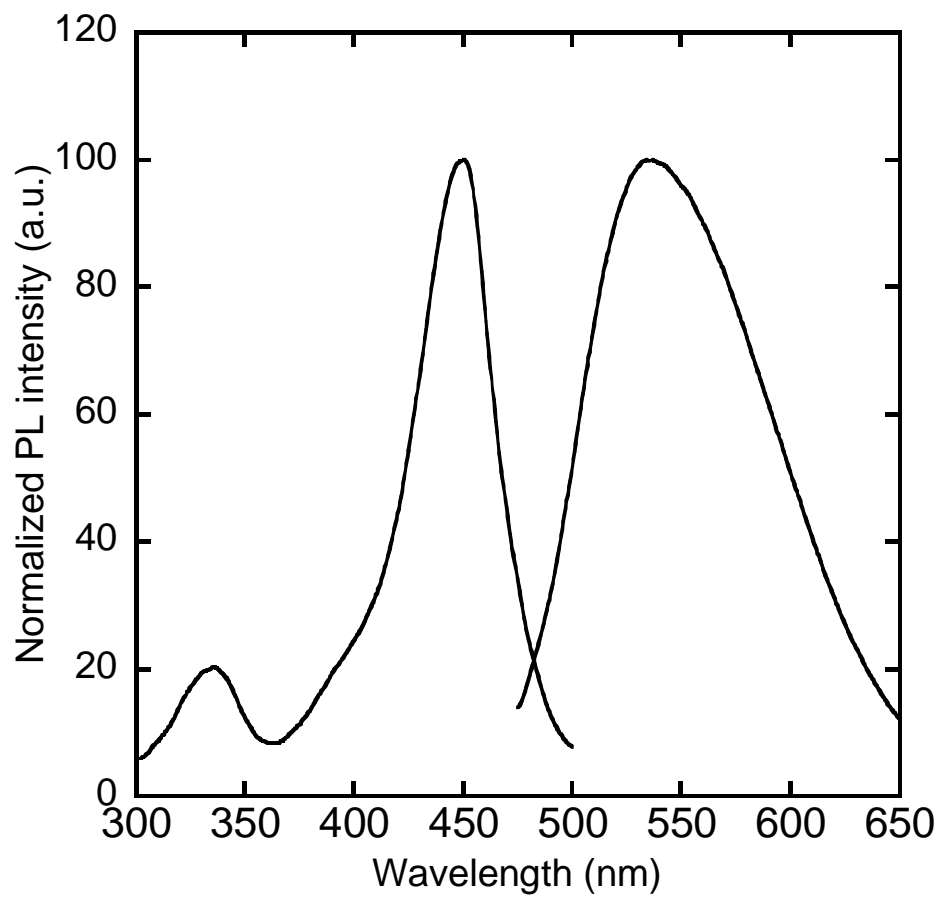


Fig.5.7 PL and PLE spectra of PAA-modified YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

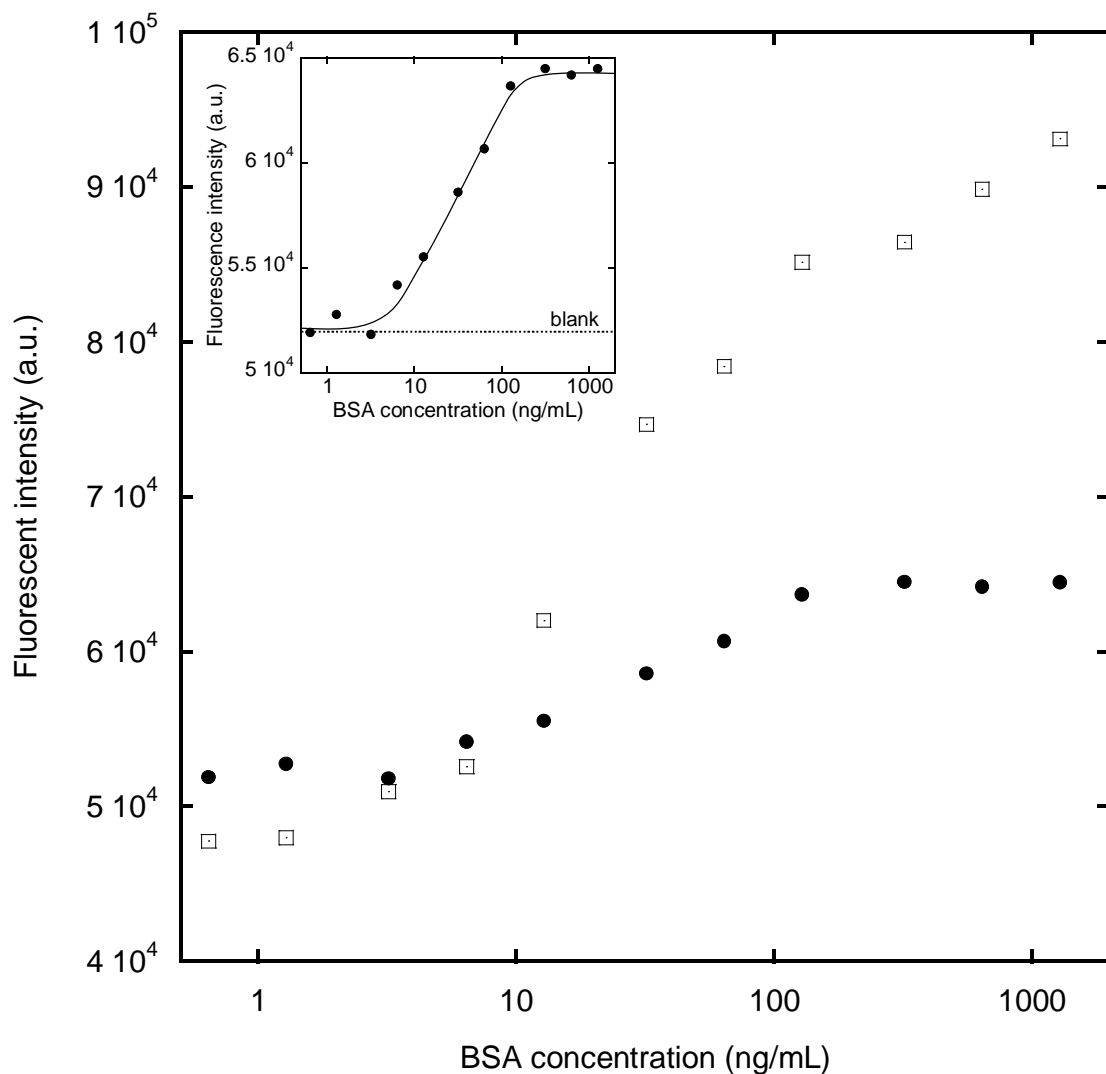


Fig.5.8 Change in the integrated fluorescence intensity for the plate assay with the BSA concentration using (●) streptavidin-YAG:Ce³⁺ nanoparticles and (□) streptavidin-FITC. Inset: Enlarged plot of the result using streptavidin-YAG:Ce³⁺ nanoparticles.

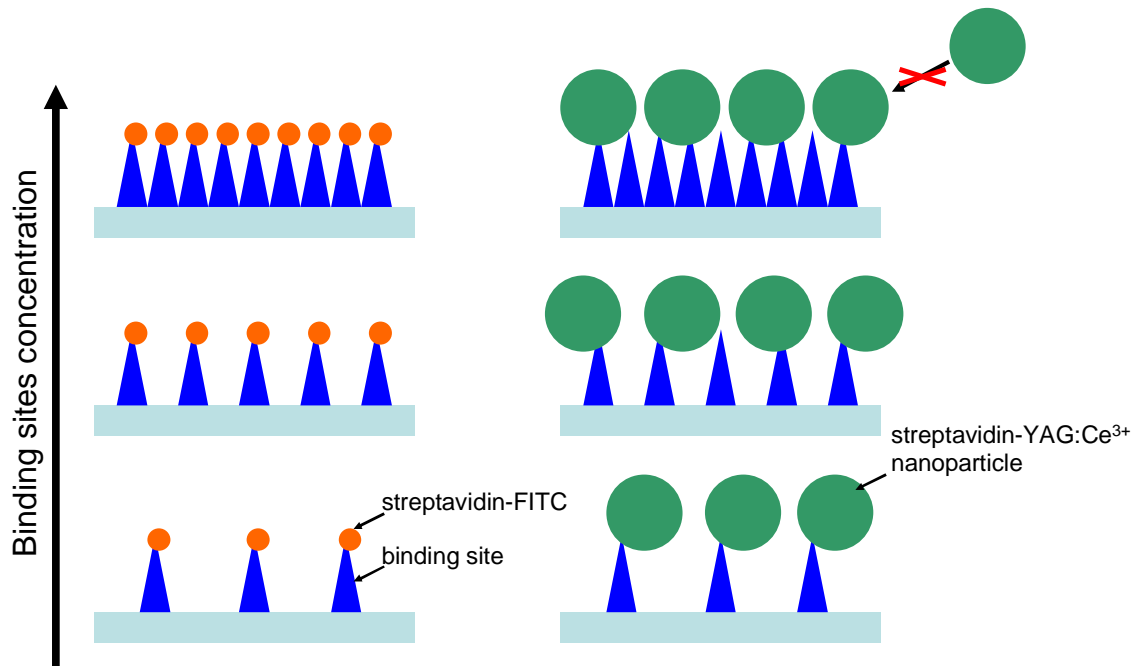


Fig.5.9 Illustration of binding inhibition of streptavidin-YAG:Ce³⁺ nanoparticles with their steric hindrance in plate assay.

5.4 結論

YAG:Ce³⁺ ナノ粒子に PAA を静電的に吸着させ PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を調製した。調製した PAA 被覆 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は PBS 中で安定に分散した。また、PAA の持つ側鎖のカルボキシル基はストレプトアビジンの固定に利用することができた。ストレプトアビジン固定 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を用いてプレートアッセイを行い、BSA を 6.4 ng/mL の濃度まで定量することができた。

第5章の参考文献

- [5-1] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8706-8715 (1993).
- [5-2] A. P. Alivisatos, "Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots", *Science*, **271**, 933-937 (1996).
- [5-3] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M. G. Bawendi, "(CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites" *J. Phys. Chem. B*, **101**, 9463-9475 (1997).
- [5-4] W. C. W. Chen, S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science*, **281**, 2016-2018 (1998).
- [5-5] B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou, J. Cheng, "Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection", *J. Immunol. Methods*, **249**, 85-89 (2001).
- [5-6] S. Ding, M. Jones, M. P. Tucker, J. M. Nedeljkovic, J. Wall, M. N. Simon, G. Rumbles, M. E. Himmel, "Quantum dot molecules assembled with genetically engineered proteins", *Nano Lett.*, **3**, 1581-1585 (2003).
- [5-7] J. A. Kloepfer, R. E. Mielke, J. L. Nadeau, M. S. Wong, G. Stucky, K. H. Nealson, "Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels", *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4205-4213 (2003).
- [5-8] A. Sukhanove, J. Devy, L. Venteo, H. Kaplan, M. Artemyev, V. Oleinikov, J. H. M. Cohen, I. Nabiev, D. Klinov, "Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabelling of membrane proteins and cells", *Anal. Biochem.*, **324**, 60-67 (2004).
- [5-9] W. J. Jin, T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, "Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions", *Chem. Comm.*, 833-835 (2005).
- [5-10] C. Huang, H. Liu, C. Tsao, L. Yin, S. Chiu, T. Chen, "Plate-based biochemical assay using quantum dots as a fluorescent labeling agent", *Sens. Actuators B Chem.*, **108**, 713-720 (2005).
- [5-11] A. Shiohara, N. Manabe, K. Omata, K. Yamamoto, "Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characteristics", *J. Chem. Eng. Jpn.*, **39**, 52-56 (2006).
- [5-12] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sunder, F. V. Mikulec, M. G. Basendi, "Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12142-12150 (2000).
- [5-13] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, T. M. Green, G. P. Anderson, V. C. Sunder, M. G. Basendi, "Bioconjugation of highly luminescent colloidal CdSe-ZnS quantum dots with an engineered two-domain recombinant protein", *Phys. Status.*

Solidi. B, **224**, 277-283 (2001).

[5-14] J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, “Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates”, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 47-51 (2003).

[5-15] E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, “Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents”, *Anal. Chem.*, **76**, 684-688 (2004).

[5-16] S. J. Rosenthal, I. Tomlinson, E. M. Adkins, S. Schroeter, S. Adams, L. Swafford, J. McBride, Y. Wang, L. J. Defelice, R. D. Blakely, “Targeting cell surface receptors with ligand-conjugated nanocrystals”, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4586-4594 (2002).

[5-17] R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, V. M. Rotello, “Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds”, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 739-743 (2004).

[5-18] W. Guo, J. J. Li, Y. A. Wang, X. Peng, “Conjugation chemistry and bioapplications of semiconductor box nanocrystals prepared via dendrimer bridging”, *Chem. Mater.*, **15**, 3125-3133 (2003).

[5-19] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. D. Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, “Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping”, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 93-97 (2004).

[5-20] H. Fan, E. W. C. Scullin, J. Gabaldon, D. Tallant, S. Bunge, T. Boyle, M. C. Wilson, C. J. Brinker, “Surfactant-assisted synthesis of water-soluble biocompatible semiconductor quantum dot micelles”, *Nano Lett.*, **5**, 645-648 (2005).

[5-21] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, “In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles”, *Science*, **298**, 1759-1762 (2002).

[5-22] N. Travert-Branger, F. Dubois, O. Carion, G. Carrot, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris, C. Mioskowski, “Oligomeric PEG-phospholipids for solubilization and stabilization fluorescent nanocrystals in water”, *Langmuir*, **24**, 3016-3019 (2004).

[5-23] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadsay, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, “Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots”, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 41-46 (2003).

[5-24] M. C. Mancini, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, S. Nie, “Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo”, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 19836-19837 (2008).

[5-25] F. Boulmedais, P. Bauchat, M. J. Brienne, I. Arnal, F. Artzner, T. Gacoin, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, “Water-soluble pegylated quantum dots: from a composite hexagonal phase to isolated micelles”, *Langmuir*, **22**, 9797-9803 (2006).

[5-26] H. Yusuf, W. Kim, D. H. Lee, Y. Guo, M. G. Moffitt, “Size control of mesoscale

- aqueous assemblies of quantum dots and block copolymers”, *Langmuir*, **23**, 868-878 (2007).
- [5-27] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, “Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels”, *Science*, **25**, 2013-2016 (1998).
- [5-28] T. Selvan, T. T. Tan, J. Y. Ying, “Robust, non-cytotoxic, silica-coated CdSe quantum dots with efficient photoluminescence”, *Adv. Mater.*, **17**, 1620-1625 (2005).
- [5-29] A. Wolcott, D. Gerion, M. Visconte, J. Sun, A. Schwartzberg, S. Chen, J. Z. Zhang, “Silica-coated CdSe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins”, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5779-5789 (2006).
- [5-30] C. Graf, S. Dembski, A. Hofmann, E. Rühl, “A general method for controlled embedding of nanoparticles in silica colloids”, *Langmuir*, **22**, 5604-5610 (2006).
- [5-31] Z. Zhelev, H. Ohba, R. Bakalova, “Single quantum dot-micelles coated with silica shell as potentially non-cytotoxic fluorescent cell tracers”, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6324-6325 (2006).
- [5-32] W. Lin, H. Liu, M. Z. Yates, H. Du, F. Jiang, L. Guo, T. D. Krauss, “Fluorescent quantum dot-polymer nanocomposite particles by emulsification/solvent evaporation”, *Chem. Mater.*, **19**, 2930-2936 (2007).
- [5-33] G. Wang, E. Song, H. Xie, Z. Zhang, Z. Tian, C. Zuo, D. Pang, D. Wu, Y. Shi, “Biofunctionalization of fluorescent-magnetic-bifunctional nanospheres and their applications”, *Chem. Comm.*, 4276-4278 (2005).
- [5-34] X. Yang, Y. Zhang, “Encapsulation of quantum nanodots in polystyrene and silica micro-/nanoparticles” *Langmuir*, **20**, 6071-6073 (2004).
- [5-35] W. Sheng, S. Kim, J. Lee, S. Kim, K. Jensen, M. G. Bawendi, “In-situ encapsulation of quantum dots into polymer microspheres”, *Langmuir*, **22**, 3782-3790 (2006).
- [5-36] Y. Chen, T. Ji, Z. Rosenzweig, “Synthesis of glyconanospheres containing luminescent CdSe-ZnS quantum dots”, *Nano Lett.*, **3**, 581-584 (2003).
- [5-37] “14303 の化学商品”, *pp.347*, 化学工業日報社 (2003).
- [5-38] 芝田隼次, 藤井勝也, 蓬萊健一, 村山憲弘, 山本秀樹, “ α -Al₂O₃ 微粒子の凝集・分散挙動におよぼすポリアクリル酸の効果”, *化学工学論文集*, **29**, 753-759 (2003).
- [5-39] A. Pettersson, G. Marino, A. Pursiheimo, J. B. Rosenholm, “Electrosteric stabilization of Al₂O₃, ZrO₂, and 3Y-ZrO₂ suspensions: effect of dissociation and type of polyelectrolyte”, *J. Coll. Interface Sci.*, **228**, 73-81 (2000).
- [5-40] J. Marchal, T. John, R. Baranwal, T. Hinklin, R. M. Laine, “Yttrium aluminum garnet nanopowders produced by liquid-feed flame spray pyrolysis (LF-FSP) of metalloorganic precursors”, *Chem. Mater.*, **16**, 822-831 (2004).
- [5-41] K. Uvdal, P. Bodo, A. His, B. Liedberg, W. R. Salaneck, “X-ray photoelectron and infrared spectroscopy of glycine adsorbed upon copper”, *J. Coll. Interface. Sci.*, **140**, 207-216 (1990).

- [5-42] D. Santhiya, S. Subramanian, K. A. Natarajan, S. G. Malghan, “Surface chemical studies on the competitive adsorption of poly(acrylic acid) and poly(vinyl alcohol) onto alumina”, *J. Coll. Interface Sci.*, **216**, 143-153 (1999).
- [5-43] J. Simon-Kutscher, A. Gericke, H. Hühnerfuss, “Effect of bivalent Ba, Cu, Ni, and Zn cations on the structure of octadecanoic acid monolayers at the air-water interface as determined by external infrared reflection-absorption spectroscopy”, *Langmuir*, **12**, 1027-1034 (1996).
- [5-44] O. Yamaguchi, K. Takeoka, K. Hirota, H. Takano, A. Hayashida, “Formation of alkoxy-derived yttrium aluminium oxides”, *J. Mater. Sci.*, **27**, 1261-1264 (1992).
- [5-45] C. Lu, H. Hong, R. Jagannathan, “Sol-gel synthesis and photoluminescent properties of cerium-ion doped yttrium aluminium garnet powders”, *J. Mater. Chem.*, **12**, 2525-2530 (2002).
- [5-46] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, “Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics”, *Science*, **307**, 538-544 (2005).

第6章 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を複合化したPMMAビーズの作製とフローサイトメトリーへの応用

6.1 緒言

6.1.1 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーとは、細胞あるいは粒子を流体中に分散させ、細管を通過させながら個々の細胞あるいは粒子を光学的に分析する解析手法である。測定した細胞あるいは粒子をあらかじめ設定した条件に従って分取できる装置を特にソーターとよび、希少な細胞を対象とした研究における強力なツールとなっている。例えば、骨髄のような多種多様の細胞集団から目的の細胞だけを分離する際、従来は細胞の大きさに依存した密度勾配遠心法や、磁性粒子との抗原抗体反応を利用した磁気的な分離法が用いられていた。フローサイトメトリーはこれらの分離法に比べ所要時間が短く、多種の細胞を同時に生きたまま分取できる点で優れている。また、フローサイトメトリーは、細胞表面抗原の同定、細胞周期の解析、DNA 異常の解析など、分子生物学や再生医学の分野で用いられるだけでなく、例えば海洋生物学におけるプランクトンの同定など多方面に用いられている[6-1]。

フローサイトメトリーによって得られる情報は、1)前方散乱強度(試料の大きさに依存する)、2)側方散乱強度(試料密度や形態に依存する)、3)蛍光の有無や強度であり、測定の対象となるものは、血球などの細胞、細菌などの微生物、ビーズのような微粒子である。

6.1.2 蛍光ビーズのフローサイトメトリーへの応用

フローサイトメトリーは測定に散乱光を利用するため、測定試料は通常マイクロサイズである。そのため、分子のようなより微小な試料を測定対象とする場合には、蛍光ビーズを用いた間接的な解析が行われる[6-2, 3]。例えば、一塩基多型(SNPs)などのゲノム解析では、大きさ、発光色、発光強度についてフローサイトメトリー解析上で区別可能な複数種の蛍光ビーズの表面にそれぞれ別々の配列を持つDNAを担持させ、未知の塩基配列を持つDNAとのハイブリダイゼーションの有無をフローサイトメトリーで観察することで塩基配列を推定することができる。同様の解析は、電気泳動法やDNAチップを用いた解析によっても行うことができるが、操作の簡便性や解析速度ではフローサイトメトリーが圧倒的である。また、フローサイトメトリーを用いて溶液中の物質濃度を定量することもできる[6-4]。フローサイトメトリーを利用した定量法は複数の物質を同時に測定できるため、試料量が少ない場合にも適応できる。

フローサイトメトリーで区別可能なビーズの種類は、そのまま一度に分析できる検体の種類となる。ビーズの種類を増加させることで一度に解析できる検体が増加するため、測定時間の短縮を図ることができる。

6.1.3 蛍光ビーズの作製法

蛍光ビーズは、シリカやポリマーなどのホスト材料に有機色素や量子ドットなどの蛍光物質を複合化することで得ることができる。その作製方法は次の3つに大別される。

1. 蛍光物質共存下でビーズを作製する
2. ビーズを作製したのちに蛍光物質を複合化する
3. ビーズをテンプレートとして蛍光物質を合成する

1.の方法は広く用いられている合成法であり、シリカ[6-5~11]やポリビニルアルコール[6-12, 13]、ポリスチレン[6-14~16]などがマトリクスとして利用される。しかしながら、この方法は蛍光物質が共存しているためビーズ径の制御が難しく、また、重合反応などの比較的反応性の高い環境下に蛍光物質が晒されるため、その劣化が懸念される。さらに、蛍光物質とマトリクスとの親和性が低い場合、マトリクス中の蛍光物質の含有率が低下し、ビーズ作製後に漏出することもある。例えば Bele らは、シリカビーズ作製時に有機色素を取り込む場合はシラノール基が負に帯電しているため、ローダミン 6G などのカチオン性色素は取り込まれやすく、逆に FITC などのアニオン性色素は取り込まれにくいことを指摘している[6-7]。そのため、マトリクスと蛍光物質との親和性の向上を目的として様々な方法が採られている。Correa-Duarte ら[6-5]や Rogach ら[6-6]は、量子ドットに3-メルカプトプロピルトリメトキシシランで前処理を行い、シリカに対する親和性の向上を図っている。また Yabuuchi らは、重合可能な色素を合成し、重合中に色素とマトリクスとを共有結合させることでビーズ作製後の色素の漏出を防止している[6-12]。近年では、ポリマレイン酸オクタデセンと量子ドットの自己組織化を利用した方法[6-17]や、CCFF 法と呼ばれる量子ドットとポリマーの混合液の滴下による工業的な合成法[6-18]など新しい方法が提案されている。

2.は、ビーズをあらかじめ作製したのちに蛍光物質との複合化を行う方法である。1.の方法とは異なりビーズのみを別に合成できるため、ビーズの粒径制御が容易である。また、ビーズと蛍光物質との複合化も比較的マイルドな条件で行うことができるため、蛍光物質の劣化を低減させることができる。しかしながら、この方法はビーズ内部まで蛍光物質を浸透させることが難しく、ビーズあたりの蛍光物質の含有量は低い。また、ビーズ表面で露出している蛍光物質はマトリクスによる保護効果が薄いため、外部の刺激により変化を起こす可能性がある。例えば、SH 基を導入したポリスチレンビーズに量子ドットを吸着させて作製した蛍光ビーズは、励起光の連続照射により量子ドットの粒子成長が誘発され、吸収端がレッドシフトすることが報告されている[6-19]。Hirai らは、同じ方法で作製した蛍光ビーズにポリチオウレタンの被覆を行って同様の実験を行い、このような粒子の溶解が起こらないことを確認した[6-20]。

2.の方法は、さらに3つの方法に分類される。その1つは交互吸着法[6-21~26]である。交互吸着法は1991年に Decher らによって提案された方法[6-27, 28]で、異符号の電荷を持つ物質を交互に積層させる合成法である。例えば Yang らは、負に帯電したポリスチレンビーズに、正に帯電した FITC 修飾ポリアリルアミン、負に帯電したポリスチレンスル

ホン酸を順次吸着させることで蛍光ビーズを作製した[6-21]。また、Battersby らは、有機色素を含有したシリカナノ粒子を作製し、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロリドとポリアクリル酸を利用した交互吸着によりポリスチレンビーズとの複合化を行った[6-25, 26]。

2 つ目は、有機溶媒で膨潤させたビーズに蛍光物質を取り込む方法である。ポリスチレンビーズを、クロロホルム、プロパノール、ブタノールの混合溶媒中で膨潤させるのが一般的である[6-29~31]。一方で Möhwald らは、環境応答性のポリマーを用いて pH や温度の変化によりビーズの密度を制御し、量子ドットを取り込んだ[6-32, 33]。

3 つ目は、多孔質ビーズの利用である。Nie らを中心にいくつかの報告があり、多孔質シリカビーズ[6-34, 35]や多孔質ポリスチレンビーズ[6-36~38]に量子ドットを含浸させることで蛍光ビーズを作製している。Zhang らはメタクリル酸共存下でポリスチレンビーズを重合し、ビーズ表面に生体分子とコンジュゲートするための COOH 基を導入したのちに量子ドットとの複合化を行った[6-38]。

3.の方法は、合成される蛍光物質の制御が難しく、ビーズあたりに導入できる蛍光物質の量も少ないため、報告も数例である。Dhas らは、シリカビーズの水分散液に超音波を照射しながら酢酸亜鉛とチオアセトアミドを順次投入し、シリカビーズ表面に粒径約 20 nm の ZnS ナノ粒子クラスターを形成した[6-39]。Zhang はカルボキシル基を官能基として有するマイクロゲルに Cd^{2+} を配位させたのちに硫化ナトリウム水溶液を加えて、マイクロゲル中に粒径 3-5 nm の CdS ナノ粒子を形成した[6-40]。

6.1.4 研究目的

本章では、第 3 章で得られた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) ビーズに交互吸着法を用いて吸着させ、フローサイトメトリー用の蛍光ビーズを作製した。吸着操作中のゼータ電位の経時変化や吸着層毎のゼータ電位を測定し、交互吸着の様子を確認した。また、吸着回数の違いによる YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の含有量の変化や蛍光強度の変化を定性的あるいは定量的に評価し、一連のビーズ群がフローサイトメトリー解析において互いに区別可能であるかどうかを実際に測定した。

最後に、作製した複合ビーズに生体分子をコンジュゲートしてフローサイトメトリー解析のモデル実験を行い、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を複合化した PMMA ビーズがフローサイトメトリーに応用可能であるかどうかを検討した。

6.2 実験方法

6.2.1 試薬

第6章で用いた試薬の一覧を [Table 6-1](#) にまとめた。

Table 6-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) hydrochloride (EDC)	-	191.70	Pierce
3-aminopropyltrimethoxysilane	-	131.25	Chisso Chemical Division
Albumin bovine serum (BSA)	>99%	-	Sigma
Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG	-	-	Molecular probe
Aluminium isopropoxide	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Avidin immobilized agarose gel beads	-	-	Sigma
Avidin immobilized polystyrene-copolymer beads	-	-	Micromod Partikeltechnologie
Cerium(III) acetate monohydrate	>99.99%	335.26	Kanto Kagaku
Sulfosuccinimidyl-6(biotinamido) hexanoate biotiny agent	-	556.59	Pierce
Poly(acrylic acid) (PAA)	-	2000	Alrich
Poly(allylamine hydrochloride) (PAH)	-	~15,000	Aldrich
Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS)	-	~70,000	Aldrich
Rabbit anti-bovine serum albumin (anti-BSA)	-	-	Sigma
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99%	338.10	Kanto Kagaku

6.2.2 試料の合成方法

6.2.2.1 YAG:Ce³⁺ナノ粒子の合成

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4水和物 7.425 mmol (2.51 g)、酢酸セリウム(III)1水和物 0.0075 mmol (0.0251 g)、およびアルミニウムトリイソプロポキシド 12.50 mmol (2.55 g)を加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液を得た。分散液は 1 週間静置して粗大粒子を沈降させ、その上澄みを以降の実験に用いた。

6.2.2.2 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を複合化したPMMA ビーズの作製

6.2.2.2-4 までの概念図を [Fig.6.1](#) に、交互吸着のスキームを [Fig.6.2](#) に示す。エタノールに分散させた PMMA ビーズ(積水化学, XX-01ET, -02ET or -03ET; bead 1)に 6.2.2.1 で

得た YAG:Ce³⁺ ナノ粒子コロイドを加え、スターラーで 1h 攪拌した。遠心分離(2000 rpm, 2-3 min) で PMMA ビーズを沈降させ、上澄みに残存した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子をデカンテーションにより除去したのちに、超純水を加えて再分散した。この洗浄操作を計 3 回行い、全量が 50 mL になるように超純水を加え、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合ビーズ (bead 2) の懸濁液を得た。

このようにして得た bead 2 の懸濁液に 1 mg/mL PSS-0.5 M NaCl 水溶液 25 mL を加え、スターラーで 20 min 攪拌した。遠心分離 (2000 rpm, 2-3 min) でビーズを沈降させ、上澄みに残存した PSS をデカンテーションにより除去したのちに、超純水を加えて再分散した。この洗浄操作を計 3 回行い、全量が 25 mL になるように超純水を加えた (bead 3)。

以上の操作を繰り返し、PMMA/YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合ビーズ (PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)_n) を得た。ここで n は被覆を行った回数を表す。

6.2.2.3 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合ビーズへの BSA の固定

6.2.2.3-4 のスキームを Fig.6.3 に示す。bead 3 に対し、PSS を被覆したときと同様の手順で 1 mg/mL PAH-0.5 M NaCl 水溶液を用いて PAH を (bead 4) 続いて 1 mg/mL PAA-0.5 M NaCl 水溶液を用いて PAA をそれぞれ吸着させ (bead 5) PBS に再分散した。

この懸濁液 0.5 mL に、1.3 mg/mL の EDC-PBS 溶液 50 μL と 5 mg/mL の BSA-PBS 溶液を 0.1 mL 加え、1.5 h 攪拌した。6.2.2.2 と同様に、遠心分離と PBS による洗浄を 3 回繰り返し行って未反応物を取り除き、全量が 0.5 mL になるように PBS を加えて再分散した (bead 6)。

6.2.2.4 BSA 固定 YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合ビーズの色素による標識

BSA が固定化された bead 6 の懸濁液 0.5 mL に PBS で 100 倍に希釈した rabbit anti-BSA を 0.1 mL 加え、1.5 h 反応させた。その後、6.2.2.2 と同様に、遠心分離と PBS による洗浄を 3 回繰り返し行って未反応物を取り除き、全量が 0.5 mL になるように PBS を加えて再分散した (bead 7)。これに、PBS で 100 倍希釈した Alexa 647 修飾 goat anti-rabbit IgG を 1 mL 加えて 1.5h 反応させ、bead 7 に固定化された rabbit IgG を蛍光標識した。その後、6.2.2.2 と同様に、遠心分離と PBS による洗浄を 3 回繰り返し行って未反応物を取り除き、全量が 1 mL になるように PBS を加えて再分散した (bead 8)。

6.2.3 試料の評価方法

第 2 章で述べた評価のうち、FE-SEM、ゼータ電位、TG-DTA、蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーによる評価を行った。また蛍光顕微鏡(Nicon, Eclipse, E600)による観察は Table 6-2 に示すフィルタ条件で行った。

Table 6-2 Condition of filter block set.

	Excitation wavelength	Dichroic wavelength	Emission wavelength
Filter block set 1	430 - 440 nm	505 nm	515 -555 nm
Filter block set 2	605 -655nm	650 nm	667.5 – 722.5 nm

6.3 結果と考察

6.3.1 ゼータ電位測定による反応時間の最適化

Fig.6.4 に交互吸着操作中のビーズのゼータ電位の経時変化を示す。Fig.6.4(a)は未修飾ビーズに対して YAG:Ce³⁺ナノ粒子を吸着させたビーズのゼータ電位の経時変化であるが、吸着開始から約 40 min 後にビーズのゼータ電位は約+50 mV に到達して飽和した。さらに PSS を吸着させた際には約 20 min 後にビーズのゼータ電位は約-50 mV に到達して飽和した。以降、YAG:Ce³⁺ナノ粒子および PSS の吸着操作を行うと、吸着開始から約 20 min でゼータ電位は飽和した。

Fig.6.5 に交互吸着回数に対する電位の変化を示す。正に帯電した YAG:Ce³⁺ナノ粒子および負に帯電した PSS を吸着させることにより、ゼータ電位は順次符号が反転した。また飽和吸着したときのゼータ電位の絶対値は 30 mV 以上であり、ビーズ同士の凝集が抑制されていると考えられる。

6.3.2 FE-SEM および蛍光顕微鏡による複合ビーズの観察

Fig.6.6 に調製した複合ビーズの FE-SEM 像を示す。未修飾ビーズの表面は、Fig.6.6(a), (b)に示すように平滑であった。YAG:Ce³⁺ナノ粒子と PSS の吸着を行った複合ビーズでは、Fig.6.6(c), (d)に示すように、YAG:Ce³⁺ナノ粒子がビーズ表面に吸着している様子が観察された。YAG:Ce³⁺ナノ粒子と PSS を 2 層吸着させたビーズでは、Fig.6.6(e), (f)に示すように、1 層だけ吸着させたときよりも多くの YAG:Ce³⁺ナノ粒子がビーズ表面に吸着している様子が観察された。

Fig.6.7 に調製した複合ビーズの蛍光顕微鏡観察結果を示す。未修飾のビーズは蛍光を発しなかったが、YAG:Ce³⁺ナノ粒子との複合化を行ったビーズは青色光の照射により緑色の蛍光が確認された。また、YAG:Ce³⁺ナノ粒子を 2 回吸着させたビーズ (Fig.6.7(c)) は、1 回のみ吸着させたビーズ (Fig.6.7(b)) よりも強い蛍光を発した。これは、YAG:Ce³⁺ナノ粒子の吸着量の増大によるものと考えられ、FE-SEM で観察された結果と対応する。

6.3.3 TG-DTA および蛍光プレートリーダーによる吸着量の定量的な評価

Fig.6.8 に複合ビーズの TG プロファイルを示す。50°C での質量減少は複合ビーズに含まれていた水の蒸発によるものである。250 - 400 °C にかけての大きな質量減少はビーズの熱分解および燃焼によるものである。この反応は 600 °C までに終了し、残渣の重量は YAG:Ce³⁺ナノ粒子の重量である。これより YAG:Ce³⁺ナノ粒子と PSS を 1 回吸着したビーズと 2 回吸着したビーズについて単位ビーズ重量あたりの残渣重量を算出したところ、それぞれ 0.54, 2.2 wt% であり、後者は前者の約 4 倍多くの YAG:Ce³⁺ナノ粒子が吸着してい

ることがわかった。

複合ビーズ分散液のビーズ濃度を細胞計数板を用いて 1×10^6 個/mL に調整し、その発光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。1 回吸着したビーズと 2 回吸着したビーズの蛍光強度はそれぞれ、 $10,500 \pm 1,600$ と $53,000 \pm 4,500$ であり、後者は前者の約 5 倍高かった。これは、TG から算出した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の吸着量の結果にほぼ対応する。

6.3.4 フローサイトメトリー解析

直径が 10 および 15 μm のビーズを元にそれぞれ複合ビーズを調製し、それら全てを混合した。この混合懸濁液をフローサイトメトリーで測定した。前方散乱強度と蛍光強度について得られたデータをプロットすると Fig.6.9(a) に示すように、6 つの識別可能なドット群が得られた。前方散乱強度は粒径に依存するため、Fig.6.9(a) 中の region 1 は 10 μm ビーズ、region 2 は 15 μm ビーズにそれぞれ対応していると考えられる。さらに region 1 に着目すると、蛍光強度について 3 つに識別できるドット群が得られている。これは未修飾ビーズ、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を 1 層吸着させたビーズおよび 2 層吸着させたビーズにそれぞれ対応する。ドットプロットが縦軸に対して平行であることから、交互吸着操作による粒径の増大は、フローサイトメトリーにおいて無視できることがわかる。さらに region 1 のドットプロットについて、蛍光強度のヒストグラムを作成し Fig.6.9(b) に示す。ピーク 1, 2 および 3 はそれぞれ、未修飾ビーズ、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を 1 層吸着させたビーズおよび 2 層吸着させたビーズにそれぞれ対応する。蛍光強度の分布の重なりはわずかであり、3 段階の蛍光を持つビーズが明瞭に識別できることが示唆される。region 2 についても region 1 の場合と同様に蛍光強度についてのヒストグラムを作成し、Fig.6.9(c) に示す。それぞれのピーク位置は region 1 の場合よりも正方向にシフトしている。これはフローサイトメトリーで得られる蛍光強度が積分値であるために蛍光強度はビーズ径に依存し、粒径が増大に伴って蛍光強度が増大して観測されるためである。

高分子電解質の被覆の効果を確認するために、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子のみを吸着させたビーズと、さらに PSS および PAH を 2 度交互吸着した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合ビーズを調製した。それぞれを未処理ビーズと混合し、超音波を 15min 照射したのちにフローサイトメトリーによって測定した結果を Fig.6.10 に示す。YAG:Ce³⁺ ナノ粒子のみを吸着させたビーズの場合、Fig.6.10(a) に示すように、同じ大きさのビーズを蛍光強度で区別することができない。これは超音波の照射によりビーズから脱離した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子が未処理ビーズへ吸着することにより、蛍光強度の平均化が起こった結果であると考えられる。一方、PSS/PAH の交互吸着を行った場合は YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の脱離が起こらず、Fig.6.10(b) に示すように、蛍光強度について区別可能であったと考えられる。この結果より、高分子電解質の被覆により YAG:Ce³⁺ ナノ粒子の脱離が防止できることが確認された。

6.3.5.4 第 2 色素を用いたフローサイトメトリー解析のモデル実験

調製した蛍光ビーズが生体反応検出に用いることができるかどうかを確認するために、調製したビーズ表面に BSA を固定化し、抗原抗体反応を利用して色素標識を行った。

Fig.6.11 にモデル実験を行った複合ビーズの蛍光顕微鏡画像を示す。Fig.6.11(a)-(c)は BSA を固定し抗原抗体反応により赤色色素を行ったビーズの蛍光顕微鏡画像であるが、YAG:Ce³⁺ナノ粒子からの緑色蛍光と、赤色色素からの赤色発光が得られた。これは、1) 固定化の操作により BSA がビーズ最外層に固定化されていること、かつ、2) 固定化した BSA が生体特異的な反応に利用できることを示す。Fig.6.11(d)-(f)は Fig.6.1 中の bead 5 に対して anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor 647 による色素標識を試みたビーズの蛍光顕微鏡観察結果であるが、Fig.6.11(c)で観察されたような赤色発光は観察されなかった。この結果は、Fig.6.11(a)-(c)で観察された色素標識が、静電氣的引力などの非特異的な吸着によるものではないことを示す。

このような色素標識を、YAG:Ce³⁺ナノ粒子を1回吸着させた15 μmのビーズに対してのみ行い、他5種類のビーズと混合してフローサイトメトリーで解析を行った。その結果、Fig.6.12(a)に示すように、前方散乱強度と緑色蛍光強度について6つのドット群を得ることができた。Fig.6.12(b)に赤色蛍光強度についてのヒストグラムを示すが、赤色発光が非常に弱い peak 1 と有意な赤色発光を示す peak 2 の2つのピークに分けられた。ここで、6つのドット群のうち peak 2 に分類されるドットを区別すると、Fig.6.12(a)中の赤色で示すプロットになり、赤色色素で標識したビーズはYAG:Ce³⁺ナノ粒子を1回吸着させた15 μmのビーズであると帰属できた。

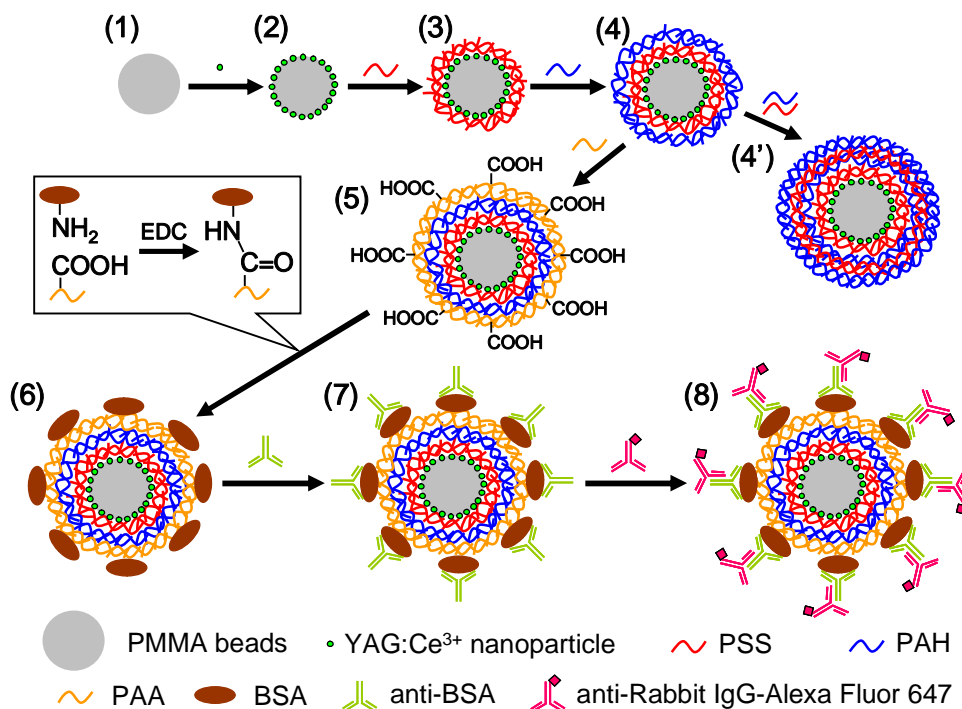


Fig.6.1 Illustration of preparation of the PMMA/YAG:Ce³⁺ composite beads and tagging with organic dye.

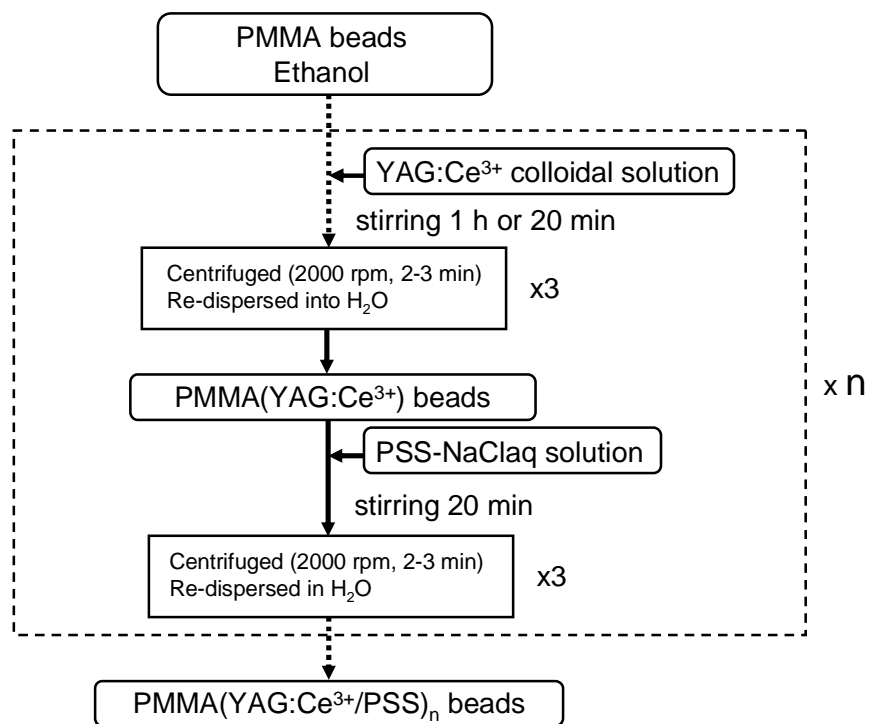


Fig.6.2 Schematic representation of the preparation of PMMA/YAG:Ce³⁺ composite beads.

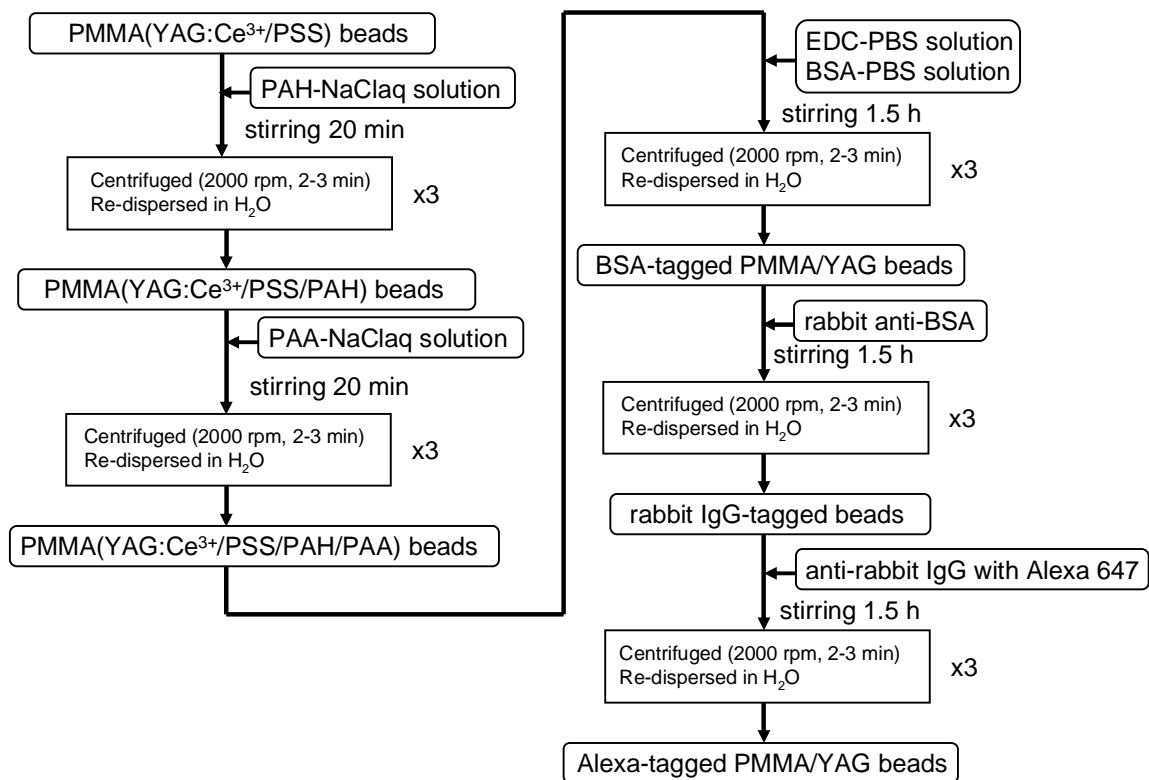


Fig.6.3 Schematic representation of the conjugation with BSA and tagging with organic dye.

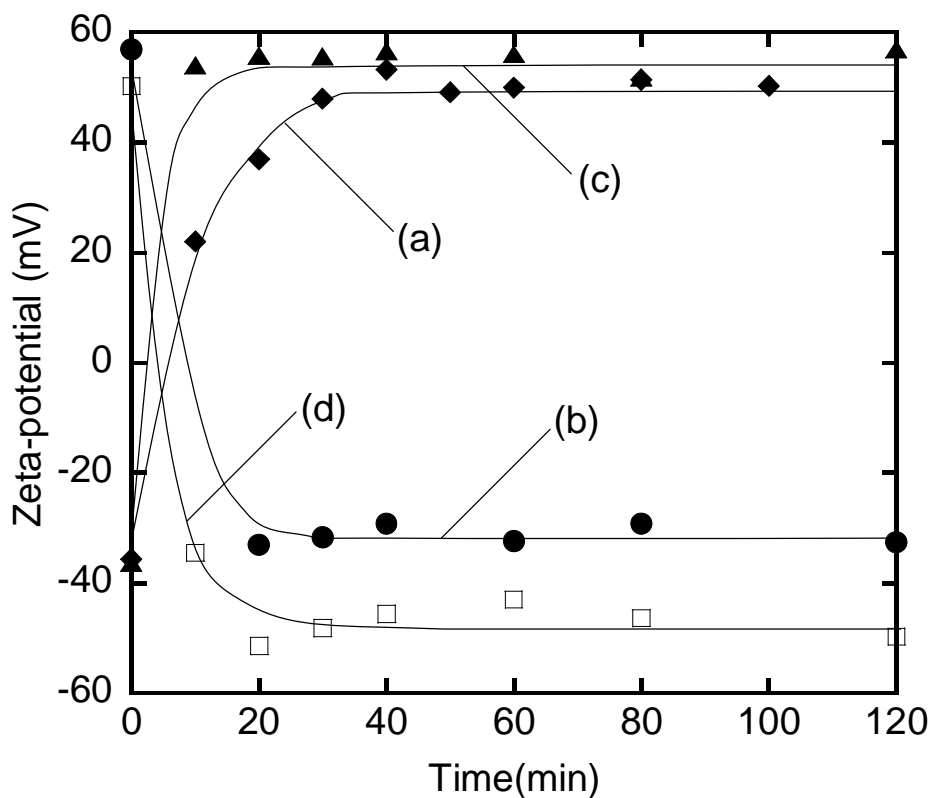


Fig.6.4 Change in zeta-potential of composite beads with mixing time. (a) PMMA(YAG:Ce³⁺), (b) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS), (c) PMMA-(YAG:Ce³⁺/PSS)YAG:Ce³⁺, (d) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)₂

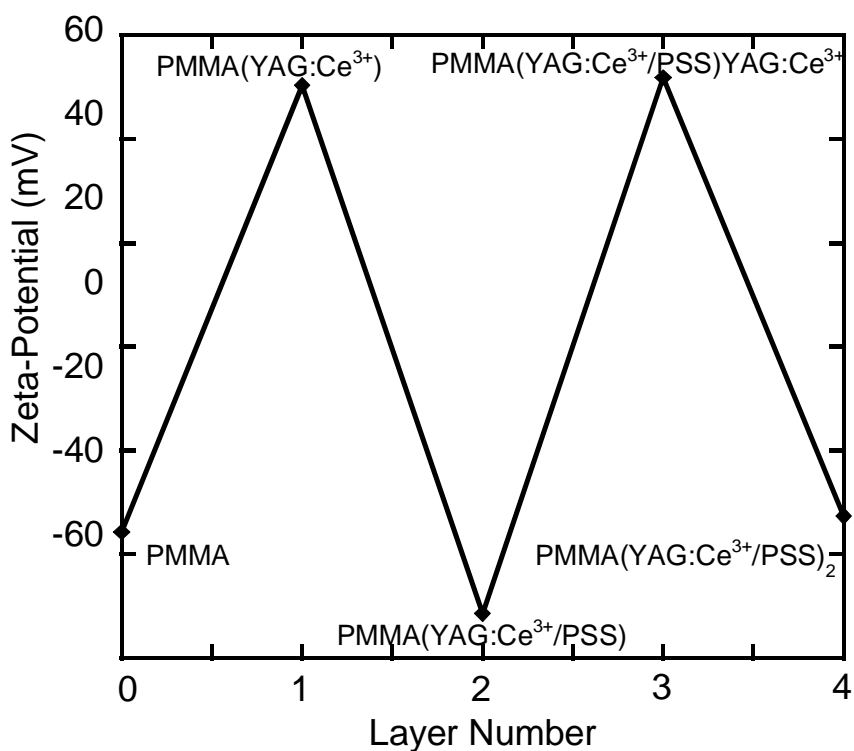


Fig.6.5 Change in saturated zeta-potentials by sequential adsorption.

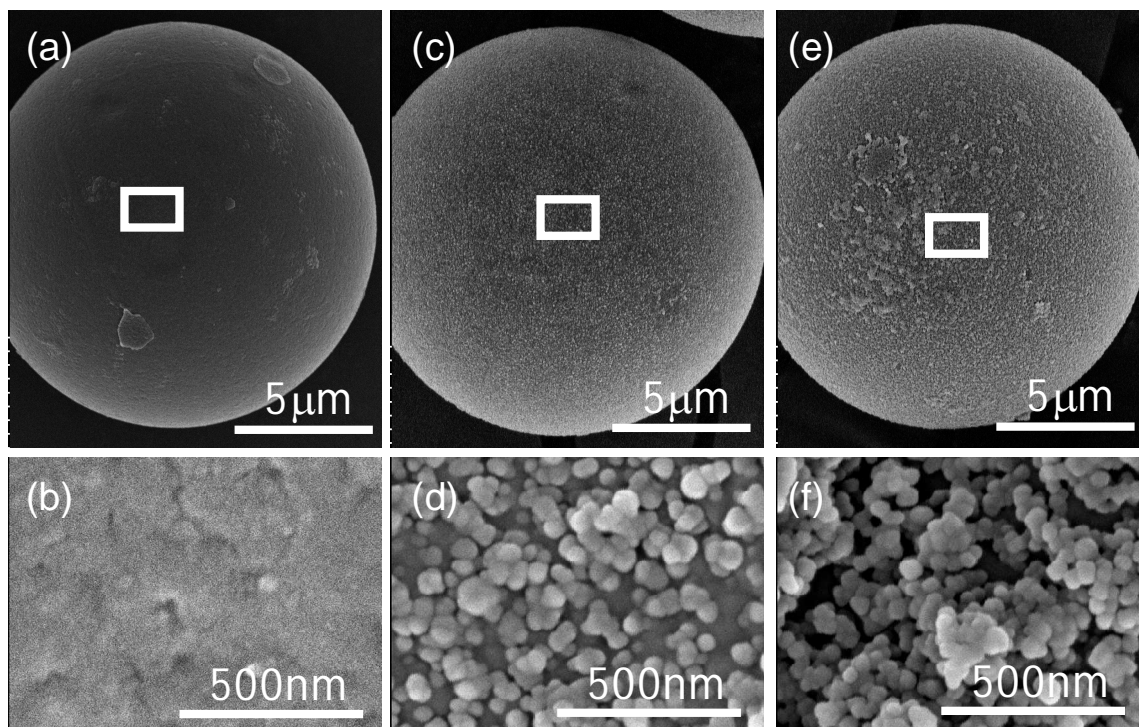


Fig.6.6 FE-SEM images of beads. (a, b) bare PMMA, (c, d) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS), (e, f) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)₂. (b, d, f) expanded images of marked areas in (a, c, e).

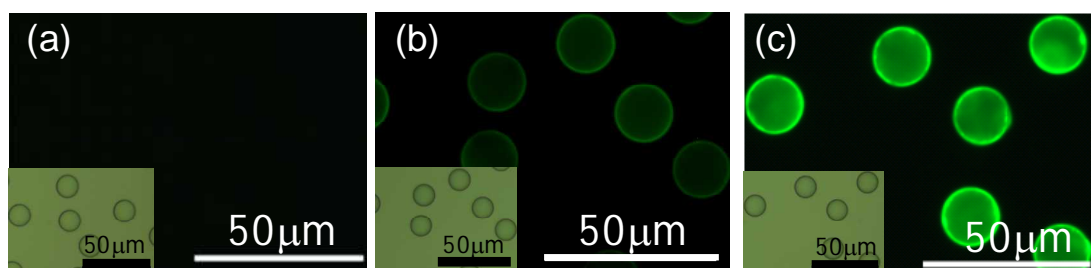


Fig.6.7 Fluorescence images and bright field images (inset) of beads. (a) bare PMMA, (b) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS), (c) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)₂. Fluorescence images were obtained under the condition of the filter block set 1.

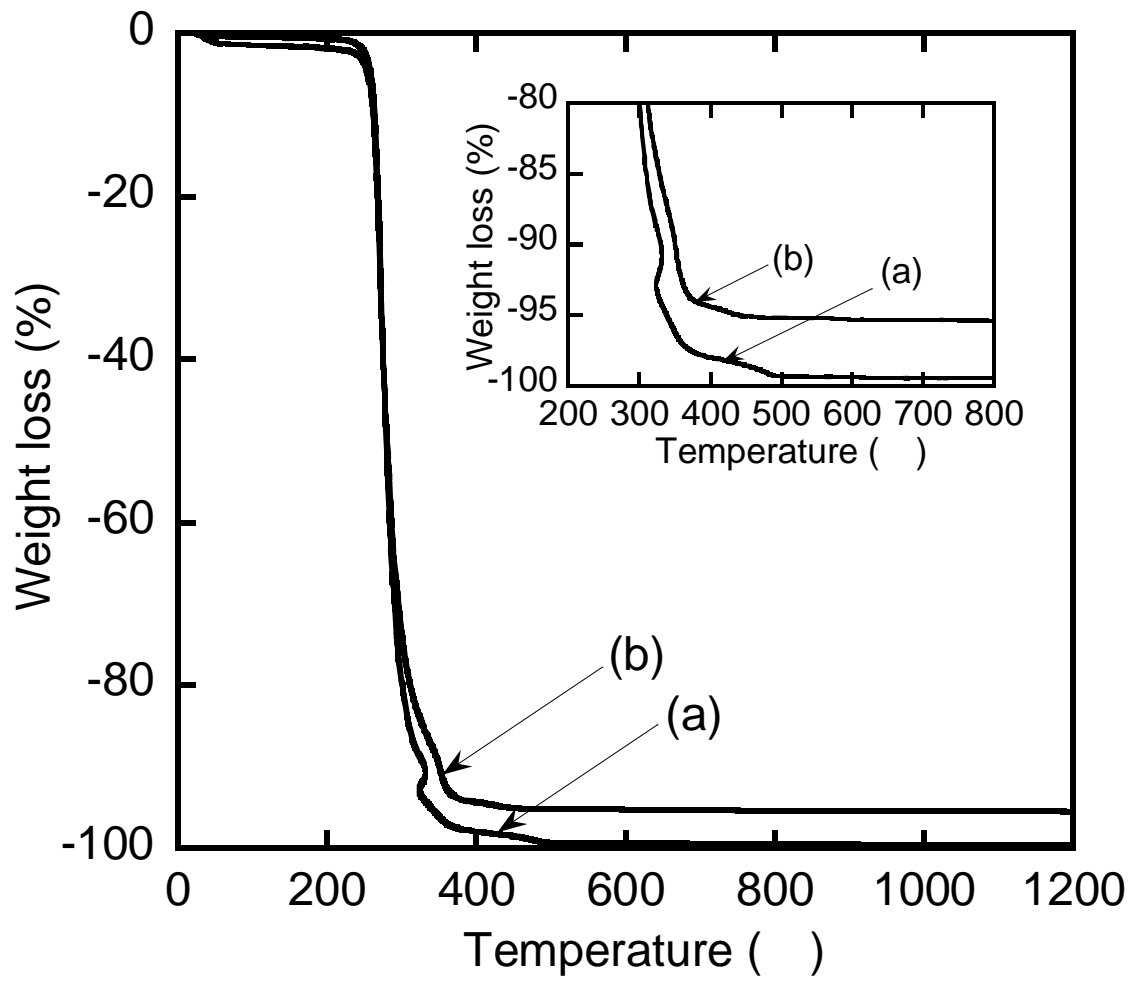


Fig.6.8 TG profile of (a) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS) and (b) PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)₂ of 15 μm in size.

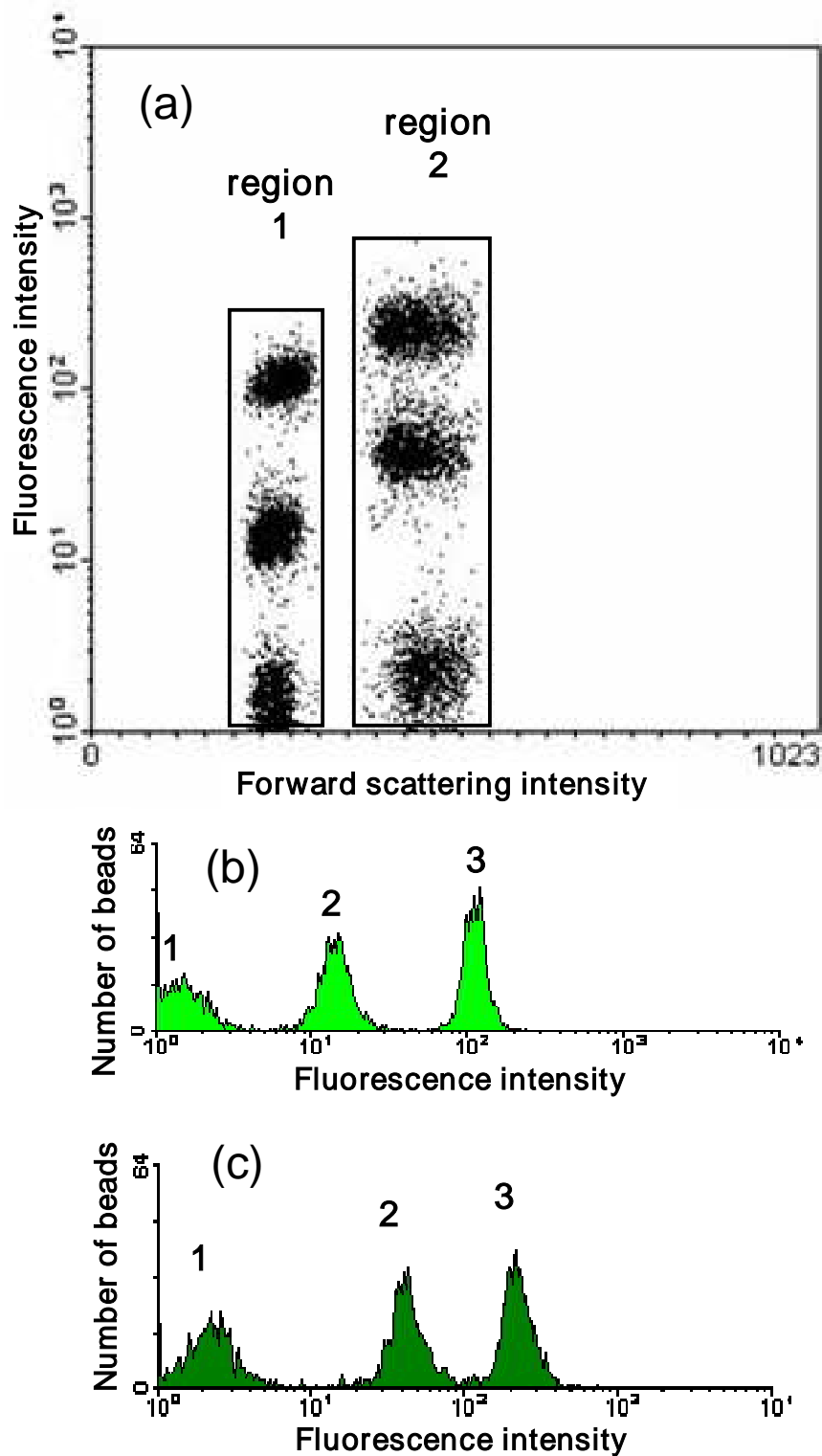


Fig.6.9 Histograms of fluorescence intensity (a, b) and dot plot (c) for the mixture of the bare PMMA beads and the composite beads, PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS) and PMMA(YAG:Ce³⁺/PSS)₂, of 10 and 15 μm in size, measured by FCM. (a) 10 μm beads, (b) 15 μm beads, (c) 10 and 15 μm beads.

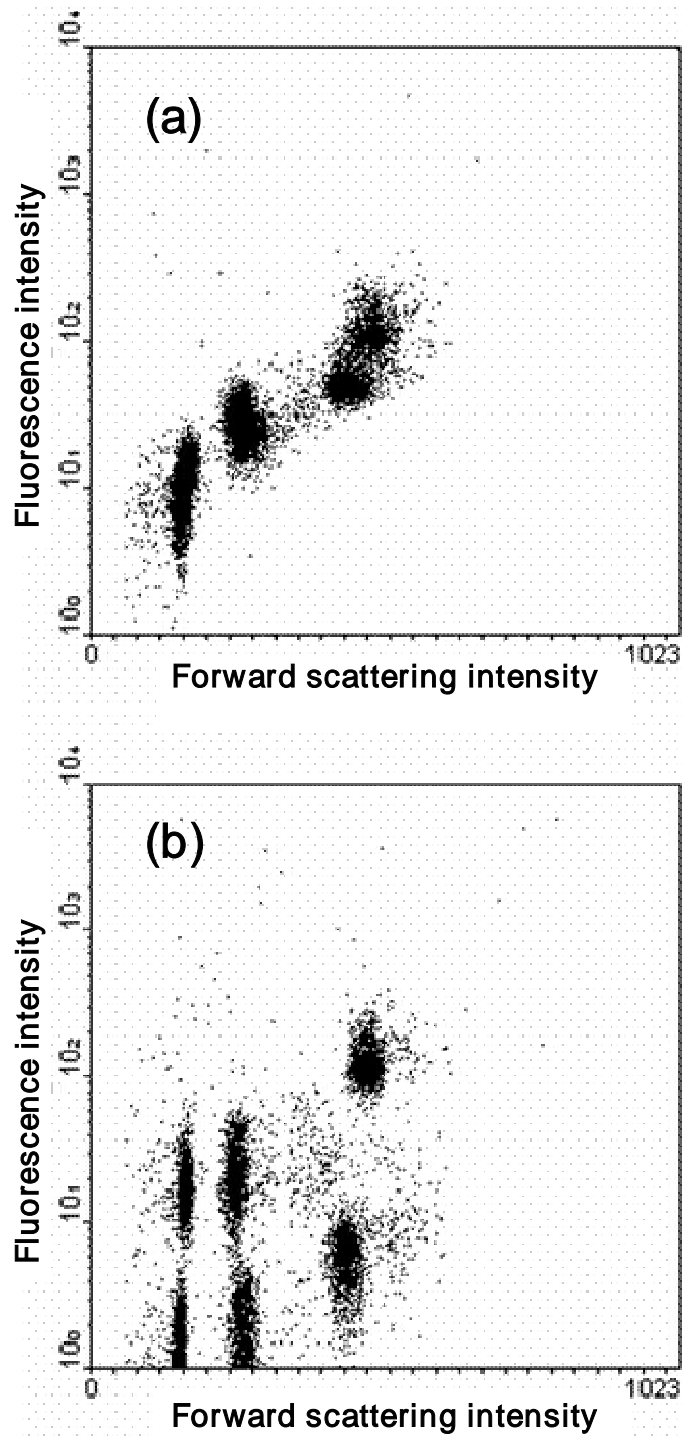


Fig.6.10 Dot plot for the mixture of the bare PMMA beads and the composite beads of 5, 10 and 15 μ m in size measured by FCM. (a) bare beads and PMMA(YAG:Ce³⁺), (b) bare beads and PMMA(YAG:Ce³⁺/(PSS/PAH)₂).

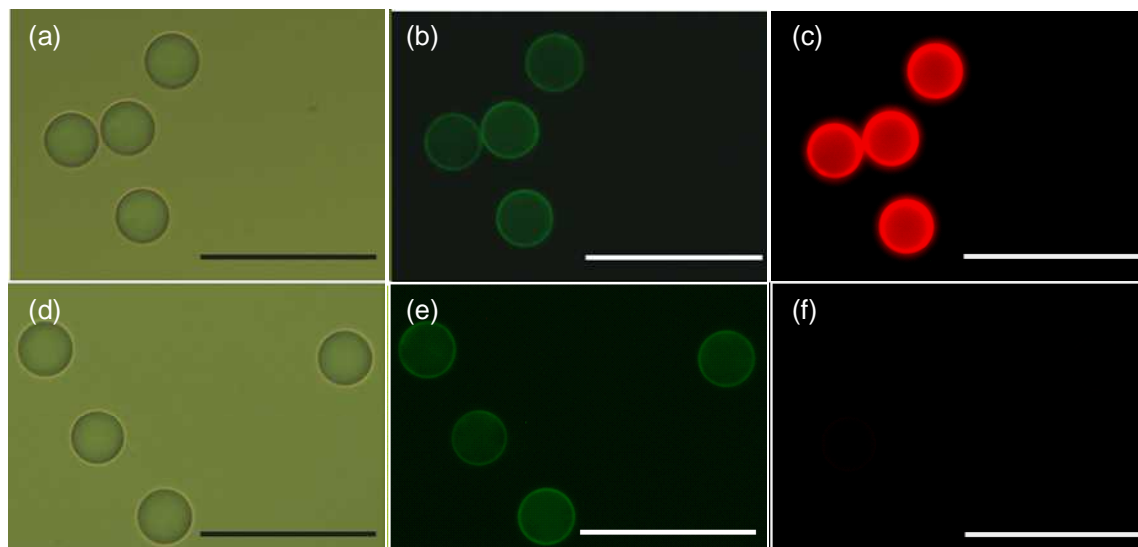


Fig.6.11 Microscopic bright field images (a, d) and fluorescence images (b, c, e, f) of beads. (a, b, c) bead 8 of 15 μm in size in Fig.6.1, (d, e, f) bead 3 treated with anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor 647 of 15 μm in size in Fig.6.1. Images (b, e) were obtained under the condition of the filter block set 1. Images (c, f) were obtained under the condition of the filter block set 2.

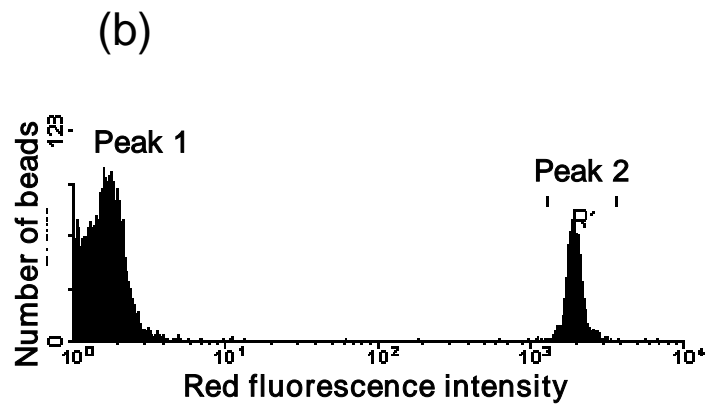
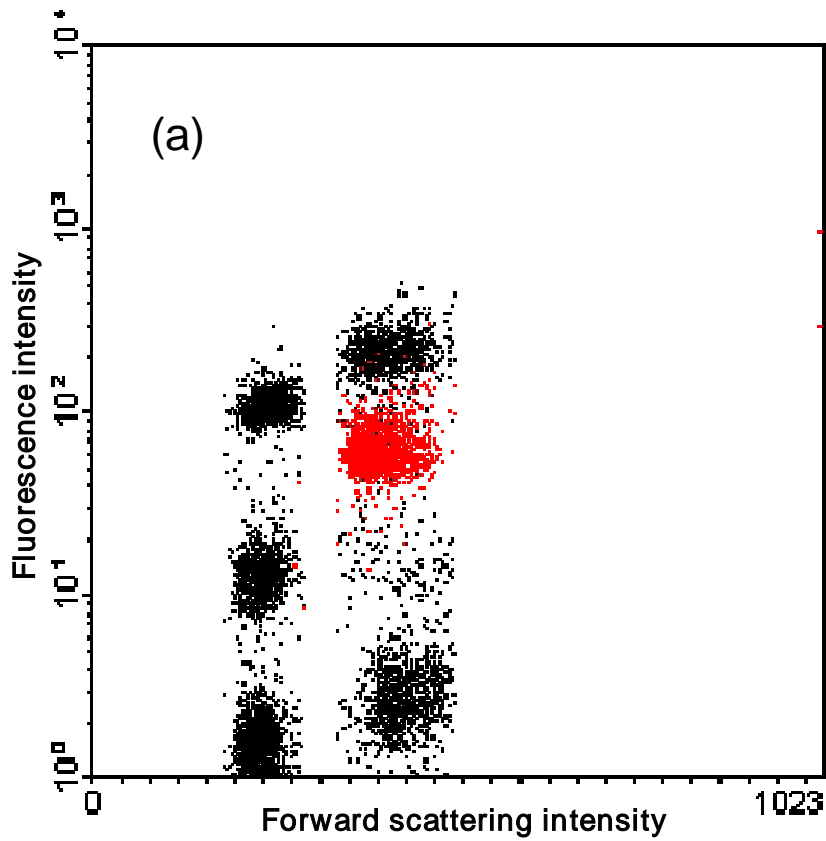


Fig.6.12 Dot plot (a) and histogram of red fluorescence intensity (b) for the mixture of the bare and composite beads of 10 and 15 μm in size, measured by FCM. The beads corresponding to the peak 2 shown in the (b) were detected as red dots shown in (a) by gating.

6.4 結論

交互吸着法により、PMMA ビーズにグリコサーマル法で合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子を吸着させ、YAG:Ce³⁺ナノ粒子を複合化した PMMA ビーズを作製した。交互吸着を順次行うことにより、ビーズのゼータ電位の符号が反転した。YAG:Ce³⁺ナノ粒子の吸着回数の増加に伴い、YAG:Ce³⁺ナノ粒子の吸着量は増大し、蛍光強度も増大した。また、このようにして調製した PMMA/YAG:Ce³⁺ナノ粒子複合ビーズは、フローサイトメトリーにおいて、蛍光強度について区別可能なプロット群として認識された。

交互吸着法によって最外層にポリアクリル酸を被覆し、ビーズ表面に生体分子とコンジュゲート可能なカルボキシル基を導入した。これを利用してビーズ表面に固定化した BSA は生体特異的に抗体と結合した。

これらの性質を利用してフローサイトメトリー解析のモデル実験を行った。赤色色素を用いたゲーティング操作により色素抗体が反応したビーズ種を特定することができた。この結果は、YAG:Ce³⁺ナノ粒子を複合化した PMMA ビーズがフローサイトメトリー解析へ応用可能であることを示唆する。

第6章の参考文献

- [6-1] 中内啓光監修, “新版フローサイトメトリー自由自在”, 秀潤社 (1999).
- [6-2] R. J. Fulton, R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker, J. R. Kettman Jr, “Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system”, *Clin. Chem.*, **43**, 1749-1756 (1997).
- [6-3] S. A. Dunbar, “Application of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection”, *Clin. Chim. Acta*, **363**, 71-82 (2006).
- [6-4] H. Iihara, T. Niwa, M. M. Shah, P. H. Nhung, S. X. Song, M. Hayashi, K. Ohkusu, Y. Itho, S. Makino, T. Ezaki, “Rapid multiplex immunofluorescent assay to detect antibodies against *burkholderia pseudomallei* taxonomically closely related nonfermenters”, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **60**, 230-234 (2007).
- [6-5] M. A. Correa-Duarte, M. Giersig, L. M. Liz-Marzán, “Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photogradation by a silica coating procedure”, *Chem. Phys. Lett.*, **286**, 497-501 (1998).
- [6-6] A. L. Rogach, D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig, N. A. Kotov, “Raisin bun”-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals”, *Chem. Mater.*, **12**, 2676-2685 (2000).
- [6-7] M. Bele, O. Siiman, E. Matijević, “Preparation and flow cytometry of uniform silica-fluorescent dye microspheres”, *J. Colloid Interface Sci.*, **254**, 274-282 (2002).
- [6-8] J. N. Cha, M. H. Bartl, M. S. Wong, A. Popitsch, T. J. Deming, G. Stucky, “Microcavity lasing from block peptide hierarchically assembled quantum dot spherical resonators”, *Nano Lett.*, **3**, 907-911 (2003).
- [6-9] D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaiya, J. Y. Ying, “Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4990-4991 (2005).
- [6-10] L. Wang, C. Yang, W. Tan, “Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling”, *Nano Lett.*, **5**, 37-43 (2005).
- [6-11] L. Wang, W. Tan, “Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation”, *Nano Lett.*, **6**, 84-88 (2006).
- [6-12] N. Yabuuchi, C. Otsuka, A. Kashihara, “Production of colored vinyl polymer particles by polymerizing a vinyl polymerizable monomer with a polymerizable dye”, *U.S. Patent*, 5,367,039 (1993).
- [6-13] P. O'Brien, S. S. Cummins, D. Darcy, A. Dearden, O. Masala, N. I. Pickett, S. Ryley, A. J. Sutherland, “Quantum dot-labelled polymer beads by suspension polymerization”, *Chem. Comm.*, 2532-2533 (2003).
- [6-14] X. Yang, Y. Zhang, “Encapsulation of quantum nanodots in polystyrene and silica micro-/nanoparticles”, *Langmuir*, **20**, 6071-6073 (2004).
- [6-15] W. Sheng, S. Kim, J. Lee, S. Kim, K. Jensen, M. G. Bawendi, “In-situ

encapsulation of quantum dots into polymer microspheres”, *Langmuir*, **22**, 3782-3790 (2006).

[6-16] Y. Yang, C. Tu, M. Gao, “A general approach for encapsulating aqueous colloidal particles into polymeric microbeads”, *J. Mater. Chem.*, **17**, 2930-2935 (2007).

[6-17] S. Fournier-Bidoz, T. L. Jennings, J. M. Klostranec, W. Fung, A. Rhee, D. Li, W. C. W. Chan, “Facile and rapid one-step mass preparation of quantum dot barcodes” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 5577-5581 (2008).

[6-18] J. Yang, S. R. Dave, X. Gao, “Quantum dot nanobarcodes: epitaxial assembly of nanoparticle-polymer complexes in homogeneous solution”, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5286-5292 (2008).

[6-19] T. Hirai, T. Saito, I. Komasaawa, “Recovery and immobilization of metal sulfide nanoparticles from reverse micellar system onto thiol-modified polystyrene particles”, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 11639-11643 (2000).

[6-20] T. Hirai, T. Saito, I. Komasaawa, “Stabilization of CdS nanoparticles immobilized on thiol-modified polystyrene particles by encapsulation with polythiourethane”, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 9711-9714 (2001).

[6-21] W. Yang, D. Trau, R. Renneberg, N. T. Yu, F. Caruso, “Layer-by-layer construction of novel biofunctional fluorescent microparticles for immunoassay applications”, *J. Colloid Interface Sci.*, **234**, 356-362 (2001).

[6-22] P. Schuetz, F. Caruso, “Electrostatically assembled fluorescent thin films of rare-earth-doped lanthanum phosphate nanoparticles”, *Chem. Mater.*, **14**, 4509-4516 (2002).

[6-23] D. Wang, A. L. Rogach, F. Caruso, “Semiconductor quantum dot-labeled microsphere bioconjugates prepared by stepwise self-assembly”, *Nano Lett.*, **2**, 857-861 (2002).

[6-24] B. Sun, S. A. Nutch, R. M. Lorenz, D. T. Chiu, “Layered polyelectrolyte-silica coating for nanocapsules”, *Langmuir*, **21**, 10763-10769 (2005).

[6-25] B. J. Battersby, D. Bryant, W. Meutermans, D. Matthews, M. L. Smythe, M. Trau, “Toward larger chemical libraries: encoding with fluorescent colloids in combinatorial chemistry”, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2138-2139 (2000).

[6-26] M. Trau, B. J. Battersby, “Novel colloidal materials for high-throughput screening applications in drug discovery and genomics”, *Adv. Mater.*, **13**, 12-13 (2001).

[6-27] G. Decher, J. D. Hong, “Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. I consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces”, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, **46**, 321-327 (1991)

[6-28] G. Decher, J. D. Hong, “Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II, consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces”, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, **95**, 1430-1434 (1991).

- [6-29] M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, "Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules", *Nat. Biotechnol.*, **19**, 631-635 (2001).
- [6-30] Y. Cao, Z. Huang, T. Liu, H. Wang, X. Zhu, Z. Wang, Y. Zhao, M. Liu, Q. Luo, "Preparation of silica encapsulated quantum dot encoded beads for multiplex assay and its properties", *Anal. Biochem.*, **351**, 193-200 (2006).
- [6-31] H. Wang, J. Wang, Y. Li, X. Li, T. Liu, Z. Huang, Y. Zhao, "Multi-color encoding of polystyrene microbeads with CdSe/ZnS quantum dots and its application in immunoassay", *J. Colloid Interface Sci.*, **316**, 622-627 (2007).
- [6-32] M. Kuang, D. Wang, H. Bao, M. Gao, H. Möhwald, M. Jiang, "Fabrication of multicolor-encoded microspheres by tagging semiconductor nanocrystals to hydrogel spheres", *Adv. Mater.*, **17**, 267-270 (2005).
- [6-33] Y. Gong, M. Gao, D. Wang, H. Möhwald, "Incorporating fluorescent CdTe nanocrystals into a hydrogel via hydrogen bonding: toward fluorescent microspheres with temperature-responsive properties", *Chem. Mater.*, **17**, 2648-2653 (2005).
- [6-34] X. Gao, S. Nie, "Doping mesoporous materials with multicolor quantum dots", *J. Phys. Chem. B*, **107**, 11575-11578 (2003).
- [6-35] T. R. Sathe, A. Agrawal, S. Nie, "Mesoporous silica beads embedded with semiconductor quantum dots and iron oxide nanocrystals: dual-function microcarriers for optical encoding and magnetic separation", *Anal. Chem.*, **78**, 5627-5632 (2006).
- [6-36] X. Gao, S. Nie, "Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity: rapid readout using flow cytometry", *Anal. Chem.*, **76**, 2406-2410 (2004).
- [6-37] H. Wang, Z. Huang, T. Liu, J. Wang, Y. Cao, X. Hua, X. Li, Y. Zhao, "A feasible and quantitative encoding method for microbeads with multicolor quantum dots", *J. Fluoresc.*, **17**, 133-138 (2007).
- [6-38] P. Zhang, H. Dou, W. Li, K. Tao, B. Xing, K. Sun, "Fabrication of fluorescent and magnetic multifunctional polystyrene microbeads with carboxyl ends", *Chem. Lett.*, **36**, 1458-1459 (2007).
- [6-39] N. A. Dhas, A. Zaban, A. Gedanken, "Surface synthesis of zinc sulfide nanoparticles on silica microspheres: sonochemical preparation, characterization, and optical properties", *Chem. Mater.*, **11**, 806-813 (1999).
- [6-40] J. Zhang, S. Xu, E. Kumacheva, "Polymer microgels: reactors for semiconductor, metal, and magnetic nanoparticles", *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7908-7914 (2004).

第7章 近赤外発光 YAG:Yb³⁺ナノ粒子の作製と特性評価

7.1 緒言

7.1.1 近赤外蛍光イメージング

波長 750-1100nm の近赤外領域はヘモグロビンや水組織による吸収が少ない[7-1]。この波長域で励起と発光を行うことで自家蛍光は抑制され、S/N 比を改善することができる。また波長が長くなるほど散乱の影響は小さくなり、組織深部まで光が透過するため、生体内部の情報を非侵襲に取得できる。In vivo で内部を観察するには MRI や放射線を用いた方法があるが、これらの方法に比べて近赤外光を用いた観察方法は簡便で検出感度も高く、複数の生化学反応をリアルタイムに観察できるという利点がある。実際に近赤外光を利用して、腫瘍の小動物イメージング[7-2~4]、ベータ細胞[7-5]およびバクテリア[7-6]のイメージングが行われているほか、アポトーシス[7-7]といった生体反応もイメージングされている。また、透過光を利用した蛍光断層撮影への期待も大きい[7-8, 9]。

7.1.2 イメージングに用いられている近赤外発光材料

近赤外発光する有機色素は可視域で発光する色素に比べて種類が少ない。多くの報告では、インドシアニングリーンか Cy5.5 を近赤外色素として用いているが、これらの色素は可視域で発光する色素に比べて安定性が低く、量子効率も低い[7-10]。そのため、より安定な色素の開発は現在でも求められている[7-11, 12]。Umezawa らが合成したボロンジビピロメテン骨格を有する有機色素は、56-98%という高い量子効率とを持ち、光照射に対する高い安定性を示している[7-12]。

一方で、光退色に対する安定性を図るためにシリカで被覆する例もある[7-13~15]。Bringley らは Stöber 法によるシリカ合成の反応環境中で有機色素が退色されるのを防ぐために、化学的安定性の高い新しい色素を合成し、シリカへの取り込みを行った[7-15]。

量子ドットも近赤外発光材料として応用が検討されている。CdSe/ZnS コアシェル量子ドットも近赤外発光材料として利用されているが[7-16, 17]、近赤外イメージングの最適波長よりも波長が短いため、Cd や Se の代わりに Hg や Te を構成元素に用いてより長波長で発光する量子ドットが提案された。しかし、ホットソープ法に用いるための Hg の前駆体は毒性が強く制御も困難であり[7-18]、一方で Te は酸化されやすく合成された CdTe 量子ドットは退色しやすいといった欠点を有していたため[7-19]、その開発は困難であった。Quin らは、水溶媒中で CdTe ナノ粒子を合成したのちに溶解・再析出を利用して Hg²⁺の固溶を行い、さらに CdS を被覆して CdHgTe/CdS 量子ドットを作製した[7-20]。作製された量子ドットは、量子効率も 20-50%と高く、光退色に対する安定性も高い。近年では PbS や PbSe のナノ粒子も近赤外発光量子ドットとして着目され[7-21~23]、蛍光イメージングへ徐々に応用されつつある[7-24]。

一方で、III-V 族半導体量子ドットも近赤外発光材料として検討されている。コアとして用いられているのは主に InAs であるが、そのままでは量子効率が低いため格子定数の

近い CdSe[7-25]や ZnSe[7-26, 27]がシェルとして被覆されている。Xie らは Cd, Hg, As, Se などの毒性の強い元素を含まない量子ドットとして InP を提案した[7-28]。

量子ドット以外にも錯体[7-29]や金ナノ粒子[7-30, 31]などの無機材料が提案されている。Masne らは $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ に Eu^{2+} 、 Dy^{3+} および Mn^{2+} をドーブしたナノ粒子を合成し、その蓄光性を利用して励起光を照射することなく小動物イメージングを行った[7-32]。また、 Yb^{3+} 、 Er^{3+} および Tm^{3+} ランタノイドイオンを発光中心として含むナノ粒子は、近赤外レーザーの照射により可視域から近赤外域にアップコンバージョン蛍光が得られるため、蛍光プローブとしての応用が期待されている[7-33~35]。

7.1.3 研究目的

第 4 章から第 6 章までの検討により、グリコサーマル法で合成された YAG ナノ粒子は生体分子検出へ応用できることが示唆された。第 7 章では、YAG にドーブするイオンとして新たに Yb^{3+} に着目し、近赤外域で励起と発光を行うことができるナノ粒子の作製を試みた。

Yb^{3+} は YAG: Yb^{3+} レーザー[7-36]などに応用されている近赤外発光イオンであり、 $10,000\text{ cm}^{-1}$ 離れたただ 2 つの準位を持ち、交差緩和による濃度消光を起こしにくい[7-37]。グリコサーマル法により YAG: Yb^{3+} ナノ粒子を合成し、その特性評価を行った。また焼成を行い、焼成が光学特性に与える影響についても考察した。

7.2 実験方法

7.2.1 試薬

第 7 章で用いた試薬の一覧を Table 7-1 にまとめた。

Table 7-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
Aluminium isopropoxide (AIP)	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Ytterbium (III) acetate tetrahydrate	>99.9%	422.23	Wako
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99%	338.10	Kanto Kagaku

7.2.2 試料の合成方法

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4 水和物 7.125 mmol (2.41 g)、酢酸イッテルビウム(III)4 水和物 0.375 mmol (0.16 g)、およびアルミニウムトリイソプロポキシド 12.50 mmol (2.55 g)を加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 日静置して粗大粒子を沈降させ、その上澄みを以降の実験に用いた。

得られた分散液を遠心沈殿管に注ぎ、メタノール変性アルコールを添加した。この分散

液を遠心分離(10000 rpm, 30 min)することで粒子を沈降させ、上澄みを除去した。この洗浄行程を合計3回行った後、送風乾燥(50 °C, 1 day)することで粉体試料を得た。

さらに、得られた粉体試料の焼成を行った。アルミナボートに投入した粉体試料を、横型管状炉にて昇温速度 10 K/min で所定の温度まで昇温し、その後 2 h 焼成した。焼成は空気フロー(300 mL/min)下で行った。一連の手順を Fig.7.1 のフローチャートに示す。

7.2.3 試料の評価方法

第2章で述べた評価のうち、FE-TEM, FE-SEM, XRD, PL, PLE, FT-IR, VSM による評価を行った。これらの評価法に加え、結晶子径および格子歪みを Stokes-Wilson 法を用いて算出した。

7.3 結果と考察

7.3.1 FE-TEM および FE-SEM による粒子観察

Fig.7.2 に未焼成試料および焼成試料の FE-TEM 像を示す。Fig.7.2(a)に示すように、画像から算出された未焼成試料の数平均1次粒子径は 11.5nm で標準偏差は 2.6nm であった。また、Fig.7.2(b)に示すように 600 °C で焼成を行った試料には粒子のサイズや形態に変化は確認されなかった。しかしながら 900 °C での焼成を行うと、Fig.7.2(c)に示すように粒子界面で焼結し始めている様子が観察され、1300 °C で焼成を行うと Fig.7.2(d)に示すように粒子の焼結はさらに促進された。

7.3.2 XRD による結晶構造の同定

Fig.7.3 に未焼成試料および焼成試料の XRD を示す。未焼成試料の XRD プロファイルである Fig.7.3(a)に観測された全てのピークは YAG に帰属され、ガーネット構造が単相で得られていることが確認された。Fig.7.3(b), (c)に示すように 600 および 900 °C で焼成した試料の全ての XRD ピークは未焼成試料の場合と同じく YAG に帰属された。しかしながら、1300 °C の焼成を行うと Fig.7.3(d)に示すように、YAG には帰属できないいくつかのピークが観測され、これはモノクリニック相(Y₄Al₂O₉)に帰属される。これは、合成により得られた粉体試料に存在していたアモルファス成分が焼成により結晶化して副相として生成したものであると考えられる。

Fig.7.4 に第一強線である(420)面を拡大したプロファイルを示す。未焼成試料のピークトップの位置は 33.08 deg であったが、600 °C 焼成試料では 33.17deg、900 °C 焼成試料では 33.26deg、1300 °C 焼成試料では 33.37deg と、焼成温度の上昇に伴い高角度側へシフトし、面間隔が減少した。これはナノ粒子特有の現象である格子緩和(構造緩和)によって説明できる。粒子サイズがナノオーダーである場合は全原子数に占める表面近傍の原子の割合が大きく、表面近傍の原子は結晶内部の原子に類似する配位数をとろうとして原子が互いに変位し合うため、平均的な面間隔が増大する。焼成による焼結により粒子サイズが増大する過程で、この変位による面間隔の増大が抑制され、本来の面間隔に向かって面間隔が減少したものであると考えられる。ピーク幅については 4.3.3 で考察する。

7.3.3 Stokes-Wilson 法による結晶子径と格子歪みの算出

測定された XRD プロファイルについて、Stokes-Wilson 法により結晶子径と格子歪みを算出した。結果を Table 7-2 に示す。合成直後の試料の結晶子サイズは 21.8 nm であり、TEM で観察された 1 次粒子径のよりも大きかった。これは格子面をそろえて粒子が合一することにより、複数の粒子に跨って結晶子径が見積もられた結果であると考えられる。また、600 °C 焼成試料では 22.3 nm、900 °C 焼成試料では 24.3 nm と焼成温度の上昇に伴って結晶子径は増大し、特に 1300 °C 焼成試料では 50.0 nm と顕著に増大した。焼成温度の上昇に伴うこの変化は FE-TEM で観察された焼結の様子とよく対応する。

一方、格子歪みは、未焼成試料で 0.0511 %、600 °C 焼成試料で 0.0502 %、900 °C 焼成試料で 0.0652 %と、焼成温度の上昇による変化は観測されなかった。しかし、1300 °C 焼成試料においては 0.0129 %と格子歪みが減少した。これは YAG 結晶中に Y³⁺ (1.159 pm) とイオン半径の異なる Yb³⁺ (1.125 pm) が固溶することにより歪んでいた格子が、1300 °C の焼成により Yb³⁺ が副相 Yb₄Al₂O₉ となって YAG 結晶中から分離することで、その歪みが解消されたものと考えられる。

Table 7.2 Crystal size and lattice distortion.

	as-prepared	600 °C	900 °C	1300 °C
Crystal size [nm]	21.8	22.3	24.3	50.0
Lattice distortion [x10 ⁻² %]	5.11	5.02	6.52	1.29

7.3.4 FT-IR による表面有機物の解析

Fig.7.5 に真空中で測定した FT-IR の結果を示す。Fig.7.5(a) は未焼成試料の FT-IR スペクトルであるが、3300 cm⁻¹ に OH 伸縮振動に帰属されるブロードな吸収が観測され、それに重なるようにして、3630 cm⁻¹ にフリー-OH 基の伸縮振動、3100, 2951, 2926 cm⁻¹ に CH 伸縮振動がそれぞれ観測された。これらの吸収ピークの存在は、合成溶媒である 1,4-ブタンジオールや洗浄に用いたメタノール変性アルコール、原料由来の酢酸の存在を示唆する。これらの振動ピークは 600 °C および 900 °C での焼成の結果、Fig.7.5(b), (c) に示すように OH 伸縮振動を除いて全て消失した。同様に、1464 および 1331 cm⁻¹ の CH₂ 変角振動に帰属される吸収ピークも焼成に伴い消失した。また、Fig.7.5(a) の未焼成試料のスペクトルにおいて、1577 cm⁻¹ および 1433 cm⁻¹ に観測される吸収ピークはそれぞれ COO 非対称伸縮および対称伸縮振動に帰属され、原料由来の酢酸イオンが粒子表面の金属イオンへ配位していることが示唆された。これら 2 つのピークは 600 °C および 900 °C での焼成により 1539 cm⁻¹ と 1382 cm⁻¹ にそれぞれシフトしつつも残存した。これは、電子供与性である炭化水素が焼成により除去されたため、残存したカルボキシル基の電子密度が下がり、低波数側へシフトしたと考えられる。これらの結果より、粒子表面の OH 基および COO 基は 900 °C 以下の焼成では完全に除去できないことがわかる。1300 °C の焼成を行うと両者に起因する吸収ピークも消失し、OH 基や COO 基が粒子より除去されることを確認した。

7.3.5 TG-DTAによる熱質量挙動の解析

Fig.7.6 に TG-DTA プロファイルを示す。昇温開始から 300 °C までの質量減少は溶媒である 1,4-ブタンジオールや洗浄に用いたメタノール変性アルコールの蒸発、また 350 -400 °C に観測される発熱を伴う質量減少は、粒子表面に配位した酢酸や溶媒の燃焼によるものと考えられる。400 °C 以上の昇温における緩慢な質量減少は、粒子表面に配位した OH 基もしくは COO 基の減少であると考えられ、7.3.4 で考察した FT-IR スペクトルの結果に対応する。

7.3.6 UV-vis-NIR 吸収スペクトル

Fig.7.7 に UV-vis-NIR 吸収スペクトルを示す。波長 1400 nm 付近の吸収は OH 伸縮振動の倍音吸収、波長 330 nm をピークトップとする吸収は C=O の π - π^* 遷移による吸収にそれぞれ帰属され、表面水酸基や有機物の存在を示唆する。これらのピークは焼成温度の上昇に伴い減少した。これは、7.3.4 で示した FT-IR スペクトルの結果とよく対応する。波長 900-1100 nm には Yb³⁺の $^2F_{7/2}$ - $^2F_{5/2}$ 遷移に帰属される吸収が観測された。ここで波長 979 nm のピークに着目すると、Fig.7.8 に示すように、焼成温度の上昇に伴いピーク強度は減少し、かつ分裂していく様子が観察された。これは副相の生成が Yb³⁺周囲の結晶場の状態を変化させた結果であると考えられる。

7.3.7 PL スペクトル

Fig.7.9 に波長 940nm の近赤外レーザーを照射して測定した PL スペクトルを示す。全ての試料において、Yb³⁺の $^2F_{5/2}$ - $^2F_{7/2}$ 遷移に帰属される発光が観測された。また、焼成温度の上昇に伴い発光強度は増大した。これは、その振動エネルギーの 3 倍が近赤外発光の遷移エネルギーに相当するために発光キラーとして働く OH 基や表面欠陥が、焼成により減少したためであると考えられる。

7.3.8 プローブとしての特性評価

合成した YAG:Yb³⁺ナノ粒子を純水に分散させて DLS により測定した粒度分布を Fig.7.10 に示す。数平均粒子径は 54.0 nm で標準偏差は 11.4 nm であり、良好に分散した。

Fig.7.11 に近赤外レーザーを照射しながら測定した YAG:Yb³⁺ナノ粒子分散液の発光強度の時間変化と分光光度計のキセノンランプを照射しながら測定した Alexa680 の発光強度の時間変化を示す。2 h のキセノンランプの照射によって Alexa は初期強度の 35%まで退色した。一方、YAG:Yb³⁺ナノ粒子は近赤外レーザーの照射によっても退色しなかった。測定終了時には 7%程度発光強度が増大しているが、これは Yb²⁺ - Yb³⁺への酸化に起因すると思われる。

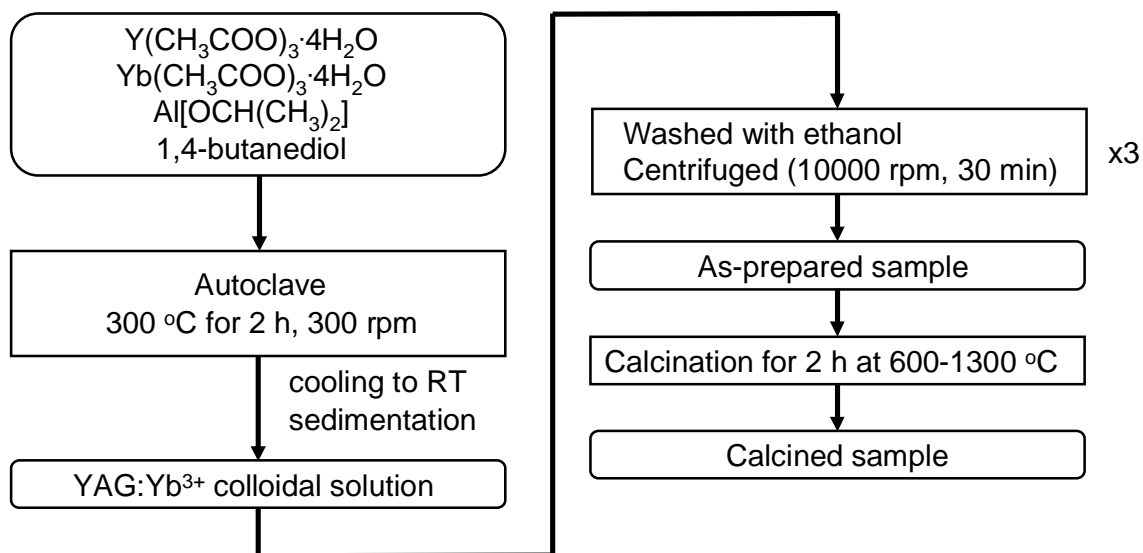


Fig.7.1 Schematic representation of the synthesis of YAG:Yb³⁺ nanoparticles.

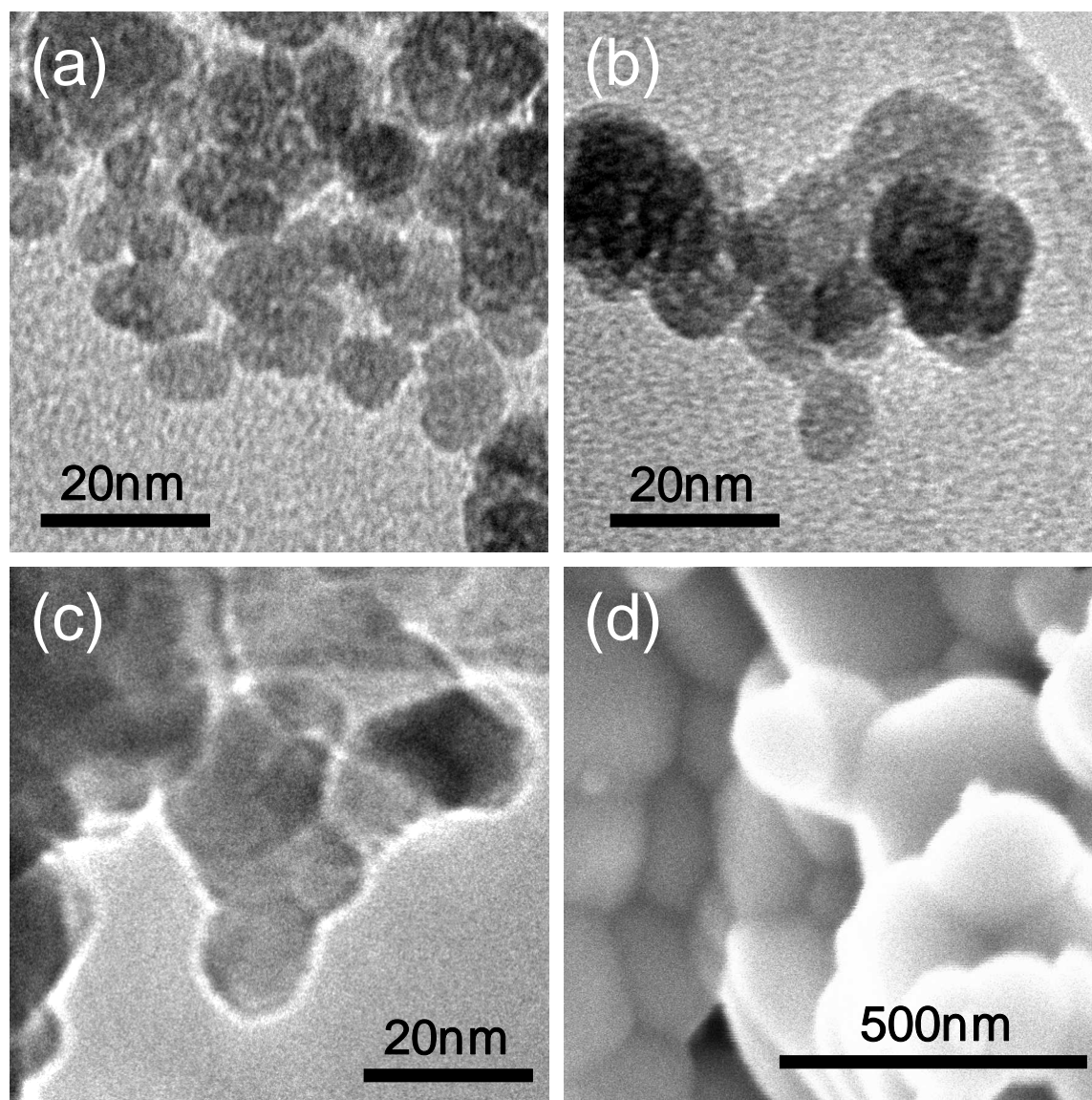


Fig.7.2 (a)-(c) TEM images of samples: (a) as-prepared, (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C; (d) SEM micrograph of sample calcined at 1300 °C.

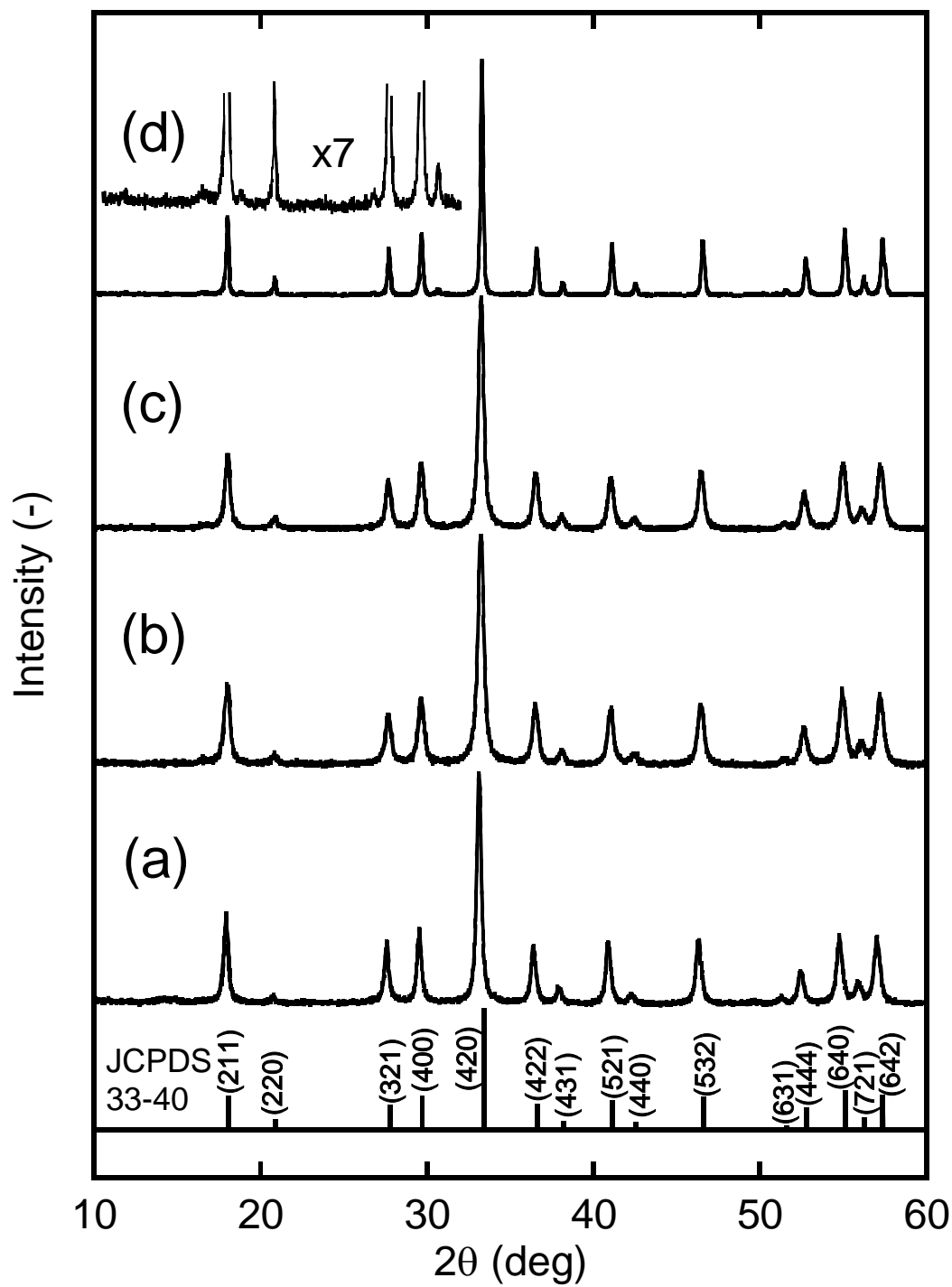


Fig.7.3 XRD profiles of samples.: as-prepared, (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C, (d) calcined at 1300 °C.

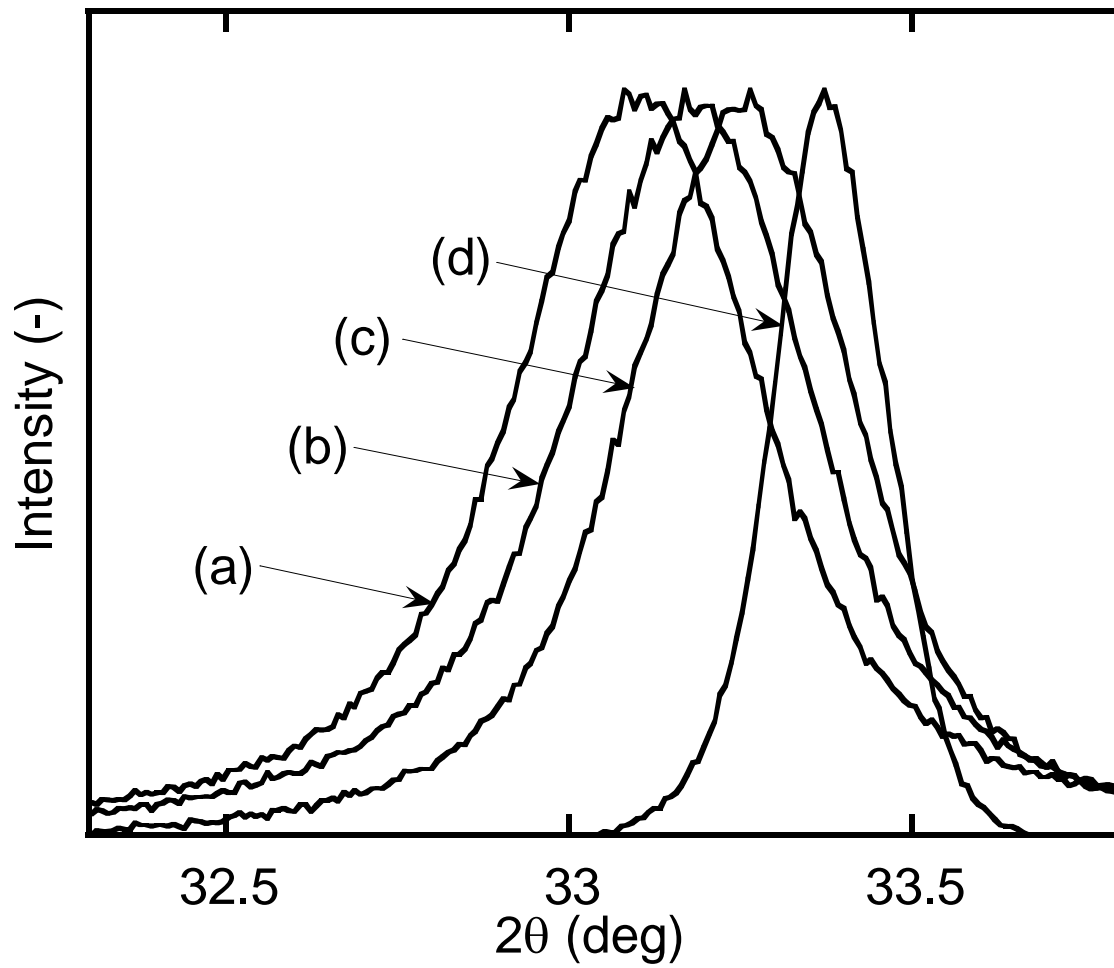


Fig.7.4 XRD peak of (420) plane: (a) as-prepared, (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C, (d) calcined at 1300 °C.

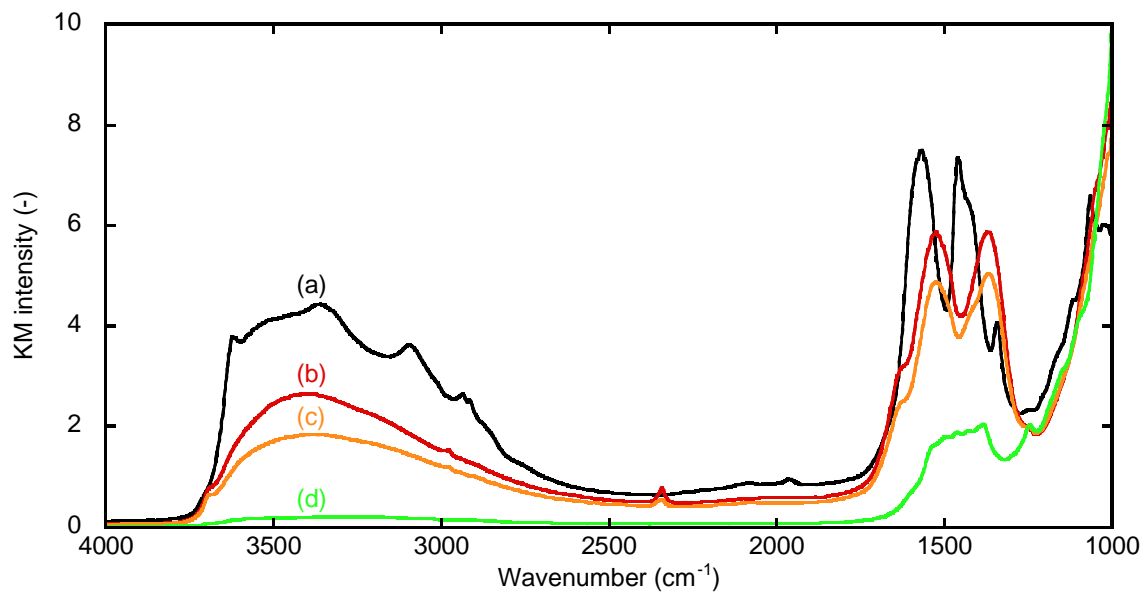


Fig.7.5 FT-IR spectra of YAG:Yb³⁺ nanoparticles: (a) as-prepared, (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C, (d) calcined at 1300 °C.

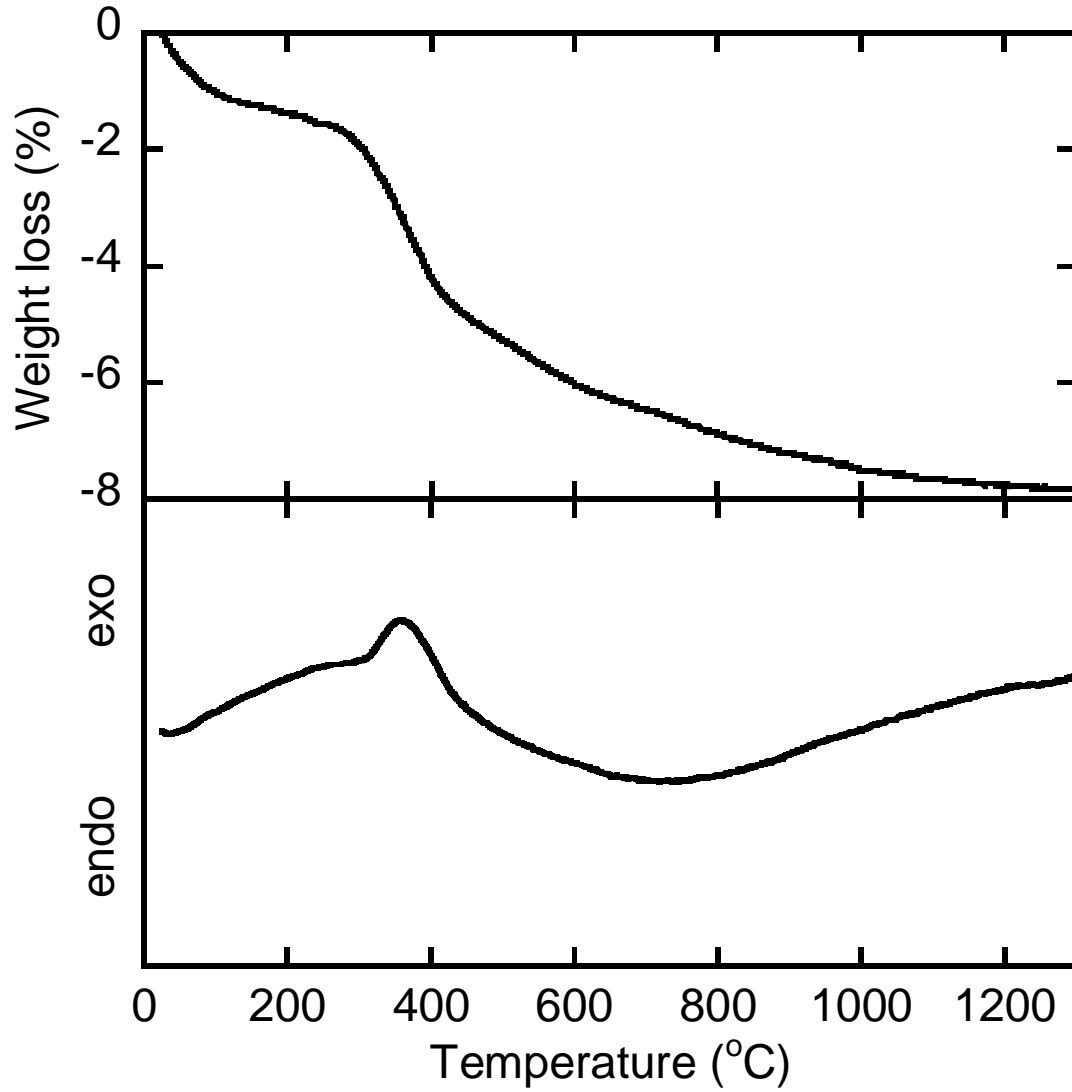


Fig.7.6 TG-DTA profile of as-prepared YAG:Yb³⁺ nanoparticles.

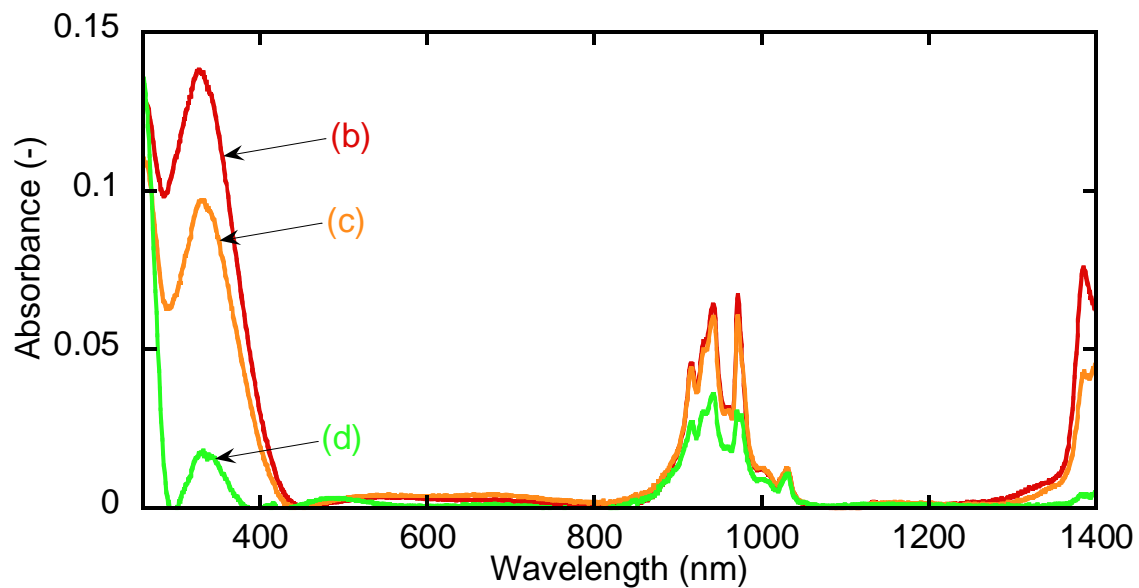


Fig.7.7 UV-vis-NIR spectra of YAG:Yb³⁺ nanoparticles: (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C, (d) calcined at 1300 °C.

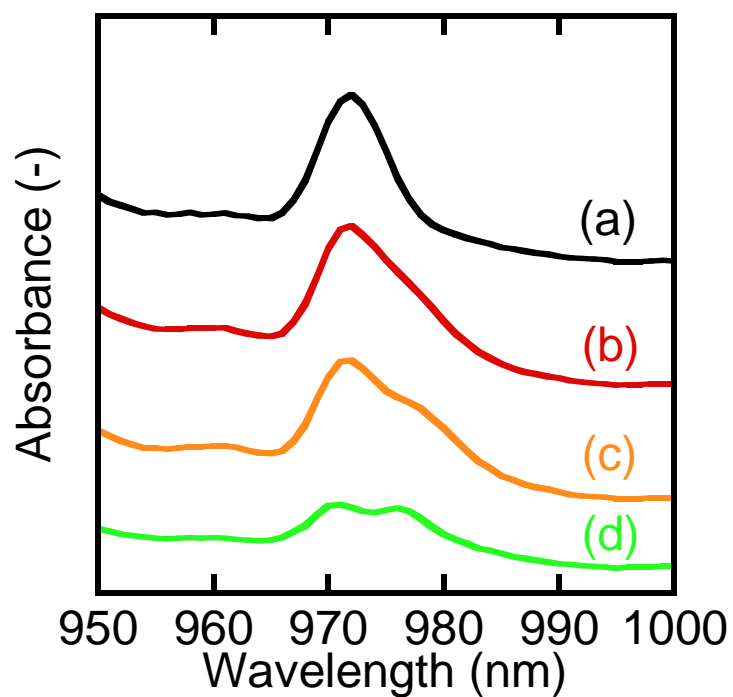


Fig.7.8 Absorption peaks assigned to f-f transition of Yb³⁺: (a) as-prepared, (b) calcined at 600 °C, (c) calcined at 900 °C, (d) calcined at 1300 °C.

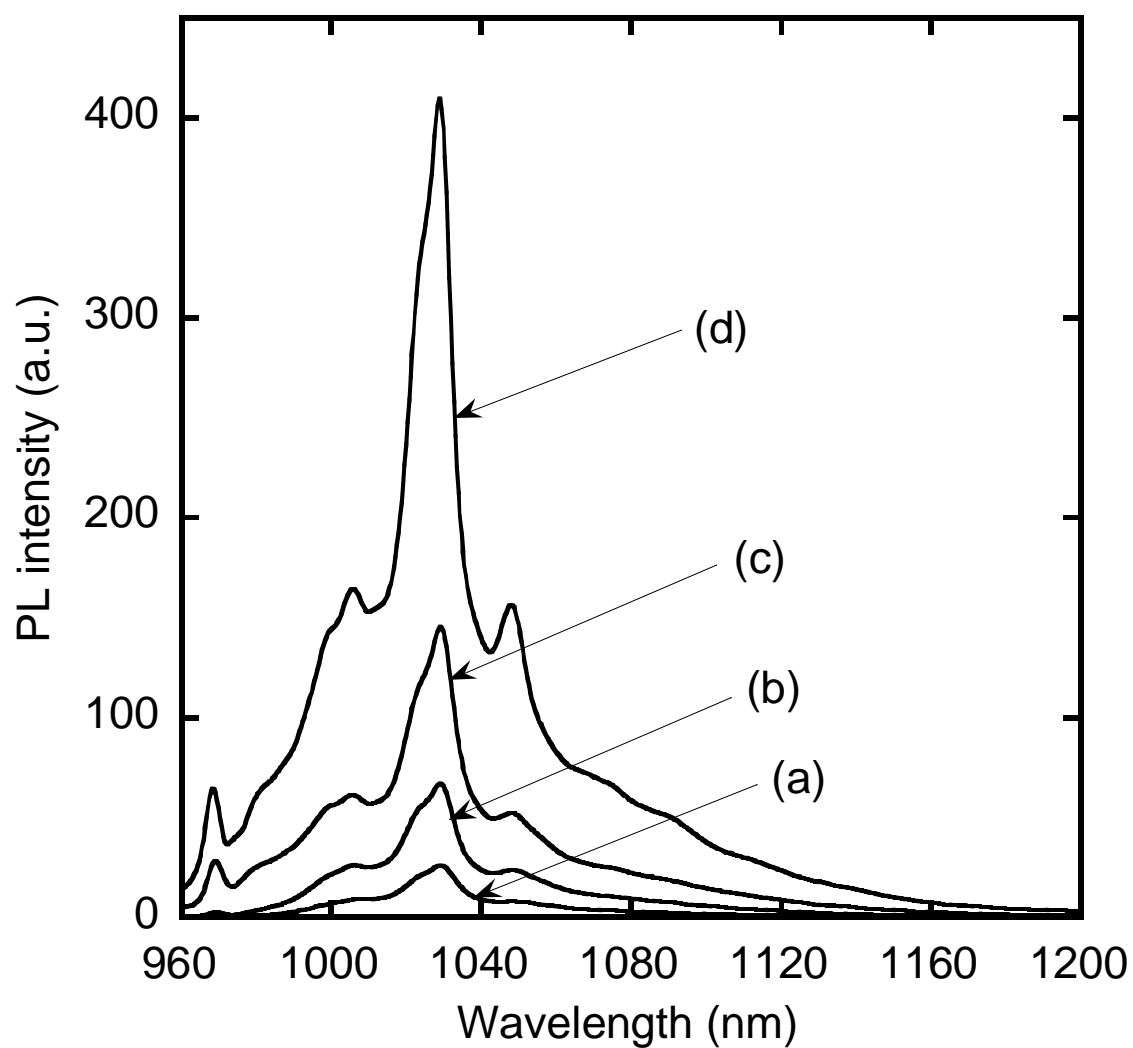


Fig.7.9 PL spectra of samples under irradiation of NIR laser ($\lambda_{\text{ex}} = 940 \text{ nm}$): (a) as-prepared, (b) calcined at $600 \text{ }^\circ\text{C}$, (c) calcined at $900 \text{ }^\circ\text{C}$, (d) calcined at $1300 \text{ }^\circ\text{C}$.

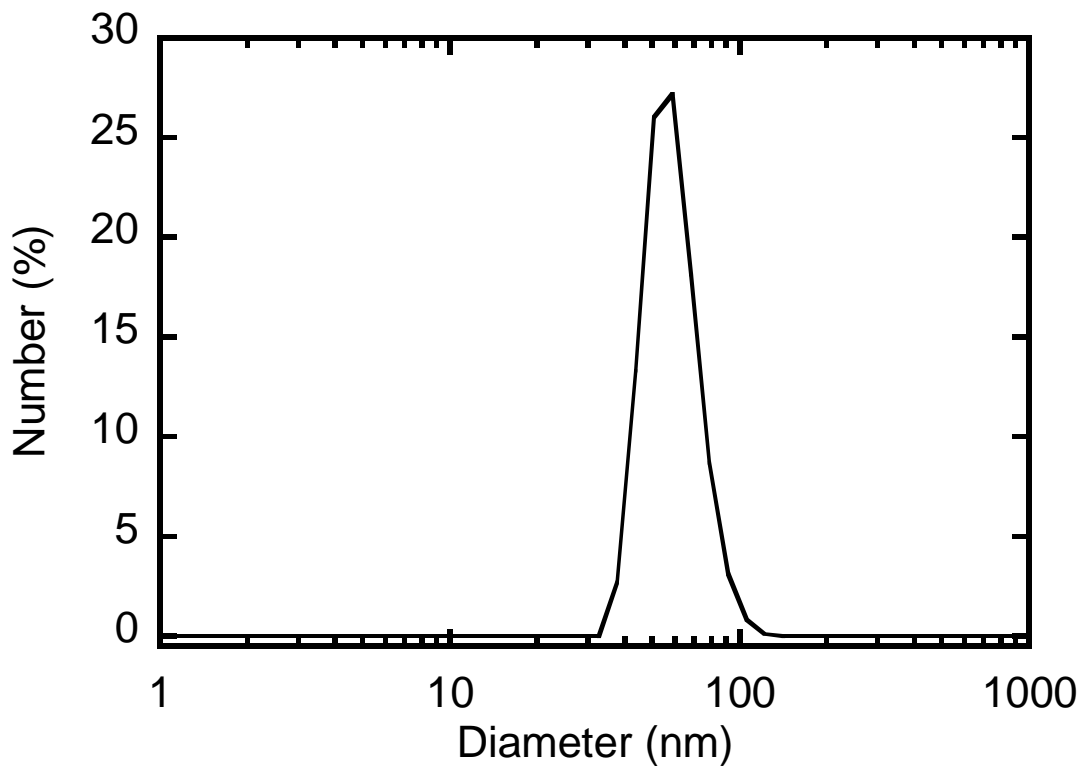


Fig.7.10 Particle size distribution measured by DLS for YAG:Yb³⁺ nanoparticles diluted in ultrapure water.

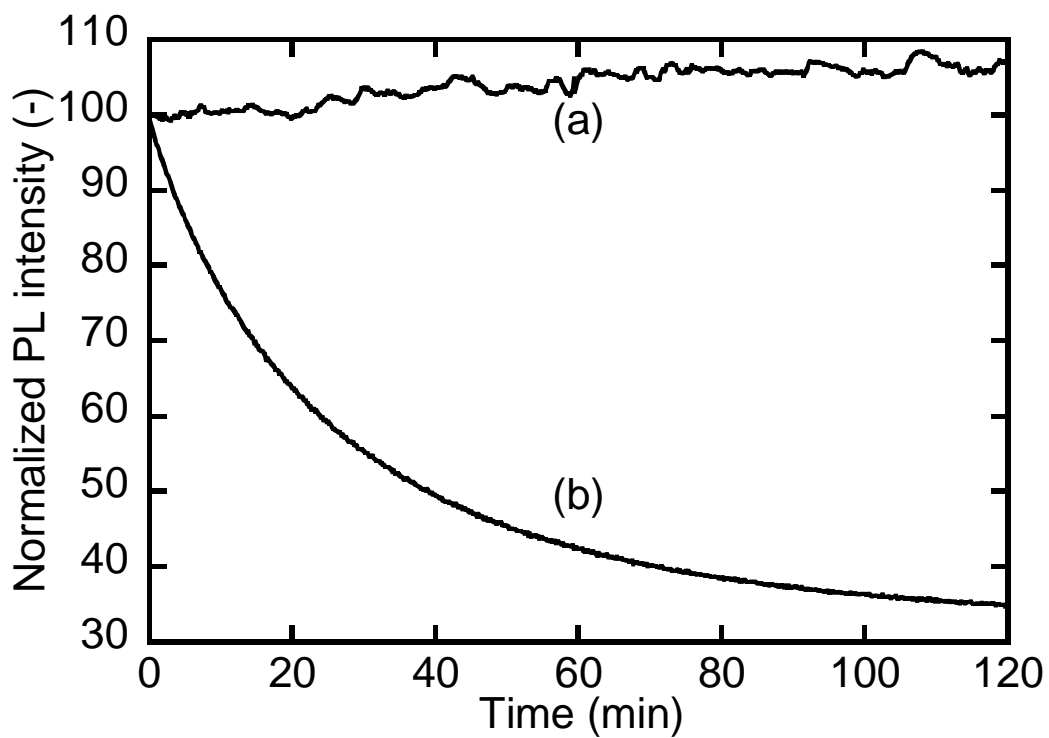


Fig.7.10 The change in the PL intensity with time. (a) YAG:Yb³⁺ nanoparticles under irradiation of NIR laser ($\lambda = 940$ nm); (b)Alexa680 under irradiation of 680 nm light..

7.4 結論

近赤外発光イオンである Yb³⁺に着目し、グリコサーマル法により YAG:Yb³⁺ ナノ粒子の作製を試みた。作製されたナノ粒子は 1 次粒子径が約 10nm であった。近赤外レーザーの照射により、近赤外領域に Yb³⁺の f-f 遷移に帰属される発光を示した。また、焼成によって表面に配位した有機物や格子欠陥が除去され、発光強度は増大した。純水に分散させた YAG:Yb³⁺ ナノ粒子に対し近赤外レーザーを 2 h 連続照射しても発光強度は低下せず、有機色素の持つ光退色の問題を解決した。

第7章の参考文献

- [7-1] V. R. Kondepati, H. M. Heise, J. Backhaus, "Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy", *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 125-139 (2008).
- [7-2] R. Weissleder, C. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov Jr., "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes", *Nat. Biotechnol.*, **17**, 375-378 (1999).
- [7-3] A. Backer, C. Hennesius, K. Licha, B. Ebert, U. Sukowski, W. Semmler, B. Wiedenmann, C. Grötzinger, "Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands" *Nat. Biotechnol.*, **19**, 327-331 (2001).
- [7-4] W. K. Moon, Y. Lin, T. O'Loughlin, Y. Tang, D. Kim, R. Weissleder, C. Tung, "Enhanced tumor detection using a folate receptor-targeted near-infrared fluorochrome conjugate", *Bioconjugate chem.*, **14**, 539-545 (2003).
- [7-5] C. Ran, P. Pantazopoulos, Z. Medarova, A. Moore, "Synthesis and testing of beta-cell-specific streptozotocin-derived near-infrared imaging probes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8998-9001 (2007).
- [7-6] W. M. Leevy, S. T. Gammon, H. Jiang, J. R. Johnson, D. J. Maxwell, E. N. Jackson, M. Marquez, D. Piwnica-Worms, B. D. Smith, "Optical imaging of bacterial infection in living mice using a fluorescent near-infrared molecular probe", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16476-16477 (2006).
- [7-7] K. Kim, M. Lee, H. Park, J. Kim, S. Kim, H. Chung, K. Choi, I. Kim, B. L. Seong, I. C. Kwon, "Cell-permeable and biocompatible polymeric nanoparticles for apoptosis imaging", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3490-3491 (2006).
- [7-8] V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V. Wang, R. Weissleder, "Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging", *Nat. Biotechnol.*, **23**, 313-320 (2005).
- [7-9] C. Wu, H. Barnhill, X. Liang, Q. Wang, H. Jiang, "A new probe using hybrid virus-dye nanoparticles for near-infrared fluorescence tomography", *Opt. Comm.*, **255**, 366-374 (2005).
- [7-10] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, "Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters", *Bioconjugate Chem.*, **4**, 105-111 (1993).
- [7-11] M. Hintersteiner, A. Enz, P. Frey, A. Jatton, W. Kinzy, R. Kneuer, U. Neumann, M. Rudin, M. Staufienbiel, M. Stoeckli, K. Wiederhold, H. Gremlich, "In vivo detection of amyloid- β deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe", *Nat. Biotechnol.*, **23**, 577-583 (2005).
- [7-12] K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino, D. Citterio, K. Suzuki, "Bright, color-tunable fluorescent dyes in the visible-near-infrared region", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1550-1551 (2008).

- [7-13] T. Deng, J. Li, J. Jiang, G. Shen, R. Yu, "Preparation of near-IR fluorescent nanoparticles for fluorescence-anisotropy based immunoagglutination assay in whole blood", *Adv. Func. Mater.*, **16**, 2147-2155 (2006).
- [7-14] X. He, J. Chen, K. Wang, D. Qin, W. Tan, "Preparation of luminescent Cy5 doped core-shell SFNPs and its application as a near-infrared fluorescent marker", *Talanta*, **72**, 1519-1526 (2007).
- [7-15] J. F. Bringley, T. L. Penner, R. Wang, J. F. Harder, W. J. Harrison, L. Buonemani, "Silica nanoparticles encapsulating near-infrared emissive cyanine dyes", *J. Colloid Interface Sci.*, **320**, 132-139 (2008).
- [7-16] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots", *Nat. Biotechnol.*, **22**, 969-976 (2004).
- [7-17] B. Ballou, B. C. Lagerholm, L. A. Ernst, M. P. Bruchez, A. S. Waggoner, "Noninvasive imaging of quantum dots in mice", *Bioconjugate Chem.*, **15**, 79-86 (2004).
- [7-18] J. M. Tsay, M. Pflughoeft, L. A. Bentolila, S. Weiss, "Hybrid approach to the synthesis of highly luminescent CdTe/ZnS and CdHgTe/ZnS nanocrystals", *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1926-1927 (2004).
- [7-19] W. Jiang, A. Singhal, J. Zheng, C. Wang, W. C. W. Chan, "Optimizing the synthesis of red- to near-IR-emitting CdS-capped CdTe_xSe_{1-x} alloyed quantum dots for biomedical imaging", *Chem. Mater.*, **18**, 4845-4854 (2006).
- [7-20] H. Qian, C. Dong, J. Peng, X. Qiu, Y. Xu, J. Ren, "High-quality and water-soluble near-infrared photoluminescent CdHgTe/CdS quantum dots prepared by adjusting size and composition", *J. Phys. Chem. C*, **111**, 16852-16857 (2007).
- [7-21] L. Bakueva, I. Gorelikov, S. Musikhin, X. S. Zhao, E. H. Sargent, E. Kumacheva, "PbS quantum dots with stable efficient luminescence in the near-IR spectral range", *Adv. Mater.*, **16**, 926-929 (2004).
- [7-22] W. W. Yu, J. C. Falkner, B. S. Shih, V. L. Colvin, "Preparation and characterization of monodisperse PbSe semiconductor nanocrystals in a noncoordinating solvent", *Chem. Mater.*, **16**, 3318-3322 (2004).
- [7-23] S. Hinds, S. Myrskog, L. Levina, G. Koleilat, J. Yang, S. O. Kelley, E. H. Sargent, "NIR-emitting colloidal quantum dots having 26% luminescence quantum yield in buffer solution", *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7218-7219 (2007).
- [7-24] B. Hyun, H. Chen, D. A. Rey, F. W. Wise, C. A. Batt, "Near-infrared fluorescence imaging with water-soluble lead salt quantum dots", *J. Phys. Chem. B*, **111**, 5726-5730 (2007).
- [7-25] A. Aharoni, T. Mokari, I. Popov, U. Banin, "Synthesis of InAs/CdSe/ZnSe core/shell1/shell2 structures with bright and stable near-infrared fluorescence", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 257-264 (2006).
- [7-26] S. Kim, J. P. Zimmer, S. Ohnishi, J. B. Tracy, J. V. Frangioni, M. G. Bawendi, "Engineering InAsP/InP/ZnSe III-V alloyed core/shell quantum dots for the

- NIR-infrared”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10526-10532 (2005).
- [7-27] J. P. Zimmer, S. Kim, A. Ohnishi, E. Tanaka, J. V. Frangioni, M. G. Bawendi, “Size series of small indium arsenide-zinc selenide core-shell nanocrystals and their application to in vivo imaging”, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2526-2527 (2006).
- [7-28] R. Xie, D. Battaglia, X. Peng, “Colloidal InP nanocrystals as efficient emitters covering blue to near-infrared”, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15432-15433 (2007).
- [7-29] P. P. Ghoroghchian, P. R. Frail, K. Susumu, T. Park, S. P. Wu, H. T. Uyeda, D. A. Kammer, M. J. Therien, “Broad spectral domain fluorescence wavelength modulation of visible and near-infrared emissive polymersomes”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15388-15390 (2005).
- [7-30] J. Zheng, C. Zhang, R. M. Dickson, “Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots”, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 077402-1~077402-4 (2004).
- [7-31] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, “Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods”, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115-2120 (2006).
- [7-32] Q. le M. de Chermont, C. Chaneac, J. Seguin, F. Pelle, S. Maitrejean, J. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, D. Scherman, “Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9266-71 (2007).
- [7-33] S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C. Tung, D. Tank, R. H. Austin, “In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*”, *Nano Lett.*, **6**, 169-172 (2006).
- [7-34] L. Wang, Y. Li, “Green upconversion nanocrystals for DNA detection”, *Chem. Comm.*, 2557-2559 (2006).
- [7-35] P. R. Diamente, R. D. Burke, F. C. J. M. van Veggel, “Bioconjugation of Ln-doped LaF nanoparticles to avidin”, *Langmuir*, **22**, 1782-1788 (2006).
- [7-36] F. D. Patel, E. C. Honea, J. Sopeth, S. A. Payne, R. Hutcheson, R. Equall, “Laser demonstration of Yb₃Al₅O₁₂ (YbAG) and materials properties of highly doped Yb:YAG”, *IEEE J. Quantum Electron.*, **37**, 135-144 (2001).
- [7-37] D. Fagundes-Peters, N. Martynyuk, K. Lünstedt, V. Peters, K. Petermann, G. Huber, S. Basun, V. Laguta, A. Hofstaetter, “High quantum efficiency YbGA-crystals”, *J. Lumin.*, **125**, 238-247 (2007).

第 8 章 マルチモーダルイメージング用(Gd, Y)AG:Yb³⁺ナノ粒子の作製と特性評価

8.1 緒言

8.1.1 マルチモーダルイメージングへの期待

蛍光物質を用いたイメージング技術は顕微鏡による細胞レベルでの観察に留まらず、一分子イメージング[8-1]のようなマイクロな領域から小動物イメージング[8-2]のようなマクロな領域に至るまで、その応用の範囲を広げてきた。

2000 年代に入り、蛍光を検出端としたイメージングプローブに次のステップとして期待されているのが、他のモダリティと複合化することによるマルチモーダルイメージングへの応用である。実用化されている例としては、PET (ポジトロン放出型断層撮影) と X 線 CT を組み合わせた映像化技術が挙げられる。PET-CT は、PET によって得られる生化学的な情報と X 線 CT によって得られる精細な 3 次元画像を重ね合わせることにより、総合的な診断が可能となっている[8-3]。このように複数のモダリティから得られた情報を相補的に取り扱うことで、単一のモダリティでは得ることが難しかった情報を引き出すことができる。また、複数のモダリティを単一のプローブに持たせることで、得られる画像の同一性を高めることができる[8-4]。

8.1.2 蛍光 - 磁性マルチモーダルプローブの用途

蛍光物質に新たに付与する機能として最も関心が高いのは磁性である。磁性は分離や誘導に用いられるだけでなく、MRI における造影剤としても重要な役割を果たしている。

MRI は、組織毎による ¹H の磁気的な緩和の違いを測定して、非侵襲に 3 次元形態画像を取得できる撮像法である。さらに、造影剤と呼ばれる磁性材料を投入し ¹H の磁気緩和に影響を与えることで、コントラストの向上や、造影剤による組織の標識を行うことができる。しかしながら、その分解能は細胞学的な観察には不向きであり、定量性も低く、装置が大掛かりである。一方で、蛍光を検出端とするイメージング技術は、これらの欠点の多くを解決することができるため、蛍光観察と MRI 造影を同時に行うことのできるハイブリッド材料に関する数多くの研究例が報告されている[8-4-29]。

また、このようなプローブは脳外科において大きな関心を集めている。脳腫瘍を観察するために頭蓋骨を透過する検出端が必要であり、現状では MRI が最適なイメージング法であると考えられている。しかしながら、腫瘍摘出の施術中に MRI よる観察を行うことは難しい。そこで、蛍光 - 磁性マルチモーダルプローブを用いることで、術前に MRI により施術方針を立て、施術中は蛍光による観察で腫瘍を摘出するという術式が提案されている[8-30, 31]。Kircher らは、ここで生体透過性の高い近赤外蛍光色素を用いることで、組織の内部に残存する腫瘍も発見することができるとしている[8-31]。

その他、磁性と蛍光とを組み合わせたプローブは、磁性粒子をトラッキングするための

検出端として蛍光を用いる場合が多い[8-32~37]。Zebli は、酸化鉄ナノ粒子と CdTe ナノ粒子を複合させたポリマービーズを作製し、外部磁場を印加することによって細胞へのポリマービーズの取り込みが促進されたことを蛍光により確認した[8-36]。また Cai らは、ニッケルナノ粒子を有するカーボンナノチューブに GFP を含む DNA プラスミド担持させ、外部磁場によって細胞内へ導入したのちに、GFP の発現を確認した[8-37]。

光学的特性を蛍光に限定せず光学 - 磁性ハイブリッド材料まで広げると、磁性ナノ粒子と感光性発熱ポリマーを用いた治療用プローブ[8-39]や、Au ナノ粒子の表面プラズモン吸収と Fe₃O₄ ナノ粒子の MRI 造影機能とのハイブリッド材料[8-40]などの例がある。

8.1.3 蛍光 磁性マルチモーダルプローブの複合化の方法による分類

蛍光と磁性を複合化した研究報告は多く、その複合化の方法は次の 5 つに大別される。

1. 蛍光特性と磁気特性を同時に併せ持つ単一の材料
2. 蛍光特性を持つ材料と磁気特性を持つ材料との複合化
3. 別のマトリクスを利用した、蛍光と磁気特性を持った材料の集積
4. 磁性粒子をコアとし蛍光特性を持つ材料をシェルとするコアシェル構造
5. 蛍光粒子をコアとし磁気特性を持つ材料をシェルとするコアシェル構造

1. は、蛍光特性と磁気特性を併せ持つような材料であり、1 つの分子内あるいは粒子内に常磁性イオンと発光イオンを含有している。Zhang らは Mn³⁺ を中心金属として有する水溶性ポルフィリンを合成し、蛍光強度や MR シグナルが Zn 濃度に対して応答することを確かめた [8-26]。ナノ粒子を用いた例では、CdS:Mn/ZnS ナノ粒子 [8-4, 10] や LaVO₄:Eu³⁺ ナノロッド [8-41] が挙げられ、ここで Mn²⁺ や Eu³⁺ は発光中心として機能するだけでなく、磁気特性を与える常磁性イオンとしても機能している。一方、Eu³⁺ や Tb³⁺ をドーブした Gd - 有機分子複合ナノロッド [8-17] や発光性ランタノイドイオンをドーブした FePt ナノ粒子 [8-42] では、母体そのものが磁気的な特性を有している。

2. の方法は、共有結合的に 2 種類の材料を組み合わせたものである。Hüber らは Gd 錯体と有機色素であるローダミンを組み合わせた分子を設計し、in vitro の実験において強い蛍光と MR シグナルを得た [8-5]。Gu らは FePt/CdS コアシェルナノ粒子を形成したのちにアニーリングを行い、ダンベル型の CdS-FePt 二量体を合成した [8-43]。Choi らはカーボンナノチューブと Fe₂O₃ ナノ粒子を複合化し、近赤外蛍光観察と MR 造影を行った [8-25]。

3. の方法は、複数の材料をそれぞれ独立して合成したのちに、何らかのホスト材料を介して集積させたものである。集積の方法として、 dendrimer 粒子表面に Gd 錯体と有機色素 Cy5.5 を共有結合的に固定するような方法 [8-15] もあるが、このような複雑な化学反応を伴う方法を用いなくとも、比較的簡便な方法で集積を行うことができる。その 1 つが交互吸着を利用する方法 [8-21, 36] である。Zebli らは、メラミンホルムアルデヒドポリマー粒子に、静電的な吸着を利用して Fe₃O₄ ナノ粒子と CdTe ナノ粒子を被覆してマイクロ

カプセルを調整し、外部磁場の印加によってマイクロカプセルの細胞への取り込みが促進されたことを蛍光により確認した[8-36]。もう 1 つの方法はビーズ状のマトリクス中に機能性の分子・粒子を埋包する方法[8-38, 44]である。Sathe らは、メソポーラスなシリカビーズの細孔に Fe₃O₄ ナノ粒子と量子ドットを取り込ませて二機能性ビーズを作製し、蛍光顕微鏡による観察と外部磁場による操作が可能であることを示した[8-38]。また、Kamaly らは Gd 錯体を結合させた脂質を利用してリポソームを作製し、内部へ有機色素ローダミンを取り込ませることで、蛍光観察と MR 造影が可能であることを示した[8-28]。

4.の方法で合成される粒子は、主に蛍光による磁性粒子のトラッキングを目的として作製されることが多い。MRI 造影剤としての利用を目的とする場合は、磁性コア周囲を覆う蛍光シェルが磁性コアと外部の水分子との相互作用を妨げるため、専ら T₂ 造影剤としての機能を期待されているが、まれに T₁ 造影剤として機能する例もある[8-20]。磁性コアとしては酸化鉄ナノ粒子が一般的であるが、Co ナノ粒子[8-35]や Gd₂O₃ ナノ粒子[8-20]をコアに用いている例もある。

シェル層に用いられる蛍光物質は有機色素[8-24, 45]だけでなく、錯体[8-13,46]、量子ドット[8-34, 35]、その他の無機蛍光体[8-33,46]など幅広い。シェル層の形成は、磁性コアに直接蛍光材料を固定する方法[8-13, 32]や、一旦デキストランや PEG、シリカなどで被覆したのちに蛍光材料を固定する方法[8-6, 20, 30]がある。その他、Lu らのように Fe₃O₄ ナノ粒子周囲にシリカ層を形成すると同時に有機色素 FITC を取り込ませる方法[8-24]や、Lu らのように、酸化鉄ナノ粒子コアを蛍光体である NaYF₄:Er,Yb 自身でコーティングする方法[8-33]もある。

5.の方法で合成される粒子は、4.の方法とは逆に最外層に磁性材料が固定される。ここで利用される磁性材料のほとんどは Gd 錯体であり、最外層の Gd³⁺が外部の水分子と相互作用することによる T₁ 短縮効果が期待されている。Lee らが行ったように、Fe₃O₄ ナノ粒子を最外層に固定して T₂ 短縮効果を狙う例は少ない[8-12]。蛍光体コア粒子として用いられるのは錯体含有するシリカナノ粒子[8-9, 18]や量子ドット[8-14, 23]などである。

8.1.4 研究目的

本章では、前述の分類で 1.にあたる複合法により、MR 造影能と近赤外蛍光を示す多機能性ナノ粒子の作製を試みた。具体的には、磁性を与える常磁性イオンとして不対電子を 7 つ有する Gd³⁺、近赤外発光イオンとして Yb³⁺に着目し、これら 2 種類のイオンを同時に含有する YAG ナノ粒子をグリコサーマル法により合成した。

2 つのイオンを共ドーブする前に、まず Gd³⁺のみを含む母体ナノ粒子を 2 種類のアプローチにより作製し、粒子径や MR 造影能について検討した。アプローチの 1 つは Gd³⁺および Y³⁺が均一にガーネット構造中に分布した固溶体ナノ粒子の作製であり、もう 1 つは 2 段階グリコサーマル処理によって表面に Gd を局在化させた YAG ナノ粒子の作製である。

これらの結果を踏まえ、最後に Yb³⁺と Gd³⁺が共された YAG ナノ粒子の作製を行い、近赤外蛍光および MR 造影の両機能を併せ持つマルチモーダルイメージングプローブとして機能するかどうかを検討した。

8.2 実験方法

8.2.1 試薬

第 8 章で用いた試薬の一覧を Table 8-1 にまとめた。

Table 8-1 List of reagents.

Reagent	Purity	FW	Maker
1,4-butanediol	>97.0%	90.12	Kanto Kagaku
Aluminium isopropoxide	>99.9%	204.24	Kanto Kagaku
Gadolinium acetate tetrahydrate	>99.9%	406.44	Wako
Ytterbium (III) acetate tetrahydrate	>99.9%	422.23	Wako
Yttrium acetate tetrahydrate	>99.99%	338.10	Kanto Kagaku

8.2.2 試料の合成方法

8.2.2.1 GAG-YAG 固溶体ナノ粒子の合成

オートクレーブ(耐圧硝子工業, TVS-120-N2)に酢酸イットリウム 4 水和物、酢酸ガドリニウム(III)4 水和物、およびアルミニウムトリイソプロポキシドを Table 8-2 に従って加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 日静置して粗大粒子を沈降させた。

得られた分散液を遠心沈殿管に注ぎ、メタノール変性アルコールを添加した。この分散液を遠心分離(10000 rpm, 30 min)することで粉体を沈降させ、上澄みを除去した。この洗浄行程を合計 3 回行った後、送風乾燥(50 °C)することで粉体試料を得た。一連の手順を Fig.8.1 のフローチャートに示す。

Table 8-2 Quantity of reagents.

Sample	Yttrium acetate tetrahydrate [g (mmol)]	Gadolinium acetate tetrahydrate [g (mmol)]	Aluminium isopropoxide [g (mmol)]
Gd0mol%	7.5 (2.54)	-	12.50 (2.55)
Gd25mol%	1.902 (5.63)	0.762 (1.87)	12.50 (2.55)
Gd50mol%	1.268 (3.75)	1.524 (3.75)	12.50 (2.55)
Gd75mol%	0.634 (1.87)	2.286 (5.63)	12.50 (2.55)
Gd100mol%	-	3.048 (7.5)	12.50 (2.55)

8.2.2.2 Gd-YAG ナノ粒子および Gd-YAG:Yb³⁺ ナノ粒子の作製

YAG ナノ粒子もしくは YAG:Yb³⁺ ナノ粒子表面に Gd³⁺ を偏析させる目的で、まずコアとなる粒子を作製したのちに Gd 原料を投入して再度オートクレーブ処理を行うという、2 段階処理を行った。

まずコアとなる粒子を作製した。オートクレーブに酢酸イットリウム 4 水和物、酢酸イ

ットリウム(III)4 水和物およびアルミニウムトリイソプロポキシドを Table 8-3 に従って加え、溶媒である 1,4-ブタンジオール 63.6 mL を投入した。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 日静置して粗大粒子を沈降させた。

Table 8-3 Quantity of reagents.

Sample	Yttrium acetate	Ytterbium acetate	Aluminium
	tetrahydrate [g (mmol)]	tetrahydrate [g (mmol)]	isopropoxide [g (mmol)]
YAG	7.5 (2.54)	-	12.50 (2.55)
YAG:Yb ³⁺	7.125 (2.41)	0.375 (0.16)	12.50 (2.55)

得られた分散液 25 mL を 1,4-ブタンジオール 38.6 mL と混合し、さらに酢酸ガドリニウム 4 水和物 0.25 mmol (100 mg)を加え、再度オートクレーブにセットした。攪拌機による攪拌(300 rpm)のもと、1.5 h で室温から 300 °C まで昇温してそのままの温度で 2 h 保持した。反応終了後、室温まで空冷し分散液を得た。分散液は 1 日静置して粗大粒子を沈降させた。

得られた分散液を遠心沈殿管に注ぎ、メタノール変性アルコールを添加した。この分散液を遠心分離(10000 rpm, 30 min)することで粉体を沈降させ、上澄みを除去した。この洗浄行程を合計 3 回行った後、送風乾燥(50 °C)することで粉体試料を得た。一連の手順を Fig.8.2 のフローチャートに示す。

さらに、YAG をコアとして 2 段階グリコサーマル処理を行った試料(Gd-YAG ナノ粒子)については得られた粉体試料の焼成を行った。アルミナボートに投入した粉体試料を、横型管状炉にて昇温速度 10 K/min で所定の温度まで昇温し、その後 2 h 焼成した。焼成は空気フロー(300 mL/min)下で行った。

8.2.3 試料の評価方法

第 2 章で述べた評価のうち、FE-TEM, FE-SEM, XRD, XRF, DLS, MRI, NIR-PL による評価を行った。

8.3 結果および考察

8.3.1 GAG-YAG 固溶体ナノ粒子

8.3.1.1 FE-SEM による粒子径の算出と DLS による純水中での粒度分布測定

Fig.8.3 に FE-SEM で観察した GAG-YAG 固溶体ナノ粒子を示す。全ての Gd 仕込み濃度において球状の粒子が得られている。また、画像から算出した数平均粒子径を Table 8-4 にまとめた。Gd 仕込み濃度が増大するに従って数平均粒子径は増大した。また試料を超純水に分散させて DLS によって粒度分布を測定した結果を Fig.8.4 に、測定により得られた平均粒子径を Table 8-4 にまとめる。SEM の観察結果と同様、Gd 仕込み濃度が増大するに従い粒子径が増大する傾向がみられた。

Table 8-4 Properties of GAG-YAG nanoparticle.

Sample	d [nm] ¹⁾	d [nm] ²⁾	Gd/(Gd+Y) [%]
Gd0mol%	56.0	45.0	0
Gd25mol%	64.6	49.2	23.5
Gd50mol%	74.8	67.8	50.2
Gd75mol%	97.3	81.3	73.1
Gd100mol%	125.1	126.9	100

1) calculated from SEM images, 2) measured by DLS

Fig.8.5 に示すように、反応中の圧力は Gd 仕込み濃度が高いほど、 $t = 2$ h からの曲線の傾きが緩やかである。この圧力上昇は反応の進行に伴って生成する低沸点成分の増大に起因するものである。すなわち、Gd 仕込み濃度が高いほど反応の進行が遅いことを示している。この原因は、1)酢酸イットリウムよりも酢酸ガドリニウムの加水分解速度が遅い、もしくは、2)イットリウムを含む前駆体よりもガドリニウムを含む前駆体の方がガーネットへ結晶化する速度が遅い、のいずれかである。もし、1)であった場合、先に加水分解されるイットリウムが優先して反応するため、合成された試料の元素比は仕込みよりもイットリウムが優勢になるはずである。しかしながら、8.3.1.2 で述べるように XRF による測定結果は仕込み比とよく対応し、両酢酸塩はほぼ同時に加水分解していることが示唆される。そのため、圧力変化の違いの原因としては 2)が該当する。Inoue らも目的生成物の単位格子が大きいほど核生成が抑制されることを報告している [8-48]。つまり、この実験においても Y^{3+} (115.9 pm) よりもイオン半径の大きな Gd^{3+} (119.3 pm) を多量に含む前駆体では核生成が抑制され、粒径が増大したと考えられる。

8.3.1.2 XRF による Gd 固溶量の定量

XRF により測定した Gd/(Y+Gd) を Table 8-4 にまとめる。試料中の Gd と Y の元素比は仕込み比をよく反映していた。

8.3.1.3 XRD による結晶構造の同定

Fig.8.6 に得られた試料の XRD プロファイルを示す。全てのピークはガーネット構造に帰属され、副生成物の生成は確認されなかった。また、Fig.8.7 に第一強線である (420) ピークを示す。Gd 仕込み濃度の増大に伴いピークは低角度側へシフトし、面間隔は増大した。これは、イオン半径の大きい Gd^{3+} がイオン半径の小さな Y^{3+} と置換固溶することに起因する。また、ショルダーやピークの分裂が確認されないことから、GAG と YAG は二層に分かれて存在しているのではなく、固溶体として存在していると推察される。

8.3.1.4 MRI 測定による造影能評価

Fig.8.8 に合成した試料をアガロースゲルに分散させて撮影した MR 画像を示す。

まず、T₁強調画像に着目する。最も Gd 仕込み濃度が低い Gd25mol%の試料では、アガロースゲルへ分散させる粒子を増加させてもシグナル強度は変化しなかった。他の 3 つの試料では、アガロースゲルへ分散させた粒子が増大するに従ってシグナル強度が減少した。Gd 仕込み濃度について着目すると、Gd 仕込み濃度が高い試料ほど同じ試料濃度でもシグナル強度は大きく減少した。いずれの試料についても、T₁造影剤に期待される“シグナル強度を増大させる”という効果は観察されなかった。

次に、T₂強調画像に着目すると、いずれの試料においてもアガロースゲルへ分散させた粒子が増大するに従ってシグナル強度は減少した。Gd 仕込み濃度について着目すると、Gd 仕込み濃度が高い試料ほど同じ試料濃度でもシグナル強度は大きく減少した。これは、Gd 仕込み濃度が高い試料ほど強い T₂短縮効果を持つことを示している。

測定により求めた緩和時間 T₁, T₂ の逆数を Gd 濃度に対してプロットした結果を Fig.8.9 に示し、さらにその直線の傾きより求めた緩和能 R₁, R₂の結果を Table 8-5 にまとめた。ここで、試料中の Gd 濃度は XRF による実測値を用いた。

Table 8-5 Values of R₁ and R₂ of GAG-YAG nanoparticles.

	R ₁ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	R ₂ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	R ₂ /R ₁
Gd25mol%	-0.04	14.3	-398
Gd50mol%	0.48	36.1	75.3
Gd75mol%	0.43	51.8	119.6
Gd100mol%	-	62.1	-

まず、R₁ 値に着目する。Gd25mol%の試料から得られたプロットの傾きはほぼ 0 であり、T₁短縮効果は認められない。Gd50mol%と Gd75mol%の試料から得られたプロットの傾きはそれぞれ 0.48, 0.43 であり、T₁短縮効果は認められたものの、その効果は弱かった。Gd100mol%の試料においては、T₂短縮効果が優勢となった結果、T₁短縮効果について有効なデータを得ることができなかった。

次に、R₂ 値に着目する。Gd 仕込み濃度が増大するとともに R₂ 値は増大した。これは Gd 仕込み濃度が高いほど粒子から発生する局所磁場が強いことを示している。実際に Gd25mol%と Gd100mol%の試料について VSM による磁気特性評価を行った結果、Fig.8.10 に示すように Gd100mol%の試料は Gd25mol%の試料よりも磁化率が大きいことが確認された。また、R₂/R₁に着目すると、全ての試料において大きな R₂/R₁ 値を示していた。これはいずれの試料についても T₁造影剤の機能がほとんど発現していないことによる。

これらの結果は以下のように説明できる。Gd 仕込み濃度の低い試料では、造影剤粒子の表面で水分子と相互作用することのできる Gd³⁺が少ないため、T₁造影剤として機能せず、むしろ T₂造影剤として機能する。一方で、Gd 仕込み濃度の高い試料では粒子表面の Gd³⁺量も増加し、粒子表面の Gd³⁺と水分子との相互作用も増加すると考えられるが、それと同時に粒子の磁化率も増大する。その結果、内部 Gd³⁺の磁化率効果によるシグナルの減衰が優勢となり、Gd 仕込み濃度の高い試料は T₁造影剤として機能しなかったと考えられ

る。また、Gd 仕込み濃度の増大に伴い粒子径も増大しているが、このような比表面積の減少も T_1 造影剤としての機能を減退させた原因として考えられる。粒子径と T_1 短縮効果の関係については、MnO ナノ粒子で同様の傾向が報告されている [8-49]。

8.3.2 Gd-YAG ナノ粒子

8.3.2.1 FE-SEM による 1 次粒子の観察

Fig.8.11 に合成した試料の FE-SEM 像を示す。画像から算出された粒子径は Gd 添加前が 55.5 nm で標準偏差が 7.2 nm、Gd 添加後が 56.0 nm で標準偏差が 10.0 nm であった。Gd の添加による粒子径の増大は確認されなかった。

8.3.2.2 XRD による結晶構造の同定

Fig.8.12 に合成した試料の XRD プロファイルを示す。Gd 添加処理によっても副生成物の生成による新たなピークの出現は観察されなかった。また第一強線である(420)ピークに着目すると、Fig.8.13 に示すように Gd 添加処理によりピークは低角度側へシフトし、面間隔は増大した。粒子径に顕著な変化が観察されなかったことと併せて考えると、Gd 添加処理によりイオン半径の大きな Gd イオンが YAG ナノ粒子の Y イオンと置換固溶していると示唆される。

8.3.2.3 MRI 測定による造影能評価

Fig.8.14 に合成した試料をアガロースゲルに分散させて撮影した MR 画像を示す。 T_1 強調画像では、Gd-YAG ナノ粒子の添加量が増大するのに伴いシグナル強度が増大した。これは Gd-YAG ナノ粒子が T_1 造影剤として機能していることを示している。一方で、 T_2 強調画像では、Gd-YAG ナノ粒子の投入量の増大に伴いシグナル強度は減少し、 T_2 短縮効果が認められた。

測定により求めた緩和時間 T_1 , T_2 の逆数を Gd 濃度に対してプロットした結果を Fig.8.15 に示した。直線の傾きより求めた緩和能 R_1 , R_2 の値はそれぞれ、5.2 , 44.2 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ である。これは同条件で測定された市販 Gd 錯体 (Gd-DOTA) の R_1 , R_2 の値 4.1 , 4.9 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ [8-20] よりも大きな値であり、造影剤として有用であることが確認された。

ここで、 R_1 値について Gd-YAG ナノ粒子と 8.3.1 の Gd25mol% の試料と比較する。XRF で測定した Gd25mol% の試料の Gd/(Gd+Y)比は Table 8-4 に示すように 23.5mol% であった。一方、同様に測定した Gd-YAG ナノ粒子の Gd/(Gd+Y)比は 7.0mol% であり、Gd25mol% の試料の約 30%しか Gd を含んでいない。しかしながら、MRI 測定では、Gd25mol% の試料では観測されなかった T_1 短縮効果が Gd-YAG ナノ粒子で観測されている。もし Gd-YAG ナノ粒子において Gd 原子が均一に固溶していると仮定すると、Gd 含有量が Gd25mol% の試料よりも少ない Gd-YAG ナノ粒子では粒子表面で水分子と相互作用できる Gd 量はより少なくなるため、 T_1 短縮効果を示さないはずである。これらの考察から、Gd-YAG ナノ粒子では Gd^{3+} が粒子表面に偏析していると考えられる。

8.3.3 Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子

8.3.2 で Gd-YAG ナノ粒子が T₁ 造影剤として利用可能であることが確認された。以下ではさらに蛍光特性を付与する目的で、YAG ナノ粒子の代わりに近赤外発光イオンである Yb³⁺を含む YAG:Yb³⁺ナノ粒子をコア粒子として用いて同様の実験を行い、マルチモーダルイメージング用材料としての可能性を検討した。

8.3.3.1 FE-TEM および FE-SEM による粒子観察

Fig.8.16 に Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子の FE-TEM 像を示す。1 次粒子径が約 10 nm の球状粒子が得られた。Fig.8.17 に FE-SEM による観察結果を示す。画像から算出した数平均粒子径は 61.6 nm、標準偏差が 12.9 nm であった。

8.3.3.2 DLS による粒度分布測定

Fig.8.18 に Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子を超純水に分散させ、DLS によって測定した粒度分布を示す。平均流体力学直径は 64.7 nm で標準偏差が 17.4 nm であり、沈殿を起こすことなく分散した。

8.3.3.3 MRI 測定による造影能評価

Fig.8.19 に Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子をアガロースゲルに分散させて撮影した MR 画像を示す。Gd-YAG の場合と同じく、ゲル中の試料濃度の増大に伴って、T₁ 強調画像ではシグナルの増大、T₂ 強調画像では T₂ シグナル減少が観察された。

測定により求めた緩和時間 T₁, T₂ の逆数を Gd 濃度に対してプロットした結果を Fig.8.20 に示す。直線の傾きより求めた緩和能 R₁, R₂ の値はそれぞれ、5.6, 30.4 s⁻¹·mM⁻¹ であった。これらの値は 8.3.2.3 とで考察した Gd-YAG ナノ粒子の値とほぼ同等であり、YAG ナノ粒子と場合と同様に、Gd イオンは YAG:Yb³⁺ナノ粒子の表面に偏析していることが示唆される。

8.3.3.4 近赤外レーザー励起による NIR-PL 測定

Fig.8.21 に、近赤外レーザー (λ = 940 nm) を照射しながら測定した PL スペクトルを示す。波長 969, 1030 nm に Yb³⁺の ²F_{5/2} → ²F_{7/2} 遷移に対応する近赤外発光が観測された。第 7 章では YAG:Yb³⁺ナノ粒子に対して焼成を行い、発光キラーである有機物や表面欠陥を除去して発光強度を増大させたが、Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子には用いることができない。なぜなら、表面に偏析している Gd イオンが熱拡散により粒子内部へと拡散し、T₁ 造影剤としての機能を失ってしまうためである。焼成を用いないで有機物を除去する方法としては、UV オゾン処理などを実施すれば、さらに PL 強度を増大させることができると推察される。

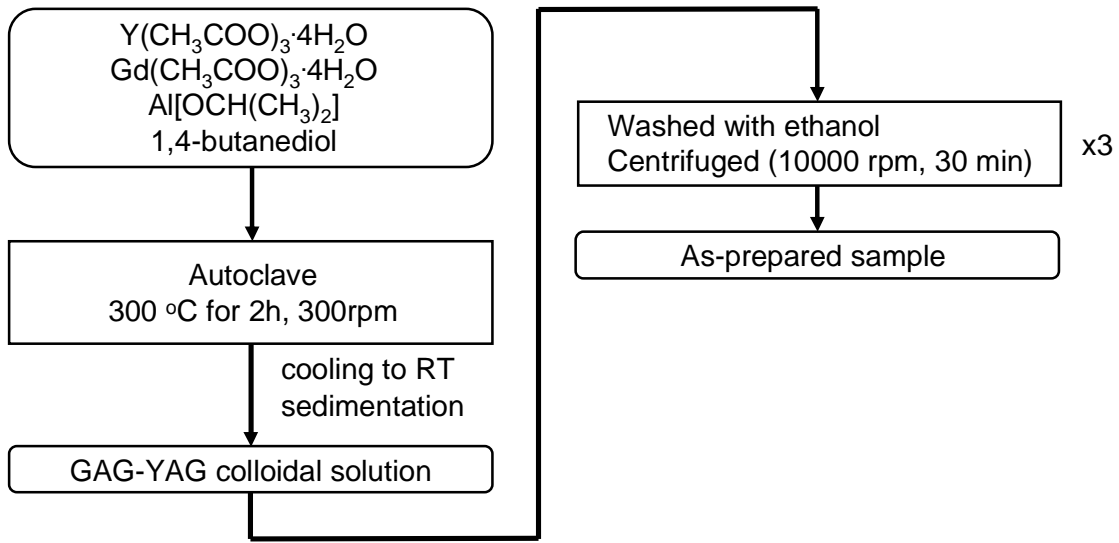


Fig.8.1 Schematic representation of the preparation of GAG-YAG nanoparticles.

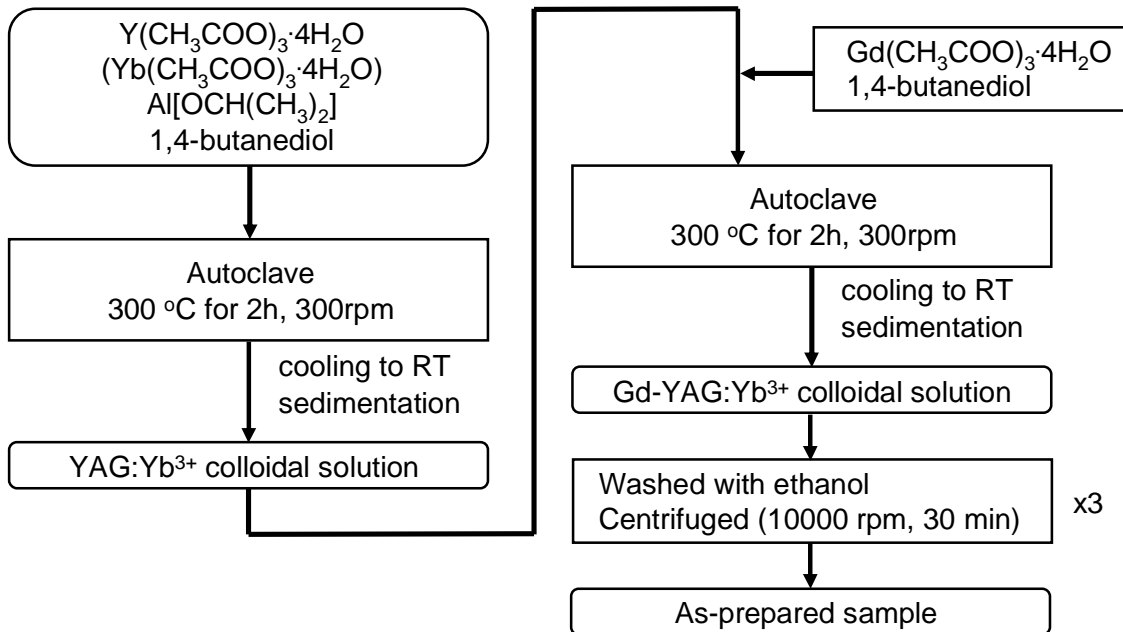


Fig.8.2 Schematic representation of the preparation of Gd-YAG (:Yb³⁺) nanoparticles.

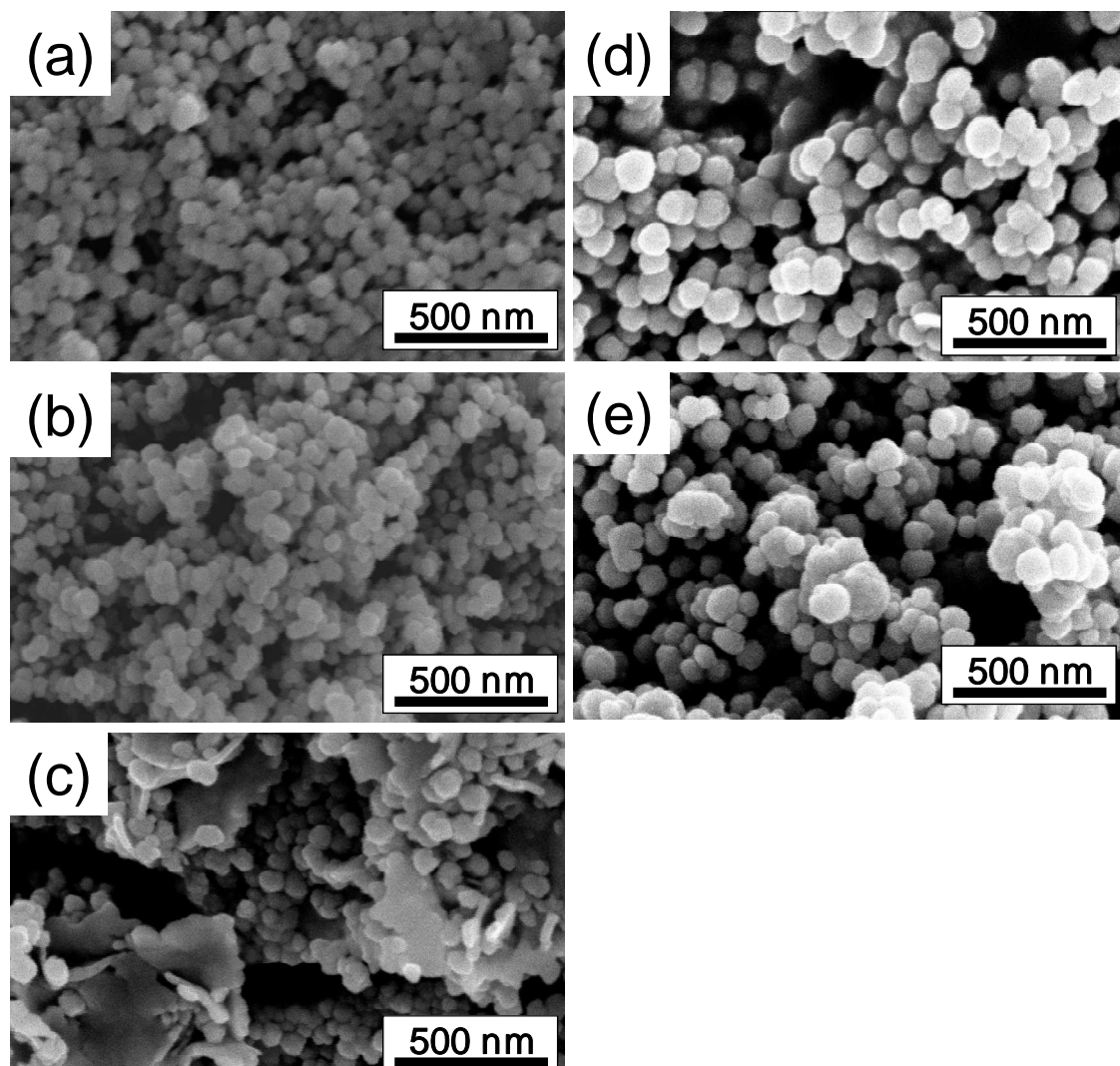


Fig.8.3 FE-SEM images of GAG-YAG nanoparticles: (a) Gd25mol%, (b) Gd50mol%, (c) Gd75mol%, (d) Gd100mol%.

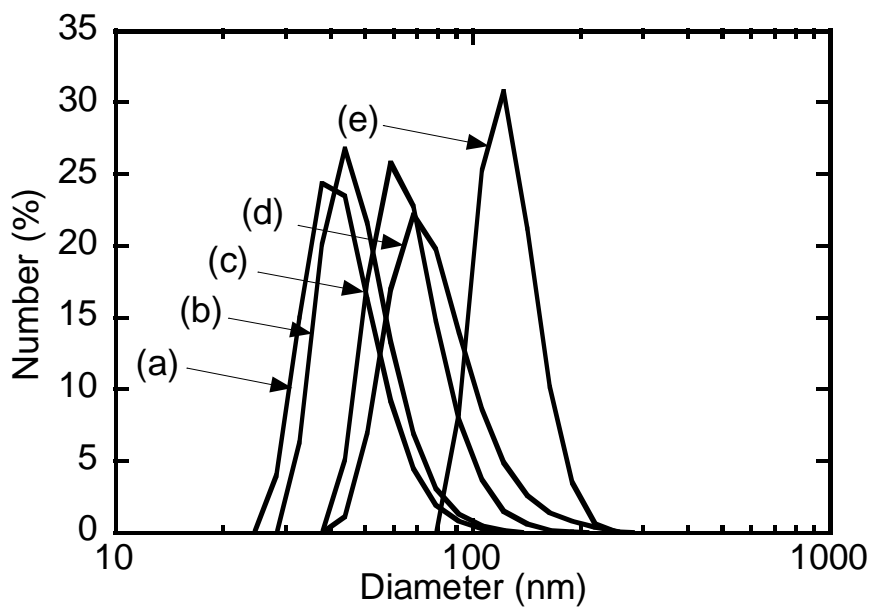


Fig.8.4 Size distribution of GAG-YAG nanoparticles dispersed in ultrapure water: (a) Gd25mol%, (b) Gd50mol%, (c) Gd75mol%, (d) Gd100mol%.

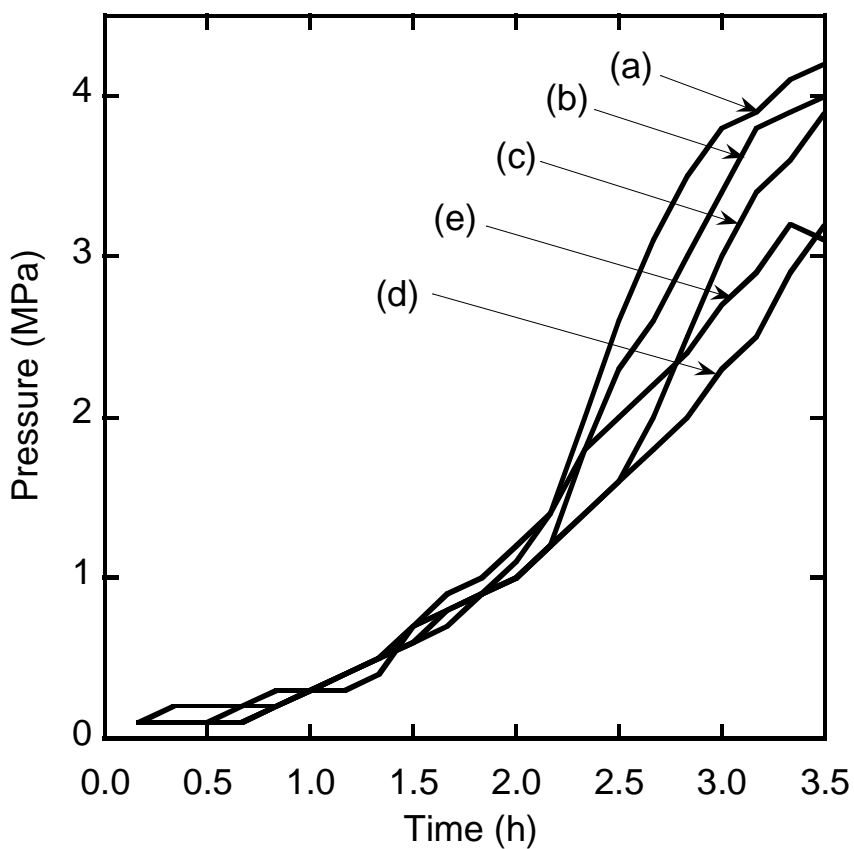


Fig.8.5 Plots of temperature and pressure vs time: (a) Gd0mol%, (b) Gd25mol%, (c) Gd50mol%, (d) Gd75mol%, (e) Gd100mol%.

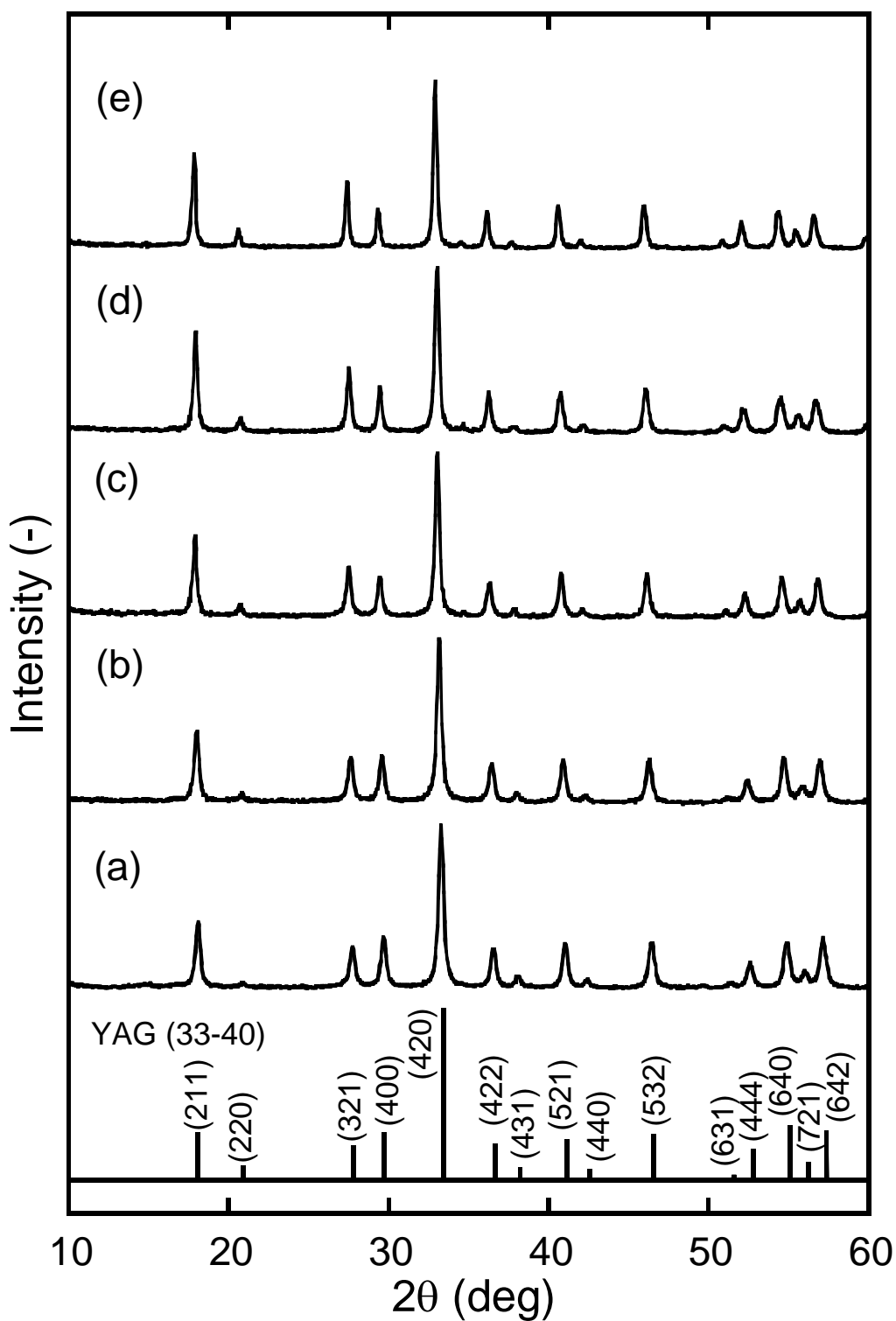


Fig.8.6 XRD profiles of GAG-YAG nanoparticles: (a) Gd0mol%, (b) Gd25mol%, (c) Gd50mol%, (d) Gd75mol%, (e) Gd100mol%.

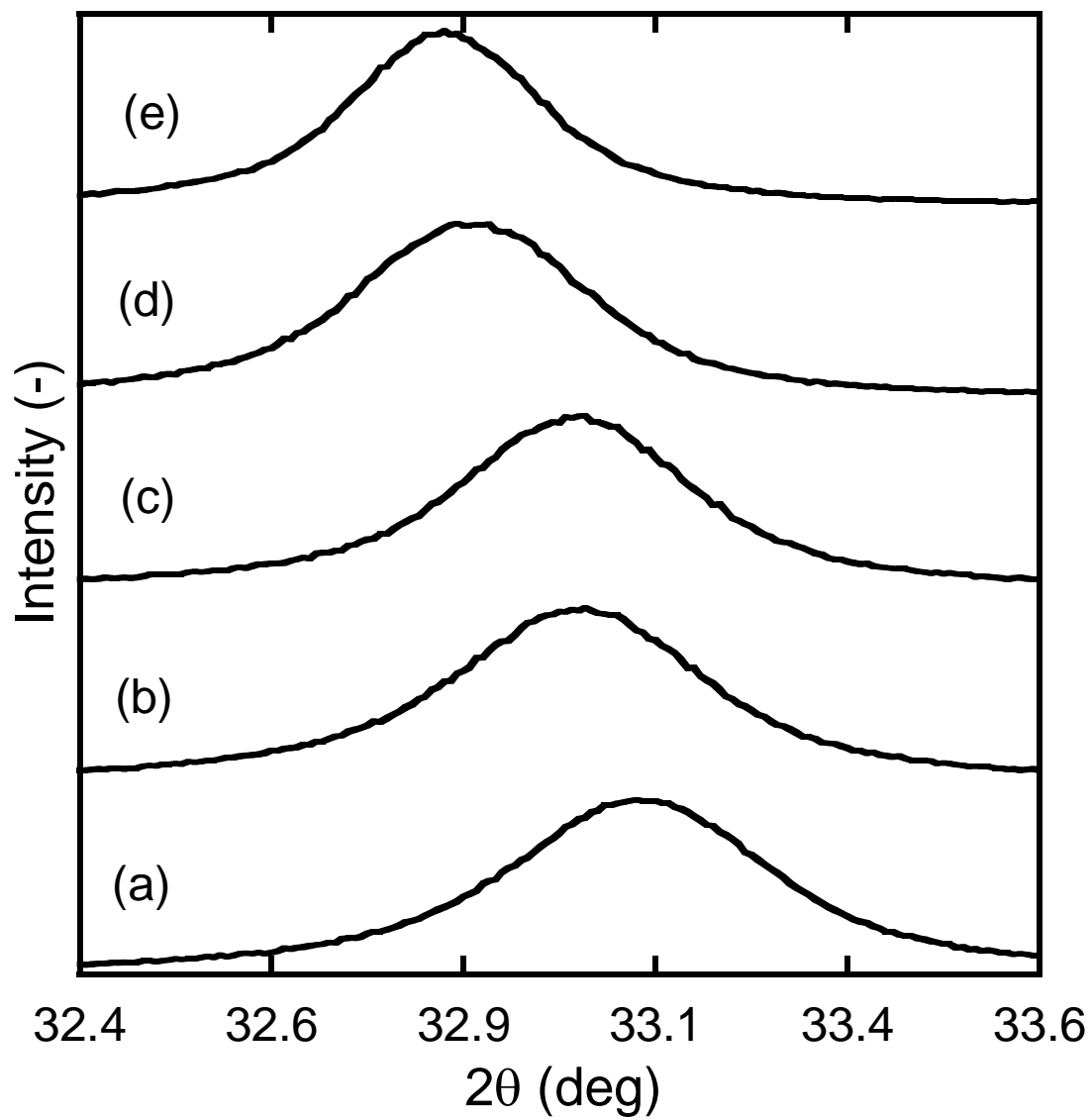


Fig.8.7 XRD peaks of (420) plane: (a) Gd0mol%, (b) Gd25mol%, (c) Gd50mol%, (d) Gd75mol%, (e) Gd100 mol%.

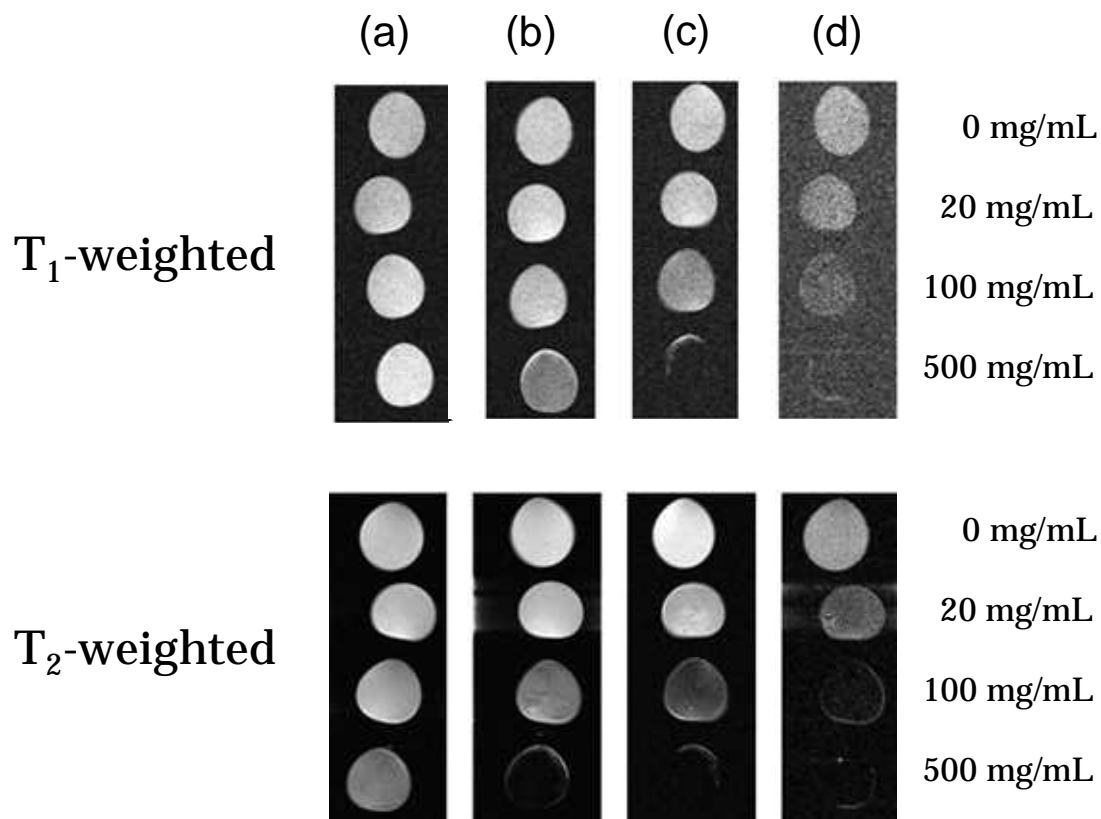


Fig.8.8 MR images: (a) Gd25mol%, (b) Gd50mol%, (c) Gd75mol%, (d) Gd100mol%.

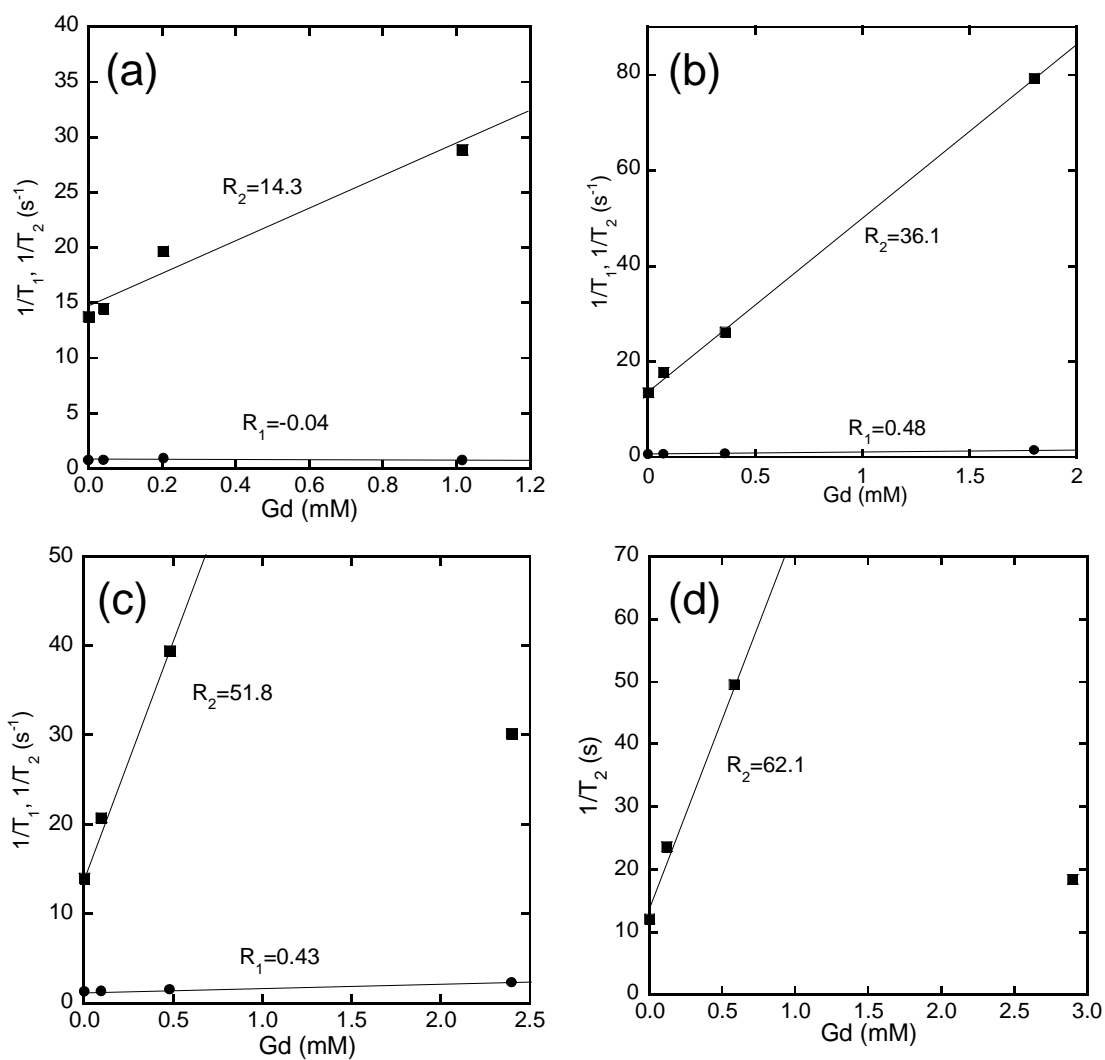


Fig.8.9 Plots of $1/T_1$ and $1/T_2$ vs Gd concentration: (a) Gd25mol%, (b) Gd50mol%, (c) Gd75mol%, (d) Gd100mol%.

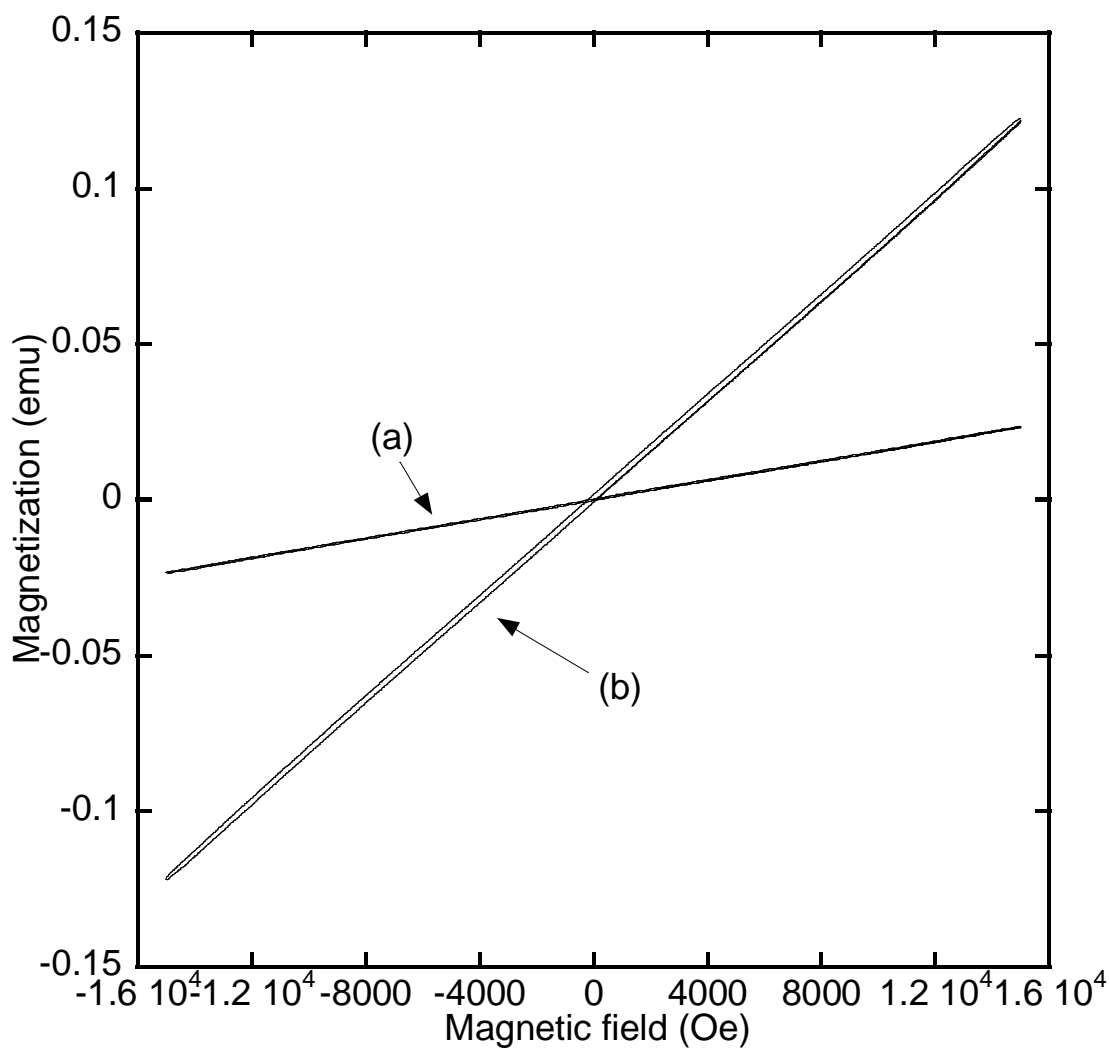


Fig.8.10 VSM measurement of (a) Gd25mol% and (b) Gd100mol%.

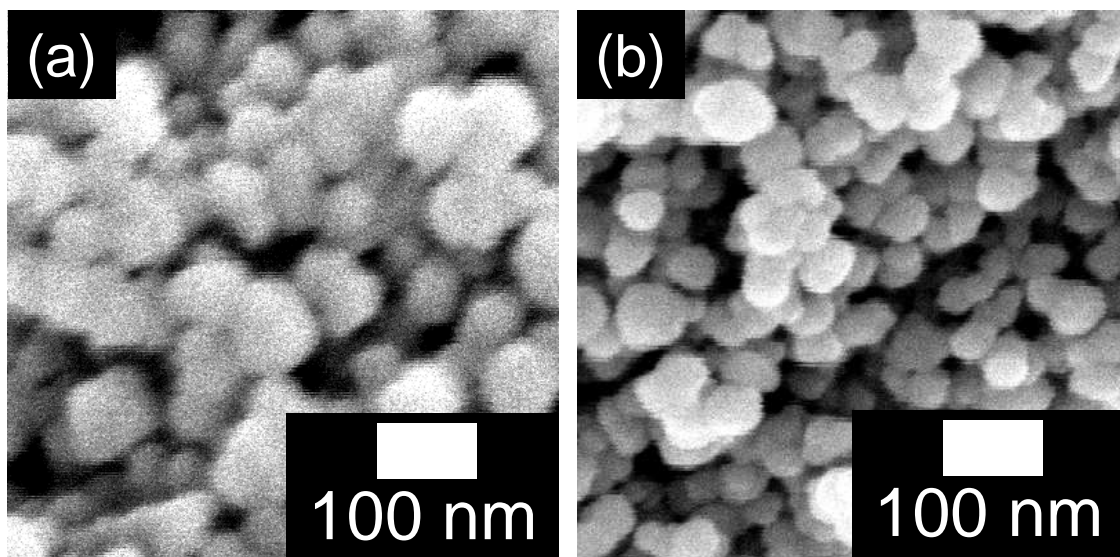


Fig.8.11 FE-SEM images of (a) YAG nanoparticles and (b) Gd-YAG nanoparticles.

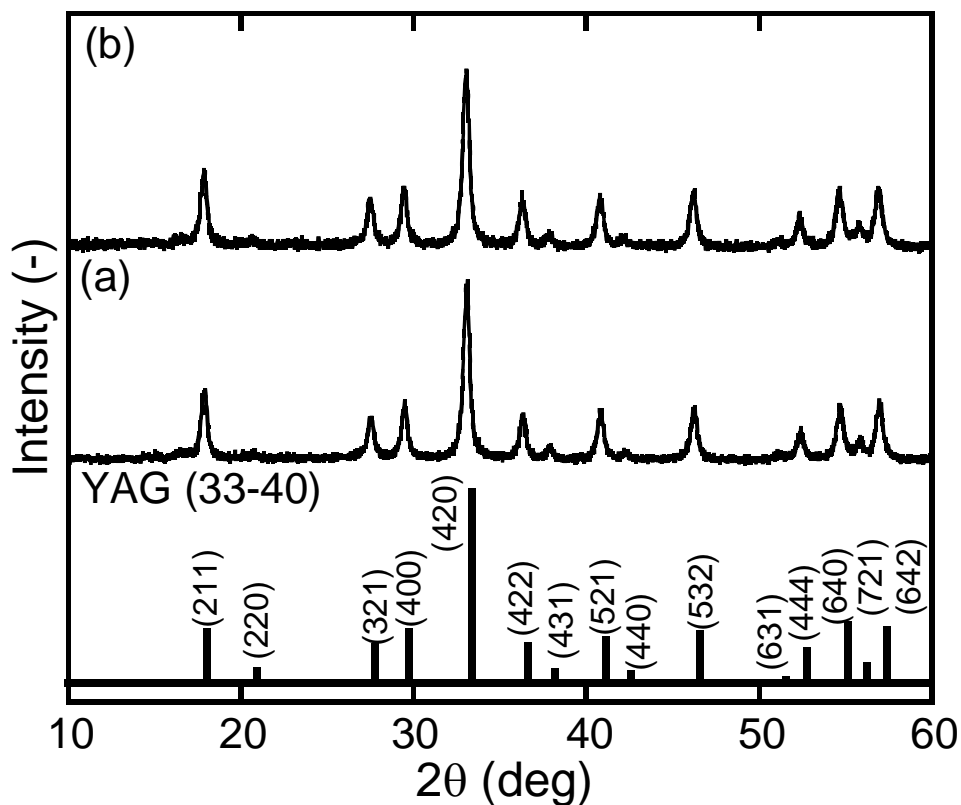


Fig.8.12 XRD profiles of (a) YAG nanoparticles and (b) Gd-YAG nanoparticles.

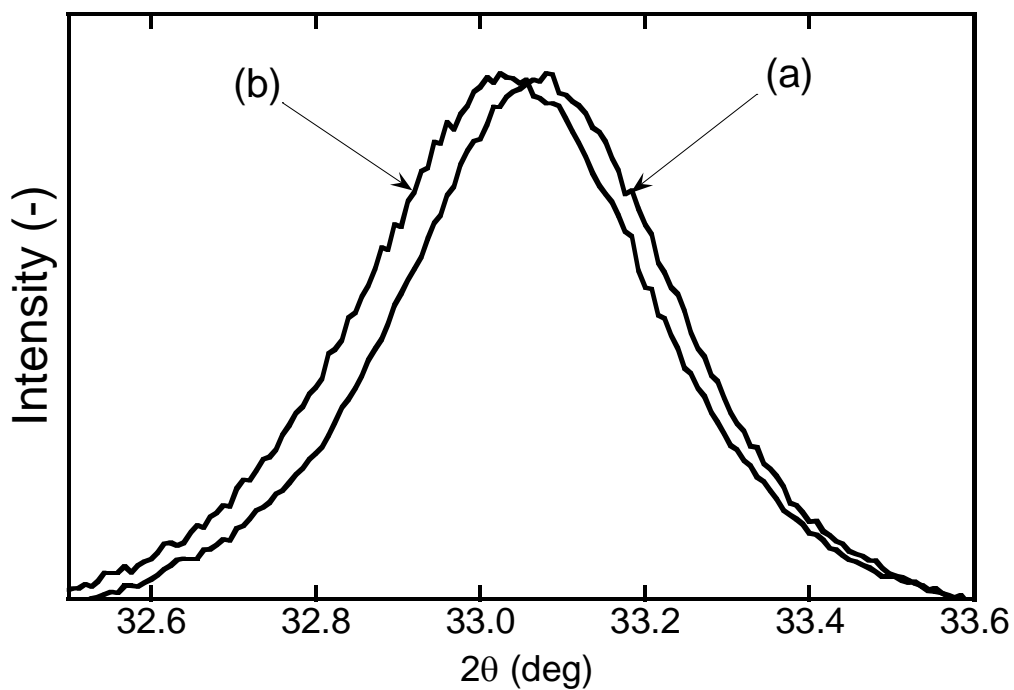


Fig.8.13 XRD peaks of (420) plane: (a) YAG nanoparticles and (b) Gd-YAG nanoparticles.

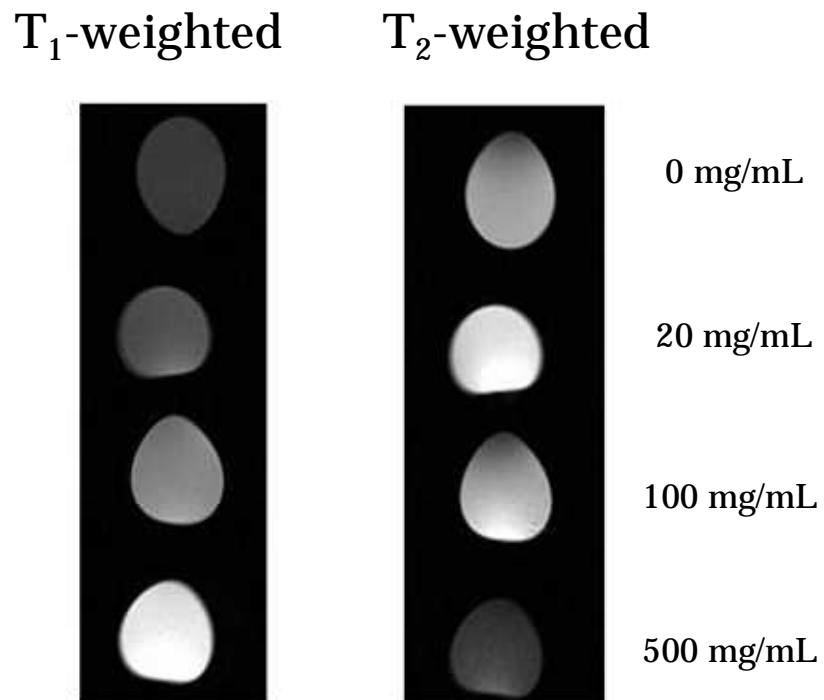


Fig.8.14 MR images of Gd-YAG nanoparticle dispersed in agarose gel.

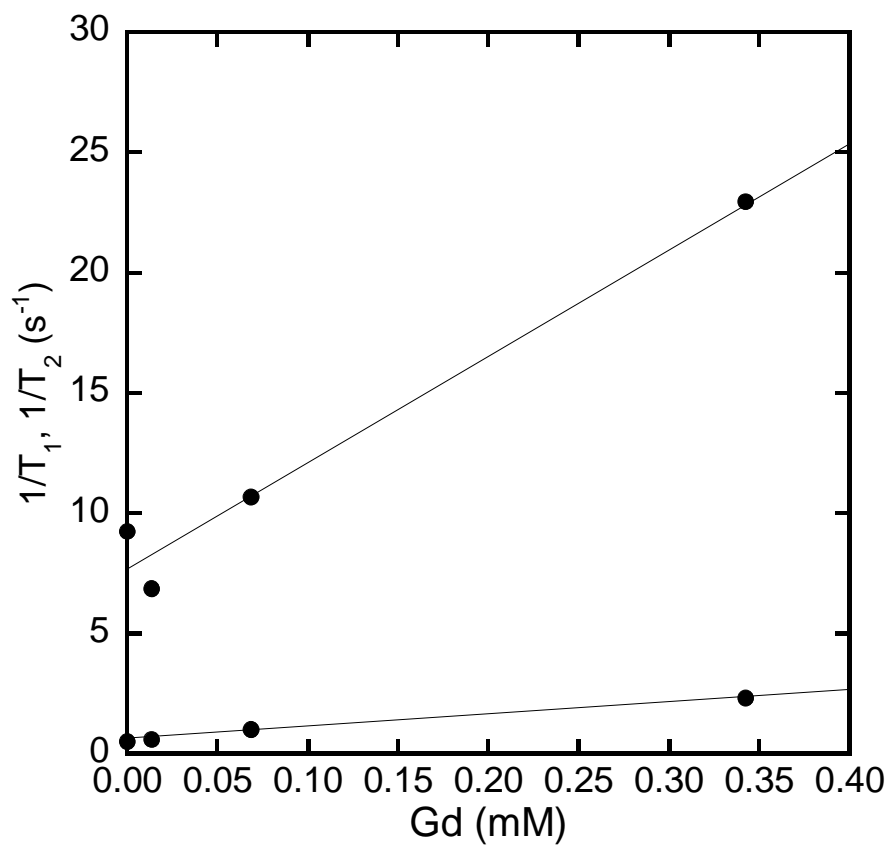


Fig.8.15 Plots of $1/T_1$ and $1/T_2$ vs Gd concentration of Gd-YAG nanoparticles.

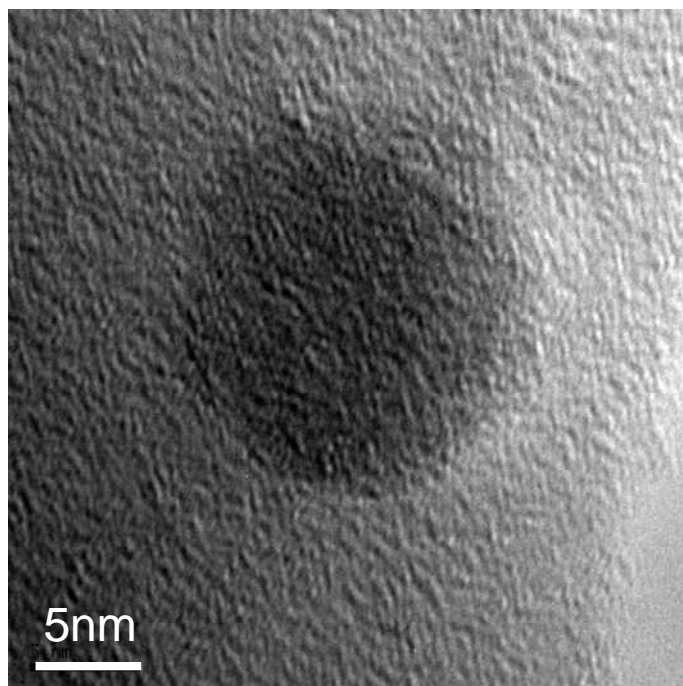


Fig.8.16 FE-TEM image of Gd-YA:Yb³⁺ nanoparticle.

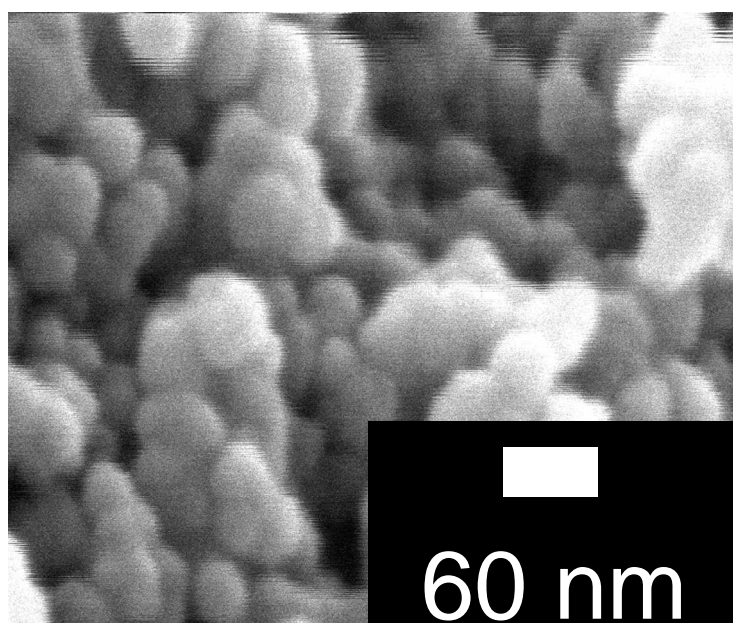


Fig.8.17 FE-SEM image of Gd-YA:Yb³⁺ nanoparticles.

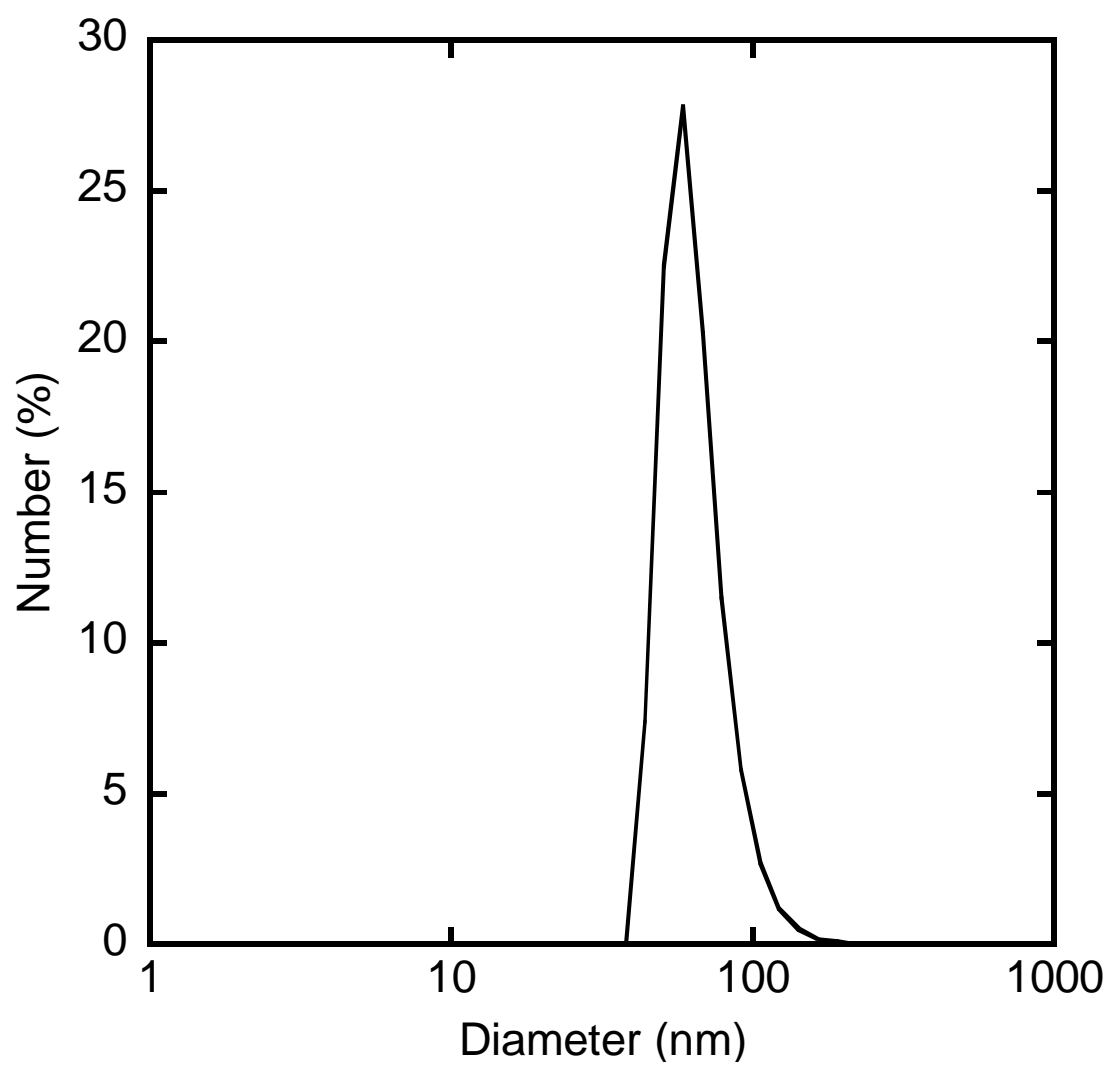


Fig.8.18 Particle size distribution measured by DLS for Gd-YAG:Yb³⁺ nanoparticles diluted in ultrapure water

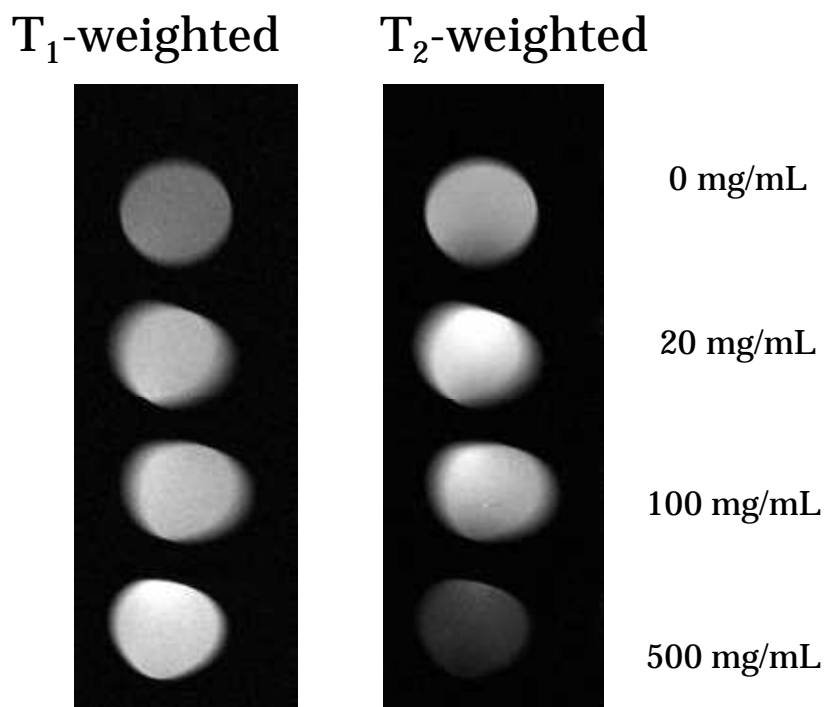


Fig.8.19 MR images of Gd-YAG:Yb³⁺ nanoparticle dispersed in agarose gel.

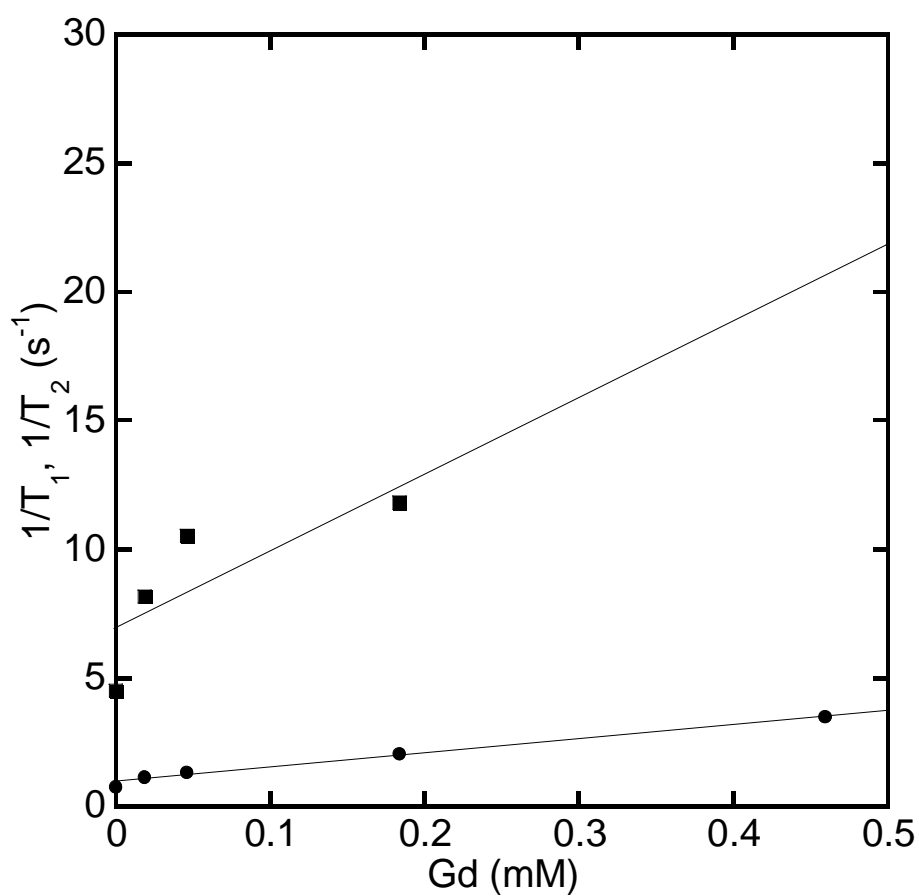


Fig.8.20 Plots of $1/T_1$ and $1/T_2$ vs Gd concentration.

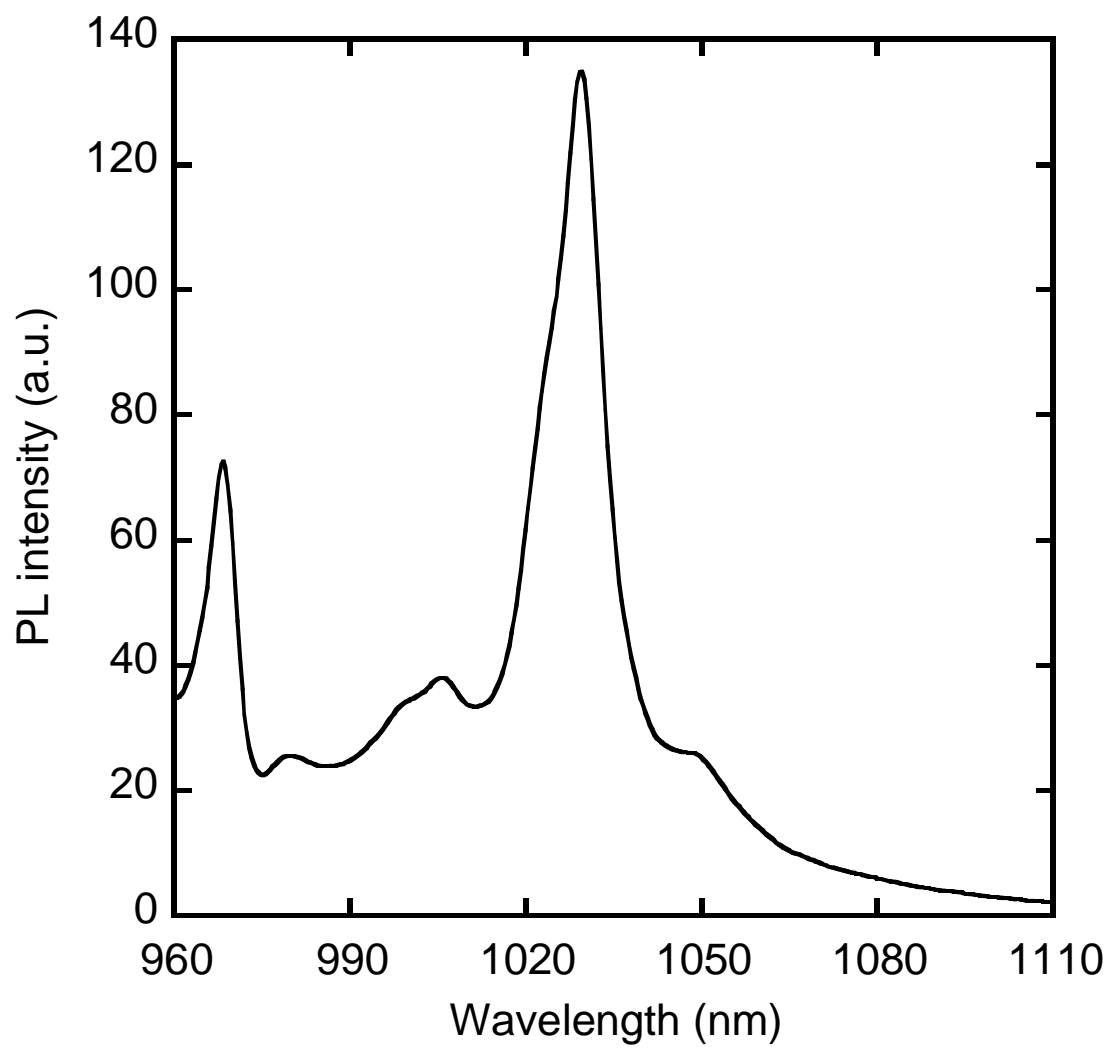


Fig.8.21 PL spectra of Gd-YAG:Yb³⁺ nanoparticles.

8.4 結論

グリコサーマル法により Gd および Yb を含有する YAG ナノ粒子の合成を行った。

酢酸ガドリニウムと酢酸イットリウムの共存下でグリコサーマル法を行い、GAG - YAG 固溶体ナノ粒子を作製した。凝集粒子径 56 - 125 nm のナノ粒子が得られ、Gd 仕込み濃度の増大に従い、粒子径は増大した。粒子をアガロースゲルに分散させて MR 撮影を行うと、T₁ 短縮効果は認められず、T₂ 造影剤として機能した。

グリコサーマル法で合成された YAG ナノ粒子コロイドに酢酸ガドリニウムを添加して、再度オートクレーブ処理を行うことにより、Gd-YAG ナノ粒子を合成した。Gd 添加による粒子径の増大、副生成物の生成は確認されなかった。粒子をアガロースゲルに分散させて MR 撮影を行った結果、T₁ 短縮効果が認められた。

最後に、Gd-YAG:Yb³⁺ナノ粒子コロイドを用いて同様の 2 段階合成を行った。得られた粒子は 1 次粒子径が約 10nm であり、沈殿することなく水によく分散した。さらに、T₁ 短縮効果だけでなく、Yb³⁺の f-f 遷移による近赤外発光を示し、マルチモーダルイメージング材料としての可能性を示唆した。

第 8 章の参考文献

- [8-1] 船津高志, “生体分子の 1 分子蛍光イメージング”, *レーザー研究*, **34**, 241-245 (2006).
- [8-2] D. Shcherbo, E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, K. A. Lukyanov, E. A. Bogadanova, A. G. Zraisky, S. Lukyanov, D. M. Chudakov, “Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging”, *Nat. Method*, **4**, 741-746 (2007).
- [8-3] G. K. von Schulthess, “Integrated modality imaging with PET-CT and SPECT-CT: CT issues”, *Eur. Radiol. Suppl.*, **15**, D121-D126 (2005).
- [8-4] S. Wang, B. R. Jarrett, S. M. Kauzlarich, A. Y. Louie, “Core/Shell quantum dots with high relaxivity and photoluminescence for multimodality imaging”, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3848-3856 (2007).
- [8-5] M. M. Hüber, A. B. Staubli, K. Kustedjo, M. H. B. Gray, J. Shin, S. E. Fraser, R. E. Jacobs, T. J. Meade, “Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents”, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 242-249 (1998).
- [8-6] M. Lewin, N. Carlesso, C. Tung, X. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, R. Weissleder, “Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells”, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 410-414 (2000).
- [8-7] L. Levy, Y. Sahoo, K. Kim, E. J. Bergey, R. N. Prasad, “Nanochemistry: synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications”, *Chem. Mater.*, **14**, 3715-3721 (2002).
- [8-8] A. Moore, Z. Medarova, A. Potthast, G. Dai, “*In Vivo* targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe”, *Cancer Res.*, **64**, 1821-1827 (2004).
- [8-9] S. Santra, R. P. Bagwe, D. Dutta, J. T. Stanley, G. A. Walter, W. Tan, B. M. Moudgil, R. A. Mericle, “Synthesis and characterization of fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic silica nanoparticles for multimodal bioimaging applications”, *Adv. Mater.*, **17**, 2165-2169 (2005).
- [8-10] S. Santra, H. Yang, P. H. Holloway, J. T. Stanley, R. A. Mericle, “Synthesis of water-dispersible fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic CdS:Mn/ZnS quantum dots: a multifunctional probe for bioimaging”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1656-1657 (2005).
- [8-11] Y. Huh, Y. Jun, H. Song, S. Kim, J. Choi, J. Lee, S. Yoon, K. Kim, J. Shin, J. Suh, J. Cheon, “In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12387-12391 (2005).
- [8-12] J. Lee, Y. Jun, S. Yeon, J. Shin, J. Cheon, “Dual-Mode Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Neuroblastoma”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 8160-8162 (2006).
- [8-13] S. A. Corr, A. O’Byrne, Y. K. Gun’ko, S. Ghosh, D. F. Brougham, S. Mitchell, Y. Volkov, A. Prina-Mello, “Magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical

- multitasking”, *Chem. Comm.*, 4474-4476 (2006).
- [8-14] W. J. M. Mulder, R. Koole, R. J. Brandwijk, G. Storm, P. T. K. Chin, G. J. Stijkers, C. M. Donegá, K. Nicolay, A. W. Griffioen, “Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe”, *Nano Lett.*, **6**, 1-6 (2006).
- [8-15] V. S. Talanov, C. A. S. Regino, H. Kobayashi, M. Bernardo, P. L. Choyke, M. W. Brechbiel, “Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging”, *Nano Lett.*, **6**, 1459-1463 (2006).
- [8-16] H. Yang, S. Santra, G. A. Walter, P. H. Holloway, “Gd^{III}-functionalized fluorescent quantum dots as multimodal imaging probes”, *Adv. Mater.*, **18**, 2890-2894 (2006).
- [8-17] W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, W. Lin, “Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents”, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9024-9025 (2006).
- [8-18] W. J. Rieter, J. S. Kim, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, T. Tarrant, W. Lin, “Hybrid silica nanoparticles for multimodal imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3680-3682 (2007).
- [8-19] C. Tu, A. Y. Louie, “Photochromically-controlled, reversibly-activated MRI and optical contrast agent”, *Chem. Comm.*, 1331-1333 (2007).
- [8-20] J. Bridot, A. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Jossierand, J. Coll, L. V. Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, “Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging”, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5076-5084 (2007).
- [8-21] J. S. Kim, W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, W. Lin, “Self-assembled hybrid nanoparticles for cancer specific multimodal imaging”, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8962-8963 (2007).
- [8-22] D. Gerion, J. Herberg, R. Bok, E. Gjersing, E. Ramon, R. Maxwell, J. Kurhanewicz, T. F. Budinger, J. W. Gray, M. A. Shuman, F. F. Chen, “Paramagnetic silica-coated nanocrystals as an advanced MRI contrast agent”, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 12542-12551 (2007).
- [8-23] L. Prenzen, R. J. H. M. Miserus, A. Dirksen, T. M. Hackeng, N. Deckers, N. J. Bitsch, R. T. A. Megens, K. Douma, J. W. Heemskerk, M. E. Kooi, P. M. Fredrik, D. W. Slaaf, M. A. M. J. van Zandvoort, C. P. M. Reutelingsperger, “Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin A5-functionalized quantum dots”, *Nano Lett.*, **7**, 93-100 (2007).
- [8-24] C. Lu, Y. Hung, J. Hsiao, M. Yao, T. Chung, Y. Lin, S. Wu, S. Hsu, H. Liu, C. Mou, C. Yang, D. Huang, Y. Chen, “Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling”, *Nano Lett.*, **7**, 149-154 (2007).
- [8-25] J. H. Choi, F. T. Nguyen, P. W. Barone, D. A. Heller, A. E. Moll, D. Patel, S. A. Boppart, M. S. Strano, “Multimodal biomedical imaging with asymmetric

- single-walled carbon nanotube/iron oxide nanoparticle complexes”, *Nano Lett.*, **7**, 861-867 (2007).
- [8-26] X. Zhang, K. S. Lovejoy, A. Jasanoff, S. J. Lippard, “Water-soluble porphyrins as a dual-function molecular imaging platform for MRI and fluorescence zinc sensing”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10780-10785 (2007).
- [8-27] J. Lee, B. Schneider, E. K. Jordan, W. Liu, J. A. Frank, “Synthesis of complexable fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles (FL SPIONs) and cell labeling for clinical application”, *Adv. Mater.*, **20**, 2512-2516 (2008).
- [8-28] N. Kamaly, T. Kalber, A. Ahmad, M. H. Oliver, P. So, A. H. Herlihy, J. D. Beli, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, “Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging”, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 118-129 (2008).
- [8-29] C. Wu, J. Hong, X. Guo, C. Huang, J. Lai, J. Zheng, J. Chen, X. Mu, Y. Zhao, “Fluorescent core-shell silica nanoparticles as tunable precursors: towards encoding and multifunctional nano-probes”, *Chem. Comm.*, 750-752 (2008).
- [8-30] O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M. Zhang, “Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas”, *Nano Lett.*, **5**, 1003-1008 (2005).
- [8-31] M. K. Kircher, U. Mahmood, R. S. King, R. Weissleder, L. Josephson, “A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation”, *Cancer Res.*, **63**, 8122-8125 (2003)
- [8-32] S. Hatanaka, N. Matsushita, M. Abe, “Direct immobilization of fluorescent dyes onto ferrite nanoparticles during their synthesis from aqueous solution”, *J. Appl. Phys.*, **93**, 7569-7570 (2003).
- [8-33] H. Lu, G. Yi, S. Zhao, D. Chen, L. Guo, J. Cheng, “Synthesis and characterization of multi-functional nanoparticles possessing magnetic, up-conversion fluorescence and bio-affinity properties”, *J. Mater. Chem.*, **14**, 1336-1341 (2004).
- [8-34] D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, A. Rosenzweig, “Superparamagnetic Fe₂O₃ beads-CdSe/ZnS quantum dots core-shell nanocomposite particles for cell separation”, *Nano Lett.*, **4**, 409-413 (2004).
- [8-35] H. Kim, M. Achermann, L. P. Balet, J. A. Hollingsworth, V. I. Kimov, “Synthesis and characterization of Co/CdSe core/shell nanocomposites: bifunctional magnetic-optical nanocrystals”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 544-546 (2005).
- [8-36] B. Zebli, A. S. Susha, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, W. J. Parak, “Magnetic targeting and cellular uptake of polymer microcapsules simultaneously functionalized with magnetic and luminescent nanocrystals”, *Langmuir*, **21**, 4262-4265 (2005).
- [8-37] D. Cai, J. M. Mataraza, Z. Qin, Z. Huang, J. Huang, T. C. Chiles, D. Carnahan, K. Kempa, Z. Ren, “Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing”, *Nat. Method*, **2**, 449-454 (2005).

- [8-38] T. R. Sathe, A. Agrawal, S. Nie, “Mesoporous Silica Beads Embedded with Semiconductor Quantum Dots and Iron Oxide Nanocrystals: Dual-Function Microcarriers for Optical Encoding and Magnetic Separation”, *Anal. Chem.*, **78**, 5627-5632 (2006).
- [8-39] W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. Dai, “FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents”, *Nat. Mater.*, **5**, 971-976 (2006).
- [8-40] C. Xu, J. Xie, D. Ho, C. Wang, N. Kohler, E. G. Walsh, J. R. Morgan, Y. E. Chin, S. Sun, “Au-Fe₃O₄ dumbbell nanoparticles as dual-functional probes”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 173-176 (2008).
- [8-41] N. Wang, W. Chen, Q. Zhang, Y. Dai, “Synthesis, luminescent, and magnetic properties of LaVO₄:Eu nanorods”, *Mater. Lett.*, **62**, 109-112 (2008).
- [8-42] M. Wen, W. Zhao, T. Zhang, Y. Zhu, Y. Wang, Q. Wu, “A fluorescent magnetic nanoalloy Lanthanum-doped FePt:RE”, *J. Colloid Interface Sci.*, **322**, 143-151 (2008).
- [8-43] H. Gu, R. Zheng, X. Zhang, B. Xu, “Facile one-pot synthesis of bifunctional heterodimers of nanoparticles: a conjugate quantum dot and magnetic nanoparticles”, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5664-5665 (2004).
- [8-44] D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, “Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots”, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4990-4991 (2005).
- [8-45] Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers, Y. Xia, “Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach”, *Nano Lett.*, **2**, 183-186 (2002).
- [8-46] S. Yu, H. Zhang, J. Yu, C. Wang, L. Sun, W. Shi, “Bifunctional magnetic-optical nanocomposites: grafting lanthanide complex onto core-shell magnetic silica nanoarchitecture”, *Langmuir*, **23**, 7836-7840 (2007).
- [8-47] M. Zhang, S. Shi, J. Meng, X. Wang, H. Fan, Y. Zhu, X. Wang, Y. Qian, “Preparation and characterization of near-infrared luminescent bifunctional core/shell nanocomposites”, *J. Phys. Chem. C*, **112**, 2825-2830 (2008).
- [8-48] M. Inoue, T. Nishikawa, H. Otsu, H. Kominami, T. Inui, “Synthesis of rare-earth gallium garnets by the glycothermal method”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 1173-1183 (1998).
- [8-49] H. B. Na, J. H. Lee, K. An, Y. I. Park, I. S. Lee, D. Nam, S. T. Kim, S. Kim, K. Lim, K. Kim, S. Kim, T. Hyeon, “Development of a T₁ contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 5397-5401 (2007).

第9章 総括と今後の展望

9.1 本研究の総括

本研究ではグリコサーマル法によりランタノイドドープ YAG ナノ粒子を合成し、その特性評価ならびに生体分子検出への応用を検討した。以下、その総括を行う。

第3章では、粒径の縮小を目的として、YAG:Ce³⁺ナノ粒子のグリコサーマル合成における反応条件の検討を行った。反応後の溶媒中にテトラヒドロピランが存在していたことから、1,4-ブタンジオールの環化反応により金属-酸素ネットワーク前駆体が形成されると推察された。また前駆体から YAG への結晶化は前駆体濃度の増大に伴い促進された。原料濃度の増加に伴い、粒子の1次粒子径は増大した。これは系内の前駆体濃度の増加に伴い、局所的な過飽和状態に到達する前駆体領域が増加したためであると考えられる。

クエン酸の添加により、クエン酸のカルボキシル基が粒子表面に配位することで粒子成長が抑制され1次粒子径は減少した。一方で、クエン酸の添加により粒子のゼータ電位は減少し1次粒子は2次的な凝集体を形成した。また、クエン酸のカルボキシル基により表面欠陥がキャッピングされることで、内部蛍光量子効率が増大し、蛍光寿命は伸長した。またグリコサーマル法で合成された YAG:Ce³⁺ナノ粒子の蛍光は、バルクの蛍光寿命よりも速い成分と遅い成分の少なくとも2つの成分に従い緩和した。

第4章では、グリコサーマル法で合成した YAG:Ce³⁺ナノ粒子に生体分子であるビオチンをコンジュゲートして、蛍光プローブを作製した。3-アミノプロピルトリメトキシシランを用いて、粒径や光学特性に影響を与えることなく粒子表面にアミノ基を導入できた。さらに、アミノ反応性のビオチン化試薬を反応させてビオチン分子をコンジュゲートし、アビジンビーズの免疫標識を行った。その結果、ビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子は生体特異的な相互作用によりビーズ表面に結合し、その蛍光を蛍光顕微鏡で検出することができた。また YAG:Ce³⁺ナノ粒子分散液をマウスへ腹腔投与した結果、その毒性が低いことが確認され、YAG ナノ粒子は低毒性のプローブ母体として利用可能であることが示された。

第4章で作製したビオチン化 YAG:Ce³⁺ナノ粒子はリン酸緩衝液中で塩析を起こして凝集した。そこで第5章ではポリアクリル酸の被覆によって分散安定性の向上を試みた。負に帯電したポリアクリル酸を正に帯電した YAG:Ce³⁺ナノ粒子表面に吸着させてポリアクリル酸被覆 YAG:Ce³⁺ナノ粒子を作製し、リン酸緩衝液中で安定に分散させることができた。さらに、ポリアクリル酸のカルボキシル基を利用してストレプトアビジンをコンジュゲートした。このように作製した粒子をプレートアッセイに応用しウシ血清アルブミンの定量を行ったところ、ウシ血清アルブミン濃度と蛍光強度の間に相関性が確認された。

第6章では、ポリメタクリル酸メチルビーズに YAG:Ce³⁺ナノ粒子を吸着させてフローサイトメトリー用の蛍光ビーズを作製した。YAG:Ce³⁺ナノ粒子や高分子電解質の吸着によりビーズのゼータ電位は順次反転した。また、YAG:Ce³⁺ナノ粒子の吸着回数を増加させることで、ビーズの発光強度を段階的に増大させることができた。このようにして作製した蛍光ビーズは、発光強度やビーズ径の違いによりフローサイトメトリー測定において互い

に識別可能であった。

調製した蛍光ビーズにポリアクリル酸を被覆し、さらにウシ血清アルブミンを共有結合的に固定した。ビーズに固定されたウシ血清アルブミンに対し赤色色素抗体による免疫標識を行い、その蛍光を蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにより確認した。また得られたデータをゲーティング解析して免疫標識されたビーズの帰属を行い、交互吸着法により作製した蛍光ビーズがフローサイトメトリー解析に応用できることが示した。

第7章では、近赤外蛍光を発する無機ナノ粒子を得るために、グリコサーマル法によるYAG:Yb³⁺ナノ粒子の作製を試みた。合成された試料のXRDピークは全てYAGに帰属され、YAG:Yb³⁺が単相で生成していることが確認された。また合成された粒子の1次粒子径は約10 nmであり、純水中で良好に分散した。波長940 nmの近赤外レーザーの照射により、Yb³⁺の4f-4f遷移による波長1030 nmの近赤外発光を得た。また2 hの近赤外レーザー光の連続照射によっても退色を起こさず、現行の近赤外発光有機色素に対する大きなアドバンテージを見出すことができた。

焼成により、1次粒子径が増大すると同時に発光強度が増大した。FT-IRや格子歪みの算出の結果より、この発光強度の増大は発光キラーである格子欠陥や粒子表面に吸着している有機物が除去されたためであると結論づけた。

第8章では、YAGナノ粒子にYb³⁺とGd³⁺を共ドーブすることにより、近赤外蛍光とMR造影という複数の機能を有するナノ粒子の作製を試みた。Y源とGd源の比率を変化させてグリコサーマル合成を行いGAG-YAG固溶体ナノ粒子を得た。作製された粒子のGd/Y比は原料比に対応し、Gd原料の増大に伴って粒径は増大した。作製された試料を用いてMRIを行った結果、Gd含有量が低い試料は造影剤として機能せず、Gd含有量が高い試料はT₂造影剤として機能した。

一方で、あらかじめ合成したYAGナノ粒子分散液にGd原料を投入して再度グリコサーマル反応を行い、粒子表面にGd³⁺を偏析させたナノ粒子を作製した。元素分析によりGdの存在を確認し、一方でXRDやTEMでは副相の生成や粒径の増大が確認されなかったことから、Gd³⁺はY³⁺と置換するように固溶していると推察した。この粒子を用いてMRIを行った結果、T₁造影剤として機能したことからGd³⁺が粒子表面に偏析していることが示唆された。

最後に、第7章で得られたYAG:Yb³⁺ナノ粒子分散液にGd源を投入し、同様にグリコサーマル反応を行った。作製されたナノ粒子はYb³⁺の4f-4f遷移による近赤外発光とT₁短縮効果を示し、マルチモーダルイメージング用のナノ粒子としての応用可能であることが示唆された。

9.2 本研究で抽出された問題点とその対策

9.2.1 粒径

グリコサーマル合成により得られたYAG:Ce³⁺ナノ粒子およびYAG:Yb³⁺ナノ粒子の1次粒子径は約10 nmであり、IgGなどのタンパク質とほぼ同じ大きさである。しかし粒子のTEM画像はいずれも凝集しており、SEM画像より算出した粒径および純水中に分散した

粒子の平均流体力学直径は約 50 nm であった。これらの結果は、1 次粒子が 2 次的な凝集体を形成していることを示唆する。蛍光プローブとしての応用を考えると、巨大な粒子は標識された生体分子の自由度を奪って生体特異的な働きを妨げるため、この 2 次的な凝集を抑制し 1 次粒子の状態分散させることが望ましい。また MR 造影剤の観点からも、粒径が小さいほど T₁ 造影剤として有効に働くため、凝集の抑制が望まれる。

クエン酸を添加したグリコサーマル合成では、粒子のゼータ電位の低下により 1 次粒子は凝集した。これは、クエン酸のカルボキシル基によって正であった粒子のゼータ電位が低下した結果であると考えられる。また、粒子のゼータ電位が充分大きな絶対値であっても、PBS などの塩濃度の高い溶液中では塩析を起こして凝集する。

これらの考察より、分散安定剤としては、立体反発できる高分子鎖を持ち、かつ粒子表面へ配位する官能基をただ 1 つ有する高分子が有効であると推察される。例えば、オレイン酸や、一方をメトキシ基で終端したポリエチレングリコールなどである。これらの分散安定剤を合成時に投入する、もしくは合成後の溶媒へ添加して還流を行うなどすることで 1 次粒子の 2 次的な凝集を防止できる可能性がある。

9.2.2 光学特性

グリコサーマル合成により得られた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は光照射により退色した。これはミクロンサイズの YAG:Ce³⁺ では観察されない挙動である。ナノ粒子の退色の原因として、大気中あるいは溶液中に存在する酸素により Ce³⁺ が非発光中心である Ce⁴⁺ へと酸化したことが考えられる。ナノ粒子は比表面積が大きく、バルク粒子と比べて表面近傍に存在する Ce³⁺ の割合も多いため、この酸化の影響が顕著に現れる。この対策として、YAG:Ce³⁺ ナノ粒子表面を何らかの材料で被覆することによって、酸素の吸着を防止することが挙げられる。例えば、樹脂封止を行った YAG:Ce³⁺ ナノ粒子は退色が抑制できることが確認されており、これは樹脂中への酸素の進入を抑制して粒子表面の Ce³⁺ の酸化を減少したためであると考えられる。

一方、グリコサーマル法により得られた YAG:Yb³⁺ ナノ粒子では退色は確認されなかったが、発光強度には改善の余地がある。発光キラーとして考えられているのは格子欠陥と表面有機物である。焼成はこれら除去して発光強度を増大させることができるが、粒径の増大を伴う。焼成することなく表面有機物を除去する 1 つの方法としてオゾン処理が挙げられる。また、300 °C 以上の高温でグリコサーマル法を行うことにより結晶性を向上させ、格子欠陥を減少させることができる可能性がある。

9.2.3 磁気特性

第 8 章では MRI を行うことにより、Gd-YAG ナノ粒子表面への Gd³⁺ の偏析を確認した。しかし、この方法は間接的な方法であるため、別の分析方法でも Gd³⁺ の偏析を確認する必要がある。例えば、ESR は不対電子を検出する分析方法であるが、Mn²⁺ の ESR 測定において Mn²⁺ 同士が近接すると測定されるスペクトルの形状に変化が現れることが知られている。Gd³⁺ も不対電子を持つため ESR で検出できる核種であり、そのスペクトルの形状

の変化から Gd^{3+} の偏析を観測できる可能性がある。

9.2.4 表面修飾

ポリアクリル酸にストレプトアビジンを固定して作製した蛍光プローブは、プレートやプレートに固定されたタンパク質に対して非特異的に吸着した。その原因として、プローブが負に帯電していたこと、また固定されたストレプトアビジン量が少なかったことが挙げられる。

粒子の帯電は、ポリエチレングリコールやデキストランなどの電氣的に中性な高分子を利用することで解決できる。その導入方法としては、(1)一端に官能基を持つ高分子を粒子表面に配位させる、(2)シランカップリング剤などで粒子に官能基を導入し、その官能基に対して高分子を結合させる、あるいは(3)電氣的に中性な高分子とアニオン性高分子のブロック共重合体を静電的にさせる、などが挙げられる。また調製した蛍光プローブをタンパク質溶液に懸濁させて保存することで、あらかじめナノ粒子表面を静電的にブロッキングし、非特異的な吸着を抑制できると考えられる。

第5章において、ストレプトアビジンが効率よく導入できなかった原因の1つとして、粒子表面に導入した官能基の自由度が低かったことが挙げられる。粒子表面と官能基との間に鎖長の長い高分子を導入することで、より効率よくコンジュゲートを行うことができると考えられる。

9.2.5 生化学操作

ストレプトアビジンを効率よく導入できなかったもう1つの原因として、コンジュゲートの際の実験条件が挙げられる。例えば同じタンパク質であってもその種類によってコンジュゲートに対して活性となる pH は異なるため、その最適 pH については検討を行う必要がある。また、反応をより低温で行うことで中間体の加水分解を抑制し、コンジュゲートの効率を向上させることができる。その際、コンジュゲート反応の活性も低下するが、反応時間を延長させることでそれを補うことができる。

また、作製したプローブの生体特異性は、競合的なアッセイを行うことでより明確に示すことができる。例えば、第4章でアビジンビーズの免疫標識を行ったが、ここでアビジンビーズとビオチン化 YAG: Ce^{3+} ナノ粒子のほかに第3の物質としてビオチンを導入することで、ビオチン分子とビオチン化 YAG: Ce^{3+} ナノ粒子の間にアビジンビーズに対する結合の競合が起こり、アビジンビーズに固定化される YAG: Ce^{3+} ナノ粒子量は減少する。このような実験を行うことにより、生体特異的な結合以外の力による吸着の可能性を排することができる。

また、作製した蛍光プローブについて、抗原抗体反応の平衡定数にあたる解離定数 K を求めることができる。例えば、抗原 - 抗体の解離定数は 10^{-7} - 10^{-12} M^{-1} 、アビジン - ビオチンの解離定数は 10^{-15} M^{-1} である。この定数は、平衡状態にある抗体の濃度と抗原 - 抗体複合体の濃度を測定し、Klotz の式あるいは Scatchard の式に当てはめることにより算出され、解離定数が小さいほど生体特異的な活性が高いことを示す。作製したプローブについ

て解離定数を算出し、通常の抗原抗体反応やほかのプロープの解離定数と比較することによって、プロープの生体特異的な活性についてより定量的な情報を得ることができる。

9.2.6 蛍光ビーズ

本研究ではポリマービーズへ YAG:Ce³⁺ ナノ粒子を吸着させることにより、無蛍光のビーズを含めて3段階の発光強度を持つビーズを作製した。しかし、発光強度は対数軸で表示されるため、交互吸着法により4段階目の発光強度を持つ複合ビーズを作製するには数十回の吸着が必要となり現実的ではない。そのため、さらに発光強度の他段階化を行うためには、ビーズ内部まで蛍光粒子を埋包できるような複合化方法を利用して、ビーズあたりの蛍光物質の含有率を増大させる必要がある。交互吸着法を用いる場合は、非発光性の物質との混合比を変化させて交互吸着を行うことで、発光強度の細分化が達成できる。その場合には、本研究で用いた YAG:Ce³⁺ ナノ粒子よりも輝度の高い蛍光物質の利用が望ましい。

学術論文および学会発表

本論文の著者による発表は、以下により公表されている。

1. 主論文に関連する原著論文

[1] R. Asakura, T. Isobe, K. Kurokawa, H. Aizawa, M. Ohkubo, “Tagging of avidin immobilized beads with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanocrystals phosphors”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1641-1647 (2006).

[2] R. Asakura, T. Isobe, K. Kurokawa, T. Takagi, H. Aizawa, M. Ohkubo, “Effects of citric acid additive on photoluminescence properties of YAG:Ce³⁺ nanoparticles synthesized by glycothermal reaction”, *J. Lumin.*, **127**, 416-422 (2007).

[3] R. Asakura, I. Kusayama, D. Saito, I. Tetsuhiko, K. Kurokawa, Y. Hirayama, H. Aizawa, T. Takagi, M. Ohkubo, “Preparation of fluorescent poly(methyl methacrylate) beads hybridized with Y₃Al₅O₁₂:Ce³⁺ nanophosphor for biological application”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46**, 5193-5 (2007).

2. 国際会議論文

[1] K. Noda, R. Asakura, T. Isobe, M. Morita, K. Kurokawa, T. Inubushi, T. Takagi, M. Ohkubo, “Glycothermal synthesis and magnetic properties of YIG/YAG nanoparticles”, *Solid State Phenom.*, **124-126**, 863-866 (2007).

[2] R. Asakura, H. Sakane, K. Noda, T. Isobe, M. Morita, T. Inubushi, “Fluorescent and magnetic resonance imaging by rare earth doped nanoparticles with garnet structure”, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **1064**, PP03-36 (2008).

3. その他の国際会議論文発表

[1] R. Asakura, T. Isobe, K. Kurokawa, T. Takagi, M. Ohkubo, “Glycothermal synthesis and characterization of YAG:Ce³⁺ colloidal solutions”, 2006 IUMRS International Conference in Asia, (Jeju, KOREA, September 2006).

[2] I. Kusayama, R. Asakura, D. Saito, T. Isobe, K. Kurokawa, H. Aizawa, T. Takagi, Y. Hirayama, M. Ohkubo, “Preparation and biological application of fluorescent poly(methyl methacrylate) beads hybridized with Y₃Al₅O₁₂:Ce³⁺ nanophosphor”, Pacific Rim meeting on Electrochemical and Solid-state Science, (Honolulu, USA, October 2008).

4. 国内学会発表

[1] 朝倉亮, 佐藤亘, 磯部徹彦, 黒川清, “ZnS:Mn²⁺ナノ蛍光体のバイオ分子とのコンジュゲートとその応用”, 第 51 回応用物理学関係連合講演会, 2004 年 3 月(東京).

[2] 磯部徹彦, 朝倉亮, 斎藤大輔, 藤本啓二, 黒川清, “ナノ蛍光体の生命科学への応用”, 電子情報通信学会 2005 総合大会, 2005 年 3 月(大阪).

[3] 朝倉亮, 斎藤大輔, 磯部徹彦, 藤本啓二, 黒川清, “YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体の生化学への応用(I): バイオ分子とのコンジュゲーション”, 第 52 回応用物理学関係連合講演会, 2005 年 3 月(埼玉).

[4] 斎藤大輔, 朝倉亮, 磯部徹彦, 藤本啓二, 黒川清, “YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体の生化学への応用(II): フローサイトメーター用蛍光ビーズの作製”, 第 52 回応用物理学関係連合講演会, 2005 年 3 月(埼玉).

[5] 磯部徹彦, 朝倉亮, 斎藤大輔, 藤本啓二, 黒川清, “YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体の生化学への応用”, 第 46 回日本細胞組織化学会, 2005 年 10 月(京都).

[6] 朝倉亮, 磯部徹彦, 斎藤大輔, 藤本啓二, 黒川清, 会澤英樹, 高木智洋, 大久保典雄, “ポリアクリル酸で被覆した YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体の生化学への応用”, 第 53 回応用物理学関係連合講演会, 2006 年 3 月(東京).

[7] 斎藤大輔, 草山育実, 朝倉亮, 磯部徹彦, 黒川清, 会澤英樹, 大久保典雄, “生体分子検出用 YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体複合 PMMA ビーズの作製”, 第 45 回セラミックス基礎科学討論会, 2007 年 1 月(宮城).

[8] 草山育実, 朝倉亮, 斎藤大輔, 磯部徹彦, 黒川清, 会澤英樹, 高木智洋, 平山陽介, 大久保典雄, “交互吸着法による多段階発光 YAG:Ce³⁺ナノ粒子/PMMA 複合ビーズの作製と生体分子検出への応用”, 第 54 回応用物理学関係連合講演会, 2007 年 3 月(東京).

[9] 朝倉亮, 磯部徹彦, 黒川清, 高木智洋, 会澤英樹, 大久保典雄, “YAG:Ce³⁺ナノ蛍光体のグリコサーマル合成におけるクエン酸添加効果”, 第 24 回希土類討論会, 2007 年 5 月(福岡).

[10] 朝倉亮, 吉川若菜, 野田国宏, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, “無機ナノ蛍光体のバイオイメージングへの展開”, 第 2 回日本分子イメージング学会, 2007 年 6 月(福井).

[11] 草山育実, 朝倉亮, 齊藤大輔, 磯部徹彦, 黒川清, 会澤英樹, 高木智洋, 平山陽介, 大久保典雄, “フローサイトメータを利用した YAG:Ce³⁺ ナノ粒子複合蛍光ビーズによる生体分子検出”, 秋期第 68 回応用物理学関係連合講演会, 2007 年 9 月(北海道).

[12] 廣嶋雄彦, 朝倉亮, 粕谷亮, 磯部徹彦, “YAG:Ce³⁺ ナノ蛍光体の光退色挙動の究明”, 第 46 回セラミックス基礎科学討論会, 2008 年 1 月(名古屋).

[13] 吉川若菜, 朝倉亮, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, “蛍光・MR イメージング用の希土類ドーブ型 GdPO₄ ナノ粒子の作製と特性評価”, 第 46 回セラミックス基礎科学討論, 2008 年 1 月(名古屋).

[14] 朝倉亮, 吉川若菜, 坂根宏志, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, “近赤外・磁気共鳴デュアルモーダルイメージング用 Gd/Yb 含有無機ナノ粒子に関する研究”, 第 3 回日本分子イメージング学会, 2008 年 5 月(埼玉).

[15] 朝倉亮, 坂根宏志, 磯部徹彦, “グリコサーマル法により合成した YAG:Yb³⁺ ナノ蛍光体の近赤外蛍光特性に与える焼成による後処理の影響”, 第 25 回希土類討論会, 2008 年 5 月(東京).

[16] 神山祐輔, 朝倉亮, 磯部徹彦, “グリコサーマル法により合成した YAG:Ce³⁺ ナノ蛍光体の光退色防止に関する検討”, 第 25 回希土類討論会, 2008 年 5 月(東京).

[17] 坂根宏志, 朝倉亮, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, “近赤外蛍光・MR デュアルイメージング用 Gd-YAG:Yb³⁺ ナノ粒子に関する研究”, 第 25 回希土類討論会, 2008 年 5 月(東京).

4. その他の成果

[1] 磯部徹彦, 黒川清, 藤本啓二, 朝倉亮, 斎藤大輔, 会澤英樹, 大久保典雄, 加納義久, “光学結晶微粒子を用いた蛍光標識化合物およびそれを用いた生体高分子検出方法”, PCT 特許, JP2006/162284, 2004 年 12 月 2 日公開.

[2] 野田国宏, 斎藤大輔, 朝倉亮, 磯部徹彦, 高木智洋, 会澤英樹, 大久保典雄, “発光標識試薬”, PCT 特許, JP2007/230877, 2006 年 2 月 27 日公開.

[3] 朝倉亮, 磯部徹彦, 書籍 “ナノ蛍光体の開発と応用” 第 4 章 6 節 バイオラベル用蛍光プローブの作製と応用, シーエムシー出版, pp. 225-232 (2007).

[4] 朝倉亮, 坂根宏志, 磯部徹彦, 森田将史, 犬伏俊郎, “蛍光-磁性マルチ機能性プローブ

の作製とイメージング応用”, 日本分子イメージング学会機関紙 Vol.2 No.1, 日本分子イメージング学会, pp13-16 (2009).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、6年間もの長き渡り懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました磯部徹彦准教授に謹んで感謝申し上げます。また、御多忙にも関わらず副査として審査を引き受けて下さった井上秀成教授、藤本啓二教授、栄長泰明准教授からは真摯な御教示を賜りました。深く感謝致します。環太平洋大学の黒川清教授からは研究の当初より生化学方面からの後教唆や技術指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。滋賀医科大学の犬伏俊郎教授、大阪大学の森田将史助教にはMR測定で御協力して頂き、また研究内容に対しても貴重な御指摘を頂きました。心より感謝申し上げます。フローサイトメトリーについて、古河電気工業株式会社の大久保典雄様、橘正人様、高木智洋様、会澤英樹様、平山陽介様には測定やディスカッションで御協力頂きました。御礼申し上げます。蛍光寿命測定は株式会社堀場製作所に御協力頂きました。ありがとうございました。

機能材料デザイン研究室の先輩や後輩には日頃より研究の内外でサポートして頂きました。ありがとうございました。蛍光ビーズに関しては草山育実さん、近赤外蛍光・MRに関しては坂根宏志君に、著者と共に最後まで研究に携わって頂きました。2人がいなければ完成しなかったと言っても過言ではありません。本当にありがとう。

なお、本研究の一部は、藤原奨学基金ならびに独立行政法人日本学術振興会特別研究員制度（DC2）、平成19年度科学研究費補助金（課題番号3832）による助成を受けて遂行されました。

慶應義塾大学大学院理工学研究科
総合デザイン工学専攻機能デザイン科学専修
機能材料デザイン研究室
朝倉亮