

## 研究終了報告書

## 「希土類添加蛍光体を用いた生体深部細胞の3次元マルチカラー光操作法」

研究期間：2018年10月～2022年6月

研究者：古川 太一

## 1. 研究のねらい

光遺伝学では、操作したい細胞の細胞膜に光活性化タンパク質を発現させ、その細胞に特定の波長の光を照射することで、イオンチャネルの開閉を行い細胞機能を操作する。このとき、細胞操作には光を用いるため、低侵襲・非接触であり、*in vivo* における細胞やマウスの動態解析が可能になった。しかしながら、光遺伝学で用いられるチャンネルロドプシン(ChR2)などの光活性化タンパク質は、可視光に応答するため、可視光が深達しにくい生体深部における細胞操作の障害となっていた。

近年、生体組織の散乱や水による吸収などの影響を受けにくく、mmスケールの生体浸達性を持つ800nm以上の近赤外(NIR)光の利活用が生体を扱う分野で進んでいる。イメージングの分野における近赤外光の活用は顕著であり、有機・無機問わず様々な材料で近赤外発光する蛍光プローブが開発されている。特にNIR励起-可視発光が可能な希土類元素添加ナノプローブ(RE-NPs)が注目を浴びている。

最近になって、このようなRE-NPsのアップコンバージョン(UC)発光を用いることで、光活性化タンパク質を発現させた細胞の深部光操作を行う試みが登場してきた。しかしながら、RE-NPsのUP発光を利用した深部細胞光操作においては、目的の部位を3次的にピンポイントで光操作することが難しい。また、980nm励起でそれぞれ青・緑・赤に発光するRE-NPsを用いるため、発光色を独立に制御することが難しい。

そこで本研究では、希土類蛍光体を異なる波長の近赤外光2波長を利用することで、生体深部において3次元かつ発光色の独立制御を行うことを目的とする。具体的には、近赤外光2波長が交差する部分のみが発光する希土類蛍光体の作製と、その高輝度化を行い、深部での3次元細胞光操作を試みる。また、異なる2波長の組み合わせにより、発光色の独立制御ができるかを試みる。さらに、作製した蛍光体が光細胞操作だけでなく、深部イメージングなどにも適用可能かについても検証する。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

生体深部において3次元かつマルチカラーで細胞を光操作することを目的として、2波長励起UC蛍光体の合成を行った。希土類蛍光体の母材や発光に寄与する希土類元素の種類、添加濃度、励起波長などを検討し、2波長で励起した際に強く発光する希土類マイクロ蛍光体・ナノ蛍光体の作製に成功した。

また、最終的に目指すべき細胞光操作の深さはmm～cmスケールのため、作製した

NaYF<sub>4</sub>:Re(Re は発光希土類元素)蛍光体のさらなる発光強度向上を目指した。高濃度な F と Na を含む化合物の存在下で水熱処理を行うことで、マイクロ蛍光体においては未処理のものと比較して 142 倍の輝度向上に成功した。

高輝度化した蛍光体を用いて、生体模倣材料の 2%イントラリピッド 2mm 越しに蛍光体の 2 波長励起を行ったところ、細胞光操作に十分な強度で発光することを確認し、深部での細胞光操作に応用可能であることを示した。しかしながら、この蛍光体は 1 波長を入射した時点である程度光ってしまうという問題があり、ピンポイントでの 3 次元光操作が難しいという課題が明らかになった。また、2 波長励起の蛍光体は赤色発光のものでは実現できたものの、レーザーパワーの不足などの問題によりその他の色で発光する蛍光体は実用レベルには達しなかった。マルチカラーでの深部細胞光操作については、希土類蛍光体ではないものの、非線形光学結晶の第二次高調波発生を利用することで、生体深部におけるマルチカラー細胞光操作の可能性を見出した。

さらに、本研究で開発した蛍光体の応用についても検討し、深部光操作だけでなく、生体深部のバイオイメーキングにも応用可能であること、電子線励起による高空間分解能なカソードルミネッセンスバイオイメーキングに用いることができることを見出した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A:高輝度アップコンバージョン(UC)発光を有する希土類添加蛍光体(RE-NPs)の開発

本研究で目指すべき細胞光操作の深さは mm~cm スケールである。これを達成するには、生体深部で減衰した弱い励起光でも高輝度に UC 発光する蛍光体が必要である。高輝度な UC 発光を得るために、酸化物、硫化物、フッ化物などを母材とする RE-NPs の作製を行い、熱緩和によるエネルギーロスが少ない母材を選定した。結果、フッ化物(NaYF<sub>4</sub>)を母材とする希土類蛍光体の発光強度が最も高いことを確認した。合成方法についても様々な方法を検討し、水熱合成方によるマイクロ粒子の合成、熱分解法によるナノ粒子の合成に成功した。熱分解法については反応溶液の昇温速度、温度などを PID 制御することで、安定的に単分散したナノ粒子を合成することができた。これら合成した希土類マイクロ蛍光体・ナノ蛍光体に関して、Ho 原子を添加したものは約 975 nm と約 1177 nm の近赤外光 2 波長で励起したときに赤色で UC 発光することを確認した(図 1)。

また、添加希土類イオンの濃度最適化、励起波長の最適化、表面改質などによる輻射遷移失活の防止による発光輝度向上を検討した。特に、作製した NaYF<sub>4</sub>:Re(Re は発光希土類元素)マイクロ蛍光体を高濃度な F と Na を含む化合物の存在下で 96 h 水熱処理を行うことで、未処理のものと比較して 142 倍の輝度向上が得られることを見出した(図 2)。さらに、輝度向上のメカニズムについても調査し、水熱処理中のイオン交換による結晶性の向上が発光強度の改善に寄与していることを明らかにした。

この他、合成した蛍光体を生体内で使用することを見据えて、蛍光体の表面を親水化分子でコーティングする技術についても検討し、最終的に水に分散可能な粒子を得ることができた。

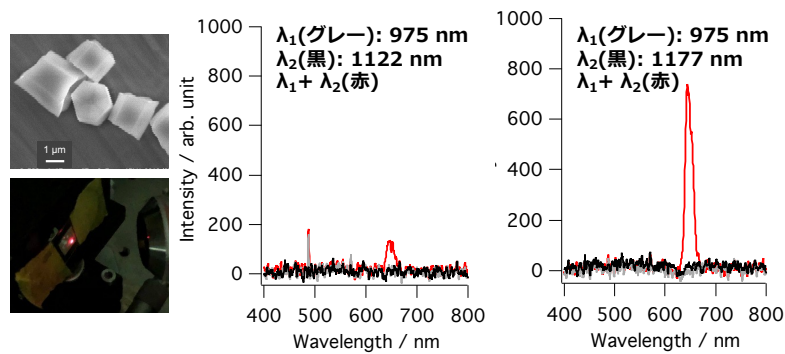


図 1 2 波長励起蛍光体 NaYF<sub>4</sub>:Ho の赤色 UC 発光

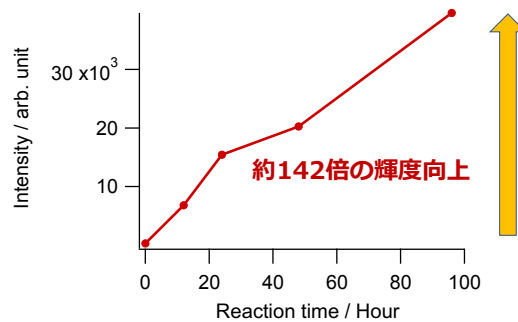


図 2 2 波長励起蛍光体の追加水熱処理による発光輝度向上

### 研究テーマ B: 深部 3 次元マルチカラー光操作の実証

研究テーマ A において作製した 2 波長励起の高輝度マイクロ蛍光体を用いて、生体深部において蛍光体を発光させることが可能かを検証した。はじめに、2 波長励起光学系の構築を行った。励起系は、2 つの波長の CW レーザーをそれぞれ異なる光路においてビームエキスパンダーで広げ、それぞれの対物レンズの光軸が 45°または 90°になるよう配置し、集光したレーザーが交差するようにした。レーザーは、半導体レーザーの他、最適なレーザー励起波長の調査のため、波長可変半導体レーザーも光路に導入可能にした。発光の検出は、サンプル後方から分光器で行った。また、生体深部における蛍光体の励起方法について、脳深部でのレーザー強度の減衰をシミュレーションし、どのような励起を行うのが良いかを確認した。

続いて、作製した蛍光プローブがどの程度深部で使用できるかを、生体模倣材料(イントラリピッドなど)やマウスの固定脳を用いて評価した結果、イントラリピッドだけでなく、3 mm のマウス固定脳越しに目視で発光を視認可能な輝度での発光を確認し、深部光操作の可能性を示した(図 3)。また、レーザーが交差している箇所においては発光強度が強いことは確認できたものの、蛍光体をできるだけ明るく発光させるために、レーザー強度を上げると 1120 nm ~ 1180 nm 付近の 1 波長でも発光してしまい、3 次元光細胞操作に課題があることも分かった。

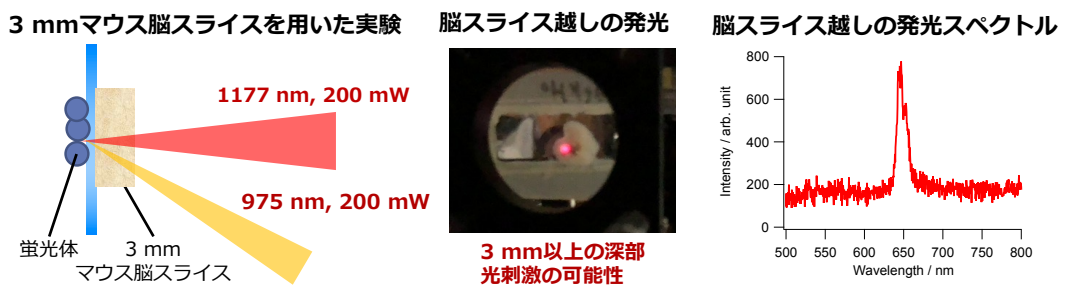


図3 3 mm の脳スライス越しの2波長励起発光

### 研究テーマ C: 非線形光学結晶を用いた細胞操作法

希土類ナノ粒子を用いない、マルチカラー細胞光操作法として、非線形光学結晶マイクロ粒子の第二高調波発生(SHG)光を用いた細胞光操作法を提案した。この方法では、非線形光学結晶である BBO マイクロ粒子を超短パルスレーザーで励起した際の SHG 光を利用する。励起波長の半分の波長の光を得ることが可能なため、レーザーの波長を変えることで BBO マイクロ粒子を青、緑、赤の様々な色で発光させることが可能である。

図4に示す通り、励起波長の半分の波長で発光していることが分かる。また、その光強度は目視できるほど明るく、光活性化タンパク質を励起するのに十分な光強度であることも分かった。また、2波長を同時に発振可能なレーザーを用いれば、異なる色を任意の位置で同時に発光させることも可能である。また、BBO マイクロ粒子を2 mm の生体模擬試料(2%イントラリピッド)越しに発光させることに成功し、さらに、2 mm にスライスした固定脳越しにも BBO マイクロ粒子を発光させることに成功した(図5)。

この粒子を用いて、SSFO を発現したマウスを用いて光細胞操作を試みたが現状成功していない。この理由として、非線形光学結晶マイクロ粒子が潮解してしまい、発光効率が低下したこと、励起レーザーの強度が高すぎることによって細胞にダメージを与えてしまうことなどが挙げられる。そのため、BBO 粒子より水への潮解性に強く、非線形係数の高いBIBOへ材質を変更することで、生体内部の環境において安定的に使用することを検討中である。

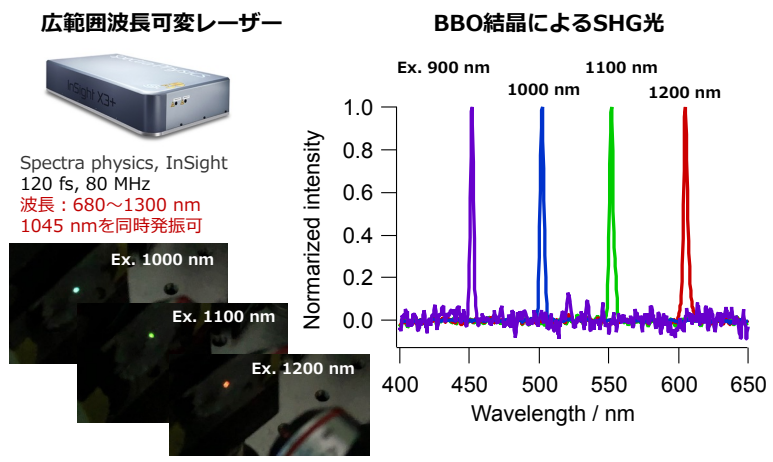


図4 BBO マイクロ粒子の SHG 発光色制御

### マウス固定脳スライス(2 mm)

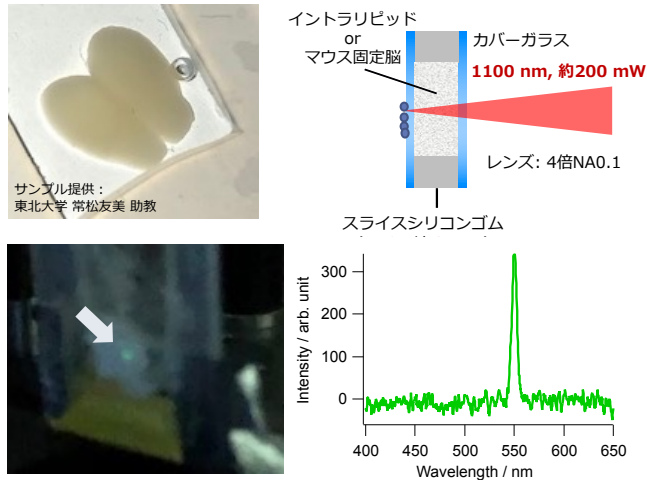


図 5 2 mm の脳スライス越しの SHG 発光

## 研究テーマ D: 開発した希土類蛍光体の応用探索

### 1. 生体深部アップコンバージョンイメージングへの応用

開発した 2 波長励起マイクロ蛍光体( $\text{NaYF}_4:\text{Ho}$ , 赤色発光)は、1120 nm~1180 nm 付近の 1 波長励起で 650 nm 付近の発光を励起可能であることがこれまでの実験でわかっている。そのため、一般的な 980 nm 励起のアップコンバージョン粒子を用いた深部イメージングより生体組織の散乱の影響を低減し、更に深部のイメージングの実現可能性がある。生体模倣材料の 1%イントラリピッド越しに  $\text{NaYF}_4:\text{Ho}$  を蛍光体の最適励起波長である 1150 nm レーザーを用いて UC イメージングした結果を図 6 に示す。イメージングはガルバノミラー走査によるラスタースキャン方式で行い、検出は光電子増倍管を用いた。この結果、生体深部 2 mm ほどまで蛍光体をイメージングすることができた。しかしながら、現状、市販の 980 nm 励起のマイクロ蛍光体ほど発光効率が低いいため、イメージングの SN 比向上やさらなる深部での使用のためには、 $\text{NaYF}_4:\text{Ho}$  蛍光体の発光効率をさらに向上させる必要がある。

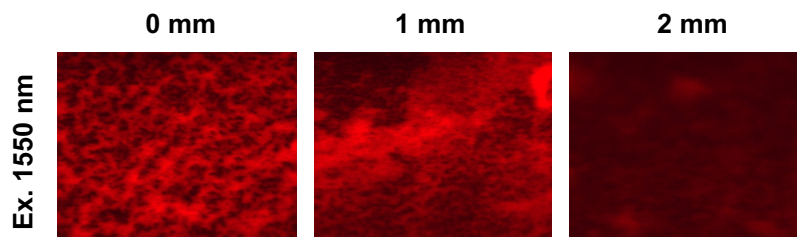


図 6 1%イントラリピッド越しの  $\text{NaYF}_4:\text{Ho}$  マイクロ粒子深部イメージング

### 2. カソードルミネッセンスイメージングへの応用

開発した  $\text{NaYF}_4:\text{Ho}$  ナノ蛍光体をカソードルミネッセンス(CL)バイオイメージングに応用できないか検討した。CL バイオイメージングは、細胞や組織のサンプルを蛍光体で免疫染色し、そのサンプルからの電子線励起による発光を検出・マッピングするイメージング手法である。電子線は光に比べて容易にナノスケールに集束可能なこと、CL は物質に依存した発光

色を呈することから、一分子スケールかつカラーのバイオイメージングを実現できる可能性を持った手法である。開発した NaYF<sub>4</sub>:Ho 粒子のイメージングの結果、CL 発光波長 650 nm の直径数十 nm の NaYF<sub>4</sub>:Ho を CL イメージングすることに成功した。また、イメージングの空間分解能は操作透過型電子顕微鏡(STEM)像と同程度であり、通常の光学顕微鏡より高い空間分解能でイメージングが可能であることを示した。今回開発したナノ蛍光体は、約 10 nm ～ 数十 nm と非常に小さいものの、電子線による励起発光を検出できているので、今後、生体サンプルを本蛍光体で免疫染色することで、CL バイオイメージングに応用可能と思われる。

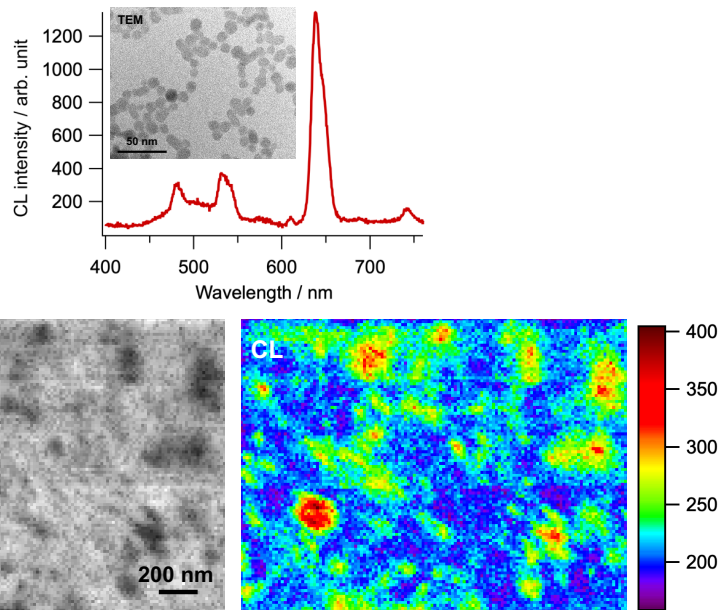


図7 NaYF<sub>4</sub>:Ho 粒子の CL スペクトル、STEM 像、CL 像

### 3. 今後の展開

解決すべき課題はあるものの2波長励起により発光するUC希土類マイクロ蛍光体・ナノ蛍光体を開発することができた。この知見は、他の希土類蛍光体の発光増強などにも応用が可能と考えられ、これまでに研究されてきた希土類蛍光体を用いたバイオイメージングなどへの応用も考えられる。また、本研究で開発した希土類蛍光体は、これまでに光遺伝学やバイオイメージングに用いられているUC蛍光体の980 nmより長い波長帯でUC発光を励起できるものもあり、この特性を利用することで、より深い領域での細胞光操作の可能性やバイオイメージングの可能性が考えられる。また、開発した希土類マイクロ蛍光体の結晶性を改善による高輝度化手法に関しては、フッ化物系のあらゆる蛍光体への適用が可能であり、既存の蛍光体の発光強度をさらに改善し、光遺伝学やバイオイメージングのみならず、様々な分野での応用展開が考えられる。熱分解法により合成した希土類ナノ蛍光体においては、電子顕微鏡を用いたナノスケールかつマルチカラーなイメージング法であるカソードルミネッセンスイメージングにも応用可能であることを示すことができたため、今後、蛍光体を標識した細胞切片を用いて細胞内タンパク質の分布を分子スケールでイメージング可能なツールとしての利活用し、生命科学に貢献していく。さらに、希土類蛍光体ではないが、非線形光学結晶粉末を利用した新しい深部マルチカラー細胞光操作法についても提案し、生体深部でも発光することを確認したので、今後、細胞や個体の光細胞操作が可能かを確認していく。

#### 4. 自己評価

予定していた希土類蛍光体の2波長励起による生体深部での3次元かつマルチカラーでの細胞光操作は達成できなかったのは悔やまれる。しかしながら、課題はあるものの2波長励起 UC 希土類蛍光体の開発については達成し、mm スケールの脳深部での光細胞操作に応用できる可能性を示すことができた点は今後につながると考える。この中で、希土類マイクロ蛍光体に関しては、結晶性を改善して高輝度化する手法を確立した点では、ある程度の成果を得られた。また、研究を行う中で、希土類マイクロ蛍光体は深部バイオイメーシングに、希土類ナノ蛍光体においては、電子顕微鏡を用いたカソードルミネッセンスイメーシングにも応用可能であること示し、新しい研究テーマにつなげることができた。さらに、希土類蛍光体は用いていないものの、非線形光学結晶粉末を利用した新しい深部マルチカラー細胞光操作法の可能性を示した。本研究では、研究に使用する装置や合成方法などのすべてを一から構築し、原理の検証から行う必要があったため、研究をここまで遂行できたのは本予算と光操作領域のすべての関係者のおかげであり、お礼を申し上げたい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 古川太一、「希土類添加蛍光体の光遺伝学への応用～生体深部細胞の3次元多色光刺激～」、国際粉体工業展(2020年11月19日)
- 河内 彰宏, 秋野 善紀, 山中 真仁, 古川 太一, 新岡宏彦, 西澤 典彦、「希土類イッテルビウム添加ナノ粒子の第2の生体窓(NIR-II)発光を用いた近赤外共焦点蛍光イメーシング」、Optics & Photonics Japan 2020 (OPJ2020) (2020年11月14日)
- 秋野 善紀, 山中 真仁, 新岡 宏彦, 古川 太一, 西澤典彦「 $\text{Yb}^{3+}$ と $\text{Nd}^{3+}$ の第2生体窓発光を用いたデュアルカラーイメーシング」、Optics and Photonics Japan 2020 (OPJ2019) (2019年12月2日)
- (招待講演) 古川太一、「希土類蛍光体のバイオメディカル応用」、第1回光若手チャプター研究会 (2019年8月23日)
- (招待講演) 古川太一、「希土類蛍光体で実現するバイオメディカル応用技術」、ものづくりライフイノベーションシンポジウム(2019年6月19日)