

# カーボンナノチューブを用いたバイオイメージング

蓬田 陽平

## はじめに

生体内物質を、明るく、鮮明に、動的に観察可能なバイオイメージングは、抹消動脈疾患や脳疾患などの診断ツールとして、生物学・医学・薬学の幅広い分野から注目されている。これまで、核磁気共鳴画像法 (MRI)、陽電子放射断層撮影 (PET-CT)、超音波検査などが用いられているが、抹消動脈疾患や脳疾患などの診断に重要となる毛細血管などの微細構造の動的観察のためには、より高い時間および空間分解能が求められている<sup>1)</sup>。

そのような背景の下、蛍光物質をプローブとして生体内に投与し、その蛍光を用いて生体内構造を可視化する蛍光イメージングが注目されている。特に、可視光より長波長の近赤外光を示すカーボンナノチューブ (CNT) を蛍光プローブとして用いたイメージングにおいては、上記の従来の技術に比べて高い空間および時間分解能が報告されている<sup>2)</sup>。CNTは、生体に対して透過性の高い蛍光波長を有し、蛍光プローブとして優れた光学的性質を有している。その一方で、CNTはさまざまな構造の混合物として合成されるため、構造の不均一性が問題となっている。

ここでは、近赤外蛍光イメージングや蛍光プローブの一般の特徴について簡単に述べた後、CNTを蛍光プローブとして用いるための表面修飾技術、CNTの不均一性を解決するための構造制御技術について触れ、最後に、厳密に構造制御されたCNTを用いた高効率な血管造影<sup>3)</sup>に関する最近の研究を紹介する。

## 近赤外蛍光イメージング

蛍光プローブを用いて生体内構造を可視化する蛍光イメージングの模式図を図1に示す。まず、外部の光源からの光が生体を通過し、生体内の蛍光物質に吸収される。次に、光吸収により励起状態となった蛍光物質からの蛍光が生体を通過し、外部の受光素子によって検出される。しかし、生体を通過する光は、生体組織による光吸収および光散乱によって損失を受けるため、観察深度が深くなるほど明るくかつ鮮明な像を得るのは困難になる。そのため、光損失の低減がイメージングの最適化に向けた課題となる。この光損失は、光の波長によって大きく変

化する。可視領域 (400–700 nm) では、生体組織による散乱とヘモグロビンやミオグロビンによる吸収が光損失をもたらす。また長波長領域 (> 1400 nm) では水による光吸収が深刻となるが、近赤外領域では、こうした光損失は低減される<sup>4)</sup>。したがって、700–1400 nmの近赤外光は生体を透過しやすく、この波長領域は、しばしば「生体の窓」とも呼ばれている。

これまでの近赤外光を用いた蛍光イメージングは、波長領域700–900 nmに限られてきたが、近赤外蛍光体や検出器の開発・改良が進み、最近では1000–1400 nmの長波長域でのイメージングも可能になってきた<sup>1)</sup>。1000–1400 nmの光の検出は、安価なSi検出器では感度が低いため難しいが、InGaAs検出器を用いれば可能である。InGaAs検出器は、製造技術の進歩により、最近では入手しやすくなっている。1000–1400 nmでは、像にボケをもたらす光散乱が低減し、高分解能撮影が可能になるというメリットも大きい。同様の理由で、さらに長波長領域である1500–1700 nmも注目されているが<sup>5)</sup>、この領域では水の光吸収の増大により、高輝度な像が得にくいというデメリットとのトレードオフになる。以下の項では、蛍光波長が1000–1700 nmの幅広い領域を網羅するCNTについて紹介する。

## 近赤外蛍光プローブとしてのCNT

蛍光イメージングでは、励起光および蛍光プローブからの蛍光が生体を通過する。励起波長および蛍光波長は蛍光プローブの種類に依存し、その両方の波長領域が光損失の少ない近赤外領域にあることがイメージングの最

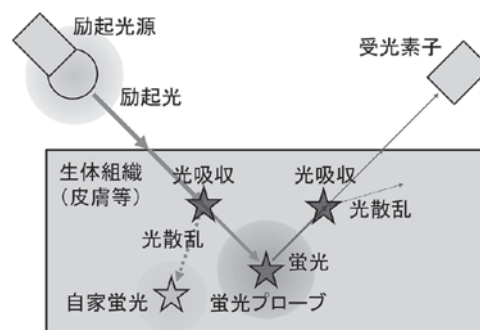


図1. 蛍光イメージング

適化に重要である。このような物質は、インドシアニングリーンなどの有機蛍光色素、量子ドットなどいくつか開発されているが、ここではCNTが有するユニークな特徴を紹介する。

CNTは炭素で構成される二次元物質であるグラフェンシートを単層あるいは多層の筒状に丸めた物質であり、直径は単層で1–2 nm程度である。ここでは、CNTは直径1 nm程度の細い単層CNTを指すこととする。CNTの構造(カイラリティ)は、グラフェンシートの巻き方によって決定され、カイラル指数と呼ばれる二つの整数の組み合わせ( $n, m$ )で表される。CNTの電気的および光学的性質はカイラル指数によって大きく変わる。たとえば、蛍光を示すのは( $n - m$ が3の倍数ではない)半導体型のCNTだけである。

CNTは、生体の窓の中でも1000–1400 nmの長波長領域に蛍光を有しており、従来の有機蛍光色素の700–900 nmの波長領域に比べて、光散乱の低減が期待される。また、同様の1000–1400 nmの波長領域を有する量子ドットにおいて問題となる高い毒性を有する原子を含まない。このようにCNTは、蛍光プローブとしてとても優れた特徴を有するが、いくつか解決すべき問題もある。以下では、その問題と解決法について紹介する。

### CNTの構造制御

CNTは、光学的性質の異なる複数の構造が混合した状態で合成され、その混合物の不均一性は蛍光プローブへの応用において問題となる。ここでは、その詳細と解決法としてのCNTの構造制御について説明する。

図2Aに典型的なCNTの励起・蛍光マッピングを示す。縦軸は励起波長、横軸は蛍光波長である。異なるカイラリティは異なるスポットとして示されている。ここから、合成後のCNTは複数のカイラリティを含んでおり、カイラリティごとに異なる励起および蛍光波長を有することが分かる。しかし、励起光源には点線で示されるよう

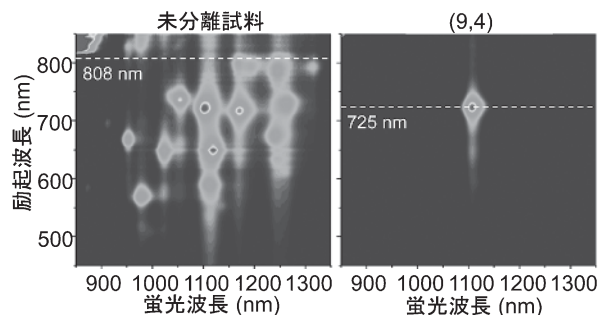


図2. 未分離試料および(9,4)試料の励起・蛍光マッピング

な単一波長光源(808 nm)が用いられるため、これまでは一部のCNTしか励起できない状況であった<sup>2)</sup>。これは、像の輝度の低下につながり、輝度を維持しようとすると投与量の増大につながる。このような理由から、特定のカイラリティだけが含まれる試料が望まれていた。しかしこれまでの合成法では、その純度や量に制限があり、蛍光プローブとして用いた例はなかった。

筆者らは、合成後の混合物から特定のカイラリティを取り出す分離法(本特集, 田中)に着目し、単一のカイラリティを高純度かつ大量に分離した<sup>3)</sup>。図2に、得られた単一カイラリティ(9,4)の励起・蛍光マッピングを示す。先程の合成後の試料(以下、未分離試料)とは一転して、単一カイラリティは、きれいな単独のスポットで示されており、たとえばその励起波長である725 nmで励起した場合、ほぼすべてのCNTつまり(9,4)が励起されることになる。また、(9,4)の蛍光波長(~1100 nm)は皮膚に対してもっとも透過性の高い波長領域に一致しており、優れた蛍光プローブとして期待される。ここでは、この(9,4)を近赤外蛍光プローブとして適用した研究を紹介する。

### CNTの表面修飾技術

蛍光プローブの投与には、注射器などで蛍光物質の水溶液を静脈に打ち込み、血液とともに循環させる手法がよく用いられる<sup>1)</sup>。しかし、CNTは油のような疎水性の表面を有し、そのままの状態では血液などの水を主成分とする液体にはなじまず、その表面同士の相互作用により凝集および沈着してしまう。また、そのような疎水性の物質は生体にとって異質な存在であるため、たとえ安定に分散できたとしても、マクロファージなどに即座に補足され、血液循環が困難になる。これらの理由により、CNTを生体内で用いるためには、CNTの表面を親水性かつ生体適合性のある物質で修飾することが必要となる。

CNTの表面修飾には、界面活性剤がよく用いられる<sup>6)</sup>。界面活性剤とは、分子内に親水部と疎水部の両方を持つ物質であり、親水部を水側に向けて疎水部をCNTの表面と密着させることで、CNTの油のような表面を水になじませることが可能である。上記の分離法で得られたCNTは、ドデシル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウムなどの低分子の界面活性剤に覆われた状態で水に分散しており、一見そのまま血中に分散可能に思えるが、実際に血中に入れてみると即座に分散性を失ってしまう。これは界面活性剤の濃度が血中で低下し、CNTから脱離するためだと考えられ、より強固にCNTと結びつく界面活性剤が必要となる。

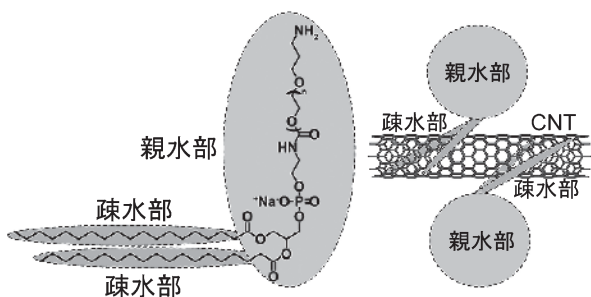


図3. DSPE-PEGの分子構造とCNT被覆の模式図

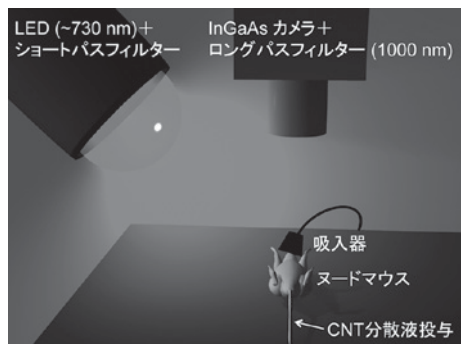


図4. 近赤外蛍光イメージングシステム

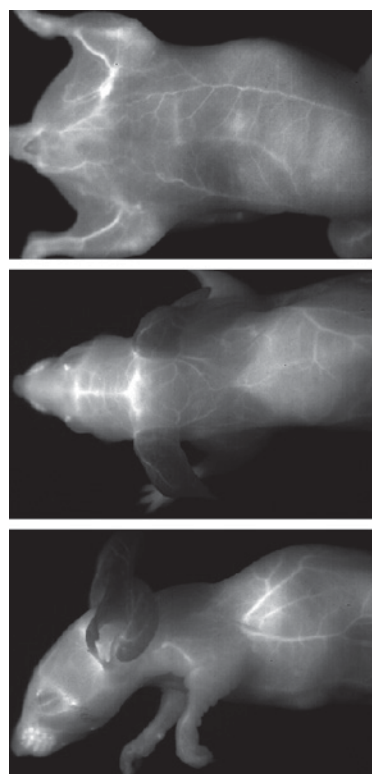


図5. マウスの血管造影

筆者らは、図3のように、CNTへの適用が報告されている生体適合性界面活性剤、ポリエチレングリコール結合リン脂質（DSPE-PEG）に着目した<sup>2)</sup>。ポリエチレングリコール、コリン、リン酸、グリセリンなどが親水部としてCNTの分散性を向上し、アルキル鎖が疎水部としてCNTの表面に強く吸着する。この疎水部同士の吸着は低分子の界面活性剤に比べて強固であると考えられ、血中で5時間以上CNTが分散性を失わないことを確認している。ここでは、限外ろ過を用いて、CNTに吸着する界面活性剤を低分子のものからDSPE-PEGに置換し、生体適合性の高い近赤外蛍光プローブを作製した。

#### 構造制御されたCNTを用いた血管造影

図4のようなイメージングシステムを作製し、マウスの血管造影を行った。DSPE-PEGで修飾した(9,4)の分散液をマウスの尾静脈から投与した。励起光源には、(9,4)の励起波長725 nmに合うように、中心波長735 nmのLEDを選択した。励起光をマウスに照射し、マウスの全身をプリンストンのInGaAsアレイを用いて撮影した。1000 nm以下の励起光や自家蛍光などはフィルターによりカットした。

図5にInGaAsアレイで撮影したマウスの全体像を示す。LEDを照射すると、血管部分が鮮明になり、皮膚を透過してきたCNTからの蛍光を検出できた。未分離

試料との比較を行ったところ、CNTの投与量が同じ場合、(9,4)試料から得られた像は未分離試料より20倍程度明るかった。これは、未分離試料では735 nmで励起されない半導体CNTや金属型CNTなどを含むのに対し、(9,4)試料ではほぼすべてのCNTが励起され蛍光の発光に寄与するためと考えられる。また、投与量の下限を調べたところ、これまでの報告値の1/100以下の0.17  $\mu\text{g}$ の投与量でも、血管造影が可能なが分かった。このような投与量の低減は、被験体の負担の軽減につながる。

最後に、近赤外蛍光イメージングに最適な波長領域を考察する。図6に、実測したマウスの皮膚の光損失スペクトルを示す。光損失スペクトルは光吸収と光散乱の寄与の足し合わせである。光損失は、1100 nm近傍で最小となっており、(9,4)の波長領域は、皮膚を介したイメージングにおいてもっとも高輝度な像が得られる領域であると言える。光損失スペクトルは、生体組織によって異なり、観察したい部位によっては他の波長が有利になる場合がある。また、光散乱は像にボケをもたらすため、高い空間分解能が求められるような用途では長波長領域が有利になる。たとえば、脳のイメージングでは、1300–1400 nmもしくはそれ以上の波長領域が最適であると考えられている<sup>7)</sup>。



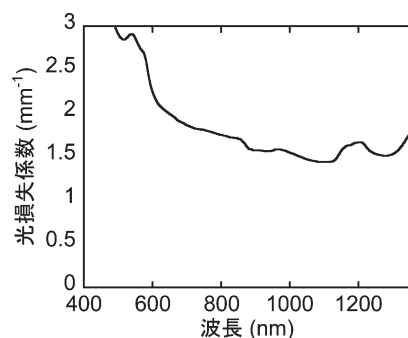


図6. 皮膚の光損失スペクトル

### おわりに

生体適合性界面活性剤DSPE-PEGで修飾した単一カイラリティ (9,4) を用いて、高効率の血管造影を行うことに成功した。CNTを用いた近赤外蛍光イメージングは、既存のMRI・PET-CT以上の空間分解能、超音波検査以上の時間分解能を有し、これまで見えなかったものを可視化し、疾患の原因の特定や新規治療方法の提案などにつながる可能性を秘めている。この蛍光イメージングを、より明るく、鮮明に、低損失にするのに重要な

のが、蛍光プローブの波長であり、CNTの構造制御技術が重要な役割を果たす部分である。今回は1100 nmの波長領域の(9,4)を用いたが、本来CNTは1000–1700 nmの広範な領域に蛍光波長を有し、最近では1300 nm付近の蛍光波長を有する単一カイラリティも得られている。最終的には、観察したい部位や観察の用途に合わせて、最適な蛍光波長を選択できるようになるだろう。それにより、バイオイメージングの進展に貢献できれば、筆者にとって望外の喜びである。

本研究は、国立研究開発法人産業技術総合研究所の張民芳先生、湯田坂雅子先生、片浦弘道先生のご協力の下、行った。この場をお借りし、深く御礼申し上げたい。

### 文 献

- 1) Hong, G. *et al.*: *Nat. Biomed. Eng.*, **1**, 0010 (2017).
- 2) Hong, G. *et al.*: *Nat. Med.*, **18**, 1841 (2012).
- 3) Yomogida, Y. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 12056 (2016).
- 4) Smith, A. M. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **4**, 710 (2009).
- 5) Diao, S. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 14758 (2015).
- 6) Sireesha, M. *et al.*: *Mater. Sci. Eng. B*, **223**, 43 (2017).
- 7) Hong, G. *et al.*: *Nat. Photon.*, **8**, 723 (2014).