

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12565

研究課題名(和文)金ナノ粒子の分散・凝集挙動を分光特性で捉え、関節軟骨の潤滑機能の評価に活かす

研究課題名(英文)Lubricity evaluation of articular cartilage by spectroscopic characterization of dispersion and/or aggregation of Au nanoparticles

研究代表者

石原 美弥 (Ishihara, Miya)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医用工学・教授)

研究者番号：30505342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：長寿社会においてADL(Activity of daily life)の維持のために、非侵襲的な方法で関節軟骨の機能を評価する方法が必要とされている。現在までに関節軟骨の機能である粘弾性と性状の評価を光計測で可能にしている。本研究では3つめの機能である潤滑を評価するための光計測法を考案した。具体的には、潤滑機能を司るヒアルロン酸における荷電状態を分光特性で評価できるようにするために金ナノ粒子を使用した。その荷電状態によって金ナノ粒子の分光特性が変化した。さらに細胞外マトリックス性状を評価する光ファイバーを用いた光学測定系と共有できるため、関節軟骨機能の同時評価が実現できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to promote a prosperous aging society, maintaining our ADL (Activity of daily life) is important. For this purpose, noninvasive measurements of articular cartilage functions are required. We developed diagnostic methods of viscoelasticity and biochemical characteristics using optical measurement. In this research, an optical method of evaluation of the third function of articular cartilage, lubrication, was designed. We strategically focused on the hyaluronic acid, which performs the function of lubrication, has specific charge state distribution. We used gold nanoparticles with various surface modifications. As results, we could characterize their charge spectroscopically. This spectroscopic measurement method has a possibility of sharing with the method of biochemical analyses of extracellular matrix of articular cartilage. Therefore, we found the potential to evaluate lubrication and biochemical characterization of the articular cartilage simultaneously.

研究分野：医用生体光学

キーワード：検査・診断システム 変形性関節症 関節鏡 ナノ粒子 摩擦係数 粘弾性係数

1. 研究開始当初の背景

長寿社会においてADL (Activity of daily life)の維持は重要である。日本国内だけで滞在患者数 3 千万人の変形性関節症は、ADL (Activity of Daily Life)だけでなく、QOL (Quality of Life)の低下も招き、長寿社会の日本が対策すべき疾患の1つである。その治療の一貫に関節軟骨の再生医療がある。連携研究者の東海大学の佐藤教授は細胞シートを用いた軟骨再生医療の臨床研究を実施している。自己細胞を用いた 10 例はすべて良好な結果となっており、同種細胞を用いた再生医療も開始している。自己細胞、同種細胞の再生医療のどちらにも、我々が独自に開発した「光音響計測法による粘弾性計測法」を導入し、そのバリデーションを実現している。具体的には、関節鏡視下で関節軟骨表面に十分に安全なレーザー光を照射して関節軟骨のみの粘弾性を測定する方法である。粘弾性特性は、関節軟骨の主要な機能の1つであるが、その他に豊富な細胞外マトリックスの性状評価や、軟骨表面の潤滑機能も重要な機能である。

細胞外マトリックスの性状評価として、我々はすでに時間分解自家蛍光スペクトル測定法を提案し、基礎的な実証実験で有効性を確認している。すなわち、関節の主要な機能のうち、軟骨表面の潤滑機能を関節鏡視下で評価できるようになれば、関節軟骨の機能評価として主要3機能をバリデーションできることになる(図1)。臨床現場では簡便な評価法が求められているため、これらの評価を同時、あるいは、同一のハードウェアで共有できれば、さらに臨床上の優位性は高い。

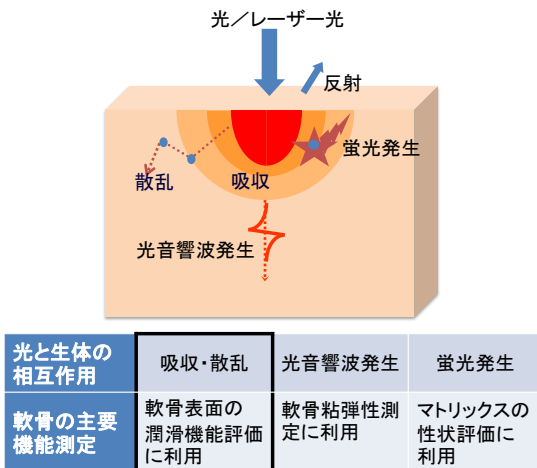


図1 関節軟骨の3大機能評価に光と生体の相互作用を利用

潤滑機能は、潤滑剤の物性と界面的性質で決まる。そこで、関節の潤滑機能を司るヒアルロン酸における荷電状態に着目した。滑液内にも関節軟骨内にも在るヒアルロン酸は負に荷電して陽イオンと水を結合することで潤滑機能を発揮している。

軟骨変性によりヒアルロン酸の濃度や分子量が減少することがわかっている。本研究

では、ヒアルロン酸の変化に伴い荷電状態も変化することに着想した。

現在までの軟骨の機能評価法に関する我々の成果として粘弾性評価と、細胞外マトリックスの性状評価をレーザー光を用いた測定法を用いることで、同一の資料を経時的に繰り返し測定するバリデーションが可能となっている。ヒアルロン酸の荷電状態も光を用いた方法で可能となれば、まさに理想的な関節軟骨機能の評価法になりうる。

2. 研究の目的

本研究では、バリデーションとして有効な光を用いた測定法で荷電状態を評価できる手法を提案する。

抗リウマチ薬の1つに金製剤があることをヒントに、可視から近赤外域に局在表面プラズモン共鳴吸収を示すナノマテリアルとして、金ナノ粒子に着目した。無機ナノ粒子中の自由キャリアがある波長の照射光電場に共鳴して集団振動した時に観察される。粒径や形状により特徴的な吸収波長があり、さらに分散状態や表面電荷なども制御して合成することができる。

ヒアルロン酸の荷電状態を金ナノ粒子の荷電状態として、その光学的评价法を検討した。その光学的评价法が、現在までに開発した、関節軟骨のバリデーション法と連動できることを条件にした。

3. 研究の方法

金ナノ粒子の生体親和性を評価するために、アニオン性のクエン酸保護金ナノ粒子とカチオン性のポリ-L-リジン保護金ナノ粒子の水溶液を培養細胞に滴下し、金ナノ粒子の細胞への取り込み挙動を調べた。図2に、透過型電子顕微鏡像(TEM像)を示す。金ナノ粒子の細胞内外の分布と状態が観察できている。

細胞内の金ナノ粒子はいずれもリソソームに局在しており、エンドサイトーシスの機構で細胞内に取り込まれていることが確認できた。細胞内の金ナノ粒子はカチオン性金ナノ粒子の場合は分散状態であるのに対して、アニオン性金ナノ粒子は凝集状態である様子が観察される。

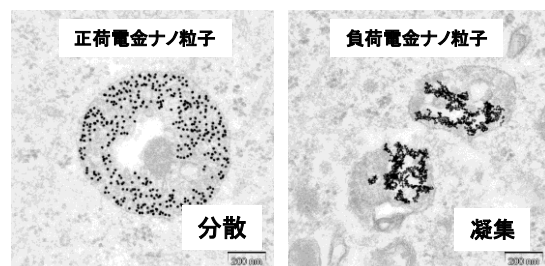


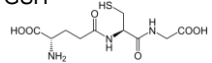
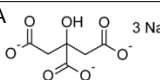

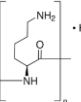
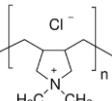
図2 細胞(リソソーム)内の金ナノ粒子(TEM画像)

連携研究者の京都大学の寺西教授は、金をは

じめ、銀などの金属、酸化物（酸化インジウムスズなど）やカルコゲニド（硫化銅など）などの半導体の材料のナノ粒子の精密な合成に実績がある。さらに粒径や形状によりプラズモン共鳴吸収波長を可視から近赤外域の範囲で細かくチューニングすることもでき、分散状態や表面電荷なども制御することが可能である。

合成した様々な表面就職をした金ナノ粒子を表2にリストする。金ナノ粒子の界面電位の評価にはゼータ電位測定を行なった。

表1 様々な界面電位の金ナノ粒子

サンプル	化学式	粒径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
GSH-Au (グルタチオン)	GSH 	8.2	-24.5
PAA-Au (ポリアクリル酸)	PAA COO ⁻ Na ⁺	15.1	-42.3
CA-Au (クエン酸ナトリウム)	CA 	15.3	-38.1
PVP-Au (ポリビニルピロリドン)	PVP 	15.7	-28.6
PLL-Au (ポリリジン)	PLL 	9.9	+41.4
PDDA-Au (塩化ポリジアリルジメチルアンモニウム)	PDDA 	15.3	+45.2

合成した金ナノ粒子のうち、特に塩化ポリジアリルジメチルアンモニウム (PDDA-Au) は生体への毒性が認められた。PDDA-Au の濃度が一定量以上になると、細胞膜が破壊されてしまう様子が TEM 像で観察された。

また、ポリビニルピロリドン (PVP-Au) はノニオン性であるが、水中のアニオンの吸着等により、ポリビニルピロリドン保護金ナノ粒子はアニオン性（ゼータ電位が負）となる結果となった。

今回のゼータ電位の測定結果から、金ナノ粒子の粒径や分子量、濃度と、ゼータ電位の直接的な関係を見つけないことができなかった。1回の測定で、n=8 を実施したところ、その n の範囲内でのバラツキは小さいが、金ナノ粒子を合成してから日にち、月をかえてゼータ電位を測定すると、急激ではないが緩やかにゼータ電位が変化していることがあった。金ナノ粒子の水溶液の安定性に関わることで、これは今後の課題として継続的に検討したい。

生体への親和性の確認のため、細胞に取り込ませた金ナノ粒子を対象にして、光測定として各種分光解析、ICP-MS 解析を実施した。取り込み量は培養時間と金ナノ粒子粒径が大きく異なり、培養時間が長いほど、また粒径が大きいほど取り込まれた。ICP-MS の測

定結果と相関があった。

今回の大きな成果である、細胞内の金ナノ粒子は全てのカチオン性金ナノ粒子の場合には分散状態であるのに対して、全てのアニオン性金ナノ粒子は凝集状態の様子が透過電子顕微鏡像で観察された (図2)。すなわち、細胞に取り込ませた金ナノ粒子はその荷電状態により分散・凝集挙動が異なることを実証した。分散状態で培養細胞に取り込まれているカチオン性金ナノ粒子のスペクトル特性は金ナノ粒子水溶液のスペクトルと一致し、凝集状態のアニオン性金ナノ粒子の場合にはレッドシフトし、および、スペクトルが広がった。

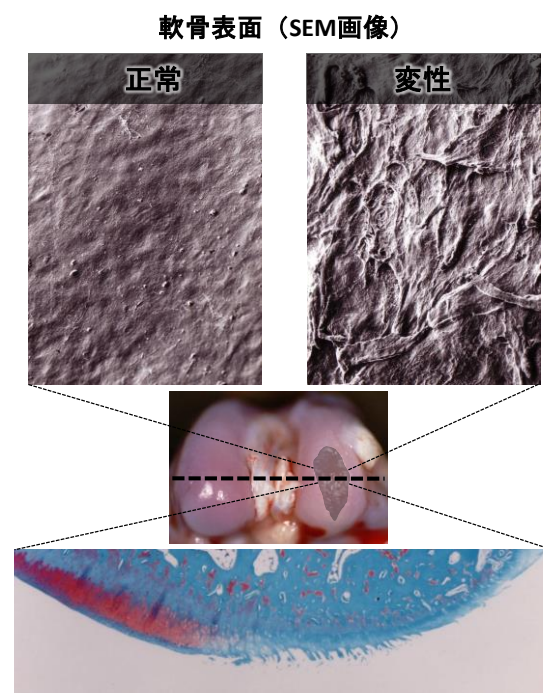


図3 ウサギ変形性関節症モデル

すでに確立しているウサギ変形性関節症モデル (図3) に適用しようとしたところ、細胞への取り込まれにくさの条件を作る必要があることがわかり、PEG-SH 保護金ナノ粒子も合成した。この結果より、界面電位だけでなく表面修飾の有機分子の化学構造や分子量も大きく影響することを示唆した結果となった。今後の課題として継続的に検討したい。

4. 研究成果

荷電状態によって金ナノ粒子の分光特性が変化した。しかし、分子量なども影響する結果となった。

分光特性評価法は細胞外マトリックス性状を評価する光ファイバーを用いた光学測定系と共有できるため、関節軟骨機能の同時評価が実現できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

- ① 石原 美弥, 光音響画像の性能を決める指標に関する基礎的検討, 電気学会研究会資料 光 量子デバイス研究会, 査読有, OQD-16-025, 2016, 43-46
- ② Shinpei Okawa, Takeshi Hirasawa, Ryota Sato, Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara, Toshiharu Teranishi, Effect of the optical properties of gold nanoparticles on photoacoustic signals, Proceedings of SPIE, 査読有, 9708, 2016, 970836-1-970836-5, DOI:10.1117/12.223879
- ③ Shinpei Okawa, Takeshi Hirasawa, Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara, Numerical and experimental studies on quantification of the optical properties by use of photoacoustic measurement, マス フォア インダストリ研究 Mathematical Background and Future Progress of Practical Inverse Problems, 査読有, 5, 2016, 81-109
- ④ Taku Ukai, Masato Sato, Miya Ishihara, Munetaka Yokoyama, Tomonori Takagaki, Genya Mitani, Yoshiki Tani, Tomohiro Yamashita, Yutaka Imai, Joji Mochida, Usefulness of using laser-induced photoacoustic measurement and 3.0 Tesla MRI to assess knee cartilage damage: a comparison study, Arthritis Research & Therapy, 査読有, 17, 2015, 383-1-383-10, DOI:10.1186/s13075-015-0899-4
- ⑤ 石原 美弥, 寺西 利治, 金ナノ粒子の潜在力を引き出す光音響イメージングプローブの開発, 化学工業, 査読有, 66(10), 2015, 725-730

[学会発表] (計 3件)

- ① Miya Ishihara, Masato Sato, Possibility of applying photo-acoustic method in term, TERMIS-AP 2016, 2016.09, Taipei, Taiwan, TERMIS-AP 2016 ABSTRACT BOOK, 496-496
- ② Miya Ishihara, Takeshi Hirasawa, Ryota Sato, Toshiharu Teranishi, Plasmonic nanoparticle interaction with cell for photoacoustic cancer imaging, Nanotech France 2015,

2015.06, Paris, France
Nanotech France 2015 Conference
Program, 141-141

- ③ 石原 美弥, 【シンポジウム】光音響イメージングの再生医療応用の可能性, 第15回日本再生医療学会総会, 2016.03, 大阪, 再生医療 15(増刊), 2016, 150-150

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原美弥 (ISHIHARA, Miya)

防衛医科大学校・医用工学講座・教授

研究者番号: 30505342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

寺西利治 (TERANISHI, Toshiharu)

京都大学・科学研究所・教授

研究者番号: 50262598

佐藤正人 (SATO, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 10056335

(4) 研究協力者

なし