

平成 22 年 12 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009 年度
 課題番号：19550157
 研究課題名（和文） カリックスアレーン被覆による水溶性半導体量子ドットを基盤とした
 蛍光プローブの開発
 研究課題名（英文） Development of fluorescent probes based on calixarene-coated water
 soluble quantum dots
 研究代表者
 神 隆（JIN TAKASHI）
 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任教授
 研究者番号：80206367

研究成果の概要（和文）：両親媒性カリックスアレーン誘導体を表面被覆剤として水溶性高輝度発光半導体量子ドットの新規合成法を開発した。得られる水溶性量子ドットの蛍光輝度は従来のチオール系化合物を表面被覆剤とした場合に比べ数倍以上高く、また水溶液中での安定性も優れていた。カリックスアレーン被覆量子ドット表面には、抗体をはじめとした生体分子を修飾する事が可能であり、生細胞の蛍光イメージング用プローブとして有効である。

研究成果の概要（英文）：A novel method for preparing water-soluble highly fluorescent semiconductor quantum dots was developed using amphiphilic calixarenes as surface coating agents. The fluorescence efficiency of the resulting quantum dots was about 5 times higher than that of the quantum dots prepared by using simple thiol compounds as surface coating agents. The surface of the calixarene-coated quantum dots can be easily modified with biomolecules such as antibodies, showing their utility as fluorescent probes for live cell imaging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体機能材料

キーワード：カリックスアレーン、半導体量子ドット、蛍光プローブ、表面被覆、水溶化

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ微粒子の合成法の進歩より、強い発光を示す半導体微粒子（量子ドット）が液相での化学合成によって容易に得られるようになった。量子ドットは、一般に直

径が約1nm-15nmの大きさの量子井戸構造を有する半導体微粒子で、その大きさの違いによって発光波長を可視から近赤外領域まで変化させることができる（量子サイズ効果）。また、有機系の蛍光色素と比べ光退色に極め

て強い優れた蛍光特性を有している。半導体量子ドットは、従来の有機系蛍光色素や希土類蛍光錯体にはない高輝度・抗光退色性蛍光プローブとして、特に*in vivo*バイオイメージングの分野で注目されている。

一般に、液相合成によって得られる半導体量子ドットは非常に疎水的であり、水には不溶である。そのため、半導体量子ドットを蛍光プローブへ応用するには、半導体表面の化学修飾により水溶化する必要がある。従来の水溶性半導体量子ドットの合成法は、2つに分けられる。1つは、マイクロエマルジョン法を利用して直接的に水溶性半導体量子ドットを得る方法である。もう1つは、現在最もよく用いられている方法で、アルキルフォスフィン系の配位性溶媒を用いてまず疎水性の半導体量子ドットを合成し、つぎに表面を化学修飾し水溶化する方法である。水溶化法としては主に、チオール系化合物あるいは両親媒性ポリマー（脂質、PEG等）を用いて疎水性の半導体表面をコートする方法が用いられてきた。チオール被覆は、簡便な方法であるが、著しい輝度の低下をもたらす。一方、ポリマー被覆をした場合は、高輝度性は維持できるが、サイズが大きくなる欠点がある。

申請者は、従来の半導体量子ドットの水溶化法の問題点（輝度の低下、サイズ・表面構造の不均一性）を克服する新規な水溶性半導体量子ドットの合成法を開発した（*Chem Commun.* 2829, 2005, *JACS*, 128, 9288, 2006）。この合成法は、両親媒性の環状フェノール化合物（カリックスアレーン）を用いて疎水性の半導体表面を被覆する方法で、高輝度でかつドットサイズの小さい水溶性量子ドットが簡単に得られる利点がある。たとえば、CdSe/ZnS（コア/シェル）量子ドットを水溶化した場合、

量子収率が0.3程度、サイズが10 nm以下の可視部発光の水溶性量子ドットを得ることができる。また、フェノール性水酸基を有するカリックスアレーンを用いるため、半導体表面の機能化（抗体、蛋白などの生体分子のラベルおよび分子認識能の付与）が比較的容易におこなえる。スルホン化カリックスアレーンを被覆した水溶性 CdSe/ZnS 量子ドットでは、蛍光の消光からアセチルコリンの検出が可能である（*Chem Commun.* 4300, 2005）。申請者が開発した半導体量子ドットの新規被覆法は、非常に簡便で水溶性半導体量子ドットの大量合成に適用でき、細胞あるいは生体（臓器）レベルでの蛍光プローブの開発に応用可能である。

2. 研究の目的

1998年、*Science*誌に半導体量子ドットによる*in vivo* イメージングの報告がされて以来、急速に半導体量子ドットの蛍光プローブとしての応用に関心が高まった。疎水性の半導体量子ドットを蛍光プローブとして応用するための最も重要な技術は、その水溶化法にある。本来の量子ドットの蛍光特性を維持したまま、高輝度で安定な水溶性量子ドットを調製することが重要である。すでに、実験室レベルでの半導体量子ドットの水溶化法は、チオール系化合物あるいは両親媒性ポリマーを用いた様々な方法が報告されている。また、一部の可視部発光水溶性量子ドットに関しては、すでに抗体ラベル蛍光プローブとして市販されている。しかし、申請者の知る限り、カリックスアレーンのような機能性有機化合物を用いた高輝度水溶性半導体量子ドットの合成法に関する報告は極めて少ない。カリックスアレーン被覆による水溶性量子ドットの利点は、チオール系化合物あるいは両親媒性ポ

リマー被覆の量子ドットに比べ、半導体表面の分子認識機能をホスト-ゲスト化学に基づいて柔軟に設計できる点にある。例えば、スルホン化カリックスアレーンあるいはチアカリックスアレーンを被覆した水溶性量子ドットでは、それぞれアセチルコリンあるいは銅イオンに応答する蛍光プローブとして機能する。また、量子ドットをカリックスアレーンの金属錯体などで被覆することによっては、MRI造影剤としての機能を併せ持つ蛍光プローブ開発が期待できる。本研究課題では、ホスト化合物であるカリックスアレーンの特性を利用した生体関連、環境関連イオン、分子を対象とした蛍光プローブの開発、さらにはカリックスアレーン被覆による水溶性量子ドットの高輝度特性を生かした近赤外領域（700-900nm）でのバイオイメーjing用蛍光プローブ（光造影）の開発をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 疎水性高輝度量子ドットの合成

疎水性の高輝度量子ドットは、Bawendiらが開発したホットソープ法(*JACS*, **101**, 8706, 1993)により、可視から近赤外に発光領域をもつものを合成する。

① 可視部発光(500-650 nm)量子ドット：
CdSe/ZnS(コア-シェル)型半導体

② 近赤外発光(650-800 nm)量子ドット：
CdTe/CdSeあるいはCdSe/ZnTeの(コア/シェル)及び合金型のCdSe_xTe_{1-x} コア構造をもった半導体

③ 近赤外発光(800-1200 nm)量子ドット：
PbSe/ZnSの(コア/シェル)型半導体

輝度の高い半導体量子ドットを得るには、反応溶媒として用いる配位性化合物であるTOPO(トリオクチルフォスフィンオキ

シド)とHDA(ヘキサデシルアミン)の組み合わせ比率および金属カルコゲナイドの原子比率が非常に重要であるため、最も適切な反応条件を検討する。

(2) カリックスアレーン被覆水溶性量子ドットの合成、精製法の確立

申請者が開発したカリックスアレーン被覆によるCdSe/ZnS半導体量子ドットの新規水溶化法をもとに、金属カルコゲナイド系半導体全般について高輝度で安定な水溶性半導体量子ドットを得るための合成、精製法を確立する。量子ドットを水溶化するための両親媒性カリックスアレーンは、抗体、核酸、ペプチドあるいはリガンドなどの化学修飾を容易とするため、カルボキシル基あるいはアミノ基をもつカリックスアレーン誘導体を用いる。

(3) カリックスアレーン被覆水溶性量子ドットのスペック

カリックスアレーン被覆の水溶性量子ドットの蛍光の量子収率は、合成条件を最適化することにより、可視部発光で0.3以上、近赤外部発光で0.1以上をめざす。また、被覆層を含む量子ドットのサイズは、10 nm以下を目標とする(サイズが大きくなると蛍光エネルギー移動の利用した測定に不利)。蛍光プローブとしての実用上重要となる水中での安定性については、生理的リン酸緩衝液中(pH=7.4)で6か月以上、凝縮を起さない安定な水溶性量子ドットを開発する。

(4) カリックスアレーンの分子、イオン認識能を利用した蛍光プローブの開発

分子、イオン認識能をもつカリックスアレーンで被覆する事により、水溶性量子ドットの界面でのホスト-ゲスト相互作用に基づく

蛍光プローブの開発が可能である。すでに、アセチルコリン、銅イオンに応答するカリックスアレーン被覆量子ドットに関して基礎的知見は得ており、感度、選択性等の改善により実用的な蛍光プローブの開発をおこなう。

(5) バイオ研究用蛍光プローブの開発

量子ドットでは光退色がほとんど起こらないため、免疫染色あるいは細胞内生理活性物質等の蛍光プローブとしてこれまでの有機系プローブにはない高感度測定が可能となる。バイオ研究用蛍光プローブとして、抗体、糖鎖、リガンドを修飾した水溶性量子ドットを開発する。

(6) バイオイメージングのための近赤外蛍光プローブ(光造影剤)の開発

生体には、ヘモグロビンをはじめとした内在性色素が存在するため、可視部領域の光はほとんど透過しない。一方、650-1200nmの近赤外光は生体透過性に優れている。量子ドットを利用した蛍光プローブとして最も新規性のある分野は、バイオメディカルイメージング用の光造影剤であると考えられる。従来の水溶性の有機色素では実現が難しいと考えられている近赤外発光造影剤を、カリックスアレーン被覆近赤外量子ドットを利用して開発する。

4. 研究成果

半導体量子ドットを蛍光プローブとして応用するためには、その蛍光特性および水中での分散安定性が保たれるよう量子ドット表面を被覆する必要がある。一般に細胞イメージング用量子ドットとして利用されているものに、高輝度発光のCdSe/ZnS(コアシェル)量子ドットがあ

げられるが、表面被覆で用いる被覆剤によって得られる水溶性量子ドットの蛍光輝度、分散性に大きな差が出る。たとえば、モノチオール系の化合物(例えばメルカプト酢酸やメルカプトプロピオン酸)で量子ドットを表面被覆した場合、その蛍光輝度は著しく低下する。また水中での分散安定性も低い(1週間ほどで凝縮する)。このような欠点を避ける方法として、両親媒性ポリマーで量子ドットをカプセル化する方法が挙げられるが、ポリマー合成や表面被覆の手順が複雑なため簡便ではない。本研究では、細胞イメージングなどに利用可能な水溶性高輝度量子ドットプローブを簡便に合成するためカリックスアレーンなどを表面被覆剤として用いた新規合成法の開発をおこなった。本研究によって得られた研究成果を以下にまとめる。

(1) 疎水性高輝度量子ドットの合成

可視部発光(520-650 nm)の疎水性高輝度量子ドットでは、CdSe/CdZnS(コアシェル)により量子収率30-60%を実現。近赤外部発光(700-900 nm)の量子ドットでは、CdSeTe/CdS(コアシェル)により量子収率10-50%を実現した。

(2) カリックスアレーン被覆水溶性量子ドットの合成

高輝度で水中分散性の高い水溶性量子ドットの調整法としてp-tert-ブチルカリックス[6]アレーンのカルボン酸誘導体を被覆剤として用いる合成法を開発した。

(3) 生細胞イメージング用量子ドットプローブの開発

細胞膜染色用グルタチオン被覆量子ドットプローブおよび表面レセプター(HER2, CXCR4)イメージング用量子ドットプローブ

を開発した。

(4) In vivo イメージング用近赤外線量子ドットプローブの開発

KPL-4 乳がん移植マウスでの癌腫瘍イメージング用近赤外線量子ドットプローブを開発した。

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 15 件、すべて査読有り)

- 1) “蛍光性半導体ナノ粒子 (量子ドット) の合成、表面修飾とその医療応用”
神 隆、粉体工学会誌、47, 646-655、2010 年
- 2) “In-vivo Toxicity Assessment of Intravenously Injected Anti-HER2 Antibody Conjugated CdSe Quantum dots in Wistar rat.”, *Int. J. Nanomed.* (*in press*).
Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and J Behari
- 3) “Fluorescent platinum (Pt₂) nanoclusters: their synthesis, purification, characterization, and application to bio-imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, (*in press*).
Shin-Ichi Tanaka, Jun Miyazaki, Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and Yasushi Inouye
- 4) “Safety Evaluation of Different Doses of Silver Nanoparticle Injected Intravenously in Wistar Rat”, *Toxicology Mechanism and Methods* (*in press*), Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and J Behari
- 5) “Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with “in vivo cryotechnique”, *Microvasc Res.* (2010), doi: 10.1016/j.mvr.201009.002.
Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Takashi Jin, and Shinichi Ohno
- 6) “Antibody-ProteinA conjugated quantum dots for multiplexed imaging of surface receptors in living cells”, *Molecular. BioSystems*, 6, 2325-2332, 2010.
Takashi Jin, Dhermendra K. Tiwari, Shin-ichi Tanaka, Yasushi Inouye, Keiko Yoshizawa and Tomonobu M. Watanabe
- 7) “Real-time Nanoscopy by using Blinking Enhanced Quantum Dots”, *Biophys. J.* 99, L50-L52, 2010.
Tomonobu M. Watanabe, Shingo, Fukui, Takashi Jin, Fumihiko Fujii, and Toshio Yanagida
- 8) “A quantum dot-based ratiometric pH sensor”, *Chem. Commun.*, 46, 2408-2410, 2010.
Takashi Jin, Akira Sasaki, Masataka Kinjo, and Jun Miyazaki
- 9) “Near-infrared fluorescence detection of acetylcholine in aqueous solution using a complex of rhodamine 800 and p-sulfonatocalix[8]arene”, *Sensors*, 10, 2438-2449, 2010.
Takashi Jin
- 10) “Synthesis and characterization of anti-HER2 antibody conjugated CdSe/CdZnS quantum dots for fluorescence imaging of breast cancer cells”, *Sensors*, 9, 9332-9354, 2009.
Dheemendra K. Tiwari, Shin-Ichi Tanaka, Yasushi Inouye, Keiko Yoshizawa, Tomonobu M. Watanabe, and Takashi Jin
- 11) “Gd³⁺-functionalized near-infrared quantum dots for in vivo dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging”, *Chem. Commun.*, 5764-5766, 2008.
Takashi Jin, Y. Yoshioka, F. Fujii, Y. Komai, J. Seki and A. Seiyama
- 12) “Preparation and characterization of highly fluorescent, glutathione-coated near infrared quantum dots for in vivo fluorescence imaging”, *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 2044-2061, 2008.
Takashi Jin, F. Fujii, Y. Komai, J. Seki, A. Seiyama and Y. Yoshioka
- 13) “Interfacial recognition of acetylcholine by an amphiphilic p-sulfonatocalix[8]arene derivative incorporated into dimyristoyl phosphatidylcholine vesicles”, *Sensors*, 8, 6777-6790, 2008.
Takashi Jin, F. Fujii and Y. Ooi
- 14) “Preparation and characterization of thiacalix[4]arene coated water-soluble CdSe/ZnS quantum dots as a fluorescent probe for Cu²⁺ ions”, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10(6):473-479, 2007.
Takashi Jin, F. Fujii, E. Yamada, Y. Nodasaka and M. Kinjo
- 15) “Calixarene-based photoresponsive ion carrier for the control of Na⁺ flux across a lipid bilayer membrane by visible light”, *Material Letters*, 61, 808-808, 2007.

Takashi Jin

〔学会発表〕（計4件）

- 1) “Development of bioimaging probes based on semiconductor nanocrystals”, Fujii Fumihiko and Takashi Jin and, IFREC-CSI Joint Symposium (Hangzhou, China), 11/2-11/50, 2010.
- 2) “Development of Highly-Fluorescent Compact Quantum Dots from Visible to Near-Infrared Region for Immune Imaging”, Fumihiko Fujii and Takashi Jin, Integrating Immune Networks with Immuno-Imaging Singapore Immunology Network (SIgN) & IFRc (Singapore), 6/18-6/19, 2009.
- 3) “Development of Highly-Fluorescent HER2-Antibody Conjugated Quantum dots for Breast Cancer Imaging”, Dhermendra Tiwari and Takashi Jin, Integrating Immune Networks with Immuno-Imaging” Singapore Immunology Network (SIgN) & IFRc (Singapore), 6/18-6/19, 2009.
- 4) “Development of highly-fluorescent compact quantum dots from visible to near-infrared region for immune imaging”, Fumihiko Fujii and Takashi Jin, International Symposium organized by JST & IFRc “Frontier Immuno-Imaging (Osaka), 5/11, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：水溶性近赤外蛍光材料およびマルチモーダル水溶性近赤外蛍光材料
発明者：神 隆 他6名
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2008-130884
出願年月日：平成 20 年度 5 月 19 日
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：水溶性蛍光材料およびその製造方法
発明者：神 隆 他4名
権利者：北海道大学、科学技術振興機構
種類：特許
番号：特許第 4245182
取得年月日：平成 21 年 1 月 16 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/laborary/nano-biomaterials/outline.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神 隆 (JIN TAKASHI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

研究者番号：80206367

(3) 連携研究者

金城 政孝 (KINJO MASATAKA)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70177971

(H19：研究分担者→H20～21：連携研究者)