

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05558

研究課題名（和文）光応答型ナノキャリアからの薬剤放出過程のリアルタイム計測法の開発

研究課題名（英文）A real-time monitoring technique of a molecular release process from photo-sensitive drug nanocapsules

研究代表者

東海林 竜也（Tatsuya, Shoji）

神奈川大学・理学部・准教授

研究者番号：90701699

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、溶液中に漂うドラッグデリバリーキャリアー粒を光圧により捕捉し、カプセル一粒からの分子放出過程を顕微分光学的手法により追跡する新たな分析手法の開発である。これまでに、金ナノ粒子を内包させたリポソームを安定的に光捕捉し、レーザー光照射に伴う蛍光強度の経時変化を追跡することに成功した。さらに、カプセル剤としてリポソームを選定し、光分解性リポソームの作製と光捕捉に注力した。光分解性脂質を導入し、紫外線照射に伴うリポソームの分解過程を顕微蛍光分光法により追跡するシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物を体内の特定部位に、特定のタイミングで、特定の量を放出するドラッグデリバリーシステムにおいて、薬物を送達するナノカプセルの開発が極めて重要である。このナノカプセルの放出速度は、そのカプセルの粒径や形状、化学組成などに大きく依存すると考えられるが、これまでの分析手法では統計平均的な情報しか得ることが難しい。本研究により、溶液中に漂うドラッグデリバリーキャリアー粒を光圧により捕捉し、カプセル一粒からの分子放出過程を顕微分光学的手法により追跡することができれば、より高精度かつ高機能なドラッグデリバリーキャリアーの開発にも役立てるだろう。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new analytical method to capture a single drug delivery carrier floating in solution by light pressure and to follow the molecular release process from the capsule by a microspectroscopic method. We have succeeded in stably trapping a single nanocapsule of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocapsule, a biodegradable polymer, and tracking its fluorescence intensity change over time due to hydrolysis. Furthermore, liposomes were selected as the encapsulant, and we focused on the fabrication and photocapture of photodegradable liposomes. We introduced photodegradable lipids and constructed a system to track the degradation process of liposomes upon UV irradiation using microfluorescence spectroscopy.

研究分野：分析化学

キーワード：光ピンセット リポソーム 光分解性脂質 顕微蛍光分光法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体内で治療部位まで薬物を運搬し治療部位で薬物を放出するドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System; DDS) において、内包薬物の放出速度を制御したナノ粒子 (ナノカプセル) 開発が重要である。代表的な DDS キャリアとして、リン脂質からなる膜小胞 (リポソーム) が挙げられる。リポソームは、その表面やリン脂質組成を改質することにより温度や pH、光などの外部刺激に応じて内包薬物を徐々に放出できる徐放性製剤として注目されている。

しかしながらその一方で、製剤化のボトルネックとしてナノカプセルを溶液に分散させた直後に内包薬物のおよそ 50 % 以上が過剰放出される「初期バースト」という現象が挙げられる。この初期バーストは、ナノカプセルの化学構造やサイズ・形状だけでなく、周辺環境 (溶媒や温度) などに依存するであろうといわれている。このような過程の放出速度は、従来の分析方法では統計学的平均値によって決定されてきた。たとえば、内包薬物の光吸収を利用した紫外可視吸光度計を用いた方法が挙げられる。このような従来方法では、水溶液内を自由拡散するナノカプセル一つ一つを個別選択的に分析することが困難である。

2. 研究の目的

本研究は光の力である「光圧」を用いたナノ粒子の捕捉・操作技術である光ピンセット法と、共焦点顕微鏡分光法を組み合わせることで、リポソーム 1 個を水中で光捕捉し、内包薬物の放出過程をリアルタイムで分光計測する手法を開発する。薬物モデルとして導入した色素分子の蛍光強度の経時変化より、サイズや形状、構造組成依存性を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

本研究では、大きく二つの研究方法により目的を達成する。

(1) 集光レーザー型光ピンセットを用いた光応答性リポソームの顕微分光分析

独自に開発した集光レーザー型光ピンセット・顕微鏡分光装置を改良し、光に応答して崩壊するリポソーム 1 粒を光捕捉し、リポソームに内包した蛍光物質からの蛍光強度の経時変化を計測する手法を確立する。蛍光強度の時間減衰曲線より、リポソーム一粒の放出速度の速度定数を決定する。

(2) リポソームナノキャリアの光捕捉に向けた新規光ピンセット法の開発

集光レーザー型光ピンセットはマイクロメートルサイズのリポソームを光捕捉するには適しているが、粒径が小さくなると作用する光圧が微弱になるため捕捉が困難となる。そこで、本研究ではプラズモンに代表されるナノ構造体による電場増強効果を利用した従来法よりも効率的な光捕捉方法を開発し、リポソームナノキャリアの光捕捉方法を確立する。

4. 研究成果

(1) 集光レーザー型光ピンセットを用いた光応答性リポソームの顕微分光分析

(1)-1 金ナノ粒子内包リポソームからの放出速度定数の決定

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (DOPC) からなるリポソームに、金ナノ粒子を内包させた金ナノ粒子内包リポソームを作製した。このリポソームに薬物モデルとして蛍光色素も内包させた。この光応答性リポソーム一粒の放出速度を決定するために、3本のレーザー光を顕微鏡に導入する計測システムを構築した。具体的には、集光レーザー型光ピンセットのための連続発振型の近赤外レーザー光 (波長 1064 nm)、もう一つは色素分子の蛍光励起光源のための連続発振型の可視レーザー光 (波長 473 nm)、そしてプラズモン励起光源としてのナノ秒パルス可視レーザー光 (波長 532 nm) を同軸で倒立顕微鏡に導入した。

この計測システムを用いて直径 4.0 μm のリポソームに近赤外レーザー光 20 mW を集光すると、リポソームを安定的に光捕捉することに成功した。さらに、より微弱な近赤外レーザー光でも光捕捉することに成功した。これはリポソームに内包している金ナノ粒子の高い分極率により勾配力が効率よく働いたためと考えられる。光捕捉した金ナノ粒子内包リポソームに、緑色レーザー光を照射することで、色素分子の蛍光を取得できる。なお、近赤外レーザー光を集光しているため、二光子吸収に伴う発光も考えられるが、捕捉に要する近赤外レーザー光が微弱なためこの効果は観測されなかった。緑色レーザー光を照射することで、S/N 比の高い蛍光スペクトルを取得することに成功した。レーザー光出力を調整し色素の光退色を抑えることで、長時間安定的にシグナルを得ることができた。プラズモン励起光源であるナノ秒パルスレーザーを照射しなければ、蛍光強度は常に一定であった。

この光捕捉したリポソームにナノ秒パルスレーザー光を照射すると、徐々に蛍光強度が減少した。プラズモンナノ粒子を用いる場合蛍光増強または退色の効果も考えられるが、予備的検討でそれらの効果も無視できる (発現しない) 実験条件に整えている。そのため、パルスレーザー光照射に伴う蛍光強度の時間減衰はリポソームを構成する膜が崩壊することで内包色素が放出している過程を反映している。このリポソームの崩壊は、金ナノ粒子の光熱効果によるナノバブル形成に起因すると考えられる。得られた時間減衰曲線は、一次の指数関

数でよく再現し、減衰定数（放出速度定数）を決定することに成功した。この手法を用いて光捕捉したりポソーム 1 粒ずつの速度定数を決定した。その結果、リポソームの粒径増加に伴い速度定数は減少、すなわち放出速度が減速することを明らかにした(T. Shoji *et al.*, *in preparation* (2023))。

(1)-2 光分解性リポソームの光捕捉と分解過程の実時間観測

金ナノ粒子内包リポソームは、ナノ秒パルスレーザー照射によるナノバブル形成が膜崩壊を誘導している。リポソームを DDS キャリアとして利用する際、このような金ナノ粒子以外に化学反応による膜崩壊を利用した例もある。そこで本手法の汎用性を検討すべく、光分解性脂質を導入したリポソームの分解速度計測を試みた。光分解性脂質として、オレイン酸 2-ニトロベンジルを合成した。これをリポソーム膜内に導入することで、紫外線照射により膜崩壊を誘導することができる。種々のリポソームについて検討を行っているが、ここでは 1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) を用いたリポソームについて報告する。

DSPC とコレステロールそして *N*-(メチルポリオキエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPE-PEG) からなるリポソームに光分解性脂質を所定量導入したりポソームを作製した。得られたリポソームは直径約 3 μm であり、集光レーザー型光ピンセットによる捕捉に最適な粒径が得られた。内包薬物としてスルホローダミンを内包させた。紫外線照射に伴うリポソームの崩壊過程を顕微蛍光分光法により検出するため、光ピンセット用の発振波長 1064 nm の近赤外レーザー、蛍光励起光源としての緑色レーザー (532 nm) に加え、紫外線 LED ランプ (中心波長 365 nm) を導入した。

図 1 に光分解性リポソーム単粒子を光捕捉し、紫外線を照射したときの明視野顕微鏡像を示す。捕捉したりポソームの直径は 1.0 μm だった。紫外線照射時間の経過とともに徐々にリポソームの膜が薄くなる様子を観察できた。さらに照射を続けると、約 6 分後にリポソームが光捕捉から外れることがわかった。紫外線照射をしない状態で光捕捉を続けると、光分解性リポソームも金ナノ粒子内包リポソーム同様に、30 分以上安定的に捕捉することができる。このことから、紫外線照射により光分解性脂質の分解により膜が徐々に崩壊することで、作用する光圧が弱まり捕捉が外れたものと考えられる。このような過程を顕微蛍光測定することで、光分解性リポソームの時定数を決定できる。

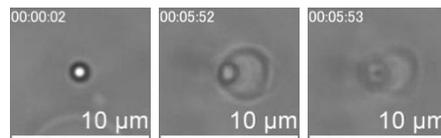


図 1 紫外線照射下の光捕捉した光分解性リポソームの明視野顕微鏡像

(2)-1 DDS ナノキャリアの光捕捉に向けたプラズモン光ファイバの作製

光圧は捕捉対象物が小さくなると弱くなるため、集光レーザー型光ピンセットによりナノ物質を操ることは難しい。そこで、光ファイバの先端に金ナノ粒子を固定化したプラズモン光ファイバを作製することで、ファイバ先端上でリポソームナノキャリアを光捕捉し、崩壊過程を表面増強ラマン散乱により分析するシステムを考案した。

クエン酸還元法により合成した金ナノ粒子をシラン剤により光ファイバ先端に結合させた。同様の方法でガラス基板上に作製した金ナノ粒子集積構造の走査型電子顕微鏡像を図 2 に示す。このように作製したナノ構造体は近赤外域にギャップモード局在表面プラズモンに相当する消光帯を有するため、690 nm のマルチモードのレーザー光を導入した光学系を構築した。

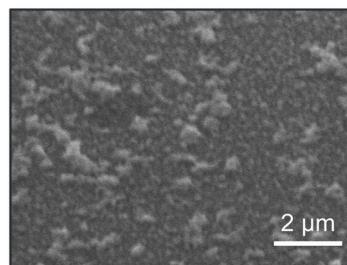


図 2 金ナノ粒子集積基板の走査型電子顕微鏡像

作製したプラズモン光ファイバの光捕捉能を評価すべく、ベンチマークとしてよく用いられるポリスチレンマイクロ粒子を捕捉対象物として選定した。マルチモードのレーザー光は集光特性に制限があるため、単独で用いても光捕捉は困難である。一方で、プラズモン光ファイバであればプラズモン励起すればナノ構造体近傍で勾配力が働くため光捕捉は実現できるメリットがある。しかしながら、実際に光捕捉を試みたところ、微粒子がファイバ端面から遠ざかる捕捉とは反対の挙動を示した。これはプラズモン光励起に伴う光熱効果により熱対流が発生したためと考えられる。ファイバ端面の金ナノ粒子の集積密度が高すぎるため、勾配力よりも熱対流の効果が上回ったため光捕捉ができなかったと考えられる。

2-(2) チタンナノ構造体を用いた光ピンセット法の開発

プラズモンの電場増強効果を用いると高効率な光捕捉を実現できるが、熱発生の効果が無視できない。そこで、新しい学理に基づく光ピンセット法を構築することで、DDS ナノキャリアの光捕捉の実現を目指す。

具体的には、チタン薄膜を酸腐食することで表面にナノメートルサイズの皺状(ナノリンクル)構造体を形成することに成功した。X線回折の結果、酸腐食によりチタン表面に水素化チタンの膜が形成されることがわかった。このナノリンクル構造に近赤外光を照射すると、溶液中を分散するポリスチレンナノ粒子を光捕捉することに成功した。集光レーザー型光ピンセットよりも低光強度で光捕捉を実現した。これまでに酸化チタンナノ構造体による光捕捉法を実現しているが、それとは違うメカニズムによる電場増強効果が働いていると考えられる。この機能と特徴、メカニズムを明らかにすることで今後、ナノキャリア光捕捉分析法を達成する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Sayaka, Uenobo Yuki, Takao Ryota, Yuyama Ken-ichi, Shoji Tatsuya, Linklater Denver P., Ivanova Elena, Juodkasis Saulius, Kameyama Tatsuya, Torimoto Tsukasa, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Incoherent Optical Tweezers on Black Titanium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials and Interfaces	6. 最初と最後の頁 27586 ~ 27593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.1c04929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakata Yoshiaki, Tsubakimoto Koji, Miyanaga Noriaki, Narazaki Aiko, Shoji Tatsuya, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Laser-Induced Transfer of Noble Metal Nanodots with Femtosecond Laser-Interference Processing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 305 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano11020305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Yasuyuki, Naka Shota, Yamanishi Daiki, Nagai Tatsuya, Yuyama Ken-ichi, Shoji Tatsuya, Ohtani Bunsho, Tamura Mamoru, Iida Takuya, Kameyama Tatsuya, Torimoto Tsukasa	4. 巻 4
2. 論文標題 Optical Trapping of Nanocrystals at Oil/Water Interfaces: Implications for Photocatalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 11743 ~ 11752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsanm.1c02335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takao Ryota, Ushiro Kenta, Kusano Hazuki, Yuyama Ken ichi, Shoji Tatsuya, Linklater Denver P., Ivanova Elena, Juodkasis Saulius, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Fluorescence Colour Control in Perylene Labeled Polymer Chains Trapped by Nanotextured Silicon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202117227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202117227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Mitsuhiro, Asoh Taka-Aki, Shoji Tatsuya, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Formation of Single Double-Layered Coacervate of Poly(N,N-diethylacrylamide) in Water by a Laser Tweezer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 2874 ~ 2883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c03009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Tatsuya, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 53
2. 論文標題 Nanostructure-assisted optical tweezers for microspectroscopic polymer analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 271 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-020-00410-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naka Shota, Shoji Tatsuya, Fujii Sho, Ueno Kosei, Wakisaka Yumi, Murakoshi Kei, Mizoguchi Tadashi, Tamiaki Hitoshi, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Thermo-Plasmonic Trapping of Living Cyanobacteria on a Gold Nanopyramidal Dimer Array: Implications for Plasmonic Biochips	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 10067 ~ 10072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.0c02071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komoto Sawa, Nagai Tatsuya, Takao Ryota, Ushiro Kenta, Matsumoto Mitsuhiro, Shoji Tatsuya, Linklater Denver P., Juodkazis Saulius, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Optical Trapping of Polystyrene Nanoparticles on Black Silicon: Implications for Trapping and Studying Bacteria and Viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 9831 ~ 9841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.0c01901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ushiro Kenta, Shoji Tatsuya, Matsumoto Mitsuhiro, Asoh Taka-Aki, Horibe Hideo, Katsumoto Yukiteru, Tsuboi Yasuyuki	4. 巻 124
2. 論文標題 Microanalysis of Single Poly(N-isopropylacrylamide) Droplet Produced by an Optical Tweezer in Water: Isotacticity Dependence of Growth and Chemical Structure of the Droplet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 8454 ~ 8463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c06932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 東海林 竜也
2. 発表標題 ナノ構造を利用した光ピンセット技術の開発と展望
3. 学会等名 2021年度 第5回 フォトニックデバイス・応用技術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東海林 竜也, 飯田 京子, 坪井 泰之
2. 発表標題 金ナノ粒子を内包したリポソーム単粒子からの分子放出挙動の顕微蛍光追跡
3. 学会等名 第21回高分子マイクロスフェア討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya SHOJI
2. 発表標題 Nanostructure-assisted optical tweezers for soft matter manipulation
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東海林 竜也
2. 発表標題 ナノ構造体を用いたナノ物質光マニピュレーション法の開発
3. 学会等名 第32回 散乱研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東海林 竜也, 松本 充央, 坪井 泰之
2. 発表標題 プラズモン光捕捉したポリ(N,N-ジエチルアクリルアミド)による分子濃縮・検出法の開発
3. 学会等名 2020年web光化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海林研究室 https://tshoji.com/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------