

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700456

研究課題名 (和文) 蛍光性有機ナノ結晶によるバイオイメージングの高度化

研究課題名 (英文) Advanced method of bioimaging using fluorescent organic nanocrystals

研究代表者

馬場 耕一 (BABA KOICHI)

大阪大学・医学系研究科・特任講師 (常勤)

研究者番号：00436172

研究成果の概要 (和文)： 蛍光顕微鏡観察は細胞や組織の状態を知りうる有益な手段であるため現在多目的に使用される。近年、医者・患者の医療・科学技術に対するニーズは高まりを見せ、あわせて新しい蛍光顕微鏡観察法の開発が強く求められている。本研究では蛍光性有機ナノ結晶の蛍光顕微鏡観察への使用という新しいコンセプトを取り入れた有益で将来技術につながる研究開発に取り組み、その結果、効果的な蛍光顕微鏡観察法への新たな道筋をつけることに成功した。

研究成果の概要

(英文)： Since a fluorescence microscopy observation is a useful technique for investigating cells and tissues conditions, this observation techniques are widely used. Recently, the development of the novel type of fluorescence microscopy observation techniques have been strongly desired along with the needs of medical doctors and patients against medical treatment and their related science technologies. In this research, novel type of fluorescence microscopy observation using fluorescent organic nanocrystals was successfully demonstrated for the first time, which will be useful for beneficial future research developments in this field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス (共通基礎研究)

キーワード：バイオイメージング、蛍光性有機ナノ結晶、共焦点レーザー顕微鏡観察

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡観察は生物医学研究において最も汎用なイメージング手法であり、生きた細胞や組織の低侵襲的なイメージングを可能とする。そのため蛍光顕微鏡観察において、高い量子収率や幅広い波長領域をカバーで

きる蛍光プローブのニーズが高まっている。また近年の科学技術の進歩にともない観察可能な領域幅は急速な広がりを見せており、現在ではナノメートルオーダーから一分子観察にまで至る。現在も国内外で精力的に研究が進められており蛍光観察によって得ら

れるナノおよび分子レベルでの多くの知見は、サイエンスへの貢献のみならず、次世代型医療の進展に大きなインパクトを与えている。また現代における蛍光観察の重要性はこのたび下村氏が緑色蛍光タンパク質に関する研究でノーベル化学賞を受賞したことから明らかであり、今後よりいっそうの加速化が推測される。

一方、申請者は有機ナノ材料化学を専門とし、これまでに主に有機光電子材料を対象とした有機ナノ結晶の作製と構造・物性評価の研究に携わってきた。このたび新たな試みとして、培った知識・経験・技術をナノ医療へ応用した結果、光増感剤ナノ結晶を用いたガンの光線力学療法における新規なドラッグデリバリーシステムの開発に世界で初めて成功した。この研究において申請者らは、水に溶けない光増感剤でもナノ結晶化することで、細胞毒性の懸念がある有機溶剤や界面活性剤を用いずに安定な水分散系を作製できることを示した。また培養ガン細胞系およびラット動物実験系において、界面活性剤をキャリアとする従来のミセルナノ粒子に匹敵する抗腫瘍効果を光増感剤ナノ結晶によって達成することに成功した。世界に先駆けて提唱したこの新規なドラッグデリバリーシステムの成果は、米国化学会の *Molecular Pharmaceutics* 誌に ASAP (as soon as possible) Article として、申請者が First Author で掲載された (K. Baba et al., *Mol. Pharmaceutics*, 4, 289-297, 2007)。

この研究成果から、申請者は、1. 水に溶解しない疎水的な有機化合物でも、ナノ結晶化することにより、界面活性剤や有機溶媒フリーで安全・安定な水分散系を構築でき、2. サイズ 100nm 程度のナノ結晶であれば細胞内に導入することが可能であり、3. 細胞内でもナノ結晶は光学活性を維持するという認識を抱くに至った。これらの特徴を蛍光色素プローブにあてはめると、ナノ結晶化の利点により、1. 水への溶解性を高める目的で併用される有機溶媒や界面活性剤を用いた既存の使用法の見直しや、2. 難水溶性のため蛍光プローブとして使用不可と認識されてきた色素群に対して、蛍光プローブとしての新規用法が考えられる。特にレーザー色素や有機 EL 素子用色素などは可視から近赤外域まで蛍光波長領域がカバーされ、また高量子収率・高光退色耐性を有するため、従来の蛍光色素プローブにない、優れた特性を有した新規有機ナノ結晶蛍光プローブの研究開発が可能であると考え、本研究課題を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

申請者は既に予備的実験を進めており興味深い結果を得ている。蛍光色素カルボシアニ

ン誘導体は細胞膜特異染色性色素として汎用される。しかしカルボシアニオン誘導体色素は疎水的であるため水に不溶である。そのため細胞をイメージングする際、色素の水への溶解度・分散安定性を上げる目的で有機溶媒や界面活性剤を併用する (*Biophys. J.*, 68, 766-778, 1995)。これらの使用は細胞毒性の観点から好ましいとはいえない。またマイクロサイズの結晶粉体を直接細胞に振り掛けるという手段も報告されているが (*J. Neurosci.*, 15, 1057-1079, 1995)、申請者らの共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察結果から、マイクロ結晶が培養細胞に取り込まれず細胞表面に接触した部分のみ蛍光し、イメージング効率が良くないことがわかった。一方、カルボシアニオン誘導体色素のナノ結晶を作製し、同様にイメージングに使用したところ、全ての細胞がきれいに蛍光染色されることが明らかとなった。また該有機ナノ結晶の水分散液は、有機溶媒および界面活性剤を用いずとも高い分散安定性を保持した。

一方、有機 EL 素子用色素として用いる顔料系色素のナノ結晶をイメージングに使用した場合、興味深いことに極めて高い光退色耐性を示すことが明らかとなった。共焦点レーザー顕微鏡のレーザー光の出力を 100% でイメージングし続けても、15 分間程、顕著な光退色が見られなかった。高い光退色耐性を有する理由のひとつは、色素のナノ結晶化により、顔料特有の堅牢な結晶構造が形成され光退色耐性が向上したためと推測している。また長時間連続的に細胞を観察できるため、細胞の動態をリアルタイムに可視化・追跡できる。

上記二例の有機蛍光色素に対して、結晶サイズが 100nm 近傍では結晶が細胞内に取り込まれることが分かってきたが、細胞内導入における詳細なサイズの影響は十分に明らかでない。また光退色耐性についても詳細検討の余地を有する。そこで本研究では、第一に、可視から近赤外域の蛍光波長領域をカバーする蛍光色素を選定し、サイズ制御されたナノ結晶の作製を行い、ナノ結晶の光学特性を評価する。第二に、培養細胞系での共焦点レーザー顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングにおいて、有機ナノ結晶蛍光プローブの結晶サイズ・構造特性、特異染色性、および光退色耐性等について詳細検討を行う。本研究課題では、培養細胞系での共焦点レーザー顕微鏡観察における有機ナノ結晶蛍光プローブとしての可能性とその最適条件を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 要旨

① 可視から近赤外域の蛍光波長領域をカバーする蛍光色素を対象に、結晶サイズ・構造

が制御されたナノ結晶の作製および光学特性の評価を行う。

② 培養細胞系での共焦点レーザー顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングにおける有機ナノ結晶蛍光プローブの結晶サイズ・構造特性、特異染色性および光退色耐性を評価する。

(2) 本研究を遂行する上での具体的な工夫

#### ① 21年度

有機ナノ結晶の作製には、申請者らの研究グループが15年前に独自に開発した再沈法を用いる(Jpn. J. Appl. Phys., Part 2, 31, L1132-L1134, 1992)。再沈法とは、再沈澱効果を利用して、有機ナノ結晶を水中に析出・安定分散させ、同時に結晶サイズ・構造を制御する手法である。

再沈法によるナノ結晶化の手順として、第一に可視から近赤外域の蛍光波長領域をカバーする蛍光色素、特にレーザー色素や有機EL素子用色素など高量子効率および高光退色耐性を有する蛍光色素を選定する。第二に溶液の濃度、水温、溶媒の種類、攪拌速度などの調整により結晶サイズおよび構造制御を行う。第三に有機ナノ結晶水分散液から透析を用いて作製に使用した有機溶媒を除去する。結晶サイズ・構造は走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡、動的光散乱法および粉末X線回折により評価する。ナノ結晶の光学特性は紫外可視近赤外吸収スペクトル測定および分光蛍光測定により評価する。

#### ② 22年度

(独) 理化学研究所バイオリソースセンターにより入手したヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞を用いた培養細胞系において、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光性有機ナノ結晶の蛍光プローブとしての評価を行う。その際、共焦点レーザー顕微鏡にCO<sub>2</sub>インキュベータを設置し、細胞培養下での長期リアルタイムイメージングにより、細胞分裂・増殖過程におけるナノ結晶の取り込み、特異染色性および光退色耐性等を評価する。また蛍光測定用分光器を共焦点レーザー顕微鏡観察と併用することで、ナノ結晶の細胞内での光学的挙動をスペクトル的に解析し評価する。

#### 4. 研究成果

可視から近赤外の波長領域をカバーする蛍光色素の中から対象化合物を選択し、結晶サイズ・構造が制御されたナノ結晶の作製および光学特性の評価を行い、培養細胞実験系で共焦点レーザー顕微鏡を用いた有機ナノ結晶蛍光プローブによる結晶サイズ・構造依存性、および特異染色性および光退色耐性の有効性を評価した。

具体的には有機ナノ結晶の作製に申請者

らの研究グループが開発した再沈法を用いた。再沈法とは、再沈澱効果を利用して、有機ナノ結晶を水中に析出・安定分散させ、同時に結晶サイズ・構造を制御する手法である。再沈法によるナノ結晶化の手順として、第一にレーザー色素や有機EL素子用色素など高量子効率および高光退色耐性を有する蛍光色素を選定した。特にペリレン色素、カルボシアニン誘導体色素、キナクリドン色素、フルオレセイン誘導体色素を選択した。第二に実験条件を最適化し結晶サイズおよび構造制御を行い結晶サイズが20-200 nm近傍のナノ結晶の作製に成功した。結晶サイズ・構造は主に電子顕微鏡、動的光散乱法および粉末X線回折により評価した。ナノ結晶の光学特性は紫外可視吸収スペクトル測定および分光蛍光測定により評価した。

上記有機ナノ結晶蛍光プローブを培養細胞系に使用し共焦点蛍光レーザー顕微鏡で観察した結果、それぞれのナノ結晶に特徴がみられたが、ナノ結晶は細胞内に良く取り込まれ、また特異染色性があり、特に顔料系ナノ結晶は光退色性に優れていることが明らかとなった。加水分解型のフルオレセイン誘導体は低毒性であることから本研究の発展として動物実験への蛍光イメージングが期待でき、また研究過程で、温度応答性蛍光ナノ結晶を発見し、温度依存的な細胞の蛍光イメージングが将来技術として期待できる。本研究成果およびその発展性は学術的・社会的に意義が高くまた重要であり、本研究課題の遂行において当初の計画・目標は十分に達成できたといえる。

#### 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2件)

① Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, and Hachiro Nakanishi; Poly(*N*-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Behavior of Fluorescent Organic Nanocrystals; Japanese Journal of Applied Physics; Vol. 50; 010202/1-010202/3, 2011; 査読有。

② Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Akito Masuhara, Hidetoshi Oikawa, and Hachiro Nakanishi; Organic Solvent-Free Fluorescence Confocal Imaging of Living Cells Using Pure Nanocrystal Forms of Fluorescent Dyes; Japanese Journal of Applied Physics; Vol. 48; 117002/1-117002/4; 2009; 査

読有.

研究者番号：

[学会発表] (計3件)

- ① 発表者(代表者)名：Koichi Baba  
発表表題：Organic Nanocrystals for Biomedical Applications  
学会名：Functionalized Nanobiomaterials for Medical Applications, Materials Research Society, USA (国際学会)  
発表年月日：2010年10月5日  
発表場所：Denver Marriott Tech Center, Denver, Colorado, USA
- ② 発表者(代表者)名：Koichi Baba  
発表表題：Fluorescent Organic Nanocrystals for Bioimaging  
学会名：XIX International Materials Research Congress (国際学会)  
発表年月日：2010年8月16日  
発表場所：Cancún, Mexico
- ③ 発表者(代表者)名：馬場 耕一  
発表表題：有機ナノ結晶を用いる癌の光線力学療法およびバイオイメージング  
学会名：第9回東北大学多元物質科学研究所研究発表会  
発表年月日：平成21年12月10日  
発表場所：仙台

[図書] (計1件)

- ① 著者名：Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, and Hachiro Nakanishi  
出版社名：Sciyo, Croatia  
書名：Organic Nanocrystals for Nanomedicine and Biophotonics *in* Nanocrystals  
発行年：2010  
総ページ数：Chap. 14, p311-326

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 耕一 (BABA KOICHI)  
大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)  
研究者番号：00436172

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )