

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23651108
 研究課題名（和文） Eu添加アパタイト・ナノ結晶に対する抗体固定法探索とがん超早期段階の診断
 研究課題名（英文） Immobilization of antibodies on Eu-doped hydroxyapatite nanocrystals and their application for a rapid diagnosis of cancer
 研究代表者
 田中 順三 （Tanaka Junzou）
 東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：10343831

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生体内・外でがん細胞を効率よく検出するため、生体・細胞親和性および発光効率の高いナノ結晶を創製して、細胞レベルで腫瘍部位を特定するイメージング技術を開発した。ユーロピウムイオン（Eu）を添加した水酸アパタイトナノ結晶を、湿式法を用いて合成した。がん細胞と特異的に結合・取込まれる葉酸分子を、ナノ結晶表面に3-aminopropyltriethoxysilane（APTES）を介して化学修飾した。がん細胞に特異性を有し、可視光領域の波長で励起可能なEu添加アパタイトナノ結晶を合成できた。

研究成果の概要（英文）：

Bio-imaging techniques to visualize specific cancer cells are important for diagnosis and medical treatments. Luminescent nano-materials with high biocompatibility, which can emit under excitation of visible light, are desired for the medical applications. In this study, luminescent Eu(III) doped hydroxyapatite nanocrystals were synthesized by a wet chemical method. A 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) molecule was immobilized on the surface, and then folic acid (FA), a specific cancer cell-binding molecule, was bonded to the amino groups of APTES. No differences of luminescent spectra were detected for the nanocrystals though the processes of immobilization of APTES and FA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ機能材料・バイオイメージング・水酸アパタイト・ナノ結晶・発光

1. 研究開始当初の背景

従来の診断技術で見つかった腫瘍は外科手術によって完全に摘出できない場合があり、結果として再発・転移する。そこで、増殖・転移の遅い「超早期」（細胞が徐々に増殖する期間で形態変化がなく、数十個のがん細胞からなる直径2 mm以下の微小な腫瘍が形成されている段階）において細胞レベルで腫瘍を高感度に検出する診断技術が求められている。細胞のがん化においては、見掛けの形態変化が起こる前に分子レベルの活動

変化が起こる。例えば、がん細胞は正常細胞に比べて大量にブドウ糖を消費し、HER2レセプターを発現する（*Lancet* 1, 36 (1985)、*Nature Protocols* 2, 753 (2007)）。同時に細胞膜上に葉酸受容体が過剰に発現して、葉酸分子を特異的に結合・吸収する（*Cancer Res* 65, 5317 (2005)）。そこで、がん細胞の分子レベルの変化に着目し、その活動を高感度に検出して画像化できれば、超早期診断を実現できると考えられる。

形態変化のない超早期の腫瘍を細胞レベ

ルで高精度に映し出すイメージングの基盤技術は、細胞特異性の高い発光材料の創製である。これまでイメージング材料として、有機色素 (*Nature Medicine* 15, 104 (2009)) および量子ドット (*Science* 281, 2016 (1998)) 等が報告されている。しかし、有機色素は退色・劣化速度が速いため観察感度が低く、また紫外線励起の光毒性が問題である。一方、量子ドットは材料成分として生体毒性の高い Cd・Hg を含んでいるのが問題である。そのため、生体・細胞親和性が高く、しかも発光効率の高い材料創製が望まれている。

そこで本研究では、生体・細胞親和性の高い水酸アパタイトに着目した。ドーパントとして生体毒性の低い Eu イオンを用いることで水酸アパタイトに発光特性を付与できる。Eu のイオン半径は Eu(III) ; 0.95 Å, Eu(II) ; 1.09 Å であり、Ca のイオン半径 (Ca²⁺ ; 0.99 Å) に近いことから、水酸アパタイトの Ca サイトに安定してドーパできると考えられる。そのため、生体安全性が高く、欠陥の少ない発光材料の創出が期待できる。さらに発光に際しては、低エネルギーの励起光 (Eu(III) : 可視光 464 nm, Eu(II) : 近赤外光 900 nm) を用いるため、生体組織の劣化が軽減される。また試料表面の光散乱が減少され高い観察感度が実現できると期待される。Eu(III) は f 軌道の電子遷移 ⁵D₀-⁷F₁ (発光波長 590 nm) および遷移 ⁵D₀-⁷F₂ (発光波長 615 nm) による赤色発光を示し、結晶性により色純度 (発光波長の強度比) と発光効率が増加するため、イメージングに最適な発光特性を制御できる。

これまでに水酸アパタイトナノ結晶をバイオイメージング材料に応用した報告はない。本材料は、従来のバイオイメージング用の有機色素に比べて発光安定性が高く、無機量子ドットに比べて生体毒性が低い点において優位である。ナノ結晶の粒径 (数 10~数 100 nm) を制御すれば、細胞に効率的に結合、取込みが可能となる。

2. 研究の目的

本研究は、生体内・外でがん細胞を効率よく検出することを目的として、生体・細胞親和性および発光効率の高いナノ結晶を創製して、細胞レベルで腫瘍部位を特定するイメージング技術を研究する。具体的には、①ユーロピウムイオン (Eu) を添加した水酸アパタイトナノ結晶の合成と欠陥・形態の制御、および②がん細胞と特異的に結合・取込まれる分子をナノ結晶表面に化学修飾する技術開発に挑戦する。超早期予防・診断医療の基本技術の確立を目指す。

水酸アパタイトのナノ結晶を用いて、2 nm 以下の腫瘍部位を細胞レベルで特定するため、以下を目標とする。(i) 水酸アパタイトナ

ノ結晶の粒径制御法と Eu イオン添加法を確立する。(ii) ナノ結晶の Eu 添加量・欠陥量・形態を制御して、発光効率を最適化する。(iii) がん細胞と特異的に結合する分子をナノ結晶表面に安定に修飾する。以上の知見を総合して、がん細胞を高選択的・高感度に検出するイメージング材料を創製する。

3. 研究の方法

(1) Eu イオンドーパ水酸アパタイトナノ結晶の作製

Eu イオンをドーパした水酸アパタイトナノ (HAp) 結晶は湿式法を用いて作製した。水酸化カルシウムを超純水に加えて、0.25 mol/L の懸濁液を調製した。塩化ユウロピウムを Eu/Ca mol 比が 1.0、2.5、5.0 となるように秤量し、0.15 mol/L のリン酸水溶液に混合した。水酸化カルシウム懸濁液に、塩化ユウロピウムとリン酸の混合溶液を 20 mL/min で滴下した。温度は室温とした。この際、懸濁液が酸性にならないよう制御した。沈殿物はろ過し、150°C で 1 時間乾燥させた。乾燥後、試料は乳鉢と乳棒を用いて十分に粉碎し、300、600、750、900、1200°C で 3 時間焼成した (昇温速度 100°C/h)。

さらに同様の手順で、80°C で水酸化カルシウム懸濁液への塩化ユウロピウムとリン酸の混合溶液の滴下を行った。同様に沈殿物は乾燥後、所定の温度で焼成した。

作製した試料のキャラクタリゼーションは、粉末 X 線回折 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、走査電子顕微鏡観察 (SEM)、熱重量・示差熱分析法 (TG-DTA) より行った。XRD は、CuKα 線源を用いて 40 kV、30 mA の条件で測定した。FT-IR は試料を KBr で 100 倍に希釈した後、拡散反射法により測定した。積算回数は 128 回、分解能 2 cm⁻¹ とした。SEM は、試料に Pt をコーティングした後測定した。TG-DTA は昇温速度 10°C/min で室温から 800°C まで測定した。

試料の発光特性は、発光スペクトル測定装置、発光強度測定装置、及び蛍光顕微鏡を用いて評価した。発光スペクトルは、620 nm を発光波長とし励起波長測定を行った。次に、励起波長測定によって得られたピークを基に、394 nm および 464 nm の励起光を試料に照射して発光波長のピーク測定を行った。測定は室温で行い、試料重量は 100 mg とした。さらに試料を 500 µg/mL となるようにリン酸緩衝液に分散させて、同様の条件で発光強度を測定した。蛍光顕微鏡を用いて、試料の蛍光状態を観察した。励起フィルターを用いて 390 nm 以下の波長の励起光を照射し観察した。

(2) 細胞結合性分子の表面修飾

EuドーブHApナノ結晶表面への細胞結合性分子の修飾は、2段階の反応により実施した。細胞結合性分子として、葉酸受容体を標的とした葉酸分子を用いた。表面修飾は、液相反応により3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) をEuドーブHApナノ結晶表面へ化学吸着させて、最表面にアミノ基を導入する。次いで、アミノ基と細胞結合性分子内のカルボン酸の脱水縮合反応 ($-\text{NH}_2 + \text{HOOC}- \rightarrow -\text{NH}-\text{CO}-$) により、細胞結合性分子をナノ結晶表面に共有結合を介して形成させた。

100 mg の Eu イオンドーブ HAp を 20 mL のエタノール中に添加し、超音波処理で十分に分散させた。その後、3.3 mmol の APTES を添加し、40°C で 30 分、1 時間、2 時間攪拌反応させた。吸引ろ過により固相を分離後、110°C で 2 時間乾燥させた。さらに、APTES を修飾した HAp を、pH7.1 に調整した 50 mmol/L リン酸緩衝液 25 mL 中に分散させ、葉酸分子末端のカルボン酸を N-ヒドロキシコハク酸イミドで置換した葉酸分子 (FA-NHS) を 10.5 mg、21.0 mg、42 mg 溶解させた 12 mL ジメチルスルホキシドと、脱水縮合剤 (WSC) を加えて、葉酸分子を結合させた。

APTES および葉酸分子の修飾の評価は、FTIR と TG-DTA を用いて行った。

4. 研究成果

室温で合成した Eu イオンドーブ HAp は、いずれも XRD 測定の結果から HAp 単相であることが確認できた。塩化ユウロピウムを 5.0 mol/L 添加し、1200°C で焼成した試料では、28°付近のピーク形状が変化した。これはリン酸ユウロピウムの生成に起因すると推察される。SEM 観察より、900°C 以下でナノオーダーの粒子が得られることが明らかとなった。焼成温度の増加に伴い粒成長するため、150°C で粒子サイズは 100 nm 以下であったが、1200°C では数 μm であった。蛍光顕微鏡観察 (励起波長 300–400 nm) から、赤色の発光が観測された。図 1 に、塩化ユウロピウムを 5.0 mol/L 添加し、1200°C で焼成した試料の蛍光顕微鏡像を示す。この試料は、酸化ユウロピウムよりも高い蛍光強度が得られた。これは、焼成により蛍光障害の原因となる構造水が蒸発するとともに、HAp に取り込まれた Eu イオンが発光に有利な配位環境であったためと考えられる。蛍光顕微鏡観察から、焼成温度が 600°C 以上の試料において、十分な発光が確認された。さらに、焼成温度が 900°C 以上では、リン酸緩衝液中に分散させた状態でも高い蛍光強度が得られることがわかった。

図 2 に、室温で合成し種々の温度で焼成し

た試料の発光スペクトル (励起波長 464 nm) を示す。発光スペクトルの形状は、焼成温度を高くすることによって変化することがわかった。焼成温度が 900°C 以上の試料の発光スペクトルから、可視光領域の波長 464 nm の励起により、4f-4f遷移による発光極大波長 ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$: 572 nm・577 nm、 $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$: 610 nm、 $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$: 621 nm・627 nm) がそれぞれ観測された。 $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ における 572 nm の発光が 577 nm に対して特異的に強いことがわかった。これは、Ca(II)サイトにEu³⁺が多く置換されたためと考えられる (*J. Lumin.*, 128, 428 (2008))。

合成温度を 80°C にして同様の検討を行った。得られた試料は XRD より HAp 単相であり、室温での合成した試料よりも結晶性が高いことが明らかとなった。しかしながら、可視光励起 (464nm) による発光は、750°C 以上の焼成が必要であった。

以上の検討から、Eu イオンを 2.5 mol% ドープさせ、600~900°C で焼成することで、可視光領域の波長で励起可能な HAp ナノ粒子

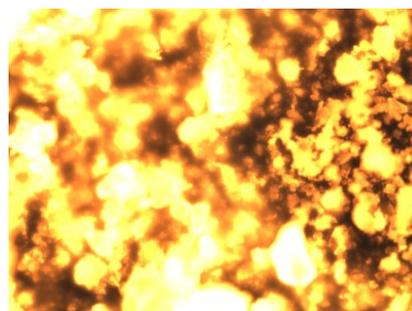


図 1 試料の蛍光顕微鏡像

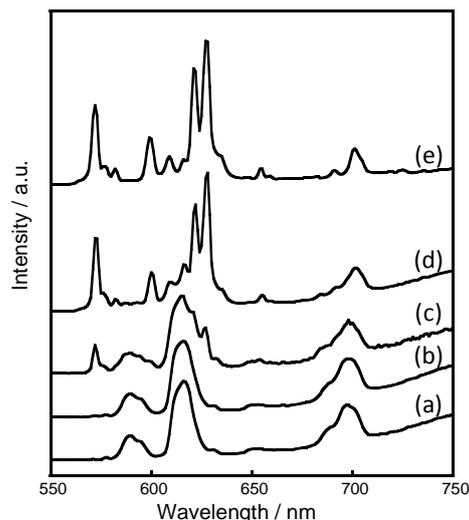


図 2 励起光 464 nm の発光スペクトル (a) 150°C、(b) 300°C、(c) 600°C、(d) 900°C、(e) 1200°C

が作製できることを明らかにした。

Eu イオンドーブ HAp の APTES 修飾および葉酸分子の固定化は FTIR により評価した。N-H と C=C 伸縮によるピーク強度が増加したことから、APTES および葉酸が固定化されたことが明らかとなった。APTES 修飾に関して、TG-DTA から得られた修飾量と、Eu イオンドーブ HAp の比表面積から計算した単分子層に必要な固定化量を比較した。その結果、APTES は Eu イオンドーブ HAp 表面で 2 層にスタッキングしていることが示唆された。

図 3 に、表面修飾前後の Eu イオンドーブ HAp の発光スペクトルを示す。464nm の励起光による発光スペクトルを測定したところ、いずれも 4f-4f 遷移による発光極大波長 ($^5D_0 \rightarrow ^7F_0$: 572 nm・577 nm、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$: 610 nm、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$: 621 nm・627 nm) が観測され、修飾前後で同等であった。このことから、各修飾処理により、Eu イオンドーブ HAp の結晶内における Eu の発光環境が変化しないことが明らかになった。これらの発光波長は、 Eu^{3+} が HAp 構造中の Ca(II) サイトへ置換することによって考えられるため、表面修飾処理は発光特性を変化させず、可視光励起で発光し、がん細胞へ特異的に結合性するナノ結晶材料を作製することができた。がん診断用発光材料としての応用が期待される。

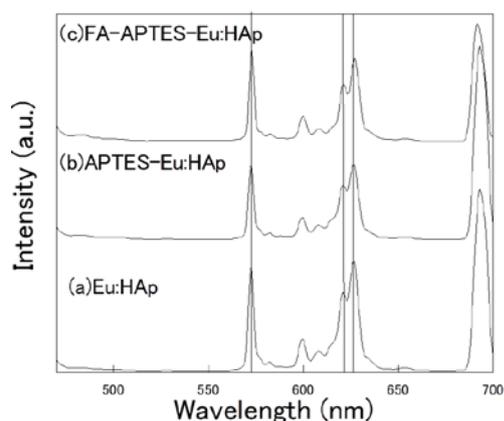


図 3 励起光 464 nm の発光スペクトル
(a) Eu イオンドーブ HAp、(b) APTES 修飾後、(c) 葉酸分子修飾後

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)

[学会発表] (計 5 件)

① 竹田龍平、多賀谷基博、吉岡朋彦、生駒俊之、田中順三
“葉酸を修飾した Eu(III) 含有水酸アパタイトナノ結晶の作製”、日本セラミックス協会 2013 年年会、2013 年 3 月 17 日 東京工業大学

② Ryohei Takeda, Motohiro Tagaya, Toshiyuki Ikoma, Tomohiko Yoshioka, Fujio Minami, and Junzo Tanaka

“Preparation of aminopropylsilane-immobilized luminescent hydroxyapatite nanocrystals”

6th International Conference on Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-6)

2012 年 6 月 26 日

Mielparque-Yokohama, Yokohama, Japan

③ 竹田龍平、多賀谷基博、生駒俊之、吉岡朋彦、南不二雄、田中順三

“バイオイメージングのための Eu 添加発光性アパタイトの作製”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011 年 11 月 21 日

京都府民総合交流プラザ京都テルサ

④ 竹田龍平、多賀谷基博、生駒俊之、吉岡朋彦、南不二雄、田中順三

“Eu 添加アパタイト粒子の合成と発光特性”

第 24 回 DV-X α 研究会、2011 年 8 月 8 日

静岡大学静岡 (大谷) キャンパス

⑤ Ryohei Takeda, Motohiro Tagaya, Toshiyuki Ikoma, Fujio Minami, Tomohiko Yoshioka, and Junzo Tanaka

“Photoluminescence Properties of Eu-doped Hydroxyapatite Nanocrystals”

5th International Conference on Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-5)

2011 年 6 月 23 日、Mielparque-Yokohama, Yokohama, Japan

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.ceram.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 順三 (Tanaka Junzou)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10343831