

## 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 29 日現在

機関番号：14701  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23750085  
 研究課題名（和文） 安全に蛍光細胞イメージングに利用できる機能性ケイ素量子ドットの設計と評価  
 研究課題名（英文） Design and Evaluation of Functional Silicon Quantum Dots for Safe Fluorescence Imaging of Cells  
 研究代表者  
 中原 佳夫（NAKAHARA YOSHIO）  
 和歌山大学・システム工学部・助教  
 研究者番号：10432600

研究成果の概要（和文）：新規な水分散性、pH 安定性、生体適合性を示す量子ドットが、ケイ素（シリコン）量子ドットの粒子表面への糖鎖（単糖類）修飾を通して得られた。シリコン量子ドットの粒子表面上の糖鎖の存在は、対応するレクチンを用いた蛍光測定によって確認された。繊維芽細胞の蛍光イメージングがグルコサミン化学修飾シリコン量子ドットを用いて行なわれ、本研究で開発した糖鎖機能化シリコン量子ドットは青色発色材料として利用できることが示された。また、シリコン量子ドットは原子移動ラジカル重合を用いて水溶性高分子によって被覆され、それらの蛍光特性が水溶液中で調査された。結果として、高分子被覆に起因するそれらの優位性が種々の実験により明らかとなった。

研究成果の概要（英文）: Novel water-dispersible, pH-stable, and biocompatible quantum dots were synthesized through the surface modification of silicon quantum dots (SiQDs) with monosaccharides. The presence of the monosaccharide on the surface of the SiQDs was recognized by the fluorescence measurements using its complementary lectin (concanavalin A). The fluorescence imaging of fibroblast cells was carried out by using SiQDs functionalized chemically with D-glucosamine, and it was shown that the SiQDs developed in this study are applicable as blue chromophores. In addition, silicon quantum dots were coated with water-soluble polymers using atomic transfer radical polymerization and their fluorescence properties were investigated in aqueous solution. As a result, their advantages over conventional SiQDs originated from polymer-coating became clear by the various experiments.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：ナノ材料、量子ドット、蛍光、細胞、原子移動ラジカル重合、生体適合性、イメージング、ケイ素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) コロイダルナノ結晶（半導体量子ドット）は、そのサイズ依存により特異的な光学的な性質を示すことから、現在、非常に注目されている材料である。特に粒子径がナノメートルサイズ（約 2-6 nm）の II-VI 族半導体

(CdS, CdSe, CdTe) では、量子収率が高い、粒子径によって発光波長（発光色）が制御できる、発光スペクトルの線幅が狭い（半値幅が約 30 nm）、退色しにくい、励起幅が広いなどの光学的優位性を示すため、蛍光細胞イメージング材料への応用が期待されている。

すでに動物実験のレベルでは優れた結果が報告されているが、しかしながらこれらの材料には重金属が多く含まれているために、臨床実験に至るまでのハードルは依然として高いと言わざるを得ない。そこで最近では、分解して毒性の高い  $Cd^{2+}$  を放出する危険性が全くないシリコン単独の量子ドットについて、注目が集まってきている。

(2)シリコン量子ドットについては、最近、R. D. Tilley らが液相反応により末端にアミノ基を有するシリコン量子ドットの開発に成功したことで、実用化の道筋が見えてきた。しかしながら、カドミウム含有量子ドットと比較した場合、分光特性に劣るため、更なる改善が必要とされている。特に実用化のためには、水分散性が低い点や水溶液中における量子収率が低いことなどを早急に解決する必要がある。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、水溶液中に安定に分散して優れた蛍光特性を示す、新規な糖鎖修飾シリコン量子ドットおよび高分子被覆シリコン量子ドットの合成を目的とした。

(2)(1)で記したシリコン量子ドットを合成した後は、詳細な構造解析を行なうとともに、それらの蛍光特性およびコロイド特性の評価を行なう。

(3)(2)において良好な物性が確認された場合においては、実際にシリコン量子ドットを細胞に導入して、蛍光イメージングについて検討する。

## 3. 研究の方法

(1)シリコン量子ドットは文献を参考にして、液相反応により合成する。トルエン溶液中、界面活性剤を用いて逆ミセルを形成させ、続いて、テトラクロロシランと還元剤を加えることで、シリコン量子ドットを合成する。還元反応によって得られたシリコン量子ドットの末端は水素であるので、ヒドロシリル化によってアシルアミンと反応させることで、反応性官能基であるアミノ基を導入する。糖鎖修飾に関しては、先のアミノ基と無水コハク酸と反応させることで末端をカルボキシル基とし、最終的にアミノ基を有する単糖類を縮合反応によって導入する。

(2)高分子被覆に関しては、まず、末端水素シリコン量子ドットと 2-ブromo-2-メチルプロパンアミド部位を有するアルケンを、ヒドロシリル化反応を行なうことで、重合開始部位を粒子末端に導入する。続いて、親水性モノマーと反応性部位としてアミノ基を有す

るメタクリレートを加えて、原子移動ラジカル重合を用いてシリコン量子ドットを水溶性高分子で被覆する。精製は、遠心分離により量子ドットを沈降させ、続いて溶媒置換を行なう操作を繰り返すことで行なう。

(3)作製したシリコン量子ドットの構造解析を行なう。糖鎖機能化シリコン量子ドットに関しては、対応するレクチン (コンカナバリン A, ConA) を用いる蛍光実験を行なうことで、糖鎖の修飾を検証する。高分子被覆シリコン量子ドットに関しては、フルオレセインを化学修飾して蛍光強度の pH 依存性を測定することで、重合反応の進行を検証する。また、透過型電子顕微鏡により、粒子サイズや形状を観察する。蛍光特性については、分光学的性質の知見を得るために、励起波長範囲、量子収率、最大蛍光波長、蛍光半値幅等について調査する。コロイド特性については、適用可能な pH 範囲について調査する。

(4)作製した糖鎖機能化シリコン量子ドットおよび高分子被覆シリコン量子ドットについて、実際に細胞を用いて、*in vitro* で蛍光イメージング観察を行なう。量子ドットの取り込み効率や経時安定性などから、蛍光イメージング能について検討する。さらに安全性を確認するために、細胞の形状変化や生存率などの評価も行なう。

## 4. 研究成果

(1)糖鎖機能化シリコン量子ドット (図 1) は、以下の手順で作製した。テトラクロロシランを出発原料とし、トルエン溶液中、テトラオクチルブロミドから成る逆ミセルを鋳型として、液相反応によって末端水素シリコン量子ドットを合成した。還元剤としては水素化アルミニウムリチウムを使用した。続いて、白金触媒存在下、アシルアミンとのヒドロシリル化反応によって粒子表面にアミノ基を導入した。アミノ基の導入はフルオレセインを用いる蛍光測定で確認した。アミノ基を介して、カルボキシル基を導入した後、最終的には、水溶性と生体適合性を付与するために、末端を糖鎖 (グルコサミンまたはガラクトサミン) によって化学修飾した。

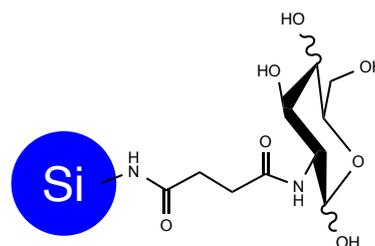


図 1 糖鎖機能化シリコン量子ドット

(2) 高分子被覆シリコン量子ドット (図 2) は、以下の手順で作製した。末端水素シリコン量子ドットに、白金触媒存在下、アリルアミン、アリルシアニド、*N*-アリル-2-ブromo-2-メチルプロパンアミドを等量の混合比で加えて、ヒドロシル化反応を行なうことで、粒子表面に重合開始部位を導入した。アリルアミンおよびアリルシアニドは、量子ドットの溶媒 (DMF) 分散性を向上させるために同時に修飾した。

続いて、重合開始部位を備えたシリコン量子ドットに、銅触媒存在下、オリゴエチレングリコールメチルエーテルメタクリレートと 2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩を DMF 中、99:1 の比で加えて、70 °C で 24 時間反応させることで、原子移動ラジカル重合による高分子被覆を行なった。

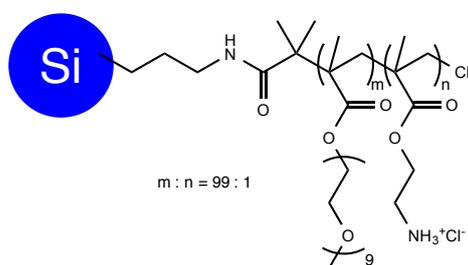


図 2 高分子被覆シリコン量子ドット

(1) および (2) で得られたシリコン量子ドットはいずれも水に良好に分散し、また数ヶ月間保存しても、凝集体の形成による沈降物の発生は観察されなかった。

(3) 糖鎖機能化シリコン量子ドットについて検討した。グルコサミン修飾シリコン量子ドットの透過型電子顕微鏡像を図 3 に示す。粒子サイズは、2-9 nm までバラツキが見られたが、その大部分は、量子サイズ効果が発現するボーア半径 (4.6 nm) 以下であることがわかった。

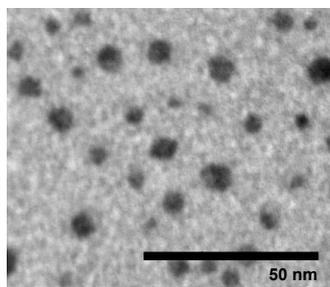


図 3 グルコサミン修飾シリコン量子ドットの透過型電子顕微鏡図

図 4 には、グルコサミン修飾シリコン量子ドットの水溶液中における励起スペクトル

(蛍光波長: 450 nm) および蛍光スペクトル (励起波長: 366 nm) を示す。366 nm の励起により、450 nm を最大とする蛍光を発生し、発光色は青色であった。量子収率は、硫酸キニーネを標準物質とする相対法で求めたところ、3.8% であり、半値幅 58 nm であった。

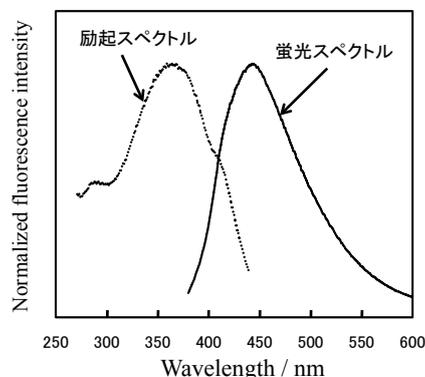


図 4 グルコサミン修飾シリコン量子ドットの励起および蛍光スペクトル

糖鎖機能化シリコン量子ドットの pH 安定性について検討した。グルコサミン修飾シリコン量子ドットの水溶液について、pH を変化させたときの蛍光強度変化を図 5 に示す。結果として、pH が 2-10 までの範囲において、蛍光強度はほとんど一定であった。量子ドット表面に導入したグルコサミンは電気的に中性な親水性の化合物であるので、さまざまな pH 環境においても水溶性を保持できると考えられる。以上のことから、糖鎖機能化シリコン量子ドットは生体環境中においても安定して分散して、優れた蛍光性を示すと考えられる。

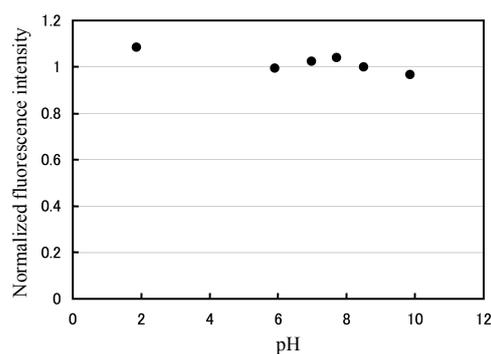


図 5 グルコサミン修飾シリコン量子ドットの蛍光強度の pH 依存性

糖鎖機能化シリコン量子ドットの粒子表面上の糖鎖の存在は、ConA を用いる蛍光測定によって行なった。まず、グルコサミン修飾シリコン量子ドットの水分散液に ConA を添加した際の蛍光スペクトル変化を観察

した(図6)。図6より、蛍光強度の有意の減少が観測されたことから、これは粒子表面に存在するグルコサミンと ConA との間に働く相互作用力が駆動力となってナノ粒子が凝集して沈降し、測定系外に移動したことを意味している。一方で、ガラクトサミン修飾シリコン量子ドットの水分散液に ConA を添加した場合には、蛍光強度にほとんど変化が見られなかった。以上の結果は ConA の分子認識能に対応しており、シリコン量子ドット粒子表面上の糖鎖の存在が確認された。

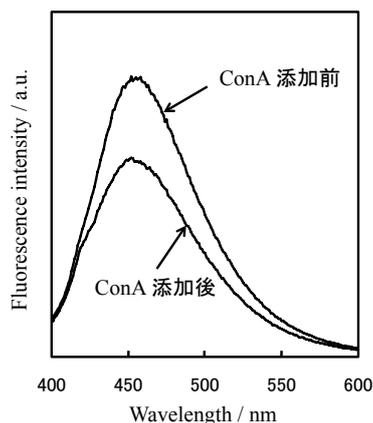


図6 グルコサミン修飾シリコン量子ドットに ConA 添加前後の蛍光スペクトル

続いて、高分子被覆シリコン量子ドットについて検討した。高分子被覆シリコン量子ドットの透過型電子顕微鏡像を図7に示す。粒子サイズは 10-20 nm 程度であり、図3と比較すると、高分子の被覆により粒子サイズが増大していることが確認された。

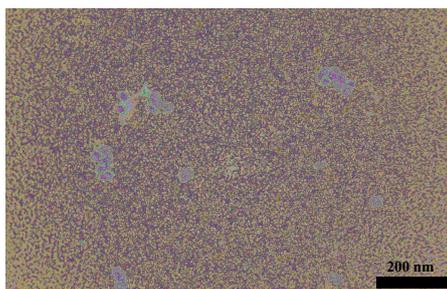


図7 高分子被覆シリコン量子ドットの透過型電子顕微鏡図

図8には、高分子被覆シリコン量子ドットの水溶液中における蛍光スペクトル(励起波長: 366 nm)を示す。366 nm の励起により、450 nm を最大とする蛍光を発し、発光色は青色であった。量子収率は、硫酸キノネを

標準物質とする相対法で求めたところ、7.7%であり、半値幅 82 nm であった。量子収率が被覆前と比較して向上した理由としては、シリコン量子ドットの粒子表面が高分子によって被覆されることで水分子との接触が効果的に抑制されることにより、熱的なエネルギー失活が阻害されたためと考えられる。

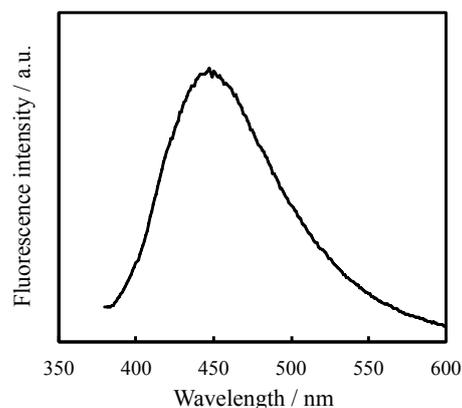


図8 高分子被覆シリコン量子ドットの蛍光スペクトル

高分子被覆シリコン量子ドットの pH 安定性について検討した。高分子被覆シリコン量子ドットの水溶液について、pH を変化させたときの蛍光強度変化を図9に示す。結果として、pH が 3-11 までの範囲において、蛍光強度はほとんど一定であった。量子ドット表面に導入したオリゴエチレングリコールは電氣的に中性な親水性の化合物であるので、さまざまな pH 環境においても水溶性を保持できると考えられる。以上のことから、高分子被覆シリコン量子ドットは生体環境中においても安定して分散して、優れた蛍光性を示すと考えられる。

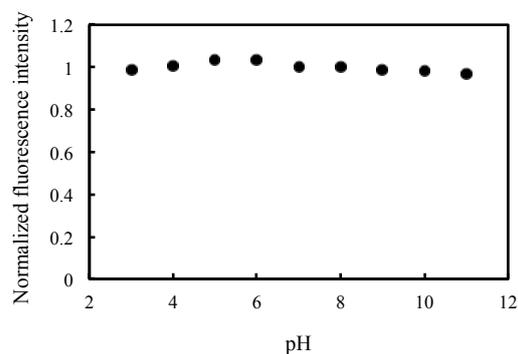


図9 高分子被覆シリコン量子ドットの蛍光強度の pH 依存性

高分子被覆シリコン量子ドットの重合反応の進行の確認は、フルオレセインを導入することで行なった。2-アミノエチルメタクリ

レート塩酸塩とフルオレセインイソチオシアネートを混合してから、オリゴエチレングリコールメチルエーテルメタクリレートと重合開始剤修飾シリコン量子ドットを加えて、原子移動ラジカル重合を行なった。遠心分離と溶媒置換を繰り返すことで未反応のモノマーを除去後に蛍光スペクトルを測定したところ、フルオレセインに基づく特徴的な pH 変化が観測されたことから (図 1 0)、フルオレセインの化学修飾が実証され、重合反応の進行が示唆された。

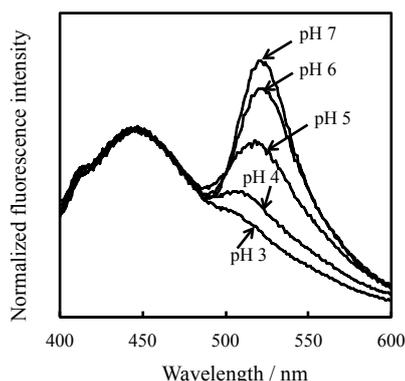


図 1 0 フルオレセイン部位を有する高分子被覆シリコン量子ドットの蛍光強度の pH 依存性

(4) 作製した糖鎖機能化シリコン量子ドットおよび高分子被覆シリコン量子ドットについて、繊維芽細胞およびアフリカミドリザル腎臓由来細胞をそれぞれ用いて、*in vitro* で蛍光イメージング観察を行なった。

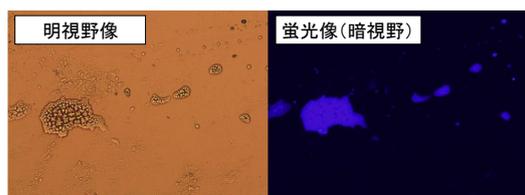


図 1 1 グルコサミン修飾シリコン量子ドットによる繊維芽細胞の蛍光イメージング

図 1 1 に、繊維芽細胞を、グルコサミン修飾シリコン量子ドットを含む培地に加え、48 時間培養後の蛍光顕微鏡像を示す。蛍光像が明視野像の形を明瞭に反映したことから、シリコン量子ドットは細胞に取り込まれ、細胞環境中においても十分に検出可能な青色発光を示すことがわかった。また、シリコン量子ドットの投与による細胞の形状変化も見られなかったため、本材料の生体適合性は比較的良好であると考えられる。

図 1 2 に、アフリカミドリザル腎臓由来細胞を、高分子被覆シリコン量子ドットを含む培地に加え、24 時間培養後の蛍光顕微鏡像を示す。左に蛍光像、中央に明視野像、右にそれらの重ね合わせを示す。細胞の存在する場所が選択的に青く発光していることから、高分子被覆シリコン量子ドットは細胞に取り込まれ、細胞環境中においても十分に検出可能な青色発光を示すことがわかった。また、シリコン量子ドットの投与による細胞の形状変化も見られなかったため、本材料の生体適合性は比較的良好であると考えられる。

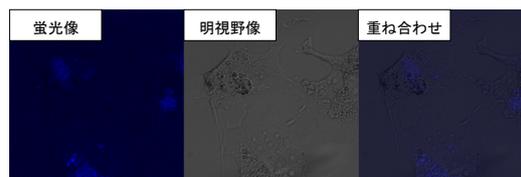


図 1 2 高分子被覆シリコン量子ドットによるアフリカミドリザル腎臓由来細胞の蛍光イメージング

## 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 1 件)

(1) Yoshio Nakahara, Kazuki Machiya, Toshiyuki Sato, Ni Tar Nwe, Tetsuya Furuike, Hiroshi Tamura, Keiichi Kimura, Synthesis of Silicon Quantum Dots Functionalized Chemically with Monosaccharides and Their Use in Biological Fluorescence Imaging, Chemistry Letters, 査読有, Vol. 42, No. 5, 2013, pp. 498-500.  
DOI: 10.1246/cl.130068

[学会発表] (計 2 件)

(1) 町谷和輝、中原佳夫、木村恵一、原子移動ラジカル重合を用いる水溶性高分子被覆シリコン量子ドットの合成と水溶液中における蛍光特性、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 03 月 24 日、草津市 (立命館大学)

(2) 町谷和輝、中原佳夫、河本大毅、古池哲也、田村裕、木村恵一、糖鎖機能化シリコン量子ドットの合成と水溶液中における蛍光特性、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、横浜市 (慶應義塾大学)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中原 佳夫 (NAKAHARA YOSHIO)

和歌山大学・システム工学部・助教

研究者番号：10432600

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者