

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310085

研究課題名(和文)分散凝集技術を利用した無毒性画像医療診断ナノカプセルの精密合成法の開発

研究課題名(英文)Development of Synthesis of Nano-Capsules for Medical Imaging Diagnoses Using Dispersion/Aggregation Process

研究代表者

小林 芳男 (KOBAYASHI, YOSHIO)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：40250849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,000,000円

研究成果の概要(和文)：発光性半導体ナノ粒子(量子ドット、QD)は蛍光イメージング用の蛍光マーカーとしての利用が期待されている。QDに含まれるCdの毒性を軽減する方法の一つとして、QD粒子をシリカ等の無毒な材料によって覆う方法が挙げられる。また、発光特性とCT造影特性を併せ持つ材料が実現できれば、複数の検査装置を組み合わせで診断を行うことが可能になる。本研究では、QD粒子のシリカカプセル化法の開発に成功した。また、X線造影材料としてAu粒子に着目し、QD/SiO₂粒子表面にAu粒子を担持する方法を開発した。さらにQD/SiO₂/Au粒子のシリカカプセル化の方法も開発した。

研究成果の概要(英文)：Luminescent semiconductor nanoparticles (QDs) are expected to be used as a fluorescent marker for medical diagnostics. Among various methods for reducing harm of Cd contained in QD, encapsulating, or coating of contrast agents with materials inert to living bodies is a good candidate. Meanwhile, materials that have both properties of fluorescence and X-ray absorption will be used for imaging targets by multiple techniques. The present work developed methods for preparing the QDs coated with silica (QD/SiO₂), the QD/SiO₂ particles on which Au nanoparticles were immobilized (QD/SiO₂/Au particles), and the QD/SiO₂/Au particles coated with silica (QD/SiO₂/Au/SiO₂ multi-layered particles).

研究分野：化学工学、材料化学

キーワード：ナノ粒子 カプセル コア-シェル 造影剤

1. 研究開始当初の背景

医療分野では、発光、X線吸収、磁気共鳴等の物理現象を利用した造影技術の導入により、検査技術が発達した。これらの技術をより効果的に利用するには、発光材料や造影能を発現する物質（X線造影剤）あるいはMR造影剤がしばしば用いられ、容易に市販品が手に入る。たとえば、発光材料としてQ-dotが、造影剤としてヨードを構造中に含む有機化合物の溶液やガドリニウム錯体溶液が挙げられる。

溶液状の材料は、物質が分子レベルで液中に溶解しているため、液体からの抵抗を受けにくい。そのため、液体中での移動速度が大きくなり、長時間の造影が困難である。粒子は流体中で抵抗を受けるので、移動速度が抑えられる。これにより長時間の造影が可能となると見込まれる。したがって、長時間の安定な造影を行うためには、造影能を発現する物質のナノ粒子化が有効と予想される。一般に、ナノ粒子は凝集を起こしやすく、それによりナノ粒子特有の性質が損なわれるという恐れが生じる。ナノ粒子の凝集を防ぐ代表的な方法として、界面活性剤を用いる方法が挙げられる。しかしながら、この方法でもナノ粒子同士の衝突を完全に防ぐことはできない、すなわち、粒子凝集を完全に防ぐことは困難である。したがって、新たな粒子凝集防止策を考案する必要がある。

また、カドミウム、ヨード、ガドリニウム等の化合物は毒性を発現し、アレルギー反応を起こす可能性があるため、患者に使用できない場合がある。この問題点を解決する方法として、発光材料あるいは造影剤のナノ粒子をコア、無毒な物質をシェルとするナノカプセル化が考えられる。この際、シェル材が分散性を向上させる性質を有する物質であれば、無毒化と凝集防止を一挙に行うことができる。

ナノカプセル化のおもな方法は、ナノ粒子にシランカップリング剤、水ガラスおよびシリコンアルコキシドを作用させる方法である。この方法により、ナノ粒子のシリカナノカプセル化が可能である。シリカは無毒で分散性に優れた材料であるので、当該研究の目的を達成するのに合致する。しかしながら、多段階の工程が必要であることが課題として残されている。また、用いる試薬からの不純物の混入により、ナノ粒子の機能が損なわれるという懸念もある。

2. 研究の目的

本研究では、発光あるいは造影ナノ粒子のナノカプセル化法の開発に取り組む。これまでに開発した直接シリカナノカプセル化法を種々の機能性ナノ粒子に適用する。具体的には、コアとなる機能性ナノ粒子が持っている分散力及び凝集力をコントロールする、すなわちコロイド科学を基盤とする技術を利用することが目的のナノカプセルを合成す

るには重要、かつ有効であることがわかった。その経験を用いて、CdSe、AgI、Gd化合物等の造影能を有するナノ粒子をシリカ等の無毒な材料で液相中にてナノカプセル化する方法を開発する。また、本研究では、本開発によって得られるナノカプセルの実用化に向けて、これらのナノカプセルの発光あるいは造影特性を詳細に調べ、その結果を試料作製法の開発研究にフィードバックして、ナノカプセル作製法の確立を図る。

3. 研究の方法

(1) ナノカプセルの作製

ナノカプセルの形成の概要を下記に示す。基本的にはいずれのナノカプセル化の手順も同様である。はじめに、①酸化還元、酸塩基、沈殿形成等の反応を利用してコア粒子を調製した。次に、②コア粒子とシェル材との親和性を向上させるために適切な表面処理を施した。続いて、コア粒子調製時と同様に、③シェル材形成反応を開始させ、コア粒子表面にシェル層を形成させた。以下に具体例を挙げて説明する。

① シリカナノカプセル化 CdSe ナノ粒子 (CdSe/SiO₂ ナノカプセル) (発光造影用)

CdSe は粒子サイズによりさまざまな波長の発光を示す半導体である。溶解度積[Cd][Se]が非常に小さいことを利用して、塩化カドミウム水溶液とセレン尿素水溶液を混合して合成した。次に、シランカップリング剤 (3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS)等) を作用させ、CdSe 粒子表面にアルコキシド基を導入した (表面修飾)。続いて、シリコンアルコキシド (tetraethoxysilane (TEOS) 等) を作用させると、加水分解縮合反応が起こり、シリカがシェル状に粒子表面に堆積していくと予想している。CdSe ナノ粒子コロイドはQ-dotという名称で市販されている。この市販粒子も研究対象とした。

② シリカナノカプセル化 AgI あるいは Au 粒子 (AgI/SiO₂ or Au/SiO₂ ナノカプセル) (X線造影用)

一般に、ヨード化合物がX線を吸収するという性質に着目した。ヨード化合物の一つであるAgIは溶解度積[Ag][I]が非常に小さいことを利用して過塩素酸銀水溶液とヨウ化カリウム水溶液の混合により合成した。次に、MPSとTEOSを作用させて、シリカナノカプセル化した。AuもX線を吸収する性質を持つため、Auナノ粒子もAgIナノ粒子の系と同様に検討した。

③ AgI あるいは Au/シリカ/マグネタイト多層カプセル粒子 (AgI/SiO₂/Fe₃O₄ or Au/SiO₂/Fe₃O₄ ナノカプセル) (X線造影用)

造影に使用したカプセル化粒子の再利用を希望する場合、何らかの方法で回収しなければならない。回収のための一つの方法として、磁気特性を利用する方法が考えられる。本研究では、造影用粒子の表面にマグネタイ

トシェルを形成させる方法を開発する。具体的には、本研究開発により得られた AgI/SiO_2 あるいは Au/SiO_2 ナノカプセルの共存下、塩基添加法あるいは均一沈殿法によるマグネタイトナノ粒子形成反応を行った。このとき、マグネタイトナノ粒子が共存粒子表面に堆積してシェルが形成していくと予想している。

④ シリカカプセル化 Gd 化合物ナノ粒子 (Gd/SiO_2 ナノカプセル) (MRI 用)

一般に、Gd 化合物は MR 特性を示すという性質に着目し、Gd 化合物のナノ粒子化とシリカナノカプセル化を検討した。Gd 塩水溶液に塩基添加、あるいは均一沈殿法等により、Gd 化合物の沈殿が生じる。この現象を利用して Gd 化合物ナノ粒子を合成し、それをコアとして同様にシリカ形成反応を行った。同様に、Gd 化合物ナノ粒子表面にシリカが堆積してシェルが形成していくと予想している。

(2) ナノカプセルのキャラクタリゼーション

原料種、原料濃度、反応温度等の様々なパラメーターによって、生成粒子の状態（サイズ、分散性、形状等）は変化する。中でも粒子のサイズや表面電位等の情報は、ナノカプセル化の手順確立には欠かせない、粒子凝集や分散の状況を教えてくれる。そのため、本研究では粒径分布およびゼータ電位測定装置 (DLS) を用いてそれらの情報を得た。その他に、ナノカプセルの形態、状態、結晶構造、元素組成、表面状態等を、所属機関所有の紫外可視分光光度計 (UV-VIS)、蛍光分光光度計、電子顕微鏡 (SEM、TEM)、X 線回折計 (XRD)、および光電子分光光度計 (XPS) を用いて調べた。

上記のように、各種ナノカプセルの作製とキャラクタリゼーションを行い、得られた知見を統合することにより、ナノカプセルの形成メカニズムを解明し、ナノカプセル作製技術の統一した材料設計指針の構築を行った。

(3) 実用化に向けた特性評価

上記の検討により得られたナノカプセルを用いて、医療検査用ナノカプセルの実用化に向けた特性評価を行った。以下に特性評価方法を示す。

① 発光造影

CdSe 系ナノカプセルコロイド溶液を用いた。あらかじめ、遠心により高濃度に濃縮しておく。次に、ラットにジエチルエーテル蒸気を吸入させ、麻酔をかける。足部の体毛を剃り、得られた高濃度ナノカプセルコロイド溶液を皮下注射した。所定の時間経過後、外部からレーザーを照射し、発光造影特性を調べる。それぞれの試験の後、生体組織を分析し、毒性についても調べた。

② X 線造影

AgI 系ナノカプセルコロイド溶液を用いた。発光造影試験と同様にラットにナノカプセルコロイド溶液を皮下注射した。所定の時間経過後、X 線を照射し、造影特性を調べた。

それぞれの試験の後、生体組織を分析し、毒性についても調べた。

③ MRI

Gd 系ナノカプセルコロイド溶液を用いた。発光造影試験と同様にラットにナノカプセルコロイド溶液を皮下注射した。所定の時間経過後、MRI 装置を用いて造影特性を調べた。それぞれの試験の後、生体組織を分析し、毒性についても調べた。

4. 研究成果

(1) 医療画像診断用量子ドットシリカコア-シェル型粒子の開発

図 1 に各粒子の TEM 像を示す。QD 粒子、 H_2O 、TEOS および NaOH の各初期濃度を適切に設定することにより粒径の異なる QD/SiO_2 粒子を作り分けることに成功した。 QD/SiO_2 粒子の粒径は大粒径のものは 59.1 nm、小粒径のものは粒径 20.4 nm であった。また、PEG 導入後もシリカカプセル化構造は維持された。

図 2 に各粒子の Zeta 電位測定結果を示す。 QD/SiO_2 -PEG 粒子の等電点は約 2 であり、 QD/SiO_2 粒子の等電点約 3 と比較して低 pH 側にシフトした。このことから、 QD/SiO_2 粒子表面の状態が変化したと考えられ、これは PEG 導入によるものと推察される。

図 3 に各粒子コロイド溶液の IVIS 蛍光画像を示す。蛍光強度は暗赤色が 0 で黄色の色合いが増すほど大きいことを表わしている。QD 粒子濃度が大きくなるにつれて蛍光強度が高くなることが確認された。また、シリカカプセル化および PEG 化後も蛍光は維持された。既に、本グループでは本法を応用して Au ナノ粒子表面に PEG 鎖を担持し、マウス内の血液滞留性を改善することに成功している。よって本研究で開発した蛍光ナノ粒子による蛍光造影診断への応用が期待される。

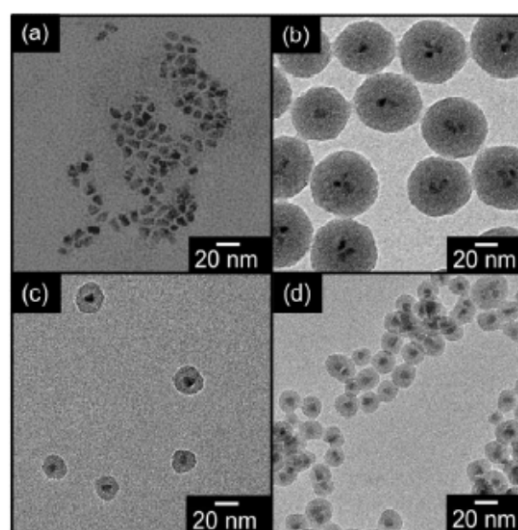


図 1 各粒子の TEM 像。

(a) QD 粒子, (b) QD/SiO_2 粒子 (59.1 nm)
(c) QD/SiO_2 粒子 (20.4 nm),
(d) QD/SiO_2 -PEG 粒子

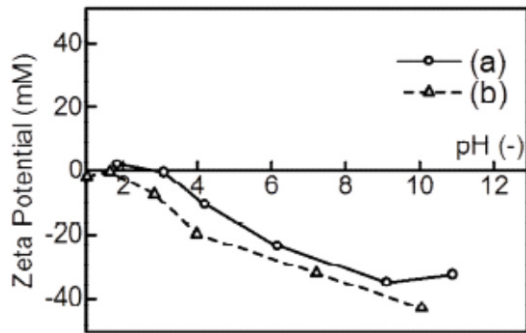


図2 各粒子の Zeta 電位測定結果.
(a) QD/SiO₂ 粒子 (20.4 nm)
(b) QD/SiO₂-PEG 粒子

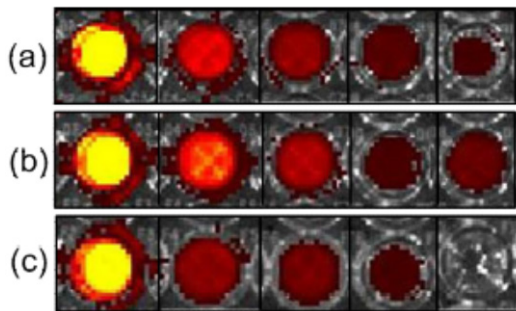


図3 種々の QD 濃度における各粒子コロイド溶液の IVIS 蛍光画像.
(a) QD 粒子, (b) QD/SiO₂ 粒子 (20.4 nm),
(c) QD/SiO₂-PEG 粒子 (左から QD 濃度 : 1×10^{-7} , 5×10^{-8} , 2.5×10^{-8} , 1.25×10^{-8} , および 6.25×10^{-9} M)

(2) 医療画像診断用 Au/SiO₂ コア-シェル型ナノ粒子の開発

図4に各粒子の TEM 写真を示す。粒径はそれぞれ Au/SiO₂-NH₂ 粒子が 53.0 nm、Au/SiO₂-PEG 粒子が 50.7 nm であり、PEG 化後も粒径の変化は見られなかった。また、PEG 導入後もシリカカプセル化構造は維持された。

図5に種々の粒子の元素分析結果を示す。Au/SiO₂-NH₂ 粒子および Au/SiO₂-PEG 粒子は、Au/SiO₂ 粒子と比較して、C および N 値が上昇した。これは APMS 由来のアミノ基および PEG 由来の有機物が表面に付着したことが原因であると考えられる。また、Au/SiO₂-PEG 粒子は Au/SiO₂-NH₂ 粒子と比較して N 値が減少した。これは粒子表面のアミノ基が PEG 基と結合したためであると推測した。以上より、本法により粒子表面へのアミノ基および PEG 基導入が良好に行われることがわかった。

図6に各造影剤の投与後の各臓器の CT 値変化を示す。市販のヨード系造影剤である Iopamiron は投与直後から心臓の CT 値が上昇し、1 h 後にもわずかに滞留しており、3 h 程度でほぼ排泄されることがわかった。一方で、Au/SiO₂-PEG 粒子は投与後の各臓器の CT 値は投与直後から心臓の CT 値が上昇し、6~9 h 後にゆっくりと減衰していく様子が確認された。また肝臓および脾臓の CT 値が変動せ

ず、ほぼ一定の値を示した。これは Au/SiO₂-PEG 粒子が体内において異物として認識されず、血液中に長期滞留したことを示している。Au/SiO₂ 粒子表面に PEG が導入されたため、血液滞留性が向上したと考えられる。本法において作製した粒子の血中滞留時間は約 6 h と推測され、Iopamiron の血中滞留時間 (3 h) の 2 倍の長さであった。このことから、長時間の安定した造影が可能であると見込まれる。

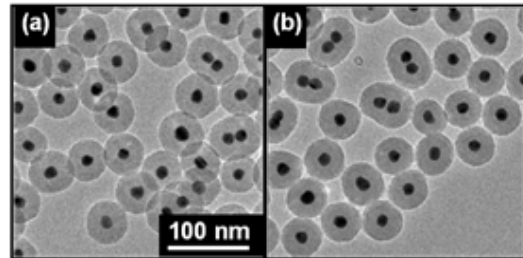


図4 各粒子の TEM 写真
(a) Au/SiO₂-NH₂, (b) Au/SiO₂-PEG

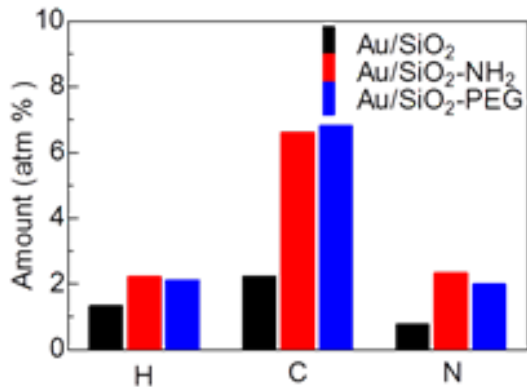


図5 種々の粒子の元素分析結果

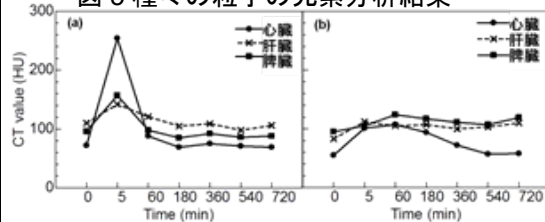


図6 各造影剤投与後の各臓器の CT 値変化
(a) Iopamiron, (b) Au/SiO₂-PEG

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

① Y. Kobayashi, H. Matsudo, T. Li, K. Shibuya, Y. Kubota, T. Oikawa, T. Nakagawa, K. Gonda, Fabrication of Quantum Dot/Silica Core-Shell Particles Immobilizing Au Nanoparticles and Their Dual Imaging Functions, Applied Nanoscience, 査読有, in press

② Y. Kobayashi, R. Nagasu, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi, Preparation of Au/Silica/Poly(ethylene glycol) Nanoparticle Colloid Solution and its Use in X-ray Imaging Process, Nanocomposites, 査読有, 2 巻, 2015,

83-88

③ Y. Kobayashi, H. Matsudo, Y. Kubota, T. Nakagawa, K. Gonda, N. Ohuchi, Preparation of Silica-Coated Quantum Dot Nanoparticle Colloid Solutions and Their Application in In-Vivo Fluorescence Imaging, Journal of Chemical Engineering of Japan, 査読有, 48 巻, 2015, 112-117

④ Y. Kobayashi, R. Nagasu, K. Shibuya, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi, Synthesis of a Colloid Solution of Silica-Coated Gold Nanoparticles for X-ray Imaging Applications, Journal of Nanoparticle Research, 査読有, 16 巻, 2014, 2551

⑤ Y. Kobayashi, H. Inose, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi, X-ray Imaging Technique Using Colloid Solution of Au/Silica Core-Shell Nanoparticles, Journal of Nanostructure in Chemistry, 査読有, 3 巻, 2013, 62

⑥ Y. Kobayashi, H. Matsudo, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, M. Takeda, N. Ohuchi, In-Vivo Fluorescence Imaging Technique Using Colloid Solution of Multiple Quantum Dots/Silica/Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles, Journal of Sol-Gel Science and Technology, 査読有, 66 巻, 2013, 31-37

⑦ Y. Kobayashi, H. Morimoto, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi, Fabrication of Hollow Particles Composed of Silica Containing Gadolinium Compound and Magnetic Resonance Imaging Using Them, Journal of Nanostructure in Chemistry, 査読有, 3 巻, 2013, 11

⑧ Y. Sakurai, H. Tada, K. Gonda, M. Takeda, L. Cong, M. Amari, Y. Kobayashi, M. Watanabe, T. Ishida, N. Ohuchi, Development of Silica-Coated Silver Iodide Nanoparticles and Their Biodistribution, The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 査読有, 228 巻, 2012, 317-323

⑨ Y. Kobayashi, H. Inose, T. Nakagawa, K. Gonda, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, Synthesis of Au-Silica Core-Shell Particles by a Sol-Gel Process, Surface Engineering, 査読有, 28 巻, 2012, 129-133

⑩ Y. Kobayashi, T. Nozawa, T. Nakagawa, K. Gonda, M. Takeda, N. Ohuchi, Fabrication and Fluorescence Properties of Multilayered Core-Shell Particles Composed of Quantum Dot, Gadolinium Compound and Silica, Journal of Materials Science, 査読有, 47 巻, 2012, 1852-1859

〔学会発表〕(計 18 件)

① 渋谷恭輔、長須遼子、小林芳男、久保田洋介、中川智彦、権田幸祐、大内憲明、医療画像診断用 Au/SiO₂ 複合ナノ粒子の開発、化学工学会第 46 回秋季大会 (2014 年 9 月 17 日, 九州大学 (福岡県福岡市))

② 渋谷恭輔、森本洗、小林芳男、久保田洋

介、中川智彦、権田幸祐、大内憲明、医療画像診断用 Gd 錯体固定化 SiO₂ 複合ナノ粒子の作製に関する研究、化学工学会第 45 回秋季大会 (2013 年 9 月 17 日, 岡山大学 (岡山県岡山市))

③ 松戸寛武、小林芳男、久保田洋介、中川智彦、権田幸祐、大内憲明、医療画像診断用シリカカプセル化量子ドットの開発、化学工学会第 45 回秋季大会 (2013 年 9 月 17 日, 岡山大学 (岡山県岡山市))

④ 長須遼子、猪瀬弘光、小林芳男、中川智彦、医療画像診断用コアシェル型粒子の開発に関する研究、化学工学会第 44 回秋季大会 (2012 年 9 月 20 日, 東北大学 (宮城県仙台市))

⑤ 松戸寛武、野沢卓也、小林芳男、中川智彦、権田幸祐、大内憲明、医療画像診断用シリカカプセル化発光性半導ナノ粒子の作製法の開発、化学工学会第 44 回秋季大会 (2012 年 9 月 20 日, 東北大学 (宮城県仙台市))

〔図書〕(計 1 件)

① 小林芳男、権田幸祐、Applied Nanoscience、マイクロ/ナノカプセルの調製、徐放性制御と応用事例ーナノカプセル造影剤の開発ー、(技術情報協会, 2014) p.264-271

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 芳男 (KOBAYASHI YOSHIO)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：40250849

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

佐藤 正秀 (SATO MASAHIDE)

宇都宮大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10261504

鈴木 昇 (SUZUKI NOBORU)

宇都宮大学・工学研究科・教授

研究者番号：40134259

権田 幸祐 (GONDA KOHSUKE)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80375435

大内 憲明 (GONDA KOHSUKE)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90203710