

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810086

研究課題名(和文)近赤外領域発光性希土類金属錯体内包シリカナノ粒子を用いる蛍光細胞イメージング

研究課題名(英文)Fluorescence Cell Imaging Using Silica Nanoparticles Modified Chemically with Rare Earth Metal Complexes Emitting in Near-Infrared Region

研究代表者

中原 佳夫 (NAKAHARA, Yoshio)

和歌山大学・システム工学部・准教授

研究者番号：10432600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光性のシリル化希土類金属錯体が、ホルミル基を有する希土類金属錯体と3-アミノプロピルトリエトキシシラン間のシッフ塩基形成反応を用いる簡便な手法により得られた。その錯体を用い、逆ミセル法によって希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子(R-SNPs)を合成した。光安定性、pH依存性、蛍光寿命などの蛍光特性について、シリカナノ粒子内に固定化された錯体では錯体単体のときと比較して大幅に性能が向上した。また、R-SNPsは優れた水分散性を示し、擬似生体環境中においてもほとんど凝集しなかった。さらにR-SNPsは、アフリカモドリザル腎臓由来細胞の蛍光イメージング用のラベル化剤として用いることができた。

研究成果の概要(英文)：A fluorescent silylated rare earth metal complex was prepared by a very simple procedure through formation of a Schiff base between a rare earth metal complex bearing a formyl group and 3-aminopropyltriethoxysilane. Using the silylated rare earth metal complex, silica nanoparticles modified chemically with rare earth metal complexes (R-SNPs) were synthesized by a reverse micelle method with Triton X-100 as a surfactant in cyclohexane. The fluorescence properties of rare earth metal complexes immobilized in silica nanoparticles were remarkably improved by photostability, pH dependence and fluorescence lifetime, compared to free rare earth metal complexes. Also, R-SNPs showed excellent dispersibility in aqueous solution and they hardly aggregated even under pseudo-psychological conditions. Furthermore, R-SNPs was usable as a label agent for the fluorescent imaging of African green monkey kidney cells.

研究分野：分析化学

キーワード：希土類金属錯体 近赤外蛍光 シリカナノ粒子 シッフ塩基 逆ミセル 水分散 蛍光寿命 細胞イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、蛍光を用いた細胞イメージング剤（細胞の分布や動態を画像化する材料）の開発が活発である。特に、テルビウムやユーロピウムに代表される発光性の希土類金属錯体は、その蛍光寿命が一般的な有機物と比べて十分に長いことから、時間分解蛍光測定を行なうことで生体組織由来の自家蛍光と明確に区別できるため、非常に有望視されている蛍光プローブである。しかしながら、希土類金属錯体単独での使用では水分子からのエネルギー失活を受けやすく、蛍光量子収率が低いことが実用化に向けて高い障壁となっている。それゆえ、希土類金属錯体をシリカナノ粒子に内包させる試みが幾つか報告されている。しかしながら多くの場合では、希土類金属錯体は物理吸着によって内包されており、錯体が粒子から徐々に流出することが懸念されるため、長時間の利用には限界があった。

(2) 希土類金属錯体をシリカナノ粒子内に安定して担持させるためには、化学結合で導入する必要がある。つまり、シリカナノ粒子表面のシラノール基と反応できるようにするために、希土類金属錯体をシリル化しなければならない。これまでに、蛍光性の希土類金属錯体のシリル化については幾つか報告例があるが、その多くは複雑で多段階の合成操作を必要とするため、この種の研究は基礎研究の域を出ていないと言わざるを得ない。

(3) 近赤外領域は生体組織由来の散乱または吸収の影響を受けにくく、蛍光細胞イメージングを行なう上で観測波長に適しているため、近赤外領域発光性希土類金属錯体についても開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、シッフ塩基の形成反応を用いる非常に簡便な手法によって希土類金属錯体にトリエトキシシリル部位を導入し、続くテトラエトキシシランとのゾルーゲル共重合によって、水溶液中に安定に分散して優れた蛍光特性を示す、新規な希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子を合成し、さらにその機能性評価を目的とした。

(2) (1)で記した希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子を合成した後は、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、実際に希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子を細胞に導入して、その蛍光イメージング能について検討する。

3. 研究の方法

(1) ホルミル基を有する希土類金属（テルビ

ウム、ユーロピウムまたはネオジウム）錯体は文献を参考にして合成する。次に、3-アミノプロピルトリエトキシシランとのシッフ塩基形成反応によって、希土類金属錯体にトリエトキシシリル部位を導入する。ナノ粒子は、シクロヘキサンおよび1-ヘキサノール溶液中、界面活性剤を用いて逆ミセルを形成させ、続いてテトラエトキシシランとトリエトキシシリル化された希土類金属錯体を加え、最後にアンモニア水を加えてゾルーゲル共重合によって合成する。

(2) 作製した希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子の構造解析を行なう。透過型電子顕微鏡により、粒子サイズや形状を観察する。また、シリカナノ粒子をフッ酸で完全に溶解し、得られた溶液中の希土類金属イオンをICP 蛍光分光法によって定量することで、ナノ粒子1個あたりに導入された希土類金属錯体の数を見積る。

(3) 作製した希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子の物性評価を行なう。蛍光特性については、分光学的性質の知見を得るために、蛍光スペクトル、量子収率について調査する。また蛍光安定性については、ナノ粒子内に固定化された場合と溶液中の場合と比較し、ナノ粒子への固定化が希土類金属錯体の蛍光特性に与える影響について検討する。コロイド特性については、適用可能なpH範囲、耐塩析性について調査する。

(4) 作製した蛍光性シリカナノ粒子について、アフリカミドリザル腎臓由来細胞を用いて、in vitro で蛍光イメージングを行なう。

4. 研究成果

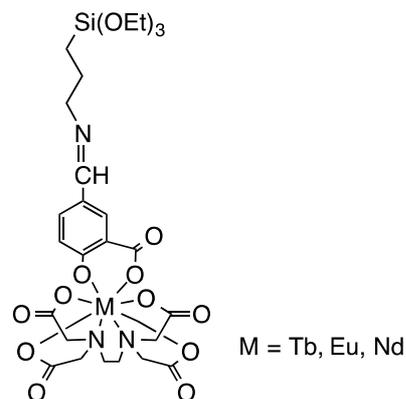


図1 トリエトキシシリル部位を有する希土類金属錯体

(1) トリエトキシシリル部位を有する希土類金属錯体（図1）は、以下の手順で作製した。エチレンジアミン4酢酸二ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを含む水溶液中に、酢酸テルビウム（酢酸ユーロピウム、酢酸ネオジウム）水溶液を加えて60℃で1時間攪拌した。

続いて、5-ホルミルサリチル酸および水酸化ナトリウムを含む水溶液を加え、さらに60で1時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を濃縮してエタノールに加え、沈殿物を生じさせた。これを回収して乾燥後、メタノールに溶解させた。続いて、3-アミノプロピルトリエトキシシランを加えて室温で1時間攪拌した。反応終了後、メタノールを減圧留去して目的物を得た。

(2) 希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子(図2)は以下の手順で作製した。シクロヘキサン、1-ヘキサノールおよび少量のイオン交換水を含む溶液中、界面活性剤であるTriton X-100を加えて逆ミセルを形成させ、続いてテトラエトキシシランとトリエトキシシリル化された希土類金属錯体を加え、最後にアンモニア水を加えて室温で24時間攪拌した。合成終了後、アセトンを加えてナノ粒子を凝集させ、遠心分離によりナノ粒子のみを回収した。さらにイオン交換水を加えてよく分散させ、遠心分離でナノ粒子のみを沈降させる操作を繰り返すことで、余分な界面活性剤やシランカップリング剤を除去した。

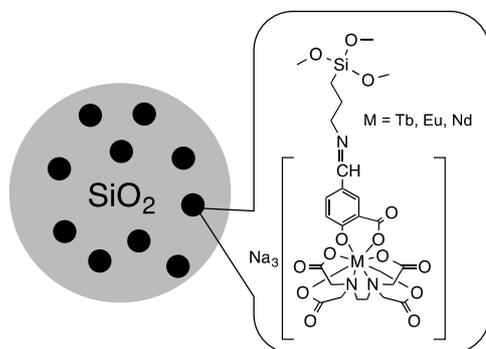


図2 希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子

(3)テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の走査型電子顕微鏡像を図3に示す。粒子サイズは 50 ± 5 nmで、球状構造をしていた。

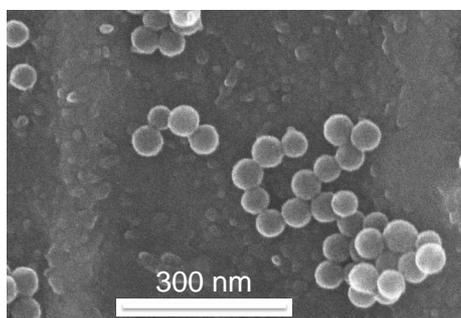


図3 テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の走査型電子顕微鏡図

フッ酸で完全に溶解させ、シリカナノ粒子に含まれるテルビウムイオンをICP発光分

光法によって定量したところ(59 nmol mg^{-1})、ナノ粒子1個あたりに導入されたテルビウム錯体の数は4600であることがわかった。

図4には、テルビウム錯体およびユーロピウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中の発光の様子と蛍光スペクトルを示す(励起波長:308 nm)。テルビウム錯体では548 nmを最大とする緑色蛍光を発生し、ユーロピウム錯体では618 nmを最大とする赤色蛍光を発生した。テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の量子収率を、硫酸キニーネを標準物質とする相対法で求めたところ、11.7%であった。テルビウム錯体単体では水溶液中で量子収率が1.5%であったことから、テルビウム錯体はシリカナノ粒子内で固定化されることで、水溶液中において量子収率が大幅に向上することが示された。また、テルビウム錯体をシッフ塩基の形成反応によるトリエトキシシリル化せず、シリカナノ粒子の合成反応に用いたところ、テルビウム錯体由来する蛍光は全く見られなかった。以上の結果から、希土類金属錯体は物理吸着ではなく、化学結合によって導入されていることが示唆された。一方で、ネオジウム錯体を用いた場合には、本研究においては有意なレベルで蛍光が観測されなかった。

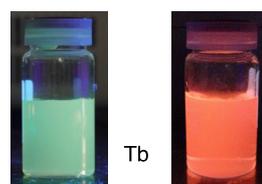
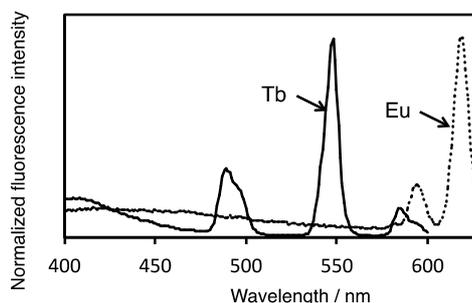


図4 テルビウム錯体およびユーロピウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中の発光の様子と蛍光スペクトル

次に、テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の蛍光安定性について検討した。水溶液中、テルビウム錯体単体またはテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子に、 10 mW cm^{-2} の紫外光を照射時の548 nmにおける蛍光強度変化を図5に示す。結果として、錯体単体のときは紫外光の照射によって蛍光強度が減少したが、シリカナノ粒子内に担持された場合には蛍光強度はほとんど一定であった。この安定化は、錯体とシリカナノ粒子間の相互作用によってもたらされたと考えられる。

また、さまざまなpHの水溶液中の548 nm

におけるテルビウム錯体単体またはテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の蛍光強度の変化を図6に示す。なお、pHは酢酸と水酸化ナトリウム水溶液を用いて調整した。結果として、錯体単体のときはpH 8以下で蛍光強度が大幅に減少したが、シリカナノ粒子内に担持された場合には、pH 5-11の範囲で蛍光強度はほとんど一定であった。錯体単体の場合には、pHの低下に伴い錯体が解離し、アンテナ部位から希土類金属へのエネルギー移動の効率が低下するためと考えられる。一方で、粒子内に固定化された錯体では、錯体が解離してもアンテナ部位は希土類金属の近傍にとどまるためと考えられる。結果として、テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子からの蛍光は、生理的条件(pH 7.4)において十分に利用できることが示された。

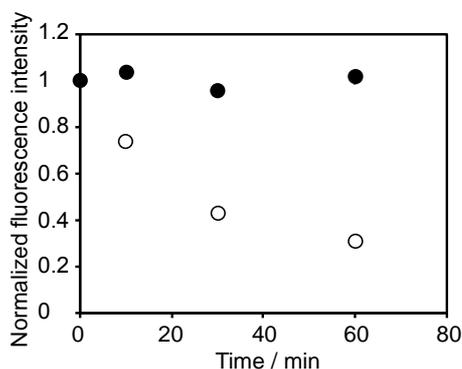


図5 水溶液中における紫外光照射時間に対するテルビウム錯体の蛍光強度の変化 (●: 錯体修飾粒子、○: 錯体単体)

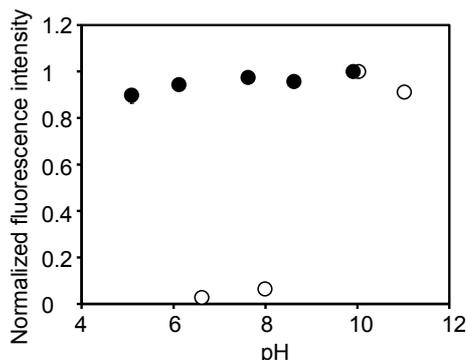


図6 水溶液中におけるテルビウム錯体の蛍光強度のpH依存性 (●: 錯体修飾粒子、○: 錯体単体)

さらに、テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の蛍光寿命について検討した。548 nmにおける蛍光強度の減衰曲線の解析より、蛍光寿命は錯体単体では0.68 ms、シリカナノ粒子内に担持された場合には1.5 msとなった。ナノ粒子内に担持された錯体で蛍光寿命が長い理由としては、粒子内では水分子との接触が効果的に阻害されたためと考えられる。結果として、本研究で作製したテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の蛍光寿命

は、一般的な有機物よりも十分長いので、時間分解蛍光測定に適用できると考えられる。つまり、ナノ粒子に由来する蛍光は、生体組織由来の自家蛍光と明確に区別できる。

続いて動的光散乱法を用いて、希土類金属錯体化学修飾シリカナノ粒子のコロイド特性について検討した。水溶液中におけるテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の得られた粒径分布を図7に示す。粒子サイズは 67 ± 14 nmであり、図3から得られた粒子サイズと比較すると若干大きい、その差はわずかであるため、大部分のナノ粒子が水溶液中で独立して分散していると予想される。

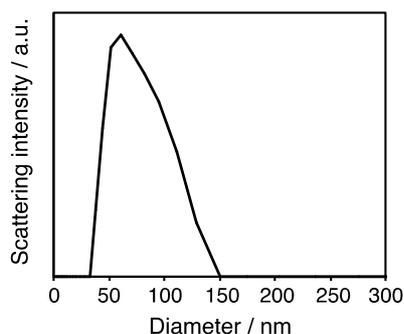


図7 テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中における粒径分布

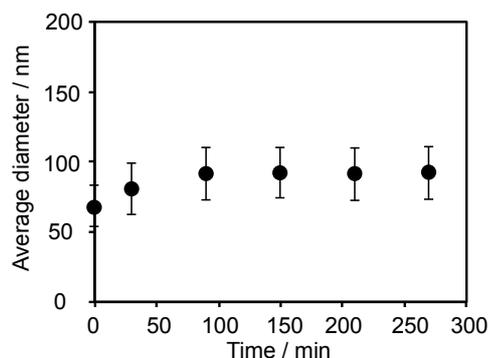


図8 150 mM NaCl 添加時のテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中における平均粒径の経時変化

図8には、塩化ナトリウム添加時のテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中における平均粒径の経時変化を示す。塩化ナトリウムを150 mM添加時においてわずかにナノ粒子は凝集したが、依然として水溶液中で沈降しない程度の十分な分散性を保っていた。また、pH変化時のテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中における平均粒径の経時変化を図9に示す。結果として、酸性条件(pH 4.3)では凝集したが、塩基性条件(pH 10.8)においてはほとんど凝集しなかった。この結果は、粒子表面がシラノール基で覆われていることに起因している。ゼータ電位測定の結果(-46.8 ± 1.4 mV)も、本研究で作製したテルビウム錯体化

学修飾シリカナノ粒子が、通常のシリカナノ粒子と同様のコロイド安定性を有することを示している。以上のことから、テルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子は生体環境中においても安定して分散し、優れた蛍光性を示すと考えられる。

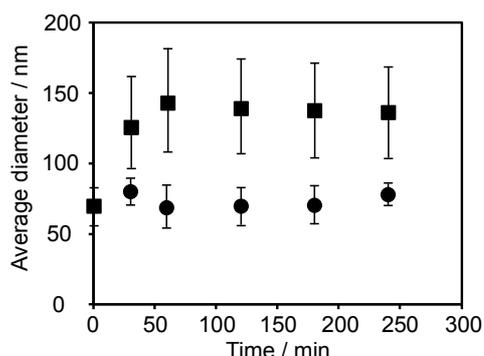


図9 pH 変化時のテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子の水溶液中における平均粒径の経時変化 (: pH 10.6、 : pH 4.3)

(4) 作製したテルビウム錯体化学修飾シリカナノ粒子について、アフリカミドリザル腎臓由来細胞を用いて、in vitro で蛍光イメージングを行なった。ナノ粒子を含まない場合では、細胞の自家蛍光のみが観測されたが、ナノ粒子を含む場合では、自家蛍光に加えてテルビウム錯体に由来する緑色発光が観測された。つまり、ナノ粒子は細胞に取り込まれ、細胞環境中においても十分に検知可能であることがわかった。また、ナノ粒子の投与によっても細胞形状には変化が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。

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, Yoichi Tatsumi, Ikuko Akimoto, Shusuke Osaki, Motomichi Doi, Keiichi Kimura, Fluorescent silica nanoparticles modified chemically with terbium complexes as potential bioimaging probes: their fluorescence and colloidal properties in water, *New Journal of Chemistry*, 査読有, Vol.39, 2015, pp.1452-1458, DOI: 10.1039/c4nj01222d.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Yoshio Nakahara, Yoichi Tatsumi, Ikuko Akimoto, Shusuke Osaki, Motomichi Doi, Keiichi Kimura, Synthesis of silica nanoparticles modified chemically with terbium complexes through formation of Schiff base and their fluorescence

properties in water, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015年12月19日, Honolulu (Hawaii Convention Center).

(2) 武田涼子、中原佳夫、玉井聡行、木村恵一、多孔性シリカ被覆金ナノロッドの近傍に存在する化合物の分光特性に与える影響、日本化学会第95春季年会、2015年3月26日、船橋市(日本大学)

(3) 武田涼子、巽洋一、中原佳夫、戸井基道、木村恵一、希土類金属錯体を化学結合したシリカナノ粒子の設計と水溶液中における蛍光特性、第62回日本分析化学会年次大会、2013年9月10日、東大阪市(近畿大学)

〔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・准教授
研究者番号：10432600

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：