

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26708025

研究課題名(和文)細胞内の化学反応を可視化する超高感度ラマン散乱増強微粒子の創製

研究課題名(英文)Creation of Highly Sensitive SERS Particles for Visualization of Chemical Reactions in Cells

研究代表者

藪 浩(YABU, HIROSHI)

東北大学・材料科学高等研究所・准教授

研究者番号：40396255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリスチレンとアミン末端ポリブタジエンからなるコア-シェル型ポリマーブレンド微粒子を独自の微粒子作製法である自己組織化析出(Self-Organized Precipitation, SORP)法により作製した。得られた微粒子の表面電位はアミン基により正に帯電していることから、負に帯電した金ナノコロイド粒子と混合することで、金ナノ粒子がシェルに高密度に充填された有機-無機コンポジット微粒子が得られることを見いだした。本微粒子が近赤外光励起によりラマン散乱シグナルを増強できることを証明し、ポリマー被覆した磁性ナノ粒子を導入することで磁場応答性を付与することに成功した。

研究成果の概要(英文)：By using the original self-organized precipitation (SORP) method, core-shell particles comprising of polystyrene core and amino-terminated polybutadiene shell have been prepared. Since obtained particles have positive surface charges, composite particles having gold nanoparticle clusters were successfully prepared by mixing negatively charged gold nanoparticle dispersions with core-shell particles. These particles show strong surface enhanced Raman scattering signals by irradiation of near infrared light excitation. Furthermore, magnetic responsive composite particles were also prepared by introducing magnetic nanoparticles into the composite particles.

研究分野：高分子化学

キーワード：自己組織化 微粒子 有機-無機ハイブリッド ラマン散乱 細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞の中の化学反応をリアルタイムでモニタリングすることは、細胞内で起きている遺伝子発現や酵素反応カスケードを理解する上で非常に重要である。現在リアルタイムPCRなどの手法により、細胞内の遺伝子発現を比較的長時間スケールで追跡することが可能となりつつあるが、破壊的なサンプル調製を必要とする上、サンプル調製の際に生じる時間的・生物化学的な誤差は避けて通れない。細胞内における反応動態を観察するために、固定化した細胞の蛍光抗体タンパクによる染色や、蛍光タンパクを発現する遺伝子変異を導入する手法が一般的に用いられているが、前者は固定化した細胞しか観察出来ず、後者は遺伝子変異を導入するため、野生型の本来の描像を描けているのかという疑念が常につきまとう。

細胞内で起きている化学反応動態を本質的に理解するためには、目的とする化学種がどのように変化していくかを細胞内でリアルタイムモニタリング可能にする手法が必要不可欠である。

藪らは2種以上のポリマーを混合した有機良溶媒溶液に貧溶媒を加え、良溶媒を蒸発させることで、ヤスヌ型やコア-シェル型微粒子が作製出来る事、内部構造がポリマーの組み合わせにより制御出来ることを見いだしている。さらに、負電荷を帯びた金ナノ粒子(Au NPs)が正電荷を帯びた末端アミノ化ポリブタジエン (PB-NH₂) /ポリスチレン (PS) コア-シェル微粒子に静電相互作用により吸着し、シェル中に拡散した後、高度に配列・組織化した金ナノ粒子-ポリマーコンポジット微粒子が作製出来ることも見いだしている。ごく最近、水分散性である金ナノ粒子-ポリマーコンポジット微粒子の光吸収が、表面プラズモン共鳴効果のため近赤外領域までレッドシフトすること、近赤外光で励起されたラマン散乱を著しく増強させる表面増強ラマン散乱 (SERS) を示すことを見いだした。このことは、水中の細胞中にある多様な化学種を、細胞を透過できる近赤外光を用いて同定できる可能性があることを示している。

そこで、貴金属ナノ粒子-ポリマーコンポジット微粒子を細胞内に導入し、顕微鏡下でそのラマン散乱シグナルをモニタリングすれば、細胞内に起きている化学反応動態をリアルタイムで可視化できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

細胞の中の化学反応をリアルタイムでモニタリングすることは、細胞内で起きている遺伝子発現や酵素反応カスケードを理解する上で非常に重要である。本研究の目的は独自に見いだした水分散性で赤外領域にプラズモン吸収を持ち、高い表面増強ラマン活性をもつ貴金属ナノ粒子-ポリマーコンポジ

ット微粒子を細胞内に導入し、標的物質のラマンシグナルをマッピングする事により、細胞内の化学反応動態をリアルタイムで可視化することを目的とする。申請期間中に①貴金属-ポリマーコンポジット微粒子の作製と②光学特性の評価を行い、③細胞内への導入を行った後、④顕微ラマン分光を行う事で、細胞内の化学反応動態可視化を実現する(図1)。

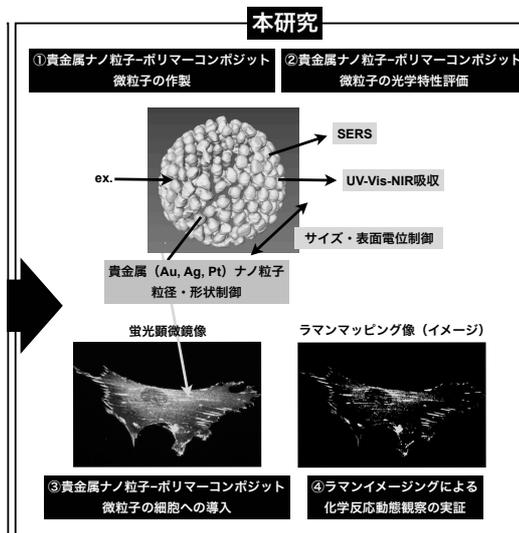


図1. 本研究の目的

3. 研究の方法

金、銀、白金等の貴金属ナノ粒子はその金属種や粒径によってプラズモン吸収波長が異なる。そこで、金属種・粒径を精密に調整した貴金属ナノ粒子をクエン酸還元法など、既往のナノ粒子合成法を駆使して合成する。

末端アミノ化ポリブタジエンとポリスチレンのコア-シェル型微粒子をSORP法により合成する。粒径、および内部構造を溶液濃度、ポリマー混合比などを調整することで制御し、上記合成した貴金属ナノ粒子とコンポジット化することで、貴金属ナノ粒子-ポリマーコンポジット微粒子を合成する。

細胞内の化学反応動態を詳細に観察するためには、ラマン散乱の励起光波長が細胞に吸収されない波長であることが必要不可欠である。そのためには、貴金属ナノ粒子を近接・配列させることにより、表面プラズモン共鳴によりその対象波長がレッドシフトさせ、吸収波長を細胞が吸収を持たない近赤外領域まで長波長化することが必要不可欠である。

先に作製したコンポジット微粒子の光吸収波長を現有のUV-Vis-NIR (紫外-可視-近赤外) 分光光度計で測定し、近赤外に吸収波長が存在する組み合わせのコンポジット微粒子を選別する。

細胞内へコンポジット微粒子を取り込ませるためには、粒径が100 nm程度であればエンドサイトーシスによる取り込み経路が

利用出来る。それ以上の粒径の粒子や細胞内への導入が困難な場合は、研究協力者保有の光ピンセット技術を用いて、細胞内への導入を行う。

4. 研究成果

初年度は金ナノ粒子-ポリマーコンポジット微粒子の作製とその機能評価を行った。末端アミン基を持つポリブタジエンとポリスチレンからなるコア-シェル型微粒子を自己組織化析出法により作製し、金ナノ粒子分散液を加えることで、シェルに金ナノ粒子が密に詰まった微粒子を得た(図2)。金ナノ粒子のプラズモン吸収はもともと520nm付近に存在しているが、シェルに高密度に配列することにより、金ナノ粒子間のプラズモン共鳴がカップリングしたことで、近赤外領域まで吸収波長がレッドシフトした。このコンポジット微粒子にパラメルカプトフェノールを吸着させ、785nmの波長で励起した表面増強ラマンスペクトルを測定したところ、高感度に検出される事が明らかとなった。比較として用いたポリマー粒子や金ナノ粒子単独ではスペクトルが確認できない濃度であったことから、近赤外領域に吸収を持つことと、表面増強効果が効果的にラマンシグナルを増強した物と考えられる。さらに、コアに磁性ナノ粒子を導入したコンポジット微粒子の作製にも着手し、磁場応答性を持つコンポジット微粒子の作製にも成功した。

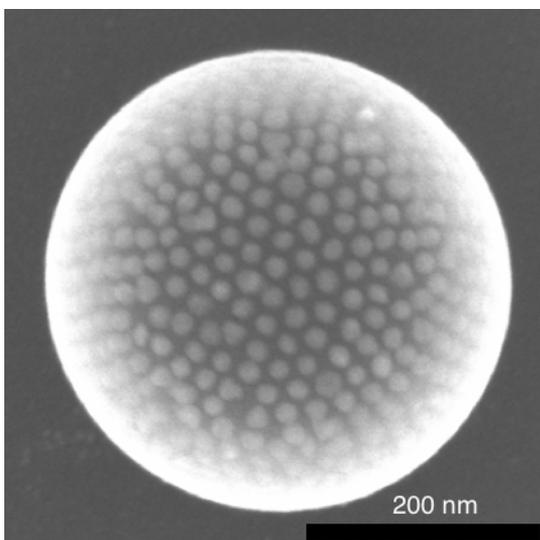


図2. 金ナノ粒子をコンポジット化したコア-シェル型微粒子の走査型電子顕微鏡像

次年度では、末端官能基化したポリマーのテトラヒドロフラン溶液にシリカナノ粒子などの表面負電荷を持つナノ粒子の水分散液を加え、テトラヒドロフランを蒸発除去する事により、シリカナノ粒子と末端官能基化ポリマーのコンポジット微粒子が自発的に形成されることを明らかとした。さらに、末端官能基化ポリマーの分子量やポリマー種に依って、シリカナノ粒子の配列や存在部位が変化する事を明らかとした。具体的には、分

子量の低いアミン末端官能基化ポリブタジエンを用いた場合、シリカ粒子はポリマー微粒子マトリクス中に包埋された構造となるのに対し、分子量の大きいアミン末端官能基化ポリブタジエンを用いた場合、シリカナノ粒子は粒子表面に偏析し、その結果、ナノ粒子が表面で最密充填した構造となることを明らかとした(図3)。アミン末端官能基化ポリスチレンを用いた場合も同様に表面にナノ粒子の偏析が見られたことから、この結果はポリマーの流動性に依存する現象であると考えられる。さらに、この知見はシリカ粒子に限らず、無機のナノ粒子をポリマー微粒子表面に高密度配列させることにつながる重要な発見である。また、従来のヘテロ凝集と異なり、ポリマー溶液から微粒子を作製させる際に同時にコンポジット化が行われるため、粒子表面の電荷を気にする必要は無く、また、溶液状態で混ぜ合わせるだけであるため、非常に簡便に高密度にナノ粒子が表面で配列したコンポジット微粒子を作製する手法を提供することになり、今後のプラズモン増強粒子の開発に重要な知見を得た。

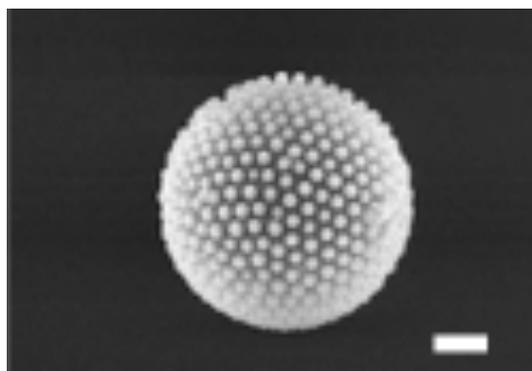


図3. シリカ-ポリマーコンポジット微粒子のSEM像

さらに、最終年度では、微粒子の内部相分離構造制御に関しては、ポリ(スチレン-ブロック-イソプレン)からなる微粒子を、自己組織化析出法を用いて調製し、四酸化オスミウムによりポリイソプレン相を染色した後、透過型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察し、トモグラフィー、走査型透過電子顕微鏡などにより構造の観察を行ったところ、サブミクロンサイズの微粒子は粒子サイズによってバルクとは全く異なる相分離構造を形成する事を見いだした。この相分離構造の妥当性を検討するため、セルダイナミクスシミュレーションを行い、実験を再現する結果が得られることを見だし、論文に報告した。さらに、より多様な構造制御因子を明らかとするために、Cahn-Hilliard方程式を用いた3次元シミュレーションを行い、一軸ラメラ構造から突起状のマイクロ相分離構造まで、多様な相分離構造を粒子内に形成できる事を明らかとした。細胞培養系への展開のために、細胞培養および将来的に移植医療への展開を考え、細胞培養基材として有用

なハニカム多孔体を生分解性のポリ乳酸から作製した。ポリ乳酸は耐熱性が 100° C 以下であり、細胞培養系に必要なオートクレーブ滅菌を行う事が難しい。そこで、ポリ(L-乳酸)とポリ(D-乳酸)の混合溶液からハニカム多孔体を作製することにより、150° C 程度まで構造を保持できるハニカム多孔体を作製することに成功した(図4)。

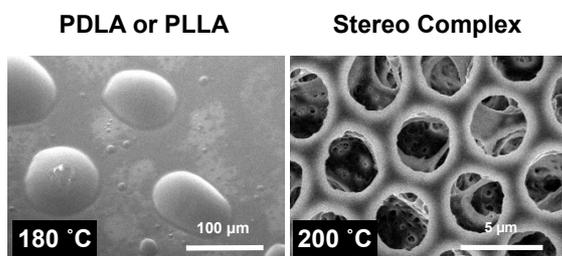


図4. 加熱状態でのポリ乳酸ハニカムフィルムのSEM像(左)とステレオコンプレックスハニカムフィルムのSEM像(右)

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 7件)

1. E. Avalos, T. Higuchi, T. Teramoto, H. Yabu, Y. Nishiura, “Frustrated phases under three-dimensional confinement simulated by a set of coupled Cahn-Hilliard equation”, *Soft Matter*, **12**(27), 5905-5914 (2016).
2. H. Abe, Y. Hirai, H. Yabu, “Thermally Stable Honeycomb-Patterned Porous Films of a Poly(L-Lactic Acid) and Poly(D-Lactic Acid) Stereo Complex Prepared Using the Breath Figure Technique”, *Macromolecular Materials & Engineering*, **301**(5), 523-529 (2016).
3. T. Higuchi, M. Pina, A. Zvelindovsky, H. Jinnai, H. Yabu, “Phase behavior in three-dimensional confinement spaces of symmetrical diblock copolymers: experimental observation and theoretical simulation of multi-pod structures”, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **54**(17), 1702-1709 (2016).
4. H. Yabu, J. Matsui, M. Hara, S. Nagano, Y. Matsuo, Y. Nagao, “Proton Conductivities of Lamellae-forming Bio-inspired Block Copolymer Thin Films Containing Silver Nanoparticles”, *Langmuir*, **32**(37), 9484-9491 (2016).
5. Y. Saito, T. Higuchi, H. Jinnai, M. Hara, S. Nagano, Y. Matsuo, H. Yabu, “Silver Nanoparticle Arrays Prepared by In Situ Automatic Reduction of Silver Ions in Mussel-Inspired Block Copolymer Films”, *Macromolecular Chemistry & Physics*, **217**(6), 726-734 (2016).

表紙に採用

6. H. Satoh, H. Yabu, One-Pot Preparation of Unique Structured Microspheres Comprised of Silica Nanoparticles and End-Functionalized Polymers”, *Macromolecular Materials & Engineering*, **301**(3), 279-286 (2016).

表紙に採用

7. M. Kanahara, H. Sato, T. Higuchi, A. Takahara, H. Jinnai, K. Harano, S. Okada, E. Nakamura, Y. Matsuo, H. Yabu, “Fabrication of NIR-Excitable SERS-Active Composite Particles Comprised of Densely-Packed Au Nanoparticles on Polymer Microparticles”, *Particles & Particle Systems Characterization*, **32**(4), 441-447 (2015)

表紙に採用

[学会発表] (計 4件)

1. 藪 浩, 「Nanostructured Polymer Particles for Display Applications and Others Prepared by Self-Organization Processes」, IDW/AD'16(招待講演)(国際学会), 2016年12月08日~2016年12月09日, 福岡国際会議場.
2. 藪 浩, 「ナノミセルと UV 光照射による金属フタロシアニンナノ結晶の合成」, 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会, 2016年06月09日~2016年06月10日, 天童ホテル.
3. 藪 浩, 「Creation of Functional Organic-Inorganic Composite Particles by Self-Organization Process」, IUMRS-ICA2014, 2014年08月24日~2014年08月30日, 福岡大学.
4. 藪 浩, 「Creation of Functional Organic-Inorganic Composite Particles by Self-Organization Process」, MASA(招待講演), 2014年07月18日~2014年07月19日, 筑波.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

https://www.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/yabu_lab/index/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪 浩 (HIROSHI YABU)

東北大学・材料科学高等研究所・准教授
研究者番号：40396255