

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13809

研究課題名(和文) バイオイメーキングへの応用に向けたコロイド状メソポーラスシリカ粒子の外表面被覆

研究課題名(英文) Outer surface coverage of colloidal mesoporous silica nanoparticles for the application to bioimaging materials

研究代表者

黒田 一幸 (KURODA, KAZUYUKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：90130872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではコロイド状メソポーラスシリカナノ粒子(CMS)のバイオイメーキング担体としての応用に向けて、CMS内部空間の精密制御法及びCMSへの温度応答性色素の封入法を開発した。細孔の鑄型となるミセルを膨潤させ、CMSの細孔径のみを4 nm - 8 nmの範囲で制御可能であった。またCMSに対しエチレン架橋された有機シロキサンを外表面被覆することで、分散安定性の高い中空シロキサンナノ粒子が得られた。加えて、色素を導入したCMSに対し制御したpH条件下でアルコキシシランを添加することにより、内部空間での色素の温度感受性を維持しつつ粒子外表面のみを選択的に被覆することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Colloidal mesoporous silica nanoparticles (CMS) as bioimaging carriers possessing various internal nanospaces were prepared and the pore clogging of outer surfaces of CMS was successfully realized. The pore size of CMS was controlled in the range from 4 nm to 8 nm using controlled templating. Hollow siloxane-based nanoparticles with high colloidal stability were also prepared when CMS were covered with ethylene-bridged organosiloxane. The outer surfaces of CMS containing thermoresponsive dyes were successfully covered by the simple addition of tetraalkoxysilane under controlled pH conditions. The thermally responsible property of the dye in the internal nanospace of CMS was retained after the pore clogging.

研究分野：無機工業材料

キーワード：メソポーラスシリカナノ粒子 バイオイメーキング 温度応答性色素 中空ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

生体における様々な現象を解明するためには、生体の情報を非侵襲的かつ直接的に観察する必要がある。蛍光プローブを用いたバイオイメージングは、非侵襲的かつ直接的に生体由来の特定分子・構造体の位置情報が解析可能な手法であり、多くの生命現象の解明に貢献してきた。そのような中、更なる生命現象の解析に向け、プローブの位置情報と同時に体内の物理的情報を定量的に得る手法の確立が近年求められてきた。中でも、温度は基礎的な生命現象を理解するために重要な物理的情報であり、がん細胞が熱励起に応答する機構の解明などが期待されている。その実現に向けて、細胞内の位置情報と温度を同時に測定する手法の開発が必要であり、ローダミン類などの温度応答性蛍光色素を用いたバイオイメージングが注目されている。ただし、これらの色素は細胞内の環境変化による影響を受けやすく、適当な担体との複合化による外部環境の影響からの遮断が必須である。従来の温度応答性蛍光色素の担体として用いられてきた物質には、PMMAのような有機物質やシリカのような硬い無機物質がある。しかし、有機物質では生体内において容易に分解する。また、無機物質では温度応答に重要な蛍光色素の温度応答部位の回転を固定して温度感受性を低下させるといった問題があり、生体安定性と温度感受性の両立は困難であった。これらの両立には、大きな空間を持つ無機物質への温度応答性蛍光色素の導入が有効だと考えられる。申請者は初めてメソポーラスシリカの合成を報告し(K. Kuroda et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 63, 988 (1990).)、この研究領域を先駆的に開拓してきた。さらに、20 nm 程度の粒径のコロイド状メソポーラスシリカ粒子(CMS)の合成に成功している(K. Kuroda et al., Chem. Comm., 34, 5094 (2009).)。この CMS は高い生体安定性を持つ上に、メソ細孔内では温度応答性蛍光色素が自由に運動することが可能であり、温度感受性の低下も抑制されるため、温度応答性蛍光色素の理想的な担体になると期待される。

2. 研究の目的

複雑な生命現象の解析に向け、蛍光プローブを用いて位置情報と温度を同時に定量的に得る手法の確立が重要性を増しており、温度応答性蛍光色素と担体との複合化が検討されてきた。しかし、これまで生体安定性と温度感受性を両立したプローブ担体は無く、温度を定量的に長期間評価することは困難であった。本研究では、コロイド状メソポーラスシリカ粒子(CMS)へ温度応答性蛍光色素を導入し、細孔内部に閉じ込めることで理想的なバイオプローブ担体を作製する。

3. 研究の方法

(1) CMS の内部空間への温度応答性蛍光色素の導入

コロイド状メソ構造体シリカナノ粒子の作製およびその鑄型除去に関しては、当研究室が既に確立した手法を用いる(K. Kuroda et al., Chem. Comm., 34, 5094 (2009).)。その後、安価で時間分解能の高い温度応答性蛍光色素であるローダミン B を導入する。具体的には、ローダミン B イソチオシアネートにトリエトキシシリル基を導入することで、粒子表面に修飾可能な色素含有シリル化剤を作製する。得られた色素含有シリル化剤を鑄型除去後の CMS に導入することで、色素封入 CMS を作製する。得られた粒子の構造を小角 X 線散乱(SAXS), TEM, SEM, 窒素吸着等で詳細に評価する。また、色素含有シリル化剤が粒子内部表面に修飾されたかどうかは、²⁹Si NMR, TG, CHN 元素分析で評価する。色素含有シリル化剤を用いた際に、立体障害が大きく粒子表面への修飾ができない場合には、Aminopropyltriethoxysilane を粒子表面に修飾し、ローダミン B イソチオシアネートを後からアミノ基に結合させる。

(2) アルコキシシランを利用した粒子外表面の選択的被覆

CMS 細孔内部に温度応答性蛍光色素を導入するためには、粒子の内部空間を保ちつつ粒子外表面のみを選択的に被覆する必要がある。そこで、通常メソポーラスシリカナノ粒子の表面のみを被覆可能な条件を調査する。特に、シリカ源の加水分解・縮合速度を制御し、細孔内部に到達する前に表面近傍でシリケートを縮合させることで、表面のみに限定的にシリカを被覆することが可能になると考えられる。そこで、シリカ源の加水分解速度を様々に変化させて、その被覆条件を検討する。得られた粒子の被覆率は、SAXS や窒素吸着法を用いて行う。

(3) 温度応答性蛍光色素複合 CMS の外表面の選択的被覆

作製した温度応答性蛍光色素複合 CMS を、上記の手法を用いて外表面被覆する。さらに、粒子外部に残存した色素分子を取り除くために、表面被覆後の粒子を純水に対して透析する。得られた粒子が温度応答性蛍光色素を内部空間に取り込んだ量の調査、および細孔内の色素の温度応答部位が回転するかの調査に向けて、UV-Vis 測定などを行う。最終的に、実際のバイオイメージングに利用可能なコロイド状メソポーラスシリカ粒子の調製指針を得る。

4. 研究成果

4.1 メソポーラスシリカナノ粒子の形態制御

理想的なバイオイメージング担体として CMS を利用するために、CMS の粒径と細孔径の精密制御法を確立した。

a) 粒径制御

各粒子の温度応答速度を均一化するために、粒径の均一な CMS の作製法を確立した。当初は CMS の粒径分布の拡大は不可避であり、その原因は、粒子を作製する過程において粒子成長と粒子核生成が同時に進行することであった。そのため、CMS 溶液に逐次的にシリカ源を添加し、加水分解を行うことで粒径拡大を行った。このとき、粒子を成長させる際に適切なシリカ源を選択し、「加水分解速度 R_H 」と「粒径拡大に消費される速度 R_c 」の比率を調整することで一様な粒子成長を実現し、均一な粒径の CMS を作製することに成功した。具体的には、 R_c に対して R_H が十分に遅くなるようにシリカ源を選択することで、加水分解されたシリカ種が核発生ではなく核成長に優先的に消費され、均一な粒径の CMS の調製が可能になった。

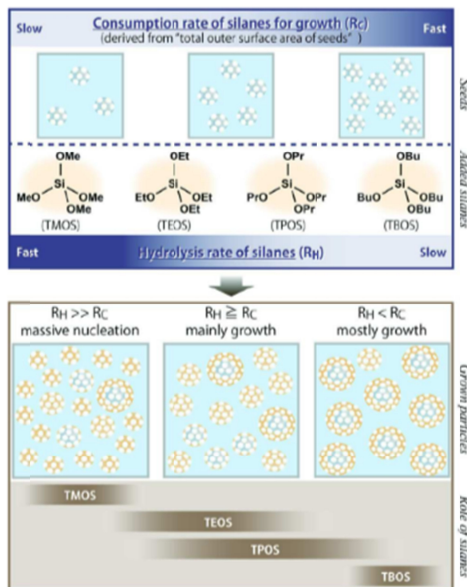


Figure 1 CMS の粒径制御

b) 細孔径制御

CMS の細孔中にゲスト分子を導入し、バイオイメージングに活用するためには、分子サイズに適した細孔径の設計が重要となる。細孔径を所望のサイズに調整する方法として、細孔の鋳型となるミセルを膨潤させ、細孔径を拡大させる手法が知られている。膨潤剤にはアルコールやアルカンなどの有機分子が活用されるが、その種類・量が細孔構造・粒子形状に及ぼす影響までは明らかにされていなかった。本検討では膨潤剤としてトリイソプロピルベンゼン (TIPB) を加えること

で、CMS の形状・細孔構造を変化させることなく細孔径のみを拡大させる事実を見出し、4 - 8 nm の範囲で CMS の細孔径を制御することに成功した。

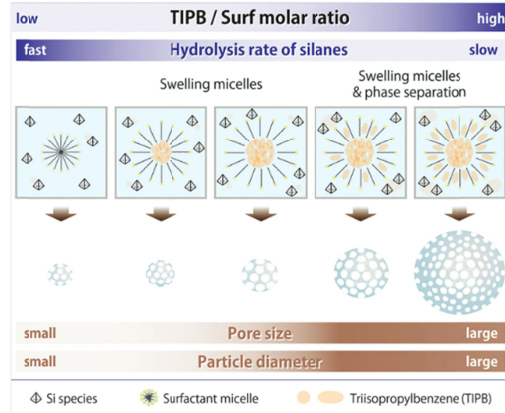


Figure 2 CMS の細孔径制御

4.2 温度応答性蛍光色素を封入した CMS の作製

CMS 外表面の選択的被覆に向けて、アルコキシシランの添加により、コロイド状態を維持しつつ CMS 外表面付近を無孔質のシリカ骨格の被覆により閉塞する条件を検討した。具体的には、pH 条件を制御しつつ、tetraethoxysilane (TEOS) を添加することで、コロイド状態を維持した CMS 外表面の選択的被覆に成功した。続いて、温度応答性蛍光色素を導入した CMS に対しても上記手法を適用することにより、色素をメソ孔内に封入することが可能か検討した。色素として Rhodamine B を選択し、それを CMS 内に導入したのち、pH 条件を制御しつつ TEOS を添加した。得られた CMS はメソ構造を有しつつ、窒素吸脱着等温線からはメソ孔の閉塞が確認され、色素を導入した場合も同様にメソ孔の閉塞に成功した (Fig.3)。さらに、得られた CMS の蛍光強度を測定すると、十分な温度感受性の保持を確認していることから、本手法は CMS の高い分散性と色素の温度感受性を保持しつつ外表面のメソ孔を閉塞可能な手法であるといえる。

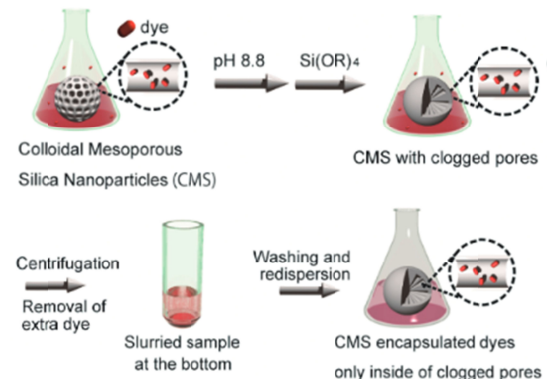


Figure 3 温度応答性蛍光色素を封入した CMS の作製

4.3 粒子内部に広い空間を有するコロイド状中空ナノ粒子の作製

中空構造のシロキサン系ナノ粒子はメソ細孔よりもはるかに広い内部空間を有しており、この空間を利用できれば温度応答性蛍光色素をより応答しやすい自由な状態で存在させることができると考えられる。しかし、プローブ担体としての応用に適した、高分散かつ粒径の小さな中空シロキサン系ナノ粒子の簡便な作製法は確立されていない。そこで CMS を架橋型有機シロキサンで被覆した際のシリカの溶解・再析出現象を利用して上記の性質を備えた中空シロキサンナノ粒子の作製を試みた。

既報を参考に作製した CMS 分散液を、界面活性剤を含む同体積の塩基性水溶液で希釈した。溶液を攪拌しながら 60 °C に保ち、そこに 1,2-bis(triethoxysilyl)ethenylene (BTEE) を添加した。一定時間加熱後に透析操作により界面活性剤を除去し試料を得た。乾燥試料の窒素吸脱着測定より中空粒子に特有の H5 型のヒステリシス曲線を観測した (Figure 4a)。また TEM 観察より、シェル部とコア部でコントラストのある粒子が形成しており、中空構造への転換が示唆される (Figure 4b)。さらに、DLS 測定により粒子の高い分散安定性を確認し、コロイド状中空シロキサンナノ粒子の作製に成功した。

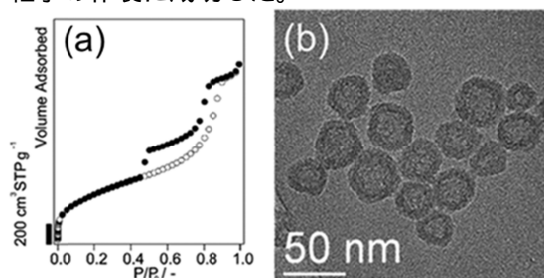


Figure 4 中空シロキサンナノ粒子の(a)窒素吸脱着等温線と(b)TEM 像

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 5 件)

E. Yamamoto, S. Uchida, A. Shimojima, H. Wada, K. Kuroda, "Transformation of Mesoporous Silica Nanoparticles into Colloidal Hollow Nanoparticles in the Presence of a Bridged-Organosiloxane Shell", *Chem. Mater.*, 2018, **30**, 540–548. 査読有

E. Yamamoto, K. Nagata, K. Onishi, C. Urata, A. Shimojima, H. Wada, S. Takeoka, K. Kuroda, "Pore Clogging of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles for Encapsulating Guest Species", *Bull. Chem.*

Soc. Jpn., 2017, **90**, 706–708. 査読有

H. Yamada, H. Ujije, C. Urata, E. Yamamoto, Y. Yamauchi, K. Kuroda, "A multifunctional role of trialkylbenzenes for the preparation of aqueous colloidal mesostructured/mesoporous silica nanoparticles with controlled pore size, particle diameter, and morphology", *Nanoscale*, 2015, **7**, 19557–19567. 査読有

E. Yamamoto, K. Kuroda, "Colloidal mesoporous silica nanoparticles", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2016, **89**, 501–539. 査読有

H. Yamada, C. Urata, E. Yamamoto, S. Higashitamori, Y. Yamauchi, K. Kuroda, "Effective Use of Alkoxysilanes with Different Hydrolysis Rates for Particle Size Control of Aqueous Colloidal Mesostructured and Mesoporous Silica Nanoparticles by the Seed Growth Method", *ChemNanoMat*, 2015, **1**, 194–202. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

内田早紀、山本瑛祐、永田皓也、下嶋敦、和田宏明、黒田一幸、シリカ溶解・再析出に基づくコロイド状中空有機シロキサン系ナノ粒子のワンポット合成、公益社団法人日本セラミックス協会 2016 年年会、2016 年 03 月 14 日~2016 年 03 月 16 日、早稲田大学 東京。

山本瑛祐、永田皓也、大西健太、浦田千尋、本間光将、武岡真司、和田宏明、下嶋敦、黒田一幸、無孔質シリカ骨格形成によるメソポーラスシリカナノ粒子のメソ孔の閉塞、第 31 回ゼオライト研究発表会、2015 年 11 月 26 日~2015 年 11 月 27 日、とりぎん文化会館 鳥取。

他 5 件

〔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

http://www.waseda.jp/sem-kuroda_lab/

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田一幸 (KURODA, Kazuyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：90424803

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
下嶋 敦 (SHIMOJIMA, Atsushi)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：90130872

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：20222094

(4)研究協力者
大庭悠輝 (OBA, Yuki)
永田皓也 (NAGATA, Koya)
廣岡奈緒子 (HIROOKA, Naoko)
藤原峰一 (FUJIWARA, Minekazu)