

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19850015

研究課題名（和文） 生体適合性を有する細胞蛍光標識シロキサンナノ粒子の開発

研究課題名（英文） Development of Fluorescent Cell-Labeling Siloxane Nanoparticles with Biocompatibility

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：癌細胞などの特定の細胞を標識する蛍光剤として、量子ドットを内包するシロキサンナノ粒子の合成および構造解析を行なった。量子ドットとはⅡ-VI族半導体であり、優れた蛍光特性を示すと同時に生体に対して高い毒性があることが知られているが、本研究では、量子ドットをコアとして、生体適合性を有するシロキサン材料で簡便に被覆する手法を開発した。得られたシロキサンナノ粒子は水溶液中で安定に分散していた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,350,000	0	1,350,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：ナノ粒子、シロキサン、蛍光、細胞、バイオイメージング、量子ドット、生体適合性、選択性

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛍光を利用した生体分子の検出法は、放射性同位体を用いない安全でかつ高感度な手法として、様々な科学領域で重要な役割を果たしている。これまでは有機系色素による染色が一般的であったが、最近では、量子ドットが独特なサイズ依存の化学的・物理的特性を示す蛍光物質として注目されている。

(2) ナノメートルサイズのⅡ-VI族半導体である量子ドットは優れた特性を示す蛍光性の微粒子であるが、生体への応用を考えるとその毒性が問題である。現在では、生体適合性を有するシロキサン材料でナノコーティ

ングをする試みが実施されている。シロキサンコーティングにより、材料表面に位置するシラノール基が中性条件で負に帯電しているため、量子ドットに安定した水分散性がもたらされる。

(3) 量子ドットを内包するシランモノマーとしては、テトラエトキシシランが一般的に利用されているが、この方法ではゾルゲルネットワークの成長が早すぎることから、複数の量子ドットを取り込むために良質な発光材料を得ることができない。最近では、有機官能基を含むモノマーであるオルガノシランによるコーティングが検討されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、水溶液中において安定に分散して優れた蛍光特性を示す、新規な量子ドットを内包するシロキサンナノ粒子の合成を目的とした。

(2) 量子ドットを内包するシロキサンナノ粒子を合成した後は、粒子表面に存在するシラノール基を利用して機能化を行なう。反応性の有機官能基を有するシランカップリング剤を修飾してタンパク質を導入した後、タンパク質の特異的に認識能を利用したバイオセンシングについて検討する。

(3) (2)において良好な認識能が確認された場合においては、実際に細胞に導入して、バイオイメージングについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 有機溶媒に分散する量子ドット（セレン化カドミウムナノ粒子）は文献記載の方法で合成する。通常は300℃以上の高温加熱を必要とするが、本研究では150℃で合成を行なう低温法を採用した。低温法では、簡便に量子ドットを合成できる反面、粒子界面が不安定であるため、量子収率の低下や溶媒分散性の低下を引き起こしやすいことが問題となっている。そこで、まず硫化亜鉛でセレン化カドミウムの粒子を被覆して、界面の安定化を行う。得られるナノ粒子について、IR、熱重量分析、元素分析等の手法で詳細な構造解析を行ない、透過型電子顕微鏡、動的光散乱、ゼータ電位測定により、形態または粒子界面の状態について検討する。

(2) 三官能性のシランカップリング剤である3-メルカプトプロピルトリメトキシシランで量子ドット表面に存在するトリオクチルホスフィンオキシドやヘキサデシルアミンと交換反応を行なう。この反応は、クロロホルム/水の二相系で行ない、反応の進行とともに量子ドットは水相に抽出される。その後、特定の有機官能基を有するシランカップリング剤で化学修飾して、ナノ粒子の機能化を図る。続いて、修飾された官能基を利用して、タンパク質を量子ドットに導入する。

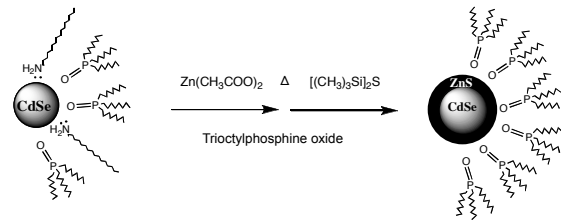
(3) 量子ドットを内包するシロキサンナノ粒子は、生体水溶液中に安定に分散する必要がある。生体水溶液は大量の塩分を含んでおり、この塩分は粒子表面に存在する電荷を中和する効果があるため、本研究で開発したシロキサンナノ粒子についても生体水溶液中で凝集する可能性がある。凝集が見られた場合には、ポリエチレングリコールを一部導入するなどして、水分散性の改善に努める。

(4) シロキサンナノ粒子の安定な水分散性が確認された後は、まずは *in vitro* で細胞の蛍光標識を行ない、ナノ粒子の取り込み効率、組織選択性、分散安定性について検討を行う。*in vivo* においては長期間の観察を行ない、蛍光強度の変化、および組織選択的取り込みによって生じた明瞭さが維持できるかについて特に留意して観察を行なう。

4. 研究成果

(1) トリオクチルホスフィンオキシドとヘキサデシルアミンを配位子とし、反応温度を150℃に設定して、セレンと酸化カドミウムを原料に用いて量子ドット（セレン化カドミウムナノ粒子）を合成した。得られた量子ドットについて蛍光スペクトルを測定したところ、蛍光最大波長（515 nm）から粒子サイズは4-6 nm程度と見積もられ、半値幅が34 nmと狭いことから、比較的単分散のナノ粒子が合成できたことが示された。量子収率は、ローダミン 6G を標準物質とする相対法で求められ、5.3%であった。

(2) (1)で得られた量子ドットについて、酢酸亜鉛とヘキサメチルジシリルチアンを原料に用いて、硫化亜鉛で数 nm 程度被覆した。



蛍光スペクトルを測定したところ、最大蛍光波長は(1)で得られたナノ粒子と比較して12 nm 程長波長側へシフトしていたことから、硫化亜鉛の被覆による粒子サイズの増大効果が認められた。量子収率は、硫化亜鉛の被覆により20.4%まで増大した(図1)。

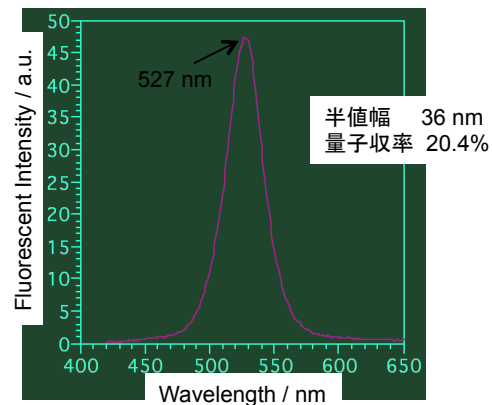


図1 硫化亜鉛被覆後の量子ドットの蛍光スペクトル（クロロホルム溶液）

次に、代表的なアルカンチオールであるドデカンチオール(Dod)を用いて、クロロホルム溶液中、トリオクチルホスフィンオキサイドやヘキサデシルアミンとの配位子交換反応を行なった。硫化亜鉛で被覆していない場合には、量子ドットの蛍光がほとんど消光されたのに対し、被覆後では粒子に対して200当量のDodの添加に対しても、蛍光の消光がある程度抑えられたことから、被覆により粒子界面の安定性が著しく向上していることが示唆された(図2)。

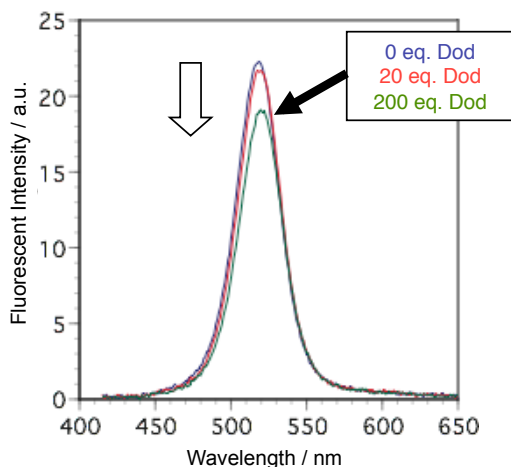
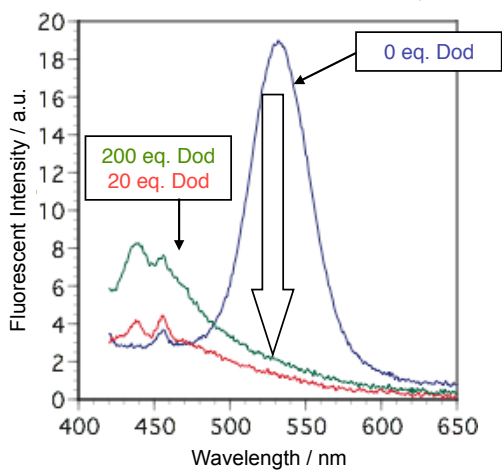
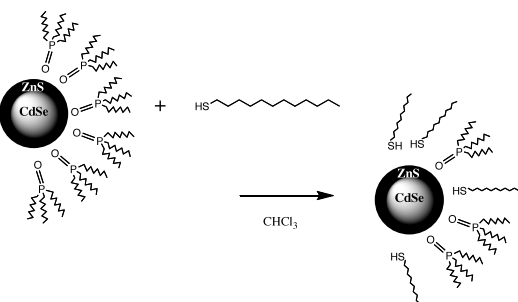
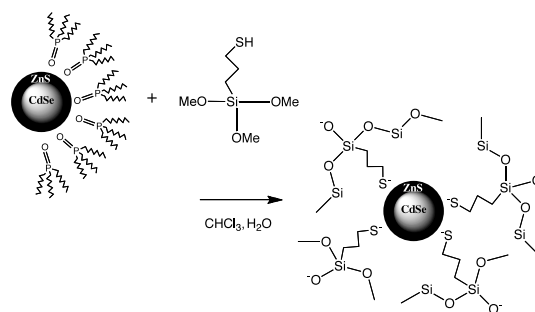


図2 ドデカンチオール(Dod)を用いて配位子交換反応を行なった後の量子ドット(上図:硫化亜鉛被覆無し、下図:硫化亜鉛被覆後)の蛍光スペクトル(クロロホルム溶液)

一般に、量子ドット表面にチオール配位子が結合すると量子収率の著しい低下が観測されるが、本研究で用いた硫化亜鉛被覆量子ドットでは、量子収率の低下がほとんど抑えられるため、以下のシロキサン被覆に用いるコアの量子ドットとして使用した。

(3)(2)までに得られた量子ドットは、クロロホルムなどの有機溶媒には安定に分散するが、生体環境の水溶液中ではすぐに凝集して消光する。そこで、量子ドット表面に結合可能なチオール基を有する3-メルカプトプロピルトリメトキシシランで配位子交換反応を行なった。この反応は、水酸化テトラメチルアンモニウムを塩基触媒として、クロロホルム/水の二相系で行なわれ、反応の進行とともに量子ドットは水相に抽出された。これは、アルコキシシランが開裂して生じたシラノール基が塩基性水溶液中では負に帯電しているため、量子ドットが水相に移動したと考えられる。



得られたシロキサン被覆量子ドットについて蛍光スペクトルを測定したところ、量子収率は配位子交換前と比較して減少したものの、依然として十分な蛍光性を示していた。半値幅の変化はほとんど見られないことから、安定に水溶液中に分散していると考えられる(図3)。

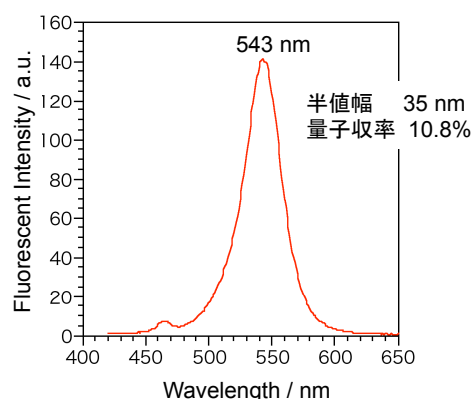


図3 3-メルカプトプロピルトリメトキシシランでシロキサン被覆後の量子ドットの蛍光スペクトル(水溶液)

次に、シロキサン被覆率の向上を目指して、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランとビニルトリエトキシシランを混合させて、シロキサン被覆実験を行なった。結果として、ナノ粒子の水分散性および安定性がシランカップリング剤を混合して用いることで向上することがわかった。図4には、作製して一週間後のシロキサンナノ粒子の蛍光スペクトルを示すが、量子ドットの分解や凝集に由来するピークは観測されなかった。これは、立体的に小さなビニル基を有するシランカップリング剤が含まれることで、被覆層におけるシロキサンネットワークの密度が向上し、量子ドット界面と水がより接触しにくくなったためと考えられる。

また、アミノ基が量子ドットに配位することで、量子収率が大きく向上する現象が知られている。そこで、今後、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランと3-アミノプロピルトリエトキシシランを混合して用いて量子ドットを被覆することで、量子収率の向上を目指す。

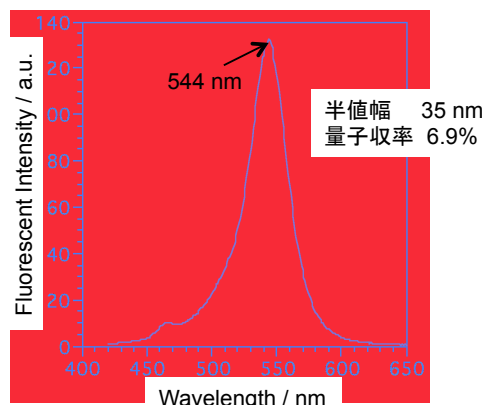
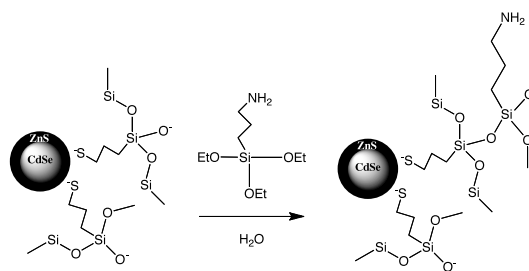


図4 3-メルカプトプロピルトリメトキシシランとビニルトリエトキシシランでシロキサン被覆後の量子ドットの蛍光スペクトル（水溶液）

続いて、反応性のシランカップリング剤として3-アミノプロピルトリエトキシシランを選択し、先のシロキサン被覆量子ドットへの化学修飾を試みた。配位子交換反応の際に用いた塩基触媒の影響で、抽出後の水溶液は塩基性であり、そこにシランカップリング剤を加えることで、3-アミノプロピルシリル基は粒子表面のシラノール基に容易に結合できると考えられる。

粒子表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランで修飾したシロキサン被覆量子ドットについて蛍光スペクトルを測定したところ、反応後においても半値幅の増大は見られなかった（図5）が、溶液がわずかに白濁したことから、水に対する分散性は低下したと思われる。



これは、アミノ基はシラノール基と酸塩基対を形成するために、シラノール基の負電荷が中和されたことによるためと考えられる。量子収率は、溶液が白濁した影響で正確な値を算出することができなかった。

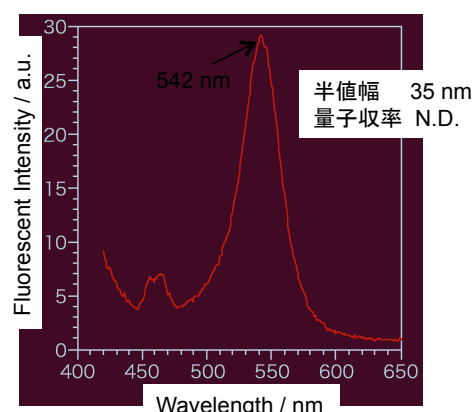


図5 粒子表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランで修飾したシロキサン被覆量子ドットの蛍光スペクトル（水溶液）

アミノ基を修飾した段階で、蛍光特性の劣化を避けるためには、アミノ基を修飾後、すぐにアミノ基を反応させることが望ましい。特にカルボン酸などの中性～塩基性条件下で負に帯電する（シラノール基の負電荷と打ち消し合わない）官能基に変換することができれば、安定した水分散性がもたらされると考えられる。

今後、一級アミンと反応して蛍光を発することが知られているフレオレスカミンを用いて粒子表面へのアミノ基の導入を確認した後は、アミノ基を修飾後即座に無水コハク酸と反応させて、粒子表面に位置する有機部位の末端官能基をカルボキシル基へと変換する。続いて、縮合剤を用いて粒子表面のカルボキシル基とタンパク質のリジン残基のアミノ基間で縮合反応を行なうことで、シロキサンナノ粒子に化学的にタンパク質を固定化させ、バイオセンシングを行なう。良好な認識能が確認された場合においては、実際に細胞イメージングについて検討する。

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 0件)

[学会発表] (計 0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]

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