

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760035
 研究課題名 (和文) 生きた細胞中での金属ナノ粒子のレーザー形成
 研究課題名 (英文) Laser Photo-Fabrication of Metallic Nanoparticles in Living Cells
 研究代表者 SMITH Nicholas Isaac (スミス ニコラス アイザック)
 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター特任講師
 研究者番号：10362592

研究成果の概要 (和文)：

本研究から、細胞の塩環境の中で多光子レーザー照射法を用いて金属を形成できることがわかったが、形成される領域を限定させることは現在でも困難である。しかし、細胞は死滅細胞指標のヨウ化プロピジウムを排出させることがわかり、本研究を今後継続していく上で極めて有望な成果である。暗視野法と発光イメージング法を用いて、強い光散乱を生じさせる領域がレーザーの焦点部位の周囲に観察された。このことは金ナノ粒子が形成されていることと合致する。

研究成果の概要 (英文)：

This research has found that metal can be fabricated in the salt conditions of the cell, but localization remains difficult, using multiphoton laser irradiation. However, the cells were found to exclude indicator propidium iodide, which is very promising for the future continuation of this work. Using dark-field and luminescence imaging, highly scattering regions were observed around the location of the laser focus, consistent with gold nanoparticles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用光学・量子光工学

キーワード：(1) ナノ粒子 (2) フォトファブリケーション (3) 培養細胞
 (4) 毒性 (5) 生存能力 (6) 表面増強ラマン

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初の状況では、適切な金属塩溶液に対してレーザー吸収を直接作用させ

ることで光還元が可能であることがわかっていった。レーザー光を線吸収し、さらにその後の光化学反応により金属イオンが還元さ

れることで光還元が生じ、それにより数個の原子からなる金属クラスターが形成され、さらなる光還元の効果で、クラスターが成長して行く。

(2) 多くの研究者が、比較的単純な金属イオン（例、銀イオンや金イオン溶液）での光還元作用について調べてきているが、生体細胞内の場合には複雑さが大きく増し、そのような細胞内では、還元酵素や吸収分子、その他の多数の化学物質が化学反応に拮抗したり干渉したりする可能性がある。この点については、本研究を提案した時点より以前には研究されていなかった。われわれの研究室では、その時すでに粒子形成のエビデンスを観察しており、そのため、より詳細に研究するという今回の研究提案となった。

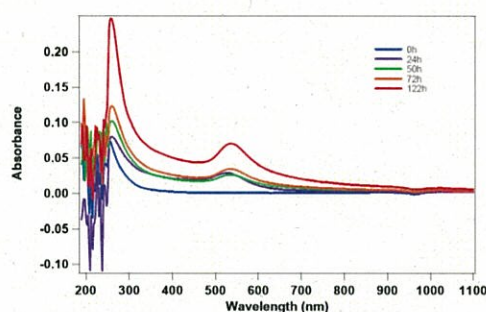


図 1: 吸光スペクトルが時間的に増加していることは、細胞内に金属粒子が形成されていることと合致している。

2. 研究の目的

(1) ナノ粒子が生物学や医学に有用に利用するためには、細胞内にナノ粒子を非破壊的に挿入できる方法がなければならない。細胞は、ある程度はナノ粒子を自然に取り込むが、細胞内でナノ粒子をファブリケートする、より直接的なアプローチを使えば、細胞内でのナノ粒子の利用範囲が拡大するであろう。

(2) 本研究の目的は、生体細胞内での光還元作用について研究すること、および、反応に関与する光子数を決定することであった。多光子吸収によって光還元プロセスが達成されるのであれば、それに関連していくつかのベネフィットが生じ（レーザー吸収を局在化できることや、細胞内での光毒性作用を軽減できることなど）、それによって、関心領域に局限した制御された光還元ゾーンを実現できるはずである。後半の研究は、このようなレーザーを用いて金属吸収体を作成したものが、光線力学治療、例えば、癌の代替治療法としてなどに使えるかどうかの妥当性を評価するようデザインした。

3. 研究の方法

(1) 金の構造物が形成されることをイメージングする至適な方法を決定し実施すること：当初は、細胞内の局所光還元により形成される回折限界以下のサイズの粒子をイメージングするテクニックとして、暗視野証明が有望であると期待された。

(2) レーザー照射を行った領域で、分光測定、とりわけラマン分光測定を行えば、（それ自体で）光還元反応が生じるはずである。

(3) 金イオン溶液その他の金属溶液中での細胞の生育可能性を調べるのに、ヨウ化プロピジウムやその他の確立している方法を用い、得られた結果を用いて、表面増強ラマン散乱を分析することや、光線力学療法にこのテクニックを用いることの妥当性を評価している。

4. 研究成果

(1) 細胞内の塩の状態では金属（ナノ粒子）をファブリケートすることができるが、光還元を行う領域を限定させるのは、現在でも困難である。吸収が非線形で、レーザーの作用を良好に局限できる多光子レーザー照射法を用いても、光還元反応をコントロールすることは困難である。形成された金属粒子は、形成前のイオン溶液よりも吸収断面積がはるかに大きく、そのため吸収が急激に上昇し、その結果発熱し、しばしばレーザー照射した周囲領域の細胞構造が破壊される結果となるからである。

(2) 細胞は、金イオン溶液中では、短時間なら生存可能である。細胞は、1日から数日までの範囲で、死滅細胞を示す指標であるヨウ化プロピジウムを排出させることができた。このことは、通常なら、細胞が溶液中で生存していることを示しているのであろう。しかし、金イオンがヨウ化プロピジウムの通常的作用に干渉しているという可能性も検討しなければならない。

(3) 光還元に使おうと考えているレーザーで、細胞に対してその他の作用も認められ、レーザーアブレーションや膜電位の過分極などが観察された作用であった。これらの作用は共に、ナノ粒子構造の形成とは関係のない、レーザーと細胞間の相互作用についての他の機序を解明するのに重要である。

(4) 細胞のラマン分光測定を行って、スペクトルが経時的に変化することがわかった(図参照)。スペクトル分散シグナルの幅が広くなり、振幅が大きく増加したことは、発光作用で説明できる。このことは細胞内に金(粒子)が形成されることと合致しているが、このことは、反応をコントロールするのが困難であることを示すことでもある。つまり、化学反応を操作し、関心領域にのみ(金属)粒子を形成させるためには、よりコントロールが必要であることを示している。

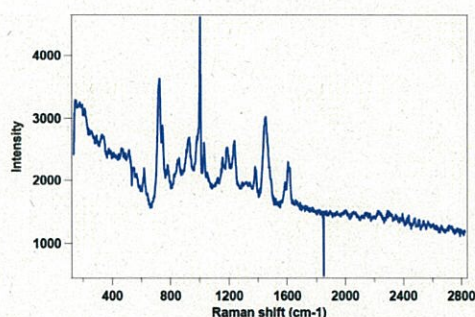


図 2: 1mM HAuCl₄ 溶液中でインキュベートした HeLa 細胞。励起波長は 633 nm

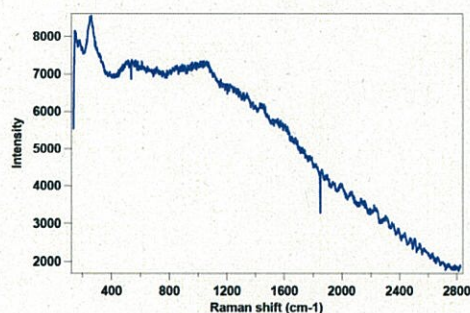


図 3: 蛍光様のスペクトル。サンプルは図 2 と同じ。図 2 を測定した後(約 30 分後)にこのスペクトルを測定した。

(5) イメージング法では良好な結果が得られた(暗視野イメージング法を用いた)。イメージング法に関する結果の一部は、以下に示した論文に発表した(Fujita et al., 2009)。結果は有望なもので、暗視野イメージング法を使って、形成された構造物がピンクの散乱光を示すことがわかった。暗視野顕鏡でピンクの色が観察されたことは、金粒子が形成されたことと合致している。しかし、散乱光の分光分析と同時暗視野照明を行わないと、粒子が何であるかについて正確に決定することはできない。光還元させた領域の発光イメージングをうまく行うことができ、レーザーの焦点領域の周囲に強く発光する領域が存

在していることがわかった。一方、透過型電子顕微鏡観察では良好な成果が得られなかった。金イオンと、TEM の標準染色法の間干渉が認められたことは、光還元領域を観察するのに TEM を使うのであれば、新しい染色法が必要であることを示すものであった。さらに、ラマン分光法を使った散乱スペクトルの確認に関する研究を行ったことで、収集したシグナルの検出法や処理法が進展した(Hamada et al, 2008)。このことにより、この領域に更なる発展が得られるであろう。

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 4 件)

- ① K. Fujita, S. Ishitobi, K. Hamada, N. I. Smith, A. Taguchi, Y. Inouye, and S. Kawata, "Time-resolved observation of surface-enhanced Raman scattering from gold nanoparticles during transport through a living cell," J. Biomed. Opt. PEER REVIEWED, VOLUME 14, ISSUE D YEAR 2009, PAGE NUMBER 024038
- ② J. Ando, NI Smith, K. Fujita, and S. Kawata, "Photogeneration of membrane potential hyperpolarization and depolarization in non-excitable cells," Eur. Biophys. J. PEER REVIEWED, VOLUME 38 (2), ISSUED YEAR 2009, PAGE NUMBER 255-262
- ③ J. Ando, G. Bautista, N. Smith, K. Fujita, and V. R. Daria, "Optical trapping and surgery of living yeast cells using a single laser" Rev. Sci. Instrum. PEER REVIEWED, VOLUME 79, ISSUED YEAR 2008, PAGE NUMBER 103705
- ④ Keisaku Hamada, Katsumasa Fujita, Nicholas Isaac Smith, Minoru Kobayashi, Yasushi Inouye, and Satoshi Kawata, J. Biomed. Opt. PEER REVIEWED, VOLUME 13, ISSUED YEAR 2008, PAGE NUMBER 044027

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 森田 寛之、新岡 宏彦、安藤 潤、藤田 克
昌、河田 聡
生細胞内での金イオン還元による金ナノ
粒子の形成
日本生物物理学会年会 2008 年 12 月 3
日ー5 日 福岡コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

SMITH Nicholas Isaac

（スミス ニコラス, アイザック）

（大阪大学・免疫学フロンティア研究
センター・特任講師）

研究者番号：1 0 3 6 2 5 9 2

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：