

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25620110

研究課題名(和文)長残光蛍光体ナノ粒子を用いた蛍光イムノクロマト技術の構築

研究課題名(英文)Construction of fluorescence immunochromatography technique using a long persistent phosphor nanoparticles

研究代表者

多喜 正泰 (TAKI, Masayasu)

名古屋大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：70378850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：イムノクロマト技術は特別な機器を使用せずに診断できる非常に簡便な方法である。「光」を用いた蛍光検出は、「色」よって判断する従来法よりも高感度検出が可能であるが、蛍光検出装置が必要であるため簡便性に欠ける。そこで本研究では、機能性セラミック材料である長残光蛍光体に着目し、暗室下に置くだけで検出できる「無励起光型蛍光イムノクロマト技術」の開発に取り組んだ。ボールミルによる粉碎条件を検討することによって、バルク材料の特異な光物性を保ったままナノ粒子化することに成功した。さらに表面修飾法についても種々検討を重ねた結果、葉酸あるいは抗人型骨肉腫抗体を含む長残光蛍光体ナノ粒子の効率的な合成経路を確立した。

研究成果の概要(英文)：The immunochromatographic assay is a simple and rapid test, which provides a result without the need for specialized and costly equipment. Although it is known that a fluorescence immunochromatographic assay is high sensitive for detection of the sample as compared with a traditional colorimetric method, this is lacking in convenience of the use because of the necessary of a fluorescence detector. Herein, I focused on a long persistent ceramics (LPC), which shows intense long-lived afterglow luminescence when irradiated with UV-vis light, and addressed the development of new phosphorescence immunochromatographic techniques with the long persistent ceramics. Ball-milling was used to prepare the nanoparticles of ceramics with long persistent property. The synthetic method to introduce biomolecules such as folic acid and antibody on the surface of the nanoparticles has been established.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：長残光蛍光体 ナノ粒子化 表面修飾

1. 研究開始当初の背景

イムノクロマト法は特別な測定機器を用いない検査手法の一つであり、インフルエンザや妊娠などの診断のみならず、食品中のアレルゲン検査や微生物検査など広く利用されている。イムノクロマト法における標識色素として最も多く用いられているのが金コロイドである。抗体が担持されたテストライン部分へ金コロイドが凝集すると、プラズモン効果によって可視領域の吸光係数が大きく増大し、その発色を目視により検出することができる。しかしながら、この方法は感度が悪いため検出限界が高くなってしまいう問題があった。

2. 研究の目的

イムノクロマト法の新たな標識色素材料として長残光蛍光体に着目した。長残光蛍光体は近紫外～可視光を数分間照射すると数時間以上緑色などの可視光を発し続ける特異な光物性を示すセラミック材料である。本研究では、抗体で表面修飾した長残光蛍光体を標識色素として用いることで、試料を展開後、暗室下に置くだけで検体を高感度検出できる全く新しい概念に立脚した蛍光イムノクロマト法の構築を目指す。



3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光体のナノ粒子化

イムノクロマト法に適用可能な 100~300 nm の粒径を有する長残光蛍光体ナノ粒子を得るため、遊星ボールミルによる粉砕処理条件について検討した。

(2) 水に対する安定性の向上

長残光蛍光体を水中に入れるとセラミック母体が溶解し、pH が大きく上昇することが知られている。そこで水に対する安定性の向上を図り、長残光蛍光体ナノ粒子の修飾法について検討した。

(3) ナノ粒子表面への抗体修飾

得られた長残光蛍光体ナノ粒子の水中における高い分散性を保持するための両親倍性ポリマーの効果について検討した。さらに、ポリマーに対して任意の抗体を結合させることにより、抗体修飾ナノ粒子を作成した。

4. 研究成果

(1) 緑色蛍光体のナノ粒子化

遊星ボールミルを用いた緑色長残光蛍光体バルク材料のナノ粒子化法について検討した。まず、エタノール溶液中、粒径 0.5 mm または 0.3 mm のビーズを用いて行ったところ、いずれも板状に粉砕されており、蛍光ス

ペクトルもバルク体とは大きく異なるものであった。また、発光強度も大きく減衰していた。次に、シランカップリング剤である 3-アミノプロピルトリメトキシシランを共存させ、粉砕と同時に表面修飾する手法についても検討したが、やはり板状の粉砕体となった。これはエタノール自身、もしくはこれに含まれる水が原因であると考え、溶媒をトルエンに変更した。またより小さい粒子を得るために、粒径が 0.1 mm のビーズを採用した。600 rpm で 2 時間粉砕し、孔径 0.7 μm のメンブレンフィルターを通じてサイズが大きい粒子を除去した結果、球形に近い粒子が得られた (図 1a)。動的光散乱法により粒径分布を測定したところ、181 nm にピークが観測され、目的とする 300 nm 以下の粒子を得ることができた (図 1b)。

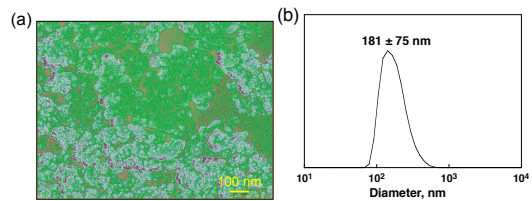


図 1. (a) 蛍光体ナノ粒子の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像, (b) 動的光散乱法による粒径分布

(2) 水に対する安定性の向上

得られたナノ粒子は水溶液中では不安定であり、長残光特性は速やかに消失してしまった。そこで、水分子が与える影響を排除するため、ナノ粒子表面を疎水的にした。様々なシランカップリング剤について検討した結果、図 2a に示す長鎖アルキル型が最も良い結果を示した。さらに粒子表面に存在する未反応の水酸基を全て取り除くため、エンドキャッピング剤でこれを処理した。このようにして得られたナノ粒子は予想通り高い撥水性を示した。

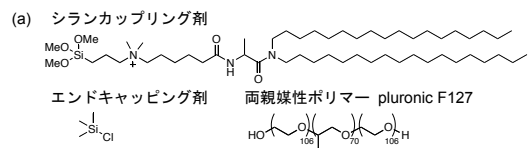


図 2. (a) 蛍光体ナノ粒子の表面修飾剤の構造

(3) ナノ粒子表面への抗体修飾

得られたナノ粒子の水に対する分散性を高めるため、両親媒性ポリマーによるナノ粒子の被覆を行った。両親媒性ポリマーの種類について検討したところ、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールから成る pluronic F127 を用いて被覆したナノ粒子が最も分散性に優れていることがわかった。本手法に従って合成した緑色長残光蛍光体ナノ粒子 (gPLNP@F127) は水溶媒中においてもバルク試料と同等の光学特性を有している

ことが確認された (図 3)。

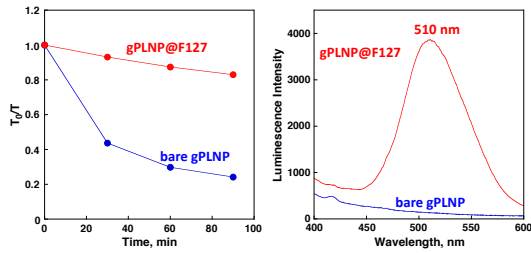


図 3. 水中における透過率変化および蛍光スペクトル

次に, pluronic F127 の両末端の水酸基に対して葉酸(FA), あるいは抗ヒト型アルカリホスファターゼ(hALP)抗体を結合し (図 4a), これを用いてナノ粒子を被覆することで, 各種修飾ナノ粒子を得た。葉酸修飾ナノ粒子のゼータ電位は gPLNP@F127 に比べ大きく負側にシフトしていたことから, 粒子表面への葉酸の修飾が裏付けられた (図 4b)

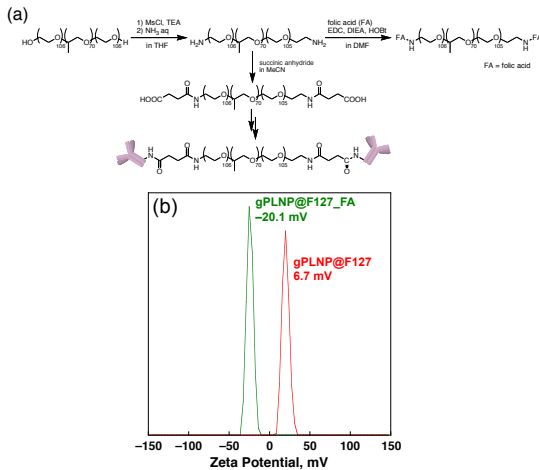


図 4. (a) 葉酸あるいは抗体を結合した pluronic F127 誘導体の合成, (b) 葉酸修飾によるゼータ電位の変化 (赤: gPLNP@F127, 緑: gPLNP@F127-FA)

得られたナノ粒子の細胞選択性について評価するために, 葉酸受容体の高発現株である HeLa 細胞と低発現株である MCF-7 細胞に対する吸着特性について検討した。それぞれの培地に gPLNP@F127-FA を加え 5 時間培養した後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観測した。その結果, HeLa 細胞の場合では細胞内からの強い発光が観測されたのに対し, MCF-7 細胞では細胞内部からの発光はほとんど認められなかった (図 5a)。

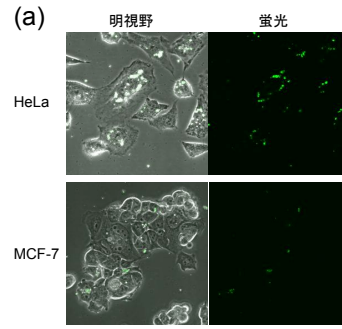


図 5. (a) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた gPLNP@F127-FA のイメージング 上段: HeLa 細胞, 下段: MCF-7 細胞

共染色実験の結果から, 細胞内の発光は酸性オルガネラ領域と一致することがわかり, エンドソームに局在しているものと示唆された (図 5b)。そこで, HeLa 細胞の培地に様々なエンドサイトーシス阻害剤 (葉酸, アジ化ナトリウム, ショ糖) を加え, gPLNP@F127-FA の取り込み阻害効果について検討したところ, いずれの場合においても蛍光強度の大幅な減少が確認された。以上の結果から, gPLNP@F127-FA は葉酸受容体を介したエンドサイトーシス機構によって細胞内部に取り込まれることが判明した。

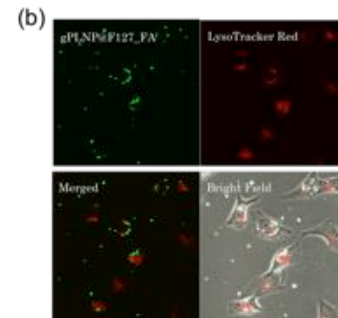


図 5. (b) LysoTracker Red との共染色画像

また, 細胞内からの発光は無励起光下においても確認でき, 「癌細胞の無励起光イメージング」を達成した (図 5c)。

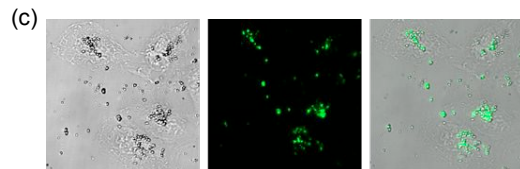


図 4. (c) gPLNP@F127-FA を取り込んだ HeLa 細胞の無励起光イメージング

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)

[学会発表] (計 3 件)

多喜正泰・西真弓・石田昭人・田部勢津久
長残光蛍光体ナノ粒子を用いた光バイオイメージング

第 54 回日本組織細胞化学会

航空会館, 2013年9月27日

多喜正泰・谷口暢子・西真弓・篠田達昭・上
田純平・石田昭人・田部勢津久・山本行男
長残光蛍光体ナノ粒子を用いた無励起光 in
vitro および in vivo イメージング
第8回日本分子イメージング学会
横浜赤レンガ倉庫, 2013年5月30-31日

谷口暢子・多喜正泰・山本行男
細胞表面タンパク質への特異的な結合特性
を有する長残光蛍光体ナノ粒子の開発
日本化学会第94春季年会
名古屋大学, 2014年3月27-30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命
分子研究所・准教授

研究者番号: 70378850