

有機シリカナノ粒子の作製と応用

Preparation and Application of Organosilica Nanoparticles

中村 教泰
Michihiro Nakamura

山口大学大学院医学系研究科器官解剖学

要旨 ナノテクノロジーを応用した新しい顕微観察技術として、我々は新規な機能性ナノ粒子である有機シリカナノ粒子を開発し医学生物学的研究を進めている。本稿では蛍光有機シリカナノ粒子をマクロフェージの取り込み能の解析に応用し、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡観察による新たな観点から機能的、形態学的特徴を評価することに成功したので紹介する。今後、ナノ粒子のさらなる多機能化により顕微観察技術に新たな展開をもたらすことが期待できる。

キーワード：有機シリカナノ粒子，蛍光ナノ粒子，蛍光顕微鏡，電子顕微鏡

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの様々な分野への応用が進められている。顕微観察においてナノ粒子などのナノ構造体を活用することのメリットとして、ナノ構造体の内部に大量の機能性分子を含有させる高機能化や複数種類の機能性分子を含有させることによる多機能化が挙げられる。さらにナノ構造体の大きさや形あるいは表面構造などの物理化学的な因子に依存した、ナノ構造体の生体内並びに細胞内での分布の特徴が明らかになりつつある。特にナノ粒子の医薬品としての応用についてはEPR効果(Enhanced Permeation and Retention Effect)^{1,2)}と呼ばれる優れた特性が知られている。それはがん組織において血管とリンパ管の組織学的特徴から特定の大きさ(50~200 nm)のナノ粒子が正常組織に比べてがん組織により高度に集積する効果である。この効果はドラッグデリバリーシステムなどのがん治療やその診断において大きなメリットとなる。また顕微観察を含むイメージングや画像診断についてもナノ粒子の応用が進められつつある。酸化鉄ナノ粒子は核磁気共鳴画像法(MRI)の造影剤として実際に臨床現場で使用されている。またカドミウム・セレンなどで構

成される蛍光ナノ粒子の量子ドットは市販され研究用試薬として応用されている。その他、金ナノ粒子やシリカナノ粒子なども診断や治療への応用が進められている。

2. 有機シリカナノ粒子の特徴と作製

シリカナノ粒子は簡単・安全に作製できると共に様々なサイズの粒子の調製が可能であり、生体親和性が高いなど多くの有用性を有している。しかし、従来から使用されている(無機)シリカナノ粒子の粒子表面はシラノール基が存在するのみで粒子の多機能化は必ずしも容易ではなかった(図1左)。我々は従来とは異なる有機シリカ化合物を唯一の材料として新規な有機シリカナノ粒子の作製に成功した^{3~7)}。有機シリカナノ粒子は作製した時点で表面ならびに内部にチオール基などの官能基を持つという特性がある(図1右)。

有機シリカナノ粒子は一段階の反応で、サイズ制御および分散性の良好なものが作製できる。粒子の合成反応においては触媒としてアンモニアを用いる。(3-メルカプトプロピル)トリエトキシシランなどの有機シリカ化合物が加水分解された後、縮合反応が起こり粒子が形成される。サイズ制御については数十ナノメートルから数マイクロメートルまでサイズ分布の整った粒子の作製法を確立している。粒子の表面電荷は材料の有機シリカ化合物の官能基に依存しており、官能基がチオール基の場合は陰性であることに加えて、(無機)シリカナノ粒子の電荷と比較してより陰性度が高く、分散性も良好であった。また官能基がエポキシ基の場合は陽性電荷の粒子が得られている。このように合成に用いる有機シリカ化合物により様々な電荷をもった粒子の作製が可能である。

有機シリカナノ粒子は機能性物質を粒子内部に含有させる内部機能化ならびに表面に結合させる表面機能化により多機能化が可能である。実際に粒子内の官能基を活用して様々な蛍光色素^{7~9)}や金属イオン、機能性ナノ粒子^{10~12)}などを粒子内に取り込ませ蛍光ナノ粒子など多機能化有機シリカナノ粒子の作製に成功している。

ここでは蛍光プローブとして応用する目的で作製した、蛍

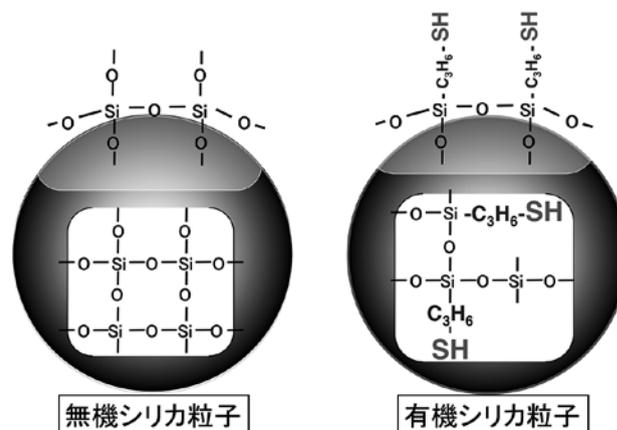


図1 シリカ粒子の分子構造の模式図

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
TEL: 0836-22-2201; FAX: 0836-22-2203
E-mail: nakam@yamaguchi-u.ac.jp
2017年8月15日受付, 2017年9月30日受理

光色素のローダミン B を内部に含有する蛍光有機シリカナノ粒子について詳しく説明する。ローダミン B は粒子合成液に加えて反応させることにより粒子内部に効率よく取り込まれた (図 2A)¹³⁾。作製した粒子を透過型電子顕微鏡で観察したところ直径は約 100 nm であり (図 2B), さらに動的光散乱法で測定したところ, 粒子サイズの分布の変動係数は 9.9% であった (図 2C)。

蛍光有機シリカナノ粒子の蛍光機能についての評価結果を図 3 に示す。粒子含有液をカバーガラス上に塗布したあと乾燥し, 蛍光顕微鏡で観察を行った。CCD カメラの観察によって直径約 100 nm の粒子の一粒検出が可能であった (図 3A)。また, 乾燥せずに粒子含有液の状態を観察した場合

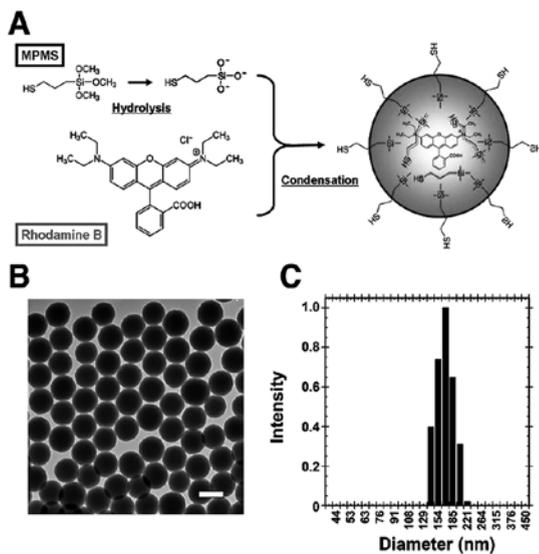


図 2 蛍光有機シリカナノ粒子の作製と材料学的評価。文献 13) より改変。

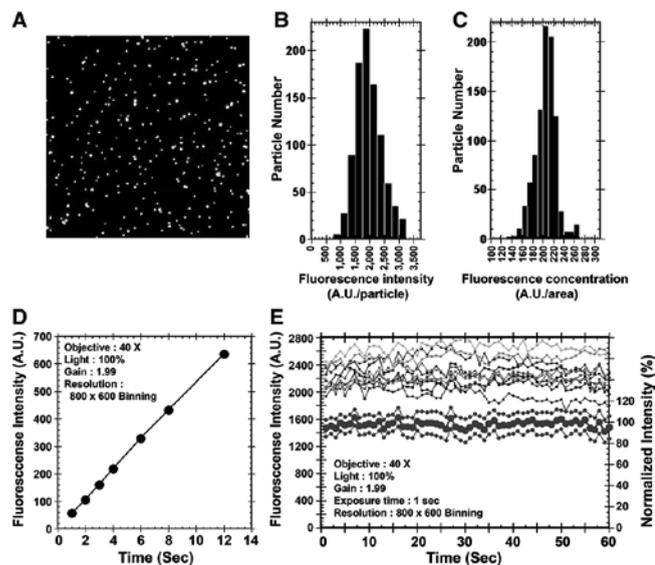


図 3 蛍光有機シリカナノ粒子の蛍光特性評価。文献 13) より改変。

は, 一粒子の検出が可能であると共に粒子のブラウン運動の撮影も可能であった。粒子の蛍光強度の均一性を評価するため一粒子の蛍光強度 (Fluorescence intensity (A.U.)) (図 3B) と粒子の蛍光面積当たりの蛍光強度 (図 3C) を測定し, 各強度の分布を計測した。変動係数はそれぞれ 26.3% と 10.6% であり, 粒子の蛍光強度も均一であった。さらに粒子の蛍光強度と露光時間の相関を評価したところ比例関係が認められた (図 3D)。これらの結果から露光時間の短い観察条件においても一粒子の蛍光強度を推定しうることが示唆された。すなわち, 単一細胞または単一細胞内小器官の蛍光強度を露光時間の短い観察条件で計測しても, 同じ観察条件の一粒子の蛍光強度から, その部位に存在する粒子の個数を推定できると考えた。また, 蛍光安定性の評価結果を (図 3E) に示している。励起条件下で 60 秒の連続観察を行っても蛍光強度の低下は認められなかった。以上より, 蛍光有機シリカナノ粒子は均一な大きさと安定した蛍光強度を持つことが確認できた。

3. 有機シリカナノ粒子の応用

我々は有機シリカナノ粒子の医学生物学的应用を進めており¹³⁻¹⁶⁾, 上述したように有機シリカ構造内に大量に蛍光色素を含有させて蛍光特性の高機能化に成功したものが蛍光有機シリカナノ粒子である。これは従来の蛍光色素や蛍光タンパク質と比較して高輝度であると共に蛍光安定性が高いなどの優位性を持っている。本粒子を用いた蛍光イメージングにおいて, 細胞膜上のタンパク質の分子追跡, *in vivo* や *in vitro* における細胞の粒子取り込みのリアルタイム観察, 腫瘍組織の *in vivo* と組織切片での同時連続観察が可能なマルチカラー蛍光イメージング等に成功している。ここでは粒子を用いたマクロファージの取り込みに関する研究を紹介する。

図 4 は, 蛍光有機シリカナノ粒子を用いてマクロファージの取り込みをタイムラプスイメージングにより評価した結果を示している。培養したマウス腹腔マクロファージに粒子を添加し経時的に撮影を行った。図 4 上段は 0, 4, 8, 12 時間後のマクロファージの蛍光を示している。細胞が粒子を取り込んだ結果, 細胞からの蛍光が次第に増大する様子が観察できる。次に各細胞の蛍光強度を測定し, グラフ化したところ (図 4 下段), 細胞毎に粒子の取り込み速度などが異なりマクロファージの取り込みの不均一性が確認できた。なお, 本実験における蛍光観察条件においては本蛍光ナノ粒子の蛍光強度の低下は認められなかった。さらに単一細胞の蛍光強度と共に, 単一細胞が含有する粒子の個数 (Particle unit) としてより定量的な評価が可能であった。粒子の個数による定量化は, 複数種類の蛍光ナノ粒子が細胞内に取り込まれる現象を定量化するのに極めて有用である。

次に細胞内に存在する小胞内の蛍光についての経時変化をタイムラプスイメージングで観察, 評価した。粒子添加 15 分後のマクロファージにおいて粒子蛍光を示す小胞が複数観察できた (図 5A)。白四角の範囲について小胞の形成過程を確認したところ 9, 12, 13.2 分後に白矢印で示す複数の小胞が融

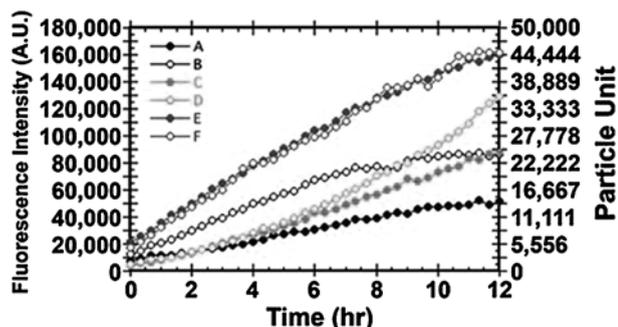
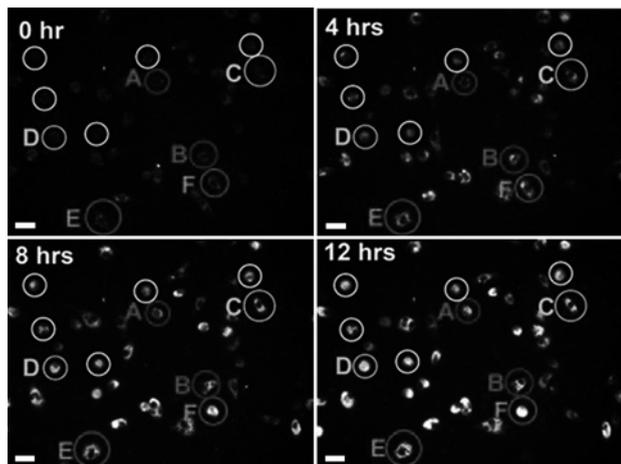


図4 蛍光ナノ粒子を用いたマクロファージの取り込みのタイムラプスイメージングと単一細胞解析. 文献13)より改変.

合している様子が確認できた (図5B). さらにその小胞の蛍光強度を測定して小胞の蛍光の経時変化を定量的に評価した結果, 小胞が融合するのに伴い蛍光強度が急激に上昇するという相関現象が認められた. これらの結果から, 蛍光有機シリカナノ粒子を用いることにより, マクロファージの取り込み能について単一細胞あるいは単一小胞レベルで明確に観察できると同時に定量的な評価も行えることが判明した.

さらにタイムラプスイメージングで観察した細胞を処理し, 電子顕微鏡観察を行った (図6). 走査型電子顕微鏡観察においては粒子を添加していない細胞 (SEM-1) と比較して粒子を添加した細胞 (SEM-2) では細胞表面に結合する粒子の分布が確認できた. また透過型電子顕微鏡観察 (TEM) においては小胞内に存在する粒子が観察できた. これらの結果から本蛍光ナノ粒子の使用によりマクロファージの取り込み過程の動的評価に加えて細胞表面と内部に存在する粒子の超微形態観察が連続的に示された.

図7は陽性の表面電荷を持つ有機シリカナノ粒子を腹腔マクロファージに取り込ませたのち, 透過型電子顕微鏡観察を行ったもので, 細胞内部に多数の粒子が観察できる (図7a). 粒子の細胞内局在を検討したところ, 小胞内に複数 (図7b) もしくは一つの粒子 (図7c) が存在するものが確認できた. また図7dに示す様に粒子周辺に小胞膜が明確に観察できないもの (左側) や小胞膜が不連続なものを (黒矢尻) が認め

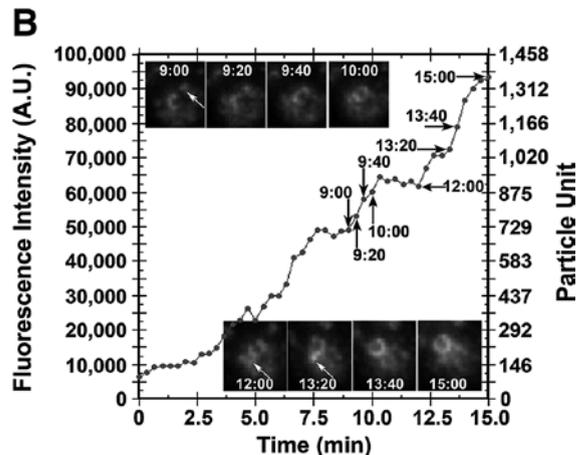
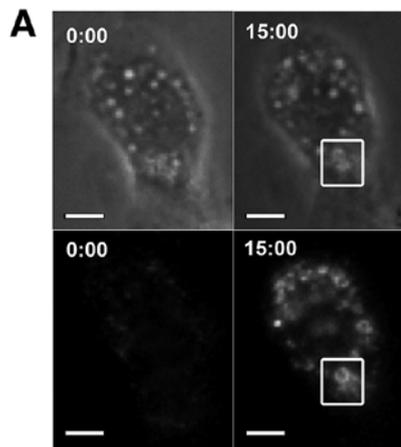


図5 マクロファージの蛍光ナノ粒子の取り込みにおけるタイムラプスイメージングと単一小胞解析. 文献13)より改変.

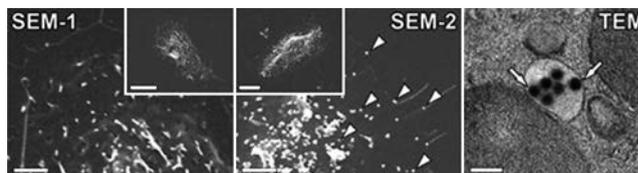


図6 蛍光ナノ粒子を取り込んだ細胞の電子顕微鏡観察. 文献13)より改変.

られた. これらの所見は粒子表面の陽性電荷によるプロトンスポンジ効果に起因した, 粒子のエンドソーム脱出と小胞膜の崩壊をとらえた所見と考えられる. これらの結果が示すように蛍光機能と有機シリカ構造による電子吸収能を持つ蛍光有機シリカナノ粒子の使用により蛍光顕微鏡並びに電子顕微鏡観察において機能的かつ詳細な形態学的評価が連続的に可能になることが明らかになった.

4. まとめと今後の展望

ナノテクノロジーの応用により顕微鏡観察技術に新たな展開が始まっている. 有機シリカナノ粒子は優れた多機能性を有し, 様々なイメージングやナノ医療など医学生物学的应用が進められている. これまで述べてきたようにマクロファージ

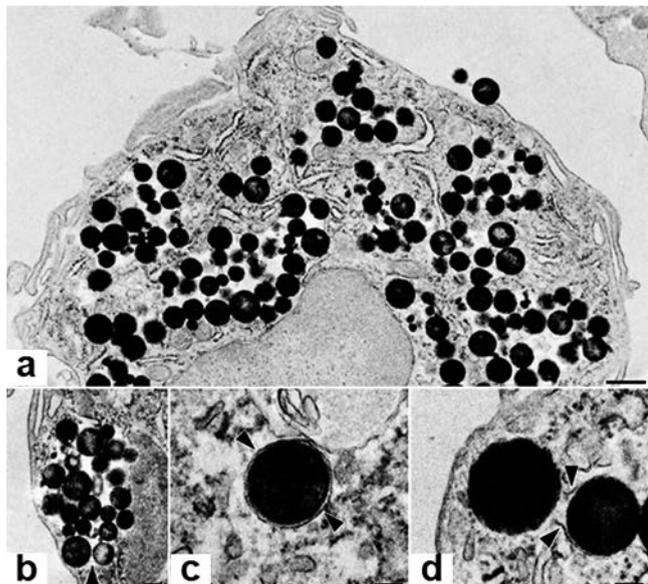


図7 蛍光ナノ粒子の細胞内分布の電子顕微鏡観察. 文献5)より改変.

の取り込みに関して有機シリカナノ粒子による機能的・形態学的研究が進められており、その多様性や特異性についての展開が期待できると考えている。

今後の展望としては、ナノ粒子の物理学的、生物学的特性を活用した顕微鏡法の大きな展開が期待できる。例えば光電子相関顕微鏡法 (Correlative light and electron microscopy: CLEM) や超解像顕微鏡など新たな顕微鏡への応用によりナノスケールの精密な解析が可能になって新たな生命現象の可視化や解明につながる可能性がある。また、こうした顕微鏡観察技術の展開を基盤として新しい医療技術の開発も期待できる。米国ではポジトロン・エミッション・トモグラフィ (Positron Emission Tomography: PET) において腫瘍組織の画像診断に用いる新しい造影剤として (無機) シリカ粒子の臨床試験が進められ、安全性と有用性について良好な結果が報告されている^{17,18)}。また診断と治療を一体化したセラノスティックスと呼ばれる新たな医薬品の概念が提唱され開発が進められている。有機シリカナノ粒子についても多機能化能を活用して、MRI や近赤外蛍光イメージングなどの画像診断機能と光線力学的治療やドラッグデリバリーなどの治療機能の一体化を実現したセラノスティックス有機シリカナノ粒子の開発が進行しており、今後の実用化が期待されている。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費 (21500409, 25350530, 16K01358), 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 大学発事業創出実用化研究開発事業, 科学技術振興機構 (JST) 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) 顕在化タイプ並びに探索タイプにより実施された。

文 献

- 1) Matsumura, Y. and Maeda, H.: *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986)
- 2) Maeda, H.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **91**, 3–6 (2015)
- 3) Nakamura, M. and Ishimura, K.: *J. Phys. Chem. C*, **111**, 18892–18898 (2007)
- 4) Nakamura, M. and Ishimura, K.: *Langmuir*, **24**, 5099–5108 (2008)
- 5) Nakamura, M. and Ishimura, K.: *Langmuir*, **24**, 12228–12234 (2008)
- 6) Nakamura, M.: in Kumar, Challa S.S.R. (Ed.), *Nanostructured Oxides*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 109–161 (2009)
- 7) Nakamura, M., Ozaki S., Abe M., Doi H., Matsumoto T. and Ishimura K.: *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **79**, 19–26 (2010)
- 8) Nakamura, M., Awaad, A., Hayashi, K., Ochiai, K. and Ishimura, K.: *Chem. Mater.*, **24**, 3772–3779 (2012)
- 9) Nakamura, M.: *Nanotechnol. Rev.*, **1**, 469–491 (2012)
- 10) Nakamura, M., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T. and Ishimura, K.: *J. Mater. Chem.*, **21**, 4689–4695 (2011)
- 11) Nakamura, M., Hayashi, K., Kubo, H., Kanadani, T., Harada, M. and Yogo, T.: *J. Colloid Interf. Sci.*, **492**, 127–135 (2017)
- 12) Nakamura, M., Hayashi, K., Kubo, H., Harada, M., Izumi, K., Tsuruo, Y. and Yogo, T.: *Sci. Rep.*, **7**, 3953 (2017)
- 13) Nakamura, M., Miyamoto, K., Hayashi, K., Awaad, A., Ochiai, M. and Ishimura, K.: *Nanomedicine: NBM*, **9**, 274–283 (2013)
- 14) Awaad, A., Nakamura, M. and Ishimura, K.: *Nanomedicine: NBM*, **8**, 627–636 (2012)
- 15) Awaad, A., Nakamura, M. and Ishimura, K.: *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 1423–1439 (2012)
- 16) Nakamura, M., Hayashi, K., Nakano, M., Kanadani, T., Miyamoto, K., Kori, T. and Horikawa K.: *ACS nano*, **9**, 1058–1071 (2015)
- 17) Ben Ezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., Wolchok, J., Larson, S.M., Wiesner, U. and Bradbury, M.S.: *J. Clin. Invest.*, **121**, 2768–2780 (2011)
- 18) Phillips, E., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Carvajal, R.D., Mohan, P., Ye, Y., Humm, J., Gönen, M., Kalaigian, H., Schöder, H., Strauss, H.W., Larson, S.M., Wiesner, U. and Bradbury, M.S.: *Sci. Transl. Med.*, **6**, 260ra149 (2014)