

図 1-5-5 マウス内がん細胞の 1 分子可視可の研究

- (上左) 生きたマウスのがん細胞の中を運動する単一量子ドットの結合した抗体の運動の軌跡。イメージは共焦点顕微鏡を用いて、ビデオレートで撮影された
- (上右) 左図を拡大図したもの
- (下) 軌跡を元に速度を計算した

の強力な手法になりうることを示した。

7 むすび

近年の生命科学のイメージング分野は、光学顕微鏡をベースとして、材料・光学・撮像・画像処理の技術が導入されて発展をとげている。しかし、生命の限られた環境で利用できる技術はごくわずかである。人を含めた個体をあつかう医学分野では、細胞や組織による「光の吸収」や「自家蛍光」の問題があり、これらに利用するためには数々の改良が必要である。たとえば、内視鏡と蛍光顕微鏡を組み合わせる（一部はすでに利用されている）、2光子励起法を利用して深部をイメージングする、波長を赤外にする、などが近い将来実用化するであろう。これら以外に、現代の方法では考えられていない研究によって、光の吸収や自家蛍光を抑える方法が現れることを期待したい。

[執筆者プロフィール]

ひぐち ひでお

1983年早稲田大学大学院理工学研究科物理学および応用物理学専攻修士課程修了。同年東京慈恵会医科大学第1生理学教室助手。89年ペンシルバニア大学医学部助手兼任。92年科学技術振興事業団柳田プロジェクト・グループリーダー。97年東北大学大学院工学研究科金属工学専攻助教授。2004年より東北大学先進医工学研究機構教授。理学博士。現在の研究テーマは、タンパク質、細胞、マウスの単一分子のナノ計測、ナノイメージング

おおうち のりあき

1978年東北大学医学部卒。84年東北大学大学院医学研究科卒・医学博士。84年アメリカ国立がん研究所研究員。87年仙台市立病院外科医長。88年東北大学医学部助手。95年東北大学医学部講師。99年東北大学医学部教授。2002～4年東北大学病院副院長を兼任。研究・専門テーマは腫瘍学、乳腺・内分泌外科、分子生物学、がん疫学、ナノメディシン

[参考文献]

1. Medical Bio 2007年 11月号「がんの光イメージング」
2. 小島清嗣, 岡本洋一編, 医学・生物学研究のための画像解析テキスト, 羊土社
3. 山本重夫 監, 「量子ドットの生命科学領域への応用, CMC出版
4. 横山浩 編, ナノ材料科学, オーム社 (2004)
5. 小川誠二, 上野照剛 監修, 非侵襲・可視化技術ハンドブック, NTS出版 (2007)
6. J.R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999)
7. S. Inoue, K.R. Spring 著, ビデオ顕微鏡, 共立出版 (2001)
8. 野島博 編, 顕微鏡の使い方ノート, 羊土社 (1997)
9. Barry R. Masters: Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy, SPIE, Washington (2006)
10. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: Nature 374 (1995) 555-559
11. 鳥羽菜, 渡辺朋信, 樋口秀男, ナノメートル計測が拓く1分子の世界 バイオテクノロジージャーナル, 羊土社 (2006) 600-604
12. S. Toba, T. M. Watanabe, L. Yamaguchi, Y. Y. Toyoshima and H. Higuchi: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103, 5741-5745, 2006
13. M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss & A. P. Alivisatos: Science 281 (1998) 2013-2016
14. T.M. Watanabe, T. Sato, K. Gonda and *H. Higuchi. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in a living cell using dual-focus imaging optics. Biochem. Biophys. Res. Comm. 359 (2007) 1-7
15. T.M. Watanabe, . and *H. Higuchi. Stepwise Movements in Vesicle Transport of HER2 by Motor Proteins in Living Cells. Biophysical J. 92 (2007) 4109-4120
16. S. Li-Shishido, T. M. Watanabe, H. Tada, *H. Higuchi and N. Ohuchi. Biochem. Biophys. Res. Comm. 351 (2006) 7-13
17. X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. Chung and S. Nie: Nat. Biotechnol. 22 (2004) 969-976
18. Tada, H., *H. Higuchi, T.M. Watanabe, and N. Ohuchi. In vivo Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice. Cancer Res. 67 (2007) 1138-1144

第10章 蛍光特性ナノ粒子の表面修飾

佐々木隆史*¹, 名嘉 節*², 大原 智*³, 阿尻雅文*⁴

1 背景

蛍光イメージングに用いられるCdSe/ZnSeなど高輝度蛍光量子ドット(QD)は、量子効率がきわめて高いことや粒子サイズによる蛍光波数(蛍光色)の制御が出来ることなどから、医療およびバイオサイエンスにおいて広く用いられている。さらに、生体親和性、標的分子・組織指向性付与技術に関して精力的に研究開発が進められている。QD以外では、酸化物など化学的に安定なマトリックスに希土類元素を導入したナノ粒子の研究開発も行われている。生体のバックグラウンド蛍光による干渉を避けるために、近赤外発光する蛍光ナノ粒子や、励起光に近赤外域を用いるアップコンバージョン法など従来とは異なる新しい材料および観測法の開発も行われている¹⁾。

一方、生体中のがんなどの特定の生体組織や分子を認識するような機能を付与する研究が行われているが、このような先進的な特定分子指向性をもたせた量子ドットや蛍光ナノ粒子を開発するに当たり、次のような未解決の技術的な課題がある。

1) 生体イメージング中の化学的安定性を得る技術

無機ナノ粒子からの金属イオン溶出は、生体への毒性が懸念されるばかりではなく、無機ナノ粒子の有する蛍光などの機能特性を著しく変えてしまう。無機材料を用いる場合は結晶性が良く水中でも化学的に安定なナノ粒子(結晶)の合成法を確立する必要がある。

2) QDおよび酸化物などの蛍光ナノ粒子に生体親和性や官能基を表出させる技術

例えば、PEGなど生体親和性の高い高分子の末端に官能基を表出させたものを用いることが

*1 Takafumi Sasaki 東北大学 多元物質科学研究所 融合システム研究部門 プロセスシステム研究分野 博士後期課程

*2 Takashi Naka 東北大学 多元物質科学研究所 融合システム研究部門 プロセスシステム研究分野 准教授

*3 Satoshi Ohara 東北大学 多元物質科学研究所 融合システム研究部門 プロセスシステム研究分野 助教

*4 Tadafumi Adschiri 東北大学 多元物質科学研究所 融合システム研究部門 プロセスシステム研究分野 教授

報告されているが、もともと凝集している無機ナノ粒子を分散させることが困難であると同時に、物理・化学吸着による表面修飾の工程は煩雑であり、その修飾状態の安定性は低い。

3) 特定分子・組織指向性をもたせるためのサイズコントロールおよび抗体等を結合させる技術

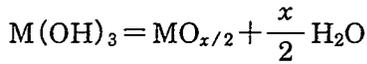
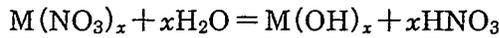
がん組織中にある血管の物質透過性の高さを利用して、ナノ粒子のサイズをコントロールすることにより、がん細胞へのイメージングプローブ導入を行うパッシブな方法がある。一方、QDや無機ナノ粒子表面に親水性有機分子や抗体を結合させて、抗原抗体間の相互作用を利用してターゲット組織や分子に選択的な指向性を持たせる方法があり、現在盛んに研究が行われている。しかし、ナノ粒子への結合後に抗体などの生体機能が失われるなど技術的な問題は多い。

したがって、QDやナノ粒子を有機分子で表面修飾することにより表面を安定化すると同時に、有機-無機材料をハイブリッド化し、これまでに無かった新しい機能・特性を付与する技術の確立が不可欠である。上記1)から3)の技術的な課題への取り組みとしては、Riegler等のCdS/ZnS量子ドットにRNAを高活性状態のまま結合させたRNA-QDの成功例がある²⁾。彼らはそのRNA-QDを用いて植物のシロイヌナズナで特定の組織観察にも成功している。また、最近では量子ドットにGd錯体を固定化させ、核磁気共鳴画像(MRI)で特定の部位のコントラストを高める能力を付与したマルチイメージング粒子の開発も行われている³⁾。他にも各種ナノ粒子を複合化したイメージングプローブとしては、蛍光色素分子-磁気(鉄酸化物)ナノ粒子⁴⁾やQD-磁気(鉄酸化物)ナノ結晶ヘテロ接合構造体⁵⁾などがある。蛍光とMRI感応能を併せ持つこれらのイメージングプローブは、術前における診断(MRI)および術中での患部の可視化(蛍光)に用いることができるという利点がある。しかし、有機プローブを固定化した無機粒子の作製には、煩雑な行程が必要となる。また、有機プローブが存在することで、粒子表面へのタンパク質等の固定化を阻害しかねない。さらに、有機蛍光体自体の低い安定性(退光)も、長時間イメージングに不向きである。ヘテロ接合体に関しては、構造体の作成法が確立されておらず、また構造体自体のサイズ制御も困難である。

以下では、まず始めに超臨界水熱場を利用したナノ粒子合成法について述べた後、上記の問題点を解決することが可能な無機ナノ結晶材料および*in-situ*表面修飾法を解説する。

2 超臨界水熱法によるナノ粒子合成

金属塩の溶けた水溶液に熱をかけていくと、金属塩から水酸化物あるいは酸化物が形成される方向に平衡がシフトする。総括の反応式は、以下のようになり、金属塩の加水分解・脱水反応と考える事が出来る。この平衡のシフトを利用して、種々の酸化物粒子を合成する手法を水熱合成という。



この水熱合成の反応場として用いる超臨界水の特異的な性質の一つに、誘電率が極端に低いということがある。図1に、誘電率の温度・圧力依存性を示す。極性溶媒である水の室温下における誘電率は約80であり、これが電解質を溶解させる要因である。しかし、この誘電率は温度上昇とともに低下し、臨界点近傍では2～10程度と極性有機溶媒と同程度の値となる。この小さな誘電率が、粒子合成の際に大きな過飽和度を得ることを可能にしており、超臨界水場がナノ粒子合成に適している事を示している。

また、誘電率が低くなるということは、通常では水と2相分離してしまう有機溶媒と均一相をとることを可能にする。水の臨界点近傍での水-有機物質2成分系の相挙動を図2に示す。極性溶媒である水は、トルエン等の無極性溶媒とは混じり合う事が無いが、高温高压の状態では均一相を形成する。これは、高温場で水の誘電率が極性有機溶媒程度にまで低下し、「水らしさ」が失われるためである。

以上の事から、超臨界水は、①ナノ粒子合成および②有機分子による粒子表面改質を同時に行う事が出来る場であるということが分かる (図3)。

我々はこれまで、超臨界場を利用した種々のハイブリッドナノ粒子の合成に成功してきた。その結果、図4の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像に示すようなシングルナノサイズのセリア (CeO₂) ナノ粒子合成に成功している。また、ヘキサ酸とハイブリッド化したこの粒子の表面は、疎水

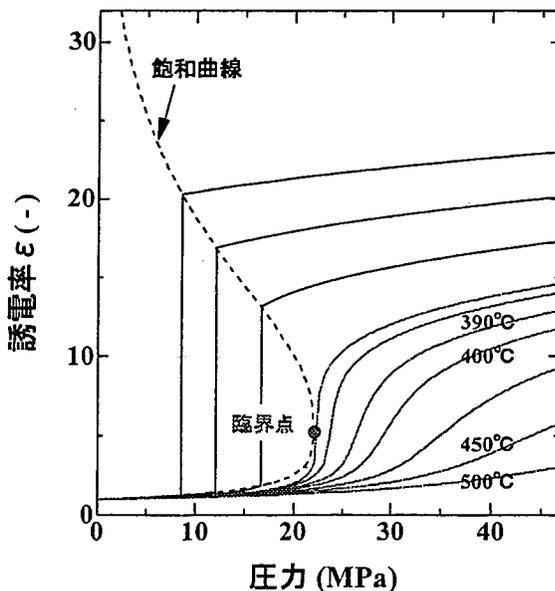


図1 水の誘電率の温度・圧力依存性

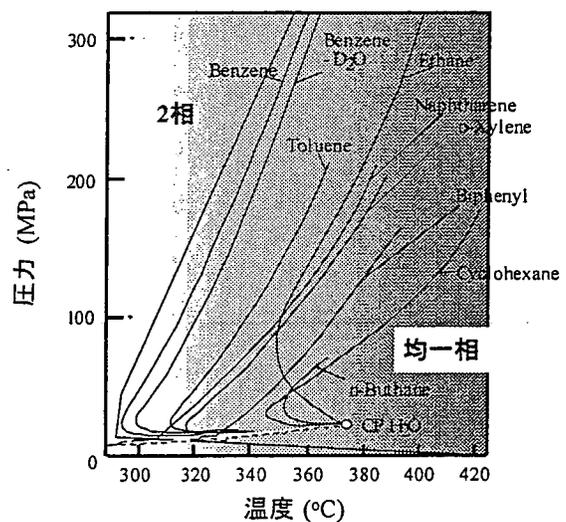
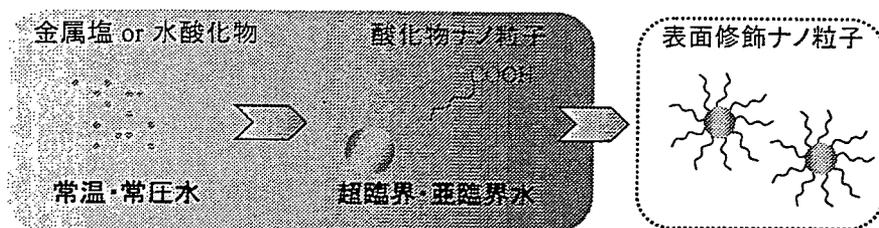


図2 水と炭化水素の2成分系の相挙動

図3 超臨界水熱合成・*in-situ*表面修飾の模式図

的であるために有機溶媒中に透明に分散する事も可能である(図4挿入図)。セリア以外にも、チタニア(TiO_2)やマグネタイト(Fe_3O_4)等の様々な酸化物ナノ粒子のハイブリッド化に成功している^{6, 7)}。

ここでは、希土類などの蛍光元素のドーピングされる母体(マトリックス)結晶として有望な希土類金属酸化物ナノ粒子や核磁気共鳴断層撮影(MRI)の増感剤(contrast agent)に応用可能な磁気酸化物ナノ粒子の超臨界水熱合成と*in-situ*表面改質について紹介する。

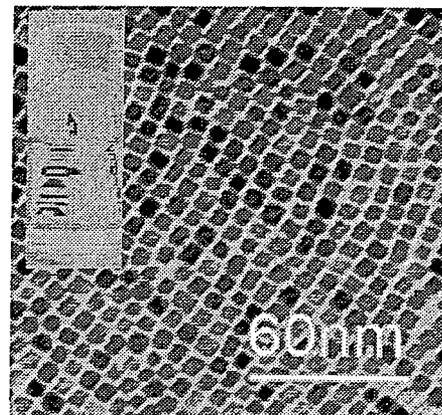


図4 ハイブリッドセリアナノ粒子のTEM像と溶媒分散写真

3 酸化物ナノ粒子の超臨界水熱合成と*in-situ*表面修飾

3.1 酸化物ナノ粒子の合成

粒子作製には、図5に示した流通式超臨界水熱合成装置を使用した。本装置のライン作製には、ステンレスを用いた。本装置では、高压送液ポンプにより供給された金属塩水溶液といった出発原料を、別のラインから高温電気炉で加熱して得られた超臨界水と接触できる。そのため、反応溶液は急速に超臨界状態にまで昇温され、超臨界水中で水熱合成が可能である。また、反応時間は数十ミリから数十秒の範囲でコントロール可能であり、反応後は外部冷却で急冷される。このように、流通式装置では昇温および冷却過程の影響を小さくすることが可能であり理想的な水熱合成が実現することができる。合成した粒子は、装置に取り付けたフィルターで回収され、フィルターを通過したものは、粒子分散液として回収し減圧濾過により粒子を捕集できる。反応溶液として、各種金属塩を含む水溶液を調整した。

伯田等の先駆的なナノ粒子合成プロセスに関する研究開発では、YAG($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$)および希土類元素TbをドーピングしたYAG:Tbナノ粒子の合成に成功している⁸⁾。蛍光元素およびイットリウムを他の希土類で置き換えた母結晶相の組み合わせにより、蛍光色や時間などの発光特性を変化させることができる。我々が合成した粒径が10nmのEuドーピングした酸化物ナノ粒子に紫外光

(波長312nm)を照射すると、赤色に発光することを確認した(図6)。この粒子の蛍光スペクトル(励起波長320nm)は波長618nmに最も強い蛍光を示している。

また、水中におけるEuドープした酸化物ナノ粒子と市販の量子ドット(CdSe@ZnS, 粒径5nm)の紫外線(波長:365nm)に対する安定性を評価した。紫外線を照射し続ける事でQDの蛍光強度は減少し続け、およそ40時間後には強度が半分まで減少した。これは、QDが分解したために生じたものと考えている。一方で、

Euドープ酸化物ナノ粒子の蛍光強度は、80時間に渡って紫外線を照射し続けても減少する事はなかった。このことは、水中で酸化物ナノ粒子はQDよりも遙かに安定である事を示している。

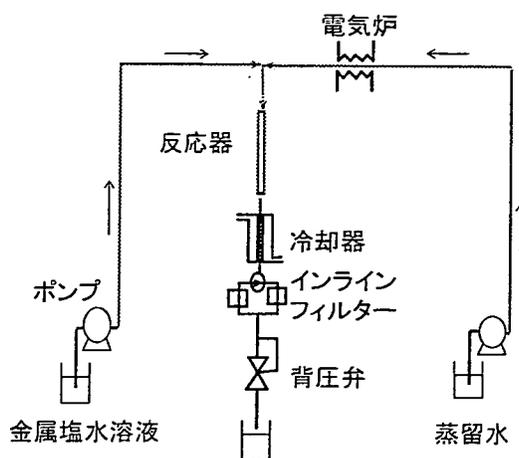


図5 流通式超臨界水熱合成装置の模式図

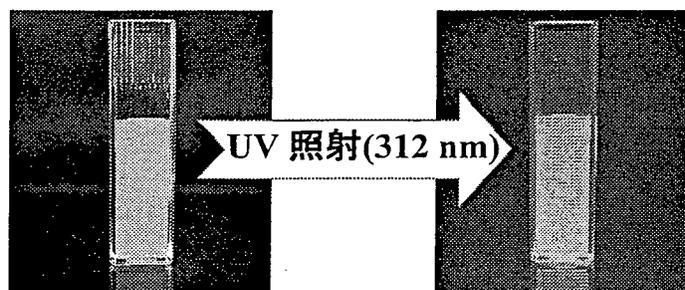


図6 Euをドープした金属酸化物ナノ粒子の発光挙動(カラー口絵参照)

3.2 有機分子による *in-situ* 表面修飾

上述したように無機ナノ粒子の水熱合成中に有機物を共存させて無機ナノ粒子の合成と同時にその表面を有機分子により修飾する技術が *in-situ* 表面修飾法である(図3)。熱水中では金属塩の加水分解・脱水反応により金属酸化物結晶の核が発生する。溶解再析出により結晶が成長する過程において、有機分子と無機結晶表面に共有結合的な結合を形成させることができる。それと同時に無機結晶面と有機分子の相互作用により粒径や結晶形状も制御できる。修飾分子としてオレイン酸やデカン酸を用いた *in-situ* 表面修飾についてセリア(CeO_2)の結果を紹介しよう⁹⁾。ナノ粒子への表面修飾を行うにあたり、有機分子の粒子表面への結合能について回分式反応実験により検討した。また、合成した粒子に対してFT-IRによる評価を行った結果、表面修飾した粒子には、有機物由来のスペクトルを観測することができる。また、結合する有機分子の量や結合強度を見積もるために、熱天秤および示差熱分析(TG/DTA)を測定した。有機分子の沸点

(約290℃) より高い400～500℃で急激な重量変化と熱量変化が観測されている。以上のことから、結晶面と有機分子間には物理・化学吸着よりも安定で強い結合が形成されていることが示唆される。図7に、トルエン中に0.5重量%のハイブリッドセリアナノ粒子の分散液を示す。この分散液は、透明でナノ粒子は完全に近い状態で分散していることがわかる。事実、動的光散乱法で測定した溶液中の粒子の粒径はハイブリッドナノ粒子の粒径に近い値であった。つまり、溶液中でハイブリッドナノ粒子は擬似的な分子として溶解しているのである。

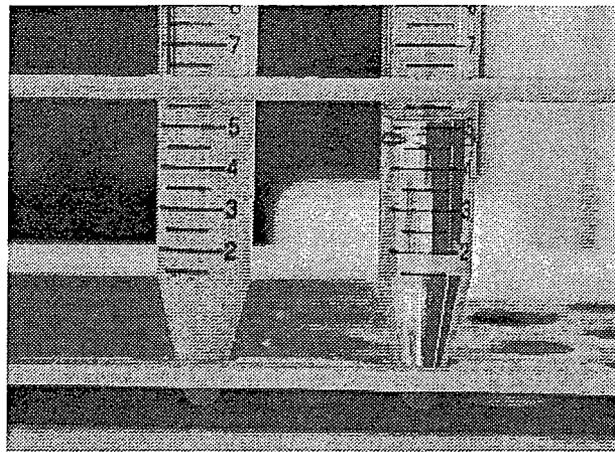


図7 溶媒（トルエン）中のナノ粒子の分散挙動
左は表面修飾しないナノ粒子，右はデカン酸による表面修飾ナノ粒子の場合。

以上の結果は、表面を疎水的な有機分子で修飾した例であるが、バイオイメージングで必要になる親水的な有機分子による表面修飾についても超臨界・亜臨界水熱場を用いた*in-situ*表面修飾により実現できる見通しが立ってきている。親水性ナノ粒子表面を得ることと、さらにその表面にタンパク質等を固定化するためには、親水基と活性な官能基を同時に粒子表面へ提示する必要がある¹⁰⁾。そこで前述した結果を踏まえて、粒子表面へのNH₂提示を目指し、アミノ酸の表面修飾を試みた¹¹⁾。合成した粒子に対し、フーリエ変換赤外吸収分光法（FT-IR）を用いた評価により、アミノ酸のカルボキシル基が粒子表面に結合して固定化され、NH₂基が提示されている事が明らかとなっている。同様に、*in-situ*表面修飾法はタンパク質固定化やポリエチレングリコールに代表される生体親和性分子の固定化にも応用できる。

このように、有機-無機ハイブリッドナノ粒子は、そのユニークな構造や溶液中での分散挙動から「擬分子 (pseudo molecule)」として特徴付けられると考える。CdSなどのQDの生体中での不安定性・毒性を考慮すれば、従来のQDに代わる比較的安定な酸化物を母体とする蛍光ナノ粒子の開発は重要である。蛍光に限らず酸化物の持つ電気、磁気、誘電特性などバラエティーに富んだ材料（機能）を複合化する技術が確立すれば、異なるハイブリッドナノ粒子をブレンドし

第10章 蛍光特性ナノ粒子の表面修飾

たクラスター型イメージングプローブやDDSなどの開発へと発展させることができる。

文 献

- 1) K. Soga, *et al.*, *J. Photopolymer Sci. and Tech.*, **18**, 73-74 (2005)
- 2) J. Riegler, F. Ditengou, K. Palme, T. Nann, *Nature Mater.*, submitted.
- 3) Veiseh, O., C. Sun, *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 1003-1008 (2005)
- 4) Yang, H.S., S. Santra, *et al.*, *Adv. Mater.*, **18**, 2890-2894 (2006)
- 5) Kwon, K.W. and M. Shim, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10269-10275 (2005)
- 6) T. Adschiri, *et al.*, *J. Mater. Sci.*, **41**, 1445-1448 (2006)
- 7) T. Adschiri, *et al.*, *Adv. Mater.*, **19**, 203-206 (2006)
- 8) 伯田幸也, 博士論文 (2000年, 東北大学)
- 9) J. Zhang, *et al.*, *Adv. Mater.*, **19**, 203-206 (2006)
- 10) Cai, W., *et al.*, *Nano Lett.*, **6**, 669-676 (2006)
- 11) T. Sasaki, *et al.*, in preparation.