

## 論文の内容の要旨

論文題目 蛍光シリコンナノ粒子の細胞内動態制御による  
イメージング/DDSへの応用

氏名 太田 誠一

### 第1章 序論

ナノ粒子は、DNA に代表される生体分子やウイルスなどと同等のサイズを持つため、従来の材料と異なる新たな特性を示すことが期待され、バイオ・医療分野への応用が検討されている。中でも半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によってサイズに応じた様々な色の蛍光を示すことから、次世代のバイオイメージング材料として注目を集めている。半導体ナノ粒子には、従来の有機蛍光分子に比べて光褪色に対する耐性が高い点など、様々な利点がある。しかし一方で、今まで研究の中心であった CdSe や CdTe などの半導体ナノ粒子は、重金属を含むため生体毒性が強く、この毒性が実用化への大きな妨げとなっていた。

これに対し本論文では、シリコンのナノ粒子(Si ナノ粒子)に着目した。シリコンは、電子機器などに用いられている汎用的な半導体材料で、重金属を含まない。このシリコンをナノ粒子化することで、低毒性かつ優れた蛍光特性を兼ね揃えた、新規の蛍光材料を創出できると期待される。現在までに幾つかのグループが Si ナノ粒子の合成に成功しているが、細胞イメージングへの応用例はまだ少ない。さらに、細胞イメージングでは、蛍光材料が細胞内に移行する速度や細胞内で集積する部位(細胞内局在性)などの細胞内動態が、イメージングされる部位や標識時間などの特性を決める重要な因子となるが、Si ナノ粒子の細胞内動態についての検討は、いまだ報告されていない。

本博士論文では、粒子物性の異なる Si ナノ粒子を合成し、その細胞内動態を調べることで、材料設計による細胞内動態の制御を目指した。さらにこの細胞内動態制御を利用して、Si ナノ粒子を細胞イメージング及び Drug Delivery System(DDS)へと応用することを目的とした。

## 第2章 シリコンナノ粒子分散液の作製とコロイド化学的性質の制御

Si ナノ粒子は、四臭化ケイ素( $\text{SiBr}_4$ )を原料としたプラズマ CVD 法によって合成した。 $\text{SiBr}_4$ がプラズマ場で Si 原子の状態まで分解され、核発生・成長することで、粒子が生成される。TEM による観察及び EDX による解析から、直径 3~8 nm 程度の Si ナノ粒子が合成されていることが確認された。これらの粒子に励起光を照射すると、粒子は量子サイズ効果によって蛍光を示した。蛍光の波長は粒子の一次粒径によって異なるが、本論文ではこの中で、蛍光波長が 460 nm 付近のものを使用した。

合成された粒子は疎水性であるため、水系の溶媒中では容易に凝集してしまう。しかし、細胞イメージングなどに使用する際には、これを水に分散する必要がある。本論文では、化学結合による粒子表面へのアリルアミンの修飾、及び両親媒性ブロックコポリマー-F127 によるミセル内包化という二種類の方法で Si ナノ粒子の水分散化を試みた。その結果、いずれの方法を用いた場合でも、Si ナノ粒子が水に分散することが確認された。このとき、粒子は一次粒子の状態ではなく、ある程度の数の粒子が集まった集合体(凝集体)の形で分散していることが、TEM による観察と動的光散乱(DLS)による測定で確認されている。この集合体のサイズ(凝集径)は、水分散化のときに加える修飾剤(アリルアミン、F127)の量により、数十~数百 nm の範囲で制御が可能であった。また、粒子表面の $\zeta$ 電位を測定したところ、アミン修飾された粒子が 15~30 mV と正電荷を持つのにに対し、F127 修飾された粒子は 2~3 mV と、ほぼ電荷を持たない状態であることが確認された。

以上の検討により、Si ナノ粒子の合成、水分散化に成功した。また、水分散化の条件を変えることで、凝集サイズ、表面電位の異なる粒子を作製することができた。これらの粒子を用いて、次章以降で細胞内動態についての検討を行った。

## 第3章 シリコンナノ粒子の細胞内局在性の制御

本章では、Si ナノ粒子の細胞内局在性に対する、粒子物性(表面化学種、凝集サイズ)の影響について検討を行った。2種類の化学種(アリルアミンと F127)と2種類の凝集径(数十 nm と数百 nm)、計4種類の粒子を用いて、Si ナノ粒子の細胞内局在性を調べた。実験にはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用した。なお、細胞イメージングには、細胞を固定化して観察する場合と、生きたまま観察する場合の二種類が存在し、どちらを選ぶかで粒子の細胞内動態は大きく異なる。本論文では、固定化細胞、生細胞それぞれの場合について、細胞内局在性を検討した。

固定化された HUVEC を Si ナノ粒子とともにインキュベートし、共焦点顕微鏡で細胞内局在性を観察した結果、アミン修飾された Si ナノ粒子が負に帯電した DNA との静電相互作用によって細胞核に局在するのに対し、F127 修飾された粒子は細胞質内に広く分布することが明らかとなった。また、凝集サイズによる局在性の違いは確認されなかった。

これに対し、生細胞の場合、Si ナノ粒子の細胞内局在性は表面化学種だけではなく、凝集サイズによっても異なることが明らかとなった。アミン修飾された粒子はサイズに関係なくリソソームに局在化するのに対し、F127 修飾された粒子は、サイズの小さいものは小胞体(ER)、大きいものはリソソームにそれぞれ局在化することが分かった。阻害剤を用いた実験などにより、この細胞内局在性の違いは、粒子取り込みに用いられるエンドサイトーシス経路の違いによるものであることが示唆されている。

以上の検討により、Si ナノ粒子の表面化学種及び凝集サイズを制御することで、粒子を細胞核、細胞質、リソソーム、ER といった細胞内小器官に、選択的に局在化させられることが明らかとなった。

#### 第4章 シリコンナノ粒子の細胞による取り込み速度の制御

Si ナノ粒子を細胞イメージングなどの応用に用いる際には、第3章で検討した細胞内での局在性に加え、そこに至る速度(細胞による粒子の取り込み速度)も、実用性を決める重要な因子となる。細胞によるSi ナノ粒子の取り込み過程に対する粒子物性の影響を明らかにするために、本章では共焦点顕微鏡によるリアルタイム観察と、物質収支式に基づいた粒子取り込みの速度論モデルを使用して、検討を行った。

凝集径の異なるアミン修飾 Si ナノ粒子を用いて、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 による粒子取り込み量の時間変化を測定した結果、粒子取り込み量は 70 nm 付近で極大値を持ち、それより小さい場合、大きい場合ともに取り込み量は減少していくことが明らかとなった。

この理由を明らかにするために、粒子取り込みの速度論モデルを構築し、このモデルを用いて取り込みの各素過程に対する粒子サイズの影響を調べた。その結果、粒子サイズの上昇に伴い、粒子の受容体への結合/脱離の過程は速くなっていくのに対し、その後の細胞膜による粒子の被覆の過程は遅くなっていくという、逆の傾向を示すことが明らかとなった。この二つの異なる効果の競合によって、取り込みに最適な粒子サイズが決まるということが、今回の検討により示唆された。

以上の検討により、70 nm 程度の Si ナノ粒子凝集体が最も効率的に細胞に取り込まれることが分かった。イメージング材料などとして用いる際には、サイズがこの付近になるように材料設計を行うことが重要であるといえる。

#### 第5章 シリコンナノ粒子の応用展開

前章までの結果により、Si ナノ粒子の細胞内動態を制御することが可能となった。本章ではこの細胞内動態制御を利用した、Si ナノ粒子の細胞イメージング及び DDS への応用を検討した。

Si ナノ粒子の細胞イメージング材料としての基礎特性を調べた結果、有機蛍光分子よりも光褪色への安定性が高く、また CdSe など他の半導体ナノ粒子に比べて毒性が低いことが示された。これらの特性と、第3章における細胞内局在性制御が掛け合わさることで、細胞内小器官を選択的かつ長期に観察できる、有用な蛍光イメージング材料になると考えられる。

また、Si ナノ粒子は DDS の薬物担体としても利用できる。Si ナノ粒子の優れたイメージング特性と DDS を組み合わせることで、蛍光による医療診断と DDS による薬物治療が一体化した、新規の医療デバイスが創製されると期待される。第3章での検討により、アミン修飾された Si ナノ粒子はリソソームに局在することが確認された。このリソソームでは、内部の pH が周りよりも低く保たれていることが知られている。本章ではこれを利用し、薬物(抗がん剤ドキシソルビシン: DOX)を内包した Si ナノ粒子凝集体が pH の低下に反応して分散し、DOX を放出するように材料設計を行うことで、細胞内でのみ選択的に薬物を放出するシステムの構築を試みた。その結果、pH 低下に伴う DOX 内包 Si ナノ粒子凝集の分散及び DOX の放出が確認され、さらにヒト肝がん由来の細胞株である HepG2 に対する明確な薬理効果も示された。今後、がん細胞への特異的なターゲティング能などが加わることで、蛍光診断と DDS の一体化へと近づいていくことができると考えられる。

以上の検討により、Si ナノ粒子の細胞イメージング及び DDS における有用性が示された。今後さらなる機能向上によって、より実用的な材料へと発展していくことが期待される。

## 第6章 総括と今後の展望

本論文では、Si ナノ粒子の物性と細胞内局在性との相関について検討を行った。その結果、第3章では、Si ナノ粒子の表面化学種と凝集径の制御によって、粒子を幾つかの細胞内小器官に選択的に局在化させることができた。また第4章では、細胞による取り込み効率を上げるためには、70 nm 程度のサイズが最適であることが明らかとなった。これらの知見から、材料設計によって Si ナノ粒子の細胞内動態を制御することが可能となった。この細胞内動態制御を利用することで、第5章では、Si ナノ粒子を細胞内の選択的イメージング、及び細胞内選択放出型の DDS として応用できることが示された。今後、蛍光診断と DDS が一体化した新規医療デバイスなど、より実用的な応用への展開が期待される。