原著

ORIGINAL ARTICLE

新規な有機シリカナノ粒子の作製と光線力学的治療への応用

中村 教泰, 石村 和敬

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス部・顕微解剖学

(平成21年4月6日受理, 平成21年7月18日掲載決定)

Preparation of Novel Organosilica Nanoparticles and Their Application for Photodynamic Therapy

Michihiro Nakamura, Kazunori Ishimura

Department of Anatomy and Cell Biology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

(Received April 6, 2009, Accepted July 18, 2009)

要 旨

光線力学的治療に用いる光感受性物質をナノサイズのキャリアに取り込ませナノ粒子化することにより様々な有用性が得られると考えられている。新規なナノ粒子である有機シリカナノ粒子を作製し、従来型シリカ粒子と比較すると共に光線力学的治療への応用を検討した。有機シリカナノ粒子は一段階の反応にて作製でき、サイズ制御、分散性も良好であった。粒子は作製した時点で表面ならび内部にチオール基などの官能基を有しており、内部機能化としてローダミンなどの蛍光色素が効率良く粒子内に取り込まれ蛍光有機シリカナノ粒子の作製も可能であった。表面機能化として粒子表面に抗体、アビジンなどのバイオ分子の吸着や化学修飾剤を用いた結合が容易であり、粒子の多機能化において高い発展性が認められた。また蛍光有機ナノシリカ粒子をマウスへ経静脈投与または腹腔内投与を行なったが明らかな毒性は認められなかった。さらに光感受性物質を含有した有機シリカナノ粒子を取り込んだ培養細胞に励起光を照射することにより細胞の形態変化が確認でき、ナノ粒子による細胞障害活性を示唆する所見が得られた。

キーワード：有機シリカナノ粒子, 細胞障害活性, イメージング, 治療用ナノ粒子

Abstract

Nanoparticles have been proposed as potential carriers for photosensitizers. Novel silica nanoparticles made of organosilica (Organo-NPs) have been successfully synthesized by using a Stöber method. We compared the Organo-NPs to classical silica nanoparticles made of tetraethoxysilane (TEOS NPs). The Organo-NPs were well dispersed in solution and have unique surface properties such as thiol residues on the surface and reduced zeta potential compared with TEOS NPs. The Organo-NPs with fluorescent dye distributed throughout the particle were synthesized by a method that deposited fluorescent dye on the silica network via a succinimidyl ester reaction with (3-aminopropyl) trimethoxysilane and via a maleimide reaction with organosilica. The resulting Organo-NPs with fluorescent were bright, non-aggregated in solution, and photostable. The fluorescence intensity and photostability of fluorescent Organo-NPs were sufficient for detection as a single fluorescent particle using flow cytometry and fluorescence microscopy. Protein-modified Organo-NPs were easily prepared by absorption and by maleimide coupling. The Organo-NPs did not exhibit death or cytotoxic findings on in vivo injection. The Organo-NPs containing photosensitizers showed phototoxic activity in culture cells. We demonstrate the usefulness of the Organo-NPs and their surface properties, and discuss their advantages for biological applications and possibility for photodynamic therapy.

Key word : organosilica nanoparticles, cytotoxicity, imaging, therapeutic particles.

1. 目的

光線力学的治療に用いる光感受性物質をナノサイズのキャリアーに取り込ませナノ粒子化することによって様々なメリットが報告されている¹⁻⁵⁾。ナノ粒子化により光感受性物質の機能安定化が期待できると共に、腫瘍組織などへ粒子サイズによる受動的な病巣部への集積 (enhanced permeability and retention effect), 並びにナノ粒子表面への腫瘍特異的抗体などの結合による生物学的機能化により能動的な病巣部への集積が期待できる。したがって光感受性物質のナノ粒子化は光線力学的治療の研究開発の重要な方向と考えられる。

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持っている。しかし、従来型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表面の機能化等は容易ではなかった。我々は従来のシリカ粒子とは異なる成分である有機シリカから構成される新規な有機シリカナノ粒子の作製に成功した⁶⁻⁹⁾。有機シリカナノ粒子は一段階の反応にて作製でき、サイズ制御、分散性も良好であった。有機シリカナノ粒子は作製した時点で表面ならび内部にチオール基などの官能基を有しており様々な有用性を示した。有機シリカナノ粒子は蛍光色素などによる内部機能化ならびに蛋白質などによる表面機能化が可能であった。粒子内の官能基の存在によりローダミンBやルテニウムなどの蛍光色素が効率良く粒子内に取り込まれ蛍光有機シリカナノ粒子の作製も可能であった。蛍光有機シリカ粒子は市販の量子ドットと同等以上の蛍光強度を示した。粒子表面に抗体、アビジンなどのバイオ分子の吸着や化学修飾剤を用いた結合が容易でありバイオ分子による表面機能化に高い発展性が認められた。また蛍光有機ナノシリカ粒子をマウスへ経静脈投与または腹腔内投与を行なったが明らかな毒性は認められなかった。有機シリカ粒子は多機能化に優れた特性を示し、蛍光プローブやイメージング、ナノ医療への応用が期待できる。本研究では光線力学的療法における有機シリカ粒子の治療用粒子としての応用の可能性を検討した。

2. 対象と方法

2.1 蛍光有機シリカナノ粒子の作製

従来型シリカナノ粒子である無機シリカ粒子の作製に用いられるTetraethoxysilane (TEOS) と有機シリカ粒子の作製が可能な3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS) を用いて粒子を作製した。TEOSとMPSをそれぞれ唯一のシリカ材料としてステーパー法にて粒子を作製した。有機シリカナノ粒子の作製は種々の濃度のTEOS 21 μ l またはMPS (Sigma-Aldrich Chemical co, St. Louis, MO) 19 μ l に30% アンモニア水溶液 (和光純薬, 大阪, 日本) 36 μ l, エタノール 325 μ l, 蒸留水68 μ l を加えて25度にて2日間反応させた。蛍光有機シリカナノ粒子の作製では前記反応液に10 mM Rhodamine red C2-maleimide (Invitrogen, Carlsbad, CA) 10 μ l を加えて反応させた。次いで、反応終了液を高速遠心機 (10,000 $\times$ g, 5分間) にかけて、そのペレットを採取した。得ら

れたペレットは、70容量%エタノールと蒸留水とを用い、それぞれ交互に3回、合計6回、遠心による洗浄を繰返した。次に、洗浄済みペレットを超音波破碎機にて攪拌により水溶液中に分散させた。

2.2 粒子の形態学的評価並びに蛍光特性評価

作製した粒子は日立電子顕微鏡 H-7650 (日立製作所, 東京, 日本) にて観察を行ない、形態、粒子サイズを評価した。またニコン研究用倒立顕微鏡 ECLIPSE TE2000 (株式会社ニコン, 神奈川, 日本), 100-W水銀ランプ, CCDカメラ (Digital Sight DS-L1, Rolera-XR Mono Fast 1394 Cooled, Qimaging, Burnaby, BC, Canada), Image-Pro Plus software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) にて粒子の蛍光観察、蛍光強度・蛍光安定性、粒子を含有する細胞の形態変化を評価した。粒子の吸収並びに蛍光はU-3000 spectrophotometer (日立製作所, 東京, 日本), F-2500 fluorescence spectrophotometer (日立製作所, 東京, 日本) にて測定した。

2.3 有機シリカ粒子の表面機能化能評価

5 μ l のシリカ粒子溶液と5 μ l の10 μ g/mlのgreen fluorescent protein (GFP) (Upstate, Lake Placid, NY) を混合して5分間後、500 μ l の蒸留水にて希釈しFACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) にて測定した。蛍光は488 nm励起レーザーにてFL1 (530/30 nm band pass filter) にて測定した。

2.4 蛍光有機シリカ粒子の細胞障害活性

蛍光有機シリカ粒子をマウス腹腔内に投与し、粒子を細胞内に取り込んだマウス腹腔マクロファージを調製した。粒子を含有するマウス腹腔マクロファージを培養し、上記の蛍光顕微鏡を用いて励起光 (528 nm) を照射し60倍対物レンズにて細胞の形態変化を観察した。

3. 結果と考察

3.1 有機シリカ粒子の作製

TEOSとMPSの粒子の合成過程の比較を電子顕微鏡を用いて行なった (Fig.1)。TEOSの場合は反応開始9時間後には電子顕微鏡にて粒子の形成が確認された (Fig.1a)。その後、1-2日に粒子形成を確認したところ9時間後と違いは認められなかった (Fig.1b,c)。一方、MPSでは粒子の合成過程は異なっていた。9時間後、電子顕微鏡像では明確な粒子は確認できず、円形構造物並びにその融合したものが観察された (Fig.1d)。また反応液から粒子の回収を試みたが粒子は回収されなかった。1日後では粒子の形成は確認できたが粒子間の境界が明確ではなかった (Fig.1e)。2日目では明確な粒子が確認された (Fig.1f)。これらの結果から従来型シリカ粒子と比較して有機シリカ粒子は同じ作製条件において粒子形成に長時間を必要とすることが確認できた。従来型シリカ粒子はTEOSの加水分解と縮合反応により形成されることが知られている。シリカネットワークを形成するケイ素の酸素結合部位はTEOSは4箇所あるのに対してMPSでは3個

Fig.1 Transmission electron microscopy images of silica nanoparticles as a function of time. TEOS NPs (a–c) and MPS NPs (d–f) were observed after 9 h (a, d), 1 day (b, e), and 2 days (c, f). Scale bars are 500 nm. (Reproduced with permission from Ref. [6]© 2007 American Chemical Society)

所と少なく、残りの1個所は有機鎖が結合している。またMPSによる有機シリカ粒子の形成において、ミセルが形成された後、加水分解と縮合反応により粒子化が起こる現象を我々は確認している⁶⁾。こうしたシリカ化合物の構造や粒子形成過程の相違により粒子形成時間に違いが生じるものと考えられる。作製した粒子は共に分散性がよく、凝集などは認められなかった。

3.2 蛍光有機シリカ粒子の蛍光特性評価

蛍光有機シリカ粒子の蛍光強度を蛍光分光光度計を用いて評価した(Table1)。対照として蛍光ナノ粒子として商品化されている量子ドット(Q-dot 605)を用いた。蛍光強度は2種類の条件(A, B)で測定した。条件Aではローダミン・レッドの蛍光発光に適した条件(励起波長570 nm, 蛍光波長590 nm)、条件BではQ-dot 605に適した条件(励起波長350 nm, 蛍光波長605 nm)で測定した。Fig.2に各粒子の蛍光スペクトル(Fig. 2a,b)と励起スペクトル(Fig. 2c,d)を示した。粒子溶液の蛍光強度を測定し粒子一個あたりの蛍光強度の比較を行なった。条件Aにおいては蛍光有機シリカ粒子はQ-dot 605と比較して粒子一個あたり110,000倍強い蛍光強度であった。また条件Bにおいては31,000倍であった。これらの結果から粒子一個あたりの蛍光有機シリカ粒子の蛍光強度はQ-dot 605に対して著明に高いことが確認できた。次に蛍光有機シリカ粒子とQ-dot 605の体積の違いによる蛍光強度の違いを補正するため、単位体積あたりの蛍光強度を計算し比較を行なった。条件Aにおいては蛍光有機シリカ粒子はQ-dot 605と比較して単位体積あたり約6倍強い蛍光強度であった。また条件Bにおいては0.23倍でありQ-dot 605の蛍光強度が強

Table1: Comparison of Fluorescence Intensity of Rhodamine red-Containing Silica Nanoparticles prepared from MPS (MPS NPs-R) and Quantum Dots 605 (Q-dot 605) under the Optimum Conditions for Rhodamine red and Q-dot 605

	MPS NPs-R	Q-dot 605	Q-dot 605
Concentration	0.10 mg/mL	40 nM	40 nM
Diameter (Ave.) (nm)	490	20	20
Particle counts (counts/mL) ^a	1×10^9	2.4×10^{13}	2.4×10^{13}
Measurement λ (Ex/Em) (nm)	570/590 (A)	570/590 (A)	350/605 (B)
Intensity	14.7	17.3	505.4
Intensity/particle ^b	6.8×10^{-8}	7.2×10^{-13}	2.1×10^{-11}
Ratio	1	1.1×10^{-5}	3.1×10^{-4}
Specific intensity ^c	1.5×10^2	2.2×10^1	6.3×10^2
Ratio	1	0.15	4.2

^a Concentration divided by weight of one particle. The weight of one particle was calculated from the volume of one particle: $4\pi(0.000290/2)^3/3$ (mm³) $\times$ 2.3 (specific gravity).

^b Intensity divided by the particle count.

^c Intensity divided by the particle count and then by the volume of one particle.

(Reproduced with permission from Ref. [6]© 2007 American Chemical Society)

Fig.2 Fluorescence spectra of MPS NPs containing Rhodamine red (A) and Quantum Dots 605 (B). Fluorescence emission spectra were obtained when excited at 570 nm (a) and 350 nm (b). Fluorescence excitation spectra were obtained with emission wavelength at 590 nm (c) and 605 nm (d).

Fig.3 Fluorescence microscopy was used to compare the photostability of MPS NPs containing rhodamine red (solid circles) and rhodamine red (open boxes).

Fig.4 Flow cytometry analysis of silica nanoparticles surface-modified with proteins. MPMS nanoparticles (a) and TEOS nanoparticles (b) modified with GFP were analyzed. Red lines and green lines indicated before and after reaction, respectively. (Reproduced with permission from Ref. [6]© 2007 American Chemical Society)

かった。単位体積あたりの蛍光強度では励起波長と測定波長によっては蛍光有機シリカ粒子はQdot 605より低くなる結果も得られた。励起波長が異なる場合、励起エネルギーの相違により蛍光強度の変化も考えられる。したがって条件BにおけるQdot 605の蛍光強度は指標の一つとしての位置付けとなる。蛍光有機シリカ粒子はその作製条件により蛍光強度が向上することも最近の研究で分かっており^{6,10)}、条件BにおけるQdot 605と同等以上の蛍光強度の粒子が作製できる可能性が考えられる。

次に蛍光有機シリカ粒子の蛍光安定性の評価を行なった。顕微鏡下にて経時的に蛍光粒子一つまたは単位体積の粒子化していない蛍光色素の蛍光強度を測定した (Fig.3)。励起光照射250秒後の蛍光有機シリカ粒子の蛍光強度は120,582から66,549と減少し、照射直後の約60%であるのに対して、粒子化していない蛍光色素は1,104,731から116,675と約10%まで低下していた。蛍光有機シリカ粒子の蛍光安定性は粒子化していない蛍光色素と比較して有意に安定していることが確認できた。したがって蛍光有機シリカ粒子は高い蛍光強度を示すと共に蛍光安定性も優れていた。

3.3 有機シリカ粒子の表面機能化能評価

有機シリカ粒子の蛋白質による表面機能化能をフローサイトメトリーを用いて評価した。有機シリカ粒子と従来型シリカ粒子とGFP溶液を混合しフローサイトメトリーにて粒子の蛍光強度を測定した (Fig.4)。従来型シリカ粒子のピークと比較して有機シリカ粒子のピークは大きく右に移動した。有機シリカ粒子の粒子数の分布は従来型シリカ粒子と比べて低蛍光域に分布が少なく、高蛍光領域に集中して認められことから、有機シリカ粒子群はGFPと直接に多くかつ均一に結合したことが確認できた。また蛍光色素を結合させた抗体などの蛋白質を用いて同様の実験を行なった結果、有機シリカ粒子表面に極

Fig.5 Photodynamic cytotoxic effect of organosilica nanoparticles containing photosensitizer. Mice peritoneal macrophages containing organosilica nanoparticles (a) showed structural changes by light irradiation after 5 min (b), 10 min (c) and 15 min (d). White arrows indicated the edges of the cell.

めて効率良く結合することが確認できた。蛍光色素を標識した蛋白質、並びに蛍光色素と結合していないGFPなどの蛍光蛋白質は有機シリカ粒子の表面に効率よく結合することが確認できた。MPSを用いて合成した有機シリカ粒子は表面にチオール基が豊富に存在すると考えられ、また表面の電荷も従来型シリカ粒子と比較してより陰性度が高いことも確認できている⁶⁾。したがってチオール基と蛋白質との分子間相互作用や静電的相互作用などにより効率良く蛋白質と結合することが考えられる。チオール基はチオール交換反応や化学共役剤を用いて結合を行なうことが可能であり多様な結合様式により蛋白質などのバイオ分子の結合を行なうことができる。有機シリカ粒子の表面機能化能は極めて高い可能性を持つと考えられる。

3.4 光感受性物質を含む蛍光有機シリカ粒子の細胞障害活性

光感受性物質を含む有機シリカ粒子を作製し細胞障害活性を評価した。粒子を細胞内に取り込んだマウス腹腔マクロファージに連続的に励起光を照射し細胞の形態変化を観察した。粒子を取り込んだ細胞は明確な蛍光を示し (Fig.3a), 照射約3分後より形態変形を開始した。その後も経時的に形態変化が確認できた (Fig.3c)。15分後には細胞輪郭が不明確となった (Fig.3d)。また細胞内の粒子が細胞外へ放出される所見も見られ細胞が障害され細胞破壊が起こっていることが示唆された。励起光の照射により粒子から発生する活性酸素が細胞内部を障害し、細胞破壊を起こしていると考えられる。今後は粒子による細胞障害活性をより詳細に評価すると共に、より高い障害活性を得るための条件検討が必要である。

4. 結論

新規な有機シリカナノ粒子を作製し、光線力学的治療への応用を検討した。光感受性物質を含む有機シリカ粒子は培養細胞を用いた実験において励起光の照射により細胞障害活性を示唆する所見が得られた。今後は有機シリカ粒子の生体における安全性の詳細な評価が必要となる。有機シリカ粒子の粒子サイズや表面並びに内部の機能化の検討を行うことにより治療効果の高い光線力学的治療用ナノ粒子となることが期待できる。

参考文献

- Kim, S., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Pande, R. K., and Prasad, P. N., Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 2669-2675, 2007.
- Ohulchanskyy, T. Y., Roy, I., Goswami, L. N., Chen, Y., Bergey, E. J., Pandey, R. K., Oseroff, A. R., and Prasad, P. N., Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.* 7: 2835-2842, 2007.
- Matsumura, Y., Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46: 6387-6392, 1986.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 65: 271-284, 2000.
- Liu, Y., Miyoshi, H., and Nakamura, M., Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int. J. Cancer* 120: 2527-2537, 2007.
- Nakamura, M., and Ishimura, K., Synthesis and characterization of organosilica nanoparticles prepared from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane as the single silica source. *J. Phys. Chem. C* 111: 18892-18898, 2007.
- Nakamura, M., and Ishimura, K., One-pot synthesis and characterization of three kinds of thiol-organosilica nanoparticles. *Langmuir* 2008, 5099-5108.
- Nakamura, M., Doi, K., and Ishimura, K., One-pot synthesis, characterization, and biological applications of size-controlled thiol-organosilica nanoparticles prepared from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane. *Langmuir* 24: 12228-12234, 2008.
- Nakamura, M.: Approaches to biofunctionalization of spherical silica nanomaterials. Kumar C.S.S.R., eds. *Nanomaterial for Life Sciences Volume 2: Nanostructured Oxides*. 109-161, 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Nakamura, M., Shono, M., and Ishimura, K., Synthesis, characterization, and biological applications of multifluorescent silica nanoparticles. *Anal. Chem.* 79: 6507-6514, 2007.

著者紹介

中村 教泰 (Michihiro Nakamura)

1992年徳島大学医学部医学科卒業、1996年徳島大学大学院医学研究科修了、1996年九州大学生体防御医学研究所附属病院医員、1999年徳島大学医学部助手、2002年米国国立衛生研究所訪問研究員、2005年徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部講師等を経て、2008年より徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部准教授、現在に至る。有機シリカ粒子技術による医療用ナノ粒子の開発・応用に従事している。

石村 和敬 (Kazunori Ishimura)

1975年広島大学医学部医学科卒業、1977年広島大学大学院医学研究科中退、1977年広島大学医学部助手、1980年 大阪大学医学部助教授、1989年より徳島大学医学部教授、2004年徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授、現在に至る。社団法人 日本解剖学会理事、日本組織細胞化学会監事。