多機能磁性ナノ粒子の合成とバイオ医療分野への応用

前之園 信也

北陸先端科学技術大学院大学 ☎ 923-1292 石川県能美市旭台 1-1

(2016 年 7 月 26 日受付 ; 2016 年 9 月 5 日掲載決定)

Synthesis and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles

Shinya MAENOSONO

Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292

(Received July 26, 2016 ; Accepted September 5, 2016)

Magnetic nanoparticles (MNPs) have become readily available thanks to the development of a range of synthetic techniques. In addition, various multifunctional hybrid MNPs have been recently developed for biomedical applications. We review the progress of research on biomedical multifunctional MNPs.

KEYWORDS : magnetic nanoparticle, biomedicine, magnetic separation, bioimaging, plasmon scattering

1. はじめに

これまで, MRI 造影剤, バイオマーカー検出プローブ, 磁気ハイパーサーミアの発熱体など, 磁性ナノ粒子のバイオ医療分野での様々な応用が検討され, 一部実用化されている。近年益々バイオ医療分野における磁性ナノ粒子の需要が高まっており, 用途の拡大に伴って, 磁性に加えてイメージング機能を併有することが望まれている。たとえば Ma らは, 疎水性酸化鉄ナノ粒子の表面をポリエチレングリコール修飾ホスホエタノールアミンで被覆し, その疎水領域へ蛍光色素を担持させた磁性-蛍光ハイブリッドナノ粒子を作製し, がんのデュアルモードイメージングと光熱治療に有効であることを示した¹⁾。Mackay らは, コロイダル量子ドットと酸化鉄ナノ粒子を複合化した粒子がマルチモーダルバイオイメージングに利用できることを示した²⁾。このように, 磁性ナノ粒子にイメージング機能を持たせる手段としては, 蛍光色素分子や量子ドットと複合化させる方法が一般的である^{3,4)}。しかし蛍光色素は耐光性が低いため退色しやすく⁵⁾, 量子ドット (単一粒子の場合) は蛍光明滅現象⁶⁾を示すため, いずれも長時間イメージングには向かない。

Au や Ag などの貴金属ナノ粒子は, 局在表面プラズモン共鳴 (localized surface plasmon resonance, LSPR) に由来する光学的性質によって, バイオイメージングや生体分子センシングに利用されてきた^{7,8)}。LSPR を利用したイメージングは退色や明滅がなく, 安定した長時間観察が可能である。したがって, 磁性材料とプラズモン材料を複合化した磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子は次世代の多機能磁性ナノ粒子として有望であり, いくつか報告例もある。たとえば, Co@Au コア@シェル型ナノ粒子⁹⁾, Au-Fe₃O₄ ヘテロダイマーナノ粒子¹⁰⁾, Au-Fe₃O₄ コア-サテライト型ナノ粒子¹¹⁾, FePt-Au ヘテロダイマーナノ粒子¹²⁾などである。我々は, 磁性材料の中でも最も高い飽和磁化を持つ FeCo¹³⁾と, プラズモン材料の中でも最も高い LSPR 散乱断面積を持つ Ag¹⁴⁾を複合化させることを考えた。FeCo と Ag を複合化させた磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の既往の研究例としては, 我々の知る限り, Sachan らのパルスレーザーディウエッティング法による Fe₈Co₉₂-Ag ヘテロダイマーナノ粒子の合成例¹⁵⁾のみであり, 化学合成による FeCo-Ag 複合ナノ粒子の作製例はない。化学合成法は, パルスレーザー法などの真空中での物理的作製法やその他の気相法に比べ, 均一なナノ粒子を大量に合成できる, 複雑な構造のナノ粒子を容易に作製できる, ナノ粒子表面に望みの配位子を結合させることができ機能化し

やすい, などの様々なメリットがあるため, 我々は FeCo-Ag 複合ナノ粒子の化学合成を試みた。

本稿では, FeCo と Ag からなる Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の化学合成法とその物性について概説した後, 細胞内小胞のイメージングと磁気分離への応用の可能性について紹介する。Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型構造を採用した理由は以下のとおりである。FeCo-Ag 複合ナノ粒子として最も単純な構造は FeCo@Ag コア@シェル型ナノ粒子だが, FeCo ナノ粒子の表面を Ag シェルで被覆することは案外難しい。なぜなら, FeCo ナノ粒子が酸化され, 格子不整合によって Ag シェルがうまく形成できなかったり, FeCo ナノ粒子の表面に Ag イオンが近づくとガルバニ置換反応による FeCo のエッチングが起きたりするためである。上記の問題を解決するため, 逆構造である Ag@FeCo コア@シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を合成した。Ag@FeCo ナノ粒子においては Ag コアから FeCo シェルへの電子移動によって FeCo の酸化が抑制されるため, FeCo シェルの表面を Ag シェルで被覆した Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型にすることが可能となる¹⁶⁾。Ag シェルの存在によって, FeCo の酸化がさらに抑制されるほか, チオール基と Ag との結合を利用することで配位子交換が容易になるという利点もある。

2. 多機能磁性ナノ粒子の化学合成

2.1 試薬

コバルト(II)アセチルアセトナート [$\text{Co}(\text{acac})_2$, 純度 $\geq 97\%$], 鉄(III)アセチルアセトナート [$\text{Fe}(\text{acac})_3$, 純度 $\geq 99.9\%$], 硝酸銀 (AgNO_3 , 純度 $\geq 99.9999\%$), 1,2-ヘキサデカンジオール, 無水コハク酸, オレイルアミン (OLA, 純度 70%), オレイン酸 (OA, 純度 90%), テトラエチレングリコール (TEG, 純度 99%) は Sigma-Aldrich 社から購入し, そのまま使用した。 ϵ -ポリリジ

ン (PLL) と 2-イミノチオランは, それぞれ JNC 株式会社および Toronto Research Chemicals 社から購入した。

2.2 Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の合成

Fig. 1 に Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型 (コア@シェル@シェル型) ナノ粒子の合成スキームを示す¹⁶⁾。まず室温で三口フラスコに AgNO_3 (0.1 mmol), 1,2-ヘキサデカンジオール (1.0 mmol), OLA (10 mmol), OA (8 mmol), TEG (10 mL) を仕込み, 側管をセプタムで密栓することによってフラスコ内を半密閉系とし, 攪拌しながら Ar バブリングを 5 分間行った。Ar バブリングを継続しながら, 反応溶液の温度を 100°C まで升温し 10 分間攪拌した後 170°C まで升温した。反応温度が 170°C に到達した直後, あらかじめ用意しておいた Co と Fe の前駆体溶液を静かにフラスコ内へシリンジを用いて注入した。この前駆体溶液の組成は $\text{Co}(\text{acac})_2$ (0.2 mmol), $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0.2 mmol), OLA (1 mL), トルエン (2 mL) である。前駆体注入後, 反応温度を 250°C まで上げ, Ag 前駆体溶液を再度注入した。Ag 前駆体溶液の組成は AgNO_3 (0.1 mmol), OLA (1 mL), トルエン (1 mL) である。Ag 前駆体溶液注入後, 反応温度 230°C で 10 分間反応させた。反応終了後, 反応溶液を自然冷却し, アセトンを加えて遠心分離を行った。遠心分離後上澄みを捨て, ヘキサンを加えナノ粒子を再分散させた後, 再度アセトンを加えて遠心分離を行った。得られたナノ粒子は, 風乾した後真空乾燥機で乾燥させた。

2.3 PLL 表面修飾剤の合成と配位子交換

合成直後の Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の表面は OLA で被覆されており疎水性であるため, 無極性溶媒にしか分散しない。バイオ医療分野で利用するためには, 水溶性かつ生体適合性の高い表面修飾剤に置換する必要がある。そこで我々はホモポリアミノ酸である PLL に着目し, PLL をベースとした表面修飾剤を合成し, 配位子交換によって OLA と置換してナノ粒子を水

Fig. 1. (color online). Synthesis scheme of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanoparticles (NPs).

溶化した¹⁶⁾。PLL 表面修飾剤は以下の手順で合成した。まず PLL の一部のアミノ基に無水コハク酸を反応させてカルボキシル (COOH) 基を導入し、両性高分子を合成した¹⁷⁾。続いて、2-イミノチオランを反応させてチオール (SH) 基を導入した。得られたポリマー (PLL-COOH-SH) は透析を2日間行った後、凍結乾燥を2日間行った。COOH 基と SH 基の導入量は核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) スペクトルから見積もった。Fig. 2a, b に代表的な PLL 表面修飾剤の構造と ¹H NMR スペクトルを示す。

配位子交換は以下の手順で行った。まず 15 mg の PLL-COOH-SH を 1 mL の超純水に溶解し、エタノール 100 μ L を添加した。水酸化ナトリウムを添加することで PLL 水溶液の pH が 12 となるよう調節した。次に、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子をヘキサンに分散し、このナノ粒子分散液 200 μ L を PLL 水溶液と混合して超音波を印加し、超音波印加中に純水 2 mL を加えた。超音波印加終了後、40,000 rpm で3分間遠心分離を行い、上澄みを捨て、沈殿物に超純水を少量加えて再分散させた。Fig. 2c に PLL-COOH-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子水分散液の写真を示す。PLL-COOH-SH 修飾によって Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の水分散性が高まったことがわかる。

2.4 Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の構造

Fig. 3 に合成直後の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の透過電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 像、高分解能 TEM (high-resolution TEM, HR-TEM) 像、高角散乱環状暗視野走査 TEM (high angle annular dark field-scanning TEM, HAADF-STEM) 像、エネルギー分散型 X 線分光 (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS) 元素マッピング像を示す。TEM 像から粒径分布解析をした結果、ナノ粒子の平均粒径は 13.5 ± 2.5 nm であった。HAADF-STEM 像では、輝度はおよそ原子番号の二乗 (Z^2) に比例するため、Ag コアは FeCo シェルより明るく見える (Fig. 3d-f)。また、EDS マッピングから、Ag コアの周囲を FeCo シェル (厚さ約 3 nm) が均一に被覆していることがわかる (Fig. 3g-r)。

また、単一ナノ粒子の EDS ラインプロファイルの詳細な解析から、薄い Ag シェルが FeCo シェルの表面に存在することが確認され¹⁶⁾、Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子が得られていることがわかる。また、FeCo シェルの平均組成はほぼ Fe : Co = 1 : 1 であるものの、Ag コア近傍では Co リッチ、外側では Fe リッチという傾斜組成を有していることがわかった。

超伝導量子干渉磁束計 (superconducting quantum interference device, SQUID) によってこのナノ粒子の磁化特

Fig. 2. (color online). (a) Structure and (b) ¹H NMR spectrum of PLL-COOH-SH polymer. (c) Photograph of dispersions of Ag@FeCo@Ag NPs before (right) and after (left) the ligand exchange. Upper and lower phases are hexane and water, respectively.

Fig. 3. (color online). (a) TEM image, (b) HR-TEM image, (c) size distribution, and (d-f) HAADF-STEM images of Ag@FeCo@Ag NPs. (g-r) EDS elemental mapping images of the Ag@FeCo@Ag NPs: (g-i) Ag L edge, (j-l) Co K edge, (m-o) Fe K edge, and (p-r) overlaid images.

性を評価した結果、室温では超常磁性を示し、飽和磁化は 36.4 emu/g であった (Fig. 4a)。Ag は反磁性体であるので、FeCo シェルのみの磁化として換算すると 45.7 emu/g (372 emu/cm^3) となり、同じ体積の酸化鉄ナノ粒子と比べて大きな飽和磁化を有している。Fig. 4b に示すように、PLL-COOH-SH 修飾した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では飽和磁化が 19.2 emu/g まで低下するが、これはナノ粒子表面が分子量の大きい PLL-COOH-SH で被覆されていることと、ナノ粒子に配位していない

Fig. 4. (color online). Magnetization curves of (a) as-synthesized and (b) PLL-COOH-SH-modified NPs measured at 5 and 300 K. (c) UV-Vis spectrum of a hexane dispersion of as-synthesized NPs.

PLL-COOH-SH がサンプル中に少量残留していたことによる。また、紫外可視分光法 (ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis) によって得られた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の吸収スペクトルには Ag コア由来の LSPR バンドが 410 nm 付近に明確に観察できる (Fig. 4c)。したがって、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子は、超常磁性と LSPR 特性を兼ね備えたハイブリッドナノ粒子であることが確認された。

Fig. 5. (color online). (a) Fe 2p and (b) Co 2p core-level XPS spectra, and (c) XRD pattern of Ag@FeCo@Ag NPs. Peaks were deconvoluted into *fcc* Ag (JCPDS PDF No. 01-087-0717), *bcc* FeCo (JCPDS PDF No. 00-049-1567) and $\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_{0.5}\text{O}$ phases. The difference pattern is shown below the observed pattern. (d) Sectional drawing of a single Ag@FeCo@Ag NP showing its internal structure. Black and white arrows denote the direction of spins in antiferromagnetic and ferromagnetic phases, respectively. (e) Magnetization curves in the range of -10 to 10 kOe recorded at 5 K, after zero-field cooling (ZFC) and field cooling (FC) procedures. The inset shows the entire magnetization curve after the ZFC procedure.

さらに、X線回折 (X-ray diffraction, XRD)、X線光電子分光 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) および SQUID による精密構造解析結果から (Fig. 5a-c)、FeCo シェルの表面は酸化されており、厚さ約 1.3 nm のコバルトオキサイド ($\text{Co}_x\text{Fe}_{1-x}\text{O}$) 層が形成されていることがわかった (Fig. 5d)。 $\text{Co}_x\text{Fe}_{1-x}\text{O}$ は反強磁性相であるため、強磁性相 FeCo との界面で顕著な磁気交換バイアス (Fig. 5e) が発現することも見いだしている¹⁸⁾。

3. 細胞内小胞の磁気分離

細胞とそれを取り巻く環境との健全なコミュニケーション

が損なわれることによって多くの疾患が引き起こされる。細胞がどのように細胞外環境と物質をやり取りし、どのように細胞内部へと伝えるのかというプロセスを分子レベルで理解することは、病気や感染症の発症機構を知るために大切である。そのため、細胞内外の物質輸送にかかわる細胞内小胞を膜タンパクごと選択的に分離できる分離技術の開発は、細胞生物学において重要な課題の一つである。

我々は Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子を用いて、そのような細胞内小胞の一種であるオートファゴソームのイメージングと磁気分離に取り組んでいる。オー

Fig. 6. (color online). Confocal laser scanning microscope images of HEK293T cells after incubation without (top) and with (bottom) Ag@FeCo@Ag NPs. Nuclei were stained by 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and autophagosomes were stained with mouse anti-LC3 and the Alexa594-conjugated anti-mouse antibodies. LSPR scattering image (second from the left) and corresponding merged image (the rightmost) with DAPI (the leftmost) and LC3 (second from the right) images clearly show NPs are internalized in autophagosomes. Scale bar is 10 μm (scale bar in the inset is 2 μm).

トファゴソームはオートファジー（自食作用）によって形成される細胞内小胞である。オートファジーとは、栄養飢餓などに応じて細胞が自身の構成成分を二重の脂質膜の小胞（オートファゴソーム）で包み込んで、リソソームなどの加水分解酵素を豊富に含む場に輸送し分解する現象である¹⁹⁾。オートファゴソームの磁気分離は、オートファゴソームの形成からリソソームとの融合までの間の適切な時間帯に行う必要がある。そのため我々は、リポフェクション（細胞内に物質を送達する手法の一つ）によって PLL 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を哺乳培養細胞の細胞質へ送達してオートファジーを誘導し、LSPR 散乱と LC3（オートファゴソームに特異的に局在するタンパク質で、オートファゴソームのイメージングに広く利用されている）によるライブイメージングでオートファゴソームにナノ粒子が取り込まれたことを確認後（あるいはオートファゴソームにナノ粒子が取り込まれるのに必要な培養時間経過後）、ホモジナイザーを用いて速やかに細胞膜のみを温和に破碎し、磁気細胞分離装置を用いてオートファゴソームを磁気分離することを考えた。我々は、既に Ag@FeCo@Ag ナノ粒子をヒト培養細胞 HEK293T へリポフェクションし、ナノ粒子がオートファゴソームに内包されることを確認している。Fig. 6 に、ナノ粒子をリポフェクションしない場合（上段）とした場合（下段）の HEK293T 細胞の共焦点顕微

鏡像を示す。なお LC3 は、マウス抗 LC3 抗体（mouse anti-LC antibody, 一次抗体）と蛍光色素標識抗マウス抗体（Alexa594-conjugated anti-mouse antibody, 二次抗体）によって染色した。ナノ粒子をリポフェクションしなかった場合には LC3 は観察されないが、ナノ粒子をリポフェクションした場合はナノ粒子の周囲を LC3 が覆っていることがわかる。このことはナノ粒子が細胞質へ送達されたことでオートファジーが誘導され、ナノ粒子をオートファゴソームが包み込んでいることを示唆している。今後、オートファゴソームを磁気的に単離し、タンパク質の網羅的解析を行い、どのような膜タンパク質がオートファゴソームに存在しているのかを明らかにしていく予定である。

近年、大隅良典教授（現東工大特任教授）らによって酵母のオートファジー関連遺伝子群の同定が成功したことをきっかけにオートファジーの機構の解明が進んでいるものの¹⁹⁾、分子レベルでの完全な理解のためにはオートファゴソームを単離し、オートファゴソームに存在するタンパク質を同定することが最も直接的かつ確実な方法である。また、細胞内小胞を磁気分離することを目的とした本技術は、オートファゴソームだけでなくエンドソームや他の細胞内小器官の単離にも応用できるため、タンパク質のミスフォールディングを原因とする疾病の医薬開発への多大な貢献が期待できるほか、肥満や

老化を防止する医療技術にも繋がる可能性を秘めている。

4. ま と め

磁性ナノ粒子を活用したナノ磁気医療技術は近年益々重要性を増している。しかし、その本格的実用化には、多機能磁性ナノ粒子の合成と表面機能化に始まり、タンパクや細胞とナノ粒子との反応制御、ナノ粒子の検出・操作システムの構築といった分野横断的な技術開発が必須となる。本稿では、磁性と局在表面プラズモン特性を兼ね備えた Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の化学合成と表面修飾について概説した。また、その用途の一つとして、細胞内小胞の一種であるオートファゴソームの磁気分離への利用について紹介した。

文 献

- 1) Y. Ma, S. Tong, G. Bao, C. Gao and Z. Dai : *Biomaterials* **34**, 7706 (2013).
- 2) P.S. Mackay, G.J. Kremers, S. Kobukai, J.G. Cobb, A. Kuley, S.J. Rosenthal, D.S. Koktysh, J.C. Gore and W. Pham : *Nanomedicine* **7**, 489 (2011).
- 3) S.K. Yen, D. Jańczewski, J.L. Lakshmi, S.B. Dolmanan, S. Tripathy, V.H.B. Ho, V. Vijayaragavan, A. Hariharan, P. Padmanabhan, K.K. Bhakoo, T. Sudhaharan, S. Ahmed, Y. Zhang and S.T. Selvan : *ACS Nano* **7**, 6796 (2013).
- 4) P.H. Zhang, J.T. Cao, Q.H. Min and J.J. Zhu : *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 7417 (2013).
- 5) P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra and B. Moudgil : *Adv. Colloid Interface Sci.* **123-126**, 471 (2006).
- 6) E. Petryayeva, W.R. Algar and I.L. Medintz : *Appl. Spectrosc.* **67**, 215 (2013).
- 7) J. Wang, X. Yu, S.V. Boriskina and B.M. Reinhard : *Nano Lett.* **12**, 3231 (2012).
- 8) H. Mollasalehi and R. Yazdanparast : *Biosens. Bioelectron.* **47**, 231 (2013).
- 9) Y.H. Xu, J. Bai and J.P. Wang : *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 131 (2007).
- 10) Y. Lee, M.A. Garcia, N.A.F. Huls and S. Sun : *Angew. Chem., Int. Ed.* **122**, 1293 (2010).
- 11) A. Mezni, I. Balti, A. Mlayah, N. Jouini and L.S. Smiri : *J. Phys. Chem. C* **117**, 16166 (2013).
- 12) J.S. Choi, Y.W. Jun, S.I. Yeon, H.C. Kim, J.S. Shin and J. Cheon : *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15982 (2006).
- 13) T. Sourmail : *Prog. Mater. Sci.* **50**, 816 (2005).
- 14) K. Aslan, J.R. Lakowicz and C.D. Geddes : *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 538 (2005).
- 15) R. Sachan, A. Malasi, J. Ge, S. Yadavali, H. Krishna, A. Gangopadhyay, H. Garcia, G. Duscher and R. Kalyanaraman : *ACS Nano* **8**, 9790 (2014).
- 16) M. Takahashi, P. Mohan, A. Nakade, K. Higashimine, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi and S. Maenosono : *Langmuir* **31**, 2228 (2015).
- 17) K. Matsumura and S.H. Hyon : *Biomaterials* **30**, 4842 (2009).
- 18) M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott and S. Maenosono : *J. Magn. Magn. Mater.* **401**, 339 (2016).
- 19) N. Mizushima, T. Yoshimori and Y. Ohsumi : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107 (2011).