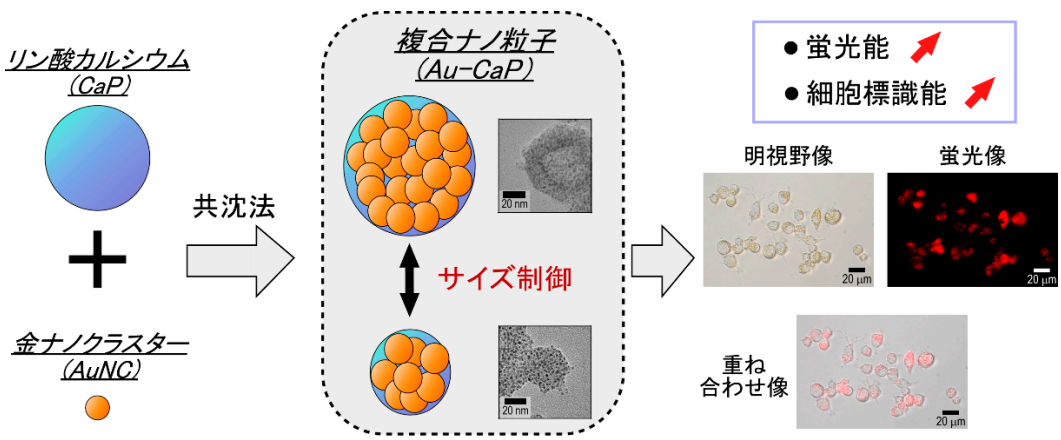
168　移植細胞の長期全身追跡用の複合ナノ粒子型造影剤開発	猪瀬　智也

【目的】近年の細胞加工技術の目覚ましい発展に伴い、難治性疾患等に対する細胞移植療法の研究開発が活発化している。iPS 細胞、免疫細胞、脂肪細胞等を用いた新たな細胞移植療法の開発が加速する中、生体内に移植する細胞の生体内挙動（位置・数）を把握するための、より高機能な追跡剤が必要とされている。シングルナノメートルサイズの金ナノクラスターは、高い X 線吸収能に加えて蛍光能を有するため、体内深部を含む全身観察を可能とする X 線 CT 造影と組織・細胞レベルの高解像顕微鏡観察を得意とする蛍光イメージングの双方に利用可能なバイモーダルイメージング剤として有用である。我々が開発したグルタチオン修飾金ナノクラスター（AuNC）は、高い化学的安定性と腎臓排泄性を併せ示すことから、短期的にも長期的にも生体への悪影響の懸念が少ないと期待されている。しかし、細胞・組織の自家蛍光等に対し、十分な蛍光能とは言えない。加えて、表面エネルギーの極めて高いシングルナノメートルサイズの AuNC を、十分な量で、かつ凝集させることなく細胞内に導入することは容易ではない。そこで本研究では、生体親和性・生体吸収性を併せ示し、細胞への遺伝子導入用キャリアとして実績を持つリン酸カルシウム（CaP）に AuNC を分散担持させた金ーリン酸カルシウム複合ナノ粒子（Au - CaP）を作製し、蛍光能と細胞標識能を評価した。

【方法】共沈法により Au - CaP の作製を試みた。具体的には、種々の濃度の AuNC を含むリン酸カルシウム過飽和溶液（Ca：5.1 mM、P：2.6 mM、Au：0.6、1、2、4、10 mM）を調製し、37℃で 60 分間静置した後、析出物を洗浄・回収して試料を得た。得られた試料の構造、組成、蛍光強度は、透過電子顕微鏡（TEM）観察、エネルギー分散型 X 線分光法（EDS）、蛍光分光法等により評価した。また、得られた試料（Au：0.6 mM 条件で作製）ならびに AuNC 単体（比較用）をマウスマクロファージ様細胞にそれぞれ 24 時間暴露した後、細胞の顕微鏡観察により細胞標識能を評価した。

【結果】TEM 観察の結果、得られた試料はシングルナノメートルサイズの微粒子を高密度に担持した球状粒子であり、EDS 分析において Ca、P、O、Au を含むことが示された。以上より、本共沈法によって CaP のマトリックスに AuNC が担持された Au - CaP が生成したと考えられた。Au - CaP の平均粒子径は、反応液中の金濃度増加に伴い 91 nm から 35 nm に減少した。表面にグルタチオン由来のカルボキシ基やアミノ基を有する AuNC が、CaP の核形成・成長プロセスに関与し、粒子径に影響を与えたと考えられる。蛍光分析の結果、Au - CaP は AuNC 単体の 33～140 倍もの蛍光強度（金元素 1 物質量あたりの蛍光強度 570 nm）を示した。これは凝集励起発光現象（AuNC 間の相互作用や AuNC のブラウン運動制限による動的消光抑制等による発光増強）の発現が主な要因と推定される。細胞の顕微鏡観察の結果、AuNC 単体ではマクロファージを可視化できなかったのに対し、Au - CaP では明瞭に可視化できた。以上、共沈法により多数の AuNC を高密度に CaP に担持することで、蛍光能と細胞標識能の両者の向上に成功した。

本研究の概要図



168. 移植細胞の長期全身追跡用の複合ナノ粒子型造影剤開発

猪瀬　智也

産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門 ナノバイオ材料応用グループ

Key words：金ナノクラスター，リン酸カルシウム，共沈法，細胞標識，バイモーダルイメージング

緒　言

近年の細胞加工技術の目覚ましい発展に伴い、難治性疾患等に対する細胞移植療法の研究開発が活発化している［1，2］。iPS 細胞、免疫細胞、脂肪細胞等を用いた新たな細胞移植療法の開発が加速する中、生体内に移植する細胞の生体内挙動（位置・数）を把握するための、より高機能な追跡剤が必要とされている。近年、次世代のイメージング剤として、シングルナノメートルサイズの金ナノクラスターが注目されている。金ナノクラスターは、高い X 線吸収能に加えて蛍光能を有するため、体内深部を含む全身観察を可能とする X 線 CT 造影と組織・細胞レベルの高解像蛍光顕微鏡観察を得意とする蛍光イメージングの双方に利用可能なバイモーダルイメージング剤として有用である［3，4］。これまでに我々は、X 線 CT 用の金ナノクラスター造影剤の開発に取り組み、マウスに血中投与可能かつ、腎臓からの排泄性を示すグルタチオン修飾金ナノクラスター（AuNC）を合成した［5］。AuNC は、高い化学的安定性と腎臓排泄性を併せ示すことから、短期的にも長期的にも生体への悪影響の懸念が少ないと期待される。しかし、AuNC の蛍光能は、細胞・組織の自家蛍光等に対し、十分とは言えない。加えて、表面エネルギーの極めて高いシングルナノメートルサイズである AuNC を十分な量で、かつ凝集させることなく細胞内に導入することは容易ではない。そこで本研究では、ヒトの硬組織の無機成分であり安全性の高い遺伝子導入用キャリアとして実績を持つリン酸カルシウム（CaP）［6］のナノ粒子に AuNC を高密度に分散担持させることで、凝集励起発光現象による蛍光能、ならびに細胞内への AuNC 導入効率（金標識能）の向上を試みた。具体的には、共沈法を利用し、反応液中の金濃度を変化させて金 - リン酸カルシウム複合ナノ粒子（Au - CaP）を作製し、得られた複合ナノ粒子および AuNC の蛍光能や細胞標識能について評価した［7］。

方　法

1. AuNC 懸濁液の調製

AuNC 懸濁液は既報［5］に従って調製した。塩化金酸水溶液に還元剤（Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride）を加えた後、水酸化ナトリウム溶液を添加して、金ナノクラスターを作製した。その後、分散剤としてグルタチオン溶液を添加・攪拌することにより AuNC 懸濁液を得た。

2. Au - CaP の作製

共沈法により Au - CaP の作製を試みた。具体的には、医療用輸液・注射液から調製したカルシウムイオン溶液、リン酸イオン溶液、炭酸イオン溶液と AuNC 懸濁液を混和し、種々の金濃度を有する反応液（Ca : 5.1 mM、P : 2.6 mM、Au : 0.6、1、2、4、10 mM）を調製した。この反応液を 37℃で 60 分間静置した後、遠心洗浄し、試料を得た。金濃度 0、0.6、1、2、4、10 mM の反応液から得られた試料を、それぞれ CaP/Au-0、CaP/Au-0.6、CaP/Au-1、CaP/Au-2、CaP/Au-4、CaP/Au-10 とした。

3. 構造・組成・蛍光能の評価

得られた試料を透過電子顕微鏡（TEM）観察用銅グリット上で乾燥させ、TEM により構造を調べた。また、シリコン板上で乾燥させた試料の組成を、エネルギー分散型 X 線分光法（EDS）により調べた。さらに、得られた試料を王水に溶解し、溶解液に含まれる金の量を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP）により測定した。また、得られた試料を注射用水に懸濁し、蛍光分光法により蛍光能を調べた。

4. 細胞毒性・細胞標識能の評価

試料（CaP/Au-0.6、試料中金濃度 100～400 μM）ならびに AuNC 単体（比較用、金濃度 400 μM）をマウスマクロファージ様細胞（RAW264.7）に暴露し、37℃で 24 時間インキュベーションした。その後、細胞数測定キット（Cell Counting Kit-8）を用いた細胞毒性試験、および顕微鏡観察による細胞標識能評価を行った。

結果および考察

1. 構造・組成の評価

得られた試料の TEM 像を図 1a に示す。AuNC を含まない反応液から作製した CaP/Au-0 では、様々な形状・サイズの粒子生成が確認された。一方、AuNC を含む反応液から作製した CaP/Au-0.6、1、2、4、10 は、いずれも数 nm サイズの微粒子を高密度に担持・固定化した球形ナノ粒子であり、EDS スペクトルにおいて Au、Ca、P、O のピークが検出された（図 1b）。これらの反応液からは、CaP のマトリックスに AuNC が担持された Au - CaP が生成したと考えられた。反応液中の金濃度の増加に伴い、球形ナノ粒子の平均粒子径は 91 nm（CaP/Au-0.6）から 35 nm（CaP/Au-10）に減少した（図 1a）。また、EDS および ICP 分析の結果より、反応液中の金濃度の増加に伴い、試料の金含有量（Au／Ca の物質量比）が増大することが確認された。表面にグルタチオン由来のカルボキシ基やアミノ基を有する AuNC が、CaP の核形成・成長プロセスに関与し、粒子径や組成に影響を与えたと考えられる。以上、反応液中の金濃度を調節することで、様々な粒子径、AuNC 担持量を有する Au - CaP を作製できることが分かった。

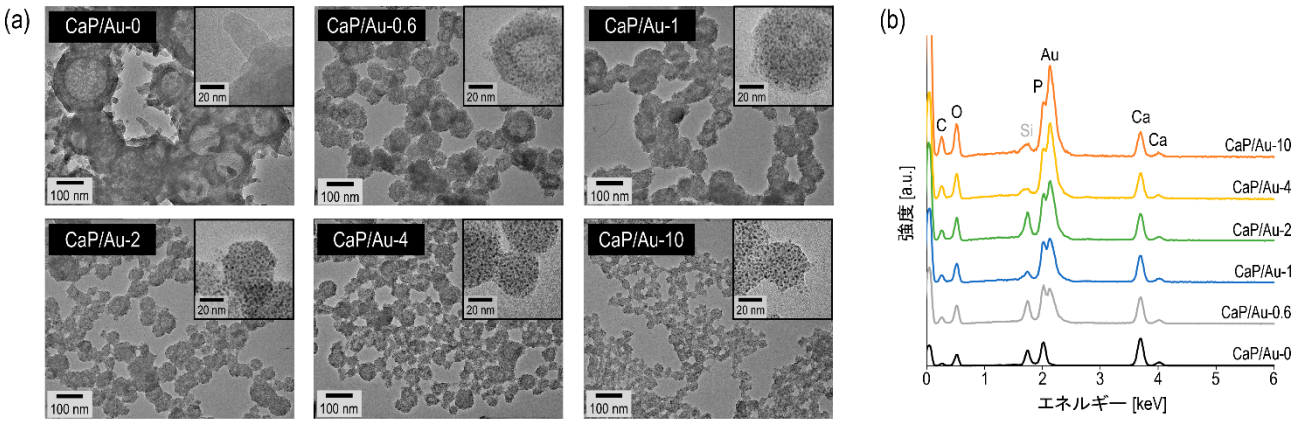


図 1. 得られた試料の構造・組成解析結果

TEM 観察、EDS スペクトル分析により試料の構造・組成を調査した。[7] の図を改変。

a) 得られた試料の TEM 像。

b) 得られた試料の EDS スペクトル。

2. 蛍光能の評価

図 2 に Au - CaP の蛍光分析結果を示す。いずれの Au - CaP も、AuNC 単体と同様に 570 nm 付近に最大蛍光波長を有することが確認された（図 2a)。次に、各 Au - CaP の金含有量より、金元素 1 物質量あたりの蛍光強度（570 nm）を算出した（図 2b)。その結果、AuNC 単体と比較して、CaP/Au-0.6、CaP/Au-1、CaP/Au-2、CaP/Au-4、および CaP/Au-10 は、それぞれ 140 倍、121 倍、92 倍、58 倍および 33 倍高い値を示した。AuNC が CaP マトリックスに、高密度で担持・固定化されたことによる凝集励起発光現象（AuNC 間の相互作用や AuNC のブラウン運動制限による動的消光抑制などによる発光増強）の発現が主な要因と推察される。作製した Au - CaP において、最も高い蛍光強度を示した CaP/Au-0.6 を用いて細胞実験を行った。

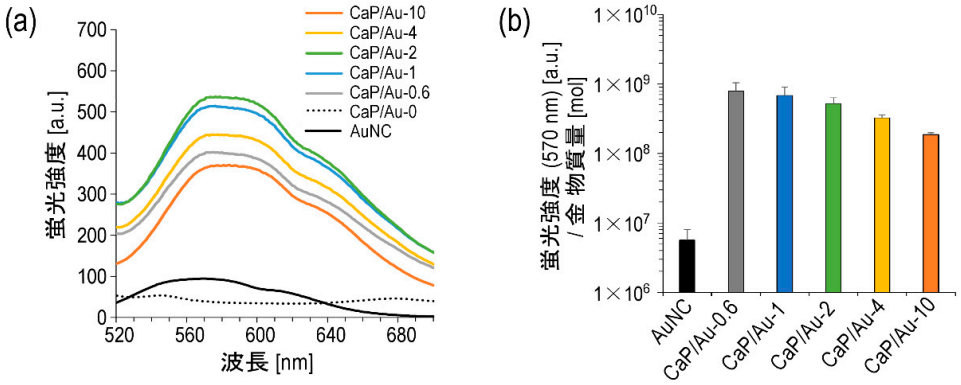


図 2. 得られた試料の蛍光分析結果

得られた試料の蛍光能を調査した。［7］の図を改変。

a) 各試料の蛍光スペクトル（励起光：460 nm）。

b) 金の 1 物質量あたりの蛍光強度（570 nm）。値は平均＋標準偏差（n＝3）。

3. 細胞毒性試験・細胞標識能評価

図 3a に細胞毒性試験の結果を示す。CaP/Au-0.6 を暴露した細胞の生存率は、非暴露細胞のそれと同程度であり、有意な差は認められなかった。また顕微鏡画像（図 3b）からも、CaP/Au-0.6 暴露による細胞サイズ・形状の顕著な変化は確認されなかった。以上より、今回の試験条件では CaP/Au-0.6 の細胞毒性は認められなかった。

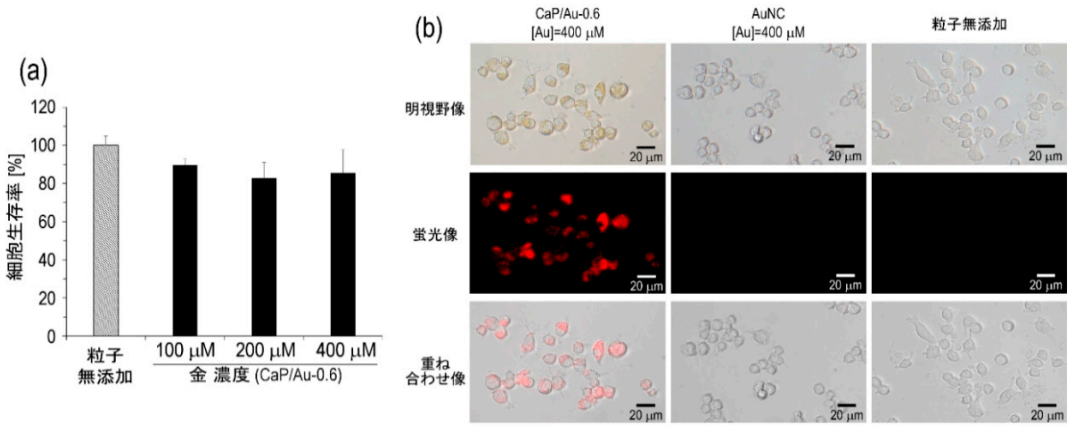


図 3. 細胞毒性試験の結果および顕微鏡画像

CaP/Au-0.6 の細胞毒性および細胞標識能を調査した。［7］の図を改変。

a) 細胞生存率（分散分析、p＝0.096、p＜0.05 を有意差ありとした）。

b) 顕微鏡画像（蛍光像：励起 520～550 nm、蛍光＞580 nm）。

次に、顕微鏡観察により CaP/Au-0.6 および AuNC の細胞標識能を評価した。図 3b 上段に、各試料を 24 時間暴露した細胞の明視野像を示す。非暴露細胞と AuNC 暴露細胞の間に、大きな違いは認められなかった。一方、CaP/Au-0.6 暴露細胞は、AuNC により黄色に染色されている様子を確認できた。AuNC は凝集すると黄色以外の色を呈することから、細胞内に導入された AuNC は分散状態を保持していると推定された。また、蛍光顕微鏡観察において（図 3b 中段、下段）、AuNC 単体では細胞を可視化できなかったのに対し、CaP/Au-0.6 では細胞を明瞭に可視化できた。以上、CaP との複合化によって、AuNC の細胞標識能を向上できることを明らかにした。

今後、本研究で得られた知見をもとに、異なる細胞種に対する Au - CaP の標識能や X 線 CT 造影能などを検討し、蛍光・X 線 CT のバイモーダルイメージングによる移植細胞の長期全身追跡の実現につなげていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所ナノ材料研究部門ナノバイオ材料応用グループの大矢根綾子博士、中村真紀博士である。本研究をご支援いただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝いたします。

文　献

1） Cha Y, Park T.Y, Leblanc P, Kim K.S. Current status and future perspectives on stem cell-based therapies for parkinson's disease. Journal of Movement Disorders. 2022 Oct 29;16(1):22-41. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36628428 DOI: 10.14802/jmd.22141

2） Han J, Zhang B, Zheng S, Jiang Y, Zhang X, Mao K. The progress and prospects of immune cell therapy for the treatment of cancer. Cell Transplantation. 2024 Jan 26; 33:1-20. Epub 2024 Mar 3. PMID: 38433349. DOI: 10.1177/09636897241231892

3） Zhou C, Long M, Qin Y, Sun X, Zheng J. Luminescent gold nanoparticles with efficient renal clearance. Angewandte Chemie International Edition. 2011 Mar 28; 50:3168-3172. Epub 2011 Mar 4. PMID: 21374769. DOI: 10.1002/anie.201007321

4） Zhang C, Zhou Z, Qian Q, Gao G, Li C, Feng L, Wang Q, Cui D. Glutathione-capped fluorescent gold nanoclusters for dual-modal fluorescence/X-ray computed tomography imaging. Journal of Materials Chemistry B. 2013 Oct 14;1(38):5045-5053. Epub 2013 Aug 21. PMID: 32261095 DOI: 10.1039/c3tb20784f

5） Inose T, Kitamura N, Takano-Kasuya M, Tokunaga M, Une N, Kato C, Tayama M, Kobayashi Y, Yamauchi N, Nagao D, Aimiya T, Furusawa N, Nakano Y, Kobayashi Y, Gonda K. Development of X-ray contrast agents using single nanometer-sized gold nanoparticles and lactoferrin complex and their application in vascular imaging. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021 Mar 29;203:111732. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33839472 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111732

6） Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, Sokolova V. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. Journal of Materials Chemistry. 2009 Oct 1;20:18-23. Epub 2010 Jan 7. DOI: org/10.1039/B910885H

7） Inose T, Nakamura M, Oyane A. Fabrication of high-fluorescence composite nanoparticles of gold nanoclusters and calcium phosphate for macrophage imaging. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2023 Jun 24;444(1):114955. Epub 2023 Jun 20. DOI: org/10.1016/j.jphotochem.2023.114955