

報告番号	※ 甲 第 11062 号
------	---------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 生体内投与を想定したAuナノ粒子と生体分子の吸着反応に関する研究

氏 名 塚田 千恵

論 文 内 容 の 要 旨

近年、様々な分野でナノテクノロジーが注目されているが、その一方で、ナノ材料の安全性についての懸念も提唱されている。ナノ材料の中でもAuナノ粒子は医療分野でがんの温熱療法やドラッグデリバリーなどへの応用に注目が集まっており、細胞実験などで安全性の評価が実施されている。しかし、その評価で使用されるAuナノ粒子は分散剤や還元剤といった高分子などの試薬を用いて作製されており、ナノ粒子表面がそれら試薬によって覆われていると考えられるため、ナノ粒子そのものの安全性について評価できているとは言い難い。さらに、安全性評価は、壊死した細胞の個数の集計により結論付けていることが多く、生体分子とAuナノ粒子の間に生じる吸着反応について分光学的手法を用いた化学状態分析などのミクロスコピックな視点からの議論はほとんどされていない。また、これは生体適合性の高いナノ粒子の作製を目指して生体分子をナノ粒子表面に修飾した場合の材料の評価方法に対しても同様である。生体内には様々な分子やpHなどの環境があり複雑なため、本研究では対象物質以外は不純物と考え、それらが存在しないシンプルな系を分子吸着反応の実験系とした。よって、Auナノ粒子は分散剤や還元剤を用いずにAuロッド、蒸留水、電解質のみで作製した。また、生体環境を模すために水環境下で分子吸着反応を促すことにした。

生体内にAuナノ粒子が投与された場合を想定し、生体分子の中でも金属との吸着反応活性が高いチオール基(-SH)をもつアミノ酸のL-システイン、および細胞膜の脂質二重層を主に構成するフォスファチジルコリン(PC)から成るリポソームとAuナノ粒子との吸着反応に着目した。リポソームは細胞膜モデルとして用いられているため、Auナノ粒子が直接、細胞膜に吸着して医薬品としての作用が可能かどうかの知見が得られると考え、使用した。さらに、分散剤などを用いて作製したAuナノ粒子に対してその表面をPCで修飾すると生体適合性が向上したとの報告から、更なる生体適合性の高いナノ粒子の作製を目指し、液中プラズマ法で準備したAuナノ粒子を用いてPC修飾Auナノ粒子の作製を試みた。また、化学状態分析に加え、Auナノ粒子が生体内に投与された際にナノ粒子が凝集すると、血管を塞いでしまう可能性があるため、吸着反応後の粒子のふるまいについても注目した。

よって、Auナノ粒子とL-システイン、またはPCおよびPCリポソームとの分子吸着反応および反応前後のふるまいについて、様々な分光学的手法や顕微鏡観察を用い

て明らかにすることを目的とした。また、吸着分子の化学状態分析には放射光X線を用いた吸収端近傍X線吸収微細構造法(NEXAFS)が有用であるが、一方で、X線の照射により生体分子の結合の解離や脱離が生じるという放射線損傷が起こると報告されているため、本研究の試料系に対する放射線損傷についても調査を行い、結果に応じた測定系の工夫を行った。以下、各章ごとに本論文の要約を示す。

第1章 序論

ナノ粒子の安全性評価の必要性、分子吸着反応から評価することの重要性、試料作製の工夫点、分子吸着反応系(Auナノ粒子、L-システイン、リポソーム)の選択理由、放射光利用実験で注意すべき点、生体適合性の高いナノ粒子の作製に対する提案について述べた。

第2章 試料作製と実験手法

本研究で用いたAuナノ粒子コロイド水溶液の作製手法である液中プラズマ法について述べた後、各実験手法として、NEXAFS、原子間力顕微鏡(AFM)、X線光電子分光法(XPS)、紫外・可視分光法(UV-Vis)、透過型電子顕微鏡法(TEM)、赤外顕微分光法(IR)について概要を記述した。

第3章 Auナノ粒子表面に吸着したL-システインの放射線損傷

Auナノ粒子表面に吸着した生体分子の化学状態分析に有用なNEXAFS測定において、放射光X線の照射により生体分子が解離してスペクトル変化を生じることが懸念されたため、放射線損傷の影響について調べた。Auナノ粒子とL-システインを吸着反応させた試料に対して窒素(N)及び酸素(O)-K吸収端領域の放射光X線を照射すると、-SH基で吸着したシステインは、Auナノ粒子からの光電子やオージェ電子によりAu-S結合が解離して脱離したことや、オージェ電子刺激イオン脱離によりN-C結合が解離してNH₂やNH₃⁺の脱離が生じたことが示唆された。よって、放射線損傷による測定スペクトルの変化を抑えるために、適宜試料位置を移動させて、同じ位置に長時間、X線を照射することを避けながら測定を行う必要があるという指針が得られた。

第4章 Auナノ粒子とL-システインの水環境下での吸着反応

生体内での分子吸着反応を明らかにするために、水環境下でAuナノ粒子とL-システインの吸着反応を促し、時間経過に伴う化学状態変化と粒子径変化に注目して実験を行った。第3章では乾燥状態での試料に対する放射線損傷の影響を示したが、本章では水を保持した状態での放射線損傷について考察した。放射光X線の照射により生じる水由来のラジカルの緩和時間が、次に入射されるX線までのパルス幅と同等もしくはそれよりも短い場合は放射線損傷が生じにくいと考え、本章で硫黄(S)-K吸収端NEXAFS測定に用いた広島大学放射光科学研究センターBL-3での測定データからも45～60分程度はスペクトル変化がほとんど見られないことを確かめた。システインがAuナノ粒子表面に-SH基で吸着した後、システインチオレートや原子状硫黄への解離、さらに2つのシステインチオレートがジスルフィド(S-S)結合を形成して生じたシスチン、原子状硫黄にH₂Oが配位して生じたSO_x(x=2～4)が生成されることが分かった。また、Auナノ粒子はシステイン吸着種のカルボキシル基やアミノ基で互いに水素結合することにより凝集したと考えられる。

第5章 Auナノ粒子とPCリポソームの吸着反応

Auナノ粒子が生体内に投与された際に生体の細胞膜に吸着して細胞内部に取り込まれる可能性を考え、PCを用いて細胞膜モデルのリポソームを作製した後、Auナノ粒子との吸着反応を調べた。Auナノ粒子はPCリポソームの外側に吸着し、内側には取り込まれないことが分かった。これは、PCリポソームを構成するPCの疎水基部分の炭化水素鎖同士で分子間力が生じているためと考えられる。また、PCは親水基と疎水基をもつ分子であるが、Auナノ粒子表面にN-CH₃、PO₄、O-C、O=Cで反応していることが分かったため、主に親水基部分で吸着していると考えられる。さらに、Auナノ粒子がPCリポソーム表面に吸着する過程として、一つ目にAuナノ粒子がそのままリポソームに吸着すること、二つ目にリポソームの形成に寄与していないPCがAuナノ粒子表面を覆った後にそのナノ粒子がPCリポソームに吸着することが考えられた。よって、生体内に投与されたAuナノ粒子が細胞膜に吸着することが推測された。

第6章 PC修飾したAuナノ粒子の作製とそのふるまい

生体適合性の高いAuナノ粒子の作製を考え、液中プラズマ法で準備したAuナノ粒子表面にPCを吸着させて表面修飾を行い、そのふるまいを明らかにした。Auナノ粒子を覆った膜の形成は、PCがAuナノ粒子表面に主に親水基部分で吸着した後に疎水基の炭化水素鎖の-CH₂同士で分子間力を生じて自己組織化膜のようになって生成したと予測された。また、PC修飾Auナノ粒子は、ナノ粒子表面に吸着したPCの炭化水素鎖が入り組んだように重なり合った状態で互いに分子間力を生じ、凝集したと考えられる。分光学的手法(IR分光法)からはPCが密な膜を形成していることが推測されたが、実際にAuナノ粒子表面の全体に対して密に存在しているのかは分からない。もしも密な膜が形成されていない場合は、システインのような小さな生体分子との吸着反応において、第4章で論じたようなAuナノ粒子表面との分子吸着反応を生じると考えられるため、PC修飾の有無による比較を行う必要がある。また、作製したPC修飾Auナノ粒子を生体内に投与するためには、凝集した状態ではなく、PC膜を保持しながら溶媒中に再分散した状態にすることが重要と考えるが、その方法については今後の課題である。

第7章 結論

本論文を総括し、今後の展望について述べた。本研究では、生体内にAuナノ粒子を投与した場合を想定し、L-システインやPCリポソームとの吸着反応について明らかにした。また、生体適合性の高いナノ粒子の作製を目指してPC修飾したAuナノ粒子の作製を試み、修飾後のふるまいを解明した。さらに、吸着分子の化学状態分析に有用である放射光X線を用いたNEXAFS測定において、Auナノ粒子表面に吸着した生体分子の放射線損傷についても考察を行った。

Auナノ粒子はPCリポソーム表面に吸着していたため、実際の細胞膜の表面にも吸着し、直接作用できる要因になると考えられる。Auナノ粒子が生体内に投与された場合、Auナノ粒子は生体分子と吸着反応を生じ、凝集することが予測された。Auナノ粒子を医療分野で実用するためには、分子吸着反応を生じないような表面修飾の工夫や、試料作製時に凝集した場合でも再分散させる操作が必要になると考えられる。また、Auナノ粒子表面に吸着した生体分子に対するNEXAFS測定では、放射線損傷を生じる可能性が示唆されたため、試料位置を移動させつつNEXAFS測定を行う等の工夫が必要であることが分かった。

本研究では、生体内で生じるナノ粒子の分子吸着反応について、これまで困難で

あった水環境下での反応を分光学的手法から明らかにし、さらにナノ粒子の凝集要因やリポソームに対する存在位置など顕微鏡観察と併せて複合的な考察を行った。その結果、生体内で生じる反応を分子レベルのミクロスコピックな視点から明らかにできる知見を得たといえる。さらに、材料の作製を行った際に、動物や細胞を用いた実験のみならず、分子レベルでの吸着反応を明らかにすることの重要性を提案できたと考える。