

蛍光バイオイメージング剤を指向した 近赤外光増強型シリカ被覆金ナノロッドの開発

Development of silica-coated gold nanorods for enhancement of near-infrared light aiming at fluorescence bioimaging agents

和歌山大学システム工学部精密物質学科 准教授 中原 佳夫
Faculty of Systems Engineering, Wakayama University, Yoshio Nakahara

要旨

現在までに開発された蛍光バイオイメージング剤のほとんどは可視領域で発光するため、ヘモグロビンや水の吸収領域と重なり、生体透過性が低く、その利用には限界がある。そこで現在注目を集めているのが、「生体の窓」と呼ばれる生体透過性の高い近赤外領域の光を利用することであるが、一般的な蛍光色素から得られる近赤外光は強度が低いことが問題とされている。一方で、金ナノロッドは局在表面プラズモンに由来する増強電場によって、その近傍に存在する蛍光色素の発光効率を飛躍的に増強させる効果が知られているため、本研究では金内包シリカナノロッドを作製し、多孔質なシリカ層に近赤外蛍光色素 (Nile Blue A) を固定化することで、色素からの近赤外光を効果的に増強させることを試みた。結果として、金を内包していないシリカナノロッドに固定化した場合と比較して、金内包シリカナノロッドに固定化した場合には、Nile Blue A の 660 nm における蛍光強度を約 4 倍増強できることが示された。

1. はじめに

蛍光バイオイメージングとは、目的とする細胞などを蛍光色素によって光らせ、その分布や動態をリアルタイムで観察することである。この技術を応用することでガンの手術中に他の部位への転移の有無や、内臓脂肪を光らせて観察することでメタボリックシンドロームが動脈硬化や糖尿病を引き起こす詳細なメカニズムが明らかとなることなどが期待されている。このように細胞を蛍光で染色する物質としては、量子ドットや希土類金属内包ナノ粒子などの蛍光性ナノ粒子が一般的に検討されている。

一方で、従来のバイオイメージング剤に用いられる蛍光性ナノ粒子のほとんどは可視領域で発光するため、ヘモグロビンなどの生体分子の吸収領域と重なり、生体透過性が低く、その利用には限界がある。そこで現在注目を集めているのが、「生体の窓」と呼ばれる生体透過性の高い近赤外領域の光を利用することである。なかでも、650 ~ 900 nm の波長領域は、生体分子に由来する自家蛍光がほとんどなく、生体組

織をイメージングするために適している波長範囲である。この領域の光は生体透過性に優れているが、蛍光強度が比較的低いことが課題として挙げられる。したがって、近赤外領域の光を利用するためには、その光を効果的に増強させる必要がある。

金ナノロッド (Au NR) とは棒状の金ナノ粒子のことであり、光の波長が粒子の大きさに匹敵し、ナノ粒子の自由電子が集団振動に関与している場合に限り、局在表面プラズモン (Localized surface plasmon: LSP) と呼ばれる現象を示す。LSP には重要な効果が 2 つある。1 つは、ある条件のもとに光の振動と共鳴することである。光の振動が LSP と共鳴したとき、光のエネルギーは金属の中に吸収され、これを局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) という。金ナノロッドでは、長軸と短軸の比であるアスペクト比を制御することで、LSPR によって可視から近赤外領域までの幅広い波長領域の光を吸収する。もう 1 つは、粒子表面に著しく増強された電場が発生することである。す

なわち、この電場内に蛍光色素が存在するとき、その発光効率が飛躍的に増加することが知られている。

以上のことをふまえ、本研究では生体透過性に優れた蛍光バイオイメージング剤の開発を目指して、金内包シリカナノロッドを作製し、さらに多孔質なシリカ層に近赤外蛍光色素である Nile Blue A を導入した (Fig. 1)。また参照物質として、金を内包していないシリカナノロッドに対しても同様に色素を固定化し、両者の蛍光強度を比較することで、金ナノロッドの LSP による色素の蛍光増強効果について定量的に検討した。

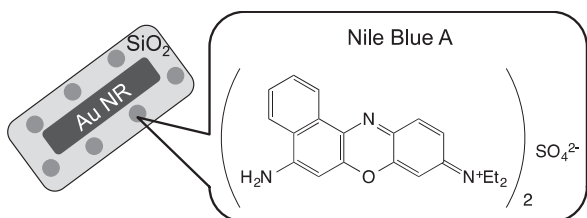


Fig. 1. 近赤外蛍光色素導入金内包シリカナノロッドの概念図

2. 実験方法

金ナノロッドは、一般的にはカチオン性界面活性剤の一種であるセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を用いて作製されるが、CTAB は生体毒性を示すことが知られていることから¹¹、本研究では CTAB を使用しない合成法を採用した。合成スキームを Fig. 2 に示す。すなわち、文献記載の方法¹²に従い、非イオン性界面活性剤から形成される逆ミセル内で内表面にアミノ基を有する中空シリカナノロッドを作製し、さらにこれを鋳型として用い、シリカナノロッド内で金ナノ粒子を成長させることで、金内包シリカナノロッドを作製した。このとき、金ナノロッドのアスペクト比は、用いる非イオン性界面活性剤の親水基の長さを変更することで制御した。親水基であるオキシエチレン鎖の平均ユニット数が 10 および 20 である界面活性剤を用いて合成された金ナノロッドを、ここではそれぞれ Au NR 1 および 2 とする (Fig. 3)。

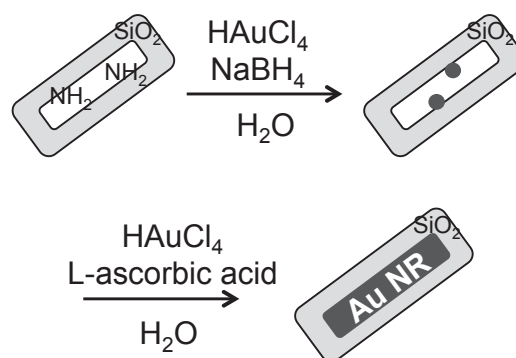


Fig. 2. 金内包シリカナノロッドの作製

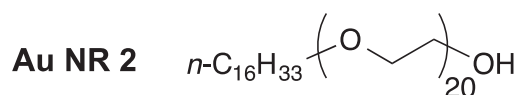
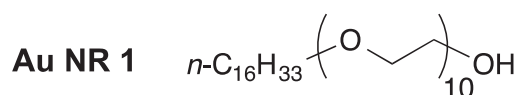


Fig. 3. 本研究で使用された非イオン性界面活性剤の化学構造

続いて、近赤外蛍光色素の金内包シリカナノロッドへの導入法について検討した。本手法で得られる金内包シリカナノロッドでは、外側のシリカ層は多孔質であるために、物理吸着によって導入できる。まず、近赤外蛍光色素をシリカ層に静電相互作用によって吸着させ、その状態でシリカ源であるテトラエトキシシラン (TEOS) を用いてゾルーゲル反応を行なうことで、近赤外蛍光色素を固定化した (Fig. 4)。色素としては、シリカ表面に吸着可能な正電荷を有する Nile Blue A について検討した。また、金を内包していないシリカナノロッドに同様の色素固定化処理を施したのも参照物質として作製した。得られた近赤外蛍光色素導入金内包シリカナノロッドはエタノールに分散させて蛍光スペクトルを測定し、金の有無やアスペクト比の違いが色素の蛍光特性に与える影響について調査した。

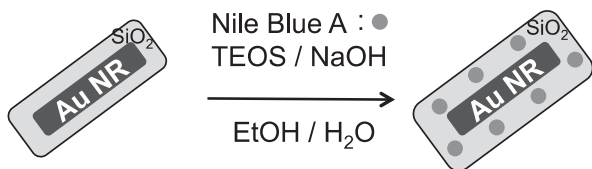


Fig. 4. 金内包シリカナノロッドへの近赤外蛍光色素の固定化

3. 実験結果

3.1. 金内包シリカナノロッド（近赤外蛍光色素導入前）の形状と分光光学特性

作製した金内包シリカナノロッドの透過型電子顕微鏡（TEM）画像を Fig. 5 に示す。いずれもナノロッドも 50-100 nm の大きさであり、TEM 画像から見積もったアスペクト比は、Au NR 1 では 3.32 ± 0.90 であり、Au NR 2 では 2.28 ± 0.59 であった。なお、近赤外蛍光色素の固定化後も、ナノロッドには形状変化はほとんど見られなかった。

また、金内包シリカナノロッドのエタノール分散液の吸収スペクトルを Fig. 6 に示す。金ナノロッドは長軸（LSPR）および短軸（TSPR）に由来する局在表面プラズモン共鳴を示すが、アスペクト比の大きな金ナノロッド（Au NR 1）の方が、LSPR および TSPR について、Au NR 2 よりも長波長側に観測された。

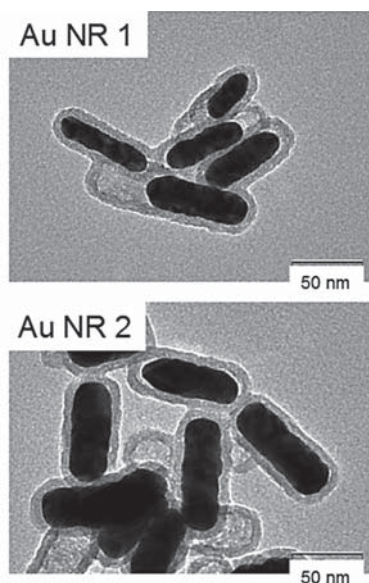


Fig. 5. 金内包シリカナノロッドの TEM 像

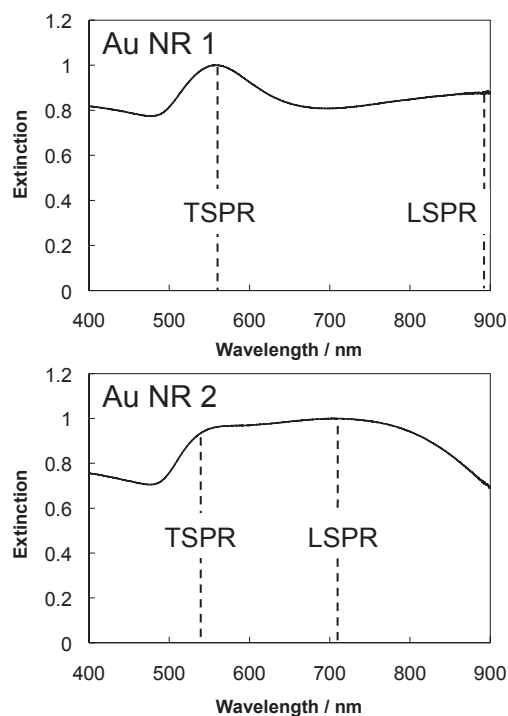


Fig. 6. 金内包シリカナノロッドのエタノール分散液の吸収スペクトル

なお、本研究で作製した金ナノロッドのプラズモン吸収帯は、理論式^[3]や文献^[2]よりも長波長側に観測された。これは、シリカ層の存在によって金ナノロッド周りの環境（屈折率）が変化したことに起因している^[4]。

3.2. 金ナノロッドによる近赤外蛍光色素の蛍光増強効果

作製した近赤外蛍光色素導入金内包および金を内包していないシリカナノロッドのエタノール分散液の蛍光スペクトルを Fig. 7 に示す（励起波長：600 nm）。Fig. 7 によれば、金内包シリカナノロッドでは、金を内包していないときと比較して、明らかに Nile Blue A に由来する蛍光が増大した。

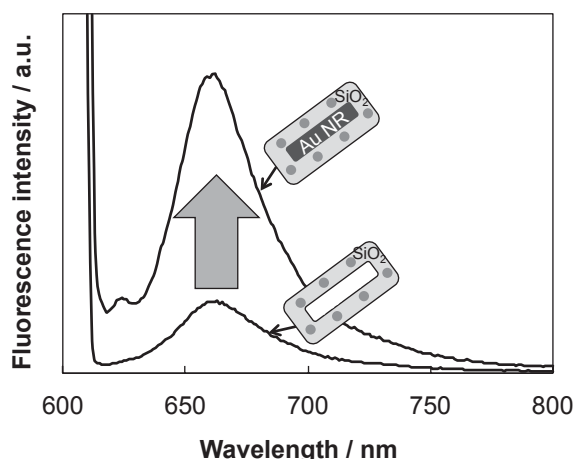


Fig. 7. 近赤外蛍光色素が導入された金内包および金を内包していないシリカナノロッドのエタノール分散液の蛍光スペクトル

続いて、金ナノロッドによる蛍光増強効果について定量的な検討がなされた。Fig. 8 は、Nile Blue A の 660 nm における蛍光強度を示しており、参照物質である金を内包していないシリカナノロッドに固定された Nile Blue A の蛍光強度を 1 として算出された値である。なおここでは、いずれの実験においても色素の導入量はほとんど同じであったため、色素濃度が蛍光強度に与える影響については考察しなくてもよい。結果として、Au NR 1 および 2 のどちらを用いても Nile Blue A の蛍光が増強される結果となったが、Au NR 1 を用いた方がより大きな増強効果が示された。これは、Au NR 1 の短軸由来のプラズモン吸収帯が Nile Blue A の極大吸収波長 (625 nm) に近いことから、表面プラズモンによってより効果的に蛍光が増強されたと考えている。これにより本研究では、色素の励起波長と金ナノロッドのプラズモン吸収帯をカップリングさせた方が、蛍光増強効果がより大きくなることが示された。

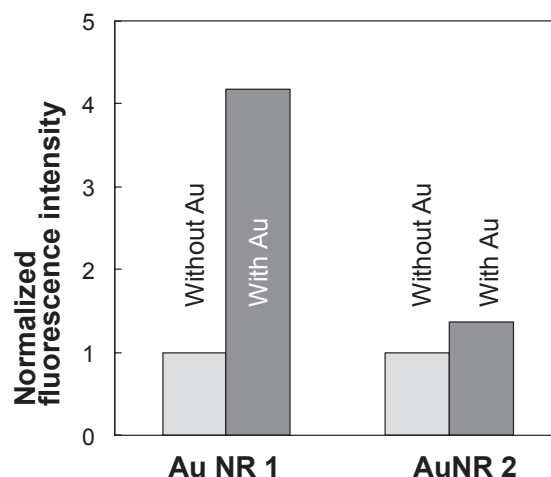


Fig. 8. 金ナノロッドによる蛍光増強効果の定量的検討

4. 結論

色素の励起波長と比較的近い位置にプラズモン吸収を示す金内包シリカナノロッドでは、外側の多孔質なシリカ層に存在する色素からの近赤外光を効果的に増強できることがわかった。今後は、シリカ表面を機能性化合物で化学修飾することにより、生体透過性に優れたバイオイメージング剤への応用が期待される。また、本手法でアスペクト比のより大きな金ナノロッドを作製することができれば、Nile Blue A のような有機蛍光色素だけでなく、量子ドットや希土類金属錯体などに由来する 1,000 nm 以上の波長域の近赤外光も効果的に増強できると考えている。

謝辞

本研究の成果は、公益財団法人京都技術科学センターの平成 26 年度研究開発助成金によるものであり、感謝申し上げます。

参考文献

- [1] A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small* **5**, 701-708 (2009).
- [2] C. Gao, Q. Zhang, Z. Lu and Y. Yin, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19706-19709 (2011).
- [3] C. Nasr and S. Hotchandani, *Chem. Mater.* **12**, 1529-1535 (2000).

[4] D. Nepal, L. F. Drummy, S. Biswas, K. Park and R. A. Vaia, *ACS Nano* **7**, 9064-9074 (2013).

研究成果発表

1) 武田涼子、中原佳夫、玉井聡行、木村恵一、
日本化学会第 95 春季年会、1C1-52、2015