

微小腫瘍の超早期診断・治療を実現する クロロフィル含有アパタイトナノ結晶の創製

長岡技術科学大学大学院 エネルギー・環境工学専攻 博士後期課程 1 年 (助成時)
同上 博士後期課程 2 年 (現 在)
劉 自振

【研究の背景と目的】

形態変化の微小な超早期段階のがん部位を蛍光内視鏡によって『安全・高感度に映し出し「その場で」治療できる材料』を創製できれば、がん診断・治療法が変革する。本研究では、高い生体安全性と発光特性をもつ無機・有機複合ナノ結晶創製による微小がん部位のイメージングと治療の両立が重要である。実用に向けて最初は複合ナノ結晶の配位状態制御及び細胞との反応メカニズムの解析が必要であった。そこで、本研究では骨の主成分である生体親和性の高いヒドロキシアパタイト (HA) に着眼し、HA の核形成段階で有機分子としてのクエン酸 (Cit) を添加し、湿式合成法により Cit 含有 HA ナノ結晶を合成した。次いで、Cit 含有 HA (Cit/HA) ナノ結晶の分散液をスピコートしてメソスケール空間を有する透明な Cit/HA ナノ結晶膜を創製した。更に、複合ナノ結晶の配位状態を制御し、ナノ結晶と細胞の反応メカニズムを詳しく解析すること、及びナノ結晶膜のタンパク質の立体吸着に対する促進効果、骨芽細胞に対する高い親和性を検証することを目的とした。

【研究実施項目とその内容】

Cit/HA 複合ナノ結晶の創製・配位状態制御と物性評価

骨の主成分である生体親和性の高い HA に着眼し、HA の核形成段階で有機分子としての Cit を添加し、湿式合成法により Cit 配位 HA ナノ結晶を合成した。HA の *a* 面に豊富に存在する Ca イオンを Cit の核形成場として機能させ、Cit が Ca イオンへ配位し、合成過程中的 Cit 添加量と熟成温度・時間を制御することで配位状態を制御できた。

Cit/HA 複合ナノ結晶膜の創製とナノ構造の制御

Cit/HA ナノ結晶間の立体障害と静電反発を利用して最適分散濃度のナノ結晶分散液を調製し、スピコート法で製膜した。複合ナノ結晶膜の透明度、表面状態、及び細孔構造の評価を行った。

ナノ結晶膜上でのタンパク質吸着特性及び細胞培養特性の評価

Cit/HA 複合ナノ結晶膜上でのタンパク質吸着と骨芽細胞培養実験を行った。単純な HA ナノ結晶膜と比べて、Cit/HA 複合ナノ結晶膜に吸着されたタンパク質が変性しにくく、立体構造を維持でき、さらに細胞の接着・増殖、および活性化を実現できた。

【研究の成果 (結果)】

X 線回折装置 (XRD) によりナノ結晶を評価し、HA に起因した回折ピークが観察され、HA の単相構造が確認された (図 1(a))。Cit 含有により低結晶化の傾向がみられ、Cit と Ca

イオンと配位し、HAの核形成が抑制されたと考えられる。フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を用いて Cit/HA ナノ結晶中の Cit の配位状態を評価した。C=O 伸縮振動に着目した 1662-1645 cm^{-1} におけるスペクトルの二次微分結果を図 1(b) に示す。Cit と比較して、ナノ結晶中の C=O 伸縮振動が低エネルギー側にシフトした。これはナノ結晶表面で Cit と Ca イオンと配位した結合体が形成したと考えられる。複合ナノ結晶膜のナノ構造を評価するために、窒素吸脱着等温線と細孔径分布の測定を行った (図 2)。Cit/HA ナノ結晶膜は IUPAC で定義されている典型的な IV(a) 型等温線を持ち、4.2 nm のナノ空隙が確認された。

ナノ結晶膜上でのウシ胎児血清 (FBS) の吸着実験を行った。FBS タンパク質の吸着は主に膜中のナノ空隙に集中していると仮定すると、図 3(a) に Cit/HA ナノ結晶膜上の単位容積あたりの FBS タンパク質の吸着量と吸着状態のイメージ図を示す。Cit 含有量の増加に伴い、タンパク質の吸着量も増大する傾向が確認された。また、市販の組織培養ポリスチレン (TCPS) を用いて骨芽細胞培養の対照実験を行った (図 3(b, c))。Cit/HA ナノ結晶膜上での細胞培養は 48 時間後の接着密度が TCPS より高く、高機能に培養されている紡錘状細胞の形状を示し、優れた細胞培養特性を有することが確認された。当該 Cit/HA ナノ結晶表面にクロロフィルを効率的に固定できており、今後、超早期診断・治療を実現するクロロフィル含有ナノ結晶としての応用が期待される。

【参考文献】

1. Z. Liu, D. Kawagoe and M. Tagaya, *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, **10**, 9599–9606.
2. Z. Liu, S. Yamada, Y. Otsuka, T. G. Peñafior Galindo and M. Tagaya, *Dalton Transactions*, 2022, **51**, 9572–9583.
3. Z. Liu, Y. Zhou, R. Kimura and M. Tagaya, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2023, **25**, 4025–4034.

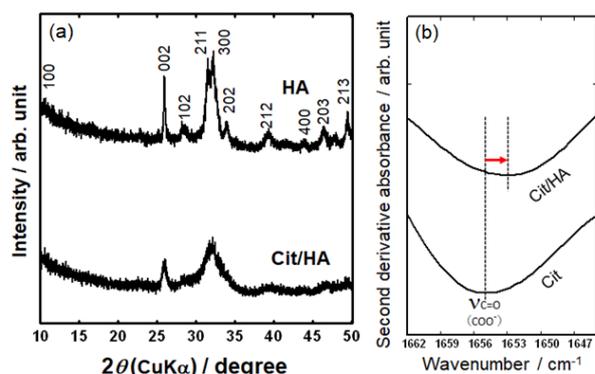


図 1. (a) HA と Cit/HA ナノ結晶の XRD パターン, (b) Cit/HA ナノ結晶と Cit の FT-IR スペクトルの二次微分結果。

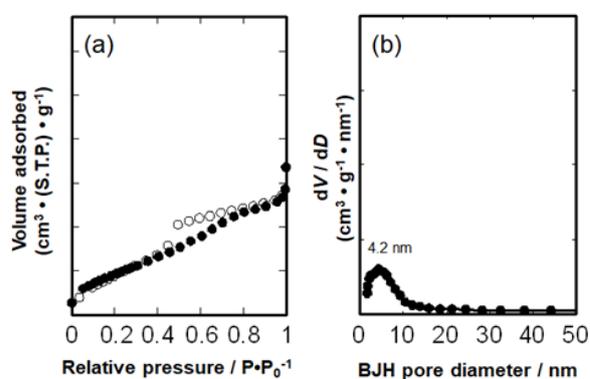


図 2. Cit/HA 複合ナノ結晶膜の(a) 窒素吸脱着等温線と(b) 細孔径分布の測定結果。

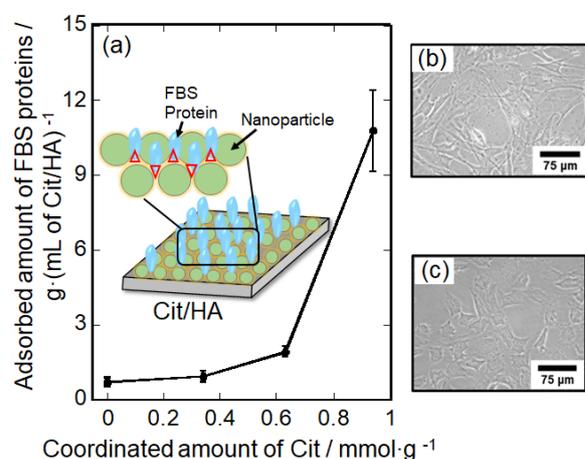


図 3. (a) Cit/HA ナノ結晶膜上の単位容積あたりの FBS タンパク質の吸着量と吸着状態のイメージ図 (Inset). 培養 48 時間後の(b) Cit/HA ナノ結晶膜と(c) TCPS 上での接着細胞の写真。