

【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-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°C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 物質あたりでの蛍光強度 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）の発現が主要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

