皮膚表皮でのナノマテリアルの動態と免疫応答の可視化 —ナノマテリアルに対する新たな安全性評価法の確立に向けて—

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

藤井文彦

Nanomaterials have been used in various fields, such as cosmetic products. The skin, as the primary interface between the body and the environment, provides the first line of defense against pathogens. We are especially interested in the motion of nanomaterials in the skin. In addition to three dimensional (3D) motion of nanomaterials, their rotational motion is also crucial to reveal their dynamics in tissue. To track nanomaterials at single particle level, first, we synthesized fluorescent probes based on semiconductor nanocrystals. In previous period, we reported on rod-shaped nanocrystals, quantum rods (QRs), for rotational measurement. In present period, we have developed a system that combines nanometry and nanomaterial science to simultaneously measure 3D and rotational motion. Then, we demonstrated simultaneous 3D and rotational single particle tracking of membrane receptors, CD36, in freshly isolated macrophages. The receptors were tracked three dimensionally at nanometer accuracy and had their relative orientations determined simultaneously. The combined technology presented here will be able to provide new information on motion and function of various nanomaterials in tissue, such as skin.

1. 緒 言

近年、ナノメーターサイズの物質を用いた化粧品やその 他の製品が数多く存在し、日常的にナノマテリアルに接す る機会が増えている。様々なナノマテリアルを化粧品に利 用していくためには、ナノマテリアルと生体間、特に皮膚 組織との相互作用を観察し、理解しなければならない。詳 細なナノマテリアルの体内動態と分子間相互作用を把握す るためには、高い時空間分解能をもった観察法を利用する ことが必要である。光を使った生体イメージングは、光の 回折限界や生体分子による多重散乱の問題を伴うものの、 生体分子や生きた細胞のダイナミクスを観るための強力な 手法である。量子ドット (QD) を含むナノメーターサイズ の半導体ナノ結晶は、蛍光タンパク質や色素の弱点を克服 できる次世代の蛍光イメージング用プローブである。本研 究では、光イメージング法と半導体ナノ結晶を用いて、ナ ノマテリアルの動態とそれに対する免疫応答を皮膚表皮で 明らかにし、化粧品の安全性に関する新たな評価法を提案 することを目的としている。上記の目的のために、去年度 はシリカ被覆ナノ粒子や超高輝度ナノ粒子に加えて、回転 運動を可視化するために棒状の半導体ナノ結晶、量子ロッ ド (Quantum rod : QR) を合成した。今年度は特にこの QRに注目して、ナノ粒子の回転運動の可視化を1粒子精 度で行った。1例として、免疫細胞の膜上受容体をQRで 標識し、受容体の回転運動を可視化することに成功した。



Visualization for movement of nanomaterials and immune responses to them in epidermis – Toward establishment of a new safety evaluation method for nanomaterials –

Fumihiko Fujii

WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University 将来的には、本技術を2光子顕微鏡などの小動物観察用顕 微鏡に応用することによって、皮膚組織におけるこれまで に無い観察法を提案したい。

2. 実験方法

2.1 量子ロッド(Quantum rod:QR)の合成

QRはコア(CdSe)とシェル(CdS)から成る半導体のナ ノ結晶でありる。コアの合成は、tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO)、octadecylphosphonic acid (ODPA)、 cadmium oxide (CdO)およびTri-*n*-octylphosphine (TOP) の混合溶液を、窒素ガス雰囲気下で370℃まで加熱し、 TOPに溶解したSeを加えて行った。得られたCdSeのナ ノ結晶と、TOPO、ODPA、hexylphosphonic acid (HPA)、 CdOが入った溶液の温度を350℃に保ち、TOPに溶解した Sを加えてコアの周りにシェル構造を成長させた。

2.2 グルタチオン被覆 QR (Glutathione coated QR:GSH-QR)の合成

還元型グルタチオン (Glutathione:GSH)を用いて、以下の手順でQRを被覆した。QR溶液からクロロホルムを除いた後、QRをテトラヒドロフラン (Tetrahydrofuran: THF)に溶解した。GSH水溶液をQR溶液に加えて混合した後、70℃まで温度を上昇させた。混合溶液が2層に分離することを確認した後、遠心操作を行ってGSH-QRを回収した。得られたペレットに蒸留水を加えた後、カリウムブトキシド (Potassium *t*butoxide:KOBu_t)を加えることによって半透明のGSH-QR溶液を得た。

2.3 抗体付加 QR (Monoclonal antibody conjugated QR:mAb-QR)の合成

まず、GSH-QRの細胞膜への非特異的な吸着を抑制する ために、以下の手順でGSHのアミノ基にPEGを付加した。 GSH-QR溶液にクロスリンカー試薬としてsulfo-SMCCを 加えた後、続いてPEG-SHを加えて室温で2時間反応させ た。

次に、GSHのカルボキシル基に以下の手順で抗CD36抗 体を付加した。GSH-QR溶液にクロスリンカー試薬とし てEDCSulfo-NHSを加えた後、続いて抗CD36抗体を加え て4℃で一晩反応させた。最後にPEG-NH₂を加えること によって、未反応のカルボキシル基を終端した。

2.4 QRの物性評価

QR 溶液の蛍光スペクトルと量子収率は、それぞれ蛍光 光度計 (FP-6200, Jasco) と絶対量子収率測定装置 (C10027, Hamamatu photonics) を用いて測定した。QRの形状は、 カーボン支持膜がコートされた銅製グリット上にQR溶液 を載せて乾燥させた後、transmission electron microscope (H-800, Hitachi)を用いて観察した。GSH-QRの水和半径 とGSH-QRへの抗体の付加の評価は、それぞれZetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) とcompact FCS装置 (C9413-01MOD, Hamamatsu Photonics K.K., Japan)を用 いて行った。

2.5 マクロファージの単離と観察

腹腔由来のマクロファージは、6 – 10週例のC57BL/6 マウスから採取した。採集したマクロファージは、1.0× 10⁵cells/wellの密度で8-well LabTek chambers (Nalge Nunc International、Rochester, NY)に培養した。mAb-QRを加えた後のマクロファージの観察は、共焦点レーザ ー顕微鏡 (FV1000, Olympus)で、473nmの励起光と575 – 675nmの検出用フィルターを用いて行った。

2.6 回転と3次元運動観察用の顕微鏡の構築

回転運動および3次元運動を同時に観察するための顕微 鏡は、IX-71 (Olympus)、対物レンズ (Olympus 60X PlanApo, 1.45NA, oil)、リレー光学系 (GA01, G-angstrom, Japan)、 CCDカメラ (EM-CCD, Ixon DV887, Andor Technology plc., UK)、レーザー (J050BS-18-11-11, Showa optronics Co., Japan)を用いて構築した。

回転運動を解析するために、観察対象からの蛍光を偏光 ビームスプリッターを用いて分離し、3次元運動を解析す るために、分離した信号を凸型および凹型のレンズペアに 通し、信号をCCDカメラに導いた。

3. 結果と考察

3.1 QR, GSH-QR, mAb-QRの特性

量子ロッド (QR) は、量子ドット (QD) と同じく半導体 元素からなるナノサイズの結晶である^{1),2)}。QDと同様に 高輝度で光退色に耐性があり、サイズを変化させることに よって発光波長をnmステップで変えることが出来る。し たがって長時間このナノ結晶を生体中で追跡することが可 能であり、多色の光イメージングにも適している。QDに 似た特性に加えて、QRは細長い形状をしているため偏光 特性をもっており、QRで標識した生体分子の回転情報、 つまり方向を知ることができる。このナノマテリアルを使 って、皮膚表皮からのナノマテリアルの取り込みを、3次 元でトレースするだけでなく、回転情報を交えた詳細な情 報を得ることができる。そこで、QRを作製し、その特性 を調べた。

QRはコア (CdSe) とシェル (CdS) から成る構造をして おり、コアの周りにシェルを一定方向に伸長させることに よって得られる。得られたQRを透過型電子顕微鏡(TEM) で観察したところ、幅は平均4nm、長さは50nmであり、 縦横比 (Aspect ratio: AR) は13だった (Figure 1)。AR が5以上のときは偏光度は0.6以上となることから²⁾、得 られたQRの99%以上が0.6以上の偏光度をもつことが示 唆された。

得られた疎水性QRを水溶化するために、トリペプチド 鎖の1種である還元型グルタチオン (GSH)を用いてQR







Figure 2 Schematic representation for the preparation of GSH-QRs. Four pictures show that QRs in tetrahydrofuran (THF) (leftmost), after adding of GSH and heating at 70°C (second from left), in water (second from right) and after adding of potassium t-butoxide (KOBu_t) (rightmost).

を被覆した。Figure 2 に示したように、疎水性 QR と GSH 溶液を混合して熱を加え、脱プロトン化剤である KOBut を加えることで簡便に水溶化 QRを得ることが出来る。 GSHは、生体中にも存在する低分子化合物であり毒性が 低い。加えて、アミノ基とカルボキシル基の官能基をもつ ため、抗体等の生体分子を QR 表面に簡便に付加すること ができる。

疎水性QRとGSH-QRの蛍光スペクトルを比較したとこ ろ大差は無く(Figure 3)、両者の量子収率はそれぞれ49 および48%だった。半導体ナノ結晶は、水溶化の過程で 表面に欠陥が生じることによって、量子収率が著しく低下 することが知られている。したがって、ここで示した GSHを用いた被覆法は、簡便さに加えてQRの特性を損な わない水溶化法といえる。広く用いられているポリマー被 覆QR(Poly-QR)とサイズを比較した場合、半分程度の水 和半径であった(Figure 4 a)。従来の被覆法よりも小さな 水溶化QRを調製可能ということで、生体分子の標識にも より適した被覆法といえる。先に述べたGSHの利点とし て、GSH-QR表面に簡便に抗体を付加できることも確認し た(Figure 4 b)。

以上の特性をもったGSH-QRを標識剤として用いて、膜 受容体CD36の運動を観察した(Figure 5 a)。CD36は、 マクロファージの膜上に存在するスカベンジャーレセプタ ーの1種であり、様々なリガンドとの結合によって細胞質 中に移行することが知られている。ここでは、CD36の3 次元運動および回転運動を1分子の精度で観察することに よって、合成したQRの有用性を実証した。

QRをCD36に特異的に結合させるために、クロスリン カー試薬を用いてGSH-QRの表面に抗CD36抗体を付加し た(mAb-QR)。Figure 5 bに示したように、マクロファー ジの培養液にmAb-QRを加えることによって、マウス腹 腔由来のマクロファージが染色された。この現象は、非標 識の抗CD36抗体を事前に過剰に加えることによって阻害



Figure 3 (a) Fluorescent image of CdSe, CdSe/CdS (QRs) and GSH coated CdSe/CdS (GSH-QRs). (b) Normarized fluorescence spectra (lower panel) of CdSe, QRs and GSH-QRs.



Figure 4 (a) DLS histograms of GSH-QRs (blue line) and polymer coated QRs (Poly-QRs, red line). (b) Autocorrelation functions of GSH-QRs (blue line) and mAb-QRs (red line). The arrow marks an increase in QR diffusion time.



Figure 5 (a) Schematic description of the internalization of mAb-QR labeled CD36 from the cell membrane to the cytoplasm. (b) The merged image of fluorescent and differential interference contrast (DIC). Red represents mAb-QR signals through a band path filter (575-675 nm).

されたことから、目的どおり大部分のmAb-QRがCD36に 結合していることが確認できた。

2 回転と3次元運動を同時観察するための顕微鏡 の構築

CD36の回転運動および3次元運動を観察するために、



Figure 6 Optical setup for simultaneous 3D and rotational single particle tracking. $1/2\lambda$, 1/2 phase plate; S, slit; BS, beam splitter; L, lens; M, mirror; Pr, prism; CvC, convex cylindrical lens; and CnC, concave cylindrical lens.



Figure 7 Polarization dependency. (a) Fluorescent images of a single GSH-QR on a coverslip simultaneously recorded in p- (upper images) and s-polarizations (lower images). The detection angle was changed from 0° to 180°. (b) The relative fluorescence intensity of a single GSH-QR as a function of detection angle.

Figure 6 のような 2 つの特徴をもった光学系を組んだ。ま ず、回転運動を解析するために、QRからの偏光を偏光ビ ームスプリッターを用いて分離した。加えて、3次元運動 を解析するために、偏光ビームスプリッターを通した後の 信号をシリンド状のレンズペアを通過させた。

この光学系を用いて、QRの偏光を測定した。Figure 7a は1粒子のQRの蛍光像を示している。p偏光(上段の画像) とs偏光(下段の画像)に違いがあり、実際にQRが偏光特 性をもつことが確認された。検出角度を20度ステップで 変化させると蛍光強度が徐々に変化し、pとs偏光の蛍光 強度は対称性をもって変化した。したがって、pとs偏光の 強度比からQRの角度を見積もることが可能である (Figure 7b)。ちなみに、ここで測定したQRの偏光度は 0.8を超えており、多数のQRの偏光度を平均すると約0.6



Figure 8 3D measurements. (a) Fluorescence images of a single GSH-QR at various Z-positions ranging from -800 to 800nm. (b) Ellipticity as a function of Z-position at various polarized intensity ratios (-0.60 to 0.59).



Figure 9 Simultaneous 3D and rotational tracking of CD36 in macrophages. 3D movements of a single mAb-QR. The angle of the mAb-QRs is indicated by the color bar (bottom).

となっていた。

また、QRと対物レンズの距離を変化させたときの蛍光 像の楕円率を測定した。Figure 8aは1粒子のQRの蛍光像 を示している。対物レンズをQRから遠距離側へ移動させ ることによって、縦長だった蛍光像が横長へと変化した。 したがって、蛍光像の縦横比からQRのZ位置を見積もる ことが可能である(Figure 8b)。この顕微鏡では、偏光度 の影響を受けずに見積もれるZ位置は約1µmであった。

3.3 CD36の回転および3次元運動の同時観察

上述したmAb-QRおよび顕微鏡を用いて、マクロファ ージ膜上のCD36の運動を1分子精度で観察した。その1 例をFigure9に示した。このCD36は、緩慢な角度変化を 伴いながら、3次元位置を大きく変化させながら移動した。 この運動は、エンドソーム内に取り込まれたCD36が、エ ンドソームの動きに合わせて回転運動を伴い、細胞質に移 動する様子を示しているのかもしれない。別のCD36は、 激しく角度を変化させていたが、Z位置の変化はほとんど 観察されなかった。このCD36は、細胞表面の膜上で自由 に回転運動をしているが、細胞質への移動を伴っていない ことを示しているのかもしれない。

生体分子の回転運動を観察するために、従来は有機系色 素が使用されてきた^{3、4)}。それらの色素類は、蛍光強度が 低く、光退色性を有するなどの不十分な点がある。特に、 皮膚などの生体深部で蛍光を観察する場合は、2光子顕微 鏡を用いなければならないが、励起光強度が高いため、そ の弱点が顕著に現れる。ここで示した半導体ナノ結晶は、 それらの点を克服できる蛍光体である。加えて、半導体ナ ノ結晶は構成する元素を換えることによって、近赤外領域 に蛍光ピークをもつ量子収率の高い蛍光体を調製すること も可能である。近赤外領域の光は、ヘモグロビンおよび水 による吸収、その他の分子による散乱が少ないため、生体 に対する透過能が高い。これを利用することによって、皮 膚などの生体深部での観察が容易となる。

また、回転運動を観察には、金ナノロッドも使用されて きた⁵⁻⁸⁾。従来の生体イメージングでは、多種類の分子を 多色の色素で標識し、相対的な位置関係や相互作用の解析 が行われてきた。回転運動の観察でも、今後は多種類の分 子を観察する必要性が増えてくると推測する。しかしなが ら、金ナノロッドの測定では光散乱を検出するために、多 色イメージングには不向きである。一方、QRの吸収は短 波長領域の広範囲におよんでおり、蛍光スペクトルの半値 幅は約30nmと狭い。したがって、多種類のQRを1種類 の光源で励起し、得られた多色の蛍光を光学フィルターで 分離することにより、容易に多色イメージングが可能である。

以上の特性によって、多種類のナノマテリアルの動態を、 皮膚などの生体深部で観察する場合、ここで報告したQR と観察法が有効である。皮膚でのナノ粒子の動態はこれま でにも報告されてきたが、我々はナノマテリアルの回転情 報を得る技術を新たに確立した。

4. 総 括

本研究では、半導体ナノ結晶と光イメージング法を用い て、皮膚表皮におけるナノマテリアルの動態とそれに対す る免疫応答の可視化を目指した。前期は、回転情報を得る ための量子ロッド (Quantum rod:QR)、粒子径をコント ロールしたナノ粒子 (Silica coated nanoparticle:Si-NP)、 生体深部での追跡を可能とする超高輝度ナノ粒子 (Ultrablight nanoparticle:UB-NP)を開発した。今期は 特にQRに注目し、それを用いて回転および3次元運動の 同時観察を試みた。皮膚表皮での観察には至らなかったが、 QRで標識した免疫細胞膜上の受容体の回転および3次元 運動を1粒子精度で同時に観察することに成功した。この 技術を生体深部の観察法に拡張することによって、これま でに無い独創的な観察法を提案できる。

5. 謝 辞

本研究は、平成21年度コスメトロジー研究振興財団の 研究助成を受けて行ったものです。本成果は、渡邉朋信、 梅本英司、神隆、宮坂昌之、柳田敏雄、諸博士との共同研 究によるものです。特に、渡邉朋信博士には顕微鏡の構築 を、梅本英司博士には免疫細胞の実験を遂行いただきまし た。同助成会および諸博士に心より感謝いたします。

(参考文献)

- Peng, X. G., Manna, L., Yang, W. D., Wickham, J., Scher, E., Kadavanich, A., Alivisatos, A. P. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* 404, 59-61 (2000).
- 2) Hu, J. T., Li, L. S., Yang, W. D., Manna, L., Wang, L. W., Alivisatos, A. P. Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science* 292, 2060-2063 (2001).
- 3) Forkey, J. N., Quinlan, M. E., Shaw, M. A., Corrie, J. E. T., Goldman Y. E. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature* 422, 399-404 (2003).
- 4) Gould, T. J., Gunewardene, M. S., Gudheti, M. V., Verkhusha, V. V., Yinhttp://www.nature.com/nmeth/ journal/v5/n12/abs/nmeth.1271.html - a3, S., Gosse, J. A. and Hess, S. T. Nanoscale imaging of molecular positions and anisotropies. *Nature Methods* 5, 1027-1030 (2008).
- 5) Sonnichsen, C., Alivisatos, A.P. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett.* **5**, 301-304 (2005).
- 6) Failla, A. V., Qian, H., Qian, H., Hartschuh, A., Meixner, A. J. Orientational imaging of subwavelength Au particles with higher order laser modes. *Nano Lett.*6, 1374-1378 (2006).
- 7) Chang, W. S., Ha, J. W., Slaughter, L. S., Link, S. Plasmonic nanorod absorbers as orientation sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2781-2786 (2010).
- 8) Wang, G., Sun, W., Luo, Y., and Fang, N. Resolving rotational motions of nano-objects in engineered environments and live cells with gold nanorods and differential interference contrast microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16417-16422 (2010).