

補助事業番号 2022M-226

補助事業名 2022年低エネルギー外部刺激での熱変換ナノ材料の開発と

DDSへの応用補助事業

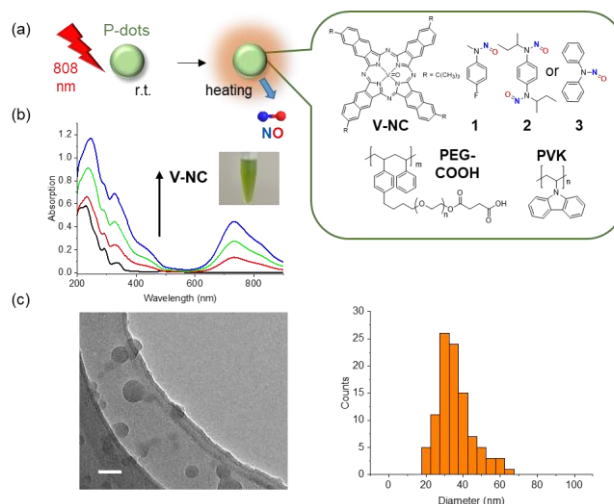
補助事業者名 大阪大学 小阪田泰子

1 研究の概要

効率的な抗菌剤の開発は、公衆衛生上重要である。細菌をその場で完全に不活性化させるために、外部刺激として光が用いられているが、光の波長域は可視光までと限られている。本研究では、バナジルナフタロシアニンをドーピングしたポリマードット (P-dots) を用いて、近赤外線と同時に発生する熱と一酸化窒素 (NO) による殺菌効果を調べた。バナジルナフタロシアニンと*N*-ニトロソ化合物を共添加したP-dotsは、近赤外光の照射により熱を発生し、NOを放出した。*N*-ニトロソ化合物は発熱により結合が解離しやすいものを用いると、NOの放出量は飛躍的に増大した。表皮ブドウ球菌と緑膿菌に対するP-dotsの抗菌効果は、熱とNOによるものであることが明らかになり、今回合成したP-dotsの抗菌剤としての可能性が示された。

2 研究の目的と背景

NOは、治療および生理学的な応用において重要な役割を果たしている。しかしNOは生理学的に短命 (<2秒) であるため、光照射によってその場でNOを放出することが望ましい。この目的のために、NO放出剤は、光照射時に細胞レベルでNOを放出できる小分子およびナノ材料を使用して開発されてきた。従来のNO放出剤は、NOケージ化合物または有機ニトロシル分子で修飾された無機ナノ粒子であった。例えば前者では、UV光によるNOケージ分子のN-N結合のホモリシスによる高性能ケージ化合物や、可視光下での光誘起電子移動トリガーNOリリーサーが開発されている。通常、これらの研究では最大650 nmまでの紫外から可視光が適用されるため、生体透過性の高い例えば、800 nmの近赤外 (NIR) 光などのより長い波長の光によって活性化できるNO放出ナノ材料の開発が望まれていた。



3 研究内容

<https://mec.isir-sanken.jp/labs/mec/wp-content/uploads/>

図 1. (a) 808 nm の NIR 光照射による NO と熱放出の模式図。(b) V-NC をドーピングした P-dots の吸収スペクトル。(c) TEM 画像と直径の分布を示すヒストグラム (研究成果の論文より転載)。

NIR光による光熱効果によるナノ粒子からの発熱とNO放出の模式図を図1aに示した。V-NCをフォトサーモフォアとして、*N*-ニトロソアミン分子をNOドナーとしてドーブした、P dotsを設計した(図1a)。

まず、V-NC P-dotsの光熱効果を調べるために、最初にV-NCドーブP-dots (P) を合成した。フォトサーモフォアとして、一重項酸素の形成を避けるためにV-NCを選択した。これは、一重項酸素の量子収率が低く ($\Phi = 0.003$)、光照射時の一重項酸素の細胞毒性を最小限に抑えるためである。以前に報告したナノ沈殿法両親媒性ポリマーであるPEG-COOHを使用して、生体適合性のある外殻を持つP-ドットを作成した。DLSで測定したPのサイズは、

流体力学的直径が115 nmであった。TEM画像からは、Pの平均直径が 40 ± 8 nm ($n = 100$)と見積もられた(図1c)。

Pの光熱効果Pの光熱効果は、最初にNIR808 nmレーザー光の照射下で2 mlのサンプルの温度変化を測定し、続いてレーザー照射なしで自然冷却する

ことによって計測した(図2a)。熱電対を備えたデジタル温度計を使用して、溶液の温度変化を測定しました(図2a)。808 nmのレーザー光を照射すると、溶液の温度は40分の光照射後に34度上昇したが、コントロールの水では、水温は照射後に5度程度の上昇しかみられなかった(図2a)。これらの結果から、Pの光熱変換効率率は66%であると見積もられ、市販の金ナノロッドに匹敵するものであった。

次に、NOの放出について検討した。NOを放出するP-dotsを合成するために、*N*-ニトロソア

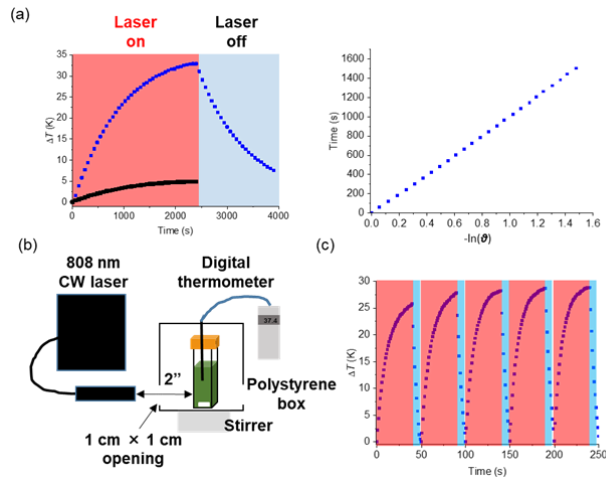


図 2. P の光熱効果。(a) V-NC (青)と、水 (黒)をドーブした P ドットの温度変化。(b) 光熱効果実験の模式図。(c)V-NC をドーブした P-dots の温度変化に対する安定性テスト。(研究成果の論文より転載)。

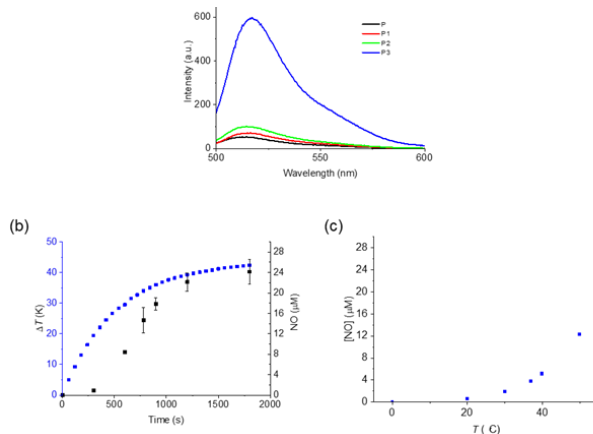


図 3。(a) 808 nm レーザー照射後に生成した NO の定量。蛍光プローブの蛍光スペクトル。(b) P3 の温度変化と対応する P3 からの NO 放出量。(c) 恒温槽で放置後 P3 から放出された NO の量。(研究成果の論文より転載)。

ミン誘導体1、2、または3をP-dotsに共ドーブして、それぞれP1、P2、およびP3を合成した。光化学的および熱的活性化により、N-N結合がホモリティックに切断してNOおよびアミニルラジカルを生成する。N-ニトロアミンをドーブしたP-dotsを合成した。TEM画像から決定したP1、P2、およびP3の平均直径は、それぞれ 24 ± 8 、 29 ± 9 、および 35 ± 8 nmであった ($n = 100$)。P-dotsのサイズはP-dots間でわずかに異なるが、これらのP-dots間で区別できるほどの光熱効果の差異は見られなかった。NIR光照射時に熱とNOを同時に放出するために、VNCおよびN-ニトロソアミン誘導体 (P1、P2、およびP3) を共ドーブしたP-dotsのNO放出を複数の方法で検証した。代表例として、蛍光プローブDAF-FMを用いて定量化した結果を記す。P3は、808 nmレーザー光 (0.43 W/cm^2)・10分の照射で9.3 mMのNO放出が見られた。一方、P、P1、およびP2は0.5 mM未満のNO放出にとどまった。P3は、光照射時の溶液温度の上昇に伴い、NOの放出量も増加した (図3b)。これらの結果は、NIR光照射により、P-dots、特にP3からNOが放出されることを示している。

最後に、今回作製したP-dotsの殺菌効果について検討した。P3は、NIR光照射時に熱を発生し、同時にNOを放出する。これにより、細菌の活性が阻害されるかをコロニーカウント法により評価した。その結果、表皮ブドウ球菌または緑膿菌にて、殺菌効果があることが分かり、効果的な抗菌剤になることを示唆する結果を得た。

以上、NIR光照射時に熱とNOを同時に生成する新しいP-dotsを合成した。V-NCおよびN-ニトロソアミンをドーブしたP-dotsは、NIR光照射時に効率的な熱とNOの生成を示した。これは、細菌の活性を阻害するのに十分であり、高い抗菌活性を達成するための効果的なアプローチであることを示した。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

近赤外線 (NIR) 光を抗菌効果に利用する意義は、熱の発生と一酸化窒素 (NO) の放出を同時に行い、細菌の活動を抑制できることである。バナジルナフタロシアニンとN-ニトロソ化合物を共添加したPドットは、NIR光の照射により発熱し、NOを放出する。N-ニトロソ化合物は発熱により結合が解離しやすいため、NOの放出量は飛躍的に増大した。このことから、近赤外光を用いることでPドットの抗菌効果を高めることができ、抗菌剤の候補として期待される。すなわち、P-dotsは、生成された熱とNOによって引き起こされる抗菌効果が明らかであり、抗菌剤としての潜在的な使用が示唆された。したがって、この研究は将来的には医療分野での利用や、工業的な微生物制御に役立つ可能性がある。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者は、これまでに、有機材料を用いたイメージングやそれらの触媒活性に関する研究を行ってきた。そのなかで、光でNOを発生させる材料が抗菌活性や将来的な治療の薬剤と

して機能することを知った。一方、その光には、生体透過性に乏しい紫外から可視光が用いられており、今後の生体応用を考えると、より長波長側の光、例えばNIRを用いることが有効であると考えた。しかし、これまでに、近赤外光を用いて効率よくNOを発生させた例は少なく、また、生体親和性を持たなければ、用いることができない。そういった観点で、有機ナノ材料を用いた例はこれまでになかった。

これらを解決する手段として、P-dotsを用いて、NIR光照射によって熱を発生すると同時に、NOを放出する材料について考え、さらに、その材料を用いた抗菌効果を示すことができれば、社会に大きく貢献できるのではないかと考えた。

以上の動機付けから、本研究では、NIR光照射によってNOを放出するナノ材料の開発に成功した。また、薬剤耐性を示す可能性のある細菌での抗菌作用を示すことができ、これらの結果から、将来的な薬剤としての可能性を期待でき、今後、さらに研究を進展させる機会を得た。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

原著論文 1報

Vanadyl Naphthalocyanine-Doped Polymer Dots for Near-Infrared Light-Induced Nitric Oxide Release and Bactericidal Effects

Zuoyue Liu, Yuta Okada, Yuma Ichinose, Daisuke Saitoh, Naoya Ieda, Seiji Yamasaki, Kunihiro Nishino, Hidehiko Nakagawa*, Mamoru Fujitsuka*, and Yasuko Osakada*

ACS Appl. Nano Mater. 2023, 6, 2, 1487-1495

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnm.2c05566>

7 補助事業に係る成果物

(1) 補助事業により作成したもの

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnm.2c05566>

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 大阪大学大学高等共創研究院

(オオサカダイガクコウトウキョウソウケンキュウイン)

住 所： 〒567-0047

大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1

担 当 者： 准教授 小阪田 泰子 (オサカダヤスコ)

担 当 部 署： 産業科学研究所 (サンギョウカガクケンキュウシヨ)

E - m a i l : yosakada@sanken.osaka-u.ac.jp

U R L : <https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/members/osakada/>