

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究
ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション

研究分担者 林 幸彦 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教

本研究は、ナノマテリアルの適切な物性解析、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。その中で、分担研究として、ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーションである。平成 27 年度（3 年計画の 1 年目）は、次のような成果を得た。金ナノ粒子および銀ナノ粒子を水溶液中で合成する方法を確立した。金ナノ粒子の一次粒径は 10 ~ 20 nm であったが、水中では一次粒径 10 nm 以下のナノ粒子や、粒径 100 ~ 200 nm の凝集体が存在することが明らかになった。ゼータ電位は +8.6 mV であった。銀ナノ粒子の一次粒径は 40 nm であり、水中では一次粒径 10 nm 以下のナノ粒子が存在していた。ゼータ電位は - 15.3 mV であった。金ナノ粒子は溶液濃度を高め、2 mg/mL にしても分散していたが、銀ナノ粒子は凝集しやすく、溶液濃度を 0.02 mg/mL 以上にすると沈降してしまった。銀ナノ粒子溶液の濃度を 2 mg/mL まで高めても安定な分散状態を保つことができるようにすることが今後の課題である。

A. 研究目的

金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成する。金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指す。

B. 研究方法

【使用した試薬】

硝酸銀（ ）（特級、キシダ化学）、Hexadecyltrimethylammonium bromide（CTAB）（Sigma-Aldrich）、D（+）-グルコース（特級、キシダ化学）、水酸化ナトリウム（特級、キシダ化学）、Gold（ ）chloride hydrate（Sigma-Aldrich）

【使用した評価機器】

透過型電子顕微鏡（TEM, H-800, Hitachi）、加圧システム（DelsaMax ASSIST, Beckman Coulter）付ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置（DelsaMaxPro, Beckman Coulter）、紫外 - 可視分光光度計（V-570, JASCO）

【合成方法】

< 金ナノ粒子の合成 >

1 M 塩化金酸水溶液 10 μ L を 5 mL の水で希釈した。また 1.1 g の CTAB を 4 mL の水に、水素化ほう素ナトリウム 0.91 mg を 1 mL の水に溶解させ、それぞれ水溶液を調製した。塩化金酸水溶液に CTAB 水溶液を加えたのち、水素化ほう素ナトリウム水溶液を一滴ずつ攪拌しながら加えた。反応が終了後、未反応の CTAB や析出した NaBr の結晶を遠心分離によって取り除いた。

< 銀ナノ粒子の合成 >

(方法1) 0.7 mM のクエン酸三ナトリウム水溶液 100 mL に 0.1 M 硝酸銀水溶液 100 μ L を攪拌しながら加えた。次に、氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液 (濃度 5.3 M) 100 μ L を 1 滴ずつ加えた。

(方法2) 25 mM グルコース水溶液、50 mM 水酸化ナトリウム水溶液、50 mM 硝酸銀 () 水溶液、50 mM CTAB 水溶液をそれぞれ 5 mL ずつ調製した。硝酸銀 () 水溶液を CTAB 水溶液に一滴ずつ攪拌をしながら加えた。これにより溶液は黄色の銀錯体溶液となった。次にグルコース水溶液に対して水酸化ナトリウム水溶液を加え、さらに銀錯体溶液を加えた。反応により溶液は黄褐色となった。この溶液を 50 で 5 時間超音波処理し、遠心分離によって未反応の CTAB を回収し、目的とする銀ナノ粒子溶液を得た。

C. 研究結果

1) 金ナノ粒子の特性：

金ナノ粒子は 2 mg/mL という高濃度で蒸留水に分散させても、凝集や沈降なく安定的に分散した (図 1a)。また、金ナノ粒子の粒径は 10~20 nm であった (図 1b)。金ナノ粒子のゼータ電位は +8.6 mV であった。蒸留水中での粒度分布を測定したところ、TEM から見積もった一次粒径とほぼ同じであったが、10 nm 以下の微小な粒子や 100 nm 以上の凝集体も存在していることが明らかになった (図 2a)。金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトルを測定したところ、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴に由来するピークが観察され、金ナノ粒子が水溶液中で均一に分散していることが光学的評価からも明らかになった (図 2b)。

2) 銀ナノ粒子の特性：

方法 1 で銀ナノ粒子を合成すると、銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上になると凝集し、沈降してしまった (図 3)。そこで、銀ナノ粒子水溶液濃度を 2 mg/mL 以

上にしても沈降しない方法の開発に取り組んだところ、方法 2 によりこの目的を達成することができることが明らかになった。この方法により得られた銀ナノ粒子は粒径が 10 nm 以下であった (図 4)。

D. 結論

金ナノ粒子は銀ナノ粒子より水中で安定であり、粒子濃度が 2 mg/mL 以上の高濃度水溶液中でも沈降なく分散した。一方、銀ナノ粒子は、粒子濃度を 0.02 mg/mL 以上にするると沈降してしまった。 NaBH_4 を用いた還元法では、粒子濃度が 2 mg/mL 以上の銀ナノ粒子水溶液を作製することができなかったが、界面活性剤として CTAB を使用し、グルコースを用いることで、粒子濃度 2 mg/mL 以上の銀ナノ粒子水溶液を作製することができた。しかし、この方法では、界面活性剤である CTAB を過剰に加える必要があった。CTAB が毒性を示すため、正確な銀ナノ粒子の毒性を評価するためには、CTAB に代わる毒性を示さず、水中分散性を高めるキャッピング剤の探索が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.* DOI: 10.1002/adfm.201504215 (Back Cover に採用)

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

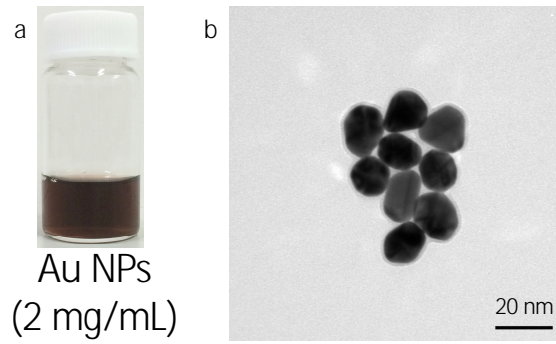


図 1. (a) 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

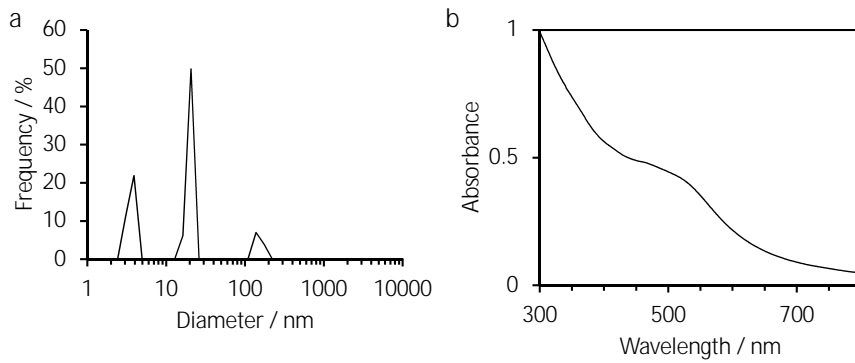


図 2. (a) 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

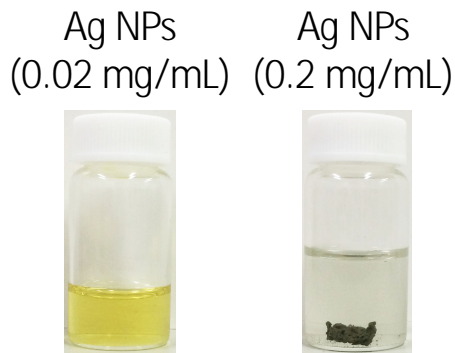


図 3. 方法 1 で作製した銀ナノ粒子水溶液の写真 : (左) 0.02 mg/mL, (右) 0.2 mg/mL

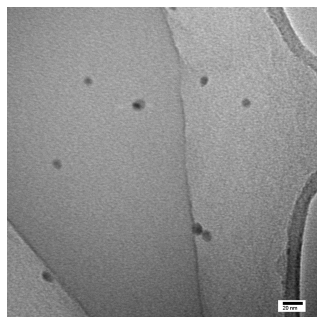


図 4. 方法 2 で作製した銀ナノ粒子の TEM 像