

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製およびキャラクタリゼーション

研究分担者 林 幸彦朗 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教

酸化チタン、金、銀ナノ粒子の作製を行った。金ナノ粒子や銀ナノ粒子は凝集が生じやすいため、一般的な作製法では *in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することが困難である。また、一般的な合成法では界面活性剤を使用するが、この界面活性剤が毒性を示すため、界面活性剤を使用しない作製法が求められる。そこで本研究では、金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液の新規作製法の開発に取り組んだ。アミノ酸であるシステインを界面活性剤の代わりとして用いることで、毒性を高めることなく、*in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することに成功した。また、酸化チタンナノ粒子については、酵素であるウレアーゼを用いることで、針状粒子が球状にクラスター化した集合体を作製することができた。また、中空構造の酸化チタンナノ粒子を作製する方法も確立した。

A．研究目的

本研究分担者は、ナノマテリアルの *in vitro* リスク評価を実施するための、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、酸化チタンナノ粒子を作製することを目的とする。特に、金ナノ粒子や銀ナノ粒子は凝集が生じやすいため、一般的な作製法では *in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度(2 mg/mL)の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することが困難である。また、一般的な合成法では界面活性剤を使用するが、この界面活性剤が毒性を示すため、界面活性剤を使用しない作製法が求められる。そこで本研究では、金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液の新規作製法の開発を目的とする。

B．研究方法

1) 一般的な方法による金ナノ粒子の作製

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 hexadecyltrimethylammonium bromide

(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。

2) 一般的な方法による銀ナノ粒子の作製

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 NaBH₄ 水溶液 (濃度 5.3 M) 100 μ L を一滴ずつ加えた。

3) 高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法

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 (I) 水溶液を CTAB 水溶液に一滴ずつ攪拌しながら加えた。

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。

4) CTAB 用いずに高濃度の金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液を作製する方法

塩化金酸水溶液または硝酸銀水溶液にシステインを溶解した。この溶液に氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液を加え、超音波処理を 5 時間行った。金ナノ粒子、銀ナノ粒子どちらにおいても、金属：システイン = 1 : 1 とした。

5) 酸化チタンナノ粒子の作製

原料として、加水分解・縮合速度や構造が異なる次の 5 つの化合物を用いた：

titanium(IV) chloride, titanium 2-ethylhexyloxide, tetrabutyl orthotitanate, bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, tetrabutyl orthotitanate tetramer, tetraisopropyl orthotitanate (図 1)

これらの化合物を、尿素およびウレアーゼ水溶液に加え、60 以下で最長 3 日間反応させた。尿素濃度は、1.2 ~ 19.2 mg/mL とし、ウレアーゼ濃度は 5 ~ 10 mg/mL とした。

C . 研究結果

1) 一般的な方法で作製した金ナノ粒子の特性

B 1)の方法で作製した金ナノ粒子は 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 2a)。また、金ナノ粒子の粒径は 10 ~ 20 nm であった(図 2b)。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 3a)。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 3b)。

しかし、戸塚先生による評価により、CTAB に毒性があることが判明したため、CTAB を用いない金ナノ粒子の作製法の開発が必要であることが明らかになった。

2) 一般的な方法で作製した銀ナノ粒子の特性

B 2)の方法で作製した方法で銀ナノ粒子を合成すると、図 4 に示すように、銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上にする凝集し、沈降してしまった。この凝集体を超音波処理により再分散させることは不可能であった。In vitro 評価を行うために、2 mg/mL 以上の濃度でも水に分散する銀ナノ粒子の作製法の開発が必要であることが明らかになった。

3) B 3)の方法で作製した銀ナノ粒子の特性

B 3)の方法により銀ナノ粒子を作製したところ、2 mg/mL 以上の濃度でも凝集・沈降が生じない銀ナノ粒子分散液を得ることができた。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 5)。しかし、この方法は CTAB を使用するため、得られる銀ナノ粒子は毒性を示すことが明らかになった。このため、CTAB を用いず 2 mg/mL 以上の濃度でも凝集・沈降しない銀ナノ粒子を作製する方法を開発する必要があることが明らかになった。

4) B 4)の方法で作製した金ナノ粒子および銀ナノ粒子の特性

B 4)の方法により作製した金ナノ粒子は粒径 20 nm 以下であった(図 6 左)。ICP-MS により元素分析を行ったところ、金 37 mmol/kg、硫黄 50 mmol/kg であった。この

硫黄はシステインに由来するものである。金と硫黄は1 : 1で仕込んでいるため、精製の過程で若干金ナノ粒子の損失があったと思われる。

B 4)の方法により作製した銀ナノ粒子は一般的な方法で作製した銀ナノ粒子よりも長細い形状をしており、サイズは約40 nm × 約12 nmであった(図6右)。ICP-MSにより元素分析を行ったところ、金51 mmol/kg、硫黄50 mmol/kgであり、仕込み比とほぼ同じであった。

B 4)の方法で得られた金ナノ粒子および銀ナノ粒子は2 mg/mL以上で蒸留水に分散させると時間が経過するにつれて凝集・沈降が生じたが、超音波で再分散させることができ、*in vitro* 評価での使用が可能であった。

以上の結果から以下のことがいえる。CTABの代わりに低毒性アミノ酸であるシステインを用いることで2 mg/mLの金ナノ粒子および銀ナノ粒子水分散液を作製することができる。金ナノ粒子においては、2 mg/mLという高濃度条件下では、CTABを用いた場合とシステインを用いた場合で分散性には大きな違いは見られない。このため、システインを使用することで分散性を低下させることなく、安全性を高めることができる。銀ナノ粒子に関しては、CTABを用いた場合は、粒子濃度を2 mg/mLにすると再分散させることができなかつたが、システインを用いることで2 mg/mLでも分散させることが可能になり、毒性だけでなく分散性の面においてもシステインを用いることの有意性がみられる。システインはCTABに比べて小さい分子であるため、ナノ粒子表面に結合する分子の数はシステインの方が多いと考えられる。また、システインと金ナノ粒子および銀ナノ粒子は共有結合で結合するため、CTABよりも強固に結合すると考えられる。これらのシステイ

ンの特性により、金ナノ粒子および銀ナノ粒子の分散性が向上したと考えられる。

5) 酸化チタンナノ粒子の特性

原料として titanium(IV) chloride を用いた場合は、尿素濃度9.6~19.2 mg/mL、ウレアーゼ濃度5.0 mg/mLの場合に中空ナノ粒子が得られた。この尿素濃度範囲では、尿素濃度が低いほど粒径が小さい粒子が得られ、尿素濃度9.6 mg/mLでは粒径約500 nmの中空粒子が得られ、尿素濃度19.2 mg/mLでは粒径約20 nmの中空ナノ粒子が得られた。ウレアーゼ濃度5.0 mg/mLの場合で、尿素濃度を9.6 mg/mL未満にすると針状粒子が得られた。ウレアーゼ濃度10 mg/mLの場合は、尿素濃度に関わらず針状粒子が得られ、尿素濃度が高くなるにつれて粒子の長さは短くなった。

以上の結果に基づき、ウレアーゼ濃度5.0 mg/mL、尿素濃度9.6 mg/mLとし、構造と加水分解・縮合速度が異なるチタンアルコキシドを原料として用いて、原料の構造と加水分解・縮合速度が生成物の形状に与える影響を調査した。Tetrabutyl orthotitanate tetramerのようにすでにTi-O-Tiの結合ができている化合物を原料として用いると、中空ナノ粒子が得られることが明らかになった。その他の化合物(titanium 2-ethylhexyloxide, tetrabutyl orthotitanate, bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato) titanium, tetraisopropyl orthotitanate)を用いた場合は、粒径100 nm以下の球状粒子が生成した。

上記の方法では、適切な原料の選択と合成条件の最適化により、one-potで中空ナノ粒子が得られたが、その生成量は僅かであった。そこで、より多くの中空粒子を得るために、予めエマルジョンを調製しておき、このエマルジョン中で上記と同様の反応を行うことで、中空ナノ粒子の作製を試みた。エマルジョンはアンモニア水、ドデカン、

エタノール、hexadecyltrimethylammonium bromide 水溶液を混合し、超音波処理を行うことで作製した。このエマルジョン中での反応の場合は、水溶液中での反応と異なり、bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato) titanium を原料として用いた場合のみ、中空ナノ粒子が得られ(図7)その他の原料では球状粒子が得られた。この結果は、エマルジョン中での反応の場合は、原料として反応速度がそれほど速くない化合物を用いて、ミセル表面でのみ反応させることが重要であることを示している。また、hexadecyltrimethylammonium bromide を用いなかった場合は、エマルジョンが生成しないため、中空ナノ粒子は得られなかった。以上より、ウレアーゼの酵素活性を活用した、エマルジョン中でのチタンアルコキシドの加水分解・縮合により、中空 TiO₂ ナノ粒子を 60 以下の低温で作製できることが明らかになった。

D . 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, Y. Sato, W. Sakamoto, T. Yogo, Theranostic nanoparticles for MRI-guided thermochemotherapy: Tight clustering of magnetic nanoparticles boosts relaxivity and heat-generation power, ACS Biomater. Sci. Eng., 2017, 3, 95–105.
- (2) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo, Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging, J. Colloid Interf. Sci., 2017, 492, 127–35.
- (3) **林幸彦朗**, 光と生体物質に応答する有機 - 無機ハイブリッド中空ナノ粒子の新規合成法とイメージガイド下三種同時治療, セラミックス, 2017, 52,130-3.
- (4) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of dual stimulus-responsive degradable hollow hybrid nanoparticles for image-guided trimodal therapy, Adv. Funct. Mater., 2016, 26, 8613–22.
- (5) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy, Adv. Funct. Mater., 2016, 26, 1708–18.
- (6) N. Ozawa, K. Hayashi, S. Yamaura, W. Zhang, W. Sakamoto, T. Yogo, Synthesis of inorganic-organic hybrid membranes consisting of triazole linkages formed by the azide-alkyne click reaction, J. Membr. Sci., 2016, 517, 21–9.
- (7) T. Hoshino, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of proton-conductive inorganic-organic hybrid membranes from organoalkoxysilane and phosphonic acid derivatives, J. Membr. Sci., 2016, 502, 133–40.
- (8) K. Takahashi, J. Umeda, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of inorganic/organic hybrid membranes from organoalkoxysilane, hydroimidazole derivative, and cyclic sulfonic acid ester, J. Mater. Sci., 2016, 51, 3398–407.
- (9) S. Zhukov, Y.A. Genenko, J. Koruza, J. Schultheiß, H. von Seggern, W. Sakamoto, H. Ichikawa, T. Murata, K. Hayashi, T. Yogo, Effect of texturing on polarization switching dynamics in ferroelectric ceramics, Appl. Phys. Lett., 2016, 108, 012907.
- (10) R. Maruyama, W. Sakamoto, I. Yuitoo, T. Takeuchi, K. Hayashi, T. Yogo, Photocurrent enhancement of chemically synthesized Ag nanoparticle-embedded

BiFeO₃ thin films, Jpn. J. Appl. Phys.,
2016, 55, 10TA14-1.

名大チーム ” , 中日新聞. 2016年12月
18日

- (11) K. Hayashi, Multifunctional hybrid
nanoparticles for biomedical applications,
J. Ceram. Soc.Jpn., 2016, 124, 855–62.

2. 学会発表

- (1) 林幸彦朗, ハイブリッドナノ粒子のバ
イオメディカル応用, 平成 28 年度日本
セラミックス協会東海支部学術研究発
表会, 名古屋, 2016 年 12 月.
- (2) 林幸彦朗, 山田翔太, 坂本渉, 余語利信,
赤血球様粒子の作製と体内動態の解明,
第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡,
2016 年 6 月.
- (3) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T.
Yogo, Dual Stimulus-Responsive
Degradable Hollow Organic-Inorganic
Hybrid Nanoparticles for Image-Guided
Trimodal Therapy, The 1st International
Symposium on Creation of Life Innovation
Materials for Interdisciplinary and
International Researcher Development
(iLIM-1), Osaka, Oct. 17-18, 2016.

E . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 林幸彦朗, 坂本渉, 余語利信, 丸岡弘
規, “ フローサイトメトリー用蛍光プ
ローブ及び蛍光標識細胞の選別方法 ”
出願番号 (国内 : 特願 2016-91356 ,
2016 年 04 月, 国際 : 2017 年 2 月 10 日,
PCT/JP2017/4979) , 名古屋大学, 倉敷
紡績株式会社, 日本国.
- 2) 林幸彦朗, 坂本渉, 余語利信, 丸岡弘
規, “ 蛍光プローブ、蛍光検出方法及
び蛍光プローブの使用法 ” , 出願番
号 (国内 : 特願 2016-91359 , 2016 年 04
月, 国際 : 2017 年 2 月 10 日,
PCT/JP2017/4981) , 国立大学法人名古
屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

3. その他

- 1) 林幸彦朗 “ 新ナノ粒子でがん狙い撃ち

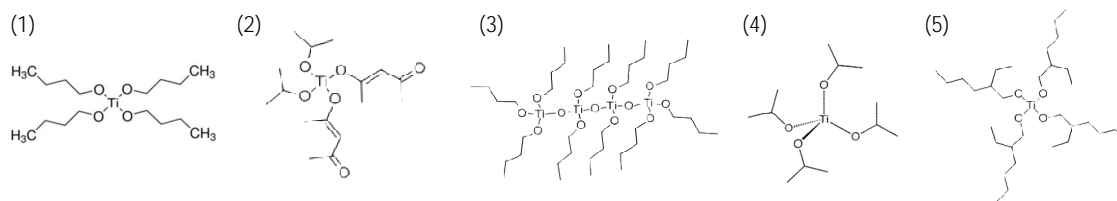


図 1. 原料の構造：(1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate, (5) titanium 2-ethylhexyloxide

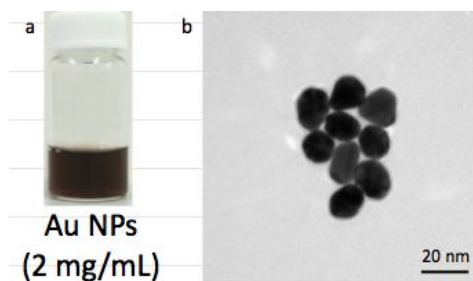


図 2 (a). 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

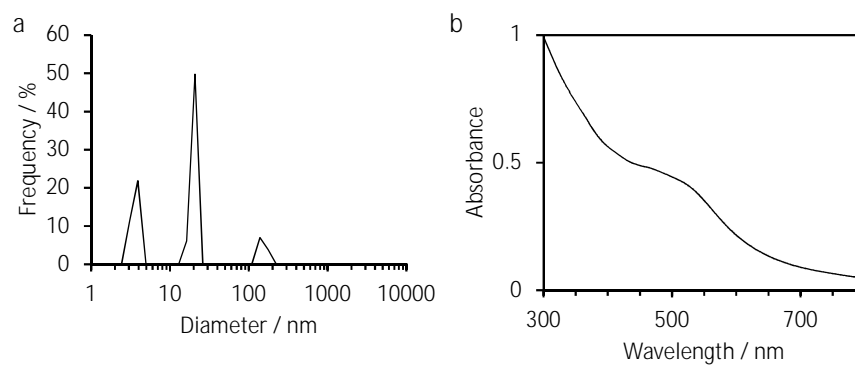


図 3 (a). 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

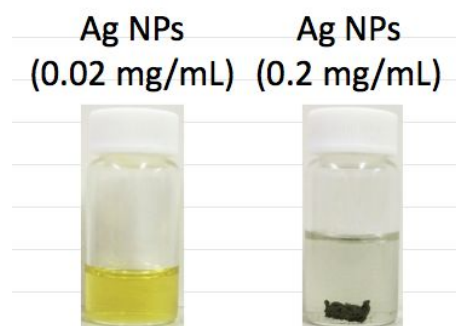


図 4. 一般的な方法で作製した銀ナノ粒子水溶液の写真：
(左) 0.02 mg/mL, (右) 0.2 mg/mL

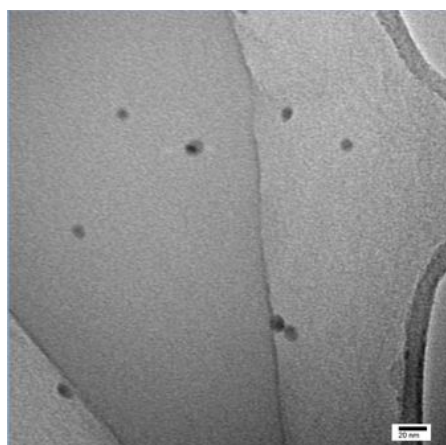


図 5. B3の方法で作製した銀ナノ粒子の TEM 像

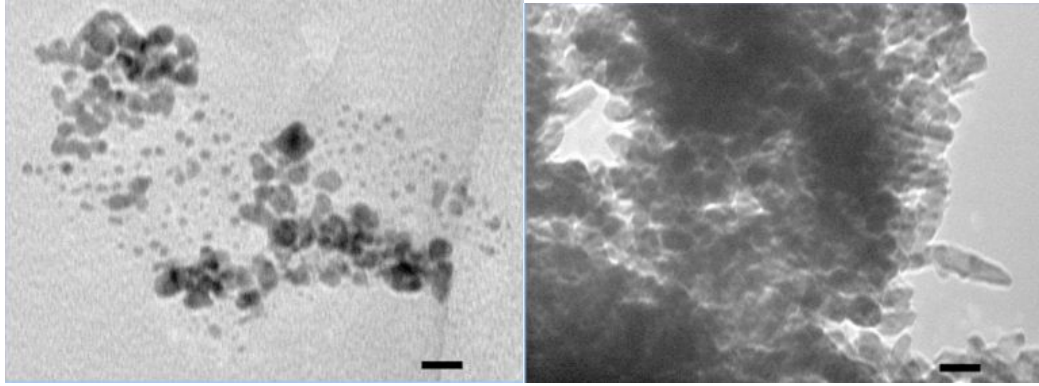


図 6. 4.4 の方法により作製した金ナノ粒子 (左) と銀ナノ粒子 (右) の TEM 像 (スケールバー : 20 nm)

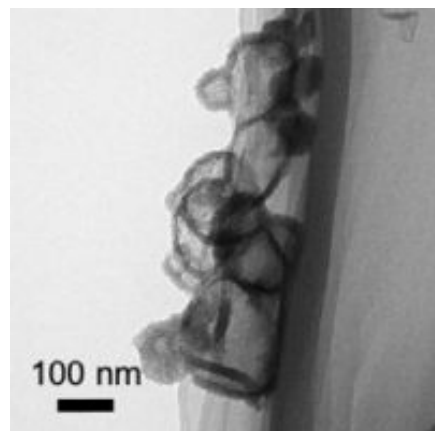


図 7. 中空酸化チタンナノ粒子の TEM 像