

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 幸壺朗 九州大学大学院歯学研究院 助教

酸化チタンの形状が毒性に与える影響を調査するために、多様な形状の酸化チタンナノ粒子の合成に取り組んだ。酸化チタンナノ粒子は様々なチタン源から、酵素（ウレアーゼ）と尿素存在下での反応により得られた。ウレアーゼはテンプレートとして働き、また、ウレアーゼと尿素との反応により生じたアンモニアは触媒として働くと考えられる。チタン源の種類や濃度、ウレアーゼおよび尿素の濃度を調整することにより、針状、ウニ状、中空状に形状を制御することができた。今後、合成条件を最適化することにより、より精密な形状制御およびサイズ制御が可能になると考えられる。

**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。これまでに、細胞毒性試験に使用可能な高濃度金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液の調製には成功しており、すでに共同研究者に提供している。

平成 29 年度は酸化チタンナノ粒子（TiO<sub>2</sub> NPs）の合成に取り組んだ。特に、TiO<sub>2</sub> NPs の形状が細胞毒性に与える影響を調査するために、様々な形状の TiO<sub>2</sub> NPs を合成することを目的とした。

**B. 研究方法**

1) 酵素（ウレアーゼ）と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成（Ti 源：TiCl<sub>4</sub>）

表 1 の条件で尿素とウレアーゼを蒸留水 10 mL に溶解した。この水溶液に TiCl<sub>4</sub> 230 μL をドラフト内で加え、発煙が収まったら溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。

各条件により得られた生成物を TiO<sub>2</sub> NPs-

1～10 とする。

表 1. TiO<sub>2</sub> NPs の合成条件

サンプル	尿素 (mg)	ウレアーゼ (mg)
TiO <sub>2</sub> NPs-1	12	50
TiO <sub>2</sub> NPs-2	24	50
TiO <sub>2</sub> NPs-3	48	50
TiO <sub>2</sub> NPs-4	96	50
TiO <sub>2</sub> NPs-5	192	50
TiO <sub>2</sub> NPs-6	12	100
TiO <sub>2</sub> NPs-7	24	100
TiO <sub>2</sub> NPs-8	48	100
TiO <sub>2</sub> NPs-9	96	100
TiO <sub>2</sub> NPs-10	192	100

2) TiCl<sub>4</sub> 以外の原料からの TiO<sub>2</sub> NPs の作製

尿素 96 mg およびウレアーゼ 50 mg を水 10 mL に溶解させた。この水溶液に tetrabutyl orthotitanate 717 μL または bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium 1019 μL または tetrabutyl orthotitanate tetramer 1851 μL または tetraisopropyl orthotitanate 636 μL を加え溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。反応終了後、生成物を水で 3 回洗浄し最終的に 10 mL の水に分

散させた。Ti 原料の構造式を図 1 に示す。また、生成物を用いた原料によってそれぞれ TiO<sub>2</sub> NPs-11, 12, 13, 14 と記す。

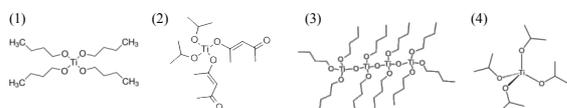


図 1. 原料の構造: (1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate

### C. 研究結果

1) 酵素（ウレアーゼ）と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成（Ti 源：TiCl<sub>4</sub>）  
得られた粒子の TEM 像を図 2 に示す。TiO<sub>2</sub> NPs-1~3 は針状粒子の集合体を形成していた。TiO<sub>2</sub> NPs-4 と 5 は中空構造の中空ナノ粒子であり、それぞれ粒径が約 600 nm, 10 nm であった。TiO<sub>2</sub> NPs-6~8 は針状粒子からなる不規則な凝集体であった。TiO<sub>2</sub> NPs-9 と 10 は球状粒子であった。

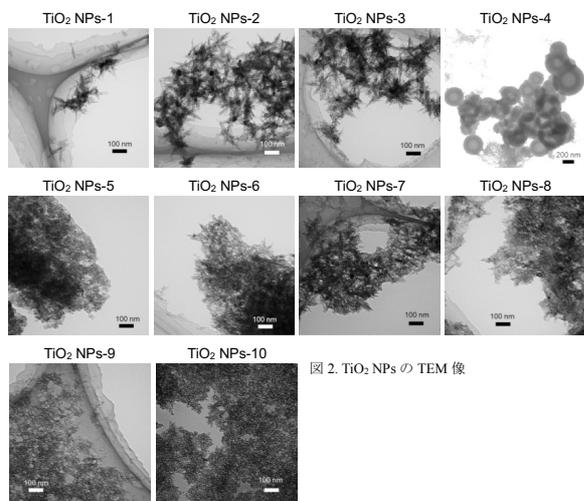


図 2. TiO<sub>2</sub> NPs の TEM 像

2) TiCl<sub>4</sub> 以外の原料からの TiO<sub>2</sub> NPs の作製

図 3 に生成物の TEM 像を示す。一次粒子の粒径は異なるが全て球状粒子の凝集体であった。TiO<sub>2</sub> NPs-13 において、一部中空粒子が確認された。

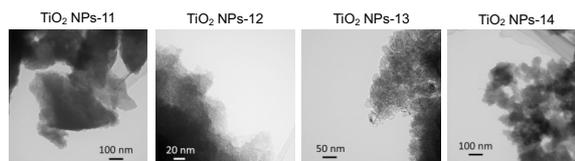


図 3. TiO<sub>2</sub> NPs-11~14 の TEM 像

以上の 1 および 2 の結果から、原料や合成条件、またはこれらに依存する反応速度の違いが生成物の形状に影響を与えることが明らかになった。現在、新たな合成方法を検討している最中であり、安定的に中空構造のナノ粒子が得られつつある。今後、さらなる条件検討により、この方法を確立することを計画している。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis, *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1706332, 2018.
- (2) K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis, *Biomater.*, 156, 45-55, 2018.
- (3) K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels, *ACS Biomater. Sci. & Engin.*, 3, 1129-35, 2017.
- (4) K. Ishikawa, T. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru. Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres, *J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.*, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34117.
- (5) H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin,

- J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia, *Oncotarget*, 9, 10307-16, 2018.
- (6) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles, *Sci. Rep.*, 7, 3953, 2017.
- (7) 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 Interface Sci.*, 49, 127–35, 2017.
2. 学会発表
- (1) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Dual Stimulus-Responsive Degradable Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *BIT's 7th Annual World Congress of Nano Science & Technology 2017*, Oct. 24–26, 2017, Fukuoka. 招待講演
- (2) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *2nd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development*, Sep. 29–Oct. 1, 2017, Nagoya. 招待講演
- (3) 林 幸壺朗. 多機能ナノ／マイクロ粒子の合成と診断・治療への応用. 第7回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 2017年9月12日, 京都大学. 招待講演
- (4) 林 幸壺朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルゲル学会第15回討論会, 2017年8月7日–8日, 大阪. 招待講演
- E. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許出願  
なし
3. その他  
新聞報道“赤血球状の粒子 肝臓に薬剤運搬”, 日経産業新聞, 平成29年12月8日