

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 幸壱朗 九州大学大学院歯学研究院 助教

研究要旨：分担研究として、ナノマテリアルの作製およびキャラクタリゼーションを目的とした。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した。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 を目指した。exadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) を界面活性剤として用いて金および銀ナノ粒子を作製したが、CTAB が毒性を示す可能性があるということから、CTAB の代わりとなる物質を探索したところ、アミノ酸であるシステインが有用であった。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た。酸化チタンナノ粒子に関しては、酸化チタンナノ粒子の粒径や形状が毒性に与える影響を調べるために、酸化チタンナノ粒子の形状および粒径制御に取り組んだ。酸化チタンナノ粒子を作製する際に酵素であるウレアーゼを使用し、さらに尿素を触媒として使用することで、針状、ウニ状、中空状のナノ粒子が得られた。また、ウレアーゼや尿素の添加量を調節することで、ナノ粒子のサイズ制御が可能であった。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た。

A. 研究目的

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した。分担研究として、ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーションを担当した。具体的には、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、すなわち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 を目指した。また、酸化チタンナノ粒子に関しては、ナノマテリアルの形状が毒性に与える影響を調べるために、球状以外の形状のナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーシ

オンを目的とした。

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 NaBH_4 水溶液（濃度 5.3 M）100 μ L を 1 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（I）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°C 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 非使用で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) 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_4)

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_4 230 μ L 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_2 NPs-1 ~ 10 とする。

6) TiCl_4 以外の原料からの TiO_2 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 μ L または bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium 1019 μ L または tetrabutyl orthotitanate tetramer

1851 μ L または tetraisopropyl orthotitanate 636 μ L 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、生成物はいった原料によってそれぞれ TiO_2 NPs-11, 12, 13, 14 と記す。

C. 研究結果

一般的な方法で作製した金ナノ粒子の特性

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、分担研究者より 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。

一般的な方法で作製した銀ナノ粒子の特性

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 以上にすると凝集し、沈降してしまっただ。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。

高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法で作製した銀ナノ粒子の特性

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。

CTAB 非使用で作製した金ナノ粒子および銀ナノ粒子の特性

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。一方、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。

これら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。

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:TiCl₄)

得られた粒子の TEM 像を図 7 に示す。TiO₂ NPs-1~3 は針状粒子の集合体を形成していた。TiO₂ 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。TiO₂ NPs-6~8 は針状粒子からなる不規則な凝集体であった。TiO₂ NPs-9 と 10 は球状粒子であった。

TiCl₄以外の原料からの TiO₂ NPs の作製

図 8 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。TiO₂ NPs-13 において、一部中空粒子が確認された。

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. まとめ

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た。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かった。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ったが、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た。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。

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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.*, 26, 8613–22, 2016.
- (2) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.*, 26, 1708–18, 2016.
- (3) 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.*, 517, 21–9, 2016.
- (4) 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.*, 502, 133–40, 2016.
- (5) 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.*, 51, 3398–407, 2016.
- (6) 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.*, 108, 012907, 2016.
- (7) 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.*, 55, 10TA14-1, 2016.
- (8) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 124, 855–62, 2016.
- (9) 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.*, 3, 95–105, 2017.
- (10) 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.*, 492, 127–35, 2017.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.

- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.

2. 学会発表

- (1) 林幸壱朗, 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) 林幸壱朗, 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. 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と

生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演

- (4) 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
- (5) 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
- (6) 林 幸壱朗. 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
- (7) 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- (1) 林 幸壱朗, 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 28 日, 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 幸壱朗, 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方法”, 出願番号 (国内: 特願 2016-91359, 2016 年 04 月 28 日, 国際: 2017 年 2 月 10 日, PCT/JP2017/4981), 国立大学法人名古屋

屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

3. その他

- 1) 林幸壺朗. “新ナノ粒子でがん狙い撃ち 名大チーム”, 中日新聞. 平成28年12月18日
- 2) 林幸壺朗. “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

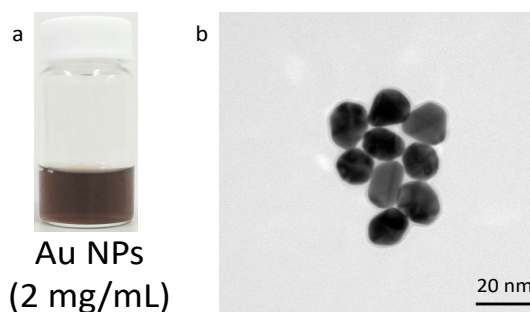


図 2 (a). 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

表 1. TiO₂ NPs の合成条件

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

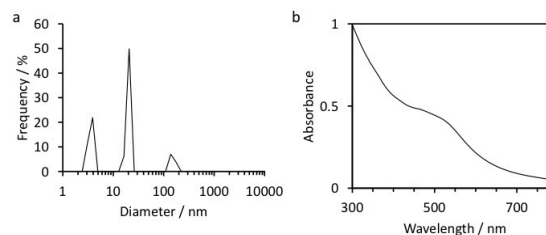


図 3 (a). 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

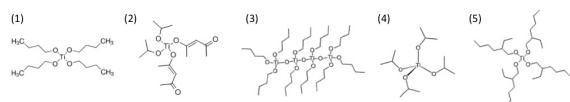


図 1. 原料の構造 : (1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate, (5) titanium 2-ethylhexyloxide

Ag NPs (0.02 mg/mL) Ag NPs (0.2 mg/mL)



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

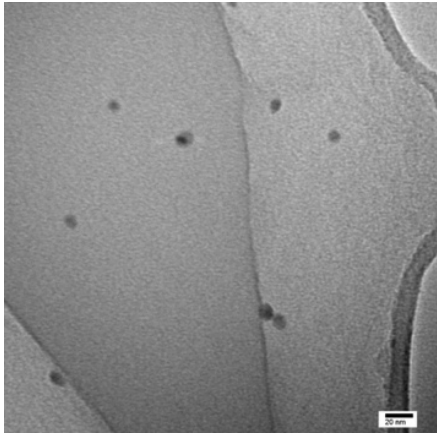


図 5 高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法による銀ナノ粒子の TEM 像

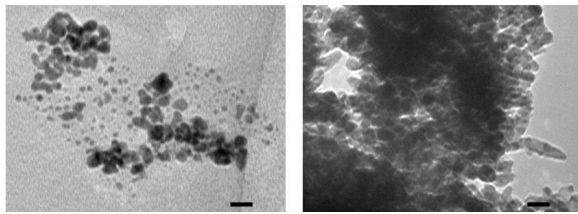


図 6. CTAB 非使用の方法により作製した金ナノ粒子（左）と銀ナノ粒子（右） TEM 像（スケールバー：20 nm）

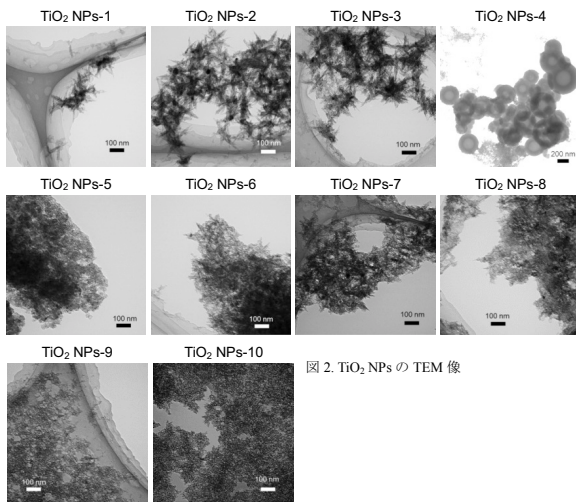


図 2. TiO₂ NPs の TEM 像

図 7.酸化チタンナノ粒子の TEM 像

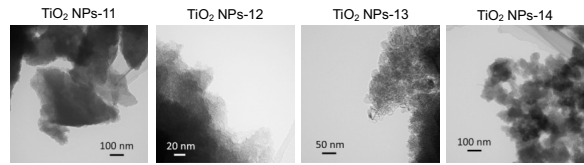


図 3. TiO₂ NPs-11～14 の TEM 像

図 8.酸化チタンナノ粒子 No.11-14 の TEM 像