

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13724

研究課題名(和文) 生体深部細胞検出用の近赤外蛍光性合金超微粒子の連続的真空蒸着法に基づく開発設計

研究課題名(英文) Development of near-infrared fluorescent alloy nanoparticles for detection of cells in deep part of living body based on successive vacuum evaporation method

研究代表者

木村 恵一 (KIMURA, Keiichi)

和歌山大学・学内共同利用施設等・名誉教授

研究者番号：50107140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：流動油面上真空蒸着法による銀超微粒子の合成において、捕集液に加えられる保護剤が与える影響が調査された。共通の疎水基(オレイル基)を有する5種類の保護剤の中では、オレイン酸を用いたときが再分散性に優れた銀超微粒子を収率よく得られた。また、優れた水分散安定性を示す近赤外蛍光性のセレン化銀超微粒子を、親水性モノマー(オリゴエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレート)の原子移動ラジカル重合によって得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Effect of protective agents on the preparation of silver nanoparticles by vacuum evaporation on running oil substrate method was investigated. Among five kinds of protective agents bearing a common hydrophobic group (oleyl group), silver nanoparticles, which can be finely re-dispersed in the solvent, were obtained in the high yield in the case of oleic acid. In addition, near-infrared fluorescent silver selenide nanoparticles, which can finely disperse in water, could be obtained by atom transfer radical polymerization of hydrophilic monomers (oligoethyleneglycol methacrylate).

研究分野：分析化学

キーワード：銀超微粒子 真空蒸着法 保護剤 オレイル基 セレン化銀超微粒子 近赤外蛍光性 原子移動ラジカル重合 水分散安定性

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、蛍光を利用するバイオイメージング剤（生体分子の分布や動態を蛍光で画像化する材料）の重要性が高まりつつある。しかし、現存するバイオイメージング剤のほとんどは紫外～可視光領域の光を利用するために、生体中の水やヘモグロビンによって吸収され、十分な生体組織透過性を有していない。つまり、生体の深部組織のイメージングに関する実現可能性は極めて低いと言わざるを得ない。そこで、新たな発光素子として、インドシアニングリーンに代表される近赤外蛍光性の化合物が注目されているが、これらは水中で凝集しやすく、また化学修飾が困難であるため、実用化のための障壁は非常に高いとされている。

(2) セレン化銀などの二種類以上の成分から成る合金超微粒子（粒径：～10 nm）の中には、近赤外領域に強い蛍光性を示すものがある。それゆえ、これら超微粒子が生体深部を観察するための蛍光イメージング剤の発光素子として有力視されている。しかしながら、これまでに報告されている近赤外蛍光性合金超微粒子では、収率よく合成できないことと、水中で安定に分散できないことが課題であった。

(3) 超微粒子を水中で安定に分散できるようにするために、重合開始部位を超微粒子表面に導入した後、親水性モノマーを用いて原子移動ラジカル重合を行い、粒子表面を親水性高分子で被覆する化学修飾法が一般的に知られている。ただし、この修飾法の近赤外蛍光性超微粒子での適用例は、研究開始当初までに報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、生体深部に存在する細胞組織を分析するための蛍光イメージング剤の開発を指向して、連続的真空蒸着法の一つである流動油面上真空蒸着法を用いる金属超微粒子の効果的な合成と、近赤外蛍光性超微粒子の親水性高分子被覆による水分散化について検討する。

(2) 流動油面上真空蒸着法を用いて収率よく金属超微粒子を合成するために、反応条件について詳細に検討する。この方法では、合成時に超微粒子の凝集を抑制するために保護剤を捕集液に加えるが、保護剤の種類が金属超微粒子の合成に与える影響について調査する。

(3) 近赤外蛍光性合金超微粒子について、原子移動ラジカル重合による高分子被覆反応の反応条件の検討と、得られた高分子被覆超微粒子の水分散性の評価を行なう。

### 3. 研究の方法

(1) 流動油面上真空蒸着法を用いて、金属超微粒子を合成する。ここでは、粒子の溶媒分

散性に関する知見を得るために、400 nm 付近に局在表面プラズモンの吸収帯を有する銀の超微粒子を作製する。真空蒸着により発生した銀蒸気の捕集液（アルキルナフタレン）に加える保護剤としては、共通の疎水基（オレイル基）を有するが、極性基（ソルビトール基、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、エステル基）の構造が異なる5種類の化合物（ソルビタンモノオレート、オレイルアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、オレイン酸メチル）を用いる。

(2) 合成した銀超微粒子について物性評価を行なう。粒子形状に関する知見を得るために、吸収スペクトル測定および透過型電子顕微鏡観察を行なう。収率に関しては、熱重量測定を行ない、捕集液を 500℃まで加熱して有機物を完全に分解させたときの残存物（銀）の重量割合を定量することで決定する。また、銀超微粒子を単離精製して、真空乾燥後の溶媒への再分散性についても検討した。

(3) セレン化銀超微粒子の高分子被覆反応について検討する。原料のセレン化銀超微粒子は1-ドデカンチオールで粒子表面が覆われているため、まず、重合開始部位を含むチオール化合物を配位子交換法により粒子表面に導入する。続いて、親水性モノマーとしてオリゴエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレートを用い、粒子表面上で原子移動ラジカル重合を行なう。重合反応時の温度、触媒、溶媒、モノマー濃度について詳細に検討する。

(4) 得られた高分子被覆セレン化銀超微粒子について物性評価を行なう。透過型電子顕微鏡観察による形状確認を行ない、続いて、水中における分散安定性の調査を行う。また比較のために、一般的な方法である水溶性配位子（11-メルカプトウンデカン酸）を用いる配位子交換によって水分散化したセレン化銀超微粒子についても同様の検討を行なう。

### 4. 研究成果

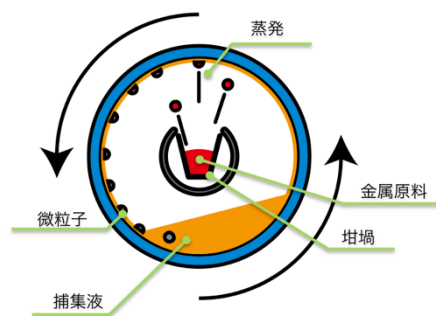


図1 本研究で検討した金属超微粒子の反応系

(1) 流動油面上真空蒸着法を用いる銀超微粒子合成は、図1に示す反応系で行った。まず、円筒状のガラスドラムの中央の坩堝に銀(10 g)を設置し、同時にドラム内に保護剤(20 wt%)を含む捕集液(100 g)を投入した。ドラムの回転によって内壁に捕集液の油膜を形成させ、その油膜に対して銀の蒸着を行い、蒸着後に超微粒子を含む捕集液をできる限り回収し、凝集物をろ別した後に種々の測定に使用した。

(2) 極性基の構造のみが異なる化合物を保護剤として用い、蒸着後に得られた捕集液の外観を図2にそれぞれ示す。大別すると、瓶側部に付着した液膜が黄色くみえるサンプル(ソルビトール基、アミノ基、カルボキシ基)と、濁って見えるもしくは粗大粒子の付着と見られるサンプル(ヒドロキシ基、エステル基)とに分類された。超微粒子の収率を熱重量測定より求めたところ、ソルビトール基(29.7%)とカルボキシ基(25.7%)を用いた場合には比較的高い値を示したが、一方で、粒子が分散しているように見えたアミノ基を用いた場合、収率は極端に低い結果(0.4%)となった。また、ヒドロキシ基(15.4%)とエステル基(7.5%)を用いた場合には、あまり高い収率で得ることはできなかった。

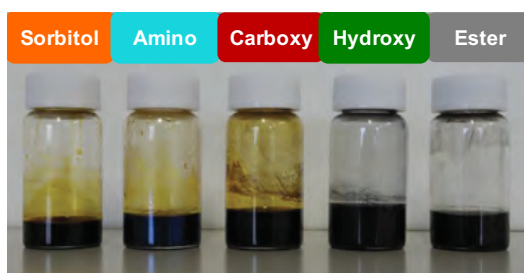


図2 蒸着後の捕集液の外観

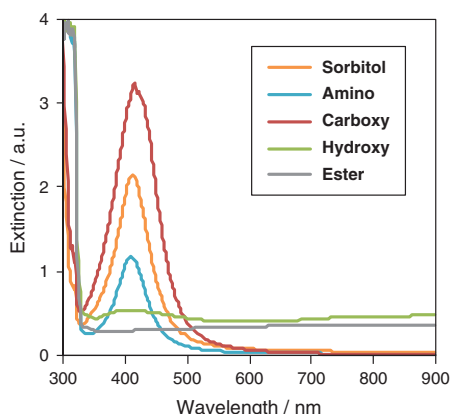


図3 捕集液の吸収スペクトル

次に、得られた捕集液をドデカンによって同じ比率で希釈し、吸収スペクトルを測定した。ソルビトール基とカルボキシ基を用いた場合にはスペクトルが飽和したため、さらに

10倍希釈した。結果を図3に示す。400 nm付近の銀超微粒子由来のプラズモン吸収により、単分散の超微粒子の存在を確認した。また、600 nm以降でスペクトルのバックグラウンドの上昇が見られたが、これは超微粒子の凝集に基づく粗大粒子の形成による光散乱に起因すると考えられる。結果として、ソルビトール基、アミノ基、カルボキシ基を用いた場合には単分散の超微粒子が形成しており、ヒドロキシ基とエステル基を用いた場合には粗大粒子が形成されたと判断できる。

合成された銀超微粒子の形状の詳細を把握するために透過型電子顕微鏡像を取得した。結果を図4に示す。吸収スペクトルの結果と同様に、ソルビトール基、アミノ基、カルボキシ基を用いた場合には球状の超微粒子が確認された。平均粒径は、それぞれ  $6.9 \pm 3.3$  nm,  $6.0 \pm 3.3$  nm,  $8.2 \pm 3.0$  nm となり、粒径については有意な変化は見られなかった。一方でヒドロキシ基とエステル基を用いた場合には、複雑な形状の粒子が多く観察された。これは、超微粒子が凝集して融合した二次粒子であると考えられる。また、保護剤を加えずに銀を蒸着した場合には、ナノ構造体は全く確認できなかった。

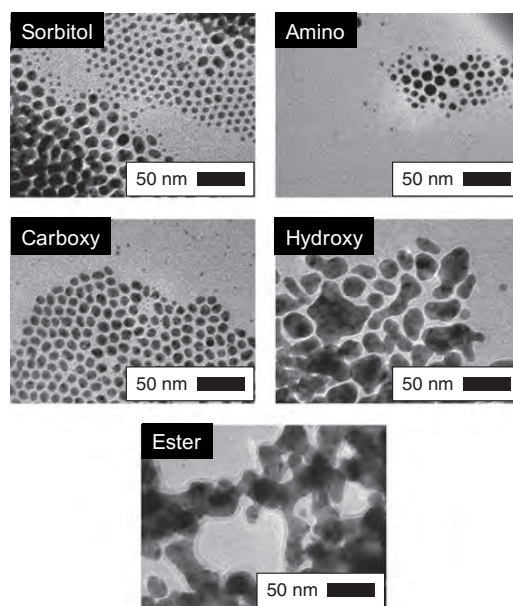


図4 銀超微粒子の透過型電子顕微鏡図

合成された銀超微粒子を遠心分離によって捕集液から単離精製して真空乾燥させた後に、銀(1 mg)をヘキサン(36 mL)に再分散させて吸収スペクトルを測定した。結果を図5に示す。保護剤にオレイン酸を用いたときに最も吸光度が高いことから、再分散性が最も良好であることが示された。以上の結果より、流動油面上真空蒸着法において、本研究で検討した保護剤の中では、オレイン酸が金属超微粒子の保護剤として最も有効に働くことが示された。

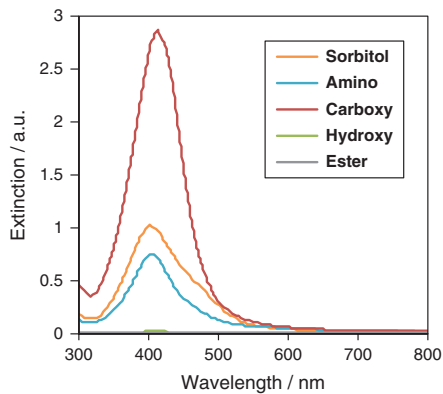


図5 銀超微粒子を単離精製後にヘキサンに再分散させた際の吸収スペクトル

(3) 金属源として酢酸銀とセレン化トリオクチルホスフィン、配位子として1-ドデカンチオール、溶媒として1-オクタデセンを用い、溶液中 160°Cで熱分解させることで、1-ドデカンチオール修飾セレン化銀超微粒子を合成した。反応終了後、遠心分離を用いて精製を行い、ヘキサンに再分散させた。この溶液の近赤外蛍光スペクトルを測定したところ、図6に示すように、1300 nm 付近にセレン化銀超微粒子由来の蛍光が観測された。また透過型電子顕微鏡により形状を観察したところ(図7)、セレン化銀超微粒子の平均粒径は、およそ 5 nm であった。この超微粒子を高分子被覆反応に用いた。

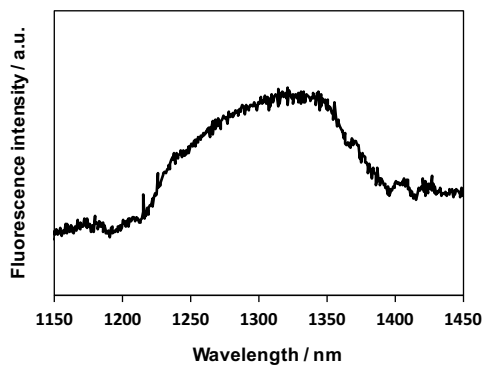


図6 セレン化銀超微粒子の近赤外蛍光スペクトル

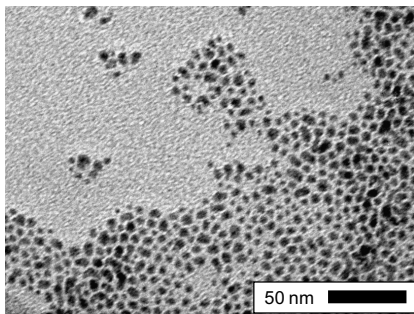


図7 セレン化銀超微粒子の透過型電子顕微鏡図

次に、配位子交換法を用いて粒子表面に重合開始部位を導入した。反応スキームを図8に示す。配位子交換は、ヘキサンと DMF の2層系で行った。ヘキサン層には1-ドデカンチオール修飾セレン化銀超微粒子を分散させ、DMF 層には 11-メルカプトウンデカノールと 2-ブロモ-2-メチル-N-(12-メルカプトドデシル)プロパンアミドを 9:1 の比で加えて、超微粒子が DMF 層に移動するまで攪拌した。ここで、11-メルカプトウンデカノールは、DMF 層に超微粒子を安定に分散させるために加えている。およそ 1 分間攪拌することですべての超微粒子が DMF 層に移動し、その後遠心分離を用いて精製を行い、余分な配位子を取り除くことで、DMF に分散する重合開始剤修飾セレン化銀超微粒子を得た。

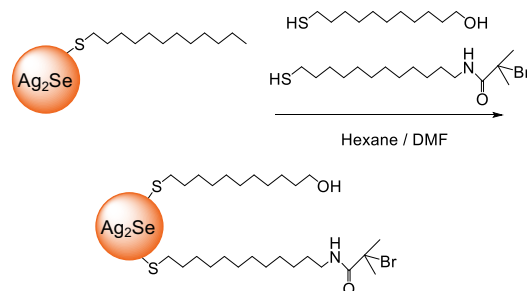


図8 配位子交換法によるセレン化銀超微粒子への重合開始部位の導入

続いて、原子移動ラジカル重合によるセレン化銀超微粒子の高分子被覆反応について検討した。反応スキームを図9に示す。親水性モノマーとしてオリゴエチレングリコールメチルエーテルメタクリレート、触媒には銅イオンを用いた。特に、重合溶媒と、銅イオンと錯体を形成するアミン配位子との組み合わせについていくつか検討した。最終的に、溶媒を水と DMF の混合溶媒 ( $H_2O / DMF = 13/6, v/v$ ) とし、アミン配位子として 2,2'-ビピリジンを用いて、室温で 1 時間 30 分攪拌することで、良好な水分散性を示す高分子被覆セレン化銀超微粒子を得ることができた。

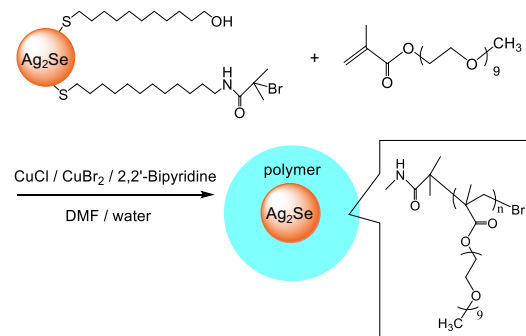


図9 原子移動ラジカル重合によるセレン化銀超微粒子の高分子被覆



さらに重合反応時において、親水性モノマーであるオリゴエチレングリコールメチルエーテルメタクリレートの添加量のみを変化させて、高分子被覆セレン化銀超微粒子を合成した。親水性モノマーの仕込み量を増やすにつれて、セレン化銀超微粒子に基づく吸収が増加したことから、得られる水分散性超微粒子の収量が増加したことが示された。これは、親水性モノマーの仕込み量を増やすことで、1粒子あたりの高分子の被覆量が増えたためと考えられる。

(4) 合成された高分子被覆セレン化銀超微粒子の形状の詳細を把握するために、高分子被覆前後で透過型電子顕微鏡像を取得した。結果を図10に示す。粒子サイズについては、高分子被覆前後で変化は見られなかった。また、高分子を被覆前では超微粒子同士が集まっている状態で観察されたが(図7)、高分子で被覆している場合には、超微粒子同士がある程度の距離を保って分布していた。

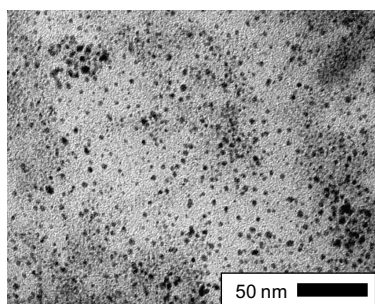


図10 高分子被覆セレン化銀超微粒子の透過型電子顕微鏡像

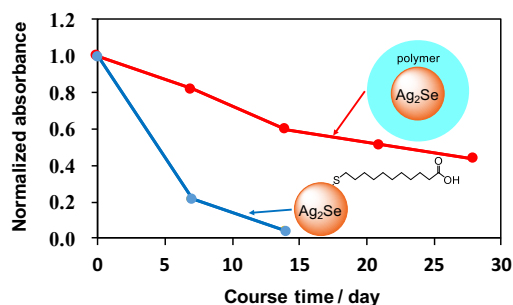


図11 高分子被覆セレン化銀超微粒子の水分散安定性の評価

水中における高分子被覆セレン化銀超微粒子の分散安定性を吸光度変化から評価した。比較のために、高分子被覆ではなく、水溶性配位子による配位子交換によって水分散化した11-メルカプトウンデカン酸修飾セレン化銀超微粒子についても同様の検討を行った。測定毎に、5000 rpmで10分間遠心分離を行うことで、凝集した超微粒子を沈降させて取り除き、上澄みの水中に分散している超微粒子のみを用いて吸収スペクトルを測定した。図11は、400 nmにおける吸光度の経時変化

を、合成直後を1として規格化して示している。高分子で被覆した場合、28日経過しても当初の5割程度の吸光度を維持しているのに対して、配位子のみで保護している場合は、7日で吸光度が約8割低下していることが確認された。この結果は、高分子で被覆することで、配位子のみで保護するよりも水中で超微粒子が安定して存在できることを示している。この高分子被覆による分散安定性の向上は、エチレングリコール鎖の排除体積効果に起因すると考えられる。

以上の結果より、今後、流動油面上真空蒸着法を用いてセレン化銀超微粒子を効率良く合成し、さらに親水性高分子で粒子表面を被覆して水分散性を付与することで、生体深部まで観察可能なバイオイメージング剤として応用できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Takashi Ienaga, Yoshio Nakahara, Setsuko Yajima, Keiichi Kimura, Effect of Protective Agents on Silver Nanoparticle Preparation by Vacuum Evaporation on Running Hydrocarbon Solution, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 査読有, 印刷中, DOI: 10.1166/jnn.2017.14392

[学会発表] (計 4 件)

(1) 岡田宗一郎、中原佳夫、家永隆史、渡辺充、玉井聡行、矢嶋摂子、木村恵一、流動油面上真空蒸着法および熱分解法で合成されたオレイン酸修飾銀ナノ粒子の配位子交換反応の比較検討、日本化学会第97春季年会、2017年3月18日、横浜市(慶應大学)

(2) 中原佳夫、岡田宗一郎、家永隆史、渡辺充、玉井聡行、矢嶋摂子、木村恵一、流動油面上真空蒸着法で製造された銀ナノ粒子表面におけるオレイン酸からオクタン酸への配位子交換反応の検討、第65回日本分析化学会年次大会、2016年9月14日、札幌市(北海道大学)

(3) 家永隆史、中原佳夫、渡辺充、玉井聡行、矢嶋摂子、木村恵一、流動油面上真空蒸着法を用いて合成された銀ナノ粒子表面におけるオレイン酸の吸着状態の分析、日本化学会第96春季年会、2016年3月24日、京田辺市(同志社大学)

(4) 家永隆史、中原佳夫、玉井聡行、矢嶋摂子、木村恵一、流動油面上真空蒸着法を用いて製造されたオレイン酸修飾銀ナノ粒子の配位子交換の検討、第64回日本分析化学会年次大会、2015年9月10日、福岡市(九州大学)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 恵一 (KIMURA, Keiichi)  
和歌山大学・学内共同利用施設等・名誉教授  
研究者番号：50107140

### (2) 研究分担者

中原 佳夫 (NAKAHARA, Yoshio)  
和歌山大学・システム工学部・准教授  
研究者番号：10432600

門 晋平 (KADO, Shinpei)  
和歌山大学・システム工学部・助教  
研究者番号：10423253

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：