

平成21年4月1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19810016

研究課題名（和文） バイオ応用を目指した金磁性ナノ粒子の粒径の最適化

研究課題名（英文） Optimization of size of gold/magnetic composite nanoparticles for biomedical applications

研究代表者

木下 卓也 (KINOSHITA TAKUYA)

大阪府立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90453141

研究成果の概要：機能性生体分子の分離、MRI 造影剤、ドラッグデリバリーなどのバイオ分野での応用を目指し、金磁性酸化鉄複合ナノ粒子を合成した。粒径制御剤として水溶性高分子である PVA や PEG を用いて共沈法により酸化鉄ナノ粒子を調製し、粒子表面に放射線を用いて生体分子の結合点となる金を付着させた。合成条件により粒径を低く抑えることができ、生体分子の吸着活性を持っていることから、バイオ分野での応用が期待できることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：ナノ粒子材料合成

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：磁気分離、磁性ナノ粒子、金、生体分子、バイオ応用、放射線

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究背景

金は一般的に化学的に不活性な元素であるが、メルカプト基 (SH) やジスルフィド基 (SS) やスルフィド基 (RSR') のような硫黄を含む官能基とは Au-S 結合による強い親和性を持つ。金を磁性酸化鉄表面に固定した金磁性複合ナノ粒子は、金を介して生体分子と結合できる可能性があり、磁場による簡便な分離回収操作も可能となることから、生体分子の単離やプロービングに、また、金と酸化鉄という生体毒性が低い材料であることから、DDS や MRI 造影剤などのような生体内利

用にも期待できる。

我々は酸化鉄ナノ粒子を分散させた金イオン溶液に放射線を照射することで、酸化鉄表面に数 nm の金粒子を担持させる技術を開発した。金と酸化鉄が複合化したナノ粒子から成るこの磁性粒子によれば、粒子と蛋白質、DNA 等の生体分子を水溶液中で混合するだけで磁性粒子上への固定が可能となる。これまでに、メルカプト基を修飾したオリゴ DNA や硫黄を含むアミノ酸 (シスチン、メチオニン) やトリペプチドであるグルタチオン (GSH) を、水中でこの粒子に吸着させ、磁気により誘導・分離できることを実証してきた。

(2) 研究背景

これまで、金の担持量や粒径については実験条件により制御して、生体分子を効率よく分離できる最適パラメータを見いだしてきたが、母体となる磁性酸化鉄ナノ粒子の最適化は進んでいなかった。その理由として、10-100 nm 程度の範囲で任意の粒径に制御された磁性酸化鉄ナノ粒子を、界面活性剤を使用せず、また水中での分散性が良い状態で入手することができなかつたためである。これまで複合ナノ粒子の原料として平均粒径 20nm の市販の酸化鉄ナノ粒子を用いてきたが、この粒子は粒径のばらつきが大きく、金を担持した複合ナノ粒子も幅の広い粒径分布を持っている。上で挙げた各応用法ではそれぞれ最適な粒径が異なっている。例えば、生体分子の磁気分離では、粒子が小さいほど比表面積が大きくなり生体分子の吸着能も高くなるが、あまりに小さすぎると、作用する磁力が低下しブラウン運動に擾乱され磁気捕集するのが困難になってしまう。また、体内に導入する場合には、大きな粒子は細網内皮系(肝臓など)に認識され排除されるので、粒径を抑えなければならない。

2. 研究の目的

本研究では、バイオ分野において様々な用途に応じた粒径に制御された酸化鉄ナノ粒子を合成できる条件を探ることを目的とした。さらに、各用途に必要なとされる水中分散性、磁気応答性なども考慮し最適な粒子の合成を試みた。これを原料とし、放射線を用いて金を酸化鉄表面に担持し、生体分子の吸着特性から実用面での性能を評価した。

3. 研究の方法

(1) 磁性酸化鉄ナノ粒子の合成

原料となる Fe^{2+} と Fe^{3+} の塩化鉄水溶液に、粒径制御のための水溶性高分子であるポリビニルアルコール (PVA、PEG) を溶解し、アンモニア水溶液を添加して共沈法により酸化鉄ナノ粒子を調製した。得られた分散液から永久磁石を用いて粒子を回収し純水で数回洗浄した。生成した粒子の粒径、形状、粒度分布、分散状況および生成相を観察し、温度、添加剤の濃度などの合成条件の影響を調査した。

(2) 金磁性酸化鉄複合ナノ粒子の合成

上記で得られた酸化鉄ナノ粒子分散液に塩化金酸を添加し、ガンマ線もしくは電子線を照射し金磁性酸化鉄複合ナノ粒子を合成した。このとき、少量の還元補助剤や水溶性高分子を添加した。得られた分散液から永久磁石を用いて粒子を回収し純水で数回洗浄

した。合成した複合ナノ粒子を上記と同様に、粒径、形状、粒度分布、分散状況などを分析し、合成条件の影響を調査した。条件としては添加剤の濃度、放射線種、放射線量、線量率などが挙げられる。

(3) 粒子の生体分子吸着性能の評価

上記で得られた金磁性酸化鉄複合ナノ粒子への生体分子吸着性能を、アミノ酸を用いて評価した。17 種のアミノ酸が含まれる溶液と複合ナノ粒子を混合し、攪拌した後、磁性成分と非磁性成分に磁気分離した。非磁性成分に残留するアミノ酸量をアミノ酸分析計で測定し、複合ナノ粒子に吸着したアミノ酸量を評価した。

4. 研究成果

(1) 生成相の同定

合成粒子の XRD パターンを図 1 に示す。金 (Au) と磁性酸化鉄 (Fe_3O_4 or $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) のピークが見られ、金と酸化鉄の複合粒子であることがわかった。

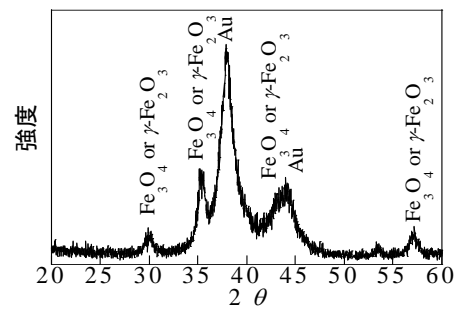


図 1 合成粒子の XRD パターン

次に、合成粒子の分散液の紫外-可視吸収スペクトルを図 2 に示す。Au の表面プラズモン吸収ピークが波長 540 nm 付近に見られ、ナノサイズの金が生成していることがわかった。

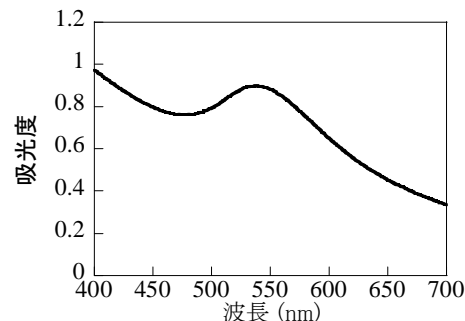


図 2 合成粒子分散液の吸収スペクトル

(2) 粒径の評価

図 3 に合成粒子の TEM 像を示す。左図は金を担持させる際にガンマ線を用いて合成し

たもの、右図は電子線を用いたものである。コントラストの薄いものが酸化鉄粒子、濃いものが金粒子である。双方とも酸化鉄粒子に金粒子が付着しているのがわかる。金粒子の平均粒径はガンマ線の場合が 10 nm であるのに対して、電子線の場合には 5 nm であった。これはガンマ線の線量率が 3 kGy/h であるのに対し、電子線は 10 MGy/h と 1000 倍以上高いために、還元力が高く核生成が促進されより微細な粒子が生成したと考えられる。

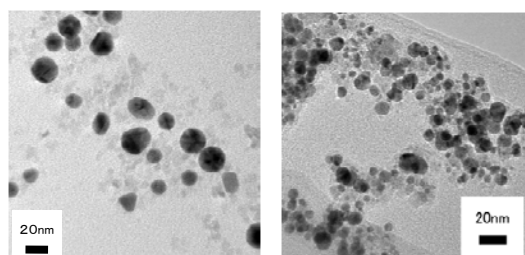


図 3 合成粒子の TEM 像
左図:ガンマ線、右図:電子線

図 3 に動的光散乱法で測定した複合ナノ粒子の平均二次粒径を、酸化鉄合成時の合成パラメータとともに示す。合成時の反応温度、PVA 濃度が高くなるにつれて、平均粒径が小さくなっていることがわかる。この DLS 平均粒径は溶液中での二次粒径と考えられ、実際に応用する際の重要なパラメータとなる。例えば、生体内で利用する際には二次粒径が 100 nm 以下である必要があり、今回の結果では最小で 60 nm の複合ナノ粒子が生成していることから、生体内での利用にも期待が持てることが示された。

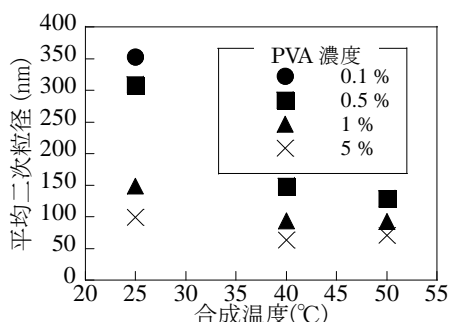


図 4 酸化鉄合成時の合成条件による複合ナノ粒子の平均二次粒径への影響

(3) 生体分子の吸着試験

2種の含硫アミノ酸が含まれる 17種のアミノ酸混合溶液と合成粒子を混合、攪拌後、磁石を用いて磁性成分と非磁性成分に分離した。非磁性成分溶液に残留するアミノ酸量をアミノ酸分析計で測定し、粒子に吸着したアミノ酸量を決定した。図 5 にアミノ酸種別の吸着量を示した。含硫アミノ酸であるシスチ

ンとメチオニンだけが吸着し、従来のものと同じように硫黄特異性があることがわかった。

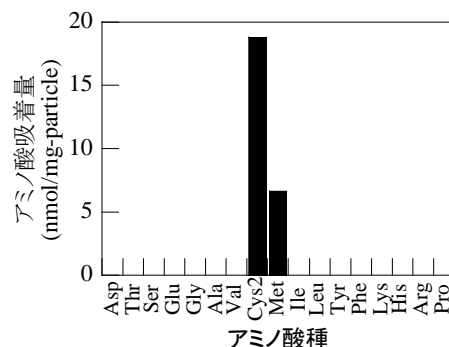


図 5 複合ナノ粒子へのアミノ酸吸着量

(4) まとめ

水溶性高分子である PVA や PEG 水溶液中で二価と三価の鉄イオンを共沈させることで、実験パラメータにより様々な粒径に制御された酸化鉄ナノ粒子の合成に成功した。さらに、酸化鉄粒子表面に放射線を用いて金を析出担持して複合ナノ粒子を合成し、生体分子の吸着性能を評価したところ、以前の粒子と同程度の吸着活性を保っていることを確認した。以上のことから、この金磁性複合ナノ粒子が様々なバイオ分野での応用が期待できることが示された。

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 3 件)

① Takuya Kinoshita, Satoshi Seino, Yoshiteru Mizukoshi, Takashi Nakagawa, Takao A. Yamamoto, Functionalization of magnetic gold/iron-oxide composite nanoparticles with oligonucleotides and magnetic separation of specific target, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 311 (2007) 174-177 査読有り

② Satoshi Seino, Takuya Kinoshita, Takashi Nakagawa, Takao Kojima, Ryoichi Taniguchi, Shuichi Okuda, Takao A. Yamamoto, Radiation induced synthesis of gold/iron-oxide composite nanoparticles using high energy electron beam, Journal of Nanoparticle Research Vol.10, No.6 (2008) 1071-1076 査読有り

③ Satoshi Seino, Yu Matsuoka, Takuya Kinoshita, Takashi Nakagawa, Takao A.

Yamamoto, Dispersibility improvement of gold/iron-oxide composite nanoparticles by polyethylenimine modification, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 321 (2009) 1404-1407 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

① 清野智史、木下卓也、飯田順一、柴田雄仁、中川貴、山本孝夫、PEGを用いた金磁性ナノ粒子の放射線合成、第31回日本応用磁気学会学術講演会、2007年9月11-14日、学習院大学

② 清野智史、木下卓也、仁谷浩明、山本孝夫、中川貴、放射線による複合ナノ粒子の合成とその応用-1. 放射線による複合ナノ粒子の合成技術の開発-、日本原子力学会2007年秋の大会、2007年9月27-29日、北九州国際会議場

③ 木下卓也、清野智史、山本孝夫、中川貴、土井健史、放射線による複合ナノ粒子の合成とその応用-3. 金磁性複合ナノ粒子の放射線合成とバイオ応用-、日本原子力学会2007年秋の大会、2007年9月27-29日、北九州国際会議場

④ 藤川祐喜、木下卓也、足立元明、清野智史、山本孝夫、粒径をバイオ用途に最適化した金/酸化鉄複合ナノ粒子の合成、第10回化学工学会学生発表会、2008年3月1日、関西大学

⑤ 木下卓也、藤川祐喜、足立元明、清野智史、山本孝夫、バイオ応用を目指した金磁性酸化鉄複合ナノ粒子の粒径制御、化学工学会第73年会、2008年3月19日、静岡大学

⑥ 藤川祐喜、吉川基宏、木下卓也、足立元明、清野智史、山本孝夫、生体内利用を目指した金/磁性酸化鉄複合の合成、化学工学会第74年会、2009年3月20日、横浜国立大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 卓也(KINOSHITA TAKUYA)

大阪府立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90453141