

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05056

研究課題名(和文) 生体適合性および有機マトリックス分散性金ナノ粒子の開発と機能性評価

研究課題名(英文) Development and functionality evaluation of gold nanoparticles with biological compatibility or dispersibility in organic matrix

研究代表者

飯村 兼一 (IIMURA, Ken-ichi)

宇都宮大学・工学部・教授

研究者番号：10272220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体高分子と界面活性剤をそれぞれ被覆材として用いた金ナノ粒子(AuNP)に対し、実験パラメータに依存した粒子サイズや分散安定性などを評価し、構造・物性制御法を明らかにした。前者の生体高分子としてはキトサンやアルギン酸、および数種のレクチンなどを用い、後者の界面活性剤としては疎水性-親水性バランスが異なる数種のポリオキシエチレンアルキルアミンを用いた。幾つかの生体高分子被覆AuNPに関しては、菌体あるいは細胞外多糖類との相互作用によると考えられる凝集能を見出した。また、界面活性剤被覆AuNPに対しては、水系から有機溶媒系への効率的な相間移動法を明らかにしたとともに、相間移動の機構を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体高分子で被覆した種々のAuNPの合成や分子種に依存した生体試料との相互作用の違い、ポリオキシエチレンアルキルアミン型界面活性剤被覆AuNPの有機溶媒中への効率的な相間移動法と相間移動メカニズムの提案、ならびにAuNPの作製条件に依存した形態学的変化や分散安定性の変化など、本研究を通じて得られた成果は、新たな知見を多く含み、AuNPが関わる学術分野の発展に寄与するとともに、バイオテクノロジーやエレクトロニクスなどにおけるAuNP利用技術の展開につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Methods for controlling structure and dispersion property of gold nanoparticles (AuNP) coated by biological polymers or surfactants were found through evaluation of particle size, dispersion stability, and so on, depending on experimental parameters. Chitosan, alginate, and some lectins, and etc. were used as the biological polymers for the former particles, while some polyoxyethylene alkylamine surfactants with different hydrophobic-hydrophilic balance were employed for the latter particles. Agglomeration ability, which was thought due to interactions between the AuNPs and bacteria or extracellular polysaccharides, was found for some biological polymer-coated AuNPs. For the surfactant-coated AuNPs, efficient phase-transfer approaches from aqueous to organic solvents were found, and a phase-transfer mechanism was proposed.

研究分野：界面化学

キーワード：金ナノ粒子 生体高分子 界面活性剤 相間移動 界面制御 X線小角散乱法 核磁気共鳴法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子 (AuNP) は、表面プラズモン共鳴に基づく特異的な光学特性、大きな比表面積、優れた熱的性質や電気伝導性などの特徴を有することから、バイオセンサーやマーカー、ドラッグデリバリーシステム、光線力学的治療、有機太陽電池、導電性インクなど、バイオテクノロジーおよびエレクトロニクス分野を中心に盛んに研究されている。さらに、上記の特徴は、AuNP の合成法や表面被覆剤の違いに依存した粒子のサイズや形状、表面官能基、凝集状態などによって制御が可能であり、このことも AuNP の材料としての魅力を高めている。しかしながら、ナノ粒子の研究が急速に発展したのは比較的最近のことであり、その合成法や表面処理法は限られている。どのような表面被覆材を用いることによって、どのような特徴の付与が可能なのか、そして、その結果もたらされる新たな機能は何なのかなど、未開の領域が多く残されている。新規 AuNP の設計・構築法を明らかにし、機能性や有用性を示すことは、AuNP を用いた基盤技術の発展に資するものと期待される。

バイオテクノロジーへの応用を促進させるためには、生体部位との特異的相互作用や生体適合性の観点から、生体由来の材料を被覆材とした AuNP の開発が必要であると考えられる。そこで本研究では、生体高分子としてキトサンやアルギン酸、レクチンなどを用いて合成・被覆した AuNP を作製し、その応用発展性を検討することにした。また、一般に、AuNP は塩化金酸をその水溶液中で還元することによって合成されるため水中に分散しているが、エレクトロニクス分野での応用を考えると、有機溶媒系に容易に安定分散する AuNP の開発が新たなブレイクスルーにつながるものと期待される。研究代表者らは、ポリオキシエチレンアルキルアミン型の界面活性剤を用いて合成・被覆した AuNP がその分散液をクロロホルムなどの有機溶媒に接触させておくだけで、有機溶媒分散用の表面配位子への交換処理を行わずに、水から有機溶媒中に相間移動することを見出していたことから、その現象を利用して有機溶媒分散型の AuNP の作製条件の精査やメカニズムなどを検討することにした。

2. 研究の目的

本研究では、生体高分子と界面活性剤をそれぞれ用いて合成・被覆した金ナノ粒子 (AuNP) の構造や物性を評価し、構造制御法を確立するとともに、機能性を明らかにすることを目的とした。生体高分子被覆 AuNP に関しては、生体高分子の表面電荷の効果またはレクチンの糖鎖認識による菌体あるいは細胞外多糖類との相互作用を検討し、界面活性剤被覆 AuNP に対しては、水系から有機溶媒系への相間移動の機構解明や分散可能な有機溶媒、効率的な相間移動法などについて主に検討した。これらにより、それぞれの表面被覆材に応じた AuNP の作製に関わる学術的基盤の構築と機能性の解明を目指した。

3. 研究の方法

生体高分子としてはアルギン酸、キトサン、レクチン (コンカナバリン A、ピーナツレクチン、レンズマメレクチン、小麦胚芽レクチン) などを用い、それらにより被覆された金ナノ粒子作製法や条件の検討、合成された AuNP の光学特性、表面電位、分散安定性などを評価した。また、電子顕微鏡による粒子形態の直接観察ならびに X 線小角散乱法 (SAXS) により粒子構造や分散液中での表面被覆材の構造解析を行った。細菌や細菌が産出する細胞外多糖、あるいは細胞外多糖のモデル化合物としての糖鎖高分子との相互作用について、凝集性評価や菌体表面観察などにより検討した。界面活性剤被覆 AuNP については、疎水性-親水性バランス (HLB) が異なる 5 種のポリオキシエチレンアルキルアミン型界面活性剤 (アミート 102、105、105A、302、320) を用い、それらの分子構造や合成時の溶液濃度や温度、水相からクロロホルム相への相間移動時の温度などの実験パラメータを系統的に変えた条件で、AuNP の合成実験ならびに相間移動実験を進め、実験パラメータによる粒子形状や光学特性、分散安定性、相間移動時間などを評価した。また、核磁気共鳴法により、溶媒に依存した界面活性剤被覆層の分子配向の評価を試みた。一方、AuNP のゲルへの固定化やその機能性についても検討した。

4. 研究成果

(1) AuNP の合成条件の最適化と構造制御

AuNP の合成方法ならびに生体高分子や界面活性剤の分子構造や反応水溶液における濃度、温度などの実験パラメータの変化による粒子サイズや形態、分散安定性を評価し、AuNP 合成の最適条件を検討した。

アルギン酸を還元剤および被覆材として用いた AuNP 合成実験において、反応温度を 95 としアルギン酸濃度を変化させて検討したところ、0.5 wt% 以上の濃度で紫外可視吸収スペクトルのピーク波長が 527 nm 付近に現れる典型的な AuNP が形成されたが、0.3 wt% 以下の条件では吸収ピークの波長は高波長側にシフトし強度も減少した。アルギン酸濃度一定の条件で合成温度を 95、90、80、70 で変化させた場合、低温条件で紫外可視吸収スペクトルにおけるピーク波長が高波長シフトし、吸収強度も減少する傾向が見られた。ただし、いずれの濃度で合成したアルギン酸被覆金ナノ粒子でも最低 2 か月間、安定に分散することが確認された。ゼータ電位の値はマイナスであり、アルギン酸濃度が低下するにつれてゼータ電位の絶対値も小さくなった。

キトサン被覆金ナノ粒子を、還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを用いて 25 で合成した系では、キトサン濃度が 0.01 ~ 0.20 wt% では合成直後の紫外可視吸収スペクトルはどのキトサ

ン濃度でもおよそ 525 nm 前後であった。これらの金ナノ粒子分散液の経時変化を観察したところ、最もキトサン濃度が低い 0.01 wt% では 1 か月程度でナノ粒子が凝集、沈殿することが確認されたが、その他の濃度ではピーク波長のレッドシフトが見られたものの安定に分散していた。ゼータ電位の値はプラスであり、キトサン濃度の低下とともにゼータ電位の絶対値も小さくなった。一方、キトサンを還元剤および被覆材として用いた加熱法によっても AuNP の合成が可能であり、例えば合成温度 95 °C でキトサン濃度 0.05 wt% の条件では、紫外可視スペクトルの吸収ピーク波長が 545 nm の金ナノ粒子分散液が得られた。

レクチン被覆 AuNP は、還元剤として水素化ホウ素水ナトリウムを用いて 25 °C で合成された。いずれのレクチンを用いた場合でも AuNP の合成は可能であったが、合成された AuNP のサイズや安定性は水溶液の pH や共存するイオンなどにより影響された。ゼータ電位はマイナスであり、レクチンの種類によってその絶対値は幅広い値を示した。

界面活性剤被覆 AuNP は、ポリオキシエチレンアルキルアミン型界面活性剤であるアミートを還元剤および被覆材として用いた加熱法により合成した。HLB 値が異なるアミートに対して、水溶液濃度や温度などによる変化を調べた。いずれの界面活性剤を用いた場合でも AuNP の合成は可能であったが、HLB 値が低いアミート 102 や 302 を用いた場合は水中での分散安定性が低くなる傾向が見られた。ただし、後述するように、それらの AuNP を含め、全ての界面活性剤被覆 AuNP は有機溶媒に、有機溶媒分散用の添加剤なしで相間移動した。

(2) 小角 X 線散乱法 (SAXS) による構造解析

SAXS により、AuNP や被覆材分子の水中での会合体の構造解析が系統的に進められた。分散液中における AuNP の構造の SAXS 解析では、多くの系で、一次粒子とそれよりサイズが大きいわずかな量の二次粒子が共存しているとして解析が可能であった。アルギン酸被覆 AuNP は被覆層における高分子鎖の網目構造が大きく、被覆層の広がりも大きくなっていると推定されたことから、被覆層の絡み合いによってアルギン酸の帯電による粒子間の静電反発の効果が弱まったのに対し、キトサン被覆 AuNP に関しては被覆層の網目構造が小さく、被覆層の広がりが小さくなっていると推定されたことから、粒子間の静電反発が有効に働き、凝集が抑制されたのではないかと考えられた。一方、アミート被覆 AuNP に対しては、アミート 102 のように親水部が小さい分子を用いた場合は AuNP の被覆層が薄いこと、アミート 320 のように親水部が嵩高い分子を用いた場合は接近した金ナノ粒子の被覆層が絡み合うことが凝集する原因であり、アミート 105 の場合は程よい親水部の嵩高さであるため分散安定性が良いと考えられた。アミートが水中で形成する会合体構造についても解析がなされ、それらの構造とアミート被覆 AuNP の一次粒子サイズの相関が示唆された。

(3) 生体高分子被覆 AuNP の機能性評価

キトサンやアルギン酸、レクチンの生体高分子で被覆した AuNP に対して、菌体との相互作用を評価した。グラム陰性細菌として *Pseudomonas aeruginosa* と *Serratia marcescens* を、グラム陽性細菌として *Staphylococcus aureus* を用い、それらの菌体の分散液に AuNP 分散液を添加し、混合攪拌後に遠心分離を行い、水に分散する余分な AuNP を除去した後、沈殿物を超純水で再分散させた溶液のレーザー回折/散乱測定を行った。図 1 には、例として、*Pseudomonas aeruginosa* を用いた系に対するサイズ分布曲線を示す。まず菌体だけの分散液に対して測定を行ったところ、3 種の菌体全てにおいて 0.8 ~ 1 μm にピークが確認された。これは顕微鏡で観察される細菌 1 個の大きさに相当することから、水中に分散した菌体由来のものであると推測した。一方、生体高分子被覆 AuNP を添加した系では、アルギン酸やレクチンを用いた場合は菌体だけの分散液とほぼ同じ結果となったが、キトサン被覆 AuNP を用いた場合にはどの菌体との混合系でも 10 ~ 30 μm にサイズ分布を持つ凝集体の形成が示唆された。菌体分散液に対してゼータ電位を測定したところ、いずれに対してもマイナスの値であったことから、キトサン被覆 AuNP 分散液の添加による凝集体の形成は、負のゼータ電位を持つ菌体凝集体と正のゼータ電位を持つキトサン被覆 AuNP との静電的相互作用によって起こっているものと考えられる。

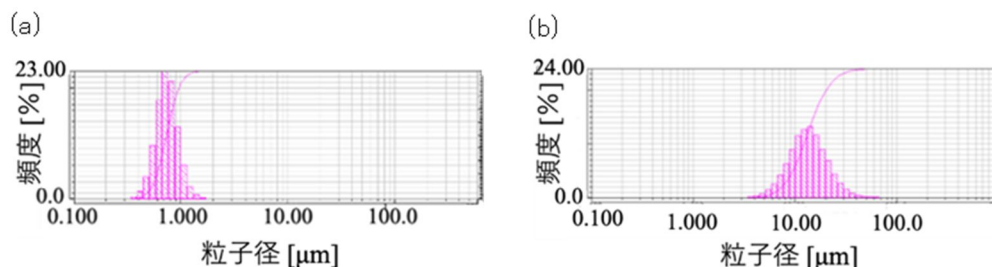


図 1 (a) *Pseudomonas aeruginosa* 分散液、(b) *Pseudomonas aeruginosa* -キトサン被覆 AuNP 混合分散液における分散体のサイズ分布曲線。

この相互作用についてさらに理解するため、*Serratia marcescens* を用いて生菌 / 死菌混合分散液における細胞外多糖の濃度の違いを利用した検討を行った。まず、加熱処理により細菌を死滅させると、死菌から細胞外多糖が遊離し、分散液中の細胞外多糖の濃度が増加することを確認した。その後、生菌 / 死菌の割合を変えた分散液に対してキトサン被覆 AuNP 分散液を添加したところ、細胞外多糖量の増大に伴って凝集する傾向が見られたことから、キトサン被覆 AuNP は細胞外多糖と相互作用している可能性が示された。また、キトサン被覆 AuNP と同じカチオン性の 2-アミノエタンチオール被覆 AuNP を合成し比較したところ、キトサン被覆 AuNP の方が細胞外多糖との相互作用の程度は大きく、細胞外多糖の検出には適していることが示唆された。

一方、金表面に固定化されたレクチンと糖鎖の相互作用に関しては、細菌分散液や細胞外多糖のモデル物質として種々の高分子の水溶液を用いた凝集試験による検討を進めた。特にコンカナバリン A 被覆 AuNP に対しては、グルコースを含む糖鎖化合物であるアミロペクチンやデキストランの水溶液と混合することによって AuNP の凝集が促進されることを明らかにした。また、分散媒として用いた緩衝液における金属イオンの影響などについて検討した。これら結果は、コンカナバリン A は適当な条件では金ナノ粒子表面に修飾されても糖を認識し結合する性質を保っていることを示唆するとともに、コンカナバリン A 被覆 AuNP は糖鎖化合物の凝集剤またはセンサーとして作用する可能性を示している。

(4) 界面活性剤被覆 AuNP の有機溶媒への相間移動性評価

異なる HLB 値を有するアミートを用いて合成した AuNP のクロロホルムに対する相間移動性を、合成条件や相間移動実験の条件に対して系統的に評価した。粒子合成時の界面活性剤濃度と温度、および相間移動時の温度が相間移動にかかる時間に与える影響について検討したところ、温度と濃度ともに高い条件の場合ほど、より短時間でクロロホルム相に移動する傾向がみられた。また、HLB 値がより低い界面活性剤を用いて合成した粒子の方が、短時間で相間移動することも確認された。さらに、HLB 値が低い界面活性剤を用いた粒子は、界面活性剤濃度が高い条件では、水中では凝集体を形成するが、相間移動後のクロロホルム中では安定して分散するという現象も観察された。また、AuNP の ^1H NMR スペクトルにおける親水部と疎水部由来のピーク強度の比を比較すると、重水中では親水基由来のピーク強度が強くなり、重クロロホルム中では疎水基由来のピーク強度が強く現れる傾向がみられたことから、これらの粒子の相間移動は、ポリオキシエチレン鎖とアルキル鎖の配向変化による可能性が示唆された。一方、相間移動の際に、水相の pH を界面活性剤被覆金ナノ粒子の等電点付近に調整すること、および比重が 1 より大きい有機溶媒に対しては遠心分離法を組み合わせることによって、より短時間で相間移動させることができることを明らかにした。これらにより、クロロホルム、ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、四塩化炭素などの有機溶媒への効率的な相間移動が可能であることを明らかにした。

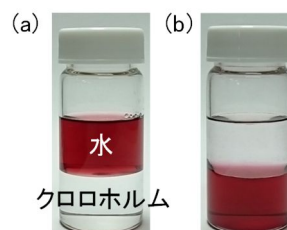


図2 アミート 105A 被覆 AuNP の(a)相間移動前および(b)移動後の写真。上相が水、下相がクロロホルム。

(5) ゲル固定化 AuNP の作製と機能

アルギン酸やアクリルアミド、ヒドロキシプロピルセルロースなどを用いたゲルへの AuNP の分散固定化が可能であり、その機能について検討された。また、AuNP の相互作用検討の過程で細菌分散液を用いて UV 照射法による AuNP の合成実験を試みたところ、細胞外多糖をマトリックスとした AuNP の合成が可能であることがわかった。このことは、可視化技術としての AuNP を用いたバイオフィルム染色が可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 飯村兼一, 畠山雄斗, 斉藤夕希也, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 古澤毅, 松岡みなも, 佐藤高彰
2. 発表標題 生体高分子被覆金ナノ粒子の作製と菌体との相互作用
3. 学会等名 2019年繊維学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡みなも, 水間友磨, 畠山雄斗, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 飯村兼一, 佐藤高彰
2. 発表標題 小角X線散乱法による機能性表面修飾を有する金ナノ粒子の溶液構造
3. 学会等名 2019年繊維学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山雄斗, 斉藤夕希也, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 古澤毅, 飯村兼一, 松岡みなも, 佐藤高彰
2. 発表標題 生体由来多糖類およびレクチンを用いた金ナノ粒子の合成とキャラクタリゼーション
3. 学会等名 2019年繊維学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤夕希也, 畠山雄斗, 奈須野恵理, 飯村兼一, 加藤紀弘, 佐藤高彰
2. 発表標題 キトサンまたはレクチンで被覆した金ナノ粒子と細菌との相互作用解析
3. 学会等名 2019年繊維学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Yamaguchi, Kenryu Entsu, Yukiya Saito, Eri Nasuno, Yuriko Takayama, Ken-ichi Iimura, Norihiro Kato
2. 発表標題 Detection of Extracellular Polymeric Matrices Derived from Gram-Negative Bacteria Using Gold Nanoparticles
3. 学会等名 The 6th Federation of Asian Polymer Societies Polymer Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenryu Entsu, Kota Sawaguchi, Yuriko Takayama, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Norihiro Kato
2. 発表標題 Inhibitory Effects of Poloxamer on Pseudomonas Biofilm Development onto the Hydrogel Surface and Analysis of Its Role Using Gold Nanoparticles
3. 学会等名 The 6th Federation of Asian Polymer Societies Polymer Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minamo Matsuoka, Yuma Mizuma, Yuto Hatakeyama, Eri Nasuno, Norihiro Kato, Ken-ichi Iimura, Takaaki Sato
2. 発表標題 Effects of Surface Modifying Molecules on Solution Structure of Functionalized Gold Nanoparticles
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山雄斗, 増淵美祐, 斉藤夕希也, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 古澤毅, 飯村兼一, 松岡みなも, 佐藤高彰
2. 発表標題 生体高分子被覆金ナノ粒子と菌体の相互作用評価
3. 学会等名 2019年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡みなも, 水間友磨, 畠山雄斗, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 飯村兼一, 佐藤高彰
2. 発表標題 表面修飾分子の違いによる機能性金ナノ粒子系のサイズ・分散性の変化
3. 学会等名 2019年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口瑞稀, 圓通賢隆, 斉藤夕希也, 奈須野恵理, 高山友理子, 飯村兼一, 加藤紀弘
2. 発表標題 グラム陰性細菌の細胞外多糖と修飾金ナノ粒子の相互作用解析
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Md. Abdullah Al Nahid, Ken-ichi Iimura
2. 発表標題 A Study on Phase Transfer Mechanism of AMIET-coated Gold Nanoparticles
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡みなも, 水間友磨, 畠山雄斗, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 飯村兼一, 佐藤高彰
2. 発表標題 被覆分子の形態に着目した機能性金ナノ粒子の構造学的研究
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増淵美祐, 畠 雄斗, 奈須野恵理, 加藤紀弘, 飯村兼一, 松岡みなも, 佐藤高彰
2. 発表標題 コンカナバリンA被覆金ナノ粒子の糖鎖化合物添加による凝集挙動の評価
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md. Abdullah Al Nahid, Ken-ichi Iimura
2. 発表標題 pH-Triggered Phase Transfer of AMIET Coated Gold Nanoparticles
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md. Abdullah Al Nahid, Ken-ichi Iimura
2. 発表標題 Efficient Transfer of In-situ Polyethoxylated Alkyl Amine Modified Gold Nanoparticles from Aqueous to Organic Media
3. 学会等名 17th Australia-Japan Colloids Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増淵美祐, 飯村兼一
2. 発表標題 コンカナバリンA被覆金ナノ粒子の分散安定性に対する高分子化合物の添加効果
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Md. Abdullah Al Nahid, Ken-ichi Imura
2. 発表標題 Monolayer of Polyethoxylated Alkyl Amine Functionalized Gold Nanoparticles
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 紀弘 (KATO Norihiro) (00261818)	宇都宮大学・工学部・教授 (12201)	
研究分担者	奈須野 恵理 (NASUNO Eri) (80709329)	宇都宮大学・工学部・助教 (12201)	
研究分担者	佐藤 高彰 (SATO Takaaki) (20373029)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------