

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：22310067
研究課題名（和文） 液中レーザーアブレーションによる生理活性物質ナノ粒子分散液の作製
研究課題名（英文） Preparation of nanoparticle colloids of bioactive substances by laser ablation in water
研究代表者
朝日 剛（ASAHI TSUYOSHI）
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：20243165

研究成果の概要（和文）：

難水溶性生理活性物質を水中に分散させる新しい技術として、水中に懸濁した薬効性化合物粉末への高強度レーザー照射によって有機溶剤等の添加物を含まないナノ粒子コロイドを作製する手法を検討した。フラボノイド類を中心に調べ、天然物由来のイソフラボン類、フラボン類について、サイズ約 60nm の安定なナノ粒子コロイドの作製に成功した。一方で化合物によっては顕著な光分解が起こり、適応可能な化合物には制限があることが分かった。作製したナノ粒子コロイドを使って、ヒトがん由来細胞に対する生理活性を評価できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Intense pulse-laser Irradiation to suspended organic microcrystalline powder in water leads to its fragmentation into nanoparticles. This technique allows fabrication of pure organic nanoparticle colloids without any chemical additives. Here, we applied this technique to water-insoluble flavonoids which are a class of plant secondary metabolites, and succeeded in preparing stable nanoparticle colloids of flavones and isoflavones. We have demonstrated the toxicity assay for HeLa cells, and have discussed potential applications of the laser ablation method to new pharmaceutical agents and drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：光化学

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：ナノ粒子、コロイド、生理活性物質、レーザーアブレーション

1. 研究開始当初の背景

医薬・化粧品分野において、より微量で効果的な効能を目的に、薬剤や化粧品の効能成分のナノ粒子化が、高い関心を集めている。

しかしながら、生理・薬理活性に対するナノ粒子効果自体、細胞レベルですらほとんど解明されていない。その大きな要因は、有効なナノ粒子化技術そのものが確立されていない

ためである。有機ナノ粒子コロイドを作製する手法として、再沈殿法（あるいは溶媒置換法）が近年広く用いられているが、本手法で得られるコロイド水分散液中には、生体試料に有害な有機溶媒が混在する。すなわち、ナノ粒子の生体・医療応用の研究を行にあたり、毒性有機物質の残留ない有機溶剤フリーのナノ粒子コロイドを作製する技術が求められていた。

2. 研究の目的

有機溶剤や化学添加物を用いることなく有機ナノ粒子コロイドを調整できる手法として、研究代表者らが独自に開発した「液中レーザーアブレーション法」に着目し、薬効性化合物の有機溶剤フリーナノ粒子水分散液の新規作製を提案する。本手法は、水中に懸濁させた目的化合物の微結晶をレーザー照射により粉碎し、ナノ粒子コロイドとして回収するものである。本研究では、難水溶性生理活性化合物であるフラボノイド類およびフラベンチンに対象を絞り、液中レーザーアブレーション法によるナノ粒子コロイドの調製法の最適条件を探る。そして、HeLa 細胞に対する薬理活性を評価することによって、ここで提案する手法がナノ粒子の生理活性解析への有効性を検討することを目的とした。

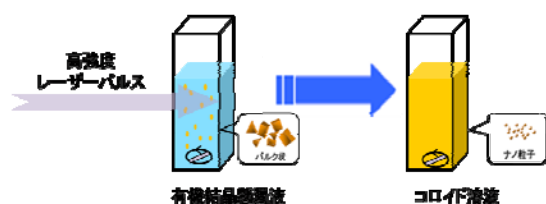


図1：液中レーザーアブレーションナノ粒子作製法の原理図

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子コロイドの調整

目的化合物の微結晶粉末の水懸濁液（濃度 0.01 ~ 0.1wt%）を 1 x 1 x 4 cm の石英セルに入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながら、高強度レーザーパルス光を照射することにより、ナノ粒子コロイドを作製した。光源にはナノ秒 Nd³⁺:YAG レーザー（パルス幅 8ns、繰り返し 10Hz）の第 2 高調波(532nm) または第 3 高調波(355nm)を用いた。生成ナノ粒子のサイズは動的光散乱法または電子顕微鏡を用いて見積もった。ナノ粒子の生成量や光反応は吸収分光、液体クロマトグラフィーにより分析評価した。

(2) ナノ粒子コロイドの物性評価：フラベンチンナノ粒子について電位測定、塩析によるナノ粒子の分散安定性の評価および蛍光。過渡吸収分光による光物性評価を行った。

(3) 細胞活性評価：細胞培地に作製コロイドを添加し、所定時間培養後の生細胞、死細胞の数を計測し、薬理活性を評価した。

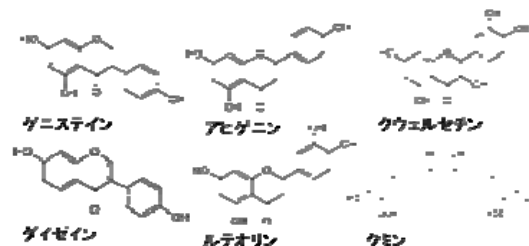


図2：研究に用いたフラボノイド類、ポリフェノール類の一例。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子コロイド作製

難水溶性活性物質として天然物由来の 15 種類のフラボノイド類とポリフェノールのクミン(図 2)について液中レーザーアブレーションによるナノ粒子化を詳細に検討した。ナノ粒子コロイド作製の一例として大豆由来イソフラボンの結果を図 3 に示す。レーザー未照射試料では原料白色粉末がセルの底に沈殿しているがレーザー照射後は乳白色のナノ粒子コロイドとなった。レーザー光強度、照射時間、原料粉末濃度などの作製条件とナノ粒子の生成量、粒子サイズを詳細に検討した結果、原料微粉末を 90% 以上の効率でナノ粒子化でき、さらに飽和水溶液の 200 倍の高濃度で安定なナノ粒子水分散液を調整することに成功した。また、レーザー光強度を調節することにより、ナノ粒子コロイドの平均サイズを 50nm から 100nm の範囲で調整できることも示された。他のイソフラボン類およびルテオリンなどの一部のフラボン類

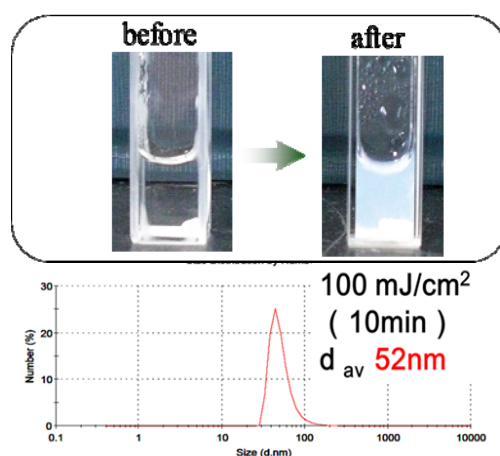


図3：ナノ粒子コロイドの作製例（ゲニステイン）。原料懸濁液（上右）と作製したコロイド（上左）。ナノ粒子のサイズ分布（下）。についても同様に、高効率で分散安定性の高いナノ粒子コロイドが得られた。ナノ粒子の

平均サイズはいずれも約 60nm であった。フラボン類についてはナノ粒子の生成効率や分子の光分解反応がわずかな置換基の違いによって大きく変化することが分かった。カテキンやフラボノールでは顕著な分子の光反応が起こり、本手法によるナノ粒子作製に適さないことが分かった。一方、ポリフェノールであるクミンにおいてもナノ粒子成と同時に固体光反応が起こった。レーザー励起条件を適当に調節することで、分子分解を抑制しつつナノ粒子化できることを明らかにした。

このように、本研究で提案する生ナノ粒子コロイド作製手法により有機溶剤や添加剤を用いることなく、難水溶性生理活性物質をナノ粒子として純水中に分散できることが示されたが、一方で適応可能な化合物には制限があることが分かった。

(2) 作製手法の改良

図1のような密閉容器を使用したバッチ法では生成ナノ粒子の光吸収による効率の低下や、耐光性の低い化合物のナノ粒子化が困難であった。こうした問題点を解決し、ナノ粒子生成の効率化及び光反応生成物の抑制すること目的に、フローセルを用いたナノ粒子装置を構築した。原料懸濁液に照射するレーザーパルスを制御しつつ連続的にナノ粒子を取り出すことができ、単位時間当たりのナノ粒子の生成量が向上することを確認した。耐光性の低い化合物のナノ粒子作製に有効であると考えられる。

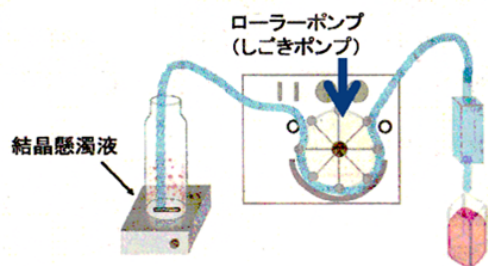


図4: フローセルを用いた液中レーザー粉砕・ナノ粒子作製装置の概略図

(3) ナノ粒子の細胞活性

イソフラボン類のゲニステインとフラボン類のルテオリンについて本手法でナノ粒子コロイドを調整し、ヒトがん由来の HeLa 細胞に対する毒性評価実験を行った。一例としてゲニステインナノ粒子の結果を示す。作製したコロイド溶液を $400\mu I$ の細胞培地に対して、 $40\mu I$ 添加し、24 時間培養後の HeLa 細胞の数をコロイド無添加(コントロール)の場合と比較した結果を図5に示す。コロイド添加により、細胞増殖が抑制され、かつコ

ロイド濃度が高いほど死細胞の割合が大きくなることが分かった。ナノ粒子の細胞活性が、ゲニステインではおもに細胞増殖の抑制効果であり、一方ルテオリンではアポトーシス誘導活性を示唆する結果が得られた。従来の難水溶性化合物の細胞評価実験では、目的分子 DMSO (Dimethyl sulfoxide) などの両親媒性溶媒にいったん溶解させ、その溶液を培地に添加する手法が一般的である。これに対し、本手法を用いることによって有機溶媒や添加物を必要とせず難水溶性化合物の細胞評価が可能となった。ルテオリンでは、通常用いられる両親媒性溶媒による水中分散よりも高い活性を示したのに対し、ゲニステインでは通常法に水分散と同程度の活性となった。このようなナノ粒子効果および化合物による違いは非常に興味深い結果であり、今後さらなる検討が必要である。

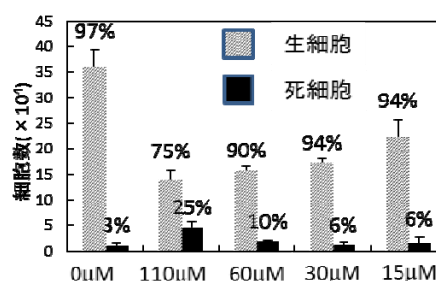


図5: 作製したゲニステインナノ粒子コロイドを添加し24時間培養後のガン細胞数の変化と添加ゲニステイン濃度の関係。

(4) ナノ粒子の物性評価

本手法で作製したナノ粒子の特徴を検査する目的で、フラレン C60 ナノ粒子の分散安定性、光物性を調べた。その結果、C60 ナノ粒子は中性の純水中において負に大きく帯電しており、さらにナノ粒子表面に水の pH に依存して電離する官能基が高い分散安定性の大きな要因であることが示された。C60 ナノ粒子の光エネルギー緩和と蛍光ダイナミクス及びその pH、界面活性剤効果を調べた結果、ナノ粒子表面と水の界面が関与した、超高速の励起状態緩和過程があることを明らかにした。さらに、過渡吸収スペクトル測定の結果より、C60 ナノ粒子コロイドの励起一重項状態の寿命は数 10ps と、溶液中分子に比べ極めて短寿命であり、励起3重項が生成しないことが分かった。これまでに再沈殿法や添加剤を使用して作製した C60 ナノ粒子の細胞毒性が報告されており、その機構としてナノ粒子による光増感活性酸素発生が考えられていった。しかし、本研究の結果から、光増感活性酸素発生機構による細胞毒性効果の可能性は極めて低いことが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Yukihide Ishibashi, Miya Arinishi, Tetsuro Katayama, Hiroshi Miyasaka, Tsuyoshi Asahi, "Excited-state Dynamics of Fullerene Nanoparticles Dispersed in Pure Water," Chem. Lett., 査読有, 41[10] (2012) 1104-1106.
DOI: 10.1246/cl.2012.1104
- ② 朝日 剛, "液中レーザーアブレーションによる有機ナノ粒子水分散液の作製", レーザー研究, 査読有, 40 (2012) 94 - 99
- ③ Teruki Sugiyama, Tsuyoshi Asahi, "Fabrication of the Smallest Organic Nanocolloids by a Top-down Method Based on Laser Ablation," Chemical Record, 査読有, 11 (2011) 54-58.
DOI: 10.1002/tcr.201000024
- ④ Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Tsuyoshi Asahi, Sen-ichi Ryo, Isamu Oh, Hiroshi Masuhara, "Nanoparticle preparation of quinacridone and β -carotene using near-infrared laser ablation of their crystals", Appl. Phys. A: Materials Science and Processing, 査読有, 101 (2010) 591-596.
DOI:10.1007/s00339-010-5922-7

[学会発表] (計 40 件)

- ① グエン ティ イン ミン, 吉岡祐樹, 田村実, 朝日 剛, "イソフラボンナノ粒子水分散液の作成と細胞毒性評価", 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学, 2013 年 3 月 21 日.
- ② Tsuyoshi Asahi, Tatsuya Fujimura, Shin-ichiro Kajiyama, "Pure aqueous colloid of flavonoids prepared by laser ablation in water," 2nd Conference on Laser Ablation and Nanoparticle Generation in Liquids, 2012 年 5 月 23 日, Taormina, Italy.
- ③ Tsuyoshi Asahi, "Preparation of pure aqueous colloids of water-insoluble flavonoids by laser ablation in water", International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference, 2012 年 5 月 17 日, Sendai. 招待講演
- ④ 朝日 剛, "添加物フリーの有機ナノ粒子水分散液の作製とその応用", 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 03 月 25 日, 慶応大学日吉・矢上キャンパス. 依頼講演
- ⑤ 藤村竜也, グエン ティ イン ミン, 朝

日剛, "液中レーザーアブレーション法によるフラボノイド類のナノ粒子作製", 2011 年光化学討論会, 2011 年 9 月 7 日, 宮崎市コンベンションエリア.

- ⑥ Tsuyoshi Asahi, "Laser Fabrication of Organic Nanoparticle Colloids", XXV International Conference on Photochemistry Beijing, China, 2011 年 8 月 9 日. 招待講演
- ⑦ Tsuyoshi Asahi, Tatsuya Fujimura, "Aqueous colloid of isoflavonoid compounds fabricated by laser ablation in water, the 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2010 年 11 月 10 日, Kokura.
- ⑧ Tsuyoshi Asahi, "Tailoring of organic nanoparticle colloids by laser ablation in water," EOS Conference on Laser Ablation and Nanoparticle Generation in Liquids," Engelberg, Switzerland, 2010 年 6 月 30 日. 招待講演

[その他]

ホームページ等

<http://www.ehime-u.ac.jp/~achem/anachem/index.html>

<http://lalnano.jp/CSJgroup/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝日 剛 (ASAHI TSUYOSHI)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 20243165

(2) 連携研究者

梶山慎一郎 (KAJIYAMA SHIN - ICHIRO)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 20243496