

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510123

研究課題名(和文)熱刺激により生成する金ナノ粒子を用いる高感度ナノプローブの創製

研究課題名(英文)Fabrication of sensitive nano-probes based on gold nanoparticles formed by thermal stimuli

研究代表者

上原 伸夫 (Uehara, Nobuo)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50203469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「熱応答性高分子を被覆した金ナノ粒子の融合現象」に関して以下に示す成果が得られた。(1)金ナノ粒子の融合現象の機構解明：熱応答性高分子の相転移により、金ナノ粒子が近接することで、両者が融合することを見出した。この時、チオール化合物は、チオール基を介して金ナノ粒子と結合し金ナノ粒子を安定化させることで、ナノ粒子の融合を阻害した。(2)高感度ナノプローブの開発：金ナノ粒子の融合現象に基づいて、熱応答性高分子にピオチン基を導入することにより、アビジンセンサーを創製した。

研究成果の概要(英文)：This research aims to elucidate a mechanism of fusion growth of gold nanoparticles conjugated with thermoresponsive polymers induced by thermal stimuli and to develop chemical probes measuring bio-related molecules based on the mechanism. Elucidation of a mechanism of fusion growth of gold nanoparticles: We have found that 5-6 nm gold nanoparticles conjugated with thermoresponsive polymers fuse to grow as a result of being heated followed by being cooled. Some parameters such as temperature of a solution, heating time, types of inhibitors, and concentration of the inhibitors were in terms of TEM observation, spectrophotometry, dynamic light scattering, and small angle X-ray scattering to elucidate the mechanism. As a result, shrinkage of chains of the thermoresponsive polymers induced by heating a solution led to contact of the nanoparticles, resulting in the growth of the nanoparticles.

研究分野：分析化学

キーワード：金ナノ粒子 熱応答性高分子 センシング プローブ

1. 研究開始当初の背景

平成 20 年度から平成 22 年度の科研費「熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子を用いるチオール化合物のセンシング」において、粒子径が 5-6nm 程度の大きさの金ナノ粒子に熱応答性高分子を複合化した複合体に熱刺激に与えると、金ナノ粒子が融合し、粒子径の大きな粒界のない金ナノ粒子する現象を見出した。

また、ナノサイエンス、ナノテクノロジーが社会的に注目を浴びるようになってから既に十数年が経過し、その成果の社会への還元が求められるようになってきた。特に可能性のある分野として医療分野への応用が期待されている。中でも、がん細胞の染色や疾病の原因物質の検出、定量などへのナノサイエンスの展開が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では先の科研費で見出した「熱応答性高分子を被覆した金ナノ粒子の融合現象」に関して、その原理を化学的に解明することを目的とした。さらにその原理に基づいて生体関連分子の計測プローブの開発およびを目指した。この成果に基づいて、生体関連分子の計測プローブを開発した。

3. 研究の方法

3-1 金ナノ粒子の融合現象の機構解明

メスフラスコ (100 mL) に 0.1 wt% HAuCl₄ 10 mL に 1 wt% テトラエチレングリコール溶液 50 mL を加えた後、pH を 2.5 に調整する。水で全量とする。この溶液を 25 °C で保ち攪拌しながら、0.1 M NaBH₄ 溶液を 1 mL を加え攪拌を 6 時間続ける。得られた溶液をシリカゲルカラムに通液し、金ナノ粒子の凝集体を除去する。この溶液 3 mL をメスフラスコに分取し、2wt% ポリ (n-イソプロピルアクリルアミド) (以下 p-NIP) 5 mL 加え、全量を 10 mL とする。この溶液を 90 °C で 30 分間加熱し、冷却後の溶液の吸収スペクトル、TEM (トンネル電子顕微鏡) および DLS (動的光散乱) の測定を行った。

3-2 高感度ナノプローブの開発

相当する原料モノマーをラジカル重合することにより、ポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド) (pNIP-Bio) を合成した。3-1 と同様に調製した金ナノクラスターを pNIP-Bio と複合化させることで、高感度ナノプローブを調製した。

四面透明石英セルに pNIP-Bio 溶液もしくは蛍光プローブを含んだ pNIP-Bio 溶液 1 mL、Avidin 溶液及びリン酸緩衝液を順次加え、純水で全量を 2 mL とした。この溶液を相転移温度以上である 40 °C にし、蛍光分光光度計を用いて散乱強度を、動的光散乱計を用いて流体力学的直径を測定した。

3-3 近赤外蛍光金ナノ複合体の創製

NIPAAm モノマー、ビニル基を導入した TETA 及びビニル基を有する Biotin モノマーを共重合させたターポリマー (ポリ N-イソプロピルアクリルアミド-アクリロイル-トリエチレントラミン-アクリロイル-ピオチン) を合成した。この高分子を金ナノ粒子と複合化し金ナノ複合体を調製した。金ナノ複合体を用いる Avidin の検出は以下の手順で行った。セミマイクロセルに金ナノ複合体溶液、Avidin 溶液、Biotin 化ポリアクリル酸ナトリウム、水及びリン酸緩衝生理食塩水を順次加え、透過率測定を行った。

4. 研究成果

4-1 金ナノ粒子の融合現象の機構解明

Fig.1 に、所定の温度加熱した金ナノクラスター溶液の含まれる金ナノ粒子の TEM 像を示す。加熱をする前の溶液には、粒径が 5nm 程度の金ナノクラスターが存在している。90 °C で加熱した時には、粒径が約 80nm に成長した金ナノ粒子の存在が認められた。この金ナノ粒子に境界が認められない。このことは、この粒子はナノクラスターの凝集体ではないことを示している。50 °C, 70 °C の加熱処理では、粒径の大きな金ナノ粒子の生成の過渡状態が観察された。加熱温度 50 °C ではナノクラスターの融合が始まっている様子が、70 °C では、ナノクラスターの融合が進み、ナノ粒子が生成している様子が観察される。

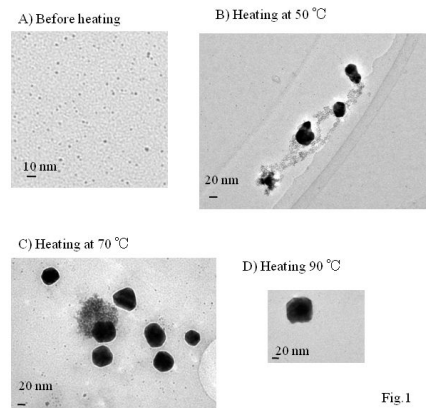


Fig. 1

粒径の大きなナノ粒子の形成は、消光スペクトルからも観察される (Fig. 2)。加熱温度の上昇とともに、波長 550nm における消光帯が上昇する。球状金ナノ粒子の粒径と極大消光波長とは、Mie 理論により関係づけられる。これによれば、極大消光波長 550nm を与える金ナノ粒子の粒径は 79 nm となり、TEM 観察により得られた金ナノ粒子の直径と一致する。この消光の度合い (吸光度) の増加は、DLS から得られた金ナノ粒子の平均粒径と密接な関連がある。(Fig. 3) DLS から得られた金ナノ粒子のポピュレーション変化は、温度の上昇とともに、ナノ粒子の粒径が徐々に大きくなっていくのではなく、粒径の

小さなナノ粒子の数が減り、粒径の大きなナノ粒子の数が増えていくことを示している。そしてこのことは、50、70 での TEM 像に見られるナノ粒子のサイズが比較的揃っていることとも一致する。加熱時間もナノ粒子の生成に対して重要な因子である。加熱時間が長くなることで、550 nm の消光帯が加熱時間の増大とともに、DLS における平均粒径も大きくなる (Supporting Information)。このことは、加熱温度と同様に、加熱時間が長くなることで粒径の大きなナノ粒子の数が増加していることを示している。

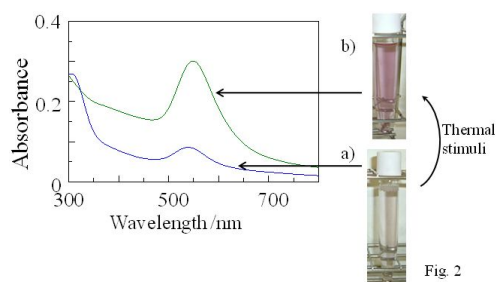


Fig. 2

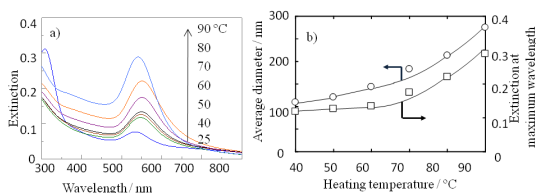


Fig. 3

金ナノクラスターに被覆する高分子の熱応答性は、粒径の大きなナノ粒子の生成に必須の条件である。熱応答性を持たない analog であるポリイソプロピルアクリルアミドでは、粒径の大きなナノ粒子は形成しなかった。同様に、ポリオキシエチレン (金ナノクラスターの合成の際に分散剤として用いた) も粒径の大きなナノ粒子を生成しない。高分子の熱応答性と同様に、ポリイソプロピルアクリルアミドに共重合させるモノマーの官能基も、粒径の大きなナノ粒子の生成に重要な役割を果たす。トリエチレントラミン基を導入した共重合体 (ポリイソプロピルアクリルアミド-co-アクリロイルトリエチレントラミン) は、ポリイソプロピルアクリルアミドよりも効率よく、粒径の大きな金ナノ粒子を生成させた。これに対して、カルボキシル基を導入した共重合体 (ポリイソプロピルアクリルアミド-co-アクリロイルメタクリル) では、粒径の大きな金ナノ粒子は生成しなかった。トリエチレントラミン基は金ナノクラスター表面との親和性が高いため、金ナノクラスター同士を融合させるのに、有効に作用したものと考えられる。それに対して、カルボキシル基はナノ粒子の安定させる効果があり、これがナノクラスターの融合を妨げているものと考えられる (クエン酸が金ナノ粒子の分散安定剤に用いられているように)。

金ナノクラスターの融合の阻害は、チオール化合物の添加によっても観察される。チオール基は金表面と安定な結合を形成するので、熱応答性高分子で被覆された金ナノクラスター溶液に添加されたチオール化合物は、チオール基を介して金ナノクラスターに結合する。そして、このチオール化合物は金ナノクラスターの保護剤として作用し、その融合を阻害する。結果として、チオール化合物は粒径の大きな金ナノ粒子生成を妨げる。添加するチオール化合物の濃度が増加するにつれて粒径の大きな金ナノ粒子の生成が強く阻害されるので、550 nm に起因する吸光度の増加が妨げられる。グリシンなどチオール基を持たない化合物は、金ナノ粒子の生成を阻害しない。このことは、この系がチオール化合物の検出に適用できることを示唆している。

4-2 高感度ナノプローブの開発

Avidin 濃度と散乱強度及び平均粒子径の関係を Fig. 4 に示す。散乱強度は Avidin 濃度が 1×10^{-8} mol/L の時に極大値を示した。一方平均粒子径は $1 \times 10^{-8.5}$ mol/L まで 400 nm 以上の値を示し、Avidin 濃度の増加とともに増加し、この濃度を超えると急激に減少した。このプロファイルは Avidin 濃度の影響という観点から三つの領域に分けられる。領域 1 では、熱応答性高分子の凝集体の形成に Avidin は大きな影響を与えず、熱応答性高分子と反応した Avidin の濃度に応じて平均粒子径が大きくなる。この領域では Biotin が相対的に過剰に存在するため、Avidin の持つ 4 つの部位のすべてに Biotin が結合しているものと考えられる。領域 2 では Avidin 量が Biotin の量に近くなっていくため、Avidin を核とする光散乱の原因になる複合体が形成される。領域 3 では、Avidin が Biotin の当量に対して過剰となるため、複合体におけるポリマーの割合が低下する。これにより、Avidin の水溶性が複合体の水溶性を支配し、結果として凝集体の形成が阻害される。Fig. 1 のプロファイルから、nmol/L レベルの Avidin が検出可能であった。

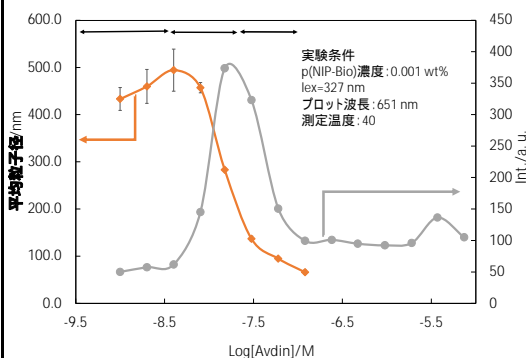


Fig. 4 Avidin 濃度と散乱強度及び平均粒子径の関係

4-3 近赤外蛍光金ナノ複合体の創製

発光性金ナノ粒子において、655 nm における発光バンドは文献 1) のものとほぼ一致している。これに対して、840 nm における発光バンドは、これまでに報告されていない。従って、840 nm において発光バンドを有する発光性金ナノ粒子は、これまで報告されているものとは異なる新たなタイプの発光性金ナノ粒子であることが期待される。また、AuNP310 は、紫外域の 310 nm において、表面プラズモン共鳴に起因する消光バンドを示した (Fig. 5 a, b)。

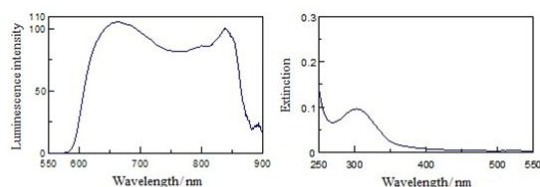


Fig. 5 a) AuNP@GSH の発光スペクトル
AuNP@GSH: 0.008 g-Au L⁻¹
励起波長: 354 nm
b) AuNP₃₁₀ の消光スペクトル
AuNP₃₁₀: 0.008 g-Au L⁻¹

AuNP@GSH、AuNP310 及び Poly(NIP-co-(AC-TETA)) を含む溶液の発光スペクトルの経時変化を Fig. 6a に示す。また、Fig. 6a において、840 nm における発光強度を時間の関数としてプロットしたグラフを Fig. 6b に示す。Fig. 6 に示すように、AuNP310 を添加すると、840 nm における発光強度は急激に増大した。その後、時間の経過に伴い発光強度はさらに増大した。発光性金ナノ複合体の構成要素について種々検討した結果、840 nm における発光強度の増大は、AuNP@GSH、AuNP310 及び Poly(NIP-co-(AC-TETA)) が共存する場合においてのみ観測されることが明らかになった。さらに、この発光性金ナノ複合体における発光特性について詳細に検討した結果、発光性金ナノ複合体に対して加熱処理を施すことで、840 nm における発光強度が著しく増大することを見出した。この発光波長は生体透過性が良好な近赤外領域に位置していることから、細胞イメージングへの適用について検討した。

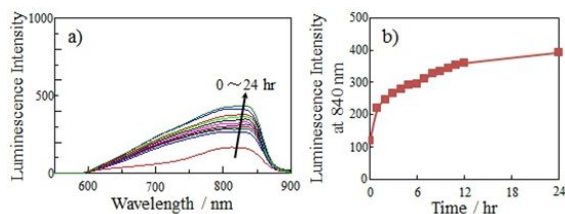


Fig. 6 発光性金ナノ複合体溶液の a) 発光スペクトルの経時変化、b) 840 nm における発光強度 vs. 時間のプロット

AuNP@GSH: 0.008 g-Au L⁻¹ 励起波長: 354 nm
AuNP₃₁₀: 0.008 g-Au L⁻¹
Poly(NIP-co-(AC-TETA)): 0.05 wt%

発光性金ナノ複合体と培養した HeLa 細胞の位相差イメージ及び蛍光イメージを Fig. 7 に示す。位相差イメージと蛍光イメージとの比較から、発光性金ナノ複合体が細胞にとり

込まれていることがわかる。また、発光性金ナノ複合体は細胞にとり込まれた状態でも発光性を保持している。以上の結果から、発光性金ナノ複合体は特別な修飾をすることなく癌細胞にとり込まれ、イメージングを行うことができることが示唆された。

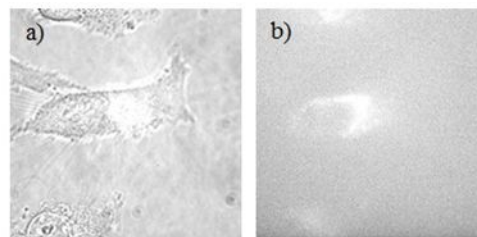


Fig. 7 発光性金ナノ複合体溶液と培養した HeLa 細胞の a) 位相差イメージ、b) 蛍光イメージ

< 引用文献 >

Po-Han Li et al., *Anal. Chem.*, 84, 5484(2012).

Zheng et al., *Lungmuir*, 22, 201(2007).

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 5 件)

Nobuo Uehara, Maki Fujita, and Tokuo Shimizu: Thermal-induced Growth of Gold Nanoparticles Conjugated with Thermoresponsive Polymer without Chemical Reduction, *J. Coll. Int. Sci.*, (査読有) vol. 359, pp. 142-147, 2011.

DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.078

Nobuo Uehara and Osamu Yoshida: Release of Nile red from thermoresponsive gold nanocomposites by heating solution and addition of glutathione, *Anal. Sci.*, (査読有) vol. 28, no. 12, pp. 1125-1132, 2012.

DOI: org/10.1021/jp310906b

Takeshi Morita, Kenta Kurihara, Osamu Yoshida, Hiroshi Imamura, Yoshiakiyo Hatakeyama, Keiko Nishikawa, and Nobuo Uehara

Fusion Growth of Gold Nanoparticles Induced by the Conformational Change of a

Thermoresponsive Polymer Studied by Distance Distribution Functions

J. Phys. Chem. C, (査読有) vol. 117, no.26, pp 13602–13608. 2013.

DOI:なし

Nobuo Uehara and M. Ogawa: Interaction between sodium dodecyl sulfate and poly(*N*-isopropylacrylamide) below its critical aggregation concentration, *Langmuir*, (査読有) vol. 30, 6367-6372 (2014).

DOI:

Nobuo Uehara, Yoshikuni Numanami: Homogeneous immuno-nephelometry composed of thermoresponsive gold nanocomposites and biotinylated palyanions, *Analytical Sciences*, (査読有) vol. 31, no. 6, 2015. In press

DOI:なし

[学会発表](計 15 件)

Nobuo Uehara and M. Ogawa, Discrimination of types of surfactants with using thermoresponsive polymers and fluorophore, Abstract of IUMRS-International Conference on Electronic Materials, Yokohama, 2012.

Y. Numanami and Nobuo Uehara, Fabrication gold nanocomposites to probe bio-molecules, Abstract of IUMRS-International Conference on Electronic Materials, Yokohama, 2012.

Mikako Mori, Minami Ogawa and Nobuo Uehara, Interaction of poly(*N*-isopropylacrylamide and surfactants under low concentration conditions, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2013- Analytical Biochemistry & Biophysics -A 209, Chiba 2013.

Chikara Haneishi, Nobuo Uehara, Determination of cysteine based on formation of a new plasmon resonance band

of gold nanoparticles, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2013- Analytical Biochemistry & Biophysics -A 238, Chiba 2013.

Shun Watanabe, Nobuo Uehara, Decomposition of metal sulfides under accelerated conditions, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2013- Analytical Biochemistry & Biophysics -A 331, Chiba 2013.

Mikako Mori, Nobuo Uehara, Ionic interaction between thermoresponsive polymers and surfactants for bio/medical applications, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2014- Analytical Technology Towards Future Society -A 118, , Chiba 2013.

Chikara Haneishi, Nobuo Uehara, Plasmonic properties of gold nano conjugates composed of gold clusters and thiol compounds, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2014- Analytical Technology Towards Future Society -A 230, Chiba 2014. Yoshifumi Hagimoto, Nobuo Uehara, Detection of avidin with thermo-responsive polymers having biotin group by light scattering, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2014- Analytical Technology Towards Future Society -A 310, Chiba, 2014.

Shun Watanabe, Nobuo Uehara, Development of adsorbent for selenium by surface modification of iron and steel making slags, Abstract of RSC Tokyo International Conference 2014- Analytical Technology Towards Future Society -A 426, Chiba, 2014.

萩元祥文, 上原伸夫, ビオチン基を導入した熱応答性高分子を用いる光散乱に基づくアビジンの検出, 日本分析化学会第 63 年会講演要旨集 Y-1080 (広島大学)

羽石力, 上原伸夫, 金ナノクラスターとチオール化合物とから成るナノコンジュゲートのプラズモニック特性, 日本分析化学会第 63 年会講演要旨集 Y1182(広島大学)

上原伸夫, 羽石力, 金ナノクラスターを用いるシステインの選択的検出, 日本分

析化学会第 63 年会講演要旨集 J3005
CD-ROM(2014) (広島大学)

N. Uehara and C. Haneishi , Plasmonic
properties of gold nano conjugates composed
of gold clusters and thiol compounds , 第 24
回日本 MRS 年次大会, No. 2368 CD-ROM,
2014 年 12 月 10-11 日, 横浜

上原伸夫, 小川陽, 熱応答性高分子が形
成する疎水性場を用いる低濃度界面活性
剤の識別, 日本分析化学会第 6 1 年会,
日本分析化学会第 61 年会講演要旨集
K3002, p.223 (2012) (金沢大学)
沼波 圭邦, 上原 伸夫, アビジン - ビ
オチン反応をモデルとする熱応答性金ナ
ノ複合体に基づく免疫センサー, 日本分
析化学会第 61 年会講演要旨集 Y1040,
p.330 (2012) (金沢大学)

〔図書〕(計 2 件)

小熊幸一編, 著者上原伸夫他 56 名, 分
析化学用語辞典, オーム社,
ISBN-978-4274210914, 2011.

小熊幸一, 上原伸夫, 他 17 名, これから
の環境化学入門, 講談社,
ISBN-978-4-06-154382-9, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 物質測定センサー
発明者: 上原伸夫, 大西徳幸
権利者: JNC 石油化学
種類: 特許
番号: 2012-194085
出願年月日: 平成 24 年 9 月 4 日
国内外の別: 国内

名称: 異種金属含有粒子の生産方法
発明者: 森田剛, 上原伸夫, 伊藤圭実
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: 2014-179681
出願年月日: 平成 26 年 9 月 1 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: 金ナノ複合体
発明者: 上原伸夫
権利者: 宇都宮大学
種類: 特許
番号: 第 5718095

出願年月日: 平成 23 年 2 月 28 日
取得年月日: 平成 27 年 3 月 27 日
国内外の別: 国内

名称: Substance Measurement Sensor
発明者: Nobuo, Uehara, Noriyuki Onishi
権利者: JNC
種類: 特許
番号: W02014/038585
出願年月日: 平成 24 年 9 月 4 日
取得年月日: 平成 26 年 3 月 3 日
国内外の別: 国際

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bunseki/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
上原伸夫 (UEHARA Nobuo)

研究者番号: 50203469

(3) 連携研究者
森田剛 (MORITA Takeshi)

研究者番号: 80332633