

名古屋大学 博士学位論文

生体内投与を想定した Au ナノ粒子と  
生体分子の吸着反応に関する研究

Study on adsorption reaction between Au nanoparticle and  
biomolecules toward administration to living body

平成 27 年 1 月

名古屋大学大学院工学研究科

量子工学専攻

塚田 千恵

## 目次

<b>第1章 序論</b>	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 ナノテクノロジーとナノ材料	1
1.1.2 ナノ材料の安全性評価	2
1.1.3 分子吸着反応系の選択（金ナノ粒子、L-システイン、リポソーム）	3
1.1.4 生体分子の放射線損傷	4
1.1.5 生体適合性の高い Au ナノ粒子のモデル提案	5
1.2 本論文の目的と構成	7
参考文献	8
<b>第2章 試料作製と実験手法</b>	10
2.1 液中プラズマ法による Au ナノ粒子の作製	10
2.2 X線吸収微細構造（XAFS：X-ray Absorption Fine Structure）	12
2.2.1 原理	12
2.2.2 シンクロトロン放射光と実験施設	15
2.2.3 大気圧 XAFS チャンバ（He-path システム）	28
2.3 原子間力顕微鏡法（AFM：Atomic Force Microscopy）	33
2.4 X線光電子分光法（XPS：X-ray Photoelectron Spectroscopy）	36
2.5 紫外・可視分光法（UV-Vis：Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy）	43
2.6 透過型電子顕微鏡法（TEM：Transmission Electron Microscopy）	46
2.7 赤外顕微分光法（IR：Infrared Spectroscopy）	48
参考文献	52
<b>第3章 Au ナノ粒子表面に吸着した L-システインの放射線損傷</b>	54
3.1 はじめに	54
3.2 実験	55
3.3 結果と考察	59
3.4 まとめ	72
参考文献	73
<b>第4章 Au ナノ粒子と L-システインの水環境下での吸着反応</b>	74
4.1 はじめに	74
4.2 実験	76
4.3 結果と考察	79

4.3.1 L-システイン分子の吸着	79
4.3.2 粒子径変化	86
4.3.3 光吸収波長の変化	90
4.4 まとめ	93
参考文献	95
<b>第5章 Au ナノ粒子と PC リポソームの吸着反応</b>	<b>96</b>
5.1 はじめに	96
5.2 実験	99
5.2.1 NEXAFS 測定用の試料作製	99
5.2.2 TEM 観察用の試料作製	101
5.3 結果と考察	120
5.3.1 Au 表面への吸着に寄与するフォスファチジルコリンの官能基の解明	120
5.3.2 リポソームに対する Au ナノ粒子の存在位置	125
5.4 まとめ	133
参考文献	135
<b>第6章 PC 修飾した Au ナノ粒子の作製とそのふるまい</b>	<b>137</b>
6.1 はじめに	137
6.2 実験	138
6.3 結果と考察	141
6.4 まとめ	147
参考文献	148
<b>第7章 結論</b>	<b>149</b>
<b>謝辞</b>	<b>153</b>
<b>発表論文一覧</b>	<b>156</b>

# 第1章 序論

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 ナノテクノロジーとナノ材料

ナノテクノロジーは今日の社会において日常的に使用される言葉となり、我々の身の周りに溢れているが、2000年頃から世界規模で注目されて発展した技術である。この発展のきっかけとなったのは、2000年1月に米国がナノテクノロジーを国家戦略の中心の一つに位置づけて研究・教育などの取り組みに対する一層の強化を目指し、国家ナノテクノロジー計画(NNI: National Nanotechnology Initiative)を掲げたことである[1-3]。欧州連合(EU: European Union)も2002~2006年の第6次フレームワークプログラム(FP6: 6th Framework Programme)においてナノテクノロジーを重要な推進事項として位置づけた[1]。また、我が国でも平成13~17年度(2001年4月~2006年3月)の第2期科学技術基本計画で、**ナノテクノロジー及びナノ材料**は**ライフサイエンス、情報通信、環境**と並んで重点推進4分野の1つとして優先的に研究開発資源を配分すべき分野であると定めた[4]。それから11年経過した平成24年度には、**ナノテクノロジー及びナノ材料**の位置づけに変化が生じ、上記の**ライフサイエンス、情報通信、環境**の各分野と並列ではなく、それらをはじめとした複数分野の領域に横断的に用いられ、広範かつ多様な技術分野を支える基盤的な役割を果たす“技術”と定義された[5]。つまり、今後はナノテクノロジーやナノ材料のそのものに対する研究のみではなく、「先端的基盤技術(科学技術の新たな可能性を切り拓き、先導する役割を担うこと)」としてそれらを用い、そして得られた成果が社会に対して形となって還元されることがより一層求められている[5,6]。これを受けて、現在、世界ではナノテクノロジーやナノ材料を用いた実用化が目指されており、その具体的な例として**ライフサイエンス**分野ではドラッグデリバリーシステム(DDS: Drug Delivery System)、バイオチップ、化粧品、また、**情報通信**分野では超高速プロセッサ、大容量メモリ、そして、**環境**分野では燃料電池、光触媒、などが挙げられる。

### 1.1.2 ナノ材料の安全性評価

ナノテクノロジーやナノ材料が工業として注目されて急速に発展する前の1990年頃から、アスベストのような繊維状物質や世界の経済発展に伴って増加したPM2.5(PM: Particle Matter)の生体に対する健康影響が評価され、呼吸器疾患や心疾患を引き起こす

ことが報告されている[7,8]。この研究結果に加え、

1. ナノ材料を生産する作業環境においても経気道的曝露による健康被害が想定されること[8]
2. DDS や化粧品などを日常的に使用する場合にナノ材料が長年にわたって体内に蓄積され、アスベストのように生体細胞を傷つけて生体毒性を示す[7]という危険性があること
3. ナノ材料のサイズが一般的に 1~100 nm (1 nm =  $10^{-9}$  m) と定義されており[8-10]、これまで生体影響が研究されてきた大きなサイズの材料とは異なる影響を及ぼす可能性があること[7]

という以上 3 点の懸念を受け、ナノテクノロジーやナノ材料が注目され始めた 2000 年頃から全世界においてナノ材料の生体に対する健康への影響や安全性が大きく危惧され、動物や細胞を用いて多くの研究がなされてきている。しかし、国際標準化機構 (ISO: International Organization for Standardization) や経済協力開発機構 (OECD: Organization for Economic Co-operation and Development) による世界標準の安全性評価のガイドラインは策定段階であり、未だにナノ材料の安全性の評価方法についての規定は提示されていない。この要因としては、(1) ナノ材料を構成している物質の多くが水に不溶性であり、すでに生体への安全性の評価方法が規定されている水溶性の化学物質に対する方法をそのままナノ粒子の評価方法として適用できないこと、(2) ナノ材料の一種であるナノ粒子 (NPs: Nanoparticles) は溶媒中で不安定であり作製後に凝集しやすいために、ナノ粒子そのものの影響ではなく、マイクロメートルサイズの凝集体の影響を評価していること、が挙げられる[7,8]。(2)のようにマイクロメートルサイズの粒子が安全性評価に用いられた場合、細胞のサイズよりも明らかに小さいサイズのナノ粒子で生じると懸念される体内動態の観測は不可能である。よって、不溶性のナノ粒子を溶媒中で安定に保持するために水溶性ポリマーや分散剤などの助剤を用い[7]、たとえ凝集したとしてもナノ粒子の大きさを 100 nm 以下に保つことが重要視されている[8]。しかしながら、これらの研究はナノ粒子の大きさに焦点を当てているが、表面化学状態については全く考慮されていない。ナノ粒子は単位体積あたりの表面積で定義される比表面積がバルク材料と比較して大きいため、表面の活性度や分子との反応性が飛躍的に高まると言われている[3,11]。また、生体は多くの分子が集まって構成されており、L-システインなどの遊離アミノ酸も豊富に存在するため、生体に対するナノ粒子の影響を評価するためには、生体分子とナノ粒子との分子吸着反応を明らかにすることが重要と考える。さらに、生体は約 70 wt% が水で構成されているため、生体分子と Au ナノ粒子の吸着反応を促す反応場として、水環境も重要である。

### 1.1.3 分子吸着反応系の選択（金ナノ粒子、L-システイン、リポソーム）

現在は医療分野でナノ粒子を用いた際の安全性評価についても焦点が当てられている。2014年に世界保健機構（WHO：World Health Organization）より発表された2000～2012年での死亡原因の第5位に入っている“がん”は[12]、手術で切除するなど様々な方法での治療が行われているが、局所的に生じたがんに対しては温熱療法やDDSが注目されている。温熱療法はすでに実用されているところもあり、幹部を生体外部から電磁波（マイクロ波など）により加温する方法が用いられている[13]。しかしこの方法では、電磁波が照射された部位の全体が温度の上昇により損傷をしてしまう可能性や、体の奥深くに存在するがんに対して電磁波を照射したとしても、脂肪や骨、体内の空気などにより減弱されてしまうために効果が減少する可能性がある。よって、より局所的に、かつ奥深くに存在するがんの治療として、金ナノ粒子（AuNPs）を用いた温熱療法[14]やDDS[15]が期待されている。

Au ナノ粒子は形状をロッドなどに变化させることで近赤外光の吸収が起こると報告されている[3,16]。近赤外光は生体組織を透過し、かつその近赤外光を吸収したAu ナノ粒子は光エネルギーを熱エネルギーに変換できる[17]。また、がん細胞は正常細胞と比べて熱に弱く、41℃以上で壊死し始める[13]。したがって、Au ナノ粒子をがん細胞に取り込ませた後、これまでの温熱療法と同様に生体外部から近赤外光を照射することで、選択的にがん細胞のみを死滅させることが可能である。さらに、DDSとしてがん細胞などの局部にのみ試薬を投与したい場合は、熱により変形する熱応答性高分子で修飾したAu ナノ粒子の高分子部分に試薬を取り込ませ、そのナノ粒子を目的の場所まで輸送したのちに近赤外光を照射し、Au ナノ粒子から生じた熱で高分子を変形させることで試薬を放出させることが実現できている[15]。

このように、これらの療法の使用が想定される場合、Au ナノ粒子を生体内に投与しなければ効果を発揮することはできない。その上、直接生体内に投与するナノ粒子としてAu ナノ粒子は多くの研究者から注目されている反面、その分子吸着のふるまいや表面における反応についてはほとんど議論されていない。本研究ではAu ナノ粒子が生体内に投与された後に生じると考えられる吸着反応として、Au ナノ粒子とL-システイン、または細胞膜の脂質二重層の2種類を選んだ。ただし、対象物質以外は不純物と考え、それらが存在しないシンプルな系を分子吸着反応の実験系としたため、細胞膜の脂質二重層については、二重層を構成するリン脂質の中でも最も多く存在しているフォスファチジルコリン（PC：Phosphatidylcholine）[18]を用い、生体膜モデルとして一般的に使用されているリポソームをPCで作製することにした。さらにAu ナノ粒子に対しても対象物質であるAu ナノ粒子以外の不純物を除去するために、一般的なAu ナノ粒子の作製手法である分散剤や還元剤を用いた溶液還元法ではなく、液中プラズマ法の中でもそれら試薬を用いずにAu ロッド、蒸留水、電解質のみで作製が可能なH. Namekiによつ

て開発された手法[19]により作製することにした。ただし、この液中プラズマ法で Au ナノ粒子を作製した際、電解質として塩化カリウム (KCl) や塩化ナトリウム (NaCl) を用いているために、Au ナノ粒子表面には Cl<sup>-</sup>イオンが部分的に吸着していることが報告されている[20]。Au ナノ粒子表面に Cl<sup>-</sup>イオンの吸着はあるが、本研究の目的である生体分子とナノ粒子の吸着反応を明らかにするためには、分散剤や還元剤を用いた場合と比較して十分に清浄と考える。

以上のように調製した試料を用いて、Au ナノ粒子とシステイン、または PC リポソームとの吸着反応を調べ、Au ナノ粒子を投与した場合に生体内で生じる現象に対して考察することを考えた。Au ナノ粒子の作製については第 2 章、L-システインと Au ナノ粒子の吸着反応については第 4 章、リポソームの作製方法及び PC リポソームと Au ナノ粒子の吸着反応については第 5 章に詳細を記す。

#### 1.1.4 生体分子の放射線損傷

Au ナノ粒子表面への吸着に寄与する生体分子の官能基及び吸着種を明らかにするためには、官能基を構成する原子の吸着反応前後における化学状態変化を解明することが有用であり、シンクロトロン放射光 (以下、放射光と記す) を用いた X 線吸収微細構造 (XAFS : X-ray Absorption Fine Structure) 測定はこの目的に最適な手法である。これまで、生体分子を主に構成する炭素 (C)、窒素 (N)、酸素 (O) に加えて、金属と反応性が高い硫黄 (S) を含む様々な分子と金属基板との吸着反応について、上述した各 K 吸収端に対する XAFS 測定を用いて研究がなされてきた[21,22]。一方で、放射線生物学の分野では、デオキシリボ核酸 (DNA) を構成する各原子の束縛エネルギーよりも高いエネルギーを持った X 線を生体に照射すると、DNA 内の結合が解離して DNA の損傷が生じると知られている[23-25]。このように X 線の照射により生じる物質の損傷を“放射線損傷 (Radiation Damage)”という。DNA 損傷は、DNA が直接イオン化する効果 (直接効果) と DNA の周囲に存在する水分子などがイオン化して生じた OH ラジカルなどの活性種が間接的に DNA を攻撃する効果 (間接効果) の 2 種類の効果により生じると考えられている[26]。直接効果の過程は主に“オージェ刺激イオン脱離機構”によって起こる[27]。この機構に対する詳細な説明に加えて、( ) 内にそれら過程に要する概ねの経過時間を示す。また、以下の(1)~(3)の過程を図 1-1 に示す。

- (1) 放射光の照射に伴い、分子を構成する原子の内殻電子が励起されて光電子として放出され、内殻に正孔が生成される (～0.1 fs)
- (2) 外殻電子による正孔の緩和が起こる過程でオージェ電子が放出され、それによりによってさらに内殻に正孔が生じ、一つの原子の中に 2 つの正孔が存在する状態



になる (1~10 fs)

- (3) 2 つの正孔同士のクーロン反発により、結合していた原子が解離してイオンとなって脱離する (10~100 fs)

上記(1)の後に生じる緩和過程には、上述した「オーজে電子の放出」の他に「蛍光 X 線の放出」があるが、本研究で用いる L-システインや PC を構成する元素は原子番号が 30 未満であるため、オーজে電子の放出による緩和が起こりやすい。また、XAFS は内殻の電子を励起させて測定を行うため、本研究の測定対象試料である Au ナノ粒子表面に吸着した生体分子に対しても XAFS 測定中にオーজে電子刺激イオン脱離が生じ、分子が解離する可能性がある。さらに、光イオン化断面積は物質に X 線を照射したときに構成元素の内殻電子が励起されて光電子として放出される確率と定義されるが、Au は N や O-K 吸収端付近のエネルギーをもつ X 線に対してもそれぞれ 0.5 及び 0.4 Mb/atom という光イオン化断面積をもつ[28]。よって、N や O-K 吸収端 XAFS 測定中に、Au ナノ粒子から放出された光電子が吸着分子内の結合の解離などを招く可能性がある。さらに、間接効果として述べた水分子により生じる活性種の影響についても、水環境下における Au ナノ粒子と生体分子の吸着反応の解明のためには調査することが必要である。以上より、Au ナノ粒子への吸着に寄与した生体分子の官能基を XAFS 測定により明らかにする前に、作製した試料に対して生体分子の放射線損傷が生じるか否かを議論する必要があると考える。放射線損傷に関しては本論文の第 3 章及び第 4 章にて記述する。

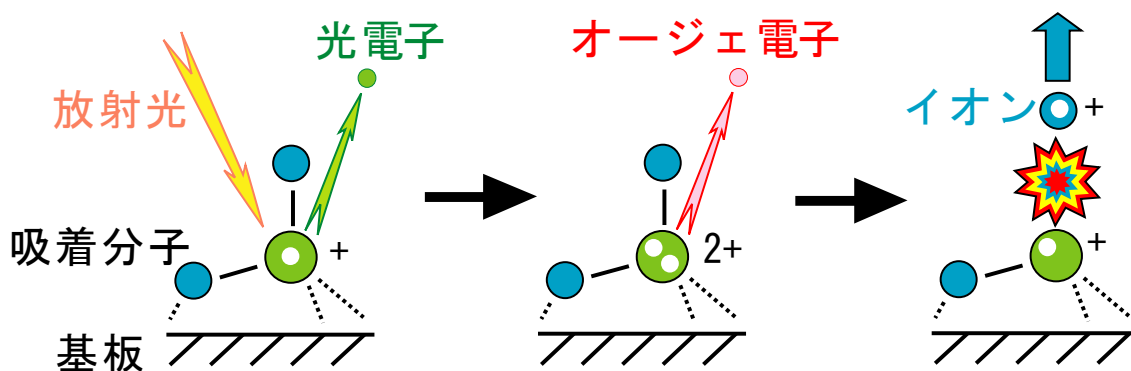


図 1-1 オージェ刺激イオン脱離機構の説明図[27].

### 1.1.5 生体適合性の高い Au ナノ粒子のモデル提案

1.1.1~1.1.3 節で Au ナノ粒子そのものに対する安全性評価の必要性について述べてきたが、現在、ナノ粒子の生体適合性を高めて実用化を目指すための研究も多く行われている。その適合性を高めるための方法の一つに、ナノ粒子表面を生体分子で修飾する



手法が考えられている[29]。1.1.3 節に述べたように、Au ナノ粒子はロッドなどに形状を変化させると近赤外光を吸収するようになるために医療分野への応用に期待されている[3,13]。ロッド状の Au ナノ粒子の作製時に用いる一般的な試薬として、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（[別名] 臭化セチルトリメチルアンモニウム、CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide）が挙げられるが[30]、この CTAB は吸入、皮膚、眼、経口摂取のいずれにおいても生体に害を与える臭素 (Br) を含んでいる[31]。この CTAB のみを細胞に与えた場合も、CTAB で覆われた Au ナノ粒子を細胞に与えた場合も、細胞を壊死させてしまうという報告がされている[32]。よって、ナノ粒子を作製する際に用いる試薬についても注意を払う必要がある。一方で、H. Takahashi らはそのロッド状の Au ナノ粒子を作製した後に、ナノ粒子表面の CTAB とリン脂質の PC を置換した場合に細胞の生存率が向上したと報告し[29]、T. Niidome らはポリエチレングリコール鎖で修飾した場合に培養した細胞に対する毒性は認められなかったと報告した[33]。このようにこれまで報告されている生体適合性を高めた Au ナノ粒子は分散剤や還元剤といった試薬を用いて作製された後に他の分子で修飾を行っており、適合性も確認されているが、ナノ粒子作製時に使用した試薬を全て除去できているかの懸念が残る。よって本研究にて分散剤や還元剤を用いずに液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子表面に、後から PC 分子を修飾することで、より生体適合性の高いナノ粒子の作製が可能ではないかと考えた。PC 修飾 Au ナノ粒子の作製と評価に関しては第 6 章に記述する。

## 1.2 本論文の目的と構成

本研究では水環境下における Au ナノ粒子と生体分子の吸着反応について明らかにする。対象の生体分子としては、アミノ酸の中でも金属と吸着反応性が高いチオール基 (-SH) をもつ L-システイン、そして生体の細胞膜の脂質二重層を主に構成するリン脂質であるフォスファチジルコリン (PC) を選んだ。生体分子が Au ナノ粒子表面に吸着するときに寄与する官能基の特定や吸着種の解明のために分光学的手法を用い、また、生体分子の吸着により生じる水環境下でのナノ粒子のふるまいの解明のために顕微鏡を用いる。さらに、細胞膜モデルのリポソームを PC で作製し、Au ナノ粒子との吸着反応後のリポソームに対して顕微鏡観察を行うことで、ナノ粒子のリポソームに対する吸着過程についても明らかにする。本研究では X 線を用いた分光学的手法により分子の化学状態分析を行うが、生体分子は X 線による損傷を受けやすく、水分子はラジカルなどの活性種へ分解されやすいことから、放射線損傷についても解明する必要があると考えた。以上を踏まえて、各章では次の内容を明らかにする。

第 3 章： 放射光の X 線を用いた場合の Au ナノ粒子表面に吸着した L-システインに対する放射線損傷の影響

第 4 章： 水環境下における Au ナノ粒子に対する L-システインの吸着種とナノ粒子のふるまい、及び放射線損傷の影響

第 5 章： PC リポソームと Au ナノ粒子の吸着反応に寄与する官能基およびそのふるまい

第 6 章： PC 修飾された Au ナノ粒子の作製と水環境下でのナノ粒子のふるまい

Au ナノ粒子と生体分子の吸着反応について、分光学的手法を用いた分子の化学状態分析と、顕微鏡を用いた吸着反応前後のナノ粒子そのものやリポソームとのふるまいの観察から複合的に評価を行い、ナノ粒子を生体内に投与する場合の生体適合性や材料開発についての知見を得ることを目的とする。

## 参考文献

- [1] 文部科学省－科学技術・学術審議会、研究計画・評価分科会『ナノテクノロジー・材料に関する研究開発の推進方策について』平成18年.
- [2] 池澤直樹『アメリカの「国家ナノテクノロジー計画」』知的資産創造 (2006).
- [3] 日本化学会／編「金属および半導体ナノ粒子の科学 新しいナノ材料の機能性と応用展開」化学同人 (2012).
- [4] 内閣府『第2期科学技術基本計画』平成13年.
- [5] 文部科学省－科学技術・学術審議会、研究計画・評価分科会、ナノテクノロジー・材料科学技術委員会『ナノテクノロジー・材料科学技術の研究開発方策について<中間取りまとめ>』平成23年.
- [6] 内閣府『第4期科学技術基本計画』平成23年.
- [7] 国立環境研究所『ナノ粒子・ナノマテリアルの生体への影響－分子サイズにまで小さくなった超微小粒子と生体反応』環境儀 (2010).
- [8] 森本泰夫、田中勇武『総説 ナノ粒子の有害性評価』産業衛生学雑誌 (2008).
- [9] P.J.A. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit, E. Oberdörster, *Particle and Fibre Toxicology* **3:11** (2006) 1-35.
- [10] 川口春馬／監修「ナノ粒子・マイクロ粒子の最先端技術」シーエムシー出版 (2004).
- [11] 小泉光恵、目義雄、中條澄、新原皓一／編「ナノマテリアルの技術」シーエムシー出版 (2007).
- [12] World Health Organization : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, 2014年12月29日最終閲覧.
- [13] 独立行政法人国立がん研究センター がん対策情報センター、がんの治療方法、温熱療法 : [http://ganjoho.jp/public/dia\\_tre/treatment/hyperthermia.html](http://ganjoho.jp/public/dia_tre/treatment/hyperthermia.html), 2015年1月12日最終閲覧.
- [14] H.-C. Huang, K. Rege, J.J. Heys, *ACS NANO* **4** (2010) 2892-2900.
- [15] S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Kitayama, T. Niidome, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19** (2011) 2130-2135.
- [16] 寺西利治／編「ナノ学会編 シリーズ第3巻 ナノコロイド 合成・物性・機能」近代科学社 (2014).
- [17] D. Bartczak, O.L. Muskens, S. Nitti, T. Sanchez-Elsner, T.M. Millar, A.G. Kanaras, *Small* **8** (2012) 122-130.
- [18] 中村桂子、松原謙一／監訳「Essential 細胞生物学 原書第2版」南江堂 (2009).
- [19] 行木啓記、「トライアルコア～愛知県のプラズマ技術産業応用の取り組み～」 : [http://www.aichi-inst.jp/sangyou/up\\_docs/hyoumen\\_trial\\_detail.pdf](http://www.aichi-inst.jp/sangyou/up_docs/hyoumen_trial_detail.pdf), 2015年1月7日最終閲覧.

- [20] T. Mizutani, Y. Abe, H. Hamaguchi, H. Nameki, S. Yagi, *Conference Proceedings NANOCON 2012*, ISBN 978-80-87294-32-1 (2012).
- [21] S. Yagi, K. Matsumura, Y. Nakano, E. Ikenaga, S.A. Sardar, J.A. Syed, K. Soda, E. Hashimoto, K. Tanaka, M. Taniguchi, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **199** (2003) 244-248.
- [22] J. Hasselström, O. Karis, M. Weinelt, N. Wassdahl, A. Nilsson, M. Nyberg, L.G.M. Pettersson, M.G. Samant, J. Stöhr, *Surface Science* **407** (1998) 221-236.
- [23] 杉浦紳之、山西弘城／著「放射線生物学」通商産業研究社 (2013).
- [24] 山口彦之／著「放射線生物学」裳華房 (1995).
- [25] 藤井健太郎、*放射光* **16** (2003) 151-158.
- [26] 原子力機構・先端基礎研究センター 放射場生体分子化学研究グループ、放射能とDNA 損傷 : <http://asrc.jaea.go.jp/soshiki/gr/yokoya-gr/mysite5/index.html>, 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [27] 太田俊明／編「X 線吸収分光法 -XAFS とその応用-」アイシーピー (2002).
- [28] J.-J. Yeh, I. Lindau, *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **32** (1985) 1-155.
- [29] H. Takahashi, Y. Niidome, T. Niidome, K. Kaneko, H. Kawasaki, S. Yamada, *Langmuir* **22** (2006) 2-5.
- [30] J. Gao, C.M. Bender, C.J. Murphy, *Langmuir* **19** (2003) 9065-9070.
- [31] 国際科学物質安全性カード (ICSC : International Chemical Safety Cards) : <http://www.nihs.go.jp/ICSC/>, 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [32] E.E. Conner, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, *Small* **1** (2005) 325-327.
- [33] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *Journal of Controlled Release* **114** (2006) 343-347.

## 第2章 試料作製と実験手法

### 2.1 液中プラズマ法による Au ナノ粒子の作製

Au ナノ粒子を水環境下で作製するために用いられる一般的な手法として、溶液還元法がある。この手法では塩化金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) の Au(III) を還元剤により Au(0) に還元しながらナノ粒子を作製しており、作製されたナノ粒子を凝集させないために多くの場合は分散剤として高分子を用いている。よって、Au ナノ粒子の表面がそれら還元剤や分散剤といった試薬により覆われていると考えられる。これまで Au ナノ粒子の安全性評価に使用されてきた粒子の多くは溶液還元法で作製されているが、本研究では Au ナノ粒子そのものと生体分子との吸着反応を明らかにしたいことから、液中プラズマ法の中でもそれら試薬を用いずに Au ナノ粒子を作製できる H. Nameki によって開発された手法に注目した[1]。液中プラズマ法も当初は  $\text{HAuCl}_4$  と分散剤が用いられており、タングステン (W) などの金属を電極にして溶液中でグロー放電のプラズマを発生させることで Au(III) を還元してナノ粒子を作製した後、分散剤によりナノ粒子を高分散に保っていた[2-8]。また、銀 (Ag) ナノ粒子ではあるが、H. Lee らは液中プラズマ法で W 電極を用いて硝酸銀 ( $\text{AgNO}_3$ ) を還元してナノ粒子を作製した際、エネルギー分散型 X 線分光測定により電極の W が Ag ナノ粒子に不純物として含まれていたことを確かめている[9]。さらに H. Nameki らは水溶性アルミ塩水溶液である  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  水溶液中で W 電極間にプラズマを発生させ、アルミナナノ粒子を作製したところ、X 線回折測定よりそのアルミナナノ粒子中には電極の W に由来するタングステン酸化物のピークが確認されたと報告した[1]。この結果を受けて、H. Nameki らは電極およびナノ粒子作製源として Au ロッドを用い、電極溶出によりナノ粒子を合成する工夫を行った。彼らが用いた材料は、Au ロッド、蒸留水、そして電解質としての塩化カリウム (KCl) または塩化ナトリウム (NaCl) のみであり、Au ロッド以外は生体内に存在するもののみで作製が可能である。この手法で作製した Au ナノ粒子表面の化学状態について、T. Mizutani らは Au ナノ粒子表面に Cl<sup>-</sup> イオンが吸着することで表面の一部分の Au が酸化して Au<sup>3+</sup> になっていることを確認しているが、錯体の  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  は存在しないと報告した[10]。還元剤や分散剤を使用していないために Au ナノ粒子表面はそれら試薬によって覆われておらず、かつナノ粒子表面に吸着している Cl<sup>-</sup> イオンも全面ではなく部分的に存在していることから、多くの分子吸着サイトが残っていると推測される。よって、液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子表面は、Cl<sup>-</sup> イオンの吸着はあるが、本研究の目的である生体分子との相互作用を検証するには十分に清浄と考えた。

続いて、液中プラズマ法による Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製方法の手順について詳細を述べる。この手順は、第 3~6 章で用いる Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製

の全てに該当するが、電解質の種類、溶液中の電解質の濃度、電極間の距離、電圧、プラズマの発生時間は異なるため、それらを表 2-1 にまとめた。ただし、Au ナノ粒子の作製源および電極としての Au ロッド (99.95%, 1 mm  $\phi$ , ニラコ社製)、ナノ粒子作製場としての蒸留水は全て共通である。また、電解質の KCl ( $\geq 99.95\%$ ) と NaCl ( $\geq 99\%$ ) は和光純薬工業社製の各粉末を用いた。

表 2-1 Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製条件.

	電解質	濃度(mM)	Au 電極間距離 (mm)	電圧(kV)	プラズマ発生時間 (分)
第 3,4 章	KCl	5	0.5~1.0	1.9	30
第 5,6 章	NaCl	10	0.1	3.2	10

#### 作製手順

Au ロッドをアルミナのガイシ管 (外径 2 mm $\phi$ 、内径 1 mm $\phi$ ) に入れて、片方の Au ロッドの先端をガイシ管から 1 mm 出し、そのロッド先端を金属やすりにより研磨した。さらに、ガイシ管が入る大きさの穴を開けた円筒型 (上底 14.6 mm $\phi$ 、下底 9.9 mm $\phi$ 、高さ 24.7 mm) のバイトン栓 (関東製) にセットし、これを 2 つ準備した。図 2-1 のように両壁面に約 12 mm $\phi$ の大きさの穴が開いている立方体型のガラスビーカー (60 $\times$ 60 $\times$ 80 mm<sup>3</sup>) に、上記で準備したゴム管をはめ込み、Au ロッドの電極間に 0.5~1 mm もしくは 0.1 mm の隙間がある状態で向かい合わせにセットした。KCl 水溶液 5 mM もしくは NaCl 水溶液 10 mM に調整した各水溶液をビーカーに 180 mL 加え、攪拌子で攪拌した。栗田製作所の交流超高圧電源を用いて Au ロッド間に周波数 20 kHz、パルス幅 3  $\mu$ s の条件で 1.9 kV または 3.2 kV の電圧をかけてグロー放電のプラズマを発生させた。プラズマ発生による Au ナノ粒子の生成時間は 10~30 分とした。

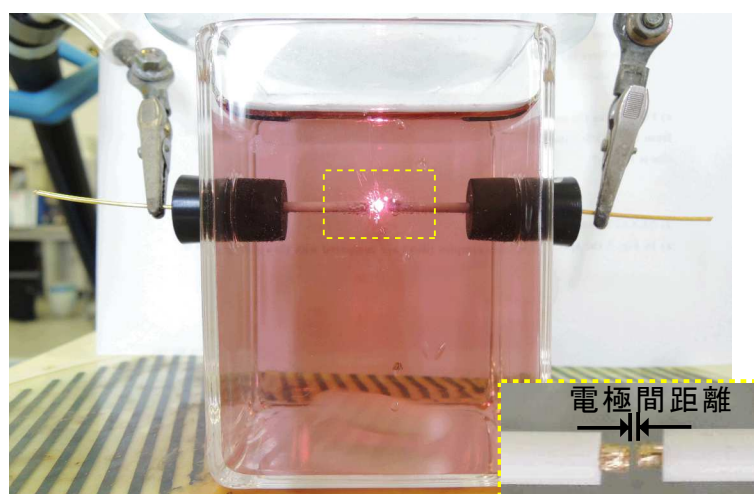


図 2-1 液中プラズマ法による Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製.

## 2.2 X線吸収微細構造 (XAFS : X-ray Absorption Fine Structure)

本研究では、Au ナノ粒子に吸着した生体分子の化学状態やその試料に対する放射線損傷の影響を調べるために、窒素(N), 酸素(O), リン(P), 硫黄(S)の各 K 吸収端近傍 X 線吸収微細構造 (NEXAFS : Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) 測定を行った。

### 2.2.1 原理

物質の X 線吸収係数は入射 X 線のエネルギーが高くなると減少する。しかし、各元素、分子には特有のイオン化エネルギーや空軌道が存在し、それ以上のエネルギーをもつ X 線の入射により遷移が可能となる。このため X 線吸収スペクトルは対応するエネルギーで急激な立ち上がりを見せる。これを吸収端と呼ぶ。X 線吸収係数に対して吸収端付近を詳しく調べると、吸収係数は複雑な形をした微細構造をもつ。図 2-2 は白金粉末の X 線吸収微細構造 (XAFS : X-ray Absorption Fine Structure) スペクトルである[11]。この図から、吸収端の後にいくつかの顕著な構造を示した後、振動しながら次第に減衰していくことが分かる。吸収端近傍では元素や分子の種類によってそれぞれ特有の傾向を示す。これは電子構造や局所構造の違いを反映している。

XAFS は発生原因の違いから吸収端のごく近傍のものと、吸収端より数十 eV 高いところのものに分けられる。前者を NEXAFS、後者を広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure) と呼ぶ[11,12]。NEXAFS からは X 線を吸収する原子の化学状態、その原子に結合 (配位) している元素の種類、結合様式、配位構造などの情報が得られる。EXAFS からは吸収原子の周囲の局所構造 (結合距離、配位、構造の乱れ) の情報が得られる。

こうした微細構造が生じる原因として、NEXAFS 領域では次のように説明される。吸収端近傍のエネルギーをもつ X 線の吸収によって電子は図 2-3 に示すように高いエネルギーの空準位 (束縛状態)、あるいは真空準位のすぐ上の連続状態に遷移する。原子の内殻準位もこれらの高エネルギー準位と共に原子の配置やポテンシャルの変化に敏感であり、準位間エネルギーに変化をもたらす。このため NEXAFS には X 線を吸収する原子の電子状態やそのごく近傍の局所構造が反映される。一方、EXAFS 領域では振動構造が見られる。これは、X 線の吸収により放出される光電子を表す外向き球面波と放出原子周辺の原子による光電子の散乱を表す散乱波が干渉するからである。そのため、EXAFS には X 線吸収原子周辺の局所構造が反映される。

ここで、含硫アミノ酸の L-シスチン粉末と L-システイン粉末の S-K 吸収端 NEXAFS (S K-edge NEXAFS) 測定の結果を例にとって考えてみる (図 2-4)。入射した X 線は硫黄の内殻 1s 軌道 (K 殻) の電子を励起する。L-シスチンの硫黄原子は S-S および S-C、L-システインの硫黄原子は S-C の結合をもつため、励起された電子は各分子由来の反結合性軌道  $\sigma^*(S-C)$  や  $\sigma^*(S-S)$ 、連続準位などの空軌道に吸収される。このピーク構造は硫



黄原子の置かれている化学状態によって変化を受ける。また L-システインの硫黄原子は水素とも結合しており、反結合性軌道 $\sigma^*(\text{S-H})$ への励起に起因するピークが $\sigma^*(\text{S-C})$ の高エネルギー側に存在するため、 $\sigma^*(\text{S-C})$ のピーク形状は非対称になっている。

このように、NEXAFS は中心原子の電子構造や対称性を強く反映する。このため、原子の価数などの化学状態に関する情報や、結合の角度や結合している原子の種類などの構造に関する情報を得ることができる。

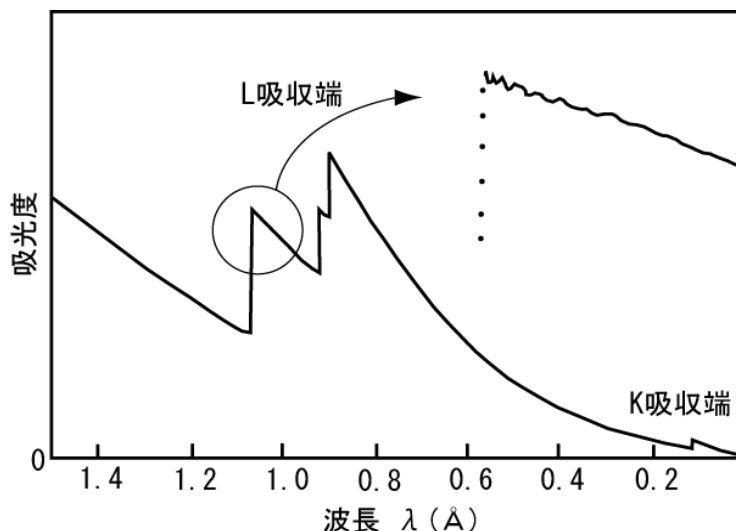


図 2-2 白金粉末の XAFS スペクトル[11].

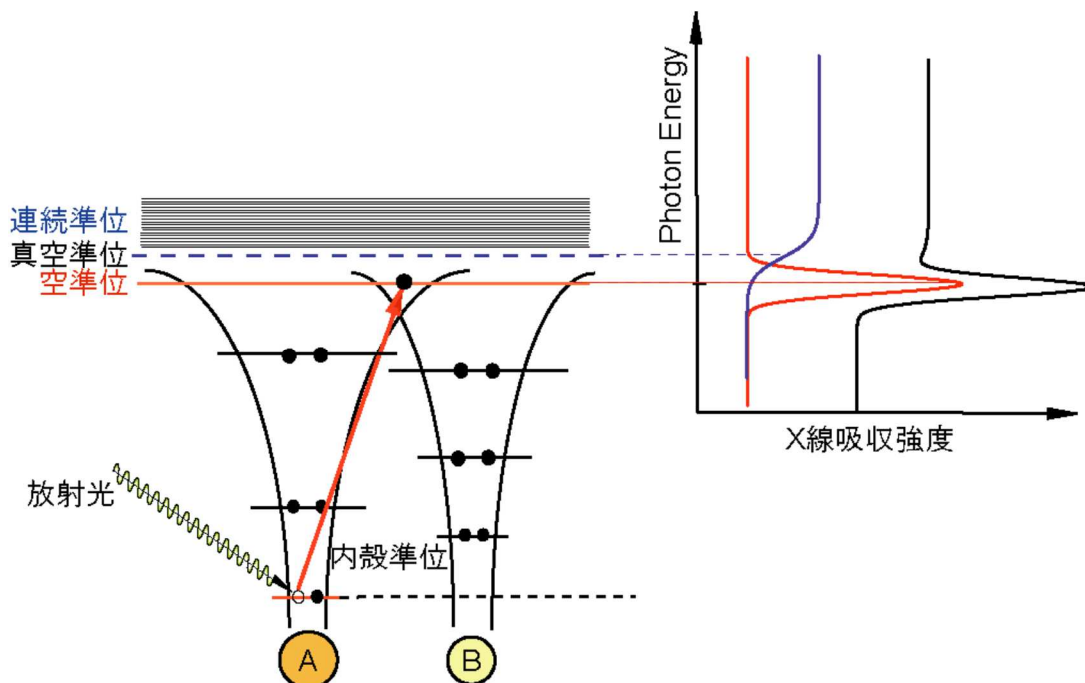


図 2-3 NEXAFS の原理.

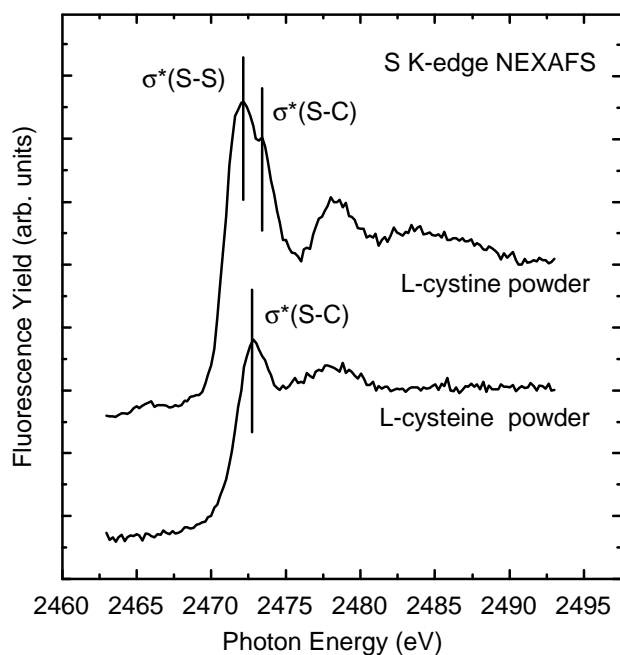


図 2-4 L-シスチン粉末と L-システイン粉末の S-K 吸収端 NEXAFS スペクトル.

## 測定方法

入射 X 線により内殻電子が励起されると、原子が安定な状態（基底状態）に戻るために外殻軌道の電子が内殻の空準位に遷移して緩和が生じる。この緩和過程として、励起状態と基底状態のエネルギー差に相当する蛍光 X 線（特性 X 線）またはオージェ電子が放出される（図 2-5）。

XAFS スペクトルは基本的に試料透過前後の X 線の強度比により得られ、これを透過法と呼ぶ。しかし、軟 X 線の領域では薄膜などの特殊な場合を除いて入射 X 線が試料を透過することは困難なため、透過法による測定は適していない。他方で、X 線の吸収後に起こる励起原子の緩和過程の頻度は X 線の吸収量に比例することから、これを測定することで、その強度を透過法による吸収係数として代用できる。具体的な測定手法としては、試料から放出された電子を補完するためにアースから試料に対して流れる試料電流を測定する全電子収量法、そして、緩和過程において試料から放出される蛍光 X 線またはオージェ電子を測定する蛍光 X 線収量法またはオージェ電子収量法がある。

本研究では P または S-K 吸収端 NEXAFS 測定において、シングルチャンネルアナライザー（SCA : Single Channel Analyzer）やエネルギー分散型 X 線検出器を用いて、目的とする元素からの蛍光 X 線のみを取り出すことで Signal/Background (S/B) 比が高い状態で測定が可能になるため、蛍光 X 線収量法を用いた。緩和過程として、蛍光 X 線とオージェ電子の放出の二通りがあることは上述したが、それら過程が生じる頻度は亜鉛

(原子番号  $Z=30$ ) でおおよその閾値がある。リン ( $Z=15$ ) や硫黄 ( $Z=16$ ) では、蛍光 X 線放出による緩和過程よりもオージェ電子放出による緩和過程が支配的に起こるが、SCA やエネルギー分散型 X 線検出器を用いて P や S の K 蛍光と他元素の K、L、M 蛍光を区別することで S/B 比を向上できるため、軽元素 ( $Z=30$  以下) であり、かつ、希薄な系の場合でも、蛍光 X 線収量法は有効であると言える。

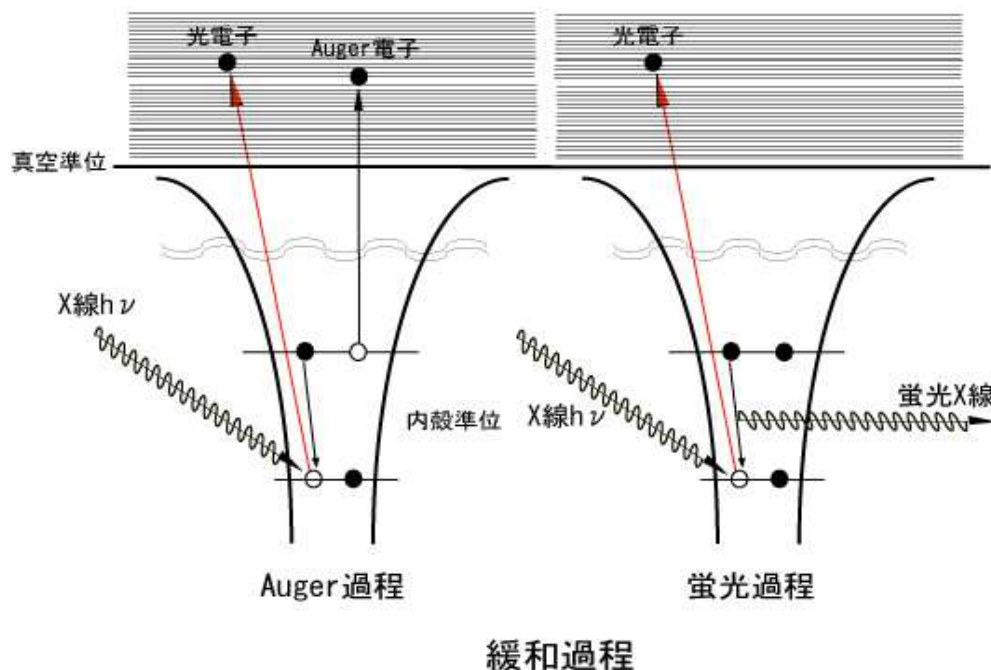


図 2-5 励起原子の緩和過程.

## 2.2.2 シンクロトロン放射光と実験施設

シンクロトロン放射光 (以下、放射光と記す) とは、電子蓄積リングにより高いエネルギーをもった状態で光速近くまで加速された電子が磁場によって軌道の変化を受けた際に、その軌道の接線方向に放射される電磁波のことである。放射光の特徴としては主に以下の 5 つが挙げられる。

- ① 輝度が高い。輝度は、電子のエネルギーが高いほど、また、バンチと呼ばれる電子集団が一点に絞られるほど高くなる。
- ② 光子エネルギー可変性がある。放射光は赤外線から X 線までの非常に広い波長領域にわたり連続なスペクトルを持っており、分光器によって使用する波長領域および入射 X 線のエネルギーを任意に選択できる。また、入射 X 線のエネルギーを連続

的に変化させることが可能である。

- ③ 指向性が高い。電子蓄積リング内で加速された電子が光速に近づくほど指向性が高く、かつ角度広がり小さくなる。
- ④ 偏光性がある。偏向電磁石から放出された光は、光の進行方向と電場ベクトルを含む電子軌道面内では直線偏光している。
- ⑤ パルス性がある。電子蓄積リングには複数個のバンチが周回しており、そのバンチが電磁石により軌道方向を曲げられた時だけ放射光が発生するため、パルス性を有している。パルス光の発生する時間の間隔（パルス周期）は HiSOR では  $2 \mu\text{s}$  であるが、数百 ps 程度の施設もある。

これらの利点の中でも、本研究で用いた XAFS 測定は ①輝度が高いことと ②光子エネルギー可変性があることが特に有用である。しかし、放射光はこれらの利点を持つ反面で、大規模な施設を必要とすることや、放射線障害を防ぐための様々な法的制約を受けることなどの不便さもある。

次に、使用した実験施設と各ビームラインについて述べる。

図 2-6 に示す広島大学放射光科学研究センター (HiSOR) は小型放射光施設である[13]。電子をマイクロトロンによって  $150 \text{ MeV}$  まで加速した後にレーストラック状の電子蓄積リングに入射・蓄積し、さらに  $700 \text{ MeV}$  まで加速している。周長  $21.95 \text{ m}$  の電子蓄積リングは両端にある偏向電磁石、直線部にある直線偏光アンジュレータと直線-楕円-円偏光が切り替えられるヘリカルアンジュレータから構成されている。HiSOR では、BL-3 表面 XAFS 実験ビームラインで S-K 吸収端、BL-14 スピン共鳴実験磁気円二色性実験ビームラインで N, O-K 吸収端の各 NEXAFS 測定を行った。

図 2-7 に示すあいちシンクロトロン光センター (AichiSR) は中型放射光施設である[14]。電子を直線加速器により  $50 \text{ MeV}$  に加速した後にブースターシンクロトロンによりさらに  $1.2 \text{ GeV}$  まで加速して電子蓄積リングに入射している。蓄積電流値は  $300 \text{ mA}$  以上であり、トップアップ入射による一定蓄積電流運転が行われている。周長  $72 \text{ m}$  の電子蓄積リングに、8 台の常伝導偏向電磁石と 4 台の  $5 \text{ T}$  超伝導電磁石の計 12 台の偏向電磁石を設置している。AichiSR では、BL6N1 材料化学状態・構造分析 II ビームラインで P-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った。

図 2-8 に示す立命館大学 SR センターは小型放射光施設である[15,16]。蓄積リングの電子エネルギーは  $575 \text{ MeV}$  であり、入射直後の蓄積電流値は約  $250 \text{ mA}$  である。周長  $3.14 \text{ m}$  の電子蓄積リングに  $3.8 \text{ T}$  の超伝導電磁石が 1 台設置されており、電子は真円型軌道を描いているため電子ビームの安定性が非常に良いという特徴をもつ。立命館大学 SR センターでは、BL-2 超軟 X 線分光ビームラインで N, O-K 吸収端 NEXAFS 測定、BL-15 赤外顕微分光ビームラインで顕微 IR 測定を行った。

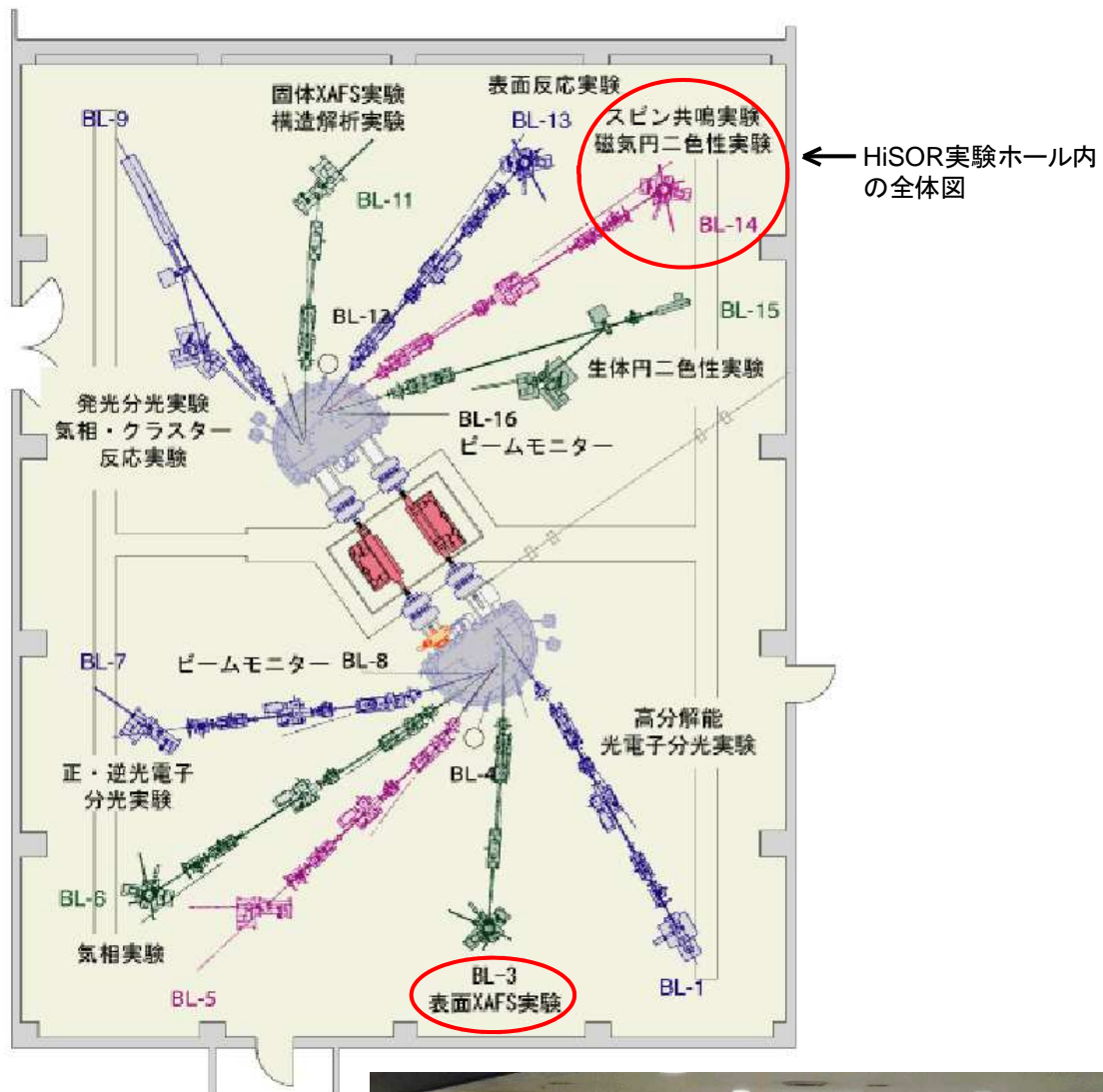


図 2-6 HiSOR 実験ホール内全体図と写真.



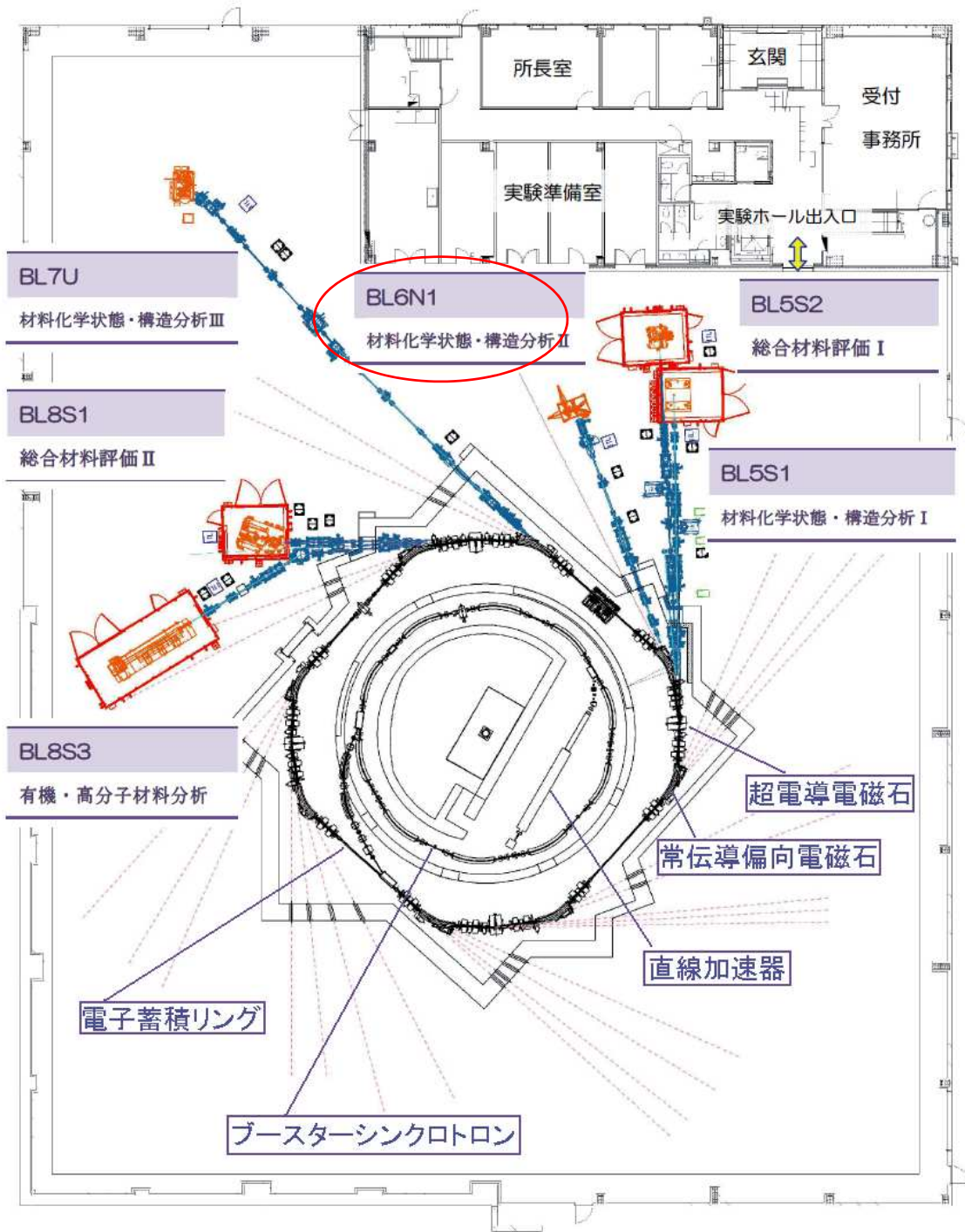


図 2-7 あいちシンクロトロン光センター実験ホール内全体図.

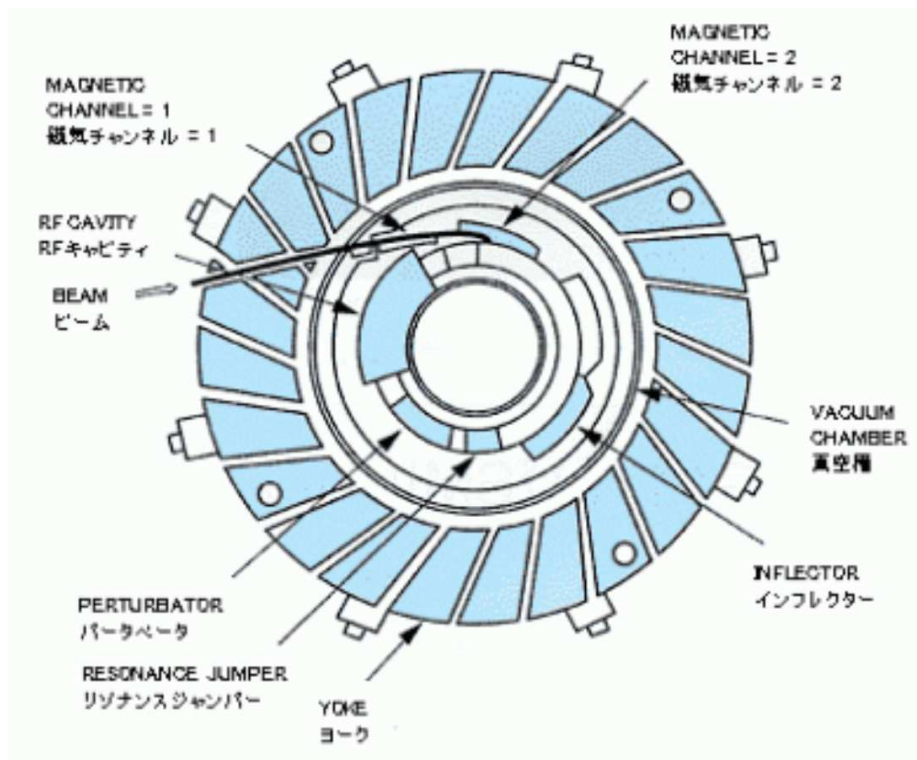
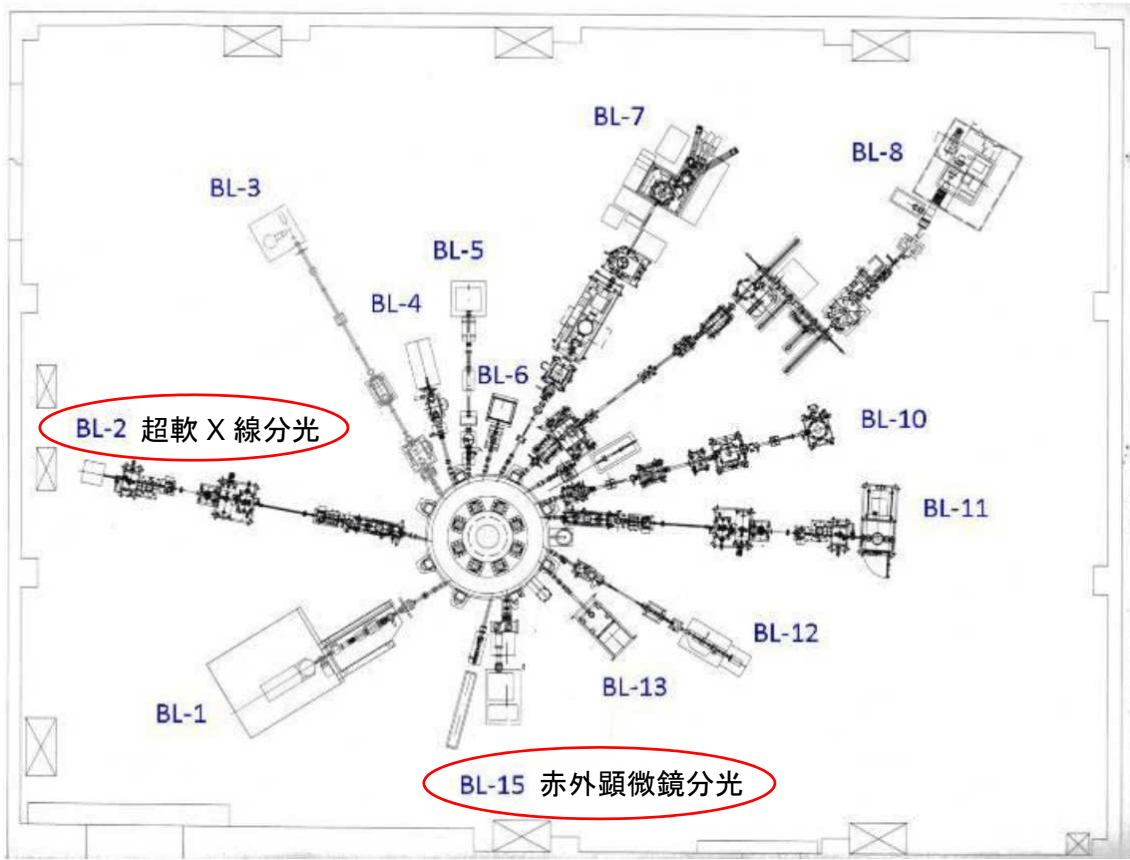


図 2-8 立命館大学 SR センター実験ホール内全体図[15]と電子蓄積リング[16].



続いて、NEXAFS 測定で使用した HiSOR BL-3、AichiSR BL6N1、HiSOR BL-14、立命館大学 SR センター BL-2 の各ビームラインの詳細について述べる。顕微 IR 測定で用いた立命館大学 SR センター BL-15 の詳細は 2.7 で記す。

### HiSOR ビームライン BL-3

HiSOR の表面 XAFS 実験 軟 X 線二結晶分光ビームラインである BL-3 は、[図 2-9](#) に示されるようにダイヤフラム (低エネルギーカットフィルター用の Be 窓 (厚さ 20  $\mu\text{m}$ ) 付き)、ダブルワイヤーモニターシステム、前置鏡 (SiO<sub>2</sub> 基板に Pt/Cr コートされたもの)、デマルケスト板 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基板に Cr がドーピングされたもので、数 eV 以上の電磁波もしくは粒子線が当たると赤色に光る性質を持つ)、二結晶分光器、そして四象限スリットから構成されている[17]。まず、前置鏡で入射光を 2° 振り上げることにより約 5000 eV 以上の高エネルギー光がカットオフされた後、二結晶分光器で放射光は単色化される。波長  $\lambda$ 、格子面間隔  $d$ 、回折が起こる角度  $\theta$  の間には Bragg の式、

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.1)$$

が成り立つ。ここで、 $n$  は回折の次数である。プランク定数  $h$ 、光速  $c$ 、光の振動数  $\nu$  として、 $\lambda$  をエネルギー  $E$  に変換すると、

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = \frac{nhc}{2d \sin \theta} \quad (2.2)$$

となり、分光結晶の角度を変えることで任意の光子エネルギーを得ることが可能となる。[図 2-10](#) に分光器内部の写真を示す[17]。本研究では InSb(111) [ $2d=0.74806 \text{ nm}$ ]と Si(111) [ $2d=0.62712 \text{ nm}$ ]の分光結晶の中でも反射率の高い InSb(111)を使用した。[図 2-11](#) に HiSOR BL-3 のエネルギープロファイルを示す[17]。軟 X 線領域の中でも約 2000~4000 eV の X 線を用いた XAFS 測定によって、K 吸収端では Si から Ca までの軽元素、L 吸収端では Kr(L<sub>1</sub>)から Sn(L<sub>3</sub>)、さらに、M 吸収端では Eu(M<sub>1</sub>)から U(M<sub>5</sub>)までの各元素を含んだ化合物の化学状態や構造に関する貴重な情報を得ることが可能である。

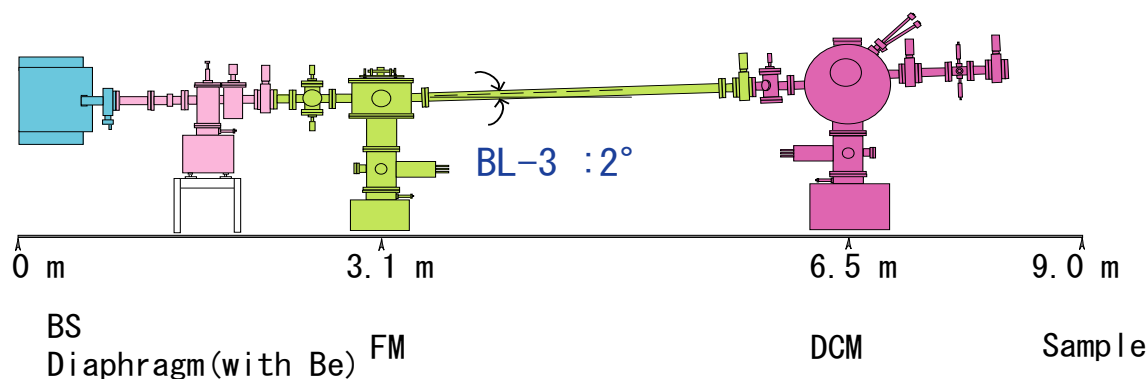


図 2-9 HiSOR BL-3 の測定装置概略図[17].

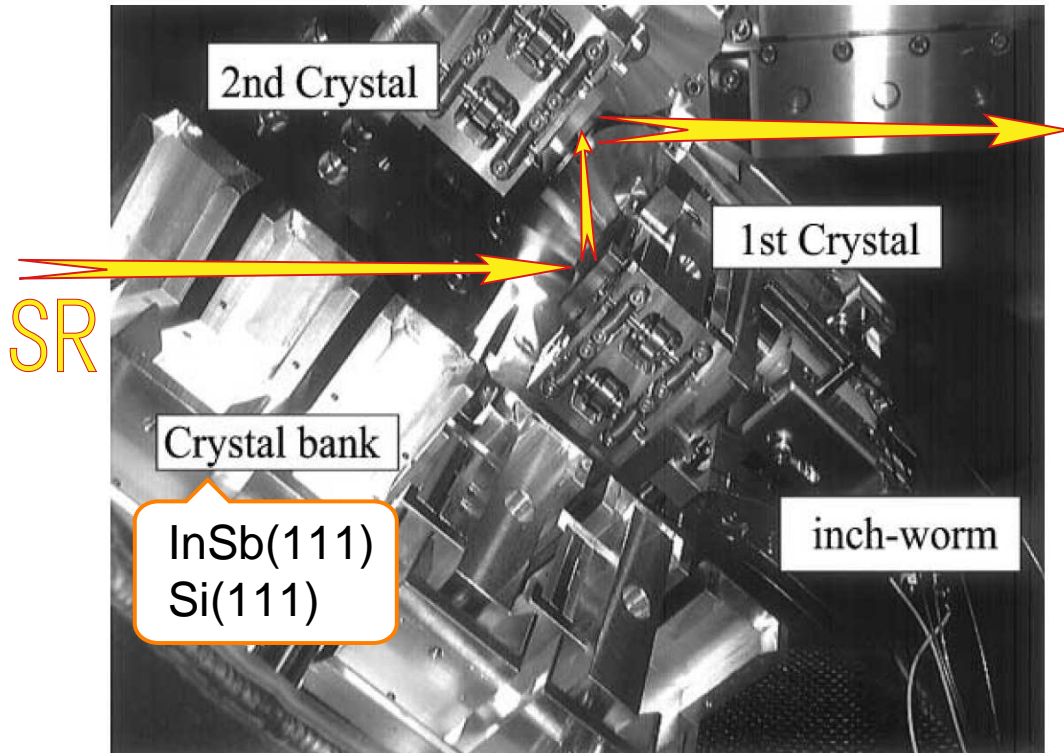


図 2-10 HiSOR BL-3 の分光器内部の様子[17].

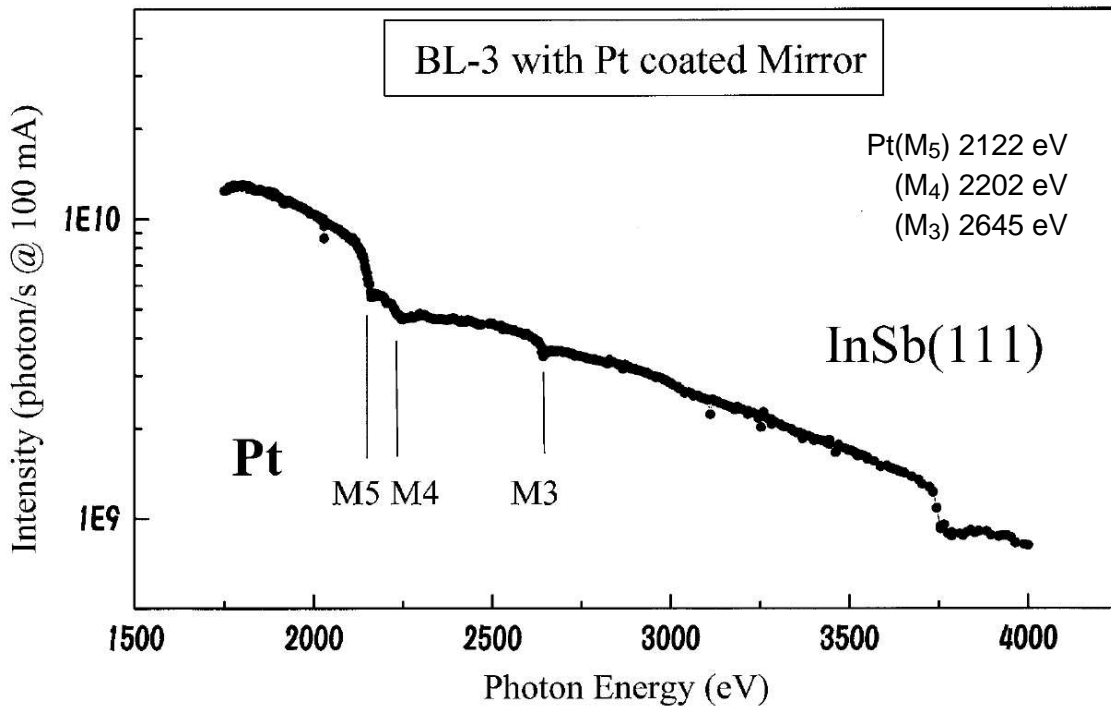


図 2-11 HiSOR BL-3 のエネルギープロファイル[17].

## AichiSR ビームライン BL6N1

AichiSR の材料化学状態・構造分析 II の軟 X 線領域 XAFS 測定用ビームラインである BL6N1 の構成を図 2-12 に示す。基本的な構成は HiSOR BL-3 と同じであるが、ビームラインの全長（偏向電磁石から測定試料までの距離）は 16.8 m となっている。蓄積リングを周回していた電子が偏向電磁石により進行方向が曲げられることで放射光が発生し、その放射光は、低エネルギーカットフィルターで熱源となる紫外・可視光が除去され、四象限スリットで成形された後、集光ミラーで集光されて、さらに二結晶分光器で単色化される。図 2-13 に AichiSR BL6N1 の二結晶分光器の写真を示しており、分光結晶として InSb(111) [ $2d=0.74806$  nm]、Ge(111) [ $2d=0.65333$  nm]、Si(111) [ $2d=0.62712$  nm]、の利用が可能である。図 2-14 に AichiSR BL6N1 のエネルギープロファイルを示す[18]。AichiSR BL6N1 では軟 X 線領域の中でも約 1750~6000 eV の X 線を用いて、K 吸収端では Si から Cr、L 吸収端では Rb(L<sub>1</sub>)から Xe(L<sub>3</sub>)までの各元素を含んだ化合物を対象に XAFS 測定を行うことができる。また、図 2-14 のプロファイルに見られるスパイク状の強度の減少はグリッチ (glitch) と呼ばれ、各結晶由来の X 線回折が起こることで現れる。もしも、入射 X 線 ( $I$ ) と透過 X 線 ( $I_0$ ) の双方にグリッチが存在した場合、通常は吸収係数  $\mu$  の算出時に  $I/I_0$  を行うためにグリッチは打ち消される。しかし、「検出系の応答が線形でない」、「入射 X 線の高次光が無視できない」「散乱光や蛍光が無視できない」「試料が不均一」などの実験条件の不備があると、グリッチは打ち消されずに残ることがある。測定エネルギー領域で  $I/I_0$  を行った際にグリッチが生じた場合、分光結晶の結晶方位を変えることでグリッチをなくすことは可能であるが、本論文での測定ではグリッチの影響が見られなかったため、分光結晶の方位を変更せずに測定を行っている。

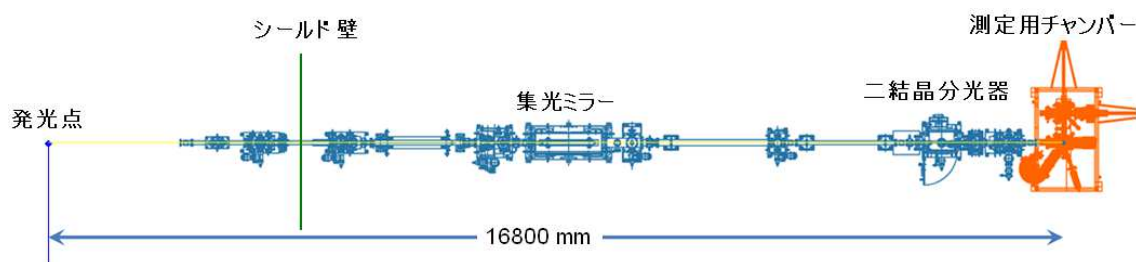


図 2-12 AichiSR BL6N1 の測定装置概略図.

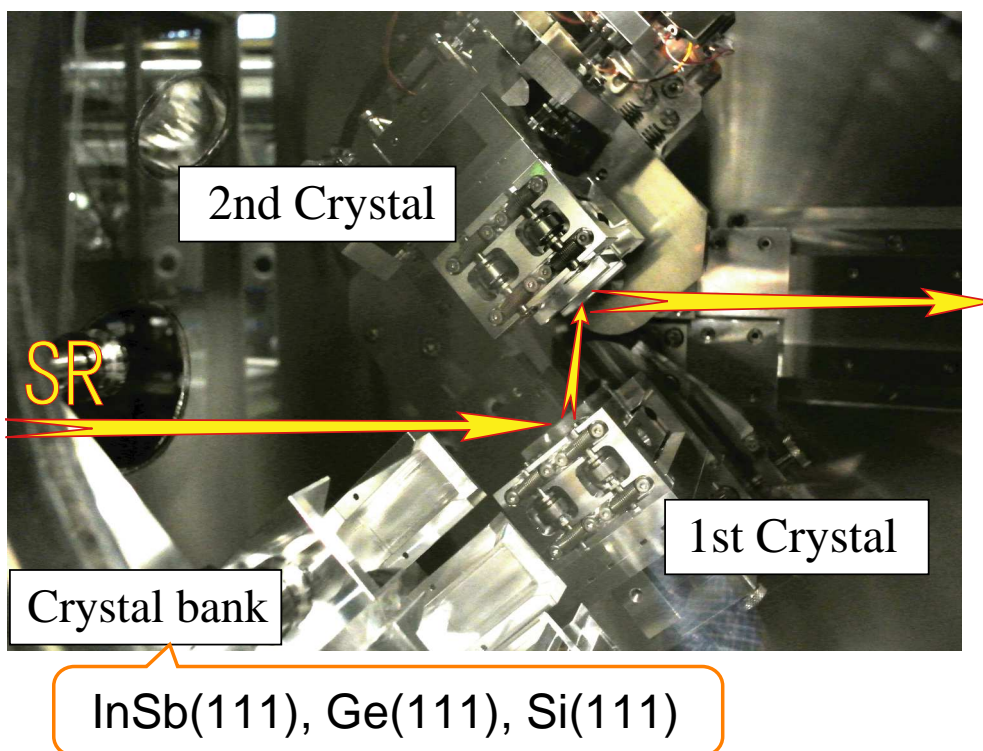


図 2-13 AichiSR BL6N1 の分光器内部の写真.

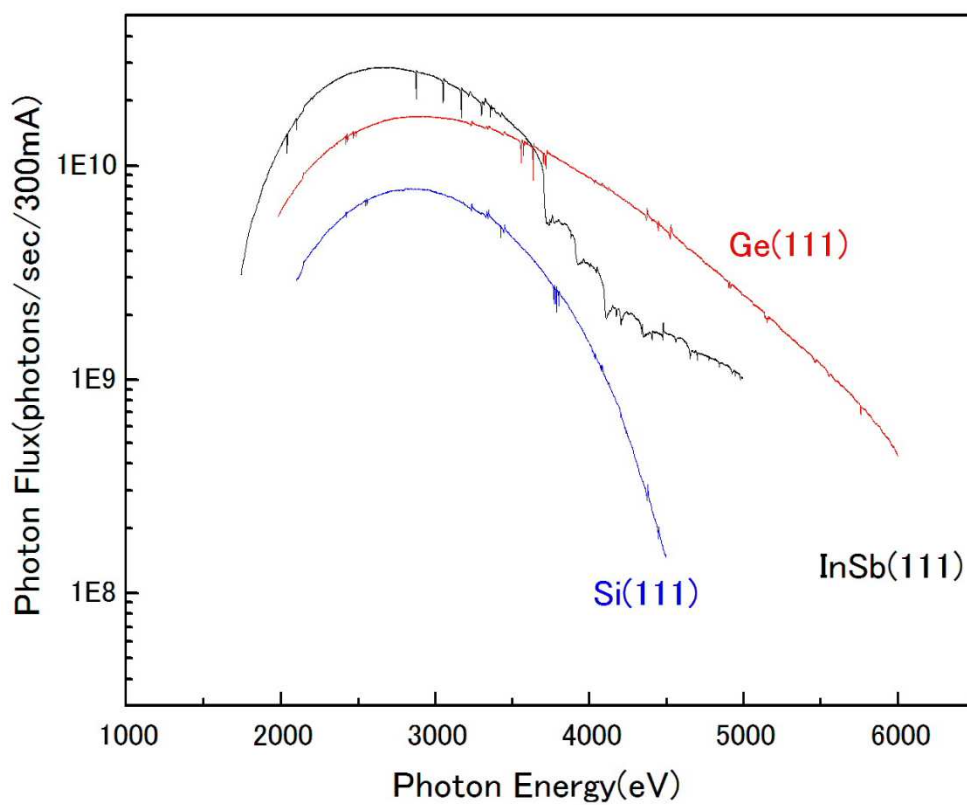


図 2-14 AichiSR BL6N1 のエネルギープロファイル[18].

## HiSOR ビームライン BL-14

HiSOR のビームライン BL-14 は、電子蓄積リングに接続されている BL-1,7,13 のようなドラゴン型分光器に類似しているが、入射スリットが可動、出射スリットを固定して使用するという形式になっており、[図 2-15](#) のようにドラゴン型分光器の使用とは前後反対の構造になっている[\[19\]](#)。このビームラインは軟 X 線領域の円偏光成分も取り出せるように設計されており、放射光源の軌道面からわずかに上下方向に傾いた方向（上下数 mm 程度）に出射した楕円偏光の光も有効に取り出せる。また、高フラックスな軟 X 線が利用できるように大型の前置鏡が使用され、分光器の波長掃引にあわせて前置集光鏡 (VFM) のピッチ方向と入射スリット位置が最適化された値に変化するよう調整されている。

固定されている出射スリットの下流部に分光された光が一旦集光するように設計されており、ここに主として磁気円二色性実験が可能な実験ステーションが設置されている。本研究ではこのチャンバに試料を導入し、直線偏光を用いた全電子収量法での XAFS 測定を行った。また、さらに下流方向には後置集光鏡があり、最終端の末端装置（光電子分光実験が可能な実験ステーション）に再度集光し、末端に置かれる光電子分光装置 (SES2002) に最適なビームサイズになるように設計されている。

この BL-14 で利用可能な軟 X 線領域のエネルギーは 3 枚のグレーティング (G1, G2, G3) によって概ね 100~1200 eV となっている ([図 2-16](#) 参照)。そのため、C, N, O の内殻光電子分光測定はもちろんのこと、3d 遷移金属の L 吸収端、希土類金属の M 吸収端をカバーしており、それらの XPS 測定や XAFS 測定にも利用可能である。ただし、測定を実施した 2012 年では G1 のグレーティングのみが使用可能であったため、C の測定は行うことが困難であった。また、このビームラインでは X 線磁気円二色性測定 (XMCD)、XPS 測定、XAFS 測定そして走査型トンネル顕微鏡観察 (STM) の測定が可能である。G1 を用いた際のエネルギー分解能 ( $E/\Delta E$ ) は、N1s 付近のエネルギー領域で約 5300 である。



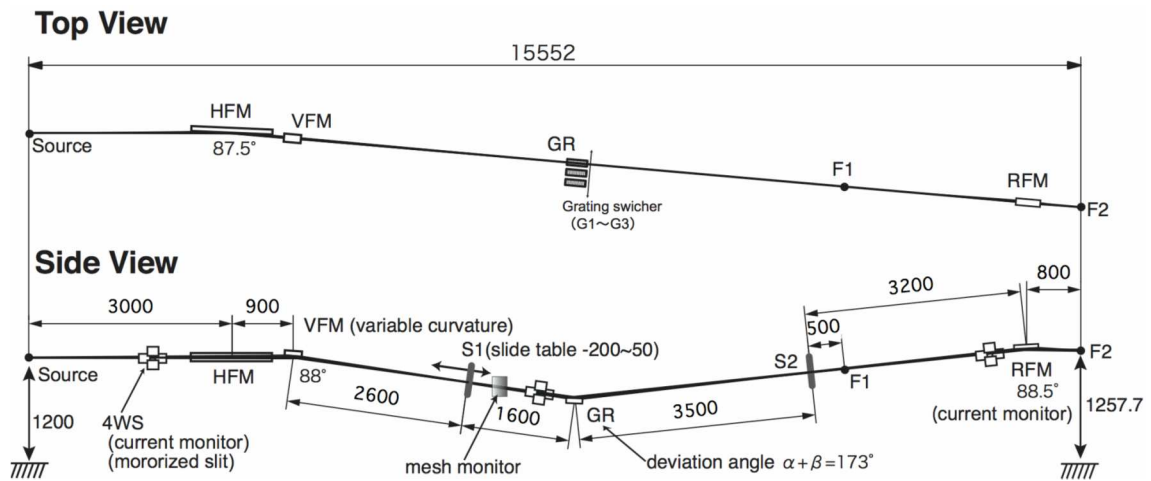


図 2-15 HiSOR BL-14 の測定装置概略図[19].

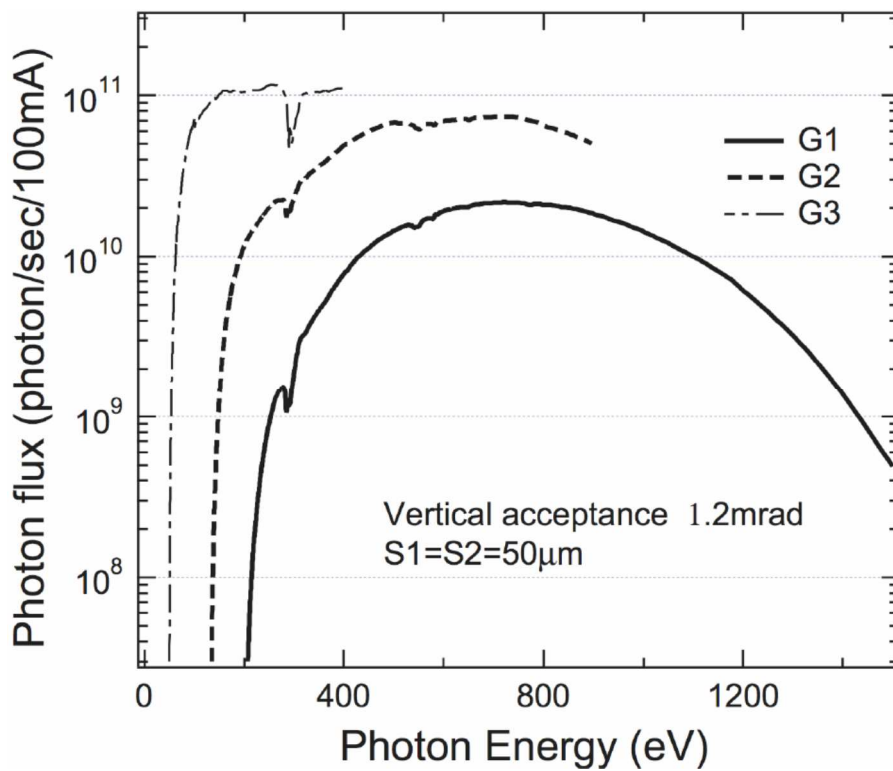
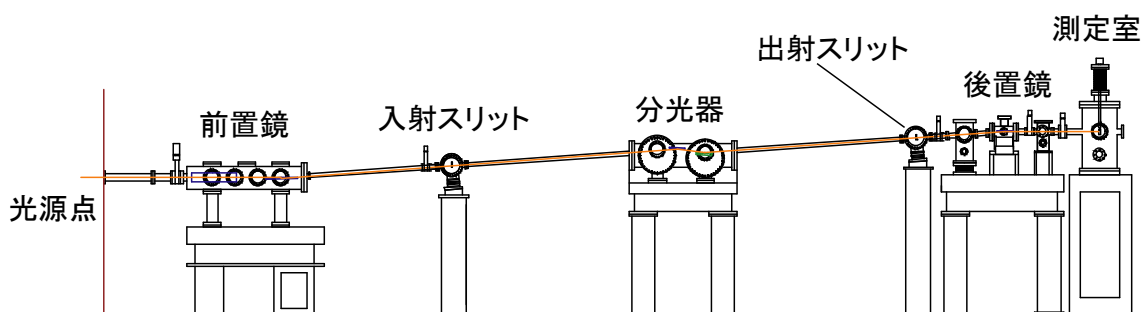


図 2-16 HiSOR BL-14 の各グレーティングに対するエネルギープロファイル[19].

## 立命館大学 SR センター ビームライン BL-2

立命館大学 SR センターのビームライン BL-2 は、不等間隔回折格子を 4 枚備えており、利用したい軟 X 線領域のエネルギーにあわせて回折格子を切り替えることで、エネルギー領域としては 40 eV から 1000 eV 程度までの XAFS 測定を行うことが可能である[20]。測定対象元素としては Li から F までの K 吸収端や Mn、Fe、Co、Ni、Cu などの 3d 遷移金属の L 吸収端である。BL-2 の構成は図 2-17(a)および(b)になっており、前置鏡、入射スリット、分光器、出射スリット、後置鏡を経て測定室の試料まで分光した軟 X 線を利用可能である[21]。BL-2 の概要を表 2-2 にまとめた。また、BL-2 の各回折格子を用いた場合のエネルギープロファイルについては図 2-18 を参照されたい。

(a)



(b)

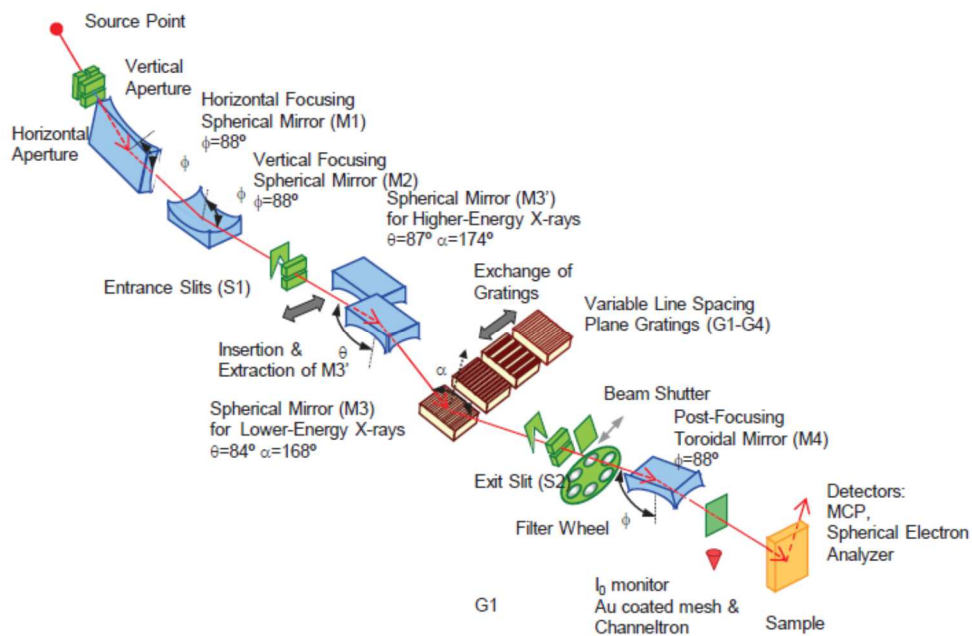


図 2-17 (a), (b) 立命館大学 SR センター BL-2 の測定装置概略図[21].



表 2-2 BL-2 の概要[20].

エネルギー範囲	40-1000 eV (4 枚の不等溝間隔回折格子を利用)
ビームサイズ	1 mm <sup>H</sup> ×1 mm <sup>V</sup> (但し、スリットを開けることで Vertical を 5 mm 程度まで広げることが可能)
測定モード	全電子収量 (試料電流計測)、部分電子収量 (MCP 利用)、蛍光 X 線収量 (MCP または SDD 利用) での測定が行え、全ての測定モードは同時に測定可能.
試料形態	固体 (粉末、薄膜)、イオン液体など
その他	BL-10 と共通のトランスファーベッセルの利用も可能

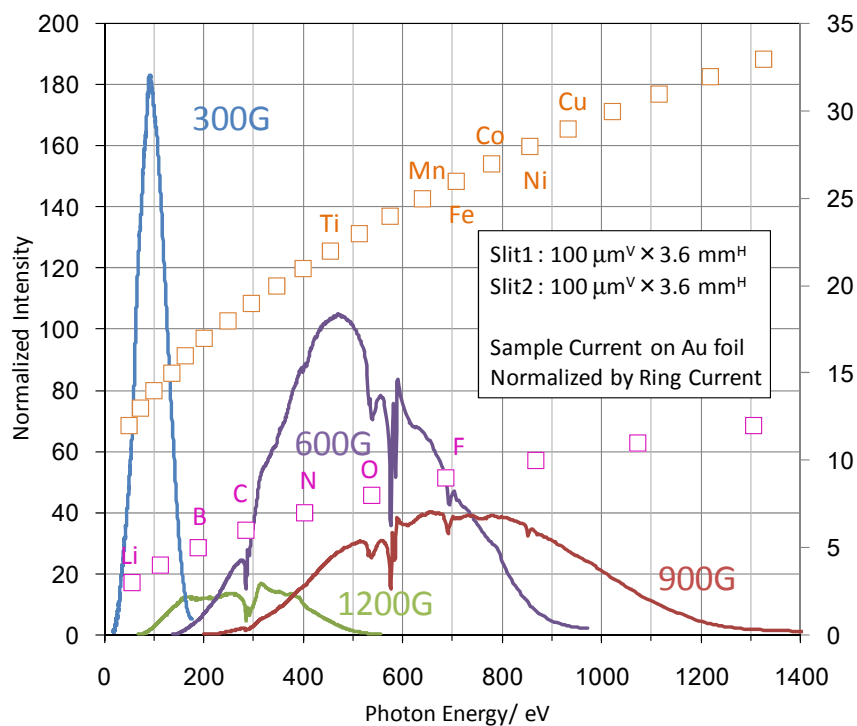


図 2-18 立命館大学 SR センター BL-2 のエネルギープロファイル[21].

### 2.2.3 大気圧 XAFS チャンバ (He-path システム)

約 2000~4000 keV の軟 X 線を用いた XAFS 測定を行う際、通常は X 線が大気により減弱されてしまうことから、超高真空条件下での測定が望ましい。しかしながら、本研究では生体環境をなるべく模した状態での Au ナノ粒子と生体分子の吸着反応を明らかにしたいため、水を保持した状態での NEXAFS 測定が重要である。また、試料について、水環境下で分子吸着反応を促した後に自然乾燥させている場合でも、Au ナノ粒子または吸着分子の周りに存在している水をなるべく水を残したままで測定を実施したい。そこで、S. Yagi らによって開発された He-path システム[22]を用い、大気圧条件下での測定を実施することにした。He-path システムの詳細を以下に示す。

図 2-19 に、測定で使用した「大気圧条件下 XAFS チャンバ」の外観図を示す[22]。このチャンバは、HiSOR BL-3 と AichiSR BL6N1 の末端に接続された超高真空チャンバのさらに下流に接続されているが、超高真空チャンバとは厚さ 20  $\mu\text{m}$  の Be 窓で仕切られており、超高真空と大気圧を分けることができる。それぞれのビームラインに接続されたチャンバを図 2-20 と図 2-21 に示す。試料交換の際、大気圧チャンバ内は大気圧であることから、超高真空チャンバとは異なり試料交換が容易であり、多くの試料の測定が可能である。また、本研究で用いる S-K 吸収端由来の 2463~2493 eV や P-K 吸収端由来の 2140~2170 eV の入射 X 線は大気中において数 mm 通過するうちにほとんど減弱してしまうが、大気圧チャンバ内を He ガスで満たすと、図 2-22 に示す通り、チャンバ内を入射 X 線が通過する距離 (Be 窓から試料までの距離) である 200 mm に対してならば入射 X 線の 98~99% 以上はチャンバ内を透過できる[23]。試料と検出器の距離も 200 nm 程度であるため、入射 X 線が試料に照射された後、試料から放出された蛍光 X 線の検出が可能になり、本研究の目的に則した測定が可能になる。蛍光 X 線の検出は、HiSOR BL-3 では蛍光 X 線比例計数管 (FPC : Fluorescence Proportional Counter)、AichiSR BL6N1 ではシリコンドリフト検出器 (SDD : Silicon Drift Detector) を用いた。

本論文では He-path システムを用いて S, P-K 吸収端 NEXAFS 測定を行っており、試料形態として「基板」、「溶液」、「粉末」の 3 種類がある。それら試料に対する HiSOR BL-3 での直線型導入器の先端へのセッティングの写真を図 2-23 に示す。「基板」は直線型導入器の先端の Ni 板にそのまま試料を貼りつけた。「溶液」は、厚さが 12  $\mu\text{m}$  のポリエチレンフィルムで構成されたバブルラップをセルとして用い、そのセルに溶液試料をテルモシリンジ (TERUMO 社製、中口、1 mL ツベルクリン用) を使用して 100  $\mu\text{L}$  程度入れた後に直線型導入器に貼りつけた。ツベルクリン用のシリンジを使用することでセルに開く穴の径は小さく済み、また、シリンジの針の先端に付いた少量の溶液がその穴を塞ぐために、セル内部の溶液が蒸発しにくい状態になる。セルの表面の汚れを取るために、予めエタノールを滴下したキムワイプでこすって洗浄した。最後に「粉末」は、ポリエチレン製の 12  $\mu\text{m}$  厚のフィルムを用い、粉末試料をそのフィルムで包んだ後に、

互いに接触したフィルムの端をピンセットで抑えることで静電気力により密着させて封をした。また、粉末試料については、濃度が濃いと自己吸収によるピーク強度の減少が生じることが後々に分かったため、粉末試料をフィルム上に置いた後にスパーテルを用いて粉末を粉砕しながらフィルムに擦りつけた。これら試料もカーボンテープを用いて直線型導入器に貼りつけた。

上述した 3 つの試料について、測定時に Be 窓や He ガス、ポリエチレンフィルム、水により入射 X 線や蛍光 X 線が減弱されるため、検出器まで透過できる X 線の割合（全透過率と記す）をそれぞれの試料に対して入射 X 線の強度を 100% として算出する。今回の計算では S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行う際を考え、入射 X 線のエネルギーは 2463~2493 eV とした。このエネルギーに対する X 線の透過率は、表 2-3 の通りである。

表 2-3 各物質に対する X 線の透過率。

物質名	Be 窓	He ガス	ポリエチレンフィルム	水
光路長（厚さ）	20 μm	20 mm	12 μm	10 μm
透過率 [%]	85	99	85	70

2 つ以上の物質を通過したときの X 線の透過率は、各物質の透過率の積で表されるため、「基板」「溶液」「粉末」のそれぞれに対する全透過率は次式で表すことができる。

$$(\text{基板試料の X 線全透過率}) = (\text{Be 窓}) \times (\text{He ガス}) = \text{約 } 84 \%$$

$$(\text{溶液試料の X 線全透過率}) = (\text{Be 窓}) \times (\text{He ガス}) \times (\text{PE フィルム、入}) \times (\text{水、入}) \\ \times (\text{水、出}) \times (\text{PE フィルム、出}) = \text{約 } 35 \%$$

$$(\text{粉末試料の X 線全透過率}) = (\text{Be 窓}) \times (\text{He ガス}) \times (\text{PE フィルム、入}) \\ \times (\text{PE フィルム、出}) = \text{約 } 61 \%$$

式中の「入」は試料に対して X 線が入射するとき、「出」は試料から X 線が放出したときを示す。粉末試料については、ポリエチレンフィルムで包んだ場合について示した。

また、HiSOR BL-3 の直線型導入器先端の試料を貼りつける部分についても工夫をしたため、以下に記す。以前は図 2-24 に示すように梯子状のサンプルホルダが付いていたが、そのサンプルホルダの表面に含硫黄分子が吸着していた場合、測定時にそのホルダに入射 X 線が照射されてしまい、その吸着している分子由来のシグナルを取得する可能性があった。本論文中で測定した試料は希薄な系であるため、測定時のそれらバックグラウンドの影響を無くすことが重要である。よって、図 2-23 に示す通り、試料を貼りつける Ni 板の幅を試料よりも細くし、この Ni 板の端に貼り付けることで、ホルダではなく試料のみに入射 X 線が当たるようにした。

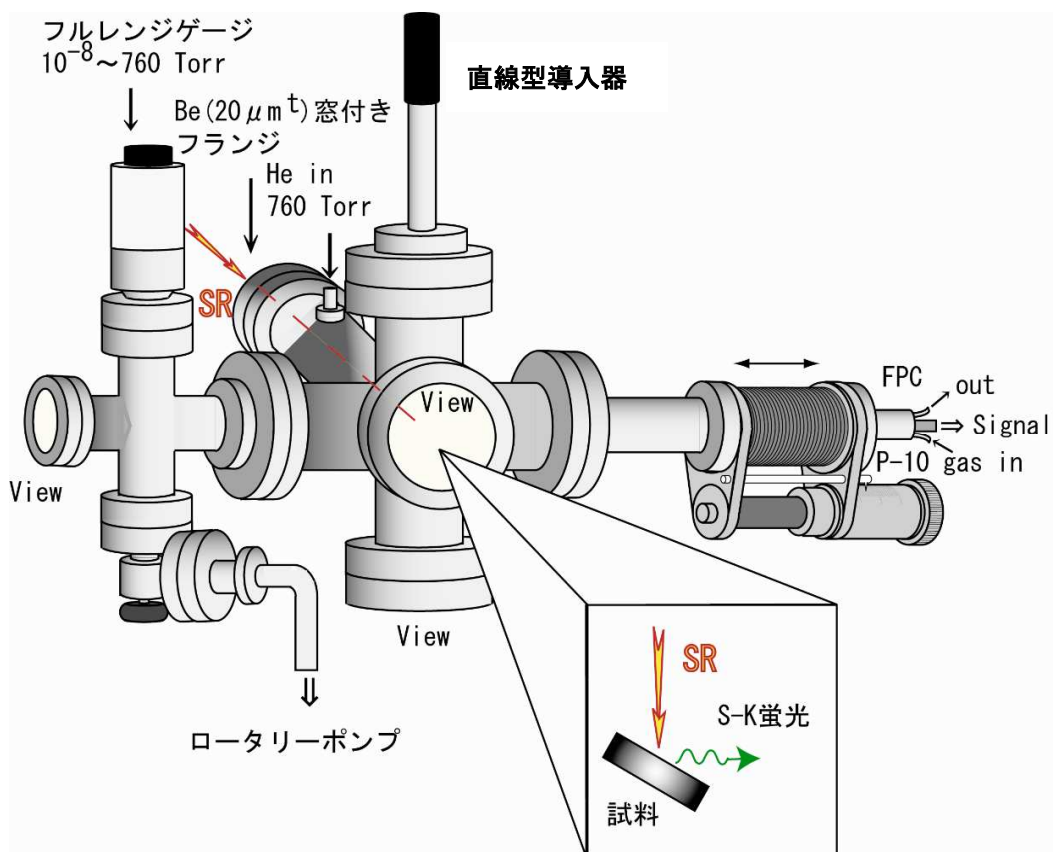


図 2-19 大気圧条件下 XAFS 測定チャンバの外観図[22].

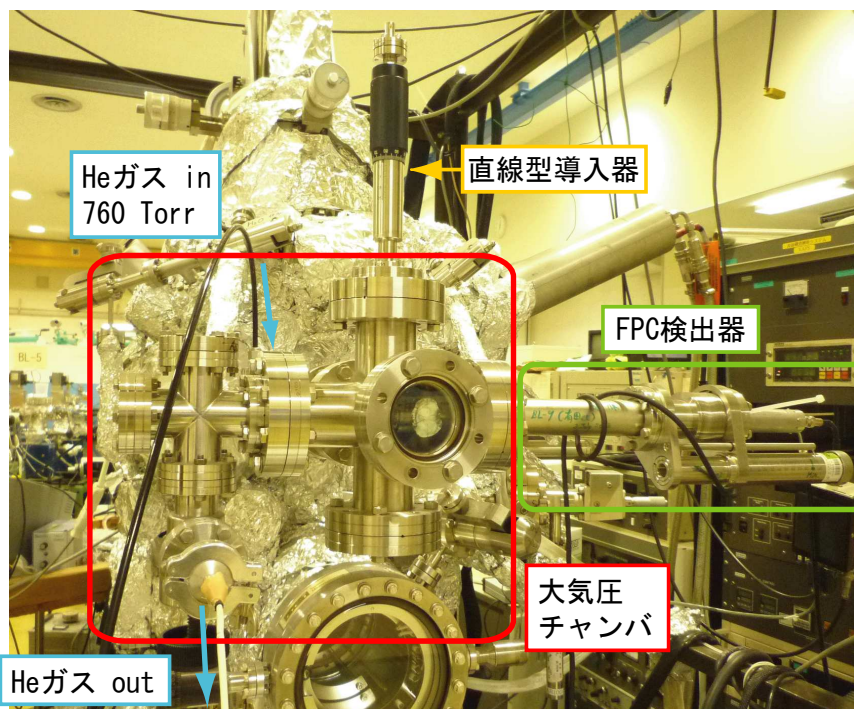


図 2-20 HiSOR BL-3 に接続された大気圧条件下 XAFS 測定チャンバの写真.



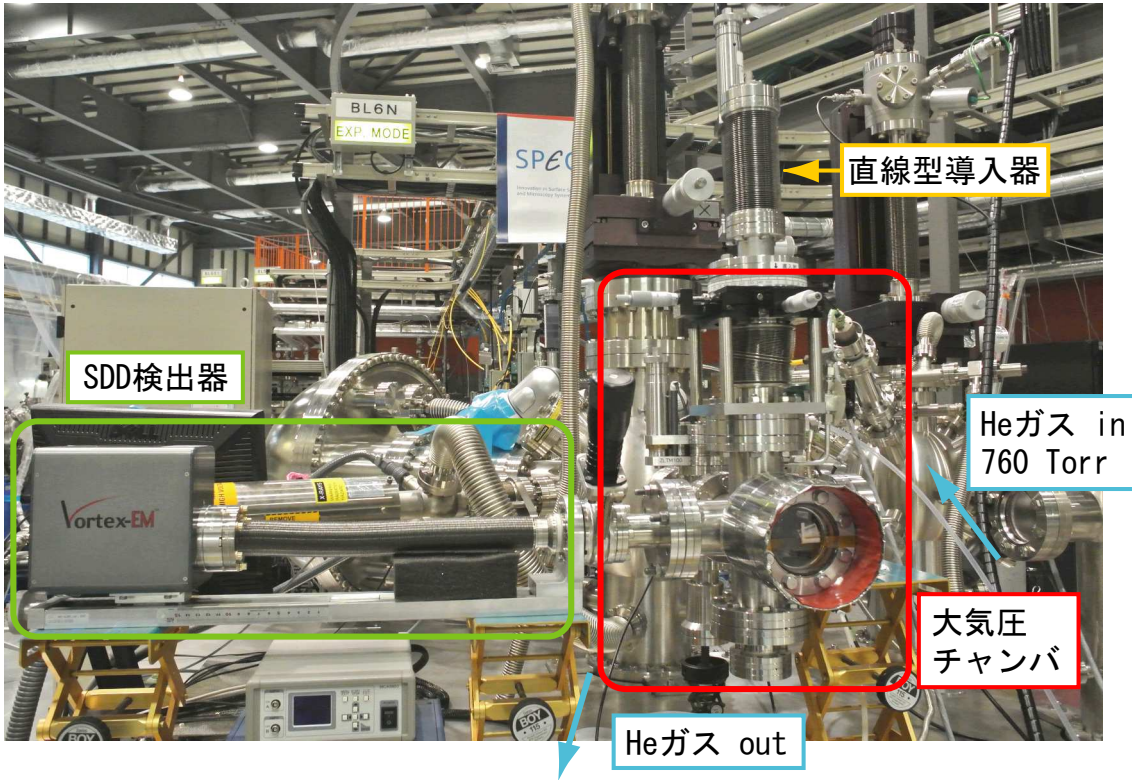


図 2-21 AichiSR BL6N1 に設置された大気圧条件 XAFS 測定チャンバの写真.

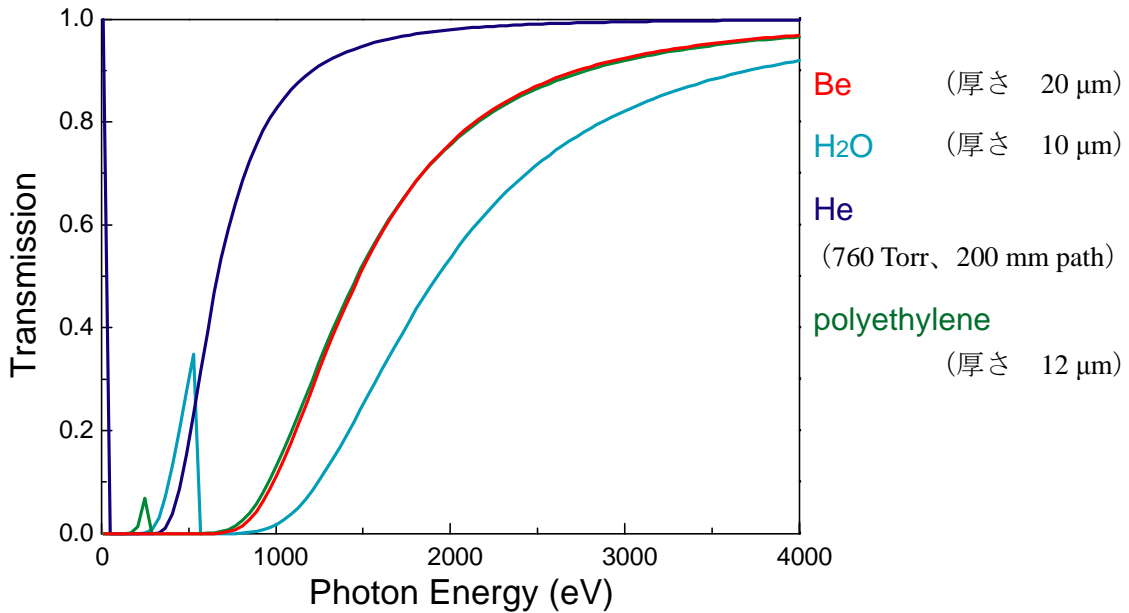


図 2-22 X 線透過率の計算値[23].

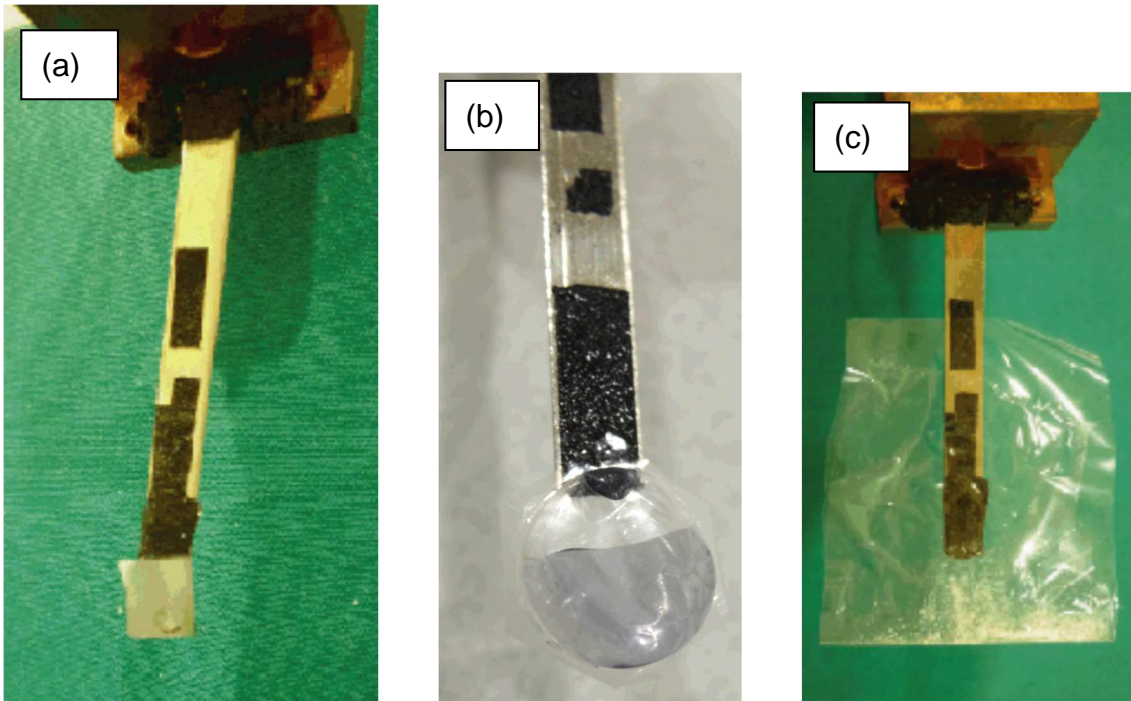


図 2-23 HiSOR BL-3 直線型導入器の先端 (a)基板試料、(b)溶液試料、(c)粉末試料.



図 2-24 梯子状ホルダに貼りつけていたときの様子.

## 2.3 原子間力顕微鏡法 (AFM : Atomic Force Microscopy)

本研究では、作製した Au ナノ粒子の粒子径、及び L-システインとの吸着反応による時間経過に伴う粒子径変化を評価するために、原子間力顕微鏡法 (AFM : Atomic Force Microscopy) を用いた。

### 原理

物質間には様々な相互作用が働く。代表的なものとして、電荷を持つもの同士に働くクーロン力、磁性を持つもの同士に働く磁気力、そして中性な物質に一時的な分極が生じることによるファンデルワールス力が挙げられる。このような物質間に働く作用力を、探針 (Probe) を用いて走査しながら検出する顕微鏡法の総称を SPM (Scanning Probe Microscopy) という。クーロン力を検知する顕微鏡法は電気力顕微鏡法 (EFM : Electronic Force Microscopy)、磁気力を検知する顕微鏡法は磁気力顕微鏡法 (MFM : Magnetic Force Microscopy) と呼ばれている。また、1982 年に G. K. Binnig と H. Rohrer らによって発表され、現在の表面構造観察の標準装置となっている走査型トンネル電子顕微鏡法 (STM : Scanning Tunneling Microscopy) は、探針と物質間の電子のトンネル効果を利用している [24]。そして、STM によるノーベル賞受賞に引き続いて G. K. Binnig が発表した顕微鏡法が、ファンデルワールス力を検知する AFM である [25]。それぞれの手法は種類の異なる相互作用を検出しているため、適した検出物性がある。STM は電子のトンネル効果を利用しているため、使用用途が導体に限られる。しかしながら、AFM は中性な物質間に働くファンデルワールス力を検出するため、絶縁体にも適用可能で、表面の凹凸形状や粗さを調べる用途に適している。

AFM には主に三つの測定モードがある (図 2-25) [26]。探針を試料表面に接触させて走査するコンタクトモードでは、原子サイズに至る分解能が得られる場合があるが、試料表面や探針の損傷の問題がある。非接触モードでは、試料や探針の損傷の問題は原理的にないが、コンタクトモードよりも分解能が低い。この二つのモードの折衷案として考案された測定モードが、タッピングモードである。この測定法は、振動するプローブを試料上方から接近させ、軽く試料に接触させ、間接的に試料表面を叩く方法である。試料へのダメージが少なく、AFM の主測定モードとして用いられている。

図 2-26 にタッピングモード AFM 測定系の模式図を示す。カンチレバーを圧電振動子で振動させながら探針を試料表面に近づけると、探針-試料間のファンデルワールス力によってカンチレバーの振動状態 (振幅や位相) が変化する。この変化は、四分割されたフォトダイオードによって光学的に検出される。探針を圧電素子で構成されたチューブスキャナーで XY 走査しながら、振動状態の変化量の分布、もしくはその変化を打ち消すための圧電素子の Z 変化量の分布をプロットすることにより、相互作用の大きさを画像化できる。こうして得られる画像が AFM 像である。



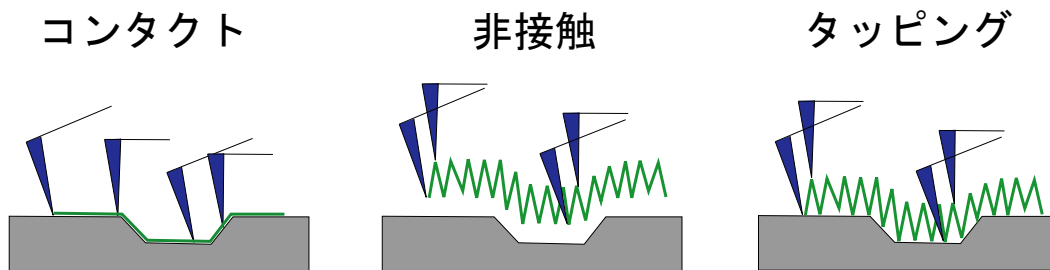


図 2-25 AFM の三種類の測定法.

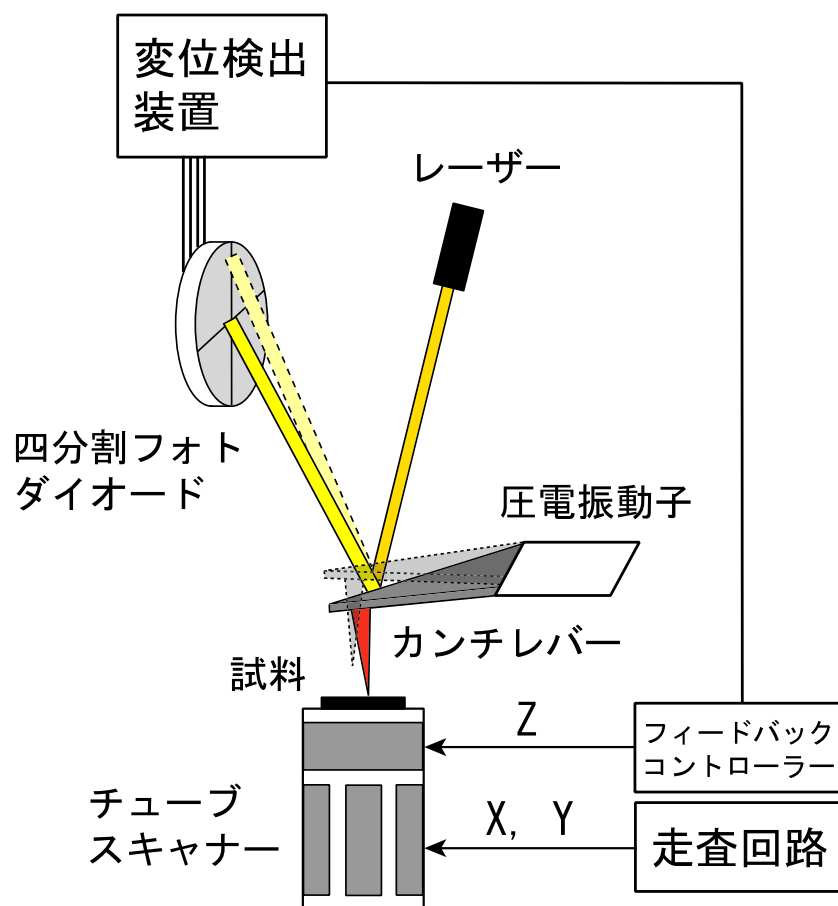


図 2-26 タッピングモードAFM の測定模式図.

## 測定方法

本研究では Park System 社製の XE-100 を使い、タッピングモードで AFM 測定を行った。AFM 測定用の試料は、各試料溶液をマイクロピペットで 500  $\mu\text{L}$  程度分取した後、 $10\times 10\text{ mm}^2$  程度の大きさにカットした Si ウェハ (Si(100)基板) 上にスピニングして作製した。また、粒子径の評価は図 2-27 のように Si ウェハ表面からの高さ方向を測定することで見積もった。AFM 測定は、針先端の曲率が異なっている場合において AFM 像の横方向のばらつきが生じるが、高さ方向の変化は少ないため、ナノ粒子の粒子径測定には非常に優れている。また、Si ウェハ表面は、AFM 測定の結果より 0.7 nm 程度の凹凸は存在することが分かったが、非常に整った平らな基板であるため、それ以上の大きさのナノ粒子であれば正確な粒子径の測定が可能である。

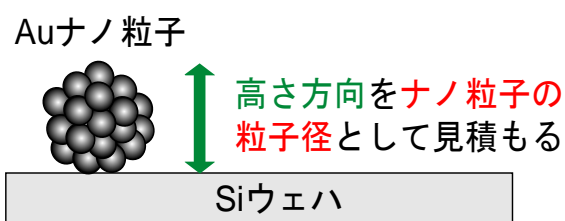


図 2-27 AFM による Si ウェハ上の Au ナノ粒子の高さ方向の測定.

## 2.4 X線光電子分光法 (XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy)

本研究では、N, O-K 吸収端の放射光を試料に照射したことで生じる生体分子の放射線損傷の影響を明らかにするために、X線光電子分光法 (XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy) 測定を行った。XPS 測定は、NEXAFS 測定の全電子収量法よりも S/B が良く、また、蛍光 X線収量法よりも検出深さが浅いため、試料表面で生じた放射線損傷の影響を S/B 及び S/N の良い状態で調べることができる。

### 原理

XPS は光電効果を元素の内殻準位に適用した分析法である。試料への X 線の入射により、原子核に束縛されている電子がエネルギーを受け取り光電子として放出される (図 2-28)。照射 X 線のエネルギーを  $h\nu$ 、放出された光電子の試料中における束縛エネルギーを  $E_B$  (フェルミ準位基準)、光電子の運動エネルギーを  $E_K$ 、仕事関数を  $\Phi$  とするとエネルギー保存則から次式が成り立つ。

$$E_B = h\nu - E_K - \Phi \quad (2.3)$$

光電子の運動エネルギー分布を測定した後、式(2.3)を用いることで、電子の試料中での束縛エネルギーの分布を求めることができる。このエネルギー分布は、元素の種類およびその化学状態により固有であるため、XPS スペクトルを解析することでそれらの同定が可能である。

図 2-29 は Mg K $\alpha$  線を用い測定した銀の XPS スペクトルである[27]。試料の深い場所で発生した光電子は、試料表面に達するまでに様々な過程で非弾性散乱を受けてエネルギーを失い、二次電子として放出される場合もある。このため図 2-29 のように、内殻準位のピークの発生後、高束縛エネルギー側では二次電子によってバックグラウンドが増加していることが分かる。光電子の脱出深さ (非弾性散乱を受けずに真空中に出てくることができる深さ) には電子のエネルギー依存性がある (図 2-30)。これは物質にも依存するが、一般には XPS で検出される光電子は主に表面数原子層 (数~数十 Å) から放出されたものである。よって、XPS は表面敏感な測定であり有力な表面分析法の一つである。光電子の放出によって内殻に生じた空孔を埋めるために、結合エネルギーの低い外殻からの電子遷移が起こる。これによって蛍光 X 線とオージェ電子の放出が起こるが、このうちオージェ電子は XPS スペクトルに共存することになる (図 2-30 中の MNN ピーク)。しかし、オージェ電子エネルギーは各元素固有であり入射 X 線エネルギーに依存しないので、2 種類以上の X 線源を用いることで光電子とオージェ電子を容易に見分けることができる。また、原子や分子の内殻電子が電離されて空孔が生じたときには、他の電子が中心ポテンシャルの変化を感じて励起や電離されることがある。この現象はそれぞれシェイクアップ (励起) およびシェイクオフ (電離) 過程と呼ばれて

いる。前者は光電子の放出に伴って外殻電子が空軌道に励起される過程であり、光電子が各元素固有のエネルギー損失を受けるのでピークとして観測される。後者は外殻電子が真空準位に励起されるため様々なエネルギーをとることができ、ピークとしては観測されない。XPSは光をプローブとして用いるため、電子やイオンをプローブとして用いた手法である電子エネルギー損失分光法（EELS：Electron Energy Loss Spectroscopy）やラザフォード後方散乱分析法（RBS：Rutherford Backscattering Spectrometry）に比べて試料損傷やチャージングを引き起こしにくい。このため、分子吸着系の研究に適している分析法である。XPS測定からは以下の情報が得られる。

- (1) 各ピークは各元素固有の結合エネルギー位置に現れるので、試料表面に含まれる元素の同定が可能である。
- (2) 各ピークは元素の化学結合状態を反映したエネルギーシフト（例として図 2-31）を起こす。この化学シフトを利用することにより、注目元素の酸化還元状態や結合している原子の種類を決定できる。
- (3) ピーク強度を解析することで、元素組成の定量分析が可能である。

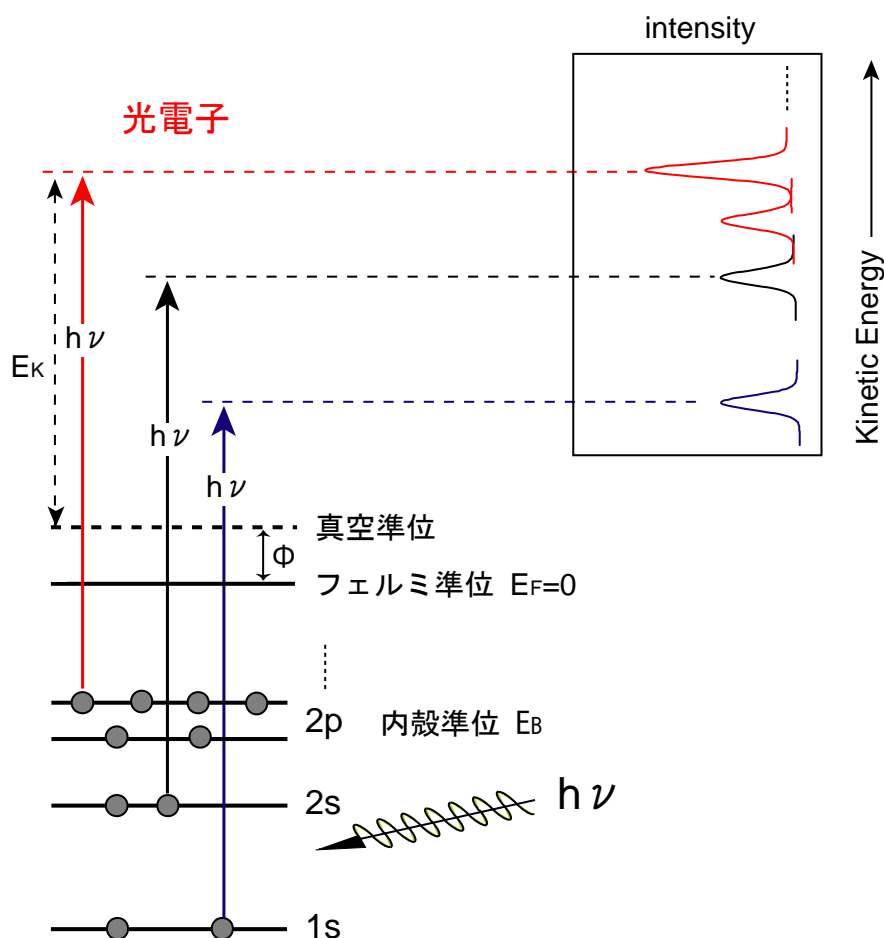


図 2-28 XPS の原理.

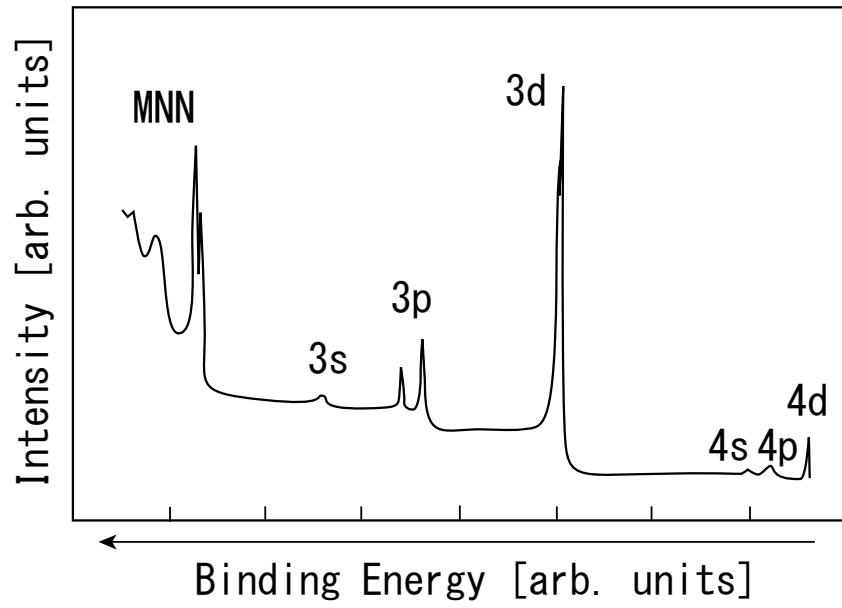


図 2-29 銀の XPS スペクトル[27].

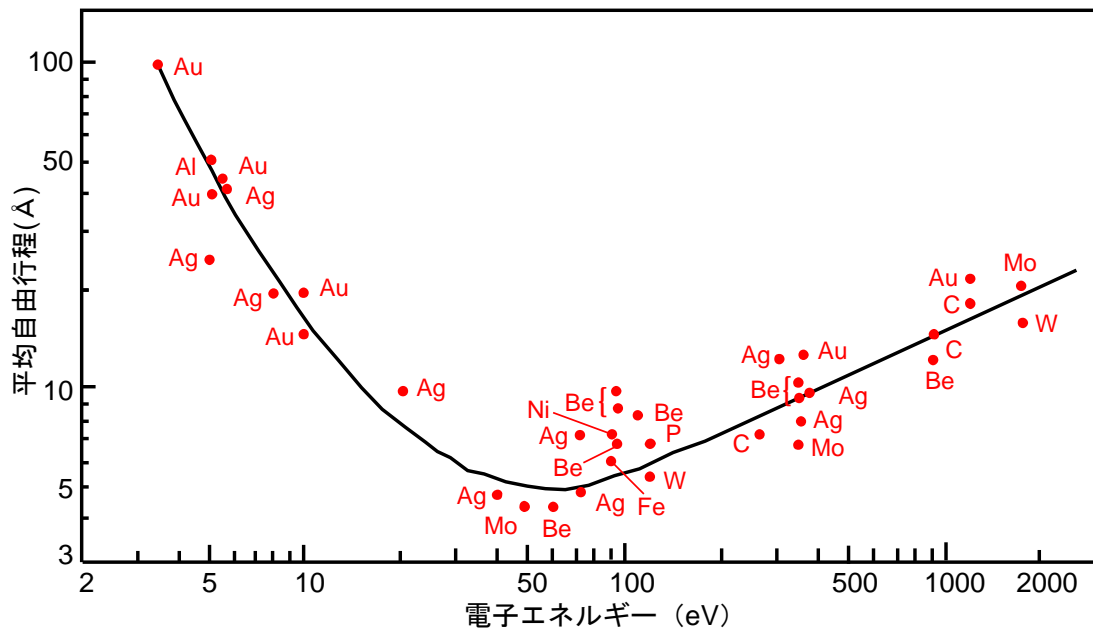


図 2-30 固体内における電子の平均自由行程のエネルギー依存性[27].

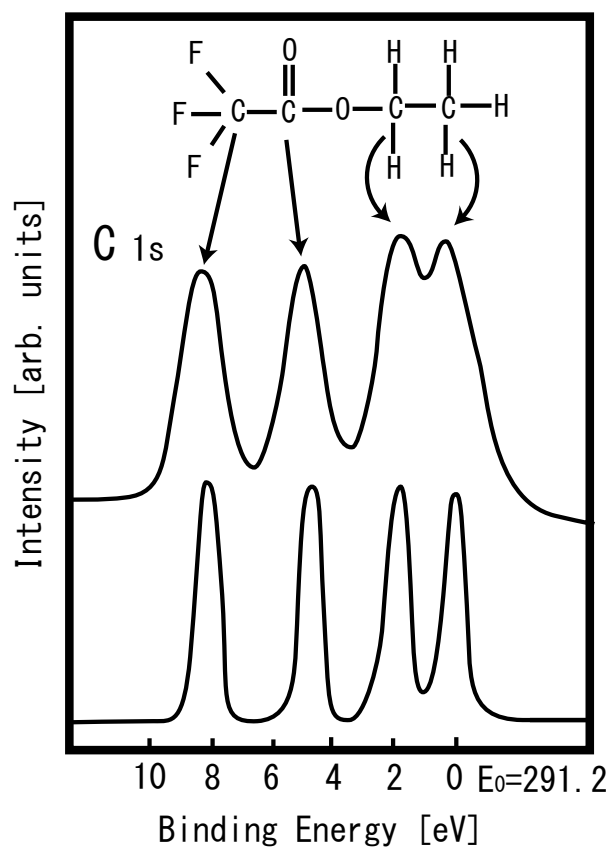


図 2-31 化学シフトの例 トリフルオロ酢酸エチルの C 1s 内殻準位スペクトル[27].  
 それぞれのピークは異なる化学状態の炭素に対応している. 図中の下のスペクトルは、  
 X線源を単色化して分解能を上げたものである. 一般的に、より酸化数の高い状態にあ  
 る原子、または、より電気陰性度の高い原子と結合しているほど、化学シフトによりピ  
 ークは高束縛エネルギー側に現れることが知られている.

## 測定方法

本研究では SPECS 社製の PHOIBOS 150-CCD を用いて XPS 測定を行った。測定装置の写真を図 2-32 に示す。PHOIBOS 150-CCD の XPS 測定装置は、試料を導入するためのロードロックチャンバ (Load-Lock Chamber)、試料表面の清浄化等の試料準備を行うためのプレパレーションチャンバ (Preparation Chamber)、そして試料の測定を行うためのアナリシスチャンバ (Analysis Chamber) の 3 つのチャンバにより構成されている。それぞれのチャンバはバルブにより仕切られている。測定試料を固定するためのホルダは図 2-33 に示すように 4 ヶ所に穴が開いており、試料の端をワッシャーとネジを用いて押さえることで試料を固定する仕組みになっている。

励起光としてはツインアノード X 線源のうち Al K $\alpha$  線 (1486.6 eV) を使用して特性 X 線をそのまま用いたが、モノクロメーターを通して光源のエネルギー幅を狭めることで、分解能の向上を図ることも可能である。

光電子のエネルギー分析器には、磁場型、阻止電場型、円筒鏡型等が存在するが、本研究では最も一般的である同心半球型電子エネルギー分析器 (CHA : Concentric Hemispherical Electron Energy Analyzer、図 2-34) を用い、超高真空中で測定を行った。検出器は一般的にチャンネルトロン (図 2-35)、もしくはチャンネルトロンを束ねて作製した直径数十 mm の円筒を作った後に切断して円盤状にして作製される電子増倍用のマイクロチャンネルプレート (MCP : Micro Channel Plate、図 2-36) が用いられる。さらに最近では、MCP と CCD カメラを併せて用いた二次元計測が使用される場合もある[28]。本研究で用いた PHOIBOS 150-CCD の検出器は、後述した MCP と CCD カメラを組み合わせたものである。

CHA では、種々のエネルギーを持った電子を最初にリターディングレンズで加減速させ、目的の運動エネルギーを持つ電子を透過させており、この一定のエネルギーをパスエネルギー  $E_p$  と呼ぶ。また、 $E_k/E_p$  を減速比と呼び、この比を変化させることでエネルギー分析を行う。減速された光電子はスリット上でちょうど集束するようになっており、スリットの通過の際に運動エネルギー  $E_p$  以下のものはカットされる。スリットはインพุットレンズの出口と CHA の出口の二箇所にある。CHA に入射された光電子は、CHA 出口で運動エネルギー毎に異なった位置に集束された後に MCP に入射される。チャンネルトロンは内壁に高抵抗の半導体膜を形成した直径 数十  $\mu\text{m}$  の非常に細いパイプである。パイプの両端には電圧が印加されており、そこに入射した電子は加速されながら内壁に衝突する。その衝突ごとに多数の二次電子が管壁から叩き出され、増倍された電子が電流として検出される。また MCP と CCD カメラを組み合わせた検出器では、MCP の背面に蛍光スクリーンと CCD カメラが設置されており、MCP で増倍された電子が蛍光スクリーンに照射された際に発光した箇所を CCD カメラで捉えることで光子を検出できる。さらに、試料から放出された光電子のエネルギー角度をある一定の範囲内で同時に計測することも可能である。これにより検出効率が飛躍的 (100 倍以上) に



向上し、計測時間が大幅に短縮できる。

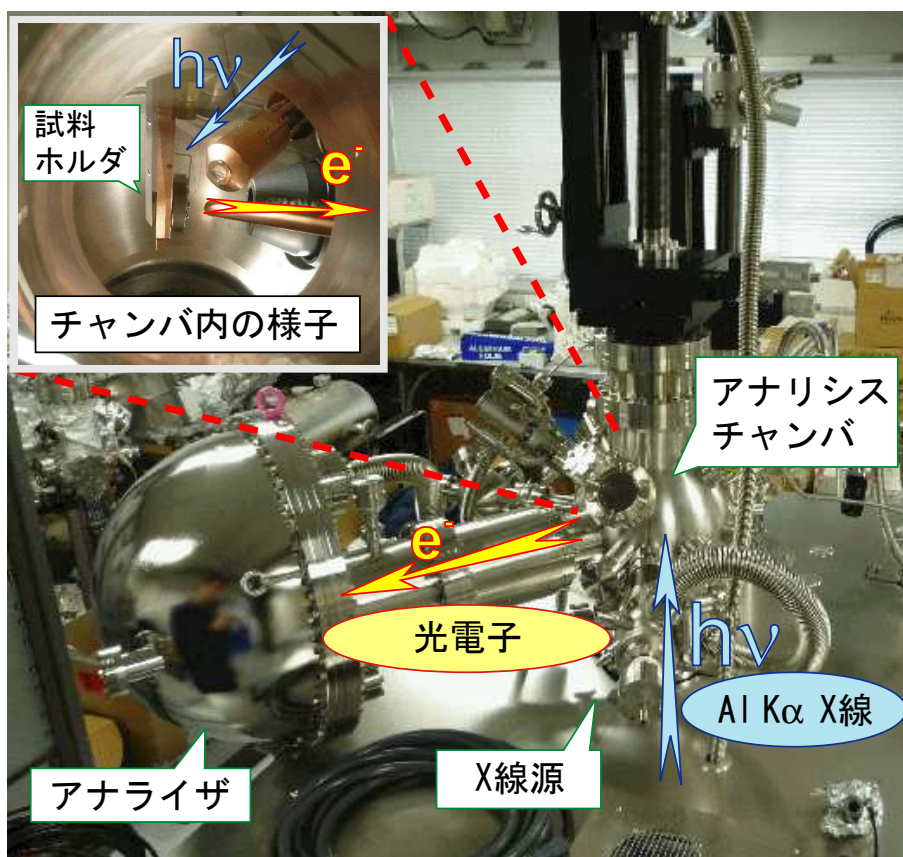


図 2-32 PHOIBOS 150-CCD (SPECS 社製) の XPS 測定装置.

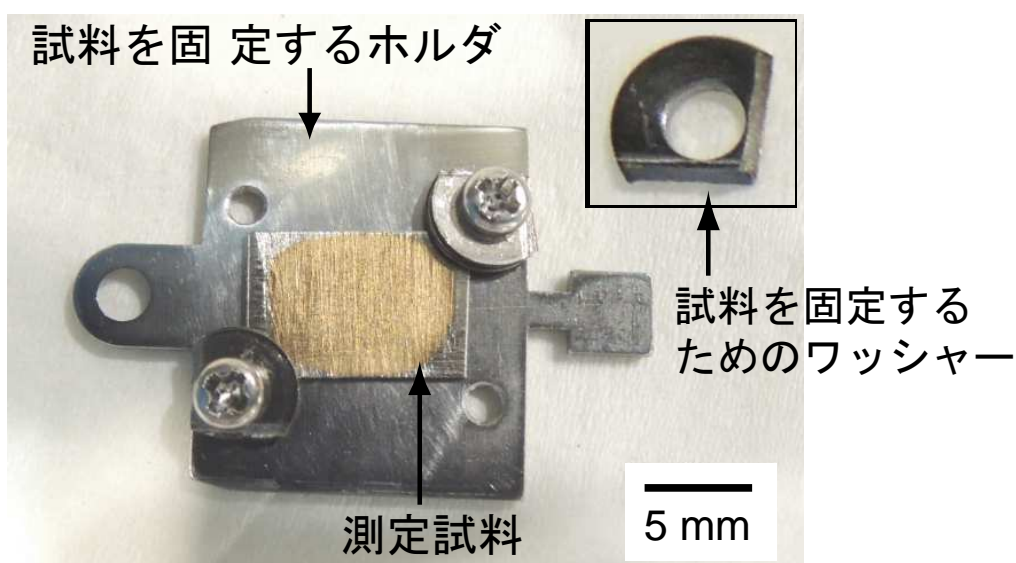


図 2-33 PHOIBOS 150-CCD の XPS 測定装置に用いるホルダ.

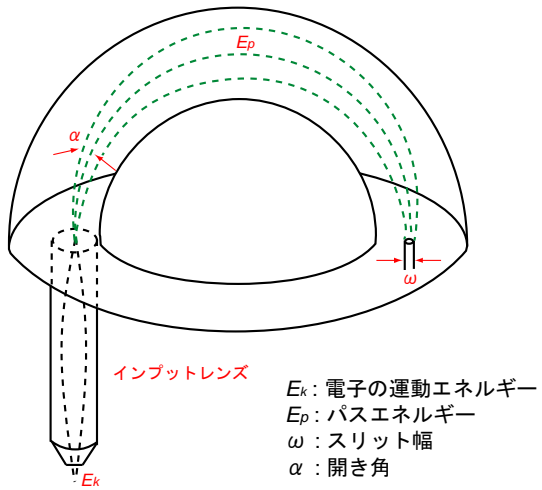


図 2-34 同心半球型電子エネルギー分析器 (CHA) の模式図.

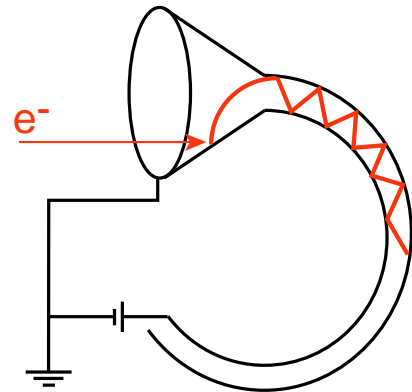


図 2-35 チャンネルトロン の模式図.

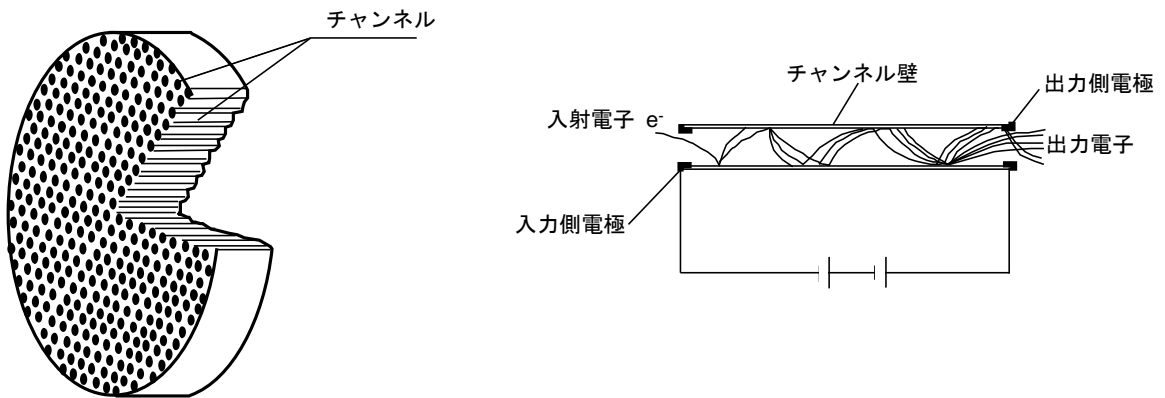


図 2-36 マイクロチャンネルプレート (MCP) の模式図.

## 2.5 紫外・可視分光法 (UV-Vis: Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy)

本研究では、Au ナノ粒子コロイド水溶液とシステインを混合したことで生じるコロイド水溶液の光吸収変化から、ナノ粒子の粒子径変化やシステインの吸着によるナノ粒子表面に存在する電子密度変化について明らかにするために、紫外・可視分光法 (UV-Vis : Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy) 測定を行った。

### 原理[29]

プラズモンは金属中の自由電子が集団振動する現象のことであり、金属が微粒子になると自由電子が局在するために、局在表面プラズモンと呼ばれる。金属微粒子の形状が球であると仮定すると、微粒子表面に存在する局在表面プラズモンによって生じる電場は図 2-37 に示すような方向と広がりをもつ。ここで、金属微粒子に光（電磁波）を入射する場合を考える。電磁波はその進行方向と電場の方向が直交しているため、様々な方向の電場を有する金属微粒子と常に相互作用し、光と微粒子はエネルギーの授受を行うことができる。金属微粒子の大きさが入射する光の波長よりも十分に小さい場合、光の電場は微粒子全体に対して一様とみなすことができるため、微粒子表面に電気的な分極が生じて、図 2-38 (a) のように単一の双極子が誘起されたと考えることが可能である。また、生じた双極子の分極率 $\alpha$ は、金属微粒子の半径を  $r$ 、微粒子及びその周囲の媒質の誘電率をそれぞれ $\epsilon_1$ 、 $\epsilon_2$ とすると、

$$\alpha = 4\pi r^3 \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2} \quad (2.4)$$

と表される。金属微粒子の誘電率 $\epsilon_1$ は、入射した光の振動数 $\omega$ によって変化する誘電関数 $\epsilon_1(\omega)$ となり、 $\epsilon_1(\omega) = \epsilon_1'(\omega) + i\epsilon_1''(\omega)$  である。よって、分極率 $\alpha$ は、式(2.4)の分母の実部である $(\epsilon_1' + 2\epsilon_2)$ が  $\epsilon_1' + 2\epsilon_2 = 0$  を満たすときに非常に大きくなり、この状態が局在表面プラズモン共鳴 (LSPR : Localized Surface Plasmon Resonance) と呼ばれる。ここで、 $\epsilon_1' + 2\epsilon_2 = 0$  は共鳴条件である。また、金属微粒子に対する光の吸収断面積  $C_{abs}$  は、入射光の単位面積あたりのエネルギー密度と、微粒子に吸収される光のエネルギー密度の関係から、比例定数を  $k$  として、

$$C_{abs} = k \text{Im}(\alpha) = k \frac{12\pi r^3 \epsilon_1'' \epsilon_2}{(\epsilon_1' + 2\epsilon_2) + (\epsilon_1'')^2} \quad (2.5)$$

と表される。式(2.5)より、吸収断面積  $C_{abs}$  は分極率 $\alpha$ についての関数であり、 $\epsilon_1' + 2\epsilon_2 = 0$  のときに分極率 $\alpha$ が大きくなることに伴って吸収断面積  $C_{abs}$  も大きくなるのが分かる。これにより UV-Vis 測定を行った際に、横軸に波長 $\lambda$  (nm)、縦軸に吸光度  $A$  (Absorbance)としてグラフを描くと、分極率 $\alpha$ が非常に大きくなる光の波長で LSPR 由来の吸収ピークが観測される。

双極子として近似した微粒子は、粒子径が大きくなると、図 2-38 (b)に示すように光

の入射側と出射側で微粒子が光から受ける電場の向きが逆向きになる。これは、遅延効果と呼ばれる波がもつ位相の遅れの効果が影響しており、結果として四重極子の成分が微粒子内部に生じる。この遅延効果を見逃すことはできない場合は Mie の散乱公式を用いる必要がある。また、誘電関数 $\epsilon_1(\omega)$ も粒子径に依存して変化する。これは、粒子径が電子の平均自由行程の距離よりも短くなると、電子がその距離を移動する前に微粒子の表面に衝突してしまい、散乱されるためである。これら二つのサイズ効果により、粒子径が大きくなるにつれて吸収ピークの位置が長波長側にシフトしていくことが計算で示されており、実験によっても確認されている[30,31]。

Au ナノ粒子の場合、局在表面プラズモン共鳴は可視光の波長に対して生じることが報告されている。例として、形状が球状であり、5~6 nm の粒子径をもつ Au ナノ粒子については、520 nm 付近で強い LSPR ピークが観察される[32]。

また、ナノ粒子表面に対して分子の吸着や結合が生じた場合、ナノ粒子の周囲に誘電体の層が形成されたと考えることができる。図 2-39 は、Au ナノ粒子表面が屈折率 1.5 の誘電体で覆われた際の吸収強度の波長依存性に関する計算結果を示している[29]。直径 50 nm の Au ナノ粒子に対して誘電体の膜厚が 0~20 nm と変化するにつれて吸収強度が増加しており、ピーク位置も長波長側へシフトしていることが分かる。

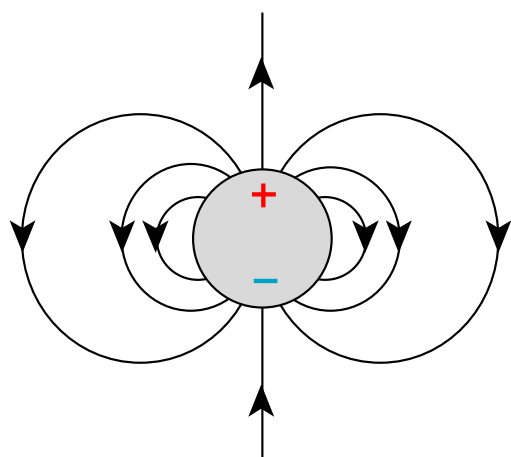


図 2-37 金属微粒子表面に存在する局在表面プラズモンによって生じる電場の方向と広がり[29].

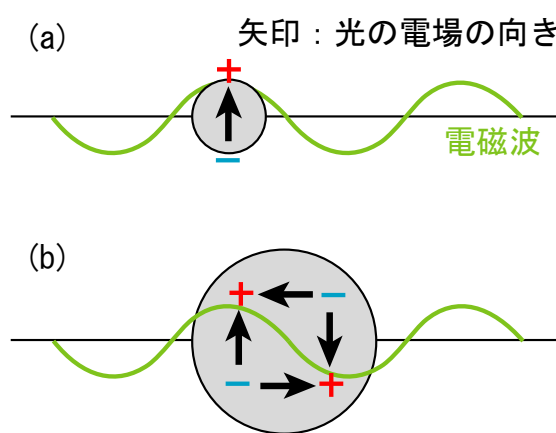


図 2-38 金属微粒子内の位置に依存した光の電場の向き[29]. 入射した光（電磁波）の波長よりも粒子径が (a)小さいとき、(b)大きいとき.

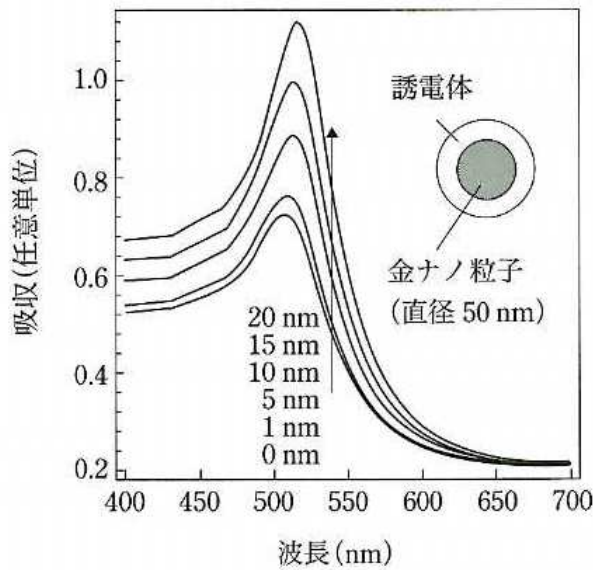


図2-39 Auナノ粒子表面が屈折率1.5の誘電体で覆われた際の吸収強度の波長依存性に関する計算結果[29].

#### 測定方法[33]

UV-Vis 測定は、紫外領域（185～370 nm）と可視領域（370～780 nm）の光を用い、試料に入射した際の吸収スペクトルを実験データとして得る。本研究では Au ナノ粒子の吸収が可視光領域に存在するため、400～700 nm の範囲で測定を行った。

作製した Au ナノ粒子は水溶液中に存在しているため、紫外・可視分光測定の中でも透過吸収法を用いた。一定の光路長  $l$ （本研究では 10 mm）のセルに Au ナノ粒子コロイド水溶液を入れ、そのセルに対して波長を変化させながら光を入射し、セルを透過する前後の光の強度を測定した。試料を透過する前の光の強度を  $I_0$ 、透過した後の光の強度を  $I$  とすると、透過率  $T$ （%）は

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.6)$$

で表され、また、散乱が無視できる場合はランベルト-ベール（Lambert-Beer）の法則から、吸光度  $A$ （Absorbance）は

$$A = \log_{10} \frac{1}{T} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c l \quad (2.7)$$

となる。ここで、 $\epsilon$  はモル吸光係数、 $c$  はモル濃度である。この基本公式に加え、Au ナノ粒子の場合は可視光領域に LSPR に由来する吸収も生じており、それらを併せて Au ナノ粒子の吸収スペクトルが得られる。



## 2.6 透過型電子顕微鏡法 (TEM: Transmission Electron Microscopy)

本研究では、作製した Au ナノ粒子の粒子径、及びフォスファチジルコリン (PC) で作製したリポソームまたはフォスファチジルコリンとの吸着反応によって生じる形態評価のために、透過型電子顕微鏡法 (TEM: Transmission Electron Microscopy) を用いた。

### 原理<sup>[34]</sup>

電子顕微鏡の光学設計は基本的に光学顕微鏡と同じであり、光 (光線) の代わりに電子 (電子線) を用いた顕微鏡である<sup>[34]</sup>。電子は電荷をもっており透過力が弱く、大気中では他の粒子と相互作用して消滅してしまうため、光学系を真空中に置くことで電子線を取り出している<sup>[34]</sup>。また、光線はガラスレンズにより屈折させるが、一方で電子線は磁気レンズ (電子レンズ) によって屈折させており、最終的な拡大像は蛍光板に電子を照射して可視光に変換して観察している<sup>[34]</sup>。以上から、電子顕微鏡を用いて試料の観察を行うためには、試料を真空中に維持でき、かつ電子線が透過できるほど薄く調整しなければならない。また、電子線は先が尖るように折り曲げた全長 10 mm ほどのフィラメントに電流を流して熱電子を発生させ、これを光源として陽極との間に高電圧をかけて取り出す。フィラメント電流を減少させると結像面上に明暗むらができるが、それを防ぐために電子線は十分に広げた状態で画像の撮影をしなければならない。

電子顕微鏡の像形成の原理を説明するために、光学顕微鏡と対比させて述べる。図 2-40 (a) と (b) にそれぞれ光学顕微鏡と電子顕微鏡の像形成の光学系 (optical pass) を示す。光学顕微鏡は対物レンズ群と接眼レンズ群の 2 群から構成されており、試料は対物レンズにより拡大され、接眼レンズの前焦点距離内に実像として結像される。さらにこの実像は接眼レンズにより拡大され、明視の距離に虚像として結像させている。一方で電子顕微鏡では、光学顕微鏡の接眼レンズに相当する「投影レンズ」と「対物レンズ」との間にさらに中間レンズが存在しており、このレンズが変倍に寄与している。最終的な拡大像は、光学顕微鏡では光の吸収と回折によって生じる光子の密度分布像であり、一方で電子顕微鏡では電子の回折と散乱によって生じる電子の密度分布像である (強度コントラスト像: amplitude contrast image)。

電子顕微鏡が光学顕微鏡よりも優れているところは、倍率が高いのではなく分解能 (resolution) が高いことである。光学顕微鏡でも倍率であれば、1000 倍の拡大像を写真に取った後に、その画像をさらに引き延ばせば倍率を高くすることは可能である。しかしながら分解能が低いためにぼやけてしまい、不明瞭な像が得られるだけである。分解能というのは、どのくらい小さなものまで見えるかという能力であり、近接する 2 点を 2 点として識別できる最小の距離として定義される。分解能は顕微鏡にとって最も重要な性能であり、レンズ (特に対物レンズ) によって決まる。



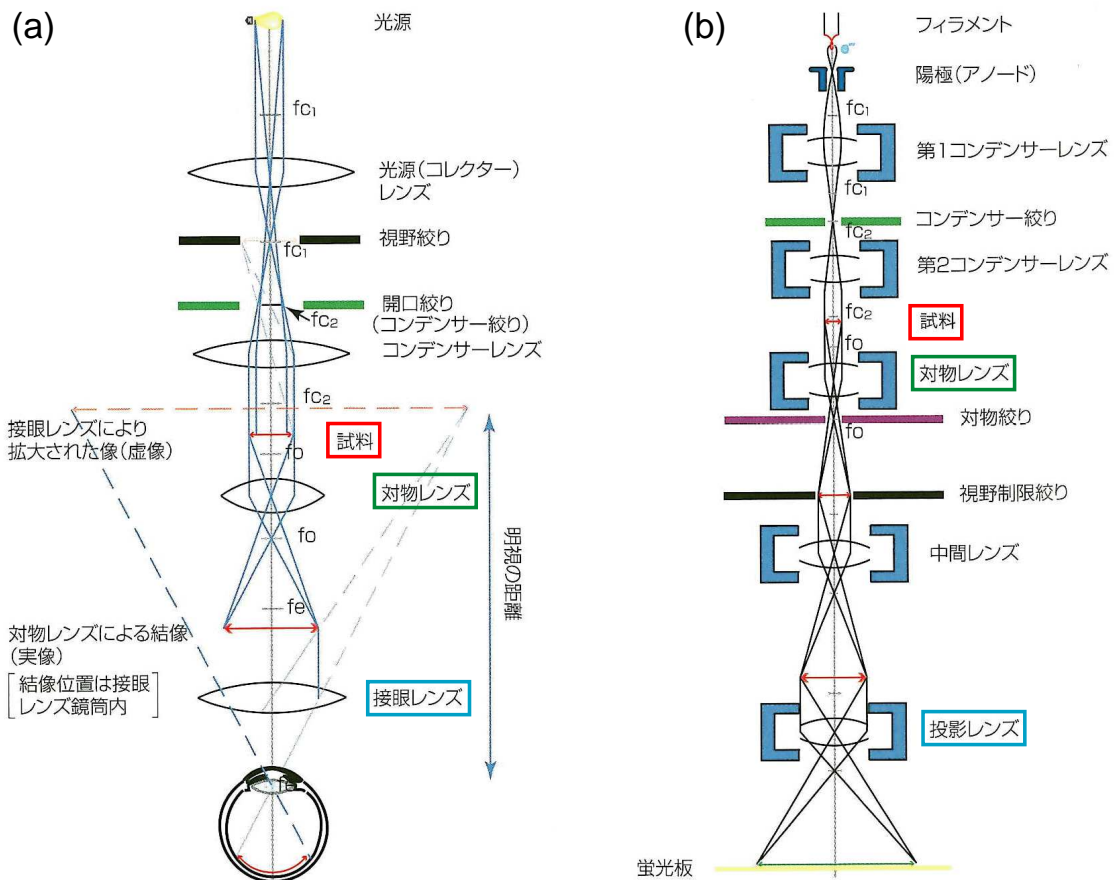


図 2-40 像形成の光学系 (a)光学顕微鏡、(b)電子顕微鏡 [34].

### 測定方法

本研究では、名古屋大学 白倉研究室所有の H-7600 (Hitachi 社製) を用い、加速電圧を 100 kV にして TEM 観察を行った。一般的に TEM では加速電圧 200 kV で観察を行うが、今回は軽元素から構成される生体分子の PC から成るリポソームや、その PC で修飾された Au ナノ粒子を観察対象としているため、電子線による PC の損傷、つまり観察試料の損傷を抑えるために加速電圧を 100 kV に設定した。

また、TEM 観察用の試料作製でも工夫を行った。例えば、PC リポソームは軽元素から構成されるためにそのままでは電子線が透過してしまい、TEM 観察が困難である。よって、重元素が含まれる染色剤 (酢酸ウラン、リンタングステン酸など) で観察対象の周囲を染色することでコントラストを得る手法である「ネガティブ染色法」を用いた。さらに、リポソームは水の溶媒中に浮遊しているため、その断面を TEM により観察するためには形状を保ちながら固定する必要がある。そこで、リポソームを脱水して樹脂包埋をした後、マイクロームにより超薄切片を作製する手法である「超薄切片法」を用いた。各 TEM 観察用試料の作製の詳細は、5.2 と 6.2 にそれぞれ示している。

## 2.7 赤外顕微分光法（顕微 IR : Infrared Spectroscopy）

本研究では、PC が Au ナノ粒子表面に吸着することでナノ粒子が凝集した要因を明らかにするために、吸着反応前後の分子振動の変化に注目し、赤外顕微分光法（顕微 IR : Infrared Spectroscopy）測定を行った。

### 赤外分光法の原理[35,36]

分子は複数の原子が化学結合を形成して成り立っており、その原子同士はばねでつながれているような状態である。また、原子間の結合の長さの伸縮、結合角の変角、分子全体の重心の移動や分子の回転などが組み合わさった運動をしている。これら運動に起因する振動を基準振動（固有振動）と言い、それに伴って生じる振動エネルギーは量子化した状態で分子内に内部エネルギーとして存在する。この振動エネルギー準位間の遷移に相当するエネルギーを持った光を分子に照射すると、その光は分子に吸収された後に振動エネルギーの基底状態から励起状態への遷移に使われる。中赤外光は波長 2.5～25  $\mu\text{m}$  の光であるが、プランク定数を  $h$ 、光速を  $c$ 、光の波長を  $\lambda$  とすると、この中赤外光のエネルギー  $E$  は

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.8)$$

より、 $7.9 \times 10^{-20} \sim 0.8 \times 10^{-20} \text{ J}$  の範囲となる。このエネルギー範囲が、上述した分子の振動エネルギー準位間の遷移に相当するため、赤外分光法は分子の振動モードに起因した測定が可能となる。また、IR 測定では一般的に波数  $\nu$  を横軸にとってグラフに表す。波数とは 1 cm あたりに存在する波の数を表しており、単位は  $\text{cm}^{-1}$  である。中赤外光の波長 2.5～25  $\mu\text{m}$  は、波数で表すと 4000～400  $\text{cm}^{-1}$  になる。ただし、赤外分光法では、複数の振動が互いに打ち消し合う場合は赤外光を吸収しないため、双極子モーメントの変化を伴った場合に対してのみ測定が可能である。

### 放射光を用いた顕微 IR 測定の特徴

一般的に赤外分光法では、物質が熱を持った場合に必ず現れる黒体輻射を利用した光源が用いられている。黒体輻射光源は光源サイズが 10 mm<sup>φ</sup> 程度であり、その全範囲に対して高強度に、かつ広いエネルギー範囲に対して連続的に極めて安定性の高い赤外光を供給できることが知られている[37]。よって数 nm 程度の大きさの試料に対して平均的なデータが必要な場合は黒体輻射光源を用いた赤外分光測定は有効である。しかしながら微小領域に対して赤外分光測定を行いたい場合は、黒体輻射光源よりも放射光を用いた方が短時間に Signal/Noise (S/N) の良い状態でデータを取得することが可能である。この理由を以下に説明する。

放射光は指向性が良く、かつ輝度が高い性質を備えており、光源サイズが 1 mm<sup>φ</sup> より

も小さい。よって微小領域を測定するために、黒体輻射光源の場合はアパーチャーを入れて視野を絞っていく必要があるために光の強度が減少していくが、放射光の場合はアパーチャーを導入する必要がほとんどなくそのままの強度を保つことができる。実例として、[図 2-41](#) に、木村と池本によって報告された国内の赤外放射光ビームライン UVSOR BL6B と SPring-8 BL43IR、さらに典型的な黒体輻射光源に対する輝度と強度（光子数）の計算値と測定値を示す[37]。黒体輻射光源については光源サイズを  $5\text{ mm}^\phi$  と  $1\text{ mm}^\phi$  にしたときのデータが載っている。輝度は明らかに放射光の方が黒体輻射光源よりも高い。強度は、黒体輻射光源の光源サイズが  $5\text{ mm}^\phi$  のときは放射光と同じもしくはそれ以上であるが、 $1\text{ mm}^\phi$  のときは放射光の方が圧倒的に強い。

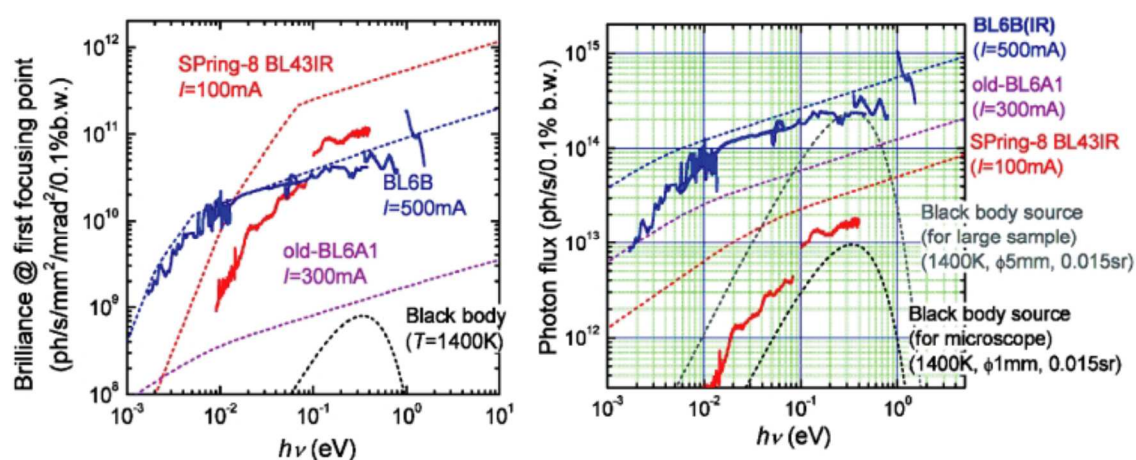


図 2-41 赤外放射光ビームライン UVSOR BL6B と SPring-8 BL43IR、黒体輻射光源に対する輝度（左）と強度（右） [37].

#### 立命館大学 SR センター BL-15 赤外顕微分光ビームライン[38]

放射光は遠赤外光から X 線までの幅広い波長の光を含んでいるが、立命館大学 SR センター BL-15 では[図 2-42](#) に示すようにリングチャンバー内に冷却管とトロイダルミラー（Au コート Si 製）を装填し、そこに放射光を入射することで、電子軌道面の高エネルギーの光を遮蔽しながらできるだけ多くの  $250\text{ mrad}^H \times 60\text{ mrad}^V$  の赤外光成分をリング外に取り出している。このトロイダルミラーで 1:1 に結像してパラボリックミラーを用いて平行光にした後、[図 2-43](#) のように市販のフーリエ変換赤外分光（FT-IR）装置（Nicolet6700、Thermo 社製）と顕微鏡（ContinuumXL、Thermo 社製）に導入している。さらに、顕微鏡に導入された赤外光は、[図 2-44](#) のようにシュバルツシルト光学系の対物レンズによって集光されて試料を透過し、試料下部の集光レンズによって再び集光された後、検出器に届く[38]。これにより赤外顕微鏡分光測定を可能にしている。[図 2-45](#) に、BL-15 の顕微鏡の対物レンズ付近の様子と対物レンズの模式図を示す。検出器は  $50\mu\text{m}$  MCT-A (MCT: Mercury-Cadmium-Tellurium、半導体型のテルル化カドミウム水銀)

であり、液体窒素で冷却しながら測定を行った。また、試料位置の調整は、顕微鏡上部の CCD カメラのデータをパソコン画面に表示して、その画面を見ながら行った。

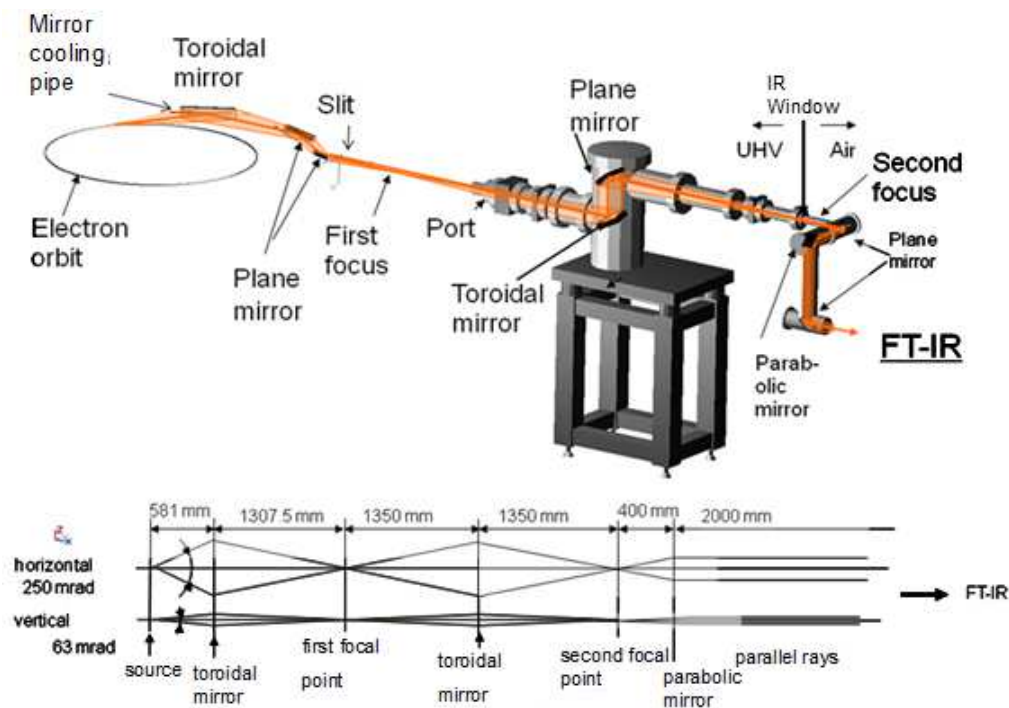


図 2-42 立命館大学 SR センター BL-15 のビームラインの構成[38].

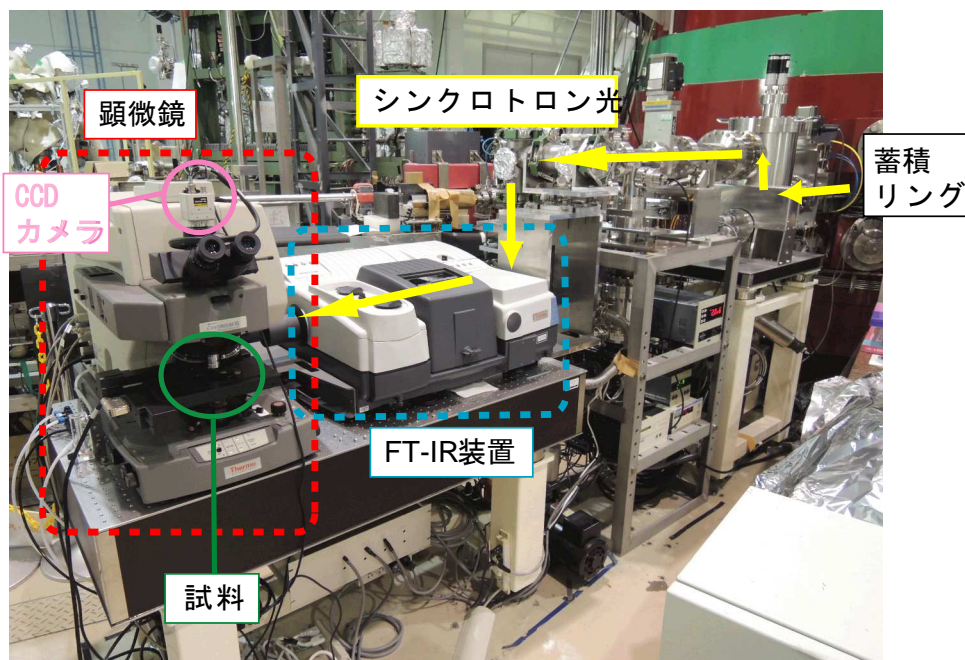


図 2-43 立命館大学 SR センター BL-15 の末端装置の写真.



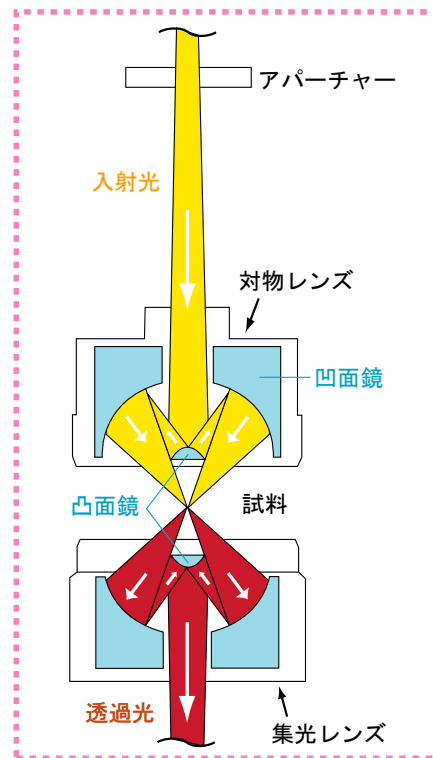
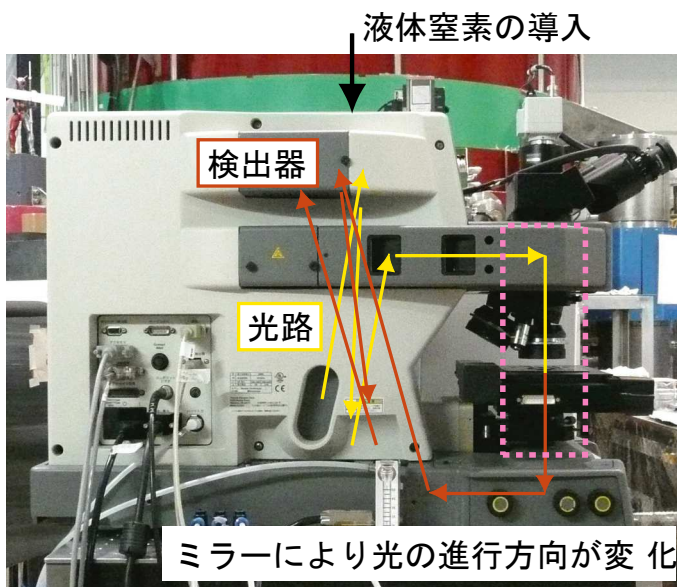


図2-44 透過モードの場合の光の経路とシュバルツシルト光学系による集光の様子。

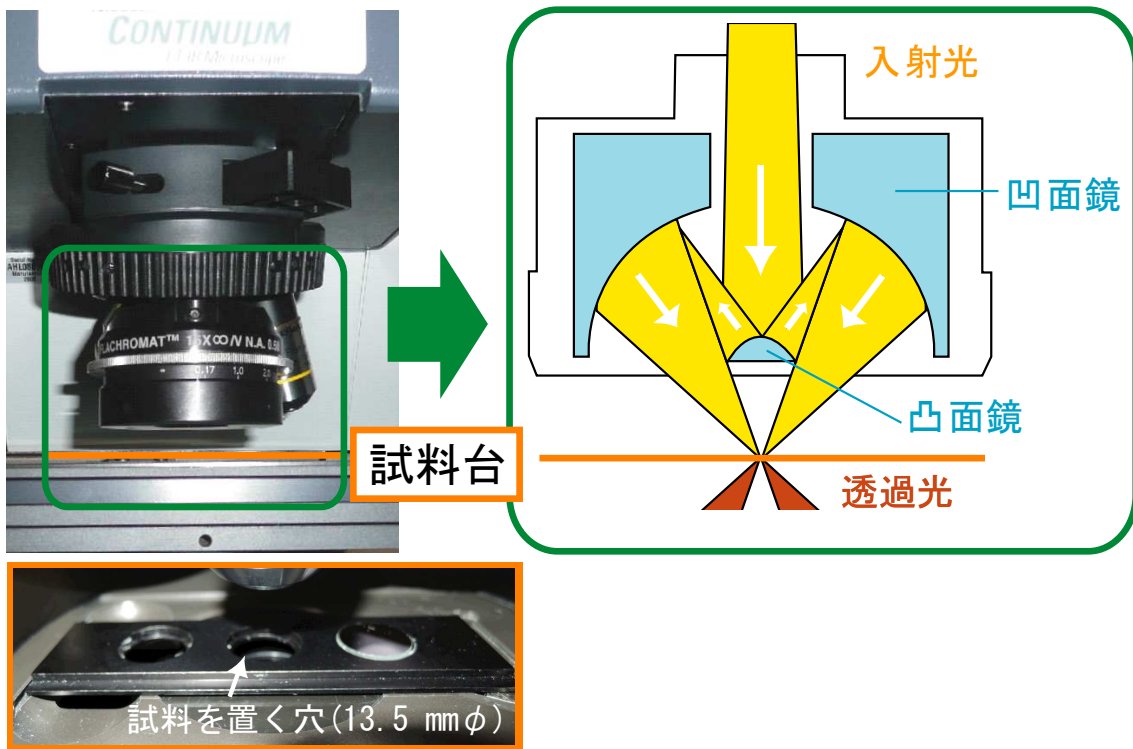


図 2-45 BL-15 の顕微鏡の対物レンズ付近の様子と対物レンズの模式図。

## 参考文献

- [1] 行木啓記、「トライアルコア～愛知県のプラズマ技術産業応用の取り組み～」：  
[http://www.aichi-inst.jp/sangyou/up\\_docs/hyoumen\\_trial\\_detail.pdf](http://www.aichi-inst.jp/sangyou/up_docs/hyoumen_trial_detail.pdf), 2015年1月7日最終閲覧.
- [2] J. Hieda, N. Saito, O. Takai, *Surface & Coatings Technology* **202** (2008) 5343-5346.
- [3] J. Hieda, N. Saito, O. Takai, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **26** (2008) 854-856.
- [4] N. Saito, J. Hieda, O. Takai, *Thin Solid Film* **518** (2009) 912-917.
- [5] M.A. Bratescu, S.-P. Cho, O. Takai, N. Saito, *The Journal of Physical Chemistry C* **115** (2011) 24569-24576.
- [6] S.-P. Cho, M.A. Bratescu, N. Saito, O. Takai, *Nanotechnology* **22** (2011) 455701-455707.
- [7] C. Richmonds, R.M. Sankaran, *Applied Physics Letters* **93** (2008) 131501-131503.
- [8] J. Patel, L. Němcová, P. Maguire, W.G. Graham, D. Mariotti, *Nanotechnology* **24** (2013) 245604-245614.
- [9] H. Lee, S.H. Park, S.-C. Jung, J.J. Yun, S.-J. Kim, D.-H. Kim, *Journal of Materials Research* **28** (2013) 1105-1110.
- [10] T. Mizutani, Y. Abe, H. Hamaguchi, H. Nameki, S. Yagi, *Conference Proceedings NANOCON 2012*, ISBN 978-80-87294-32-1 (2012).
- [11] 宇田川康夫／編「日本分光学会 測定シリーズ 26 X線吸収微細構造 XAFS の測定と解析」学会出版センター (1999).
- [12] 太田俊明／編「X線吸収分光法 -XAFS とその応用-」アイシーピー (2002).
- [13] 広島大学放射光科学研究センター ホームページ、光源装置の説明部分：  
<http://www.hsrb.hiroshima-u.ac.jp/hisor.htm>, 2015年1月7日最終閲覧.
- [14] あいちシンクロトロン光センター ホームページ、光源概要部分：  
<http://www.astf-kha.jp/synchrotron/userguide/kougen/>, 2015年1月7日最終閲覧.
- [15] 立命館大学 SR センター ホームページ、ビームラインの説明部分：  
<http://www.ritsumei.ac.jp/acd/re/src/beamline.html>, 2015年1月7日最終閲覧.
- [16] 立命館大学 SR センター ホームページ、光源の説明部分：  
<http://www.ritsumei.ac.jp/acd/re/src/aurora.html>, 2015年1月7日最終閲覧.
- [17] S. Yagi, G. Kutluk, T. Matsui, A. Matano, A. Hiraya, E. Hashimoto, M. Taniguchi, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **467-468** (2001) 723-726.
- [18] あいちシンクロトロン光センター ホームページ、BL6N1 材料化学状態・構造分析 II の説明部分：[http://www.astf-kha.jp/synchrotron/userguide/gaiyou/bl6n1\\_ii\\_xxafs.html](http://www.astf-kha.jp/synchrotron/userguide/gaiyou/bl6n1_ii_xxafs.html), 2015年1月7日最終閲覧.
- [19] M. Sawada, K. Yaji, M. Nagira, A. Kimura, H. Namatame, M. Taniguchi, *AIP Conference Proceedings* **879** (2007) 551-554.
- [20] 立命館大学 SR センター ホームページ、BL-2 超軟 X線分光ビームラインの説明



- 部分 : <http://www.ritsumei.ac.jp/acd/re/src/info/BL02.pdf>, 2015 年 1 月 7 日最終閲覧.
- [21] H. Ishii, K. Nakanishi, I. Watanabe, T. Ohta, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* **9** (2011) 416-421.
- [22] S. Yagi, Y. Matsumura, K. Soda, E. Hashimoto, M. Taniguchi, *Surface and Interface Analysis* **36** (2004) 1064-1066.
- [23] CXRO X-ray Interactions With Matter : [http://henke.lbl.gov/optical\\_constants/](http://henke.lbl.gov/optical_constants/), 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [24] G.K. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel, *Physical Review Letters* **49** (1982) 57-61.
- [25] G.K. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber, *Physical Review Letters* **56** (1986) 930-933.
- [26] 日本表面科学会／編「ナノテクノロジーのための走査プローブ顕微鏡」丸善 (2002).
- [27] 二瓶好正／編「日本分光学会 測定シリーズ 35 固体の表面を測る」学会出版センター (1997).
- [28] 高橋隆／著「光電子固体物性」朝倉書店 (2011).
- [29] 岡本隆之、梶川浩太郎／著「プラズモニクスー基礎と応用」講談社 (2010).
- [30] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, *Analytical Chemistry* **79** (2007) 4215-4221.
- [31] T.K. Sau, A. Pal, N.R. Jana, Z.L. Wang, T.Pal, *Journal of Nanoparticle Research* **3** (2001) 257-261.
- [32] 寺西利治／編「ナノ学会編 シリーズ第3巻 ナノコロイド 合成・物性・機能」近代科学社 (2014).
- [33] 田中庸裕、山下弘巳／編「固体表面キャラクタリゼーションの実際」講談社サイエンスエディフィク (2005).
- [34] 臼倉治郎／著「よくわかる 生体電子顕微鏡技術 プロトコル・ノウハウ・原理」共立出版 (2008).
- [35] 大西晃宏、ネットワークポリマー **32** (2011) 50-57.
- [36] 日本分析化学会／編「基本分析化学」朝倉書店 (2004).
- [37] 木村真一、池本夕佳、放射光 **18** (2005) 290-297.
- [38] 立命館大学 SR センター ホームページ、BL-15 赤外顕微分光ビームラインの説明部分 : <http://www.ritsumei.ac.jp/acd/re/src/info/BL15.pdf>, 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.

## 第3章 Au ナノ粒子表面に吸着した L-システインの放射線損傷

### 3.1 はじめに

本研究ではシンクロトロン放射光（以下、放射光と記す）の軟 X 線による吸収端近傍 X 線吸収微細構造（NEXAFS）を用いて、L-システインやフォスファチジルコリンの Au ナノ粒子表面への吸着に寄与する官能基や吸着した後の吸着種を明らかにしたいと考えた。しかし、X 線が生体の分子や DNA に与える影響は大きく、これまでそれらに対する放射線損傷について多くの研究がなされている[1-5]。例として、Y. Zubavichus らは L-システインの各官能基を構成する元素の S、N、O に注目し、システイン粉末に対してそれぞれ S-L<sub>3</sub>、N-K、O-K 吸収端 NEXAFS 測定を繰り返し行ったところ、時間を追ってシステインの解離や官能基の脱離が生じたと報告している[5]。さらに K. Fujii らは生体内に含まれる DNA に対して C、N、O の各吸収端付近の放射光を照射すると、DNA 内の結合が解離したと報告している[3]。このような放射線損傷による分子解離が主にオージェ電子刺激イオン化脱離機構によって生じることが 1.1.4 に述べたが、放射線損傷を定義する上では、物質に対してある特定のエネルギーをもった X 線を照射したときに構成原子の内殻電子が励起されて光電子として放出される確率である「光イオン化断面積（Photoionization cross section）」と、照射する X 線の単位時間・単位面積あたりの光子数である「光子束密度（Photon flux density）」という二つの要因が重要である。その理由として、X 線を物質に照射したときにそもそも内殻電子が励起されなければオージェ電子は放出されず、かつ原子内の緩和が完了する前に引き続いて別の光子の入射により内殻電子が励起されたときにイオン化脱離が生じるためである。同じエネルギーを持った X 線を照射した場合でも対象元素によって光イオン化断面積は異なり、これは I. Lindau と J.J. Yeh によってまとめられている[6,7]。また、光子束密度は、測定で使用したビームラインや放射光施設の蓄積電流値によって変化する。

本研究では Au ナノ粒子表面に吸着した生体分子の放射線損傷について注目しているが、Au は N-K や O-K 吸収端付近のエネルギーをもつ X 線に対してもそれぞれ 0.5 及び 0.4 Mb/atom という光イオン化断面積をもつため[6]、それら X 線を試料に照射した際に Au ナノ粒子から光電子が放出され、Au とシステイン吸着種の間形成された結合に対して解離などの影響を与えるかもしれない。また、X 線光電子分光（XPS）測定は、照射した X 線の種類などの条件が異なる試料に対してでも、Au4f のピーク面積で規格化することで Au 原子一つに対する生体分子の結合の種類や量の変化を求めることができるため、放射線損傷を調べるにあたり、NEXAFS 測定と併せて実施することにした。さらに、本論文の中で取り扱う試料は生体分子の吸着量が少なく希薄な系であり、NEXAFS 測定のスเปクトルを Signal/Noise (S/N) の良い状態で取得するためには繰り返し測定（溜め込み測定）が必須であることから、X 線の照射時間に対する放射線損傷の度合いにつ

いても評価する必要がある。また、本論文で研究対象にしている二つの分子のうち、分子構造が単純なシステインを用いて放射線損傷の議論を行うことにする。

よって本章では、Au ナノ粒子表面に吸着した L-システインに対して N-K および O-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合に生じる放射線損傷について、N-K, O-K, S-K 吸収端 NEXAFS 測定及び S2p, N1s XPS 測定により明らかにすることを目的とする。

## 3.2 実験

### Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製及びその粒子径評価

Au ナノ粒子コロイド水溶液は液中プラズマ法で作製した。作製手法と各条件の詳細は 2.1 に記述している。また、Au ナノ粒子の粒子径は AFM 測定で 100 粒子点を測定して見積もったところ、平均粒子径及び標準偏差は  $2.9 \pm 1.0$  nm であった。

### Au ナノ粒子表面に吸着したシステインの試料作製

Au ナノ粒子コロイド水溶液 5 mL を 5 mL 用メイリングチューブに入れた後、L-システイン粉末 ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich 社製) を 4 mg 秤量して加えて攪拌した。溶液の色は素早く 赤→紺 に変化した。攪拌後に容器を静置したところ、Au ナノ粒子は徐々に互いに凝集して沈澱していき、24 時間後には容器の底に黒色の沈澱物と透明な上澄み溶液に分離した。続いてこの上澄み溶液を取り除いた後、蒸留水を加えて沈澱物を分散させ、再び容器を静置して沈澱の生成を促す、というリンス作業を複数回行った。リンスは、Au ナノ粒子表面に化学吸着したシステインのみを残して、物理吸着しているシステインを除去するために行った。複数回のリンス後の黒色の沈澱物をマイクロピペットで吸い取り、[図 3-1](#) のようにダイヤモンドやすりで表面を研磨した  $7 \times 10$  mm<sup>2</sup> の Ni 板表面に滴下して全体に広げた後、自然乾燥させた。この試料を Cysteine/AuNPs/Ni と記述する。

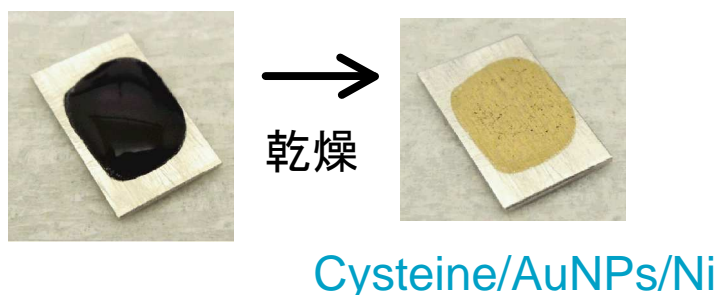


図 3-1 システインと Au ナノ粒子を Ni 基板上に滴下して自然乾燥させた試料.

## N-K, O-K, S-K 吸収端 NEXAFS 測定

### ■ 実験施設及びホルダへの試料設置

N-K 及び O-K 吸収端 NEXAFS 測定は HiSOR BL-14 にて超高真空条件下で全電子収量 (TEY : Total Electron Yield) 法により行った。Cysteine/AuNPs/Ni 基板を BL-14 の試料ホルダ貼りつけた写真を図 3-2 に示す。各試料基板は導電性のカーボンテープを用いてホルダに貼り付けた。カーボンテープに散乱 X 線などが照射されてバックグラウンドのシグナルが検出されることを防ぐために、カーボンテープの大きさは試料基板よりも小さくなるようにした。ビーム径が 0.5 mm×2.0 mm であるため、後で詳細を示す 条件 (i) と 条件(ii) については、図 3-2 のように同じ Cysteine/AuNPs/Ni 基板に対して測定位置を変えて測定を行った。また、このとき横軸校正は行えなかったため、ピークの帰属については行っていない。標準試料として、システイン粉末をカーボンテープに擦りつけた試料を測定した。入射 X 線は試料表面に対して 90°で入射した (直入射)。

S-K 吸収端 NEXAFS 測定は HiSOR BL-3 にて He-path チャンバを用いた He ガス 1 気圧中で部分蛍光 X 線収量 (PFY : Partial Fluorescence Yield) 法により行った。検出器は蛍光 X 線比例計数管 (FPC) を用いた。試料基板はカーボンテープを用いて試料ホルダに貼り付けた。K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 粉末のピーク位置が 2481.7 eV になるように横軸校正を行った。ビームラインと検出器は直交しており、入射 X 線は試料表面に対して 45°で入射し、放出された蛍光 X 線は試料表面に対して 45°で検出した。

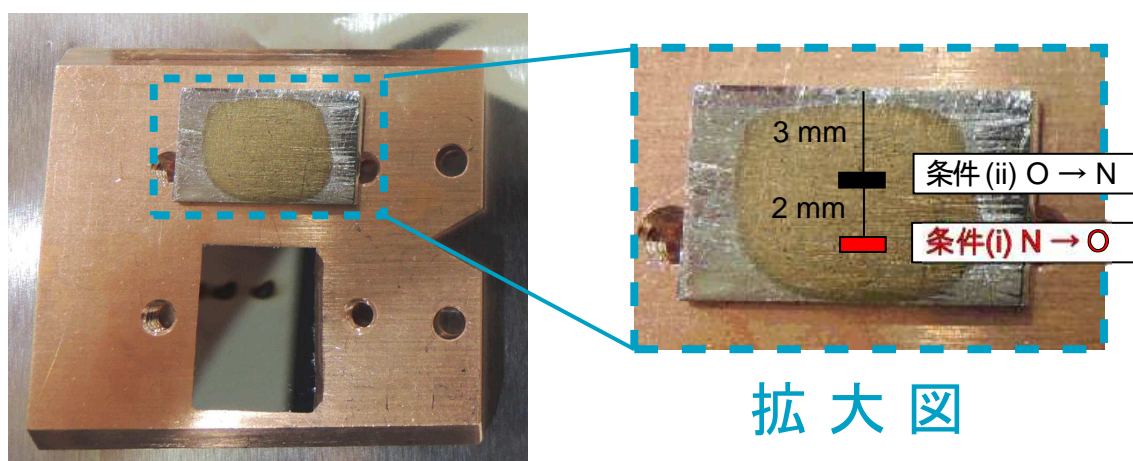


図 3-2 HiSOR BL-14 の試料ホルダ及び条件(i)と(ii)の測定位置.

### ■ 測定条件

測定範囲は N (397~412 eV)、O (520~550 eV)、S (2465~2490 eV) とし、また、1 スペクトルあたりの測定時間は N (7 分)、O (10 分)、S (13 分) でそれぞれ行った。

N-K, O-K, S-K 吸収端 NEXAFS 測定を Cysteine/AuNPs/Ni 試料に対して行うことで、Au ナノ粒子表面に吸着したシステインのアミノ基(-NH<sub>2</sub>)やカルボキシル基(-COOH)、

そして Au ナノ粒子表面への吸着に最も寄与すると考えられるチオール基 (-SH) の解離や脱離について調べるために、表 3-1 のような条件で測定を行った。表 3-1 の上段の各 K 吸収端の表記の下に ( ) で書かれているエネルギー値 (例えば、N-K 吸収端の場合は 400 eV) は、各 K 吸収端のおおよそのエネルギー位置を示している。また、表 3-1 に記載されている時間 (例えば、条件(i)の N-K 吸収端では 40 min) は、各 K 吸収端の放射光を試料に照射した合計時間を示している。この値は、各 K 吸収端 NEXAFS 測定において「ビームシャッターを開けてからの時間」と「スペクトルの測定の時間」を足し合わせて算出しており、この時間が試料に対してビームを照射した時間になる。さらに、時間の下に書かれている値 (例えば、条件(i)の N-K 吸収端では  $1.8 \times 10^{14}$ ) は、各 K 吸収端に対して上述した合計時間の放射光を照射したときの、単位面積当たり照射されたおおよその光子数を示している。単位は表 3-1 の右下に記述しており、photons/mm<sup>2</sup> である。この値は、各ビームラインで提示されているエネルギープロファイルにおいて、各 K 吸収端 (例えば、N-K 吸収端の場合は 400 eV) での蓄積電流が 100 mA あたりの光子束密度 (単位は photons/second/100 mA/mm<sup>2</sup>) を調べ、さらにこの値に、各スペクトルを測定したときの蓄積リングの電流値と放射光の照射時間を掛け算して算出した。各 K 吸収端の吸収端での光子束密度は、N( $2.7 \times 10^{10}$ )、O( $5.1 \times 10^{10}$ )、S( $1.1 \times 10^9$ ) であった。一番左の列に [ ] で書かれている記号は、それぞれの条件における各 K 吸収端 NEXAFS 測定をした順番を示している。Total とは、N-K 及び O-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合の合計の測定時間と光子数をそれぞれ示している。S-K 吸収端 NEXAFS の測定時間は、溜め込み回数で異なっている。条件(i)~(iii)に対する測定条件について表 3-1 の下に述べる。

表 3-1 条件(i)~(iii)に対する詳細な測定条件.

	N-K吸収端 (400 eV)	O-K吸収端 (530 eV)	Total	S-K吸収端 (2470 eV)	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 1em; height: 1em; vertical-align: middle;"></div> で囲ったもの : Cysteine/AuNPs/Ni の各試料に対して 一番初めに照射した 放射光  (photons/mm <sup>2</sup> )
条件(i) [N→O→S]	40 min $1.8 \times 10^{14}$	20 min $1.5 \times 10^{14}$	60 min $3.3 \times 10^{14}$	80 min $1.2 \times 10^{13}$	
条件(ii) [O→N→S]	10 min $0.3 \times 10^{14}$	50 min $3.5 \times 10^{14}$	60 min $3.8 \times 10^{14}$	70 min $1.0 \times 10^{13}$	
条件(iii) [S]	-	-	-	50 min $0.7 \times 10^{13}$	

■条件(i) [N→O→S]

初めに N-K 吸収端 NEXAFS 測定を繰り返して 4 回行い、長時間、放射光を照射したことで生じる Au ナノ粒子表面に吸着したシステインの-NH<sub>2</sub> 基への放射線損傷を調べた。続いて、同じ照射位置に対して O-K 吸収端 NEXAFS 測定を 1 回行い、N-K 吸収端



の放射光を照射したことによる-COOH 基に対する放射線損傷を調べた。さらに、S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行い、Au ナノ粒子とシステインの結合に寄与した-SH 基に対する放射線損傷を調べた。

■条件(ii) [O→N→S]

初めに O-K 吸収端 NEXAFS 測定を繰り返して 4 回行い、長時間、放射光を照射したことで生じる Au ナノ粒子表面に吸着したシステインの-COOH 基への放射線損傷を調べた。続いて、同じ照射位置に対して N-K 吸収端 NEXAFS 測定を 1 回行い、O-K 吸収端の放射光を照射したことによる-NH<sub>2</sub> 基に対する放射線損傷を調べた。さらに、S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行い、Au ナノ粒子とシステインの結合に寄与した-SH 基に対する放射線損傷を調べた。

■条件(iii) [S]

条件(i)と(ii)の参照試料として、N-K 吸収端や O-K 吸収端の放射光を照射していない Cysteine/AuNPs/Ni に対して S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った。

S2p 及び N1s の XPS 測定

条件(i)~(iii)で NEXAFS 測定を行った後の試料について、PHOIBOS 150-CCD (SPECS 社製) を用いて Al K $\alpha$  X 線源 (1486.6 eV) を 200 W (10 kV $\times$ 20 mA) で動作させて XPS 測定を行った。測定範囲については、その結合エネルギー領域を S2p (180~155 eV)、N1s (415~390 eV) とした。測定試料の設置方法の詳細は 2.4 に記述している。

### 3.3 結果と考察

#### N-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 3-3 に Cysteine/AuNPs/Ni に対して測定した条件(i) [N]の 1 回目と 4 回目、条件(ii) [O→N]、さらに Au 板についての N-K 吸収端 NEXAFS 測定の結果を示す。それぞれのスペクトルについて、Pre-edge の強度を揃えた。標準試料として L-システイン粉末のスペクトルも載せた。システイン粉末のスペクトルには 404~406 eV 付近に特徴的なピークが確認された。条件(i) [N]の 1 回目と 4 回目、及び条件(ii) [O→N]のスペクトルにはそのような特徴的なピークは確認されなかったが、N-K 吸収端 NEXAFS では N 由来の吸収が生じないと考えられる Au 板のスペクトルと比較すると、404~406 eV 付近にはシステインが Au ナノ粒子表面に吸着したことに由来する吸収がわずかに見られた。図 3-3 の 410~412 eV 付近の拡大図を見ると、条件(i) [N]の 1 回目と 4 回目のスペクトルは Post-edge がほとんど一致していた。後に示す N1s XPS 測定より、NH<sub>2</sub>や NH<sub>3</sub><sup>+</sup>が Au ナノ粒子表面のシステイン吸着種から解離及び脱離したという結果を考慮すると、Pre-edge と Post-edge の強度差であるエッジジャンプは N 原子の存在量を示すことから、N-K 吸収端 NEXAFS 測定の Post-edge での強度は 1 回目よりも 4 回目の方が減少すると予測される。しかしながら、N-K 吸収端 NEXAFS スペクトルは TEY 法で測定しているためにシステインの炭素や Au ナノ粒子の Au の内殻電子が励起されたことで生じる正孔の緩和に起因するシグナルも得ていることから、Signal/Background (S/B) が悪いと言える。さらに、システイン吸着種の-NH<sub>2</sub>基の解離及び脱離量がスペクトルの変化に反映されるほど多くなかったため、条件(i) [N]の 1 回目と 4 回目の Post-edge の強度が大きく変化しなかったと考えられる。また、条件(ii) [O→N]のスペクトルは条件(i) [N]の各スペクトルと比較して Post-edge の強度が大きかったが、これは放射光を照射している単位面積あたりの Au ナノ粒子の個数が条件(ii) [O→N]の方が多く、上述した C や Au の内殻電子励起後の正孔の緩和が多く生じたためであると考えられる。

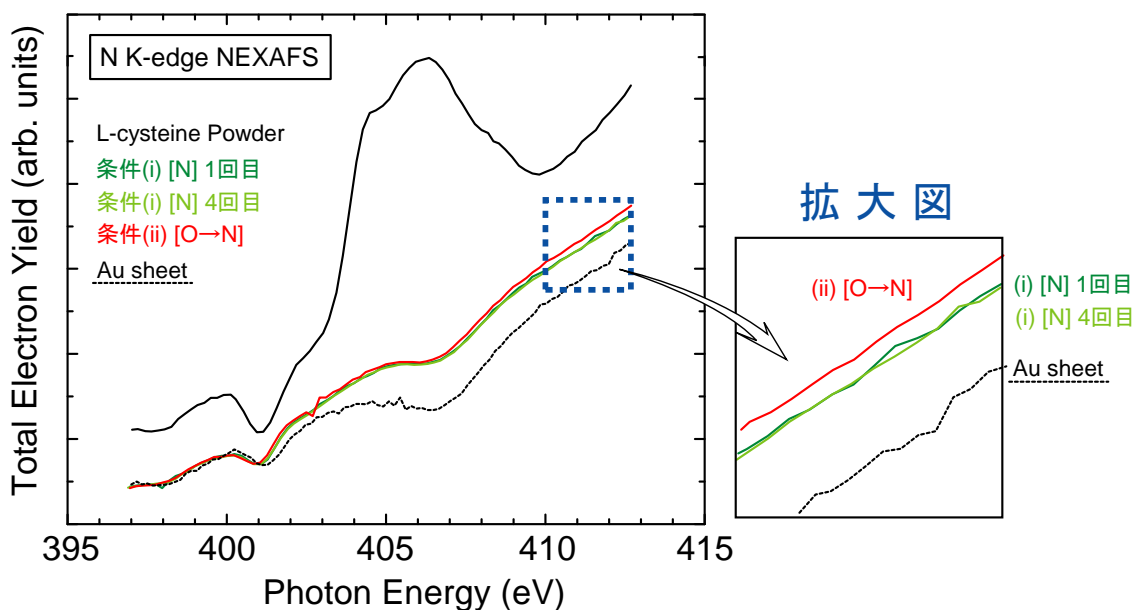


図 3-3 N-K 吸収端 NEXAFS スペクトル.

#### O-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 3-4 に Cysteine/AuNPs/Ni に対して測定した条件(ii) [O]の 1 回目と 4 回目、条件(i) [N→O]、さらに Au 板についての O-K 吸収端 NEXAFS 測定の結果を示す。それぞれのスペクトルについて、Pre-edge の強度を揃えた。標準試料として L-システイン粉末のスペクトルも載せる。システイン粉末のスペクトルには 532.5 eV と 535 eV 付近に鋭いピークが確認された。条件(ii) [O]の 1 回目と 4 回目、及び条件(i) [N→O]のスペクトルでは、同様に 532.5 eV 付近にピークが確認されたため、Au ナノ粒子表面に吸着したシステインに由来する吸収が見られたと考えられる。さらに、それらスペクトルには 545 eV 付近から右上がりの吸収が確認された。これは Au 板のスペクトルにも見られたスペクトルの変化であるが、Au 4p<sub>3/2</sub> に由来する結合エネルギーが 546.3 eV であるために[8]、545 eV 以上の放射光を入射することで Au に由来する吸収が生じたためである。条件(ii) [O]の 1 回目と 4 回目のスペクトルの Post-edge の強度について、542.5~547.5 eV 付近の拡大図で比較すると、1 回目よりも 4 回目の方が減少していた。よって、O-K 吸収端領域の放射光を照射することでシステイン吸着種の-COOH 基の解離と脱離が生じたと考えられる。さらに、後に示す S2p XPS 測定の結果から、N-K 吸収端及び O-K 吸収端の放射光の照射により Au ナノ粒子とシステイン吸着種の間が生じている Au-S 結合が解離してシステイン吸着種そのものが脱離したことも示唆されたため、これも Post-edge の強度が減少した要因の一つと考えられる。また、条件(i) [N→O]のスペクトルの Post-edge での強度が、条件(ii) [O]の各スペクトルよりも小さかった。この結果は、N-K 吸収端 NEXAFS 測定で条件(ii) [O]よりも条件(i) [N→O]の Post-edge での強度の方が小さか

ったという結果と一致しており、放射光を照射している単位面積あたりの Au ナノ粒子の個数が条件(ii) [O]の方が多く、システイン吸着種の C や Au ナノ粒子の Au の内殻電子励起後に生じる正孔の緩和に由来するシグナルが、条件(ii) [O]の方が多く生じたためであると考えられる。

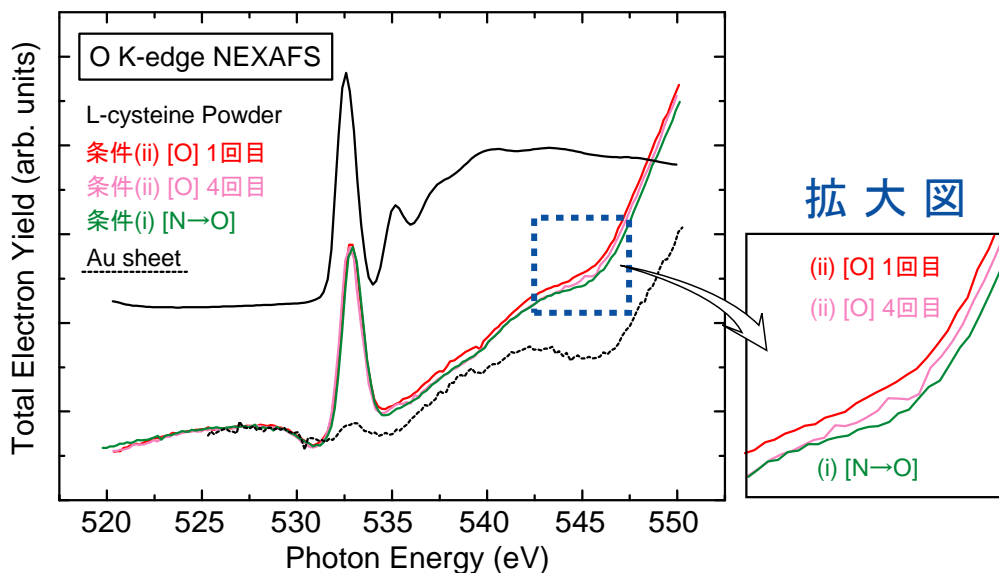


図 3-4 O-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。

### S-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 3-5 に Cysteine/AuNPs/Ni についての条件(i)~(iii)、及び L-システイン粉末の S-K 吸収端 NEXAFS スペクトルを示す。システイン粉末のスペクトルには 2472.5 eV に $\sigma^*(S-C)$ 由来のピークが確認された。続いて、Cysteine/AuNPs/Ni の条件(i)~(iii)のスペクトルをエッジジャンプで規格化したところ、全てのスペクトルのプロファイルが一致しており、2470.0 eV に肩構造、2473.0 eV にピークが確認された。2470.0 eV の肩構造はシステインが Au ナノ粒子表面に-SH 基で吸着した後、原子状硫黄まで解離したことに由来するピークであると考えられる[9]。また、4.3.1 の(viii) 沈殿物[乾燥後]の S-K 吸収端 NEXAFS 測定結果で、2471.6 eV と 2473.0 eV に確認されたピークは Au ナノ粒子表面で合成されたシスチンの $\sigma^*(S-S)$ と $\sigma^*(S-C)$ に由来するピークであると考察しているが、図 3-5 には 2471.6 eV のピークが見られなかったため、シスチンは吸着していないと予測される。一方で P. Zhang らは、アルカンチオールが Au ナノ粒子表面に-SH 基で吸着した場合、S-K 吸収端 NEXAFS スペクトルの $\sigma^*(S-C)$ のピークが吸着前と比較して高エネルギー側にシフトし、さらに、そのピークの約 3 eV 低エネルギー側に S-Au 結合に由来する肩構造が現れると報告している[10,11]。この結果を考慮すると、図 3-5 のスペクトルではシステインが Au ナノ粒子表面にシステインチオレートとして吸着した際の

$\sigma^*(\text{S-C})$ に由来するピークが 2473.0 eV、S-Au 結合に由来するピークが 2470.0 eV に生じたとも考えられる。これらピークや肩構造の帰属についてはまだ定かでないところはあるが、システインが Au ナノ粒子表面に-SH 基で吸着していることは確かである。

S-K 吸収端 NEXAFS 測定で得た Cysteine/AuNPs/Ni の条件(i)~(iii)のスペクトルは全てプロファイルが一致しており、分子の解離や脱離が生じていないように考えられる。しかし、N-K や O-K 吸収端 NEXAFS 測定、そしてこの後に示す S2p や N1s XPS 測定結果において、N-K や O-K 吸収端領域の X 線を照射した Cysteine/AuNPs/Ni では分子の解離や脱離が確認された。S-K 吸収端 NEXAFS 測定は試料に X 線を入射して蛍光 X 線を検出しているため、他の測定と異なり検出深さが深い。よって、放射線損傷が生じていない深さからのシグナルを多く検出したことが要因で、条件(i)~(iii)のスペクトルのプロファイルが一致したと推測した。そこで、この推測を検証するために、N, O, S の各 K 吸収端の X 線を試料に入射したときの減衰長を CXRO (The Center for X-ray Optics) [12] の The Attenuation length of a solid というソフトウェアを用いて求め、N-K 及び O-K 吸収端 NEXAFS 測定時に試料に対して入射した X 線の侵入深さと、S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った際の検出深さを調べ、以下に考察する。減衰長とは、あるエネルギーをもった X 線を物質に垂直に入射したとき、物質中を進行した X 線のエネルギーが  $1/e$  ( $\approx 0.368$ ) 倍まで減弱された際の物質表面からの距離を示す。

まず、今回の測定試料の Cysteine/AuNPs/Ni は、Au ナノ粒子一つあたりのシステインの吸着量や、Cysteine/AuNPs/Ni の単位体積あたりの Au ナノ粒子の個数が定かではなく、密度を算出することが困難である。したがって、Cysteine/AuNPs/Ni の比較試料として、L-システインと Au のそれぞれのバルク材料に対して、N, O, S の各 K 吸収端の X 線を入射した場合の減衰長を求めた。L-システインの密度は  $1.344 \text{ g/cm}^3$ [13]、Au の密度は  $19.32 \text{ g/cm}^3$  とした。図 3-6 に、それぞれのバルク材料に対する入射 X 線エネルギーと減衰長の関係のグラフを示し、その数値から計算した各条件における減衰長を表 3-2 と表 3-3 にまとめた。システインについては吸収端後において X 線が対象原子に吸収されて内殻電子の励起に使用されるために減衰長が短くなることから、吸収端前後のそれぞれの値を示している。また、N-K 及び O-K 吸収端 NEXAFS 測定は試料表面に対して直交した方向から X 線を入射して行ったため、X 線の侵入深さ、つまり“放射線損傷が生じる深さ”は表 3-2 と表 3-3 の「90°入射 減衰長( $\mu\text{m}$ )」と等しい。S-K 吸収端 NEXAFS 測定は試料表面に対して 45°傾いた方向から X 線を入射し、反対方向に 45°の角度をもって放出された蛍光 X 線を検出しているため、減衰長の値は、X 線が試料に入射してから再び試料表面に蛍光 X 線が放出されるまでの距離を考える必要がある。さらに、試料表面に対する入射 X 線と放出された蛍光 X 線の角度も併せて考慮すると、図 3-7 のように 90°入射における減衰長( $\mu\text{m}$ )の半分の距離(減衰半長とする)を斜辺とし、角度 45°の直角三角形を考えたときの対辺の長さが“検出深さ”となる。この値は表 3-2 と表 3-3 の「45°入射、45°検出 検出深さ( $\mu\text{m}$ )」の欄にまとめた。

図 3-8 に、(a)L-システイン及び(b)Au のそれぞれのバルクに対して N-K, O-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合の放射線損傷が生じる深さ(減衰長)と、S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合の検出深さをそれぞれ示す。これらの図から、S-K 吸収端 NEXAFS 測定の実検出深さは N-K, O-K 吸収端 NEXAFS 測定による放射線損傷が生じる深さよりも深く、システインについては約 4~25 倍、Au については約 2 倍近く深いことが分かった。よって、S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行っているとき、放射線損傷が生じていない深さからのシグナルを多く検出したことが条件(i)~(iii)のスペクトルのプロファイルが一致した要因になり得ることが明らかになった。

他の化学状態分析を行える手法として XPS 測定があり、X 線を試料に入射した後に放出される光電子を検出している。固体内における電子の運動エネルギーと平均自由行程の関係をまとめたグラフ(図 2-29) から、S2p (180~155 eV) 及び N1s (415~390 eV) のエネルギーをもつ光電子の平均自由行程、つまりその脱出深さはそれぞれ 0.6 nm と 0.9 nm 程度であることが見積もられた。よって、XPS 測定は非常に表面敏感な手法であるため、放射線損傷が生じているならばスペクトルの変化が確認できると期待されたため、S2p 及び N1s XPS 測定を行うことにした。

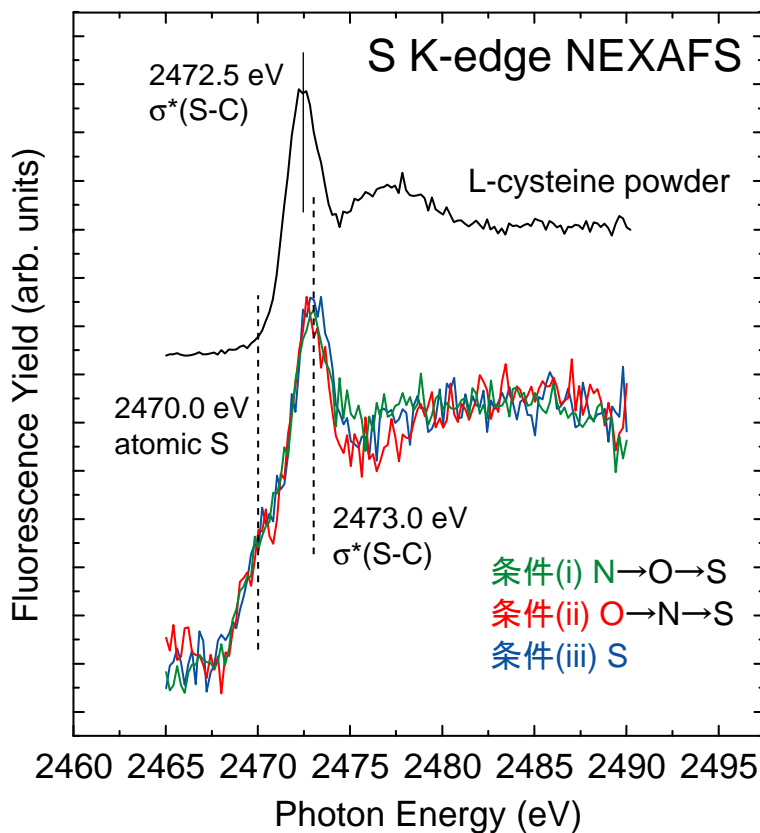


図 3-5 S-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。



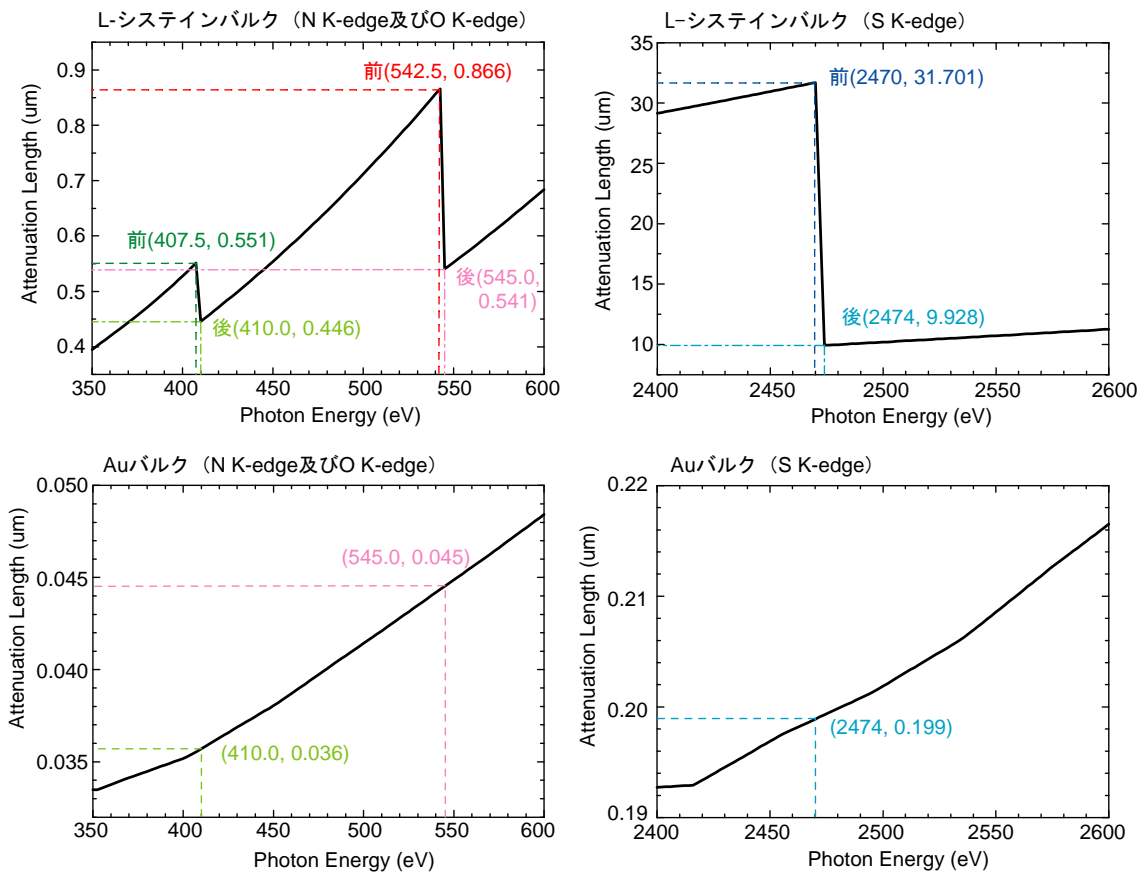


図 3-6 L-システイン及び Au のバルク材料に対する入射 X 線エネルギーと減衰長. グラフ中の“前”と“後”は、吸収端の前後を示しており、( ) の中の左側が入射 X 線のエネルギー、右側が減衰長を表す.

表 3-2 L-システインバルクに対する減衰長と検出深さ.

吸収端の種類	吸収端	X 線エネルギー(eV)	90°入射減衰長(μm)	90°入射減衰半長(μm)	45°入射、45°検出検出深さ(μm)
N-K	前	407.5	0.551	-	-
	後	410.0	0.446	-	-
O-K	前	542.5	0.870	-	-
	後	545.0	0.541	-	-
S-K	前	2470.0	31.701	15.851	11.208
	後	2474.0	9.928	4.964	3.510

表 3-3 Au バルクに対する減衰長と検出深さ.

吸収端の種類	X線エネルギー(eV)	90°入射減衰長(μm)	90°入射減衰半長(μm)	45°入射、45°検出検出深さ(μm)
N-K	410.0	0.036	-	-
O-K	545.0	0.045	-	-
S-K	2474.0	0.199	0.099	0.070

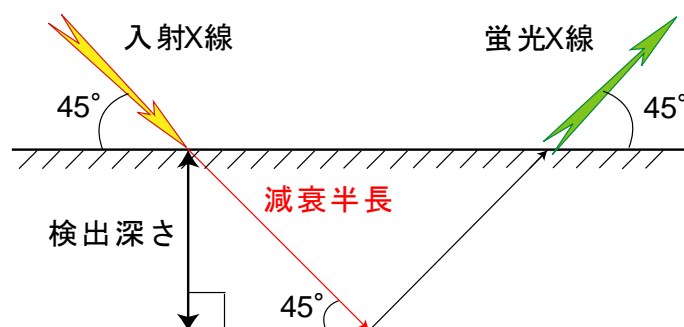
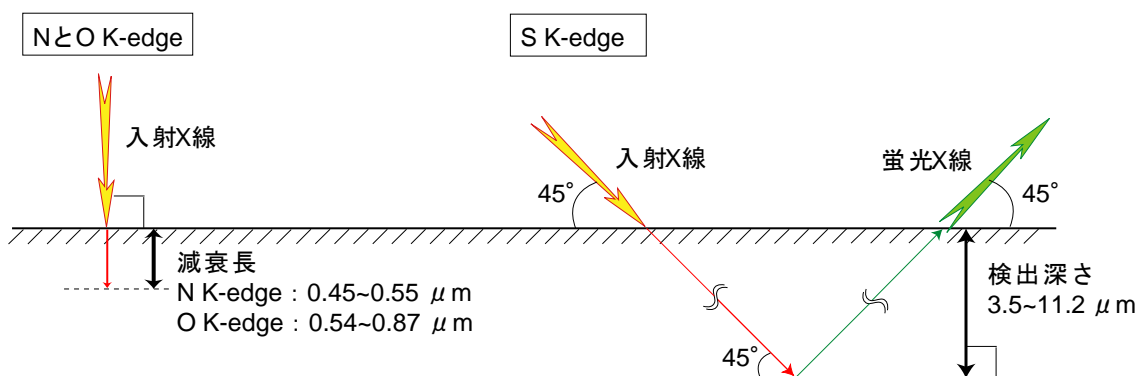


図 3-7 S-K 吸収端 NEXAFS 測定における検出深さの算出方法.

(a) システイン



(b) Au

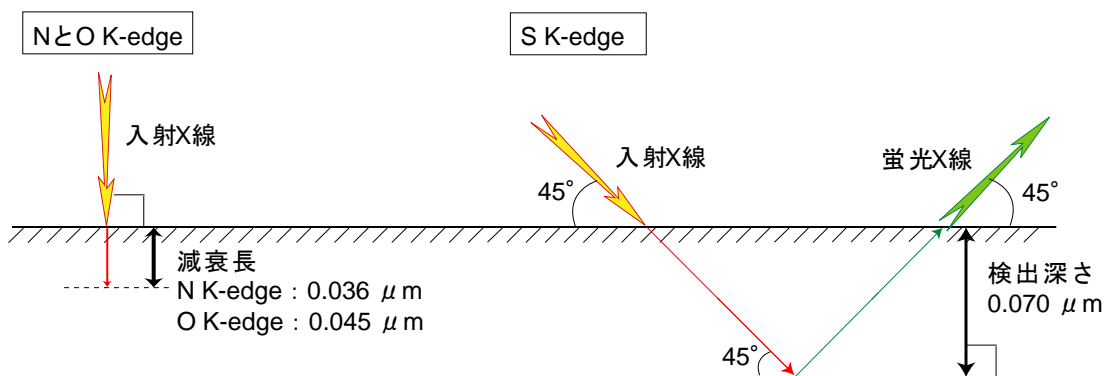


図 3-8 (a)システインと(b)Au に対する減衰長(N, O-K 吸収端)と検出深さ(S-K 吸収端).

## S2p XPS 測定

図 3-9 に Cysteine/AuNPs/Ni についての条件(i)~(iii)の S2p XPS スペクトルを示す。これらスペクトルは Au4f のスペクトルの面積で規格化した。条件(i)~(iii)でスペクトルのプロファイルが異なっており、放射線損傷の影響が反映されていると考えられる。N-K や O-K 吸収端の放射光を照射したことで生じる-SH 基の変化量を明らかにするために、条件(i) [N→O→S]または条件(ii) [O→N→S]から、条件(iii) [S]のスペクトルを差し引いて差分スペクトルを得た。これらをそれぞれ subtracted spectra (i)-(iii)と(ii)-(iii)として図 3-9 に示している。

まず、条件(i)~(iii)のスペクトルでは 162 eV にピークが確認された。システインチオレートに由来する S2p<sub>3/2</sub>は 162 eV 付近に thiolate-Au 結合のピークが生じると報告されているため[14-17]、これはシステインが Au ナノ粒子表面に吸着してシステインチオレートが生じ、ナノ粒子表面に吸着していることを示す。また、L-システインは 164 eV[14,15,17]、原子状硫黄は 161 eV[15]に S2p<sub>3/2</sub>に由来するピークが生じるが、これらピーク位置の範囲に条件(i)~(iii)の S2p XPS スペクトルではピークが見られたことから、Cysteine/AuNPs/Ni の条件(i)~(iii)の試料にはシステインチオレートに加えて、L-システインや原子状硫黄も Au ナノ粒子表面に存在していると考えられる。

続いて差分スペクトル (i)-(iii) 及び (ii)-(iii) について考察する。差分スペクトルではシステインチオレートに由来するピーク位置に負の大きなピークが見られた。これは Cysteine/AuNPs/Ni に対して N-K や O-K 吸収端領域の放射光を照射することにより、主にシステインチオレートが Au ナノ粒子表面から脱離したことを示す。その他、161 eV や 164 eV 付近にもピークの裾がかぶっているため、原子状硫黄やシステインの脱離も生じた可能性がある。X 線の照射で生じる試料の損傷は X 線の照射量に依存し[18,19]、また、損傷速度は光イオン化断面積に比例する[18,20]と報告されている。システインは -SH 基で Au ナノ粒子表面に吸着していることが S-K 吸収端 NEXAFS 測定や S2p XPS 測定の結果から明らかである。よって、システイン吸着種 (システイン、システインチオレート、原子状硫黄) の脱離が生じた要因について、条件(i) [N→O→S]と条件(ii) [O→N→S]の試料基板に対して N-K および O-K 吸収端領域の放射光を照射した際の S と Au における照射された光子の全吸収量を見積もった後に、考察することにした。S と Au の光子の全吸収量は、表 3-1 の「各 K 吸収端に対して上述した合計時間の放射光を照射したときの単位面積あたりに照射されたおおよその光子数 (photons/mm<sup>2</sup>)」に「各 K 吸収端の放射光を照射したときの各元素の光イオン化断面積」を掛け合わせてそれぞれ算出した。光イオン化断面積は I. Lindau と J.J. Yeh らがまとめたグラフ[6,7]、を参考にしており、図 3-10 に S、Au、N のグラフを示す。S については N-K 吸収端 (400 eV) または O-K 吸収端 (530 eV) の放射光を照射した際の各軌道に対する断面積を読み取り、足し合わせて S の光イオン化断面積とした。N-K 吸収端 (400 eV) の光を照射したときの断面積は S (0.123)、Au (0.50)、N (0.70) であり、O-K 吸収端 (530 eV) の光を

照射したときの断面積は S (0.056)、Au (0.40)、N (0.34) であった。各元素に対して算出した照射された光子の全吸収量を表 3-4 に示す。この結果から、条件(i) [N→O→S] と条件(ii) [O→N→S]の各試料について、S よりも Au の方が 5 倍と 6.7 倍の光子の全吸収量について差があることが分かった。よって Au ナノ粒子表面に吸着したシステイン吸着種の脱離は、図 3-11 のように Au ナノ粒子からの二次電子の電子衝撃により S-Au 結合の解離が促進されて生じたと考えられる。また、Au に対する条件(i) [N→O→S]と条件(ii) [O→N→S]の光子の全吸収量は、 $1.5 \times 10^{14}$  photons/mm<sup>2</sup> と  $1.6 \times 10^{14}$  photons/mm<sup>2</sup> でありほとんど値に差がないため、それぞれのシステイン吸着種の脱離量が同じ程度となり、図 3-9 の差分スペクトルが一致したように見られたと考えられる。

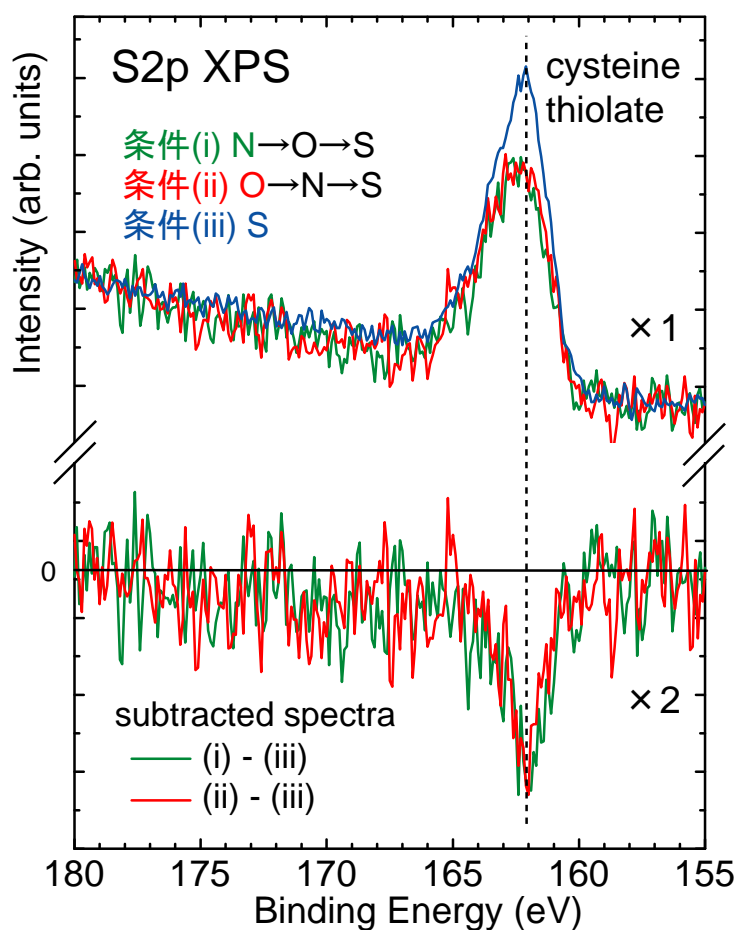


図 3-9 S2p XPS スペクトル.

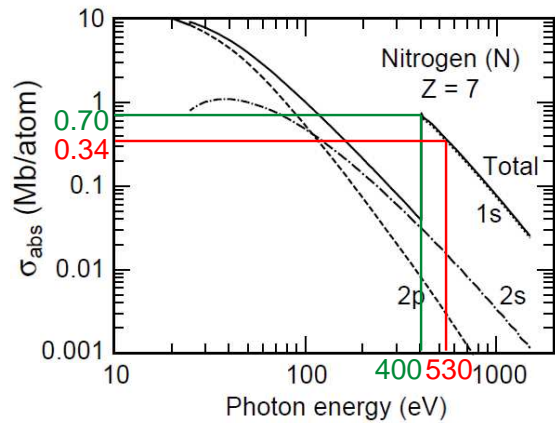
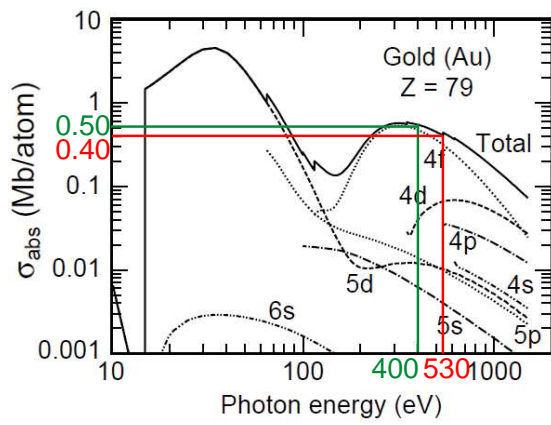
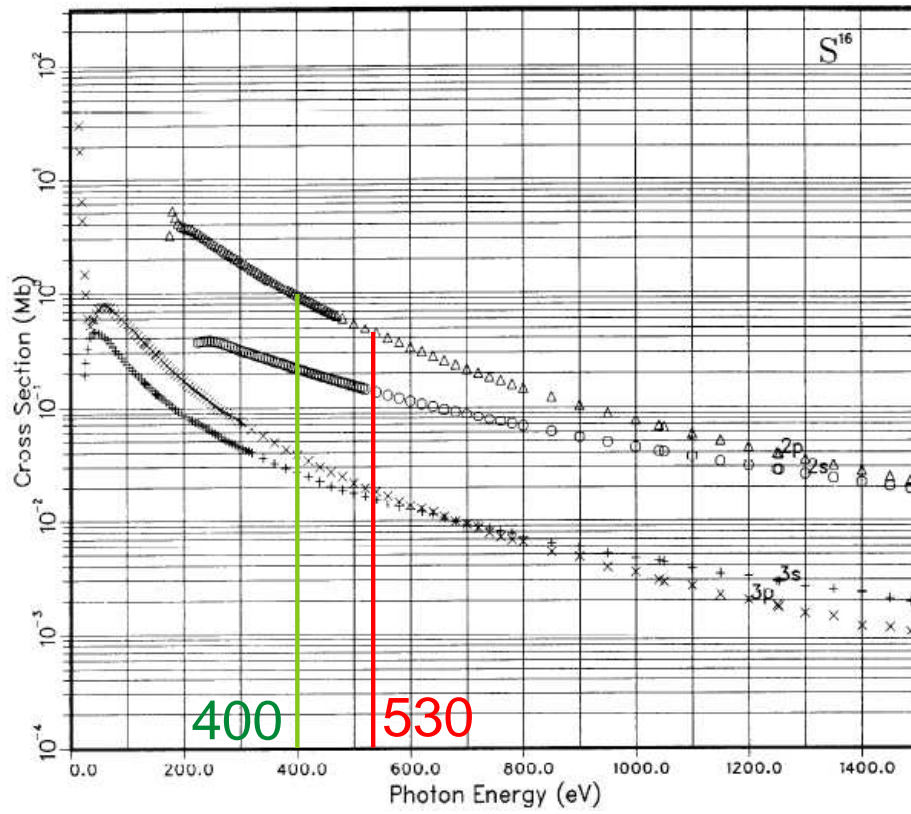


図 3-10 S, Au, N に対する光イオン化断面積[6,7].

表 3-4 各元素に対する照射された光子の全吸収量（単位：photons/mm<sup>2</sup>）。

	条件(i) N→O→S	条件(ii) O→N→S
S	$3.0 \times 10^{13}$	$2.4 \times 10^{13}$
Au	$1.5 \times 10^{14}$	$1.6 \times 10^{14}$
N	$1.7 \times 10^{14}$	$1.4 \times 10^{14}$

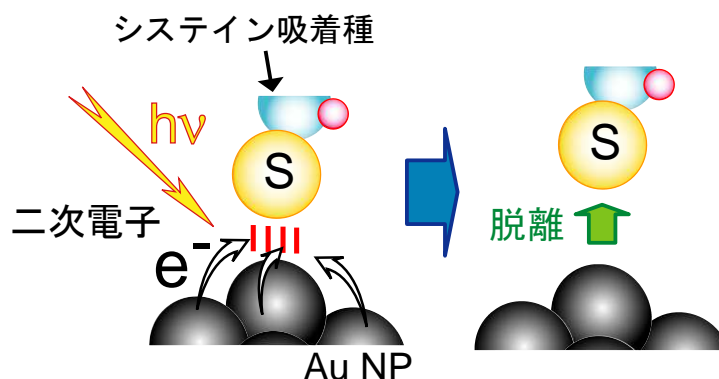


図 3-11 Au ナノ粒子からの二次電子の電子衝撃によるシステイン吸着種の脱離。

### N1s XPS 測定

図 3-12 に Cysteine/AuNPs/Ni についての条件(i)~(iii)の N1s XPS スペクトルを示す。これらスペクトルは Au4f のスペクトルの面積で規格化した。条件(i)~(iii)でスペクトルのプロファイルが異なっており、放射線損傷の影響が反映されていると考えられる。N-K 吸収端や O-K 吸収端の放射光を照射したことで生じる-NH<sub>2</sub> 基の変化量を明らかにするために、条件(i) [N→O→S]または条件(ii) [O→N→S]から、条件(iii) [S]のスペクトルを差し引いて差分スペクトルを得た。これらをそれぞれ subtracted spectra (i)-(iii)と(ii)-(iii)として図 3-12 に示している。まず、条件(i)~(iii)の全てのスペクトルに対して、400 eV 付近と 402 eV 付近にピークと肩構造が観察された。これはそれぞれ NH<sub>2</sub> [14,17]と NH<sub>3</sub><sup>+</sup>[14,17]に由来するピークである。既往の研究で、富原はシステインが物理吸着して両性イオン[-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -COO<sup>-</sup>]の状態の場合は NH<sub>3</sub><sup>+</sup>であり、水により酸化されて陰イオン[NH<sub>2</sub>, -COO<sup>-</sup>]になった場合は NH<sub>2</sub>になると報告している[17]。よって、図 3-12 に観察されたピークは両性イオンと陰イオンになっているシステインが存在していると考えられる。

続いて、差分スペクトル (i)-(iii) と (ii)-(iii) について考察する。それぞれ NH<sub>2</sub>と NH<sub>3</sub><sup>+</sup>に由来する負のピークが確認された。このピーク強度は各官能基の脱離量を示している。N は放射光が照射されて内殻電子が励起された後にオージェ過程が生じやすい。よって、これらの官能基の脱離は、内殻電子が励起されたあとにオージェ電子が真空中に放出さ



れ、その際に生じた正孔が他の内殻電子によって緩和される前にシステイン吸着種の N-C 結合が解離するというオーজে電子刺激イオン化脱離により生じたと考えられる。図 3-13 にモデル図を示す。また、差分スペクトルでの NH<sub>2</sub> のピーク強度は、(ii)-(iii) よりも (i)-(iii) の方が大きかった。表 3-2 に記した N に対する照射された光子の全吸収量について、条件(i) [N→O→S]では  $1.7 \times 10^{14}$  photons/mm<sup>2</sup>、条件(ii) [O→N→S]では  $1.4 \times 10^{14}$  photons/mm<sup>2</sup>であり、条件(i)の方がわずかに大きかったため、条件(i)の方が NH<sub>2</sub> の脱離量が多かったと考えられる。

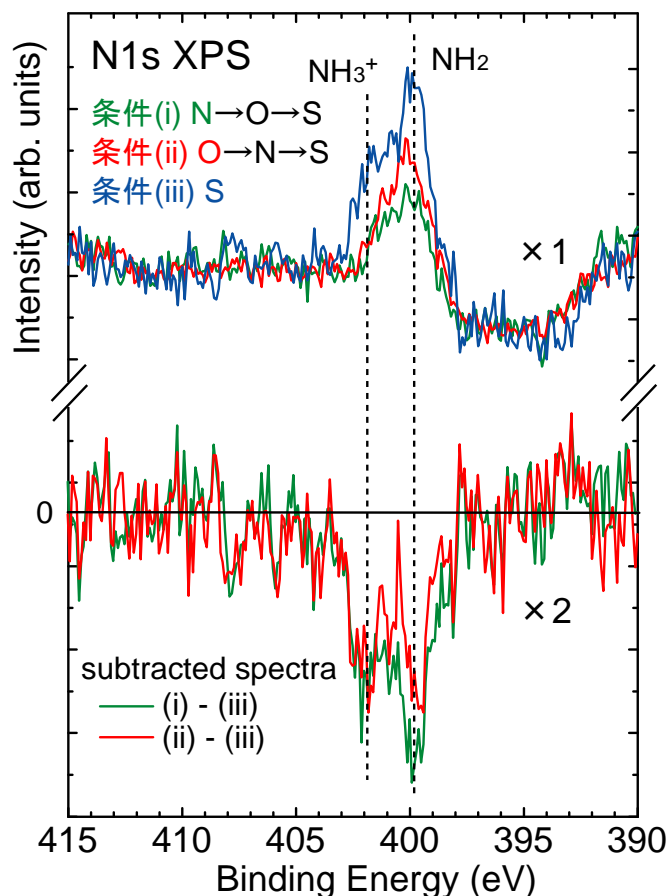


図 3-12 N1s XPS スペクトル.

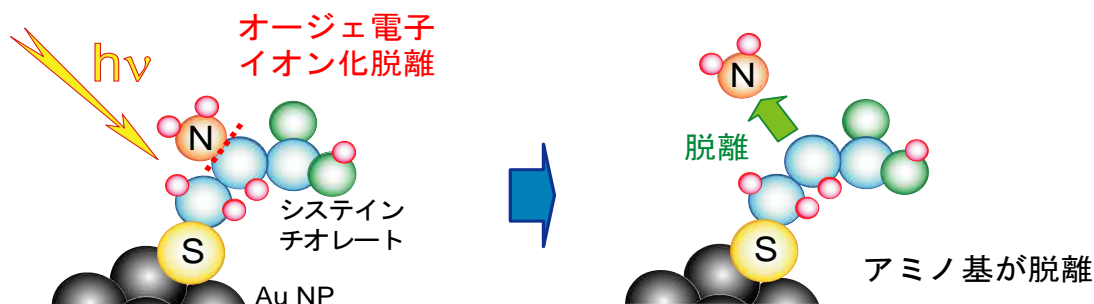


図 3-13 オーজে電子イオン化脱離によるアミノ基の脱離.

### NEXAFS 測定での放射線損傷の要因、損傷によるスペクトル変化を防ぐ解決策の提案

以上の結果から、Au ナノ粒子表面に吸着したシステイン吸着種の脱離は、ナノ粒子からの二次電子の電子衝撃により S-Au 結合の解離が促進されたこと、また、NH<sub>2</sub>や NH<sub>3</sub><sup>+</sup>の官能基の脱離は、内殻電子が励起されたあとにオージェ電子が真空中に放出され、その際に生じた正孔が他の内殻電子によって緩和される前にシステイン吸着種の N-C 結合が解離するというオージェ電子刺激イオン化脱離が生じたことにより、それぞれ起こったと考えられる。さらに、これら放射線損傷の要因は、X 線の光子束密度が大きく効いていると推測された。よって、放射線損傷による NEXAFS スペクトルの変化を防ぐためには、長時間、同じ試料位置に対して X 線を照射し続けないことが重要と考えられる。よって、一つのスペクトルを得るための一点あたりの溜め込み時間を短くし、かつ、スペクトルが得られる毎に放射線損傷によるスペクトルプロファイルの変化が生じていないかを判断し、もしも変化が見られた場合は試料位置を変更することが必要と考える。スペクトルの S/N は、溜め込み回数を増やし、測定で得た複数のスペクトルを後から足し合わせることで向上できる。

### N, O, S-K 吸収端 NEXAFS 測定を用いて放射線損傷を解明する方法の提案

上述したように、N, O, S-K 吸収端 NEXAFS 測定では、繰り返し測定を行った前後でのスペクトル変化がほとんど生じておらず、放射線損傷について詳細な議論ができなかった。これらスペクトル変化が生じなかった理由として、N, O-K 吸収端 NEXAFS 測定に用いた TEY 法の場合は S/B が悪かったこと、そして S-K 吸収端 NEXAFS 測定に用いた PFY 法の場合は X 線を入射して蛍光 X 線を取得しているために、検出深さが深く、放射線損傷が生じていない深さからのシグナルが多く得られたことが考えられる。以上の結果から、NEXAFS 測定によるスペクトル変化から放射線損傷を明らかにするためには、S/B が良いことと表面敏感であることが必要条件であると言える。この二つの条件を満たす最も適した測定法として、内殻電子の励起後の緩和過程で生じるオージェ電子のみを捉えるオージェ電子収量法 (AEY : Auger Electron Yield) が挙げられる。オージェ電子は元素固有の運動エネルギーをもっているために S/B が良く、かつオージェ電子を検出するため表面敏感である。ただし、入射 X 線のエネルギーを少しずつ変化させて測定を行う XAFS 測定において、オージェ電子のエネルギーは一定であるものの、光電子のエネルギーは変化していくため、光電子も検出するエネルギー領域になると S/B が悪くなることに注意が必要である[21]。また、試料から放出された電子の中でも、ある一定の値以上の運動エネルギーをもつ電子を取り込むようにした部分電子収量法は、オージェ電子収量法よりも多くシグナルが得られ、かつ全電子収量法と比べて非弾性散乱を受けて非常に遅くなった電子を取り込まないため表面敏感の測定が行える。よって、吸着量が少ない分子吸着反応系の試料で、かつ表面敏感で測定を行いたい場合は適する手法であると考えられる。

### 3.4 まとめ

液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子コロイド水溶液中に L-システイン粉末を加えて分子吸着反応を促した試料 (Cysteine/AuNPs/Ni) に対し、N-K および O-K 吸収端の放射光を照射することで生じる放射線損傷について、NEXAFS 測定及び XPS 測定により、以下の点が明らかになった。

- (1) Cysteine/AuNPs/Ni に対して N-K 及び O-K 吸収端領域の X 線を照射すると、Au ナノ粒子の Au から二次電子が発生する。その二次電子は電子衝撃により S-Au 結合の解離を促進し、結果としてシステイン吸着種が脱離すると考えられる。
- (2) N-K や O-K 吸収端領域の X 線を照射すると、システイン吸着種の-NH<sub>2</sub> 基を構成する N では内殻電子が励起された後にオージェ電子が真空中に放出される。ここで生じた正孔が他の内殻電子により緩和される前に、システイン吸着種の N-C 結合が解離するというオージェ電子刺激イオン化脱離が生じるために、NH<sub>2</sub> や NH<sub>3</sub><sup>+</sup> が脱離すると考えられる。
- (3) O-K 吸収端領域の X 線を Cysteine/AuNPs/Ni に対して長時間照射することで、オージェ電子刺激イオン化脱離が生じ、システイン吸着種の-COOH 基の脱離が生じると考えられる。

以上より、Au ナノ粒子表面に吸着した分子について、放射光を用いた化学状態分析を行う場合は、分子を構成する官能基のオージェ電子刺激イオン化脱離だけではなく、Au ナノ粒子から生じる二次電子の電子衝撃による分子の脱離も考える必要があることが分かった。また、これら放射線損傷の要因は、X 線の光子束密度が大きく効いていると推測された。金属ナノ粒子表面に吸着した分子に対しては上記の 2 つの要因で放射線損傷が生じる可能性が示唆されたため、放射光を用いた分光学的手法によって化学状態分析を行う場合は、試料位置を適宜移動させて、同じ位置に長時間、X 線を照射することを避けながら測定を行う必要があるという指針が得られた。

## 参考文献

- [1] 杉浦紳之、山西弘城／著「放射線生物学」通商産業研究社 (2013).
- [2] 山口彦之／著「放射線生物学」裳華房 (1995).
- [3] 藤井健太郎、*放射光* **16** (2003) 151-158.
- [4] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, M. Zharnikov, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **603** (2009) 111-114.
- [5] Y. Zubavichus, O. Fuchs, L. Weinhardt, C. Heske, E. Umbach, T.D. Denlinger, M. Grunze, *Radiation Research* **161** (2004) 346-358.
- [6] X-ray Data Booklet, Section 1.5 Subshell Photoionization Cross Sections : [http://xdb.lbl.gov/Section1/Sec\\_1-5.html](http://xdb.lbl.gov/Section1/Sec_1-5.html), 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [7] J.-J. Yeh, I. Lindau, *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **32** (1985) 1-155.
- [8] X-ray Data Booklet, Section 1.1 Electron Binding Energies : [http://xdb.lbl.gov/Section1/Sec\\_1-1.html](http://xdb.lbl.gov/Section1/Sec_1-1.html), 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [9] M.A. MacDonald, P. Zhang, H. Qian, R. Jin, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **1** (2010) 1821-1825.
- [10] P. Zhang, T.K. Sham, *Physical Review Letters* **90** (2003) 245502-1 – 245502-4.
- [11] P. Zhang, X. Zhou, Y. Tang, T.K. Sham, *Langmuir* **21** (2005) 8502-8508.
- [12] CXRO X-ray Interactions With Matter : [http://henke.lbl.gov/optical\\_constants/](http://henke.lbl.gov/optical_constants/), 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [13] Guidechem : <http://www.guidechem.com/>, 2014 年 12 月 29 日最終閲覧.
- [14] G. Doderio, L.D. Michieli, O. Cavalleri, R. Rolandi, L. Oliveri, A. Dacca, R. Parodi, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **175** (2000) 121-128.
- [15] L.-J. Fan, Y.-W. Yang, Y.T. Tao, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **144-147** (2005) 433-436.
- [16] J. Noh, E. Ito, K. Nakjima, J. Kim, H. Lee, M. Hara, *The Journal of Physical Chemistry B* **106** (2002) 7139-7141.
- [17] 富原大介 名古屋大学 卒業論文 (2005).
- [18] 三浦薫, *Journal of Surface Analysis* **7** (2000) 49-57.
- [19] C.J. Powell, M.P. Seah, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **8** (1990) 735-763.
- [20] R. Chaney, G. Bath, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **329** (1987) 143-146.
- [21] 太田俊明／編「X線吸収分光法 –XAFS とその応用–」アイシーピー (2002).

## 第4章 Au ナノ粒子と L-システインの水環境下での吸着反応

### 4.1 はじめに

生体内には遊離アミノ酸やたんぱく質の形成分子として約 20 種類のアミノ酸が豊富に存在している[1]。よって、Au ナノ粒子が生体内に投与された際にこれらアミノ酸とナノ粒子の間で分子吸着反応が生じることが予測される。アミノ酸は分子中にアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) とカルボキシル基 (-COOH) の両方の官能基をもつ分子であるが[1]、それら官能基以外に各アミノ酸を特徴付ける官能基が結合してそれぞれのアミノ酸を形成している。アミノ酸の中でも L-システインはチオール基 (-SH) をもった分子である。硫黄 (S) を含んだ分子は S の部分で金属と結合を形成しやすいことが知られており、これまでに様々な含硫黄分子と金属との吸着反応が調べられてきた[2-6]。また、S は特に Au と強固な結合を形成することが分かっており、既往の研究で、末端に-SH 基を持った炭化水素分子を Au 単結晶上で反応させて S-Au の結合を形成することで特定の自己組織化膜 (SAMs) の作製を実現している研究が多く報告されている[7-8]。

Au ナノ粒子は表面を様々な分子で修飾して生体適合性やドラッグデリバリーシステムの機能を持たせた後に生体内に投与することが検討されている。しかし、ナノ粒子表面の全面に対して分子が吸着しておらず吸着サイトが残っているならば、システインは分子の大きさが 1 nm 未満と小さいため、システインが修飾分子の間を通り抜けてナノ粒子表面に到達し、Au ナノ粒子表面で吸着反応を生じると考えられる。場合によっては生体内に存在しない分子が合成される、もしくは生体内に存在する分子だとしても過剰に生成されてしまう可能性がある。また、システインは生体内のたんぱく質の中でも立体構造を構成するために重要なジスルフィド結合 (S-S) の形成を担っており、かつ、たんぱく質の末端にも存在する分子である。したがって、もしも Au ナノ粒子が生体内に投与され、それらシステインの硫黄原子と結合するならば、たんぱく質の構造の乱れやたんぱく質を構成する分子の解離を生じ、結果として細胞や組織の損傷につながる可能性がある。さらに、ドラッグデリバリーなどとしてナノ粒子を生体内に投与し、目的箇所に届ける方法として血管内での輸送が想定されているが、血管の直径は狭いところで 5~20 μm 程度である[9]。よって、ナノ粒子が生体の血管内で凝集すると血栓などにつながる可能性がある。他の金属ナノ粒子の場合でも、ナノ粒子がシステインと吸着反応をした後にシステイン吸着種を介して凝集したという報告もなされているため[10-11]、システインの Au ナノ粒子に対する吸着種やそれによるナノ粒子の形態変化について調べるのが重要と考えられる。

また、生体内を模した状態で Au ナノ粒子とシステインの吸着反応を明らかにするためには、水環境中での測定が重要である。しかしながら、水に対して X 線を照射する

と、一部の  $\text{H}_2\text{O}$  が分解されて  $\text{H}$  ラジカルや  $\text{OH}$  ラジカルになると報告されている。このように発生したラジカルは反応性が高く、水の中に存在する分子を解離させると言われている[12-14]。これが 1.1.4 で述べた間接効果である。分子を構成する官能基の中でも  $-\text{SH}$  基はラジカルと反応しやすい性質をもっている。ラジカルと反応した  $-\text{SH}$  基をもつ分子は、 $\text{S-H}$  結合が解離した後、その二つの分子で  $\text{S-S}$  結合を形成することで安定な物質になる[12-14]。つまり、この反応が生じることで結果としてラジカルが消失し、かつ系全体として安定な状態になる。また、本研究で分子吸着反応の解明対象にしているシステインでいえば、システインの  $-\text{SH}$  基がラジカルと反応してシスチンが形成されるということになる。よって、水環境下で  $\text{S-K}$  吸収端 NEXAFS 測定を行う場合、間接効果による放射線損傷についても考慮する必要がある。

よって、本章では  $\text{Au}$  ナノ粒子と  $\text{L}$ -システインの分子吸着反応を水環境下で促し、反応時間経過に伴う水環境下での  $\text{Au}$  ナノ粒子表面に対するシステインの吸着種を  $\text{S-K}$  吸収端 NEXAFS 測定、 $\text{Au}$  ナノ粒子の粒子径変化を AFM 測定、さらに光吸収波長を UV-Vis 測定より明らかにすることを目的とする。



## 4.2 実験

### 【試料作製】

#### Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製

2.1 に Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製方法及び各条件について記述した。作製したままの Au ナノ粒子コロイド水溶液を(i)初期とし、その写真を図 4-1 に示す。続いて以下に、Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて分子吸着反応を促した試料について詳細を述べる。

#### Au ナノ粒子コロイド水溶液とシステインの吸着反応後の試料の調整

Au ナノ粒子コロイド水溶液 5 mL をディスポーザブル容器に入れ、そこに L-システイン粉末 ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich 社製) を 4 mg ( $33 \mu\text{mol}$ ) 加えた後、30 秒ほど上下左右に攪拌すると粉末が見えなくなりシステインが完全に溶解した。反応経過に伴って生じる溶液の変化を観察するため、攪拌後に容器を静置した。システインを Au ナノ粒子コロイド水溶液に加えてから、(ii)1 分後、(iii)4 分後、(iv)3 時間後、(v)24 時間後のそれぞれの写真を図 4-1 に示す。写真から分かるように、システインを加えてからすぐに Au ナノ粒子コロイド水溶液の色は 赤 $\rightarrow$ 紺 に向かって変化しており、さらに(iv)3 時間後では Au ナノ粒子の凝集によりわずかにナノ粒子が容器の底に沈殿していた。(v)24 時間後では Au ナノ粒子の黒色の沈殿と透明な上澄み液が生じた。Au ナノ粒子表面に化学吸着したシステインのみを残すために、その透明な上澄み液を吸い出し、milli-Q 水 ( $18 \text{ M}\Omega\text{cm}$ ) を加えて沈殿物をリンスすることで、ナノ粒子表面に物理吸着、もしくは透明な上澄み液に存在する未反応のシステインを除去した。沈殿物に水を加えてリンスを行う際、Au ナノ粒子は水溶液中に拡散するが、この Au ナノ粒子が沈殿するまでに数日間を要する。静置により再び生じた黒色の沈殿物と透明な上澄み液のうち、上澄み液を吸い出して milli-Q 水を加えるというリンスの作業を複数回行った。リンスの際に沈殿物を水溶液中に拡散させた状態の紺色の溶液を(vi)紺色溶液 と呼ぶ。複数回のリンスの後の(vi)紺色溶液が沈殿した後、水の存在下で保持していた沈殿物試料を(vii) 沈殿物[水環境下]、この沈殿物をポリエチレンフィルムの上で乾燥させた試料を(viii) 沈殿物[乾燥後]と呼ぶ。

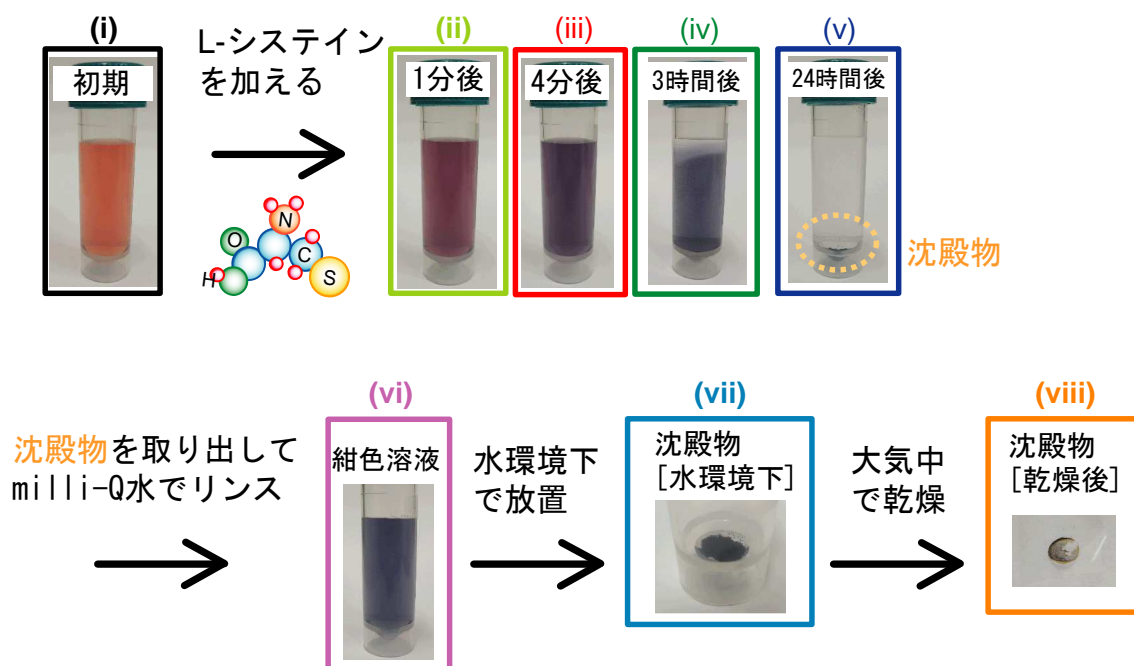


図 4-1 Au ナノ粒子コロイド水溶液中にシステインを混合後に生じる溶液変化 ((i)～(v))、及びナノ粒子の沈殿後に調整した試料 ((vi)～(viii)) .

#### 【各試料の評価方法】

##### 時間変化に伴う L-システインの化学吸着種

Au ナノ粒子表面に吸着したシステインの吸着種を明らかにするために、(iii) 4 分後、(iv) 3 時間後、(v) 24 時間後、(vii) 沈殿物[水環境下]、(viii) 沈殿物[乾燥後]に対して S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った。(iii)、(iv)については、(iii)をポリエチレンフィルム (12  $\mu\text{m}^2$ ) のバブルラップのセル中に加えて測定を行った後、3 時間経過するまで放置し、そのセル中の溶液の上の方を測定した。(v)～(vii)に関しては新たなバブルラップのセルに透明な上澄み液、紺色の溶液、または水も含めた沈殿物を加えて測定を行った。測定条件については、範囲：2463～2493 eV、エネルギーステップ：0.2 eV で行った。 $\text{K}_2\text{SO}_4$  のピークが 2481.7 eV になるようにキャリブレーションを行った。また、部分蛍光 X 線収量 (PFY : Partial Fluorescence Yield) 法で大気圧条件 XAFS 測定を行うために、He-path チャンバ内を He ガス ( $\geq 99.99\%$ ) で 1 気圧に満たし、かつチャンバ内を常に He ガスで満たすことができるように 10  $\mu\text{L}/\text{minute}$  のフローレートで測定中にガスを流し続けた。

##### 粒子径変化

分子吸着反応の時間経過に伴って生じる Au ナノ粒子の粒子径変化を見積もるために、自然酸化膜をもつ Si(100)基板上に、(i) 初期、(iii) 4 分後、(iv) 3 時間後、(vi) 紺色溶液の溶液試料をそれぞれ 500  $\mu\text{L}$  程度滴下してスピンドコーティングした後、AFM 測定で粒子

の高さ方向を測定した。(iv)3時間後 に関しては、上澄み液の中でも液面近くの溶液を分取して滴下した。AFM 測定は XE-100 (Park systems 社製) を用い、タッピングモードで測定した。

#### 光吸収波長の変化

Au ナノ粒子コロイド水溶液とシステインを混合したことで生じるコロイド水溶液の光吸収変化から、ナノ粒子の粒子径変化やシステインの吸着によるナノ粒子表面に存在する電子密度変化について明らかにするために UV-Vis 測定を行った。UV-Vis 装置は UV-2450 (島津製作所社製) を用いた。2 mL の Au ナノ粒子コロイド水溶液を UV-Vis 測定用のディスポーザブル用セルに入れ、1.6 mg のシステイン粉末を加えてマイクロピペッタで攪拌した後、装置内にセルをセットして静置した。(i)初期、(ii)1分後、(iii)4分後、(iv)3時間後、に対して室温で 400~700 nm の領域についての UV-Vis 測定を透過法で行った。さらに (v)24時間後の透明な上澄み溶液に対しては、V-670 (日本分光社製) を用い、石英セルに溶液を加え、同条件で UV-Vis 測定を行った。UV-Vis 測定では二つの装置を用いているが、それぞれの装置で(i)初期を測定し、Au ナノ粒子由来の局在表面プラズモンの吸収ピーク位置であった 517 nm の吸収強度が一致するように定数を掛け、全てのスペクトルを一つのグラフに載せた。

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 L-システイン分子の吸着

#### H<sub>2</sub>O 由来の活性種による S-K 吸収端 NEXAFS 測定スペクトルへの影響

Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて吸着反応時間を促した試料に対する S-K 吸収端 NEXAFS スペクトルの議論を行う前に、溶媒の水に X 線を照射することで生成される H ラジカルや OH ラジカルなどの活性種が測定スペクトルに与える影響を明らかにすることが重要である。S-K 吸収端 NEXAFS の一回の測定に要する時間は 13 分間程度であり、かつ対象試料は希薄な系であることから Signal/Noise (S/N) を良くするために 3~4 回程度の繰り返し測定が必要である。よって、一つの試料に対して 45~60 分間ほど X 線を照射して繰り返し測定を行ってデータを得たが、それらスペクトルを全て足し合わせて良いかどうかを先ず判断した。そこで、Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて(iii)4 分後の試料に対する測定スペクトルについて、1 回目と 3 回目を比較した。図 4-2 に、(a)生スペクトル、(b)生スペクトルに対して 5 点毎に平均をとったスムージングスペクトル、そして(c)スムージングスペクトルを一階微分したスペクトルをそれぞれ示す。(a)と(b)はエッジジャンプで規格化した。(a)や(b)に表示した二つのスペクトルのプロファイルは S/N の範囲内で一致しているように見える。さらに、(b)を一階微分したスペクトルである(c)についても 1 回目と 3 回目のプロファイルがほとんど一致していることから、(a)におけるスペクトルの立ち上がりやピークトップの位置は概ね同じであると言える。既往の報告で、-SH 基は水から生成されたラジカルと反応し、S-H 結合が解離した後にその二つの分子で S-S 結合を形成して安定な物質を形成すると述べられているため[12-14]、本研究ではシステインが解離してシスチンが形成される可能性がある。しかしながら、図 4-2 (a)~(c)についての 1 回目と 3 回目のスペクトルのプロファイルは S/N の範囲内で等しいため、S-K 吸収端 NEXAFS 測定時に、水から生成された活性種が要因で起こるシスチンの生成などの放射線損傷の影響は考慮する必要がなく、45~60 分程度であれば同じ試料位置に対して X 線を照射し、繰り返し測定で得たスペクトルをそのまま足し合わせて良いと判断した。続いて、繰り返し測定を行った場合にスペクトルの変化が生じにくかった理由を以下に考察する。

X 線が溶媒の水に照射された際、X 線は溶媒に対して局所的に 100 eV ずつエネルギーを与える[12-14]。エネルギーを与えられた際に活性種が生成され、その活性種が高濃度に存在する直径 2 nm 程度の領域をスパークと呼ぶ。スパーク内で生じた活性種の一部はスパーク外に拡散する。また、活性種は時間経過に伴って互いに化学反応を繰り返して安定な物質になり、H<sub>2</sub>O の場合は最終的に H<sub>2</sub> や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> になる。安定物質の生成までに要する時間は、スパーク内では活性種が高濃度に存在するために 0.01 μs 程度、他方のスパーク外では活性種が低濃度に存在するために 10 μs 程度を要する。2.2.2 で述べた通り、HiSOR

では 2  $\mu$ s ごとにパルス光がビームラインに供給されるため、スパー内では次のパルス光が水に照射される前に活性種が消失すると考えられる。スパー外については活性種が消失する前に次のパルス光が照射されるが、活性種は溶媒中に低濃度に存在していることで、新たな活性種の生成やシステインの解離、シスチンの生成が生じた場合でもその量が少なかったために S-K 吸収端 NEXAFS スペクトルに変化が生じなかったのではないかと考える。以上より、パルス光が照射される時間の間隔が 1 ns 未満の AichiSR BL6N1 で測定を行う場合は H<sub>2</sub>O 由来の活性種が消失する前に次のパルス光が照射されるため、放射線損傷の影響を考慮する必要があると推測される。

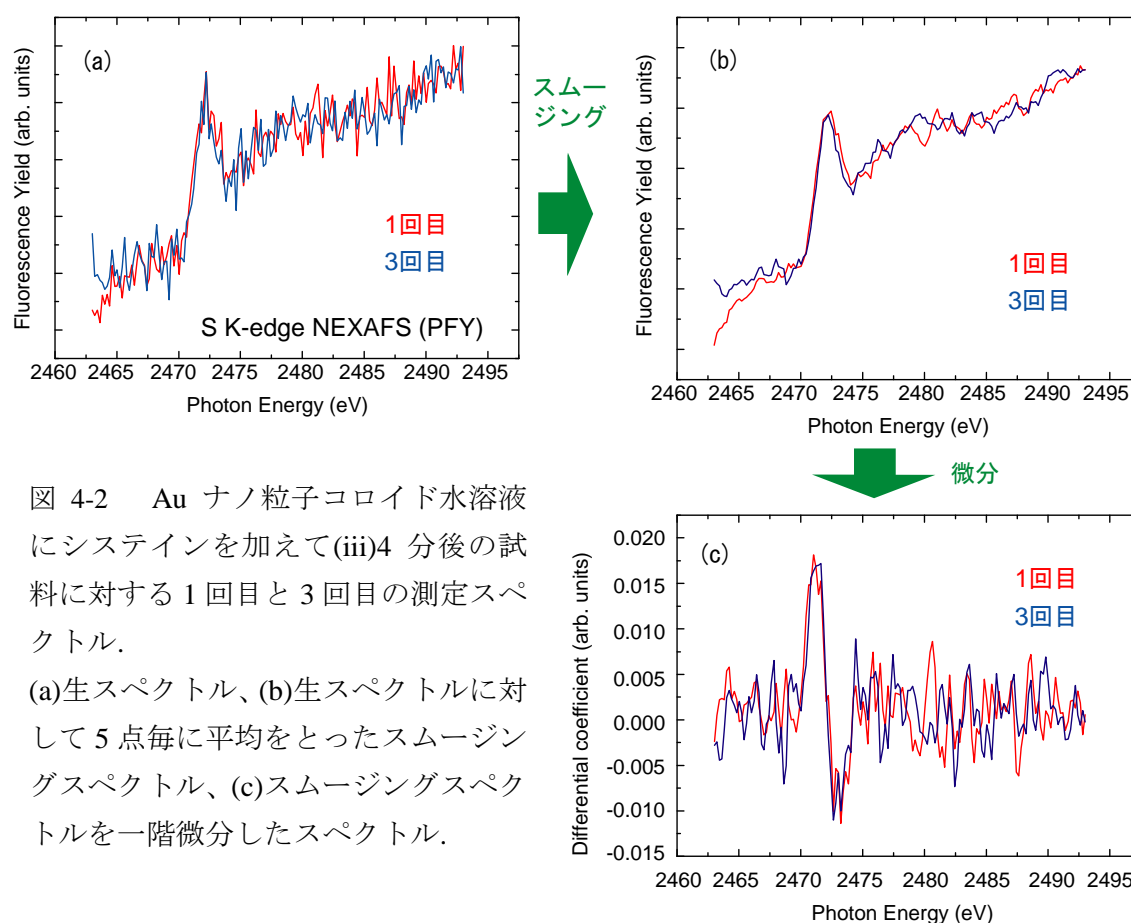


図 4-2 Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて(iii)4 分後の試料に対する 1 回目と 3 回目の測定スペクトル。  
(a)生スペクトル、(b)生スペクトルに対して 5 点毎に平均をとったスムージングスペクトル、(c)スムージングスペクトルを一階微分したスペクトル。

(iii)4 分後、(iv)3 時間後、(v)24 時間後

図 4-3 に Au ナノ粒子にコロイド水溶液にシステインを加えて(iii)4 分後、(iv)3 時間後、(v)24 時間後、そして標準試料として L-システイン水溶液の各 S-K 吸収端 NEXAFS 測定スペクトルを示す。これらスペクトルは全てエッジジャンプで規格化している。システイン水溶液のスペクトルには 2472.5 eV に鋭いシングルピークがみられ、また、このピークの高エネルギー側の 2473 eV 付近には肩構造のような広がり確認された。このピーク及び肩構造はそれぞれシステインの反結合性軌道の  $\sigma^*(\text{S-C})$  と  $\sigma^*(\text{S-H})$  に由来



する。(iii)4分後、(iv)3時間後、(v)24時間後の全てのスペクトルで同じ2472.5 eVにピークが確認されたことから、Au ナノ粒子と未吸着反応のシステインが各溶液中に含まれていることが分かる。もしもシステインがAu ナノ粒子と反応した場合、システインの吸着・解離や、他の分子の合成により2472.5 eVのピークの半値幅が変化すると考えられる。ピークの半値幅の変化に注目し、2469~2476 eVの領域を拡大して図4-3に併せて示す。(iii)4分後ではシステイン水溶液の半値幅と比較して低エネルギー側にわずかな広がりが見られた。既往の研究でPd ナノ粒子とL-システインを水環境下で吸着させた際、2472.5 eVよりも低エネルギー側にピークが観察された[11]。上述したように2472.5 eVのピークは $\sigma^*(\text{S-C})$ と $\sigma^*(\text{S-H})$ のピークの足し合わせで構成されているため、低エネルギー側にピークが見られた理由としては、システインがPd ナノ粒子表面に吸着し、Pd ナノ粒子からシステインの $\sigma^*(\text{S-H})$ に電子が逆供与されてS-H結合が解離し、 $\sigma^*(\text{S-H})$ 由来のピークが無くなったことが考えられる。よってシステインはAu ナノ粒子表面に吸着した後においても、S-H結合が解離してシステインチオレートとしてナノ粒子表面に吸着していると言える。さらにD. A. OutkaとJ. Stöhrは同じ結合でも結合長が長くなると低エネルギー側にピークがシフトすると報告しているため[15]、Au ナノ粒子表面に吸着したシステインチオレートのS-C結合がシステインと比較して伸びたことによって、さらに低エネルギー側にピークがシフトしたことが考えられる。続いて(iv)3時間後にはシステイン水溶液の半値幅よりも高エネルギー側に広がりが見られた。システインのS-H結合が解離して生じた2つのシステインチオレートがジスルフィド(S-S)結合を形成することでシスチンが合成されるが、シスチン粉末に対するS-K吸収端NEXAFSスペクトルは図4-3に示すように2472.1 eVに $\sigma^*(\text{S-S})$ に由来するピーク、2473.4 eVに $\sigma^*(\text{S-C})$ に由来する肩構造が見られ、この $\sigma^*(\text{S-C})$ の位置は2472.5 eVよりも高エネルギー側に存在する。さらにロジウム(Rh)やパラジウム(Pd)ナノ粒子ではあるが、それらナノ粒子表面に吸着したシステインからシスチンが合成されることが報告されている[11,16]。よって、(iv)3時間で見られた高エネルギー側の半値幅の広がりには、Au ナノ粒子表面に存在するシステインチオレートがS-S結合を形成して生成されたシスチンに由来すると考えられる。また、(iv)3時間後には2470 eV付近に(iii)4分後では確認されなかった膨らみが見られた。M.A. McDonaldらはgold-thiolate nanoparticlesとして、チオレートが吸着したAu ナノ粒子を作製したとき、S-K吸収端NEXAFSスペクトルでは2470 eV付近にS-Au結合が生じると報告している[17]。さらに、H. KondohらはAgではあるが、Ag(100)表面に-SH基で吸着したドデカンチオールが解離して原子状硫黄(atomic S)になったとき、2470 eVに肩構造が確認されたと報告した[4]。よって、図4-3の(iv)3時間後で見られた2470 eV付近の膨らみは、Au ナノ粒子表面に存在するシステインチオレートのS-C結合が解離して原子状硫黄が生成されたことを示すと考えられる。(v)24時間後の2472.5 eVの半値幅について、図4-3の2472.5 eV付近の拡大部分を見ると、(iv)3時間後と比較して低エネルギー側及び高エネルギー

側がともに更に広がっていることが分かる。これはシステインが吸着した後のシステインチオレートやシスチンの生成量が増加したために生じたと考えられる。また、2470 eV 付近の肩構造が(iv)3 時間後と比較してはっきりとしているため、時間経過に伴いシステインチオレートから原子状硫黄への解離が進行したと言える。(v)24 時間後の試料は透明な上澄み溶液であるが、そのスペクトルは上述したようにシステイン水溶液と比較して 2472.5 eV のピークの半値幅が広がり、2470 eV の肩構造が現れたことから、(iv)24 時間後の透明な上澄み溶液中には Au ナノ粒子が浮遊していると判断できる。これは UV-Vis 測定の結果と一致する。

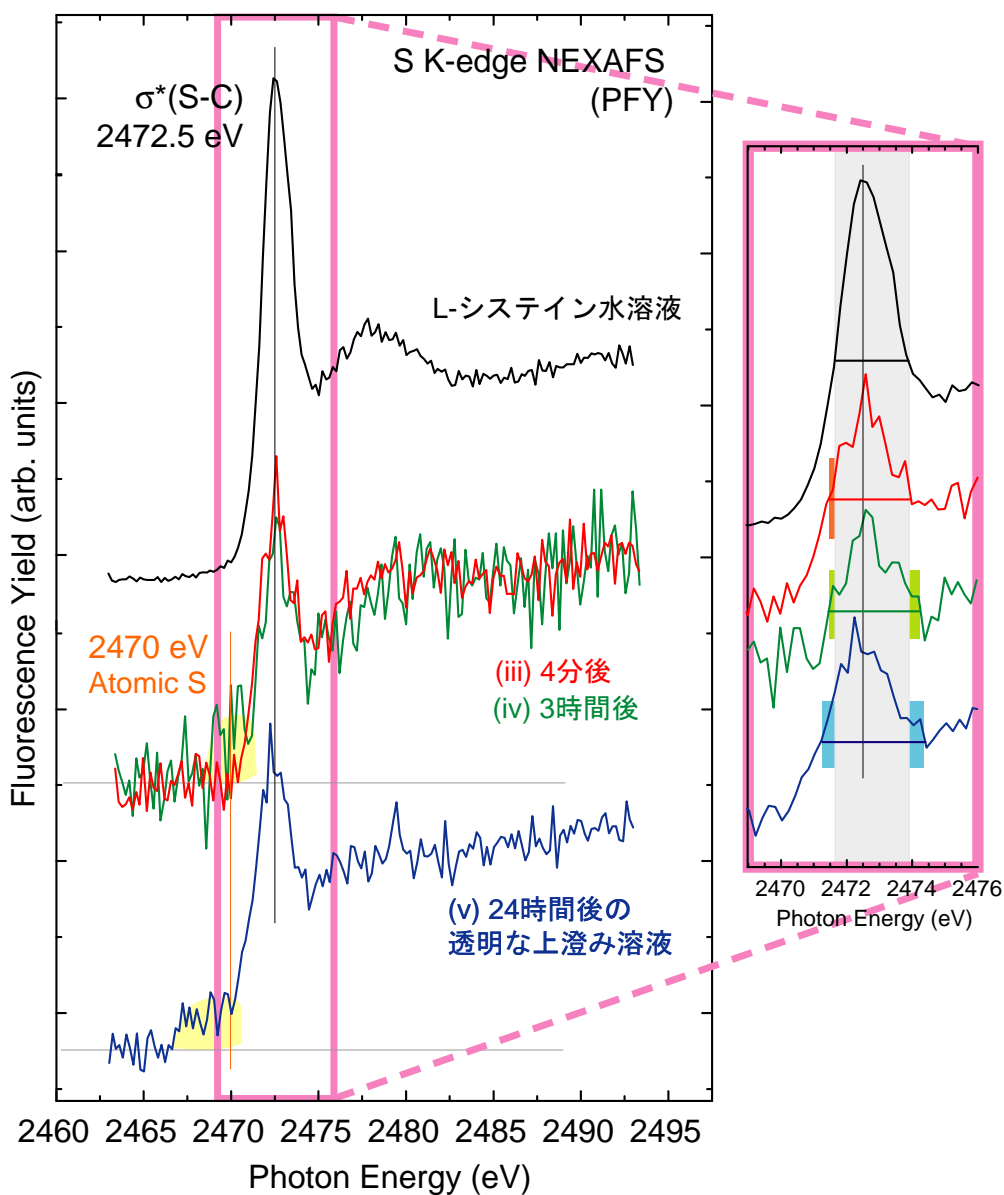


図 4-3 Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて(iii)4 分後、(iv)3 時間後、(v)24 時間後、及び標準試料の L-システイン水溶液の S-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。

(vii) 沈殿物[水環境下]、(viii) 沈殿物[乾燥後]

図 4-4 に Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて生じた沈殿物をリンスした後に水環境下で保持した試料 (vii) 沈殿物[水環境下]および 乾燥させた試料 (viii) 沈殿物[乾燥後]、さらに標準試料として L-シスチン粉末及び  $K_2SO_4$  も示す。(vii) 沈殿物[水環境下]のスペクトルについて、(iii)4 分後～(v)24 時間後のスペクトルでは確認されなかった 2481.7 eV のピークが現れた。このピーク位置は  $K_2SO_4$  のスペクトルに見られる位置と一致していることから、 $SO_4$  に由来するものであると考えられる。(vii) 沈殿物[水環境下]で見られた 2481.7 eV のピークは、沈殿物試料を水環境下で長時間保持していたことから、図 4-5 のように Au ナノ粒子表面に存在する原子状硫黄に  $H_2O$  が配位結合して生成されたと考えられる。この仮定を明らかにするために、沈殿物試料を自然乾燥により  $H_2O$  を脱離させて(viii) 沈殿物[乾燥後]を準備し、測定を行った。(viii) 沈殿物[乾燥後]のスペクトルでは  $SO_4$  に由来するピークが大きく減少し、一方で 2480 eV 付近の黄緑色で囲んだ  $SO_x$  ( $x=2$  or  $3$ ) に由来するピークと 2470 eV 付近の黄色で囲んだ原子状硫黄に由来する肩構造が現れた。この結果から、(vii) 沈殿物[水環境下]では Au ナノ粒子表面上の原子状硫黄に  $H_2O$  が配位して  $SO_4$  が形成されているが、この沈殿物を乾燥させると  $H_2O$  が脱離して、原子状硫黄や  $SO_x$  ( $x=2$  or  $3$ ) が生成されたとと言える。

(vii) 沈殿物[水環境下]や(viii) 沈殿物[乾燥後]では上記のピークや肩構造以外に 2473.0 eV 付近にピークが存在しており、また、(viii) 沈殿物[乾燥後]では 2471.6 eV に肩構造が見られた。標準試料として測定した L-シスチン粉末は 2472.1 eV のピークと 2473.4 eV の肩構造が確認されたが、これらの所属はシスチンの  $\sigma^*(S-S)$  と  $\sigma^*(S-C)$  にそれぞれ由来しており、スプリット幅は 1.3 eV である。一方で(viii) 沈殿物[乾燥後]のピーク (2473.0 eV) と肩構造 (2471.6 eV) のスプリット幅は 1.4 eV であり、シスチンのものとほぼ同様である。(viii) 沈殿物[乾燥後]のピークと肩構造の強度がシスチンと逆転している理由としては、図 4-6 のようにシスチンが S-S 結合部分で Au ナノ粒子表面に吸着し、Au からシスチンの  $\sigma^*(S-S)$  に電子が逆供与されることで S 1s から  $\sigma^*(S-S)$  に励起される電子数が減少したためであると考えられる。また、シスチン粉末と(viii) 沈殿物[乾燥後]のスペクトルに見られるピークと肩構造の位置について、(viii)の方がシスチンと比較して 0.4~0.5 eV だけ低エネルギー側にシフトした理由として、シスチンの  $\sigma^*(S-S)$  に Au から電子が逆供与されたことでシスチンの S-S 結合および S-C 結合が弱くなり結合長が伸びたためであると推測する。

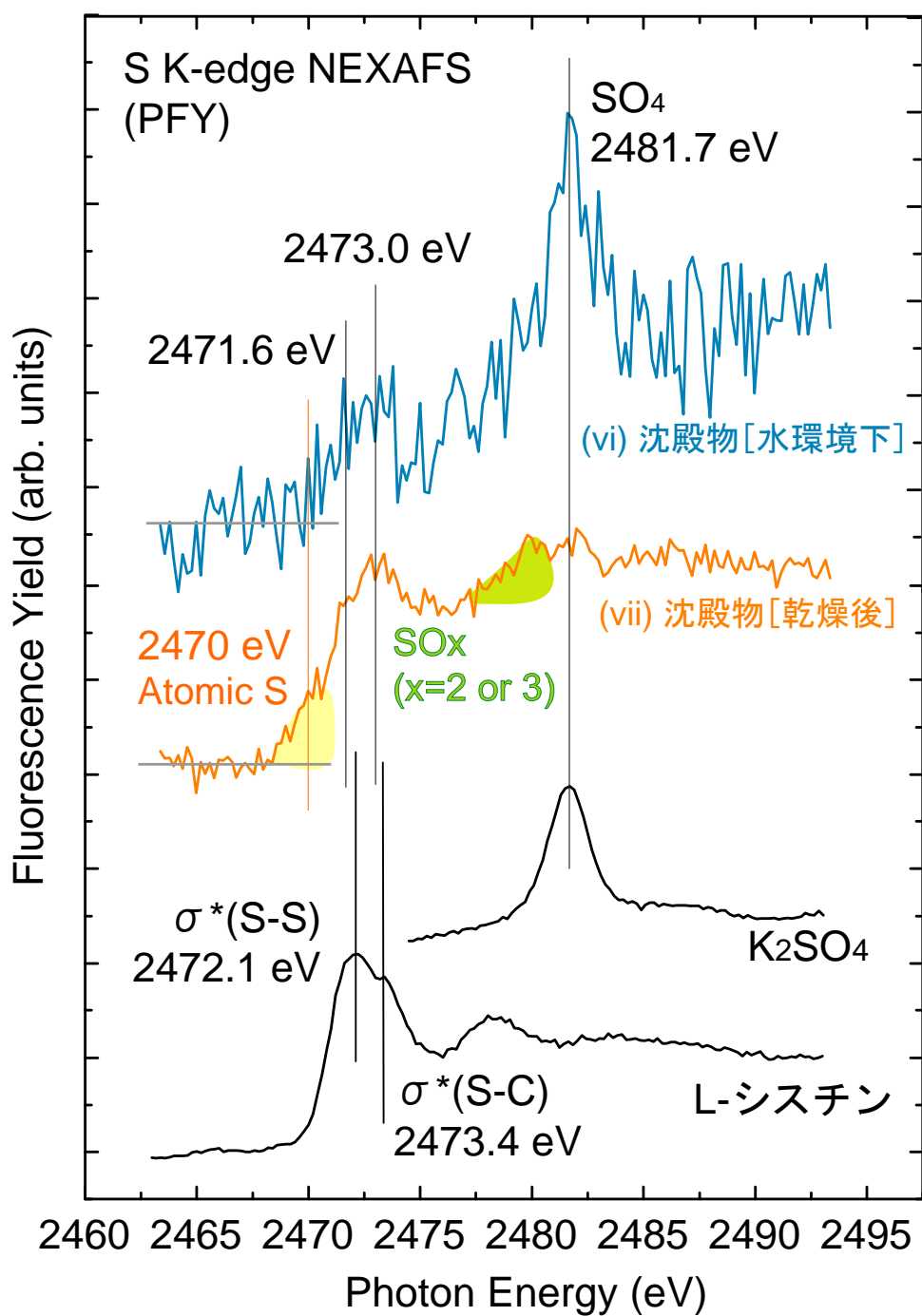


図 4-4 Au ナノ粒子コロイド水溶液にシステインを加えて生じた沈殿物をリンスした後、水環境下で保持した試料 (vii) 沈殿物[水環境下]および乾燥をさせた試料 (viii) 沈殿物[乾燥後]. さらに、標準試料としてL-シスチン粉末及び  $\text{K}_2\text{SO}_4$  のスペクトルも示す.

上面図

側面図

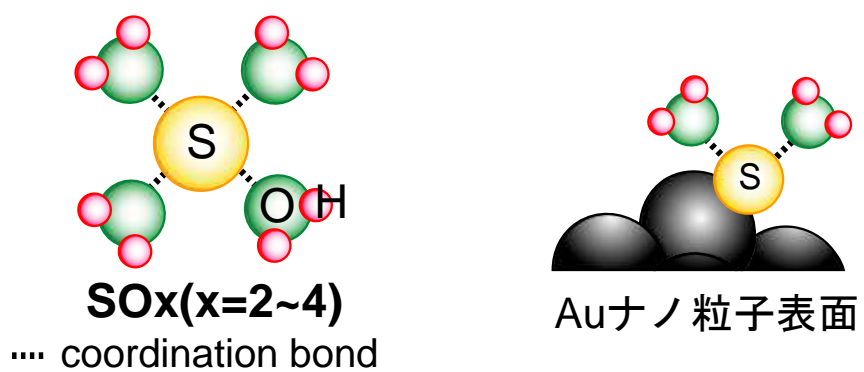


図 4-5 Au ナノ粒子表面の原子状硫黄に H<sub>2</sub>O が配位した状態の上面図と側面図.

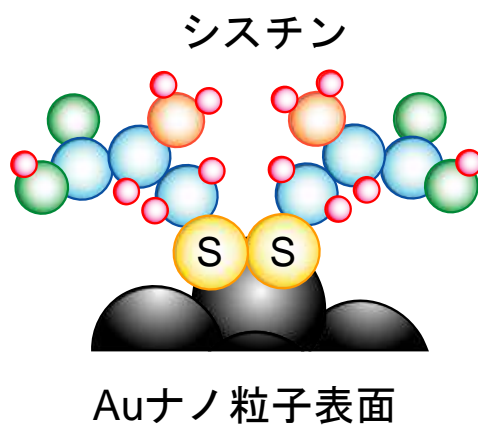


図 4-6 Au ナノ粒子表面に吸着したシスチン.

### 4.3.2 粒子径変化

図 4-7 に(i)初期、(iii) 4 分後、(iv) 3 時間後、(vi)紺色溶液 の試料に対する AFM 像及びその粒子径分布のグラフを示す。それぞれの AFM 像で差はあるが、Au ナノ粒子を示す白色の輝点が一方方向に流れている様子が確認された。この現象はアーティファクトと呼ばれ、探針の先端が測定による摩耗や汚れの付着により劣化したために生じたものである。ただし、AFM 像にアーティファクトは存在しているが、粒子径は Si ウェハ表面からの高さを測定して見積もっているため、精度に問題はない。

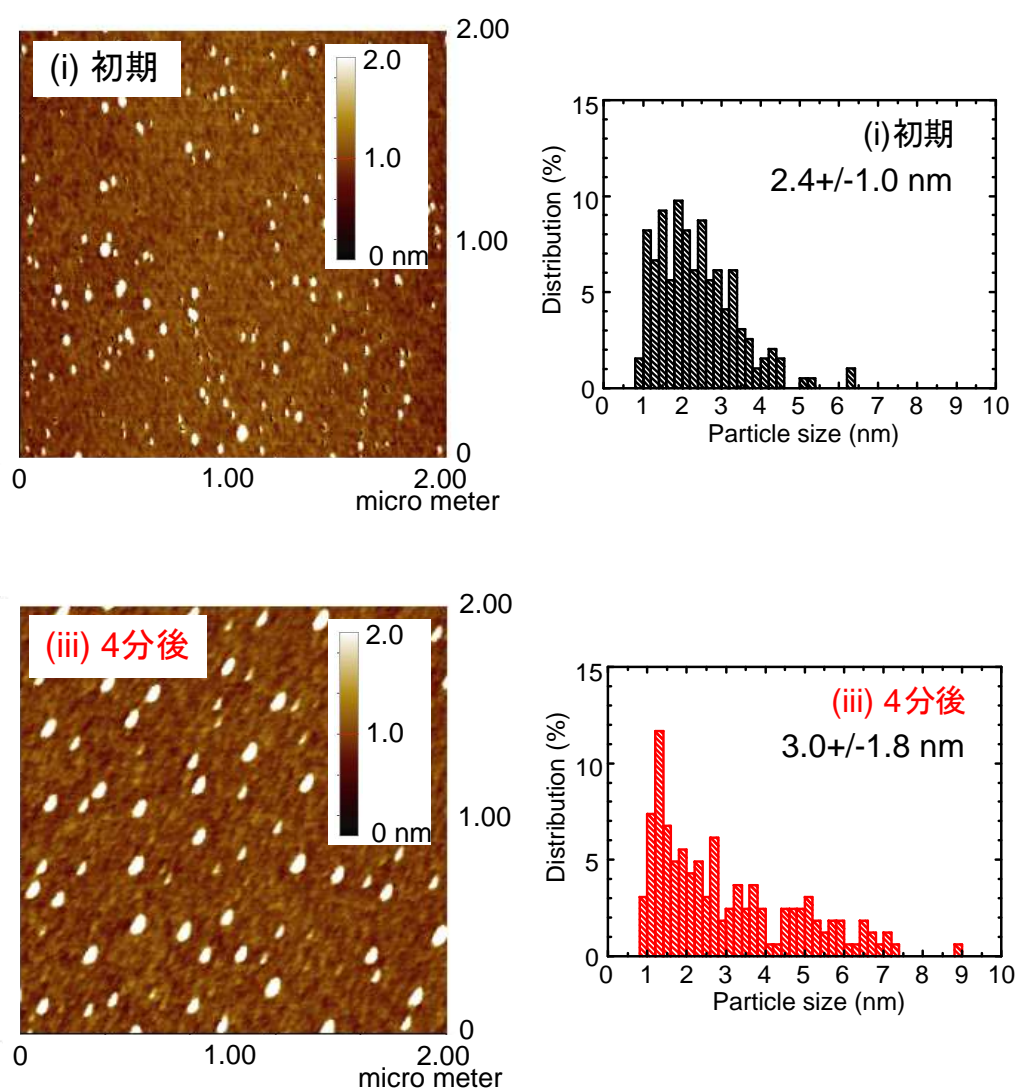
(i)の結果から、初期の平均粒子径及び標準偏差は  $2.4 \pm 1.0 \text{ nm}$  と見積もられた。粒子径分布のグラフより、この分布は大きい粒子径の方に裾を引いている非対称のガウシアンカーブの形状をとることがわかる。よって、(i)初期の溶液中には一次粒子と二次粒子(一次粒子が複数個集まって構成される粒子)が含まれていると考えられる。しかし、AFM 像は高さ方向を見積もっているため、二次粒子のように複数個のナノ粒子が凝集している場合、その一次粒子を一つ一つ区別することはできない。吸着反応を開始して(iii)4 分後の結果では Au ナノ粒子の平均粒子径及び標準偏差は  $3.0 \pm 1.8 \text{ nm}$  であり、これは(i)初期と比較して大きくなっていった。4.3.1 で記述した NEXAFS 測定の結果から、(iii)4 分後ではシステインが Au ナノ粒子表面に-SH 基で吸着し、その後生成されたシステインチオレートが確認されたため、この粒子の凝集は、図 4-8 のように Au ナノ粒子表面に吸着したシステインチオレートの-COOH 基や-NH<sub>2</sub> 基で互いに水素結合して生じたと考えられる。この結果は、水環境下で Pd ナノ粒子とシステインの吸着反応を促した際にナノ粒子径が大きくなったことについて、ナノ粒子が粒子表面のシステインチオレート吸着種の-COOH 基や-NH<sub>2</sub> 基で水素結合して凝集したために生じたという結果と同じである[10,11]。続いて、さらに反応時間が経過した (iv) 3 時間後 では、平均粒子径及び標準偏差が  $1.9 \pm 0.6 \text{ nm}$  と見積もられた。これら粒子径と偏差の値が(i)初期 よりも小さい理由として、以下の 2 つの要因が考えられる。

1. 上述したように (i)初期は一次粒子と二次粒子で構成されているが、二次粒子のような大きな Au ナノ粒子は質量が大きく、システインがナノ粒子表面に吸着した後に沈澱するサイズまで凝集することが容易なため
2. 一次粒子のような小さな Au ナノ粒子は、システインの吸着後に 3 時間が経過した時点では沈澱するサイズまで凝集していないものが多く存在し、まだ溶液の上澄み液に浮遊しているままであるため

最後に(vi)紺色溶液について述べる。沈殿物のリンスの際に Au ナノ粒子を水溶液中に拡散させることで生じた(vi)紺色溶液の平均粒子径および標準偏差は  $3.0 \pm 1.5 \text{ nm}$  であり、粒子径分布の概形が(iii)4 分後と似ている。よって(vi)紺色溶液の中には(i)初期の Au ナノ粒子に加えて、(iii)4 分後で示した凝集したナノ粒子も含まれていることを示すと考



えられる。凝集は Au ナノ粒子表面のシステイン吸着種により生じたと上述したが、沈殿物を再び水溶液中に拡散させた場合でも凝集したナノ粒子が観察されたことから、この凝集に寄与している水素結合は、リンス程度の作業に対してはおおよそ安定な結合であると考えられる。(vi)紺色溶液のナノ粒子の沈殿を待って準備した(vii) 沈殿物[水環境下]に対する 4.3.1 NEXAFS 測定の結果から、Au ナノ粒子表面にはシステインチオレート他に 2 つのシステインチオレートがジスルフィド (S-S) 結合を形成することで生じるシスチンが合成されていると考えられたため、(vi)紺色溶液での Au ナノ粒子の凝集は、システインチオレート他にシスチンといったシステイン吸着種での水素結合も寄与して起こったと考えられる。(i)初期から(vi)紺色溶液までの反応過程について図 4-9 に示す。



(図 4-7 のキャプションは次のページに記述している)

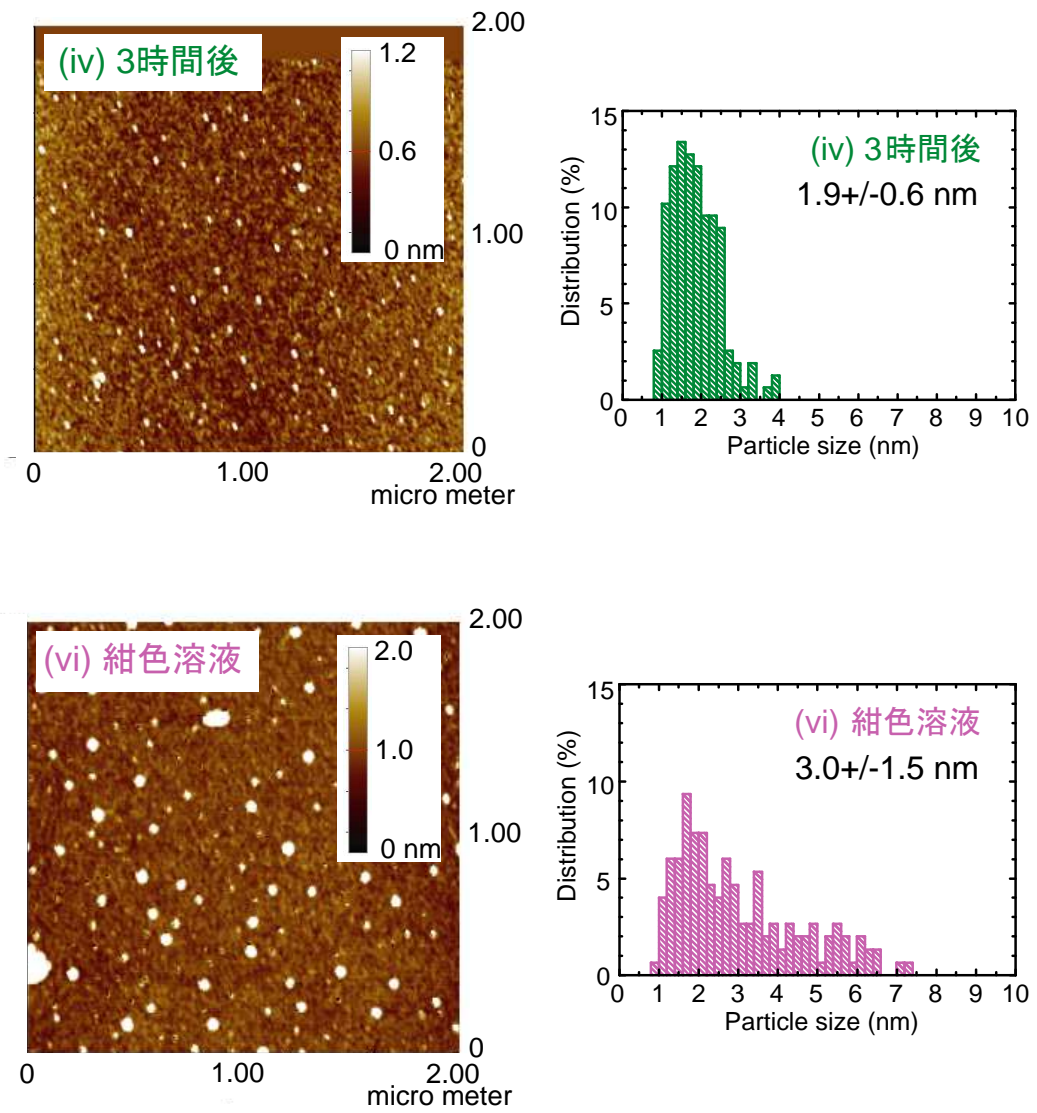


図 4-7 (i)初期, (iii)4 分後, (iv)3 時間後, (vi)紺色溶液 に対する AFM 像及びその粒子径分布.

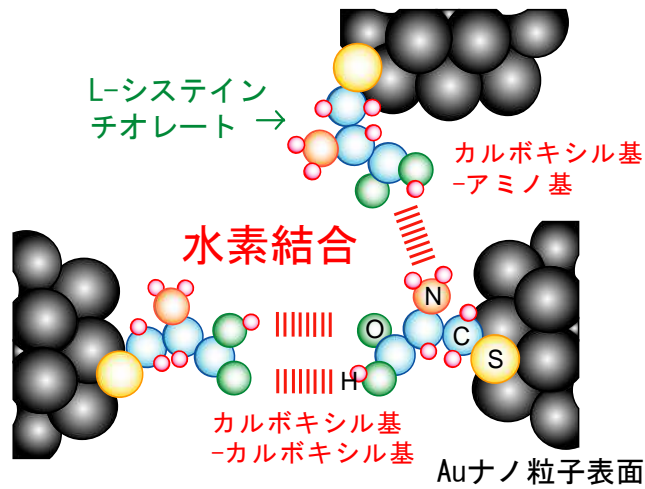


図 4-8 Au ナノ粒子表面のシステインチオレートのカルボキシル基やアミノ基で水素結合をして凝集している様子.

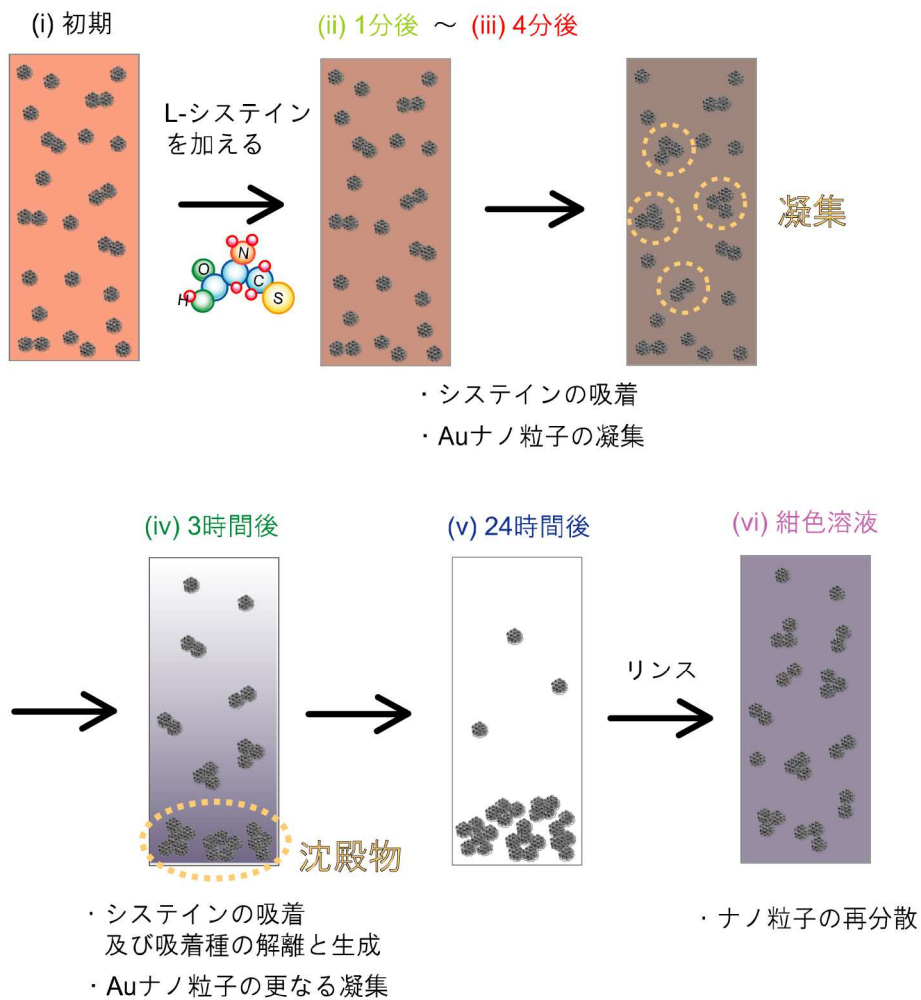


図 4-9 (i)初期 から (vi)紺色溶液 までの反応過程.

### 4.3.3 光吸収波長の変化

図 4-10 に (i)初期、(ii)1 分後、(iii)4 分後、(iv)3 時間後、(v)24 時間後 に対する UV-Vis スペクトルを示す。また、(v)24 時間のスペクトルについては吸光度に対して拡大した図も併せて示す。この後に記述するピーク位置は各スペクトルを一階微分したときの微分係数が 0 になったときの横軸の値である。(i)のピーク位置は 517 nm であった。これは Au ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) の吸収に由来するピークである。4.2 の試料作製で述べたように、システインを Au ナノ粒子コロイド水溶液中に加えるとすぐに溶液の色が 赤→紺 に変化した。この変化に対応する試料が(ii)1 分後と(iii)4 分後であるが、これら試料の UV-Vis スペクトルは(i)初期と比較して長波長側の吸収も生じており、かつ、時間経過に伴って吸収の中心位置が長波長側にシフトしていることが分かった。この長波長側へのシフトが生じた理由として、次の 2 つが要因と考えられる。まず一つ目は、4.3.1 NEXAFS 測定の結果より(iii)4 分後においてシステインは Au ナノ粒子表面に-SH 基で化学吸着したことが明らかになったことから、Au ナノ粒子表面に存在するいくらかの電子が図 4-11 のようにシステインの-SH 基の $\sigma^*(\text{S-H})$ や $\sigma^*(\text{S-C})$ への逆供与に用いられたことで、LSPR に寄与する Au ナノ粒子表面の自由電子の総数が減少し、ナノ粒子表面の誘電率が(i)初期の Au ナノ粒子のものと比較して変化したことである。電子の逆供与は、初めに $\sigma^*(\text{S-H})$ に対して生じ、続いて S-H 結合が解離してシステインチオレートになった後に $\sigma^*(\text{S-C})$ に対して生じると考えられる。二つ目は、システインが Au ナノ粒子表面に吸着したことでナノ粒子が凝集して粒子径が大きくなったことである。Au ナノ粒子は粒子径が大きくなるにしたがって長波長側に吸収ピークがシフトすると知られており [18,19,20]、本研究の 4.3.2 AFM 測定の結果にて(iii)4 分後のナノ粒子径が(i)初期に比べて大きくなっていたことと、本項の UV-Vis スペクトルの結果は合致する。また、システインを Au ナノ粒子コロイド水溶液に加えた後の(ii)1 分後や(iii)4 分後の UV-Vis スペクトルの吸収強度が(i)初期よりも大きくなっている理由として、Au ナノ粒子がシステイン吸着種を介して互いに凝集したとき、ナノ粒子同士の距離が近接することで個々のナノ粒子表面に生じている表面プラズモン由来の電場が重なり合って増強され、LSPR に応答する光が増加したためであると考えられる。さらに、金属ナノ粒子表面に対して分子の吸着や結合が生じた場合、ナノ粒子の周囲に誘電体の層が形成されたと考えることができ、このとき、誘電体の層の膜厚が 0 nm から 20 nm と変化するにつれて吸収強度が増加したという報告 [18] から、本研究ではシステインが Au ナノ粒子表面に吸着することで吸収強度が増加したと言える。

続いて、(iv)3 時間後の UV-Vis スペクトルは、(iii)4 分後と比較して全体に吸収強度が大きく減少し、かつ吸収の中心位置がさらに長波長側にシフトした。(iv)3 時間後の試料について、4.2 の試料作製で述べたように、いくらかの Au ナノ粒子は凝集して容器の底に沈澱していたことから、UV-Vis 測定を行った紺色の上澄み溶液に存在する Au ナノ

粒子の個数が(iii)4分後と比較して少ないため、吸収強度が減少したと考えられる。吸収の中心位置が長波長側にシフトした理由は、Au ナノ粒子が(iii)4分後のときと比べて沈澱する大きさまで凝集したことに加えて、4.3.1 NEXAFS 測定の結果より(iv)3時間後で原子状硫黄も確認されたことから、Au ナノ粒子表面に吸着したシステインチオレートの S-C 結合が解離するためにナノ粒子表面の電子が用いられたことが考えられる。4.3.2 に示した(iv)3時間後の AFM 測定の結果では凝集した Au ナノ粒子が確認されておらず UV-Vis 測定の考察と矛盾するが、これは図 4-12 のように AFM 測定を行うために分取した溶液と UV-Vis 測定を行った溶液のセル内での位置が異なるためと推察する。Au ナノ粒子コロイド水溶液はシステインを混合した後に静置しており、凝集したナノ粒子は重力に従って沈澱し、凝集していないナノ粒子は溶液の液面側に浮遊するため、溶液の位置によってナノ粒子の大きさに違いが生じる。図 4-10 の上側の図に示した(v)24時間後のスペクトルは、透明な上澄み溶液に対する測定結果である。ほとんど吸収は生じていないように見えるが、拡大すると、図 4-10 の下側の図で示すように微少ながら Au ナノ粒子に由来する吸収が確認された。UV-Vis で本試料を測定する前に蒸留水によるバックグラウンド測定を行い、その後に同じ蒸留水に対して吸光度を測定したところ、 $\pm 0.0003$  程度の測定値のばらつきがあったが、(v)24時間後のピークはこのばらつきよりも大きな吸収の変化であるため、有意だと判断できる。よって、(v)24時間後の透明な上澄み溶液にも Au ナノ粒子が含まれていることが分かった。この結果は 4.3.1 NEXAFS 測定の結果と一致する。

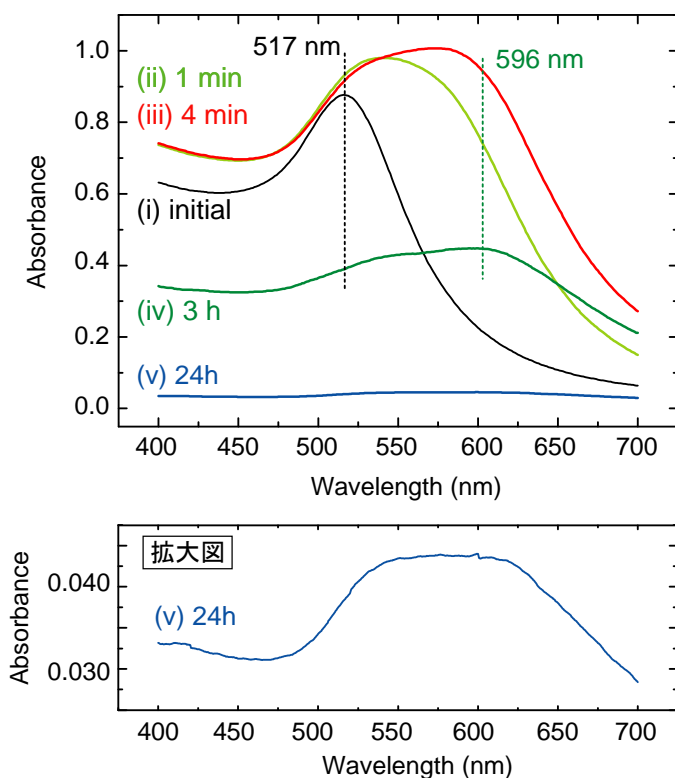


図 4-10 (i)初期、(ii)1分後、(iii)4分後、(iv)3時間後、(v)24時間後に対する UV-Vis スペクトル。(v)24時間後を吸光度に対して拡大した図も示す。



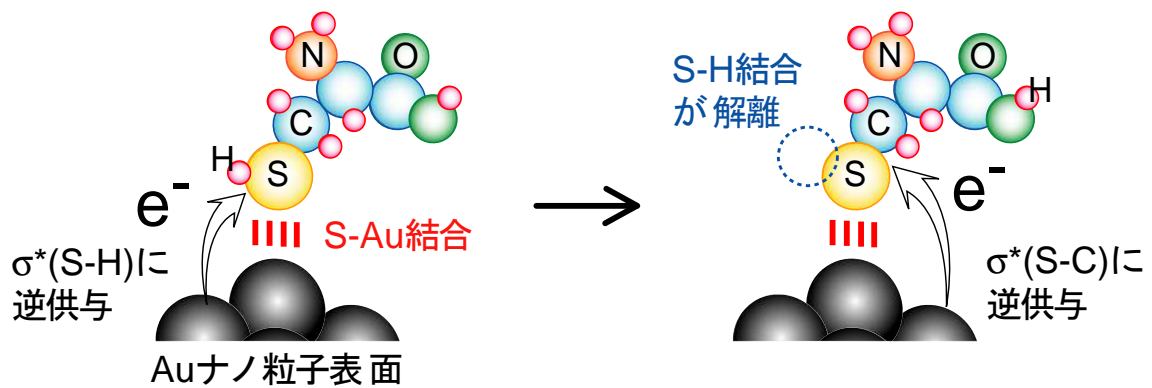


図 4-11 システインが吸着して生じる Au ナノ粒子からの電子の逆供与.

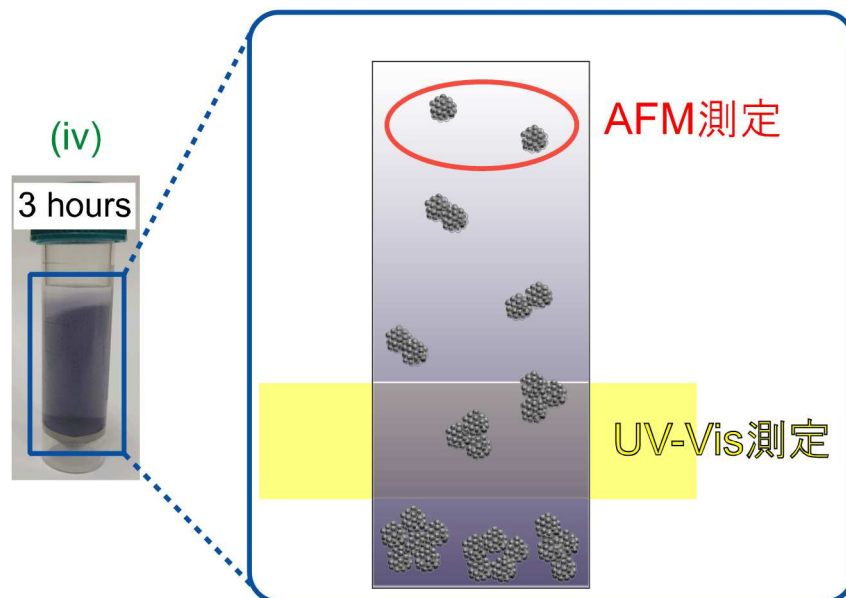


図 4-12 (iv) 3 時間後に対する AFM 測定及び UV-Vis 測定の実施場所.



## 4.4 まとめ

液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子コロイド水溶液中に L-システイン粉末を加えて分子吸着反応を促し、時間経過に伴う水環境下での Au ナノ粒子の粒子径変化を AFM 測定、光吸収波長を UV-Vis 測定、さらに Au ナノ粒子表面に対するシステインの吸着種を S-K 吸収端 NEXAFS 測定より調べることで、以下の点が明らかになった。また、水環境中での S-K 吸収端 NEXAFS 測定における放射線損傷についても併せて記述する。

- (1) 液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子の平均粒子径及び標準偏差は  $2.1 \pm 1.0$  nm である。
- (2) Au ナノ粒子コロイド水溶液はシステインを加えるとすぐに色が 赤→紺 に向かって変化し始めた。分子吸着反応を促して4分後の Au ナノ粒子の平均粒子径は  $3.0 \pm 1.8$  nm であり、初期粒子径と比較して大きくなっていることが分かる。このような溶液色の変化やナノ粒子径の肥大化は、システインが-SH 基で Au ナノ粒子表面に吸着して Au ナノ粒子表面からシステインの反結合性軌道に電子が逆供与され、システインチオレートという吸着種に解離することや、複数のナノ粒子がシステインチオレートの-COOH 基や-NH<sub>2</sub> 基で水素結合を形成して凝集することで生じたと考えられる。4分後で既に分子の吸着が生じていることから、Au ナノ粒子表面には分子の吸着サイトが多く存在していると推察される。
- (3) 分子吸着反応を促して3時間後には、システインはシステインチオレート以外に、原子状硫黄やシスチンとして Au ナノ粒子表面に吸着していることが分かった。シスチンは Au ナノ粒子表面に吸着した2つのシステインチオレートが硫黄原子部分でジスルフィド (S-S) 結合を形成し、生成されたと考えられる。また、静置していた溶液に濃淡が生じており、容器の底の濃い色の溶液部分では目視でもナノ粒子の凝集体が確認され、一方で液面近くの薄いまたは透明な色の溶液部分に存在するナノ粒子の平均粒子径は  $1.9 \pm 0.6$  nm であった。したがって、時間経過に伴い Au ナノ粒子の凝集が進行して沈殿物が生じたが、一方で凝集せず溶液中に浮遊しているナノ粒子も存在することが分かった。
- (4) 分子吸着反応を促して24時間後には、Au ナノ粒子が凝集して沈殿し、目視で透明な上澄み溶液が確認された。しかし、NEXAFS 測定や UV-Vis 測定の結果から透明な溶液中にも Au ナノ粒子が存在していることが分かり、そのナノ粒子表面には3時間後と比較して、さらにシステインチオレート、原子状硫黄、シスチンの生成が進行したことが分かった。
- (5) 生じた Au ナノ粒子の沈殿物をリンスする作業の際、沈殿物を再び milli-Q 水中に拡

散させた場合でも凝集したナノ粒子が観察されたことから、この凝集に寄与している水素結合は、リンス程度の作業に対してはおおよそ安定な結合であると考えられる。

- (6) リンス後、水環境中で長時間保持していた Au ナノ粒子沈殿物の表面には原子状硫黄に H<sub>2</sub>O が O の部分で配位して SO<sub>4</sub> が形成されることが分かった。この Au ナノ粒子沈殿物を乾燥させると、SO<sub>4</sub> が減少し、かつ H<sub>2</sub>O の脱離により生じたと考えられる原子状硫黄や SO<sub>x</sub> (x=2 or 3) が増加した。
- (7) 溶媒が水である試料に対して HiSOR BL-3 で S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合、45~60 分程度の溜め込み測定であれば、放射線損傷の影響は考慮せずにスペクトルの取得が可能であると判断した。

以上より、液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子表面は分子の吸着サイトが多く存在しているため、分子吸着反応が迅速に進行し、システイン吸着種によりナノ粒子の凝集が生じたと推測された。また、生体内に Au ナノ粒子を投与した場合に上記のような分子吸着反応が生じると、生体内の各種機能性分子に変化を与え、それが生体に予期しない悪影響を与える可能性や、Au ナノ粒子が凝集してしまい血管を通過できず、生体内の目的の箇所に輸送できずにドラッグデリバリーシステムなどの機能を果たせない状態になることも考えられる。よってこれら懸念点を解決した Au ナノ粒子を作製するために、分子吸着反応を生じにくい SiO<sub>2</sub> や生体適合性の高い分子などでナノ粒子表面を密に覆うような工夫が必要であると考えられる。

## 参考文献

- [1] 中村桂子、松原謙一／監訳「Essential 細胞生物学 原書第2版」南江堂 (2009).
- [2] S. Yagi, K. Matsumura, Y. Nakano, E. Ikenaga, S.A. Sardar, J.A. Syed, K. Soda, E. Hashimoto, K. Tanaka, M. Taniguchi, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **199** (2003) 244-248.
- [3] 野本豊和 名古屋大学 博士論文 (2009).
- [4] H. Kondoh, H. Tukabayashi, T. Yokoyama, T. Ohta, *Surface Science* **489** (2001) 20-28.
- [5] P. Zhang, T.K. Sham, *Physical Review Letters* **90** (2003) 245502-1 – 245502-4.
- [6] P. Zhang, X. Zhou, Y. Tang, T.K. Sham, *Langmuir* **21** (2005) 8502-8508.
- [7] Y. Sato, B.L. Frey, R.M. Corn, K. Uosaki, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **67** (1994) 21-25.
- [8] R.V. Duevel, R.M. Corn, *Analytical Chemistry* **64** (1992) 337-342.
- [9] 鈴木洋通／監修「図解入門 よくわかる最新からだの基本としくみ – 人体のメカニズムを図解する」秀和システム (2008).
- [10] A. Mocanu, I. Cernica, G. Tomoaia, L.-D. Bobos, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **338** (2009) 93-101.
- [11] C. Tsukada, S. Ogawa, T. Mizutani, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, S. Yagi, *Applied Surface Science* **262** (2012) 184-187.
- [12] 杉浦紳之、山西弘城／著「放射線生物学」通商産業研究社 (2013).
- [13] 山口彦之／著「放射線生物学」裳華房 (1995).
- [14] 西澤邦秀・飯田孝夫／編「放射線 安全取扱の基礎 アイソトープから X 線・放射光まで」名古屋大学出版会 (2006).
- [15] D.A. Outka, J. Stöhr, *The Journal of Chemical Physics* **88** (1988) 3539-3554.
- [16] S. Gohda, T. Ashida, S. Yagi, K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* **7** (2009) 314-318.
- [17] M.A. MacDonald, P. Zhang, H. Qian, R. Jin, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **1** (2010) 1821-1825.
- [18] 岡本隆之、梶川浩太郎／著「プラズモニクスー基礎と応用」講談社 (2010).
- [19] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, *Analytical Chemistry* **79** (2007) 4215-4221.
- [20] T.K. Sau, A. Pal, N.R. Jana, Z.L. Wang, T.Pal, *Journal of Nanoparticle Research* **3** (2001) 257-261.

## 第5章 Au ナノ粒子と PC リポソームの吸着反応

### 5.1 はじめに

細胞膜の脂質二重層は細胞内部の物質が外部に流出して細胞外液と混合することを防いでいる[1]。温熱療法やドラッグデリバリーシステムでは、生体内に取り込まれた Au ナノ粒子が細胞膜表面に吸着、または細胞内部に取り込まれる必要がある。既往の研究で、受容体に応答する分子を修飾したナノ粒子は、細胞膜表面の受容体タンパク質を介してエンドサイトーシスにより細胞内部に取り込まれると報告されている[2]。他の可能性として、ナノ粒子が受容体ではなく脂質二重層に吸着して安定に存在することも想定されるが、それは分かっていない。リポソームは一般的にリン脂質の他にクロロホルムやバッファーといった溶媒試薬を用いて作製される[3-5]。しかし、本研究では水環境下において直にリポソームを構成するフォスファチジルコリン (PC) と清浄表面を持った Au ナノ粒子との吸着反応およびそのふるまいを明らかにするために、PC と水のみでリポソームの作製を試みた。図 5-1 に PC の構造式を (a)PC を構成する 4 つの部分、(b)親水性の頭部 (親水基と記す) と疎水性の尾部 (疎水基と記す)、として示す。ただし、炭化水素鎖部分については PC 分子の種類によって炭化水素鎖の長さや不飽和結合の個数が異なってくる。また、PC リポソームの作製を水の溶媒で行う場合、PC の親水基が脂質二重層に対して外側を向くと考えられる。Au ナノ粒子が PC リポソーム表面に吸着するならば、PC の官能基を構成する N, O, P の化学状態変化に注目して分光学的手法を用いることで、吸着反応に寄与する官能基を特定できると考えた。しかし、リポソームは脂質二重層が球体の形状をしており、Au ナノ粒子と未反応の PC がリポソームの内側に多く存在すると考えられるため、リポソームと Au ナノ粒子を混合した溶液では PC と Au ナノ粒子が吸着反応をした場合の界面の情報について、Signal/Background (S/B) の良い状態で実験データの取得が困難であると考えた。さらに、詳細は 5.2.2 の PC リポソームの作製に必要な条件の決定で示すが、PC は水に溶解した際に単分子ではなくリポソームのような凝集体を構成した方が安定であるため、PC と Au ナノ粒子との吸着反応を明らかにするためには試料作製の工夫が必要である。よって、Au ナノ粒子に対する PC の分光学的手法による比較試料として、PC 懸濁液中に Au 板を入れて分子吸着反応を促した後、Au 板表面を水で洗い流すことで物理吸着した PC 凝集体を除去し、Au 板に化学吸着した PC からの情報のみを得ることを考えた。また、もしも Au ナノ粒子が PC リポソーム表面に吸着した後、フリップ-フロップという現象により脂質二重層を構成する PC がリポソームの外側と内側を移動するならば、図 5-2 のように Au ナノ粒子がリポソームの脂質二重層の間やリポソームの内側に取り込まれて存在する可能性がある。ただし、このフリップ-フロップという現象はほとんど生じ

ないと報告されているが[1]、Au ナノ粒子の吸着により変化が生じることも考えられる。この疑問の解明のために、透過型電子顕微鏡（TEM）でも、投影像を観察するネガティブ染色法と、試料を薄く切り出して断面像を観察する超薄切片法を用いることが適すると判断した。

よって、本章では Au ナノ粒子が PC リポソームに吸着する際に寄与する PC の官能基について、比較試料として準備した Au 板表面に吸着する前後の PC の N, O, P の化学状態変化を N, O, P-K 吸収端近傍 X 線吸収微細構造（N, O, P K-edge NEXAFS）測定から調べ、さらに、PC リポソームと Au ナノ粒子を吸着反応させた際のふるまいとして、Au ナノ粒子のリポソームに対する存在位置を透過型電子顕微鏡（TEM）観察から調べる。これら NEXAFS 測定と TEM 観察の結果を併せて、リポソームに対する Au ナノ粒子の吸着機構を解明することを目的とする。

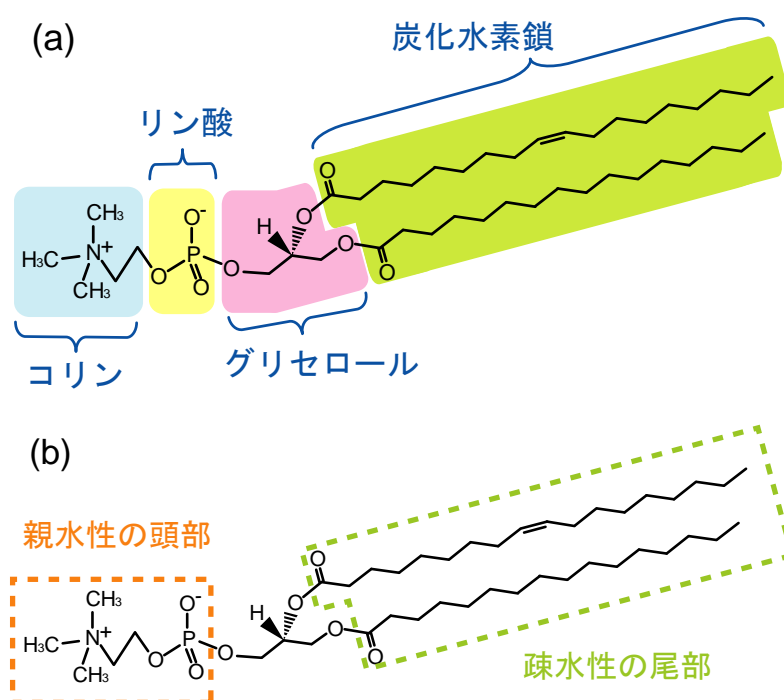
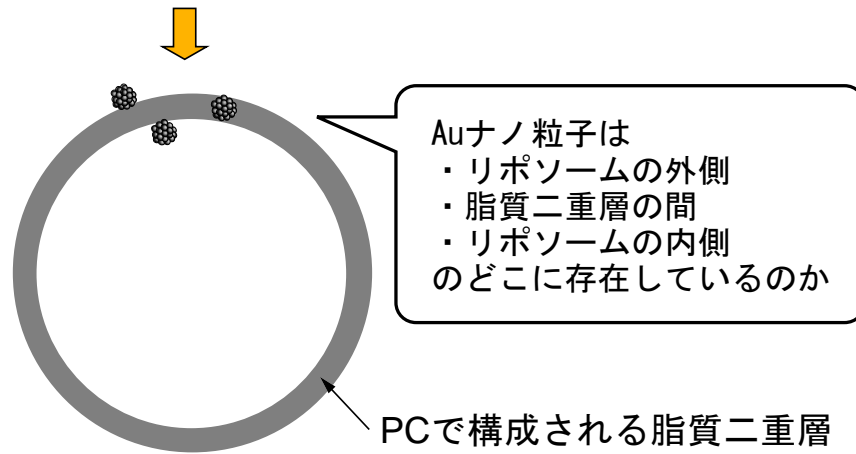


図 5-1 フォスファチジルコリン（PC）の一般的な構造式。

(a)PC を構成する 4 つの部分 及び (b)親水性の頭部（親水基と記す）と疎水性の尾部（疎水基と記す）について示す。コリンがリン酸を介してグリセロールに結合している親水基と、グリセロールについた 2 本の炭化水素鎖から成る疎水基がある。2 本の炭化水素鎖は脂肪酸から生じており、炭化水素鎖の一端にある脂肪酸の-COOH 基を介してグリセロールとエステル結合している。フォスファチジルとは、リン酸-グリセロール-脂肪酸 から構成される部分を指す。[1]

ネガティブ染色法での観察方向(投影像)



超薄切片法による観察(断面像)

図 5-2 リポソームに対する Au ナノ粒子の存在位置. ネガティブ染色法と超薄切片法での測定方向の違いも示す.



## 5.2 実験

### 5.2.1 NEXAFS 測定用の試料作製

#### N, O, P-K 吸収端 NEXAFS 測定用試料の作製

Avanti Polar Lipids 社製の Egg 由来の PC には  $-53\sim 55^{\circ}\text{C}$  の間の様々な相転移温度をもった分子が含まれているが、PC の凝集体の生成をなるべく抑えるために  $4^{\circ}\text{C}$  で PC と Au 板の吸着反応を促すことにした。 $4^{\circ}\text{C}$  は水が凍らない温度の中で最も低い温度として選択した。

Au 板 ( $0.2\times 50\times 50\text{ mm}$ 、ニラコ社製) を  $7\text{ mm}$  角に切り出して  $\text{Al}_2\text{O}_3$  研磨剤 (粒子径  $1\ \mu\text{m}$ ) を用いて表面研磨をした後、エタノール溶液中で超音波洗浄を行った。Egg 由来の PC 粉末 ( $>99\%$ , Avanti Polar Lipids 社製) を  $1\text{ mg}$  秤量して  $2\text{ mL}$  用マイクロチューブに入れ、その中に冷蔵庫で  $4^{\circ}\text{C}$  に冷却した milli-Q 水を  $2\text{ mL}$  加えた後、ボルテックスミキサーを用いて PC 粉末の塊が完全に溶解するまで攪拌して PC 懸濁液を作製した。PC 懸濁液中に Au 板を入れ、 $4^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫内に  $36$  時間放置して PC と Au 板の分子吸着反応を促した後、Au 板をピンセットで取り出し、洗瓶から milli-Q 水を Au 板表面にかけ流してリンスを行うことで、物理吸着した PC の凝集体を除去した。このとき、Au 板を挟んでいるピンセットの先端に残っている PC 懸濁液も除去するために、もう一つのピンセットで Au 板の他方をはさみ、初めのピンセットを外した後、Au 板全体に対して再度 milli-Q 水をかける作業も行った。その後、ブロワーで Au 板表面の水滴を除去した後、自然乾燥させて試料とした (PC/Au sheet と記す)。また、上記と同じように作製した PC 懸濁液を数十  $\mu\text{L}$  程度分取して Au 板表面に滴下して板の全面に広げ、自然乾燥させることで、Au 板と吸着反応をしていない PC の標準試料を作製した (PC bulk と記す)。さらに、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  研磨剤で研磨した Au sheet も準備した。また、O-K 吸収端 NEXAFS 測定用の  $\text{PO}_4$  に関する標準試料として、リン酸鉄 ( $\text{FePO}_4$ ) 粉末をインジウム (In) 板に擦りつけた基板も作製した。

#### N, O-K 吸収端 NEXAFS 測定の実施設、測定条件、試料ホルダ

立命館大学 SR センター BL-2 で実施した。900G の回折格子を用い、超高真空条件下で全電子収量 (TEY : Total Electron Yield) 測定を行った。試料の放射線損傷の影響を考慮し、試料位置を適宜変更して測定した。横軸校正について、N-K 吸収端は In 板に擦りつけた h-窒化ホウ素 (BN) 粉末の第一ピークが  $399.1\text{ eV}$ 、O-K 吸収端は同様に In 板に擦りつけた  $\alpha$ -酸化鉄(III) ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 粉末の第一ピークが  $529.4\text{ eV}$  になるように行った。試料ホルダは  $20\text{ mm}$  角の Cu 製またはステンレス製であり、カーボンテープを用いて各試料基板を貼りつけた。試料ホルダに試料基板を貼りつけた一例の写真を [図 5-3](#) に示す。このとき、カーボンテープが試料基板からはみ出さないように注意しながらも、試料基

板背面のほぼ全体に対してカーボンテープとしっかりと接するように貼りつけた。試料基板がカーボンテープから浮いている場合にチャージアップの影響と考えられるスペクトルプロファイルの歪みが生じたため、注意して作業した。

#### P-K 吸収端 NEXAFS 測定の実施設、測定条件、試料ホルダ

あいちシンクロトロン光センター BL6N1 で実施した。分光結晶は InSb(111)を用い、He-path チャンバを用いた大気圧条件下で測定を行った。検出器は SDD を用い、部分蛍光 X 線収量 (PFY : Partial Fluorescence Yield) 法でデータを取得した。測定試料に応じて、1 秒間あたり 60000 カウントを超えないように、試料と SDD の距離を調整した。また、入射光と検出器の角度は 90°に設定されており、試料に対して 70°の角度でシンクロトロン放射光を入射して測定を行った。横軸校正のために少量のリン酸鉄 ( $\text{FePO}_4$ ) 粉末をポリエチレンフィルムにこすりつけた試料を測定し、スペクトルのピークトップが 2153.0 eV になるように後からデータ処理を行った。また、[図 5-4](#) のように試料基板はカーボンテープを用いて試料ホルダに貼りつけた。

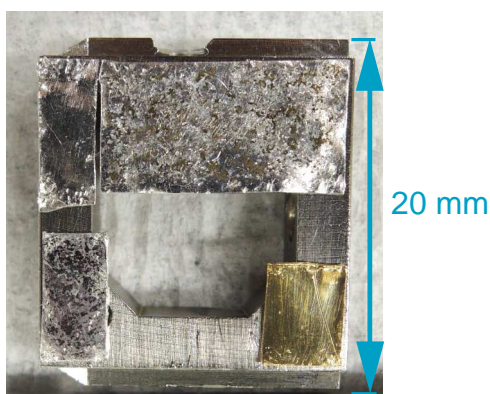


図 5-3 立命館大学 SR センター BL-2 の試料ホルダ。

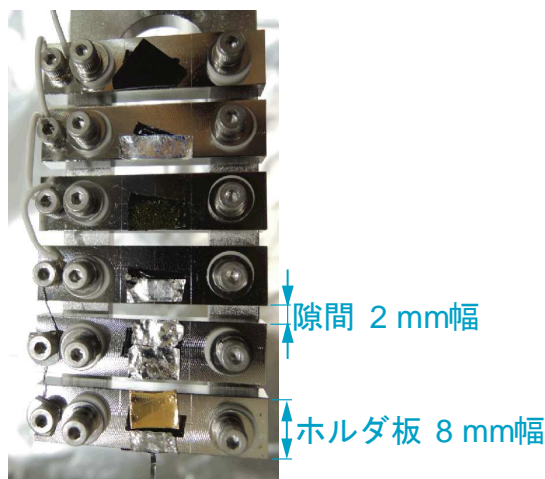


図 5-4 AichiSR BL6N1 の試料ホルダ。

## 5.2.2 TEM 観察用の試料作製

### Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製

Au ナノ粒子コロイド水溶液は液中プラズマ法で作製した。作製手法と各条件の詳細は 2.1 に記述している。

### PC リポソームの作製に必要な条件の決定

PC と水のみで PC リポソームを作製するために、次に述べるリン脂質の 2 つの性質に注目した。一つ目は、リン脂質が親水性の頭部 (hydrophilic head) と疎水性の尾部 (hydrophobic tail) から成り立っており、自然と親水性の頭部は水に引き寄せられ、疎水性の尾部は水を避けて他の疎水性分子と会合しようとする性質である。この性質を満たしてリン脂質が安定に水の中で存在するために、リン脂質は疎水性の尾部を内側に配置したシート状の脂質二重層を形成したのち、さらにその二重層が球形に閉じた状態のリポソームになる。この理由は、(1)リン脂質の頭部が水に接すること、(2)尾部が互いに隣り合って整列すること、(3)リポソームの形成により二重層の末端部分の尾部が水と接しなくなること、の 3 点によりエネルギー的に最も低く、安定な状態になるためである [1,6]。二つ目は、脂質分子の相転移温度によって二重層の状態が変化する性質である。リン脂質は頭部の種類、尾部を構成する炭素鎖の長さや不飽和結合の個数によって相転移温度が変化する。相転移温度とは脂質二重層を構成している場合に二重層の相の状態が変化する温度を示しており、高温にするにつれて、ゲル相 ( $L_{\beta}$ ) → リップル相 ( $P_{\beta}$ ) → 液晶相 ( $L_{\alpha}$ ) と変化する。ゲル相はリン脂質が規則正しく並んで結晶格子を組んでおり、二重層内の炭素鎖も自由に動けず平らな層になっている状態、リップル相はゲル相の状態に近いが二重層全体で波打つ構造をとっている状態、液晶相は結晶格子を保ちつつも炭素鎖もリン脂質自体も液体のように自由に動ける状態を示す [7-8]。  $L_{\beta}$  →  $P_{\beta}$  の転移を前転移 (Pre-transition)、  $P_{\beta}$  →  $L_{\alpha}$  の転移を主転移 (Main transition) と呼ぶ。リポソームは脂質分子を溶かした溶液を主転移温度 ( $T_m$  : m は Main transition の頭文字) 以上に加温して作製することが必要である [9]。本論文では生体の細胞膜を模した状態を想定したため、PC の炭化水素鎖の長さや不飽和結合の個数が様々である Egg 由来の PC 粉末を用いることにした。今回用いた Avanti Polar Lipods 社製の Egg 由来 PC の炭化水素鎖の種類を図 5-5 [10]、炭化水素鎖の違いによる各  $T_m$  を表 5-1 [10] にまとめる。表 5-1 から、 $T_m$  は一番高く 55 °C であるため、室温で PC 粉末を milli-Q 水に混合した後、溶液を  $T_m$  以上である 60 °C まで加温してリポソームを作製することにする。

リン脂質は水に溶かすだけで、脂質二重層が数層重なった様々な大きさのリポソームである多重層リポソーム (MLV : multilamellar vesicle) を形成できるが、細胞膜は脂質二重層が一層のみで形成されるため、リポソームを細胞膜モデルとして用いるためには一層から成るリポソームの作製が重要である。よって、本論文ではリポソームの作製に

押し出し法 (Extrusion technique) を用いることにした。押し出し法は  $T_m$  以上に加温した PC 溶液をポリカーボネート膜に繰り返し通すことで大きさのそろった一層から成るリポソームを作製できる[9]。

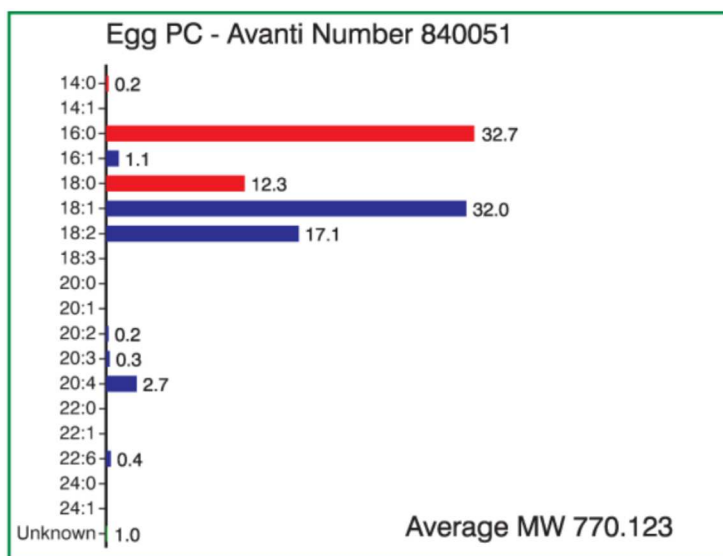


図 5-5 Avanti Polar Lipids 社製の Egg 由来の PC の種類[10].例として、14:0 は炭化水素鎖数が 14 であり、そのうちの不飽和結合数が 0 であることを意味する。

表 5-1 Egg 由来 PC に含まれる PC の種類ごとの相転移温度[10]. ただし 20:2, 20:3, 20:4, 22:6 は不明のため未記載.

種類	主転移温度 $T_m$ (°C)
14:0 (DMPC: Dimyristoylphosphatidylcholine)	23
16:0 (DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholine)	41
16:1	-36
18:0 (DSPC: Distearoylphosphatidylcholine)	55
18:1	-20 ~ 1
18:2	-53

## PC リポソームの作製

Egg 由来の PC 粉末 (>99%, Avanti Polar Lipids 社製) を 5 mg 秤量して 2 mL 用マイクロチューブに入れ、さらに milli-Q 水を 1 mL 加えた。milli-Q 水の中に加えた PC 粉末の塊がなくなり溶解するまでボルテックスミキサーを用いてチューブを攪拌して PC 懸濁液を調整した。続いて恒温水槽中の水を循環させながら 60°C まで加温した後、[図 5-6](#)のようにスポンジで作製したチューブ立てに PC 懸濁液の入ったチューブを挿して放置した。発砲スチロールは恒温水槽中の水かさが減少しないようにカバーとして用意した。試料溶液が 60°C まで上昇したかどうかの確認は、温度確認用として準備した室温の水の入ったチューブの水温を熱電対温度計により測定して行った。この温度確認用チューブは PC 懸濁液の入ったチューブと同時に恒温水槽に入れた。

Avanti Polar Lipids 社製のリポソーム作製用装置 Mini-Extruder を用いて押し出し法によりリポソームを作製した。Mini-Extruder でリポソームを作製する際のセットアップの写真とポリカーボネート膜 (Polycarbonate Membrane) をセットする部分の器具の設計図 (赤色の破線で囲んだ部分) [\[11\]](#)を[図 5-7](#)に載せる。Mini-Extruder の黒色の台をヒーターの上に置き、黒色の台が 60°C 以上になるまで加熱し放置した。熱電対温度計で黒色の台の上とヒーターの上の温度を測定した際、黒色の台はヒーターと比較して 5°C 程度低くなっていたため注意した。[図 5-7](#)の赤色の破線で囲まれた部分に書かれている Internal Membrane Support に O-ring をセットした後、O-ring の内側に milli-Q 水を 20  $\mu$ L 程度滴下し、Filter supports を乗せた。続いて 400 nm の細孔をもつポリカーボネート膜を milli-Q 水で湿らせてから Filter supports / O-ring / Membrane supports の上に乗せ、[図 5-7](#)の赤い破線で囲んだ設計図のように Extruder Outer Casing と Retainer Nut でそれらをねじ込み式に挟み込み、黒色の台の上に置いた。その両側から Internal membrane support の部分に 1 mL 用シリンジをはめ込んだ。ただし、シリンジの一つは milli-Q 水を加えたもの、もう一つは空のものを準備した。片方のシリンジ内の水をポリカーボネート膜に通しながら空のシリンジへ移して milli-Q 水を赤色の破線の器具に往復させることで、ポリカーボネート膜のセット部分を水で湿らせながら、器具から水が漏れていないか確認した。続いて 60°C に加温して準備した PC 懸濁液をシリンジで吸い取り、上記と同様にポリカーボネート膜の間を 13 回往來させ、PC リポソームを作製した。作製した PC リポソーム水溶液は 2 mL 用のチューブに入れ、室温で放置した。



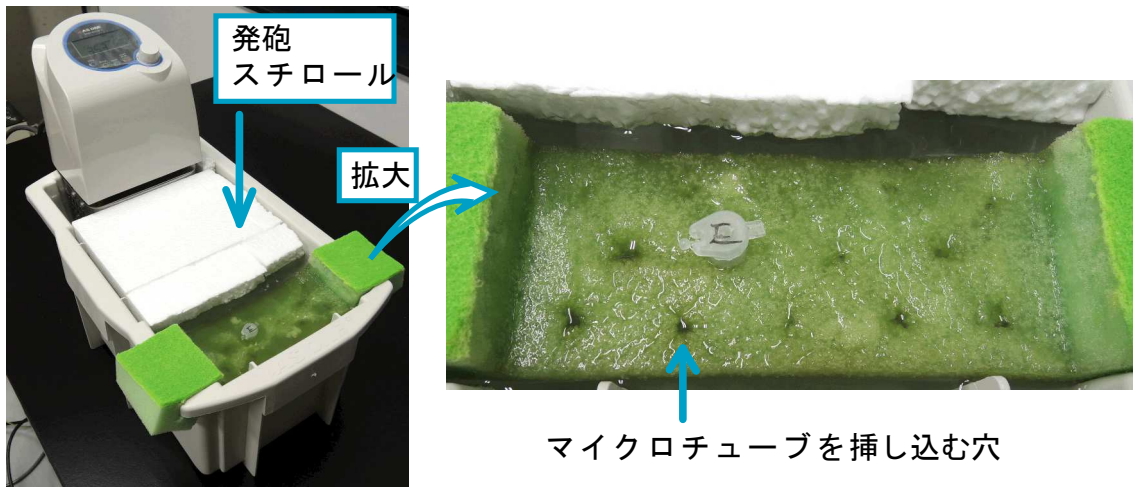


図 5-6 マイクロチューブ内の溶液を加温するための恒温水槽の写真.

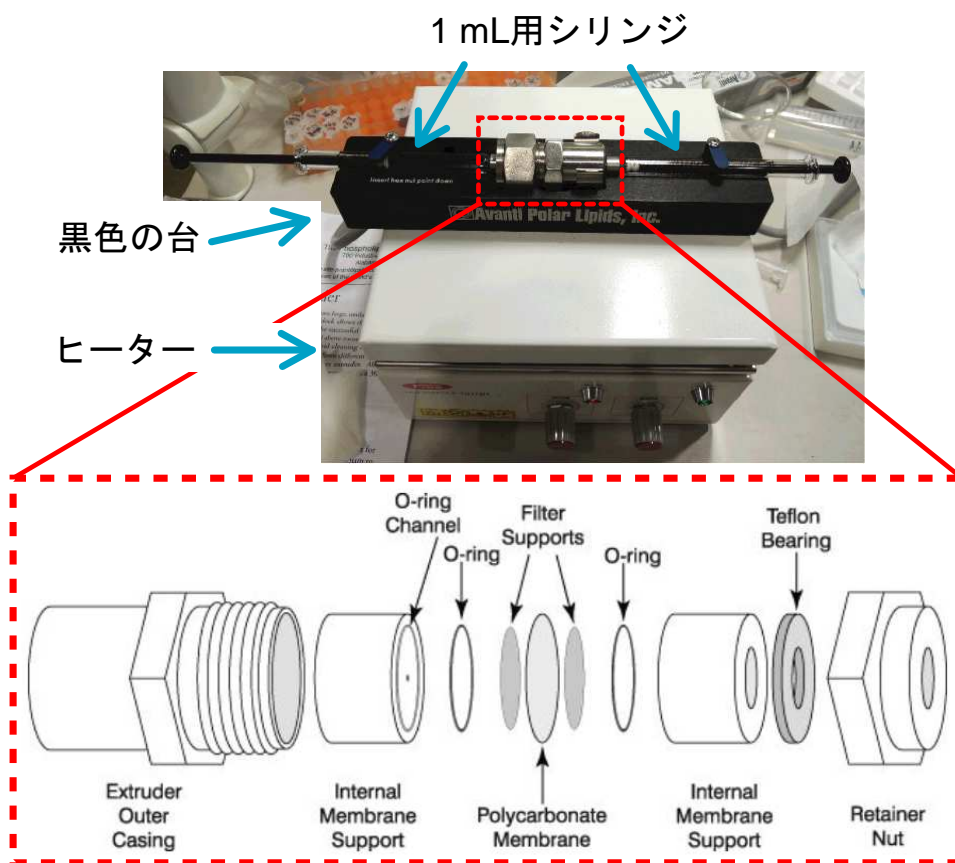


図 5-7 Mini-Extruder でリポソームを作製する際のセットアップの写真とポリカーボネート膜の器具の設計図[11].



### PC リポソームと Au ナノ粒子コロイド水溶液の混合

PC リポソーム水溶液に Au ナノ粒子コロイド水溶液を加えて、リポソームに対する Au ナノ粒子の分子吸着反応を水環境下で促した。PC リポソーム水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液の混合は体積比で 1:100 と 1:10 として行い、それぞれの試料を PCA100 と PCA10 と呼ぶ。PC リポソーム水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液、そして PCA100 と PCA10 の各溶液の写真を図 5-8 に示す。

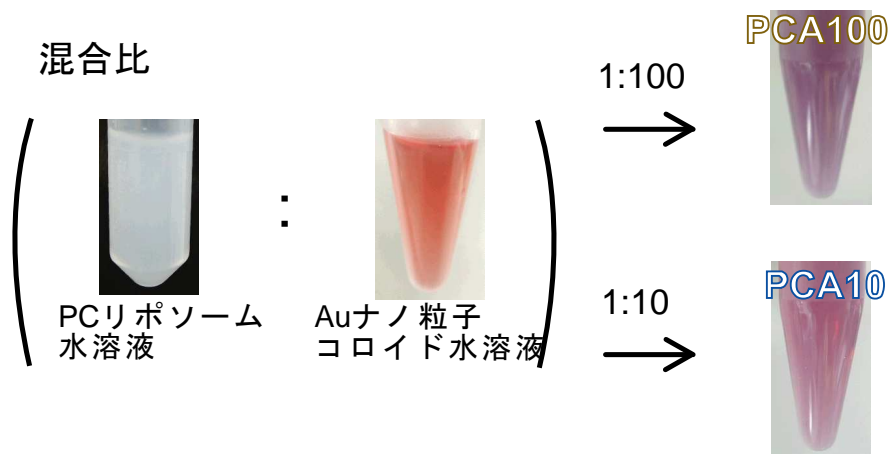


図 5-8 PC リポソーム水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液の体積比を (1:100) または (1:10) として混合して作製した PCA100 と PCA10 の各溶液に対する写真.

### TEM 観察用グリッドおよび TEM 観察用試料の作製

TEM 観察は ネガティブ染色法 と 超薄切片法 の 2 種類の手法で観察用の試料を作製して行った。それぞれについてグリッドおよび TEM 観察用の試料の作製方法が途中から異なるため、以下に詳細を説明する。ただし、今後の記述でシャーレと書いているときはプラスチック製のディスポーザブルシャーレのことを意味し、ガラス製のシャーレを用いたときはそのように記述する。さらに、バイアルビンは基本的に蓋にはパッキンが付いているものを意味しており、パッキンが付いていないものを用いた場合はそのように記述する。

#### 【共通部分】 フォルムバル膜/Cu グリッドの作製

スライドガラス表面についているほこりや汚れをキムワイプやブローで除去した後、図 5-9 のフォルムバル膜張装置 (日新 EM 社製) を用いて フォルムバル膜/スライドガラス を作製した。フォルムバル膜を milli-Q 水の上に浮遊させた状態をつくるために、フォルムバル膜/スライドガラス の表面の四方をカッター刃で傷つけた後、傷をつけた面を上にして milli-Q 水が張られたビーカー内にガラスの端からゆっくり沈め、フォルムバル膜をガラス表面からはがした。図 5-10 のように Cu グリッド

(G200HH、日新 EM 社製) の表側を下にしてフォルムバール膜の上に乗せ、その上に紙を置いた。紙が透けてきてグリッド見える状態になったら紙をビーカーから取り出し、自然乾燥させた。このグリッドを“フォルムバール膜/Cu グリッド”と記す。

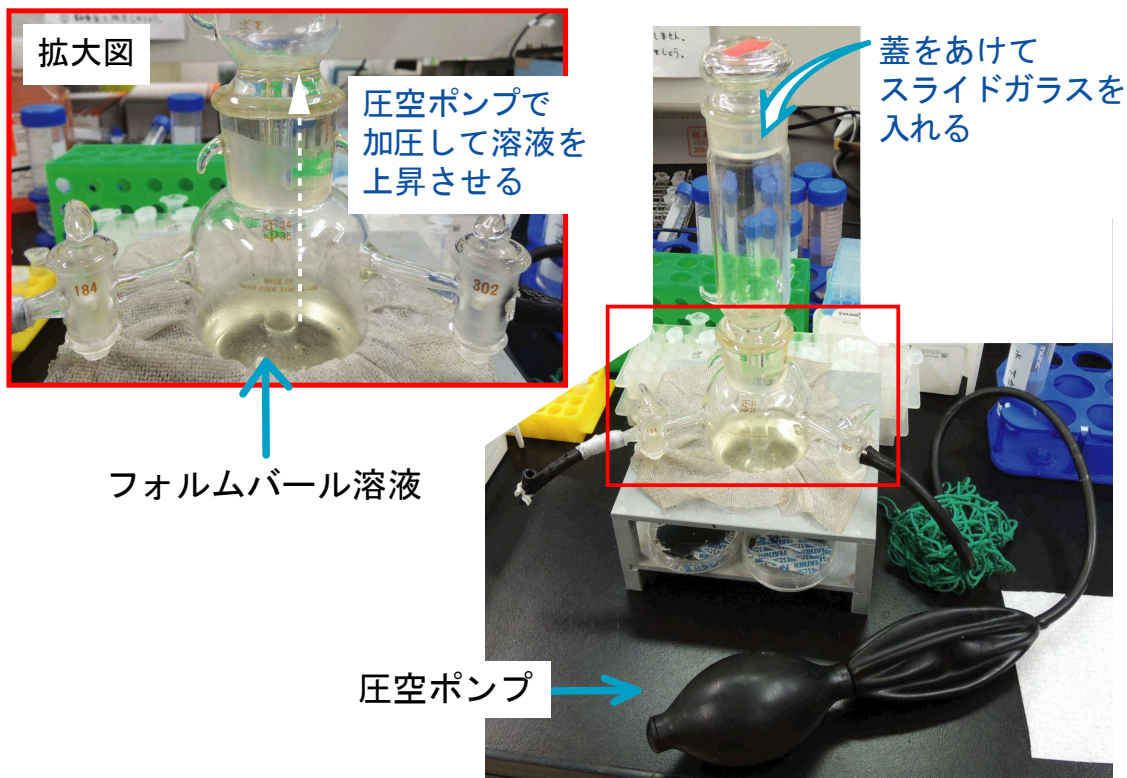


図 5-9 フォルムバール膜張装置の写真.

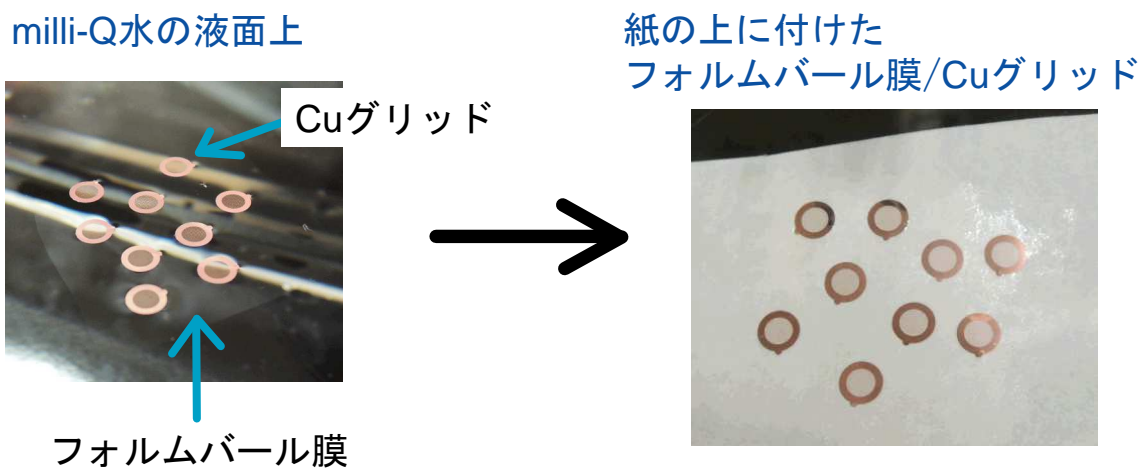


図 5-10 フォルムバール膜/Cu グリッドの作製.

### 【ネガティブ染色法】

#### ■カーボン/フォルムバール膜/Cu グリッドの作製

図 5-11 のように、両面テープを貼ったホルダにフォルムバール膜/Cu グリッドを貼りつけ、名古屋大学 臼倉治郎特任教授が作製したカーボン蒸着用の真空装置の中にホルダを導入した。装置内の真空度が  $10^{-6}$  Pa 台になったらカーボン蒸着源と W コイルの間に 3 kV の高電圧を印加した後、W コイルに 100 mA の電流を流すことで熱電子を W から放出させた。放出した熱電子を電位差によりカーボン蒸着源まで加速することで、カーボンを蒸発させ、ホルダに貼りつけたフォルムバール膜/Cu グリッド上に蒸着した。蒸着時、ホルダ上のグリッドに対して均等にカーボンが蒸着できるようにホルダを回転させた。蒸着は電流値が 100 mA に達してから 10 秒間行った。蒸着後、装置内からホルダを取り出した。このグリッドを“カーボン/フォルムバール膜/Cu グリッド”と記す。

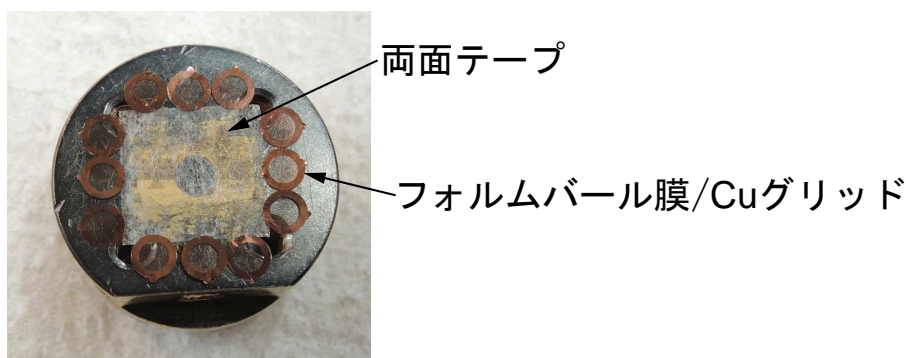


図 5-11 ホルダに貼りつけたフォルムバール膜/Cu グリッド。

#### ■溶液試料/カーボン/フォルムバール膜/Cu グリッド の作製

カーボン/フォルムバール膜/Cu グリッドの表側を上にしてろ紙を敷いたシャーレ（ろ紙/シャーレと記す）上に並べ、親水性処理装置プラズマイオンボンバーダ（真空デバイス社製）に入れて Soft (7~8 mA) で 90 秒間のプラズマ処理を行うことでグリッド表面を親水化させた。続いて、パラフィルムを敷いたシャーレ（パラフィルム/シャーレ）上に親水化処理をしたカーボン/フォルムバール膜/Cu グリッドを並べ、Au ナノ粒子コロイド水溶液、PC リポソーム水溶液、PCA100 溶液、PCA10 溶液をそれぞれグリッド上に  $4 \mu\text{L}$  ずつ滴下し、10 分間放置した。milli-Q 水または 2% 酢酸ウラン水溶液の水滴をパラフィルム/シャーレ上に  $10 \text{ mm}^{\circ}$  程度の大きさで 3 つずつ準備した。Au ナノ粒子コロイド水溶液の場合は milli-Q 水、PCA100 または PCA10 の場合は 2% 酢酸ウラン水溶液の各水滴に 3 回ずつくぐらせ、グリッド上に接着していない Au ナノ粒子や PC リポソームを除去した。酢酸ウランにくぐらせた際はこの作業により同時に染色も行った。水滴にくぐらせた後の各グリッドをパラフィルム/シャーレ上に置き、グリッド上の余分な水滴をろ紙を用いて除去し、自然乾燥させた。

### 【超薄切片法】

#### ■カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスの作製

アセトン（和光純薬工業、試薬特級）中に浸して保存していた 1.4 mm<sup>φ</sup>のサファイアガラス（1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスと記す）を取り出し、ろ紙/シャーレ上に置いてアセトンを蒸発させた。ネガティブ染色のグリッド作製時に用いたものと同じカーボン蒸着用の真空装置を用いて、【ネガティブ染色法】で記述した同様の操作を行い 1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス上にカーボンを蒸着した（カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスと記す）。ガラスのカーボン蒸着面が分かるようにピンセットの先端を用いてカーボン蒸着面に“2”と傷をつけた。シャーレ内にエタノールを注ぎ、その中にカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスを入れた後、シャーレの蓋をしてその周りをパラフィルムで覆い、冷蔵庫で 1 時間以上放置して両面テープの粘着剤を除去した。エタノールの揮発を抑えるために、パラフィルムでシャーレの周りを覆い、かつ冷蔵庫で放置した。

#### ■アルシアンブルーによるカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス表面のプラスチャージ添加

PC リポソームがアニオン性である[12]ためにマイナスの電荷を帯びているガラス表面にリポソームを固定することは困難であるが、ガラス表面をアルシアンブルーで修飾してプラス電荷を持たせることで PC リポソームをガラス表面に固定させやすくなると報告されている[12]。よって、PC リポソームをカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスの表面に固定させるために、アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス を作製することにした。その作製手順を以下に示す。

冷蔵庫で放置していたカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスをエタノール溶液中から取り出し、ガラス表面上のエタノールをろ紙/シャーレのろ紙で吸い取らせた後、カーボン蒸着面を上にしてろ紙/シャーレの上に置いた。親水性処理装置プラズマイオンボンバーダに入れ、Hard（11～12 mA）で 90 秒間のプラズマを発生させて親水化処理を行った。続いて、カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス をパラフィルム/シャーレの上に一か所に固めて並べた。アルシアンブルー粉末（Sigma-Aldrich 社製）を milli-Q 水に溶かして 1%アルシアンブルー水溶液を調製し、その溶液をディスポーザブル用のシリンジに取った後、シリンジ先端に 0.20 μm の細孔のフィルタ（Millipore 社製）を取り付け、そのフィルタを通して濾過したアルシアンブルー水溶液を 200 μL 程度、カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスの上に滴下した。この状態で 10 分間放置した後、milli-Q 水を入れたシャーレにカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスをくぐらせてアルシアンブルー水溶液を除去した後、ろ紙/シャーレのろ紙にカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス上の水滴を吸い取らせ、かつ自然乾燥させた。

アルシアンブルーをカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスに修飾する他の方法として、200 μL 程度を滴下したアルシアンブルー水溶液の水滴にカーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラスを一枚ずつくぐらせた後、パラフィルム上で 10 分間放置するというやり方があるが、この場合はガラス表面に乗せられるアルシアンブルー水溶液の量が非常に少ないために、10 分間放置し

ている間に溶媒である水が蒸発してしまうという問題が生じた。したがって、上述したように、一か所にガラスを固めて置き、その上にアルシアンブルー水溶液を 200  $\mu\text{L}$  滴下するという工夫を行った。このガラスを“アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラス”と記す。

#### ■PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラス の加圧急速凍結

アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラス をパラフィルム/シャーレの上に置いた。PCA10 溶液を作製した後、その溶液をアルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラスの上に 200  $\mu\text{L}$  滴下して 1 時間程度放置して、PCA10 溶液中に存在するリポソームなどをガラス表面上に固定させた。この試料を“PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラス”と記す。

PCA100/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラスの加圧急速凍結を行うために、EM PACT2 (Leica 社製) を用いた。加圧急速凍結とは、溶液試料に対して瞬時に 2100 bar ( $\approx 2072$  気圧) をかけて液体の粘性を高めながら、それと同時に液体窒素で急速冷却を行うことであり、これにより試料 (今回の場合は PCA10 の溶液) に対して水の晶質形成を抑制した状態で試料溶液の凍結が可能になる方法である[13]。また、空気圧を試料に伝えるための加圧媒体としてメチルシクロヘキサンを用いた。

EM PACT2 のコンプレッサを立ち上げて、メチルシクロヘキサンと液体窒素を入れて装置の準備を行った。真ん中が窪んだ金製の台座に、PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm $\phi$ ガラス を PCA10 溶液も含めて入れた後、溶液が漏れないようにホルダに入れて装填した。このホルダを EM PACT2 にセットした後、スイッチを押して加圧急速凍結をさせた。バイアルビン (8 mL 用) を液体窒素に浸して冷却し、凍結試料と液体窒素をそのバイアルビンに入れて、パッキンが付いていない蓋で緩く閉じた後、凍結保存容器内に入れて保管した。凍結させた試料をピンセットで取り扱う場合は、試料の温度が上昇しないようにピンセットの先端を液体窒素に浸して冷却してから使用することに注意した。

#### ■ドライアセトンの作製

200 mL 用のバイアルビンをアセトン (和光純薬工業、試薬特級) で共洗いした後にモレキュラーシーブス (Sigma-Aldrich 社製) を 50 mL の線まで入れ、さらに、アセトンを 100 mL の線まで加えた。この状態で 12 時間以上放置し、アセトン中に含まれる微量な水をモレキュラーシーブスに吸収させて除去した。このドライアセトンのバイアルビンを 2 本準備した。これらドライアセトンは加圧急速凍結した試料を樹脂包埋する際に使い、2 本のうちの一つは「作業途中に試料を洗浄するため (洗浄用)」、もう一つは「PCA10 の中の水をアセトンで置換するため (置換用)」として準備した。



これ以降に記述する作業は、4種類の試料を作製する場合を想定した容量を記述する。

■PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス の凍結置換（水→アセトン）

本試料のリポソームはリン脂質の PC で作製されたが、PC は軽元素から構成されることから、TEM 測定により試料の観察を行うためには電子密度の高い分子で染色を行う必要がある。脂質の固定と染色にはオスミウム酸が適していると報告されている[14]。これは、脂質の炭化水素鎖に二重結合 (C=C) が含まれている場合、オスミウム酸が強い酸化剤であるために脂質の炭化水素鎖の C=C と反応するためである[15-16]。本論文中で用いている PC は Egg 由来であり、様々な種類の炭化水素鎖が含まれているが、その中の 53.8%は PC 一分子当たり C=C 結合を 1~4 つ有しているため、オスミウム酸を用いて PC リポソームの固定と染色を行うことにした。また、試料の樹脂包埋を行うために、PCA10 に含まれる水をアセトンに置換するという凍結置換を行った。

図 5-12 の断面図で示すようにステンレス製の容器の底に 1 kg の平板形のドライアイスの板をかなづちで半分に割って敷いた後、30~40 mm 角に砕いたドライアイスが容器の 3分の2程度入れ、コルク製の蓋をして容器が冷却されるまで放置した。容器が十分に冷えたら、アセトンをドライアイスの高さの 7~8 割程度加えた。アセトンの量が多すぎるとドライアイスが早く溶けてしまい、一方で少なすぎると後に示す 8 mL 用のバイアルビンがアセトン中に浸らなくなってしまうが、これ以降の作業ではステンレス容器内の温度を-79°C（ドライアイスの温度）で一定に保つ必要があった。よって後からアセトンを追加することができないため、アセトンを入れる量に注意した。

8 mL 用のバイアルビンを 4 つ、20 mL 用のバイアルビンを 1 つ準備した。これら 5 つのバイアルビンに対してアセトンを用いた共洗いを行ったが、初めに 20 mL 用のバイアルビンにアセトンを加えた後、8 mL 用の 4 つのバイアルビンにそのアセトンを分けて洗浄する、という順番で行った。アセトンでの共洗いはそれぞれ 3 回行い、全て和光純薬工業社製のアセトンを用いたが、以下のように種類が異なる。

- 一回目： 市販の茶色の試薬瓶に入っている特級のアセトン（試薬瓶アセトンと記す）
- 二回目： 洗浄用のドライアセトン（洗浄用アセトンと記す）
- 三回目： 置換用のドライアセトン（置換用アセトンと記す）

続いて、パスツールピペットを 2 本準備し、洗浄用アセトンをパスツールピペット上部から流し込むという洗浄の作業をそれぞれ 2 回行った。パスツールピペット用のスポイトゴムをはめ、置換用アセトンを吸ってもう一度共洗いを行った後、20 mL 用バイアルビンに置換用アセトンを 20 mL 加えた。0.5 mg のオスミウム酸結晶（日新 EM 社製）の入った瓶をアンブルカッターで切り、オスミウム酸結晶を置換用アセトンの入った 20 mL 用バイアルビンに加えて溶かした。この溶液を 4 つの 8 mL 用バイアルビンに分けて入れた後、バイアルビンの蓋を固く閉め、ドライアイスとアセトンが入っているステ



ステンレス製容器に入れた。このとき、8 mL 用バイアルビン内の“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”の液面が必ずステンレス容器内のアセトンに浸っているように注意した。また、オスミウム酸は置換用アセトンに溶かすと薄い黄色の溶液となったが、室温ではすぐにバイアルビン内に少量残っている有機物とオスミウム酸が反応して黒色の溶液になってしまう。この反応の進行を抑えて、PC と反応するオスミウム酸をアセトン溶液中に残すために、オスミウム酸をアセトンに溶かした後はなるべく早く、-79°C のステンレス容器内で保管する必要がある。よってオスミウム酸を取り扱う作業を素早く行うために、この“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”を作製する前に、ステンレス製容器内のドライアイスの位置を動かして 8 mL 用のバイアルビンを入れられる場所を確保した。

加圧急速凍結した PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス（凍結試料と記す）を液体窒素で満たしたバイアルビン から“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”の入ったバイアルビン へ移すために、ドライアイスとアセトンが入っているステンレス容器とは別のステンレス容器を準備し、その容器内を液体窒素で満たした（液体窒素ステンレス容器と記す）。凍結保存容器内に保存していた凍結試料の入ったバイアルビンを取り出し、凍結試料を液体窒素ステンレス容器の中に出した。“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”が入ったバイアルビン をドライアイスとアセトンの入っているステンレス容器 から取り出し、“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”の液面の半分を液体窒素に浸して溶液を半分凍らせた後、バイアルビンの蓋を緩い状態に閉めなおした。ピンセットの先端を液体窒素に浸して冷却した後、液体窒素ステンレス容器内の凍結試料を“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”に素早く移し、蓋を固く閉めて、再びドライアイスとアセトンが入っているステンレス容器に浸した。このとき、凍結試料の表側を上に向けてバイアルビンの中に入れることで、凍結試料の表面が凍った“オスミウム酸 + 置換用アセトン溶液”に接しないように注意した。バイアルビン を 4 種類の試料を作製するときは、この段落の文章の作業を 4 回繰り返した。最後に、[図 5-13](#)のようにバイアルビンが全て隠れるまで 30~40 mm 角に砕いたドライアイスを追加して上に重ね、コルク製の蓋をし、その上になづちを重石として乗せた。ドライアイスが昇華するため、約 12 時間ごとに 30~40 mm 角に砕いたドライアイスバイアルビンの上に乗せ、バイアルビンが見えないようにした。温度を-79°C に保ちながら 48 時間の凍結置換を行った。最後に洗浄用ドライアセトンのバイアルビンに試薬瓶アセトンを追加した。

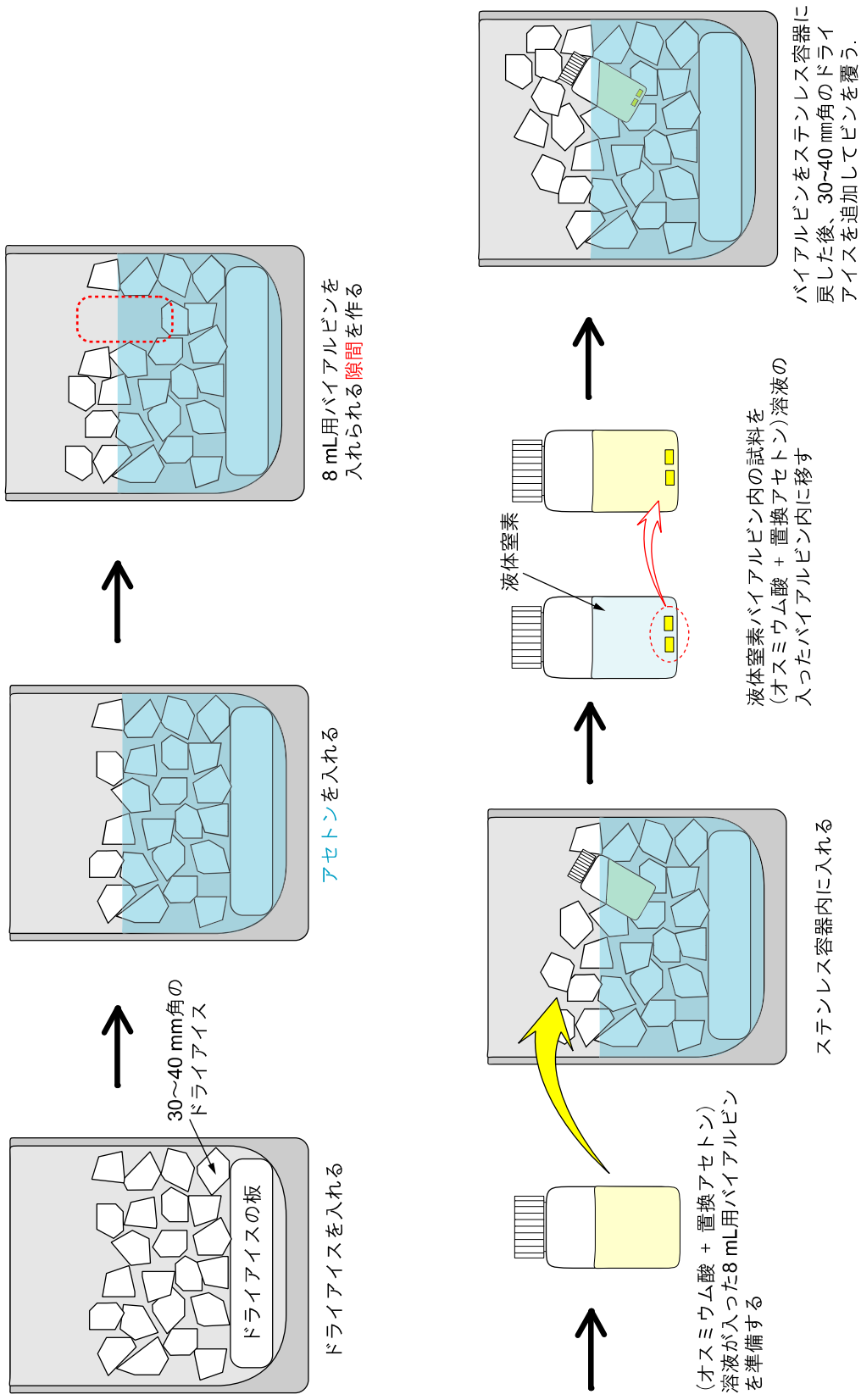


図 5-12 凍結置換作業を示した断面図.

30~40 mm角のドライアイスで  
バイアルビンを覆った様子



コルク製の蓋



約12時間後



ドライアイスが昇華することで  
バイアルビンが現れた様子



ドライアスを追加した様子

図 5-13 ドライアイスでバイアルビンを覆った後の様子.

#### ■PCA10/アルシアンブルー/カーボン/1.4 mm<sup>φ</sup>ガラス の樹脂包埋

凍結置換の作業を開始して 48 時間後、試料の入った 8 mL 用のバイアルビン、ドライアイスとアセトンの入ったステンレス容器内から取り出し、ガラス製のシャーレに立てて置いて -20°C の冷蔵庫に入れて放置した。合計 1 時間、冷蔵庫内で放置したが、30 分経過した時点でバイアルビン軽く振って溶液を攪拌させた。1 時間経過後、バイアルビンの入ったシャーレを 4°C の冷蔵庫に移してさらに 20 分間放置した後にもう一度バイアルビン振って溶液を攪拌し、室温に取り出して 5~10 分間放置してバイアルビン室温に戻した。パストゥールピペットを 2 本、洗浄用アセトンで洗浄して準備した。1 本目のパストゥールピペットを用いて 8 mL 用バイアルビンに 2~3 mm 程度の高さの溶液が残るような状態までアセトンを吸い出し、2 本目のパストゥールピペットで洗浄用アセトンを入れて 5 分間放置した。この作業を 4 回繰り返すが、2 回目以降は 10 洗浄用アセトンを加えた後に 10 分間放置した。また、2 回目の作業の際に、加圧急速凍結のために用いた金製のホルダを取り出した。4 回目の 10 分間の放置が終わったあと、2 本

目として用いていたパストゥールピペットを使用して、バイアルビン中の溶液の高さが 2～3 mm になるまでアセトンを吸い出し、すぐに酸化プロピレン（和光純薬工業、試薬特級）を試薬瓶からバイアルビンに加えて放置した。15 分後にバイアルビン内の液面が 2～3 mm の高さになるように酸化プロピレンをパストゥールピペットで吸い出し、再び試薬瓶から酸化プロピレンを加えて 15 分間放置した。

4 種類の試料を包埋するために樹脂を 30 mL 作製する必要があるため、蓋つきの 50 mL 用メスシリンダを用いた。メスシリンダ内を試薬瓶アセトンで超音波洗浄した後、ドライヤーを用いてメスシリンダ内壁のアセトンを完全に揮発させた。樹脂の作製には、エポキシ樹脂 Poly/Bed 812 セット（ポリサイエンス社製）に含まれる Poly/Bed 812、DDSA（Dodecenylsuccinic Anhydride）、NMA（Nadic Methyl Anhydride）、DMP-30（(Dimethylaminomethyl)-Phenol）を用いた。メスシリンダに Poly/Bed 812 を 14.4 mL、DDSA を 7.5 mL、NMA を 7.5 mL 入れ、蓋をしてよく混合した。ディスパーザブルのシリンジに DMP-30 を 0.6 mL 取り、メスシリンダ内に一気に加えて蓋をし、すばやく樹脂を振り混ぜた。20 mL 用のバイアルビンに酸化プロピレンを 8 mL 程度加え、さらに作製した樹脂を 8 mL 程度加え、蓋をして攪拌した。試料が入っている 8 mL 用バイアルビン中の酸化プロピレンを、バイアルビン内の液面が 2～3 mm の高さになるようにパストゥールピペットで吸い出した後、20 mL 用バイアルビン内の“酸化プロピレン + 樹脂”の溶液を 4 mL 程度、素早く 8 mL 用バイアルビンに加えた。8 mL バイアルビン内の試料の表面が上を向くようにした後、バイアルビンの蓋を開けた状態でガラスシャーレ上に置き、シリカゲルが入ったデシケータ内で一晩放置して酸化プロピレンを揮発させた。メスシリンダ内の樹脂は翌日に用いるために蓋をしてパラフィルムを巻き、水の流入を防いだ状態で -20°C の冷凍庫で保存した。

樹脂の入ったメスシリンダを冷凍庫から取り出して室温に戻すために 1 時間ほど放置した後、アルミニウム秤量皿（40 mm<sup>φ</sup>, 1 mm<sup>t</sup>）に樹脂を注いだ（樹脂/アルミ秤量皿と記す）。デシケータ内で一晩放置していた 8 mL 用バイアルビン内から試料を取り出してキムワイプで軽く樹脂を取り除いた後、樹脂/アルミ秤量皿に試料を入れた。樹脂中の気泡を除去するために、樹脂/アルミ秤量皿を真空デシケータ内に入れ、ロータリーポンプで真空引きを行った。1 時間後に真空デシケータをパーズして、樹脂/アルミ秤量皿を取り出し、樹脂中の試料のガラスの文字が“2”と読める、つまりカーボン蒸着面が上になるようにしながら、ガラス同士が重ならないように並べた。また、樹脂包埋された試料の切片を作る際に必要な円柱型の土台を樹脂で作製するために、ビームカプセル（内径 8 mm<sup>φ</sup>、高さ 20 mm、ビーム社製）にメスシリンダ内の樹脂を入れ（樹脂/カプセルと記す）、金属製のビームカプセル立てにセットし、カプセルが宙に浮いた状態にした。樹脂/アルミ秤量皿と樹脂/カプセルを 60°C のオープンに入れ、30 時間放置して樹脂を固めた。樹脂/カプセルをカプセル立てにセットせずに直立させてオープンに入れると、カプセルが変形して土台として使用できなくなるため、注意した。

■ トリミング

オーブンから樹脂/アルミ秤量皿を取り出し、固まった樹脂をアルミ秤量皿から外した。この樹脂の写真を図 5-14 に載せる。電動のこぎりで試料ガラスを中心に含んだ状態で 6 mm 角程度に切り出した後、ガラスのついている面を上にして、図 5-15 のように樹脂で作製した円柱状の土台に瞬間接着剤を用いて貼りつけた。続いて図 5-16 に形状を整えていくまでの過程を投影図と断面図で示す。まず、図 5-15 で示した状態を図 5-16 (a) とする。接着剤が固まったら、金属やすりを用いて樹脂の側面を削って台形型にした。片刃（フェザーS 青函、FEATHER 社製）を用いて樹脂をカットしていき、試料ガラスの円弧の接線部分まで切った（図 5-16 (b)）。ガラス表面の樹脂を削り取り、ガラスがむき出しになった状態で、その部分を液体窒素に軽く浸した後、ピンセットでガラスを取り外した（図 5-16 (c)）。さらに片刃を用いて 0.5 mm 角までカットし、最後に両刃（フェザーS 青函、FEATHER 社製）を用いて側面を滑らかにした（図 5-16 (d)）。このとき、樹脂の先端は上底と側面が 120° の角度をもった台形型になるように切り出した。また、上述した片刃および両刃は側面に錆止めや粘着剤が付着していたため、キムワイプにアセトンをつけてこすり取った後、アセトンで満たしたバイアルビンの中に浸して放置したものを用いた。

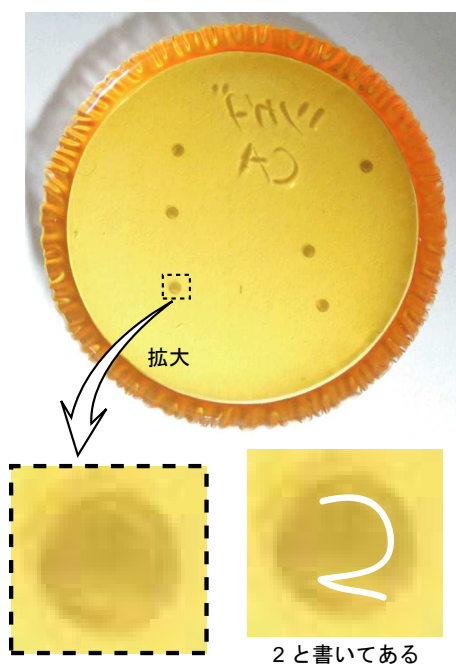


図 5-14 樹脂包埋した試料ガラス。

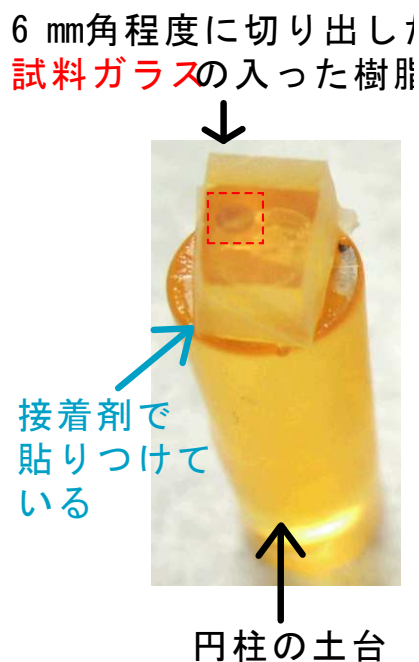


図 5-15 約 6 mm 角に切り出した試料ガラスの入った樹脂を円柱の土台に貼りつけた所。

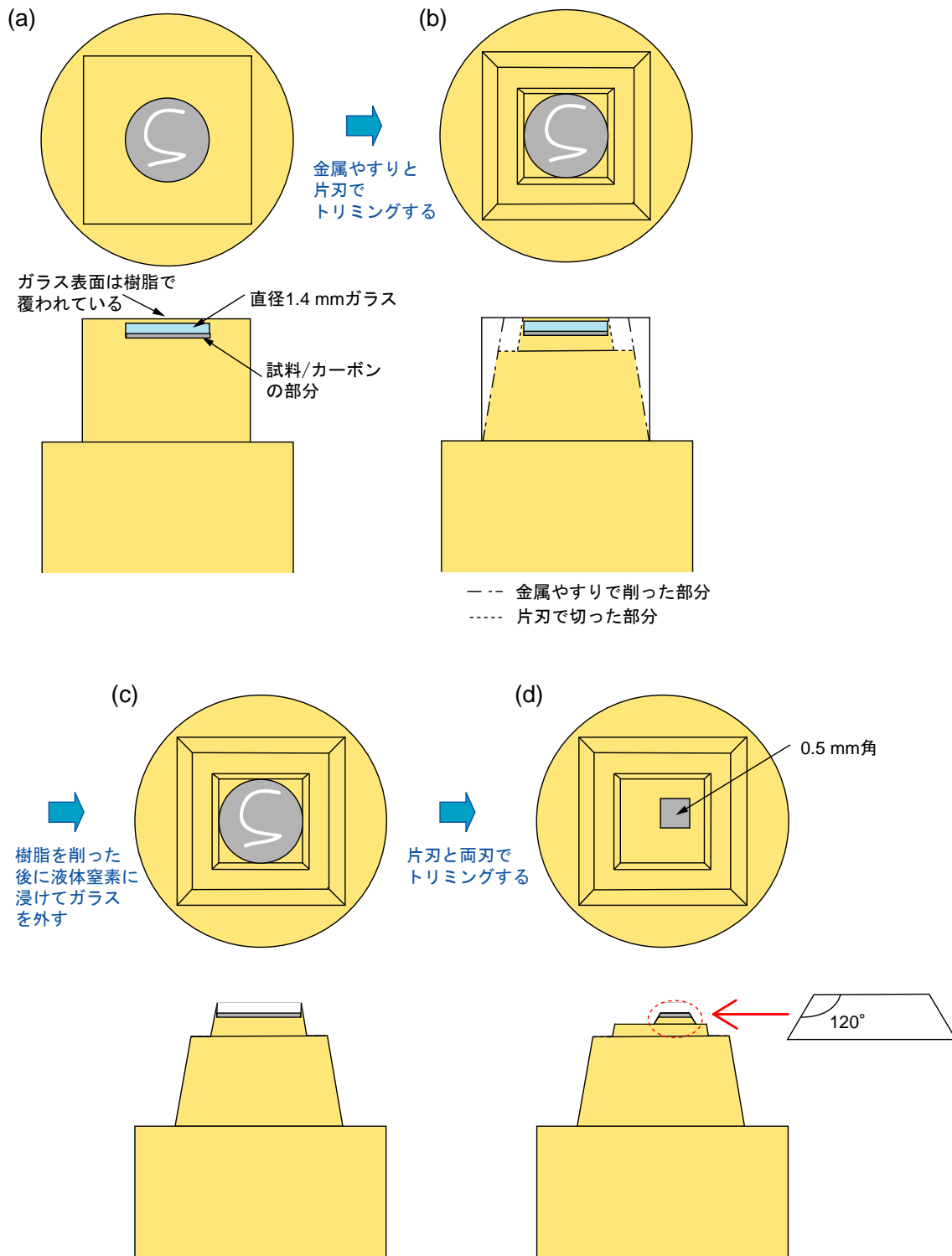


図 5-16 形状を整えていくまでの過程（投影図と断面図）。



## ■マイクロトーム

マイクロトームは ULTRACUT (Reichert-Nissei 社製)、ダイヤモンドナイフは Nanotome 薄切用 (刃角 45°、刃幅 3.0 mm、DiATOME 社製) を用いた。図 5-17 にマイクロトームの全体図を示す。ダイヤモンドナイフに milli-Q 水→70%エタノール の順番で各溶液をかけて洗浄した後、ブロワーで乾かした。ダイヤモンドナイフをマイクロトームにセットした後、milli-Q 水をダイヤモンドのポート部分に入れ、ダイヤモンドナイフの刃先を発泡スチロールでこすって汚れやほこりを除去した。ダイヤモンドナイフを取り外して再び milli-Q 水により洗浄してブロワーで乾かした後、99.5%エタノールを 1 mL 程度ポート部分にかけ流して親水性を増したものをマイクロトームにセットし、ダイヤモンドナイフのポート部分の壁面に沿うくらいまで milli-Q 水を入れた。ポートに入れる milli-Q 水の量の微調整はシリンジを用いて行い、最終的にマイクロトームの顕微鏡からダイヤモンドナイフの刃先近くの水面を見て、刃先と水面が同じ高さになるように調整した。トリミング後の試料付の円柱をマイクロトームにセットし、図 5-18 のように試料付の円柱とダイヤモンドナイフの刃先を近づけた。試料面と水平に均一の厚さで切片を作製できるように、試料面とダイヤモンドナイフの面合わせを行った[17]。マイクロトームの装置で切片の厚さを 50 nm にセットした後、図 5-17 に示したマイクロトームのレバーを回転させて試料付の円柱を上下させることで試料をカットして超薄切片を作製し、ダイヤモンドナイフのポート部分に浮かべた。まつげを爪楊枝先端に接着剤で貼りつけて作製した道具を用いて超薄切片を液面上で動かして、2~3 枚ずつ集めたのち、フォルムバール膜/Cu グリッドの表側を下にして切片上に浸けることで、切片をフォルムバール膜/Cu グリッドに移した。切片/フォルムバール膜/Cu グリッドをろ紙/シャーレの上に置いて余分な水をろ紙に吸い取らせた後、そのまま自然乾燥させた。

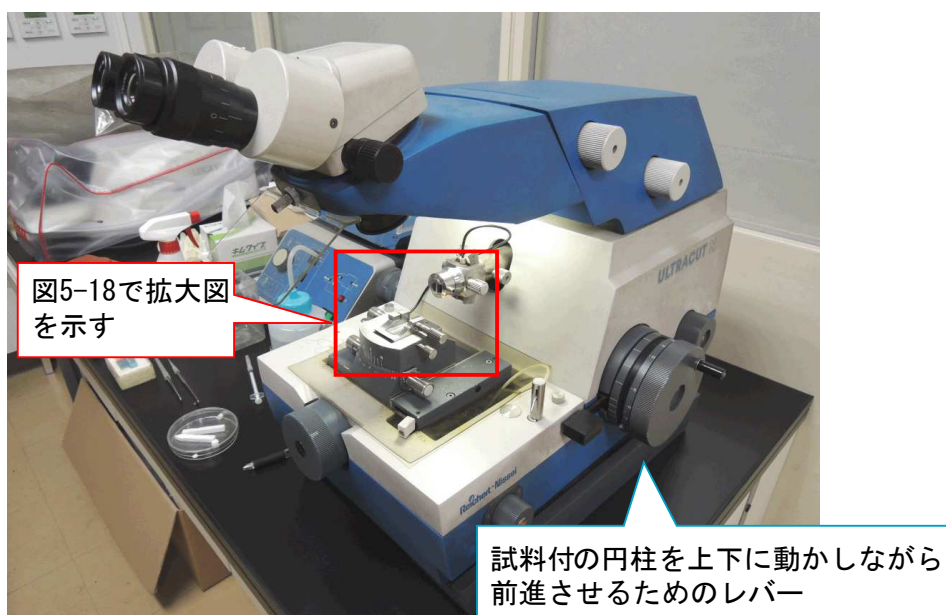


図 5-17 ミクロトームの全体写真.

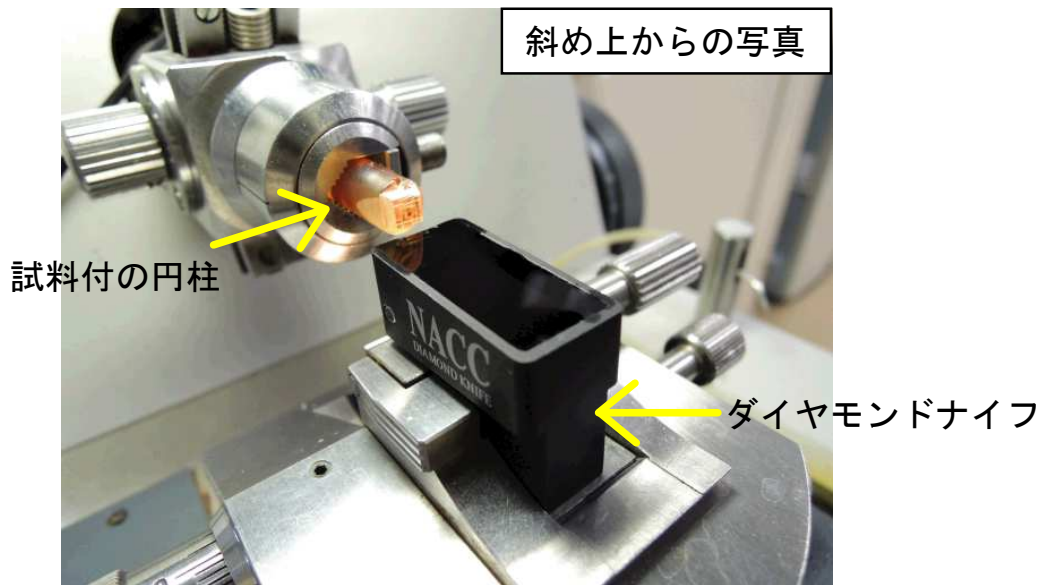


図 5-18 試料付の円柱とダイヤモンドナイフを近づけた様子。

#### ■切片/フォルムバール膜/Cu グリッド の染色

パラフィルム/シャーレの上に 10 mm<sup>φ</sup>程度の大きさの 50%エタノールと、50%エタノールに溶かして作製した 5%酢酸ウランを滴下した。さらに、机の上にパラフィルムを二枚貼りつけ、一枚目は 50%エタノールの水滴 3つ、二枚目は milli-Q 水の水滴を 4つ準備した。5%酢酸ウランは 0.22 μm のフィルタを通して滴下した。

切片/フォルムバール膜/Cu グリッド について、初めにシャーレ内の 50%エタノールに浸してグリッド表面を洗浄した後、5%酢酸ウラン水溶液に 5 分間浸した。続いて机の上に貼りつけたパラフィルムのうち、一枚目の 50%エタノールの各水滴にグリッドを

数回ずつ浸けた後、二枚目の milli-Q 水の各溶液にも浸け、さらに milli-Q 水を張ったシャーレ内でグリッドをすすぐことで酢酸ウランを除去した。新しく準備したパラフィルム/シャーレの上に酢酸ウランで染色したグリッドを置き、そのシャーレの中にクエン酸鉛を滴下して水滴を準備した。グリッドをクエン酸鉛の水滴中に浸して1分間放置した。milli-Q 水を張った新しいシャーレを2つ準備して、それらシャーレ内の milli-Q 水中にグリッドを浸してすすぎの作業を行い、クエン酸鉛を除去した。ろ紙/シャーレの中に染色後のグリッドを置いて保管した。

#### TEM 観察の条件及びネガフィルムの現像

TEM 観察は名古屋大学 臼倉研究室所有の H-7600 (Hitachi 社製) を用い、加速電圧を 100 kV にして行った。TEM 画像は TEM 用フィルム (8.2×11.8 cm、キャビネ 1/2、富士フィルム社製) を用いて取得した。フィルムの現像は、現像時間 4~4.5 分、定着時間 3 分、水洗い 5 分で行った。また、現像後のフィルムはドライヤーを用いて乾燥させた。

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 Au 表面への吸着に寄与するフオスファチジルコリンの官能基の解明

#### N-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 5-19 に PC bulk と PC/Au sheet についての N-K 吸収端 NEXAFS スペクトルを示す。これらスペクトルはエッジジャンプで規格化した。397~399 eV 付近に見られた強度の増減は、ビームラインのミラーに付着した窒化物由来の汚れである。PC bulk のスペクトルには 403.6 eV に鋭いピークが見られた。PC は N-CH<sub>3</sub> の結合を有することから、このピークは N1s→σ\*(N-C) の遷移に起因するピークであると考えられる。続いて PC/Au sheet のスペクトルでは PC bulk に見られた 403.6 eV のピークと同様の位置にピークが確認されたが、その強度は大きく減少していた。ピーク強度が減少した理由として、PC が N-CH<sub>3</sub> の部分で Au 板表面に吸着し、Au 板から σ\*(N-C) に電子が逆供与され、N-C 結合が解離したことが考えられる。ここで、もし N-Au 結合や N-C-Au 結合が生成された場合、新たな反結合性軌道由来のピークや肩構造が現れると予測できるが、そのようなピークや肩構造は有意に確認されなかった。ただし、PC/Au sheet のスペクトルの 402 eV あたりには PC bulk のスペクトルよりも若干ではあるが膨らみがあるとも言える。既往の研究で、S-K 吸収端 NEXAFS 測定において、チオール基(-SH)をもつ分子が金属表面に-SH で吸着して金属表面と S の結合が生じた場合、未吸着分子の-SH 基由来の反結合性軌道のピーク位置よりも低エネルギー側にピークがシフトしたという報告がある[18-20]。よって PC/Au sheet の 402 eV 付近に確認された膨らみは、N-Au 結合や N-C-Au 結合が形成されたことに起因する可能性が考えられる。この可能性の確度を増すためには、例えば、赤外分光測定において、C-H や N-C といった結合の解離や上述した新たな結合の形成により、ピーク位置のシフトや新たなピークの生成が見られると推測されるため、N-K 吸収端 NEXAFS 測定のみでなく、他の測定による知見が必要と考える。

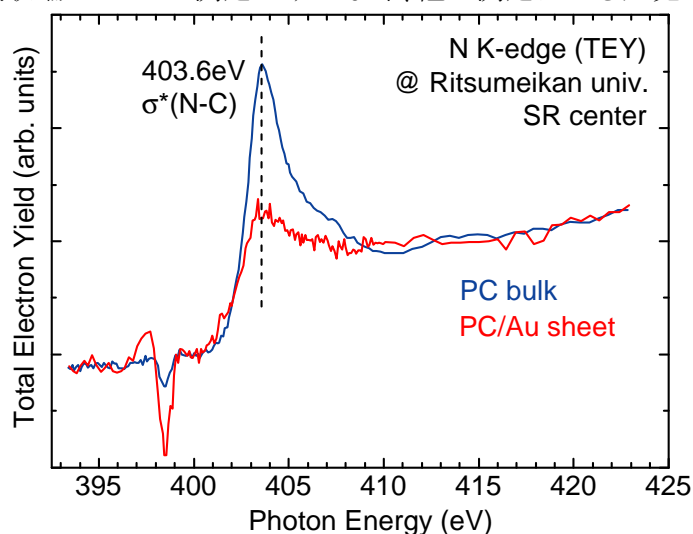


図 5-19 PC bulk と PC/Au sheet の N-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。

## P-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 5-20 に PC bulk と (PC/Au sheet)-Au sheet の P-K 吸収端 NEXAFS スペクトルを示す。これらのスペクトルはエッジジャンプで規格化している。また、(PC/Au sheet)-Au sheet のスペクトルに関してはスムージングをした Smoothed spectrum も併せて載せている。まず、(PC/Au sheet)-Au sheet について説明する。P-K 吸収端 NEXAFS 測定は部分蛍光 X 線収量 (PFY) 法で行っているが、蛍光 X 線収量 (FY) 法ではマイクロメートルの深さまでの試料のシグナルも検出するため、PC/Au sheet のスペクトルからバックグラウンドである Au 板のスペクトルを差し引く必要があると考えた。図 5-21 に PC/Au sheet 及び Au sheet に対して測定したままの各スペクトル (生スペクトル) を載せている。Au sheet について、2151~2156 eV 付近に Au 板に含まれる不純物に由来すると考えられる吸収が見られた。しかしその強度は PC/Au sheet のスペクトルの 2151~2156 eV 付近に確認されたピークの強度よりも小さいため、PC/Au sheet のスペクトルには PC が Au 板表面に吸着したことで生じたシグナルが含まれていると判断した。上述したように Au sheet 由来のバックグラウンドを PC/Au sheet から除去するために、PC/Au sheet のスペクトルから Au sheet のスペクトルをそのまま差し引いた。この作業により得られたスペクトルが図 5-20 の (PC/Au sheet)-Au sheet である。

PC bulk のスペクトルに 2151.8 eV のピークが確認された。このピークは高エネルギー側に裾を引いており非対称である。PC のリン酸基について、少なくとも P=O 結合、P-O 結合、P-O-C 結合の 3 種類の結合に由来する反結合性軌道の吸収が生じると考えられる。また、NEXAFS 測定において、本論文 5.3.1 中の O-K 吸収端 NEXAFS 測定の図 5-22 で示すように、O=C のように二重結合を含む分子には  $\pi^*$  と  $\sigma^*$  に由来する吸収が生じており、 $\pi^*$  よりも  $\sigma^*$  の方が高エネルギー側に吸収が生じること、及び  $O1s \rightarrow \sigma^*(O-C)$  よりも  $O1s \rightarrow \sigma^*(O=C)$  の方が高エネルギー側に位置することから、PC bulk の P-K 吸収端 NEXAFS 測定の最も低エネルギー側に  $P1s \rightarrow \pi^*(P=O)$  由来の吸収が生じ、続いて、高エネルギー側になるに従って、 $\sigma^*$  に由来する  $P1s \rightarrow \sigma^*(P-O)$ 、 $P1s \rightarrow \sigma^*(P=O)$  のピークが現れると判断できる。2151.8 eV に見られるピークが高エネルギー側に裾を引いた非対称な形状である理由として、上記の吸収を生じる反結合性軌道が 2150~2155 eV に集中していることに加え、 $\pi^*$  由来のピークは  $\sigma^*$  由来のピークよりも半値幅が狭く、鋭い形状であるためと考えられる。続いて (PC/Au sheet)-Au sheet のスペクトルについて考察する。(PC/Au sheet)-Au sheet のスペクトルのピーク位置は 2152.6 eV に観測され、PC bulk と比較して高エネルギー側にシフトした一方で、PC bulk のスペクトルでピークが確認された 2151.8 eV には、(PC/Au sheet)-Au sheet のスペクトルにおいて肩構造と判断できる膨らみが見られた。よって、2152.6 eV へのピークシフトは PC がリン酸基の部分で Au 板と吸着反応をし、Au 板から各反結合性軌道へ電子の逆供与が起こったことで、 $P1s$  の電子が  $\pi^*$  や  $\sigma^*$  に励起できる確率が減少したために、見かけ上、ピークがシフトしたように見えたと考えられる。また、 $P1s \rightarrow \pi^*(P=O)$  由来の 2151.8 eV のピーク強度が、(PC/Au

sheet)-Au sheet では PC bulk よりも大きく減少しているが、これは本論文 5.3.1 の中の O-K 吸収端 NEXAFS 測定 で、PC bulk のスペクトルの O=P 結合に起因した吸収である  $O1s(O=P) \rightarrow \pi^*(O=P)$ 、 $O1s(O-P) \rightarrow \pi^*(O=P)$  由来のピーク強度が PC/Au sheet のスペクトルで大きく減少し、かつ  $P1s \rightarrow \sigma^*(P=O)$  由来と考えられる吸収を含む位置の肩構造が消失したことと同じ傾向を示しており、P=O 結合が解離した可能性が示唆された。

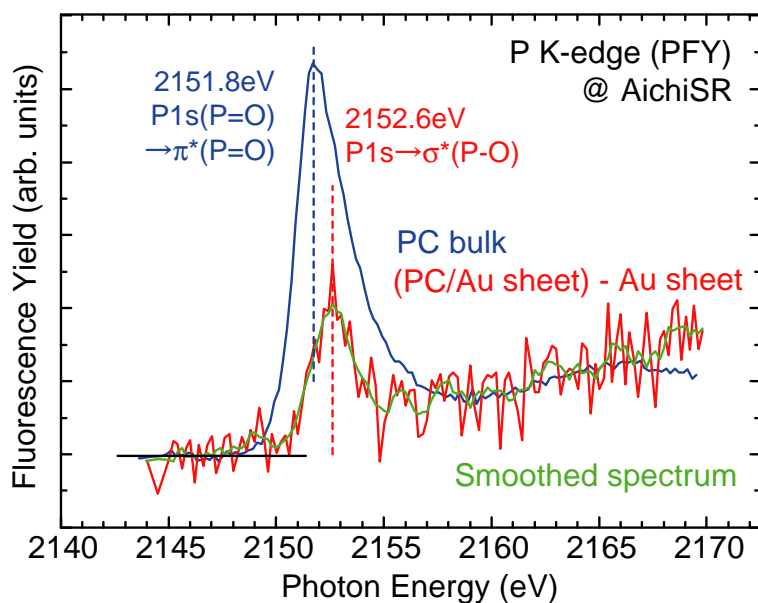


図 5-20 PC bulk、(PC/Au sheet) - Au sheet、Smoothed spectrum の P-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。

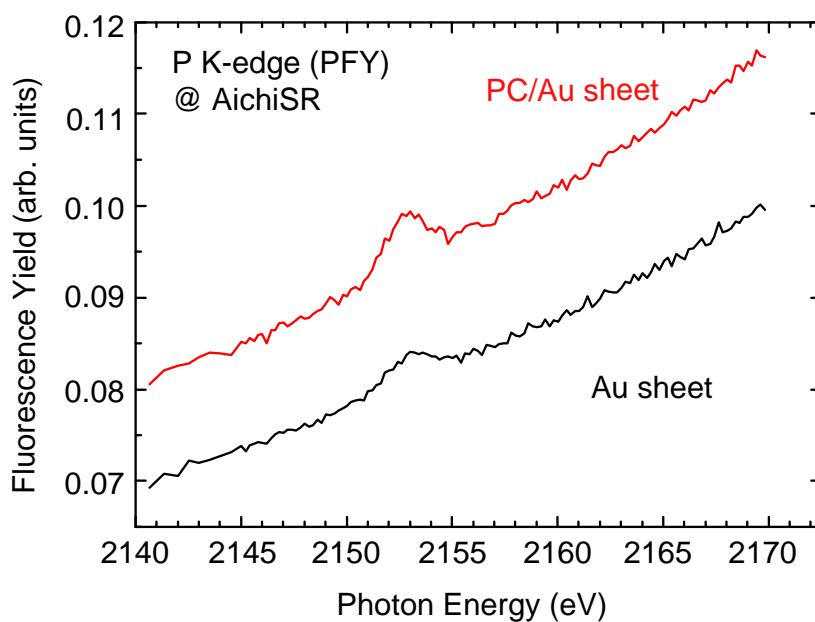


図 5-21 PC/Au sheet と Au sheet の P-K 吸収端 NEXAFS に対する生スペクトル。



## O-K 吸収端 NEXAFS 測定

図 5-22 に PC bulk、PC/Au sheet、FePO<sub>4</sub> 粉末の O-K 吸収端 NEXAFS スペクトルを示す。PC bulk と PC/Au sheet のスペクトルはエッジジャンプで規格化している。また、FePO<sub>4</sub> 粉末は、リン酸基 PO<sub>4</sub> に対する O-K 吸収端 NEXAFS の参照試料として測定した。

まず、PC bulk の O-K 吸収端 NEXAFS スペクトルについて、各ピークや肩構造に対する吸収の由来を考察する。PC は酸素との結合を形成している元素として炭素 (C) と P がある。初めに O と C の結合に関して述べる。PC は 5.1 で記述したようにグリセロールと脂肪酸が“エステル結合”を形成して構成されている。図 5-22 の PC bulk のスペクトルに対して 531.5 eV と 534.4 eV にピークと肩構造が確認されたが、T. Okajima らは“エステル結合”をもつ分子に対して O-K 吸収端 NEXAFS 測定を行った場合、～532 eV と～535 eV においてそれぞれ O1s(O=C)→π\*(O=C)と O1s(O-C)→π\*(O=C)に由来するピークが観察されると報告している[21]。よって図 5-22 の PC bulk のスペクトルにおける 531.5 eV のピークが O1s(O=C)→π\*(O=C)、534.4 eV の肩構造が O1s(O-C)→π\*(O=C)を示すと考えられる。また、PC bulk のスペクトルに 536.4 eV 及び 545～550 eV の肩構造が確認された。テレフタル酸とブタンジオールをエステル結合させて重縮合することにより得られたポリブチレンテレフタレートに対する O-K 吸収端 NEXAFS 測定で、O1s→σ\*(O-CH<sub>2</sub>)由来のピークが 536.4 eV、O1s→σ\*(O=C)由来のピークが 545.1 eV に見られることが報告されているため[21]、PC bulk のスペクトルの 536.4 eV 及び 545～550 eV の肩構造はそれぞれ O1s→σ\*(O-CH<sub>2</sub>)と O1s→σ\*(O=C)を示すと考えられる。続いて O と P の結合について述べる。FePO<sub>4</sub> 粉末では 530.2 eV、531.5 eV、537.3 eV、544.6 eV にピークや肩構造が見られた。FePO<sub>4</sub> は Fe<sup>3+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>がイオン結合して形成される物質であるが、上述した O と C の結合の結果を考慮すると、530.2 eV は O1s(O=P)→π\*(O=P)、531.5 eV は O1s(O-P)→π\*(O=P)、537.3 eV は O1s→σ\*(O-P)、544.6 eV は O1s→σ\*(O=P)に由来すると考えられる。PC は PO<sub>4</sub> の状態ではなく P-O 結合が新たに C と結合している状態であるため、FePO<sub>4</sub> のスペクトルのπ\*やσ\*のピーク位置と全く同じエネルギー位置にピークが現れるとは考えにくい。しかしながら、O と P の結合に由来するπ\*やσ\*の位置と、O と C の結合に由来するπ\*やσ\*の位置はおおよそ同じであり、π\*は 528～533 eV、σ\*は 533～550 eV 付近に吸収が現れると分かった。以上を考慮して、PC bulk のスペクトルに見られたピークのうち、538.3 eV は、O と C または O と P の結合のうちで上述していないσ\*に由来するもの、もしくは上述したσ\*のピークの足し合わせで生じたと考えられる。

続いて、PC/Au sheet の O-K 吸収端 NEXAFS スペクトルについて述べる。PC/Au sheet のスペクトルは PC bulk と比較して、531.5 eV のピーク強度が大きく減少し、また、534.4 eV 及び 545～550 eV の肩構造が消失していた。これらのエネルギー位置は全て O=C または O=P 結合のπ\*やσ\*への吸収に由来する位置であるため、PC は Au 板表面に O=C または O=P 結合の O で吸着してそれら結合のπ\*やσ\*に Au から電子が逆供与されたと考

えられる。また、 $O=C$  や  $O=P$  の結合が解離した可能性も考えられる。さらに PC/Au sheet のスペクトルには 537 eV 付近及び 540 eV 付近に肩構造が見られた。537 eV 付近は PC bulk のスペクトルに見られた  $O1s \rightarrow \sigma^*(O-CH_2)$  や  $FePO_4$  粉末のスペクトルに見られた  $O1s \rightarrow \sigma^*(O-P)$  に近い位置であり、540 eV 付近は  $O1s \rightarrow \sigma^*(O-C)$  [21] に由来するピークに近い位置であることから、上記の吸収に由来するものであると考えられる。このように O が C や P と単結合している部分の吸収が PC/Au sheet のスペクトルで確認されたことから、PC は O-C や O-P よりも  $O=C$  や  $O=P$  の方が Au 板に吸着しやすいと考えられる。これらの結果は 5.3.1 の P-K 吸収端 NEXAFS 測定 と同じ結果を示している。

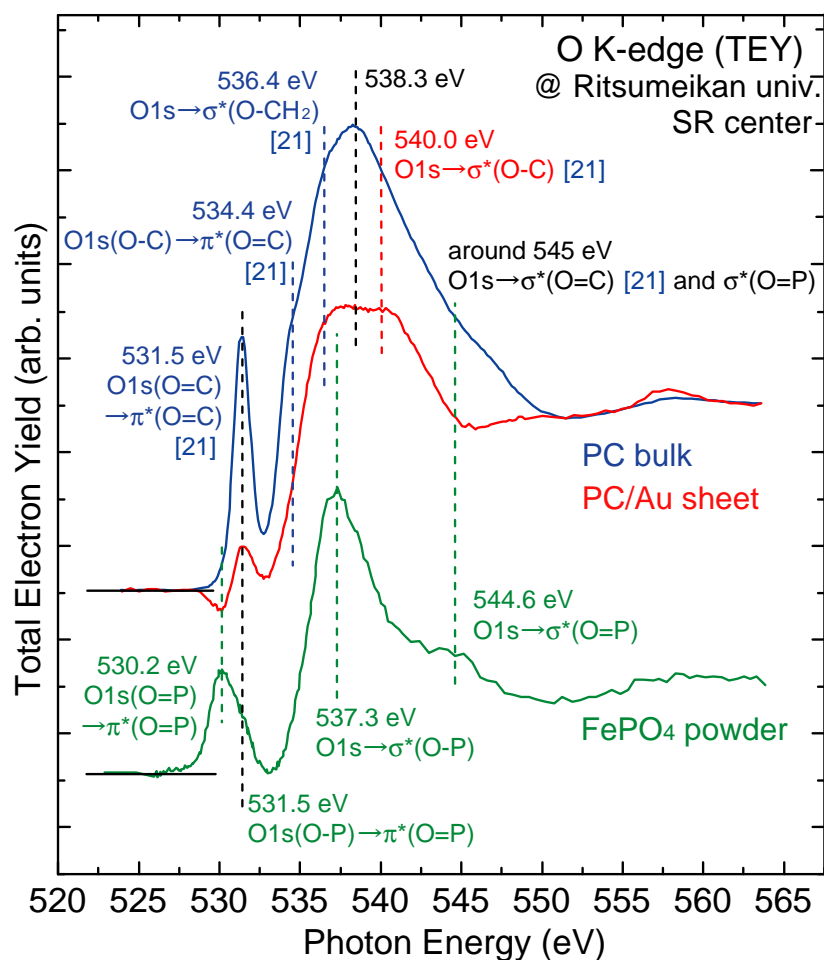


図 5-22 PC bulk、PC/Au sheet、 $FePO_4$  粉末の O-K 吸収端 NEXAFS スペクトル。

### 5.3.1 リポソームに対する Au ナノ粒子の存在位置

#### Au ナノ粒子の粒子径

図 5-23 に Au ナノ粒子の TEM 像、図 5-24 に TEM 観察より得た Au ナノ粒子の粒子径分布を示す。Au ナノ粒子の粒子径はナノ粒子の形状が楕円形の場合はその長径を測定した。100 粒子点を測定したところ、平均粒子径と標準偏差は  $13.4 \pm 3.3$  nm であった。PC リポソームと Au ナノ粒子の吸着反応後の TEM による観察を行いやすくするために、第 3 章や第 4 章で用いた Au ナノ粒子よりも大きな径の粒子を用いることにした。

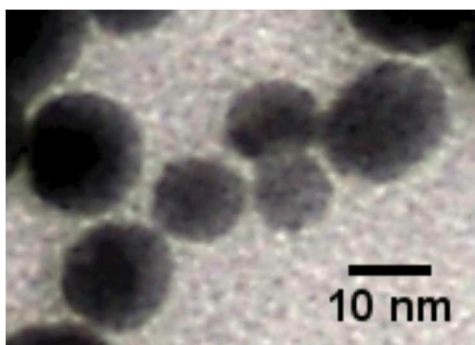


図 5-23 Au ナノ粒子の TEM 像.

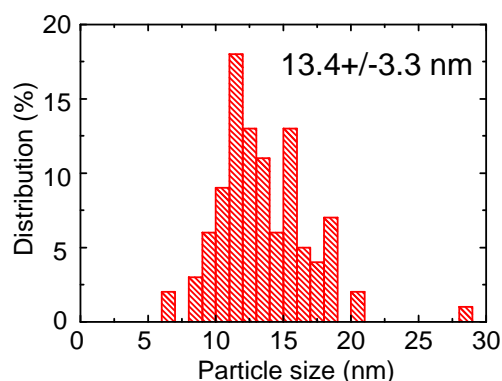


図 5-24 Au ナノ粒子の粒子径分布.

#### 作製された PC リポソーム

図 5-25 に作製した PC リポソームの TEM 像を示す。これはネガティブ染色法で準備した TEM 観察用試料である。PC 粉末を milli-Q 水に溶かして主転移温度以上に加温した後、ポリカーボネート膜に通すのみでリポソームが作製できたことが明らかになった。このリポソームは 400 nm の細孔のポリカーボネート膜を用いて作製したが直径が 200 nm 程度であった。しかし、図 5-25 以外に、図 5-26～図 5-28 に示すようなネガティブ染色法で調整した他の TEM 像も併せて考えると、リポソームの大きさは 100～400 nm 程度の分布を持っていると考えられる。

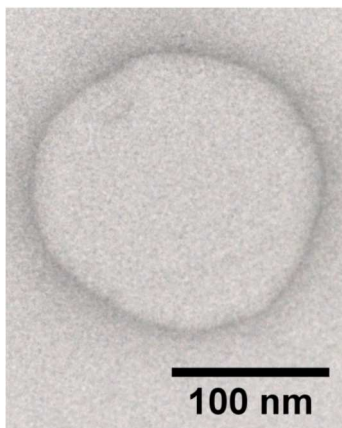


図 5-25 PC リポソームのネガティブ染色の TEM 像.

## ネガティブ染色法 (PCA100、PCA10)

図 5-26 と図 5-27 に PCA100 のネガティブ染色法で作製した試料の TEM 像を示す。2 つの図から Au ナノ粒子はリポソームの表面に吸着していることが分かった。さらに拡大図を見てみると、Au ナノ粒子について、膜で覆われているものと膜で覆われていないものの 2 通りが観察された。図 5-27 の拡大図で確認された Au ナノ粒子はリポソーム表面に吸着していないが、ナノ粒子を覆っている膜を介して互いに凝集しているように考えられる。この凝集の要因については、第 6 章で記述する。

以上より、Au ナノ粒子はリポソームとの吸着反応を促した際、(1)ナノ粒子がそのままリポソーム表面に吸着する、もしくは、(2)リポソームを成していない PC がナノ粒子を覆った後にリポソーム表面に吸着する、という 2 通りの反応が生じたと考えられる。この 2 通りの吸着過程は、それぞれ半分程度の割合で確認された。PC で覆われている Au ナノ粒子については染色剤によって膜の外側が染色されていることからリポソームの外側に吸着していると判断できる。一方で、PC で覆われていないナノ粒子については、図 5-26 や図 5-27 の TEM 像が投影図であるため、図 5-2 のように Au ナノ粒子がリポソームの脂質二重層の間やリポソームの内側に取り込まれたかどうかは解明できない。よって、超薄切片法によりリポソームをスライスし、断面図を観察することにした。ただし、PCA100 ではリポソームに吸着している Au ナノ粒子の個数が多く、上記に挙げた疑問点を解明することが困難と考えたため、PCA10 の試料を超薄切片法での TEM 観察試料に選んだ。図 5-28 に PCA10 に対してネガティブ染色法で作製した試料の TEM 像を示すが、明らかに図 5-26 や図 5-27 よりもナノ粒子の吸着量が少ないことが分かった。

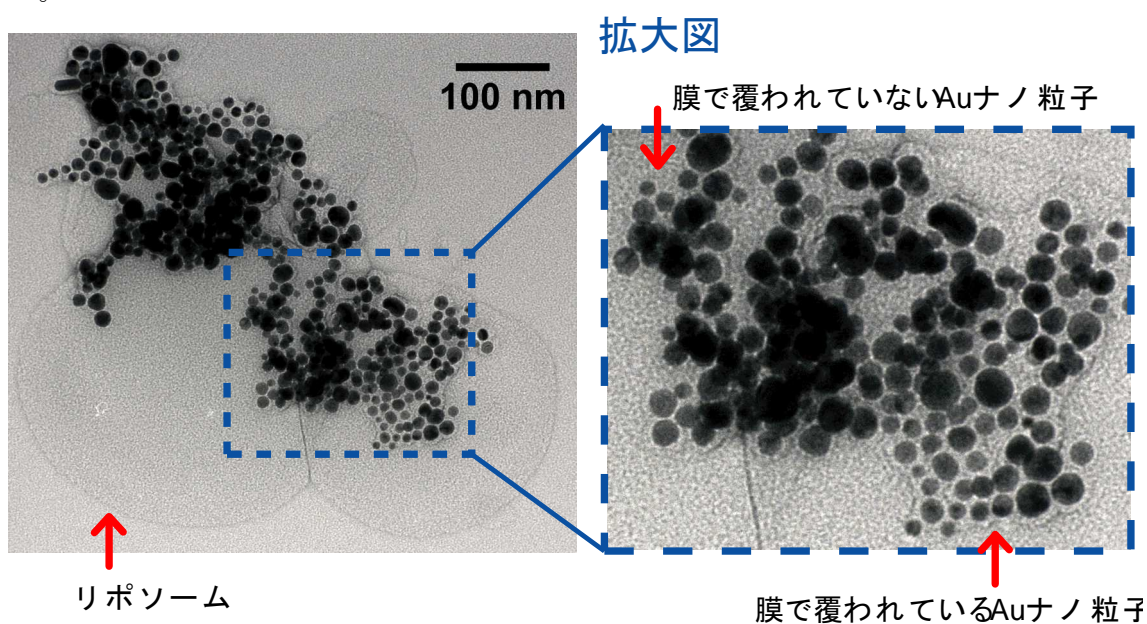


図 5-26 PCA100 をネガティブ染色法で調製した TEM 像. Au ナノ粒子が膜で覆われているものと覆われていないものの 2 通りが観察された.



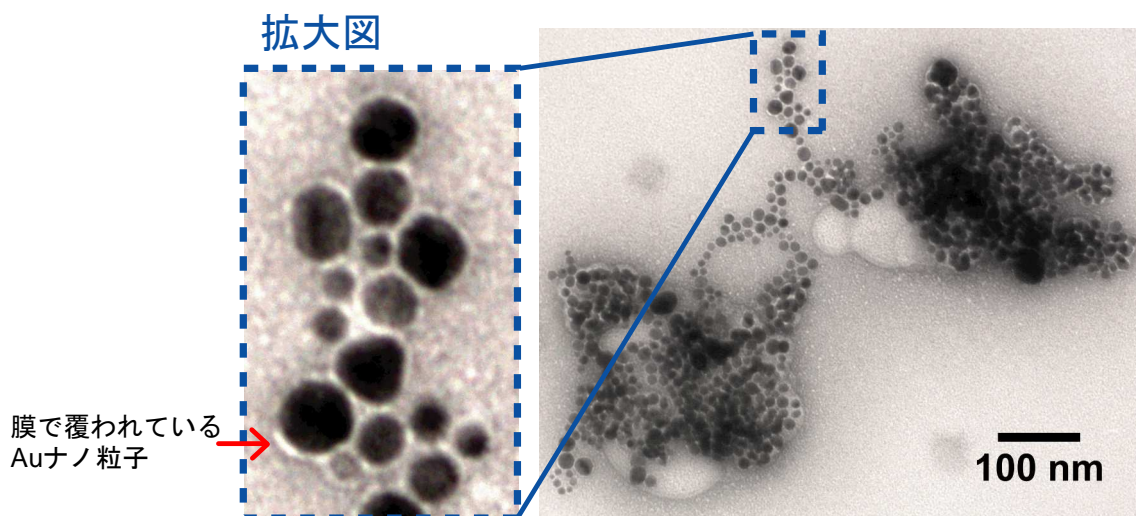


図 5-27 PCA100 をネガティブ染色法で調製した TEM 像. Au ナノ粒子は膜を介して凝集しているように見える.

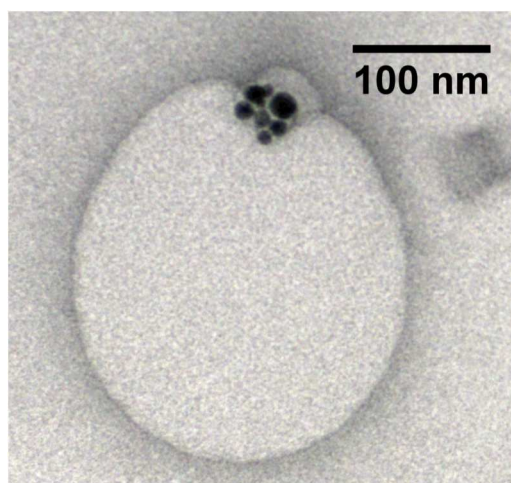


図 5-28 PCA10 をネガティブ染色法で調製した TEM 像.

### 超薄切片法 (PCA10)

図 5-29 に PCA10 の超薄切片法で作製した試料の TEM 像を示す。この試料は樹脂に包埋しているが、高分子が PC リポソームの脂質二重層を通り抜けてリポソーム内部まで樹脂が入りきらなかったため、リポソームの内側が明るく観察されていると考えられる。また、5.2 の超薄切片の試料作製に関する説明部分で「脂質の固定と染色にはオスミウム酸が適している」、「オスミウム酸が強い酸化剤であるために脂質の炭化水素鎖の C=C と反応する」と記述したが、PCA10 の超薄切片試料では染色が行われているように見られなかった。この理由として、1つの PC に存在する C=C 結合の数が少なかったこと、及びリポソームを構成する PC の炭化水素鎖同士で分子間力が生じて密に脂質二

重層を構成していたことが考えられる。また、PC リポソームの内側と Au ナノ粒子の間に灰色の帯状の部分が観察されたが、これは 5.3.2 のネガティブ染色法 (PCA100、PCA10) の結果を考慮すると、(1)リポソームの脂質二重層のみから構成、または、(2)リポソームの脂質二重層と Au ナノ粒子表面に吸着した PC から構成、のどちらかに由来するものと考えられる。(1)は Au ナノ粒子がそのままリポソーム表面に吸着したこと、(2)はリポソームを成していない PC がナノ粒子を覆った後にリポソーム表面に吸着したこと、のそれぞれにより構成されたと考えられる。ここで、図 5-29 の拡大図にて赤色の矢印で挟んだ部分のように、リポソーム内側と Au ナノ粒子の各面が直交するようにして灰色の帯状の長さを 40 か所測定したところ、平均長さ及び標準偏差は  $7.1 \pm 1.6$  nm であった。その分布図を図 5-30 に示す。

まず、灰色の帯状の部分が (2)リポソームの脂質二重層と Au ナノ粒子表面に吸着した PC から構成されたとき に関して考察する。5.3.1 の N, O, P-K 吸収端 NEXAFS 測定の結果から、PC は Au 板表面に親水基の部分 (N-CH<sub>3</sub> や PO<sub>4</sub>) や疎水基の中でも親水基寄りの O-C や O=C で吸着していることが明らかになったため、簡易的に図 5-31 (a) のように親水基全体で PC がナノ粒子表面に吸着していると仮定する。PC は疎水基を構成する炭化水素鎖の炭素の数によって長さが異なっているが、PC の親水基から疎水基の各末端までを分子の長さとして定義すると約 2.0~2.5 nm であると報告されている [1,22]。さらに PC は親水基と疎水基が一直線上に無く、おおよそ 30°の傾きを成していると報告されているため [23-27]、図 5-31 (b) のように PC の疎水基が Au ナノ粒子の円弧の接線方向から 30°の傾きをもっていると考えられる。ここで PC の長さ 2.0~2.5 nm を斜辺にした直角三角形を考えると、赤色の矢印で示した長さは 1.0~1.25 nm であり、これが PC 一分子分によって構成される層の厚さになる。続いて、PC で覆われた Au ナノ粒子が PC リポソーム表面に吸着したときを考える。この説明の図を図 5-32 と図 5-33 に示す。本論文の PC リポソームは水を溶媒にして作製しているため、リポソームの脂質二重層は親水基が外を向くと判断できる。また、親水基と疎水基では結合を形成しにくいので、Au ナノ粒子の周囲を PC 一分子分の層で覆われている状態ではナノ粒子は安定にリポソーム表面に吸着できない。よって PC が Au ナノ粒子表面に一分子分の層の吸着をした後、さらに他の PC の疎水基で Au ナノ粒子表面の PC の疎水基と結合をもつことで、Au ナノ粒子表面には合計で PC 二分子分の層、つまり脂質二重層が形成されたと考えられる。最終的に PC リポソームの内側から Au ナノ粒子表面までには 4 分子分の PC の層が存在していると考えられる。ここで、PC 一分子分の層の厚さを  $d$  と置くと、4 分子分の PC で構成される層の厚さは  $4d$  である。5.3.1 の N, O, P-K 吸収端 NEXAFS 測定の結果を考慮して、PC が Au ナノ粒子表面に親水基の部分 (N-CH<sub>3</sub> や PO<sub>4</sub>) や疎水基の中でも親水基寄りの O-C や O=C で吸着したために、PC の疎水基が Au ナノ粒子の円弧の接線方向から 30°の傾きをもっており、かつ、リポソームを構成している全ての PC も Au ナノ粒子に対して 30°の傾きを成している場合は  $1.0 \text{ nm} \leq d \leq 1.25 \text{ nm}$  であるため、



4分子分の層の厚さは  $4.0\text{ nm} \leq 4d \leq 5.0\text{ nm}$  になる。一方で、PCが親水基末端の  $\text{N-CH}_3$  で Au ナノ粒子表面に吸着したために、PCの疎水基が Au ナノ粒子表面に対して直立しており、かつ、リポソームを構成している全ての PC も Au ナノ粒子表面に対して直立している場合、PC一分子分の長さをそのまま  $d$  と考えられるので  $2.0\text{ nm} \leq d \leq 2.5\text{ nm}$  であり、4分子分の厚さは  $8.0\text{ nm} \leq 4d \leq 10.0\text{ nm}$  になる。リポソーム内側と Au ナノ粒子の間に確認された灰色の帯状の部分の平均長さ及びその標準偏差は  $7.1 \pm 1.6\text{ nm}$  であったが、この数値は、4分子分の全ての PC の疎水基が Au ナノ粒子表面の接線方向に対して  $30^\circ$  傾いているときの最短の長さの  $4.0\text{ nm}$  より大きく、Au ナノ粒子表面に対して直交しているときの最長の長さの  $10.0\text{ nm}$  よりも小さい。また、[図 5-30](#) に示した灰色の帯状の部分の長さに対する分布をみると、ほとんどが  $4.0\text{ nm} \sim 10.0\text{ nm}$  の間の長さであることが分かった。したがって、[図 5-29](#) に観察された灰色の帯状の部分は、(2)リポソームの脂質二重層と Au ナノ粒子表面に吸着した PC によって構成されており、そこには PC 4分子分の厚さが反映されていると考えると理に適っている。

続いて、灰色の帯状の部分が (1)リポソームの脂質二重層のみから構成されたときを考察する。(2)の考察で記述した内容を応用して、[図 5-34](#) のように、リポソームの脂質二重層の PC が  $30^\circ$  の傾きを成している場合と、直立している場合の2通りを考える。 $30^\circ$  の傾きを成している場合は PC 一分子分の層の厚さが  $1.0\text{ nm} \leq d \leq 1.25\text{ nm}$  であるため、リポソームの脂質二重層を構成する厚さ  $2d$  は、 $2.0\text{ nm} \leq 2d \leq 2.5\text{ nm}$  になる。また、直交している場合は PC 一分子分の層の厚さが  $2.0\text{ nm} \leq d \leq 2.5\text{ nm}$  であるため、リポソームの脂質二重層を構成する厚さ  $2d$  は、 $4.0\text{ nm} \leq 2d \leq 5.0\text{ nm}$  になる。よって脂質二重層の厚さは最短で  $2.0\text{ nm}$ 、最長で  $5.0\text{ nm}$  と考えられる。[図 5-30](#) に示した灰色の帯状の部分の長さに対する分布をみると、 $3.0 \sim 4.0\text{ nm}$  付近に多少の分布が見られることから、灰色の帯状の部分は (1)リポソームの脂質二重層のみで構成される部分も存在していると考えられる。

また、[図 5-29](#) で示した超薄切片の TEM 像では、PC リポソームの周りに吸着している Au ナノ粒子が PC 分子を介さずに互いに重なっているような部分が見られた。5.3.2 の Au ナノ粒子の粒子径に関する結果から、Au ナノ粒子の平均粒子径と標準偏差は  $13.4 \pm 3.3\text{ nm}$  であると分かっている。さらに、マイクロトームで超薄切片を作製する際に、切片を切るときの厚さを  $50\text{ nm}$  に設定していたため、切片中では電子線の入射方向に対して複数の Au ナノ粒子が重なっている可能性があり、これにより Au ナノ粒子が PC を介さずに互いに重なっているように見えたと考えられる。また、[図 5-29](#) の TEM 像から、Au ナノ粒子はリポソームの脂質二重層の間やリポソームの内側に存在せず、リポソームの外側にのみ吸着している様子が観察された。エポキシ樹脂を作製する際に用いた4つの溶剤の各分子量は、Poly/Bed 812 が  $260.3$ 、DDSA が  $266.38$ 、NMA が  $178.2$ 、DMP-30 が  $265.45$  であり、Egg 由来の PC の平均分子量  $770.123$  の  $1/3 \sim 1/4$  倍である。Egg 由来の PC の構成元素は P 以外だと C, N, O の軽元素であり、エポキシ樹脂の各溶

剤の構成元素も C, O の軽元素から構成される。よって、分子量から分子の大きさを判断した際、溶剤の方が Egg 由来の PC よりも小さいと考えられる。しかし樹脂がリポソーム内側に入り込めていないことを考えると、リポソームを構成する Egg 由来の PC の疎水基同士の分子間力が強いことが分かる。Au ナノ粒子はエポキシ樹脂を構成する分子もしくは Egg 由来の PC よりも明らかに大きいため、ナノ粒子がリポソームの内側に取り込まれることは困難であると考えられる。また、脂質二重層を構成する PC がリポソームの外側と内側を移動するというフリップ-フロップという現象はほとんど生じないと報告されているが[1]、Au ナノ粒子がリポソームに吸着することでも変化はないことが予測された。ただし、Au ナノ粒子の粒子径が PC 一分子よりも小さい場合は異なる結果になることも考えられる。

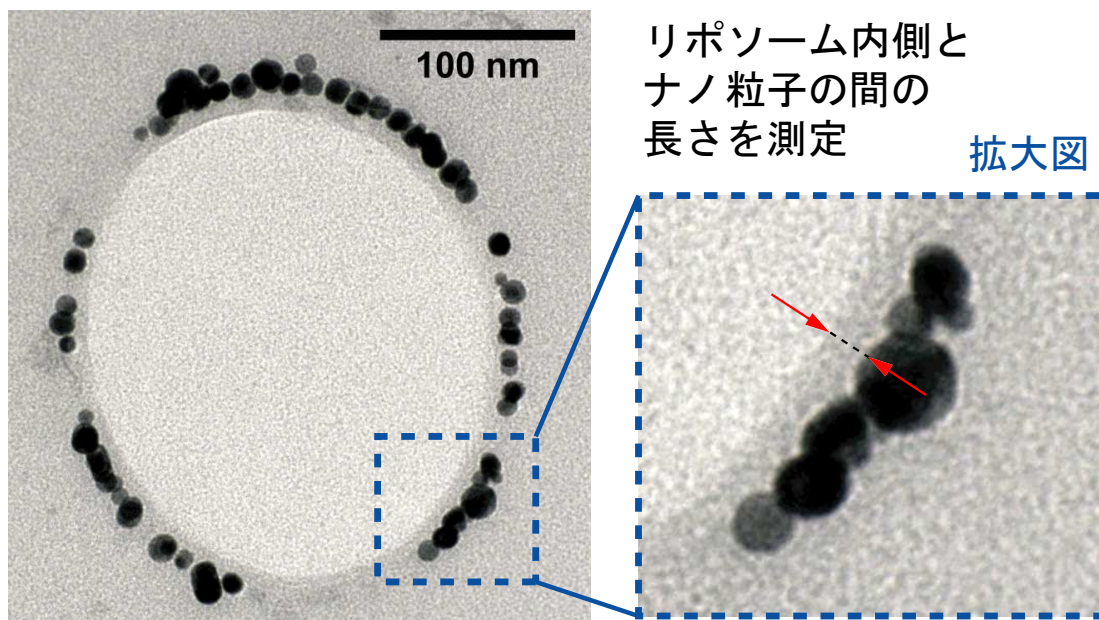


図 5-29 PCA10 を超薄切片法で調整した TEM 像.

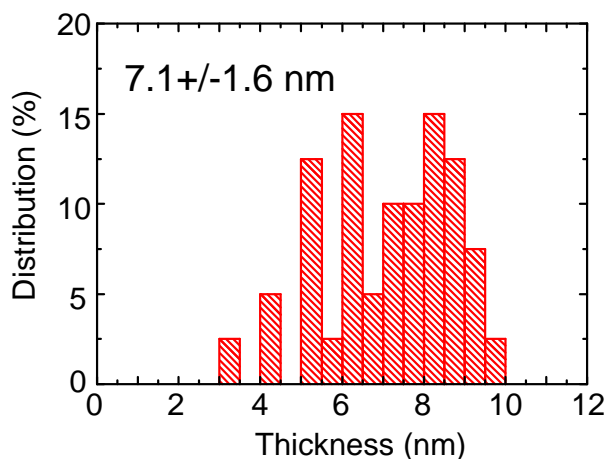


図 5-30 図 5-29 でリポソーム内側と Au ナノ粒子の間に確認された灰色の帯状の部分の長さ分布.

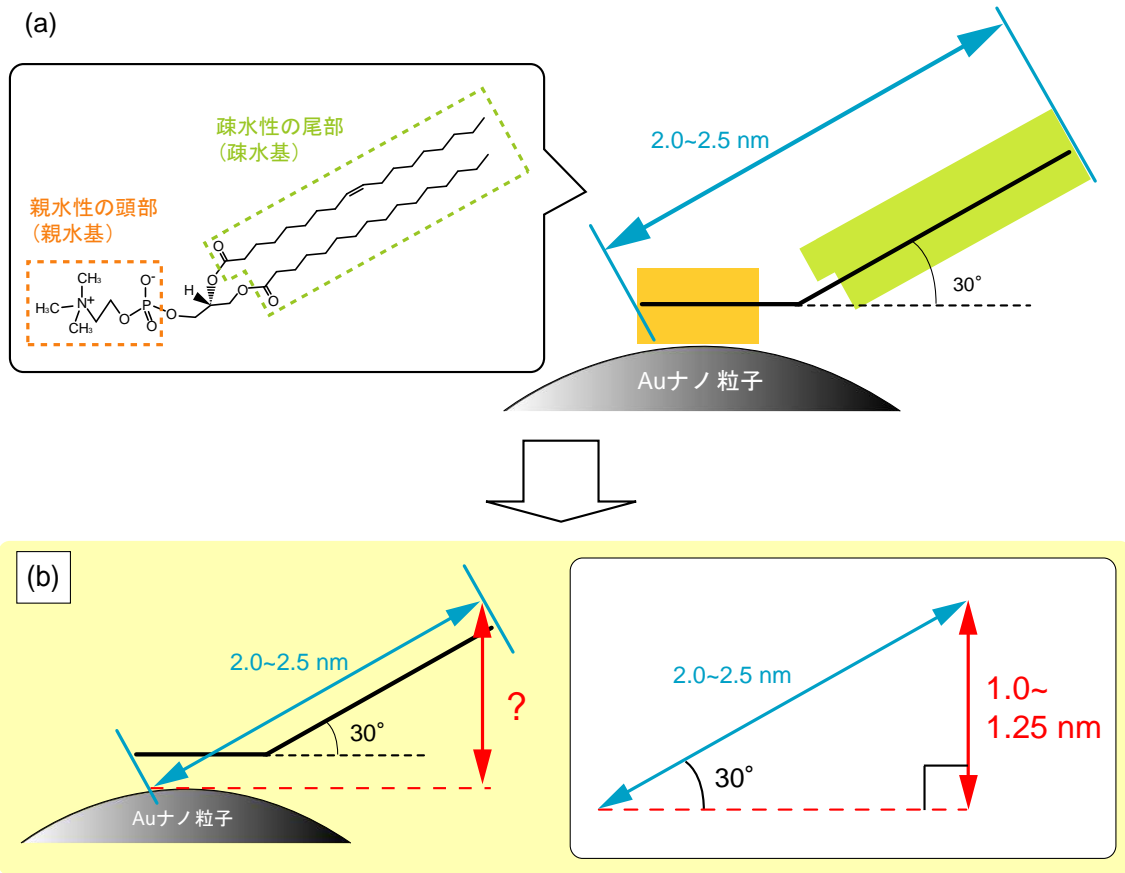


図 5-31 Au ナノ粒子表面が PC 一分子分で覆われている際の膜の厚さの計算.

30° の傾きを持っている場合 (最短の長さ)

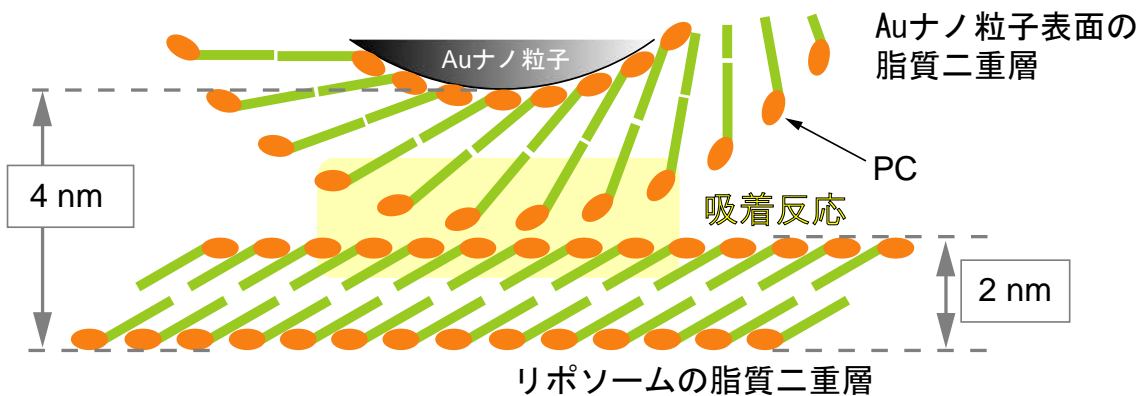


図 5-32 Au ナノ粒子が PC で覆われた後にリポソーム表面に吸着したときで、全ての PC が Au ナノ粒子の円弧の接線方向に対して 30°傾いている場合.

直立している場合(最長の長さ)

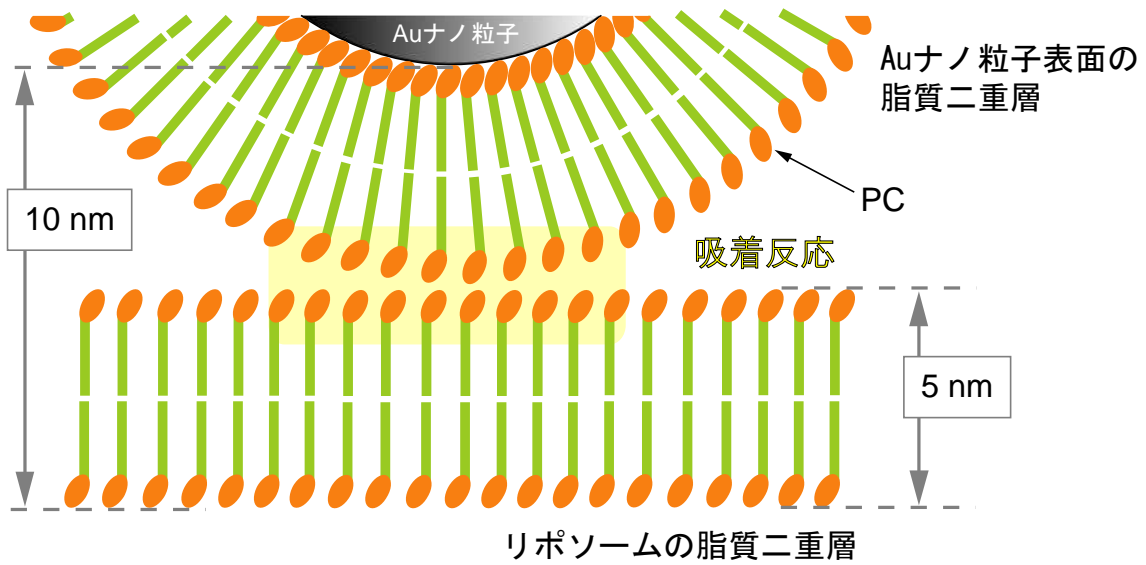
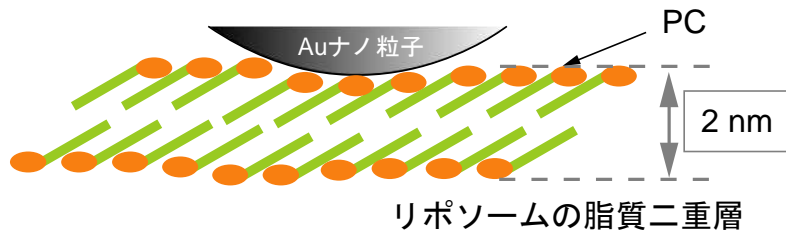


図 5-33 Au ナノ粒子が PC で覆われた後にリポソーム表面に吸着したときで、全ての PC が Au ナノ粒子表面に対して直立している場合.

30° の傾きを持っている場合(最短の長さ)



直立している場合(最長の長さ)

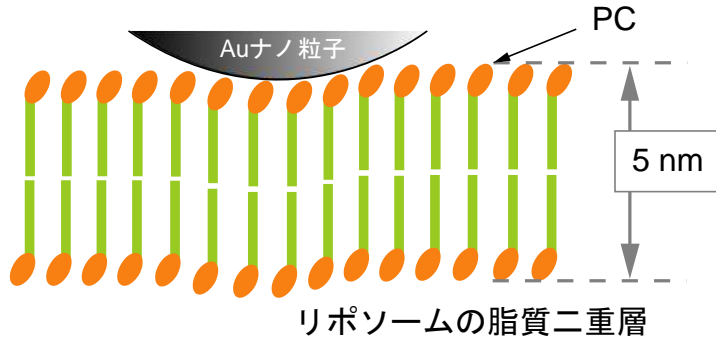


図 5-34 Au ナノ粒子がそのままリポソーム表面に吸着したときで、リポソームの脂質二重層の PC が 30° の傾きを成している場合と直立している場合.

## 5.4 まとめ

PC リポソーム水溶液を Egg 由来の PC 粉末と milli-Q 水を用いた押し出し法、また、Au ナノ粒子水溶液を Au ロッド、蒸留水、KCl を用いた液中プラズマ法により作製した。それら PC リポソーム水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液を混合して吸着反応を促した試料に対して TEM 観察を実施し、さらに、PC と Au 板表面の分子吸着反応を水環境下で促した試料に対して N, O, P-K 吸収端 NEXAFS 測定を行うことで、以下の点が明らかになった。

- (1) PC は Au 板表面に N-CH<sub>3</sub> や PO<sub>4</sub>、O-C、O=C の部分で吸着反応をしていることが分かった。また、PC の O-P、O-C、O=P、O=C 結合の中でも、二重結合を形成している O の方が Au 板と吸着反応が生じやすいことが示唆された。この結果は Au ナノ粒子の場合にも適応できると考えたため、PC は Au ナノ粒子表面に上述した官能基で吸着反応を生じると言える。
- (2) 液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子の平均粒子径及び標準偏差は 13.4±3.3 nm である。
- (3) PC 粉末と水のみでも、相転移温度を考慮することで、押し出し法により PC リポソームの作製が可能である。
- (4) PC リポソーム水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液を混合して吸着反応を促した際、Au ナノ粒子はリポソームの外側に吸着しており、リポソームの内側には取り込まれていないことが分かった。また、この Au ナノ粒子のリポソームへの吸着過程について、次の 2 通りが考えられる。
  - (i) PC の膜で覆われていない Au ナノ粒子がそのままリポソームの外側に吸着し、リポソームの親水基と Au ナノ粒子が結合する
  - (ii) リポソームの構成に寄与していない PC が Au ナノ粒子表面に吸着して、親水基を外側にもつ脂質二重層の膜を形成した後、その Au ナノ粒子表面の PC の親水基がリポソームの外側の親水基と相互作用する
- (5) 超薄切片法の TEM 像から、リポソームの内側と Au ナノ粒子表面までの間の PC から成る層の厚さとその標準偏差は 7.1±1.6 nm であり、分布は 3~10 nm の広がりをもっていることが分かった。この厚さの値と分布は、Au ナノ粒子表面に対する PC の吸着角度を考慮して立てたモデルから判断して、PC が 4 分子分、もしくは 2 分子分で形成されると仮定した場合、(4)で述べた(i)及び(ii)の吸着過程のどちらも満たすことを確かめた。
- (6) 脂質二重層を構成する PC がリポソームの外側と内側を移動するというフリップ-フロップという現象はほとんど生じないと報告されているが、平均粒子径 13.4 nm の Au ナノ粒子がリポソーム表面に吸着した場合もその生じやすさに変化がないと予

測される。

以上より、分子吸着が可能な表面をもった Au ナノ粒子は、PC リポソームの外側で安定に存在することが分かった。本研究では、Au ナノ粒子そのもの、もしくは、リポソームの形成に寄与しなかった PC が Au ナノ粒子表面に吸着して膜を形成した後に脂質二重層に吸着したことが推測された。実際の生体内では PC などのリン脂質分子は細胞内部で生成されるため、Au ナノ粒子が生体内に投与された場合は Au ナノ粒子そのものが細胞の脂質二重層に吸着すると考えられる。また、生体適合性の高い Au ナノ粒子の作製のために、PC でナノ粒子表面を覆った PC 修飾 Au ナノ粒子を作製した場合も、細胞の脂質二重層に吸着することが予測される。



## 参考文献

- [1] 中村桂子、松原謙一／監訳「Essential 細胞生物学 原書第2版」南江堂 (2009).
- [2] M. Deserno, W.M. Celbart, *The Journal of Physical Chemistry B* **106** (2002) 5543-5552.
- [3] O.L. Bihan, P. Bonnafous, L. Marak, T. Bickel, S. Trépout, S. Mornet, F.D. Haas, H. Talbot, J.-C. Taveau, O. Lambert, *Journal of Structural Biology* **168** (2009) 419-425.
- [4] D. Pornpattananangkul, S. Olson, S. Aryal, M. Sartor, C.-M. Huang, K. Vecchio, L. Zhang, *ACS NANO* **4** (2010) 1935-1942.
- [5] S. Thamphiwatana, V. Fu, J. hu, D. Lu, W. Gao, L. Zhang, *Langmuir* **29** (2013) 12228-12233.
- [6] 八田一郎、村田昌之／編「シリーズ・ニューバイオフィジックスII [4] 生体膜のダイナミクス」共立出版株式会社 (2000).
- [7] 松木均、金品昌志、*Netsu Sokutei* **33** (2006) 74-82.
- [8] 末崎幸生／著「脂質膜の物理」九州大学出版会 (2007).
- [9] 奥直人／著「リポソームの作成と実験法」廣川書店 (1991).
- [10] Avanti Polar Lipids 社のホームページの製品説明より引用：  
[http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=260&Itemid=212&catnumber=840051](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=260&Itemid=212&catnumber=840051), 2014年12月29日最終閲覧.
- [11] Mini-Extruder の取り扱い説明書より引用.
- [12] 村司雄一、*The TRC News* **111** (2010) 34-35.
- [13] 岩崎憲治、宮崎直幸、伊藤喜子、高木淳一、*顕微鏡* **47** (2012) 44-50.
- [14] 伊藤利章、*北海道大学農学部技術部研究・技術報告* **2** (1995) 16-24.
- [15] 程晶磊、藤田秋一、大崎雄樹、鈴木倫毅、篠原友樹、藤本豊士、*名古屋大学全学技術センター 第5回技術研修会報告の要旨* (2011).
- [16] 羊土社ホームページ、実験医学 online へようこそ バイオキーワード集：  
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/1549.html>, 2014年12月29日最終閲覧.
- [17] 臼倉治郎／著「よくわかる 生物電子顕微鏡技術 プロトコル・ノウハウ・原理」共立出版 (2008).
- [18] T. Nomoto, S. Yagi, G. Kutluk, K. Soda, E. Hashimoto, M. Taniguchi, *Journal of Surface Analysis* **12** (2005) 238-243.
- [19] S. Gohda, T. Ashida, S. Yagi, H. Namatame, M. Taniguchi, *Journal of Surface Analysis* **14** (2008) 458-461.
- [20] C. Tsukada, S. Ogawa, T. Mizutani, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, S. Yagi, *Applied Surface Science* **262** (2012) 184-187.
- [21] T. Okajima, K. Hara, M. Yamamoto, K. Seki, *BUNSEKI KAGAKU* **59** (2010) 477-488.
- [22] S.-H. Park, S.-G. Oh, J.-Y. Mun, S.-S. Han, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **48** (2006) 112-118.

- [23] H. Asakawa, S. Yoshioka, K. Nishimura, T. Fukuma, *ACSNANO* **6** (2012) 9013-9020.
- [24] K. Tu, D.J. Tobias, J.K. Blasie, M.L. Klein, *Biophysical Journal* **70** (1996) 595-608.
- [25] D.A. Pink, M. Belaya, V. Levadny, B.A. Quinn, *Langmuir* **13** (1997) 1701-1711.
- [26] J. López-Cascals, T.F. Otero, L. Fernández-Romero, A.J. Camachoe, *Langmuir* **22** (2006) 5818-5824.
- [27] E.C. Mbamala, A. Fahr, S. May, *Langmuir* **22** (2006) 5129-5136.

## 第6章 PC修飾したAuナノ粒子の作製とそのふるまい

### 6.1 はじめに

Au ナノ粒子を生体内に投与する場合、ナノ粒子に生体適合性を持たせることは重要である。生体への投与を念頭に置くと、本論文で記述しているように分散剤などの生体適合性の低い試薬を用いずに Au ナノ粒子を作製できることは大きな利点である。しかし、第4章の結果から、作製した Au ナノ粒子と L-システインは水環境下で迅速に吸着反応を生じることが明らかになったため、作製したままの状態では Au ナノ粒子を生体に投与することは、ナノ粒子と生体分子で吸着反応を生じ、結果として細胞や組織の損傷につながる可能性がある。さらに、分子の吸着により Au ナノ粒子の光の吸収波長が変化することから、温熱療法やドラッグデリバリーなどの機能を持たせたナノ粒子がその機能を果たせない状態になることも考えられる。よって、Au ナノ粒子表面で分子吸着反応が生じないような材料作製の工夫が必要である。H. Takahashi らは溶液還元法を用いて作製した Au ナノ粒子の表面を生体細胞の脂質二重層を主に構成するフォスファチジルコリン (PC) で修飾して、生体適合性の高いナノ粒子を作製できたと報告している [1]。また、第5章において、TEM 観察と NEXAFS 測定の結果から、液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子表面に PC が主に親水基で吸着し、ナノ粒子の周囲を覆って膜を形成した後に膜を介してナノ粒子が凝集すると示唆されたが、その凝集の要因は明らかになっていない。H. Zhu らは PC で修飾された Au ナノ粒子の作製後に TEM 観察を行った結果、PC 二層分の厚さがナノ粒子間に観察されたため、PC の疎水基の炭化水素鎖を介して凝集したと考察している [2]。しかし、それは TEM 観察の結果のみであり、推測の状態である。PC は軽元素で構成されるために Au ナノ粒子表面への吸着や膜の形成により、PC 内の各結合に起因する分子振動が変化すると考えられる。赤外分光 (IR) 測定はこの変化の解明に適した分光学的手法であるが、赤外光を照射する試料範囲内で試料が均一な厚さであることが理想である。しかし PC は水環境中で凝集体を形成しやすく、また、上述したように Au ナノ粒子も PC の吸着により凝集すると考えられるため、数  $\text{mm}^2$  の広範囲に渡って均一な膜を作製することが困難である。したがって、室内光源よりも輝度が高く、狭い範囲での測定が可能な、放射光を用いた顕微 IR 測定に注目した。

よって、本章では液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子に対して、後から PC を修飾するというボトムアップにより生体適合性の高いナノ粒子の作製を試み、さらにその PC 修飾 Au ナノ粒子が起こすふるまいとその要因について、TEM 測定と顕微 IR 測定により明らかにすることを目的とする。

## 6.2 実験

### Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製

Au ナノ粒子コロイド水溶液は液中プラズマ法で作製した。作製手法と各条件の詳細は 2.1 に記述している。

### PC 修飾 Au ナノ粒子の作製

第 5 章で詳細を述べたが、PC は水に溶解すると単分子ではなく凝集体として存在する方が安定である。よって PC が Au ナノ粒子表面を覆っている状態 (PC 修飾 Au ナノ粒子と記す) を作製するために、少量の PC が溶けた水溶液を多量の Au ナノ粒子コロイド水溶液に加えて分子吸着反応を促すことを考えた。また、Egg 由来の PC には -53 ~ 55°C の間の様々な相転移温度をもった分子が含まれているが、PC の凝集体の生成をなるべく抑えるために 4°C で PC と Au ナノ粒子の吸着反応を促すことにした。4°C は水が凍らない温度の中で最も低い温度として選択した。

Au ナノ粒子コロイド水溶液を 1 mL ずつ、1.5 mL 用マイクロチューブに入れたものを複数本準備して 4°C の冷蔵庫に入れて冷却した。複数本のマイクロチューブを準備した理由としては、1 本のマイクロチューブあたりに作製できる PC 修飾 Au ナノ粒子の量が少ないためである。Egg 由来の PC 粉末 (>99%, Avanti Polar Lipids 社製) を 1 mL 秤量して 2 mL 用マイクロチューブに入れ、さらに 4°C の milli-Q 水を 2 mL 加えてボルテックスミキサーを用いて PC 粉末の塊が完全に溶解するまで攪拌した。遠心分離機 (マイクロ冷却遠心機 3520, KUBOTA 社製) 中の温度を 4°C に冷やしておいた後、PC 懸濁液の入ったマイクロチューブを装置内に入れて、4°C、20000 rcf、5 分間の条件で遠心分離を行い、PC の大きな凝集体を沈澱させ、[図 6-1](#) のように PC 上澄み水溶液と沈澱物に分離した。また、これ以降に記述する作業は[図 6-1](#) に写真も載せてまとめて示している。4°C に冷却していた Au ナノ粒子コロイド水溶液に PC 上澄み水溶液を 100  $\mu$ L ずつ加えてボルテックスミキサーで攪拌した後、4°C で放置して分子吸着反応を促した。12 ~ 24 時間後、マイクロチューブの底面や壁面に目視で見える細かな黒色の凝集体が付着していたため、マイクロピペットの先端を用いて底面や側面をこすって大きな凝集体にして沈澱を促した。複数本のマイクロチューブの底に沈澱した凝集体を分取して一つのマイクロチューブに集めた。黒色の凝集体を分取する際に赤色の Au ナノ粒子コロイド水溶液も共に吸い取ってしまうため、数時間放置して凝集体をマイクロチューブの底に沈澱させた後、赤色の上澄み溶液を吸い取って沈澱物のみを残し、そこに milli-Q 水を 1 mL 加えてボルテックスミキサーで攪拌した (1 回目のリンス)。数時間放置して凝集体を沈澱させた後、生じた沈澱物を新しいマイクロチューブに分取し、milli-Q 水を 1 mL 加えてボルテックスミキサーで再び攪拌した (2 回目のリンス)。1 回目のリンスで用いたマイクロチューブの壁面には未反応の PC や Au ナノ粒子が付着している可能性

が懸念されたため、沈殿物を分取して新しいマイクロチューブに移して2回目のリンスを行ったが、3回目のリンス以降は凝集体の沈殿を促した後、透明な上澄み溶液をマイクロチューブから除去した後に milli-Q 水に加えてボルテックスミキサーで攪拌するというリンスの作業を行った。上記の手順で、milli-Q 水を用いた凝集体のリンスを 3~4 回行った。リンス後の黒色の凝集体の沈殿物を“PC 修飾 Au ナノ粒子”と記す。

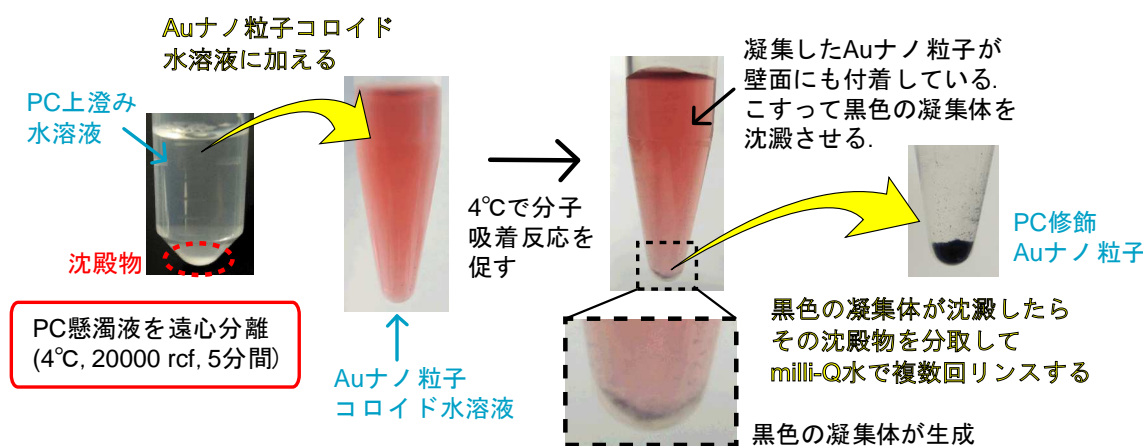


図 6-1 PC 修飾 Au ナノ粒子の作製の手順.

### TEM 観察用試料の作製

PC 修飾 Au ナノ粒子の TEM 観察用試料はネガティブ染色法で作製した。グリッドと TEM 観察用試料の作製方法の詳細は 5.2 実験の TEM 観察用グリッドおよび TEM 観察用試料の作製の【ネガティブ染色法】で記述しているが、第 5 章とは用いた染色剤が異なり、pH7 の 2% リンタングステン酸水溶液を調整して染色に使用した。次に、2% リンタングステン酸水溶液の作製方法について述べる。

リンタングステン酸（正式名：12 タングストリン酸 n 水和物、関東化学社製）を 20 mg 秤量し、1.0 mL の milli-Q 水に溶かした。この時点でリンタングステン酸水溶液は pH が 1~2 程度の強酸性のため、pH が 7 付近の中性になるように 2N の NaOH を 25  $\mu$ L 加えた。pH の判断は、pH 試験紙に調製した溶液を滴下した後、試験紙の色を目視で確認して行った。

続いて、TEM 観察用試料の作製方法について述べる。パラフィルム/シャーレの上に親水化処理をしたカーボン/フォームバール膜/Cu グリッドを置き、PC 修飾 Au ナノ粒子を 4  $\mu$ L 取ってグリッドの上に滴下して 10 分間放置した。pH7 の 2% リンタングステン酸水溶液の水滴を 1 つ、milli-Q 水の水滴を 2 つ、10 mm<sup>φ</sup>程度の大きさでパラフィルム/シャーレの上に準備した。PC 修飾 Au ナノ粒子/グリッドを リンタングステン酸水溶液 → milli-Q 水 → milli-Q 水 の順番で各水滴に 3 回ずつくぐらせ、グリッド上に接着していない PC 修飾 Au ナノ粒子の除去、リンタングステン酸水溶液による染色を行った。水滴にくぐらせた後のグリッドをパラフィルム/シャーレ上に置き、グリッド上の

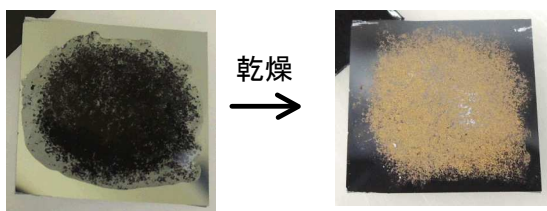
余分な水滴をろ紙を用いて除去し、自然乾燥させた。第5章で用いていた酢酸ウランと同様にリンタングステン酸水溶液の水滴を3つ準備して染色を行うと、リンタングステン酸の量が多いためにリンタングステン酸の結晶ができてしまい、試料の観察ができなかったため、リンタングステン酸水溶液の水滴にグリッドをくぐらせた後、milli-Q水の水滴にくぐらせることで、余分なリンタングステン酸水溶液を除去する工夫を行った。

#### 顕微 IR 測定用試料の作製と測定条件

Si(100)ウェハ ( $725 \mu\text{m}^2$ ) を 15 mm 角に切り出し、エタノールによる超音波洗浄を行った。図 6-2 のように洗浄した Si ウェハ上に PC 修飾 Au ナノ粒子を 40  $\mu\text{L}$  滴下して自然乾燥させた。この試料を PC 修飾 Au ナノ粒子と呼ぶ。また、Au ナノ粒子と未反応の PC に関する標準試料として、脂質二重層を形成して炭化水素鎖同士で結合を成している状態の PC に由来する波数を求めたいため、一度リポソームを作製した後に Si ウェハ上に滴下して自然乾燥させることにした。Egg 由来の PC 粉末 (>99%, Avanti Polar Lipids 社製) を 5 mg 秤量して 1 mL の milli-Q 水に溶かした後、5.2 の PC リポソームの作製 で記述した手順で PC 懸濁液を 100 nm の細孔をもつポリカーボネート膜に 85 回通して PC リポソームを作製した。ポリカーボネート膜に通す回数が多いほどリポソームの大きさが整うことが分かったため、第5章の時よりもポリカーボネート膜に通す回数を増やした。図 6-2 のように PC リポソーム水溶液を Si ウェハ上に 100  $\mu\text{L}$  滴下して自然乾燥させた。この試料を PC リポソームと呼ぶ。また、上記2つの試料をなるべく早く乾燥させるために、ドラフター内で水の蒸発を促したが、それに伴って PC リポソーム水溶液については溶液が Si ウェハの角に向かって流れた状態になった。

顕微 IR 測定は  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  の範囲に対して行い、透過法で測定した。検出器は液体窒素冷却下で使用する半導体型のテルル化カドミウム水銀 (MCT: Mercury-Cadmium-Tellurium) 検出器を用い、分解能は  $2 \text{cm}^{-1}$ 、積算測定回数は 500 回で行った。

PC修飾Auナノ粒子



PCリポソーム

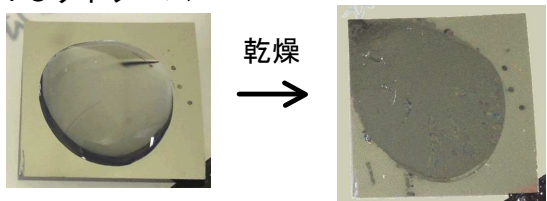


図 6-2 PC 修飾 Au ナノ粒子、及び PC リポソーム水溶液を Si ウェハ上で自然乾燥させた様子。



## 6.3 結果と考察

### TEM 観察

PC 修飾 Au ナノ粒子の TEM 像は大きく分けて 3 種類が観察された。それらの TEM 像を図 6-3 の(a)~(c)として示した。(a)Au ナノ粒子が一つの大きな凝集体として固まっている像、(b)ナノ粒子が数珠繋ぎ状になっている像、(c)PC の凝集体にナノ粒子が吸着している像である。(c)より、試料作製時に遠心分離を行って PC の凝集体を沈澱させた場合でも、PC の凝集体は上澄み液中に存在していることが分かった。しかしその一方で、(a)や(b)のような像も多く観察された。(a)や(b)では Au ナノ粒子の周囲に明るい膜が観察され、その膜を介してナノ粒子が凝集しているように見えた。PC 修飾 Au ナノ粒子は PC 水溶液と Au ナノ粒子コロイド水溶液を混合して作製している。また、第 5 章の結果から、PC は Au ナノ粒子表面に親水基で吸着することが示唆されたため、(a)や(b)で観察された明るい膜は PC が Au ナノ粒子表面に吸着して形成されたと考えられる。Au ナノ粒子が凝集した要因を解明するために、ナノ粒子の間に見られた隙間の距離を 300 箇所測定したところ、平均距離及び標準偏差は  $1.5 \pm 0.4 \text{ nm}$  であった。このナノ粒子間の距離に対する分布図を図 6-4 に示す。ここで、Au ナノ粒子 1 個あたりについて PC で形成される膜の厚さを考え、図 6-5 にそのモデル図を示す。PC 一分子における親水基から疎水基までのおおよその長さは  $2.0 \sim 2.5 \text{ nm}$  であるため[3,4]、図 5-31 で考察したように、PC が Au ナノ粒子表面に親水基で吸着して、ナノ粒子表面の接線方向に対して  $30^\circ$  の傾きを持ち、PC 一分子分の層が形成された場合は、 $1.0 \sim 1.25 \text{ nm}$  程度の膜が形成されると考えられる。よって、この PC 修飾 Au ナノ粒子が、ナノ粒子表面に吸着した PC の疎水基を介して凝集している場合でも、最短で  $2 \text{ nm}$  の距離が必要になる。しかし、図 6-3 (a)や(b)の TEM 像でのナノ粒子間の平均距離が  $1.5 \text{ nm}$  であったことから、PC の疎水基が入り組んで重なり合い、疎水基の炭化水素鎖同士で分子間力が生じて凝集した可能性が示唆された。ただし、このような PC の疎水基同士の重なり合いは、PC の炭化水素鎖の炭素数が 16 で揃っており、かつ飽和結合で構成されているジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) から成る脂質二重層では、高圧下や両親媒性物質存在下においてのみ生じたと報告されている[5-8]。DPPC は脂質二重層を構成している際、不飽和結合を含む炭化水素鎖が存在しないために、炭化水素鎖の折れ曲がりといった立体障害が無く、横並びの DPPC の炭化水素鎖同士で強い分子間力が生じており安定であると考えられる。一方で、本研究で用いた PC は様々な炭化水素鎖の種類が混在し、かつ不飽和結合も含まれる Egg 由来の PC であるために、脂質二重層の形成時の炭化水素鎖同士の分子間力は DPPC よりも弱いと推測される。それに加えて、PC は一定の曲率をもった Au ナノ粒子表面に吸着しているため、炭化水素鎖同士の分子間力はさらに弱くなると考えられる。また、本研究の試料作製時の溶媒は水であり、Au ナノ粒子表面に吸着した PC の炭化水素鎖がナノ粒子の外側を向いていると不安定であるた

め、その Au ナノ粒子にさらに PC が吸着して脂質二重層を形成するか、もしくはナノ粒子が PC を介して凝集したと考えられる。よって、PC が Au ナノ粒子表面に吸着した後、それら PC が炭化水素鎖で入り組んで重なり合い、分子間力を生じることで Au ナノ粒子が凝集したと考えられる。(a)は Au ナノ粒子コロイド水溶液と PC 上澄み水溶液を混合した際に、上述した PC の Au ナノ粒子に対する吸着やそのナノ粒子の凝集が溶媒中で浮遊している際に生じ、凝集の後に沈澱したと考えられる。また、(b)は(a)と同様に溶媒中で数珠繋ぎ状の凝集体が形成された可能性の他に、TEM 観察用の試料作製時にグリッド上から水が蒸発することに伴って、Au ナノ粒子が水滴のふちに沿うように導かれて形成されたことも考えられる。

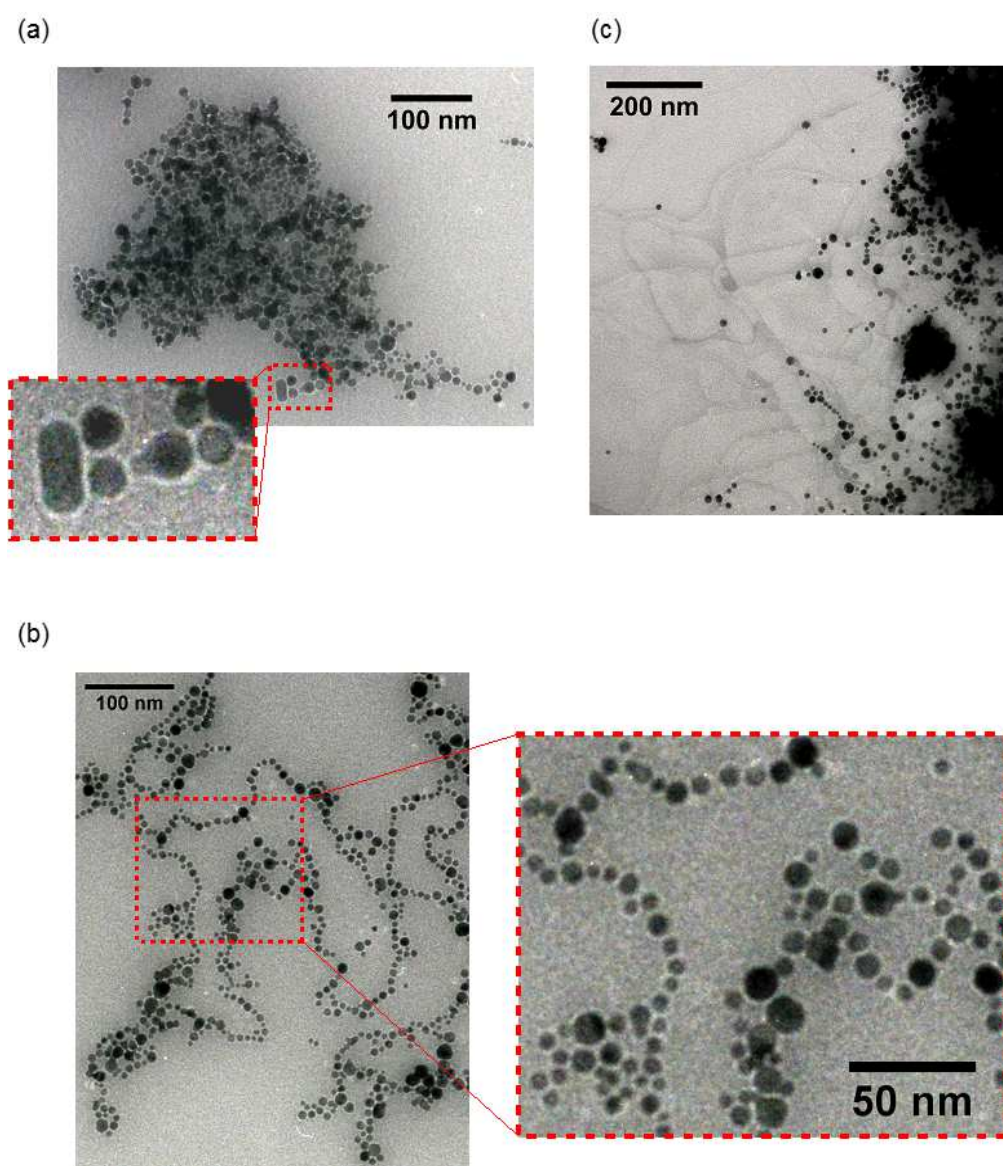


図 6-3 PC 修飾 Au ナノ粒子の各 TEM 像.

(a) Au ナノ粒子の大きな凝集体、(b)数珠繋ぎ状、(c)PC の凝集体にナノ粒子が吸着.

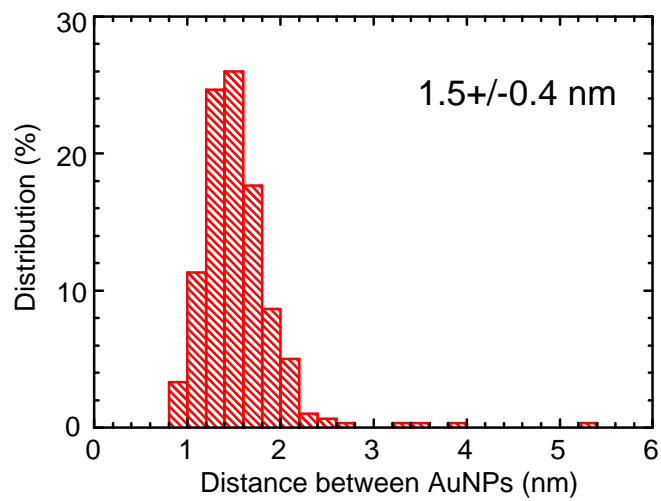


図 6-4 Au ナノ粒子間の距離に対する分布図.

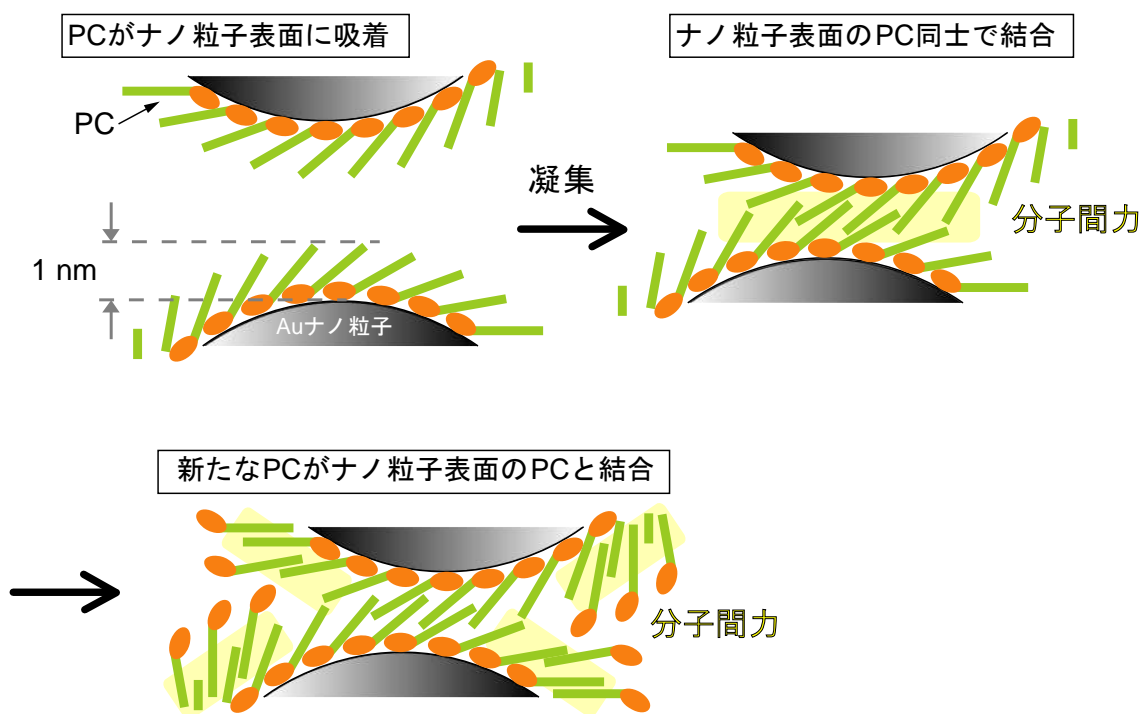


図 6-5 PC 修飾 Au ナノ粒子の凝集過程.

## 顕微 IR 測定

図 6-6 に PC リポソームと PC 修飾 Au ナノ粒子に対する顕微 IR 測定を行った位置を示す。この画像は CCD カメラで取得した。赤色の四角の外側の細かい線で囲まれた範囲を測定しており、この大きさが  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  である。図 6-6 の場所以外にも複数個所に対して顕微 IR スペクトルを得たが、測定する場所によっては、試料 (PC リポソームまたは PC 修飾 Au ナノ粒子) と Si ウェハの合計の厚さが、入射した赤外光の波長と干渉する厚さであったためにスペクトルに sin カーブの様な構造が生じた。そのような構造が生じない場所に対して取得した IR 測定の結果を図 6-7 に示す。3100~2750  $\text{cm}^{-1}$  は  $\text{CH}_3$  や  $\text{CH}_2$  に対する対称及び非対称に由来する振動ピークが現れる。PC リポソームと PC 修飾 Au ナノ粒子のスペクトルは、バックグラウンドを差し引いた後、炭化水素鎖の  $\text{CH}_3$  のみに由来するピークが現れる波数領域で、かつこの後の議論において結合の振動に変化が生じないと考えられる  $\nu_s(\text{CH}_3)$  の 2873  $\text{cm}^{-1}$  のピーク強度で規格化した。

PC には炭化水素鎖由来と親水基の N- $\text{CH}_3$  由来の 2 通りのピークが 3100~2750  $\text{cm}^{-1}$  に現れる。まず、炭化水素鎖由来のピークについて考察する。PC リポソームでは、炭化水素鎖に由来する 2853  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_s(\text{CH}_2)$ 、2873  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_s(\text{CH}_3)$ 、2923  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ 、2955  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  のピークが見られた。一方で、PC 修飾 Au ナノ粒子では、炭化水素鎖の  $\text{CH}_3$  に由来する  $\nu_s(\text{CH}_3)$  と  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  のピーク位置は PC リポソームと同じであったが、 $\text{CH}_2$  に由来する  $\nu_s(\text{CH}_2)$  と  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  のピークが 2850  $\text{cm}^{-1}$  と 2917  $\text{cm}^{-1}$  に見られ、PC リポソームと比較してそれぞれ 3  $\text{cm}^{-1}$  と 6  $\text{cm}^{-1}$  だけ低波数側にシフトしていた。また、PC 修飾 Au ナノ粒子の半値幅が PC リポソームと比較して、明らかに狭くなっていた。既往の研究で、Y. Sato らは、炭化水素鎖をもつ分子がその末端のチオール基 (-SH) で平板上に吸着した後、時間経過と共に  $\text{CH}_2$  の部分で分子間力を生じることで秩序立って自己組織化膜を形成すると、それに伴って IR 測定での  $\nu_s(\text{CH}_2)$  と  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  のピーク位置が低波数側にシフトし、かつ半値幅が狭くなると報告している[9]。さらに、分子が完全に秩序立った際の  $\nu_s(\text{CH}_2)$  と  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  のピークは、2851  $\text{cm}^{-1}$  と 2918  $\text{cm}^{-1}$  にそれぞれ現れると述べている。この分子の他にも、炭化水素鎖を持つ様々な分子が秩序だった場合に、IR スペクトルの  $\nu_s(\text{CH}_2)$  と  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  のピークが低波数側へシフトし、上記したピーク位置付近に収束したという報告がなされている[10-12]。本研究で作製した PC 修飾 Au ナノ粒子の IR スペクトルに観測されたピーク位置は、それらにより報告された位置と同程度であったため、PC は Au ナノ粒子表面に吸着した後、炭化水素鎖同士で分子間力を生じていると分かる。この結果は TEM 観察での考察の結果と一致している。

続いて、親水基の N- $\text{CH}_3$  に由来するピークについて考察する。PC リポソームでは、3009  $\text{cm}^{-1}$  に  $\nu_{as}(\text{N-CH}_3)$  [10] のピークが確認された。ただし、N- $\text{CH}_3$  に由来する  $\nu_s(\text{N-CH}_3)$  の肩構造が 2949  $\text{cm}^{-1}$  と 2959  $\text{cm}^{-1}$  に、 $\nu_{as}(\text{N-CH}_3)$  のピークが 3009  $\text{cm}^{-1}$  以外に 3016  $\text{cm}^{-1}$  と 3030  $\text{cm}^{-1}$  に弱いながらも生じる[10]と報告されているが、本測定では観測できなかった。PC 修飾 Au ナノ粒子では、3009  $\text{cm}^{-1}$  のピークが消失していた。これは PC が Au ナ

ノ粒子表面に N-CH<sub>3</sub> 吸着して、N-C 結合が解離したことを示すと考えられる。この結果は 5.3.1 の N-K 吸収端 NEXAFS 測定 で、PC が Au ナノ粒子表面に親水基の N-CH<sub>3</sub> で吸着しているという結果と一致している。

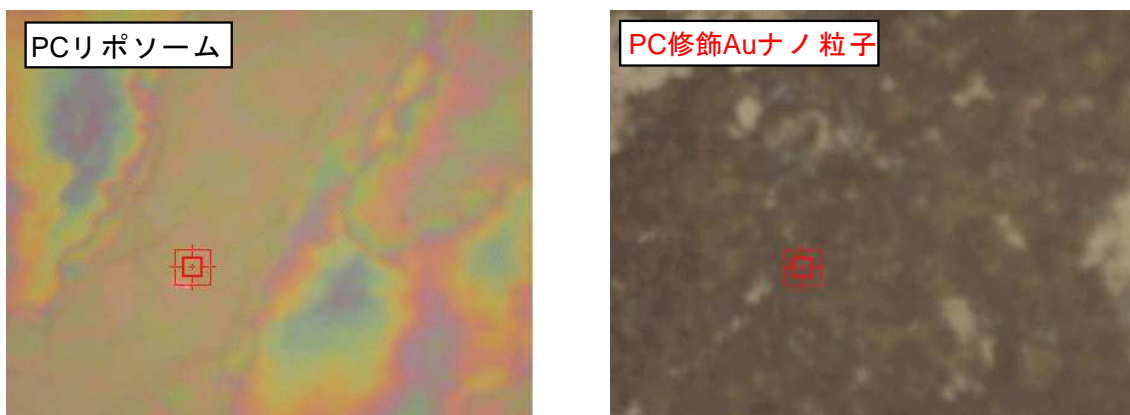


図 6-6 光学顕微鏡による各試料の画像と IR 測定位置.

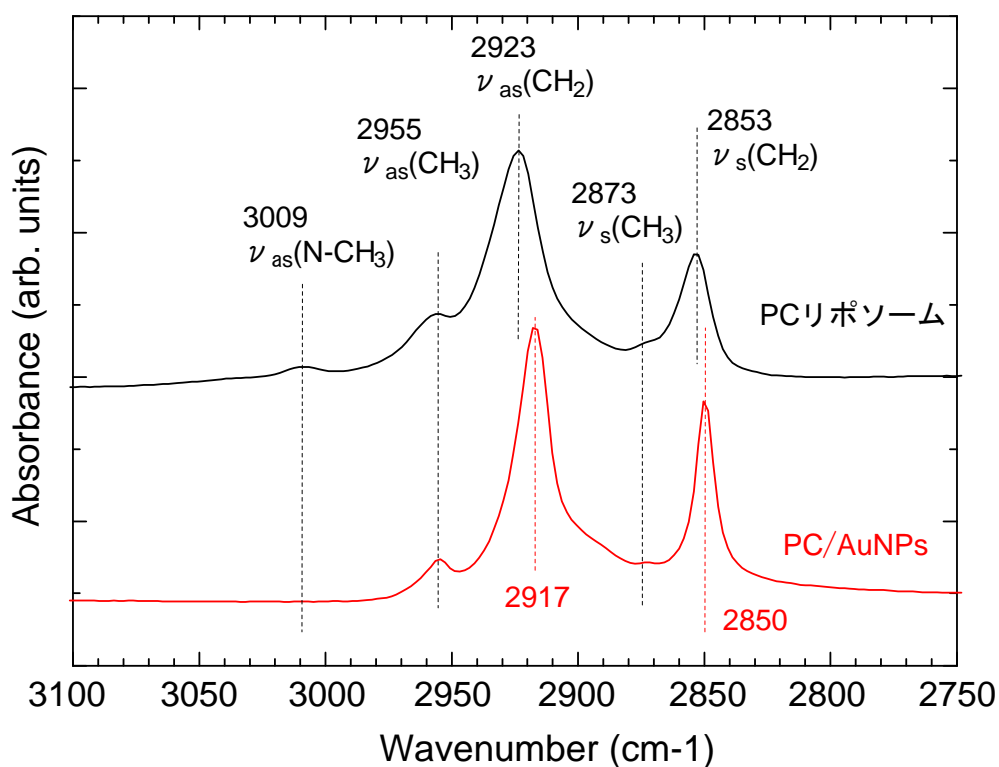


図 6-7 PC リポソーム及び PC 修飾 Au ナノ粒子に対する顕微 IR 測定スペクトル.



#### 密な PC 膜が Au ナノ粒子表面に形成されたことの評価方法の提案

第 6 章の結果から、Au ナノ粒子コロイド水溶液に PC 上澄み液を加えることで、秩序だった PC 膜で修飾された Au ナノ粒子を作製できたことが分かった。しかし、その PC 膜が Au ナノ粒子の全表面に対して密に覆うことができているのかは不明である。そこで、本論文の第 4 章で示した Au ナノ粒子と L-システインの水環境下での分子吸着反応のように、PC 修飾 Au ナノ粒子と L-システインの吸着反応を水環境下で促した後に S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行うことを提案する。もしも PC が Au ナノ粒子表面に密な膜を形成しており、システインの吸着サイトが存在しない場合、S-K 吸収端 NEXAFS 測定で得られるスペクトルはシステイン水溶液と同じになると予測される。一方で、PC 修飾 Au ナノ粒子表面にシステインの吸着サイトが残っている場合は、第 4 章で示した結果と似たようなシステインの解離に由来するスペクトルが得られると考えられる。TEM 観察といった顕微鏡法に加えて、このように分光学的手法も併せて複合的な評価を行うことで、作製材料に対する分子レベルでの詳細な評価が行えると考えられる。

#### PC 修飾 Au ナノ粒子の生体内投与を考えた場合の改善すべき点

Au ナノ粒子は PC が吸着することで凝集体を形成していたが、その凝集体は図 6-1 で示すように、目視でも確認できるほどの大きなものも含まれていた。生体の血管の中でも狭いところでは内径が 5~20  $\mu\text{m}$  程度[13]であるため、作製した PC 修飾 Au ナノ粒子をそのまま生体内に投与することは困難であると考えられる。よって、Au ナノ粒子表面を PC で修飾した後、その PC 膜を保ったまま、再びそのナノ粒子を溶媒中に高分散に拡散する必要がある。今のところそのような改善のためのアイデアを提案できないが、今後の課題としてここに挙げる。



## 6.4 まとめ

PC 懸濁液を遠心分離して凝集体を沈澱させた後、その上澄み溶液を液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子コロイド水溶液に加え、PC 修飾 Au ナノ粒子の作製を試みた。TEM 観察及び顕微 IR 測定の結果から、以下の点が明らかになった。

- (1) PC は Au ナノ粒子表面を覆って膜を形成した後、PC を介して凝集していると考えられる。そのナノ粒子間の距離は  $1.5\pm 0.4$  nm であった。
- (2) PC の N-CH<sub>3</sub> 部分で Au ナノ粒子と吸着反応を生じていることが明らかになった。
- (3) (1)のナノ粒子間の距離に加え、顕微 IR と第 5 章の結果から、PC が親水基部分で主に Au ナノ粒子表面に吸着した後、その PC の疎水基の炭化水素鎖部分が入り組んで重なり合うことで、凝集したことが示唆された。

以上より、PC は Au ナノ粒子表面に吸着した後、疎水基を構成する炭化水素鎖部分で自己組織化膜のような膜を形成することが明らかになった。この結果から、液中プラズマ法で作製した Au ナノ粒子に PC を修飾することで、生体適合性の高いナノ粒子の作製が行える可能性を得た。ただし、Au ナノ粒子の全表面を密に覆うことができているのかは不明である。この疑問を解決するために、第 4 章のように作製した PC 修飾 Au ナノ粒子と L-システインの水環境下での吸着反応を明らかにすることで、分子レベルから作製材料の評価が行えると考ええる。また、PC 修飾 Au ナノ粒子は目視で確認できるほどの大きな凝集体を形成していたため、そのまま生体に投与すると血管を詰まらせてしまう可能性がある。よって、PC 修飾後に Au ナノ粒子を再分散させることが必要と考えるが、その方法については今後の課題である。

## 参考文献

- [1] H. Takahashi, Y. Niidome, T. Niidome, K. Kaneko, H. Kawasaki, S. Yamada, *Langmuir* **22** (2006) 2-5.
- [2] H. Zhu, C. Tao, S. Zheng, J. Li, *Colloids and Surfaces A* **257-258** (2005) 411-414.
- [3] 中村桂子、松原謙一／監訳「Essential 細胞生物学 原書第2版」南江堂 (2009).
- [4] S.-H. Park, S.-G. Oh, J.-Y. Mun, S.-S. Han, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **48** (2006) 112-118.
- [5] 松木均、金品昌志、*Netsu Sokutei* **33** (2006) 74-82.
- [6] 末崎幸生／著「脂質膜の物理」九州大学出版会 (2007).
- [7] L.F. Braganza, D.L. Worcester, *Biochemistry* **25** (1986) 2591-2596.
- [8] E.S. Rowe, J.M. Champion, *Biophysical Journal* **67** (1994) 1888-1895.
- [9] Y. Sato, B.L. Frey, R.M. Corn, K. Uosaki, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **67** (1994) 21-25.
- [10] R.B. Viana, A.B.F. da Silva, A.S. Pimentel, *Advances in Physical Chemistry* (2012) Article ID 903272, 14pages.
- [11] T. Kawai, J. Umemura, T. Takenaka, M. Kodama, S. Seki, *Journal of Colloid And Interface Science* **103** (1985) 56-61.
- [12] K.V. Padalkar, V.G. Gaikar, V.K. Aswal, *Journal of Molecular Liquids* **144** (2009) 40-49.
- [13] 鈴木洋通／監修「図解入門 よくわかる最新からだの基本としくみ - 人体のメカニズムを図解する」秀和システム (2008).

## 第7章 結論

ナノ粒子は医療や工業への応用が期待される一方で、生体に対する安全性が懸念されている。Au ナノ粒子は医療分野でがん温熱療法などへ用いることが想定されており、その実用時には生体内に投与することが前提条件であるため、Au ナノ粒子の生体適合性を明らかにすることは重要である。一般的にナノ粒子の安全性や生体適合性の評価は動物や細胞へナノ粒子を投与した後、組織の観察や細胞の生存率評価といったマクロな視点で行われている。しかし、組織や細胞に変化が生じる要因について、それらを構成する生体分子と Au ナノ粒子の間で起こる吸着反応といったミクロスコピックな視点からの議論はほとんど行われていない。この理由の一つとして、生体内には多数の分子が存在しており、様々な要因が複雑に関わっているためであると考えられる。さらに、研究で使用されているナノ粒子についても、分散剤などの試薬を用いて作製されているために、ナノ粒子投与後の組織や細胞の変化は、ナノ粒子そのものか、それとも分散剤の影響なのか、判断することは困難である。そこで本研究では、生体分子と Au ナノ粒子の吸着反応を明らかにするために、対象物質（生体分子と Au ナノ粒子）のみが存在するシンプルな系の試料を準備した。反応環境としては生体の約 70% が水で構成されることから水環境を選択した。さらに、Au ナノ粒子コロイド水溶液は分散剤などの試薬を用いずに、Au ロッドと NaCl 水溶液のみで液中プラズマ法により作製した。吸着反応を解明する対象は、生体内に遊離アミノ酸として豊富に存在し、かつ金属と反応しやすいチオール基 (-SH) をもつ L-システイン、そして生体細胞膜の脂質二重層に最も多く存在するフォスファチジルコリン (PC) を用いて作製した細胞膜モデルの PC リポソームの二つを選んだ。また、吸着分子の化学状態分析にはシンクロトロン放射光（以下、放射光と記す）を用いた NEXAFS 測定が有用であるが、X 線の照射により、生体分子は直接的もしくは水由来のラジカルなどの活性種により間接的に解離や脱離をしやすい。このような放射線損傷の影響が測定スペクトルに反映されることが懸念されたため、測定条件や工夫すべき点について検討を行った。さらに、液中プラズマ法を用いて作製した Au ナノ粒子の医薬品としての実応用を目指し、そのナノ粒子表面を PC で修飾することで生体適合性の高いナノ粒子の作製を試みた。以下に各章の概要と成果を述べ、最後に本論文の総括を述べる。

第2章では、本研究で用いた Au ナノ粒子の作製手法、及び各実験手法の詳細を記述した。初めに、Au ナノ粒子コロイド水溶液の作製方法である液中プラズマ法について述べた。続いて、本研究では、吸着反応や放射線損傷により生じる分子の化学状態変化を吸収端近傍 X 線吸収微細構造法 (NEXAFS) 及び X 線光電子分光法 (XPS)、ナノ粒子の粒子径変化および対象物質との吸着のふるまいを原子間力顕微鏡法 (AFM) 及び透

過型電子顕微鏡法 (TEM)、Au ナノ粒子の吸収波長変化を紫外・可視分光法 (UV-Vis)、分子の振動モード変化を赤外顕微分光法 (顕微 IR) のそれぞれにより解明したため、それら各測定手法の概要を記述した。

第 3 章では、Au ナノ粒子表面に吸着したシステインの乾燥試料に対して、システインを構成する窒素 (N)、酸素 (O)、硫黄 (S) の各 K 吸収端近傍の放射光を照射することで生じる放射線損傷について明らかにした。HiSOR BL-14 で N や O-K 吸収端の X 線を照射すると Au ナノ粒子表面のシステインの解離や脱離が生じることが明らかとなった。また、放射線損傷が生じた大きな要因は、X 線の光子束密度の大小であることが示唆された。Au は重元素であり、N-K や O-K 吸収端のエネルギー領域近傍の X 線が入射した際も Au から光電子やオージェ電子が放出される。これら電子がシステインと Au ナノ粒子の間で生じる Au-S 結合を解離させたと考えられる。さらにシステイン分子内の結合についても、オージェ電子刺激イオン脱離により解離して NH<sub>2</sub> や NH<sub>3</sub><sup>+</sup> が脱離したと考えられる。よって、軟 X 線領域の XAFS 測定では、同じ位置に長時間、X 線を照射することによる放射線損傷を避けるために、試料位置を適切に移動させながら測定を行う必要があるという指針が得られた。

第 4 章では、Au ナノ粒子とシステインの水環境下での吸着反応、および水を溶媒とした場合の放射線損傷の影響を明らかにした。HiSOR BL-3 で水環境下の S-K 吸収端 NEXAFS 測定を行い、システインの化学状態変化を調べたが、試料に対してパルス光が照射される時間の間隔よりも、水由来のラジカルなどの活性種が安定な物質に変化する時間の方が短いため、放射線損傷の影響は考慮せずにスペクトルの溜め込み測定を行えると判断し、実際の測定スペクトルからもその結果を確かめた。また、システインは Au ナノ粒子表面と迅速に吸着反応を生じ、時間経過に伴ってシステインチオレートや原子状硫黄への解離、また、2つのシステインチオレートがジスルフィド (S-S) 結合を形成して生じたシスチンや、原子状硫黄に H<sub>2</sub>O が配位した SO<sub>x</sub> (x=2~4) の生成が起こることが推測された。さらに、Au ナノ粒子の粒子径は、吸着反応後の時間経過に伴い、ナノ粒子同士が凝集して大きくなることが分かった。この凝集は、ナノ粒子表面のシステインチオレートやシスチンといった吸着種の-COOH 基や-NH<sub>2</sub> 基で互いに水素結合を形成することで生じたと考えられる。

第 5 章では、PC リポソームと Au ナノ粒子との吸着反応を明らかにした。PC は親水性の頭部 (親水基) と疎水性の尾部 (疎水基) をもつ両極性分子であるが、水の溶媒中でリポソームを作製したために脂質二重層の外側は親水基、内側は疎水基が向いていると考えられる。Au ナノ粒子コロイド水溶液と PC リポソーム水溶液を混合したところ、Au ナノ粒子はこの PC リポソームの外側に吸着しており、内側には取り込まれないこ

とが分かった。このことから、リポソームの脂質二重層を構成する PC 同士の分子間力が大きく、PC が密に層を成していることが予測された。また、この Au ナノ粒子に対して、PC で覆われているものと覆われていないものが観察されたため、リポソーム表面に吸着する過程として以下の 2 通りを提案した。一つ目は Au ナノ粒子がそのままリポソームに吸着すること、二つ目はリポソームの形成に寄与していない PC が Au ナノ粒子表面を覆った後にそのナノ粒子が PC リポソームに吸着することである。さらに、PC は Au ナノ粒子表面に親水基の N-CH<sub>3</sub> や PO<sub>4</sub>、O=C、O-C で吸着していることが示唆された。この結果に加えて溶媒が水であることを考慮すると、PC リポソームの内側からリポソームに吸着している Au ナノ粒子の表面までに存在している PC は、2 または 4 分子分の層を成していることが示唆された。よって、Au ナノ粒子を生体内に投与した場合、そのナノ粒子が細胞膜の脂質二重層に吸着すると予測した。

第 6 章では、PC 修飾 Au ナノ粒子を作製し、そのナノ粒子が起こすふるまいと要因を明らかにした。PC が Au ナノ粒子表面に吸着することで、約 1.5 nm の隙間を開けた状態でナノ粒子が互いに凝集することが分かった。この隙間の長さ、PC が Au ナノ粒子表面に親水基で吸着していることに着目すると、ナノ粒子の凝集は、Au ナノ粒子表面の PC の疎水基同士が入り組んだように重なり合い、炭化水素鎖の -CH<sub>2</sub> に対して分子間力が生じたことで起こったと考えられる。また、TEM 観察の結果より、PC は Au ナノ粒子表面の全体を覆っていたことから、Au ナノ粒子表面に吸着した PC 同士でも疎水基の炭化水素鎖で分子間力が生じており、自己組織化膜のように密に膜を形成していると予測された。しかし、実際に PC が Au ナノ粒子表面の全体に対して密に吸着できているのかは不明であるため、今後、作製材料とシステインのような小さな生体分子との分子吸着反応を調べ、分子レベルでの材料評価を行う必要があると考える。また、作製した PC 修飾 Au ナノ粒子を生体内に投与するためには、PC 膜を保ちながら溶媒中に再分散させる必要があると考えるが、その方法については今後の課題である。

以上から、生体内にナノ粒子を投与した際、Au ナノ粒子表面に吸着サイトが存在する場合には、そのサイトに分子が吸着してナノ粒子が凝集することが示唆された。システインや PC の吸着により、ナノ粒子は目視で確認できるまで大きな凝集体になることから、マイクロメートルサイズまで大きくなっていると考えられる。今後、Au ナノ粒子をドラッグデリバリーシステムやがん温熱療法へ実応用させ、生体内の目的の箇所へのナノ粒子の輸送を目指すならば、ナノ粒子を毛細血管の直径である 5~20 μm を困難なく通過させなければならない。したがって、分子吸着による Au ナノ粒子の凝集を防ぐことが重要である。生体分子と吸着反応を生じない生体適合性の高い Au ナノ粒子の作製を行う場合、ナノ粒子表面に対して、自己組織化膜を形成する分子や不活性な材料 (SiO<sub>2</sub> など) で密に覆う必要があると考える。また、材料作製の段階においてマイクロ

メートル程度の大きさまで Au ナノ粒子が凝集してしまうと、安全性を考慮するとそのまま生体内に投与することができないため、溶媒中に再分散させる工夫が必要になることも分かった。これら指針は Au 以外の他の金属ナノ粒子を生体内に投与する場合にも適用できる。

本研究では、生体内で生じるナノ粒子の分子吸着反応について、これまで困難であった水環境下での反応を分光学的手法から明らかにし、さらにナノ粒子の凝集要因やリポソームへの存在位置など顕微鏡観察と併せて複合的な考察を行った。その結果、生体内で生じる反応を分子レベルのミクロスコピックな視点から明らかにできる知見を得たといえる。さらに、材料の作製を行った際に、動物や細胞を用いた実験のみならず、分子レベルでの吸着反応を明らかにすることの重要性を提案できたと考える。



## 謝辞

本研究を推進していくにあたり、これまで研究室内外の多くの方に大変お世話になりました。本ページにて、以下に厚く感謝を申し上げます。

M1 から D3 までの 5 年間、主査である名古屋大学エコトピア科学研究所の八木伸也教授は、私が研究者として自信をもって独り立ちできるように、博士論文が完成する本日まで、常に全力で、私に正面から向き合ってくださいました。「研究者になりたいです。頑張ります！」という私の言葉を信じ、私が成長できることも信じ、諦めずに根気よく付き合ってください、大変感謝いたしております。実験に取り組む姿勢や考え方、研究の議論や発表の仕方、言葉遣いなど、私の良いところも悪いところも正直に、そして的確に指摘してくださり、それらが私の成長や自信に繋がったと感じております。今後、研究者として自信を持ち、そして研究者同士で互いに助け合っていける一員になれるよう、諦めずに精進して参ります。

副査の先生方であり、名古屋大学の曾田一雄教授、同所属の佐々木勝寛准教授、そして東京医科歯科大学の宇尾基弘教授には、本論文を執筆するにあたり様々な重要なコメントを賜りました。お忙しい中、隅々まで査読してくださり、先生方のお考えを教授してただけましたことに感謝申し上げます。

八木研究室のスタッフであります名古屋大学エコトピア科学研究所の吉田朋子准教授には、報告会や実験を通して様々なご指導を賜った一方で、女性研究者としてご活躍なさいながら、ご家庭も持ちいらっしゃる立場から、「やりたいことは全てやる！」という考え方を教えていただきました。その考え方は「場合によっては諦めるものも出てくるだろう」という初めから諦めてしまっていた私の考えを覆すもので、単純だけでも私にとっては目から鱗が落ちるものでした。今後、自分も周りの人も生き生きとし、人生を謳歌できますよう、多くの方に感謝しながら懸命に努力して参ります。

八木研究室のスタッフであります名古屋大学の小川智史助教は、学年が一つ上の先輩であり、小川さんが学生でいらっしゃる時から今まで大変お世話になりました。ご自分の研究とまっすぐに向き合って推進することと同時に、忙しい中でも後輩の指導やアドバイスを一生懸命になさっていらっしゃるお姿は理想の先輩像でした。また、私にとっても心強い先輩であり、多くの場面で助けていただきました。D2 の水谷剛士君は、研究や学問に対する姿勢が真摯であり、報告会などでの皆に対するコメントが私には無い考え方であることが多く、常に刺激を受けていました。水谷君の発言から、たびたび自分自身を見つめ直し、甘かった考えを反省し、成長できる大きなきっかけになりました。

M2の藤本大志君は、今後の本研究の進展までを考えて、研究テーマが異なる私の研究にも大きな興味を持ち、報告会以外でも積極的に様々な質問やコメント、議論をしてくださいました。率直に私はそのことが大変嬉しく、ぜひ私自身もこれからもそのような姿勢を見習い、今後の生活にて実践していきたいと思います。お三方には長年同じ研究グループとしてお世話になり、感謝致します。

M2の小森勝之君は質疑応答の際に物事をしっかり考え、内容をまとめてから発言しており、「早く発言をしないといけない」と焦っていた頃の私にとって、発言の早さも重要ですが、それよりも論理だったことを発言できることの大切さを教わりました。山本直人君は常日頃から一生懸命で、真摯に研究に取り組んでおり、また、学会発表はもちろんのこと、報告会や輪講などの内々の発表だとしても自分で練習を行ってから本番に臨んでおり、その姿勢を見る度に初心を思い出し、身が引き締まりました。山本宗昭君は研究のことも世間話も話しやすい人柄で、IR 実験の試料作製やデータ解析の際は特にお世話になりました。相談した内容に対して熱心に、そして最善の策を出そうと共に考えてくれ、感謝しています。

M1の中野優治君は目の前にある課題を懸命に取り組み、また、発表での張りのある声がとても心地良く、見習っていました。見須悠平君は常に論文や本をたくさん読んでおり、「私も作業の合間の時間を作って文献を読むぞ!」と思う良い刺激になりました。

B4の赤柄誠人君はD3の一年間、隣の席で、触媒分野の研究について様々な話をし、他分野の研究内容も考える貴重な時間になりました。また、コンピュータ関係のことをいろいろと教えてくれ、勉強になりました。阿久津麻衣さんは先輩と話すときも屈せず自分の意見をはっきりと述べており、今後、私も誰に対しても自分の考えをしっかりと述べていきたいと思います。上原一希君は私の分野と最も似ているチオール基をもった分子とAuナノ粒子の吸着反応についての研究を行っており、データについて議論することで私もとても勉強になりました。小川秀太君は自身の発表で原稿を作成して考えをまとめてから臨んでおり、人前に立つときに前もって準備を行うことの重要性を思い返すきっかけになりました。初心を忘れずに取り組んでいきます。

曾田研究室の加藤政彦助教は、月一回のクイックセルバッチの交換の際、電話で連絡をくださり、時にはお忙しい中届けに来てくださり、大変助かりました。今年度から瓜谷研究室に移りました現M1の校條洋輔君とは、昨年度一年間に多くの話をし、彼の成長を通して、自分で掲げた理想に対して努力を重ね、かつ、諦めない心を強く持つことの大切さを私も再認識しました。今後も諦めずに頑張ります。現在はアメリカに留学なさっている元秘書の伊藤麗子さんは、女性としての奥ゆかしさや、英語を学びたいと考えて行動を起こす姿勢が私にとって刺激的で、見習って私も頑張りたいと思います。

そして、この5年間で研究室を卒業していかれた諸先輩方、同期の皆さん、後輩の皆さん。多くの皆様のおかげで、研究についてはもちろんのこと、世間話まで幅広く、様々な分野の内容を話すことで、笑いの絶えない、そして充実した研究生活を過ごすことが

できました。

**SPECS** のハイシューラーさんは、初めての海外での研究発表の際、原稿を作成して練習もしたけれどもやっぱり心配で、原稿を片手に発表していた私に「原稿を見るな。ポスターのデータを指しながら発表できる。頑張れ！」と、拙い私の発表も温かく見守ってくださいました。その後も **SPECS** への訪問や学会会場で何度か海外でお会いする機会があり、その度に叱咤しながら温かく接してくださいました。ハイシューラーさんの気持ちに恥じず成長した研究者になれるよう、英語も含め、今後も頑張ります。

**Au** ナノ粒子コロイド水溶液の作製や様々な実験設備の使用はあいち産業科学技術総合センターの行木啓記博士、**AFM** 観察や **P-K** 吸収端 **NEXAFS** 測定はあいちシンクロトン光センターの野本豊和博士、**S-K** 吸収端 **NEXAFS** 測定は広島大学放射光科学研究センターの Galif Kutluk 准教授、**N-K** 及び **O-K** 吸収端 **NEXAFS** 測定は広島大学放射光科学研究センターの澤田正博准教授および立命館大学 **SR** センターの山中恵介さん、リポソームをはじめとした生体試料の作製は広島大学放射光科学研究センターの松尾光一博士、**TEM** 観察の試料作製及び観察は辻琢磨博士、顕微 **IR** 測定は立命館大学 **SR** センターの家路豊成博士、そしてその他、研究室外での実験作業を行った際に各施設の非常に多くの方々にお世話になりました。

データの解析について、放射線損傷は日本原子力研究開発機構の藤井健太郎博士、**P-K** 吸収端 **NEXAFS** 測定は京都大学の中西康次博士、**TEM** 観察は名古屋大学の臼倉治郎特任教授に有意義な議論をしていただきました。

博士課程後期課程のうち、**D2**~**D3** の 2 年間、日本学術振興会の特別研究員 (**DC2**) として採択され、研究費の補助をしていただきながら本研究を推進致しました。また、名古屋大学からも博士課程助成金を補助していただき、それらのおかげで実験や研究の幅が広がり、国内外で多くの発表もさせていただき、研究活動に専念することができました。

最後に、私の身体を気かけながら、朝早くから夜遅くまでの私の研究生生活を傍で懸命に支えてきてくれた母、「やりたいことをやればいい」と背中を押し、温かく見守ってきてくれた父、落ち込んでいたときに私のことを身近な立場から常に心配してくれた兄、その他の多くの皆様に支えられ、多くの刺激を受け、この 5 年間、本研究に打ち込むことができましたことにこの場を借りてお礼申し上げます。私にとって、密度が濃い、本当に貴重な 5 年間でした。ありがとうございました。

平成 27 年 1 月 塚田千恵

## 発表論文一覧

### 第3章

- 1) C. Tsukada, T. Mizutani, S. Ogawa, T. Nomoto, H. Nameki, T. Ueno, M. Sawada, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, T. Yoshida, S. Yagi, “Study on radiation damage for L-cysteine on Au nanoparticle by soft X-ray”, *Conference Proceedings NANOCON 2012*, ISBN 978-80-87294-32-1, pp. 648-653 (2012).

### 第4章

- 2) C. Tsukada, T. Mizutani, S. Ogawa, T. Nomoto, Y. Abe, H. Nameki, K. Matsuo, G. Kutluk, S. Yagi, “Adsorption reaction of L-cysteine on Au nanoparticle prepared by solution plasma”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol. 11, pp. 18-24 (2013).

### 第5章

- 3) C. Tsukada, T. Tsuji, K. Matsuo, H. Nameki, T. Yoshida, S. Yagi, “Study on interaction between phosphatidylcholine(PC) liposome and gold nanoparticles by TEM observation”, *Journal of Surface Analysis*, Vol. 20, pp. 230-233 (2014).

### その他の論文

- 4) C. Tsukada, S. Ogawa, H. Niwa, S. Yagi, T. Nomoto, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, “Adsorption Reaction of Amino Acid Molecule on Pd Thin Layer Surface Constructed by Nano-dots under Water Environment”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol. 9, pp. 289-292 (2011).
- 5) S. Ogawa, S. Murakami, K. Shirai, K. Nakanishi, C. Tsukada, T. Ohta, S. Yagi, “Size dependence of air oxidation for Mg nanoparticle”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol. 9, pp. 315-321 (2011).
- 6) S. Murakami, S. Ogawa, K. Shirai, C. Tsukada, S. Yagi, K. Nakanishi, T. Ohta, “The spectroscopic study on the chemical state at Pd/Mg interface”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol. 9, pp. 438-441 (2011).

- 7) C. Tsukada, S. Ogawa, T. Mizutani, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, S. Yagi, "Aggregation mechanism of Pd nanoparticles in L-cysteine aqueous solution studied by NEXAFS and AFM", *Applied Surface Science*, Vol. 262, pp. 184-187 (2012).
- 8) C. Tsukada, S. Yagi, T. Nomoto, T. Mizutani, S. Ogawa, H. Nameki, Y. Nakanishi, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, "Adsorption behavior of L-cysteine on Ag nanoparticles under water environment studied by S K-edge NEXAFS", *Applied Surface Science*, Vol. 262, pp. 231-233 (2012).
- 9) K. Shirai, C. Tsukada, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, S. Yagi, "(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Adsorption Behavior on Pd/Mg Thin Film Surface Studied by NEXAFS", *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol. 10, pp. 194-197 (2012).
- 10) S. Yagi, M. Nambu, C. Tsukada, S. Ogawa, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, "Spectral studies on sulfur poisoning of Pd/Mg<sub>6</sub>Ni by NEXAFS and XPS", *Applied Surface Science*, Vol. 267, pp. 45-47 (2013)
- 11) C. Tsukada, S. Ogawa, H. Niwa, T. Nomoto, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, S. Yagi, "Morphological and spectroscopic studies on enlargement of Pd nanoparticle in L-cysteine aqueous solution by AFM and XPS", *Applied Surface Science*, Vol. 267, pp. 48-52 (2013).
- 12) S. Yagi, Y. Menjo, C. Tsukada, S. Ogawa, G. Kutluk, H. Namatame, M. Taniguchi, "Vulcanization reaction of squalene and S8 powder studied by Sulfur K-edge NEXAFS under liquid phase", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, in press (2015).