# **JAIST Repository**

https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	細胞小器官の高選択的磁気分離技術構築に向けた磁性 - プラズモンハイブリッドナノ粒子の創製とオートフ ァゴソームの単離への応用に関する研究	
Author(s)	高橋,麻里	
Citation		
Issue Date	2018-03	
Туре	Thesis or Dissertation	
Text version	ETD	
URL	http://hdl.handle.net/10119/15332	
Rights		
Description	Supervisor:前之園 信也,マテリアルサイエンス研究 科,博士	



Japan Advanced Institute of Science and Technology

# 博士論文

細胞小器官の高選択的磁気分離技術構築に向けた 磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の創製と オートファゴソームの単離への応用に関する研究

# 高橋 麻里

主指導教員 前之園 信也

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科

平成 30 年 3 月

目次

第	1章 緒論	••••	5
1.1	従来技術である細胞・タンパク質の磁気分離		5
	1.1.1 細胞の磁気分離		5
	1.1.1.1 血中循環腫瘍細胞の磁気分離		5
	1.1.1.2 幹細胞の磁気分離		6
	1.1.2 タンパク質の磁気分離		8
	1.1.2.1 抗体の磁気分離		8
	1.1.2.2 バイオマーカーの検出		8
1.2	オルガネラの磁気分離に関する既往の研究		9
	1.2.1 エンドソームの磁気分離		11
	1.2.1.1 ニーマン・ピック病 C 型とエンドソーム膜タンパク質の関係		11
	1.2.1.2 シグナル伝達の場となるエンドソーム		12
	1.2.2 エキソソームの磁気分離		13
	1.2.3 ミトコンドリアの磁気分離		15
1.3	汎用性の高いオルガネラの磁気分離技術に向けて		16
	1.3.1 オルガネラ磁気分離に求められる磁気ビーズの条件		18
	1.3.1.1 粒径について		18
	1.3.1.2 イメージング機能の有用性		18
	1.3.2 次世代磁気ビーズとしての磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子		19
1.4	研究の目的		20
1.5	参考文献		20
第	2章 磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の生成機構		25
2.1	緒言		25
2.2	ハイブリッドナノ粒子の合成		25
	2.2.1 試薬及び評価装置		25
	2.2.2 Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子の合成		26
	2.2.3 Ag@FeCo、Ag@Co及び Ag@Fe コア@シェル型ナノ粒子の合成		27
	2.2.4 FeCoナノ粒子(比較対象)の合成		27
2.3	ハイブリッドナノ粒子の構造		27
	2.3.1 Ag@FeCo@Agナノ粒子の構造解析結果		27
	2.3.2 Ag@FeCoナノ粒子の構造解析結果		28
	2.3.3 Ag@FeCo@Agナノ粒子とAg@FeCoナノ粒子の粒径分布と結晶構造		31
	2.3.4 Ag@Coナノ粒子及び Ag@Fe ナノ粒子の構造解析結果		32
	2.3.5 FeCoナノ粒子(比較対象)の構造解析結果		34
2.4	ハイブリッドナノ粒子の生成機構		35
	2.4.1 Ag コアの還元触媒作用と FeCo シェルの形成機構について		35

	2.4.1.1 Ag クラスターの電子エネルギー準位		35
	2.4.1.2 Ag ナノ粒子の酸化還元電位		38
	2.4.1.3 FeCo シェルの形成機構		39
	2.4.2 サイズフォーカシング(粒径集束)とオストワルド熟成		41
	2.4.3 表面偏析による Ag シェルの形成		44
2.5	結言		46
2.6	参考文献		46
第	3章 交換バイアスを用いた FeCo 磁性層酸化膜の解析	••••	48
3.1	緒言		48
3.2	交換バイアスとは		48
	3.2.1 交換バイアスの発見		49
	3.2.2 交換バイアス発現機構の定性的説明		49
	3.2.3 二次元薄膜積層構造における交換バイアス		51
	3.2.4 コア@シェル型ナノ粒子における交換バイアス		52
3.3	ハイブリッドナノ粒子の合成		53
	3.3.1 比較対象となる AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子について		53
			55
2.4	3.3.3 AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子の合成		55
3.4			56
	3.4.1 正宜週週空电丁興國現による博坦胜例 2.4.2 半学時研証価		50 50
	3.4.2 几子付住計価 3.4.3 V 線回折注に上る結晶構造解析		50
	3.4.1 化学安定性評価		61
			65
	3.4.51 FeCo 磁性層の酸化によろ的和磁化の減少		65
	3452 FeCo 磁性層の酸化に伴う交換バイアス磁場の変化		69
3.5	交換バイアス磁場と FeCo 層酸化膜厚の関係について		73
	3.5.1 交換バイアス磁場が FeCo 層酸化膜体積に対して振動的挙動を示す理由		73
	3.5.2 交換バイアス磁場から FeCo 層酸化膜厚を推定する方法		74
3.6	結言		75
3.7	参考文献		76
第	4章 ハイブリッドナノ粒子の表面修飾	••••	78
4.1	緒言		78
4.2	表面修飾に用いる水溶性ポリマーの合成と評価		78
	4.2.1 試薬及び評価装置		78
	4.2.2 水溶性ポリマーの合成		79
	4.2.3 水溶性ポリマーの組成解析		80
	4.2.4 水溶性ポリマーのゼータ電位		80
4.3	配位子交換によるハイブリッドナノ粒子の水溶化		81

	4.3.1 試薬及び評価装置	 81
	4.3.2 水溶性ポリマーとの配位子交換	 82
	4.3.3 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の吸収スペクトルと粒子濃度測定	 83
	4.3.4 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の分散安定性	 85
	<i>4.3.4.1</i> ゼータ電位による評価	 85
	4.3.4.2 流体力学的粒径による評価	 87
	<i>4.3.4.3</i> 吸収スペクトルによる評価	 87
	4.3.5 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の磁気特性	 87
	4.3.6 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の細胞毒性	 90
4.4	ハイブリッドナノ粒子表面へのタンパク質修飾	 91
	4.4.1 ビオチン-アビジン相互作用	 91
	4.4.2 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子へのビオチン標識 BSA 修飾	 92
	4.4.3 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子へのアビジン及びトランスフェリン修飾	 94
	4.4.4 タンパク質修飾粒子のサイズにおける今後の課題	 96
4.5	結言	 97
4.6	参考文献	 97

# 第5章 ハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソームの磁気分離…100

5.1	緒言	100
	5.1.1 ナノ粒子の細胞への導入法	100
	5.1.1.1 エンドサイトーシスによる導入	100
	5.1.1.2 トランスフェクションによる導入	104
	5.1.2 本研究におけるハイブリッドナノ粒子の細胞への導入法	105
5.2	オートファゴソームの磁気分離とその成否確認の方法	105
	5.2.1 オートファゴソームとは	105
	5.2.2 試薬、器具及び評価措置	108
	5.2.3 トランスフェクション	109
	5.2.4 細胞免疫染色	110
	5.2.5 電子顕微鏡観察	110
	5.2.6 磁気分離法	111
	5.2.7 タンパク質ゲル染色	114
	5.2.8 ウェスタンブロッティング	114
5.3	オートファゴソームのイメージングと磁気分離の結果について	115
	5.3.1 共焦点顕微鏡によるハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の観察	115
	5.3.2 電子顕微鏡によるハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の観察	117
	5.3.3 トランスフェクション条件下でのハイブリッドナノ粒子の凝集状態	118
	5.3.4 タンパク質ゲル染色の結果	119
	5.3.5 ウェスタンブロッティングの結果	121
5.4	考察	122
	5.4.1 ハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の培養時間変化	122
	5.4.2 既往のオートファゴソーム分離法との比較	123
5.5	結言	126

5.6 参考文献	126
第6章 総括	130
6.1 各章の研究成果とまとめ	130
6.2 今後の展望	133
6.3 参考文献	135
付録	136
A.1 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子における磁気光学効果	136
A.1.1 粒子の合成	136
A.1.2 粒子の構造解析結果と特性評価	137
A.1.3 磁気光学効果	137
A.2 異種金属原子間での電子移動について	139
A.3 粒子の核生成と核成長について	143
A.3.1 LaMer 機構	143
A.3.2 拡散律速による核成長	144
A.4 磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の例	147
<b>A.5</b> 前駆体の仕込順を変更した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成	149
A.5.1 実験方法	149
A.5.2 結果	149
A.6 Ag ナノ粒子のみの場合の粒径集束とオストワルド熟成について	151
A.6.1 実験方法	151
A.6.2 結果	151
A.7 Ag-Co、Fe-Ag、Co-Feの相図	153
A.8 磁気カラムと充填剤	154
A.9 Co <sub>0.5</sub> Fe <sub>0.5</sub> O の磁化曲線	155
A.10 エンドサイトーシスによる COS-1 細胞への Tfn-NPs の導入法	156
A.11 15%ポリアクリルアミドゲルの作製方法	156
A.12 バッファーの調製方法	157
A.13 プロテアーゼインヒビターの組成	158

A.14 Ag 染色の方法

研究業績

....160

.... 159

# 謝辞

....165

# 第1章 緒論

磁性体ナノ粒子は、核磁気共鳴画像法の造影剤、ドラッグデリバリー、ハイパーサーミア、 磁気記録媒体など、バイオ医療分野や工学分野において幅広く利用されている現代において必 要不可欠なナノ材料である。多種多様な応用に関する研究が行われているが、本論文は、細胞 小器官(オルガネラ)の磁気分離を目的とした"多機能磁性体ナノ粒子の創製"と、それらを 用いたオルガネラ磁気分離のモデルケースとしての"オートファゴソームの単離"について述 べたものである。本章では、これまでに報告されている細胞、タンパク質およびオルガネラの 磁気分離の例をいくつか紹介した後、本研究の目的を示す。

## 1.1 従来技術である細胞・タンパク質の磁気分離

#### 1.1.1 細胞の磁気分離

細胞の磁気分離は古くから行われており、最も古い例では 1978 年に酸化鉄微粒子を含有 したポリアクリルアミドアガロースゲル粒子によるリンパ球の磁気分離が報告されている<sup>11</sup>。 その後 1990 年に Miltenyi らによりデキストラン修飾酸化鉄ナノ粒子を用いた細胞の磁気分離 が報告<sup>[2]</sup>されて以来、今や彼らの磁気細胞分離(Magnetic-Activated Cell Sorting: MACS)システ ム (Miltenyi Biotec)は、細胞の磁気分離におけるデファクトスタンダードとなっている。本節 では、磁気細胞分離のなかでも特に研究が進んでいる血中循環腫瘍細胞と幹細胞の磁気分離の 具体例をいくつか紹介し、現代における磁気細胞分離の重要性について概説する。

#### 1.1.1.1 血中循環腫瘍細胞の磁気分離

血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell: CTC)とは、がん細胞が転移する際に血中を循 環する腫瘍細胞の総称である。がんによる死因の90%以上は転移に起因しているため<sup>[3]</sup>、CTC を調べることでがんの転移・再発及び治療効果を診断することができる。フローサイトメトリ ー法を用いた CTC 検査は現代において幅広く利用されている。CTC が腫瘍から遊離し血管内 を浸潤し他の組織へ転移する機序に関しては未知の部分が多く、がんの転移を理解するために も CTC 解析は重要である。また、患者の CTC を解析することで患者に適した抗腫瘍療法のオ ーダーメイド医療を行うことができる。しかし、現在の CTC 捕獲技術は白血球によるコンタ ミネーションや、分離に前処理や時間がかかり細胞の生存率を低下させる問題があった。そこ で Wu らは、抗原抗体反応を利用して迅速かつ高効率で生存 CTC を磁気分離することを試み た<sup>[3]</sup>。彼らは CTC を分離するために、抗上皮細胞接着分子(Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM)抗体を修飾したマグへマイト(γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)粒子を用いた。その結果、約1mL の血液サ ンプルに含まれるわずか 5 個の CTC を再現性高く検出することに成功した。また、分離に要 する時間が短縮されたことで、分離後の CTC の約 94%が生存能力及び増殖能力を維持してい た。さらに、10 人のがん患者の血液サンプルのいずれからも CTC を検出することができた。 このように、CTC の磁気分離は腫瘍転移メカニズム解明や患者の治療法選択に大きな貢献を する技術と期待されている。

上皮由来の CTC を補足する際に EpCAM は最も広く使われているバイオマーカーであり、 アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) により認可された CellSearch<sup>®</sup> は 世界的に利用されている。肝細胞は上皮由来だが、多くの肝細胞がん (Hepatocellular Carcinoma: HCC) は EpCAM を発現しない。従って EpCAM を標的とした CTC の検出は HCC には不適で あった。そこで Yin らは磁気分離による HCC-CTC の分離を試みた<sup>[4,5]</sup>。彼らはアシアロ糖タン パク質受容体と呼ばれる肝細胞に特異的な受容体への抗原抗体反応を利用し、磁気ビーズ

(MicroBeads、Miltenyi Biotec)と自動磁気細胞分離装置 (autoMACS Pro Separator、Miltenyi Biotec)を用いて健常者と様々な疾患の患者からの血液サンプルを調べた。その結果、HCC 患者の 89%から CTC を検出することに成功した<sup>[5]</sup>。また、健常者及び HCC 以外の疾患の患者からは HCC-CTC は検出されなかった。HCC 患者から CTC を検出する効率を改善したことで、この方法は予後マーカーや治療効果の診断に役立つと期待される。

#### 1.1.1.2 幹細胞の磁気分離

多能性幹細胞は環境に応じて分化することで体を構成するあらゆる細胞に成り得る。多能 性幹細胞のうち、多能性胚幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を利用した基礎 研究や臨床研究は現在盛んに行われている。しかし、多能性幹細胞が特定の神経細胞集団へ分 化する際に観察される細胞の不均質性は、神経細胞の分化の研究や臨床において大きな障害で あった。Barral らはマウス ES 細胞から分化した神経細胞の不均質な集団から目的の細胞集団 を純度高く得るために磁気分離を行った<sup>[6]</sup>。ポリシアル酸(Polysialylated Acid: PSA)により修 飾された神経細胞接着分子(Neutral Cell Adhesion Molecule: NCAM)は発達中の神経前駆細胞 のマーカーとして利用されており、PSA-NCAM 陽性神経前駆細胞は脳修復や神経防護作用に 効果が期待されている。Barral らは抗原抗体反応を利用し、MicroBeads により PSA-NCAM 陽 性神経前駆細胞を autoMACS で濃縮することで、細胞の均質性を向上することに成功した。

磁気ビーズを機能化することは細胞を磁気分離した後の応用においても大切である。ヒトの末梢血には血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)と呼ばれる幹細胞が存在し、

6

血管内皮細胞へと分化することで血管新生部位を補充且つ促進することが分かっている。末梢 血中の EPC 数と動脈硬化のリスクは負の相関を示し、EPC の数が少ないヒトでは血管内皮機 能が低下していることが報告された<sup>[7]</sup>。EPC を利用した再生医療が期待されてはいるものの、 血中の EPC の数は極めて少なく、成人の末梢血の単核球の 0.01~0.0001% しか存在しない<sup>[8]</sup>。 EPC を回収するために密度勾配遠心分離、蛍光活性化細胞分類(Fluorescence-Activated Cell Sorting: FACS) 及び磁気分離などの方法が提案されており、回収した EPC を再生医療で用いる ために細胞を増殖させる技術も開発されてきた。しかし、既報文献の多くは"分離"または"増 殖"のどちらか一方に重点をおいていた。また、増殖法では、治療に必要な量の EPC を得るた めには何日間か細胞を培養する必要があった。そこで Wadajkar らは、EPC の磁気分離から細 胞増殖、更に細胞剥離までを一貫して行える 50~100 μm の多層機能性シェルを有する酸化鉄 粒子を作製した<sup>®」。</sup>粒子の最外殻のシェルは EPC に特異的な抗体である抗 CD34 抗体が修飾さ れている。その内側には、下限臨界溶液温度が 32~34 ℃ の熱応答性ポリマーからなる層があ り、温度変化により粒子の細胞への吸着と脱離を制御することが可能である。また、このポリ マー層には血管内皮増殖因子が含まれており、EPC の増殖を促進する。中心部は塩基性線維芽 細胞増殖因子を含む生分解性ポリマーにより構成されており、ポリマーが分解される際に増殖 因子が放出され、EPC の分化を促す。酸化鉄粒子は生分解性ポリマーと結合している(図 1-1)。 この粒子を用いることで血液サンプルから EPC を磁気分離し、濃縮することに成功した<sup>[8]</sup>。



図 1-1<sup>[8]</sup> 多機能性磁気ビーズによる末梢血からの EPC の磁気分離、濃縮および細胞剥離の模式 図。MNPs、PNIPAAm-AH、PLGA、VEGF、bFGF はそれぞれ、磁性体ナノ粒子、熱応答性ポリマー、 生分解性ポリマー、血管内皮増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子を表す。

#### 1.1.2 タンパク質の磁気分離

タンパク質の磁気分離は、磁気ビーズへタンパク質を修飾し、抗原抗体反応や免疫親和性 を利用することで、複雑な工程を要する抗体や抗体断片の精製を簡便にしたり、血液から疾患 のバイオマーカーを濃縮し迅速に検出したりすることを可能にする技術である。特に、バイオ マーカーの検出では後に説明するように金属ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)を利用することで、検出感度を高めることが可能となる。

#### 1.1.2.1 抗体の磁気分離

免疫グロブリン (Immunoglobulin: Ig) は免疫機能において重要な役割を果たす抗体であり、 免疫学的測定や細胞やタンパク質の機能解析など様々な分野で利用されている。また、ある種 の抗体は抗がん剤としても利用されている。即ち、がん細胞表面の必要以上に活性化した部位 を抗がん剤(抗体)によりブロックすることでがんの増殖を抑制するのである。一般的な抗体 の精製法は、Igと結合するプロテインG又はプロテインAを利用したアフィニティークロマ トグラフィーであり、不溶性不純物によるカラムの閉塞や、精製までに長時間要するという問 題があった。これに対し、磁気分離は簡便で迅速な分離法であり、分離に利用した磁気ビーズ を再利用することも可能である。これまでにプロテイン G やプロテイン A を磁気ビーズに修 飾し抗体を分離した例がいくつか報告されている<sup>[9,10]</sup>。Hu らは Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> コア@シェル型ナ ノ粒子の表面をメソポーラスシリカで被覆した Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@多孔性 SiO<sub>2</sub>コア@シェル@シェ ル型ナノ粒子を作製し、その表面にプロテインGを修飾してIgGの磁気分離を行った<sup>[9]</sup>。メソ ポアを持たない Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>粒子の IgG との結合能力が 20 mg/g であり、この値は市販のポリ マーやシリカで被覆された Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>粒子と同等であるのに対し、メソポーラスシリカシェルを形 成することで結合能力は 41 mg/g に増加した。また、ポアサイズを大きくすることで、51 mg/g と結合能力を更に増加することに成功し、より効率的な IgG の磁気分離が可能であることを示 した。

#### 1.1.2.2 バイオマーカーの検出

トロポニンは Ca イオンとの結合を介して筋収縮を制御するタンパク質であり、3 つのサ ブユニット(トロポニン C、トロポニン I、トロポニン T)からなる。急性冠症候群では心臓の 冠動脈に形成されたプラークが破裂することで、血栓が形成され、心筋梗塞や心臓突然死に陥 る可能性がある。心筋トロポニン I (cTnI)と心筋トロポニン T は急性冠症候群の患者のバイ オマーカーとして利用され、これらの検出量が高いと死亡率が増加することが報告されている に cTnI を検出する方法を提案した<sup>[12]</sup>。Au ナノロッド由来の LSPR ピークはナノロッド表面の 屈折率の変化に依存して波長がシフトする。従って、抗 cTnI 抗体修飾 Au ナノロッドに cTnI が結合すると LSPR ピークが約 6 nm レッドシフトする。これに対して、抗 cTnI 抗体を修飾し た Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ粒子で cTnI を補足し磁気分離した後、抗 cTnI 抗体修飾 Au ナノロッドに結合さ せたところ、LSPR ピークは約 13 nm レッドシフトし (図 1-2)、LSPR ピークのシフト量と cTnI の濃度は線形関係を示すことがわかった。LSPR による比色検出と磁気分離を組み合わせるこ とで、検出感度を 6 倍に高めた<sup>[12]</sup>。



図 1-2<sup>[12]</sup> 血液サンプルからの cTnI の磁気分離とLSPR による比色検出の模式図。

# 1.2 オルガネラの磁気分離に関する既往の研究

オルガネラとは、細胞内外において分化した機能を果たす構造の総称である。細胞内には 様々なオルガネラが存在し、それらが有機的に働くことで我々は生命活動を維持することがで きる。動物細胞のオルガネラの一例を図1-3に示す。オルガネラの構造及び機能解析は基礎研 究、臨床研究、創薬の分野において重要となる。オルガネラを単離することの利点は、オルガ ネラ特異的に存在するタンパク質の情報や遺伝学的手法では調べることが困難なタンパク質 の翻訳後修飾、糖鎖付加、脂質組成などを直接的に調査することが出来る点である。



図 1-3 動物細胞のオルガネラ。①エンドソーム、②リソソーム、③ペルオキシソーム、④エキソソーム、⑤小胞体、⑥核、⑦ミトコンドリア、⑧ゴルジ体、⑨中心体。

オルガネラを単離する際、細胞分画法は一般的に用いられる手法であり、超遠心分離法が 用いられる。細胞分画法には大きく分けて、分画遠心法(速度を高めながら遠心操作を繰り返 す方法)、速度沈降法(大きさによる沈降速度の差を利用する方法)及び平衡沈降法(密度勾配 遠心法ともいい、浮遊密度の差を利用して分画する方法)の3つがある<sup>[13]</sup>。これらの細胞分画 法の概念図を図1-4に示す。しかし、これらの方法はいずれも、目的のオルガネラを得るまで には長時間に亘る高速遠心を必要とするため、分離過程での膜タンパク質の変性や、膜に弱く 結合している表在性膜タンパク質の脱離が懸念される。また、物理的性質の近い異なるオルガ ネラが不純物として混入してしまうという問題があった。そこで、短時間で選択的に標的オル ガネラを分離する手法として、近年磁気分離法が注目を集めている。オルガネラの磁気分離に 関する報告は、細胞、タンパク質あるいは細菌の磁気分離と比べると圧倒的少数ではあるが、 これまでに、エンドソーム<sup>[14-18]</sup>、エキソソーム<sup>[19-24]</sup>、ミトコンドリア<sup>[25-28]</sup>、ペルオキシソーム <sup>[29-31]</sup>、リソソーム<sup>[14-18]</sup>、エキソソーム<sup>[19-24]</sup>、ミトコンドリア<sup>[25-28]</sup>、ペルオキシソーム 本節ではエンドソーム、ミトコンドリア、エキソソームの磁気分離例について紹介し、オルガ ネラの磁気分離が実際にどのような研究に役立てられているのかを説明する。



図 1-4 オルガネラの分離に利用される細胞分画法の概念図<sup>[13]</sup>: (a) 分画遠心法、(b) 速度沈降法、 (c) 平衡沈降法。

### 1.2.1 エンドソームの磁気分離

エンドソームはエンドサイトーシスにより形成される一重の生体膜から成るオルガネラ であり、細胞外からの物質の取り込み、シグナル伝達などに関与する。エンドソームの磁気分 離は、主にエンドソームの膜タンパク質や脂質組成の解析のために行われている。エンドソー ムを磁気分離するためには、まず磁気ビーズをエンドサイトーシスにより細胞へ取り込ませ、 磁気ビーズがエンドソームへ到達した段階で細胞膜を破砕して磁気分離を行う。

#### 1.2.1.1 ニーマン・ピック病 C型とエンドソーム膜タンパク質の関係

ニーマン・ピック病 C型(Niemann-Pick Type C: NPC)はエンドソームの膜タンパク質で ある NPC1 または NPC2 が欠損することで、リソソーム内に遊離型コレステロールや糖脂質が 蓄積する疾患である。約 95%の NPC 病の患者は NPC1 遺伝子に変異をもち、残りの患者は NPC2 に変異をもつ。NPC の発症機序において NPC2 タンパク質がどのような働きをするのか は未だ分かっていないが、NPC1 もしくは NPC2 遺伝子の欠損による細胞表現型は似ており、

ここから NPC1 タンパク質の欠損が NPC2 タンパク質の機能や局在に影響を及ぼすのではない かと考えられる。この仮定を確かめるために、Chen らは野生型マウスと NPC1 タンパク質に 変異を持つマウス(NPC1 マウス)から後期エンドソームを分離して調査した<sup>[14]</sup>。デキストラ ンで被覆した超常磁性酸化鉄ナノ粒子(Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: SPIONs)を マウスの尾静脈から投与すると、SPIONs は代謝されないため肝臓に蓄積し、エンドサイトー シスにより細胞内へ取り込まれる。SPIONs を投与してから一定時間後にマウスを安楽死させ 肝臓を摘出し、組織を破砕後遠心分離を行い、得られたエンドソームを含む画分に対して磁気 分離を行った。ウエスタンブロット(WB)の結果から、SPIONsの投与から肝臓摘出までの時 間を制御することで、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームを磁気分離分画へ濃 縮出来ることが分かった。 野生型と NPC1 マウス由来の後期エンドソームのタンパク質と脂質 をWBと高性能薄層クロマトグラフィーで解析したところ、二種類のエンドソームでは膜輸送 制御に関するタンパク質(Rab ファミリータンパク質)と脂質組成に大きな違いがあることが 明らかとなった。更に NPC1 マウスから検出された NPC2 タンパク質は野生型と比較して、WB のバンドが広がっており、これはNPC2 タンパク質が糖鎖修飾されたためだと考えられる。こ れらの結果から彼らは NPC1 タンパク質と NPC2 タンパク質の相互作用により、NPC1 マウス でもNPC2タンパク質の品質が劣化している可能性を示した。

#### 1.2.1.2 シグナル伝達の場となるエンドソーム

受容体の介在したエンドサイトーシスは、細胞内でのシグナル伝達カスケードを制御する ことが報告されており、シグナル伝達とエンドサイトーシスの関係性を明らかにすることは細 胞生物学の分野において重要なトピックの一つである。しかしエンドサイトーシスにおけるシ グナル伝達の詳細な機構は完全には解明されていない。Ras タンパク質は低分子 GTP

(Guanosine Triphosphate: GTP) 結合タンパク質であり、GTP が加水分解され GDP (Guanosine Diphosphate: GDP) になると不活性となる。Ras タンパク質は様々な細胞内シグナル伝達に関 与するがその内の一つに Ras/MAPキナーゼシグナル伝達経路がある。この経路は細胞の増殖、 分化、細胞死に関わる。Li らは、インスリンを非特異的に吸着させた粒径約 10 nm の SPIONs を受容体介在性エンドサイトーシスによって HIRcB 細胞内に取り込ませ、エンドソームを磁 気分離することで Ras/MAP キナーゼシグナル伝達カスケードを調べた<sup>[17]</sup>。その結果、培養時 間を 5 分から 60 分へ増やすと、SPIONs を含む膜小胞のサイズが約 150 nm から約 1.5 µm へ大 きくなることが分かった (図 1-5)。その後、細胞膜を破砕し、磁気分離を行い、WB で培養時 間を変化させたときのエンドソーム膜のタンパク質を調べた。その結果、インスリン修飾 SPIONs は培養時間の増加とともに初期エンドソームからリソソームへと徐々に輸送されてい ることが分かった。また、分離したエンドソームから Ras/MAP キナーゼシグナルカスケード に関与するタンパク質を調べたところ、それぞれのタンパク質は時間依存的にエンドソーム上 に集積していることが示された。ここから、インスリンによる Ras/MAP キナーゼシグナル伝 達カスケードはエンドソーム上で起こることが示唆されたが、これが一般的な現象であるのか、 インスリンに依存した機構であるのかは今後の検討課題である。



図 1-5<sup>[17]</sup> 培養時間を変化させながらインスリン修飾 SPIONs を取り込ませた HIRcB 細胞の電子顕 微鏡写真。培養時間はそれぞれ、(A) 5、(B) 15、(C) 30、(D) 60 分間。

#### 1.2.2 エキソソームの磁気分離

細胞は細胞外へエキソソーム(約40~100 nm)、マイクロベシクル(約50 nm から数 µm) あるいはアポトーシス小体(約50~5000 nm)などの膜小胞を放出する<sup>[36]</sup>。エキソソームの生 理的機能は現在でも広く研究されており、抗原提出や細胞間での生体分子の輸送に関与するこ とが知られている<sup>[22]</sup>。エキソソームは、がんや神経変性疾患の進行、感染症などの疾患とも関 係があることが報告されている<sup>[37,38]</sup>。分画遠心法や市販のエキソソーム検出キットはエキソソ ームを調べる際に利用される一般的な方法である。これらの方法に対して、磁気分離法は、短 時間で多種のエキソソームの中から目的のエキソソームを選択的に分離出来るという利点を もつ。エキソソームを磁気分離する際は、細胞を培養した培養液に対し、標的のエキソソーム を分離するための抗体を修飾した磁気ビーズを加え、抗原抗体反応を利用した磁気分離(免疫 磁気分離)が利用される。

Tauro らはエキソソームを超遠心分離、分画遠心法、磁気分離の3種類の方法で分離して、 それぞれの分離効率を比較した<sup>[21]</sup>。その結果、磁気分離法が他の方法と比べ、高い分離効率を 示すことが分かった。次に、彼らは大腸がんにおけるエキソソームの生理的な機能を調べた[22]。 腫瘍微小環境はがんの発生や進行、転移に影響を及ぼすことから、細胞が放出するエキソソー ムの詳細な解析は腫瘍微小環境を制御するエキソソームの生理的機能を理解するために重要 である。彼らはヒト大腸がん LIM1863 細胞を培養しオルガノイド(臓器の前駆細胞で形成さ れた人工器官)を形成した。LIM1863 細胞の培養液には A33-エキソソームと EpCAM-エキソ ソームの2種類の異なるエキソソームが存在する。これら2種類のエキソソームは電子顕微鏡 観察では見分けがつかず、また一般的なエキソソームマーカーである TSG101 や Alix、HSP70 を両方とも発現している。これらを別々に分離するために、まず得られた細胞フリーの培養液 に対し、抗 A33 抗体を修飾した SPIONs (Dynabeads<sup>®</sup>、Invitrogen)を用いて A33-エキソソーム を磁気分離した。その後、残りの培養液に対して抗 EpCAM 抗体を修飾した SPIONs (EpCAM MicroBeads、Miltenyi Biotec)を用いて EpCAM-エキソソームを磁気分離した。図 1-6A に磁気 分離したエキソソームの電子顕微鏡像を示す。磁気分離した2種類のエキソソームからはエキ ソソームのマーカータンパク質である Alix や TSG101 が WB により検出された(図 1-6B)。 A33-エキソソームと EpCAM-エキソソームの違いを調べるために、プロテオーム解析を行った ところ、A33-エキソソームからは 1024 のタンパク質が検出され、EpCAM-エキソソームからは 898のタンパク質が検出された。また、検出されたタンパク質の内、684のタンパク質はA-33 エキソソームと EpCAM-エキソソームの両方に発現していることが明らかとなった(図 1-6C)。 興味深いことに、 いくつかの MHC クラス I 分子は A33-エキソソームで顕著に検出されたのに 対し、EpCAM-エキソソームでは MHC クラス I 分子と MHC クラス II 分子の両方とも検出さ れなかった。EpCAM-エキソソームでは EpCAM と Claudin-7、CD44 が共に存在することが今 回の調査で初めて分かり、これらのタンパク質が腫瘍の進行に関与することが知られているこ とから、更にプロテオーム解析を詳細に行うことで、エキソソームが腫瘍形成時に果たす役割 を追究することが出来ると考えられる。



図 1-6<sup>[22]</sup>(A) LIM1863 細胞由来の A33-エキソソームと EpCAM-エキソソームの電子顕微鏡像(スケ ールバーは 100 nm)。(B) 磁気分離した A33-エキソソーム(左)、A33-エキソソーム分離後の培養液 (中央)、磁気分離した EpCAM エキソソーム(右)の WB の結果。(C) A33-エキソソームと EpCAM エ キソソーム由来のタンパク質のベン図。

#### 1.2.3 ミトコンドリアの磁気分離

ミトコンドリアは細胞内での ATP 生産や活性酸素の生成、アポトーシスなど多くの過程 に関与する。従ってミトコンドリアの機能障害はしばしば肥満<sup>[39]</sup>、がん<sup>[40]</sup>、神経変性疾患<sup>[41]</sup>、 心疾患<sup>[42]</sup>など様々な疾患を引き起こすことが知られている。ミトコンドリアの機能や活性を正 確に調べるためには、ミトコンドリアの単離が必要となる。一般的にミトコンドリアの分離に おいて分画遠心法は広く利用される手法であるが、長時間の遠心が必要であることや、試料の 種類によっては純度が低下するという問題があった。磁気分離法は、迅速かつ簡便に高純度の ミトコンドリアを単離できる手法として期待されている。具体的には、細胞破砕液に対しミト コンドリアへの抗体を修飾した磁気ビーズを添加した後磁気分離を行うことでミトコンドリ アを単離する。

Franko らは様々なマウス組織からミトコンドリアを磁気分離する手法を提案した<sup>[27]</sup>。彼ら は、抗 TOM22 (Translocase of Outer Mitochondria Membrane 22 Homolog) 抗体を修飾した磁気ビ ーズ (MicroBeads, Miltenyi Biotec)を用いて、組織破砕液からミトコンドリアを磁気分離した。 心臓、筋肉、脳、肝臓から磁気分離した後のミトコンドリア及び、遠心分画法で肝臓の組織か ら分離したミトコンドリアの電子顕微鏡像を図 1-7 に示す。電子顕微鏡像から約 90%のミトコ ンドリアは磁気分離過程において損傷を受けていないことが示唆された。WBを行ったところ、 磁気分離分画からミトコンドリアのマーカータンパク質である TOM20 とシトクロム c を検出 することができ、磁気分離されなかった分画(非磁気分離分画)からはこれらのマーカータン パク質は検出されなかった。一方、小胞体のマーカータンパク質とペルオキシソームのマーカ ータンパク質は磁気分離分画から検出されなかったのに対し、非磁気分離分画からは検出され た。このことからミトコンドリアの磁気分離が成功していることが示唆された。磁気分離後もミトコ ンドリアの機能を評価するために、酸素消費速度を調べたところ、磁気分離後もミトコ ンドリアの機能は維持されていることが分かった。磁気分離法と分画遠心法を質量分析によっ て比較したところ、磁気分離したミトコンドリアの方が分画遠心法で調製したミトコンドリア より純度が高いことが明らかとなった。

## 1.3 汎用性の高いオルガネラの磁気分離技術に向けて

上述のように、磁気ビーズによる細胞、タンパク質、オルガネラの磁気分離は、各々の目 的に応じた工夫がなされている。表 1-1 に細胞、タンパク質、オルガネラの一般的な磁気分離 とその目的をまとめた。多くの場合、磁気ビーズは SPIONs (あるいは SPIONs からなる粒子) を主とし、粒子表面を抗体やリガンドなどで修飾することで特異的に細胞やオルガネラと結合 するように設計されている。本節では、より汎用性の高いオルガネラの磁気分離技術に必要な 磁気ビーズの仕様について議論する。1.2 節でみたように、これまで種々のオルガネラの磁気 分離が報告されてはいるが、その実施例は決して多くない。



図 1-7<sup>[27]</sup> 抗 TOM22 抗体修飾磁気ビーズによる様々な組織からのミトコンドリアの分離。(A) 心臓、 (B) 骨格筋、(C) 脳、(D) 肝組織から磁気分離したミトコンドリアの電子顕微鏡像。(E) 分画遠心法に より肝組織から分離したミトコンドリアの電子顕微鏡像。外膜上に観察される小さな黒点は磁気ビー ズである。スケールバーは、左側のパネルでは 1 µm、右側のパネルでは 200 nm。

標的大分類	標的小分類	主な目的
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	血中循環腫瘍細胞	診断
不田月已	幹細胞	回収
	バイオマーカー	診断
クレハク貝	抗体	回収
	エンドソーム(エンドサイトーシス経路を利用)	解析
オルガネラ	エキソソーム(細胞培養液を利用)	診断・解析
	その他(細胞破砕液を利用)	解析

表 1-1 細胞、タンパク質、オルガネラを標的とした磁気分離。

オルガネラの磁気分離には、一般的に次の3種類の方法がある。1番目の方法は、エンド サイトーシスにより磁気ビーズを細胞内へ導入する方法で、この方法では粒子が細胞内を時間 経過とともに異なるオルガネラ(初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームなど)に 輸送され、これらのオルガネラを分離することが可能となる<sup>[17]</sup>。2番目の方法は、エキソソー ムなど細胞外へ放出される検体を分離する手法で、細胞培養した培地に対してオルガネラ特異 的タンパク質に対する抗体などを結合した磁気ビーズを導入し、標的オルガネラと結合させた 後分離する。3番目の方法は、ミトコンドリアなど細胞質内に存在するオルガネラを分離する 手法で、細胞膜を破砕した破砕液に対し、リガンド修飾磁気ビーズを添加し、標的オルガネラ と結合させた後分離する。この手法ではエンドサイトーシスをはじめとした膜輸送では磁気ビ ーズをターゲッティングできないオルガネラの磁気分離が可能となる。それでは、より汎用性 の高いオルガネラの磁気分離技術のために求められる磁気ビーズには、どのような特性が求め られるであろうか?

#### 1.3.1 オルガネラ磁気分離に求められる磁気ビーズの条件

#### 1.3.1.1 粒径について

細胞よりも小さなオルガネラを磁気分離する際、最も重要なことは磁気ビーズの粒径であ る。どのオルガネラを磁気分離の標的にするかにより、利用できる粒径が変わる。例えば、エ キソソームの分離では細胞培養液中の膜小胞を標的とするため、直径数 µm の磁気ビーズでも 利用できるが<sup>[19]</sup>、同じ大きさの磁気ビーズを細胞内へ導入しエンドソームの分離に利用するこ とは難しい。エンドサイトーシスにより粒子を細胞内へ導入する場合は、磁気ビーズの大きさ はエンドソームよりも小さくなくてはならない。エンドサイトーシスには様々な種類が存在し、 その中でもクラスリン依存性エンドサイトーシスにより形成されるクラスリン被覆小胞のサ イズがは約 120 nm と小さい<sup>[43]</sup>。これらの輸送小胞へ磁気ビーズを取り込ませるためには、必 然的に粒径約 100 nm 以下の粒子が求められる。しかし、市販の磁気ビーズの粒径は数 µm か らサブ µm が一般的であり、最も小さい市販の磁気ビーズは Miltenyi Biotec の MACS Micro Beads で平均粒径の公称値は 50 nm である。これ以上小さな磁気ビーズを作製できない一つの 理由として、平均粒径 9~15 nm の酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は 250~400 emu/cm<sup>3</sup>と低く<sup>[4447]</sup>、 これ以上サイズを小さくすると一粒子当たりの磁化が減少してしまい、分離効率が著しく低下 してしまうためである。

#### 1.3.1.2 イメージング機能の有用性

上述の例(図1-5、1-6、1-7)からもわかるように、多くのオルガネラの磁気分離では、磁

18

気分離後に分離分画の電子顕微鏡写真を撮影することでオルガネラへの磁気ビーズのターゲ ティングを確認している。例えば、エンドサイトーシスにより磁気ビーズを取り込ませた場合 には、培養時間を変化させたときの磁気ビーズの局在を電子顕微鏡とWBにより確認している <sup>[19]</sup>。細胞の電子顕微鏡観察の場合、特殊な前処理や熟練の技術が必要であるため、外部委託す ることも普通である。従ってリアルタイムで簡便に磁気ビーズの細胞内局在を観察することは 不可能である。もし、細胞観察でごく一般的に利用されている共焦点顕微鏡等の光学顕微鏡で 磁気ビーズの局在を可視化することが出来れば、標的オルガネラの免疫染色と併用することで、 容易に磁気ビーズの標的オルガネラへのターゲティングの成否を確認できる。さらにライブイ メージングが可能になれば、エンドサイトーシス経路にのせた磁気ビーズの局在をリアルタイ ムでモニタリングすることができ、オルガネラ磁気分離のための条件出しなどが極めて簡便化 される。

#### 1.3.2 次世代磁気ビーズとしての磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子

では具体的にどのような磁気ビーズが汎用的なオルガネラ磁気分離技術に理想的である か考えてみよう。酸化鉄は細胞毒性が低く作製が容易という利点をもつものの、バルクの飽和 磁化が低く、粒径を 30 nm 以下にしようとすると表面効果によってさらに飽和磁化が減少する ため、磁気分離能が急激に減少する。そこで本研究では、バルクの飽和磁化が酸化鉄よりもは るかに高い規則合金系の強磁性材料からなる磁性体ナノ粒子を作製することを考えた。具体的 には、磁性材料の中で最も高い飽和磁化を有する鉄コバルト合金 (FeCo) に注目した。FeCo は バルクで 1790 emu/cm<sup>3</sup> という高い飽和磁化<sup>[48]</sup>を示し、Fe (1710 emu/cm<sup>3</sup>)<sup>[49]</sup>や Co (1400 emu/cm<sup>3</sup>)

次に、磁性体ナノ粒子にイメージング機能を持たせるために、本研究ではプラズモニック 材料の利用を考えた。プラズモニック材料とは、Auナノ粒子やAgナノ粒子など顕著な LSPR 特性を有する材料のことである。蛍光色素を利用しない主な理由は、蛍光色素は退色により共 焦点顕微鏡等による長時間観察に不向きであることと、エンドサイトーシスにより細胞内へ導 入する場合はオルガネラの環境 (pH 等)により退色・脱離・分解の可能性があることである。 プラズモニック材料として、本研究では最も散乱断面積の高い Ag を採用した<sup>[50]</sup>。実際に Au ナノ粒子<sup>[51]</sup>やAgナノ粒子<sup>[52]</sup>の LSPR を利用した細胞のイメージングは報告されている。

このような考えに基づき、高橋らは、粒径約15nm で磁気特性とイメージング能力を有す る Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子を創製した<sup>[53]</sup>。これは FeCo の優れた磁気 特性と Ag の高いプラズモン散乱特性を併せ持つ磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子であ る。他にも様々な磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子が報告されているので、参考までに、 これらの磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子について付録に記載した。本論文では、 Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の生成機構 (第2章)、交換バイアスを用いた FeCo 磁性層酸化膜の解析(第3章)、ハイブリッドナノ粒 子の表面修飾(第4章)、ハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソームの磁気分離(第 5章)についてそれぞれ詳細な検討を行った。

# 1.4 研究の目的

本研究の目的は、Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型磁性-プラズモンハイブリッド ナノ粒子を実際にオルガネラの磁気分離に利用し、汎用的なオルガネラ磁気分離技術構築の可 能性を示すことである。本研究では、磁気分離のモデルとして、オートファジーによって細胞 質内で形成される"オートファゴソーム"を標的とした。これまでオートファゴソームに磁気 ビーズを取り込ませて分離した例はない。また、材料科学的な立場からは、ハイブリッドナノ 粒子の生成機構の解明や特性解析を徹底的に行い、粒子表面修飾の自由度を検討することで、 ハイブリッドナノ粒子の特徴と今後の改善点を明らかにすることを目的とした。

本論文の構成は以下のとおりである。まず第2章で Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル 型ナノ粒子の自己組織的な生成機構について述べる。第3章では FeCo 磁性層の酸化による交換バイアスの発現機構と交換バイアス磁場を活用した酸化膜厚の評価方法について述べる。第4章ではハイブリッドナノ粒子のポリアミノ酸による水溶化とタンパク質修飾について述べる。

## 1.5 参考文献

- 1. Antoine, J-C.; Ternynck, T.; Rodrigot, M.; Avrameas, S. Lymphoid Cell Fractionation on Magnetic Polyacrylamide-Agarose Beads. *Immunochemistry* **1978**, *15*, 443-452
- 2. Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry* **1990**, *11*, 231-238
- Wu, L-L.; Wen, C-Y.; Hu, J.; Tang, M.; Qi, C-B.; Li, N.; Liu, C.; Chen, L.; Pang, D-W.; Zhang, Z-L. Nanosphere-Based One-Step Strategy for Efficient and Nondestructive Detection of Circulating Tumor Cells. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 94, 219-226
- 4. Xu, W.; Cao, L.; Chen, L.; Li, J.; Zhang, X-F.; Qian, H-H.; Kang, X-Y.; Zhang, Y.; Liao, J.; Shi, L-H.; Yang, Y-F.; Wu, M-C.; Yin, Z-F. Isolation of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Using a Novel Cell Separation Strategy. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3783-3793

- Li, J.; Chen, L.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Liu, H.; Sun, B.; Zhao, L.; Ge, N.; Qian, H.; Yang, Y.; Wu, M.; Yin, Z. Detection of Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma Using Antibodies against Asialoglycoprotein Receptor, Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Pan-Cytokeratin. *PLoS One* 2014, 9, e96185
- 6. Barral, S.; Ecklebe, J.; Tomiuk, S.; Tiveron, M. C.; Desoeuvre, A.; Eckardt, D.; Cremer, H.; Bosio, A. Efficient Neuronal *in vitro* and *in vivo* Differentiation after Immunomagnetic Purification of mESC Derived Neuronal Precursors. *Stem Cell Res.* **2013**, *10*, 133-146
- Hill, J. M.; Zalos, G.; Halcox, J.P.; Schenke, W. H.; Waclawiw, M. A.; Quyyumi, A. A.; Finkel, T. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* 2003, *348*, 593-600
- 8. Wadajkar, A. S.; Santimano, S.; Tang, L.; Nguyen, K. T. Magnetic-Based Multi-Layer Microparticles for Endothelial Progenitor Cell Isolation, Enrichment, and Detachment. *Biomaterials* **2014**, *35*, 654-663
- Hu, J.; Huang, S.; Huang, X.; Kang, Z.; Gan, N. Superficially Mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Core Shell Microspheres: Controlled Syntheses and Attempts in Protein Separations. *Micropor. Mesopor. Mater.* 2014, 197, 180-184
- Hou, X.; Zhao, C.; Tian, Y.; Dou, S.; Zhang, X.; Zhao, J. Preparation of Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Magnetic Nanoparticles for Monoclonal Antibody Purification. *Chem. Res. Chin. Univ.* 2016, *32*, 889-894
- 11. Babuin, L.; Jaffe, A. S. Troponin: The Biomarker of Choice for the Detection of Cardiac Injury. *CMAJ* **2005**, *173*, 1191-1202
- 12. Tang, L.; Casas, J.; Venkataramasubramani, M. Magnetic Nanoparticle Mediated Enhancement of Localized Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Bioanalytical Assay in Human Blood Plasma. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1431-1439
- 13. Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Essential Cell Biology, Second Edition*; Garland Science/Taylor and Francis Group, 2004
- Chen, F. W.; Gordon R. E.; Ioannou, Y. A. NPC1 Late Endosomes Contain Elevated Levels of Non-Esterified ('Free') Fatty Acids and an Abnormally Glycosylated form of the NPC2 Protein. *Biochem. J.* 2005, 390, 549-561
- Wittrup, A.; Zhang, S. H.; ten Dam, G. B.; van Kuppevelt, T. H.; Bengtson, P.; Johansson, M.; Welch, J.; Mörgelin, M.; Belting, M. ScFv Antibody-Induced Translocation of Cell-Surface Heparan Sulfate Proteoglycan to Endocytic Vesicles. J. Biol. Chem. 2009, 284, 32959-32967
- Wittrup, A.; Zhang, S. H.; Svensson, K. J.; Kucharzewska, P.; Johansson, M. C.; Mörgelin, M.; Belting, M. Magnetic Nanoparticle-Based Isolation of Endocytic Vesicles Reveals a Role of the Heat Shock Protein GRP75 in Macromolecular Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107, 13342-13347
- 17. Li, H. S.; Stolz, D. B.; Romero, G. Characterization of Endocytic Vesicles Using Magnetic Microbeads Coated with Signalling Ligands. *Traffic* **2005**, *6*, 324-334
- Nakamura, N.; Lill, J. R.; Phung, Q.; Jiang, Z.; Bakalarski, C.; de Mazière, A.; Klumperman, J.; Schlatter, M.; Delamarre, L.; Mellman, I. Endosomes are Specialized Platforms for Bacterial Sensing and NOD2 Signalling. *Nature* 2014, 509, 240-244
- 19. Clayton, A.; Court, J.; Navabi, H.; Adams, M.; Mason, M. D.; Hobot, J. A.; Newman, G. R.;

Jasani, B. Analysis of Antigen Presenting Cell Derived Exosomes, Based on Immuno-Magnetic Isolation and Flow Cytometry. *J. Immunol. Methods* **2001**, *247*, 163-174

- Ji, H.; Chen, M.; Greening, D. W.; He, W.; Rai, A.; Zhang, W.; Simpson, R. J. Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Cell Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures. *PLoS One* 2014, 9, e110314
- Tauro, B. J.; Greening, D. W.; Mathias, R. A.; Ji, H.; Mathivanan, S.; Scott, A. M.; Simpson, R. J. Comparison of Ultracentrifugation, Density Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods for Isolating Human Colon Cancer Cell Line LIM1863-Derived Exosomes. *Methods* 2012, *56*, 293-304
- 22. Tauro, B. J.; Greening, D. W.; Mathias, R. A.; Mathivanan, S.; Ji, H.; Simpson, R. J. Two Distinct Populations of Exosomes are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-Derived Organoids. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 587-598
- 23. Hong, C. S.; Muller, L.; Boyiadzis, M.; Whiteside, T. L. Isolation and Characterization of CD34+ Blast-Derived Exosomes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One* **2014**, *9*, e103310
- Zong, S.; Wang, L.; Chen, C.; Lu, J.; Zhu, D.; Zhang, Y.; Wanga, Z.; Cui, Y. Facile Detection of Tumor-Derived Exosomes Using Magnetic Nanobeads and SERS Nanoprobes. *Anal. Methods* 2016, *8*, 5001-5008
- 25. Hornig-Do, H. T.; Günther, G.; Bust, M.; Lehnartz, P.; Bosio, A.; Wiesner, R. J. Isolation of Functional Pure Mitochondria by Superparamagnetic Microbeads. *Anal. Biochem.* **2009**, *389*, 1-5
- 26. Tang, B.; Zhao, L.; Liang, R.; Zhang, Y.; Wang, L. Magnetic Nanoparticles: An Improved Method for Mitochondrial Isolation. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *5*, 1271-1276
- 27. Franko, A.; Baris, O. R.; Bergschneider, E.; von Toerne, C.; Hauck, S. M.; Aichler, M.; Walch, A. K.; Wurst, W.; Wiesner, R. J.; Johnston, I. C.; de Angelis, M. H.; Efficient Isolation of Pure and Functional Mitochondria from Mouse Tissues using Automated Tissue Disruption and Enrichment with Anti-TOM22 Magnetic Beads. *PLoS One* **2013**, 8, e82392
- 28. Kappler, L.; Li, J.; Häring, H. U.; Weigert, C.; Lehmann, R.; Xu, G.; Hoene, M. Purity Matters: a Workflow for the Valid High-Resolution Lipid Profiling of Mitochondria from Cell Culture Samples. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21107
- 29. Lüers, G. H.; Hartig, R.; Mohr, H.; Hausmann, M.; Fahimi, H. D.; Cremer, C.; Völkl, A. Immuno-Isolation of Highly Purified Peroxisomes Using Magnetic Beads and Continuous Immunomagnetic Sorting. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1205-1210
- 30. Wang, Y.; Taylor, T. H.; Arriaga, E. A. Analysis of the Bioactivity of Magnetically Immunoisolated Peroxisomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 41-49
- 31. Kikuchi, M.; Hatano, N.; Yokota, S.; Shimozawa, N.; Imanaka, T.; Taniguchi, H. Proteomic Analysis of Rat Liver Peroxisome: Presence of Peroxisome-Specific Isozyme of Lon Protease. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 421-428
- 32. Rodriguez-Paris, J. M.; Nolta, K. V.; Steck, T. L. Characterization of Lysosomes Isolated from *Dictyostelium Discoideum* by Magnetic Fractionation. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 9110-9116
- 33. Diettrich, O.; Mills, K.; Johnson, A. W.; Hasilik, A.; Winchester, B. G. Application of Magnetic Chromatography to the Isolation of Lysosomes from Fibroblasts of Patients with Lysosomal

Storage Disorders. FEBS Lett. 1998, 441, 369-372

- 34. Mura, C. V.; Becker, M. I.; Orellana, A.; Wolff, D. Immunopurification of Golgi Vesicles by Magnetic Sorting. *J. Immunol. Methods* **2002**, *260*, 263-271
- 35. Journet, A.; Klein, G.; Brugière, S.; Vandenbrouck, Y.; Chapel, A.; Kieffer, S.; Bruley, C.; Masselon, C.; Aubry, L. Investigating the Macropinocytic Proteome of *Dictyostelium* Amoebae by High-Resolution Mass Spectrometry. *Proteomics* **2012**, *12*, 241-245
- 36. van der Meel, R.; Krawczyk-Durka, M.; van Solinge, W. W.; Schiffelers, R. M. Toward Routine Detection of Extracellular Vesicles in Clinical Samples. *Int. J. Lab. Hematol.* **2014**, *36*, 244-253
- 37. De Toro, J.; Herschlik, L.; Waldner, C.; Mongini, C. Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 203
- 38. Kalani, A.; Tyagi, A.; Tyagi, N. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 590-600
- 39. Bournat, J. C.; Brown, C. W. Mitochondrial Dysfunction in Obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2010**, *17*, 446-452
- 40. Kiebish, M. A.; Han, X.; Cheng, H.; Chuang, J. H.; Seyfried, T. N. Cardiolipin and Electron Transport Chain Abnormalities in Mouse Brain Tumor Mitochondria: Lipidomic Evidence Supporting the Warburg theory of Cancer. J. Lipid Res. **2008**, 49, 2545-256
- 41. Johri, A.; Beal, M. F. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. J. Pharmacol. Exp. Ther. **2012**, 342, 619-630
- 42. Wallace, K. B. Adriamycin-Induced Interference with Cardiac Mitochondrial Calcium Homeostasis. *Cardiovasc. Toxicol.* **2007**, *7*, 101-107
- 43. Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. Nature 2003, 422, 37-44
- Manohar A.; Krishnamoorthi C. Low Curie-transition Temperature and Superparamagnetic Nature of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Prepared by Colloidal Nanocrystal Synthesis. *Mater. Chem. Phys.* 2017, 192, 235-243
- 45. Wan, J.; Tang, G.; Qian, Y. Room Temperature Synthesis of Single-Crystal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with Superparamagnetic Property. *Appl. Phys. A* **2007**, *86*, 261-264
- 46. Gyergyek, S.; Makovec, D.; Jagodič, M.; Drofenik, M.; Schenk, K.; Jordan, O.; Kovač, J.; Dražič, G.; Hofmann, H. Hydrothermal Growth of Iron Oxide NPs with a Uniform Size Distribution for Magnetically Induced Hyperthermia: Structural, Colloidal and Magnetic Properties. J. Alloy. Comp. 2017, 694, 261-271
- 47. Xie, H.; Zhu, Y.; Jiang, W.; Zhou, Q.; Yang, H.; Gu, N.; Zhang, Y., Xu, H.; Xu, H.; Yang, X. Lactoferrin-Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles As a Specific MRI Contrast Agent for Detection of Brain Glioma in vivo. *Biomaterials*. **2011**, *32*, 495-502
- 48. Maenosono, S.; Saita, S. Theoretical Assessment of FePt Nanoparticles as Heating Elements for Magnetic Hyperthermia. *IEEE Trans. Magn.* **2006**, *42*, 1638-1642
- 49. 志賀正幸, 磁性入門 スピンから磁石まで, 内田老鶴圃, 2007
- 50. Yguerabide, J; Yguerabide, E. E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly

Fluorescent Analogs and Their Use As Tracer Labels in Clinical and Biological Applications - I. Theory. *Anal. Biochem.* **1998**, *262*, 137-156

- 51. Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell surface Expression and Spatial Nanoclustering through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3231-3237
- 52. Wang, H.; Shen, J.; Li, Y.; Wei, Z.; Cao, G.; Gai, Z.; Hong, K.; Banerjee, P.; Zhou, S. Porous Carbon Protected Magnetite and Silver Hybrid Nanoparticles: Morphological Control, Recyclable Catalysts, and Multicolor Cell Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 9446-9453
- 53. Takahashi, M.; Mohan, P.; Nakade, A.; Higashimine, K.; Mott, D.; Hamada, T.; Matsumura, K.; Taguchi, T.; Maenosono, S. Ag/FeCo/Ag Core/Shell/Shell Magnetic Nanoparticles with Plasmonic Imaging Capability. *Langmuir* **2015**, *31*, 2228-2236

# 第2章 磁性-プラズモンハイブリッド ナノ粒子の生成機構

## 2.1 緒言

ハイブリッドナノ粒子の生成機構を調べることは、再現性高く粒子を合成するためにも、 また粒径の制御や新たな合成法を考案する際にも非常に重要である。Ag@FeCo@Ag コア@シ ェル@シェル型ナノ粒子は、ダブルシェルという複雑な構造であるにも関わらず、合成自体は 単純なワンポット合成により行われる。また合成時間も、準備から粒子を得る過程まで約2時 間と比較的短時間である。合成手順としては、まず Ag の前駆体をフラスコへ仕込み、昇温時 に、FeCo及び Ag の前駆体を順次反応溶液へ注入することで Ag@FeCo@Ag のダブルシェル型 構造が得られる。一見、種媒介成長(Seed-mediated Growth)により、逐次的にシェルが形成さ れていると考えられるが、実際はそう単純ではない。本章では、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の生 成機構について体系的に考察する。本章で明らかになった Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の生成機構 は、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子だけでなく、その他の異種材料を組み合わせたへテロ構造ナノ粒 子にも応用することが可能な実用的知見となるだろう。

## 2.2 ハイブリッドナノ粒子の合成

#### 2.2.1 試薬及び評価装置

【試薬】 鉄(III)アセチルアセトナート [Fe(acac)<sub>3</sub>、純度 ≥99.9%]、コバルト(II)アセチルアセ トナート [Co(acac)<sub>2</sub>、純度 97%]、硝酸銀 (AgNO<sub>3</sub>、純度 ≥99.9999%)、1,2-ヘキサデカンジオ ール (純度 90%)、オレイルアミン (OLA、純度 70%)、オレイン酸 (OA、純度 90%)、テト ラエチレングリコール (TEG、純度 99%) は Sigma-Aldrich から購入した。ヘキサンとアセト ンは関東化学から購入し、エタノールはナカライテスクから購入した。トルエンは和光純薬か ら購入した。

【評価装置】 ナノ粒子の構造解析は、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope: TEM、Hitachi H-7650、加速電圧 100 kV)、走査 TEM (Scanning TEM: STEM、JEOL JEM-ARM200F、 加速電圧 200 kV)、エネルギー分散型 X 線分光装置 (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: EDS)、 X 線回折装置 (X-ray Diffractometer: XRD、Rigaku MiniFlex600、CuKa 線)で行った。組成分析 は誘導プラズマ結合発光分光 (Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy: ICP-OES、 Shimadzu ICPS-7000) で行った。

#### 2.2.2 Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子の合成

最初に2種類の前駆体溶液をバイアル瓶に調整する。0.1 mmolの AgNO3 を秤量し、バイ アル瓶へ移した後に1 mLのオレイルアミンを加えた。これに超音波洗浄機を用いて、結晶が 部分的に溶解して自濁するまで超音波を印加した。溶液が自濁したところで、トルエンを1 mL 加え、結晶が完全に溶解し、溶液の色が透明になるまで超音波を印加した。このとき、Ag イ オンの還元を防ぐために、超音波洗浄機の水温が 35 ℃ 以上にならないように注意した。別の バイアル瓶には 0.2 mmolの Fe(acac)<sub>3</sub> と 0.2 mmol の Co(acac)<sub>2</sub>を量りとり、1 mL の OLA 及び 2 mL のトルエンを加えた。この前駆体溶液も同様に超音波を印加して結晶を溶解した。次に、 三口フラスコに 0.1 mmol の AgNO<sub>3</sub>、1.0 mmol の 1,2-ヘキサデカンジオール、10 mmol の OLA、 8 mmol の OA、10 mL の TEG を加えた。三口フラスコに攪拌子を入れ、両側の口をセプタム で閉じ、片方のセプタムには Ar バブリング用にパスツールピペットを挿入した。三口フラス コを、コンデンサーと接続したトラップ球に接続し、5 分間ほど室温で反応溶液を 350 mL/分 の流量で Ar バブリングを行った。Ar バブリングは反応が終了するまで継続した。

フラスコ内が Ar ガスで十分に置換された後、反応溶液の温度を温度コントローラーと接 続されたマントルヒーターで 100 ℃ まで上げ、10 分間攪拌した後、更に温度を 170 ℃ まで上 げた。この際、170℃まで温度が一定の速度で昇温するように温度コントローラーの設定温度 を 300 ℃ とした。反応温度が 170 ℃ に達したところで、Fe と Co の前駆体溶液をシリンジを 使って反応溶液へ注入した。この時に温度が 170 ±2 ℃ の範囲内で収まるように注入速度を手 動で調整した。その後、反応温度が250℃に達した瞬間、Agの前駆体溶液を約30秒かけて注 入した。Agの前駆体溶液の注入後、即座に温度コントローラーの設定温度を 230 ℃ に切り替 え、前駆体溶液注入後から15分間反応させた。反応終了後、マントルヒーターを取り除き、 反応溶液を自然冷却した。温度が70℃以下に達したところで、トラップ球から三口フラスコ を取り外した。攪拌子には生成したナノ粒子が磁気的相互作用のため吸着しているので、スタ ーラーで攪拌子を回転させながら、反応溶液を吸い取り、2本の 50 mL の遠沈管へ均等に分配 した。そしてアセトンを全体の容積が 45 mL となるように加え、4500 rpm (3760 G、ユニバー サル冷却遠心機 5910、Kubota) で 5 分間の遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みを捨てた後、 400 µL のヘキサンを遠沈管に加え、粒子を分散させた。そして 200 µL ずつ別の 2 本の新しい 遠沈管に移し、4本の遠沈管にアセトンを容積が45mLとなるように加え、同じ条件で遠心分 離を行った。最後に上澄みを捨て、遠沈管底に沈殿した粒子を真空乾燥機で乾燥させた。

26

#### 2.2.3 Ag@FeCo、Ag@Co及び Ag@Fe コア@シェル型ナノ粒子の合成

Ag@FeCo ナノ粒子の合成方法は Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成方法とほぼ同じであり、 唯一の違いは Ag@FeCo ナノ粒子では Ag の前駆体を 250 ℃ で注入することなく、反応温度が 250 ℃ に達した際に、少量の反応溶液をサンプリングして、温度コントローラーの設定温度を 230 ℃ に設定し、15 分間反応させたことである。

Ag@Coナノ粒子及びAg@Fe ナノ粒子の合成も基本的にはAg@FeCoナノ粒子の合成方法 と同じである。ただし、Ag@FeCoナノ粒子では 170 °C で Fe と Co の前駆体溶液を注入した が、Ag@Coナノ粒子の合成の際は、Fe の前駆体を含まない Co の前駆体溶液を注入し、Ag@Fe ナノ粒子の合成の際は Co の前駆体を含まない Fe の前駆体溶液を注入した。その他の試薬の 量、反応時間、洗浄過程は Ag@FeCo ナノ粒子の合成方法と基本的に同じである。ただし、 Ag@Fe ナノ粒子の場合、洗浄過程で1回目の遠心分離後に得られた沈殿物が少なかったため、 2 回目の遠心分離を行わずに、そのナノ粒子を真空乾燥させた。

#### 2.2.4 FeCo ナノ粒子(比較対象)の合成

比較対象として、Ag コアを含まない FeCo ナノ粒子の合成を行った。まず、三口フラスコ に 0.2 mmol の Fe(acac)<sub>3</sub>、0.2 mmol の Co(acac)<sub>2</sub>、1.0 mmol の 1,2-ヘキサデカンジオール、10 mmol の OLA、8 mmol の OA、及び 10 mL の TEG を加えた。室温で5分間ほど Ar バブリングを行 った後、反応温度を 100 ℃ まで上げ、10分間攪拌することで揮発性物質を取り除いた。その 後、反応温度を 290 ℃ まで上げ、20分間反応させた。昇温中、反応温度が 230 ℃、250 ℃、270 ℃ 及び 290 ℃ に達したところでサンプリングを行った。反応終了後、マントルヒーターを取 り外し、反応溶液を自然冷却した。その後、トラップ球から三口フラスコを取り外し、反応溶 液を 2本の遠沈管に均等に分配し、アセトンを容積が 45 mL になるまで加えた。この状態で遠 心分離を行っても沈殿物は得られないため、アセトンがナノ粒子の分散性を低下させるのを待 っために遠沈管を 2 時間放置した。その後、遠沈管に対して 4500 rpm で 5 分間の遠心分離を 行い、上澄みを捨てた後、最終生成物を真空乾燥機で乾燥させた。

### 2.3 ハイブリッドナノ粒子の構造

#### 2.3.1 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の構造解析結果

図 2-1 に Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の TEM、STEM-高角環状暗視野(HAADF)像及び EDS 元素マッピング像を示す。TEM 像(図 2-1a,b)から Ag@FeCo@Ag ナノ粒子は球状で中心に重

い元素を含むコアシェル構造を有することが示唆された。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の粒径は 13.5±2.5 nm (*n*=531) であった。電子線を試料に照射した際の散乱電子数は原子番号の二乗 に比例するため、STEM-HAADF 像では組成に対応したコントラストを得ることができる。つ まり重い元素ほど明るいコントラストが得られる。従って、図 2-1c に示す STEM-HAADF 像か らも、このナノ粒子はコアに重い元素を含むことが確認された。EDS 元素マッピング像(図 2-1d-g) から、ナノ粒子は Ag のコア及び FeCo のシェルを有するコアシェル型ナノ粒子であるこ とが確認された。HAADF 像と EDS 元素マッピング像を比較しながら、Ag のコアの粒径解析 を行ったところ、Ag のコアの直径は 9.3±2.5 nm (*n*=38) であった。

図 2-1g に示した黄色の線に沿って EDS ラインプロファイルを取得したところ、図 2-1h に 示すように、Ag の検出強度が粒子表面で強くなることが確認された。このことから Ag シェル が粒子最表面に形成されていることを確認した。Ag の EDS シグナルがコアと最表面以外から も検出されている理由は、電子線を粒子上で走査する際に高さ(z 軸)方向の分解能が二次元 平面(x 軸及びy 軸方向)の分解能ほど高くないため、焦点面以外からの特性 X 線も検出され ているためである。Ag シェルの厚みは、TEM 像や Ag L 端からの元素マッピング像で顕著に 観察されないことから非常に薄く、サブモノレイヤーから数原子層だと考えられる。EDS から 求められた組成比は Ag: Fe: Co = 29:31:40 であり、ICP-OES から求められた組成比は Ag: Fe: Co = 19:36:45 であった。これらの実験的に得られた組成比は仕込み比から計算した理論 組成比 Ag: Fe: Co = 12:44:44 と近い値である。

#### **2.3.2** Ag@FeCo ナノ粒子の構造解析結果

図 2-2 に Ag@FeCo ナノ粒子の TEM 像、STEM-HAADF 像及び EDS 元素マッピング像を 示す。最終生成物の平均粒径は 16.9±3.4 nm (n=855) であった。図 2-2f から Ag@FeCo ナノ 粒子には、2 種類のナノ粒子が存在することが示唆された。1 つは Ag コアが FeCo シェルで完 全に被覆された欠陥のないコア@シェル構造を有するナノ粒子であり、もう 1 つは粗大な Ag コアの表面に部分的に FeCo シェルが堆積しているナノ粒子である。図 2-2g は合成画像中の黄 色で枠組みされた粒子の拡大図である。良く見ると、FeCo シェルは Ag コアの近傍では Co リ ッチであり、粒子表面へ向かうに従って Fe の割合が多くなるという組成に関する傾斜構造を 有していることがわかった。また、STEM-HAADF 像と EDS 元素マッピング像を比較しながら Ag コアの粒径を慎重に見積もったところ、FeCo シェルにより完全被覆された Ag のコアの直 径は 11.8±1.5 nm (n=4) であった。



**図 2-1** Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の(a) TEM 像、(b) 高分解能 TEM 像、(c) STEM-HAADF 像及び (d-g) EDS 元素マッピング像。(d) Ag L 端、(e) Fe K 端、(f) Co K 端、(g) 合成画像。(h) 合成画像中の黄 色の線に沿った EDS ラインプロファイル(点線は生データ、実線は low pass filter をかけたデータ。 青:Ag、赤:Fe、緑:Co)。



**図 2-2** Ag@FeCo ナノ粒子の (a) TEM 像、(b) STEM-HAADF 像及び (c-g) EDS 元素マッピング像。 (c) Ag L 端、(d) Fe K 端、(e) Co K 端、(f) 合成画像。(g) 合成画像(f)の黄色の枠組みされた粒子の 拡大図。(h) 合成画像(g)の黄色の線に沿った EDS ラインプロファイル(点線は生データ、実線は low pass filter をかけたデータ。青: Ag、赤: Fe、緑: Co)。

#### 2.3.3 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子と Ag@FeCo ナノ粒子の粒径分布と結晶構造

図 2-3 に最終生成物である Ag@FeCo@Ag ナノ粒子及び Ag@FeCo ナノ粒子の粒径分布を示す。また、反応温度が 250 °C に到達した時点でサンプリングした Ag@FeCo ナノ粒子の粒径分布を TEM 像(挿入図)も併せて示した。サンプリングしたナノ粒子の粒径は 6.4±1.8 nm (*n* = 529)であった。ヒストグラムは全粒子数が 100 となるように規格化している。興味深いこと に、Ag@FeCo ナノ粒子の粒径及び標準偏差が Ag@FeCo@Ag ナノ粒子よりも大きいことがわ かった (図 2-3)。これは Ag@FeCo ナノ粒子のみに観察された粗大な Ag コアを有する粒子 (図 2-2)の存在が起因している。また、サンプリングした粒子の粒径が約 6.4 nm であるのに対し、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の Ag のコアのサイズは約 9.3 nm、綺麗なコアシェル構造を有する Ag@FeCo ナノ粒子の Ag のコアのサイズが約 11.8 nm であり、反応温度が 250 °C に達した段 階ではまだ Ag ナノ粒子しか生成されていないことがわかる。

次に、図 2-4 に Ag@FeCo@Ag ナノ粒子及び Ag@FeCo ナノ粒子の XRD パターンを示す。 詳細な結晶構造解析は第 3 章に譲るが、どちらのナノ粒子からも *fcc* Ag と *bcc* FeCo の両方の 相が検出された。また、XRD パターンからはどちらのナノ粒子にもマグネタイト(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)、マ グへマイト( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、ヘマタイト( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)などの酸化鉄、及びコバルトフェライト(CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) などのフェリ磁性相は検出されなかった。



図 2-3 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子、Ag@FeCo ナノ粒子及びサンプリングした粒子の粒径ヒストグラム。 黒は 250 °C でサンプリングした Ag@FeCo ナノ粒子(6.4 ± 1.8 nm)、赤は Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の 最終生成物(13.5 ± 2.5 nm)、青は Ag@FeCo ナノ粒子の最終生成物(16.9 ± 3.4 nm)を示す。挿入 図は 250 °C でサンプリングした Ag@FeCo ナノ粒子の TEM 像を示す。



図 2-4 Ag@FeCo ナノ粒子(上段)及び Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(下段)の XRD パターン。リファレンス はそれぞれ JCPDS PDF No. 00-049-1567 (*bcc* Co<sub>50</sub>Fe<sub>50</sub>)、01-087-0717 (*fcc* Ag)、01-071-4918 (cubic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)、01-074-6402 (cubic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)。

#### 2.3.4 Ag@Co ナノ粒子及び Ag@Fe ナノ粒子の構造解析結果

Ag@Co ナノ粒子及び Ag@Fe ナノ粒子の TEM 像、STEM-HAADF 像、及び EDS 元素マッ ピング像を図 2-5 に示す。平均粒径は、Ag@Co ナノ粒子は 13.8±3.5 nm (n=230)、Ag@Fe ナ ノ粒子は 30.4±8.6 nm (n=164) であった。図 2-5 より、Ag@Co ナノ粒子の場合には Ag@Co コア@シェル構造を有する粒子と Co シェルを持たない Ag ナノ粒子がそれぞれ観察された。 Ag@FeCo ナノ粒子の場合、Fe(acac)<sub>3</sub> と Co(acac)<sub>2</sub> をそれぞれ 0.2 mmol ずつ合計 0.4 mmol の前 駆体を添加しているのに対し、Ag@Co ナノ粒子の場合には Co(acac)<sub>2</sub> を 0.2 mmol 添加してい るのみであるため、全ての Ag コアを均一に被覆するためには Co 前駆体量が不足していたた めと考えられる。Ag@Fe ナノ粒子の場合には、EDS 元素マッピング像(図 2-5h-j) からわかる とおり、Ag コアの粒径が大きくなり、結果として粒径が増大している。また、Ag@Fe ナノ粒 子の Fe シェルは薄く不均一であった。



図 2-5 Ag@Co ナノ粒子の(a) TEM 像、(b) STEM-HAADF 像、及び(c-e) EDS 元素マッピング像。 (c) Co K 端、(d) Ag L 端、(e) 合成画像。Ag@Fe ナノ粒子の(f) TEM 像、(g) STEM-HAADF 像、及び (h-j) EDS 元素マッピング像。(h) Fe K 端、(i) Ag L 端、(j) 合成画像。

#### 2.3.5 FeCoナノ粒子(比較対象)の構造解析結果

Ag 前駆体の非存在下で FeCo ナノ粒子を合成したところ、反応温度 270 °C 以下ではナノ 粒子の生成はほとんど観察されなかった。図 2-6a に、反応温度が 290 °C に達した際にサンプ リングした粒子の TEM 像を示す。平均粒径は 4.9 ± 1.1 nm (n = 149) であった。図 2-6b に最 終生成物の TEM 像を示す。平均粒径は 8.3 ± 1.5 nm (n = 165) の球状ナノ粒子が観察された。 図 2-6c にサンプリングした粒子と最終生成物の粒径分布を示す。290 °C で 20 分間反応させる ことで、粒子成長が起きていることが確認できた。最終生成物の XRD パターン (図 2-6d) か ら、得られたナノ粒子は Co<sub>x</sub>Fe<sub>1-x</sub>O (コバルトウスタイト)<sup>[1]</sup>であることが確認された。ICP-OES の結果から Fe と Co の組成は 52 : 48 であり、化学組成は Coo<sub>x</sub>Fe<sub>0.5</sub>O であることが分かった。



図 2-6 Ag の非存在下で合成した FeCo ナノ粒子。(a) 反応温度が 290 ℃ に達した際にサンプリン グした粒子及び (b) 最終生成物の TEM 像。(c) 290 ℃ でサンプリングしたナノ粒子(黒)と最終生成 物(赤)の粒径のヒストグラム。(d) 最終生成物の XRD パターン。
## 2.4 ハイブリッドナノ粒子の生成機構

#### 2.4.1 Ag コアの還元触媒作用と FeCo シェルの形成機構について

まず、Ag コア表面での FeCo シェルの形成に関して考えよう。考察に際して重要となる実験事実を下記に列挙する。

- (i) FeCo ナノ粒子の合成では、反応温度が 250 ℃ に達した段階ではナノ粒子はまだ生成されていない。反応温度が 290 ℃ に到達した直後には、粒径約 4.9 nm のナノ粒子の生成が確認された。
- (ii) Ag@FeCo ナノ粒子の合成において、反応温度が 250 ℃ でサンプリングした粒子は粒径約 6.4 nm の Ag ナノ粒子であり、FeCo シェルはまだ形成されていない。またその大きさは、最終生成物である Ag@FeCo ナノ粒子(あるいはAg@FeCo@Ag ナノ粒子)の Ag コアのサイズ(約 10 nm)よりかなり小さい。
- (iii) Ag@FeCo及び Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成では、反応温度が 250 ℃ 以下でも FeCo シェルは形成される。

Fe と Co の還元電位は低く、Fe<sup>2+</sup>/Fe は−0.45 V(vs. SHE)、Co<sup>2+</sup>/Co は−0.28 V(vs. SHE)で ある<sup>[2]</sup>。これに対して Ag<sup>+</sup>/Ag は+0.8 V(vs. SHE)と高く<sup>[2]</sup>、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成で は Ag ナノ粒子が最初に形成される。(i)及び(iii)の実験事実から、Ag ナノ粒子が存在すること で、Fe 及び Co のカチオンが通常では還元されないような低温でも還元されることが分かる。 即ち、Ag ナノ粒子が Fe 及び Co カチオンの還元触媒として作用していることが推察される。 また、Ag@FeCo 及び Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成において、Fe と Co の前駆体溶液を 170 ℃ で注入しているにも関わらず、(ii)の実験事実からわかるように、反応温度が 250 ℃ に達し た段階ではまだ FeCo シェルは形成されておらず、Ag コアが成長して粒径約 10 nm まで到達 した時点で、Fe 及び Co カチオンを還元できるだけの触媒活性を獲得したと考えられる。つま り、Ag ナノ粒子の還元触媒活性は粒径に依存するということが示唆される。

## 2.4.1.1 Ag クラスターの電子エネルギー準位

金属における電子エネルギーを議論する際、一般的に物理学者と化学者は異なるエネルギ ースケールを用いる<sup>[3]</sup>。図 2-7 に 1 個の電子の真空もしくは気相中でのエネルギー(ε)と酸化 還元電位(E)のスケールを示した。物理学者は電子の真空もしくは気相中でのエネルギー準 位をゼロとし、電子が束縛されている状態をエネルギーの低い状態とした左側のスケールを用 いることが多い。図 2-7 の左側のスケールに Ag のバルクのフェルミ準位  $\varepsilon = -4.6 \text{ eV}$  ( $\varepsilon = -\Phi$ 、 $\Phi$ : 仕事関数) と 1 個の Ag 原子のイオン化エネルギー  $\varepsilon = -7.5 \text{ eV}$  ( $\varepsilon = -\text{IE}$ 、 Ionization energy: IE) を示した。ここから、Ag の粒径が大きくなるに従ってイオン化エネルギーが小さ くなることが分かる。つまり、気相中では粒径が大きくなるに従い、電子のエネルギーも高く なる。図 2-8 はクラスター内の Ag 原子の数に対して IE をプロットしたグラフである<sup>[3]</sup>。IE は Ag 原子数が増加するに従って振動しながら減少することが分かる。これは安定な電子構造を とることが可能なクラスターには原子の魔法数が存在するためである<sup>[4]</sup>。



図 2-7 電子エネルギーのスケール。(左) 1 個の電子の真空もしくは気相中でのエネルギー準位。 (右) 標準水素電極内の電子のエネルギーを *E*-|*e*|=0 eV としたときの水相での電子のエネルギー に相当。添え字の m はクラスター内の原子数。



図 2-8<sup>[3]</sup> Ag クラスターのイオン化エネルギーと原子数の関係。

一方、化学者は電気化学に基づいて電子的過程を標準酸化還元電位により議論することが 多い。図 2-7 の右側のスケールは電子のエネルギーを電気化学のスケールで示している。標準 水素電極内の電子のエネルギーは真空準位を基準としたスケールでは-4.44 eV に対応する。従 って 2 つのスケールは以下の式により互いに変換される。

$$E = -(\varepsilon + 4.44)/|e| \tag{2-1}$$

$$\varepsilon = -(E|e| + 4.44) \tag{2-2}$$

Ag 電極の標準酸化還元電位は+0.8 V であり、これは-5.3 eV に相当する。一方、水中の1 個の Ag 原子の標準酸化還元電位は-1.8 V で、-2.7 eV に相当する。従って、Ag 原子1 個の IE は、物理スケールで与えられる値よりも電気化学スケールで与えられる値の方が小さいことが 分かる。この理由は、電気化学測定では生成された Ag+が水和されることで大きな自由水和エ ンタルピーを得ることで安定化するためである。従って、気相もしくは真空中の Ag の電子エ ネルギーを論じた物理スケールと異なり、水相の Ag の IE はクラスターサイズが大きくなる に従い増加するという逆の挙動を示すことが分かる。図 2-9 は、横軸を Ag クラスター内の原 子数、縦軸を Ag クラスターの標準酸化還元電位としたプロットである。図 2-8 と同様に振動 的挙動が観測された。Ag クラスターの原子数が 2 から 4 の場合、酸化還元電位は負の値を示 し、強い電子供与体として働く。原子数が増加するに従って、酸化還元電位はバルクの値 (+0.8 V) へと近づいていく。即ち、Ag クラスターの酸化還元電位は粒径に依存する。



図 2-9<sup>[3]</sup> Ag クラスターの酸化還元電位と原子数の関係。

#### 2.4.1.2 Ag ナノ粒子の酸化還元電位

上述のように、電気的に中性の Ag クラスターの場合、水相においては粒径が大きくなる につれ電子エネルギーが低下する。一般的に金属ナノ粒子の酸化還元電位は熱力学的サイクル から導出した式(2-3)により記述できる<sup>[5,6]</sup>。

$$\left[E_{ze/(z-1)e}^{\circ}\right]_{\text{AVS}}^{\text{NP}} = \frac{\Phi_{\text{bulk}}}{e} + \frac{(2z-1)e}{8\pi\varepsilon_0(r+d)} \left(\frac{d}{\varepsilon_{\text{d}}}r + \frac{1}{\varepsilon_{\text{r}}}\right)$$
(2-3)

ここで、*e*は電気素量、 $[E_{ze(z-1)e}^{\circ}]_{Avs}^{PP}$ は真空準位を基準としたナノ粒子の酸化還元電位 (V)、 $\phi_{bulk}$ はバルクの仕事関数、*z*はナノ粒子の電荷、 $\varepsilon_0$ は真空の誘電率、*r*は粒子半径、*d*は粒子表面保護剤の全長、 $\varepsilon_d$ は表面保護剤の誘電率、 $\varepsilon_r$ は溶媒の比誘電率を表す。 $e[E_{ze(z-1)e}^{\circ}]_{Avs}^{PP}$ とすることでナノ粒子の仕事関数 (eV)を求めることができ、ナノ粒子のフェルミ準位は $-e[E_{ze(z-1)e}^{\circ}]_{Avs}^{PP}$ と表せる。ナノ粒子が保護剤で修飾されていない場合には、式(2-3)は以下のように簡単化される。

$$\left[E_{ze/(z-1)e}^{\circ}\right]_{\text{AVS}}^{\text{NP}} = \frac{\Phi_{\text{bulk}}}{e} + \frac{(2z-1)e}{8\pi\varepsilon_{0}\varepsilon_{r}r}$$
(2-4)

式(2-4)から、ナノ粒子が帯電した場合、酸化還元電位は電気的に中性のナノ粒子と異なる 値を示すことが分かる。式(2-4)に基づき、ナノ粒子の粒径と帯電量を変化させたときの Au ナ ノ粒子及び Ag ナノ粒子のフェルミ準位の変化を図 2-10a-c に示す。図 2-10d には溶媒が TEG のときの中性 Ag ナノ粒子のフェルミ準位の粒径依存性を示す。粒径が小さい方が電子のエネ ルギー準位が高く、粒径が大きくなるにつれ、バルクのフェルミ準位に近づくことが分かる。 これは図 2-7 の右側に示した水相での電子のエネルギー準位の振る舞いと一致する。

図 2-10a-c に示すように、Ag ナノ粒子が負に帯電するにつれフェルミ準位が高くなること が分かる。このように帯電したナノ粒子は化学反応性に富むため、触媒として多く利用されて いる。例えば Jana らは、色素の還元触媒として Ag ナノ粒子を用い、Ag ナノ粒子が成長する 過程で電子が還元剤から Ag ナノ粒子に移動し、さらに Ag ナノ粒子から色素へ移動すること を実験的に見出した<sup>[7]</sup>。本研究においても Ag ナノ粒子が成長するにつれ、Fe 及び Co カチオ ンを還元できる触媒活性を獲得すると示唆されたが、図 2-10d から分かるように、電気的中性 な Ag ナノ粒子の場合には、粒子が成長するとともに電子エネルギー準位は下がるだけであり、 還元触媒活性が増大するとは考えられない。従って、電子が還元剤から Ag ナノ粒子へ移動す

38

ることで、Ag ナノ粒子が負に帯電し高いエネルギー準位を得ているのではないかと考えられる。還元剤から Ag ナノ粒子への電子移動は Ag ナノ粒子の表面積、即ち r<sup>2</sup>に比例する。従って、式(2-4)から、Ag ナノ粒子のフェルミ準位は r に比例して増大することが分かる。これらの知見に基づいて、FeCo シェルの形成機構を次のように考察した。



図 2-10 (a) 水中での Au ナノ粒子のフェルミ準位の粒径及び帯電量依存性。(b) 水中、又は (c) TEG 中での Ag ナノ粒子のフェルミ準位の粒径及び帯電量依存性。(赤) r = 25 nm、(橙) 10 nm、 (緑) 5 nm、(青) 3 nm、(紫) 1 nm。(d) 電気的中性な Ag ナノ粒子のフェルミ準位の粒径依存性。 点線はバルクの Ag(111)の仕事関数から求めたエネルギー準位を示す。 $\varepsilon_{water} = 80.1$ 、 $\varepsilon_{TEG} = 20.44$ 、  $\varphi_{Au(111)} = 5.31 \text{ eV}$ 、 $\varphi_{Ag(111)} = 4.74 \text{ eV}$ とした<sup>[2]</sup>。

#### 2.4.1.3 FeCo シェルの形成機構

図 2-11 に Ag、Fe、Co 及び還元剤である TEG の電子の室温でのエネルギーダイアグラム を示す。TEG のエネルギー準位は不明であるが、エチレングリコールのエネルギー準位は-6.9 eV<sup>[8]</sup>と報告されている。反応溶液中での TEG のエネルギー準位は中間体の形成や立体配置に より高くなると考えられる。Ag、Fe、Co の中で還元電位が高い(エネルギー準位が低い)Ag が反応の最初の段階で還元され Ag ナノ粒子を形成する。一般に、ポリオールは脱プロトン化 してモノアニオンとなると高い還元力を示すことが知られているが<sup>[9]</sup>、Ag ナノ粒子の非存在 下では、反応温度 250 ℃ では Fe や Co カチオンの還元が起きていないことから[実験事実(i)]、 この温度領域では TEG の脱プロトン化による Fe や Co カチオンの直接還元は考えにくい。



図 2-11 TEG、Ag ナノ粒子(Ag NP)、Co、Fe のエネルギーダイアグラム。

一方、先に形成された Ag ナノ粒子は成長を続けていき、電子エネルギー準位は徐々に下 がっていく。TEG が酸化されるとともに Ag ナノ粒子に TEG から電子移動がおこり、Ag ナノ 粒子は負に帯電することで高いエネルギー準位に到達する。そして、まず Co カチオンを還元 できる程度まで、電子エネルギー準位が高くなったところで、Co カチオンが Ag ナノ粒子の表 面で電子を受け取って還元される。続いて還元電位が最も低い Fe カチオンが Ag もしくは Co から電子を受け取りその表面近傍で還元される。この仮説は、Ag@Co ナノ粒子が容易にコア シェル構造を形成したのに対し、Ag@Fe ナノ粒子では Fe は綺麗なシェルを形成しなかった事 実と矛盾しない。従って、Ag ナノ粒子の周りでまず Co カチオンが還元され、後から Fe カチ オンが還元されると考えるのが妥当である。Ag と Co の相図<sup>[10]</sup>及び Ag と Fe の相図<sup>[11]</sup>から、 Ag-Co や Ag-Fe は合金を形成しないのに対し、Fe と Co は合金を形成し易いため<sup>[12]</sup>、Co の還 元が起きた後に Fe が還元され、合金化したと考えられる。参考までに Ag-Co、Ag-Fe、Fe-Co の相図を付録に示す。図 2-2 に示したように、FeCo シェルの組成に傾斜構造が観察されたのは このためである。Co カチオンの還元が起こるのに必要な Ag ナノ粒子の Bg コアの粒径がいず れも約 10 nm であることから、平均臨界サイズは約 10 nm であると考えられる。

## 2.4.2 サイズフォーカシング(粒径集束)とオストワルド熟成

次に、平均粒径及び粒径分布ともに Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の方が Ag@FeCo ナノ粒子よ り小さい理由について考えてみよう。図 2-2 から分かるように、Ag@FeCo ナノ粒子の粒径分 布が広い主な理由は、粗大な Ag コアの表面に部分的に FeCo シェルが堆積しているナノ粒子 が存在するためである。反応温度が 250 ℃ に到達し、Ag 前駆体を注入する直前までは Ag@FeCo@Ag ナノ粒子、Ag@FeCo ナノ粒子のいずれの場合も Ag ナノ粒子しか形成されてい ない。反応温度 250 ℃ で Ag 前駆体を注入した後、Ag コアの粒径が Co カチオンの還元触媒と して作用する臨界サイズに達するまで、どのように Ag コアは成長したのであろうか?

拡散律速により制御される半径 r の粒子成長は式(2-5)で表される<sup>[13]</sup>。ナノ粒子の合成において、核生成・成長の制御は極めて重要である。付録に式(2-5)の導出と現在一般的に受け入れられている核生成・成長に関する説明を記載した。

$$\frac{dr}{dt} = \frac{K_{\rm D}}{r} \left( \frac{1}{r^*} - \frac{1}{r} \right) \tag{2-5}$$

r\*は臨界粒子サイズであり、これよりも小さい粒子は溶出し小さくなり、大きな粒子は成長する。K<sub>D</sub>は次式で表される。

$$K_{\rm D} = \frac{2\sigma D V_{\rm m}^2 C_{\infty}}{RT}$$
(2-6)

 $\sigma$ は固液界面における自由エネルギー、Dは粒子を構成するモノマーの拡散係数、Vmは固体の モル体積、C<sub>∞</sub>は無限平面に対する平衡モノマー濃度、Rは気体定数、Tは絶対温度である。図 2-12には $r^* = 1$ としたときの粒子の線成長速度を $r/r^*$ に対してプロットした。但し、線成長速 度は $r^*$ の値によらず $r/r^*=2$ で最大値に達する。また、 $r^*$ はバルクでのモノマー濃度(C<sub>b</sub>)に依 存し、式(2-7)の関係がある。

$$C_{\rm b} \cong C_{\infty} \left( 1 + \frac{2\sigma V_m}{r^* RT} \right) \tag{2-7}$$



図 2-12 粒子の線成長速度[(dr/dt)/Ko]の r/r\*に対するプロット。

拡散律速で成長する粒子において、C<sub>b</sub>が大きいときr<sup>i</sup>は小さくなり、平均粒径はr<sup>i</sup>より大 きくなるため、多くの粒子はr<sup>i</sup>r<sup>\*</sup> > 2 の状態となり、小さい粒子は大きい粒子より速く成長す る。これがサイズフォーカシング(粒径集束)と呼ばれる現象である。しかし、モノマーが枯 渇してくると(C<sub>b</sub>が小さくなると)、r<sup>i</sup>は大きくなり次第に平均粒径を上回る。するとr<sup>i</sup>r<sup>\*</sup> < 1 の状態にある粒子は溶出し、r<sup>i</sup>r<sup>\*</sup>>1の状態にある粒子は成長を続けるため、粒径分布は悪化す る。これがオストワルド熟成と呼ばれる現象である。オストワルド熟成にある状態で前駆体を 反応溶液中に注入するとモノマー濃度が増加するため、r<sup>i</sup>は再び小さくなり、サイズフォーカ シングが引き起こされる。これらの現象は実験的にも証明されており、例えば、ホットインジ ェクション法で CdSe ナノ粒子や InAs ナノ粒子を合成したときの平均粒径と粒径分布(標準偏 差)の時間変化を調べたところ、図 2-13 に示すように、前駆体注入直後にはサイズフォーカシ ングが、モノマーが枯渇してくるとオストワルド熟成が、それぞれ観察された<sup>[14]</sup>。実際に、反 応時における Ag の前駆体注入が及ぼす Ag ナノ粒子の粒径分布への影響を調べる為に、Fe と Co の前駆体非存在下で Ag ナノ粒子を合成した(付録参照)。その結果、反応時に Ag 前駆体 を注入することで、Ag 前駆体を注入しない場合よりも Ag ナノ粒子の粒径分布が狭くなるこ とが明らかとなった。

従って、本実験系でも同様に、Ag@FeCo@Agナノ粒子の場合、反応温度 250 ℃ で Ag 前 駆体を注入することで、Ag コアの核成長とサイズフォーカシングが同時に引き起こされた結 果、単分散な Ag コアが得られたと考えられる。一方、Ag 前駆体を注入しなかった Ag@FeCo

42

ナノ粒子の場合では、Ag コアのオストワルド熟成によって、多分散の Ag コアとなったと考えられる。このことを踏まえ、図 2-14 に Ag@FeCo@Ag ナノ粒子と Ag@FeCo ナノ粒子の生成機構を表す模式図を示す。



**図 2-13**<sup>[14]</sup> CdSe ナノ粒子(左)とInAs ナノ粒子(右)の粒径(上段)と粒径分布(標準偏差)(下段)の時間変化。矢印は前駆体溶液の注入を示す。



図 2-14 Ag@FeCoナノ粒子とAg@FeCo@Agナノ粒子の生成機構の模式図。

Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では、Ag 前駆体注入による Ag コアのサイズフォーカシングのた め、反応溶液中に存在する Ag コアが一斉に Co と Fe カチオンの還元触媒として作用する臨界 サイズに到達するため、FeCo シェルが全ての Ag コアに対して均一に形成される。これに対 し、Ag@FeCo ナノ粒子の場合はオストワルド熟成によって Ag コアの粒径分布が悪化するた め、FeCo シェルが形成される時期がずれてしまう。つまり、先に臨界サイズに到達した Ag コ ア上には完全な FeCo シェルが形成されるが、後から成長した Ag コアに対しては、既に Fe と Co のモノマーが枯渇してしまっているため、コアを完全に被覆することができず部分的な FeCo シェルが形成される。そして、むき出しの Ag 表面ではオストワルド熟成が進行すること で、楕円に近い粗大粒子も形成されたと考えられる。実際に完全なコア@シェル構造を有する 各々の粒子の FeCo シェルの厚さを解析したところ、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では約 2.1 nm、 Ag@FeCo ナノ粒子では約 2.5 nm であった。この結果は上記の仮説を支持する結果である。

#### 2.4.3 表面偏析による Ag シェルの形成

最後に Ag@FeCo@Ag ナノ粒子における最外殻の Ag シェルの形成機構について考えてみ よう。図 2-14 に示したように、250 ℃ で Ag 前駆体を注入し、その後 FeCo シェルが形成され ている間も Ag 前駆体は反応溶液中に残存しており、Ag の還元電位が高いため、FeCo シェル 形成中も常に還元されて FeCo シェル中に取り込まれていると考えるのが自然である。しかし 図 2-1 に示した EDS 解析からも、最終生成物の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では AgFeCo 合金シェ ルではなく最外殻に Ag シェルを有した Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型構造を形成し ていることが分かる。では、どのようにして Ag シェルは形成されたのであろうか?

Ruban らは、密度汎関数法による第一原理計算によって遷移金属元素間での表面偏析エネ ルギー( $E_{segr}$ )を計算した<sup>[15]</sup>。  $E_{segr}$ は1個の不純物原子BをホストAの内部から表面へ移動 するときに必要なエネルギーであり、式(2-8)で表される。

$$E_{\text{segr}}^{\text{B}} = \frac{dE_{\text{suff}}(A_{\text{I}-x}B_x)}{dx}\bigg|_{x=0}$$
(2-8)

 $E_{surf}$ は表面エネルギー、x は組成を表す。 $E_{segr}$ が負の値の場合、不純物原子 B は表面へ偏析する。各種元素の組み合わせにおける  $E_{segr}$ を図 2-15a に示す。Ag を不純物原子、*bcc* Fe または*hcp* Co をホストとしたときの  $E_{segr}$ は、それぞれ-2.37 eV 及び-0.93 eV となり(図中黄色の枠で囲った部分)、Ag は表面へ偏析した方が安定であることを示す。Ruban らは  $E_{segr}$  はそれぞれの元素の  $E_{surf}$ の差に大きく起因するほか、結晶構造や欠陥なども影響すると結論付けた。



図 2-15 (a) 密度汎関数法による第一原理計算から計算された遷移金属元素間の表面偏析エネル ギーのマトリックス<sup>[15]</sup>。(b) TBIM による表面偏析エネルギーの計算結果を Ref. 15 の結果と比較しな がら描いたマトリックス<sup>[16]</sup>。

その後、2011 年に Roussel らは、強結合イジングモデル(Tight-Binding Ising Model: TBIM) から、*E*<sub>segt</sub>を式(2-9)に示すように 3 つの項の足し合わせから求め、その結果を Ruban のデータ ベースと比較した<sup>[16]</sup>。

$$E_{\text{seer}} = \Delta h + \Delta H_{\text{size}} + zV \tag{2-9}$$

Δh、ΔH<sub>size、Z</sub>Vはそれぞれ、表面エネルギー項、原子半径項、及び溶解度項を表す。即ち、式 (2-9)は、表面エネルギーが低い元素、原子半径の大きい元素、溶解度の低い元素が表面に偏析 し易いということを意味している。図 2-15b には Roussel らの TBIM による計算結果と Ruban らの第一原理計算による結果との比較を示した。図 2-15b の赤色の枠線で示したように、Ag が Fe または Co のホストに不純物原子として存在する場合、表面エネルギー項、原子半径項、及 び溶解度項の全てにおいて、Ag が表面へ偏析した方が熱力学的に安定であることが分かる。 従って、FeCo シェル形成中に取り込まれた Ag 原子は速やかに表面に偏析するため、粒子最表 面は常に Ag シェルが存在した状態で FeCo シェルが形成されていくと考えられる。

## 2.5 結言

本章では Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の生成機構について、体系的な実験結果に基づいて考察 した。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成において、反応温度が 250 °C に達した段階ではまだ Ag ナノ粒子しか形成されていないが、Ag 前駆体を注入することで Ag コアの核成長とサイズフ オーカシングが起こり、全ての Ag コアが一斉に Co と Fe の還元触媒能を示す臨界サイズに達 するため、均一に FeCo シェルが形成される。このとき FeCo シェル中に取り込まれた Ag 原子 は強い表面偏析により粒子最表面へ析出することで、自己組織的に Ag@FeCo@Ag コア@シェ ル@シェル型ナノ粒子が得られると考えられる。この生成機構を検証するために、前駆体の仕 込順を変更して Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成を行った。その結果については、紙面の都合上 付録に掲載するが、結論を述べると、前駆体の仕込順によらず同様の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子 が得られた。単分散な Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を得るために最も重要なパラメーターは Ag 前 駆体の注入速度である。これまでの経験から Ag 前駆体を急速に (8 秒以内) 注入すると粒径 分布が悪化し、注入速度を遅くすると粒径分布が狭くなる。そこで本論文では、Ag 前駆体の 注入を約 30 秒で行っている。本章で論じた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の生成機構に関する知見 は、他のへテロ構造ナノ粒子や多元系ナノ粒子の合成においても有用な洞察を与えるであろう。

本章の成果は、英国王立化学会(Royal Society of Chemistry)が発行する国際学術雑誌である CrystEngComm 誌の特集号 "Fundamentals of Nanocrystal Formation" (Eds. G. Garnweitner, D. Gebauer and M. Niederberger) に掲載された。

## 2.6 参考文献

1. Baaziz, W.; Pichon, B. P.; Liu, Y.; Grenèche, J. M.; Ulhaq-Bouillet, C.; Terrier, E.; Bergeard,

N.; Halté, V.; Boeglin, C.; Choueikani, F.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Turning of Synthesis Conditions by Thermal Decomposition toward Core-Shell  $Co_xFe_{1-x}O@Co_xFe_{3-y}O_4$  and  $CoFe_2O_4$  Nanoparticles with Spherical and Cubic Shapes. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5063-5073

- 2. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92nd Edition*; Haynes, W. M. Ed.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2011
- 3. Henglein, A. Nanoclusters of Semiconductors and Metals. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 1562-1572
- 4. Jackschath, C.; Rabin, I.; Schulze, W. Electron Impact Ionization of Silver Clusters Ag<sub>n</sub>, n ≤ 36. *Z. Phys. D* **1992**, *22*, 517-520
- 5. Scanlon, M. D.; Peljo, P.; Méndez, M. A.; Smirnov, E.; Girault, H. H. Charging and Discharging at the Nanoscale: Fermi Level Equilibration of Metallic Nanoparticles. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2705-2720
- 6. Su, B.; Girault, H. H. Absolute Standard Redox Potential of Monolayer-Protected Gold Nanoclusters. J. Phys. Chem. B 2005, 109, 11427-11431
- 7. Jana, N. R.; Sau, T. K.; Pal, T. Growing Small Silver Particle as Redox Catalyst. J. Phys. Chem. B 1999, 103, 115-121
- Scanlon, M. D.; Peljo, P.; Méndez, M. A.; Smirnova, E.; Girault, H. H. Charging and Discharging at the Nanoscale: Fermi Level Equilibration of Metallic Nanoparticles. *Chem. Sci.* 2015, 6, 2705-2720
- 9. Matsumoto, T.; Takahashi, K.; Kitagishi, K.; Shinoda, K.; Huaman, J. L. C.; Piquemal, J.-Y.; Jeyadevan, B. Dissolution and Reduction of Cobalt Ions in the Polyol Process Using Ethylene Glycol: Identification of the Active Species and Its Role. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5008-5018
- 10. Karakaya, I.; Thompson, W. T. The Ag-Co (Silver-Cobalt) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* **1986**, *7*, 259-263
- 11. Swartzendruber, L. J. The Ag-Fe (Silver-Iron) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* **1984**, *5*, 560-564
- 12. Okamoto, H. Co-Fe (Cobalt-Iron). J. Phase Equilib. Diffus. 2008, 29, 383-384
- Sugimoto, T. Preparation of Monodispersed Colloidal Particles. Adv. Colloid Interface Sci. 1987, 28, 65-108
- Peng, X.; Wickham, J.; Alivisatos, A. P. Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: "Focusing" of Size Distributions. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 5343– 5344
- 15. Ruban, A. V.; Skriver, H. L.; Nørskov, J. K. Surface Segregation Energies in Transition-Metal Alloys. *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 15990-16000
- 16. Roussel, J.-M.; Tréglia, G.; Legrand, B. Surface Segregation Maps Derived from Tight-Binding Ising Model. *Solid State Phenom.* **2011**, *172-174*, 1008-1015

# 第3章 交換バイアスを用いた FeCo 磁性 層酸化膜の解析

## 3.1 緒言

磁性体粒子を磁気分離プローブへ利用する際、飽和磁化は磁気分離性能に関わる重要な因子となる。磁性体粒子が結合した検体にかかる磁気力は磁気勾配と磁性体粒子の磁化に比例し、 次式で記述される<sup>III</sup>。

$$\overrightarrow{F_{\text{mag}}} = (M_{\text{s}}V_{\text{mag}} \cdot \nabla)\overrightarrow{B}$$
(3-1)

 $\overrightarrow{F_{mag}}$ は磁気力、 $M_s$ は単位体積当たりの飽和磁化、 $V_{mag}$ は磁性体の体積、 $\nabla B$ は磁気勾配を表す。 従って、粒径の小さい磁性ナノ粒子の場合、高い $M_s$ を有することが重要となってくる。本論 文では、1.3.2 項で述べたように磁性材料の中で最も高い $M_s$ を有する FeCo を選んでいる。し かし、FeCo は酸化されやすく、酸化によって $M_s$ が著しく低下することが知られているため、 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の大気中での酸化挙動を調べることは大切である。

本章では、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子および比較対象としての AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子 を大気中に保存した際の磁気特性や化学状態の経時変化を詳細に調べた。その結果、ナノ粒子 が酸化されると FeCo シェルの一部が Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O (コバルトウスタイト)となり、強磁性相 FeCo と反強磁性相 Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O の界面で交換バイアスが発現することを見出した。また、交換バイア ス磁場は反強磁性相 Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O の体積増加に伴って振動的挙動を示すことが明らかとなった ため、その理由について詳細な考察を行った。さらに、交換バイアス磁場から酸化膜厚を推定 する方法を提案した。

## 3.2 交換バイアスとは

磁性体材料が異種の磁性相、即ち、強磁性体(Ferromagnetic Material: FM)、反強磁性体 (Antiferromagnetic Material: AFM)、あるいはフェリ磁性体(Ferrimagnetic Material: FIM)から 形成される界面を含む場合、磁場中冷却(Field Cooling: FC)後に磁化曲線を測定すると、磁化 曲線の中心が原点からシフトする。この現象を交換バイアスと呼ぶ。

48

## 3.2.1 交換バイアスの発見

交換バイアスは 1956 年に Meiklejohn と Bean により Co@CoO ナノ粒子系で初めて発見さ れた<sup>[2]</sup>。Co は FM 相、CoO は AFM 相である。図 3-1 に Co@CoO ナノ粒子の 77 K における磁 化曲線を示す。1 T の外部磁場を印加して FC を行ったときの磁化曲線(実線)は、零磁場冷却 (Zero Field Cooling: ZFC)後の磁化曲線(破線)と比較すると、外部磁場とは逆の方向(負の 磁場)へその中心がシフトしていることが分かる。これは、AFM 相である CoO のネール温度 が 293 K であるため<sup>[3]</sup>、FM/AFM 界面で FM 電子スピンが一方向異方性を獲得したためである と考えられた。



図 3-1<sup>[2]</sup> 77 K での Co@CoO ナノ粒子の磁化曲線。実線は1 T の外部磁場中で FC を行った後の磁 化曲線、破線は ZFC 後に測定した磁化曲線を示す。

### 3.2.2 交換バイアス発現機構の定性的説明

交換バイアスは FM/AFM(または FM/FIM や AFM/FIM)界面で起こる磁気モーメントの 相互作用により、界面近傍において FM(または FIM)相が磁化の異方性を獲得するために生 じる。図 3-2 に交換バイアスの発現機構の模式図を示す。



図 3-2<sup>[4]</sup> FM/AFM 界面における交換バイアス発現機構の模式図。 √ 以下まで磁場中冷却(FC)を行った後、外部磁場を掃引したときのスピンの配向を簡略化して描いている。

FM/AFM 界面を含む試料 [図 3-2(i)] をキュリー温度 ( $T_c$ ) 以下且つネール温度 ( $T_N$ ) 以上の温度 ( $T_c > T > T_N$ ) からネール温度以下 ( $T_N > T$ ) まで磁場中で冷却 (FC) すると、界面 近傍の AFM スピンは FM スピンと相互作用して平行に配列する。そして残りの AFM スピン は正味の磁化がゼロとなるように反平行に配列する [図 3-2(ii)]。この状態で外部磁場を逆方向 へ掃引すると、FM スピンは反転を始めるが、AFM の磁気異方性定数は FM のそれよりも十分 に大きいため AFM スピンは反転しない。従って FM/AFM 界面で強磁性的に交換結合している FM スピンを反転するにはより大きな磁場が必要となる [図 3-2(iii)]。しかし、一度反転した FM スピン [図 3-2(iv)] を再び元の位置に戻す際は、AFM スピンがトルクとして働くため、少 ない磁場で反転できる [図 3-2(v)]。その結果、磁化曲線は中心が原点からずれる。原点からの シフト量を表す磁場は交換バイアス磁場 (Exchange Bias Field:  $H_E$ ) と呼ばれ、次式で表される。

$$H_{\rm E} = \frac{-(H_{\rm c,right} + H_{\rm c,left})}{2}$$
(3-2)

H<sub>c,right</sub> 及び H<sub>c,left</sub> はそれぞれ、正あるいは負の磁場を掃引したときに磁化がゼロとなるときの磁場(保磁力)である。現実には、界面におけるスピンの配向や異方性、界面の粗さや欠陥、結晶性など様々な要因が H<sub>E</sub> に影響を及ぼすことが知られている<sup>[4]</sup>。これまで、H<sub>E</sub> を統一的に説明するために様々な理論が提唱され、今日ある程度は交換バイアスを理解することが可能となったが、全ての要因を考慮した包括的な理論は未だ存在せず、現在でも多くの研究者が理論と実験の両面から交換バイアスの全貌を理解しようと尽力している。

#### 3.2.3 二次元薄膜積層構造における交換バイアス

交換バイアスはナノ粒子系で初めて発見されたが、その後は二次元薄膜積層構造を利用した研究が盛んとなった。何故なら、薄膜積層系はナノ粒子系と異なり、再現性良く均一な薄膜 積層構造を作製でき、尚且つ厚さの精密制御も容易だからである。薄膜積層構造において  $H_E$ が FM と AFM の厚さにどのように依存するか見てみよう。図 3-3a に AFM 層 (Fe<sub>50</sub>Mn<sub>50</sub>)の厚 さを 50 nm に固定し、FM 層 (Ni<sub>80</sub>Fe<sub>20</sub>)の厚さを変化させたときの  $H_E$ の挙動を示す<sup>[5]</sup>。一般的 に  $H_E$ は FM 層の厚さ ( $t_{FM}$ ) に反比例することが知られており、以下の関係が成り立つ<sup>[4,6]</sup>。

$$H_{\rm E} \propto \frac{1}{t_{\rm FM}} \tag{3-3}$$

上式は FM 層が連続体である限り適用されるが、FM 層が薄くなり過ぎて連続体を形成しなく なると、この関係式は成立しない。一方、 $t_{FM}$ =7 nm に固定したときの、 $H_E$ の AFM 層厚さ( $t_{AFM}$ ) に対する依存性を図 3-3b に示す<sup>[6]</sup>。 $t_{AFM}$ を変化させたときの  $H_E$ の挙動は複雑であるが、一般 的な傾向として、 $t_{AFM}$ が充分に大きいときは  $H_E$ は一定値を示す。 $t_{AFM}$ を小さくしていくと、 $H_E$ は減少し最終的にはゼロとなる。どのくらいの  $t_{AFM}$  で  $H_E$ の急激な減少や消失が観察されるの かということについては、材料や測定温度、試料内の微細構造に依存するため<sup>[4-6]</sup>、厳密に決定 することは難しい。交換バイアスが観測されるためは、次式を満たす必要がある。

$$K_{\rm AFM} t_{\rm AFM} > J_{\rm INT} \tag{3-4}$$

*K*<sub>AFM</sub>は AFM 相の磁気異方性定数、*J*<sub>INT</sub>は界面での FM スピンと AFM スピンの相互作用エネ ルギー (カップリング定数)を表す。*t*<sub>AFM</sub>が減少すると交換バイアスが観測されなくなるのは、 この条件を満たさなくなるためである。



図 3-3 (a) AFM 層(FeMn)の厚さを 50 nm とし、FM 層(NiFe)の厚さを変化させたときの  $H_{\epsilon}(●、図中 では H_{ex} と表記) 及び保磁力 H_{\epsilon}(〇)の挙動<sup>[5]</sup>。(b) FM 層(NiFe)の厚さを 7 nm とし、AFM 層(FeMn)の 厚さを変化させたときの <math>H_{\epsilon}(■、図中では H_{tb} と表記) 及び H_{\epsilon}(▲)の挙動<sup>[4,6]</sup>。$ 

## 3.2.4 コア@シェル型ナノ粒子における交換バイアス

異なる磁性相から形成されるコア@シェル型ナノ粒子における交換バイアスの研究は、コ アやシェルの寸法制御、表面の影響、評価法の制限などから薄膜積層系ほど単純ではない。し かし、FM または AFM の寸法を変化させたときの交換バイアスの傾向は薄膜積層系の場合と 類似している。例えば Feygenson らは、粒径約 11 nm の Co ナノ粒子を熱分解法で合成し、液 相中でその表面を酸素バブリングにより酸化させた Co@CoO ナノ粒子を作製した<sup>[3]</sup>。酸素バ ブリングの時間を変えることで、粒径を変化させずに反強磁性 CoO シェルの厚さ ( $t_{CoO}$ ) 及び 強磁性 Co コア半径 ( $r_{Co}$ )を制御した。 $t_{CoO}$ と及び  $r_{Co}$ は磁化測定と小角 X 線散乱測定から決定 した。この Co@CoO ナノ粒子の  $H_E$ を測定したところ、 $H_E$ が  $t_{CoO}$ に対して非線形な応答を示し た (図 3-4a)。 $t_{CoO} \cong 0$  及び  $r_{Co} \cong 1$ の場合、 $H_E \cong 0$ となる。Rinaldi-Montes らは、熱分解法によ り異なる粒径(約 9 nm、11 nm、23 nm)をもつ Ni ナノ粒子を合成し、その表面を酸化させる ことで Ni@NiO ナノ粒子を作製した<sup>[7]</sup>。全てのサンプルにおいて反強磁性 NiO シェルの厚さ ( $t_{NiO}$ )は約 2 nm であった。この Ni@NiO ナノ粒子の  $H_E$ を測定したところ、 $H_E$ は強磁性 Ni コ ア半径( $r_{Ni}$ )の逆数に比例した。このように、コア@シェル型ナノ粒子における交換バイアス の一般的傾向として、AFM の寸法(膜厚、粒径あるいは体積)が増加、または FM の寸法(膜 厚、粒径あるいは体積)が減少すると、 $H_E$ が増大することが分かる。また、FIM を含む粒子で も交換バイアスは観察される。例えば Soares らは、粒径約 73 nm のフェリ磁性 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒 子を合成し、水素雰囲気下で粒子を還元することで表面を強磁性 CoFe<sub>2</sub>へ還元した。具体的に は  $t_{FM}$  を 2.6 nm から 35 nm の間で変化させながら、CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@CoFe<sub>2</sub>ナノ粒子を作製した<sup>[8]</sup>。 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@CoFe<sub>2</sub>ナノ粒子の  $H_E$ を測定したところ、 $H_E$  は  $t_{FM}$  が減少するに伴って指数関数的に 増加した。



図 3-4 (a) Co@CoO ナノ粒子における  $H_{E}$ (図中では  $H_{EB}$ と表記)及び  $H_{c}$ の $t_{coo}$ 依存性<sup>[3]</sup>。(b) Ni@NiO ナノ粒子における  $H_{c}$ (図中では  $H_{EB}$ と表記)の  $r_{Ni}^{-1}$ (図中では  $r^{-1}$ と表記)に対するプロット<sup>[7]</sup>。

ー方、Hu らは異なる寸法をもつコア@シェル型ナノ粒子(格子定数を 1 としたとき粒径 50 の粒子)の  $H_{\rm E}$ をモンテカルロ法による計算から求めた<sup>[9]</sup>。図 3-5a に AFM@FM ナノ粒子の  $H_{\rm E}$ を  $t_{\rm FM}$ に対してプロットした図、図 3-5b に FM@AFM ナノ粒子の  $H_{\rm E}$ を  $r_{\rm FM}$ に対してプロットした図、図 3-5b に FM@AFM ナノ粒子の  $H_{\rm E}$ を  $r_{\rm FM}$ に対してプロットした図をそれぞれ示す。AFM@FM ナノ粒子の場合では  $H_{\rm E}$ は  $t_{\rm FM}$ に反比例するが、逆構造で ある FM@AFM ナノ粒子の場合には  $H_{\rm E}$ は  $r_{\rm FM}$ に対して複雑な挙動を示す。 $16 \le r_{\rm FM} \le 22$ の領域 では、 $H_{\rm E}$ は  $r_{\rm FM}$ の増加に伴い線形的に減少する。しかし、 $r_{\rm FM} < 16$ の領域では  $H_{\rm E}$ は  $r_{\rm FM}$ に対し て振動的な挙動を示す。このような振動挙動は実験的にはこれまで観測されていない。 $22 < r_{\rm FM}$ の領域では、 $t_{\rm AFM} \cong 0$ となり  $H_{\rm E}$ はゼロに近づく。

## 3.3 ハイブリッドナノ粒子の合成

### 3.3.1 比較対象となる AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子について

本章の背景として、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子において FeCo シェルの酸化抑制の検討を行ったということがある。具体的には、注入する Ag の前駆体量を増加したり、Ag@FeCo@Ag ナ



## 図 3-5<sup>[9]</sup> コア@シェル型ナノ粒子におけるモンテカルロシミュレーションの結果。(a) AFM@FM ナノ粒子における H<sub>E</sub>の t<sub>FM</sub> 依存性。(b) FM@AFM ナノ粒子における H<sub>E</sub>の t<sub>FM</sub> (図中では R<sub>FM</sub>と表記)依存性。

しかし、結論を述べると、Ag や Au は還元電位が高いため、Ag ナノ粒子や Au ナノ粒子の均 一核生成を防ぐことが出来ないだけでなく、Ag シェルの厚膜化も難しいことがわかった。一 方、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子において酸化されやすいはずの薄い FeCo シェルが全ては酸化さ れずに FeCo 相を維持できているのは、Ag コアから FeCo シェルへの電子移動によると考えら れる<sup>[10]</sup>。バルクの合金における電子移動は最初電気陰性度に従って起こるが、電気的中性を保 つために電荷再分配が続いて起こる<sup>[11]</sup>。電子移動の駆動力は界面を形成する異種材料の電気陰 性度の ( $\chi$ ) 差である<sup>[11]</sup>。界面・表面では電荷再配分により、 $\chi$ が大きい元素から小さい元素へ移動するという、バルクとは逆の傾向を示すことが報告されており、例えば Weightman らは、 Cu<sub>x</sub>Pd<sub>1-x</sub> 合金表面において Pd ( $\chi_{Pd}$ =2.20<sup>[12]</sup>) から Cu ( $\chi_{Cu}$ =1.90<sup>[12]</sup>) へ電子移動が起こっている ことを報告している<sup>[13]</sup>。このような電子移動の詳細な説明に関しては付録に記載したので参照 頂きたい。Fe、Co 及び Ag の $\chi$ は、それぞれ 1.83、1.88 及び 1.93 である<sup>[12]</sup>。これらよりも大 きい $\chi$ をもつ Au ( $\chi_{Au}$  = 2.40) を Ag コアに合金化できれば、FeCo シェルの酸化を更に抑制す ることが出来るのではないかと考え、第2章で述べた粒子の生成機構を踏まえ、AgAu 合金の コア及びシェルを有する AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子の合成を試みた。簡単のため、本章の みにおいて、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子及び AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子を、以後それぞれ "Ag コアナノ粒子"及び "合金コアナノ粒子" と呼ぶ。

## 3.3.2 試薬及び評価装置

【**試薬**】 酢酸金(III) [Au(OAc)<sub>3</sub>、純度 99.99%] は Alfa Aesar から購入した。酢酸は和光純薬 から購入した。その他の試薬の購入先は 2.2.1 に記載したとおりである。

【評価装置】 化学組成分析及び化学状態解析は X 線光電子分光法(X-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS、Shimadzu-Kratos AXIS-ULTRA DLD、AlKa線)を用いて行った。磁気特性 は超伝導量子干渉磁束計(Superconducting Quantum Interference Device Magnetometer: SQUID、 Quantum Design MPMS)を用いて測定した。光学特性は紫外可視吸光光度計(UV-Vis、Jasco V670) により測定した。その他の評価装置は 2.2.1 に記載したとおりである。

#### 3.3.3 AgAu@FeCo@AgAu ナノ粒子の合成

合金コアナノ粒子の合成は、2.2.2 項に記載した Ag コアナノ粒子の合成法を基に行った。 異なる点は、250 °C で注入する前駆体溶液を、0.6 mL の OLA と 0.6 mL のトルエンに 0.07 mmol の AgNO<sub>3</sub> を溶解した溶液と、0.8 mL の酢酸に 0.05 mmol の Au(OAc)<sub>3</sub> を溶解した溶液を混合す ることで調整した点である。それ以外の合成条件は Ag コアナノ粒子の合成と同じである。Ag と Au の理論組成比は Ag: Au = 77:23 である。第2章に記載したように、反応温度が 250 °C に達した段階では Ag ナノ粒子しか形成されておらず、注入された Ag 前駆体の一部は Ag コ アの核成長に使われる。従って、Ag 前駆体の一部を Au 前駆体で置換することで、AgAu 合金 コアと AgAu 合金シェルを有する合金ナノ粒子を形成することが出来ると考えられる。注入す る前駆体の全てを Au で置換しなかった理由は、ナノ粒子をイメージングプローブとして利用 するために Ag の優れた LSPR 特性を維持したかったためと、Au ナノ粒子の還元触媒能は Ag ナノ粒子に比べてどうも低いようであり、Au コアでは Co や Fe カチオンの還元は Ag コアほ どうまく行われないという実験結果を得ていたためである。

合成直後のナノ粒子の磁気特性や化学状態の測定に際しては、ナノ粒子の大気への曝露を 最小限に抑えるために、合成終了後直ちにナノ粒子を真空乾燥し、合成完了から1時間以内に XPS あるいは SQUID の真空チャンバーに試料を導入した。大気中でのナノ粒子の経時変化を 調べるために、真空乾燥後の粉末状のナノ粒子を遮光された断熱箱の中に静置し、一定期間保 存後に適宜 XPS や SQUID による測定に供した。

## 3.4 ハイブリッドナノ粒子の構造解析

## 3.4.1 走査透過型電子顕微鏡による構造解析

合金コアナノ粒子の TEM 像、STEM-HAADF 像及び EDS 元素マッピング像を図 3-6 に示 す。平均粒径は 13.8±2.0 nm (*n*=453) であった。EDS 元素マッピングから、コアが Ag と Au の合金からなることが確認された。しかし、図 3-6d,eの画像を比較して分かるように、全ての コアが均等に Au の元素を含むわけではないことも分かった。EDS 元素マッピング像の解析か ら、合金コアをもつナノ粒子の割合は全体の約 72%であった。図 3-6b の黄色の線で囲んだ合 金コアの組成を EDS により求めたところ Ag: Au = 85:15 であった。ラインプロファイルの結 果から、Ag L 端の強度が粒子表面 (0 nm 付近) で高くなっており、AgAu シェルが形成された ことが確認された。なお、Au L 端の強度は粒子表面ではノイズレベルだが、これは Au の取り 込み量が約 15 atom%と少ないため、シェルでは EDS の検出限界以下であったためと考えられ る。Ag が Fe や Co と合金を形成しないように<sup>114,151</sup>、Au も温度が 400 ℃ 以下では Fe や Co と 合金を形成しないことや<sup>116,171</sup>、第 2 章の図 2-15 に示した Ruban らの計算でも Au 原子が *bcc* Fe や *hcp* Co のホスト中に含まれたときの *E*segr は、それぞれ−1.93 eV 及び−0.76 eV と非常に低い ことから<sup>1181</sup>、Ag と同様に表面偏析により粒子の最外殻シェルを形成していると考えるのが妥 当である。また、第 2 章に記載した方法で Ag コアナノ粒子を合成し、その構造解析を行った 結果、Ag コアナノ粒子の平均粒径は 16.0±2.2 nm (*n*=431) であった。

Ag コアナノ粒子及び合金コアナノ粒子のコアの直径を求めるために、STEM-HAADF 像と EDS 元素マッピング像から、Ag コアナノ粒子 (n = 32)及び合金コアナノ粒子 (n = 13)の粒 径とコア直径を解析した (図 3-7)。図 3-7 からわかるとおり、粒径とコア直径には線形関係が あり、 $x \ge y$ をそれぞれコアと粒子の直径 (nm) とすると、Ag コアナノ粒子ではy = 0.8853 x+ 6.1105 ( $R^2 = 0.89$ )、合金コアナノ粒子ではy = 1.0258 x + 4.2997 ( $R^2 = 0.81$ ) という相関が得 られた。Ag コアナノ粒子と合金コアナノ粒子で関係式が一致しないのは、それぞれの粒子の

56

成長過程の微妙な差を反映しているためと考えられる。この関係式を用いることで、平均粒径 から平均コアサイズを見積もることが可能となった。従って平均のコア直径は Ag コアナノ粒 子では約 11.2 nm、合金コアナノ粒子では約 9.3 nm と見積もられた。ここから FeCo シェルの 厚さは Ag コアナノ粒子では約 2.4 nm、合金コアナノ粒子では約 2.3 nm であると計算された。 これらの結果を表 3-1 にまとめた。



**図 3-6** 合金コアナノ粒子の (a) TEM 像、(b) STEM-HAADF 像、(c-e) EDS 元素マッピング像。(c) 合 成画像、(d) Ag L 端、(e) Au L 端。青、黄、赤、緑はそれぞれ Ag、Au、Fe、Co を示す。(f) 黄色の直線 に沿った EDS ラインプロファイル。青、赤、緑、ブラウンはそれぞれ Ag、Fe、Co、Au を表す(点線は生 データ、実線は low pass filter をかけた後のデータ)。



図 3-7 (a) Ag コアナノ粒子及び (b) 合金コアナノ粒子における粒子直径とコア直径の関係。

 ナノ粒子	粒径 (nm)	コア直径 (nm)	FeCo シェル厚 (nm)	
Ag コアナノ粒子	16.0	11.2	2.4	
合金コアナノ粒子	13.8	9.2	2.3	

表 3-1 粒径、コアの直径及び FeCo シェル厚さ。

## 3.4.2 光学特性評価

次に Ag コアナノ粒子及び合金コアナノ粒子の光学特性を調べた。各々のナノ粒子の紫外 可視吸収スペクトルを図 3-8 に示す。どちらのナノ粒子でも Ag 由来の LSPR バンドが明確に 観察された。LSPR ピーク波長は、Ag コアナノ粒子の場合は 414 nm、合金コアナノ粒子の場 合は 418 nm であり、合金コアでも Ag の LSPR 特性を維持していることがわかる。Ag ナノ粒 子の場合、LSPR ピーク波長は 410 nm 付近であり、Au ナノ粒子の場合 520 nm 付近であるた め、AgAu 合金ナノ粒子の場合は組成によってその中間に LSPR ピークを持つことは良く知ら れた事実である。従って、合金コアナノ粒子の LSPR ピークが Ag コアナノ粒子に比べて約 4 nm 程度レッドシフトしている原因は、主に合金化によるものと考えられる。



図 3-8 Ag コアナノ粒子(黒)と合金コアナノ粒子(赤)の紫外可視吸収スペクトル。

## 3.4.3 X線回折法による結晶構造解析

本項では、XRD による Ag コアナノ粒子の結晶構造解析結果に関して述べる。なお、Ag と Au の格子定数はほぼ同じであり XRD パターンに違いが見られないため、合金コアナノ粒子の XRD パターンは割愛する。図 3-9 に、27°  $\leq 2\theta \leq 55^{\circ}$ の範囲の Ag コアナノ粒子の XRD パター ンを示す。CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、FeCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> などの酸化相に由来する XRD ピ ークは検出されなかった。27°  $\leq 2\theta \leq 55^{\circ}$ の範囲で検出された 2 つのピークは、主に *fcc* Ag と *bcc* FeCo のピークからなると考えられる。そこでまず、Ag 相のみが存在すると仮定して、式 (3-5)で表されるガウスーローレンツ複合関数<sup>[19]</sup>を用いてピークフィッティングを行った。

$$f(x) = \frac{I_0}{\{1 + M(x - x_0)^2 / \Gamma^2\} \exp\{(1 - M) \ln 2(x - x_0)^2 / \Gamma^2\}}$$
(3-5)

*M*はガウスーローレンツ混合比で0から1の間の値をとる。*M*=0では式(3-5)は純粋なガウス 関数となり、*M*=1では純粋なローレンツ関数となる。Γは分散、*I*<sub>0</sub>は最大強度、*x*<sub>0</sub>はピーク位 置、σは標準偏差をそれぞれ表す。図 3-9b 上段にフィッティング結果を示す。XRD パターン の下に差分を表示している。矢印が示す箇所、特に2つのピークの鞍部において大きくずれが 生じていることがわかる。次に、Ag 相と FeCo 相が共存していると仮定してピークフィッティ ングを行った結果を図 3-9b 中段に示す。この場合でも、2つのピークの鞍部においてずれが生 じている。

図 2-6 に示した Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O ナノ粒子の XRD パターンのピークは (111)面が 36.08°、(200)面が 42.66° であり、(200)面のピークは Ag コアナノ粒子の XRD パターンに見られる 2 つのピーク の丁度鞍部に位置する。そこで、FeCo シェルが酸化されて Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O になったと想定し、Ag 相と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相が共存していると仮定してピークフィッティングを行った結果を図 3-9b 下 段に示す。鞍部は良好にフィッティングされたものの、矢印が示す箇所、特に 2 つのピークの 裾部においてずれが生じてしまった。そこで、FeCo シェルの表面が一部酸化されて Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O になったと想定し、Ag 相、FeCo 相及び Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相の全てが共存すると仮定してピークフィ ッティングを行った結果を図 3-9a に示す。ナノ粒子は球状であり、等方的に成長すると仮定す ると、Ag 相と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相の 2 本のピークの相対強度比はリファレンスと同等であると考え られるので、各ピークの強度比をピークフィッティング時の制約条件とした。また、ピーク分 離の結果から得られた Ag(111)及び Ag(200)のそれぞれのピークを用いてシェラー式から求め た平均結晶子径がどちらも同じ値となるように各ピークのパラメーターに制約条件を課した。  $Co_{0.5}Fe_{0.5}O$ の(111)及び(200)ピークにも同様の制約条件を課した。その結果、ナノ粒子の XRD パターンを綺麗にフィッティングすることができた。それぞれのピークからシェラー式より求 めた平均結晶子径を表 3-2 にまとめた。残差二乗和(Error Sum of Squares: ESS)を ESS= $\Sigma(I_{exp}-I_{fil})^2$ として求めたところ 11,200 であった。これに対し、図 3-9b 上段では ESS = 78,475、中段では ESS = 18,106、下段では ESS = 22,431 となった。これらの結果から、FeCo シ ェルは酸化により部分的に Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相となっていることが示唆された。



図 3-9 Ag コアナノ粒子の XRD パターンとピークフィッティングの結果。(a) fcc Ag (JCPDS PDF No. 01-087-0717)、bcc FeCo (JCPDS PDF No. 00-049-1567)、及び Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相(図 2-6)が共存すると 仮定してピークフィッティングを行った結果。黒、青、赤、緑及び黄の線は、それぞれ、実験データ、Ag 相、FeCo 相、Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相及び全ての合成関数を表す。(b) 上段: Ag 相のみを考慮してフィッティングした結果。中段: Ag と FeCo を考慮してフィッティングした結果。下段: Ag と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O を考慮してフィッティングした結果。 下段: Ag と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O を考慮してフィッティングした結果。 本 XRD パターンの下には差分パターンを示した。

表 3-2 Ag コアナノ粒子の XRD パターンのフィッティング結果。括弧内はリファレンスの値を示す。

	Co <sub>0.5</sub> Fe <sub>0.5</sub> O (111)	Co <sub>0.5</sub> Fe <sub>0.5</sub> O (200)	Ag (111)	Ag (200)	FeCo (110)	
$2\theta$ [degree]	36.3 (36.08)	42.3 (42.66)	38.3 (38.12)	44.5 (44.30)	44.9 (44.86)	
D <sub>XRD</sub> [nm]	1.1	1.1	5.9	6.0	1.0	
$I_{200}/I_{111}$	2.3 (	2.27)	0.42	(0.45)	N/A	

## 3.4.4 化学安定性評価

Ag コアナノ粒子及び合金コアナノ粒子の化学安定性を、Fe と Co の化学種(Fe<sup>0</sup>、Fe<sup>2+</sup>、 Fe<sup>3+</sup>及び Co<sup>0</sup>、Co<sup>2+</sup>、Co<sup>3+</sup>)の存在割合の経時変化を XPS によって追跡することで評価した。 大気中での保存期間の異なるサンプルを XPS 測定に供し、Fe 2p 及び Co 2p のスペクトルを取 得した。Fe 2p に関しては Fe<sup>0</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、表面の帯電による寄与、サテライトの 5 つの要素 を考慮し<sup>[10]</sup>、Co 2p については Co<sup>0</sup>、Co<sup>2+</sup>、Co<sup>3+</sup>、サテライトの 4 種類の要素を考慮して<sup>[10]</sup>、 XPSPEAK41 ソフトウェアを用いてデコンボリューションを行った。デコンボリューションに 際しては、各化学種のピーク位置、半値幅、スピンー軌道相互作用によって分裂したピーク (2p<sub>3/2</sub>及び 2p<sub>1/2</sub>)のエネルギー差、面積強度比などに矛盾が生じないようにピークパラメータ ーに厳密な制約条件を設けた上で実施した。XPS で測定したサンプルとしては、合成直後のも

Ag コアナノ粒子の XPS スペクトルを図 3-10 に、合金コアナノ粒子の XPS スペクトルを 図 3-11 に示す。デコンボリューション後に得られたピークパラメーターは、Fe 2p については 表 3-3、Co 2p については表 3-4 にまとめた。合成直後のナノ粒子の XPS スペクトルから求め た Fe と Co の各化学種の相対存在比を表 3-5 に示す。どちらのナノ粒子においても 2 価の化学 種が Fe と Co の両方で最も多く検出された。この結果は XRD 解析から FeCo の表面は酸化さ れて Coo.5Fe0.5O となっていると示唆された結果と整合している。

の、大気中で2日間静置したもの、大気中で7日間静置したものを用いた。

また、合金コアナノ粒子では、Fe<sup>0</sup>と Co<sup>0</sup>の存在割合が Ag コアナノ粒子に比べて若干多く なっていた。0 価の化学種の存在割合の経時変化を調べたところ、図 3-12 に示すように、どち らのナノ粒子でも Fe<sup>0</sup>と Co<sup>0</sup>は最初の 2 日間で急激に減少し、その後緩やかに減少した。大気 中に7 日間放置したナノ粒子では、合金コアナノ粒子における 0 価の割合が Ag コアナノ粒子 のそれより若干高いことが分かる。これは Ag のコアよりも AgAu の合金コアを形成すること で、FeCo シェルへの電子移動の効果が増大し、酸化が抑制されたためと考えられる。

XPS は試料表面に敏感であることから、ナノ粒子の酸化が進み、Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 層が厚くなる につれ、コア近傍の FeCo を検出することが難しくなる。一般に、光電子の脱出深さは数 nm で あり<sup>[20]</sup>、CoO の薄膜を通過する Fe 2p 由来の光電子の脱出深さは約 2 nm である<sup>[21]</sup>。このこと が、2 日以降の 0 価の存在割合の減少速度が緩やかになった一因と考えられる。

因みに Ag 3d の内殻準位 XPS スペクトルを 2 種類のナノ粒子で比較したところ、粒子種 類や大気中での保存日数にかかわらず、同等のピーク形状であった。合金コアナノ粒子の Ag 3d 及び Au 4f XPS スペクトルより求めた Ag と Au の組成は Ag: Au = 76:24 であり、理論組成 比とほぼ等しい。

61



**図 3-10** Ag コアナノ粒子の (a-b) 合成直後、(c-d) 2 日後、(e-f) 7 日後の (a,c,e) Fe 2p 及び (b,d,f) Co 2p の XPS スペクトル。



**図 3-11** 合金コアナノ粒子の(a-b)合成直後、(c-d)2日後、(e-f)7日後の(a,c,e)Fe 2p及び(b,d,f) Co 2pの XPS スペクトル。

				2p <sub>3/2</sub>					2p <sub>1/2</sub>		
ナノ粒子	保仔期间 (日)	Fe⁰	Fe <sup>2+</sup>	Fe³⁺	Fe surface	Fe satelli te	Fe <sup>o</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Fe³⁺	Fe surface	Fe satelli te
	0	707. 3 (2. 8)	709. 3 (2. 8)	711.3 (2.4)	713. 2 (3. 4)	716. 9 (5. 1)	720. 7 (2. 8)	722. 5 (2. 7)	724. 6 (2. 3)	726. 7 (4. 0)	730. 8 (5. 7)
Ag コア ナノ粒子	2	707.3 (3.0)	709. 3 (2. 7)	711. 2 (2. 5)	713. 3 (3. 4)	717. 0 (4. 8)	720. 5 (2. 8)	722. 5 (3. 0)	724. 3 (3. 0)	726. 8 (4. 4)	731.5 (6.0)
	7	707.3 (2.3)	709. 3 (2. 8)	711.2 (2.7)	713. 3 (3. 4)	717. 0 (5. 7)	720. 5 (2. 5)	722. 5 (3. 0)	724. 4 (3. 0)	726. 8 (4. 3)	731.2 (6.0)
	0	707. 3 (2. 9)	709. 5 (2. 5)	711.3 (2.3)	712. 9 (3. 5)	716. 8 (6. 0)	720. 5 (3. 0)	722. 7 (3. 0)	724. 5 (3. 0)	726. 4 (4. 5)	731. 3 (6. 5)
合金コア ナノ粒子	2	707. 3 (2. 6)	709. 5 (2. 5)	711.3 (2.2)	713. 2 (3. 0)	717. 1 (5. 8)	720. 5 (2. 5)	722. 6 (3. 0)	724. 4 (2. 9)	726. 7 (4. 0)	731. 4 (6. 5)
	7	707. 3 (2. 8)	709. 4 (2. 6)	711.3 (2.6)	713. 3 (3. 6)	717. 3 (5. 6)	720.5 (2.6)	722. 7 (3. 0)	724. 5 (3. 0)	726. 8 (4. 5)	731. 7 (6. 5)

表 3-3 Fe 2p の各ピークの結合エネルギー (eV)。括弧内は半値幅 (eV) を表す。

表 3-4 Co 2p の各ピークの結合エネルギー (eV)。括弧内は半値幅 (eV) を表す。

				2p <sub>3/2</sub>					2p <sub>1/2</sub>		
ナノ粒子	保存期間 (日)	Co <sup>o</sup>	Co <sup>2+</sup>	Co <sup>3+</sup>	Co <sup>2+</sup> satelli te	Co <sup>3+</sup> satelli te	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Co <sup>2+</sup> satelli te	Co <sup>3+</sup> satelli te		
	0	777.2 (1.3)	781. 5 (3. 5)	779. 3 (2. 5)	785. 2 (4. 0)	788. 7 (3. 4)	792. 1 (2. 0)	796. 5 (3. 8)	794. 2 (2. 8)	801. 3 (4. 2)	805. 1 (3. 6)
Ag コア ナノ粒子	2	777.3 (1.4)	781. 3 (3. 5)	779. 2 (2. 4)	785. 2 (4. 1)	788. 7 (3. 4)	792. 3 (2. 1)	796. 5 (3. 8)	794. 7 (2. 8)	801.6 (4.2)	805. 1 (3. 5)
	7	777.5 (1.3)	781. 4 (3. 5)	779.5 (2.3)	785. 2 (4. 0)	788. 7 (4. 0)	792. 3 (1. 8)	796. 6 (3. 5)	794. 8 (2. 8)	801.5 (4.0)	805. 0 (4. 0)
	0	777. 3 (1. 4)	781. 4 (3. 8)	779. 1 (2. 4)	785. 2 (4. 0)	788. 0 (3. 8)	792. 4 (2. 0)	796. 7 (3. 8)	794. 3 (2. 8)	801.5 (4.2)	804. 5 (3. 7)
合金コア ナノ粒子	2	777.3 (1.6)	781. 2 (3. 6)	779. 2 (2. 4)	785. 2 (4. 2)	788. 5 (4. 0)	792. 3 (2. 2)	796. 5 (3. 8)	794. 5 (2. 5)	801.5 (4.2)	804. 9 (3. 9)
	7	777.3 (1.3)	781. 3 (3. 6)	779. 2 (2. 4)	785. 2 (4. 2)	788. 4 (4. 0)	792. 4 (2. 0)	797. 0 (3. 8)	795. 0 (2. 5)	801.6 (3.7)	805. 0 (3. 6)

表 3-5 合成直後のナノ粒子の FeとCoの化学種の組成比。

化学種	Ag コアナノ粒子	合金コアナノ粒子
$Fe^0$ : $Fe^{2+}$ : $Fe^{3+}$	18:65:17	21 : 54 : 25
$Co^0$ : $Co^{2+}$ : $Co^{3+}$	23:46:31	29:41:30



**図 3-12** Ag コアナノ粒子(●)及び合金コアナノ粒子(〇)における (a) Fe<sup>0</sup> と (b) Co<sup>0</sup>の存在割合の 経時変化。

## 3.4.5 磁気特性評価

#### 3.4.5.1 FeCo磁性層の酸化による飽和磁化の減少

Ag コアナノ粒子の室温と 5 K での磁化曲線を図 3-13a に示す。室温での保磁力は 18 Oe で ほとんどヒステリシスは観察されないのに対し、5 K ではヒステリシスを描くことから、Ag コ アナノ粒子は室温超常磁性であることが分かる。FC-ZFC 測定からブロッキング温度は約 200 K と見積もられた<sup>[10]</sup>。Ag コアナノ粒子の室温での Ms を保存時間に対してプロットした図を図 3-13b に示す。その結果、Ag コアナノ粒子の Ms は、酸化のため最初の数日で顕著に低下した。 また、合成直後の Ag コアナノ粒子を 1 T 中で磁場中冷却 (FC) して測定した磁化曲線と、零 磁場冷却 (ZFC) 後測定した 5K での磁化曲線を図 3-13c に示した。図 3-13c から明らかなよう に、交換バイアスが観察された。XRD 解析と XPS 解析の結果を踏まえると、交換バイアスは FM FeCo 相と AFM Coo.sFeo.sO 相の界面が形成されたために発現したと考えられる。これらの 結果 から、Ag コアナノ粒子の構造は図 3-13d に示 したような多層シェル構造 (Ag@FeCo/Coo.sFeo.sO@Ag) であることが分かった。

次に、表 3-1 に示した 2 種類のナノ粒子の、合成直後、2 日後、4 日後のサンプルを FC 後 及び ZFC 後に測定した磁化曲線を図 3-14 に示す(磁性体シェルの体積で規格化した磁化を右 軸で示した)。全てのサンプルから交換バイアスが観察された。合成直後では M<sub>s</sub>は Ag コアナ ノ粒子で 31.7 emu/g、合金コアナノ粒子で 32.1 emu/g であった。しかし、これらの値は磁化モ ーメントを反磁性成分も含んだサンプル全重量で割った値であるので、2 種類のナノ粒子では 組成、コア直径及び粒径などが異なるため、どちらが M<sub>s</sub> と酸化耐性において優れているかを 正しく評価することはできない。そこで、それぞれのナノ粒子の M<sub>s</sub> を各磁性相の体積、



図 3-13 (a) Ag コアナノ粒子の磁化曲線。(b) 300 K での M<sub>8</sub>の大気中での保存時間依存性。(c) 合成直後の Ag コアナノ粒子の ZFC 後(黒)及び FC 後(赤)の磁化曲線。(d) Ag コアナノ粒子の構造模式図(矢印は電子スピンの向きを表す)。

つまり FeCo 相 ( $v_{FM}$ ) と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相 ( $v_{AFM}$ )の合計で規格化するために、FeCo 相と Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 相の体積及び厚さを計算した。1 粒子当たりの磁化  $m_{NP}$  (emu) は式(3-6)または式(3-7)で記述できる。

$$m_{\rm NP} = M_{\rm S}(\rho_{\rm core}v_{\rm core} + \rho_{\rm FM}v_{\rm FM} + \rho_{\rm AFM}v_{\rm AFM})$$

$$m_{\rm NP} = M_{\rm S,FM}\rho_{\rm FM}v_{\rm FM} + M_{\rm S,AFM}\rho_{\rm AFM}v_{\rm AFM}$$
(3-6)
(3-7)

$$v_{\rm NP} = v_{\rm core} + v_{\rm FM} + v_{\rm AFM} \tag{3-8}$$

 $M_{\rm S}$ はナノ粒子の飽和磁化(emu/g)、 $\rho$ は密度(g/cm<sup>3</sup>)、vは体積(cm<sup>3</sup>)を表す。下付きの添 え字はそれぞれの構成要素を表す。 $M_{\rm S,FM}$ には粒径約10 nmのFeCoナノ粒子の $M_{\rm S}$  = 129 emu/g <sup>[22]</sup>、 $M_{\rm S,AFM}$ には粒径約5.6 nmのCo<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>Oナノ粒子の $M_{\rm S}$  = 5 emu/g(付録参照)を用いた。ま た、1粒子の体積は式(3-8)で表される。最外殻シェルの厚みは薄いため無視し、式(3-6)、(3-7)、 (3-8)を解くことで $v_{\rm FM}$ と $v_{\rm AFM}$ を計算し、そこから $t_{\rm FM}$ と $t_{\rm AFM}$ を算出した(表 3-6)。



**図 3-14** 合成直後 (a,b)、大気保存 2 日後 (c,d)、4 日後 (e,f) の (a,c,e) Ag コアナノ粒子と (b,d,f) 合金コアナノ粒子の磁化曲線。黒線は ZFC 後、赤線は FC 後の磁化曲線を示す。

図 3-15 には磁性体シェルの体積で規格化した *M*<sub>S</sub>、保磁力、*t*<sub>FM</sub> と *t*<sub>AFM</sub> の時間変化のプロットを示した。FeCo シェルの酸化の進行は 2 つの競合する現象により決定される。一つは粒子表面からの酸素の拡散による酸化の促進、もう一つはコアからの電子移動による酸化の抑制である。Ag コアナノ粒子と合金コアナノ粒子の酸化耐性を比較しようとしたとき、この 2 種類の粒子ではコアやシェルの寸法が異なるため、単純比較は難しいということに留意しておかなければならない。電子移動による FeCo シェルの電子構造の変化はコアと FeCo シェルの界面近傍数 nm の範囲でのみ起きていると考えられる。表 3-6 に示すように、合成直後の Ag コアナノ粒子では *t*<sub>FM</sub>=1.0 nm であるので、電子移動による酸化抑制効果が及んでいる範囲は Ag コア表面からたかだか 1 nm 程度の領域であると考えられる。合成直後の合金コアナノ粒子の場

合でもその範囲は等しく約 1 nm 程度である。しかし、4 日後には FeCo シェルの酸化は徐々に 進行し、Ag コアナノ粒子では  $t_{FM}$  = 0.5 nm 及び  $t_{AFM}$  = 1.9 nm となったのに対し、合金コアナノ 粒子では  $t_{FM}$  = 0.6 nm 及び  $t_{AFM}$  = 1.7 nm であり、合金コアナノ粒子は Ag コアナノ粒子に比べ て表面酸化膜が薄いにも関わらず、Ag コアナノ粒子と同等もしくはより厚い FeCo シェルが残 っていることから、僅かながらも合金コアを形成することで FeCo シェルの酸化耐性が Ag コ アナノ粒子より向上したと考えられる。

ナノ粒子	保存期間 (日)	Ms (emu/g)	$M_{ m S,shell}$ (emu/cm <sup>3</sup> )	v <sub>FM</sub> (cm <sup>3</sup> )	V <sub>AFM</sub> (cm <sup>3</sup> )	t <sub>FM</sub> (nm)	t <sub>AFM</sub> (nm)
4-77	0	31.7	385.6	49	92	1.0	1.4
Ag コ ゲ ナノ粒子	2	26.0	312.2	39	102	0.9	1.5
	4	15.0	175.8	20	121	0.5	1.9
~~-~	0	32.1	377.3	32	63	1.0	1.3
合金コア ナノ粒子	2	18.9	215.7	17	79	0.6	1.7
	4	20.0	228.8	19	77	0.6	1.7

表 3-6 飽和磁化、磁性体シェル体積、磁性体シェル厚さの経時変化(体積は×10<sup>-20</sup>)。



図 3-15 (a) 磁性体シェルの体積で規格化した飽和磁化(*M*<sub>S,shell</sub>)、(b) ZFC 後に測定した保磁力 (*H*<sub>C,ZFC</sub>)、(c) *t*<sub>FM</sub>、(d) *t*<sub>AFM</sub>の時間変化。●は Ag コアナノ粒子、〇は合金コアナノ粒子を表す。

もし、磁性体シェルが全て FeCo 相から構成され、全く酸化されていないと仮定した場合、 各々の粒子の*M*<sub>s</sub>(反磁性のコアを含めての値)は、Agコアナノ粒子で77.4 emu/g(692.1 emu/cm<sup>3</sup>)、 合金コアナノ粒子で 79.8 emu/g(732.7 emu/cm<sup>3</sup>)となる。これがこれらのナノ粒子の *M*<sub>s</sub>の理 論最大値となる。

#### 3.4.5.2 FeCo磁性層の酸化に伴う交換バイアス磁場の変化

次に、2種類のナノ粒子で観察された交換バイアスと酸化の関係性を議論する。交換バイ アスは3.2節で述べたように各々の磁性相の厚さに極めて鋭敏に影響を受ける。従って、交換 バイアスを利用して、ナノ粒子の酸化状態をより厳密に評価することができるのではないかと 考えた。そこで、図 3-14 に示した ZFC 後及び FC 後の磁化曲線から H<sub>E</sub>を求めた (図 3-16)。 どちらのナノ粒子も合成直後では H<sub>E</sub> の値は小さいが、時間が経過するにつれ (酸化が進むに つれ)、H<sub>E</sub>が顕著に増加している。これは交換バイアスに見られる一般的な傾向 (3.2 節参照の こと)、即ち、FM 層が薄いほど、また AFM 層が厚いほど H<sub>E</sub> が大きくなる傾向と合致してい る。但し、前述のように 4 日後の t<sub>AFM</sub> は合金コアナノ粒子の方が Ag コアナノ粒子よりも小さ いにも関わらず H<sub>E</sub> の値は合金コアナノ粒子の方が Ag コアナノ粒子よりも常に大きいことか ら、H<sub>E</sub>は単純な t<sub>AFM</sub> の関数ではないと考えられる。



図 3-16 株の経時変化。Ag コアナノ粒子(●)及び合金コアナノ粒子(〇)。



図 3-17  $H_{\rm E}$ の(a)  $t_{\rm FM}$ 、(b)  $t_{\rm AFM}$ 、(c)  $v_{\rm FM}$ 、(d)  $v_{\rm AFM}$ 、(e)  $A_{\rm int}$ 、及び(f)  $t_{\rm AFM} / t_{\rm FM}$ に対するプロット。

 $H_E$ と酸化の関係をより定量的に評価するために、 $H_E$ を  $t_{FM}$ 、 $t_{AFM}$ 、 $v_{FM}$ 、FM/AFM 界面積 ( $A_{int}$ )、及び AFM 層と FM 層の厚さの比 ( $t_{AFM}/t_{FM}$ ) に対してプロットした (図 3-17)。なお、表 3-6 には記載していない他の実験結果から得られた Ag コアナノ粒子に関するデータ 3点を加え、合計 9点の実験データをプロットした。図 3-17a-d からわかるように  $t_{FM}$  と  $v_{FM}$  が小さくなるにつれ、また  $t_{AFM}$  と  $v_{AFM}$  が大きくなるにつれ  $H_E$ が大きくなるという大域的な傾向は見られるものの、これらの構造パラメーターと  $H_E$  との相関は弱い。これは当然のことで、 $H_E$ は  $t_{FM}$  と  $t_{AFM}$  (あるいは  $v_{FM}$  と  $v_{AFM}$ )の双方に依存するが、ナノ粒子系の場合には酸化に伴って、 $t_{FM}$  と  $t_{AFM}$  ( $v_{FM}$  と  $v_{AFM}$ )の双方が同時に変化するため、どちらか1つの相の構造パラメー
ターだけでは H<sub>E</sub>との相関は弱くなるのは妥当である。図 3-17e に示すように、A<sub>int</sub>と H<sub>E</sub>の相 関は更に弱く、H<sub>E</sub>を記述する構造パラメーターとして不適である。これは、二次元薄膜積層構 造において FM/AFM 界面積が H<sub>E</sub>に大きな影響を及ぼすとは考えにくいことからも、妥当な結 果である。

しかし、 $t_{AFM}/t_{FM}$ に対して  $H_E$ をプロットしたところ(図 3-17f)、モンテカルロシミュレーションによって得られた FM@AFM ナノ粒子における  $H_E$ の  $r_{FM}$  依存性(図 3-5b)<sup>[9]</sup>と同じように、線形領域( $t_{AFM}/t_{FM}$  が小さいとき)と振動領域( $t_{AFM}/t_{FM}$  が大きいとき)が見られた。従って、 $t_{AFM}/t_{FM}$ は  $H_E$ を記述する構造パラメーターとして適していると考えられる。但し、厳密には、図 3-17 に示したデータは別々に合成された計4種類のナノ粒子から取得したデータであり、コア直径やシェル厚さが全て同一ではないため、 $t_{FM}$ や  $t_{AFM}$ がもし同じ値だったとしても、 $v_{FM}$ や  $v_{AFM}$ が同じ値とは限らないので、AFM 層と FM 層の体積比( $v_{AFM}/v_{FM}$ )を構造パラメーターとしてプロットしたところ、図 3-18a に示すように、線形領域での相関が改善された。



図 3-18  $v_{AFM}/v_{FM}$ に対して  $H_e$ をプロットしたグラフ。(a)本論文のナノ粒子系の実験結果、(b) FM@AFM ナノ粒子のモンテカルロシミュレーション結果<sup>[9]</sup>、(c) Co@CoO ナノ粒子系の実験結果<sup>[3]</sup>。黄 色の領域は線形領域を示す。挿入図は  $v_{AFM}/v_{FM} \le 5$ の領域の拡大図。(d) FM@AFM ナノ粒子系にお ける  $v_{AFM}/v_{FM}$ に対する  $H_e$ の応答の様子を示した模式図。

反磁性体である Ag や AgAu のコアは H<sub>E</sub> へ影響を及ぼさないと考えられるため、コアの存 在を無視することで Ag コアナノ粒子と合金コアナノ粒子をどちらも FM@AFM コア@シェル 型ナノ粒子と単純化して考え、同じ FM@AFM コア@シェル型ナノ粒子の文献値と比較した (図 3-18b,c)。このとき、FM コアの体積は v<sub>FM</sub>、AFM シェルの体積は v<sub>AFM</sub> とする。

まず Hu らのモンテカルロシミュレーションの結果<sup>[9]</sup>と比較してみよう。図 3-5b のデータ の横軸を  $v_{AFM}/v_{FM}$ に変換すると(図 3-18b)、 $v_{AFM}/v_{FM} \cong 3.6$ 付近で線形領域から振動領域への遷 移が起こっていることがわかる。本論文のナノ粒子系においても同じような  $v_{AFM}/v_{FM}$ の閾値で 線形領域から振動領域への遷移が起こっている(図 3-18a)。Hu らのモンテカルロシミュレー ションでは粒径 50*a* (*a* は格子定数)の粒子を計算に用いたが、*a* に FeCo の格子定数である 2.855Å を代入すると、粒径が 14.3 nm となり、本研究でのナノ粒子系とサイズはほぼ同等であ る。

続いて、Feygenson らによる Co@CoO ナノ粒子の実験結果<sup>[3]</sup>とも比較する。図 3-4a のデー タの横軸を  $v_{AFM}/v_{FM}$  に変換した図を図 3-18c に示す。モンテカルロシミュレーションの結果<sup>[9]</sup> や本論文の結果と同様、 $H_E$ は0 <  $v_{AFM}/v_{FM}$  < 1 の範囲では  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して線形関係を示して いる。しかし、 $v_{AFM}/v_{FM}$  > 3.6 の領域ではデータ数が少な過ぎ、振動領域の存在は確認できない。 一方、モンテカルロシミュレーション <sup>[9]</sup>や本論文では得られていない  $v_{AFM}/v_{FM}$  が大きい領域 ( $v_{AFM}/v_{FM}$  > 50) のデータが存在し、 $v_{AFM}/v_{FM}$  > 50 では AFM スピンとの相互作用によりピン止

めされる FM スピンの数が極端に少なくなるため H<sub>E</sub>が減少する様子が観測されている。

図 3-18dに、上記の結果を総合して得られた FM@AFM ナノ粒子系における  $v_{AFM}/v_{FM}$ の変化に対する  $H_E$ の挙動をまとめた模式図を示す。即ち、 $v_{AFM}/v_{FM}$  が小さい領域では  $H_E$ は  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して線形に増加し、 $v_{AFM}/v_{FM}$  が大きい領域では  $H_E$ は  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して単調減少する。そしてその中間領域において、 $H_E$ は  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して振動挙動を示すことがわかった。なお、図 3-18a-cを比較すると、 $H_E$ が0となる  $v_{AFM}/v_{FM}$ の値は系毎に異なることが分かる。この理由は定かではないが、3.2.3 項で述べたように、 $H_E$ の消失が起こる AFM 層の厚みは材料や測定条件に強く依存するためであると考えられる<sup>[4-6]</sup>。3.2.4 項で述べたように、モンテカルロシミュレーションで観察された FM@AFM ナノ粒子系における  $H_E$ の振動的挙動(図 3-5b、図 3-18b) はこれまで実験的には観測されておらず、本論文で初めて実験的に観測することに成功した。また、従来は  $H_E$ を記述する構造パラメーターとして FM 相あるいは AFM 相どちらかの寸法(膜厚や粒径)のみを用いてしか議論されてこなかったため統一的な解釈が難しかったが、 $v_{AFM}/v_{FM}$ を構造パラメーターとして用いることで異なる系のデータ間でも比較できる可能性を示したことは、本分野の研究者にとって有用な洞察を与えるものと思う。

72

## 3.5 交換バイアス磁場と FeCo 層酸化膜厚の関係について

#### 3.5.1 交換バイアス磁場が FeCo 層酸化膜体積に対して振動的挙動を示す理由

本項では、なぜ  $v_{AFM}/v_{FM}$ に対して  $H_E$  が線形に増加する領域(線形領域)から振動的挙動を 示す領域(振動領域)へある閾値で遷移するのか、また振動的挙動の原因は何に由来するのか を考えてみたい。Wu らは FM@AFM ナノ粒子において  $r_{FM}$ を変化させた際( $t_{AFM}$  は固定)の  $H_E$  の挙動をモンテカルロシミュレーションにより計算した<sup>[23]</sup>。モンテカルロシミュレーショ ンでは  $H_E$  は次式で表される。

$$H_{\rm E} = -J_{\rm INT} \cdot M_{\rm INT} \tag{3-9}$$

**J**<sub>INT</sub>は界面での FM スピンと AFM スピンの相互作用エネルギー(カップリング定数)、*M*<sub>INT</sub> は 次式で定義される無次元数である<sup>[23]</sup>。

$$M_{\rm INT} = \Delta N_{\rm Int} / N_{\rm Int} \tag{3-10}$$

 $\Delta N_{\text{Int}}$ は FM/AFM 界面において正方向に配向している AFM スピンと負方向に配向している AFM スピンの数の差を表し、 $N_{\text{Int}}$ は FM/AFM 界面に存在する全 AFM スピン数を表す。

図 3-19 に、 $r_{FM}$ に対してプロットした  $N_{Int}$ 、 $\Delta N_{Im}$ 及び  $M_{INT}$ のグラフを示す。 $N_{Int}$ は FM/AFM 界面積 ( $A_{int}$ ) に比例するため、単純に直径の二乗に比例する (図 3-19a)。一方  $\Delta N_{Int}$  は確率論 的に決まる値であり、平均的にはある一定の割合の AFM スピンが逆向きに配向しているもの の常にゆらぎを伴っているため、 $A_{int}$ に対して振動しながら増大する (図 3-19a)。またその振 幅も  $A_{int}$ の増加に伴って増大する。これは  $A_{int}$ が増加すると全 AFM スピン数 (母数) が増える ので統計学的に振れ幅も増大したためである。しかし、 $\Delta N_{Int}$ は  $N_{Int}$ に比べて一桁以上小さいた め、その平均値はほぼ一定と見なせる。従って、 $M_{INT}$ は  $r_{FM}$ 二乗に反比例する形で減少してい く (図 3-19b)。また、 $r_{FM}$ が小さくなると分母 ( $N_{Int}$ )が減少するせいで  $\Delta N_{Int}$ のゆらぎが強調さ れ、大きく振動する挙動を示すようになる。つまり、FM@AFM ナノ粒子において、酸化によ って  $v_{AFM}/v_{FM}$ が増加すると、最初は近似的に  $M_{INT}$ が線形に増大するが、ある閾値を超えると  $A_{int}$ が小さくなるため  $N_{Int}$ が小さくなり、その結果として  $M_{INT}$ の振動が増幅される結果  $H_E$ の振 動挙動が顕在化すると考えられる。閾値の値は、材料や測定条件などに依存すると考えられる。 このような現象はコア@シェル型ナノ粒子だからこそ見られるものであり、薄膜積層系で  $H_E$ の振動現象が観察されないのは  $N_{Int}$ が充分大きくかつ  $A_{int}$ が一定だからであると考えられる。



図 3-19<sup>[23]</sup> FM@AFM ナノ粒子におけるモンテカルロシミュレーションの結果。 $r_{FM}$  (図中では  $d_{Co}$ と記載)に対してプロットした (a)  $M_{ht}$  と  $M_{ht}$  及び (b)  $M_{NT}$ 。 $t_{AFM}$  は 3 に固定して計算している。

## 3.5.2 交換バイアス磁場から FeCo 層酸化膜厚を推定する方法

前項で見てきたように、 $v_{AFM}/v_{FM}$ が小さい領域では  $H_E$ は  $v_{AFM}/v_{FM}$ に対して線形に増加する ため、この線形関係を利用して Ag コアナノ粒子及び合金コアナノ粒子において酸化膜厚( $t_{AFM}$ ) を精確に見積もる方法を提案する。このようなナノ粒子系での酸化膜厚の測定は他の方法では なかなか難しく、本項で提案する方法は磁性体ナノ粒子の酸化膜の解析に関して有効な手段の 一つとなると期待される。まず、図 3-18a の線形領域のデータを直線近似した。得られた近似 式を用いて  $H_E$ から  $v_{AFM}/v_{FM}$ を求める。また TEM 解析から得られる平均粒径から図 3-7 の関係 を使って  $v_{NP}$  と  $v_{core}$ が求められるため、式(3-8)より  $v_{FM}$  と  $v_{AFM}$ を決定する。そこから  $t_{AFM}$ を計 算することができる。つまり、 $H_E$  と平均粒径さえ測定すれば酸化膜厚を推定できるわけであ る。図 3-20 に  $H_E$  と  $t_{AFM}$ の関係を示す。線形領域から振動領域へ遷移する閾値は  $v_{AFM}/v_{FM} \cong 3.6$ なので、 $v_{AFM}/v_{FM} < 3.6$ の範囲でのみ適用できる。従って、 $v_{AFM}/v_{FM} \cong 3.6$ の際の  $H_E$  (約 1500 Oe) を図 3-20 において上限とした。 $H_E$ は  $t_{AFM}$ の変化に対して極めて敏感であることがわかる。また、Ag コアナノ粒子(図 3-20a)と合金コアナノ粒子(図 3-20b)を比べると、粒径を変化させたときの $H_E$ の $v_{AFM}/v_{FM}$ に対する応答が明らかに異なることがわかる。例えば Ag コアナノ粒子の場合、粒径 14 nm では  $H_E$  = 300 Oe のとき  $t_{AFM}$  = 1.46 nm であるが、 $H_E$  = 600 Oe のとき  $t_{AFM}$  = 1.56 nm と、わずか 1 Å の差で  $H_E$ は 2 倍となる。また、合金コアナノ粒子では、同じ酸化膜の厚さ( $t_{AFM}$  = 1.3 nm) であっても、粒径 16 nm のときは  $H_E$  = 80 Oe であり、粒径 12 nm のときは  $H_E$  = 380 Oe と約 5 倍も増大する。このように、ナノ粒子系では交換バイアスが粒子系、粒径、あるいは酸化などに敏感に影響を及ぼされるため、ナノ粒子系の交換バイアスに関する既往の研究報告を統一的に理解することが難しい一因となっている。



図 3-20 異なる粒径の(a) Ag コアナノ粒子及び(b) 合金コアナノ粒子の Heと tarmの関係。

## 3.6 結言

本章では Ag コアナノ粒子及び合金コアナノ粒子の酸化と磁気特性の関係に焦点を絞り、 詳細な検討を行った。XRD、XPS、SQUID による解析から、これらのナノ粒子の磁性体シェル は FM FeCo 層と AFM Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O 層から成ることが明らかとなった。それぞれの層厚を計算し たところ、合金コアナノ粒子の方が Ag コアナノ粒子よりも僅かながら耐酸化性が向上してい ることが示唆された。また、FM/AFM 界面で交換バイアスが発現することも見出し、H<sub>E</sub>は AFM 層と FM 層の体積比 ( $v_{AFM}/v_{FM}$ )で整理でき、統一的に解釈できることを示した。さらに、 $v_{AFM}/v_{FM}$ < 3.6 では H<sub>E</sub> は  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して線形的に増加するが、 $v_{AFM}/v_{FM} > 3.6$  では  $v_{AFM}/v_{FM}$  に対して振 動的な振る舞いをすることを実験的に明らかにした。線形領域から振動領域への遷移は FM/AFM 界面積が減少することによる界面近傍の AFM スピンの減少に起因する。線形領域に おける  $v_{AFM}/v_{FM}$  と H<sub>E</sub> の関係を利用して、酸化膜厚 ( $t_{AFM}$ ) を精確に推定する方法も提案した。 本研究の成果は、磁性体ナノ粒子の研究者のみならず、交換バイアスの研究コミュニティ でも一つの重要なマイルストーンとなることと期待している。その証左として、本章の成果を 米国物理学協会 (American Institute of Physics) が発行する国際学術雑誌である Journal of Applied Physics 誌に投稿した際にレビュワーから頂戴したコメントを、本章の締め括りとして紹介し ておきたい。

"The authors used an experimental method to study the size effect in an ultrathin nanoparticle with a ferromagnetic/antiferromagnetic core/shell morphology. The results are well agreeable with the simulation predictions, which shows a significant and interesting work on exchange bias."

"This work provides very instructive insights into the dependence of the exchange bias field as a function of the ratio between the volumes of the AFM and FM layers. The presented results are interesting and the conclusions well-supported by data. In particular, I would like to highlight the fact that, contrary to what happens in most exchange bias studies, which focus mainly on the magnetic behaviour of the samples, this work is equipped with an impressive section devoted to the structural characterization of the nanoparticles. In this way, by combining the information coming from advanced microscopy techniques and XPS results, the morphology of the studied magnetic system has been fully characterized before studying its exchange bias properties. This synergic approach makes this work stand above similar studies in this field of research."

## 3.7 参考文献

- 1. Lim, J.; Lanni, C.; Evarts, E. R.; Lanni, F.; Tilton, R. D.; Majetich, S. A. Magnetophoresis of Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5*, 217-226
- 2. Meiklejohn, W. H.; Bean, C. P. New Magnetic Anisotropy. Phys. Rev. 1956, 102, 1413-1414
- 3. Feygenson, M.; Yiu, Y.; Kou, A.; Kim, K-S.; Aronson, M. C. Controlling the Exchange Bias Field in Co Core/CoO Shell Nanoparticles. *Phys. Rev. B* **2010**, *81*, 195445
- 4. Nogués, J.; Schuller, I. K. Exchange Bias. J. Magn. Magn. Mater. 1999, 192, 203-232
- 5. Mauri, D.; Kay, E.; Scholl, D.; Howard, J. K. Novel Method for Determining the Anisotropy Constant of MnFe in a NiFe/MnFe Sandwich. *J. Appl. Phys.* **1987**, *62*, 2929-2932
- Jungblut, R.; Coehoorn, R.; Johnson, M. T.; aan de Stegge, J.; Reinders, A. Orientational Dependence of the Exchange Biasing in Molecular-Beam-Epitaxy-Grown Ni<sub>80</sub>Fe<sub>20</sub>/Fe<sub>50</sub>Mn<sub>50</sub> Bilayers. J. Appl. Phys. 1994, 75, 6659-6664
- Rinaldi-Montes, N.; Gorria, P.; Martínez-Blanco, D.; Fuertes, A. B.; Barquín, L. F.; Puente-Orench, I.; Blanco, J. A. Bridging Exchange Bias Effect in NiO and Ni(core)@NiO(shell) Nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater. 2016, 400, 236-241
- 8. Soares, J. M.; Galdino, V. B.; Machado, F. L. A. Exchange-Bias and Exchange-Spring Coupling in Magnetic Core-Shell Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *350*, 69-72

- 9. Hu, Y.; Liu, Y.; Du, A. Shi, F. Dependence of Exchange Bias on Core/Shell Relative Dimension in Ferromagnetic/Antiferromagnetic Nanoparticles. *Phys. Lett. A* **2014**, *378*, 1667-1674
- M. Takahashi, P. Mohan, A. Nakade, K. Higashimine, D. M. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono. Ag/FeCo/Ag Core/Shell/Shell Magnetic Nanoparticles with Plasmonic Imaging Capability. *Langmuir* 2015, *31*, 2228-2236
- 11. Bzowski, A.; Yiu, Y. M.; Sham, T. K. Charge Redistribution in Au-Metalloid Intermetallics: A Au *L*<sub>2,3</sub>-Edge X-Ray-Absorption Study. *Phys. Rev. B* **1995**, *51*, 9515-9520
- 12. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92nd Edition*; Haynes, W. M. Ed.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2011
- 13. Cole, R. J.; Brooks, N. J.; Weightman, P.; Francis, S. M.; Bowker, M. The Physical and Electronic Structure of the Cu<sub>85</sub>Pd<sub>15</sub>(110) Surface; Clues from the Study of Bulk Cu<sub>x</sub>Pd<sub>1-x</sub> Alloys. *Surf. Rev. Lett.* **1996**, *3*, 1763-1772
- 14. Karakaya, I.; Thompson, W. T. The Ag-Co (Silver-Cobalt) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* **1986**, *7*, 259-263
- 15. Swartzendruber, L. J. The Ag-Fe (Silver-Iron) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* 1984, 5, 560-564
- 16. Okamoto, H.; Massalski, T. B.; Hasebe, M.; Nishizawa, T. The Au-Co (Gold-Cobalt) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* **1985**, *6*, 449-454
- 17. Okamoto, H.; Massalski, T. B.; Swartzendruber, L. J.; Beck, P. A. The Au-Fe (Gold-Iron) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* **1984**, *5*, 592-601
- 18. Ruban, A. V.; Skriver, H. L.; Nørskov, J. K. Surface Segregation Energies in Transition-Metal Alloys. *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 15990-16000
- 19. Maenosono, S.; Lee, J. D.; Dao, A. T. N.; Mott, D. Peak Shape Analysis of Ag 3d Core-Level X-Ray Photoelectron Spectra of Au@Ag Core-Shell Nanoparticles using an Asymmetric Gaussian-Lorentzian Mixed Function. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44*, 1611-1614
- 20. West, A. R. Solid State Chemistry and Its Applications, 2nd Edition; John Wiley & Sons, 2014
- 21. Brambilla, A.; Sessi, P.; Cantoni, M.; Duò, L.; Finazzi, M.; Ciccacci, F. Epitaxial Growth and Characterization of CoO/Fe(001) Thin Film Layered Structures. *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 7519-7524
- 22. Chaubey, G. S.; Barcena, C.; Poudyal, N.; Rong, C.; Gao, J.; Sun, S.; Liu, J. P. Synthesis and Stabilization of FeCo Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7214-7215
- 23. Wu, M. H.; Li, Q. C.; Liu, J.-M. Monte Carlo Simulation of Size, Random Field and Temperature Dependences of Exchange Bias in a Core/Shell Magnetic Nanoparticle. *J. Phys. Condens. Matter* **2007**, *19*, 186202

## 第4章 ハイブリッドナノ粒子の表面修飾

## 4.1 緒言

第2章でAg@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子 の合成法について詳しく述べたとおり、合成直後のハイブリッドナノ粒子の表面はオレイルア ミン(OLA)及びオレイン酸(OA)によって保護されているため、ハイブリッドナノ粒子は無 極性溶媒には分散するが、極性溶媒に分散しない。本論文の目的であるオルガネラの磁気分離 に用いるためには、ハイブリッドナノ粒子を水溶化することが必要不可欠である。また汎用性 の高い磁気分離プローブとして用いるためには、単に水溶化するだけでなくタンパク質などの リガンドで表面修飾する必要がある。そこで本章では、水分散 Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナ ノ粒子を作製するために、水溶性ポリマーを用いた配位子交換を行った。また、アルブミンや トランスフェリンなどのタンパク質による表面修飾を行った。

## 4.2 表面修飾に用いる水溶性ポリマーの合成と評価

水溶性ポリマーを合成する出発物質として、アミノ酸の1種であるリジン(図4-1a)を単 位ユニットにもつ ε-ポリ-L-リジン(ε-Poly-L-Lysine: PLL、図4-1b)を選択した。PLL はドラッ グデリバリーのキャリアーや細胞の凍結保存剤、食品防腐剤などに利用されている<sup>[1]</sup>。重合度 は約32であり、数平均分子量(*M*<sub>n</sub>)は約4090、重量平均分子量(*M*<sub>w</sub>)は約4700であり<sup>[2]</sup>、分 子量分布(*M*<sub>w</sub>/*M*<sub>n</sub>)は1.14と狭い。PLLのアミノ基を介して様々な官能基を導入することが可 能である。本論文では、PLLのアミノ基にチオール基を導入した PLL-SH(図4-1c)と、カル ボキシル基及びチオール基を導入した PLL-COOH-SH(図4-1d)をそれぞれ合成した。

#### 4.2.1 試薬及び評価装置

【試薬】 無水コハク酸(純度  $\geq$  99%) と水酸化ナトリウム(純度  $\geq$  98%) は Sigma-Aldrich から購入した。PLL と 2-イミノチオラン塩酸塩はそれぞれ JNC. Co 及びナカライテスクから購入した。

【評価装置】 <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは 400 MHz 核磁気共鳴分光装置 (AVANCE III、Bruker Biospin) により取得し、ゼータ電位は動的光散乱・光散乱電気泳動測定装置 (Zetasizer Nano ZS、Malvern) を用いて測定した。



図 4-1 (a) リジン、(b) PLL、(c) PLL-SH、(d) PLL-COOH-SH の構造式。(e) PLL-SH と (f) PLL-COOH-SH の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル。

#### 4.2.2 水溶性ポリマーの合成

PLL の 1 つのリジンユニットの分子量は 128 g/mol であり、1 つのユニットに 1 個のアミノ基を含む。本論文では、PLL 全体のアミノ基に対し、カルボキシル基が約 70%、チオール基が約 20%の割合で導入された PLL-COOH-SH と、チオール基のみが約 20% 導入された PLL-SH を合成した。カルボキシル基の導入には無水コハク酸を、チオール基の導入には 2-イ ミノチオランを用いた。まず 25 wt% PLL 水溶液から 10 mmol のリジンユニットに相当する量 を量り取り、7 mmol の無水コハク酸を加え 50 ℃ で 1 時間攪拌しながら反応させた。その後、 2 mmol の 2-イミノチオランを加え、室温で 2 時間攪拌しながら反応させた。

得られた生成物を分画分子量(Molecular Weight Cutoff: MWCO) 500 の透析膜(スペクト ラ/ポア CE 透析用チューブ)を用いて2日間透析した。その後凍結乾燥を2日間行い、乾燥 した PLL-COOH-SH を得た。PLL-SH の場合は、10 mmol のリジンユニットに相当する PLL 水溶液を少量の塩酸で pH を中性にした後、2 mmol の2-イミノチオランを加えた。その後の操 作は PLL-COOH-SH の場合と同様である。

#### 4.2.3 水溶性ポリマーの組成解析

カルボキシル基及びチオール基の導入率を調べるために、PLL-SH 及び PLL-COOH-SH の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。図 4-1e,f にそれぞれ PLL-SH 及び PLL-COOH-SH の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。カルボキシル基の導入率はチオール基を導入する前の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル のケミカルシフトが 2.5 から 2.7 の間のピーク 4 と 5 の積分値から求めた。またチオール基の 導入率はピーク 1 から計算した。それぞれの積分強度は  $\beta$ 、  $\gamma$ 、  $\delta$  の積分強度 (6 個のプロトン に対応) と比較した。表 4-1 に得られた水溶性ポリマーの組成をまとめた。*l、m、n* は図 4-1c,d に記載したユニットを示す。また、この結果をもとに水溶性ポリマーの分子量を計算したとこ ろ、PLL の数平均分子量が 4096 g/mol であるのに対し、PLL-SH では 4512 g/mol (ユニットの 平均分子量: 141 g/mol)、PLL-COOH-SH では 6720 g/mol (ユニットの平均分子量: 210 g/mol) であった。

	PLL-SH ( <i>l</i> : <i>n</i> )	PLL-COOH-SH $(l:m:n)$
理論値(%)	80 : 20	10:70:20
実験値(%)	87:13	18:70:12

表 4-1 ポリマーのユニット組成。

#### 4.2.4 水溶性ポリマーのゼータ電位

それぞれのポリマーを超純水に溶解したところ、PLL-SHはpH=6を示し、PLL-COOH-SH はpH=5を示した。2種類のポリマー水溶液のpHを少量の塩酸または水酸化ナトリウムで調 整し、ゼータ電位を測定した結果を図 4-2 に示す。PLL にカルボキシル基を導入することで、 ポリマーの等電点が PLL-SH より酸性側へシフトすることが分かった。PLL-COOH-SH の等 電点は pH=5 付近であるのに対し、PLL-SH の等電点は pH=8 であった。

PLL-COOH-SHのゼータ電位が7<pH<10の範囲で不安定になる理由として、ポリマー 間での組成の違いや、無水コハク酸が導入された位置などの違いにより、プロトンの解離の仕 方がそれぞれのポリマー分子で微妙に異なり、多くの準安定状態が形成されたためだと考えら れる。PLL-SHがアルカリ性側で負電荷を示す理由として、チオール基のプロトンが解離する ことで、ポリマーが負に帯電した可能性や、プロトン化したアミノ基へ過剰量のカウンターイ オンが吸着し結果的に負電荷を示した可能性が考えられる<sup>[3]</sup>。



図 4-2 PLL-SH(青)及び PLL-COOH-SH(赤)のゼータ電位の pH 依存性。

## 4.3 配位子交換によるハイブリッドナノ粒子の水溶化

次に、これらの水溶性ポリマーを用いてハイブリッドナノ粒子表面の配位子交換を行った。 2 種類の水溶性ポリマー(PLL-SH 及び PLL-COOH-SH)は、図 4-2 に示したように pH に対 する表面電荷が異なるため、水分散ハイブリッドナノ粒子を作製する際、その点を考慮する必 要がある。また、得られた水分散ハイブリッドナノ粒子のコロイド分散安定性と磁気特性につ いても調べた。

#### 4.3.1 試薬及び評価装置

【試薬】 エタノール、0.1 mol/L りん酸緩衝液 (pH=7.0)、及びフェノールレッドを含まない

ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)はナカライテスクか ら購入した。ウシ胎仔血清(Fetal Bovine Serum: FBS)はGibcoから購入した。ヘキサンは関東 化学から購入した。グリシンは和光純薬から購入した。水酸化ナトリウムはSigma-Aldrichか ら購入した。2-モルホリノエタンスルホン酸一水和物(2-Morpholinoethanesulfonic Acid: MES) と細胞毒性評価のためのCell Counting Kit-Fは同仁化学から購入した。

【評価装置】 吸収スペクトルは紫外可視吸光光度計(V-750、日本分光)により取得した。コ ロイド分散安定性は動的光散乱測定装置(Dynamic Light Scattering: DLS、Zetasizer Nano ZS、 Malvern)を用いて評価した。水分散ハイブリッドナノ粒子の磁気特性は SQUID (Quantum Design MPMS)と熱重量分析(Thermogravimetry: TG、EXSTAR6000、セイコーインスツル)に より評価した。細胞毒性評価試験での蛍光強度はマイクロプレートリーダー(Varioskan Flash、 Thermo Scientific)を用いて検出した。

#### 4.3.2 水溶性ポリマーとの配位子交換

まず、PLL-SHによる配位子交換の方法を示す。10 mg の PLL-SH を超純水 1 mL に溶解 し、溶液の極性を下げるために 100 μL のエタノールを加えた。この PLL-SH 水溶液に、ハイ ブリッドナノ粒子(合成後に得られた 4 本のチューブの内 2 本分)を 1 mL のヘキサンで分散 し、その分散液を添加した。混合液は室温で約 30 分間振とうさせながら超音波を印加した。 この操作はヘキサンが蒸発し易いように開放系で行った。また、超音波印加中に超純水を 1 mL ずつ適宜添加し、最終的に合計 5 mL の水を加えた。これにより、配位子交換が完了したナノ 粒子が水相中で濃度過剰となってナノ粒子同士がポリマーにより架橋されることを防ぐ。配位 子交換反応終了後、1.5 mL チューブ 6 本に混合液を均等に約 1 mL ずつ分注し、超遠心分離機

(CS100FNX、日立)を用いて 35,000 rpm (54,879 G) で 3 分間超遠心を行った。遠心分離後上 澄みを取り除き、全てのナノ粒子を最終的に 2 mL の超純水に再分散させた。これを新しい 1.5 mL チューブ 2 本に移し、同じ条件で再度超遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みを取り除 き、少量の水で粒子を分散させて 1 本のチューブに回収した。図 4-3a に PLL-SH で配位子交 換した水分散ハイブリッドナノ粒子の写真を示す。

次に PLL-COOH-SH による配位子交換の方法を示す。PLL-COOH-SH は水中(pH = 5) ではゼータ電位がほぼゼロとなるため弱く凝集し、その結果純水中では白濁してしまう。そこ ヘ少量の水酸化ナトリウム水溶液を添加し、pH をアルカリ性(10~12)に調整すると、白濁 は消失し無色透明のポリマー水溶液が得られる。このようにして超純水 1 mL に溶解した 15 mg の PLL-COOH-SH のアルカリ性水溶液に、100 μL のエタノールを加えた。そして PLL-SH の場合と同様の操作で1回目の遠心分離まで行った。1回目の遠心分離後上澄みを取り除き、

82

2mLのグリシン-水酸化ナトリウムバッファー(pH=9、以下グリシンバッファー、調整方法 は付録に記載)で分散した後2本のチューブに集め、2回目の遠心分離を行った。上澄みを取 り除いた後、少量のグリシンバッファーで再分散させた。図4-3bに PLL-COOH-SH で配位子 交換した水分散ハイブリッドナノ粒子の写真を示す。



**図 4-3** (a) PLL-SH 及び (b) PLL-COOH-SH で配位子交換する前(右)と後(左)のハイブリッドナノ 粒子の分散液の写真(上:ヘキサン、下:水)。

#### **4.3.3** 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の吸収スペクトルと粒子濃度測定

金属ナノ粒子の光散乱については Mie により定式化されている。金属中の自由電子の集団 振動はプラズマ振動と呼ばれる。このプラズマ振動を量子力学的に粒子とみなしたものがプラ ズモンである。金属ナノ粒子中ではプラズモンが表面に局在するため、局在表面プラズモン (Localized Surface Plasmon: LSP)と呼ぶ。金属ナノ粒子にプラズマ周波数と一致する周波数の 電磁波が照射されると、LSPと電場が共鳴して強い吸収や散乱が起こる。これを局在表面プラ ズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)と呼び、LSPR による散乱をプラズモ ン散乱と呼ぶ。粒径が大きい金属粒子の場合、電場と金属粒子内の自由電子は様々なモードで 共鳴を起こすので、その重ね合わせを考慮することで散乱特性を記述できる<sup>[4,5]</sup>。一方、粒径が 光の波長よりも十分小さい場合(*D*<<*λ*、*D*:粒子直径)、金属粒子と電場の相互作用は単純な 二重双極子モードとなり、消光断面積は次式で表される<sup>[5,6]</sup>。

$$\sigma_{\text{ext}} = \frac{18\pi |\varepsilon_{\text{m}}|^{3/2}}{\lambda} V \frac{\varepsilon_2(\lambda)}{[\varepsilon_1(\lambda) + 2\varepsilon_{\text{m}}]^2 + [\varepsilon_2(\lambda)]^2}$$
(4-1)

Vは単一粒子の体積、 $\lambda$ は入射光の波長、 $\varepsilon_m$ は周囲媒質の比誘電率を表す。 $\varepsilon_1(\lambda) \ge \varepsilon_2(\lambda)$ はそれ ぞれ、粒子の誘電関数の実部と虚部である。誘電関数は次式で表される。

$$\varepsilon(\lambda) = \varepsilon_1(\lambda) + i\varepsilon_2(\lambda) = (n + i\kappa)^2$$
(4-2)

nとκはそれぞれ物質の屈折率と消衰係数である。

水分散 Ag@FeCo@Agハイブリッドナノ粒子の配位子交換前後の粒子の吸収スペクトルを 図 4-4a に示した。配位子交換前のナノ粒子はヘキサンに分散しており、LSPR ピークの波長は 403 nm であった。これに対し、配位子交換後の水分散ナノ粒子の場合は、PLL-SH 修飾ナノ粒 子では 412 nm、PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子では 416 nm となり、ヘキサン分散の場合に比べ て長波長シフトした。この理由を明らかにするため、Mie 理論(式(4-1)及び(4-2))を用いて異 なる比誘電率をもつ媒質中での粒径 10 nm の Ag ナノ粒子の消光スペクトルを計算した(図 4-4b)。なお、Ag の n と κ の値は Ref. 7 を参照した。



図 4-4 (a) Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の吸収スペクトル。黒:ヘキサン分散ナノ粒子、赤:水分散 PLL-SH 修飾ナノ粒子、青:水分散 PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子。(b) Mie 理論によって計算した粒径 10 nm の Ag ナノ粒子の消光スペクトル。周囲の媒質が、水(黒、 $\varepsilon_m$ =1.78<sup>[8]</sup>)、ヘキサン(赤、 $\varepsilon_m$ =1.89<sup>[9]</sup>)、 PLL(緑、 $\varepsilon_m$ =2.14<sup>[10]</sup>)、マグネタイト(青、 $\varepsilon_m$ =7.53<sup>[11]</sup>)の場合についてそれぞれ計算した。Ag の屈折 率と消衰係数は Ref. 7 を参照した。

図 4-4b から分かるように、LSPR ピーク波長は、Ag ナノ粒子の周囲の比誘電率が高くなるにつれ長波長シフトする。計算結果から、裸の Ag ナノ粒子を水やヘキサンに分散した場合には LSPR ピーク波長は約 385 nm にあるが、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の LSPR ピーク波長は400 nm を超えている。これは、Ag コアの周囲を被覆する磁性体シェルの影響であると考えら

れる(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>結晶中に Ag ナノ粒子が埋め込まれた系では LSPR ピーク波長は約 600 nm)。ピー クの形状が計算結果ではシャープであるのに対し、実験結果では緩やかである理由も同様に、 磁性体シェルによる遮蔽効果のためであると考えられる。また計算からは、媒質がヘキサンの 場合と比べ、水中では LSPR ピーク波長が短波長シフトする筈であるが(図 4-4b)、実際には 長波長シフトしている(図 4-4a)。この理由は、PLL 修飾により粒子表面近傍の比誘電率が増 大したためと考えられる(図 4-4b)。

次に、LSPR ピーク強度と粒子濃度には相関があるため、LSPR ピーク強度から粒子濃度を 算出できるようにするため、既知の濃度でヘキサンに分散させた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の LSPR ピーク強度を濃度に対してプロットして検量線を作成した(図 4-5)。検量線は y=0.024x (R<sup>2</sup>=0.99) [y:吸光度、x:濃度(µg/mL)]となり、良い線形関係を示した。この検量線を用 いることで分散液中のナノ粒子濃度を容易に決定することができる。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子 のモル吸光係数を求めたところ ε=1.6×10<sup>8</sup> Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> であった。この値は粒径約 10 nm の Ag ナノ粒子のモル吸光係数(5.56×10<sup>8</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)<sup>[12]</sup>と比較すると低い値である。これは Ag コ アの表面を覆う磁性体シェルによる遮蔽効果が原因と考えられる。



図 4-5 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子へキサン分散液における LSPR ピーク吸光度と粒子濃度の関係。

#### 4.3.4 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の分散安定性

#### 4.3.4.1 ゼータ電位による評価

水に分散した PLL-SH 修飾ナノ粒子のゼータ電位は 45.3±6.7 mV、グリシンバッファーに

分散した PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子のゼータ電位は-40.2±2.1 mV であった。PLL-SH 及び PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子を MES バッファー (pH = 5)、水 (pH = 7)、グリシンバッファ - (pH = 9) に分散させたときのゼータ電位を図 4-6 に示す。どちらの粒子のゼータ電位もそ れぞれのポリマーのみのゼータ電位と類似している。PLL-SH 及び PLL-COOH-SH 修飾ナノ 粒子の等電点はそれぞれ pH = 8 及び pH = 6 付近にあると考えられる。



**図 4-6** PLL-SH 修飾ナノ粒子(青)とPLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子(赤)を MES バッファー(pH = 5)、 純水(pH = 7)、グリシンバッファー(pH = 9)に分散させたときのゼータ電位。



図 4-7 PLL-SH 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径の経時変化。

#### 4.3.4.2 流体力学的粒径による評価

水分散ナノ粒子のコロイド分散安定性を定量的に評価するために、水に分散した PLL-SH 修飾ナノ粒子(濃度が 300 µg/mL から 1600 µg/mL の間の 4 サンプル)の流体力学的粒径を、 配位子交換直後から 4 日間に亘って DLS で測定した。軟凝集(フロッキュレーション)した 粒子を再分散するために、DLS 測定前は毎回 3 分間ほど粒子分散液に超音波を印加した。図 4-7 に PLL-SH 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径の経時変化を示す。配位子交換直後の流体力学的 粒径は 59±25 nm であるのに対し 4 日後は 71±44 nm であった。この結果から、PLL-SH 修飾 ナノ粒子の分散安定性は比較的高く、少なくとも急速凝集は起こさないことが明らかとなった。 ゆっくりとではあるが凝集が進行している要因は次のように考えられる。ナノ粒子表面に多点 吸着している PLL-SH は部分的には吸着脱離を繰り返しており、たまたま一部脱離していると ころに他のナノ粒子が近づいてきてそちらに配位することで粒子同士を架橋する。本実験系で 見られた緩慢な凝集は PLL-SH による粒子同士の架橋が一つの主な原因であろう。

#### 4.3.4.3 吸収スペクトルによる評価

一方、吸収スペクトルの形状からもナノ粒子の凝集を評価することが可能である。金属ナ ノ粒子同士が凝集すると、互いのプラズモンがカップリングすることで LSPR ピークが長波長 シフトする。これを利用した計測やセンサーなども報告されている<sup>[13-16]</sup>。本実験では PLL-SH 及び PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子を異なる媒質に分散させ、2 時間後の分散液の様子を写真 撮影し、吸収スペクトルを測定した。まず、1000 µg/mL の濃度で純水中に分散した PLL-SH 修 飾ナノ粒子とグリシンバッファー中に分散した PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子を準備した。そ の後、これらのナノ粒子分散液を pH = 7 の異なる溶媒(PBS、DMEM、10 wt%の FBS を含む DMEM) に添加し、最終的な粒子濃度が 100 µg/mL となるように分散液を調整した。図 4-8 に PLL-SH 及び PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子を各溶媒に分散させた直後と 2 時間後の写真を示 す。図 4-9 には 2 時間後の各々のナノ粒子分散液の吸収スペクトルを示し、LSPR ピーク波長 を表 4-1 にまとめた。この結果から PLL-SH 修飾ナノ粒子は PBS と FBS を含まない DMEM 中 では分散不安定となり沈殿することがわかった。PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子の場合は PBS 中のみで分散不安定となり沈殿することがわかった。

#### 4.3.5 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の磁気特性

水分散ナノ粒子の磁気特性を調べるために、凍結乾燥した PLL-SH 修飾ナノ粒子の磁化測 定を SQUID によって行った。なお凍結乾燥は測定前日に行った。PLL-SH 修飾ナノ粒子に含 まれる PLL-SH 質量を求めるために窒素雰囲気下で熱重量分析を行った(図 4-10a)。その結 果、ナノ粒子の質量の約 50%がポリマー由来であることが示唆された。図 4-10b は PLL-SH 修飾ナノ粒子の *M*s の値を配位子交換後の時間に対してプロットした図である。図中、黒丸は合成直後のナノ粒子の *M*s の値を示し、青丸は PLL-SH で配位子交換した後のナノ粒子を水に分散させた状態で保存した後の *M*s の値を示す。赤丸は PLL-SH の質量を差し引いて計算した *M*s の値である。配位子交換と水中での保存により粒子が徐々に酸化されることが示唆された。



**図 4-8** PLL-SH 修飾ナノ粒子(左列)とPLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子(右列)を各溶媒に分散させた 直後(左)と2 時間後(右)のナノ粒子分散液の写真。

溶媒	PLL-SH 修飾ナノ粒子	PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子	
水/グリシンバッファー	414 nm	419 nm	
PBS	438 nm	434 nm	
DMEM (-FBS)	443 nm	422 nm	
DMEM (+FBS)	423 nm	421 nm	

表 4-1 水分散ナノ粒子を各溶媒に分散させてから 2 時間後の LSPR ピーク波長。



**図 4-9** (a) PLL-SH 修飾ナノ粒子を、水(黒)、PBS(赤)、FBS を含まない DMEM(緑)、または FBS を 含む DMEM(青)に分散させたときの吸収スペクトル。(b) PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子を、グリシン バッファー(黒)、PBS(赤)、FBS を含まない DMEM(緑)、または FBS を含む DMEM(青)に分散させ たときの吸収スペクトル。



**図 4-10** (a) PLL-SH 修飾ナノ粒子の熱重量曲線。(b) M<sub>8</sub>の経時変化。黒:合成直後の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子、青:水に分散させた PLL-SH 修飾ナノ粒子、赤:PLL-SH の質量を差し引いた PLL-SH 修 飾ナノ粒子の M<sub>8</sub>。

#### 4.3.6 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の細胞毒性

PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の細胞毒性をアフリカミドリザルの腎細胞である COS-1 細胞を使い Cell Counting Kit-F のマニュアルに従って評価した。Ag@FeCo@Ag ナノ粒 子は可視光領域の波長を散乱するため、毒性評価の際に蛍光を利用する。まず、蛍光測定用の 96 ウェルプレートリーダーに1 ウェル当たり 3500 個の細胞を FBS を含む DMEM 100 µL に懸 濁させて播種し、37 ℃ で一晩培養した。このときに細胞を含まない培地だけのウェルも作製 した。翌日、最終濃度が 5 µg/mL、10 µg/mL または 20 µg/mL となるように PLL-SH 修飾ナノ 粒子をウェルに添加し、1 時間、2 時間、または 4 時間培養した。同時にナノ粒子を添加しな いコントロール用の細胞のウェルも作製した。培養後は培地を吸い取り、PBS を 100 µL 加え た。そして 10 µL ずつカルセイン-AM DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 溶液を加え、約 20 分間培 養してから蛍光強度を測定した。カルセイン-AM は生細胞に取り込まれ、細胞内エステラーゼ により蛍光性のカルセインへ加水分解される。蛍光強度と細胞生存率は比例関係にあり、コン トロールの細胞と比較することで細胞生存率を計算することが可能である。励起波長を 485 nm、 検出波長を 518 nm としたときの蛍光強度を測定し、式(4-3)から細胞生存率(%) を求めた。

Cell viability (%) = 
$$\frac{A_{\rm s} - A_{\rm b}}{A_{\rm c} - A_{\rm b}} \times 100$$
 (4-3)

A。はナノ粒子が添加された細胞からの蛍光強度、A。はナノ粒子非存在下での細胞からの蛍光強度、A。はナノ粒子非存在下での細胞からの蛍光強度を示す。図 4-11 に細胞生存率の結果をまとめた。この細胞 毒性評価の結果、5~20 µg/mLの濃度範囲では極端な毒性の濃度依存性は観察されなかった。 また、培養時間が2時間以内では細胞生存率は70%以上であるが、4時間では60%以下に減少 することが明らかとなった。

これまでに報告されている Ag ナノ粒子の細胞毒性の研究としては、例えば、クエン酸またはポリビニルピロリドン (PVP) で保護された粒径 10 nm の Ag ナノ粒子の BEAS-2B 細胞に対する細胞毒性に関する報告がある<sup>[17]</sup>。Ag ナノ粒子の細胞毒性を Alamar Blue アッセイにより調べた結果、5µg/mL の粒子濃度で細胞と粒子を 24 時間共培養した場合、細胞生存率は 90%以上であったが、粒子濃度を 50µg/mL に増やすと 20%以下に減少した。他の事例としては、システイン-リジン-リジンのペプチドで保護された粒径 20 nm の Ag ナノ粒子の Caco-2 細胞に対する細胞毒性に関する研究がある<sup>[18]</sup>。Ag ナノ粒子の細胞毒性を CellTiter-Blue アッセイにより調べた結果、5µg/mL の粒子濃度で細胞と粒子を 24 時間共培養した場合、細胞生存率は 80%

以上であった。これに対して粒子濃度を 50 μg/mL に増やすと細胞生存率は約 20%までに下が った。本研究では 5 μg/mL の濃度でも 4 時間の培養後には毒性が現れたことから、PLL-SH 修 飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の細胞毒性は上記の Ag ナノ粒子よりも高いことがわかった。



図 4-11 COS-1 細胞を用いて評価した PLL-SH 修飾ナノ粒子の細胞毒性。

## 4.4 ハイブリッドナノ粒子表面へのタンパク質修飾

#### 4.4.1 ビオチンーアビジン相互作用

ナノ粒子を細胞内へ取り込ませる際、その表面を任意のリガンド(タンパク質や糖鎖など 細胞により認識される生体分子)で修飾することで、受容体を介した特異的な取り込みが可能 となる。本研究ではリガンドを粒子表面へ修飾する際に、リガンドを直接ナノ粒子に結合させ るとタンパク質の変性や自由度の低下が生じる可能性を鑑み、リガンドと粒子の間にバインダ ーを挟むこととし、バインダーとしてビオチンーアビジン結合を利用した。ビオチンは図4-12a の化学構造式で表される低分子で、ビオチン結合性タンパク質[アビジン(Avidin: Avi)、スト レプトアビジン (Streptavidin: Savi)、ニュートラアビジン (Neutravidin: Navi)]と親和性が高 く、ビオチン結合性タンパク質の4つの結合サイトで強く非共有結合する(図4-12b)。

ビオチン結合性タンパク質を表 4-2 にまとめた。この中で Navi はビオチンとの解離定数 が  $K_d = 10^{-15}$  M であり<sup>[19]</sup>、非特異吸着を最も抑制しながら結合することができる。本研究では、 まず粒子表面ヘビオチンが標識されたウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA)を非 特異的に吸着し、Navi を介してビオチン標識リガンドを結合することを試みた。リガンド修飾 の模式図を図 4-12c に示す。BSA の等電点は pI = 5.4 であり<sup>[20]</sup>、水中では負に帯電している。 従って、水中で正に帯電した PLL-SH 修飾ナノ粒子に対して静電的相互作用により非特異吸着 すると考えられる。



**図 4-12** (a) ビオチンの化学構造式。(b) ビオチンとアビジンの結合を表す概念図。(c) ビオチンーア ビジン結合を利用した粒子表面へのリガンド修飾の模式図。

	Avi	Savi	Navi
分子量(kDa)	67	53	60
ビオチン結合サイト	4	4	4
等電点	10	6.8~7.5	6.3
特異性	低い	高い	最も高い

表 4-2 ビオチン結合性タンパク質の比較[19,21-26]。

## 4.4.2 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子へのビオチン標識 BSA 修飾

PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子への BSA 修飾の方法をより具体的に述べる。ビオ チン標識 BSA (bBSA、Thermo Fisher Scientific)を 10 mg/mL の濃度となるように超純水で調整 し、分注して使用直前まで冷凍保存した。また、ビオチン非標識アルブミン(BSA、Sigma-Aldrich) を 20 wt%の濃度となるように超純水で調整した水溶液を作製した。超純水 879 µL に対して bBSA 水溶液(10 mg/mL)を19 µL、BSA 水溶液(20 wt%)を1.9 µL 加えた。そして、この混 合水溶液へ配位子交換直後の PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子水分散液(1000 µg/mL) 100 µL を添加し、室温で 30 分間静置した。BSA を約 5 nm の球状とすると、粒径 15 nm の球 状粒子の表面に最密充填できる BSA 数は約 580 である。それに対して上記の濃度比は、1 個の PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子に対し、bBSA と BSA の数が各々300 個と 600 個となる 条件であり十分な BSA 量である。その後 10,000 rpm で 3 分間超遠心分離を行い、上澄みを捨 て、沈殿した粒子を PBS で回収することで bBSA 修飾ナノ粒子を作製した。また、ビオチン非 標識の BSA のみを修飾したナノ粒子も以下の手順で作製した。超純水 897 µL に BSA 水溶液 を 2.86 µL 加え、PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子水分散液(1000 µg/mL) 100 µL を添加 し(1 粒子当たり 900 個の BSA に相当)、後は同様の過程で BSA 修飾ナノ粒子を作製した。



**図 4-13** (a) BSA 修飾ナノ粒子の PBS、FBS を含まない DMEM[(-FBS)]、FBS を含む DMEM[(+FBS)] に分散させた直後(左)と 2 時間後(右)の写真。(b) BSA 修飾ナノ粒子を水(黒)、PBS(赤)、DMEM (-FBS)(緑)、DMEM (+FBS)(青)に分散させたときの吸収スペクトル。

BSA 修飾前の PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の流体力学的粒径が約 59±25 nm(配 位子交換 0 日後)であるのに対し、BSA 修飾後の bBSA と BSA 修飾ナノ粒子の流体力学的粒 径は約 134±39 nm と増加した。また、bBSA と BSA 修飾ナノ粒子の PBS 中でのゼータ電位を 測定したところ、-13.0±1.3 mV と負の値を示した。これは BSA の等電点が酸性側にあるた め、粒子に BSA が修飾されることで PLL-SH の電荷が遮蔽され過剰に吸着した BSA のために 負に帯電したと考えられる。BSA 修飾ナノ粒子のコロイド分散安定性を調べた結果を図 4-13 に示す。図 4-13a には BSA 修飾ナノ粒子を、水、PBS、FBS を含む DMEM と含まない DMEM に 100 μg/mL の濃度で分散させた直後と 2 時間後の写真を示した。図 4-13b には各溶媒に分散 させ 2 時間経過後の BSA 修飾ナノ粒子の吸収スペクトルを示した。LSPR ピーク波長は表 4-3 にまとめた。BSA 修飾前と比べ PBS や FBS を含まない DMEM 中での分散安定性が向上した。

溶媒	BSA 修飾ナノ粒子	
水	418 nm	
PBS	434 nm	
DMEM (-FBS)	422 nm	
DMEM (+FBS)	421 nm	

表 4-3 BSA 修飾ナノ粒子を各溶媒に分散させて 2 時間後の LSPR ピーク波長。

## 4.4.3 水分散 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子へのアビジン及びトランスフェリン修飾

次に、bBSA 修飾ナノ粒子に対して Navi を結合させた。Navi は和光純薬から購入し、ア ッセイバッファー [組成:10 mM Tris-Acetate (pH = 7.5)、50 mM 酢酸カリウム、2.5 mM グリ コールエーテルジアミン四酢酸] で濃度 10 mg/mL に調整し、分注して使用直前まで冷凍保存 した。4.4.2 項に記載の方法に従い、PLL-SH 修飾ナノ粒子と bBSA 水溶液を混合し 30 分間室 温で静置した後、遠心分離を行わずに濃度 10 mg/mL の Navi 溶液を 17 μL 加え室温で 10 分間 静置した。1 粒子当たりの Navi の数は約 300 個である。その後、遠心分離を 10,000 rpm で 3 分 間行い、上澄みを捨て、PBS に分散させた。得られたナノ粒子を以後 Navi 修飾ナノ粒子と呼 ぶ。Navi 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径は 163 ± 45 nm となり、bBSA 修飾及び BSA 修飾ナ ノ粒子(134 ± 39 nm) と比べ粒径が増加した。

本研究ではリガンドとしてトランスフェリン(Transferrin: Tfn)を選択した。Tfn は細胞膜 表面のTfn 受容体(TfnR)により認識され、クラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞 内へ取り込まれる。Navi 修飾ナノ粒子へ Tfn を結合するために、ビオチン標識 Tfn (Sigma-Aldrich)をアッセイバッファーで濃度 5 mg/mL に調整し、分注して使用直前まで冷凍保存し た。上記の方法で Navi 修飾ナノ粒子を作製した後、遠心分離は行わずに濃度 5 mg/mL の Tfn 溶液を 16 µL 加え、10 分間室温で静置した。1 粒子当たりの Tfn の数は約 100 個である。その 後、遠心分離を 10,000 rpm で 3 分間行い、上澄みを捨て、PBS に分散させた。得られたナノ粒 子を以後 Tfn 修飾ナノ粒子と呼ぶ。Tfn 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径は 173 ± 20 nm であ った。BSA、Navi、Tfn をそれぞれ修飾したときの PBS 中での流体力学的粒径と吸収スペクト ルの変化を図 4-14 に示す。また表 4-4 に流体力学的粒径の値と LSPR ピーク波長をまとめた。



**図 4-14** (a) PLL-SH 修飾ナノ粒子 (PLL-SH)、bBSA 修飾及び BSA 修飾ナノ粒子 (BSA)、Navi 修飾 ナノ粒子 (Navi)、及び Tfn 修飾ナノ粒子 (Tfn)の流体力学的粒径。(b) 各々のナノ粒子の吸収スペ クトル (黒:PLL-SH 修飾ナノ粒子、赤:BSA 修飾ナノ粒子、青:Navi 修飾ナノ粒子、緑:Tfn 修飾ナノ 粒子)。 溶媒は PLL-SH 修飾ナノ粒子の場合は純水、タンパク質を修飾した粒子の場合は PBS。

	修飾前	BSA 修飾後	Navi 修飾後	Tfn 修飾後
流体力学的粒径(nm)	$59\pm25$	$135\pm39$	$163\pm45$	$173\pm20$
LSPR ピーク波長 (nm)	412	418	419	422

表 4-4 タンパク質修飾による流体力学的粒径とLSPR ピーク波長の変化。

Navi 修飾が成功したことを確かめるために、ビオチン標識フルオレセインイソチオシアネ ート (Fluorescein Isothiocyanate: FITC、Sigma-Aldrich)を用いて蛍光像を取得した。具体的には、 濃度約 1 mg/mL の bBSA 修飾ナノ粒子、Navi 修飾ナノ粒子または Tfn 修飾ナノ粒子 100 μL に 対して 10 mM のビオチン標識 FITC を 0.96 μL 加え、遮光して 10 分間静置した。その後、遠心 分離を 10,000 rpm で 3 分間行い、上澄みを捨て、PBS に分散させた。この溶液をガラスのカバ ースリップ上に極微量滴下し、もう一枚のカバースリップで挟んで励起光(AURA light engine®、 Lumencor)を照射しながら蛍光顕微鏡(IX71、Olympus)で観察した結果を図 4-15 に示す。 PLL-SH 修飾及び bBSA 修飾ナノ粒子では蛍光が全く検出されなかったが、Navi 修飾及び Tfn 修飾ナノ粒子では蛍光が観察されたため、これらのナノ粒子に Navi が修飾されたことが確認 された。



**図 4-15** 各ナノ粒子にビオチン標識 FITC を結合した後の蛍光像。(a) PLL-SH 修飾ナノ粒子、(b) bBSA 修飾ナノ粒子、(c) Navi 修飾ナノ粒子、及び (d) Tfn 修飾ナノ粒子。

## 4.4.4 タンパク質修飾粒子のサイズにおける今後の課題

本章では粒子にビオチンーアビジン結合を介してタンパク質を修飾したが、それぞれのタンパク質の大きさ(約5nm)を仮定すると、タンパク質修飾後の流体力学的粒径の大きさは著しく増加した。この理由の一つに遠心分離による粒子同士の架橋や凝集の可能性が考えられる。 その証左として、同様の方法で、Tfn と Avi を PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子に結合させた場合、遠心分離による精製を行う前の流体力学的粒径が 137 nm であるのに対し、遠心分離後は 182 nm に増加したことが挙げられる。タンパク質修飾後の粒径を小さく保つ為に、今後は PLL 以外の配位子の検討(ポリエチレングリコールなど)や精製過程の見直し(限外濾過との組み 合わせ)などが必要となるであろう。

## 4.5 結言

本章ではAg@FeCo@Agナノ粒子表面の生体機能化やコロイド化学的特性について検討した。具体的には、まずPLL にチオール基やカルボキシル基を導入した水溶性ポリマー(PLL-SH 及びPLL-COOH-SH)を合成した。次に、配位子交換反応によってAg@FeCo@Agナノ粒子表面をこれらの水溶性ポリマーで修飾することで水分散ハイブリッドナノ粒子を作製した。この水分散ハイブリッドナノ粒子の流体力学的粒径は約 60 nm であった。pH = 7 では PLL-SH 修飾及び PLL-COOH-SH 修飾ナノ粒子は各々正及び負のゼータ電位を示し、目的に応じて正帯電あるいは負帯電の水分散ハイブリッドナノ粒子を作り分けることが可能となった。但し、今後の課題として、コロイド分散安定性、化学安定性、細胞毒性を改善していく必要があることも明らかとなった。

汎用的な磁気プローブとして用いることができるようにするためには、ナノ粒子表面をリ ガンド(タンパク質や糖鎖など細胞により認識される生体分子)で修飾し、受容体を介した特 異的な取り込みを可能にする必要がある。そこで、本章では、所望のリガンドを水分散ハイブ リッドナノ粒子に修飾することを目的として、ビオチンーアビジン結合を利用したオンデマン ドタンパク質修飾に関する基礎検討を行った。またタンパク質修飾による液体培地中でのコロ イド分散安定性の向上も狙った。具体的には、PLL-SH 修飾ナノ粒子の表面にビオチン化 BSA を静電相互作用により吸着させ、ニュートラアビジン(Navi)を結合させた。これによってビ オチン標識されたリガンドであれば、ビオチンーアビジン結合を利用して容易に Navi 修飾ナ ノ粒子に修飾することが可能である。概念実証実験としてビオチン標識 Tfn を Navi 修飾ナノ 粒子に結合させた。修飾後の粒径を小さく保つことは今後の課題であるが、任意のリガンド修 飾された粒子を利用することで、生物学的応用の幅が拡がると期待される。

## 4.6 参考文献

- Shih, I. L.; Shen, M. H.; Van, Y. T. Microbial Synthesis of Poly(ε-Lysine) and Its Various Applications. *Bioresource Technol.* 2006, 97, 1148-1159
- 2. Matsumura, K.; Hayashi, F.; Nagashima, T.; Hyon, S. H. Long-Term Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Carboxylated Poly-*L*-Lysine without the Addition of

Proteins or Dimethyl Sulfoxide. J. Biomater. Sci.-Polym. Ed. 2013, 24, 1484-1497

- 3. Shyue, J. J.; Guire, M. R. D. Acid-Base Properties and Zeta Potentials of Self-Assembled Monolayers Obtained via In Situ Transformations. *Langmuir* **2004**, *20*, 8693-8698
- 4. Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications I. Theory. *Anal. Biochem.* **1998**, *262*, 137-156
- 5. Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4797-4862
- 6. Mohan, P.; Takahashi, M. Higashimine, K.; Mott, D.; Maenosono, S. AuFePt Ternary Homogeneous Alloy Nanoparticles with Magnetic and Plasmonic Properties. *Langmuir* 2017, *33*, 1687-1694
- 7. Johnson, P. B.; Christy, R. W. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B* 1972, 6, 4370-4379
- Hale, G. M.; Querry, M. R. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-µm Wavelength Region. Appl. Opt. 1973, 12, 555-563
- 9. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92nd Edition*; Haynes, W. M. Ed.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2011
- Lawrence, N. J.; Wells-Kingsbury, J. M.; Ihrig, M. M.; Fangman, T. E.; Namavar, F.; Cheung, C. L. Controlling E. coli Adhesion on High-*k* Dielectric Bioceramics Films using Poly(amino acid) Multilayers. *Langmuir* 2012, 28, 4301-4308
- 11. Schlegel, A.; Alvarado, S. F.; Wachter, P. Optical Properties of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). J. Phys. C Solid State Phys. **1979**, *12*, 1157-1164
- 12. Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst* **2014**, *139*, 4855-4861
- Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell surface Expression and Spatial Nanoclustering through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* 2012, *12*, 3231-3237
- 14. Guo, L.; Jackman, J. A.; Yang, H.-H.; Chen, P.; Cho, N.-J.; Kim, D.-H. Strategies for Enhancing the Sensitivity of Plasmonic Nanosensors. *Nano Today* **2015**, *10*, 213-239
- 15. Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia through Plasmon Coupling. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6619-6628
- 16. Yuan, Z.; Hu, C.-C.; Chang, H.-T.; Lu, C. Gold Nanoparticles as Sensitive Optical Probes. *Analyst* **2016**, *141*, 1611-1626
- 17. Gliga, A. R.; Skoglund, S.; Wallinder, I. O.; Fadeel, B.; Karlsson, H. L. Size-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Lung Cells: the Role of Cellular Uptake, Agglomeration and Ag Release. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 11
- Böhmert, L.; Niemann, B.; Thünemann, A. F.; Lampen, A. Cytotoxicity of Peptide-Coated Silver Nanoparticles on the Human Intestinal Cell Line Caco-2. Arch. Toxicol. 2012, 86, 1107-1115

- 19. Hiller, Y.; Gershoni, J. M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. Biotin Binding to Avidin. Oligosaccharide Side Chain Not Required for Ligand Association. *Biochem. J.* **1987**, *248*, 167-171
- 20. Shi, Q.; Zhou, Y.; Sun, Y. Influence of pH and Ionic Strength on the Steric Mass-Action Model Parameters around the Isoelectric Point of Protein. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 516-523
- 21. Brett, P. J.; Tiwana, H.; Feavers, I. M.; Charalambous, B. M. Characterization of Oligopeptides That Cross-react with Carbohydrate-specific Antibodies by Real Time Kinetics, In-solution Competition Enzyme-linked Immunosorbent Assay, and Immunological Analyses. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20468-20476
- 22. Unson, M. D.; Newton, G. L.; Arnold, K. F.; Davis, C. E.; Fahey, R. C. Improved Methods for Immunoassay of Mycothiol. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2053-2157
- 23. Wojciechowski, M.; Sundseth, R.; Moreno, M.; Henkens, R. Multichannel Electrochemical Detection System for Quantitative Monitoring of PCR Amplification. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1690-1693
- 24. Glover, B. P.; McHenry, C. S. The DNA Polymerase III Holoenzyme: An Asymmetric Dimeric Replicative Complex with Leading and Lagging Strand Polymerases. *Cell* **2001**, *105*, 925-934
- 25. Guo, Y.; Guettouche, T.; Fenna, M.; Boellmann, F.; Pratt, W. B.; Toft, D. O.; Smith, D. F.; Voellmy, R. Evidence for a Mechanism of Repression of Heat Shock Factor 1 Transcriptional Activity by a Multichaperone Complex. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45791-45799
- 26. Claypool, S. M.; Dickinson, B. L.; Yoshida, M.; Lencer, W. I.; Blumberg, R. S. Functional Reconstitution of Human FcRn in Madin-Darby Canine Kidney Cells Requires Co-Expressed Human  $\beta_2$ -Microglobulin. J. Biol. Chem. 2002, 277, 28038-28050

# 第5章 ハイブリッドナノ粒子を用いた オートファゴソームの磁気分離

## 5.1 緒言

第4章では水溶性ポリマー(PLL-SH 及び PLL-COOH-SH)を用いて Ag@FeCo@Ag コア @シェル@シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の水溶化に成功した。本章ではこ の水分散ハイブリッドナノ粒子を実際に細胞内へ導入し、オルガネラのイメージングおよび磁 気分離の実証実験を行う。その背景や目的については第1章で述べたとおりである。本論文で はオートファゴソームを標的のオルガネラとした。オートファゴソームに関しては後述するの で、本項ではオルガネラの磁気分離において重要となるナノ粒子を細胞内へ導入する方法につ いて概説しておこう。

#### 5.1.1 ナノ粒子の細胞への導入法

細胞内へ外部から物質(タンパク質、核酸、粒子など)を導入する際、大きく分けて2つ の方法が存在する。1つはエンドサイトーシスを利用する方法である。エンドサイトーシスと は後述するように、細胞自身が自ら行う細胞外物質の取り込み機構である。もう1つの導入方 法はトランスフェクションと呼ばれ、人為的に核酸などを細胞内へ導入する手法である。後者 は細胞の遺伝子改変の際に一般的に用いられる手法である。これまで、様々な粒子がこれらの 手法により細胞内へ導入されてきた。以下にその具体例を簡単に説明する。

#### 5.1.1.1 エンドサイトーシスによる導入

エンドサイトーシスは細胞外部から栄養やシグナル、病原体を取り込む機構であり、取り 込み経路は大きく以下の4つに分類される(図 5-1)。"ファゴサイトーシス"は、主にマクロ ファージ、単球、好中球など免疫応答に特化した細胞により、バクテリアなどの病原体や死細 胞の残骸の駆除のために行われる。"マクロピノサイトーシス"は、多くの細胞において成長 因子などの刺激に応答して細胞膜がひだ状に波打ち細胞外物質を取り込む機構である。"クラ スリン依存性エンドサイトーシス"は、全ての哺乳動物細胞で行われ、低密度リポタンパク質

(Low-density Lipoprotein: LDL)や上皮細胞成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)、トラン スフェリン(Transferrin: Tfn)などが受容体を介して取り込まれる<sup>[1]</sup>。クラスリンは集合するこ とで格子状の籠を形成する。クラスリンにより裏打ちされた膜小胞をクラスリン被覆小胞とよ び、そのサイズは約 120 nm と小さい<sup>[2]</sup>。上記 3 種類以外のエンドサイトーシスは、"クラスリ ン非依存性エンドサイトーシス"に分類される。クラスリン非依存性エンドサイトーシスは、 その種類や機構に関して未知な部分も多い。クラスリン非依存性エンドサイトーシスの例の一 つとして長さ約 200~300 nm の小管の形成が報告されている<sup>[3]</sup>。



図 5-1 エンドサイトーシスの種類。左からファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、クラスリン非依存性エンドサイトーシス。

エンドサイトーシスを利用して粒子を細胞内へ取り込ませた例は多数存在する。ファゴサ イトーシスによる粒子の取り込みは主に、バクテリアを捕食する食食細胞がどのように病原体 を認識するかを調査するために行われており、数 µm オーダーの様々な形状をもつポリスチレ ン粒子の取り込み過程が調査されている<sup>[4-6]</sup>。マクロピノサイトーシスを介した粒子導入とし ては、例えば、球状またはロッド状のメソポーラスシリカナノ粒子(100~300 nm)を HeLa 細 胞や A549 細胞へ取り込ませた例が報告されている<sup>[7]</sup>。ファゴサイトーシスやマクロピノサイ トーシスは粒径が比較的大きな粒子(>100 nm)でも細胞内へ取り込むことが可能である。粒 径が 100 nm 以下の粒子の取り込みに関しては、粒子のサイズ、形状、表面電荷、タンパク質 量が及ぼす取り込み量への影響を調査した研究が存在する。これらはドラッグデリバリーにお ける担体や薬物の動態を調べるための基礎研究を目的とすることが多い。粒子の取り込みに関 する研究例を(i)表面電荷に焦点を当てた例、(ii)粒径に焦点を当てた例、(iii)表面タンパ ク質に焦点を当てた例に分けて紹介する。

#### (i) 表面電荷に焦点を当てた例

Choらは粒径約18 nmのAuナノ粒子の表面電荷を変化させたときの、細胞への粒子の吸着量と取り込み量の関係を調べた<sup>[8]</sup>。Auナノ粒子の表面は異なる化学物質で修飾され、その表

面電荷はクエン酸のとき-10 mV、ポリビニルアルコール(Polyvinyl Alcohol: PVA)のとき-4 mV、ポリアリルアミン塩酸塩(Polyallylamine Hydrochloride: PAA)のとき+20 mV であった。 培養時間を変化させたときの SK-BR-3 細胞による粒子の取り込み量(細胞膜表面への吸着も 含まれる)を誘導結合プラズマ質量分析で調査した(図 5-2)。その結果、細胞膜は負に帯電し ているため<sup>[9]</sup>、正に帯電した粒子の取り込み量が最も多かった。また細胞膜表面で局所的に正 に帯電している領域が存在するため、負に帯電した粒子の方が電気的中性に近い粒子よりも取 り込み量が若干多くなることも明らかとなった。次に、細胞膜へ吸着した Au ナノ粒子をヨウ 素とヨウ化カリウムの混合溶液によるエッチングで溶解し、粒子の細胞への吸着量と内在量を 分けて調べたところ、正に帯電した粒子は細胞膜への吸着も多く、電気的中性に近い粒子は吸 着量が最も少ないことが示唆された。彼らは粒子の取り込みが、細胞への吸着と内在化という 2 つの段階から成ると仮定し、得られたデータを速度論的に解析したところ、吸着は内在化よ りも遅く、細胞膜への粒子の吸着が、細胞が粒子を取り込む際の律速段階であることを示した。

Jiang らは 10 nm 以下の Au ナノ粒子の粒径と表面の電荷を変化させたときの血清フリーの培地中での HeLa 細胞による取り込み量の変化を調べた<sup>[10]</sup>。この場合も正に帯電した Au ナノ粒子の細胞当たりの取り込み量が最も多く、粒径が大きくなるにつれ取り込み量は増加した。 逆に中性または負に帯電した粒子の取り込み量は粒径が大きくなるにつれ減少した。



図 5-2<sup>[8]</sup> 表面電荷が異なる 3 種類の Au ナノ粒子の SK-BR-3 細胞による取り込み量の培養時間 依存性。N は細胞当たりの Au ナノ粒子の個数。

#### (ii) 粒径に焦点を当てた例

Devika らは粒径 14~100 nm の Au ナノ粒子を合成し、サイズ、濃度、培養時間を変化さ せたときの Au ナノ粒子の HeLa 細胞への取り込み量を追跡した<sup>[11]</sup>。Au ナノ粒子の表面はクエ ン酸で被覆されている。Au ナノ粒子を HeLa 細胞と共に血清を含む培地中で 6 時間培養し、 Au ナノ粒子の取り込み量を ICP-OES で定量したところ、取り込み量はサイズに強く依存する ことがわかった(図 5-3)。取り込み量及び取り込み速度は粒径 50 nm のナノ粒子で最大となっ た。クエン酸被覆 Au ナノ粒子の場合、培地中で血清タンパク質が表面に吸着することでタン パク質コロナが形成される。このタンパク質が細胞表面の受容体により認識されることで、受 容体依存性エンドサイトーシスを介して取り込まれたと考えられる。



図 5-3<sup>[11]</sup> (a) Au ナノ粒子の HeLa 細胞による取り込み量の粒径依存性。(b) 異なるサイズの Au ナノ粒子の取り込み量の培養時間依存性。

#### (iii) 表面タンパク質に焦点を当てた例

血清中のタンパク質は粒子表面へ静電的相互作用により吸着し、タンパク質コロナを形成 する。そして粒子表面が血清タンパク質により被覆されることで粒子の細胞内への導入が促進 されると考えられる。Walkey らは、Au ナノ粒子の表面をポリエチレングリコール (Polyethylene Glycol: PEG) で被覆した場合、PEG 密度が増加するに従って血清タンパク質の吸着量が減少す ることを見出した<sup>[12]</sup>。この Au ナノ粒子をマクロファージ (J774A.1 細胞) に取り込ませたと ころ、粒子表面の血清タンパク質の吸着量が多いほど細胞内への取り込み量が増加することが わかった。これは受容体依存性エンドサイトーシスを介した粒子の取り込みが起きたためと考 えられる。血清タンパク質の中でも Tfn は細胞膜表面の Tfn 受容体 (TfnR) により認識され、 クラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる。Devika らは Tfn を修飾し たサイズの異なる Au ナノ粒子を HeLa 細胞、STO 細胞、SNB19 細胞に取り込ませたところ、 粒径 50 nm の Au ナノ粒子の取り込み量が最も多く、クラスリン依存性エンドサイトーシスに よって取り込まれていることを示した<sup>[13]</sup>。

このように、エンドサイトーシスを介した粒子の細胞への取り込み機構は、表面電荷、サ イズ、タンパク質コロナ、細胞種などに強く依存する。実際にどのようにして細胞がこれらの 違いを認識し、エンドサイトーシスにより取り込んでいるのかは未解明な部分も多い。これま での知見をまとめると、エンドサイトーシスを利用して粒子を細胞へ導入する場合、粒子の取 り込み量には大まかに以下の傾向があると考えられる。(i) 正に帯電した粒子は静電的相互作 用により細胞膜への非特異吸着も増えるがその分、細胞内へも取り込まれやすい。(ii) サイズ により粒子の取り込み量は変化し、中間サイズ(約50nm)が最も取り込まれやすい。(iii) 粒 子表面にタンパク質コロナが存在する方が受容体を介したエンドサイトーシスにより粒子は 取り込まれやすい。

#### 5.1.1.2 トランスフェクションによる導入

次に、人為的に粒子を細胞へ導入する手法を紹介する。一般的にトランスフェクションは 細胞への遺伝子導入を目的に行われる。トランスフェクションには様々な方法があり、トラン スフェクション試薬を用いる方法、電場を印加する方法(エレクトロポレーション)、磁性体 粒子を用いて磁場を印加する方法(マグネトフェクション)などがある。これまで、トランス フェクション試薬を用いた Au ナノ粒子<sup>[14,15]</sup>や樹脂ビーズ<sup>[16,17]</sup>の細胞内導入、エレクトロポレ ーションによる Au ナノ粒子<sup>[18,19]</sup>や半導体ナノ粒子<sup>[20]</sup>の細胞内導入、マグネトフェクションに よる磁性体粒子[21,22]の細胞内導入などが報告されている。また、粒子を遺伝子導入時の担体と して用いることで遺伝子発現効率が上がることも報告されている<sup>[14,15,18,19]</sup>。マグネトフェクシ ョンに用いる磁性体粒子(粒径約140~200 nm)<sup>[23]</sup>やプレートは既に市販されている。しかし、 トランスフェクション試薬やマグネトフェクションによる粒子導入は、エンドサイトーシスを 介すると考えられているが、"自然"なエンドサイトーシスと比べ、トランスフェクションに より誘発される"人為的"なエンドサイトーシスにはどのような違いがあるかということは、 完全には理解されていない。例えば、Lipofectamine(トランスフェクション試薬の一種)を用 いた場合、DNA と試薬の複合体は微小管に沿って核へ直接輸送されるという報告もあれば<sup>[24]</sup>、 細胞内でブラウン運動を示し、微小管に沿ったリソソームへの輸送を免れるために遺伝子発現 効率が高いという報告もある<sup>[25]</sup>。いずれにしてもトランスフェクションという手法を用いれば、 通常なら細胞内へ導入できない物質も半ば強制的に細胞質内へ導入することができる。

104

#### 5.1.2 本研究におけるハイブリッドナノ粒子の細胞への導入法

Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子の細胞内への導入法を考えた際、細胞の自発的なエ ンドサイトーシスを利用すると、前述のように、様々なパラメーターが取り込み機構に影響す るため再現性が低くなる惧れがある。そこで、まずトランスフェクションによる導入を選択す ることとした。一方、トランスフェクション試薬を用いて数 µm のサイズの樹脂ビーズを細胞 内へ導入すると、樹脂ビーズがオートファゴソームと呼ばれるオルガネラに内包されることが 吉森らによって報告されている<sup>[16,17]</sup>。オートファゴソームは細胞質内で形成されるオルガネラ であるため、通常のエンドサイトーシスを利用した場合は粒子をオートファゴソームへ送達す ることは難しい。そこで、本論文では、樹脂ビーズの替わりに Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナ ノ粒子を哺乳動物細胞へトランスフェクションすることでオートファゴソームにターゲティ ングし、ハイブリッドナノ粒子がオートファゴソームに内包されたことをプラズモンイメージ ングによって確認した後、オートファゴソームの磁気分離を行うことを考えた。本章では、ハ イブリッドナノ粒子を用いた汎用性の高いオルガネラの磁気分離の概念実証をオートファゴ ソームをモデルとして行った結果について述べ、既存のオートファゴソーム分離法と比較する。

## 5.2 オートファゴソームの磁気分離とその成否確認の方法

#### 5.2.1 オートファゴソームとは

オートファゴソームとは、二重の生体膜から形成される約 0.5~1.5 μm の大きさの膜構造 体であり<sup>[26]</sup>、オートファジーと呼ばれる細胞内でのバルク分解機構の過程で形成されるオルガ ネラである。オートファジーとはギリシャ語で"自食"を意味し、酵母から哺乳動物細胞まで 進化的に保存された現象である<sup>[27]</sup>。オートファジーは、図 5-4a に示すように ① 隔離膜の形 成、② 隔離膜の伸長、③ 隔離膜が閉じることによるオートファゴソームの形成、④ オート ファゴソームとリソソームの融合によるオートリソソームの形成、⑤ リソソームの分解酵素 による内包物の分解の 5 つの素過程から成る<sup>[28]</sup>。分解により得られたアミノ酸は再利用され る。オートファジーは細胞内で恒常的に起こっているが、飢餓状態にするとアミノ酸確保のた めに活発化し 5~10 分後にオートファゴソームが形成される<sup>[26]</sup>。図 5-4b に、飢餓状態にした 哺乳動物細胞とマウスにおけるオートファゴソームの局在を緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)で標識した LC3 (Microtubule-associated Protein Light Chain 3)を発現 させて撮影した蛍光顕微鏡像を示す<sup>[27]</sup>。図 5-4c にはオートファゴソーム及びオートリソソー ムの電子顕微鏡像を示した<sup>[27]</sup>。 LC3 はオートファゴソームマーカーとして良く知られたタンパク質であり、細胞質に存在 している状態のLC3-Iと、LC3-IのC末端がフォスファチジルエタノールアミンと共有結合し 隔離膜やオートファゴソームにリクルートされた状態のLC3-II がある<sup>[29,30]</sup>。LC3-IとLC3-II は ウェスタンブロットにより分離することができ、それぞれの検出量を比較することで、オート ファジーの活性を調べることができ、LC3-II量がオートファゴソーム数と正の相関を持つ<sup>[27]</sup>。 オートファジーは細胞内の恒常性維持において重要な働きをしているため、その機能不全はが ん<sup>[31-33]</sup>、神経変性疾患<sup>[34,35]</sup>、感染症<sup>[36,37]</sup>などの疾患と深く関係している。



図 5-4 (a) オートファジーの過程。LC3-II はオートファゴソームの外側と内側に局在し、内側の LC3-II は分解され、外側の LC3-II は Atg4 によりフォスファチジルエタノールアミンから切り離され LC3-Iとなり再利用される。(b) NIH 3T3 細胞(上段)とマウスの骨格筋(下段)における飢餓状態による GFP-LC3 の発現量の変化<sup>[27]</sup>。左はコントロール。右は飢餓状態にした場合。GFP-LC3 がオートファゴソームに集積し点状に観察される。(c) 電子顕微鏡像<sup>[27]</sup>。一本矢印はオートファゴソーム、二本矢印はオートリソソームまたはアンフィソーム(オートファゴソームとエンドソームのハイブリッドオルガネラ)を示す。オートファゴソームの特徴である二重膜が観察される。矢じりはオートファゴソームに取り込まれた小胞体を示す。


図 5-5<sup>[16]</sup> (a) オートファゴソームに内包された樹脂ビーズの光学顕微鏡像(LM)と電子顕微鏡像 (EM)。LM の左から、GFP-LC3 の蛍光像、明視野像、及び合成画像(スケールバーは 2 µm)。EM で はビーズが二重膜構造(矢じり)に内包されていることがわかる。スケールバーは(上)500 nm、(下) 200 nm。(b) WB の結果。ビーズをトランスフェクションすると GFP-LC3-II 量が増加した。Vinblastine はオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する試薬である。従って Vinblastine+ではオートファゴ ソームが蓄積するため LC3-II の検出量がさらに増加した。

オートファジーは大きく分けて、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペ ロン介在性オートファジーの3種類に分類される。マクロオートファジーでは二重膜構造の隔 離膜が最初に形成されるのに対し、ミクロオートファジーではオートファゴソームを介さず、 リソソームの膜の一部が陥没することで細胞質成分を分解する。<sup>[38]</sup>また、シャペロン介在性オ ートファジーでは分解基質がシャペロンタンパク質により認識され、リソソーム内へ送り込ま れる。<sup>[38]</sup>一般的にオートファジーというとマクロオートファジーを指すことが多い。マクロオ ートファジーは分解する基質により更にいくつかのタイプに分類される。凝集したタンパク質 を基質とする場合はアグリファジー、損傷したミトコンドリアを基質とする場合はマイトファ ジー、外部から侵入したバクテリアを標的とする場合はゼノファジーと呼ぶ<sup>[26]</sup>。ゼノファジー では病原体が細胞内へエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドソームから細胞質へ脱出 したときに、病原体を駆除する目的で引き起こされる<sup>[39]</sup>。しかしゼノファジーは病原体に限ら ず、樹脂ビーズをトランスフェクションした場合にも引き起こされる(図 5-5a)<sup>[16]</sup>。ゼノファ ジーは病原体により損傷したエンドソーム膜がユビキチン化されることで誘発される<sup>[17]</sup>。図 55b には Effectene というトランスフェクション試薬を用いてビーズを導入した 3 時間後に細胞 膜を界面活性剤で溶解して得られた細胞抽出液に対してウェスタンブロット(Western Blot: WB) を行った結果である。ビーズをトランスフェクションした場合、膜結合型の LC3-II 量が増加し た。

## 5.2.2 試薬、器具及び評価装置

【試薬】 PermaFluor Aqueous Mounting Medium (封入剤)、Page Ruler Prestained Protein Ladder (電気泳動用マーカータンパク質)、Lipofectamine® 2000 (トランスフェクション試薬)、Opti-MEM は Thermo Fisher Scientific から購入した。塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl)、ジギトニン及び 2-メルカプトエタノールは和光純薬から購入した。2×Laemmli サンプルバッファーと 10×トリ ス緩衝生理食塩水(Tris-buffered Saline: TBS)はバイオ・ラッドから購入した。0.1% (w/v)ポリ -L-リジン溶液、BSA、DMEM は Sigma-Aldrich から購入した。4%パラホルムアルデヒドリン 酸緩衝液、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (Tween20) はナカライテスクか ら購入した。Amersham ECL select WB 検出試薬は GE ヘルスケアから購入した。N-シクロヘキ シル-3-アミノプロパンスルホン酸 (N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic Acid: CAPS) は同仁化 学研究所から購入した。30% (w/v) アクリルアミド/ビス溶液はコスモ・バイオから購入した。 FBS は Gibco から購入した。Quickblue Staining Solution [Coomassie Brilliant Blue (CBB) 溶液] は BioDynamics Laboratory から購入した。顕微鏡観察ではマウス抗 LC3 抗体とヤギ抗 Vacuolar Protein Sorting-associated Protein 26 (VPS26) 抗体はそれぞれコスモ・バイオとエベレストバイ オテックから購入した。4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)、二次抗体である Alexa Fluor 594 抗マウス IgG と Alexa Fluor 594 抗ヤギ IgG は Thermo Fisher Scientific から購入した。また、 Alexa Fluor 647 マウス抗 CD107A (Lysosome-associated Membrane Protein 1: LAMP1) 抗体は BD Biosciences から購入した。WB ではウサギ抗 LC3 抗体を医学生物学研究所から購入した。マウ ス抗 Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) 抗体、マウス抗 LAMP2 抗体、マウス 抗 TfnR 抗体はそれぞれメルクミリポア、コスモ・バイオ、Thermo Fisher Scientific から購入し た。西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase: HRP) 結合抗ウサギ IgG 抗体と HRP 結合抗マウス IgG 抗体は GE ヘルスケアから購入した。

【器具及び評価装置】 顕微鏡観察用の円形ガラスカバースリップ(直径 12 mm、厚さ 0.12~0.17 mm)は松波硝子工業から購入した。試料は共焦点レーザー走査型顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM、FV 1000D、Olympus)で観察した。また、細胞の TEM (JEM-120EX、JEOL)観察は花市電子顕微鏡技術研究所に委託した。自動磁気細胞分離装置(autoMACS Pro Separator、Miltenyi Biotec)は金沢大学医学部産婦人科の装置を利用した。バンドの検出は化学

発光検出器(LAS-3000、Fujifilm)により行った。ゲル電気泳動にはスラブゲルタイプのスラブ 電気泳動装置(バイオクラフト)を使用した。WBにはセミドライ式ブロッティング装置(ト ランスブロット SD セル、バイオ・ラッド)を利用した。流体力学的粒径は DLS(Zetasizer Nano ZS、Malvern)を用いて評価した。

#### 5.2.3 トランスフェクション

Lipofectamine 2000(トランスフェクション試薬)を用いて、PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(以後 PLL-SH 修飾ナノ粒子)をアフリカミドリザルの腎細胞である COS-1 細胞へ 導入した。細胞はトランスフェクションの前日に、ディッシュへ播種した。目的に応じて、24 ウェルプレート(CLSM による観察)または 10 cm シャーレ(電子顕微鏡による観察または磁 気分離実験)を用いた。

まず、24 ウェルプレートに培養した細胞への PLL-SH 修飾ナノ粒子のトランスフェクシ ョンの手順を説明する。細胞を播種するに先立ち、α-ポリ-L-リジン(以下ポリリジン)で被覆 したガラスカバースリップを作製する。滅菌した超純水で 10 倍希釈した最終濃度 0.01% (w/v) ポリリジン溶液を 10 cm シャーレへ加え、滅菌したガラスカバースリップを必要量浸漬した。 10 分後にポリリジン溶液を捨て、蓋を半開にし、クリーンベンチ内に一晩放置することで風乾 させた。翌日カバースリップを PBS で 3 回洗浄した後、室温で PBS 中に保存した。カバース リップを 24 ウェルプレートに入れ、2 万個の COS-1 細胞をウェル当たり 0.5 mL の DMEM に 調整し播種した。これを一晩 37 ℃ で培養した。DMEM には予め 10% FBS を添加しておいた。 翌日 4 µg に相当する PLL-SH 修飾ナノ粒子と 50 µL の Opti-MEM を混合した。そして、別の チューブで 1 µL の Lipofectamine 2000 と 50 µL の Opti-MEM を混合し 5 分間静置した後、ナノ 粒子の Opti-MEM 分散液に加え 20 分間静置した。その後、PLL-SH 修飾ナノ粒子と Lipofectamine 2000 の混合溶液をウェルに 100 µL 加え、一定時間(30 分、1 時間、2 時間、4 時間または 6 時 間) 培養した。

次に、10 cm シャーレに培養した細胞への PLL-SH 修飾ナノ粒子のトランスフェクション の手順を説明する。55 万個の COS-1 細胞を FBS を含む 5 mL の DMEM に懸濁させ、10 cm の シャーレに播種し一晩 37 ℃ で培養した。翌日 40 µg の PLL-SH 修飾ナノ粒子と 500 µL の Opti-MEM を混合した。そして、別のチューブで 10 µL の Lipofectamine 2000 と 500 µL の Opti-MEM を混合し 5 分間静置した後、ナノ粒子の Opti-MEM 分散液に加え 20 分間静置した。その後、 PLL-SH 修飾ナノ粒子と Lipofectamine 2000 の混合溶液をシャーレに 1000 µL 加え、一定時間 (0 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間または 8 時間) 培養した。0 分の培養時

間ではナノ粒子を添加してから10秒後に培地を取り除いた。

最後に、Lipofectamine 2000 と PLL-SH 修飾ナノ粒子を混合した際の流体力学的粒径の測 定法を示す。8 μg の PLL-SH 修飾ナノ粒子と 100 μL の Opti-MEM を混合した。別のチューブ で 2 μL の Lipofectamine 2000 と 100 μL の Opti-MEM を混合し 5 分間静置後、ナノ粒子の Opti-MEM 分散液に加え 20 分間静置した後、さらに Opti-MEM で 4 倍希釈して DLS で測定した。

#### 5.2.4 細胞免疫染色

24 ウェルプレートに播種した COS-1 細胞ヘナノ粒子を導入し一定時間培養後、培地を取 り除き、PBS で洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 15 分間固定した 後、PBS で洗浄した。次に、50 μg/mL のジギトニン-PBS で 5 分間透過処理を行い、PBS で洗 浄後、50 mM NH<sub>4</sub>CI-PBS で 10 分間クエンチングを行った。PBS で洗浄した後、非特異吸着を 防ぐために 3% BSA - PBS で 30 分間ブロッキングを行い、その後 3% BSA - PBS に調整した一 次抗体を加え、4℃ で一晩遮光して反応させた。一次抗体としては、初期エンドソームにはヤ ギ抗 VPS26 抗体を 200 倍希釈で用い、オートファゴソームにはマウス抗 LC3 抗体を 100 倍希 釈で用いた。リソソームには Alexa Fluor 647 マウス抗 LAMP1 抗体を 100 倍希釈して用いた。 翌日、試料を PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、3% BSA-PBS に調整した二次抗体と 0.05 μg/mL DAPI (超純水で調整した 100 μg/mL の母液を 2000 倍希釈して利用)を室温で1 時間反応させ た。二次抗体としては、初期エンドソーム染色には Alexa Fluor 594 抗マウス IgG 抗体を 2000 倍希釈して用い た。リソソーム染色には二次抗体は用いない(一次抗体が既に蛍光標識されている)。二次抗 体で処理後、試料を 5 分間ずつ 3 回 PBS で洗浄し、封入剤を用いてプレパラートにカバース リップを載せ、CLSM 観察時まで遮光保存した。CLSM の光路系を図 5-6 に示す。

#### 5.2.5 電子顕微鏡観察

細胞の電子顕微鏡観察は、下記の手順で作製した試料を株式会社 花市電子顕微鏡技術研 究所に送付し先方で実施して頂いた。5.2.3 項に記載の方法でハイブリッドナノ粒子を COS-1 細胞にトランスフェクションし、30 分または 2 時間培養した。その後、10 mL の PBS で 10 cm シャーレを 2 回洗浄し、2%グルタールアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液を加え、4℃ で前固 定した。そして 0.1 M リン酸緩衝液で 12 時間洗浄し、2%オスミウム水溶液を加え 4℃ で 3 時 間、後固定した。その後、試料をエタノールで脱水しエポキシ樹脂に包埋した。試料をウルト ラミクロトームで切断し 80 nm の切片を作製し、2% 酢酸ウラン染色を 10 分間、鉛染色を 5 分 間行った後 TEM 観察を行った(前固定後の工程は花市電子顕微鏡技術研究所のほうで実施し た)。



図 5-6 CLSM の光路設定(BA: Band Pass Filter、SDM: Sharp Cut Dichroic Mirror)。(a) ナノ粒子 (NPs)、VPS26、LC3 の観察時の設定。(b) NPs、LAMP1 の観察時の設定。

#### 5.2.6 磁気分離法

5.2.3 項に記載の方法でハイブリッドナノ粒子を COS-1 細胞にトランスフェクションして から一定時間培養後、細胞を 10 mL の冷やした PBS で 2 回洗浄した。その後、プロテアーゼ インヒビター (付録参照) を含む 1 mL の PBS を加え、セルリフター (コーニング) を用いて、 氷上の 10 cm シャーレ上から細胞を剥離した。PBS に剥離した細胞を懸濁させながら、ダウン ス型ホモジナイザー (ウイトン社) に細胞を回収した。そして粗調製用のペストルを使い、20 回ストロークすることで細胞膜のみを温和に破壊し、細胞破砕液をチューブに回収した。得ら れた細胞破砕液を自動磁気細胞分離装置 (autoMACS Pro Separator、Miltenyi Biotec、図 5-7) に 供して磁気分離を行った。分離プログラムとして Posseld (Positive Selection in Standard Model, Double-column Program)、洗浄プログラムとして Qrinse を選択した。Posseld では 2 本の磁気カ ラムを使用し、得られる容量はネガティブセレクション (NS、磁気分離されなかった分画) で は試料量 + 2 mL、ポジティブセレクション (PS、磁気分離分画) では 0.5 mL である。PS は BSA を含むランニングバッファー(Running Buffer: RB)により抽出される。図 5-7c に autoMACS Pro Separator の簡易的な流路図を示した。流路系は界面活性剤を含む洗浄液 (Washing Solution: WS) で洗浄される。Posseld では 2 本のカラムを使用することで分離効率を高めることが可能 となる。1本目のカラムへはサンプルは 4 mL/min の速度で流入し、2本目のカラムには 1 mL/min の速度で流入する。サンプルを流入後、磁場を印加した状態で RB により非特異的にカラムに 吸着した成分が洗浄され、その後、磁場を取り除いた状態で RB により PS を得る。装置使用 後は磁気カラムは 70%(v/v)のエタノールで満たされ、保存される。磁気カラムは使用後 2 週間 までは同じカラムを利用できる。磁気カラムの写真を付録に示した。



**図 5-7** autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec 社製)の (a) 外観写真<sup>[40]</sup>、(b) 磁気カラムが装着 された内部の写真、(c) 流路略図。

磁気分離後 PS に含まれる BSA を取り除くと同時に試料を濃縮するために、PS を4 ℃ で 5 分間 1000 G で遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みを捨て、粒子を含むペレットを 200 µL の PBS に再分散させた。これを磁気分離分画(MS)とした。そして 200 µL のサンプルバッフ ァー(2-メルカプトエタノールと 2×Laemmli サンプルバッファーが 1:20 の割合で含まれる) を加え、95 ℃ で 10 分間の熱処理を行った。Laemmli サンプルバッファーには負の電荷をもつ 界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Dodecyl Sulfate: SDS)が含まれており、 SDS がタンパク質に配位することで高次構造をほどき、またタンパク質を負に帯電させる。2-メルカプトエタノールは還元剤であり、タンパク質内やタンパク質間のジスルフィド結合を切 断する役割を担う。タンパク質は熱処理後、直鎖状となり、分子量に比例した負の帯電量を示 す。一般的にはタンパク質1gに対して SDS は 1.4g 配位する。熱処理した試料は分注して-20 ℃で使用直前まで冷凍保存した。ナノ粒子をトランスフェクションしてから、オートファゴソ ームを磁気分離するまでの全体の流れを図 5-8 にまとめた。細胞破砕から MS を得るまで 30 分以内に行うことが出来る。コントロールも含めた全試料を表 5-1 にまとめた。コントロール の C3 から C5 に関してもサンプルバッファーを混合し、熱処理を行った。



図 5-8 トランスフェクションから磁気分離分画(MS)を得るまでの工程。

表記	Lip.	NPs	培養時間	磁気分離	遠心分離	
H0	+	+	0 min	_	_	
H15	+	+	15 min	—	—	
H30	+	+	30 min	—	—	
H1	+	+	1 h	_	_	
H2	+	+	2 h	_	_	
H4	+	+	4 h	_	_	
H6	+	+	6 h	_	_	
H8	+	+	8 h	_	_	
<b>S</b> 0	+	+	0 min	+	+	
S15	+	+	15 min	+	+	
<b>S</b> 30	+	+	30 min	+	+	
<b>S</b> 1	+	+	1 h	+	+	
S2	+	+	2 h	+	+	
S4	+	+	4 h	+	+	
<b>S</b> 6	+	+	6 h	+	+	
<b>S</b> 8	+	+	8 h	+	+	
C1	+	—	2 h	—	—	
C2	_	_	2 h	_	—	
C3	ナノ粒子のみ 40 µg					
C4		プロテアーゼインヒビターのみ				
C5			RBのみ			
C6	+	+	2 h	—	+	

表 5-1 電気泳動用試料のまとめ(Lip.:Lipofectamine® 2000)。

## 5.2.7 タンパク質ゲル染色

得られた磁気分離分画には様々なタンパク質が含まれるが、これらを分離するためにポリ アクリルアミドゲル電気泳動 (Poly-acrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) を行った。本研究で は約 14~16 kDa の位置に現れる LC3<sup>1271</sup>を検出するために、硬めの 15 %ポリアクリルアミドゲ ルを作製した (付録に記載)。電気泳動する際は、ゲルが挟まったガラス板を電気泳動槽に取 り付け、泳動バッファー (付録参照) で泳動槽を満たした。そしてゲルからコームを静かに抜 き取り、それぞれのレーンにサンプルを加えた。マーカータンパク質は 10 μL、MS は 50 μL、 残りのレーンには 2×サンプルバッファーを 30 μL 加えた。ゲルの下端の気泡を取り除き、電 極を電源に挿入し 200 kV の電圧で電気泳動を行った。ゲルの分子ふるい効果により、小さな タンパク質の方が大きなタンパク質よりも速く泳動する。色素が含まれたサンプルバッファー がゲルの下端まで泳動されたところで泳動を止め、ゲルを CBB 染色または Ag 染色すること で分離されたタンパク質をバンドとして可視化した。Ag 染色は CBB 染色よりも高感度にタン パク質を染色することができる (Ag 染色の方法は付録に記載)。CBB 染色を行う場合は、ゲル を超純水で 15 分間振とう後、水を捨てた後、Quickblue staining solution を加え、タンパク質の

## 5.2.8 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE後ウェスタンブロッティング(Western Blotting: WB)を行った。15%ポリアク リルアミドゲルでタンパク質を分離した後、ゲルを CAPS バッファー(付録参照)中で15分 間振とうした。その後、セミドライ式の転写装置を用いて、下からフィルターペーパー(バイ オ・ラッド)、ポリフッ化ビニリデン(Polyvinylidene Difluoride: PVDF)膜、ゲル、フィルター ペーパーの順番に置き、しっかりと密着させた後、蓋をした。PVDF 膜は予めメタノールに1 分間浸漬した後、CAPS バッファーにフィルターペーパーと一緒に浸してから利用した。転写 時は電圧を15 V に設定し、45分間かけてタンパク質を膜に転写した。転写後、Tween20を含 むトリス緩衝食塩水(TBST バッファー)(付録参照)で PVDF 膜を5分間×2回洗浄し、TBST バッファーに調整した5%スキムミルクを用いて30分間室温でブロッキング処理を行った。そ の後、膜をTBST で5分間×2回洗浄を行い、5%BSA TBST に調整した LC3(1000 倍希釈)、 TfnR(1000 倍希釈)、LAMP2(200 倍希釈)または GAPDH(2000 倍希釈)の一次抗体を加 え、4℃で振とうしながら一晩反応させた。翌日 PVDF 膜を TBST で5分間×2回洗浄し、5% スキムミルク TBST に調整した HRP 修飾二次抗体(4000 倍希釈)の抗ウサギ IgG 抗体または 抗マウス IgG 抗体を加え、1 時間室温で反応させた。その後、TBST で 10 分間×3 回洗浄を行った。化学発光検出は ECL 反応溶液を用い、LAS3000 で 30 秒ごとの積分強度を検出した。

# 5.3 オートファゴソームのイメージングと磁気分離の結果について

## 5.3.1 共焦点顕微鏡によるハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の観察

PLL-SH 修飾ハイブリッドナノ粒子を COS-1 細胞にトランスフェクションし、一定時間培養した後の CLSM 像を図 5-9~図 5-11 に示す。ナノ粒子をトランスフェクションして 30 分後には VPS26 と粒子の共局在が観察されたため(図 5-9)、ナノ粒子が初期エンドソームに取り込まれたことが示唆された。1 時間後にも初期エンドソームに内包されたナノ粒子は観察されたが、30 分後と比較するとその数は減少していた。一方、図 5-10 に示すように、ナノ粒子を導入して1 時間後からは、LC3 ポジティブの膜小胞と共局在するナノ粒子が増加してくる様子が観察された。既往の研究において、樹脂ビーズをトランスフェクションすることで、ビーズがオートファゴソームに内包されることがわかっており<sup>1161</sup>、ナノ粒子の場合もオートファゴソームに内包されたと考えられる。LAMP1 の染色を行ったところ、ナノ粒子を導入して 2 時間後以降ではリソソームとナノ粒子が共局在する様子が観察された(図 5-11)。

図 5-9~図 5-11 において、各マーカータンパク質と共局在していない粒子は、ガラス基板 または細胞膜に吸着した粒子、もしくは他のオルガネラに存在するナノ粒子と考えられる。培 養時間が長くなるに従ってそのようなナノ粒子の割合は増加し、細胞の仮足に沿って局在して いるようであり(図 5-11d)、何らかの機構でナノ粒子が細胞外へ排出されていると考えられる が、詳細は現段階では不明である。



**図 5-9** COS-1 細胞の CLSM 像[青:DAPI(核)、緑:プラズモン散乱(ナノ粒子)、赤:VPS26(初期エンドソーム)]。スケールバーは 10 µm。(a) Lipofectamine のみ導入し 2 時間培養した細胞(コントロール)。ナノ粒子導入後 (b) 30 分(挿入図:黄色枠の部分の拡大像) 及び (c) 1 時間培養した細胞。



**図 5-10** COS-1 細胞の CLSM 像[青:DAPI(核)、緑:プラズモン散乱(ナノ粒子)、赤:LC3(オートフ ァゴソーム)]。スケールバーは 10 µm。(a) Lipofectamine のみ導入し 2 時間培養した細胞(コントロー ル)。ナノ粒子導入後 (b) 30 分、(c) 1 時間、(d) 2 時間、(e) 4 時間、(f) 6 時間培養した細胞。



**図 5-11** COS-1 細胞の CLSM 像[青:DAPI(核)、緑:プラズモン散乱(ナノ粒子)、赤:LAMP1(リソソ ーム)]。スケールバーは 10 µm。(a) Lipofectamine のみ導入し 2 時間培養した細胞(コントロール)。 ナノ粒子導入後 (b) 2、(c) 4、及び (d) 6 時間培養した細胞。

## 5.3.2 電子顕微鏡によるハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の観察

ナノ粒子導入後 30 分及び 2 時間培養した細胞の TEM 像を図 5-12 に示す。TEM 像に見ら れる電子密度の高い黒点がナノ粒子である。ナノ粒子導入後 30 分の細胞には単膜の小胞に内 包されているナノ粒子が多く観察された(図 5-12a,b)。これは CLSM 観察でナノ粒子導入後 30 分ではナノ粒子が主に初期エンドソーム(単膜小胞)に局在していることを示す結果(図 5-9) と矛盾しない。また図 5-12c に示すように、二重膜小胞に内包されたナノ粒子も観察されたた め、培養 30 分で既にオートファゴソーム(二重膜小胞)に内包されたナノ粒子も現れ始めて いると考えられる。一方、2 時間後ではほとんどのナノ粒子がオートリソソーム様の膜小胞に 内包されていた(図 5-12d-f)。またナノ粒子は、粒子同士凝集した大きな二次構造(恐らく Lipofectamine との複合体)を形成していた(図 5-12d 挿入図)。TEM 観察結果は前項で述べた CLSM 観察結果と矛盾せず、細胞へ導入されたナノ粒子はまず初期エンドソームに送達され、 その後オートファゴソーム及びオートリソソームへと順次輸送されたと考えられる。



図 5-12 COS-1 細胞の TEM 像。ナノ粒子導入後 (a-c) 30 分、又は (d-f) 2 時間培養した細胞。(d) の挿入図はナノ粒子凝集体の拡大図。

## 5.3.3 トランスフェクション条件下でのハイブリッドナノ粒子の凝集状態

TEM 像に見られたナノ粒子が凝集した大きな二次構造(図 5-12d 挿入図)が細胞内で形成 されたのか、あるいは Lipofectamin と混合した際に形成されたのかということを明らかにする ために、ナノ粒子と Lipofectamin を混合する前後での流体力学的粒径を評価した。測定には配 位子交換9日後のナノ粒子を用いた。その結果、Lipofectamine と混合する前の流体力学的粒径 は79±11 nm であったのに対し(図 5-13a)、同じナノ粒子を Lipofectamine と混合し細胞へ添 加する直前の状態で測定すると 1352±182 nm へ増加した(図 5-13b)。Lipofectamine は DOSPA (2,3-dioleyloxy-*N*-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-*N*,*N*-dimethyl-l-propanaminium trifluoroacetate)

と DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) (図 5-14) が 3:1 の比率で混ざった混合物である ため<sup>[41]</sup>、DOPE のリン酸基が負に帯電し、静電的相互作用(もしくは疎水相互作用)によって PLL-SH 修飾ナノ粒子と複合体を形成したと考えられる。



図 5-13 (a) 配位子交換 9 日後の PLL-SH 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径のヒストグラム。(b) 同 粒子を Lipofectamine 2000 と混合した後の流体力学的粒径のヒストグラム。



図 5-14<sup>[42]</sup> (a) DOSPA と(b) DOPE の化学構造式。

## 5.3.4 タンパク質ゲル染色の結果

SDS-PAGE後にコントロール試料 C1~C5(表 5-1参照)を CBB 染色した結果を図 5-15a に示す。また、コントロール試料 C6と MS サンプル(S30、S2、S4 及び S6、表 5-1参照)を Ag 染色した結果を図 5-15b に示す。図 5-15aの C3を見ると、PLL-SH 修飾ナノ粒子のみでは 顕著なバンドを示さないことがわかる。PLL-SH の分子量は約 4.5 kDa でありゲルの下端に現 れたスメアは PLL-SH 由来と考えられる。プロテアーゼインヒビター(C4)もバンドを示さな い。C5 からは多くのバンドが検出され、RB には様々なタンパク質(BSA 含む)が存在してい ることがわかる。BSA の分子量は約 66 kDa であることから、72 kDa 付近の膨らんだバンドは BSA 由来と考えられる。C1 と C2 のバンドからは顕著な違いは観察されなかった。一方 Ag 染 色の結果(図 5-15b)を見ると、ナノ粒子を導入して磁気分離を行わずに遠心分離をした場合 (C6)、未破砕細胞や核が含まれるためタンパク質がラダー状に現れた。これに対し磁気分離 を行った MS サンプル(S30、S2、S40及び S6)ではバンドの数が減少したため、磁気分離に より特定のタンパク質が濃縮されたと考えられる。特に 10~26 kDa に現れるバンドの数や濃 淡がサンプル間で異なることから、培養時間を変化させることでそれぞれ異なるオルガネラの 分離に成功した可能性が示唆された。



図 5-15 (a) コントロール試料の CBB 染色の結果。(b) コントロール試料と MS の Ag 染色の結果。

次に、ナノ粒子導入後の培養時間を変化させたときの細胞破砕液と MS をそれぞれ CBB 染色により比較した(図 5-16)。S0~S8(表 5-1 参照)に見られる 72 kDa 付近の濃いバンド は RB 中の BSA である。S0 では顕著なタンパク質のバンドは検出されなかった。細胞破砕液 と MS のバンドを比較すると、約 17 kDa 付近のバンドが磁気分離後に濃く検出されているこ

とがわかる。LC3-I(細胞質型)及びLC3-II(膜結合型)のバンドはそれぞれ約16kDa及び14 kDa付近に現れることが知られている<sup>[27]</sup>。LC3-IIの方がLC3-Iよりもサイズは大きいものの、 LC3-IIは疎水性が高いためLC3-Iよりも速く泳動する<sup>[27]</sup>。実際にオートファゴソームマーカー であるLC3-IIが濃縮されているのか、即ち、オートファゴソームの磁気分離が成功しているの かどうかを確認するためにWBを行った。



図 5-16 PLL-SH修飾ハイブリッドナノ粒子を COS-1 細胞にトランスフェクションしてから0分、15分、 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、及び 8 時間培養後の細胞破砕液(H)と MS(S)の SDS-PAGE 後の CBB 染色の結果(各試料の作製条件は表 5-1 を参照のこと)。

## 5.3.5 ウェスタンブロッティングの結果

タンパク質ゲル染色では試料中に含まれるのタンパク質の分子量は推定できるものの、同 定はできない。磁気分離後のサンプル (MS) に標的オルガネラのマーカータンパク質が濃縮さ れて存在している (つまり、磁気分離が成功している) ことを確認するために WB を行った結 果について述べる。WB では、LC3 (オートファゴソームマーカー)、TfnR (エンドソームマ ーカー)、LAMP2 (リソソームマーカー)、GAPDH (細胞質タンパク質)の検出を行った。 GAPDH は解糖系の酵素であり細胞質内に存在し MS には含まれないため、本研究ではネガテ ィブコントロールとして用いた。図 5-17 に WB の結果を示す。



**図 5-17** PLL-SH修飾ハイブリッドナノ粒子をCOS-1細胞にトランスフェクションしてから0分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、及び8時間培養後の細胞破砕液(H)とMS(S)のWBの結果(各試料の作製条件は表 5-1を参照のこと)。

GAPDH は細胞破砕液からは検出されたのに対し、MS からは検出されなかった。S0 から はいずれのタンパク質も検出されなかった。MS ではナノ粒子導入後 15 分からは LC3-II が徐々 に検出されるようになり、培養時間とともにバンドが濃くなっていった。細胞破砕液と MS を 比較すると、細胞破砕液では LC3-I と LC3-II の両方が検出されたのに対し、MS では LC3-II の みが濃縮されていることから、CLSM 像と TEM 像の結果も併せて考えると、オートファゴソ ームの磁気分離に成功したと言える。ナノ粒子導入 1 時間後では粒子を含む初期エンドソーム の数が 30 分後より減少したという CLSM の観察結果から、ナノ粒子を導入して 30 分後では 多くの粒子は初期エンドソームに存在するが、その後初期エンドソーム膜が損傷することでゼ ノファジーが誘導され、ナノ粒子がオートファゴソームに内包されたものと考えられる。LC3-II の検出量は S6 及び S8 で顕著に増加している一方、LAMP2 は S8 の検出強度が最も高くなっ たことから、ナノ粒子はオートファゴソームを経由した後、最終的にオートリソソームに輸送 されたと考えられる。

## 5.4 考察

## 5.4.1 ハイブリッドナノ粒子の細胞内局在の培養時間変化

得られた結果をもとに、トランスフェクションされた PLL-SH 修飾ハイブリッド粒子の細胞内での輸送過程の模式図を図 5-18 にまとめた。トランスフェクション後ナノ粒子はまず初期エンドソームに輸送される。その後、樹脂ビーズを用いた先行研究<sup>161</sup>の場合と同様、初期エンドソーム膜に損傷が起こり、エンドソームの基質タンパク質がユビキチン化され<sup>[17]</sup>、ゼノファジーが引き起こされたと考えられる。損傷したエンドソーム膜はナノ粒子と共にオートファゴソームに内包される。そしてオートファゴソームは最終的にリソソームと融合し、オートリソソームとなる。その為、WB では培養時間が長くなると TfnR、LC3、LAMP2 の 3 種類のマーカータンパク質が同時に検出されたと考えられる(図 5-18)。粒子を導入してから 30 分後では多くの粒子は初期エンドソームに存在するが、2 時間後には TEM や CLSM の観察の結果からオートリソソームに存在すると考えられるため、初期エンドソームからオートファゴソームへのナノ粒子の移行は粒子導入 30 分後から 2 時間後の間で起きると考えられる。従って、オートファゴソームを分離するためには、粒子導入後比較的早い段階(30 分から 2 時間以内)で分離することが望ましい。

リソソームは分解酵素を含むため、オートリソソーム内ではタンパク質の消化が起こるが、 WB では培養時間を延ばしても MS から LC3 と TfnR が検出された。既往の研究で、ナノ粒子

122

をエンドサイトーシスにより細胞内へ導入するとリソソーム機能の障害やオートファジーの 阻害が起こることが報告されている<sup>[43-46]</sup>。細胞、粒子及び導入法が本研究と既往研究では全く 異なるものの、類似の機構によってリソソームの分解機能が阻害されたためLC3 と TfnR が分 解されずに残留した可能性は十分考えられる。但し、図 5-16 に示す S8 の 17 kDa 付近のバン ドが他の MS のバンドと比較して広がりを見せていることから、完全に分解機能が阻害されて いる訳ではない可能性も捨てきれない。



図 5-18 トランスフェクションされた PLL-SH 修飾ハイブリッド粒子の細胞内輸送過程の模式図とマ ーカータンパク質検出量の培養時間に対する依存性[オレンジ:初期エンドソーム(TfnR)、赤:オート ファゴソーム(LC3)、紫:リソソーム(LAMP2)]。

## 5.4.2 既往のオートファゴソーム分離法との比較

ここでは既報のオートファゴソームの分離法を紹介し、本研究のオートファゴソームの分離法と比較する。超遠心分離法による腎臓<sup>[47]</sup>や肝臓<sup>[48-52]</sup>からのオートファゴソームの分離は既に報告されており、オートファゴソームを分離するためのプロトコルが Seglen らにより提案されている(図 5-19)<sup>[51]</sup>。彼らは、18 時間飢餓状態にしたラットから肝臓を摘出し肝細胞を分離し、肝細胞を Vinblastine とアミノ酸フリーの培地で2時間共培養した。Vinblastine は抗がん 剤としても利用され微小管の重合を阻害する。従って、微小管によるオルガネラの輸送を阻害 することで、オートファゴソームとエンドソームとの融合及びリソソームとの融合を阻害し、 オートファゴソームの蓄積を引き起こす。その後、細胞膜を破砕した後にカテプシン C 基質で 破砕液を処理することでリソソームを浸透圧の差により破壊することが出来る。核を遠心分離 で取り除き、得られた分画を Nycodenz®(密度勾配液)を媒体として用い、4℃、141,000 G の 条件で1時間密度勾配遠心分離を行った。この過程でミトコンドリアやペルオキシソームは取 り除かれるが、小胞体とオートファゴソームは一緒に濃縮される。オートファゴソームと小胞 体が濃縮された分画を取り出し、Nycodenz®と Percoll®(密度勾配液)を用いて4℃、72,000 G の条件で 30 分間密度勾配遠心分離を行うことで小胞体とオートファゴソームを分離した。更 に Percoll®を取り除くために、イオジキサノールを用いて4℃、71,000 G の条件で 30 分間密 度勾配遠心分離を行った。その結果、約 3.6g の肝細胞から 5 mg のオートファゴソーム(純度 約 95%)を分離することに成功したと報告している<sup>[52]</sup>。



**図 5-19<sup>[51]</sup> ラット肝臓からのオートファゴソーム分離プロトコル(AP:オートファゴソーム、ER:小胞体、** MITO:ミトコンドリア、NUC:核、PNS:除核上清分画、PX/PEROX:ペルオキシソーム、VBL: Vinblastine)。

また、遺伝子改変細胞を用いることでオートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、 マクロオートファジーの過程で形成されたオートファゴソームを精製した例もある。オートフ ァゴソームとリソソームが融合する際に、互いの膜上の SNARE タンパク質が相互作用する。 SNARE タンパク質は一般的に輸送小胞とターゲットとなる膜の膜結合において重要な働きを

担い、オートファゴソーム上には SNARE タンパク質の syntaxin17 (STX17) が存在する。水島 らは STX17 の N 末端ドメイン (NTD) を欠いた STX17ΔNTD、または N 末端に GFP を発現し た GFP-STX17 を細胞内で過剰発現させることで、オートファゴソームとリソソームの融合が 阻害され、オートファゴソームが蓄積されることを報告した<sup>[53]</sup>。そこで、Tet-On/Off システム (抗生物質であるドキシサイクリンを投与することで細胞において可逆的に目的遺伝子の発 現を調節できるシステム)を利用し、ドキシサイクリン存在下で GFP-STX17ΔNTD を過剰発 現できる Tet-On HeLa 細胞株を作製した。さらにこの Tet-On HeLa 細胞が FLAG 標識 LC3 を発 現できるようにした後、ドキシサイクリン存在下2日間培養し、細胞膜を破砕した後、OptiPrep により150,200Gで3時間密度勾配遠心分離を行った。つまり、ドキシサイクリン投与によっ て GFP-STX17ΔNTD を過剰発現させた状態でオートファジーを誘導させることで FLAG 標識 LC3 が結合したオートファゴソームを細胞内に蓄積させ、それを密度勾配遠心分離法で濃縮し たということである。その後、オートファゴソームが含まれる分離分画に対して抗 FLAG 抗体 修飾磁性体粒子(粒径約 180±30 nm)を添加し、2 時間の抗原抗体反応を行った。そして磁石 により磁性体粒子と共にオートファゴソームを回収し、SDS を含むサンプルバッファーでタン パク質を可溶化した。その結果、オートファゴソームに内包されたミトコンドリア(TOM20) のタンパク質が少量検出されるものの、リソソーム(LAMP1)の混入が無く、オートファゴソ ームの精製に成功したことが示された。

上記のオートファゴソームの分離例と本論文におけるオートファゴソームの分離との主 な違いは以下の4点である。(1)既往の研究ではマクロオートファジーによって基質非特異的 に形成されたオートファゴソームを分離しているのに対し、本論文ではマクロオートファジー の中でもゼノファジーにより形成されたオートファゴソームを分離している。(2)本論文の方 法では、培養時間を変化させるだけで分離する標的オルガネラをオートファゴソームから初期 エンドソームやオートリソソームへ切り替えが容易である。(3)既往の方法では、細胞膜を破 砕してからオートファゴソームを精製するまでに多くの工程と長時間の超遠心分離(>71,000 G)が必要であるのに対し、本論文の方法では細胞膜破砕からオートファゴソームの濃縮まで 30分以内に行うことができ、かつプロセスが比較的温和なので表在性タンパク質の剥離など が抑制できる可能性が高い。(4)既往の分離法では純度の高いオートファゴソームを得ること が可能だが、本論文の方法では純度はそこまで高くない。純度に関しては、既往研究と同様リ ソソームとの融合を阻害したり、分離分画に含まれるオートリソソームを破砕したりする等の 手段と組み合わせることで改善可能である。

125

# 5.5 結言

本章では水分散 PLL-SH 修飾 Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子を哺乳動物細胞ヘトラ ンスフェクションし、Ag コアの持つプラズモン散乱特性により細胞内でのナノ粒子の局在を CLSM で容易に追跡することが可能であることを示し、FeCo シェルの持つ磁性によりオート ファゴソーム (あるいは初期エンドソームやオートリソソーム)を温和かつ迅速に磁気分離す ることに成功した。トランスフェクションによって細胞内へ導入されたナノ粒子は、初期エン ドソーム→オートファゴソーム→オートリソソームへと移行していくことが CLSM、TEM 及 びWB の結果から明らかとなった。本論文ではゼノファジーにより形成されるオルガネラを磁 気分離したが、今後ハイブリッドナノ粒子の生体機能化をより洗練することによってリガンド 修飾ハイブリッドナノ粒子を創製し、クラスリン依存性およびクラスリン非依存性エンドサイ トーシス経路に関与する膜輸送小胞やオルガネラの磁気分離へと拡張することで、それらに局 在するタンパク質を同定するための革新的な技術の端緒となる重要な一歩を示すことができ たと考えている。

# 5.6 参考文献

- 1. Lakadamyali, M.; Rust, M. J.; Zhuang, X. Ligands for Clathrin-Mediated Endocytosis are Differentially Sorted into Distinct Populations of Early Endosomes. *Cell* **2006**, *124*, 997-1009
- 2. Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. Nature 2003, 422, 37-44
- Römer ,W.; Berland, L.; Chambon, V.; Gaus, K.; Windschiegl, B.; Tenza, D.; Aly, M. R. E.; Fraisier, V.; Florent, J.-C.; Perrais, D.; Lamaze, C.; Raposo, G.; Steinem, C.; Sens, P.; Bassereau, P.; Johannes, L. Shiga Toxin Induces Tubular Membrane Invaginations for Its Uptake into Cells. *Nature* 2007, 450, 670-675
- 4. Champion, J. A.; Mitragotri, S. Role of Target Geometry in Phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **2006**, *103*, 4930-4934
- Champion, J. A.; Walker, A.; Mitragotri, S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharm. Res.* 2008, 25, 1815-1821
- Doshi, N.; Mitragotri, S. Macrophages Recognize Size and Shape of Their Targets. *PLoS One* 2010, 5, e10051
- Meng, H.; Yang, S.; Li, Z.; Xia, T.; Chen, J.; Ji, Z.; Zhang, H.; Wang, X.; Lin, S.; Huang, C.; Zhou, Z. H.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Aspect Ratio Determines the Quantity of Mesoporous Silica Nanoparticle Uptake by a Small GTPase-Dependent Macropinocytosis Mechanism. *ACS Nano* 2011, 5, 4434-4447
- Cho, E. C.; Xie, J.; Wurm, P. A.; Xia, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I<sub>2</sub>/KI Etchant. *Nano Lett.* 2009, *9*, 1080-1084

- 9. Platre, M. P.; Jaillais, Y. Anionic Lipids and the Maintenance of Membrane Electrostatics in Eukaryotes. *Plant Signal. Behav.* **2017**, *12*, e1282022
- Jiang, Y.; Huo, S.; Mizuhara, T.; Das, R.; Lee, Y.-W.; Hou, S.; Moyano, D. F.; Duncan, B.; Liang, X.-J.; Rotello, V. M. The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles. ACS Nano 2015, 9, 9986-9993
- 11. Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662-668
- Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, *134*, 2139-2147
- Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* 2007, 7, 1542-1550
- 14. Sandhu, K. K.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Smith, S. W.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 3
- 15. Durán, M. C.; Willenbrock, S.; Barchanski, A.; Müller, J.-M. V.; Maiolini, A.; Soller, J. T.; Barcikowski, S.; Nolte, I. Feige, K.; Escobar, H. M. Comparison of Nanoparticle-Mediated Transfection Methods for DNA Expression Plasmids: Efficiency and Cytotoxicity. J. Nanobiotechnology **2011**, *9*, 47
- Kobayashi, S.; Kojidani, T.; Osakada, H.; Yamamoto, A.; Yoshimori, T.; Hiraoka, Y.; Haraguchi, T. Artificial Induction of Autophagy around Polystyrene Beads in Nonphagocytic Cells. *Autophagy* 2010, 6, 36-45
- Fujita, N.; Morita, E.; Itoh, T.; Tanaka, A.; Nakaoka, M.; Osada, Y.; Umemoto, T.; Saitoh T.; Nakatogawa, H.; Kobayashi, S.; Haraguchi, T.; Guan, J.-L.; Iwai, K.; Tokunaga, F.; Saito, K.; Ishibashi, K.; Akira, S.; Fukuda, M.; Noda, T.; Yoshimori, T. Recruitment of the Autophagic Machinery to Endosomes During Infection is Mediated by Ubiquitin. *J. Cell Biol.* 2013, 203, 115-128
- 18. Huang, S.; Deshmukh, H.; Rajagopalan, K. K.; Wang, S. Gold Nanoparticles Electroporation Enhanced Polyplex Delivery to Mammalian Cells. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 1837-1845
- 19. Zu, Y.; Huang, S.; Liao, W.-C.; Lu, Y.; Wang, S. Gold Nanoparticles Enhanced Electroporation for Mammalian Cell Transfection. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 982-992
- 20. Sun, C.; Cao, Z.; Wu, M.; Lu, C. Intracellular Tracking of Single Native Molecules with Electroporation-Delivered Quantum dots. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11403-11409
- Wang, Y.; Cui, H.; Li, K.; Sun, C.; Du, W.; Cui J.; Zhao, X.; Chen, W. A Magnetic Nanoparticle-Based Multiple-Gene Delivery System for Transfection of Porcine Kidney Cells. *PLoS One* 2014, 9, e102886
- 22. Li, J.; Zou, S.; Gao, J.; Liang, J.; Zhou, H.; Liang, L.; Wu, W. Block Copolymer Conjugated Au-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles as Vectors for Enhancing Colloidal Stability and Cellular Uptake. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 56
- Sapet, C.; Laurent, N.; de Chevigny, A.; Le Gourrierec, L.; Bertosio, E.; Zelphati, O.; Béclin, C. High Transfection Efficiency of Neural Stem Cells with Magnetofection. *BioTechniques* 2011, *50*, 187-189

- 24. Ondřej, V.; Lukášová, E.; Falk, M.; Kozubek, S. The Role of Actin and Microtubule Networks in Plasmid DNA Intracellular Trafficking. *Acta Biochim Pol.* **2007**, *54*, 657-663
- Cardarelli, F.; Digiacomo, L.; Marchini, C.; Amici, A.; Salomone, F.; Fiume, G.; Rossetta, A.; Gratton, E.; Pozzi, D.; Caracciolo, G. The Intracellular Trafficking Mechanism of Lipofectamine-Based Transfection Reagents and Its Implication for Gene Delivery. *Sci. Rep.* 2016, *6*, 25879
- 26. Shibutani, S. T.; Yoshimori, T. Autophagosome Formation in Response to Intracellular Bacterial Invasion. *Cell Microbiol.* **2014**, *16*, 1619-1626
- 27. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **2010**, *140*, 313-326
- 28. Mari, M.; Tooze, S. A.; Reggiori, F. The Puzzling Origin of the Autophagosomal Membrane. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 25
- 29. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosome Membranes after Processing. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5720-5728
- Fujita, N.; Hayashi-Nishino, M.; Fukumoto, H.; Omori, H.; Yamamoto, A.; Noda, T.; Yoshimori, T. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol. Biol. Cell* 2008, *19*, 4651-4659
- 31. Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of Autophagy in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2007, *7*, 961-967
- 32. Yang, Z. J.; Chee, C. E.; Huang, S.; Sinicrope, F. A. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer. Ther.* **2011**, *10*, 1533-1541
- 33. Kenific, C. M.; Debnath, J. Cellular and Metabolic Functions for Autophagy in Cancer Cells. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 37-45
- 34. Nah, J.; Yuan, J.; Jung, Y.-K. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: from Mechanism to Therapeutic Approach. *Mol. Cells* **2015**, *38*, 381-389
- 35. Frake, R. A.; Ricketts, T.; Menzies, F. M.; Rubinsztein, D. C. Autophagy and Neurodegeneration. J. Clin. Investig. 2015, 125, 65-74
- 36. Yuk, J.-M.; Yoshimori, T.; Jo, E.-K. Autophagy and Bacterial Infectious Diseases. *Exp. Mol. Med.* **2012**, *44*, 99-108
- 37. Escoll, P.; Rolando, M.; Buchrieser, C. Modulation of Host Autophagy During Bacterial Infection: Sabotaging Host Munitions for Pathogen Nutrition. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 81
- 38. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 107-132
- Nakagawa, I.; Amano, A.; Mizushima, N.; Yamamoto, A.; Yamaguchi, H.: Kamimoto, T.; Nara, A.; Funao, J.; Nakata, M.; Tsuda, K.; Hamada, S.; Yoshimori, T. Autophagy Defends Cells Against Invading Group A Streptococcus. *Science* 2004, *306*, 1037-1040
- 40. Miltenyi Biotech Website. http://www.miltenyibiotec.co.jp/ja-jp/products-and-services/macs-cell-separation/ instruments/automacs-pro-separator.aspx

- 41. Fiszer-Kierzkowska, A.; Vydra, N.; Wysocka-Wycisk, A.; Kronekova, Z.; Jarząb, M.; Lisowska, K. M.; Krawczyk, Z. Liposome-Based DNA Carriers May Induce Cellular Stress Response and Change Gene Expression Pattern in Transfected Cells. *BMC Mol. Biol.* **2011**, *12*, 27
- 42. Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541-555
- 43. Ma, X.; Wu, Y.; Jin, S.; Tian, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Yu, L.; Liang, X.-J. Gold Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Size-Dependent Nanoparticle Uptake and Lysosome Impairment. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8629–8639
- 44. Schütz, I.; Lopez-Hernandez, T.; Gao, Q.; Puchkov, D.; Jabs, S.; Nordmeyer, D.; Schmudde, M.; Rühl, E.; Graf, C. M.; Haucke, V. Lysosomal Dysfunction Caused by Cellular Accumulation of Silica Nanoparticles. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 14170-14184
- 45. Mishra, A. R.; Zheng, J.; Tang, X.; Goering, P. L. Silver Nanoparticle-Induced Autophagic-Lysosomal Disruption and NLRP3-Inflammasome Activation in HepG2 Cells Is Size-Dependent. *Toxicol. Sci.* **2016**, *150*, 473-487
- 46. Zhang, X.; Zhang, H.; Liang, X.; Zhang, J.; Tao, W.; Zhu, X.; Chang, D.; Zeng, X.; Liu, G.; Mei, L. Iron Oxide Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Multiple Mechanisms: Lysosome Impairment, Mitochondrial Damage, and ER Stress. *Mol. Pharm.* 2016, 13, 2578-2587
- 47. Berkenstam, A.; Ahlberg, J.; Glaumann, H. Isolation and Characterization of Autophagic Vacuoles from Rat Kidney Cortex. *Virchows Arch. B* **1983**, *44*, 275-286
- 48. Øverbye, A.; Brinchmann, M. F.; Seglen, P. O. Proteomic Analysis of Membrane-Associated Proteins from Rat Liver Autophagosomes. *Autophagy* **2007**, *3*, 300-322
- 49. Marzella, L.; Ahlberg, J.; Glaumann, H. Isolation of Autophagic Vacuoles from Rat Liver: Morphological and Biochemical Characterization. *J. Cell Biol.* **1982**, *93*, 144-154
- 50. Berg, T. O.; Strømhaug, P. E.; Berg, T.; Seglen, P. O. Separation of Lysosomes and Autophagosomes by Means of Glycyl-Phenylalanine-Naphthylamide, a Lysosome-Disrupting Cathepsin-C Substrate. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 595-602
- 51. Strømhaug, P. E.; Berg, T. O.; Fengsrud, M.; Seglen, P. O. Purification and Characterization of Autophagosomes from Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* **1998**, *335*, 217-224
- 52. Seglen, P.O.; Brinchmann, M. F. Purification of Autophagosomes from Rat Hepatocytes. *Autophagy* **2010**, *6*, 542-547
- 53. Uematsu, M.; Nishimura, T.; Sakamaki, Y.; Yamamoto, H.; Mizushima, N. Accumulation of Undegraded Autophagosomes by Expression of Dominant-Negative STX17 (Syntaxin17) Mutants. *Autophagy* **2017**, *13*, 1452-1464

# 第6章 総括

# 6.1 各章の研究成果とまとめ

本論文では最終目的である"磁性ープラズモンハイブリッドナノ粒子を用いて汎用的なオ ルガネラ磁気分離技術構築の可能性を示す"を達成するために、粒子合成からその構造・特性 評価、表面の配位子合成、粒子表面の機能化、オートファゴソームを磁気分離モデルとした細 胞実験など様々な分野にまたがり研究を行った。各章は分野が異なり一見独立しているように 見えるが、全ての研究がこの最終目的を達成するために有機的に連結している。各章で得られ た研究成果は本論文で扱う磁気分離の観点からだけでなく、その他の分野においても有益な知 見になり得ると考えている。本章では第1章から第5章までの研究内容のまとめと磁気分離の 観点からみた研究成果及びその他の分野への貢献のまとめを示す。

## <第1章>

<u>内容</u>: 本論文の背景として既存の磁性体粒子による細胞、タンパク質、オルガネラの磁気分離例を紹介した。そして既存の磁気分離プローブの多くは酸化鉄を母体としており、粒径が 50 nm より小さいプローブを作製することが困難であることを述べた。また、プローブの細胞内での局在を追跡するためには電子顕微鏡での観察が一般的であることを述べた。そこで、磁性体材料の中で最も高い飽和磁化を有する FeCo とプラズモニック材料の中で最も高い散乱断面積を有する Ag を複合化した粒径約 15 nm の Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型磁性ープラズモンハイブリッドナノ粒子を新たな磁気分離プローブとして提案した。

<第2章>

<u>内容</u>: 磁気分離プローブの作製において常に同じ品質のナノ粒子を合成することは重要であ る。そこで第2章ではAg@FeCo@Agハイブリッドナノ粒子の生成機構を解明した。その結果、 ハイブリッドナノ粒子の多層シェルは、単純な種媒介成長による形成ではなく、Ag ナノ粒子 のサイズフォーカシング、粒径に依存した還元触媒能の獲得、Ag 原子の表面偏析による最外 殻シェルの形成といった現象の結果、生成されることが明らかとなった。

<u>成果</u>: ハイブリッドナノ粒子の生成機構を解明したことで、粒子合成時の再現性の向上に成功した。一般的に2種類以上の材料を組み合わせたヘテロ構造ナノ粒子は単一材料から成るナノ粒子より合成が難しい。粒子の生成機構を、実験事実に基づき、既報の文献と照らし合わせ

て考察した結果、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子は様々な現象が重畳し自己組織的に形成されること が明らかとなった。この事実は非常に興味深く、第2章で得られた見識は Ag@FeCo@Ag ナノ 粒子に限らず、その他のヘテロ構造ナノ粒子の作製において実用的な知見となるであろう。

#### <第3章>

内容: ナノ粒子の磁気特性の評価は磁気分離を行う際に必須である。第3章では Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子の磁気的性質の変化を調査した。その結果、FeCo シェル の外側は合成後、Coo.5Feo.5O へ酸化していることが明らかとなった。飽和磁化は合成直後が最 も高く、時間経過とともに減衰することが確認された。また、強磁性体 FeCo と反強磁性体 Coo.5Feo.5O の界面で形成される交換バイアスを観測した。

<u>成果</u>: 粒子の酸化状態を明らかにした。ナノ粒子系における交換バイアスの研究は薄膜積層 系より難しいものの、第3章に示した粒子の厳密な構造解析結果と組み合わせることで交換バ イアス磁場を記述するのに相応しい構造パラメーター(FM と AFM の体積比)を本論文で初 めて見出した。また、交換バイアスを利用することで粒子表面の酸化膜の厚さを推定する方法 を提案した。更に、粒子表面の酸化に伴う交換バイアス磁場の時間変化を追跡することで、界 面積の減少に起因した交換バイアス磁場の振動現象を実験系で初めて観測した。本成果は、ナ ノ粒子の精密構造解析と物性解析を体系的に行ったことによって初めて得られたものであり、 そのような報告は既往の文献にはほとんど無いのが現状である。従って、ナノ粒子系の交換バ イアスの研究者にとっても新たな視点を与え得るものと期待される。

#### <第4章>

<u>内容</u>: 合成直後のハイブリッドナノ粒子は水に分散しないため、第4章では細胞実験に向け た水分散 Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子の作製を行った。具体的には2種類のpH に対 する電荷応答が異なるポリマーを合成し、粒子表面の配位子交換を行うことで水分散ナノ粒子 を作製した。また水分散ナノ粒子のコロイド分散安定性を評価した。更に、磁気分離の際に特 定のオルガネラを標的とすることを考慮し、粒子表面ヘビオチン-アビジン相互作用を利用し た粒子表面へのタンパク質修飾を試みた。

<u>成果</u>: 水中での電荷応答の異なる2種類の水分散ナノ粒子を作製することに成功した。粒子 表面ヘビオチン標識された任意のリガンドを修飾することが可能となり、オルガネラ特異的タ ンパク質に対する抗体などを修飾することで、粒子の様々なオルガネラへのターゲティングに おいて有望となった。

131

### <第5章>

<u>内容</u>: 実際に水分散 Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソームの磁 気分離を検証した。粒子はトランスフェクション試薬と混合することで巨大な複合体を形成し、 細胞内へ導入されると、ゼノファジーによりオートファゴソーム内に内包される。オートファ ゴソームは最終的にリソソームと融合し、粒子はオートリソソームへと移行される。このナノ 粒子の細胞内での局在変化をプラズモン散乱を用いたイメージングにより観察した。また各段 階のオルガネラ(初期エンドソーム、オートファゴソーム、オートリソソーム)を自動磁気細 胞分離装置により磁気分離した。

<u>成果</u>: 粒子の細胞内での局在を追跡することに成功した。また、オートファゴソームの磁気 分離に成功した。以上の結果より、Ag@FeCo@Ag ハイブリッドナノ粒子はイメージング能と 磁気分離能を併有しているため、オートファゴソームに限らず、その他のオルガネラの磁気分 離プローブとして汎用性・利便性・拡張性が高いことを実証した。既存の方法では分離に長時 間、過酷な環境を要したオルガネラでも、磁性ープラズモンハイブリッドナノ粒子による磁気 分離で、脂質や膜タンパク質などの解析が容易となり、細胞生物学における基礎研究をはじめ、 臨床研究、創薬などの分野において多大な貢献をもたらすだろうと期待できる。



# 図 6-1 本論文の章構成。

# 6.2 今後の展望

本研究でのオートファゴソームの分離ではトランスフェクション試薬を用いるため、先行 研究<sup>[1,2]</sup>で報告されているように数 µm のサイズの樹脂ビーズでもオートファゴソームに内包 することができる。従って、粒子のサイズは大きな問題とはならなかった。一次粒子のサイズ が小さい Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の利点を生かしたオルガネラの磁気分離を目指し、第4章に 示した方法に従い、トランスフェリン (Transferrin: Tfn)を粒子に修飾し、クラスリン依存性エ ンドサイトーシスを介した細胞への導入実験を行った。Tfn は鉄イオンを細胞内へ運搬する役 割を担い、細胞膜上の受容体 (TfnR) で認識されるとクラスリン依存性エンドサイトーシスに より取り込まれ、細胞内ではクラスリン被覆小胞 (サイズ約 120 nm<sup>[3]</sup>)、初期エンドソーム、 リサイクリングエンドソームへと輸送され<sup>[4]</sup>、最終的に細胞外へ放出される(図 6-2)。



#### 図 6-2 Tfn の細胞内での移行過程。鉄イオンは弱酸性の初期エンドソーム内で解離する。

Tfn を修飾した粒子を細胞へ導入することで、各々の段階のオルガネラを磁気分離することが可能だと考えられる。実際に Tfn 修飾ナノ粒子と BSA 修飾ナノ粒子をコントロールとして COS-1 細胞へ導入し、30 分培養した後の共焦点顕微鏡像を取得した。COS-1 細胞ではリサイクリングエンドソームはリング状のゴルジ体の中心に局在することが知られており<sup>[5]</sup>、本実験では初期エンドソームまたはゴルジ体を染色した。実験方法については付録に記載した。図 6-3 に得られた共焦点顕微鏡画像を示す。Tfn 修飾ナノ粒子では一部、初期エンドソームやリング状のゴルジ体の中心に位置する粒子を観察できたものの、BSA 修飾ナノ粒子と比較して著しい違いは観察されなかった。これは、Tfn 修飾ナノ粒子の流体力学的粒径が約 173 nm (第4 章参照)と大きかったため、TfnR により認識されたとしても細胞内へ効率的に取り込まれな かった可能性が考えられる。今後、円滑にクラスリン被覆小胞へのナノ粒子導入を行うために は、配位子交換後の粒子のコロイド分散安定性を高めること及び、タンパク質修飾後の流体力 学的粒径を小さくすること(<120 nm)が必要となる。また、本研究のような短い培養時間(< 2時間)でも磁気分離可能なオートファゴソームでは特に問題にはならないが、培養時間を延 ばすと Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の毒性が顕著になることから、長期培養が求められる場合を考 慮した細胞毒性が低いプローブの作製も求められるであろう。

磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子によるイメージングと磁気分離が実現可能で、オ ルガネラの精製において有効な手段と成り得ることが本研究において実証されたいま、様々な 種類の小さなオルガネラを分離するために、材料科学の立場から今後追求できることは、高い 磁気安定性、高いコロイド分散安定性及び、低い細胞毒性を有し、なおかつ任意のリガンド修 飾が可能な多機能磁性プローブの創製である(図 6-4)。多機能磁性プローブを用いてオルガネ ラを単離し、それらのオルガネラに存在するタンパク質、脂質及び糖鎖などを解析する技術は、 細胞生物学や病理学、創薬の分野へと応用を拡げることができるであろう。



図 6-3 粒子を導入してから 30 分後の (a,b) BSA 修飾ナノ粒子と (c,d) Tfn 修飾ナノ粒子の COS-1 細胞での局在。青は DAPI、赤は初期エンドソームマーカーの VPS26 (a,c) またはゴルジ体マーカーの GM130 (b,d)、緑は粒子の散乱を示す。





図 6-4 本研究における磁性プローブと今後求められる磁性プローブの特徴。

# 6.3 参考文献

- Kobayashi, S.; Kojidani, T.; Osakada, H.; Yamamoto, A.; Yoshimori, T.; Hiraoka, Y.; Haraguchi, T. Artificial Induction of Autophagy around Polystyrene Beads in Nonphagocytic Cells. *Autophagy* 2010, 6, 36-45
- Fujita, N.; Morita, E.; Itoh, T.; Tanaka, A.; Nakaoka, M.; Osada, Y.; Umemoto, T.; Saitoh T.; Nakatogawa, H.; Kobayashi, S.; Haraguchi, T.; Guan, J.-L.; Iwai, K.; Tokunaga, F.; Saito, K.; Ishibashi, K.; Akira, S.; Fukuda, M.; Noda, T.; Yoshimori, T. Recruitment of the Autophagic Machinery to Endosomes During Infection is Mediated by Ubiquitin. *J. Cell Biol.* 2013, 203, 115-128
- 3. Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. Nature 2003, 422, 37-44
- 4. Mayle, K. M.; Le, A. M.; Kamei, D. T. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 264-281
- 5. Misaki, R.; Nakagawa, T.; Fukuda, M.; Taniguchi, N.; Taguchi, T. Spatial Segregation of Degradation- and Recycling-Trafficking Pathways in COS-1 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, *360*, 580-585

付録

# A.1 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子における磁気光学効果

磁気光学効果とは磁場存在下で電磁波を物体に照射したときに、その透過光や反射光の偏 光状態が変化する現象であり、透過光の偏光状態が変化する場合をファラデー効果、反射光の 偏光状態が変化する場合を磁気光学カー効果という。磁性体材料とプラズモニック材料を複合 化した場合、プラズモン共鳴により磁気光学効果が増強することが知られている。例えば、 Fe/Cu 薄膜積層系ではカー回転角が Cu のプラズモン共鳴により 560 nm 付近で増強されること が報告されている<sup>[1]</sup>。磁性材料とプラズモニック材料でコア@シェル型ナノ粒子を作製した場 合も同様に、プラズモン共鳴により磁気光学効果が増強することが報告されている。例えば、 Wang らは Co と Ag の組成を変更しながら粒径約 20 nm の Co@Ag ナノ粒子を作製した<sup>[2]</sup>。磁 場存在下で粒子を懸濁した油に偏光を照射し、その透過光を解析したところ、ファラデー回転 角が粒子由来の LSPR バンドの範囲内で増強されることが明らかとなった。この効果は Agの 組成比が高くなるにつれ顕著に表れた<sup>[2]</sup>。同様に、Fe@Ag ナノ粒子<sup>[3]</sup>や γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au ナノ粒子 <sup>[4]</sup>においても LSPR バンドにおいてファラデー効果の増強が報告されている。これらの粒子は 有機系と比べると酸化雰囲気である水系で合成されており、また、シェル側をプラズモニック 材料が構成している。これに対し、本論文の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子は有機系で合成され、プ ラズモニック材料のAgはコアに位置するため、磁気光学効果の顕著な増強が期待できる。そ こで、本研究では、スペインのナノサイエンス共同研究センター(CIC nanoGUNE)の Alberto López-Ortega 博士と Paolo Vavassori 教授との共同研究により Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の磁気光 学効果を調査した。

#### A.1.1 粒子の合成

本研究では Ag@FeCo@Ag ナノ粒子と FeCo ナノ粒子を合成した。Ag@FeCo@Ag ナノ粒 子の合成方法は本章の 2.2.2 に記載した通りである。ここでは FeCo ナノ粒子の合成方法を示 す。まず 0.5 mmol の Fe(acac)<sub>3</sub> と Co(acac)<sub>2</sub>をフラスコへ仕込み、続いて 1.0 mmol の 1,2-ヘキサ デカンジオール、10 mmol の OLA、8 mmol の OA、8 mL の TEG をフラスコへ加え、室温で 5 分間 Ar バブリングを行った。その後 100 ℃ で 10 分間攪拌した後、290 ℃ で 40 分間反応させ た。反応後、反応溶液を捨て、ナノ粒子が磁気的に吸着した攪拌子をガラス皿にのせ、30 mL のトルエンを加えた。ガラス皿の下からネオジウム磁石を近づけ、プラスチック製のピンセッ

136

トで撹拌子のみ取り除き、得られた粒子を遠沈管に回収し、4000 rpm で3分間の遠心分離を行った。その後、上澄みを捨て、粒子を真空乾燥機で乾燥させた。

#### A.1.2 粒子の構造解析結果と特性評価

図 A-1a に FeCo ナノ粒子の TEM 像を示す。粒径は 19 ± 5 nm であった。図 A-1b には Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(上段)と FeCo ナノ粒子(下段)の XRD パターンを示した。これら の結果から、酸化相を顕著に含まない FeCo ナノ粒子の合成に成功したことが示唆された。FeCo ナノ粒子の組成は Fe : Co = 49 : 51 であり、飽和磁化は約 100 emu/g であった。次に、 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子または FeCo ナノ粒子をパイレックスガラス基板に約 1  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>の密度 で塗布し、400~1000 nm の波長範囲の透過率を調べた。図 A-1c に示すように、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では 500 nm 付近に LSPR 由来のバンドが観察されたのに対し、FeCo ナノ粒子では波 長が短くなるにつれ透過率が減少した。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の LSPR ピークが、溶液に分 散している状態よりもレッドシフトした理由として、基板上での粒子間距離が短くなることで、 プラズモンカップリングが生じたためである。



**図 A-1** (a) FeCo ナノ粒子の TEM 像。(b) Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(上段)と FeCo ナノ粒子(下段)の XRD パターン。リファレンスはそれぞれ PDF No. 00-049-1567 (*bcc* Co<sub>50</sub>Fe<sub>50</sub>)、01-087-0717 (*fcc* Ag)。 (c) Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(赤)及び FeCo ナノ粒子(黒)の透過スペクトル。挿入図はパイレックスガ ラス基板に塗布した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の写真。

### A.1.3 磁気光学効果

磁気光学効果を調べる為に、粒子を塗布したガラス基板へ偏光を照射し、その透過光を分析した。このとき磁場を基板表面に対して垂直に印加した。ファラデー回転角( $\theta_F$ )とファラデー楕円率( $\epsilon_F$ )を 400~800 nm の波長範囲で測定した結果を図 A-2a に示す。 $\theta_F$ は FeCo ナノ粒子の場合、0.5 mrad と全波長領域で一定であるのに対し、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では 500

nm で 2.6 mrad と約5倍高い値が検出された。一方、 $\epsilon_F$ に関しては FeCo ナノ粒子では、長波長 になるに従い徐々に増加し、800 nm のときに 0.3 mrad と最大値を示したのに対し、 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子では 650 nm で約 2 mrad のピークを示した。 $\theta_F$ と $\epsilon_F$ はクラマース・ク ローニヒの関係があり、複素ファラデー回転角  $\Theta_F = \theta_F + \epsilon_F i$ の実数部と虚数部は互いに独立で はない。図 A-2a から分かるように、 $\theta_F$ (または $\epsilon_F$ )がゼロに近づくと、 $\epsilon_F$ (または $\theta_F$ )が最大 値を示し、クラマース・クローニヒの関係と一致していることが分かる。複素ファラデー回転 角の絶対値 $|\Theta_F|$ をとることで、磁気光学活性(Magneto-Optical Activity: MOA)を調べた結果を 図 A-2b に示す。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子からのみ MOA のピークが 500 nm に観測され、FeCo ナノ粒子の約5倍の MOA を示すことが明らかとなった。また、磁気光学効果の増強が LSPR に由来していることを確かめるために、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子をトルエン中に分散させ、そ の透過スペクトルと $\theta_F$ を測定したところ、図 A-3に示すように、LSPR バンドは 50 nm ほどブ ルーシフトし、同様に $\theta_F$ もブルーシフトしたことから、磁気光学効果は確かに LSPR により増 強されていることが示された。本研究では、化学合成法によりプラズモニック材料の Ag の周 囲を磁性体 FeCo で均一に被覆することで、磁気光学効果を顕著に増強することに成功した。



**図 A-2** Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(赤)とFeCo ナノ粒子(黒)の(a) ファラデー回転角(上段)とファラデ 一楕円率(下段)及び(b) MOA と透過率。



**図 A-3** 基板に塗布した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子(赤)とトルエンに分散させた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子 (緑)の(a) 透過スペクトル及び(b) ファラデー回転角。

## 参考文献

- 1. Katayama, T.; Suzuki, Y.; Awano, H.; Nishihara, Y.; Koshizuka, N. Enhancement of the Magneto-Optical Kerr Rotation in Fe/Cu Bilayered Films. *Phys. Rev. Lett.* **1988**, *60*, 1426
- Wang, L.; Clavero, C.; Huba, Z.; Carroll, K. J.; Carpenter, E. E.; Gu, D.; Lukaszew, R. A. Plasmonics and Enhanced Magneto-Optics in Core-Shell Co-Ag Nanoparticles. *Nano Lett.* 2011, 11, 1237-1240
- Wang, L.; Yang, K.; Clavero, C.; Nelson, A. J.; Carroll, K. J.; Carpenter, E. E.; Lukaszew, R. A. Localized Surface Plasmon Resonance Enhanced Magneto-Optical Activity in Core-Shell Fe– Ag Nanoparticles. J. Appl. Phys. 2010, 107, 09B303
- Jain, P. K.; Xiao, Y.; Walsworth, R.; Cohen, A. E. Surface Plasmon Resonance Enhanced Magneto-Optics (SuPREMO): Faraday Rotation Enhancement in Gold-Coated Iron Oxide Nanocrystals. *Nano Lett.* 2009, 9, 1644–1650

# A.2 異種金属原子間での電子移動について

合金を形成することで、構成元素の電子構造がどのように変化するかは固体物理や材料科 学において長年に亘るメインテーマの一つである。中でも Au 合金における電子移動について は、エックス線吸収端近傍構造(X-ray Absorption Near Edge Structure: XANES)、X線光電子分 光法(XPS)、<sup>197</sup>Au メスバウアー分光法などを用いて以前から精力的に研究されている。XANES では、Au(電子配置は[Xe] 4f<sup>14</sup> 5d<sup>10</sup> 6s<sup>1</sup>)の L<sub>2</sub>及び L<sub>3</sub>吸収端は 2p から 5d 軌道への電子遷移に 由来しているので、L2及びL3吸収端の吸光度から5d軌道のホールの数を知ることが出来る。 XPS では、結合エネルギー(主に Au 4f 軌道)のケミカルシフトから Au の電子密度に関する 情報が得られる。メスバウアー分光では、Au の s 軌道の電子密度に関する情報が得られる。 例えば、Au が合金内で希釈されるに従って、あるいは Au と合金を形成する相手の元素との電 気陰性度の差が大きくなるに従って、Au メスバウアースペクトルにおけるアイソマーシフト が増大することが報告されている<sup>[1-4]</sup>。この結果は、合金化によって Au の s 軌道の電子密度が 増加していることを示唆している。一方、Au4f結合エネルギーは、Auが合金内で希釈される に従って、あるいは Au と合金を形成する相手の元素との電気陰性度の差が大きくなるに従っ て増加することも知られている<sup>(4)</sup>。これは Au サイトにおいて電子が枯渇していることを意味 している。この2つの矛盾した結果を説明する為に様々なモデルが提唱された。例えば Watson らは、合金化によって Au 伝導帯 s 軌道に電気陰性度に従って相手の元素から電子が加えられ ると、電気的中性を維持するために電子が Au の d 軌道から相手の元素へ移動するという電荷 再分配モデルを提唱した<sup>[5]</sup>。Bzowski らは Au $M_2$  (*M* = Al、Ga、In、Sn、Sb または Te) におけ る Au L<sub>2.3</sub>端の XANES を解析することで、Au と M の電気陰性度の差が大きくなるに従い Au のd軌道のホール密度が増加することを明らかにし、電荷再分配モデルの確からしさを実証し た<sup>[6]</sup>。但し、正味の電荷は電気陰性度に従って相手の元素から Au へ移動すると考えられてい る<sup>[4,7]</sup>。電荷再分配は Au 以外の合金においても報告されており、例えば Pd-Ag 合金でも正味の 電荷移動量は電気陰性度に従うと報告されている<sup>[8]</sup>。一方 Levin と Ehrenreich は、Au<sub>x</sub>Ag<sub>1-x</sub>合金 の光吸収実験結果とコヒーレントポテンシャル近似によるバンド計算から、Au-Ag 合金では Au から Ag へ正味 0.3e の電子移動が起こっていると報告した<sup>[9]</sup>。

上述の議論はバルク合金におけるものであるが、金属表面に吸着した異種原子の電子状態 は、バルクの電子状態と大きく異なることが知られている。例えば、Pt(111)や Rh (100)上に形 成された Cu の 1 原子層を XPS で測定した結果、Cu 2p の結合エネルギーがバルクの Cu と比 較して低エネルギー側へシフトすることが報告されている<sup>[10,11]</sup>。各々の元素の電気陰性度は χcu = 1.90、χPt=2.20、χRh=2.28 である<sup>[12]</sup>。また、Pd 原子層を Mo (110)上に積層した表面の Pd 3d<sub>5/2</sub> の XPS スペクトルを解析したところ、バルクの Pd と比べポジティブシフトしていることが明 らかとなった<sup>[13]</sup>。Pd と Mo との電気陰性度はそれぞれ χPd = 2.20、χMo = 2.16 である<sup>[12]</sup>。これら の結果は、バルクの電気陰性度から予想される結果とは正反対であり、この原因について

140

Rodriguez らは、表面原子の電気陰性度はバルクでの電気陰性度と大きく異なるためであると 結論づけた<sup>[13]</sup>。そこで Weightman らは、Cu<sub>x</sub>Pd<sub>1-x</sub>合金の表面における正味の電荷移動を調べた ところ、電気陰性度に反して Pd から Cu へ正味の電子が移動していることを見出した(図 A-4)<sup>[14]</sup>。また、Sykes らは、走査トンネル分光法を用いて、Cu{111}上の Pd 原子は 0.01*e* 電子を 失っており、Pd から Cu へ正味の電子移動が起こっていることを報告した<sup>[15]</sup>。以上のような先 行研究から、金属 A の表面に異種の金属 B がへテロ接合された場合、厚さ数原子層分の B 原 子の電子構造や化学的性質はバルクとは大きく異なることが示唆された<sup>[13-16]</sup>。



図 A-4 Cu<sub>x</sub>Pd<sub>1-x</sub>合金における Cu 及び Pd サイトでの正味の電荷の変化量。

金属表面に存在する異種金属原子の電子構造や化学的性質がバルクと大きく異なること を考慮すると、異種金属元素の界面を有するコア@シェル型ナノ粒子でも同様の効果を示すと 考えられる。以下にコアとシェルの界面での電子移動に起因してシェルの化学安定性が向上し たと考えられる事例を紹介する。Ag ナノ粒子は酸素と塩素イオンの存在下で容易に溶出する ことが知られているが、Au@Ag コア@シェル型ナノ粒子を作製すると、塩素イオンを含む電 解質溶液での化学安定性が向上することが報告されている<sup>[17]</sup>。Au@Ag ナノ粒子を XANES と XPS で測定したところ、Au@Ag ナノ粒子では Au ナノ粒子と比較して Au 5d 軌道のホール密 度が増加し、4f 軌道の結合エネルギーはバルクの Au と比べポジティブシフトすることが確認 された<sup>[18]</sup>。また同時に、Ag 3d 軌道の結合エネルギーはバルクの Ag と比べネガティブシフト することも確認された<sup>[19]</sup>。但し電子移動の効果が現れるのはコア表面から数原子層のシェル原 子であるということもわかっている<sup>[19]</sup>。以上のことから、より電気陰性度の高い元素をコアと した場合、結果としてシェルの化学安定性を増すことが可能となると考えられるが、表面・界 面における電子移動のメカニズムに関しては(特にナノ粒子系において)未知な部分が多く残 されており、今後益々研究が進むことが期待される。

## 参考文献

- 1. Barrett, P. H.; Grant, R. W.; Kaplan, M.; Keller, D. A.; Shirley, D. A. Electron Transfer in Dilute Gold Alloys. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 1035
- Roberts, L. D.; Becker, R. L.; Obenshain, F. E.; Thomson, J. O. Correlation of the Mössbauer Isomer Shift and the Residual Electrical Resistivity for <sup>197</sup>Au Alloys. *Phys. Rev.* 1965, *137*, A895
- 3. Huray, P. G.; Roberts, L. D.; Thomson, J. O. Study of the Cu-Au and Ag-Au Alloy Systems as a Function of Composition and Order through the Use of the Mössbauer Effect for <sup>197</sup>Au. *Phys. Rev. B* **1971**, *4*, 2147-2161
- 4. Sham, T. K.; Perlman, M. L.; Watson, R. E. Electronic Behavior in Alloys: Gold Non-Transition-Metal Intermetallics. *Phys. Rev. B* 1979, *19*, 539-545
- 5. Watson, R. E.; Hudis, J.; Perlman, M. L. Charge Flow and *d* Compensation in Gold Alloys. *Phys. Rev. B* **1971**, *4*, 4139-4144
- 6. Bzowski, A.; Yiu, Y. M.; Sham, T. K. Charge Redistribution in Au-Metalloid Intermetallics: A Au *L*<sub>2,3</sub>-Edge X-Ray-Absorption Study. *Phys. Rev. B* **1995**, *51*, 9515-9520
- 7. Lee, Y.-S.; Jeon, Y.; Chung, Y.-D.; Lim, K.-Y.; Whang, C.-N.; Oh, S.-J. Charge Redistribution and Electronic Behavior in Pd-Au Alloys. *J. Korean Phys. Soc.* **2000**, *37*, 451-455
- 8. Coulthard, I.; Sham, T. K. Charge Redistribution in Pd-Ag Alloys from a Local Perspective. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 4824-4827
- 9. Levin, K.; Ehrenreich, H. Model Hamiltonian Description of Ag-Au Alloys in the Coherent-Potential Approximation. *Phys. Rev. B* **1971**, *3*, 4172-4188
- 10. Shek, M. L.; Stefan, P. M.; Lindau, I.; Spicer, W. E. Photoemission Study of the Adsorption of Cu on Pt(111). *Phys. Rev. B* **1983**, *27*, 7277-7287
- 11. Rodriguez, J. A.; Campbell, R. A.; Goodman, D. W. Interaction of Ultrathin Films of Copper with Rhodium(100) and Ruthenium(0001): An XPS Study. J. Phys. Chem. **1991**, 95, 2477-2483
- 12. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92nd Edition*; Haynes, W. M. Ed.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2011
- Rodriguez, J. A.; Campbell, R. A.; Goodman, D. W. Electron Donor-Electron Acceptor Interactions in Bimetallic Surfaces: Theory and XPS Studies. J. Phys. Chem. 1991, 95, 5716-5719
- 14. Cole, R. J.; Brooks, N. J.; Weightman, P.; Francis, S. M.; Bowker, M. The Physical and Electronic Structure of the Cu<sub>85</sub>Pd<sub>15</sub>(110) Surface; Clues from the Study of Bulk Cu<sub>x</sub>Pd<sub>1-x</sub> Alloys.
Surf. Rev. Lett. 1996, 3, 1763-1772

- 15. Tierney, H. L.; Baber, A. E.; Sykes E. C. H. Atomic-Scale Imaging and Electronic Structure Determination of Catalytic Sites on Pd/Cu Near Surface Alloys. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7246-7250
- 16. Rodriguez, J. A.; Campbell, R. A.; Goodman, D. W. The Nature of Metal-Metal Bonding at Bimetallic Interfaces, *Surf. Sci.* **1994**, *307-309*, 377-383
- Shankar, C.; Dao, A. T. N.; Singh, P.; Higashimine, K.; Mott, D. M.; Maenosono, S. Chemical Stabilization of Gold Coated by Silver Core-Shell Nanoparticles via Electron Transfer. *Nanotechnology* 2012, 23, 245704
- 18. Nishimura, S.; Dao, A. T. N.; Mott, D.; Ebitani, K.; Maenosono, S. X-ray Absorption Near-Edge Structure and X-ray Photoelectron Spectroscopy Studies of Interfacial Charge Transfer in Gold-Silver-Gold Double-Shell Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 4511-4516
- 19. Maenosono, S.; Lee, J. D.; Dao, A. T. N.; Mott, D. Peak Shape Analysis of Ag 3d Core-Level X-ray Photoelectron Spectra of Au@Ag Core-Shell Nanoparticles using an Asymmetric Gaussian-Lorentzian Mixed Function. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44*, 1611-1614

## A.3 粒子の核生成と核成長について

#### A.3.1 LaMer 機構

粒子の核生成と核成長はLaMer機構に基づき、反応溶液内中の粒子を構成するモノマー濃度と時間の関係で記述することが出来る。図A-5にLaMerダイアグラムを示した。ステージIではモノマーの濃度は反応溶液中で増加する過程であり、この段階では核は生成されない。ステージIIでモノマー濃度が飽和溶解度を超えて過飽和状態となり、核生成臨界濃度(C\*min)を超えると核生成が引き起こされる。モノマー濃度はしばらく増加した後、核生成による消費の為、減少する。ステージIIではモノマー濃度が再びC\*minに達すると核生成は終了し、モノマー濃度が飽和溶解度に近づくまで核成長が進行する。もし、核生成速度が十分に大きくないとき、モノマー濃度CはC\*maxとC\*minの間にとどまり、この段階では粒子成長も起こるため、粒径分布がシャープで単分散な粒子は得にくい。これに対し、核生成速度が速い場合、ステージIIを瞬時に通過することができ、ここでの粒子成長の効果は顕著でなくなる。もし単分散な粒子を得たい場合、ステージIIを迅速に分けることが必要となる。



図 A-5<sup>[1]</sup> LaMerダイアグラム。Csは飽和溶解度、C\*minは核生成に必要な最低モノマー濃度、C\*maxは 核生成における最大モノマー濃度を表す。ステージⅠは核生成前をステージⅡは核生成期を、ステー ジⅢは核成長期を示す。

#### A.3.2 拡散律速による核成長<sup>[1]</sup>

粒子の成長は過飽和状態にあるモノマーが粒子表面へ拡散し、表面で反応することで成長 する。粒子成長速度を定式化するために、核成長している粒子の界面近傍でのモノマー濃度を 考える。図 A-6a には半径 r の球状粒子の模式図を示す。周囲の拡散層の厚みが δ で、粒子中 央から拡散層内の同心円までの距離が x である。図 A-6b には拡散層での濃度変化を示した。 粒子表面 (x=r) におけるモノマー濃度を C<sub>i</sub>で、バルクでのモノマー濃度を C<sub>b</sub>で示している。 C<sub>e</sub> は粒子からモノマーが溶出するときの流速と粒子に取り込まれるモノマーの流速が等しい ときの粒子界面における濃度で、このとき、固液平衡が成立し、粒子の成長速度はゼロとなる。 粒子近傍のモノマー濃度は時間が経過するにつれ、粒子が成長し、青色で示した過程を辿り、 最終的に C<sub>i</sub> = C<sub>b</sub> となり、このとき粒子の成長は止まる。

拡散層中での粒子からの距離 x における球状表面を通過するモノマーの全流速はフィックの法則で表される。

$$J = 4\pi x^2 D \frac{dC}{dx}$$
(A-1)

Dは拡散係数、Cは粒子からの距離xにおけるモノマーの濃度を表す。粒子に取り込まれるモノマーの拡散が定常状態であるとき、Jはxによらず定数となる。従って、式(A-1)を $r+\delta$ からrまでxに対して積分すると、次式が得られる。

$$J = \frac{4\pi Dr(r+\delta)}{\delta} (C_{\rm b} - C_{\rm i}) \tag{A-2}$$

また、モノマーの粒子表面での取り込み反応を単純な一次反応と仮定し、*k*を速度定数とする と、粒子表面において取り込まれるモノマーの流速は次式で記述される。

$$J = 4\pi r^2 k (C_{\rm i} - C_{\rm e}) \tag{A-3}$$

式(A-2)と(A-3)から、式(A-4)を得る。

$$\frac{C_{\rm i} - C_{\rm e}}{C_{\rm b} - C_{\rm i}} = \frac{D}{kr} \left( 1 + \frac{r}{\delta} \right) \tag{A-4}$$



図 A-6 (a) 球状粒子周囲の拡散層。(b) 粒子近傍のモノマーの濃度プロファイル。

一般的にナノ粒子の成長機構には2つの律速段階が存在する。拡散律速による成長と表面 での反応律速による成長である。粒子成長が拡散律速により制御されているとき D << kr とな り、 $C_i$ は $C_e$ に近づく。式(A-2)の $C_i$ に $C_e$ を代入すると次式を得る。

$$J = \frac{4\pi Dr(r+\delta)}{\delta} (C_{\rm b} - C_{\rm e}) \tag{A-5}$$

粒子に取り込まれるモノマーの流速は、Vmを固体のモル体積とすると粒子の線成長速度を用いて式(A-6)で表される。

$$J = \frac{4\pi r^2}{V_{\rm m}} \frac{dr}{dt}$$
(A-6)

式(A-5)と(A-6)より、

$$\frac{dr}{dt} = DV_{\rm m} \left(\frac{1}{r} + \frac{1}{\delta}\right) \left(C_{\rm b} - C_{\rm e}\right) \tag{A-7}$$

を得る。一方、粒子表面での反応が粒子成長を制御する場合 *D* >> kr となり、*C*<sub>i</sub> は *C*<sub>b</sub> に近づく。式(A-3)の *C*<sub>i</sub> に *C*<sub>b</sub> を代入し式(A-6)に代入することで、次式が得られる。

$$\frac{dr}{dt} = kV_{\rm m}(C_{\rm b} - C_{\rm e}) \tag{A-8}$$

上式から、表面での反応が律速の場合には粒子成長は粒径に依存しないことがわかる。

ところで、式(A-7)の C<sub>e</sub>は厳密には粒子の粒径に依存する。それは粒径が小さくなると表面の効果に伴い融点が降下する為である。この現象はギブスートムソン効果と呼ばれ、次式で表される。

$$C_{\rm e} = C_{\infty} \exp\left(\frac{2\sigma V_{\rm m}}{rRT}\right) \tag{A-9}$$

 $C_{\infty}$ は無限平面に対する平衡溶質濃度、 $\sigma$ は表面自由エネルギーを表す。ここで、 $2\sigma V_{m}/rRT << 1$ のとき、 $C_{e}$ は式(A-10)、また  $C_{b}$ は式(A-11)で記述される。

$$C_{\rm e} \cong C_{\infty} \left( 1 + \frac{2\sigma V_{\rm m}}{rRT} \right) \tag{A-10}$$

$$C_{\rm b} \cong C_{\infty} \left( 1 + \frac{2\sigma V_{\rm m}}{r^* RT} \right) \tag{A-11}$$

拡散層が無限大と仮定すると、典型的な拡散律速における粒子成長速度は、式(A-7)に式(A-10) 及び (A-11)を代入することで得られ、

$$\frac{dr}{dt} = \frac{K_{\rm D}}{r} \left( \frac{1}{r^*} - \frac{1}{r} \right) \tag{A-12}$$

$$K_{\rm D} = \frac{2\sigma D V_{\rm m}^2 C_{\infty}}{RT} \tag{A-13}$$

と表される。式(A-12)が本論文の式(2-5)である。

## 参考文献

 Sugimoto, T. Preparation of Monodispersed Colloidal Particles. Adv. Colloid Interface Sci. 1987, 28, 65-108

# A.4 磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の例

これまでに様々な種類の磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子が報告されている。ナノ 粒子の構造には異種ナノ粒子同士が接合したダルマのようなヘテロ構造、一つの粒子の両端が 違う相をもつヤヌス型構造、卵型のコア@シェル型構造、コアの周りに小さな粒子が多数修飾 されたコアーサテライト構造などが存在する。磁性体材料としては、酸化鉄、FePt、Coなどが 多く利用される。一方、プラズモニック材料では Au や Ag などが利用される。磁性体材料と プラズモニック材料を組み合わせる際に、多くの場合は相分離することから、合金ナノ粒子よ りもヘテロ構造ナノ粒子の方が合成は容易である。また合金ナノ粒子では互いの特性が半減し てしまうが、ヘテロ構造は互いの特性を維持することが可能であることから様々な応用におい て有望である。図 A-7 にいくつかの磁性 - プラズモンハイブリッドナノ粒子の TEM 像や STEM-HAADF 像を示した。Ag@FeCo@Ag ナノ粒子を除いた、FeCo と Ag を複合化したナノ 粒子に関しては Sachan らによりパルスレーザーディウェッティング法による FeCo (但し Fe の含有量は 8 atom%) と Ag を組み合わせた FeCo-Ag ハイブリッドナノ粒子の作製が報告されている<sup>[1]</sup>。



**図 A-7**(a)酸化鉄@金コアシェル型ナノ粒子<sup>[2]</sup>。(b)ダンベル型 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子<sup>[3]</sup>。(c) Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ粒子<sup>[4]</sup>。(d) FePt-Au ヘテロ構造ナノ粒子<sup>[5]</sup>。(e) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C-Ag ハイブリッドナノ粒子<sup>[6]</sup>。(f) Ag-Co ヘ テロ構造ナノ粒子<sup>[1]</sup>。

## 参考文献

- 1. Sachan, R.; Malasi, A.; Ge, J.; Yadavali, S.; Krishna, H.; Gangopadhyay, A.; Garcia, H.; Duscher, G.; Kalyanaraman, R. Ferroplasmons: Intense Localized Surface Plasmons in Metal-Ferromagnetic Nanoparticles. *ACS Nano* **2014**, *8*, 9790-9798
- Cho, S. J.; Idrobo, J. C.; Olamit, J.; Liu, K.; Browning, N. D.; Kauzlarich, S. M. Growth Mechanisms and Oxidation Resistance of Gold-Coated Iron Nanoparticles. *Chem. Mater.* 2005, 17, 3181-3186
- 3. Yu, H.; Chen, M.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; White, R. L.; Sun, S. Dumbbell-Like Bifuntional Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 379-382
- 4. Mezni, A.; Balti, I.; Mlayah, A.; Jouini, N.; Smiri, L. S. Hybrid Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Plasmonic, Surface Enhanced Raman Scattering, and Phase Transition Properties. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 16166-16174
- 5. Choi, J. S.; Jun, Y.-W.; Yeon, S.-I.; Kim, H. C.; Shin, J.-S.; Cheon, J. Biocompatible Heterostructured Nanoparticles for Multimodal Biological Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15982-15983
- Wang, H.; Shen, J.; Li, Y.; Wei, Z.; Cao, G.; Gai, Z.; Hong, K.; Banerjee, P.; Zhou, S. Porous Carbon Protected Magnetite and Silver Hybrid Nanoparticles: Morphological Control, Recyclable Catalysts, and Multicolor Cell Imaging. ACS Appl. Mater. Interfaces 2013, 5, 9446-9453

# A.5 前駆体の仕込順を変更した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成

#### A.5.1 実験方法

Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成において Ag、Fe、Co の前駆体を反応溶液に仕込む順番を 変えて合成した。ただし、250℃ での Ag の前駆体溶液の注入、洗浄過程は第2章の2.2.2 に示 した方法に従った。以下に前駆体の順番を変えた3種類の合成法を記載した。

#### I. Ag、Fe、Co 全ての前駆体を 170 ℃ で注入する方法

三口フラスコへ 1.0 mmol の 1,2-ヘキサデカンジオール、10 mmol の OLA、8 mmol のオレ イン酸を加え、更に 10 mL の TEG を加えた。その後の工程は 2.2.2 で述べた Ag@FeCo@Ag ナ ノ粒子の合成法と同じである。反応温度が 170 ℃ に到達した際、0.1 mmol の AgNO<sub>3</sub>、0.2 mmol の Co(acac)<sub>2</sub>、0.2 mmol の Fe(acac)<sub>3</sub>、2mL の OLA 及び 1 mL のトルエンを含む溶液を注入した。 それ以外の過程は 250 ℃ での Ag の前駆体溶液の注入や洗浄過程も含めて全て同じである。

#### II. Ag、Fe、Co全ての前駆体を最初からフラスコへ仕込む方法

三口フラスコへ 0.1 mmol の AgNO<sub>3</sub>、0.2 mmol の Co(acac)<sub>2</sub>、0.2 mmol の Fe(acac)<sub>3</sub>、1.0 mmol の 1,2-ヘキサデカンジオール、10 mmol の OLA、8 mmol のオレイン酸を加え、更に 10 mL の TEG を加えた。その後の工程は 2.2.2 で述べた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成法と同じである。 ただし、温度プロファイルを 2.2.2 に示した合成法と同じにするために、反応温度が 170 ℃ に 到達した際、2mL の OLA 及び 1 mL のトルエンを含む溶液を注入した。それ以外の過程は 250 ℃ での Ag の前駆体溶液の注入や洗浄過程も含めて同じである。

#### III. Co 前駆体をフラスコへ仕込み Fe 及び Ag の前駆体を 170 ℃ で注入する方法

三口フラスコへ 0.2 mmol の Co(acac)<sub>2</sub>、1.0 mmol の 1,2-ヘキサデカンジオール、10 mmol の OLA、8 mmol のオレイン酸を加え、更に 10 mL の TEG を加えた。その後の工程は 2.2.2 で述 べた Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成法と同じである。反応温度が 170 ℃ に到達した際、0.1 mmol の AgNO<sub>3</sub>、0.2 mmol の Fe(acac)<sub>3</sub>、2mL の OLA 及び 1 mL のトルエンを含む溶液を注入した。 それ以外の過程は 250 ℃ での Ag の前駆体溶液の注入や洗浄過程も含めて同じである。

#### A.5.2 結果

図 A-8 にそれぞれの方法で合成された Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の TEM、STEM-HAADF、 EDS 元素マッピング像を示した。図 A-9 はそれぞれの合成法から得られた Ag@FeCo@Ag ナノ 粒子の XRD パターンを示した。比較のために本文の図 2-4 に示した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子 (Agの前駆体をフラスコに仕込み Fe と Co を 170 ℃ で注入する合成法)の XRD パターンも 一番上に示した。上から二段目は方法 I、三段目は方法 II、最下段は方法 III により合成された ナノ粒子の XRD パターンを示した。XRD パターンはどれも同じ形状で全てのナノ粒子におい てほぼ等しい結晶性を持っていることが確認された。これらの結果から、Ag@FeCo@Ag ナノ 粒子の合成は前駆体を仕込む順番を変えても同様のダブルシェル型構造と結晶性をもつナノ 粒子が得られることが確認された。



**図 A-8** 前駆体の仕込順を変えて合成した Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の TEM (a-c)、STEM-HAADF (df)、EDS 元素マッピング像 (g-r)。(g-i) Ag L 端、(j-l) Co K 端、(m-o) Fe K 端、(p-r) マージ画像。(左 列)方法 I、(中央)方法 II、及び(右列)方法 III で合成したナノ粒子。



図 A-9 Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の XRD パターン。上段は Ag を先に仕込み Fe と Co を 170 °C で注入する方法(図 2-14 参照)、二段目は方法 I、三段目は方法 II、最下段は方法 III により合成したナノ 粒子の XRD パターン。

## A.6 Ag ナノ粒子のみの場合の粒径集束とオストワルド熟成について

#### A.6.1 実験方法

2.2.2 記載の Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成方法に基づき、Fe 及び Co 前駆体の非存在下 250 ℃ で Ag 前駆体を注入した場合、及び注入しなかった場合の二通りの方法で Ag ナノ粒子 を合成した。洗浄過程は 2.2.2 に記載した方法と同様である。

## A.6.2 結果

図 A-10 に得られた Ag ナノ粒子の TEM 像を示す。Ag 前駆体を 250 ℃ で注入した場合、 Ag の均一核生成により多量の小さな Ag ナノ粒子が観察された(図 A-10a)。このような小さ な粒子は Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合成では観察されなかった。この違いは Ag ナノ粒子の合 成では Fe や Co の前駆体や錯体が反応溶液中に存在しないため、Ag@FeCo@Ag ナノ粒子の合 成で得られる Ag コアとは粒子の核生成や核成長過程が異なることを反映していると考えられ る。一方、Ag 前駆体を注入せずに合成した Ag ナノ粒子は粒径が著しく不均一であり、なかに は粒子同士が焼結し 100 nm を超す粒子も観察された(図 A-10b)。2 種類の Ag ナノ粒子の粒 径解析を行ったところ、Ag 前駆体を注入した場合ヒストグラムは二峰性分布を示した(図 A-11)。二峰性分布の内、粒径が小さいほうのピークを対数正規分布関数、粒径が大きいほうの ピークを正規分布関数でフィッティングしたところ、粒径が大きいほうのピークに含まれる Agナノ粒子の平均粒径は8.1±3.3 nmであった。なお、粒径が小さいほうのピークは、Ag前 駆体を注入したため均一核発生によって新たに生成したAgナノ粒子である。これに対し、Ag 前駆体を注入しなかった場合はヒストグラムの裾野は広く、粒径は13.2±9.7 nmであった。標 準偏差はAg前駆体を注入した場合の粒径が大きいほうのピークに含まれるAgナノ粒子では 41%、Ag前駆体を注入しなかった場合は73%であり、Ag前駆体を注入することでオストワル ド熟成による粒径の不均一化が抑制されることが示された。



図 A-10 Ag 前駆体を 250 °C で(a) 注入した場合と(b) 注入しなかった場合に得られた Ag ナノ粒 子の TEM 像。



図 A-11 粒子の総数を 1000 として規格化した粒径ヒストグラム。Ag 前駆体を 250 ℃ で注入した場合 (赤) としなかった場合 (黒)。



図 A-12<sup>[1]</sup> Ag-Coの相図。



図 A-13<sup>[2]</sup> Fe-Agの相図。



図 A-14<sup>[3]</sup> Co-Feの相図。

## 参考文献

- Karakaya, I.; Thompson, W. T. The Ag-Co (Silver-Cobalt) System. *Bull. Alloy Phase Diagrams* 1986, 7, 259-263
- 2. Swartzendruber, L. J. The Ag-Fe (Silver-Iron) System. Bull. Alloy Phase Diagrams 1984, 5, 560-564
- 3. Okamoto, H. Co-Fe (Cobalt-Iron). J. Phase Equilib. Diffus. 2008, 29, 383-384

# A.8 磁気カラムと充填剤

図 A-15 に本研究で用いた Miltenyi Biotec の autoMACS カラム及びカラム内部の磁性充填 剤の写真とその走査型電子顕微鏡像を示す。充填剤は直径約 0.5 mm の球状粒子であり、互い にポリマーで架橋されていると考えられる。



図 A-15 (a) 磁気カラムの写真。カラムの全長は 6.4 cm で充填剤が占める長さは 4 cm。(b) 充填剤の写真。(c) 充填剤の拡大写真。(d) 充填剤の走査型電子顕微鏡像。

A.9 Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>Oの磁化曲線



図 A-16 Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>0.5</sub>O ナノ粒子の 300K での磁化曲線。

## A.10 エンドサイトーシスによる COS-1 細胞への Tfn-NPs の導入法

BSA 修飾ナノ粒子と Tfn 修飾ナノ粒子は本章の 4.4.2 及び 4.4.3 の方法に従い作製した。 COS-1 細胞は 24 ウェルプレートへ、ウェル当たり 2 万個の細胞を 0.5 mL の FBS を含む DMEM に懸濁させ播種した。ウェルにはあらかじめポリリジン(P4832、Sigma-Aldrich)で被覆したガ ラスカバースリップを入れた。細胞を播種したプレートを一晩 37 ℃ で培養した。翌日、培地 を吸い取り、PBS で一度洗い、FBS フリーの培地を 0.5 mL 加え、30 分間培養した。その後、 BSA 修飾ナノ粒子または Tfn 修飾ナノ粒子を最終濃度が 100µg/mL となるようにウェルに添加 し、37 ℃ で 30 分間培養した。その後、本章の 5.2.4 に記載した細胞免疫染色の方法に従い、 共焦点顕微鏡観察用の試料を作製した。一次抗体には、初期エンドソームの染色にはヤギ抗 VPS26 抗体、ゴルジ体の染色にはマウス抗 GM130 抗体(BD Transduction Laboratories, 150 倍希 釈)、CLSM で観察時の光路設定は図 5-6a に従った。結果は第6章に示した。

## A.11 15%ポリアクリルアミドゲルの作製方法

分離ゲルの作製方法を説明する。5.0 mL の超純水にペルオキソ二硫酸アンモニウム (Ammonium Peroxodisulpahate: APS)を薬さじ小いっぱい(約50 mg)ほど添加して溶解する。 これを、10.0 mL の 30 % (w/v)アクリルアミド/ビス溶液、5.0 mL の 1.5 M の Tris-HCI 溶液 (pH=8.8)、200 μL の 10 % SDS 水溶液、16 μL の N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine: TEMED)を含む溶液へ混合し、即座にゲルの型となる ガラス板の間に、気泡が入らないように流し込む。ゲルの上層が少し固まってきたら、ゲルが 乾燥しないように超純水を静かに流し込み、約30分間放置した。濃縮ゲルは 6.0 mL の超純水、 800 μL の 30 % (w/v)アクリルアミド/ビス溶液、0.93 mL の 1.0 M Tris-HCI 溶液 (pH=6.8)、 75 μL の 10% SDS 水溶液、6 μL の TEMED、約 20 mg の APS で調整した。分離ゲル作製後に 上層の水を捨て、濃縮ゲルを分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ。約2時間放置し た後、ガラスに挟まったゲルを乾燥しないように湿らせたラップで包み、使用するまで冷蔵庫 に保存した。ゲルは作成後3日以内に実験で使用した。

156

## A.12 バッファーの調製方法

## <u>MES バッファー(pH = 5)</u>

① 0.1 M MES (2-モルホリノエタンスルホン酸)水溶液

② 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液

①に②を混合しpH=5にする。

#### <u>グリシンバッファー(pH = 9)</u>

0.1 M グリシン水溶液

② 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液

50 mLの①に 8.8 mLの②を混合し、最終容積を 100 mL に合わせる。

#### 1.5 M トリス-塩酸バッファー(Tris-HCl、pH 8.8)300 mL

トリス(ヒドロキシル)アミノメタン(Tris base) 0.45 mol を超純水 280 mL に溶解。塩酸を加 え pH = 8.8 にした後、水を足し 300 mL とする。

#### <u>1.0 M トリス-塩酸バッファー(Tris-HCl、pH 6.8)300 mL</u>

Tris base 0.3 mol を純水 280 mL に溶解。塩酸を加え pH = 6.8 とし、水を足し 300 mL とする。

#### <u>10×泳動バッファー</u>

① Tris base	: 30.30 g	(最終濃度:250 mM)
② グリシン	: 144 g	(最終濃度:1.92 M)
③ SDS	: 10 g	(1%)

①~③を超純水に溶解し最終容積を1Lにする。電気泳動で使用する際は10倍希釈した泳動バ ッファーを利用する。

#### 転写バッファーのストック溶液(100 mM CAPS 溶液、pH = 11)1000 mL

CAPS (N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid) 22.132 g を 800 mL の超純水に溶解する。2.0 M水酸化ナトリウム水溶液を加え pH = 11 にする。その後、最終容積を 1000 mL へ合わせる。

#### 転写バッファー

① 100 mM CAPS 溶液(pH =11)	: 100 mL	(最終濃度:10 mM)
② メタノール	: 100 mL	(最終濃度:10%)

①と②を混合し超純水で最終容積を 1000 mL に合わせる。

157

#### <u>トリス緩衝生理食塩水(Tris Buffered Saline: TBS)</u>

10×TBS (バイオ・ラッド)を超純水で 10 倍希釈する。最終的に pH=7.5 の 20 mM Tris base、 500 mM 塩化ナトリウム水溶液になる。

#### <u>Tween20を含む TBS(TBST バッファー)</u>

- ① TBS : 1000 mL
- ② Tween20 : 500 μL

①と②を混合する。

#### <u>5% スキムミルク in TBST</u>

(1)	スキムミルク	(森永)	: 1.5 g

② TBST バッファー : 30 mL

②に①を混合する。

#### <u>10% SDS 水溶液</u>

10gの SDS を超純水に溶解し最終容積を 100 mL に合わせる。

#### <u>20% BSA 超純水</u>

50 mL の遠沈管に 10gの BSA と 40 mL の超純水を加え、冷蔵庫で一晩静置する。時々遠沈管 を転倒させた。翌日、超純水を足して最終容積を 50 mL にする。その後 0.20 µm のポアサイズ のフィルター(ミニザルト、ザルトリウス)でろ過した。

## A.13 プロテアーゼインヒビターの組成

プロテアーゼインヒビターは PBS 1 mL に対し、*N*,*N*-ジメチルホルムアミドに溶解した 0.1 M PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)を 1  $\mu$ L (1000 倍希釈)、プロテアーゼインヒビターカ クテルを 5  $\mu$ L (200 倍希釈)加えて調整した。プロテアーゼインヒビターカクテルの組成は DMSO に溶解した 0.1 mg/mL ロイペプチンへミ硫酸塩一水和物、0.14 mg/mL ペプスタチンA、 14 mg/mL *N-p*-Tosyl-*L*-phenylalanine Chloromethyl Ketone、15 mg/mL  $N_{\alpha}$ -p-Tosyl-*L*-arginine Methyl Ester Hydrochloride、0.4 mg/mL アプロチニン、32 mg/mL ベンズアミジンである。

## A.14 Ag 染色の方法

#### 固定液

① エタノール	: 50 mL	(最終濃度:25%)
② 酢酸	: 10 mL	(最終濃度:15%)

調整方法:①と②と超純水を混合し最終容積を200mLに合わせる。

#### <u>増感液</u>

調整方法: チオ硫酸ナトリウム 40 mg (最終濃度: 0.02%) を超純水に溶解し最終容積を 200 mL に合わせる。

#### <u>銀染色液</u>

調整方法:硝酸銀 100 mg を超純水に溶解し最終容積を 100 mL に合わせる。

#### <u>現像液</u>

① 30% ホルムアルデヒド	: 120 µL	(最終濃度:0.036%)
② 炭酸ナトリウム	: 2 g	(最終濃度:2%)

調整方法:①と②と超純水を混合し最終容積を 100 mL に合わせる。

#### <u>停止液</u>

酢酸 : 2 mL

Ag 染色は SDS-PAGE 後に下記の手順で行った。

- 1. 電気泳動後、ゲルを固定液で1時間振とう。
- 2. 超純水で 10 分間 2 回の洗浄。
- 3. ゲルを増感液に浸し1分間振とう。
- 4. 超純水で1分間2回の洗浄。
- 5. ゲルを銀染色液に浸し30分間室温で振とう。
- 6. 超純水で 30 秒の洗浄。
- 7. 現像液に浸す。このとき、洗浄を開始してから1分以内に現像液に浸すようにする。
- 8. バンドが適当な濃さになるまで振とうした後、現像液 100 mL に対して停止液 2 mL 加え て反応を停止する。
- 9. 超純水で5分間3回の洗浄。ゲルの写真撮影。

# 研究業績

## 原著論文(筆頭著者として)

- "Ag/FeCo/Ag Core/shell/shell Magnetic Nanoparticles with Plasmonic Imaging Capability", <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, A. Nakade, K. Higashimine, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, *Langmuir* (2015) 31, 2228-2236
- (2) "Formation Mechanism of Magnetic-Plasmonic Ag@FeCo@Ag Core-Shell-Shell Nanoparticles: Fact is More Interesting than Fiction", <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, *CrystEngComm* (2015) 17, 6923-6929
- (3) "Exchange Bias in Ag/FeCo/Ag Core/Shell/Shell Nanoparticles due to Partial Oxidation of FeCo Intermediate Shell", <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, *J. Magn. Magn. Mater.* (2016) 401, 339-344
- (4) "Transition of Exchange Bias from the Linear to Oscillatory Regime with the Progression of Surface Oxidation of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles", <u>M.</u> <u>Takahashi</u>, P. Mohan, K. Higashimine, D. Mott, and S. Maenosono, *J. Appl. Phys.* (2016) 120, 134301
- (5) "Magnetic Separation of Autophagosomes from Mammalian Cells using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanobeads", <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Mukai, Y. Takeda, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, H. Arai, T. Taguchi, and S. Maenosono, *ACS Omega* (2017) 2, 4929-4937

#### 原著論文(共著者として)

- "AuFePt Ternary Homogeneous Alloy Nanoparticles with Magnetic and Plasmonic Properties", P. Mohan, <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, D. Mott, and S. Maenosono, *Langmuir* (2017) 33, 1687-1694
- (2) "A Study of the Properties of Core/Shell/Shell Ag/FeCo/Ag Nanoparticles", A. S. Kamzin, <u>M. Takahashi</u>, S. Maenosono, and A. A. Valiullin, *Phys. Solid State* (2017) 59, 1999-2005
- (3) "Sustainable Thermoelectric Materials Fabricated by Using Cu<sub>2</sub>Sn<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>S<sub>3</sub> Nanoparticles as Building Blocks", W. Zhou, C. Shijimaya, <u>M. Takahashi</u>, M. Miyata, D. Mott, M. Koyano, M. Ohta, T. Akatsuka, H. Ono, and S. Maenosono, *Appl. Phys. Lett.* (2017) 111, 263105
- (4) "Colloidal Synthesis of Hybrid Magneto-Plasmonic Nanocrystals: an Improved Route for the Preparation of High-Performance Magneto-Optical Enhanced Materials", A. López-Ortega, M. Takahashi, S. Maenosono, and P. Vavassori, submitted.

#### 著書

(1) "Magnetic Nanoparticles for Organelle Separation", <u>M. Takahashi</u> and S. Maenosono,

*Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles*, Edited by Nguyen T. K. Thanh, Chapter 12, CRC Press/Taylor and Francis (2018), In press

(2) "Synthesis and Characterization of Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticles", <u>M.</u> <u>Takahashi</u>, R. Kitaura, P. Mohan and S. Maenosono, *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*, Edited by Raluca M. Fratila and Jesús M. de la Fuente, Elsevier (2018), In press

## 特許

"金属複合体粒子及びその製造方法",前之園 信也,高橋 麻里,特願 2015-31559

## 外部資金

日本学術振興会 H27 年度特別研究員に採用(DC1、面接免除)

## 受賞

- (1) IUMRS-ICA 2014の Award for Encouragement of Research (研究奨励賞)
- (2) IWAMSN2014 のベストポスター賞
- (3) EMRS 2016 Spring MeetingのYoung Scientist Award (研究奨励賞)
- (4) IUMRS-ICAM 2017の Award for Encouragement of Research (研究奨励賞)
  Symposium A-4 (Magnetic oxide thin films and hetero-structures)
- (5) IUMRS-ICAM 2017の Award for Encouragement of Research (研究奨励賞) Symposium B-7 (Nano-biotechnology on interfaces)

## 国際学会発表

#### (筆頭著者としての発表)

- (1) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Mukai, Y. Takeda, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Imaging and Isolation of Autophagosomes using Magnetic-Plasmonic Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Hybrid Nanoparticles", *The 15<sup>th</sup> International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017)*, 27 Aug. -1 Sep. 2017, Kyoto, Japan (口頭発表)
- (2) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. M. Mott, S. Maenosono, "Transition from Linear to Oscillatory Behavior of Exchange Bias Revealed with Progression of Surface Oxidation of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles", *The 15<sup>th</sup> International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017)*, 27 Aug. -1 Sep. 2017, Kyoto, Japan (口頭発表)
- (3) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Mukai, Y. Takeda, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Imaging and Isolation of Autophagosomes using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanobeads", *The 8<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy (The 8th ISA)*, 29 May -1 Jun. 2017, Nara Kasugano International Forum IRAKA, Nara, Japan
- (4) <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Formation Mechanism of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles: Fact is More Interesting than Fiction" *The 2016 MRS Fall Meeting*, 27 Nov. -2 Dec. 2016, Boston, USA

- (5) <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Formation Mechanism of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles", *The 2<sup>nd</sup> International Conference on Polyol Mediated Synthesis (IC-PMS 2016)*, 11-13 Jul. 2016, Hikone, Japan (口頭発表)
- (6) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoprobes for Isolation of Intracellular Membrane Vesicles", *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France (口頭発表)
- (7) <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Formation Mechanism of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoprobes Designed for Biomedical Separation/Imaging Applications", *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France (口頭発表)
- (8) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Exchange Bias in Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Hybrid Bioprobes Due to Partial Oxidation of FeCo Intermediate Shell", *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France
- (9) <u>M. Takahashi</u>, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Formation Mechanism of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles", *The International Chemical Congress* of Pacific Basin Societies 2015, 15-20 Dec. 2015, Honolulu, USA (口頭発表)
- (10) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic-Plasmonic Hybrid Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoprobes for Isolation of Intracellular Membrane Vesicles", *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015*, 15–20 Dec. 2015, Honolulu, USA
- (11) <u>M. Takahashi</u>, R. Rastogi, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Investigation of the Effect of Polyol Amount on FeCo@Ag Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticle Synthesis", *The 2014 MRS Fall Meeting*, 30 Nov. -5 Dec. 2014, Boston, USA
- (12) <u>M. Takahashi</u>, R. Rastogi, S. Terasaka, P. Mohan, Y. Takeda, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic-Plasmonic Ag@FeCo@Ag Double-Shell Nanoparticles as Novel Bioprobes", *The 7<sup>th</sup> International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (IWAMSN 2014)*, 2-6 Nov. 2014, Halong City, Vietnam
- (13) <u>M. Takahashi</u>, R. Rastogi, A. Nakade, D. Mott, K. Matsumura, T. Hamada, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic Core-Plasmonic Shell Dual Functional Nanoparticles as a Novel Cellular Probe for Bioapplications", *The 15<sup>th</sup> IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014)*, 24-30 Aug. 2014, Fukuoka, Japan (口頭発表)
- (14) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, A. Nakade, T. Hamada, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic-Plasmonic Heterostructured Nanoparticles as a Novel Cellular Probe for Bioapplications", *UK Colloids 2014*, 6-9 Jul. 2014, London, UK
- (15) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, A. Nakade, T. Hamada, S. Maenosono, "Magnetic Core-Plasmonic Shell Dual Functional Nanoparticles as a Novel Cellular Probe for Bioapplications", *E-MRS 2014 Spring Meeting*, 26-30 May 2014, Lille, France
- (16) <u>M. Takahashi</u>, P. Singh, D. Mott, K. Matsumura, S. Maenosono, "Magnetic FePt Core -Plasmonic Shell Dual Functional Nanoparticles as a Cellular Probe", *The 2013 MRS*

Fall Meeting, 1-6 Dec. 2013, Boston, USA

#### 国内学会発表

#### (筆頭著者としての発表)

- (1) <u>M. Takahashi</u>, Y. Wang, K. Mukai, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, T. Taguchi, H. Arai, S. Maenosono, "Establishment of Versatile Magnetic Separation of Organelles using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticles" 日本化学会第 98 春季年会, 20-23 Mar. 2018, 日本大学理工学部, 船橋, 千葉(英語口頭発表)
- (2) <u>高橋 麻里</u>、P. Mohan、D. Mott、前之園 信也、"Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子 における交換バイアス"応用物理学会第 65 回春季講演会、17-20 Mar. 2018、早稲田大学、 新宿、東京
- (3) 高橋 麻里、P. Mohan、向井 康治朗、 武田 裕一、 松本 多圭夫、 松村 和明、 高倉 正博、 新井 洋由、 田口 友彦、 前之園 信也、 "磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を用いた オートファゴソームの磁気分離"、第39回日本バイオマテリアル学会大会、20-21 Nov. 2017、 タワーホール船堀、東京(口頭発表)
- (4) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Mukai, Y. Takeda, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Isolation of Autophagosomes Using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticles", 日本化学会第 97 春季年会、16-19 Mar. 2017、慶應義塾大学日吉キ ャンパス、神奈川(英語口頭発表)
- (5) 高橋 麻里、P. Mohan、向井 康治朗、武田 裕一、松本 多圭夫、松村 和明、高倉 正博、田 ロ 友彦、前之園 信也、"磁性ープラズモンハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソー ムの単離"、日本化学会第 97 春季年会、16-19 Mar. 2017、慶應義塾大学日吉キャンパス、神 奈川
- (6) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Higashimine, D. Mott, S. Maenosono, "Transition from Linear to Oscillatory Behavior of Exchange Bias Revealed with Progression of Surface Oxidation of Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoparticles", 第 67 回コロイドおよび界面 化学討論会, 22-24 Sep. 2016, 北海道教育大学旭川校, 北海道(英語口頭発表)
- (7) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, S. Maenosono, "Magnetic-Plasmonic Hybrid Ag@FeCo@Ag Core@Shell@Shell Nanoprobes for Isolation of Intracellular Membrane Vesicles", 日本化学会第 96 春季 年会、24-27 Mar. 2016、同志社大学、京都
- (8) <u>M. Takahashi</u>, P. Mohan, D. Mott, S. Maenosono, "Exchange Bias in Ag/FeCo/Ag Core/Shell/Shell Nanoparticles due to Partial Oxidation of FeCo Intermediate Shell", 日本化学会第 96 春季年会、24-27 Mar. 2016、同志社大学、京都(英語口頭発表)
- (9) <u>高橋 麻里</u>、東嶺孝一、P. Mohan、D. Mott、前之園 信也, "単分散 Ag@FeCo@Ag ダブルシェル 型ナノ粒子の生成機構~サイズフォーカシングと表面偏析による自発的層構造形成~"、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、10-12 Sep. 2015、鹿児島大学、鹿児島
- (10) <u>高橋 麻里</u>、P. Mohan、中出 暁子、D. Mott、松村 和明、濱田 勉、前之園 信也、"磁気分離 とプラズモンイメージングの機能を有した Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子"、日本化学 会第 95 春季年会、26-29 Mar. 2015、日本大学理工学部、千葉(口頭発表)
- (11) 高橋 麻里、R. Rastogi、寺坂 慎平、P. Mohan、武田 裕一、中出 暁子、D. Mott、濱田 勉、

松村 和明、田口 友彦、前之園 信也、"細胞内小胞の磁気分離に向けた磁性-プラズモンヘテ ロ構造ナノ粒子の合成及び特性評価"、第36回日本バイオマテリアル学会大会、17-18 Nov. 2014、タワーホール船堀、東京(**口頭発表**)

- (12) 高橋 麻里、R. Rastogi、寺坂 慎平、P. Mohan、中出 暁子、D. Mott、濱田 勉、松村 和明、 田口 友彦、前之園 信也、「細胞小胞のイメージングと単離を目的とした磁性ープラズモンハ イブリッドナノ粒子の合成と特性評価「、第65回コロイドおよび界面化学討論会、3-5 Sep. 2014、東京理科大学、東京(口頭発表)
- (13) <u>高橋 麻里</u>、P. Mohan、D. Mott、松村 和明、中出 暁子、濱田 勉、前之園 信也、<sup>7</sup>糖修飾磁 性-プラズモンハイブリッドナノ粒子<sup>7</sup>、日本化学会第 94 春季年会、27-30 Mar. 2014、名古 屋大学、名古屋(口頭発表)
- (14) <u>高橋 麻里</u>、P. Mohan、D. Mott、松村 和明、中出 暁子、濱田 勉、前之園 信也、"ラクトー ス修飾された磁性-プラズモンデュアル機能ナノ粒子の合成とバイオイメージング応用"、第 二回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会、16 Dec. 2013、富山大学、富山(口頭 発表)
- (15) <u>高橋 麻里</u>、P. Singh、T. T. T. Nguyen、D. Mott、松村 和明、前之園 信也、"次世代バイ オプローブとしての磁性-プラズモンコアシェル型ナノ粒子の合成と評価"、平成 25 年度北 陸地区講演会と研究発表会、22 Nov. 2013、石川ハイテクセンター、石川
- (16) <u>高橋 麻里</u>、P. Singh、T. T. T. Nguyen、D. Mott、松村 和明、前之園 信也、"次世代バイ オプローブとしての磁性-プラズモンデュアル機能ナノ粒子の合成と評価"、第 64 回コロイ ドおよび界面化学討論会、18-20 Sep. 2013、名古屋工業大学、名古屋

# 謝辞

本研究は多分野にわたる多くの皆様に支えられ、また分析装置の豊富な本学だからこそ行 うことができた研究だと思います。本研究に関わってくださりました学生、研究員、技術職員、 先生方の皆様に心から深く深く感謝申し上げます。

はじめに、こんなにエキサイティングな研究課題を修士から博士までの5年間を通して与 えてくださりました指導教員の前之園 信也先生と、「小胞を分離するための良い磁気ビーズは ないか」と、そのきっかけを作ってくださりました、東京大学の田口 友彦先生に心より感謝 申し上げます。入学当初は分野を変えたこともあり基礎が抜けている私に、前之園先生は「と にかく歯を食いしばってやれ」と何度も叱咤激励してくださりました。凡庸な一学生である私 が、何とか一人前の研究者として旅立てるのも、先生の熱いご指導の賜物と存じます。先生か ら学んだ研究に対する姿勢・方針・解析・考察は私の将来の研究活動に活かされると信じてお ります。田口先生からは細胞実験に関する方法や解釈について何度も電話やメールを通して、 議論させて頂きました。細胞実験に関しては素人な私でしたが、田口先生の丁寧で的確なご助 言のおかげで路頭に迷うことなく、前進することが出来ました。また、東京大学の向井 康治 朗先生にも実験方法において何度もご助言頂きましたことを心より御礼申し上げます。

また、金沢大学の磁気分離装置を利用するにあたり、高倉 正博先生(現・金沢医科大学) と松本 多圭夫氏には大変にお世話になりました。ほぼ自由に装置を使用させて頂き、実験を スムースに進めることができました。また、中島 由香里さんには金沢大学で細胞を、私に代 わり継代して頂きました。皆様に深く御礼申し上げます。

本学での細胞実験は、松村 和明先生のお力添えなしには達成することができませんでし た。松村先生の研究室で細胞を培養させて頂き、ポリマーや毒性評価など様々な実験に関する ご助言を頂きました。河本 慶子さんには細胞実験や継代において何度も助けて頂きました。 また、松村研究室へ頻繁に足を運ぶたびに、松村研究室の学生の皆様とも研究の話をしたり、 励まし合ったりと、支えられました。松村先生を初め、松村研究室の皆様に心より御礼申し上 げます。

平塚 祐一先生からは粒子へのタンパク質修飾において貴重なご助言を頂いたり、様々な 試薬を使わせて頂いたりしました。平塚研究室へも度々通わせて頂き、超遠心分離機を初め、 蛍光顕微鏡、ときには暗視野顕微鏡やエレクトロポレーションを自由に利用させて頂きました。 平塚先生に深く御礼申し上げます。また、辰巳 千晴さんからは電気泳動やウェスタンブロッ ティングの方法をご教授頂きました。誠にありがとうございました。 化学発光検出やマルチプレートリーダーによる蛍光検出は藤本研究室の装置を利用させ て頂きました。装置の使用を許可してくださりました藤本 健造先生と、使用方法をご教授く ださりました中村 重孝先生に心より感謝申し上げます。

電子顕微鏡の技術職員の東嶺 孝一氏には何度も STEM 観察をして頂き、綺麗な画像を取得して頂きました。また、技術職員の村上 達也氏には XPS 装置の問題において何度も助けて 頂きました。誠にありがとうございました。

その他にも University College London の Nguyen T. K. Thanh 先生や滋賀県立大学のバラチ ャンドラン ジャヤデワン先生、福島県立医科大学の和栗 聡先生には学会先で私の研究に関し て議論や激励をして頂きました。心より感謝申し上げます。また、本研究課題によって私を特 別研究員 (DC1) として採用して頂き、経済的に支援して頂いた日本学術振興会には感謝して おります。

国際学会における発表や論文執筆では前之園研究室の Derrick Mott 先生に頻繁に英語を添 削して頂きました。誠にありがとうございました。また、四十万谷 智子さんをはじめ、卒業生 を含めた前之園研究室の皆様【Nguyen T. Mai さん、Md. Shahiduzzaman 氏、小平 哲氏、下瀬 弘幸氏、堀田 大輔氏、Sandhya Verma さん、Aparna Wadhwa さん、Dao T. Ngoc Anh さん、Rishika Rastogi さん、Dipali Ahuja さん、Kanika Gupta さん、Ian Godfrey 氏、Aziliz Hervault さん、Setia Budi 氏、Priyank Mohan 氏、Maninder Singh 氏、Simone Famiani 氏、周 薇さん、北浦 諒一氏、 初鹿野 雅仁氏、中田 豪氏、王 囿人氏、Pratibha Dwivedi さん、Buhe Bateer 氏】には、日頃か ら研究だけでなく英語、異文化交流もさせて頂き、大変に鍛えられました。各国の料理が並ぶ 研究室の宴会はいい思い出です。特に Mohan 氏は研究室を最も長く一緒に過ごした先輩で、 研究や世界の情勢、時には日本のニュースを彼と議論させて頂きました。また、頻繁に開催さ れた研究室合同カラオケでは他の先生方前之園先生から演歌を含めた古き良き日本のお歌を たくさん紹介して頂き、感性を鍛えることが出来ました。心より深く御礼申し上げます。

最後に、私の研究や活躍を楽しみに、日頃支えてくれた家族に心より感謝いたします。

皆様のおかげで私は幸せな博士研究生活を送ることができました。

2018年 1月 22日 高橋 麻里