

両親媒性多糖デンドリマーを保護剤とした 金・白金ナノコロイドによる活性酸素消去活性

奈良女子大学大学院人間文化研究科

吉村 倫一

Tadpole-type amphiphilic dendrimers with poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons and a single alkyl chain (alkyl chain length = 16, generation number = 1–5) were designed and synthesized, and investigated their adsorption and aggregation properties using surface tension, fluorescence of pyrene, dynamic light scattering (DLS), and small-angle neutron scattering (SAXS). The amphiphilic dendrimers exhibit low critical micelle concentration and high efficiency in lowering the surface tension of water, indicating that the dendron-head moieties were more efficiently packed at the air-water interface and in solution. The DLS and SANS show that the amphiphilic dendrimers form small micelles in aqueous solution regardless of the generation and the concentration. Gold and platinum nanoparticles were prepared by chemical reduction protected by tadpole type amphiphilic dendrimers, and their catalytic activities for reduction reaction of *p*-nitrophenol and DPPH radical scavenging reaction were investigated. It was found that the catalytic activities for reduction reaction were significantly influenced by the dendrimer generation and the size of nanoparticles.

1. 緒言

近年、活性酸素の健康などへの影響が一般的に知られ注目を集めている。活性酸素は体中で発生して細胞を攻撃し、動脈硬化、がん、アルツハイマー、脳梗塞など200種類以上の病気や老化の原因となっている^{1)–3)}。人間の体内には活性酸素を消去してくれる強力な酵素をもっているが、20代をピークにその働きは衰えていく。これを補うためには、ビタミンCやポリフェノールなどの抗酸化物質を体外から摂取する必要があるが、現代の食生活でこれらを効果的に摂取することは非常に難しい。これまでに我々は、ヒアルロン酸、フコイダン、キトサン、デンドリマーなどの水溶性高分子存在下で金ナノ粒子を調製し、そのヒドロキシルラジカルの活性酸素消去活性および1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジド(DPPH)ラジカルの消去活性について調べた結果、いずれも高い活性が認められることを見出した^{4)–9)}。ここで用いたデンドリマーは、従来の高分子と異なり分子形状やサイズが制御された規則的な多分岐構造を有し、水溶液中では自己会合せず単分子ミセルで存在する。また、近年、我々はデンドリマーを自己集合させるために、デンドリマー骨格に1本の炭化水素鎖を導入したTadpole型(おたまじゃくし型)の両親媒性デンドリマーを分子設計・合成し、これらは気/液界面に効率よく吸着・配向し、水中で数10~100nmの会合体を形成することを明らかにした。

本研究では、これらの両親媒性デンドリマーや末端官能

基を糖鎖で修飾した多糖デンドリマーを保護剤とした金および白金ナノ粒子を合成し、*p*-ニトロフェノールの還元反応、DPPHラジカルおよびヒドロキシルラジカルの消去反応に対するナノ粒子の触媒活性を評価することを目的とする。会合体のナノ構造と細胞認識をもつ糖鎖を用いることで、人体や環境に配慮した粒径のそろった安定なナノ粒子と高い触媒活性が得られると確信する。

2. 実験

2.1 合成

2.1.1 Tadpole型両親媒性デンドリマー(2デンドロン骨格)の合成

メタノールに溶解させたヘキサデシルアミンを40°C付近まで昇温させた後、アクリル酸メチルを約1時間かけて加え、約94時間、40°Cで加熱攪拌した。反応終了後、未反応のアクリル酸メチルを除去するために、メタノールによる共沸で減圧蒸留を行い、メチルエステル末端基を有する世代0.5のTadpole型両親媒性デンドリマー(C₁₆-2denG0.5)を少し粘性のある透明液体で得た。収率は100%であった。構造は、¹H NMRおよびESI-MSにより確認した。

次に、メタノールに溶解させたC₁₆-2denG0.5を40°C付近まで昇温させた後、エチレンジアミンを約1.5時間かけて滴下し、約80時間、40°Cで加熱攪拌した。反応終了後、未反応のエチレンジアミンを除去するために、トルエン、エタノール、メタノールの順による共沸で減圧蒸留を行い、白色粘体を得た。この粘体をヘキササンで洗浄し、真空デシケーターで十分に乾燥させることにより、アミノ末端基を有する世代1のTadpole型両親媒性デンドリマー(C₁₆-2denG1)を白色固体で得た。収率は93%であった。構造は、¹H NMRおよびESI-MSにより確認した。

上と同様の方法により、アクリル酸メチルおよびエチレン



Active Oxygen Scavenging of Gold and Platinum Nano-Colloids Protected by Amphiphilic Dendrimers with Multi-Sugars

Tomokazu Yoshimura

Graduate School of Humanities and Sciences,
Nara Women's University

ジアミンの反応を繰り返すことによって、2つのデンドロン骨格を有する世代5までのTadpole型両親媒性デンドリマー (C_{16} -2denGn; n は世代で1~5) を収率よく合成した。

2.1.2 Tadpole型両親媒性デンドリマー(3デンドロン骨格)の合成

2.1.1でヘキサデシルアミンの代わりに、*N*-ヘキサデシルエチレンジアミンを用いて同様に、3つのデンドロン骨格を有する世代1~5のTadpole型両親媒性デンドリマー (C_{16} -3denGn; n は世代で1~5) を合成した。構造をFig.1に示す。

2.1.3 糖鎖の導入

メタノールに溶解させたTadpole型両親媒性デンドリマーに、大過剰量のラクトピオン酸を加え、窒素雰囲気、還流下、100時間加熱撹拌した。反応終了後、メタノールを減圧留去して、透析を数日間行い未反応の糖を除去した。構造は、 ^1H NMR, ESI-MSおよび元素分析により確認した。

2.2 界面化学的特性

合成したTadpole型両親媒性デンドリマーの表面張力を、自動表面張力計Kruss K122を用いてウイルヘルミー法により25°Cで測定した。各濃度での平衡表面張力を得るために、表面張力値の変化が毎9分で 0.05 mN m^{-1} 以下となるまで測定を行なった。cmcとcmcにおける表面張力は、表面張力と濃度の対数曲線の屈曲点から決定した。

Tadpole型両親媒性デンドリマーが形成する会合体の大きさは、Uniphase社製He-Neレーザー(出力:35mW, 波長:632.8nm-垂直偏光)を光源とする独国ALV社製のALV-5000Eを用いて測定した。すべての溶液は、測定前にセルロースエステル製の $0.2\mu\text{m}$ フィルターでろ過して用いた。解析はヒストグラム法により拡散係数を決定し、Stokes-Einsteinの式を用いて流体力学的直径を算出した。

界面活性剤水溶液の蛍光測定は、日立650-10S蛍光分

光光度計によりプローブにピレンを用いて測定した。スペクトルは335nmの励起波長、360~400nmで記録し、ピレンの濃度は $1 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$ とした。ピレン蛍光スペクトルの振動バンドの低波長側から数えて1番目と3番目の強度比(I_1/I_3)より、水溶液中の会合体の疎水的環境を評価した。

中性子小角散乱(SANS)の測定は、Tadpole型両親媒性デンドリマーを溶解した重水(D_2O)中で重塩酸(DCl)または重水酸化ナトリウム(NaOD)の添加によりpHを調整した試料を用いて行った。

2.3 金および白金ナノ粒子の合成

Tadpole型両親媒性デンドリマー (C_{16} -3denGn; $n = 1 \sim 5$) と塩化金酸の濃度比が1:1または4:1になるように、塩化金酸水溶液を C_{16} -mdenGn水溶液に加え、30分間よく撹拌した。この混合溶液に氷冷した水素化ホウ素ナトリウムを加えて、30分間撹拌を続けることで還元を行い、金ナノ粒子を調製した。

また、白金ナノ粒子の調製は、金ナノ粒子の場合と同様に、塩化金酸を塩化白金酸に変えて同条件で行った。Tadpole型両親媒性デンドリマー (C_{16} -3denGn; $n = 1 \sim 5$) と塩化白金酸の濃度比は1:1または4:1になるように調製した。

2.4 *p*-ニトロフェノールの還元反応

石英セルに、金または白金ナノ粒子、*p*-ニトロフェノール、超純水を加えて、撹拌した。この混合溶液に、氷冷した水素化ホウ素ナトリウムを素早く加え、可視紫外吸光分光計にセットし、時間に伴う400nmの吸光度を測定した。

2.5 金および白金ナノ粒子のDPPHラジカル消去能

石英セルに、金または白金ナノ粒子とDPPHラジカル溶液を加え、撹拌した。この混合溶液を可視紫外吸光分光計にセットし、時間に伴う517nmの吸光度を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 合成

Tadpole型両親媒性デンドリマー (C_{16} -mdenGn, m はデンドロンの数で2, 3, n は世代で1~5) は、コアにヘキサデシルアミンまたは*N*-ヘキサデシルエチレンジアミンを用いて、アクリル酸メチルによるMichael付加反応と生成したメチルエステルとエチレンジアミンの反応を繰り返すDivergent法に従い収率よく合成することができた。

3.2 界面化学的特性

pH2の水溶液における C_{16} -mdenGnの表面張力は、いずれも濃度の増加とともに減少し、臨界ミセル濃度(cmc)

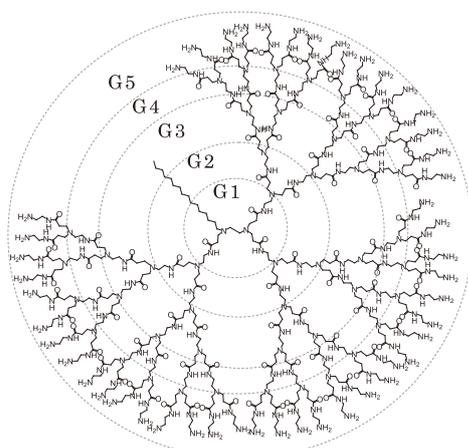


Fig. 1 Structure of C_{16} -3denGn.

を示す明瞭な屈曲点が見られほぼ一定となった (Fig.2)。世代1～3のcmcは世代の増加すなわちデンドリマーの親水性の増大とともに増加したが、世代4,5になるとcmcの大きな増加は認められず、cmcは逆に小さくなるか、あるいはほとんど変わらなかった。気/液界面での吸着・配向状態は、cmcにおける表面張力 (γ_{cmc}) およびGibbs式から求めた分子占有面積 (A_{cmc}) を用いて評価することができる。C₁₆-mdenGnの γ_{cmc} は36～47 mN m⁻¹, A_{cmc} は0.53～0.86 nm² となり、嵩高い構造のデンドロン骨格を有しているにもかかわらず、従来の界面活性剤と同様に気/液界面に効率よく吸着・配向していることがわかった。これは、世代およびデンドロン骨格が増加すると、デンドロンのアミド基間の水素結合が増加して密にパッキングできるためと考えられる。C₁₆-mdenGnのミセル形成の標準自由エネルギーの絶対値 $|\Delta G^0_{mic}|$ は、世代が1から2に増加すると小さくなるものの、世代2～5ではほぼ同じ値であり、 $|\Delta G^0_{mic}|$ および吸着の標準自由エネルギーの絶対値 $|\Delta G^0_{ads}|$ とも、デンドロンの骨格数に大きな違いは見られなかった。また、いずれの世代でも $|\Delta G^0_{mic}|$ は $|\Delta G^0_{ads}|$ よりも小さくなり、ミセル形成よりも気/液界面への吸着の方が優れることがわかった。ピレンの蛍光スペクトルの373nmと384nmの強度比 I_1/I_3 および静的光散乱から得られた散乱強度は、世代1および2では表面張力曲線から求めたcmc付近の濃度からそれぞれ減少、増大したが、世代3以上になるとcmc以下の濃度から変化が見られた。これは世代が高くなると、気/液界面への吸着と同時に水溶液中で会合体を形成していることを示唆する。

3.3 水溶液中でのミセル特性

デンドリマーの末端アミノ基の一部がプロトン化されるpH9の低濃度 (5 mmol dm⁻³) 溶液におけるC₁₆-3denGn ($n = 1 \sim 5$) のSANS曲線 (Fig. 3) は、散乱ベクトル $Q > 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ において Q^{-4} に従う散乱が観測されていることから、会合体の構造は球状であることが示唆される。Guinierの式を用いて得られた回転半径は、世代には依存せず2.0～2.4 nmであった。また、低Q領域 ($Q < 0.005 \text{ \AA}^{-1}$) では、デンドリマーの世代によって散乱曲線が異なり、C₁₆-2denGn ($n = 4, 5$) およびC₁₆-3denGn ($n = 3 \sim 5$) では低世代と異なり立ち上がりが見られた。これは、世代1～3のC₁₆-2denGn および世代1, 2のC₁₆-3denGn では水溶液中で球状ミセルとして存在するのに対し、世代が増加するとミセル同士が集まって大きな凝集体を形成していることを示唆する。一方、pH2の溶液では、デンドリマーのアミノ基がすべてプロトン化されるため、SANS曲線は $Q = 0.06 \sim 0.09 \text{ \AA}^{-1}$ 付近にミセル間の静電的反発に起因するブロードなピークプロファイルが観測された。このピーク位置は濃度の増加とともに高Q側にシフトし、ミセル間の

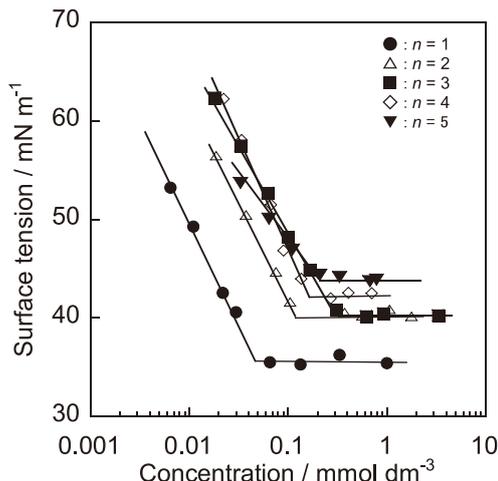


Fig. 2 Surface tension for C₁₆-3denGn.

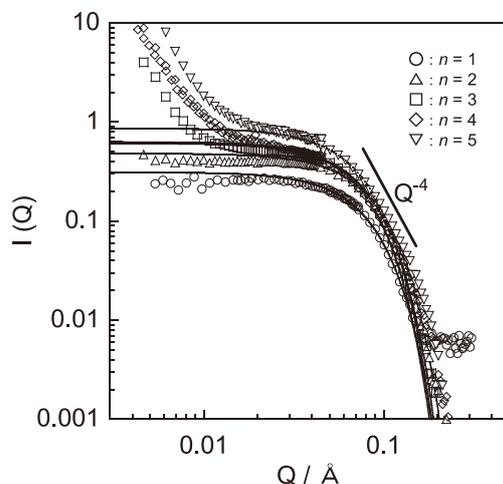


Fig. 3 SANS curves for C₁₆-3denGn at pH9.

距離が近づいたことがわかった。また、pH2の溶液でもpH9で見られた低Q領域での立ち上がりが同様に観測された。世代2では、5～25 mmol dm⁻³の低濃度で立ち上がりが見られなかったが、濃度が100 mmol dm⁻³に増加すると立ち上がりが観測され、ミセルの凝集体が示唆された。これは動的散乱から求めた見かけの流体力学的直径の大きさとほぼ一致した。すなわち、低濃度では数nmの粒径のミセルが得られたのに対し、100 mmol dm⁻³では72～85 nmの大きな会合体が認められた。また、世代3～5では、世代2と異なり低濃度から凝集体の形成が確認された。pH2の溶液におけるC₁₆-3denG3 (100 mmol dm⁻³) のcryo-TEM写真 (Fig. 4) から100～600 nmの球状および内部が空洞になったドーナツ状の凝集体が確認された。この大きな凝集体の存在が、SANS曲線の低Q領域の立ち上がり起因している結論づけられる。さらに、コントラスト変化法を用いて見積もった会合体中の1分子あたりの体積は、いずれの世代でも計算値よりも小さくなり、その差は世代の増加とともに大きくなった。これは高世代になるほど会合体中で分子が密にパッキングされていることを示唆する。

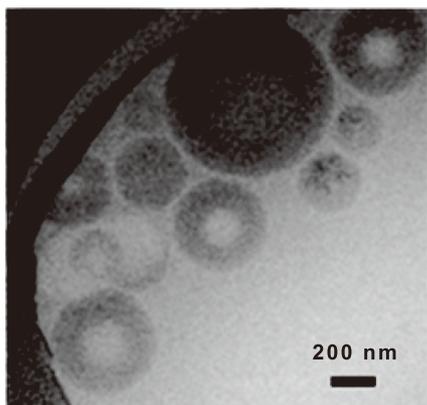
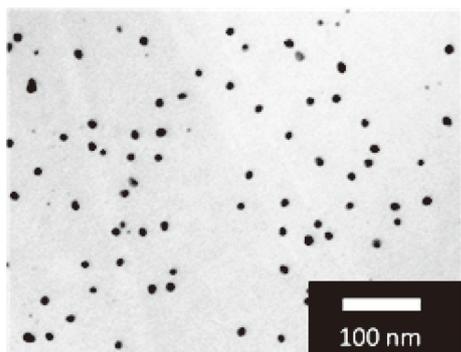
Fig. 4 Cryo-TEM images of C₁₆-3denG3 at pH2.

Fig. 5 TEM image of gold nanoparticles.

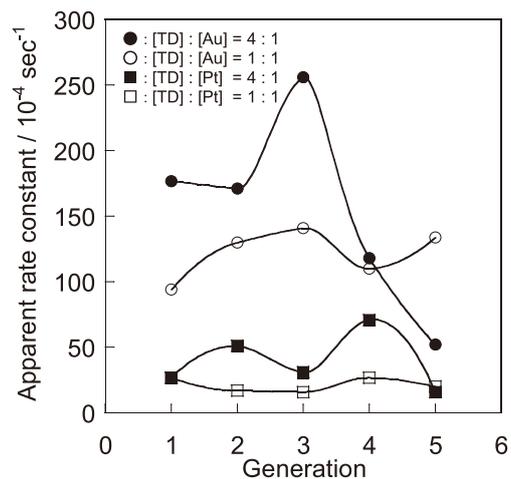
この傾向は気/液界面での吸着と同様に、世代の増加とともにデンドリマーのアミド基間の水素結合が増加するためと考えられる。また、SANS曲線は、溶液の温度を25℃から63℃に上昇させても違いが見られなかったことから、ミセルおよびミセル同士が集まった凝集体は温度に対して極めて安定であることがわかった。

3.4 金・白金ナノ粒子の調製と触媒活性およびDPPHラジカル消去能

C₁₆-3denGnを保護剤とした金および白金ナノ粒子は、C₁₆-3denGnと塩化金酸または塩化白金酸の混合溶液を化学還元することで調製した。C₁₆-3denGnと塩化金酸または塩化白金酸の濃度比が4:1では、金の場合、直径4 nm以下の単分散なナノ粒子が得られたが、白金の場合、大きな粒径のナノ粒子が得られ、金属とデンドリマーのアミノ基の相互作用は金よりも白金の方が弱いことがわかった。C₁₆-3denGnで保護した金および白金ナノ粒子を用いた

-

ニトロフェノールの還元反応における触媒活性は、世代3の金ナノ粒子を用いたときに最も高い活性が認められ、これまでに報告されたPAMAMおよびPPIデンドリマーを保護剤として用いたナノ粒子よりも高いことがわかった。一方、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカルの消去反応に対しては、C₁₆-3denGnで保護したナノ粒子は高い触媒活性を示さなかった。

Fig. 6 Apparent rate constant and generation for C₁₆-3denGn.

4. 総括

高性能化ならびに高機能化の発現を目指して分子設計・合成したTadpole型両親媒性デンドリマーは、高世代で親水部のデンドロン骨格がかなり高高いにもかかわらず、デンドロン間の相互作用が働いて高い界面活性を有することがわかった。この両親媒性デンドリマーを保護剤として金または白金ナノ粒子を調製でき、*p*-ニトロフェノールの還元反応やDPPHラジカルの消去反応における触媒活性を示すこともわかった。今後、金属ナノ粒子を用いたヒドロキシルラジカルやその他の活性酸素種の消去作用について詳しく検討していく予定である。

(引用文献)

- 1) Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3217, 2000.
- 2) Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3396, 2000.
- 3) Gyamfi M A, Yonamine M, Aniya Y, *Gen. Pharmacol.* **32**, 661, 1999.
- 4) Esumi K, Takei N, Yoshimura T, *Colloids Surf. B* **32**, 117, 2003.
- 5) Esumi K, Houdatsu H, Yoshimura T, *Langmuir* **20**, 2536, 2004.
- 6) Isono R, Yoshimura T, Esumi K, *J. Colloid Interface Sci.* **288**, 177, 2005.
- 7) Akiyama S, Yoshimura T, Esumi K, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* **78**, 112, 2005.
- 8) Akiyama S, Yoshimura Torigoe K, T, Esumi K, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* **78**, 409, 2005.
- 9) Endo T, Fukunaga T, Yoshimura T, Esumi K, *J. Colloid Interface Sci.* **302**, 516, 2006.