

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13729

研究課題名(和文)免疫定量に利用可能なプラズモニクナノ粒子集合体の創製

研究課題名(英文) Developments of plasmonic nanoparticle assemblies that are applicable for immunoassay

研究代表者

新留 康郎 (Niidome, Yasuro)

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号：50264081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノロッドの2量体の作製を行った。実験条件を細かく最適化し、金ナノロッドの2量体を高収率かつ再現性よく調製する条件を見出した。TEM観察によると約30%の収率でナノロッド2量体が得られていることがわかった。さらに密度勾配遠心分離法によって2量体を分画した。ショ糖を用いたステップグラジエントによって、2量体が約70%である溶液の調製に成功した。

銀シェル金ナノロッド表面に多様な表面修飾を施すために、アセトニトリル・ジメチルスルホキシド・ジメチルホルムアミドに分散できる表面修飾法を開発し、機能性ペプチドの吸着によってもナノロッドが凝集しない表面修飾法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Dimers of gold nanorods were prepared. After careful optimizations, we have found the efficient and reproducible experimental condition to give the nanorod dimers. TEM observation showed that the yield of the nanorod dimers was about 50%. The nanorod dimers were fractionized by density gradient centrifugation. A stepwise density gradient using sucrose was successful to fractionize the nanorod dimers. The resultant solution contained about 70% of nanorod dimers.

To make various surface modification on gold-silver core-shell nanorods, we have developed a surface modification to disperse the nanorod in polar organic solvents that were acetonitrile, dimethylsulfoxide, and dimethylformamide. The surface modification contributed the colloidal dispersion of the core-shell nanorods on which functional peptides adsorbed.

研究分野：コロイド・界面化学

キーワード：金ナノロッド コアシェルナノロッド 2量体 プラズモン

1. 研究開始当初の背景

酵素結合免疫吸着法(ELISA)やイムノアフィニティクロマトグラフなど、抗原抗体反応を用いた免疫検出には「発色剤」の存在が不可欠である。一般に高感度免疫検出に用いられる「発色剤」は酵素化学反応によって発色を「増幅」するプロセスを取り入れている。増幅プロセスが無い場合、すなわち抗体に結合した色素の吸収や蛍光を測定する方法では検出感度が十分ではないことが多い。高感度かつ再現性の良い免疫検出の為に、高い発色性(吸光度、発光強度)と安定した発色を実現できる酵素が必要である。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)は多くの抗体との複合体として市販されており、発色用酵素のデファクトスタンダードである。実際の高感度分析には 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine のような有機分子を酸化して発色させる免疫染色法や、ルミノールによる化学発光法が用いられる。バックグラウンドシグナルの少ない化学発光法は、適切に操作されれば、放射性同位元素法に匹敵する検出感度を有するとされている。

これらの高感度検出法の問題は、操作の煩雑さとそれに伴う精度/再現性の不十分さである。より簡便で再現性の高い手法を開発し、有機分子の発色性の悪さや化学発光強度の経時変化を改善することは、実用の免疫検出技術に大きく貢献すると期待された。

研究代表者は形状均一な異方性金ナノ粒子である金ナノロッドに均一な銀シェルを付与することに成功した。この銀シェル金ナノロッドは特異な形状に由来する表面プラズモン(SP)バンドを有し、その吸光係数は極めて大きい($\sim 10^{14}/\text{mol}(\text{particle})\text{cm}^{-1}$)ので、発色剤=マーカー粒子としての応用が期待される。しかしながら、この吸光係数でも免疫の高感度検出には不十分であり、何らかのシグナル増幅反応が必要である。

2. 研究の目的

本研究では金ナノロッドや銀シェル金ナノロッドを組織化し、SPバンドの共鳴状態を実現する。ナノロッドは各コーナーが鋭い四角柱状の形状をしており、孤立分散の状態でも形状に由来する特異なSPバンドを示す。異方的なナノロッドの2量体を構成し、基板上に固定する。ナノ粒子組織体のギャップ部分のわずかな形状変化が大きなプラズモンの共鳴条件の変化につながる「プラズモニックナノ粒子組織体」を実現することによって、組織体の酸化溶解に伴うプラズモンの共鳴状態の変化を増幅反応として機能することが期待できる。本研究では金属ナノ粒子の組織体を構築し、さらに抗体結合性ペプチドを修飾し機能性を損なわずに抗体をナノロッド表面に固定することで、プラズモニックな特性を免疫定量に用いることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ナノロッド組織体の調製とその分光特性の評価、および化学反応に伴う分光特性変化の評価を主として行った。既報を踏まえて、金ナノロッドの長軸を平行に2個組織化する手法で金ナノロッド2量体を高収率に調製する条件を検索した。ナノロッドの分散安定剤となっている界面活性剤を遠心分離で除去する手続き、凝集させるために添加するチオール化合物とエタノールの量を幅広く調整して最適値を探した。また、金ナノロッドに疎水的な機能性ペプチドを修飾する際に凝集体が形成しないように、極性有機溶媒中に分散する表面修飾技術を検索した。

4. 研究成果

我々のナノロッドを用いると論文の実験結果は全く再現しなかった。すべての実験条件を再度精査し、2量体に対応する分光特性が得られる実験条件を決定した。具体的には、金ナノロッドを10 mMのヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)溶液5 mL中に分散し、これに5 μL のヘキサデカンチオールを添加した。ボルテックス震とう後、4.7 mLのエタノールを添加した。2量体の形成は溶液の分光特性でモニターし、適切な分光特性を示したら溶液をCTAB溶液(0.1 M)と混合し、凝集の進行を抑制した。2量体の生成率は約3割であった。

これでは2量体に由来する分光特性を利用した機能化は望めないため、2量体の分画濃縮を試みた。ゲルろ過や電気泳動も検討したが、最終的にはショ糖を用いた密度勾配遠心分離でナノロッド2量体を分画できることがわかった。ここでは60, 50, 40, 30, 20%(重量)のショ糖溶液を容量15 mLの遠心管に重畳し、最上層にナノロッド溶液を静かにおいて、3400 \times gで20分間、30 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離した。遠心後、2つの分散層と側壁の沈殿、さらにチューブ底に沈殿が生じた。ナノロッド2量体は側壁の沈殿に多く存在しており、ナノロッド2量体を約7割に濃縮することに成功した。この成果は日本化学会速報誌(Chemistry Letters)に投稿済みである。

金ナノロッドに疎水的な機能性ペプチドを修飾すると凝集して分散安定性を失うことが多い。これを抑止するために表面にポリエチレングリコール(PEG)鎖を修飾するとともに、極性有機溶媒に分散することが有効である。ここではアセトニトリル・ジメチルスルホキシド・ジメチルホルムアミドへと水の混合溶液への金ナノロッドの分散性を表面プラズモンバンドのバンド幅で評価した。動的光散乱の結果と合わせて、ナノロッドを分散できる溶媒条件やPEGの効果を一系統的に評価した。本研究世界によって、水に難容の機能性ペプチドを表面修飾する際に金ナノロッドを凝集させない溶

媒条件があらかじめ予測可能になり、機能性ペプチドの吸着によってもナノロッドが凝集しない表面修飾法を確立できた。この成果は日本化学会欧文誌 (Bulletin of Chemical Society of Japan) に掲載された。さらに、金ナノロッドおよびその2量体を導電性透明基板に固定し、これに電気化学的に銀を析出させる条件を検索し、銀の析出に伴う分光特性の変化を in situ に評価できる測定系を構築した。一連の実験条件は確立されており、得られたデータをもとに現在学術論文を投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Ultra-High Sensitivity Detection of Gold Nanorods on a Blotting Membrane by Laser Induced Desorption/Ionization of Gold Ions
Daiki Muko, Yuki Inoue, Atsushi Nishitani, Yasuro Niidome
Analytical Methods, 2017, Vol. 9, No. 7, pp. 1177-1184. DOI: 10.1039/C6AY03315F (平成29年1月) 査読あり
 2. Colloidal Dispersion of Gold Nanorods and Gold-Silver Core-Shell Nanorods in Polar Organic Solvents
Takeharu Kitamura, Yasuro Niidome
Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2017, Vol. 60, No. 2, pp. 161-168. DOI: 10.1246/bcsj.20160297. (平成29年1月) 査読あり
 3. Gold-Silver Core-Shell Nanorods: Colorimetry of Horseradish Peroxidase (HRP) and Catalase
Ayaka Kiya, Yukiko Tsuru, Yasuro Niidome
Chemistry Letters, 2016, Vol. 45, No. 12, pp. 1376-1378. DOI: 10.1246/cl.160755. (平成28年9月) 査読あり
 4. Stepwise Preparation of Spherical Gold Nanoparticles Passivated with Cationic Amphiphiles
Yuki Inoue, Yo Tsutomoto, Daiki Muko, Kazuaki Nanamura, Tsuyoshi Sawada, Yasuro Niidome
Analytical Sciences, 2016, Vol. 32, No. 8, pp. 875-880. DOI: 10.2116/analsci.32.875 (平成28年7月) 査読あり
 5. Anisotropic Gold-Based Nanoparticles: Their Preparation, Properties, and Applications
Yasuro Niidome, Aung Thu Haine, Takuro Niidome
Chemistry Letters (Highlight Review), 2016, Vol. 45, No. 5, pp. 488-498. DOI: 10.1246/cl.160124 (平成28年5月) 査読あり
- [学会発表](計15件)
1. 極性有機溶媒中に分散する銀シェル金ナノロッドの調製, 北村 雄春、新留 康郎, ナノ学会第14回大会, ポスター, 2016.6.15, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 2. 溶液中での金ナノロッド組織体形成と2量体の分取, 蔦本 陽、新留 康郎, ナノ学会第14回大会, ポスター, 2016.6.16, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 3. Deposition of Silver Nanoplates on a Substrate and its Spectroscopic Properties, Rabor Janice B., 川村 洸貴、新留 康郎, ナノ学会第14回大会, ポスター, 2016.6.15, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 4. 異方性金属粒子の極性有機溶媒中での分散状態, 北村 雄春、新留 康郎, 第53回化学関連支部合同九州大会, ポスター, 2016.7.2, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 5. 金ナノロッド組織体の調製と2量体の分画, 蔦本 陽、新留 康郎, 第53回化学関連支部合同九州大会, ポスター, 2016.7.2, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 6. 銀ナノプレート固定基板の分光特性制御, 川村 洸貴、Rabor Janice B., 新留 康郎, 第53回化学関連支部合同九州大会, ポスター, 2016.7.2, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 7. 金ナノ粒子固定基板を用いた銀の電解析出, 宮崎 杏奈、新留 康郎, 第53回化学関連支部合同九州大会, ポスター, 2016.7.2, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 8. Dispersion of Nanorods in Polar Organic Solvents, Takeharu Kitamura, Yasuro Niidome, 4th International Kyushu Colloid Colloquium, ポスター, 2016.9.27, 九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)
 9. Preparation of Gold Nanorod Assemblies and Separation of Nanorod Dimers by Sucrose Gradient Centrifugation, Yo Tsutomoto, Hironobu Tahara, Masanori Kasai, Yasuro Niidome, 4th International Kyushu Colloid Colloquium, ポスター, 2016.9.27, 九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)
 10. Control of Spectroscopic Properties of Silver Nanoplate Deposited on Glass Substrates, Koki Kawamura, Janice B. Rabor, Yasuro Niidome, 4th International Kyushu Colloid

- Colloquium, ポスター, 2016.9.27, 九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)
11. Electrochemical Deposition of Silver on Gold-nanoparticle Deposited Substrates, Anna Miyazaki、Yasuro Niidome, 4th International Kyushu Colloid Colloquium, ポスター, 2016.9.27, 九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)
 12. Colloidal Dispersion of Rod Shaped Particles in Polar Organic Solvents, Takeharu Kitamura、Yasuro Niidome, Joint Symposium of JTBW2016 & KNJS2016, ポスター, 2016.11.1, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
 13. Assembling of Gold Nanorods and Separation of Nanorod Dimers, Yo Tsutamoto、Yasuro Niidome, Joint Symposium of JTBW2016 & KNJS2016, ポスター, 2016.11.1, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
 14. Control of Spectroscopic Properties of Anisotropic Silver Nanoplate Deposited on Glass Substrates, Koki Kawamura、Janice B. Rabor、Yasuro Niidome, Joint Symposium of JTBW2016 & KNJS2016, ポスター, 2016.11.1, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
 15. Electrochemical Formation of silver shell on Rod-shaped Gold Nanoparticles on an ITO plate, Anna Miyazaki、Yasuro Niidome, Joint Symposium of JTBW2016 & KNJS2016, ポスター, 2016.11.1, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:水生生物用標識剤及び水生生物水生生物の標識方法

発明者:新留康郎

権利者:国立大学法人鹿児島大学

種類:特許

番号:特願 2016-235699

出願年月日:2016年12月5日

国内外の別:国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ:<http://www.nanorod.net>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新留康郎(NIIDOME, Yasuro)

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号:50264081

(2)研究分担者
なし

研究者番号:

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし