

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05528

研究課題名(和文) 金ナノ粒子マスプローブの機能評価と実用技術化

研究課題名(英文) Application and characterization of gold nanoparticle mass-probe

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノ粒子、白金ナノ粒子、さらに金銀合金ナノ粒子および金パラジウム合金ナノ粒子から生じる金属イオンの脱離効率を明らかにする。合金ナノ粒子からは各種合金クラスターが脱離する。金属ナノ粒子をマスプローブとして、ナノ粒子の体内動態を明らかにする技術を開発する。さらに、合金ナノ粒子から脱離する各種クラスターイオンを解析して、複数のターゲット分子を識別する「多色」マスプローブを実現し、抗体を用いた新しい免疫検出法の基盤的技術とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属ナノ粒子、特に合金ナノ粒子をマスプローブとして用いることで、極めて微量のナノ材料・タンパク質の体内動態を検出できる新しい技術となることを実証した。MALDI-MS装置は研究機関には普及している分析機器であり簡便な操作で超高感度なナノ粒子分析が可能であることを実証した。また、合金ナノ粒子の組み合わせによる免疫検出は新しい分析技術として今後広く普及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Desorption/ionization efficiencies of metal ions generated from gold nanoparticles, platinum nanoparticles, gold-silver alloy nanoparticles, and gold-palladium alloy nanoparticles were investigated. Alloy nanoparticles gave various alloy cluster ions. We developed techniques to investigate the bio-distribution of nanoparticles in a living body using alloy nanoparticles as mass probes. Furthermore, by analyzing the cluster ions desorbed from the alloy nanoparticles, "multicolor mass probes" that could identify multiple target molecules were proposed. The alloy-nanoparticle mass probes will be used as a novel technology for immunosensings.

研究分野：ナノ粒子化学

キーワード：金属ナノ粒子 金銀合金ナノ粒子 免疫検出

1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法は有機分子をイオン化する汎用的な方法である。試料プレートを2次元的にスキャンすることで、特定物質の分布を2次元的に調べるイメージング質量分析に展開するなど、生命科学の進展に欠かせない技術となっている。MALDI法の最大の問題はイオンサプレッション：大量に脱離するイオンが微量成分のイオン化を抑制する現象である。組織切片の場合は、組織中の脂質が大量に脱離する。その結果、分子量の大きな酵素や抗体のようなタンパク質の脱離イオン化が抑制される。脂質をアルコールで洗い流すとタンパク質の検出は可能になるが、切片構造の完全な維持は難しい。「マスプローブ」はこの問題を解決する方法として提案されたものである。

申請者は金ナノ粒子をマスプローブに利用することを検討していた。一連の研究では、担癌マウスの腫瘍組織に集積する金ナノ粒子のイメージングが可能であることを、プロテオミクスメンブレン上で 10^{-20} mol(particle)/mm² の高感度な分析が可能であることを明らかにした。高い化学的安定性と高い検出感度を有する金ナノ粒子は、優れたバイオプローブとして機能すると期待される。しかし、研究開始当初は以下の点で議論が不十分であった。

- 1: 金ナノ粒子の切片組成やマイクロ形状が金イオンの脱離イオン化に与える影響は?
- 2: 金イオン検出の高感度を実用的な免疫検出の測定系で活かせるか?
- 3: 複数種の分子を同時に検出する「多色」なプローブ粒子をどう実現するか?

これらの課題を解決することは、金ナノ粒子のレーザー脱離イオン化プロセスの特徴を明らかにし、さらに多様な金属ナノ粒子をマスプローブとして利用して新しい分析技術を作れる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では金ナノ粒子、白金ナノ粒子、さらに金銀合金ナノ粒子および金パラジウム合金ナノ粒子から生じる金属イオンの脱離効率を明らかにする。合金ナノ粒子からは各種合金クラスターが脱離する。金属ナノ粒子をマスプローブとして、ナノ粒子の体内動態を明らかにする技術を開発する。さらに、合金ナノ粒子から脱離する各種クラスターイオンを解析して、複数のターゲット分子を識別する「多色」マスプローブを実現し、抗体を用いた新しい免疫検出法の基盤的技術とする。

3. 研究の方法

3-(1): 金銀合金ナノ粒子の体内動態

クエン酸還元法で作製した金ナノ粒子に銀シェルを付与した。銀シェルの生成方法は研究グループオリジナルのアスコルビン酸による還元反応を用いた。銀シェル金ナノ粒子にパルスレーザー光(Q-switch Nd-YAG Laser, 532 nm, ~10 ns, 2-5 mJ/pulse)を照射し、水溶液中分散状態のまま融合し、金銀合金ナノ粒子を作製した。合金ナノ粒子の生成は、紫外可視吸収スペクトル、電子顕微鏡、原子吸光法によって確認した。走査型電子顕微鏡(SEM)像を図1に示す。平均粒径は 37 ± 7 nmであった。

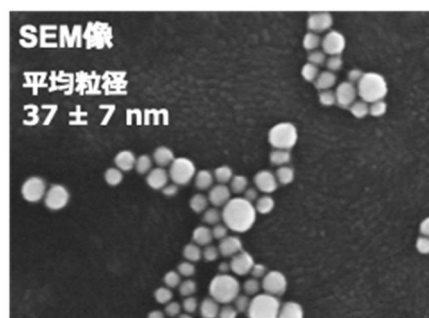


図1 金銀合金のSEM像

体内動態の調査には野生種のゼブラフィッシュを用いた。合金ナノ粒子を含む餌を摂食させた後、トリカインで深く麻酔をかけて安楽死させ、全身切片とした。

切片は質量分析装置(Autoflex Speed, Bruker)のイメージング質量分析モードを用いて脱離イオンの網羅的検出を行った。

3-(2): 白金ナノ粒子の体内動態

クエン酸共存下で塩化白金酸を NaBH_4 で還元することにより、平均粒径 5 ± 1 nmの白金ナノ粒子を調製した。この粒子を餌に混ぜ、ゼブラフィッシュに経口投与して、投与後の体内動態をイメージング質量分析法で調べた。ここで用いたイオン化手法は表面支援脱離イオン化(SALDI-MS)である。SALDI-MSとは、金属ナノ粒子と試料を混合し、パルスレーザー光を照射することで、金属ナノ粒子が励起され、試料分子の脱離イオン化を促進さ

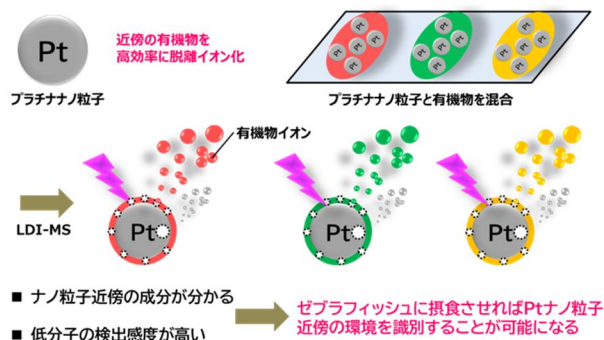


図2 表面支援脱離イオン化の模式図

せる方法である。同じレーザー脱離イオン質量分析 (LDI-MS) である MALDI 法に比べて、マトリックスを使用せずに蒸着あるいは混合、吹き付けという観点から、簡便な前処理かつマトリックス由来によるノイズの少ない良好なピークが得られるといったメリットがある。

3-(3) : 合金ナノ粒子を用いた免疫検出法の開発

金ナノ粒子は免疫検出用マプローブとして使用できる。図3はメンブレン上に固定した抗原が抗体修飾金ナノ粒子結合したエリアで金イオンのマスシグナルが得られることを示した実験結果である。しかし、メンブレンに対する抗体金ナノ粒子の非特異吸着のために、バックグラウンドレベルが高くなり検出限界が悪かった。しかしながら、質量分析が要求するレベルまで非特異吸着を低減させることは不可能であった。抗原抗体反応に伴って特有のシグナルが発生するよう系を設計する必要があった。ここでは金パラジウム合金ナノ粒子と金銀合金ナノ粒子でターゲット物質をサンドイッチし、両者が抗原抗体反応によって近接した場合のみ銀パラジウム合金クラスターイオンが検出できる検出系の構築を行った (図4)。

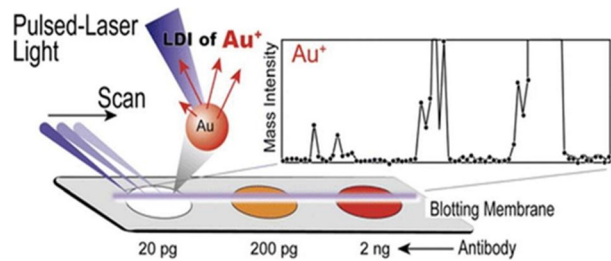


図3 金ナノ粒子 Mass-probe による免疫検出

ここでは金パラジウム合金ナノ粒子と金銀合金ナノ粒子でターゲット物質をサンドイッチし、両者が抗原抗体反応によって近接した場合のみ銀パラジウム合金クラスターイオンが検出できる検出系の構築を行った (図4)。

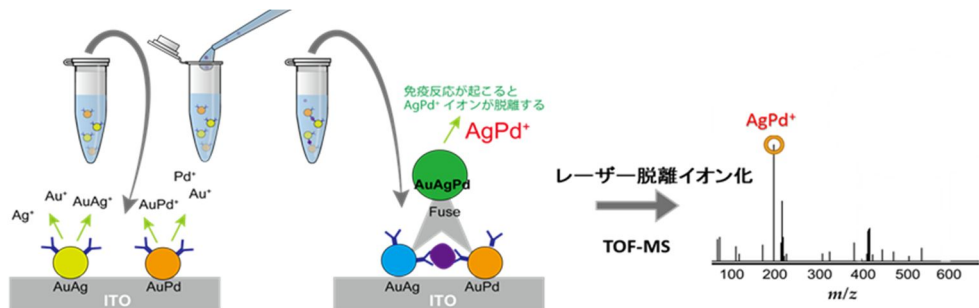
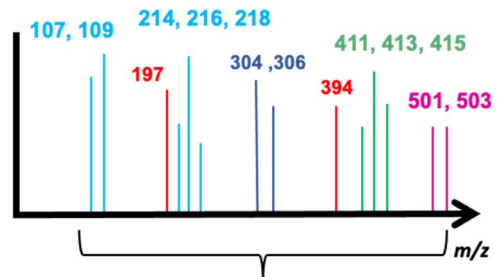


図4 合金ナノ粒子を用いた免疫検出の模式図

4. 研究成果

4-(1) : 金銀合金ナノ粒子の体内動態

組織切片に紫外線パルスレーザー光が照射されると数百種類の有機物イオンが脱離する。金銀合金から脱離する金属イオンを有機物の夾雑イオンと識別するために、金銀合金ナノ粒子由来の14種類のイオン(図5)が全部揃っている測定点のみをナノ粒子が存在しているとして採用し、それ以外の測定点は破棄することで信頼性の高いイメージング質量分析を実現した。



14種

図5 14種類のマスシグナル

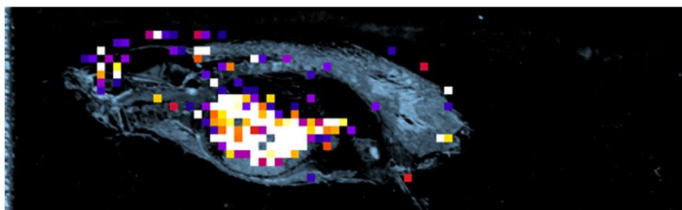


図6 a. Au⁺イオン(m/z 197)のマッピング図(摂食直後)

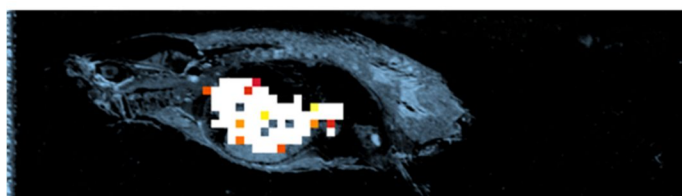


図6 b. 14種類のイオンによるマッピング図(摂食直後)

図6 a は摂食直後のゼブラフィッシュの全身切片から得られた金イオンのマスシグナル(m/z 197)のマッピング図である。金イオンのシグナルの強い部分に多くの金ナノ粒子が分布していたはずである。ゼブラフィッシュの頭部は図の左側であり、シグナルが強い部分は消化器官の位置に相当

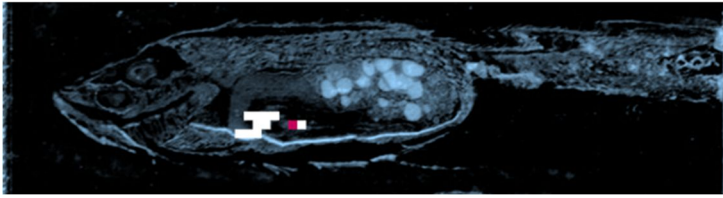


図 7. 14 種類のイオンによるマッピング図(摂食 12 時間後)

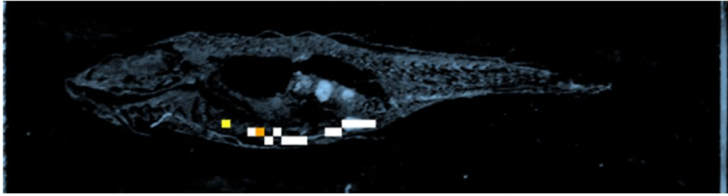


図 8. 14 種類のイオンによるマッピング図(摂食 24 時間後)

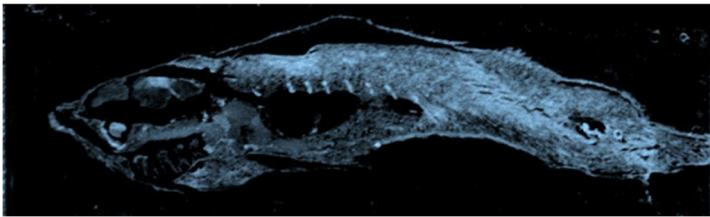


図 9. 14 種類のイオンによるマッピング図(摂食 72 時間後)

する。摂食直後に消化器官にナノ粒子が存在することは合理的であるが、頭部にもシグナルが分布していた。14種類の金属イオンが同時に検出できたスポットに限定すると、シグナルは腹部のみに限定され、より合理的なシグナル処理ができたことを確認できた(図 6b)。

同じ処理によって 14 種類のイオンを 12 時間後(図 7)、24 時間後(図 8)、72 時間後(図 9)にマッピングした結果を示す。12 時間後、24 時間後では消化管の一部にシグナルが見られた。ナノ粒子が確実に消化管内に残っていることがわかった。72 時間後はシグナルが失われナノ粒子が体内から排出されたことがわかった。

ごく微量のナノ粒子が体内のどの部分に残留するかということについて定量的な分析方法はこれまで知られてこなかった。摂食後 24 時間後までナノ粒子の動態を MALDI-MS という汎用的な装置で分析できる画期的な技術の開発に成功したと言える。

4-(2)：白金ナノ粒子の体内動態

金銀合金ナノ粒子のイメージング質量分析と同様に白金イオンの強度を摂食後の時間ごとにマッピングした結果を図 10 に示す。

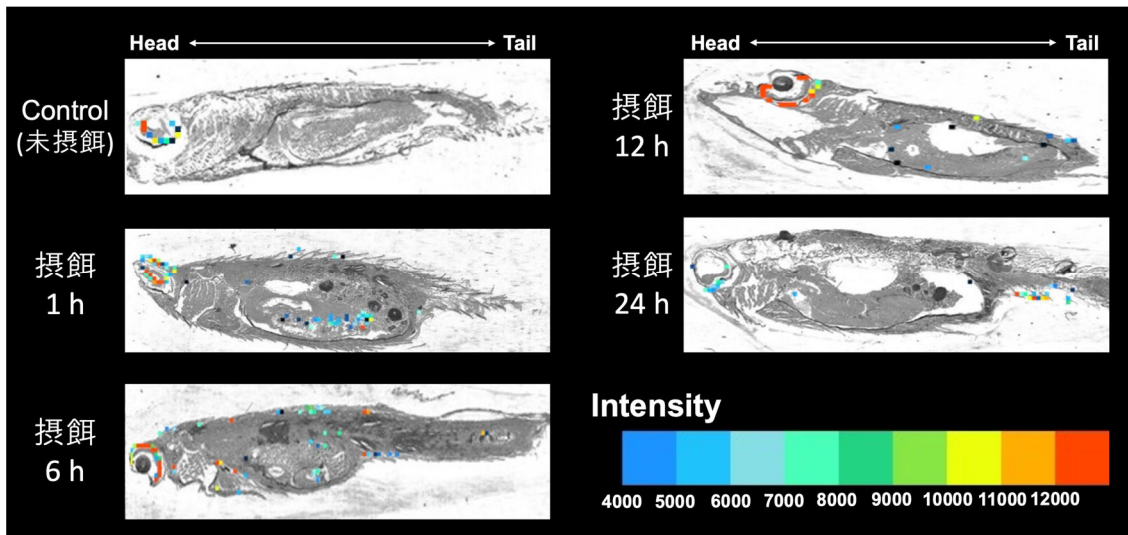


図 10. 白金イオン 5 種類(m/z 194, 195, 196, 389, 391)を積算してマッピングした図

接触させた直後は金銀合金と同様に消化管からシグナルが検出された。合理的な結果である。眼球からもシグナルが得られたが、これはナノ粒子を摂食させていないコントロールの個体からもシグナルが得られているので、眼球に存在する色素に由来する夾雑ノイズであると考えられる。摂食 6 時間後には体内のいろいろな部分から検出されるが、12 時間後、24 時間後にはほぼシグナルは検出されなくなった。白金の脱離イオン化効率金は銀ナノ粒子と比べると非常に小さく、ナノ粒子の体内濃度が検出感度以下になったためだと考えられた。

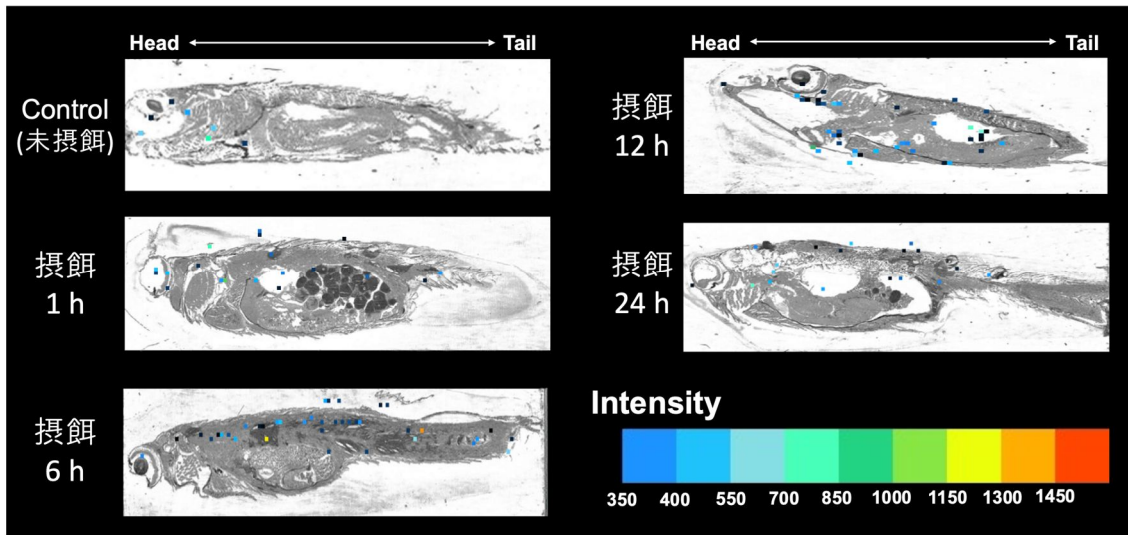


図 1 1 . 血液成分から特異的に得られるイオン 1 1 種類を積算してマッピングした図

図 1 1 は表面支援脱離イオン化(SALDI)によって血液から特異的に得られる 1 1 種類のイオンをマッピングした図である。摂食直後でも消化管に局在するシグナルが見られないことから、計測・分析が適切に行われていることがわかる。6 時間後は背骨近傍から直線状にシグナルが得られており、白金ナノ粒子が血液中に分布していたことを示している。1 2 時間後、2 4 時間後は全身からわずかにシグナルが得られるだけである。これらの結果は白金をマスプローブとして用いて、ナノ粒子が血液中に移動したことを明確に示した結果である。比較的小径 (5 ± 1 nm) のサイズの粒子は消化管を通過できることを示した結果である。ナノ粒子としては小さい方に分類される白金ナノ粒子を用いた実験ではあるが、タンパク質のサイズと比較すると極めて大きく、このサイズのナノ粒子が腸管を通過するということを明確に示す実験結果は大きな成果である。

4-(3) : 合金ナノ粒子を用いた免疫検出法の開発

銀には 2 種類、パラジウムには主として 5 種類の同位体があり、 AgPd^+ には 1 0 種類の同位体の組み合わせがある。このうち Ag_2^+ 、 Pd_2^+ と m/z 値が重複しないのは m/z 217 と m/z 219 の 2 種類のイオンである。さらに m/z 215 は Pd_2^+ が重複するが、 ^{105}Pd と ^{110}Pd はいずれも存在比の少ない同位体であり、一方 m/z 215 にシグナルを与える AgPd^+ は ^{109}Ag と ^{106}Pd の組み合わせと ^{107}Ag と ^{108}Pd の組み合わせであり、存在比率の大きい Pd 同位体由来するイオンである。抗原交代結合のマーカーのレポーターイオンとして期待されるのは m/z 215、 m/z 217、 m/z 219 の 3 つであり、最も注目すべきシグナルは m/z 217 である。

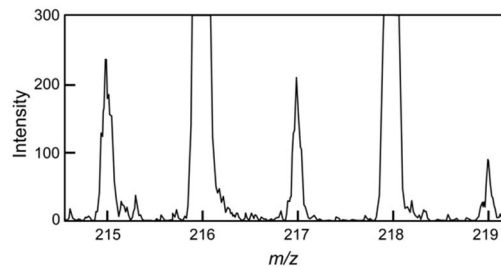


図 1 2 2 種類の合金ナノ粒子が複合体を形成した場合のマススペクトル

4-(4) : 合金ナノ粒子検出感度の評価

AuAg 合金ナノ粒子に Goat-IgG 抗体を修飾した。AuPd 合金ナノ粒子には anti-Goat-IgG 抗体を修飾した。これらの粒子は抗原抗体結合によって会合する。抗体を修飾していない 2 種類のナノ粒子を混合して基盤にキャストしても m/z 217 のシグナルは検出されなかった。一方、抗体修飾ナノ粒子を用いた場合は m/z 215、 m/z 217、 m/z 219 にはっきりしたシグナルが観察され、 AgPd^+ の脱離が確認された。 AgPd^+ イオンが抗原抗体反応のレポーターイオンになることを確認できた(図 1 2)。粒子濃度を変えて m/z 217 のシグナル強度をプロットした結果を図 1 3 に示す。粒子濃度 4.4×10^{-12} M の溶液を混合した場合まではシグナルを検出できた。キャストした溶液は 25 μL であり、試料中のナノ粒子量は 2 種類の合金ナノ粒子についてそれぞれ約 10^{-16} mol である。

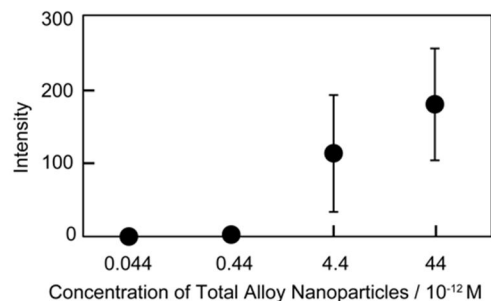


図 1 3 複合体を形成したナノ粒子の濃度と AgPd^+ イオン強度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mio Tameike, Takuro Niidome, Yasuro Niidome, and Junichi Kurawaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Novel Photoluminescent Gold Complexes Prepared at Octanethiol-Water Interfaces: Control of Optical Properties by Addition of Silver Ions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1875-1881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20210064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Nishi and Yasuro Niidome	4. 巻 38
2. 論文標題 Anionic Gold Ions Desorbed from Gold Nanorods and Nanospheres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 443-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.21N027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahiro Fukagawa, Yasuro Niidome	4. 巻 473
2. 論文標題 Mass Signal Intensity of Ag ²⁺ Ions Desorbed from a Single Gold-Silver Core-Shell Nanorod	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 116795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijms.2021.116795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 祝迫 健人, 新留 康郎	4. 巻 71
2. 論文標題 ナノ材料の体内動態を明らかにする金ナノロッドマスペローブ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 153-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maiko Akasaka, Tomoki Nishi, Yasuro Niidome	4. 巻 -
2. 論文標題 Gold-Silver and Gold-Palladium Alloy Nanoparticles as Mass-Probes for Immunosensing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Nishi, Daiki Muko, Janice B. Rabor, and Yasuro Niidome	4. 巻 93
2. 論文標題 Reproducible Ionization of Gold Nanospheres and Nanostars in Gelatin Sections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 58-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Inoue, Ohji Niihara, Janice B. Rabor, Takanori Ikenaga, Masanori Kasai, Yasuro Niidome	4. 巻 48
2. 論文標題 Gold Nanorod-Tags in Mucous Membrane of a Zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1488-1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Janice B. Rabor, Koki Kawamura, Junichi Kurawaki, and Yasuro Niidome	4. 巻 144
2. 論文標題 Plasmon-Enhanced Two-Photon Excitation Fluorescence of Rhodamine 6G and Eu-diketonate complex by Picosecond Diode Laser	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 4045-4050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9an00247b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 北里 光智、牧野 隆啓、新留康郎
2. 発表標題 SALDI-MSを用いた生体内金属ナノ粒子の動態調査
3. 学会等名 南日本分析化学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川本 泰成、新留康郎
2. 発表標題 質量分析を用いた金銀合金ナノ粒子の動態
3. 学会等名 南日本分析化学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤坂 舞子、新留康郎
2. 発表標題 Mass-Tagを用いた多色イメージングに要する金属ナノ粒子の開発
3. 学会等名 南日本分析化学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森山 賢太、新留康郎
2. 発表標題 銀シェル金パラジウム合金ナノ粒子から脱離する金属イオンの質量分析
3. 学会等名 南日本分析化学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 一紀、新留康郎
2. 発表標題 金銀合金ナノ粒子の酸化還元挙動
3. 学会等名 南日本分析化学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西 朋紀、池永 隆徳、笠井 聖仙、新留 康郎
2. 発表標題 金属ナノ粒子マスペローブを利用した組織切片中に存在するタンパク質の高感度イメージング
3. 学会等名 第80回応用物理学学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mio Tameike、Yasuro Niidome
2. 発表標題 Synthesis and Size Fractionation of Thiol-Protected Binary Clusters
3. 学会等名 5th NDSU-KU Joint Symposium on Biotechnology, Nanomaterials and Polymers, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Makino、Yasuro Niidome
2. 発表標題 Preparation of Polymer Surface Modified Gold Nanoparticles for Highly Sensitive Bacteria Detection by Mass Spectrometer
3. 学会等名 5th NDSU-KU Joint Symposium on Biotechnology, Nanomaterials and Polymers, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazune Tanaka, Yasuro Niidome
2. 発表標題 Synthesis and catalytic properties of nanoparticles
3. 学会等名 5th NDSU-KU Joint Symposium on Biotechnology, Nanomaterials and Polymers, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maiko Akasaka, Yasuro Niidome
2. 発表標題 Investigation of inhomogeneous distribution of gold nanoparticles on gelatin slices
3. 学会等名 5th NDSU-KU Joint Symposium on Biotechnology, Nanomaterials and Polymers, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuro Niidome
2. 発表標題 Colloidal Gold Nanoparticles Used as a Mass-probe in a Living Body
3. 学会等名 5th International Kyushu Colloid Colloquim (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 検出キット及び検出方法	発明者 新留康郎	権利者 国立大学法人 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/001528	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 検出キット及び検出方法	発明者 新留康郎	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-006270	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------