

別添1 厚生労働科学研究費補助金研究年度終了報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

抗原応答ゲート膜を用いた超高速イムノクロマト法の開発に関する研究

平成20年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 伊藤 大知

平成21(2009)年 4月

別添2 厚生労働科学研究費補助金研究年度終了報告書目次

目 次

I. 総括研究年度終了報告 抗原応答ゲート膜を用いた超高速イムノクロマト法の 開発に関する研究	-----	1
伊藤大知		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	44

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業研究事業）  
（総括）研究年度終了報告書

抗原応答ゲート膜を用いた超高速イムノクロマト法の開発に関する研究  
に関する研究

研究代表者 伊藤 大知 東京大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

安心・安全な食品を社会に供給するためには、極低濃度で食品に含まれる有害タンパク質、微生物、農薬などの低分子化合物を、簡便に高速でかつ感度良く検出する手法の開発が必須である。申請者は特定のイオン濃度に選択的にかつ敏感に応答して自律的に、膜細孔径を200nmから0nmまで閉める膜の開発に成功している。この膜は厚さ20~200 $\mu\text{m}$ 、200nmの細孔径を持つ多孔基材の細孔表面に特定サイズのイオンを捕捉するクラウンエーテルと、この分子刺激に応答して体積を変化させるpoly-NIPAM (N-isopropylacrylamide) をグラフト共重合したものである。本研究ではクラウンエーテルの代わりに抗体を固定して、抗原を抗体によって選択的に捕捉して細孔が閉まる抗原ゲート膜を新たに作製し、イムノクロマト法に応用する。図3に示すように抗体固定金コロイドで標識抗原が抗原ゲート膜を通過するように配置すると、抗原はゲート膜に捕捉され、膜細孔が閉まるので透過側に通過できない。一方抗原がない場合はゲート膜細孔が開いたままなので、金コロイドが膜を通過し透過側が着色する。イムノクロマト法では金コロイドが長距離を移動するのに対し、本方法では厚さ20 $\mu\text{m}$ 程度の膜を透過するだけで判定ができるので、測定時間の大幅な短縮が可能で、キットの大幅な小型化が期待できる。さらに金コロイドが保持する水和量を制御することにより、NIPAMの抗原に対する応答感度を向上させ、現在のイムノクロマト法よりも高感度を実現する。

平成20年度は、単分散金ナノコロイドの合成に成功し、さらにこれへの物理吸着による抗体の固定と末端にチオール基を持つポリエチレングリコール鎖の固定に成功した。また温度応答性を持つpoly-NIPAM鎖と抗体をFabのコンジュゲイトにもほぼ成功している。さらに抗体ゲート膜作製に備え、ビオチン固定NIPAMグラフト膜の作製、NIPAMグラフト膜からのグラフト鎖の単離と解析にも成功した。平成21年度は、抗原をブリッジにしたサンドイッチ抗原抗体反応によるリニアチェーンNIPAMと親水化金コロイドの相互作用を詳細に明らかにし、膜細孔中でのナノ構造設計指針を確立する。さらに、抗原応答ゲート膜の作製と金コロイドの透過特性に重点的に取り組み、新規イムノクロマト法の設計指針確立し、実際の性能をデモンストレーションする。

伊藤大知・東京大学大学院  
医学系研究科・准教授

#### A. 研究目的

安心・安全な食品を社会に供給するためには、極低濃度で食品に含まれる有害タンパク質、微生物、農薬などを、簡便に高速でかつ感度良く検出する手法の開発が必須である。この用途として ELISA 法や HPLC 法などが用いられてきたが、測定時間が長く、高価な測定装置を必要とするため、簡便な手法とはなっていない。一方で近年、イムノクロマト法 (Figure A-1) による簡便な検査が広まってきた。しかしさらに高速で、検出感度が高く、望ましくは濃度に関する半定量性も備えていることが望ましい。

申請者は特定のイオン濃度などに選択的にかつ敏感に応答して自律的に、膜細孔径を 200nm から 0nm まで閉める膜の開発に成功している。この膜は厚さ 20~200 $\mu$ m、200nm の細孔径を持つ多孔フィルムの細孔表面にクラウンエーテルなどのレセプター分子を固定し、このリガンド刺激に応答して体積を変化させる poly-NIPAM (N-isopropylacrylamide) をグラフト共重合したものである。一連の研究は他に類する研究がなく、国際的にも獨創性を高く評価されている。

本研究ではこのナノ構造制御の知を生かして、ビオチン・NIPAM 固定膜にアビジンを介して抗体を固定して抗原を

抗体によって選択的に捕捉して細孔が閉まる抗原ゲート膜を新たに作製し、イムノクロマト法に応用する。抗体固定金コロイドで標識された抗原が抗原ゲート膜を通過するように配置すると、抗原はゲート膜に捕捉され、膜細孔が閉まるので透過側に通過できない。一方抗原がない場合はゲート膜細孔が開いたままなので、金コロイドが膜を通過し透過側が着色する。従来のイムノクロマト法では金コロイドが長距離を移動する必要があるのに対し、本方法では厚さ 20 $\mu$ m 程度の膜を通過するだけで判定ができるので、測定時間の大幅な短縮が可能である (Figure A-2)。また本研究のコンセプトにおいて、金コロイド固定抗体と NIPAM 固定抗体のサンドイッチ抗体抗原反応により NIPAM が膨潤・収縮することを示すことも、ポリマー物性科学の見地からも獨創的な点である。

#### B. 研究方法

目標を達成するために、平成 20 年度には、抗原ゲート膜の作製の基盤を築くこと、金コロイドの作製法を確立することを目標とした。

申請者の既往の研究から、クラウンエーテルに大量の水和水とともにイオンが配位して、この刺激で NIPAM 鎖が膨潤することがわかっている。このため抗体と金コロイド標識抗原が結合した時に、金コロイド標識抗原が大量の水和水を保持していれば、少数の抗原が結合しただけで大量の水和水がポリマーに取り込まれ、NIPAM 鎖が膨潤することが

期待される。すなわち応答感度の向上に必須な増幅効果は、金コロイドから持ち込まれる水和水の量に依存する。このため金コロイド表面にも PEG などの親水性ポリマーをグラフトすることによって大量の水和水を保持させることにより応答感度が向上すると考えられる。この時親水性ポリマーが抗原と金コロイドに結合してある抗体の抗原抗体反応を阻害しないように構造制御を行う必要がある。

さらに当初に研究計画に加えて、追加的に末端に抗体 Fab を持つ NIPAM リニアポリマーの合成を試みた (Figure A-3)。そもそも、金コロイド固定抗体と NIPAM 固定抗体のサンドイッチ抗体抗原反応により NIPAM が膨潤・収縮することを示すことも重要かつ独創的であり、新規に合成したこのポリマーにより、基礎原理を検証する。

また抗原ゲート膜の作製の基盤を構築するために、ビオチンゲート膜の作製を行った。ビオチンはアビジンと分子間相互作用により強固に結合する。このビオチンモノマーと NIPAM の共重合グラフト膜を作製し、次年度アビジンを介してビオチン化抗体と反応させ、抗原ゲート膜を基礎築くことを目標とした。

なお本研究では特別に人権・動物愛護倫理面の配慮が必要となるような実験計画は含まれていない。

## C. 研究結果

### C-1. 金ナノ粒子の作製結果

#### C-1-1. 概要

金ナノ粒子の合成を行った。合成は塩化金イオンをクエン酸で還元することで行った。クエン酸は弱い還元剤であり、生成するコロイド粒子の粒径は 12nm 以上となり、それ以下の粒径のものは合成することができない。10nm 以下の粒径の金ナノ粒子を合成するためには、水素化ホウ素ナトリウムや黄リンなどのもっと強い還元剤を使う必要がある。本研究では反応物の添加順を 2 通りに変えて行った。将来膜の細孔に入れることを見据え、クエン酸還元法でできる限りの小さい粒径の粒子を合成するようにした。また粒径分布は狭く単分散性ができるだけ高い粒子の合成を目指した。

#### C-1-2. 実験方法

##### C-1-2-1. 金ナノ粒子合成法 1

まず稲澤らの方法 (稲澤晋 東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻 博士論文 2006) を参考にし、金ナノ粒子を合成した。

##### C-1-2-1-1. 試薬

クエン酸三ナトリウムは和光試薬特級、塩化金酸は和光のテトラクロロ金(III)酸四水和物 99.9% を 1g 購入した。

① 納品された塩化金酸は密閉ガラス管に入っている。それをガラスカッターで輪切りにし、中に RO 水を少しずつ注ぎながらサンプル瓶に塩化金酸水溶液として流し出した。RO 水は全部で 10ml 使用した。これにより 0.24M の塩化金酸水溶液を調製した。

② 調製した水溶液を 1.5ml エッペ

ンドルフチューブに分注し、冷凍庫で保存した。

#### C-1-2-1-2.合成(1)

① 合成の前に予め使用するガラス器具、サンプル瓶、温度計、攪拌子を RO 水でゆすぎ、超音波洗浄器にかけて乾燥させておいた。これは器具に汚れやほこりが付着していないようにするためである。このほうが粒子の生成が上手くいきやすい。また、実験で使用する RO 水は、洗浄瓶の水を使わずに RO 水製造装置から直接取るようにした。実験操作中もほこりの混入に注意し、ガラス容器はラップやキムワイプでふたをしながら実験をした。反応を行うトルビーカーと温度計は金ナノ粒子合成専用にした。

② メスシリンダーで RO 水を 50ml 測りとり、200ml トールビーカーに入れた。そこに 0.1M のクエン酸三ナトリウム水溶液を決められた量加えた。サンプル番号と加えるクエン酸三ナトリウム水溶液の量の関係は Table C-1-1 のようにした。

③ Figure C-1 のようにビーカーを Barnstead International 社製ホットスターラーに乗せ、温度計をセットし沸騰するまで攪拌しながら加熱した。設定温度は 210℃、攪拌速度は 300rpm であった。液中に温度分布や濃度分布ができると粒径分布が多分散になりやすいので攪拌はしっかりやる。

④ 沸騰し液温 97℃に達したら、

0.24M の塩化金(III)酸水溶液 25 $\mu$ L をマイクロピペットで一滴ずつ加えた。攪拌を続けながら三分間反応させた。溶液の赤色への変化を確認。

⑤ ホットスターラーからトルビーカーをはずし、反応後の溶液を空冷する。攪拌子を入れないように注意して溶液を 50ml サンプル瓶に移す。

⑥ 次の合成に進む前に温度計の超音波洗浄を 5 分行い、RO 水ですすいだ。

⑦ 金ナノ粒子溶液瓶は冷蔵庫で保存した。

#### C-1-2-1-3.合成(2)

先の方法で金の還元が行われているか、また反応物の添加の方法は重要なのかを調べ、それにより単分散の粒子を合成するために先の実験の条件を変更して実験を行った。その内容を Table C-2 に示す。

#### C-1-2-1-4.DLSによる粒径測定

合成した溶液の粒径を動的光散乱(Dynamic Light Scattering: DLS)を用いて測定した。粒子のブラウン運動から起こる、入射した光の散乱光の時間変化から粒子の大きさを求める方法である。ブラウン運動している粒子に光を照射すると、そのブラウン運動の速度に対応したゆらぎが生じる。その際の揺らぎを観測し、自己相関係数を算出する。

DLS 解析装置は Malvern 社のゼータサイザーナノシリーズを使用した。セルは PS 製ディスポーザブル

セルを用いた。生成した溶液をそのまま測定した。その溶液はほこりを取り除くため、孔径  $0.2\mu\text{m}$  の Minisart RC15 シリンジフィルターを通してセルに入れた。測定は温度  $25^\circ\text{C}$  で行った。測定のために入力するパラメーターだが、吸光度は  $0.05$  で固定した。粘度は水の粘度を用いた。金ナノ粒子の屈折率は、 $0.24$  を用いた。Analysis model は「Multiple narrow modes」を用いた。

#### C-1-2-1-5.紫外可視測定

さらに、生成した溶液を分光光度計でその吸光度を測定した。分光光度計は日立製のものを使用した。セルは石英製マイクロタイプを用いた。生成した溶液をそのまま測定した。スキャンスピードは  $600\text{nm}/\text{min}$  であった。測定は全て合成した当日か翌日に行った。

#### C-1-2-2. 金ナノ粒子合成法2

Pong の研究 (Boon-Kin Pong et al. *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 6281-6287, 2007) を参考にして金ナノ粒子を合成した。

##### C-1-2-2-1.合成(3)

① 使用する試薬と器具、ホットスターラーは前報と同じであった。実験の前に使用する器具は超音波洗浄をしておいた。200ml トールビーカーに 50ml の RO 水、そして  $0.24\text{M}$  の塩化金酸水溶液  $210\mu\text{l}$  を加え、 $1\text{mM}$  塩化金酸水溶液にする。400rpm で激しく攪拌しながら加熱して沸騰させた。

② 沸騰したら (液温  $97^\circ\text{C}$ )、 $38.8\text{mM}$  のクエン酸三ナトリウム水溶液の決められた量をマイクロピペットですばやく加え、攪拌を続けながら 5分30秒反応させた。用いたクエン酸ナトリウムの量は Table C-3 のとおりであった (サンプル 17-19)。

③ トールビーカーをホットスターラーから外し、デュアル瓶に入れた液体窒素に沈め 30秒間つけて急冷した。

④ その後加熱していないスターラーに乗せて完全に冷めるまで攪拌を続けた。

⑤ 溶液が冷めたらサンプル瓶に移し、冷蔵庫で保存した。

⑥

##### C-1-2-2-2.合成(4)

サンプル 19 とクエン酸ナトリウムの量は同じにして、若干操作を変更しての合成も行った。変更点は、サンプル 20 はビーカーにアルミホイルを巻いたこと。サンプル 21 は反応終了後に液体窒素による急冷を行わなかったことである。

##### C-1-2-2-3.合成(5)

合成(3)のやり方を変更して合成を行った。変更点四点あり、反応液に加えるクエン酸ナトリウム水溶液の濃度を2倍の  $77.6\text{mM}$  にすることであった。それから、そのクエン酸ナトリウム水溶液は 50ml のビーカーに入れ、反応液に加えるまでにホットスターラーの上に置いておき温めておき、添加はト

ールビーカーのラップをめくって一気にクエン酸ナトリウム溶液を投入することで行ったことである。もう一つは、反応時間を 15 分間にしたことである。最後は、反応終了後液体窒素で急冷せず、室温で冷めるまで加熱していないスターラーの上で攪拌を続けたことである。クエン酸ナトリウム水溶液を入れたビーカーは、添加の直前までラップでふたをしておいた。その加熱はビーカーの内側が曇る程度までにした。クエン酸ナトリウムの量は Table C-4 のとおりであった。

それから、反応前と反応後の反応容器の重さを量り水の蒸発量を調べ、生成した金ナノ粒子の濃度を求めた。

#### C-1-2-2-4.合成(6)

また合成法を変更して実験した。加えるクエン酸ナトリウムの濃度は 38.8mM にした。添加の方法は合成(5)と同じであった。さらに、反応時間は 5 分 30 秒にした。そしてクエン酸ナトリウム水溶液をいくら加えても、反応液の全量を 60ml で統一した。サンプルごとのクエン酸ナトリウムの使用量は Table C-5 のとおりであった。

#### C-1-2-2-5.DLS による粒径測定

合成した粒子の粒径を DLS で測定した。生成した粒子の濃度が濃いためにシリンジフィルターに通すと粒子がフィルターに詰まってしまうので、DLS 測定の際シリンジフィルターは使わずそのままの溶液で測定した。

#### C-1-2-2-6.紫外可視測定

生成した金ナノ粒子溶液は濃いため、そのままセルに入れると石英に付着してしまう。また吸光度が 1 よりはるかにおおきくなり、再現性が悪くなる。そのため測定は溶液を 10 倍に薄めて行った。ただしサンプル 17 は薄めずに測定した。測定は合成当日か翌日に行った。

#### C-1-2-2-7.金ナノ粒子の TEM 観察

合成したサンプルを透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。TEM は測定試料に電子線を当て、透過してきた電子線による干渉像を拡大して観察する。

- ① サンプル溶液 100  $\mu$ l を 1.5ml エッペンドルフチューブ中で 2 倍に薄めた。
- ② ガラス板にテフロンテープを巻き、そこに応研商事製のエラスチックカーボン支持膜付き銅グリッドを乗せた。この際グリッドの裏表に気をつけた。濃い色の光沢のある面が表であるので、そちらを上にして乗せた。
- ③ マイクロピペットで溶液をグリッドに乗せた。グリッドに直接垂らすのではなく、グリッドから数 mm 離れたテフロンテープ上に 100  $\mu$ l 程度垂らした。
- ④ シャーレにグリッドを乗せたガラス板を入れ、軽くふたをして溶液を自然乾燥させた。乾燥は 30 分ほどで完了し TEM により粒子を観察した。



### C-1-3.結果および考察

#### C-1-3-1. 金ナノ粒子合成法1

##### C-1-3-1-1.合成(1)の結果

合成時の観察事項を述べる。4,5,6では、塩化金酸の滴下後1分ほどで赤く色づき始め、それがどんどん濃くなって最終的に赤紫色の溶液になったことを観察した。一方1,2,3では最初に濃い紫色になり次第に赤が混じり始め最終的に赤色の溶液になった。7,8は、色は濃くならず終始薄い赤紫色のままだった。金ナノ粒子の溶液は無臭であった。合成した金ナノ粒子の写真をFigure C-2に載せる。

DLSによる粒径測定の結果をTable C-6に示す。粒径分布のグラフは、Intensity表示のものとVolume換算のものを使った。Intensity表示は、装置が測定したデータそのままのものである。粒子の光の散乱強度はRayleigh散乱の式で表されるが、この式には粒径の5乗の項があり、粒子が大きいくほど散乱強度は大きくなる。そのためIntensity表示のグラフは実際よりも大きい粒子が小さい粒子より存在割合が大きく表されている。一方、測定の前にDLS装置に入力した屈折率や吸光度や粘度のパラメーターにより、Intensityの粒径分布をVolume換算に直して出力することができる。そのグラフは、ある粒径を持つ粒子の体積の割合である。これも大きい粒子のほうがより大きな割合となる。Volume換算からさらにNumber換算に直すこともできる。これは粒子の個数割合を

示すグラフとなる。ただしNumber換算は誤差が大きくなっている。要するにIntensity、Volume、Numberと粒径分布の描き方を変えていくとそれに従って平均粒径の値は小さくなる。Table C-6からもそのことが確認できる。

DLS測定の結果、サンプル1と3では、大きさ1.8nm程度の小さい粒子が確認された。またサンプル4-8では100nm程度以上の大きな粒子の混入が確認された。

反応液中のクエン酸濃度と生成した粒子の粒径の関係をFigure C-3に示す。Volume換算の粒径は一部のサンプルで値が1nm近くまで小さく比較ができないため、粒径はIntensity表示のものを用いた。グラフより、クエン酸ナトリウム濃度が高くなるにつれて粒径が小さくなることが確認できた。サンプル6-8では使用したクエン酸の量が変わっても生成する粒子はVolume換算で12-13nmであった。この粒径がクエン酸ナトリウムを還元剤とした時作製できる最小の大きさであった。

紫外可視測定の結果をTable C-7に示す。スペクトルは520nm付近にピークがあり、短波長でまた高くなる特徴がある。サンプル7と8は、ピークが他に比べてかなり低く、ブロード化した。

##### C-1-3-1-2.合成(2)の結果

DLS測定の結果をTable C-8に示す。3通りの変更を行ったが、どの方法でも数百nmの大きい粒子が生成してい

るサンプルがあった。クエン酸の量が少ないサンプル 11,14 も合成(1)と変わらず小さい数 nm の粒子が混在している結果であった。唯一サンプル 15 のみピークは単一であった。

合成(2)の結果も加えた反応液中のクエン酸濃度と生成した粒子の粒径の関係も合成(1)とだいたい同じ傾向だった。

紫外可視測定の結果も合成(1)と同じく、クエン酸の量が多かったサンプル 10 と 16 のピークは低く、ブロード化した。

#### C-1-3-1-3. 合成法 1 に関する考察

サンプル 1,3 では 2nm 程度の小さな粒子が生成している。これはクエン酸による還元が上手くいかず粒子が成長しなかったことが原因と考えられる。クエン酸ナトリウムを 180  $\mu$ l 用いた場合、塩化金酸との mol 比が 3:1 となる。サンプル 1,3 は用いたクエン酸ナトリウムの量が 60  $\mu$ l, 90  $\mu$ l と少なかつたために、還元が不完全となり小さい粒子が混在することになったと考えられる。それを裏付けるため、常温でクエン酸ナトリウム水溶液と塩化金酸水溶液を混合する実験を行った。常温なのでクエン酸の還元は非常に遅い。数日間かけて溶液の色はだんだん強くなっていたが色は赤くならず常に紫色だった。DLS 解析によってその粒径は 5nm 以下のものが含まれると判明した。その紫外可視スペクトルも、ピークはブロード化し、最大吸収波長は 569nm であり紫色の透過光と一致した。つまり還元剤による塩化金イオン

の還元が遅いと粒子は大きく成長せず最小で 2nm ほどにとどまる。またその透過光は赤紫でなく紫色となる。水素化ホウ素ナトリウムを還元剤として作製した、粒径 2nm ほどの粒子の溶液の色は濃い赤色をしている。なので今回の還元が遅いために生成した小さい粒子は、水素化ホウ素ナトリウムを用いて合成した粒子とは違うものであると考えられる。

クエン酸ナトリウムを多く用いたサンプルでは、吸収ピークが高くならない傾向があった。また 260nm 付近の段になっている部分もなく急激にスペクトルが縦線になっている。つまり粒子表面に塩化金が吸着していないということである。この理由の詳細は不明だが、クエン酸の濃度が関係すると思われる。クエン酸が多いために成長途中の粒子を覆ってしまい、塩化金酸が近づきにくくなる可能性がある。また、180-540  $\mu$ l のクエン酸ナトリウムを用いたサンプルでは合成中に色が紫色になることはなかった。既往の研究 (Boon-Kin Pong et al. *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 6281-6287, 2007) から、これらはサンプルの成長粒子は、合成中に金ナノクラスターを形成していないということになる。クエン酸ナトリウムを 60-90  $\mu$ l 使用したサンプルは、合成中の溶液は紫色を経ている。これらは金ナノクラスターを形成していたということである。金ナノクラスターは粒子同士の接触により形成するため、多くのクエン酸ナトリウムを用いたサンプ

ルは成長粒子同士の接触が妨げられている、もしくは接触しても粒子が合体しないと考えられる。それはクエン酸ナトリウムが多く含まれることが起因となっているだろう。金ナノクラスターを形成しないことは同じでも、180  $\mu$ l とそれより多く使ったもの間に吸光度の相違があった。これもクエン酸ナトリウムの量が2倍以上になったことによると考えられる。

紫外可視スペクトルの 200nm 切片はサンプルによって異なるが、これはサンプルに含まれるクエン酸ナトリウムの濃度を反映している。

本研究の稲澤らの方法を参考にした合成では、反応物の添加順序、反応時間を変更して実験したが、大きい粒径の粒子はどのやり方でも依然生成してしまい、原因はわからなかった。また、呈色性の再現性の乏しいということが判明した。本研究成功のためにも、より再現性があり、単分散に近い均一な粒径の粒子を合成するため、金ナノ粒子の合成法を大きく変える必要があり Pong の方法を参考に、新たな合成法を試みた。

### C-1-3-2.金ナノ粒子合成法2

#### C-1-3-2-1.合成(3)の結果

生成した金ナノ粒子溶液の写真を Figure C-4 に載せる。DLS での粒径測定の結果を Table C-9 に示す。その粒径分布は Figure C-5,6 である。クエン酸ナトリウムの量が増えると粒径が小さくなることが確認できた。サンプル 18

では、約 1.5nm の小さい粒子が混入した。

紫外可視測定結果、ピーク位置はサンプル 17 が 631nm、サンプル 18 が 524nm、サンプル 19 が 520nm であった。

#### C-1-3-2-2.合成(4)の結果

DLS による粒径測定の結果、合成(3)の結果と3つのサンプルはほとんど同じ粒径分布を持っていることを確認した。

#### C-1-3-2-3.合成(5)の結果

DLS による粒径測定の結果を Table C-10 に示す。サンプル 24 で小さい粒子が混在していることがわかった。

#### C-1-3-2-4.合成(6)の結果

合成した溶液の写真を Figure C-7 に示す。DLS による粒径測定の結果を Figure C-8 に示す。ピークは全て単一ピークとなった。

紫外可視測定の結果を Figure C-9 に示す。サンプル 26 だけ吸光度が大きいのは、溶液を 10 倍ではなく 5 倍に薄めたからである。

#### C-1-3-2-5. 金ナノ粒子の TEM 観察の結果

サンプル 26 の TEM 画像を Figure C-10 に示す。粒子の存在が確認でき、また真球に近いと判明した。画像解析により粒径は 14nm であること、アスペクト比は 1.1 であることを確認した。共にそのヒストグラムも載せる。

#### C-1-3-2-6. 合成法2に関する考察

Pongの方法をベースに、新たな方法で合成した金ナノ粒子は、反応液中の塩化金酸の濃度が稲澤らの方法のおよそ8倍の約0.018wt%である。そのため生成した溶液の色は濃い。さらに、合成法2によって、数百nmの大きい粒子は混合せず、粒径分布のせまい粒子が合成できたということである。この方法で成功した理由は、液体窒素で急冷することで還元反応を停止させ、粒子の凝集を抑えたためと考えた。しかし合成(4)の結果から、液体窒素で冷やさなくても、大きい粒子は混在せず、また粒径もあまり変わらないことが判明した。またピーカーにアルミホイルを巻くことも何も効果がなかった。そのため液体窒素を使ったことでなく、反応終了後も攪拌を続けたことが単一ピークの粒径分布が得られた要因と考えられる。

またサンプル19の粒子の粒径の計時変化から、2ヶ月以上経っても、凝集しての粒径の変化はなく、安定に粒子が存在していることが確認できた。

合成(6)では、サンプル25,26の溶液の色は、それまでのサンプルよりも呈色性が低下した。サンプル18と比べるとよくわかるが、サンプル25,26の金原子の濃度は、サンプル18に対して11/12の濃度であり、濃度が低いために色が薄くなっているわけではない。またDLSによる粒径も、サンプル18の26nm (Volume換算) に比べて、16,17nmと小さくなっている。Pongらの報告 (Boon-Kin Pong et al. *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 6281-6287,

2007) では、反応物の濃度が同じやり方で13-15nmの粒子の合成が報告されている。サンプル26はTEM観察で粒子径14nmと判明しており、この値は文献値に近い。また反応の観察で、濃い赤紫が薄くなったことから、今まで濃いままで止まっていたものがさらに進化したものと推測される。しかしサンプル27は溶液の色は薄いが、サンプル25,26よりも加えたクエン酸の量が多いにも関わらず、粒径は大きかった。サンプル25,26は、塩化金酸とクエン酸ナトリウムの比が1:3.88であった。Frensらの研究 (G. Frens, *Kolloid-Z. u. Z. Polymer*, 250, 736-741, 1972) では塩化金酸とクエン酸ナトリウムの比が1:2.66で16nmの粒子が生成している。このため、サンプル25,26のクエン酸ナトリウムの量5mlより多く加えても粒径が変化しない領域であると考えられる。またクエン酸ナトリウム水溶液を10ml用いたサンプル28は、溶液の色が黒が強くなりサンプル19などと同じになった。

また追加実験で、クエン酸ナトリウム水溶液の量を3mlと2mlにすることで粒径が31nmのものとは46nmのものを合成したが、これらは凝集に関して不安定で、次の章の抗体固定の実験では凝集体を作ってしまうやすいことがDLSで確認できた。そのためこれらを用いることは適当でない。

最終的に、5mlのクエン酸ナトリウムを加えたものをその後6サンプル合成し、それら全ての溶液でサンプル26のような呈色性と粒度分布になった。この濃度

条件では再現性が完全にとれ、DLS による粒径測定では粒径分布が狭い、均一な金ナノ粒子が得られた。

#### C-1-4. 金ナノ粒子作製のまとめ

Pong らの方法をベースにして新たな金ナノ粒子合成法（合成法2）を確立し、粒子径分布が狭い、約 14nm 程度の粒子径を持つ、金ナノ粒子の安定的な合成法を確立した。本研究提案の実現のためには、金ナノ粒子が膜を透過する必要がある。このために最適な小さな粒子径と、粒度分布、また真球状の形状を持つ粒子の作製に成功し、次年度以降の研究につながる結果が得られた。

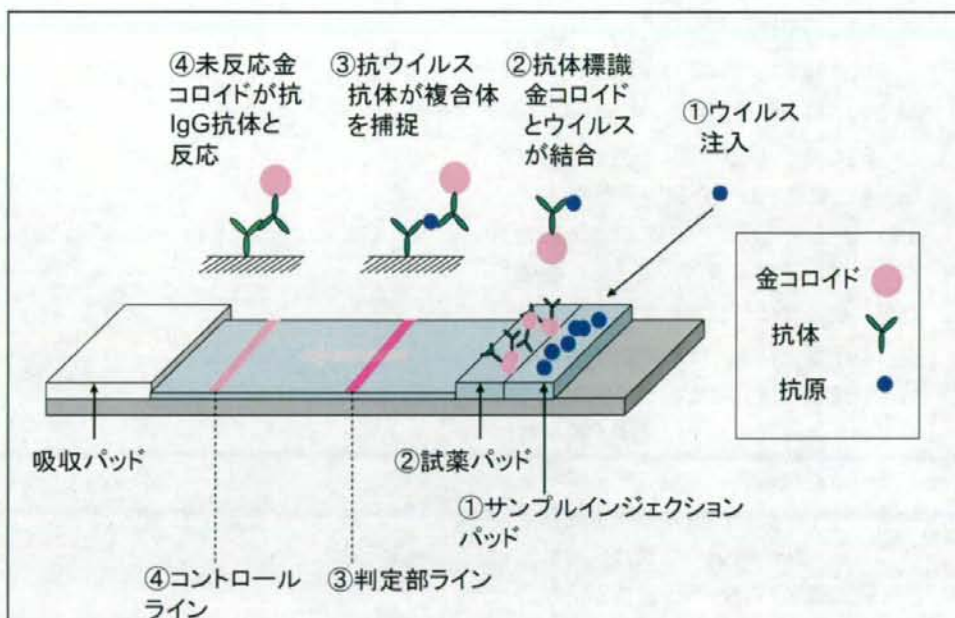


Figure A-1 イムノクロマト法

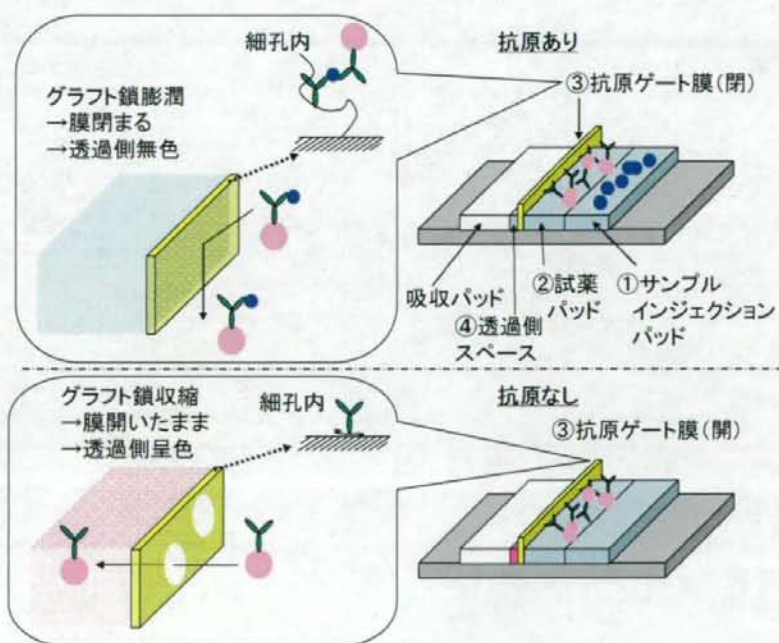


Figure A-2 本研究のコンセプト

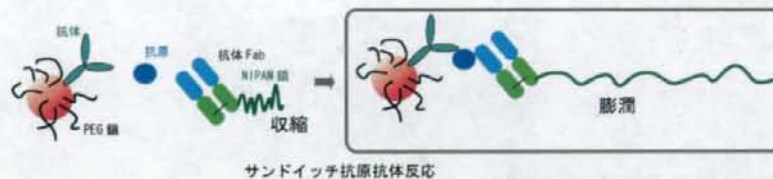


Figure A-3 サンドイッチ抗原抗体反応による NIPAM 鎖の膨潤・収縮の実証

Table C-1. 合成サンプルそれぞれのクエン酸ナトリウムの量 合成(1)

サンプル	
番号	用いた 0.1M クエン酸ナトリウム水溶液の量[ $\mu$ l]
1	60
2	90
3	90
4	180
5	180
6	360
7	360
8	540

Table C-2. 合成(2)での変更点とクエン酸ナトリウムの量

サンプル		用いた 0.1M クエン酸ナトリウム水溶液の量[ $\mu$ l]
番号	変更内容	
9	塩化金酸水溶液を一気に加える	180
10	塩化金酸水溶液を一気に加える	360
11	反応時間を 30 分にする	60
12	反応時間を 30 分にする	90
13	反応時間を 30 分にする	360
14	塩化金酸とクエン酸ナトリウムの順番を逆にする	90
15	塩化金酸とクエン酸ナトリウムの順番を逆にする	180
16	塩化金酸とクエン酸ナトリウムの順番を逆にする	360



Figure C-1. 金ナノ粒子合成装置

Table C-3. 合成サンプルそれぞれのクエン酸ナトリウムの量 合成(3)

サンプル	
番号	用いた 38.8mM クエン酸ナトリウム水溶液の量[ml]
17	1
18	5
19	10

Table C-4. 合成サンプルそれぞれのクエン酸ナトリウムの量 合成(5)

サンプル	
番号	用いた 77.6mM クエン酸ナトリウム水溶液の量[ml]
22	2.5
23	4
24	5



Table C-5. 合成サンプルそれぞれのクエン酸ナトリウムの量 合成(6)

サンプル	
番号	用いた 38.8mM クエン酸ナトリウム水溶液の量[ml]
25	5
26	5
27	8
28	10



Figure C-2. 合成した金ナノ粒子溶液  
(数字はサンプル番号)

Table C-6. DLS による粒径測定結果

サンプル 番号	用いた 0.1M クエン酸ナ トリウム水 溶液の量 [ $\mu$ l]	Intensity			Volume	
		peak	size[nm]	%	size[nm]	%
1	60	peak1	2.2	10.9	2.0	99.8
		peak2	4.4	8.1	31	0.2
		peak3	40	81.1		
2	90	peak1	31	100.0	26	100
3	90	peak1	1.7	7.5	1.7	99.8
		peak2	31	92.5	28	0.2
4	180	peak1	26	89.3	21	99.8
		peak2	456	10.7	490	0.2
5	180	peak1	24	59.3	22	98.4
		peak2	288	38.8	306	1
6	360	peak1	15	53.7	13	99.5
		peak2	150	43.8	137	0.3
7	360	peak1	14	56.4	13	99.8
		peak2	187	43.6	189	0.2
8	540	peak1	14	35.5	12	99.3
		peak2	81	13.3	72	0.3
		peak3	349	51.2	391	0.4

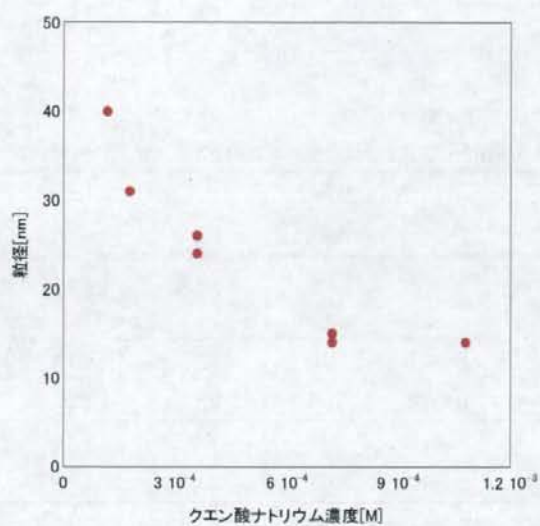


Figure C-3. クエン酸ナトリウム 対 粒径プロット

Table C-7. 紫外可視測定結果 合成(1)

サンプル番号	最大吸収波長[nm]	吸光度
1	526	0.398
2	521	0.471
3	522	0.500
4	528	0.436
5	517	0.406
6	518	0.423
7	534	0.097
8	534	0.087

Table C-8. DLS による粒径測定結果 合成(2)

サンプル番号		Intensity		Volume	
		size[nm]	%	size[nm]	%
9	peak1	27	76.3	19	99.6
	peak2	317	23.7	333	0.4
10	peak1	19	72.9	17	99.8
	peak2	205	27.1	209	0.2
11	peak1	1.5	6.2	1.5	99.8
	peak2	36	93.8	29	0.2
12	peak1	28	87.9	23	99.8
	peak2	212	12.1	217	0.2
13	peak1	40	86.1	30	99.5
	peak2	169	13.9	187	0.5
14	peak1	3.1	18.5	3.0	99.8
	peak2	43	81.5	40	0.2
15		24	100	21	100
16	peak1	24	87.0	21	99.8
	peak2	242	13.0	252	0.2

Table C-9. DLS による粒径測定結果 合成(3)

サンプル番号		Intensity		Volume	
		size[nm]	%	size[nm]	%
17	peak1	135	100	120	100
18	peak1	1.5	14.6	1.5	99.9
	peak2	31	85.4	26	0.1
19	peak1	15	100	14	100