

Figure C-6. DLS 測定結果 (サンプル 17-19)

Volume 換算

Table C-10 DLS による粒径測定結果 合成(5)

サンプル番号		Intensity		Volume	
		size[nm]	%	size[nm]	%
22	peak1	25	100	21	100
23	peak1	20	14.6	16	99.9
24	peak1	0.7	12.2	0.7	100
	peak2	23	100		

Table C-11. DLS による粒径測定結果 合成(6)

サンプル番号		Volume	
		size[nm]	%
25	peak1	16	100
26	peak1	17	100
27	peak1	21	100
28	peak1	16	100

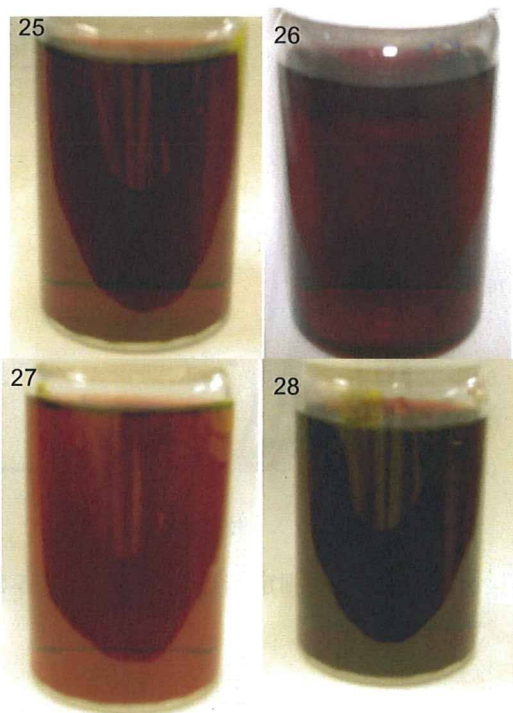


Figure C-7. 合成した金ナノ粒子溶液
(数字はサンプル番号)

Table C-12. 紫外可視測定結果 合成(6)

サンプル番号	最大吸収波長[nm]	吸光度
25	519	0.319
26	518	0.676
27	522	0.221
28	521	0.327

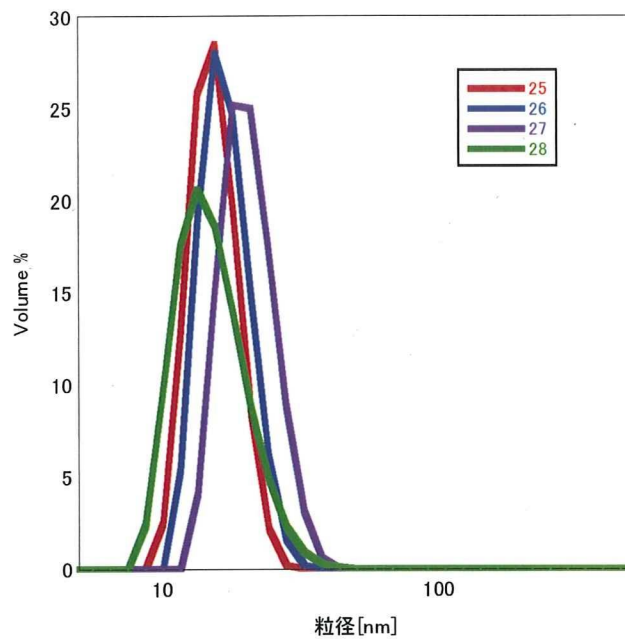


Figure C-8. DLS 測定結果 (サンプル 25-28)
Volume 換算

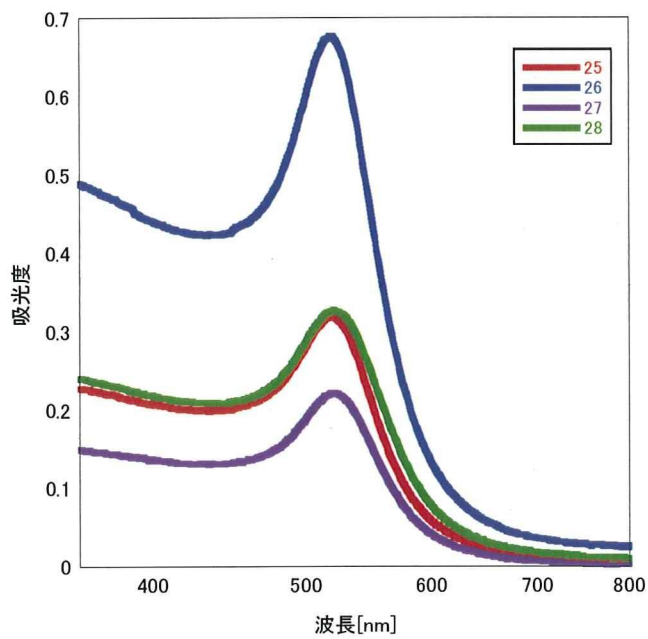
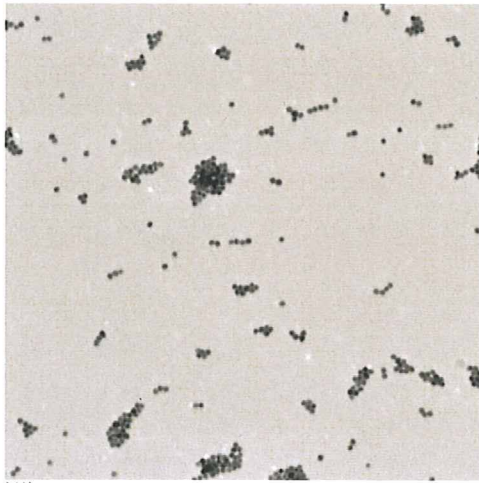
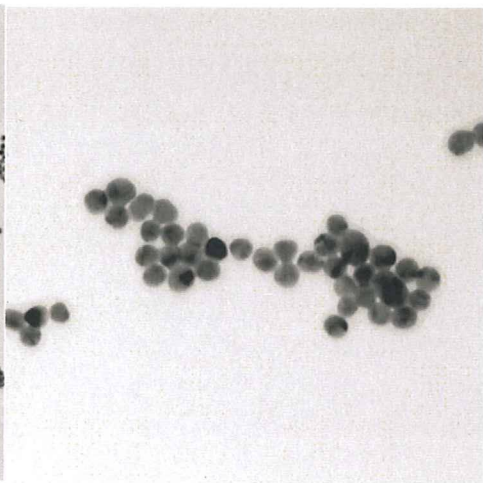


Figure C-9. 紫外可視スペクトル (サンプル 25-29)



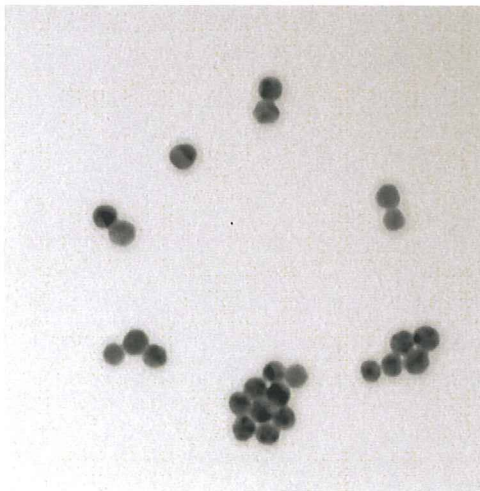
3.114
Print Mag: 163000x @ 7.0 in
15.04 02/12/09

100 nm
HV: 180kV
Direct Mag: 17000x



4.114
Print Mag: 671000x @ 7.0 in
15.12 02/12/09

20 nm
HV: 180kV
Direct Mag: 70000x



5.114
Print Mag: 671000x @ 7.0 in
15.14 02/12/09

20 nm
HV: 180kV
Direct Mag: 70000x

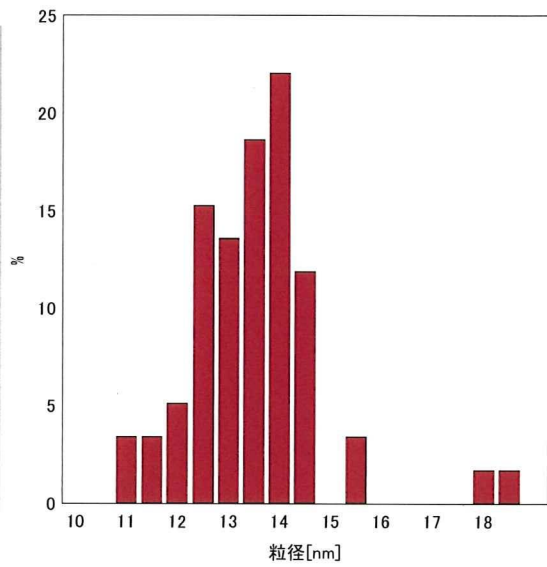


Figure C-10. サンプル 26 の TEM 画像とヒストグラム

左上: 17000 倍、右上: 70000 倍、下: 70000 倍

C-2. ビオチンモノマー・NIPAM 共重合膜 (アビジンゲート膜) の作製結果

C-2-1. 概要

Figure C-2-1 に示す、ビオチンモノマーと NIPAM の共重合膜の作製に行った (C-2-2)。さらに予備的検討として、アビジンとビオチンとの反応性を、アビジンとの反応後の溶液透過実験により検証し、さらにより高い反応性を実現するために、親水性スペーサーをビオチンモノマーに導入することを試みた。

C-2-2. 実験方法および結果

C-2-2-1. ビオチンモノマー・NIPAM 共重合膜の作製

本研究では抗原ゲート膜作製の足がかりとなる、ビオチンモノマー・NIPAM 共重合グラフト膜を作製した。アビジンはビオチンに対し特異性を有し、高い結合定数($K_d = 10^{-15}$)で捕捉する。このた

め、ビオチン導入膜はアビジンを介して、将来抗体を固定できる。ビオチンモノマー(BiotinA)を合成し、ポリエチレン多孔基材を用いて、プラズマグラフト重合法を用い感温性部位 N-isopropylacrylamide (NIPAM)とアビジン認識部位 BiotinA を有する共重合グラフトポリマーを固定し作製した。基材は多孔膜ポリエチレン膜 (最大孔径 150nm、空隙率 17%、膜厚 17 μ m) を用い、仕込みモノマー比は NIPAM: BiotinA = 95: 5mol%とした。BiotinA は FTIR、NMR 及び HPLC により評価し、高純度モノマーであることを確認できた。(収率 85%、白色固体) アビジン認識架橋ゲート膜に関しては重量変化及び呈色反応によって作製の成功を確認した。

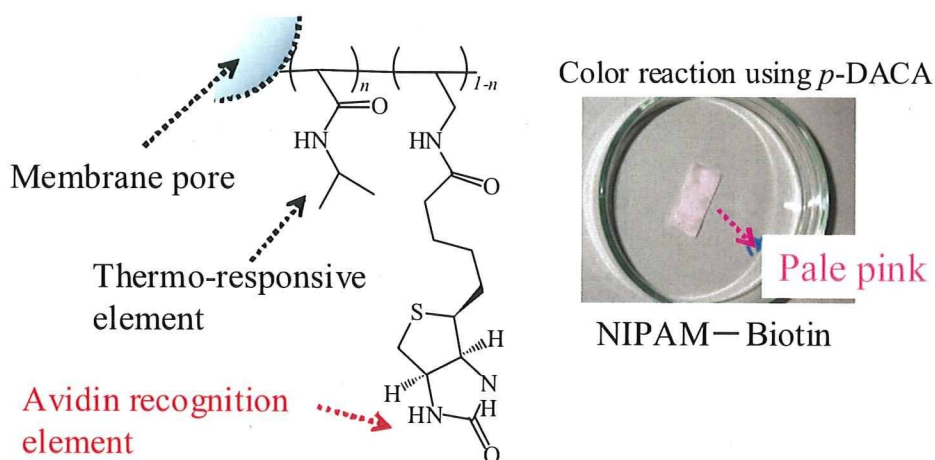


Figure C-2-1. ビオチンモノマー・NIPAM グラフト共重合膜

C-2-2-2. ビオチン導入ゲート膜を用いたアビジン応答性の評価

アビジンの膜への結合性を実証するためにビオチン導入ゲート膜（グラフト率 8.3%）を用い透過試験を行った。Figure C-2-2.に示すようにアビジン結合後（アビジン濃度: $1.7 \times 10^1 \text{ pmol mm}^{-2}$, 透過液: 0.02M Phosphate buffer saline (PBS) + 0.15M NaCl, pH 7.4) 透過流束の減少が確認できた。また、8M グアニジン塩酸塩(pH 1.5)を用いアビジンを解離させることで結合前の透過流束が再現でき、透過流束の減少はアビジン結合による架橋の効果であることが確認できた。さらに、生体分子認

識架橋ゲート膜（グラフト率 9.7%）を用い浸透圧試験を行った。浸透圧試験は 37°C、0.02M PBS (pH 7.4)とし溶質としてPVP (Mw = 360,000) を用い溶質濃度は 10 wt%とした。非特異的生体分子としてアルブミンを用い、アビジンとの選択性を評価した。アビジンおよびアルブミンを添加後（共に $1.7 \times 10^1 \text{ pmol mm}^{-2}$ ）、選択性のある浸透圧出力を観察された。このことから、ビオチン導入ゲート膜は確かにアビジンと結合能を有することを証明した。

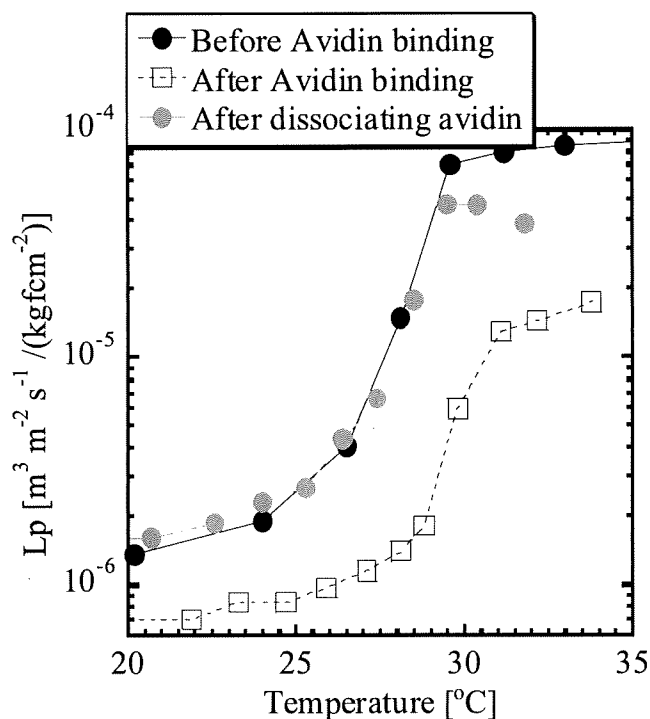


Figure C-2-2. ビオチン導入ゲート膜のアビジン応答性：縦軸単位加圧力あたりの透過流束のアビジン処理前後

C-2-2-3. PEG スペーサー導入 BiotinB

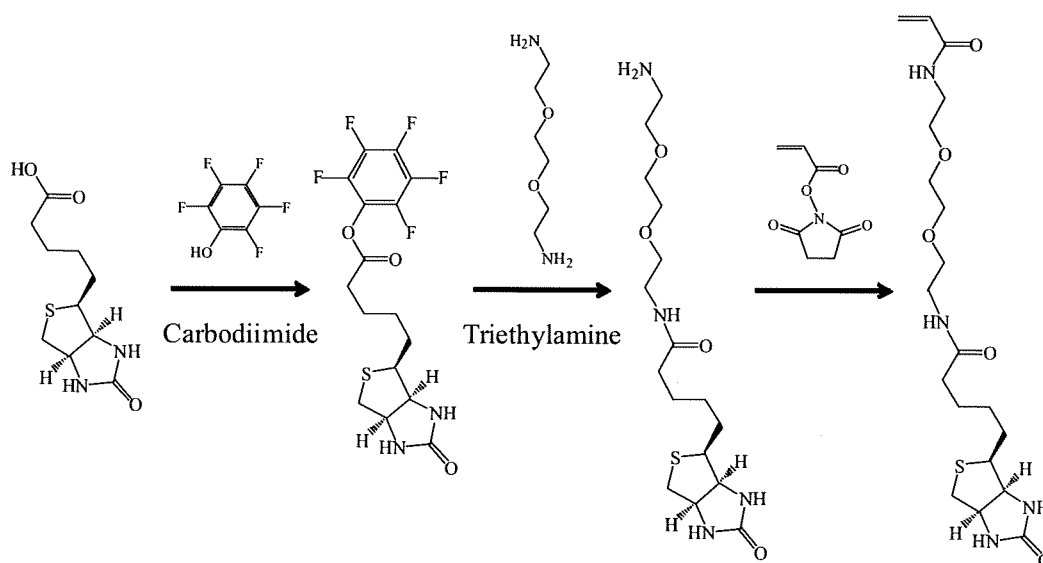
モノマーの作製

BiotinA モノマーを用いビオチン導入ゲート膜のアビジン結合性能の証明に成功した。しかし、ビオチンの運動性が十分でなく、その結合能が期待よりも低いこと予想される。そこで、アビジン-ビオチン結合に関し、ビオチン結合部位がアビジン表層から深い位置に存在することに着目し、ビオチンモノマーにPEG スペーサーを導入した BiotinB を新たに合成した。BiotinB は既往の文献に従い、Scheme 1 に示すように3段階反応で合成を行い、FTIR、NMR 及び HPLC により評価し、高純度モノマーであることを確認した。

BiotinB を用い C2-2-1 と同様にプラズマグラフト重合を用いて、アビジン認識架橋ゲート膜を作製した。BiotinA は重合速度が遅いことからグラフト率 12%以上の製膜が困難であったのに対し、BiotinB は 30%以上のグラフト率の製膜に成功しグラフト率のコントロールが可能であることが示された。

このため C-3 章に後述のように分子認識応答性、C-4 章のように金ナノ粒子の透過特性を調べることができる膜の作成に成功した。

C-2-3. ビオチンモノマーB・NIPAM 共重膜の作製とまとめ



Scheme 1. BiotinB モノマーの合成スキーム

C-3. アビジンゲート膜の分子認識応答性の評価

C-3-1. 概要

ビオチンモノマーB と NIPAM の共重合膜 (アビジンゲート膜) を用いて、アビジンを含む様々なタンパク質と反応させた後に、透水実験を行って、アビジンゲート膜がアビジンのみに選択的に応答するかを検証した。

C-3-2. 実験方法および結果

C-3-2-1. アビジンゲート膜のアビジン架橋後の電子顕微鏡観察

グラフト率が 18% のアビジンゲート膜を用いて、アビジンまたはアルブミン濃度 $17 \text{ pmol mm}^{-2}\text{-membrane}$ (1.5 mM) 中に浸漬し、アビジンゲート膜とアビジンを反応させ、膜表面を電子顕

微鏡で観察した (FigC-3-1-1)。

下図に示すように、アビジンで反応した場合は乾燥後に膜面積が小さくなるのがわかる。これは細孔内でアビジンとビオチンが架橋反応を起こし、元の多孔基材膜よりも細孔体積が減少するためと考えられる。膜の伸縮に異方性があるのは、基材膜の延伸により引っ張り強度に異方性があるためと考えられる。

さらに膜表面を電子顕微鏡で観察すると、アビジンと同濃度のアルブミンで処理した場合は、全く膜と反応が起これば明確な膜細孔が観察される。一方でアビジンと反応した場合は、膜細孔が閉塞していることが観察された。

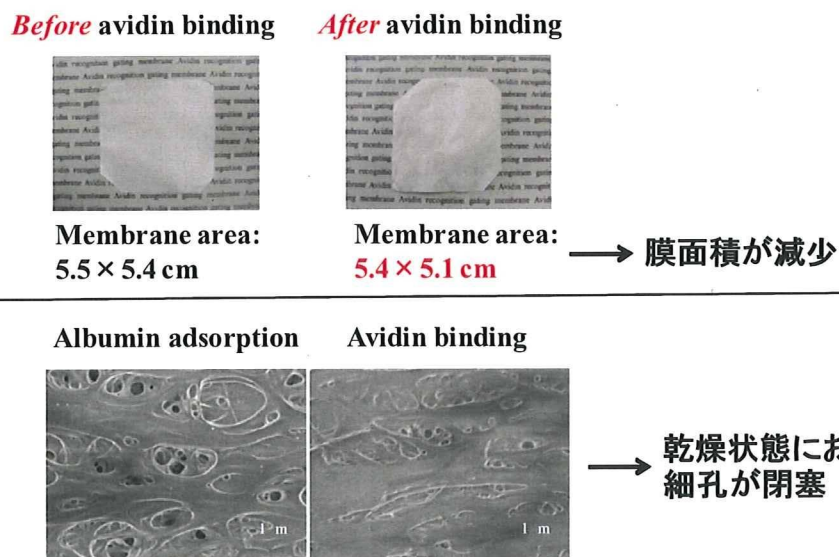


Figure C-3-1. アビジンゲート膜のアビジン応答前後での膜表面観察

C-3-2-2. アビジンゲート膜のアビジン 吸着量の定量

グラフト率が 18%のアビジンゲート膜を用いて、アビジン濃度 $17 \text{ pmol mm}^{-2}\text{-membrane}$ (1.5 mM) 中に浸漬し前後のアビジン濃度変化を測定することによって、アビジンゲート膜と反応したアビジン量の定量を行った。アビジン濃度は UV-vis スペクトルで測定した。(Fig.C-3-2)

アビジン吸着量から細孔 1 本に約 2×10^4 個のアビジンが細孔内の架橋反応に寄与していることが求められた。

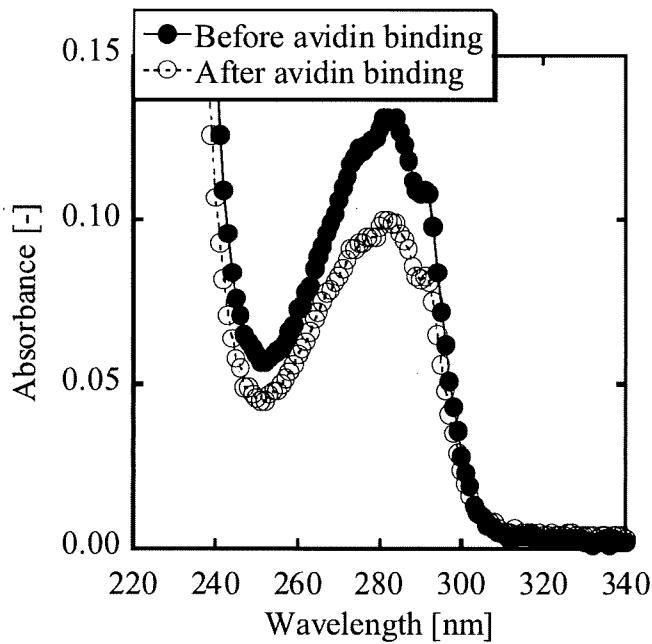


Figure C-3-2. アビジンゲート膜のアビジン吸着実験結果

C-3-2-3. アビジンゲート膜のアビジン 選択的応答性

グラフト率が18%のアビジンゲート膜を用いて、アビジン濃度 $17 \text{ pmol mm}^{-2}\text{-membrane}$ (1.5 mM) 溶液中に浸漬前後の圧力透過透水量を測定した。透水量は、ギアポンプで流速 500 ml で純水を循環加圧しながら、クロスフローセルにセットしたゲート膜から透

過してくる流量を測定し、透過圧力と膜面積で規格化して純水透過係数 L_p として評価した。コントロール実験として同濃度のアルブミンと反応させたアビジンゲート膜についても同様の実験を行った。

結果を Fig.C-3-3 に示す。アビジン及びアルブミンと反応する前のアビジンゲート膜は同様の膜透過流束 L_p を

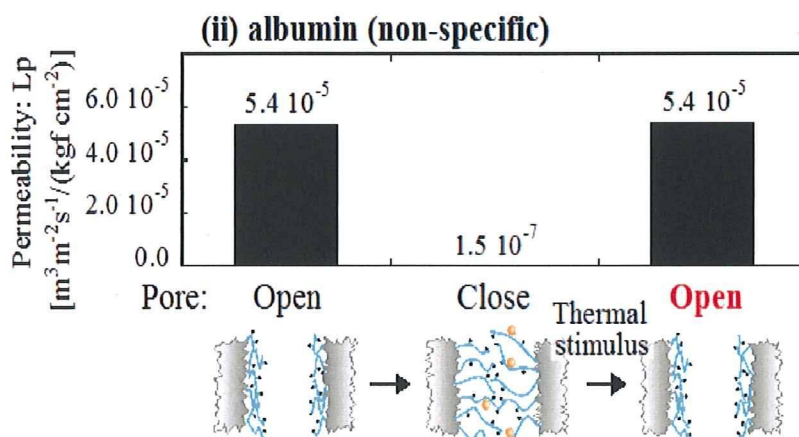
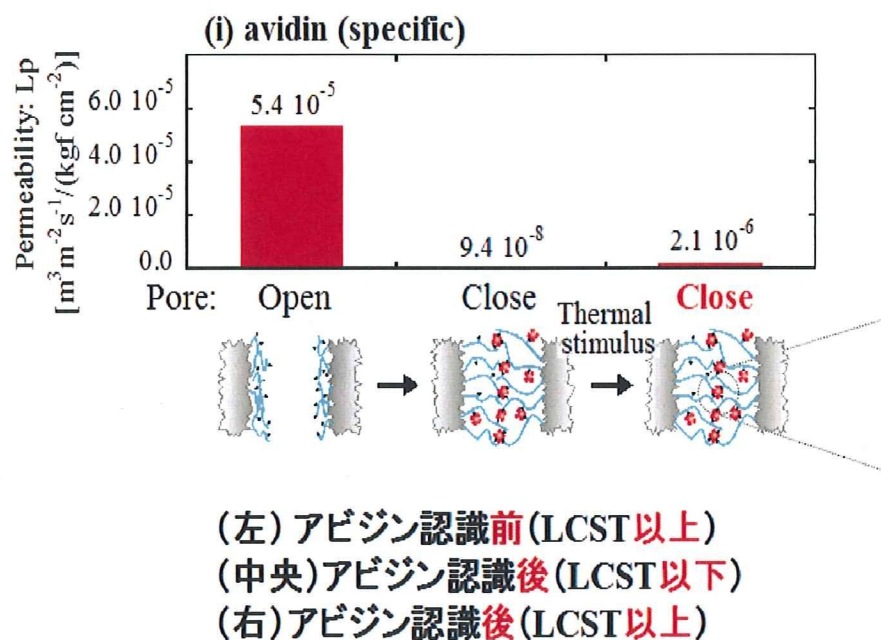


Figure C-3-3. アビジンゲート膜の応答特性

示す。さらにアビジンまたはアルブミンと反応させて、液温が低い状態で L_p を測定すると非常に低い値となる。

さらに液温を高温にして L_p を測定する。アビジンと反応した場合は高温にしても膜が閉塞したままで、 L_p が非常に小さいのに対して、アルブミンと反応させた場合は、 L_p が回復する。これはアビジンゲート膜が細孔内でアビジンとのみ選択的に架橋反応を起こして、アビジンに特異的に応答して膜細孔を不可逆的に閉塞することを示している。

C-3-2-4. アビジンゲート膜の様々なタンパク質に対する応答性

さらにアビジンゲート膜をアルブミン以外の様々なタンパク質と反応させた後、同様の方法で透水実験を行った。

膜細孔中で反応が起こっている場合、アビジンゲート膜は温度応答性を喪失する。一方でアビジンゲート膜が膜タンパクと全く反応していない場合は、膜細孔内で何も起こっていないために、アビジンゲート膜は温度応答性を保持する。このため水温を変化させて透水実験を行うことによって、アビジンゲート膜の分子認識応答性を調べることができる。

結果を Fig.C-3-4 に示す。アビジン以外のタンパク質 (IgG、トランスフェリン、オボアルブミン、リゾザイム) ではいずれも分子認識応答性を示さずアビジンゲート膜のアビジンに対する特異的な応答が確認できた。また膜への非特異的吸着による膜性能の変化も観察されなかった。

アビジン認識ゲート膜B: Filling ratio = 18%
タンパク質溶液: 17 pmol mm⁻²-membrane

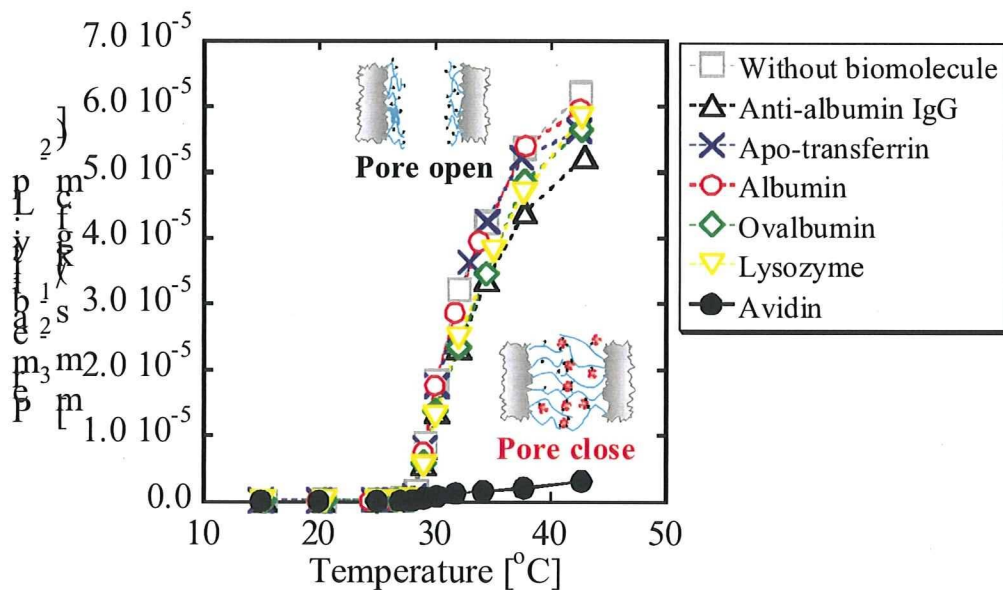


Figure C-3-4. アビジンゲート膜の様々なタンパク質に対する応答特性

**C-3-2-5. アビジンゲート膜のアビジン
吸着量の膜透過流束に及ぼす影響の検
証**

C-3-2-2 によりアビジンゲート膜に
対するアビジン吸着量が測定されてい
る。アビジンを直径7nmの球形を仮
定して、細孔内で結合したアビジンが
空間的に閉塞した体積を減じて生じる
透過流束 L_p をフラックスをハーゲン
ポワズイユ式を仮定して推算した。こ
の結果を Fig.C-3-5 に示す。計算結果は
点線で示されており、アルブミンの細
孔内での反応固定のみでは、 L_p がほ
とんど低下しないことがわかる。この
ために、細孔内でアビジンが架橋点と
して働き、グラフトポリマー鎖が細孔
内で架橋されて、細孔閉塞が起こって
いることが示された。

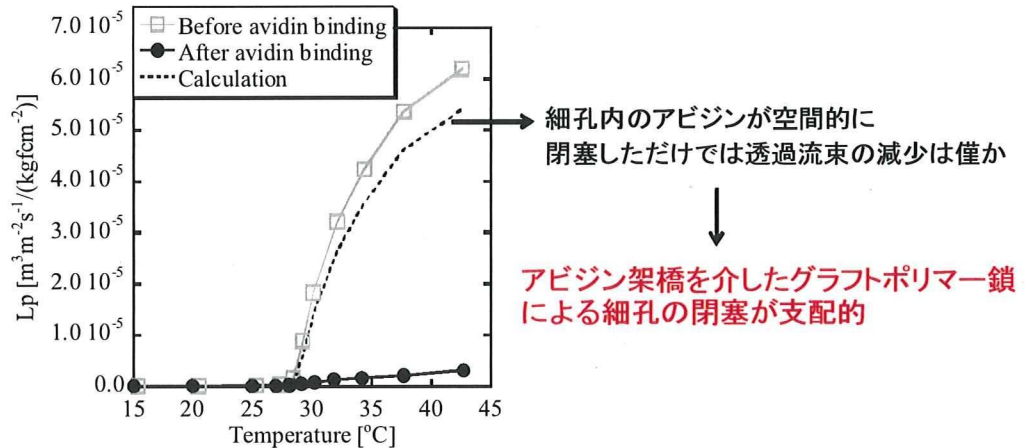


Figure C-3-5. アビジンゲート膜の様々なタンパク質に対する応答特性

C-3-2-6. アビジンゲート膜における PEG スペーサーの影響

研究者らはPEG スペーサーを持たないビオチン A モノマーを用いたアビジンゲート膜と、ビオチンとグラフト主鎖の間にPEG スペーサーを持つビオチン B モノマーを用いたアビジンゲート膜の 2 種類の膜を作製している。この二種類の膜の特性の相違についても検証を行った。

当初アビジン結合部位のポケット深さとビオチンの分子サイズを考慮して、PEG スペーサーを用いることによって、ビオチンモノマーA よりも、ビオチンモノマーB を用いたアビジンゲート膜の方が反応性がより鋭敏になるのではないかと考えた。すなわちより低濃度のアビジンで効率的に細孔内架橋反応が起こると考えた。

異なったビオチンモノマーを用いたアビジンゲート膜の、アビジンとの反

能前後での透過流束 L_p の比を下表 (Table C-3-1) に示す。

グラフト率 (下表での filling ratio) が異なった膜同士の比較であるために推測ではあるものの、アビジンゲート膜に反応するアビジンの量は、モノマーの種類やグラフト率に関わらずほぼ一定となっていることから、膜細孔閉塞に重要な要素は、モノマー構造よりもグラフト率の方が大きく寄与するのではないかと示唆された。

C-3-3. アビジンゲート膜の分子認識応答性のまとめ

以上の検討により、アビジンゲート膜がアビジンにのみ分子認識的に応答して細孔を閉塞することを世界で初めて実証した。さらにモノマー構造よりもグラフト率などの細孔内ナノ構造の方が応答特性に大きく寄与することを示した。

Filling ratio	Biotin	without biomolecules	avidin binding	Change of L_{max} (before) / (after)	The amount of bound avidin in membrane pores ^a
[%]		L_{max} above LCST			
		$[m^3 m^{-2} s^{-1} / (kgf cm^{-2})]$		[-]	$[p mol mm^{-2} \cdot membrane]$
8	A	9.0E-05	1.8E-05	5	4.1
18	B	5.4E-05	2.1E-06	25	3.4
31	B	4.1E-05	1.6E-06	25	4.2

a. Calculated by the concentration change before and after avidin binding measured by UV-vis.

PEGスペーサーによる結合量の有意な差は観察されない

✓ アビジン応答特性は充填率の変化に伴う細孔内部のグラフトポリマーに起因することが示唆

Table C-3-1. ビオチンモノマーA または B を用いた時のゲート膜特性の相違

C-4. アビジンゲート膜の金ナノ粒子透過特性の評価

C-4-1. 概要

ビオチンモノマー-B と NIPAM の共重合膜（アビジンゲート膜）の金ナノ粒子透過特性を評価した。C-1 で合成した金ナノ粒子及び PEG 化金ナノ粒子を用い、C-2,3 で評価したアビジンゲート膜を用いて、アビジンに反応前後のアビジンゲート膜の細孔開閉による金ナノ粒子の透過量の測定を試みた。

C-4-2. 実験方法および結果

C-4-2-1. 基材多孔膜の PEG 未修飾金ナノ粒子透過特性

注入速度: 1mL/h
液温: 36-37°C

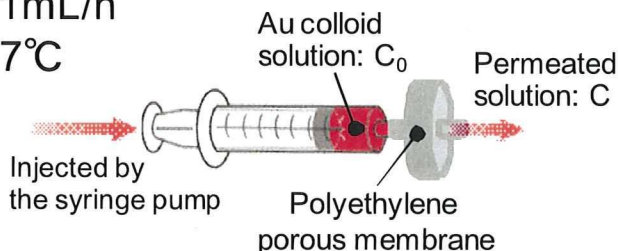
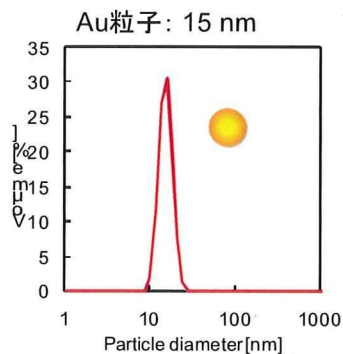


Figure C-4-1. 基材多孔膜の金ナノ粒子の透過実験



H6022, ポリエチレン多孔膜

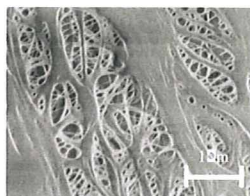


Figure C-4-2. 金ナノ粒子の粒子径と基材多孔膜

濃度が異なる PEG 非修飾金ナノ粒子溶液 (Fig.C-4-3) をシリンジポンプでグラフト重合をおこなう前のポリエチレン多孔膜に透過した (Fig.C-4-1)。金ナノ粒子の透過濃度を UV-vis 測定によって決定し、透過率を求めた。用いた金ナノ粒子のサイズ、及び多孔膜の電子顕微鏡写真を Fig C-4-2 に示す。

透過率は供給液濃度が濃くなるほど透過率が低下し、ある一定以上の濃度になると透過率が 20%程度となってしまい金ナノ粒子が透過できなくなることがわかった (Fig.C-4-4)。

C-4-2-3. アビジンゲート膜の PEG 未修飾金ナノ粒子透過特性

ビオチンモノマーB と NIPAM の共重合膜 (アビジンゲート膜) の PEG 未修飾金ナノ粒子透過特性を評価した。C-4-2-1 で用いた装置と同様の装置を用い、多孔基材膜の代わりにアビジンゲート膜をセットした。用いたゲート膜の重合率は 13~14%である。重合率は基材細孔中のグラフトポリマーの体積分率に相当する。このためグラフト鎖が収縮状態で

は、細孔空孔が存在し、ある程度の金ナノ粒子の透過が期待できる。多孔基材膜での条件検討結果をもとに、注入速度 0.5or1.0mL/h、金ナノ粒子濃度 1.7×10^{-3} wt% (1/10 希釈)、液温: 36-37°Cで透過実験を行った。

しかしながら、PEG 未修飾金ナノ粒子の場合はいずれの供給流速においても膜細孔中で凝縮してしまい (Fig.C-4-5,6) 透過しないことがわかった。

(左から) Au 原液 (0.017 wt%),
1/3, 1/10, 1/20希釈



Figure C-4-3. 多孔基材膜透過に用いた金ナノ粒子

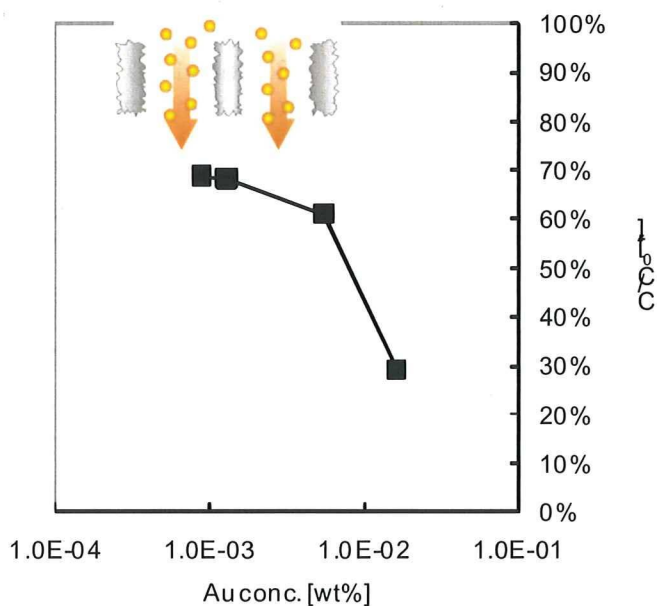


Figure C-4-4. 多孔基材膜の金ナノ粒子透過率

✓ Au粒子が膜細孔で凝集して詰まり
Au粒子は透過せず



Figure C-4-5. アビジンゲート膜透過中凝集する PEG 未修飾金ナノ粒子

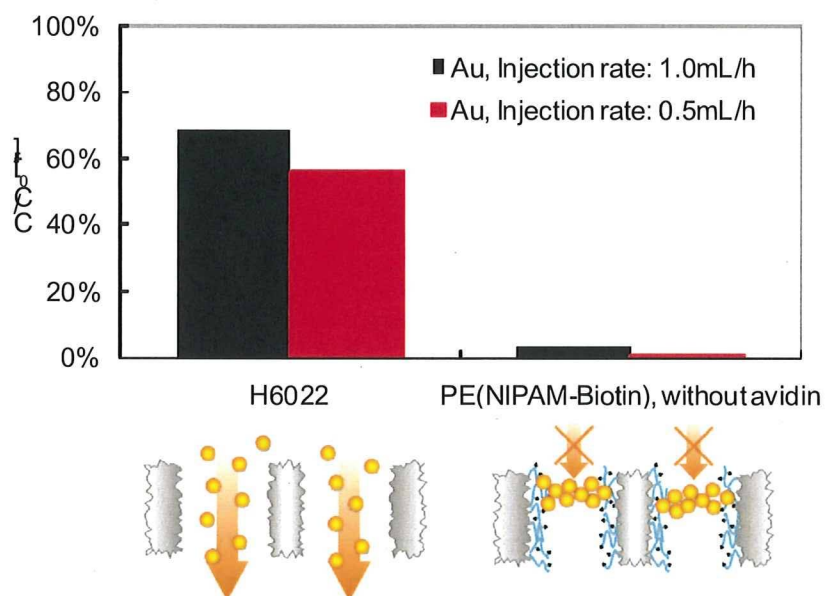


Figure C-4-6. 基材多孔膜アビジンゲート膜の PEG 非修飾金ナノ粒子透過率

C-4-2-4. 基材多孔膜の PEG 修飾金ナノ粒子透過特性

PEG 未修飾金ナノ粒子はアビジンゲート膜を透過できず、本研究提案のシステムは実現できない。このため PEG 修飾金ナノ粒子を用いることを検討した。

PEG 修飾をすることにより、金ナノ粒子サイズは 27nm まで増加する

(Fig.C-4-7)。しかしながら、粒子径の増加によって、粒子の透過率は同じ濃度でも低下することがわかった。ただし濃度を適切に選択すれば、基材多孔膜は十分に金ナノ粒子が透過できることを確認した (Fig.C-4-8)。

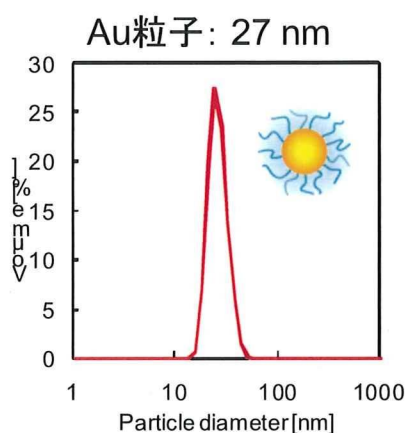


Figure C-4-7. 透過実験に用いた PEG 修飾金ナノ粒子

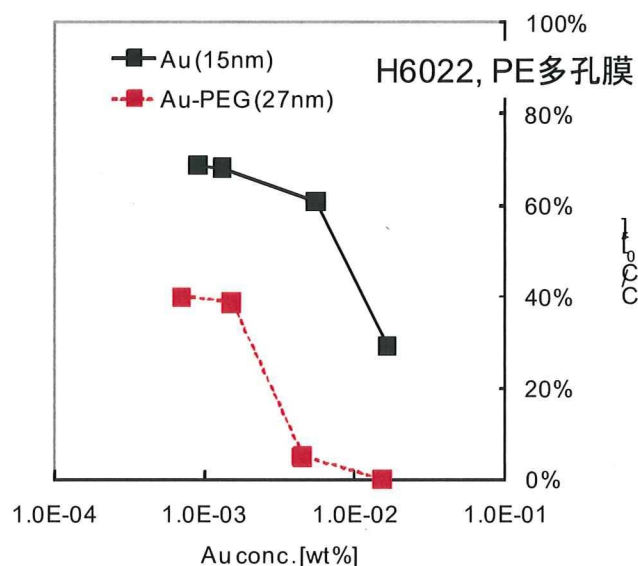
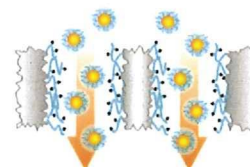
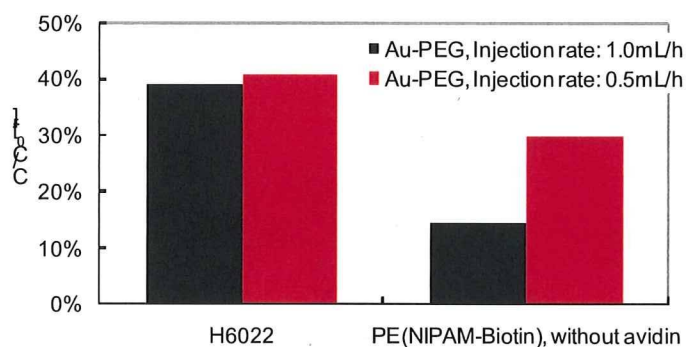


Figure C-4-8. 基材多孔膜の PEG 非修飾 (Au) と PEG 修飾 (Au-PEG) 金ナノ粒子透過率

C-4-2-5. アビジンゲート膜の PEG 修飾金ナノ粒子透過特性

PEG 未修飾金ナノ粒子はアビジンゲート膜を透過できなかったが、PEG 修飾金ナノ粒子は粒子サイズが大きくなるにもかかわらず、アビジンゲート膜を透過できることを示した。

(Fig.C-4-9) これは PEG 修飾によってナノ細孔内での金ナノ粒子の凝集が防止できるためと考えられるが、グラフト鎖ポリマーと金ナノコロイドナノ粒子の相互作用が低減するためとも考えられる。いずれにしろ粒子サイズとは逆の関係を示すことになり、科学的知見からも興味深く、また今後の機構の解明がまたれるところである。



✓ PEG修飾により膜細孔で粒子の凝集が抑制され Au-PEG粒子は透過

Figure C-4-9. 基材多孔膜とアビジンゲート膜の PEG 修飾金ナノ粒子

C-4-2-6. アビジンゲート膜の分子認識的開閉による PEG 修飾金ナノ粒子透過特性 (ON/OFF 制御)

先の検討により PEG 修飾金ナノ粒子はアビジンゲート膜を透過できることが示された。(Fig.C-4-9)

このため、アビジンゲート膜をアビジンと反応させて膜ナノ細孔を閉塞させた場合と、アビジンで未処理の場合で、PEG 修飾金ナノ粒子の透過挙動が変化するかどうかを調べた (Fig.C-4-10)。

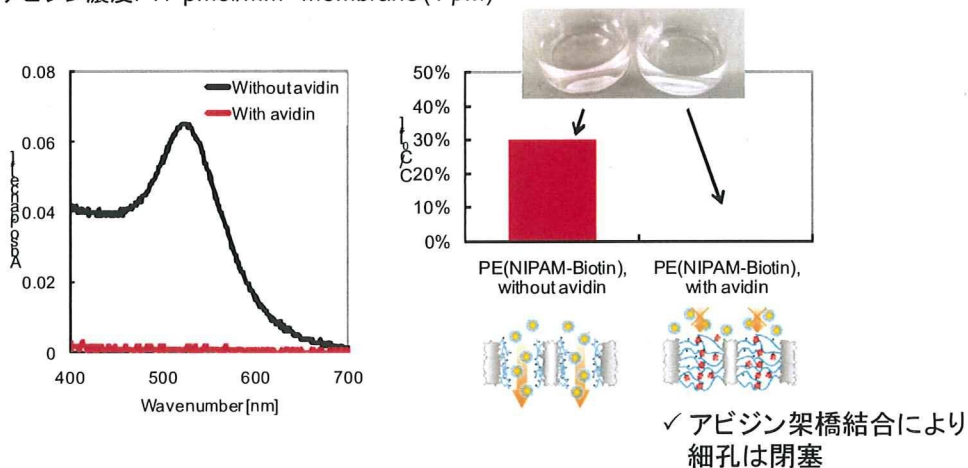
この結果アビジンでゲート膜が反応して膜細孔が閉塞した場合は粒子が透過せず、アビジンと反応する前は金ナ

ノ粒子が透過して着色し、可視化が可能であることが示された。

C-4-3. アビジンゲート膜の金ナノ粒子透過特性のまとめ

以上の検討から、アビジンゲート膜において、アビジンを認識して細孔内架橋が起こり、ナノ細孔が閉塞した場合のみ金ナノ粒子の透過が起こり、アビジンの存在を金ナノ粒子の着色で可視化することに成功した。またサイズが大きくなるにもかかわらず金ナノ粒子の PEG 修飾によって本研究提案のシステムが実現できることが実証された。

注入速度: 0.5 mL/h
Au-PEG濃度: ca. 1.7×10^{-3} wt% (1/10希釈)
アビジン濃度: 17 pmol/mm²-membrane (1 μ M)



✓ Au-PEG粒子の透過により視覚的に検出

Figure C-4-10. アビジンゲート膜のアビジン認識による PEG 修飾金ナノ粒子の透過率変化

D. 考察

まず本研究提案に適した金ナノ粒子の合成に成功した。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により本システムの検討条件の基盤を整えた。さらに金ナノ粒子表面と末端にチオール基を持つPEGの反応により、PEG修飾金ナノ粒子も作製し、粒子径は27nmとなった。

さらに抗体ゲート膜のモデル膜ともなり、また抗原ゲート膜作製の基盤となるアビジンゲート膜の作製に世界で初めて成功した。ビオチンモノマーの最適化や、グラフト鎖構造の制御によって、ビオチンレセプターを有するアビジンゲート膜を作製し、その分子認識挙動を詳細に調べることによって、アビジンのみを選択的に認識してナノ細孔を閉塞することに成功した。これも世界レベルで最先端の結果である。

このアビジンゲート膜と金ナノ粒子を組み合わせることによって、本研究提案の基礎コンセプトを実証することに成功した。すなわちアビジン存在下でのみ金ナノ粒子の透過を阻止し、金ナノ粒子による発色で可視化することによって、簡便にアビジンの存在を検出できるシステムの創製に成功した。この際に、粒子径が大きくな

るにも関わらず、アビジンゲート膜の金ナノ粒子透過性はPEG修飾によって著しく向上することを見出し、ナノ界面科学上からも重要な知見が得られた。

E. 結論

金ナノ粒子、アビジンゲート膜の作製と透過特性の解明、そしてそれぞれの要素技術の組み合わせによって、本研究提案の新規イムノクロマトシステムの基本コンセプトの検証に成功した。

今後はモデルとしてアビジン以外のリガンドも自由自在に認識できるように、膜開発・粒子設計・システム設計ともに今後研究を深化させることによって、臨床適用・実用化に大きく近づくことができる。

F. 健康危険情報

該当する事項なし。