

パラジウム被覆金ナノロッド粒子を用いた センシング技術

Sensing Technology Using Palladium-Coated Gold Nanorods

スペシャリティ事業部門 新事業創出室
New business Creation Dept.



鈴木 重明
Shigeaki SUZUKI



光延 愛美
Manami MITSUNOBU



林堂 好紘
Yoshihiro HAYASHIDO

要 旨

異方性貴金属ナノ粒子である金ナノロッドにパラジウム被覆を行ったナノ粒子は、可視域でフラットな分光特性を示して黒色を呈することが報告されている。本報では、パラジウム被覆金ナノロッドの分光特性に着目し、イムノクロマト方式の検査キットの黒色呈色材として応用した研究に関して報告する。

Abstract

Palladium-coated gold nanorods (AuPd) in anisotropic noble metal nanoparticles show black color due to the flat spectral characteristics in visible region.

We focused on spectral characteristics of AuPd, researched potential of AuPd as black materials. In this report, we introduce the use of AuPd as black materials in lateral flow immunoassays.

1. はじめに

金、銀などの貴金属のナノ粒子は特有の光学特性を示す¹⁾。例えば、直径数十ナノメートルの球状金ナノ粒子は530nm付近の波長を吸収して鮮やかな赤紫色を呈するため、古くより色材として利用されている。また、抗原-抗体反応といった特異的な反応を検出原理とするインフルエンザ検査キットや妊娠検査キットにおいて、目視判定に使用する呈色材に利用されている²⁾。これらの検査キットはイムノクロマト方式検査キットと呼ばれる。

検査にも利用されている貴金属ナノ粒子の着色は、局在表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance:LSPR)と呼ばれる光学特性であり、金属の自由電子の集団的な振動が特定の周波数を吸収して起こる。LSPRの周波数(波長)は、貴金属の種類、形状、周囲の誘電率、さらに組織化(集積、配列など)に強く依存することが報告されており、生きた生体組織の内部を観察する生体内イメージングや分子の検出を行う表面プラズモンセンサーなど様々な分野において研究対象になってきた。

金ナノ粒子の場合、球状の他に様々な異方性形状のナノ粒子が研究されており、ロッド状、プレート状、ワイヤー状、針状などの合成方法や粒子成長メカニズムが報告されている^{3~6)}。近年では、異方性形状の貴金属ナノ粒子表面に異種金属を被覆する技術が報告されており、異種金属の被覆により光学特性が大きく変化する点が注目されている。このような異方性貴金属ナノ粒子は、光学特性を制御することで多彩な色を呈するためイムノクロマト方式の呈色材として有望であり⁷⁾、呈色材としての性能(検出感度)の改良が継続されている。

本報では、異方性形状の貴金属ナノ粒子としてパラジウムを被覆した金ナノロッドがフラットな分光特性を示して黒色を呈することに着目し、イムノクロマト方式の検査キットとしてのセンシング技術への応用研究を行った。

2. 異方性貴金属ナノ粒子

2.1 金ナノロッド

異方性貴金属ナノ粒子は、精密な粒子形状の制御を目的に界面活性剤を溶解した溶媒中で金属イオンを還元する方法が多く報告されている⁸⁾。界面活性剤はナノ粒子表面に吸着し、特定の結晶面の成長の促進や抑制、および溶媒中で安定分散するための分散剤として機能している。例えば、金ナノロッドは、形状制御と安定分散のために界面活性剤として四級アンモニウム塩のセチルトリメチルアンモニウムブロミド(以下CTAB)を過剰に含む水溶液中で金イオンを還元して合成する方法(ソフトテンプレート法)が代表的である。さらに、金ナノロッドの表面に異種金属を被覆する方法が研究されており、異種金属としてパラジウム、ニッケル、銀、銅を被覆すると光学特性が大きく変化することが報告されている^{9~12)}。

2.2 パラジウム被覆金ナノロッド

金ナノロッドは、短軸方向のLSPRに起因する530nm付近の吸収と、長軸方向のLSPRに起因する吸収が近赤外域に発現することが報告されている³⁾。特に、長軸方向の吸収はアスペクト比(長軸長/短軸長)に大きく依存し、アスペクト比が大きくなると吸収ピーク波長は長波長側にシフトし、可視域から近赤外域で確認される。金ナノロッドにパラジウムを被覆したパラジウム被覆金ナノロッド(以下AuPd)は、パラジウムの被覆膜厚が厚くなるにつれて近赤外域の特徴的な長軸方向のLSPRが短波長側にシフトし、可視域がフラットな吸収特性を示して黒色を呈することが確認されている¹³⁾。例えば、化学還元と光還元を組み合わせた新留らの金ナノロッドの合成方法¹⁴⁾は、長軸長が45nm、短軸長が9nmでLSPRのピークを900nm付近に示す単結晶の金ナノロッドの単分散系を再現性良く合成可能である。この粒子サイズの金ナノロッドをコア粒子とするAuPdに関する研究を報告した辻らの方法¹⁵⁾で調製すると、長軸長が約 65 ± 4 nm、短軸長が約 20 ± 2 nmの直方体形状のAuPdの単分散系が再現良く得られる。この金ナ

ノロッド表面には約10nm以下の膜厚でパラジウムが被覆されており、AuPd分散液は黒色を呈している(図1)。得られたAuPdの分光特性は、可視領域(400~780nm)でフラットな分光特性を示す(図2)。また、吸光度2.0に調製したAuPd水分散液のCIE1976色空間(L^* , a^* , b^*)は、 $L^*=1.9$, $a^*=+0.1$, $b^*=+0.3$ であり、黒色を呈しており、はっきりとしたコントラストが得られる。

地を背景にした場合、はっきりとしたコントラストが得られる。

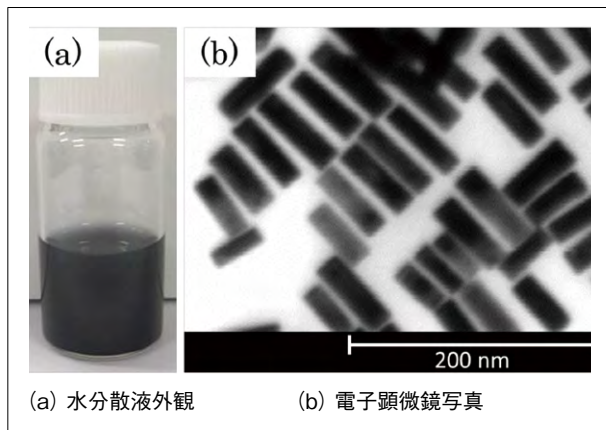


図1 パラジウム被覆金ナノロッド

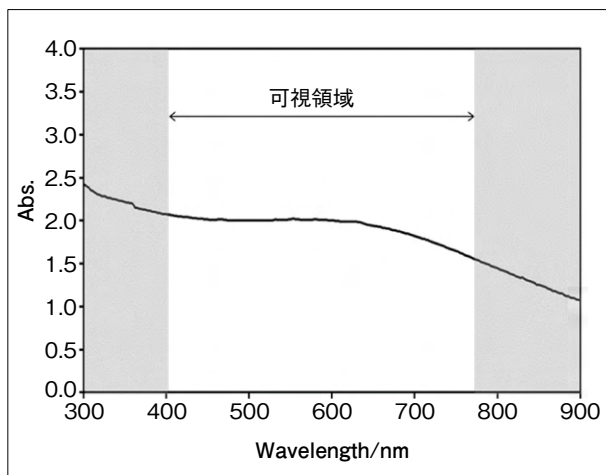


図2 パラジウム被覆金ナノロッド水分散液の分光特性

3. センシング材料としてのイムノクロマト方式検査キットへの適用

3.1 イムノクロマト方式検査キット

イムノクロマト方式の検査キット(以下検査キット)は一般的に①給水紙、②ニトロセルロースメンブレン、③コンジュゲートパッド、④サンプルパッドで構成される(図3)。検査は、抗原を含む検体溶液をサンプルパッドへ滴下して開始する。検体溶液は毛細管現象で④→③→②→①の順にフローする。コンジュゲートパッドには抗体修飾したナノ粒子が担持されており、滴下された検体溶液に含まれる抗原と反応しながらニトロセルロースメンブレンへ溶出する。ニトロセルロースメンブレンには「検出ライン」と呼称する抗原と特異的に結合する抗体をライン状に固定化した部位があり、抗体を介してナノ粒子と結合した抗原とさらに結合する。この反応により、検出ラインにナノ粒子が集積す

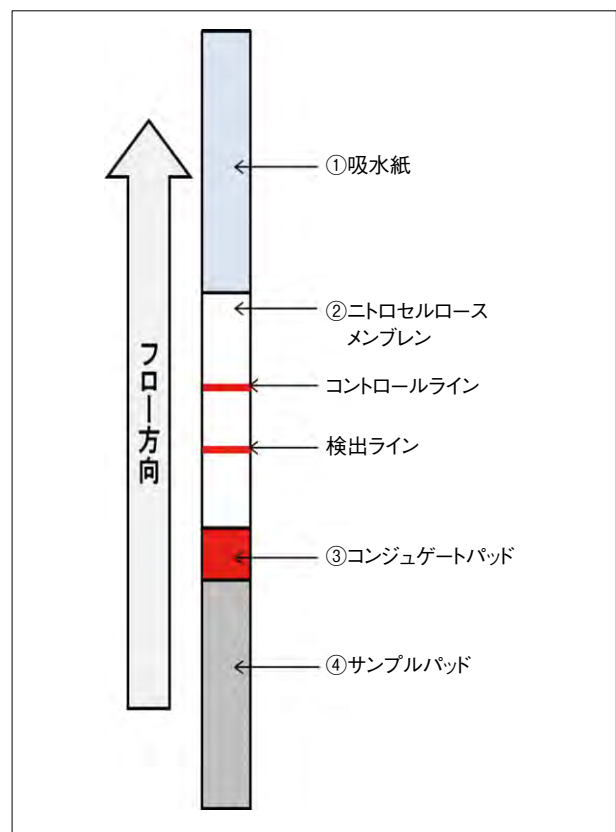


図3 イムノクロマト試験紙概略図

るため、ナノ粒子の色調でライン部が呈色して目視判定が可能となる。また、図3の「コントロールライン」と呼称する部位は、ナノ粒子がニトロセルロースメンブレン中をフローする過程で、検出ラインを通過しているか確認する機能がある。

呈色材としては、貴金属ナノ粒子や着色ラテックス粒子が使用されている。代表的な呈色材は赤色を呈色する球状金ナノ粒子であり、①静電吸着や疎水性相互作用により抗体修飾が容易、②ニトロセルロースメンブレン中をフロー可能、③視認性のよい粒子サイズが選択可能、④化学的安定性に優れるなどの特性を有する。一般的なイムノクロマト試験では、鼻水や尿などの透明な検体が用いられるため、赤色を呈する球状金ナノ粒子の視認性は高い。しかし、心筋梗塞といった検体に血液を利用するイムノクロマト試験において、球状金ナノ粒子は血液と同じ赤色のため、目視判定が困難な場合があり、赤色以外に呈するナノ粒子が求められている。筆者らは、AuPdの光学特性を分光光度計で確認した場合に可視域でフラットとなる理想的な黒の分光特性を示すことを応用し、イムノクロマト方式の検査キットの呈色材として検討した。

3.2 AuPdの調製

AuPd表面は粒子合成やパラジウム被覆のために必要な界面活性剤であるCATBが吸着している。AuPdを呈色材に適用するためには粒子表面に抗体を修飾する必要があり、CATBの除去が必要となる。筆者らは、Weiら¹⁶⁾や川崎ら¹⁷⁾の金ナノロッド表面のCATBを高度に除去する方法を応用し、AuPd表面に吸着するCATBの除去技術を確認した。この方法では、適切な高分子と溶媒の選択および処理方法を工夫することでAuPd表面に吸着しているCATBの除去が可能である。CATB除去後のAuPdは、クエン酸三ナトリウムなど球状金ナノ粒子でも使用される抗体修飾に影響の少ない低分子量の分散剤で分散可能であり、疎水性相互作用など汎用的に用いられる抗体修飾の手法が適用可能であることを確認している。

3.3 イムノクロマト試験結果

筆者らが本報で検討したイムノクロマト方式の一般的な簡易試験概要を以下に示す(図4(a))。また、本検討では、抗原として妊娠中に産生されるホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を用いた。手順①：検出ライン部位にhCG抗体(hCG Ab)を固定したニトロセルロースメンブレンを準備する。手順②：第一の展開液としてhCGを含む検体溶液をニトロセルロースメンブレンに展開し、抗原-抗体反応であらかじめ検出ライン部位に固定したhCG AbでhCGを捕捉する。手順③：第二の展開液として、hCG Abを修飾したAuPdの分散液をニトロセルロースメンブレンに展開し、手順②で検出ライン部位に固定化されたhCG Abと反応する。手順④：検出ライン部位に集積したAuPdを目視で確認する。

AuPdを呈色材とするイムノクロマト試験結果を図4(b)に示した。AuPdは検出ライン部位で集積して黒色ラインを呈していることを目視で確認した。また図4(c)に示した、一般的な検査キットで用いられている赤色粒子(球状金ナノ粒子(粒子径40nm)以下AuSP)の結果と比較した場合、目視で同等レベルの濃淡が確認された。この結果より、AuPdは検査キットの呈色材として応用可能であることが判明した。

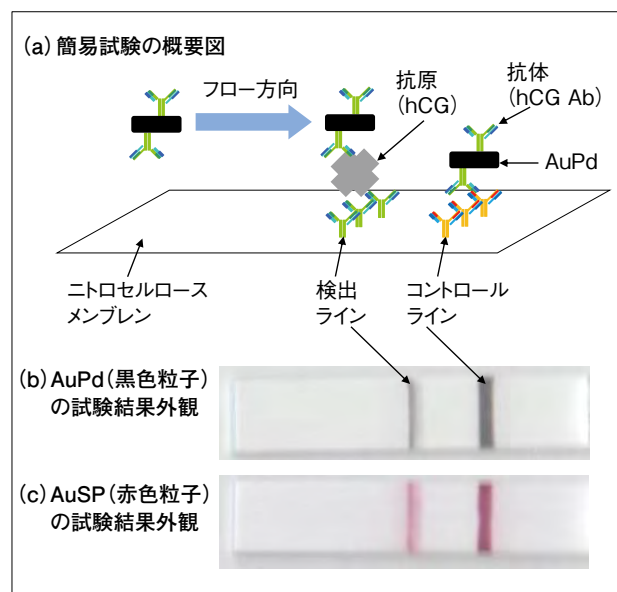


図4 イムノクロマト試験

3.4 試験の結果解析

近年、検査キットの目視判定における信頼性や検出感度の向上を目的に、球状金ナノ粒子(赤色呈色)以外のマルチカラー技術が期待されており、青色金ナノ粒子や市販の着色ラテックスを用いた開発が進められている¹⁸⁾。また、目視判定の診断精度を改善すべく、マルチカラー化に対応した測定機器の導入も進められている。AuPdは、こういったマルチカラー技術の一つとして期待できる。本報では、前述と同試験方法で、AuPdとAuSPの検出感度を比較した。

解析装置に浜松ホトニクス株式会社製イムノクロマトリーダー(C10066-10)を使用して、2波長(赤色系と青色系)の発色強度の検出限界を確認することで検出可能な最低抗原濃度量(検出限界、以下DL)を比較している。なおDLは、JIS K 0462:2008非競合免疫測定方法(サンドイッチ法)通則によると、検量線が原点を通る直線となるとき、下記のように定義されている。

$$DL = 3.3\sigma/a \cdots (1)$$

(σ : blank試料の吸光度の標準偏差、 a : 検出限界付近の検量線の勾配)

この(1)式を用いて、DLの解析を行った。

AuPdとAuSPを使用したイムノクロマト試験の検出ラインを赤色系と青色系での測定、各波長の測定値を加算し比較した。AuPdの結果を図5、AuSPの結果を図6に示す。これらの図は横軸に抗原量、縦軸に吸光度を

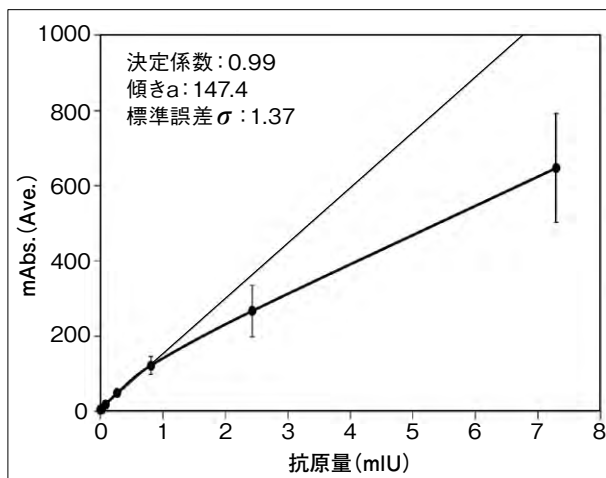


図5 赤色系と青色系の測定結果を足し合わせたAuPdの結果

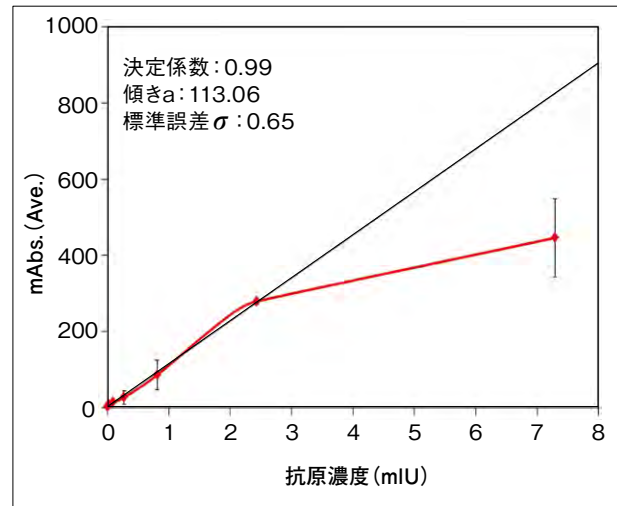


図6 赤色系と青色系の測定結果を足し合わせたAuSPの結果

示したグラフである。

(1)式より、AuPdとAuSPのDLはそれぞれ0.03mIUと0.02mIUであり、同等の感度であった。AuSPと比較し、AuPdは幅広い抗原量に対して発色強度が大きく変化するため、定量性試験への応用が期待できる。

この結果は、呈色材として黒色を呈するAuPdを適用した場合、血液を用いたイムノクロマト試験においては、ニトロセルロースメンブレンが血液により赤く染まることがあるため、黒色の検出ラインを呈するAuPdの適用で視認性の向上が期待される。

4. まとめ

特別な機器を必要としない目視判定可能な検査キットは、家庭や電力が得られない環境でも迅速検査が可能なツールとして利用できるため、利便性がよい。本報では、AuPdが黒色を呈することを応用し、免疫クロマト方式の検査キットの色材としての可能性を報告した。

新規の黒色ナノ粒子は高い視認性が得られるため高感度検出への期待も高く、新しい診断ツールとして有望である。

参考文献

- 1) J. A. Creighton, D. G. Eadon : J. Chem. Soc. FARADAY TRANS., 87, 3881 (1991).
- 2) E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed : Chem. Soc. Rev., 41, 2740 (2012).
- 3) K. Torigoe, K. Esumi : Langmuir, 8, 59 (1992).
- 4) R. Jin, Y. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Zheng : Science, 294, 1901 (2001).
- 5) N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy : Chem. Commun., 617 (2001).
- 6) C. L. Nehl, H. Liao, J. H. Hafner : Nano Lett., 6 [4], 683 (2006).
- 7) 溝口大剛, 宮澤雄太, 室内聖人 : プラズモニク化学研究会Webニュースレター, 2014年度No.10 (2015).
- 8) Y. Chen, Z. Fan, Z. Zhang, W. Niu, C. Li, N. Yang, B. Chen, H. Zhang : Chem. Rev., 118, 6409 (2018).
- 9) Y. Xiang, X. Wu, D. Liu, X. Jiang, W. Chu, Z. Li, Y. Ma, W. Zhou, S. Xie : Nano. Lett., 6, 2290 (2006).
- 10) M. Grzelczak, B. R-Gonzalez, J. P-Juste, L. L-Marzan : Adv. Mater., 19, 2262 (2007).
- 11) Y. Okuno, K. Nishioka, Y. Niidome : Chem. Lett., 38, 60 (2009).
- 12) Y. Yoshida, K. Uto, M. Hattori, M. Tsuji : CrystEngComm, 16, 5672 (2014).
- 13) Y. Xiang, X. Wu, D. Liu, X. Jiang, W. Chu, Z. Li, Y. Ma, W. Zhou, S. Xie : Nano. Lett., 6, 2290 (2006).
- 14) Y. Niidome, K. Nishioka, H. Kawasaki, S. Yamada : Chem. Commun., 2376 (2003).
- 15) M. Tsuji, K. Ikedo, K. Uto, M. Matsunaga, Y. Yoshida, K. Takemura, Y. Niidome : CrystEngComm, 15, 6553 (2013).

-
- 16) J. G. Mehtala, D. Y. Zemlyanov, J. P. Max,
N. Kadasala, S. Zhao, A. Wei :
Langmuir, 30, 13727 (2014).
- 17) K. Nishida, H. Kawasaki : RSC Adv., 7,
18041 (2017).
- 18) B. P. Khanal, E. R. Zubarev :
J. AM. CHEM. SOC., 130, 12634 (2008).
-