

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7691724号
(P7691724)

(45)発行日 令和7年6月12日(2025.6.12)

(24)登録日 令和7年6月4日(2025.6.4)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	1/04 (2006.01)	C 1 2 N	1/04	
A 2 3 B	2/85 (2025.01)	A 2 3 B	2/85	A
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	

請求項の数 9 外国語出願 (全19頁)

(21)出願番号	特願2019-219063(P2019-219063)	(73)特許権者	510273880
(22)出願日	令和1年12月3日(2019.12.3)		コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
(65)公開番号	特開2021-112128(P2021-112128		ビジネス ファウンデーション
	A)		KOREA UNIVERSITY RE
(43)公開日	令和3年8月5日(2021.8.5)		SEARCH AND BUSINESS
審査請求日	令和3年3月30日(2021.3.30)		FOUNDATION
審判番号	不服2023-8023(P2023-8023/J1)	(74)代理人	大韓民国、0 2 8 4 1 ソウル、ソンブ
審判請求日	令和5年5月17日(2023.5.17)		ク - グ、アナム - ロ 1 4 5
(31)優先権主張番号	10-2019-0154268		100137095
(32)優先日	令和1年11月27日(2019.11.27)		弁理士 江部 武史
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(72)発明者	ドン ジュン アン
			大韓民国 0 6 7 2 1 , ソウル , セオ
			チョ - グ , ヒョレオン - ロ 6 8 - ギル
			, 8 1 , (セオチョシアパートメント
			, セオチョ - ドン) 1 0 2 - 4 0 3
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結氷抑制用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一部が凹んだ金ナノ構造体を含み、
前記構造体は、少なくとも一つの面が凹部を有するものであり、四面体、六面体、八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体 (tetrahexahedron)、六八面体 (hexoctahedron) または菱形十二面体である、結氷抑制用組成物。

【請求項 2】

前記構造体の前記少なくとも一つの面の前記凹部は、2 - メルカプト - 1 - エタノール (C 2 O H)、3 - メルカプト - 1 - プロパノール (C 3 O H)、3 - メルカプト - 2 - プロパノール (C 2 O H - C H 3)、6 - メルカプト - 1 - ヘキサノール (C 6 O H) のいずれかで表面改質されている請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記構造体は、その径が 4 0 ~ 1 0 0 n m であるように形成されている請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記構造体は、その径が 1 0 n m ~ 1 , 0 0 0 n m である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

凹部の表面曲率の絶対値が $0 . 1 \times 1 0 ^ { - 2 } n m ^ { - 1 } \sim 5 \times 1 0 ^ { - 2 } n m ^ { - 1 }$ である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記構造体は、その表面が改質されて親水性が増加したものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞または組織凍結用組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物を含む、食品凍結用組成物。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の前記組成物の存在下で対象細胞または組織を氷点下の温度にさらすステップを含む、細胞または組織の凍結方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、結氷抑制用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

低温保護剤 (cryoprotective agent、C P A) は、溶液中に存在するとき、0 下の温度にさらされる溶液における氷結晶の形成を低減または阻害できる化合物である。現在の C P A は、小分子 (浸透性 C P A と呼ばれることもある。)、合成ポリマー、および凍結防止剤タンパク質を含む。

【0003】

20

現在、臓器移植は、生存率、生活の質および費用対効果の側面で末期臓器不全の最良の治療法である。しかし、残念ながら、臓器移植物の供給と需要の間には相当な格差が存在する。この格差は、体を衰弱させる疾患を有する患者に長期間の待機期間中の生活の質の低下を招き、重大な医療障壁になっている。臓器の顕著な不足は、信頼できる保存方法の不在により発生するかなりの廃棄物に起因する。実際に肺、脾臓および心臓の 50% 以上は、死亡したドナーから提供されないままである。

【0004】

臓器を適切に保存するためには、臓器を保存溶液で洗浄して血液を除去し、臓器を安定化させなければならない。保存溶液中で安定化した後も、ドナーから摘出後に臓器の割り当て、輸送及び移植に利用可能な時間は限られている (6 ～ 12 時間)。この短い時間は、ほとんどの臓器が地域の患者に提供されることをもたらす。遠隔の患者とのマッチは、限られた時間内に確認できないことがしばしばあるからである。この不足の結果として、ほぼ全ての国で人間の臓器の売買を禁止する法律が存在しているにもかかわらず、違法な臓器売買および人身売買が増加して需要を供給してきた。

30

【0005】

臓器保存で使用される現在の浸透性 C P A は、一般的に、特にエチレングリコール、1, 2 - プロパンジオール、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、グリセロール、スクロース、ラクトース、及び D - マンニトールを含む。臓器保存温度で氷結晶の成長を低減または阻害するためには、浸透性 C P A の有効濃度が非常に高くなければならない (60% 以上がしばしば求められる。)。その高濃度では、これらの化合物は保存しようとする組織に毒性であることがあり、移植前の加温時の C P A の大量除去は不可逆的な細胞死を引き起こすことがある。

40

【0006】

氷結晶の形成を低減または阻害するのに使用される他の C P A は、合成ポリマー及び凍結防止剤タンパク質を含む。浸透性 C P A と同様に、これらはそれぞれ欠点を持っている。例えば、合成ポリマーは、細胞膜を浸透することができない。このため、合成ポリマー C P A は、細胞外の氷の形成のみを制御できる。生物サンプルを効果的に保存するために、氷結晶の形成は、細胞の内部及び外部の両方で制御しなければならない。自然に発生する凍結防止剤タンパク質、例えば魚類、植物または昆虫から単離されたタンパク質は、氷の形成を防止するのに非常に効果的であるが、現在利用可能な凍結防止剤タンパク質は、

50

純度は低く、非常に高価である。付加的に、生物サンプルを保存するための凍結防止剤タンパク質の使用は、免疫原性の潜在的な供給源を導入する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】韓国特許第1681973号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、結氷抑制用組成物を提供することを目的とする。

10

【0009】

また、本発明は、細胞の生存率を高めるための細胞または組織凍結用組成物を提供することを目的とする。

【0010】

さらに、本発明は、食品の凍結時にも食感を維持できる食品凍結用組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

1. 少なくとも一部が凹んだ金ナノ構造体を含む結氷抑制用組成物。

【0012】

20

2. 前記項目1において、前記構造体は、少なくとも一つの面が凹部を有するものであり、四面体、六面体、八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体(tetrahexahedron)、六八面体(hexoctahedron)、菱形十二面体、円筒状、鞍状またはキャップ状である、組成物。

【0013】

3. 前記項目1において、前記構造体は、少なくとも一つの面が凹部を有するものであり、四面体、六面体、八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体(tetrahexahedron)、六八面体(hexoctahedron)または菱形十二面体である、組成物。

【0014】

4. 前記項目1において、前記構造体は、サイズが $10\text{ nm} \sim 1,000\text{ nm}$ である、組成物。

30

【0015】

5. 前記項目1において、凹部の表面曲率の絶対値が $0.1 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1} \sim 5 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1}$ である、組成物。

【0016】

6. 前記項目1において、前記構造体は、その表面が改質されて親水性が増加したものである、組成物。

【0017】

7. 前記項目1～6のいずれか一つの組成物を含む、細胞または組織凍結用組成物。

【0018】

40

8. 前記項目1～6のいずれか一つの組成物を含む、食品凍結用組成物。

【0019】

9. 前記項目7の前記組成物の存在下で対象細胞または組織を氷点下の温度にさらすステップを含む、細胞または組織の凍結方法。

【発明の効果】

【0020】

本発明の組成物は、氷の再結晶の抑制効果に優れる。これにより、細胞の凍結保存時の細胞生存率を高めることができ、食品凍結に使用時にもその食品の食感を維持することができる。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 2 1 】

【図 1】図 1 は、金属ナノ構造体の結氷抑制シミュレーションの結果である。

【図 2】図 2 は、金属ナノ構造体の結氷抑制シミュレーションの結果である。

【図 3】図 3 は、金属ナノ構造体の結氷抑制シミュレーションの結果である。

【図 4】図 4 は、金ナノキューブを作製する概略図である。

【図 5】図 5 は、作製された金ナノキューブ、金ナノキャップ、金球状粒子の仕様である。

【図 6】図 6 は、作製された金ナノキューブの S E M、T E M 画像である。

【図 7】図 7 は、作製された金ナノキューブのサイズを示すものである。

【図 8】図 8 は、作製された金ナノキューブの吸収スペクトルである。

【図 9】図 9 は、作製された金ナノキューブの写真である。

10

【図 10】図 10 は、作製された金ナノキューブの粒子サイズ分布である。

【図 11】図 11 は、作製された金ナノキャップの顕微鏡画像である。

【図 12】図 12 は、作製された金ナノキャップの濃度および粒子サイズ分布を示すものである。

【図 13】図 13 は、金球状粒子を作製する概略図および作製された金球状粒子の顕微鏡画像である。

【図 14】図 14 は、金ナノキューブの表面改質により、化合物のスルフヒドリルピークが消えることを示す F T I R 結果である。

【図 15】図 15 は、表面改質により、金ナノキューブの吸収スペクトルに変化が起こることを示すものである。

20

【図 16】図 16 は、表面改質により、金ナノキューブの吸収スペクトルに変化が起こることを示すものである。

【図 17】図 17 は、表面改質により、金ナノキューブの吸収スペクトルに変化が起こることを示すものである。

【図 18】図 18 は、金ナノキューブが H S C - 3 細胞内に挿入されることを確認できる画像である。

【図 19】図 19 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 20】図 20 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 21】図 21 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 22】図 22 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

30

【図 23】図 23 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 24】図 24 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 25】図 25 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 26】図 26 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果を示すものである。

【図 27】図 27 は、氷再結晶の抑制効果を数値化する概略図である。

【図 28】図 28 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果の数値化の結果である。

【図 29】図 29 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果の数値化の結果である。

【図 30】図 30 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果の数値化の結果である。

【図 31】図 31 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果の数値化の結果である。

【図 32】図 32 は、金ナノ構造体の氷再結晶の抑制効果の数値化の結果である。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 2 3 】

本発明は、結氷抑制用組成物に関するものである。

【 0 0 2 4 】

氷の結晶は、氷の再結晶化により成長できるが、これは小さな氷結晶から更に大きな氷結晶に成長する過程を意味する。この成長は、オストヴァルト熟成 (Ostwald ripening) のメカニズムにより起こる。オストヴァルト熟成 (Ostwald ripening) は、常温と結晶の間の表面エネルギーの差による圧力によって、融解 - 拡散 - 再凍結または昇華 - 拡散

50

-凝縮のメカニズムで進行され得る。換言すれば、氷結晶の成長は、氷同士がくっついて成長するのではなく、小さな氷結晶が結晶の間で融解して大きな氷結晶に向かって拡散した後、大きな氷結晶の一部となって再凍結されて起こる。

【0025】

結氷の抑制は、氷が形成されないようにするか氷の形成速度を遅らせたり、氷の再結晶化が行われなようにしたり、氷再結晶化の速度を遅らせたり、氷結晶の大きさを小さく維持する作用を意味する。

【0026】

本発明の結氷抑制用組成物は、少なくとも一部が凹んだ金ナノ構造体を含む。

【0027】

図2に示されるように、少なくとも一部が凹んだ金ナノ構造体は、氷結晶の成長面と接する場合に、その凹部と当接する面は氷が成長せずに液状水層が形成され、凹部の外側に氷が押し出されて、その部分に結氷抑制効果が示され得る。

【0028】

金ナノ構造体は、少なくとも一つの面が凹部を有するものであり、凹部を有すると、少なくともその部分では結氷抑制効果が示されるので、少なくとも一つの面の少なくとも一部が凹部を有するものであればよい。凹部は一面以上、全面以下に存在することができる。

【0029】

金ナノ構造体は、例えば、四面体、六面体、八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体(tetrahexahedron)、六八面体(hexoctahedron)、菱形十二面体、円筒状、鞍状(saddle)またはキャップ状などの構造を有することができるが、これらに限定されるものではない。

【0030】

金ナノ構造体は、例えば、サイズが $10\text{ nm} \sim 1,000\text{ nm}$ であってもよく、具体的には $20\text{ nm} \sim 800\text{ nm}$ 、より具体的には $40\text{ nm} \sim 700\text{ nm}$ であってもよいが、これらに限定されるものではない。例えば、金ナノ構造体が多面体の場合、前記サイズは一辺の長さであってもよく、キャップ状の場合、前記サイズは直径であってもよいが、これらに限定されるものではない。より具体的には、金ナノ構造体が多面体の場合、サイズは $20\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ であってもよく、キャップ状の場合、サイズは $10\text{ nm} \sim 1,000\text{ nm}$ であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0031】

金ナノ構造体は、例えば、凹部の表面曲率の絶対値が $0.1 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1} \sim 5 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1}$ であってもよく、具体的には $0.3 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1} \sim 3 \times 10^{-2}\text{ nm}^{-1}$ であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0032】

金ナノ構造体は、その表面に官能基として、トリメチルアンモニウムクロライドセチル基、又はトリメチルアンモニウムプロミドセチル基を有するものであってもよい。

【0033】

また、金ナノ構造体は、表面が改質され、親水性、疎水性または両性官能基を有することができる。その場合、結氷の抑制効果が減少または増加して、結氷をより細かく調整することができる。

【0034】

親水性官能基としては、例えば、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルボニル基、ホスフェート基、アンモニウム基、エステル基、イミド基、チオイミド基、ケト基、エーテル基、インデン基、スルホニル基、ポリエチレングリコール基などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。疎水性官能基としては、例えば、 $C1 \sim C30$ のアルキル基、 $C3 \sim C30$ のシクロアルキル基、 $C6 \sim C30$ のアリール基、 $C2 \sim C30$ のヘテロアリール基、ハロゲン基、 $C1 \sim C30$ のエステル基、ハロゲン含有基などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。両性官能基としては、例えば、ヒドロキ

10

20

30

40

50

シＣ１～Ｃ１０アルキル基、トレオニンを含むペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００３５】

前記官能基は、例えば、前記親水性、疎水性または両性官能基および末端に－ＳＨ官能基を有する化合物で金ナノ構造体の表面を改質して金ナノ構造体の表面に形成されたものであってもよいが、これに限定されるものではない。

【００３６】

また、本発明は、前記組成物を含む細胞または組織凍結用組成物に関するものである。

【００３７】

細胞または組織を凍結保存すると、その後の使用時、凍結された細胞または組織を溶かす過程で、氷の再結晶化は、細胞膜の損傷、細胞の脱水を進行させ、細胞および組織に損傷を与える。低温環境に住む有機体は、氷の再結晶化によってより簡単に損傷してしまうことがある。

10

【００３８】

本発明の組成物は、通常的に保存のために凍結して使用するすべての細胞がその適用対象となり、例えば、原核細胞；真核細胞；微生物；動物細胞；癌細胞、精子；卵子；成体幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞を含む幹細胞；臍帯血、白血球、赤血球、および血小板を含む血液細胞；腎細胞、肝細胞および筋肉細胞を含む組織細胞であってもよいが、これらに限定されない。

【００３９】

また、組織は、同様に保存のために凍結して使用するすべての組織がその適用対象となり、例えば、角膜、腎臓、心臓、小腸、脾臓、肺、肝臓などのすべての組織を制限なく使用することができる。

20

【００４０】

また、本発明は、前記組成物の存在下で対象細胞または組織を氷点下の温度にさらすステップを含む、細胞または組織の凍結方法に関するものである。

【００４１】

前記組成物の存在下で対象細胞または組織を凍結させる場合、その後の解凍時の氷再結晶を阻害し、細胞または組織が損傷されることを防止できる。

【００４２】

また、本発明は、前記組成物を含む食品凍結用組成物、そして前記組成物の存在下で食品を氷点下の温度にさらすステップを含む食品の凍結方法に関するものである。

30

【００４３】

本発明の組成物は、すべての冷凍食品に適用できるものであり、これを使用することにより、解凍時の食品の食感の低下を最小限に抑えることができる。

【００４４】

以下、本発明を具体的に説明するために実施例を挙げて詳細に説明することにする。

【００４５】

実施例

１．シミュレーション

40

粒子の表面形状による氷成長の差異を調べるために、電算模写シミュレーションを行った。材料としては、凹面を有する正六面体の金ナノ粒子と、凸面を有する球状の金ナノ粒子とを使用した（図１）。

【００４６】

その結果、凹面を有する正六面体の金ナノ粒子は、凹部と当接する面は氷が成長せずに液状水層が形成され、凹部の外側に氷が押し出されて、その部分に結氷抑制効果が示されたが、球状の金ナノ粒子はそうでなかった（図２、３）。

【００４７】

２．金ナノ構造体の作製

（１）凹面を有する金ナノキューブ（Gold Concave Nanocube（AuCC））

50

作製に使用される材料は、以下の通りである。

- 水素化ホウ素ナトリウム (Sodium borohydride (NaBH_4))、 98.0%
- 塩化金 (III) 水和物 (Gold (III) chloride hydrate (HAuCl_4))、 99.9%
- 塩化セチルトリメチルアンモニウム (Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC)) 溶液、25wt% in H_2O
- 硝酸銀 (Silver nitrate (AgNO_3))、 99.9999%
- 塩酸溶液 (Hydrochloric acid solution (HCl))、 1.0N
- L - アスコルビン酸 (L-Ascorbic acid)、 99%

【0048】

作製のために、10 mM NaBH_4 の 0.60 ml を水に溶かした後、冷蔵庫で冷ました。その後、シードの形成のために 10 mM HAuCl_4 の 0.25 ml と、100 mM CTAC の 10.00 ml を混合した。その後、作っておいた NaBH_4 を迅速に混合し、1 分間かき混ぜた後、2 時間放置した。その後、成長溶液 (Growth solution) の製造のために、10 mM HAuCl_4 の 0.50 ml、10 mM AgNO_3 の 0.10 ml、1.0 M HCl の 0.20 ml、100 mM アスコルビン酸 (ascorbic acid) の 0.10 ml を混合した。

【0049】

その後、製造されたシードを $\times 1/10$ から $\times 1/10^4$ まで希釈した後、その 0.1 ml を製造しておいた成長溶液に添加した。反応が終わるまで放置した後、遠心分離器で洗浄した (3,000 rpm、10 min) (図 4)。

【0050】

シードの濃度を希釈して成長させることにより、様々なサイズの金ナノキューブを作製することができる。具体的には、同じ量の成長液をシード溶液に塗布すると、成長液のゴールドイオンがシードの表面にくっついてナノキューブに成長することになる。これはシードの数によって、例えば、数が少ないほど一つのシードにくっつくゴールドイオンが増加して、より大きなサイズの金ナノキューブが作られる。前記方法により、図 5 に示す仕様のナノキューブを作製した。

【0051】

作製されたナノキューブは、凹面を有することが確認できる (図 6)。そのサイズおよび吸収スペクトルは、図 7 ~ 9 に示す通りである。

【0052】

また、 AuCC40 (サイズ 40 nm) は、 4.54×10^{10} 粒子/ml、 AuCC70 (サイズ 70 nm) は、 1.00×10^{10} 粒子/ml、 AuCC170 (サイズ 170 nm) は、 13.79×10^8 粒子/ml の濃度で得られた。その粒子サイズ分布は、図 10 に示す通りである。

【0053】

(2) 金ナノキャップ (Au Cap)

作製に使用される材料は、以下の通りである。

- オルトケイ酸テトラエチル (Tetraethyl orthosilicate (TEOS))、 99.999%
- 水酸化アンモニウム溶液 (Ammonium hydroxide solution (NH_4OH))、~25% NH_3 basis
- エタノール (Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$))、 99.9%
- クリーンガラス (Clean glass) (2.5 × 2.5 cm)
- ゴールドプレート (Gold plate)、半径 5 インチ (inch radius)
- フッ化水素溶液 (Hydrofluoric acid solution (HF))、35%

【0054】

6.34 g のエタノールと 1.86 g の TEOS を混ぜた後、予め作成しておいた 16 g のエタノール + 2.64 g の NH_4OH の溶液に一滴ずつ添加して反応させた。反応 24 時間後、遠心分離器で洗浄して (3,000 rpm、30 min)、シリカビーズを作製した。その後、5 mg/ml のシリカ溶液をクリーンガラス基板 (2.5 × 2.5 cm

10

20

30

40

50

）上に 0.10 ml 落とし、乾燥した。その後、金属イオン (Metal ion) DC / RF スパッタリング (sputtering) 装置を用いて金をイオン化して、基板上に 20 nm の厚さに積み重ねた。超音波処理 (Sonication) により、基板上に置かれているシリカ粒子を取り外し、5 % HF の溶液を混ぜて内部のシリカ粒子を溶かして、外側の金ナノキャップ粒子のみを残した。

【0055】

前記方法で、直径 500 nm サイズの金ナノキャップ粒子を作製し、TEOS 溶液の量を減らして更に小さいサイズのナノキャップ粒子を作成した (図 5)。逆に、TEOS 溶液の量を増やすと、更に大きいサイズのナノキャップ粒子を作ることができる。

【0056】

作製されたナノキャップは、凹面を有することが確認できる (図 11)。Au Cap 100 (サイズ 100 nm) は、 2.36×10^8 粒子 / ml、Au Cap 500 (サイズ 500 nm) は、 2.60×10^8 粒子 / ml の濃度で得られた。そのサイズ分布は、図 12 に示す通りである。

【0057】

(3) 凸面を有する (凹面を有しない) 金球状粒子 (Spherical Gold Nanoparticle (AuNS))

作製に使用される材料は、以下の通りである。

- 塩化金 (III) 水和物 (Gold (III) chloride hydrate (HAuCl₄))、99.9 %
- クエン酸三ナトリウム二水和物 (Sodium citrate tribasic dihydrate)、99.0 %

【0058】

1.0 g の HAuCl₄ を 50 ml の脱イオン水に溶かした。その後、0.5 g のクエン酸ナトリウム (sodium citrate) を 5 ml の脱イオン水に溶かした。製造された HAuCl₄ 溶液を 120 °C で沸騰するまで加熱した。溶液が沸騰すると、準備した sodium citrate 溶液を添加し、10 分間反応させた。反応が終わった溶液は、室温まで冷やした後、0.20 μm で濾過 (filtering) して冷蔵保管した (図 13)。

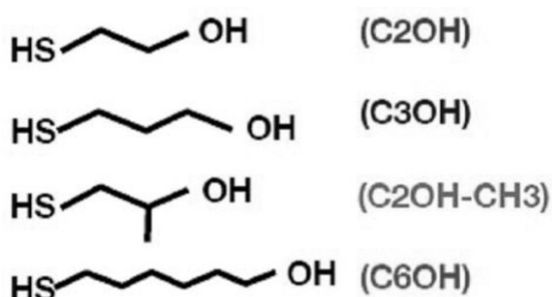
作成された粒子は、凸球状粒子であることを確認できる (図 13)。

【0059】

(4) 表面改質

(1) で作製されたサイズ 40、70、100 nm の金ナノキューブの表面を改質した。金ナノキューブは CTAC を用いて作製されたものであるところ、その表面にトリメチルアンモニウムクロライドセチル基を有するものであり、これを下記化合物とそれぞれ反応させ、表面改質された金ナノキューブを得た。

【0060】



【0061】

図 14 を参照すると、反応でチオールのスルフヒドリル基が金粒子と Au-S 結合をなすので、FTIR 測定時に表面が改質され、スルフヒドリルピークが消えることを確認できる。

【0062】

また、表面改質され、金粒子表面の SPR (Surface Plasmonic Resonance) 効果に

10

20

30

40

50

より吸収スペクトルに変化が起こり、表面積が広いほど変化幅が更に大きいことを確認した(図15~17)。

【0063】

3. 細胞内挿入が可能かどうかの確認

AuCC40のHSC-3細胞内への挿入が可能であることを確認した。

具体的には、合成した 4.54×10^9 粒子/mlの濃度のAuCC40の100 μ lを生きている細胞(HSC-3)培地に添加した後、約2時間反応させると、ナノサイズのキューブ粒子が細胞膜に入り込み、最終的には細胞内部まで侵入することになる。入り込んだ金キューブ粒子は、散乱効果により光学顕微鏡で観察可能である。

その結果、細胞内に金ナノキューブが挿入されることを確認した(図18)。

10

【0064】

4. 結氷抑制効果の評価

結氷抑制の効果を氷の再結晶化の抑制効果を観察して評価した。氷は急速冷却の直後、非常に小さい(数マイクロメートル)氷ドメインを有し、時間が経過するにつれて再結晶化現象によって氷ドメインのサイズが大きくなる。これを定量化するために、スプラット法(splat method)と液体窒素を用いて急速冷却を行った後、30分間-6の温度にさらして氷ドメインの面積を測定した。Splat methodは、氷再結晶化の抑制を観察するために定形化された冷却方法であり、液体窒素で急速冷却された基板に高さ1.5mの上空から水滴を落として薄い膜状に氷を形成した。

【0065】

20

図19は、6-メルカプト(Mercapto)-1-ヘキサノール(hexanol)(C6OH)で改質されたAuCC40の 7.54×10^{-11} M、図20は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuCC40の 7.54×10^{-12} M、図21は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuCC40の 7.54×10^{-13} M、図22は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuCC40の 7.54×10^{-14} M、図23は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuNS80の 1.66×10^{-11} M、図24は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuNS80の 1.66×10^{-12} M、図25は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuNS80の 1.66×10^{-13} M、図26は、6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)で改質されたAuNS80の 1.66×10^{-14} の結氷抑制効果を示すものである。

30

【0066】

それを参照すると、親水性官能基が改質された材料は、氷の再結晶化を抑制する効果を示し、材料の形状とサイズによって氷の再結晶化の程度が異なることが確認できる。この結果を図27に示す方法により数値化した。

【0067】

具体的には、大きいサイズの氷ドメインを10個以上選定し、ImageJプログラムの粒子分析(particle analysis)ツールを用いて面積を算出した。その中、面積が大きい上位10個の氷の平均面積を求め、同じサンプルに対して3回以上同じように面積を計算して最終平均値として使用した。RI値は(材料を入れた水の氷平均面積)/(純粋な水の氷平均面積)で、純粋な水と比較して値を導出した。RIの値が0に近づくと、氷の平均面積が非常に小さいことであり、結氷抑制性能に優れるということである。

40

【0068】

その結果は、図28、29に示す。それを参照すると、AuCCの場合には、RIの値が非常に小さくて結氷抑制性能に優れるが、AuNSの場合には、はるかに大きいRI値を示した。

【0069】

また、図30にはAuCC、図31には表面改質したAuCC、図32にはAuCap

50

の R I 数値化の結果を示す。

【 0 0 7 0 】

図 3 0 を参照すると、作製時に添加する金シードの量が少ないほど大きい粒子が作られるので、粒子のサイズを大きくすると、高濃度で粒子を得ることは難しいが、各サイズの粒子がすべて凍結抑制効果を示すことを確認できる。

【 0 0 7 1 】

図 3 1 を参照すると、表面改質を行っていない場合 (C T A C)、そして C 6 O H で表面改質した場合に、最も結氷抑制効能に優れることを確認できる。

【 0 0 7 2 】

図 3 2 を参照すると、A u C a p の場合には、水と近似した R I 値が示された。これは、A u C a p は、基板上にスパッタリング方法で製造するため、溶液中で粒子を合成する方法に比べて濃度が低く、優れた R I 値を示すには濃度が十分ではなかったからであると判断される。

10

20

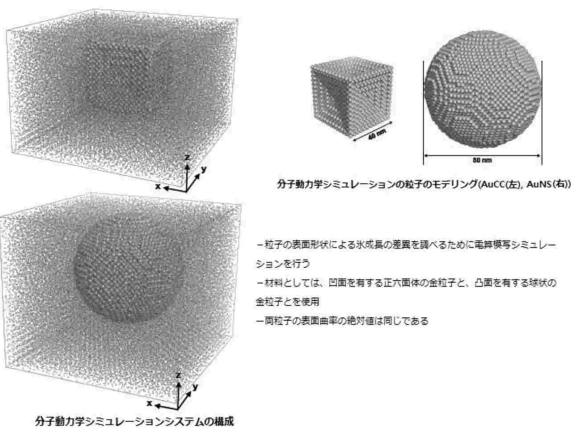
30

40

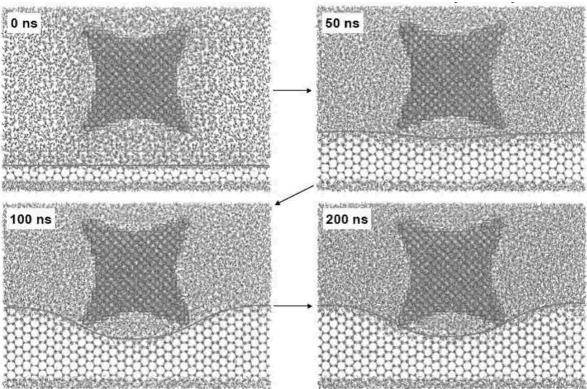
50

【図面】

【図 1】

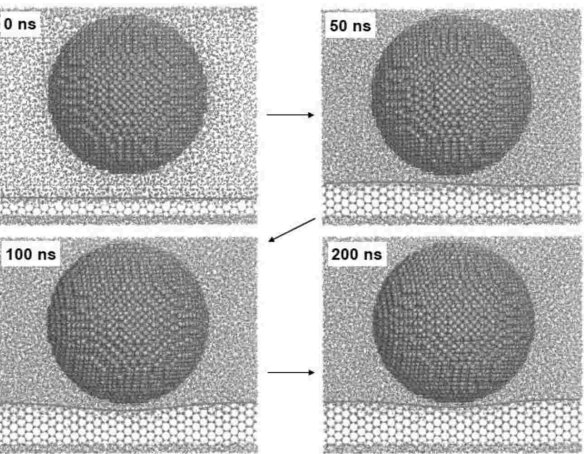


【図 2】

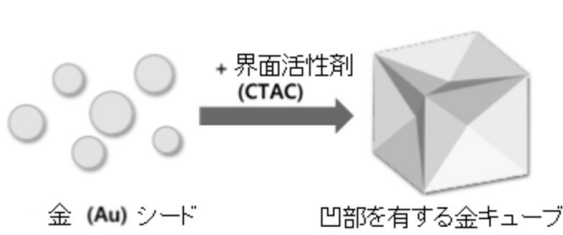


10

【図 3】



【図 4】



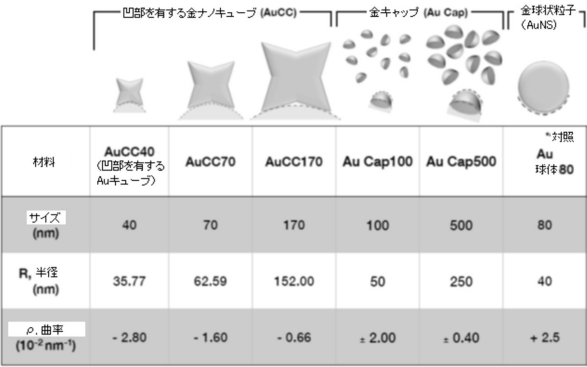
20

30

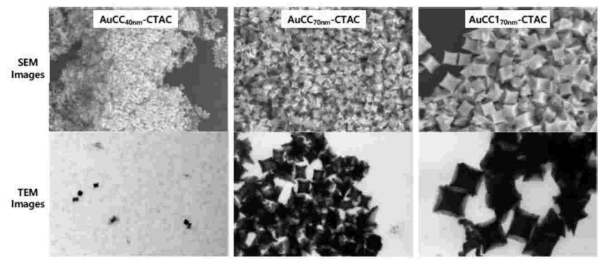
40

50

【図 5】

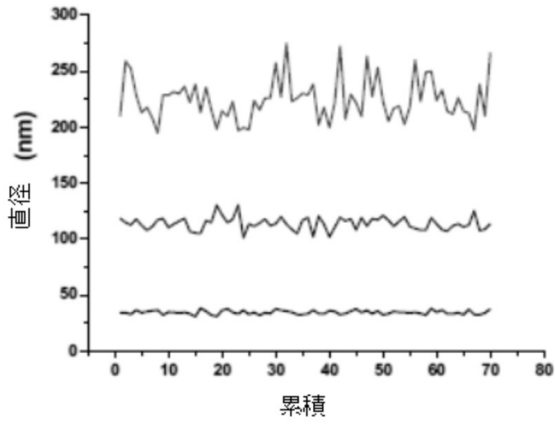


【図 6】

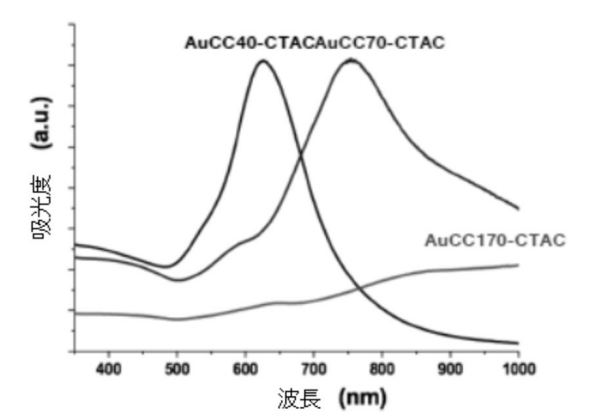


10

【図 7】



【図 8】



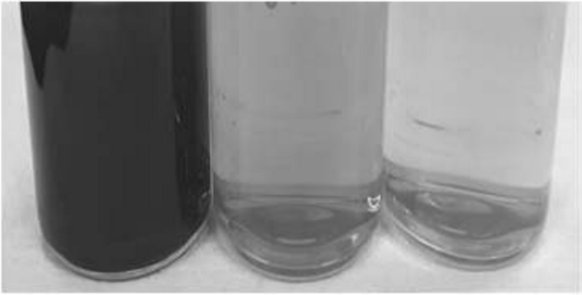
20

30

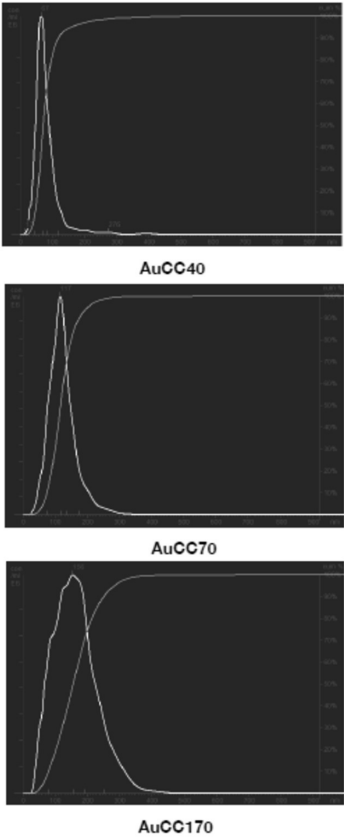
40

50

【図 9】



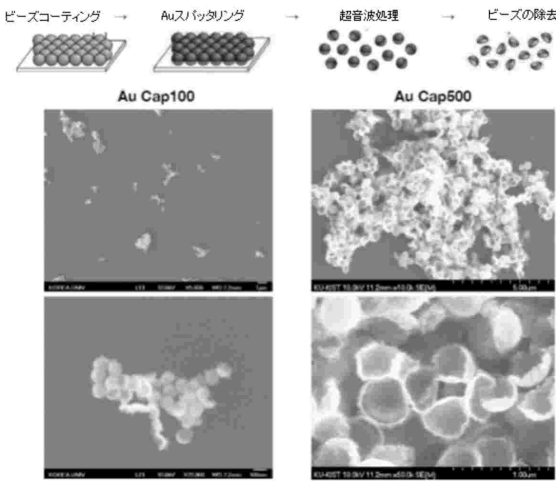
【図 10】



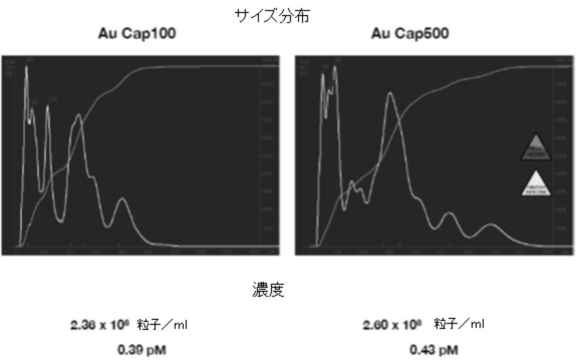
10

20

【図 11】



【図 12】

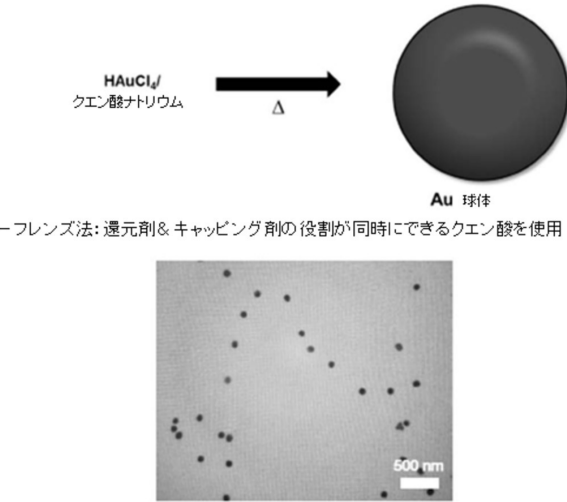


30

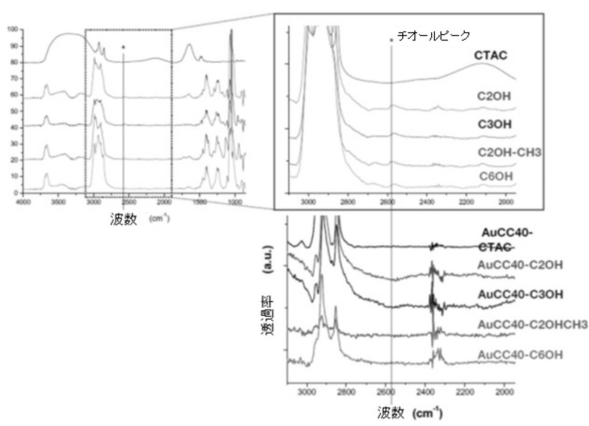
40

50

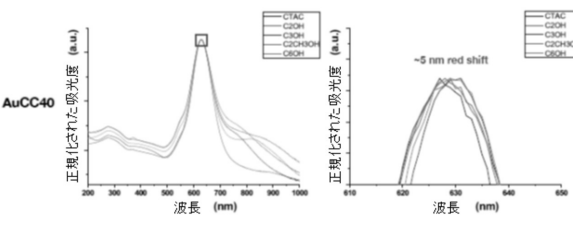
【図 1 3】



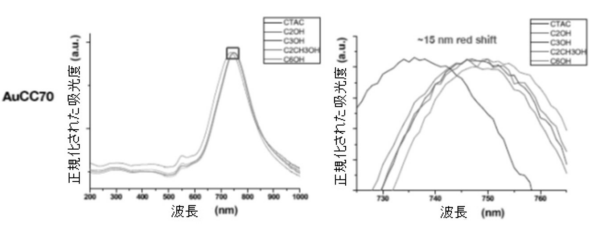
【図 1 4】



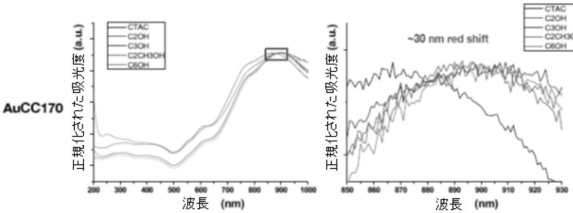
【図 1 5】



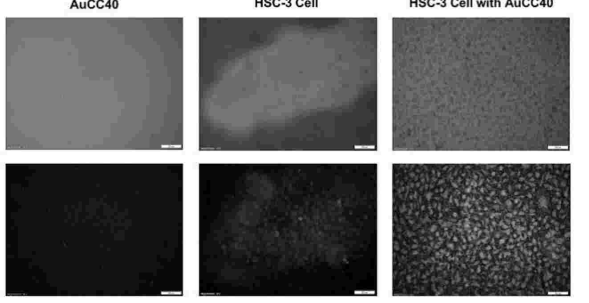
【図 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】



Magnification: 40x

10

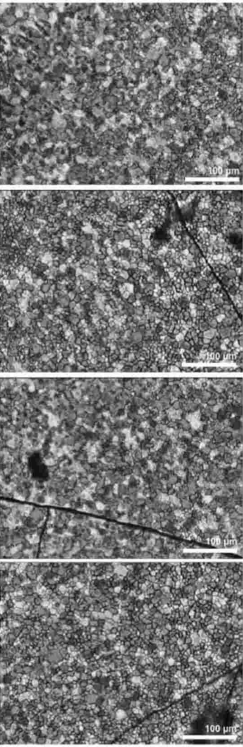
20

30

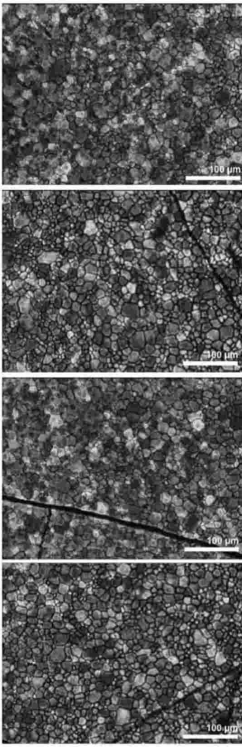
40

50

【図 19】



30 min
@-6°C

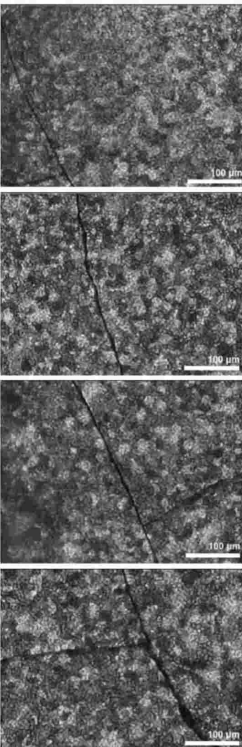


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

【図 20】

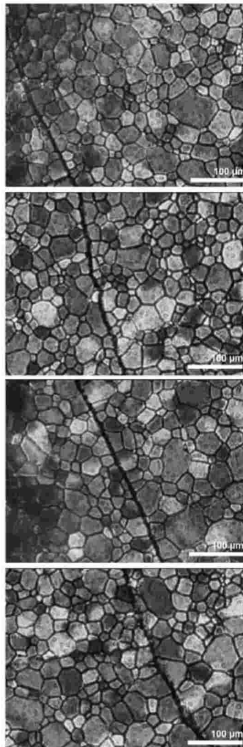


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

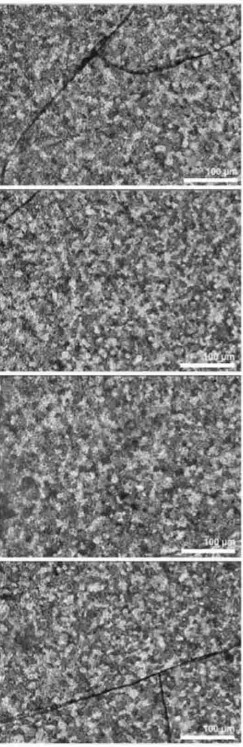
30 min
@-6°C



10

20

【図 21】

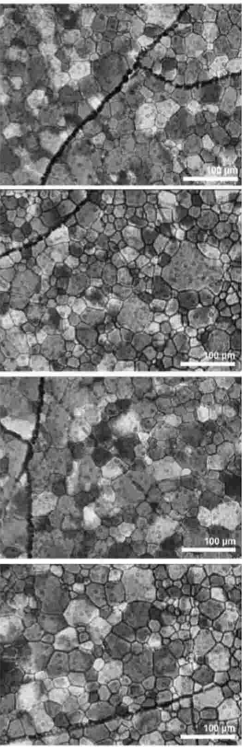


30 min
@-6°C

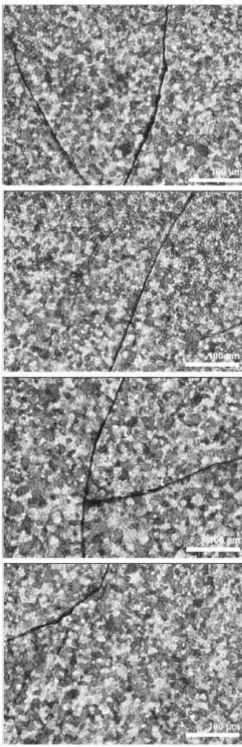
30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C



【図 22】

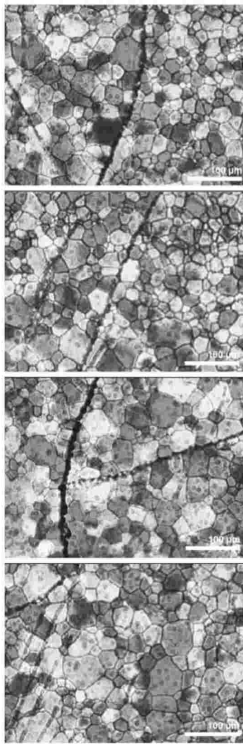


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

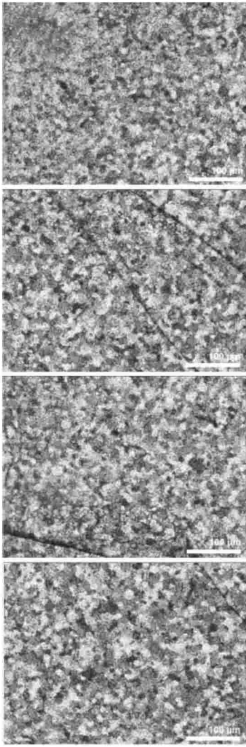


30

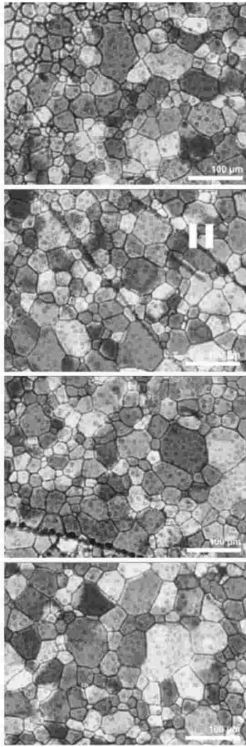
40

50

【 図 2 3 】



30 min
@-6°C

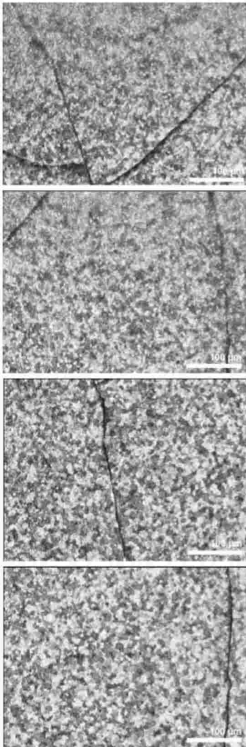


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

【 図 2 4 】

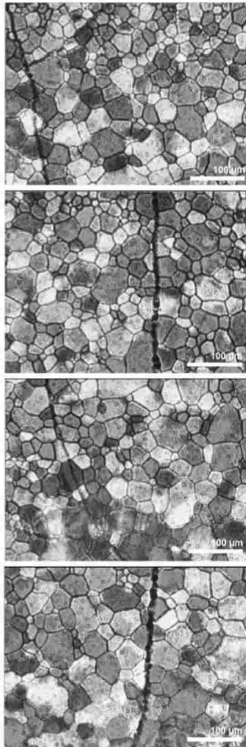


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

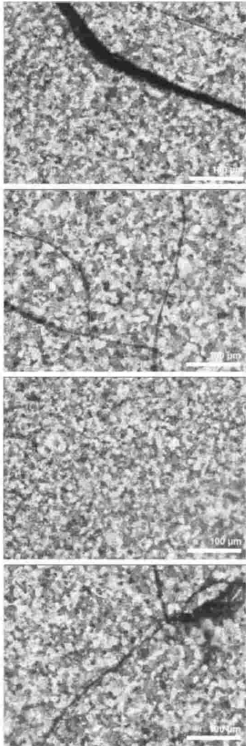
30 min
@-6°C



10

20

【 図 2 5 】

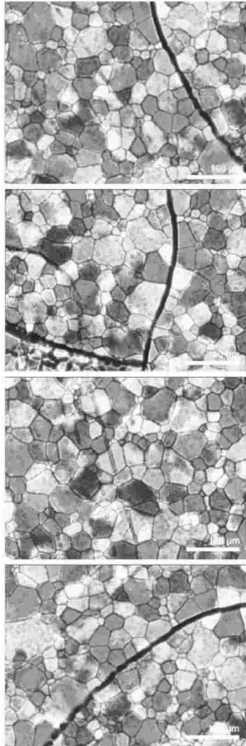


30 min
@-6°C

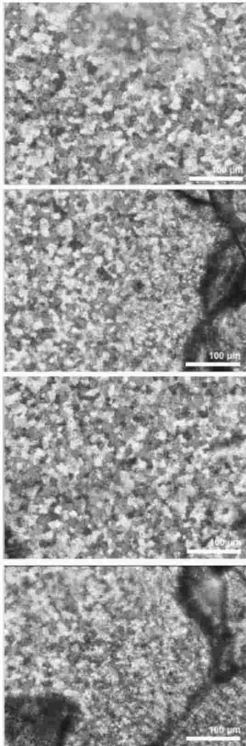
30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C



【 図 2 6 】

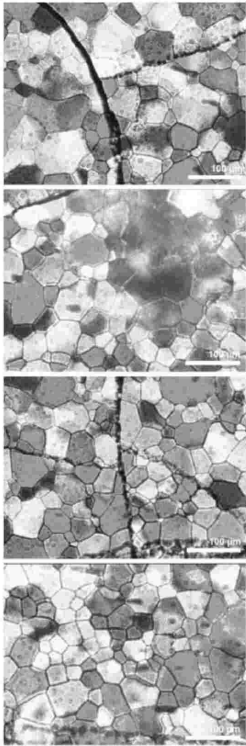


30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

30 min
@-6°C

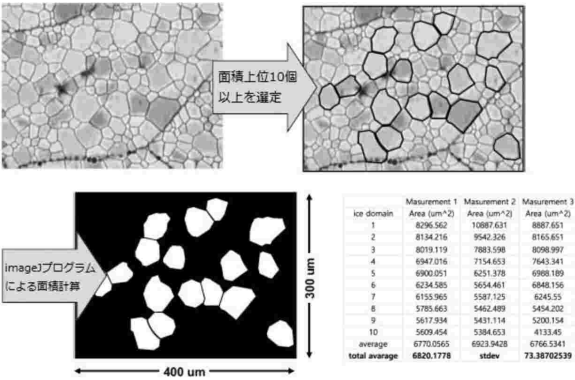


30

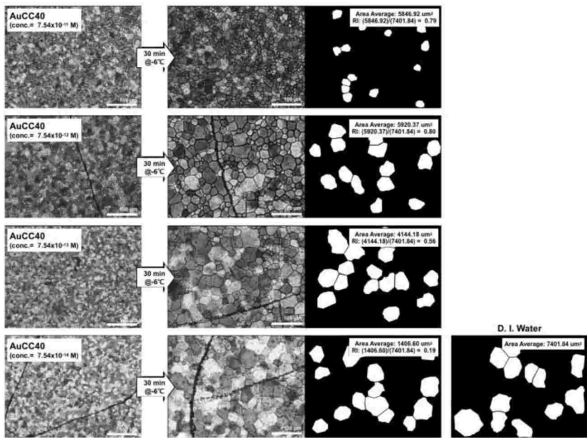
40

50

【図 27】

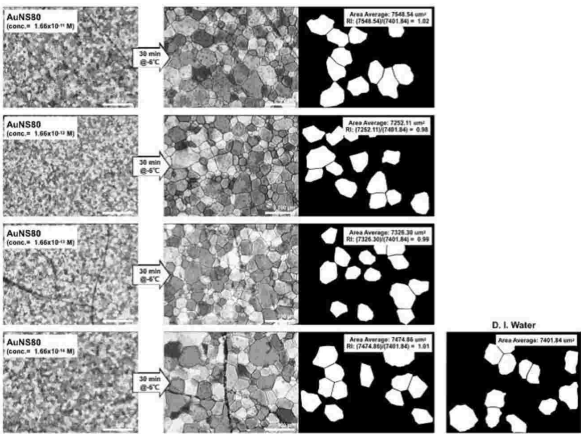


【図 28】

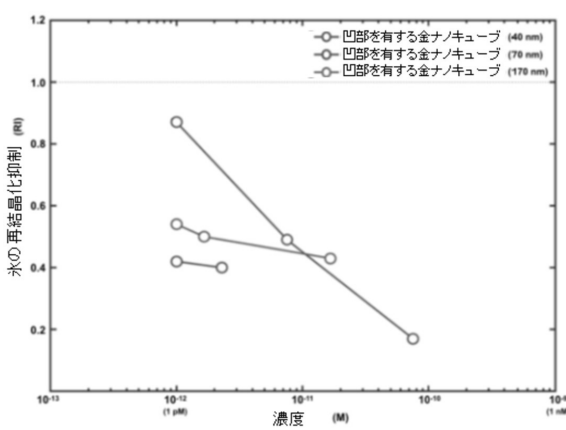


10

【図 29】



【図 30】



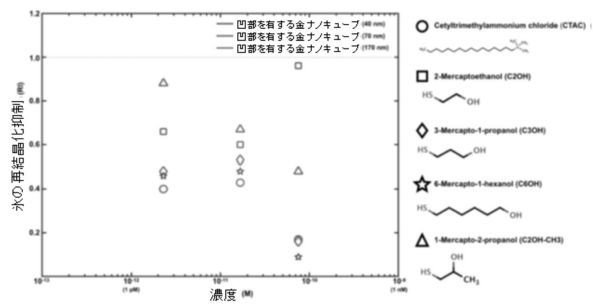
20

30

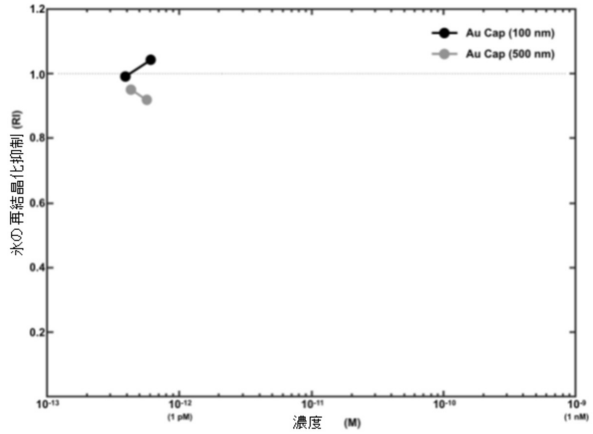
40

50

【図 3 1】



【図 3 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 サン ユップ イ

大韓民国 07949, ソウル, ヤンチェオン - グ, モクドンジュンガンブク - ロ, 38,
モクドンロッテキャッスルアパートメント 109 - 1305

(72)発明者 ヨン ホ チョ

大韓民国 02574, ソウル, ドンダエムン - グ, ムハク - ロ 44 - ギル, 47 - 7, (ジェギ - ドン) ビー 1エフ

合議体

審判長 加々美 一恵

審判官 植原 克典

審判官 中村 浩

(56)参考文献 韓国公開特許第10 - 2018 - 0107887号公報 (KR, A)

特表2015 - 501140号公報 (JP, A)

米国特許出願公開第2019 / 0116783 (US, A1)

J. Am. Chem. Soc., 2013年, Vol.135, No.49, pp.18238-18247

Polymer Chemistry, 2019年, Vol.10, pp.2986-2990

Langmuir., 2019年, Vol.35, No.23, pp.7364-7375

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N1/00-5/28

PubMed

BIOSIS/CAPLUS/EMBASE/MEDLINE(STN)

JSTPLUS/JST7580/JMEDPLUS/(JDreamIII)