

QUARTZ DOT[®]を用いた高感度蛍光イムノクロマト法の開発

Development of a Highly Sensitive Fluorescent Immunochromatographic Assay Using QUARTZ DOT

会澤 英樹^{*}
Hideki Aizawa

西田 昌貴^{*}
Masataka Nishida

山 中 信 光^{*}
Nobumitsu Yamanaka

大 久 保 典 雄^{*}
Michio Ohkubo

鎌 田 隆 行^{*2}
Takayuki Kamada

須 田 敏 史^{*3}
Toshifumi Suda

概要 イムノクロマト法は簡易迅速に判定を行うことを特徴とする有力な検査手法の一つであり、臨床の現場で使用可能な簡易診断手法として広範囲に普及している。イムノクロマト法による診断の正確性を向上させより多くの診断項目に応用展開するためにはイムノクロマト法の検出感度を向上させることが重要な開発課題となっている。

当社はイムノクロマト法の高感度化の手法として蛍光シリカナノ粒子 (Quartz Dot) を用いた蛍光イムノクロマト法を開発した。その結果妊娠検査用抗原について従来法の100倍、A型インフルエンザ判定用抗原については従来法の20倍の高感度検出が可能であることを確認した。更に簡易な定量測定法として蛍光イムノクロマト法を用いた被検物質の定量方法についても検討した。

1. はじめに

1.1 Quartz Dotの特性

Quartz Dotとは有機色素分子を高濃度に含有した蛍光シリカナノ粒子である¹⁾。当社はこの蛍光ナノ粒子をライフサイエンス分野における標識材料として用いた生体分子の高感度検出技術の開発を行っている。

図1～3にはQuartz Dotの構造の模式図、コロイドの外観、SEM写真を示す。Quartz Dotの特長は、①高輝度、②無害、③優れた実験取り扱い性である。以下これらの特性について説明する。

①高輝度

ライフサイエンス分野では医薬品候補化合物のスクリーニング、遺伝子診断や再生医療などの先端医療分野、簡易診断分野などの様々な分野で蛍光標識材料が使用されている。最もよく使用されている蛍光標識材料は有機色素分子であるが、有機色素分子は非常に退色し易く、また用途によっては輝度が不足しており、十分な検出感度が得られないという問題がある。一方、Quartz Dotは有機色素分子を高濃度に封入しており、1粒子あたり有機色素分子数十個分以上、場合によっては数千個分以上の輝度を有し高感度検出に適した標識材料である。

②無害

近年、ナノテクノロジーを活用したナノ粒子型の蛍光材料の

開発が盛んに行われている。その代表例は化合物半導体ナノ粒子である²⁾。半導体ナノ粒子は高い蛍光強度と高い光安定性を特長とするが、可視光近辺で発光する材料には人体に有害なカドミウムやセレンが使用されている。一方、Quartz Dotはゾル-ゲル法³⁾で作製される非晶質のシリカ粒子であり、人体に対して無害な材料である。

③優れた実験取り扱い性

粒子型色素の代表例には有機蛍光色素を含有した蛍光ラテックス粒子が挙げられる。蛍光ラテックス粒子は合成に用いられる原料の特性上比較的疎水性が高いために標識に用いた場合には疎水性相互作用による非特異的吸着を生じやすく、吸着による蛍光信号のノイズレベルの上昇や検出感度低下を招くことが考えられる。これに対してQuartz Dotは粒子表面は親水性の高いシラノール基で覆われているため親水性が高く、疎水性相互作用による吸着が起こりにくいことが特長である。

また、粒子を溶液に分散させる工程では超音波処理を用いることが一般的である。ラテックス粒子は超音波処理によって粒子が破碎されてしまうことが知られているが、シリカ粒子はシロキサン結合の強固なネットワークで形成された粒子であり、機械的強度が高く超音波処理を行っても全く破碎されないため実験操作性が非常に優れている。

上述したように、蛍光シリカ粒子はライフサイエンス分野における蛍光標識材料として優れた特長を有している。

^{*} 研究開発本部横浜研究所

^{*2} 古河電工アドバンスドエンジニアリング 新事業推進部

^{*3} 情報通信カンパニーファイテル製品事業部光サブシステム部

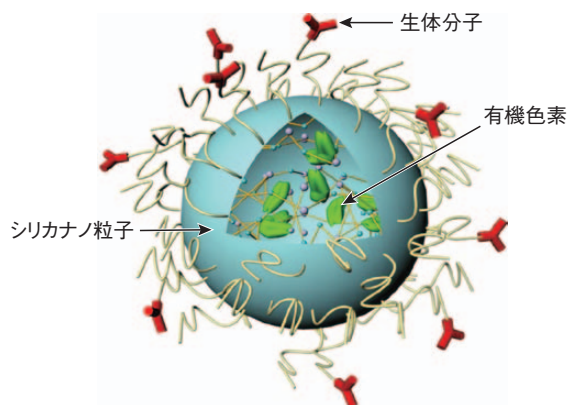


図1 Quartz Dotの構造
Structure of Quartz Dot.



図2 Quartz Dotコロイド
Colloidal dispersions of Quartz Dot.

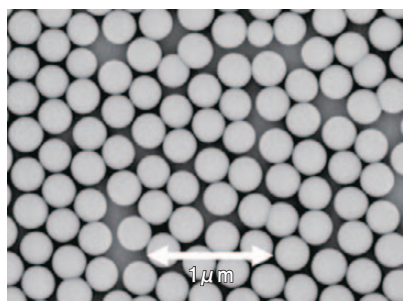


図3 Quartz DotのSEM写真
SEM image of Quartz Dot.

1.2 蛍光イムノクロマト法

1.2.1 イムノクロマト法の特長

イムノクロマト法は図4に示すように、①検体に含まれる被検物質とナノ粒子が抗原抗体反応で結合し、②被検物質が結合したナノ粒子が毛細管現象でメンブレンを移動し、③メンブレンにライン状に固定された抗体と被検物質が結合したナノ粒子が第2の抗原抗体反応を生じ、④ライン上にナノ粒子が集積することでラインが発色し、⑤このラインを目視で確認することによって判定する診断手法である⁴⁾。判定には2本のラインが用いられる。1本は陽性陰性を判定するためのラインであり、「テストライン」と呼ばれる。もう1本は検体液がメンブレンを適切に流れたことを確認するためのラインであり、「コントロールライン」と呼ばれる。

イムノクロマト法は操作が簡便で、判定までに要する時間が10～30分程度と比較的短時間であり、判定に特殊な装置を要しないことから臨床の現場で多用される優れた簡易診断手法である。例えば、インフルエンザウィルスの感染の判定では患者から採取した咽頭ぬぐい液や鼻腔ぬぐい液を検体としてその場で短時間で判定が可能であり、感染の簡易判定手法として非常に有力なツールとして普及している。

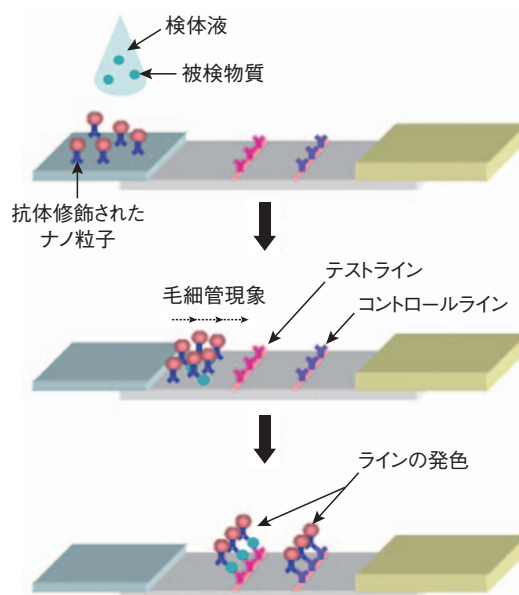


図4 イムノクロマト法の原理
Mechanism of immunochromatographic assay.

1.2.2 イムノクロマト法の課題

以上のように、イムノクロマト法はすぐれた簡易診断手法であるが、検体に含まれる被検物質の量が十分でない場合にはイムノクロマト法を用いることができない検査項目が存在する。例えばインフルエンザウィルスの感染の判定では検体中に十分な量のウィルスが存在しない感染初期にはイムノクロマト法による診断を行っても陰性と判定されてしまう場合がある。これらの課題を解決するためにイムノクロマト法の高感度化に向けた試みが行われている。

1.2.3 蛍光イムノクロマト法

当社はイムノクロマト法の高感度化を目的に標識粒子としてQuartz Dotを用いた「蛍光イムノクロマト法」を開発した。

従来のイムノクロマト法では標識粒子として金コロイドや着色ラテックス粒子などの着色粒子が主に用いられており、発色するラインを目視で確認することで判定を行う。一方蛍光イムノクロマト法は標識粒子としてQuartz Dotを用いラインを蛍光検出するため目視の判定に比べて高感度な判定が可能となる。

以下、Quartz Dotを用いた蛍光イムノクロマト法の開発について報告する。

2. hCG 検出用蛍光イムノクロマト検査薬の開発

2.1 開発の目的

妊娠判定用のイムノクロマト検査薬は受胎後に尿中に分泌されるhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を検出することで判定を行う。本検査薬を用いることで医療機関に赴くことなく簡易に妊娠の判定ができることから、最も広く一般に使用されているイムノクロマト検査薬の一つである。

第一の検討項目としてhCG検出用の蛍光イムノクロマト検査薬を作製し、標識粒子として金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト検査薬と感度を比較した。また、テストラインの蛍光強度を測定することでhCGの添加量とテストラインの蛍光強度の相関を評価した。

2.2 部材

2.2.1 Quartz Dotの仕様

Quartz Dotはローダミン6Gを含有する粒径290 nmのものをを用いた。図5にはQuartz Dotの蛍光スペクトルを示す。ローダミン6Gの蛍光波長は555 nmであり、これは最も視感度が高い波長帯に相当することから蛍光の目視判定に適した蛍光色素である。

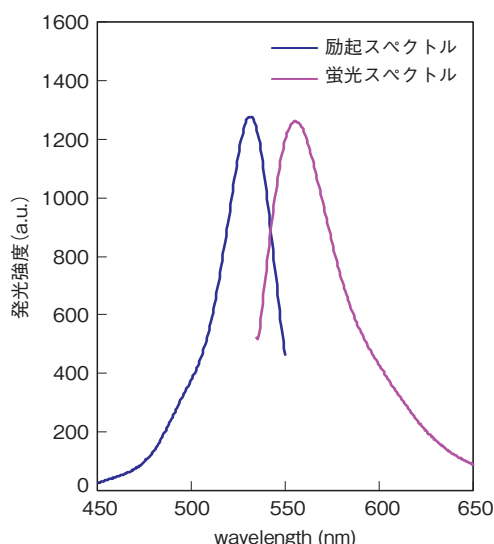


図5 蛍光スペクトル
Fluorescence spectrum of Quartz Dot.

2.2.2 抗体修飾

Quartz Dotに修飾する抗体として抗hCGマウスIgG抗体を用いた。

2.2.3 ラインの作製

ラインを塗布するメンブレンとして、ニトロセルロースメンブレン(Millipore社製)を用いた。また、テストラインとして塗布する抗体には抗ヒト α サブユニットマウスIgG抗体を用い、コントロールラインとして塗布する抗体には抗マウスIgGヤギ抗体を用いた。

2.3 検出感度評価

2.3.1 試験方法

抗原のhCGには市販品(Scripps Laboratories社製)を使用し、リン酸緩衝液に溶解したものをサンプルとした。

また、比較として標識粒子に金コロイド(粒径40 nm)を用いたイムノクロマト検査薬で試験を実施し、検出感度を比較した。なお、金コロイドを用いたイムノクロマト検査薬を標識粒子に金コロイドを用いる以外は蛍光イムノクロマト検査薬と同じ部材を用いて作製した。

蛍光イムノクロマト法ではラインの判定に図6に示すハンディタイプの蛍光リーダーを用いた。本蛍光リーダーは励起光源をライン部に照射した時に発する蛍光を検出する装置であり、図7に示すような蛍光ラインが発色することを目視で確認できる。一方、金コロイドを用いたイムノクロマト法のラインの判定を十分な明るさの下で目視で行った。



図6 蛍光リーダー
Reader Device.



図7 蛍光ライン
Fluorescence Line.

2.3.2 結果

表1にテストラインの判定結果を示す。蛍光イムノクロマト法では検出限界が0.02 mIUであった。一方、金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト法では検出限界が2 mIUであり、蛍光イムノクロマト法は金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト法に比べて100倍の高感度検出が可能であることを確認できた。

表1 hCG検出試験結果
hCG detection test results

hCG (mIU)	蛍光イムノクロマト法 (Quartz Dot)	従来型イムノクロマト法 (Au)
5	+	+
2	+	+
1	+	-
0.5	+	-
0.2	+	-
0.1	+	-
0.02	+	-
0	-	-

2.4 テストライン強度の定量的評価

2.4.1 試験方法

定量性の確認を行うためにテストラインの蛍光強度とhCG添加量の相関を評価した。テストラインの強度を蛍光イムノクロマト用に開発した蛍光スキャナで測定して得られる蛍光プロファイルから求めた。本蛍光スキャナは励起光源部と蛍光受光部からなる検出ユニットをテストストリップの流れ方向と平行に走査して蛍光プロファイルを取得することによってメンブレン上の蛍光強度の定量測定が可能な装置である。

2.4.2 結果

図8に本スキャナで取得した蛍光プロファイルを示す。また図9に蛍光プロファイルから求めたテストラインの蛍光強度とhCG添加量の相関を示す。

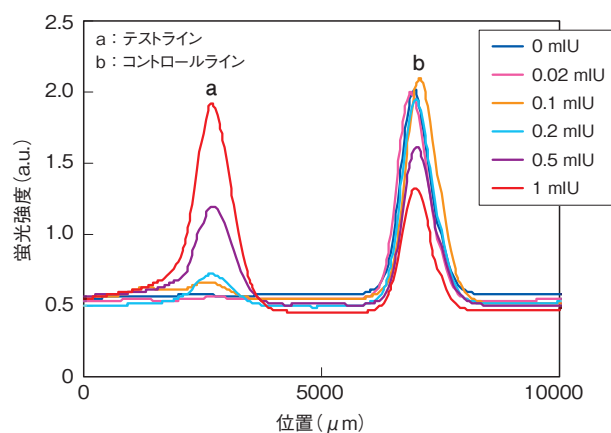
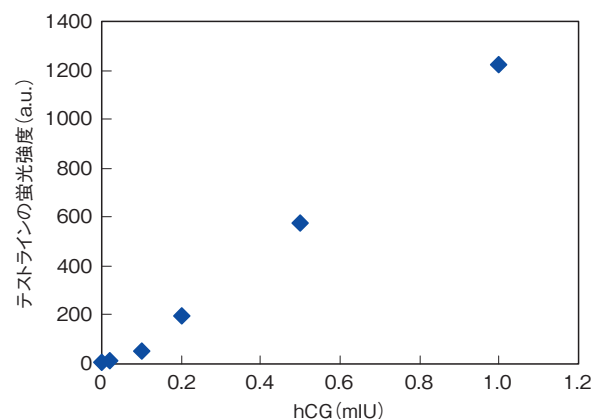
図8 蛍光プロファイル
Fluorescence profile of test strip.図9 テストライン蛍光強度と hCG 添加量の相関
Relationship between fluorescent intensity of test line and hCG amount.

図9に示すようにテストライン強度とhCG添加量はほぼ比例の相関を示した。ここで図9のテストラインの蛍光強度はテストラインの蛍光の面積強度である。この結果、予めhCG添加量に対するテストラインの面積強度の相関のデータを得ておけば、hCGの含有量が不明な検体についても蛍光プロファイルから検体に含まれるhCGの量を求めることが可能になる。これは蛍光イムノクロマト法が単に陽性陰性を判定するだけでなく、被検物質の簡易な定量手法としても有効な技術であることを示している。

3. A型インフルエンザウイルス抗原検出用 蛍光イムノクロマト検査薬の開発

3.1 開発の目的

インフルエンザの感染有無では感染拡大の防止と抗インフルエンザウイルス剤の早期投与の観点からできるだけ早い時期での判定が必要とされる。イムノクロマト法は短時間で簡易に感染の判定が可能であることから感染の判定の有用なツールとなっているが感染初期では検体に十分な量のウイルスが存在しないため正しい判定ができない。例えば、イムノクロマト検査薬の判定では陰性であったが後日インフルエンザ疾患を発症したという例も報告されている。このような点からインフルエンザウイルスの高感度検出には感染初期における正確な判定の観点から大きな意義がある。

そこで第二の検出物質としてインフルエンザウイルス検出を目的とした蛍光イムノクロマト検査薬を作製し、標識粒子として金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト検査薬との感度比較を実施した。

3.2 部材

Quartz Dotに修飾する抗体及びテストラインとして塗布する抗体に抗A型インフルエンザ核タンパク質マウスIgG抗体を使用し、前述のhCG検出用蛍光イムノクロマト検査薬と同様にA型インフルエンザウイルス検出用の蛍光イムノクロマト検査薬を作製した。

3.3 試験方法

抗原としてリコンビナントA型インフルエンザ核タンパク

質 (Imgenex社製) を使用し、リン酸緩衝液に溶解したものをサンプルとした。また比較として標識粒子に金コロイド (粒径 40 nm) を用いたイムノクロマト検査薬で試験を実施し、検出感度を比較した。なお、金コロイドを用いたイムノクロマト検査薬は標識粒子に金コロイドを用いる以外は蛍光イムノクロマト検査薬と同じ部材を用いて作製した。

蛍光イムノクロマト法ではラインの判定に蛍光リーダーを用いた。一方、金コロイドを用いたイムノクロマト法では十分な明るさの下で目視でラインの判定を行った。

3.4 結果

3.4.1 検出限界評価

表2にテストラインの判定結果を示す。蛍光イムノクロマト法では検出限界が1 ngであった。一方、金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト法では検出限界が20 ngであり、金コロイドを用いた従来型のイムノクロマト法に比べて蛍光イムノクロマト法では20倍の高感度検出が可能であることを確認した。

表2 A型インフルエンザ核タンパク質検出試験結果
Influenza A nucleus protein detection results.

A型インフルエンザ 核タンパク質 (ng)	蛍光イムノクロマト法 (Quartz Dot)	従来型イムノクロマト法 (Au)
50	+	+
20	+	+
10	+	-
5	+	-
2	+	-
1	+	-
0.5	-	-
0	-	-

4. 着色・蛍光両用型イムノクロマト検査薬の開発

4.1 開発の目的

これまで述べたように蛍光イムノクロマト法は高感度検出にとって非常に有効な手法であるが、従来のイムノクロマト法でも判定できる十分な被検物質が含まれるサンプルについては蛍光リーダーを用いず目視で確認できた方が操作が簡便である。そこで標識粒子に蛍光粒子と着色粒子の両方を用いることで一定濃度以上の被検物質を含む検体については目視での判定が可能で、被検物質が微量であり高感度検出が必要な検体については蛍光リーダーを用いた高感度判定も可能な「着色・蛍光両用型イムノクロマト検査薬」を開発した。

4.2 部材

標識粒子として蛍光型のQuartz Dotと着色型のQuartz Dotの両方を用いた。着色型のQuartz Dotは蛍光型の20倍程度の有機色素分子を含有させた粒子であり、濃度消光によって蛍光は発しないが高いモル吸収係数を持つ着色粒子である。

他の部材については前述のインフルエンザウィルス検出用の蛍光イムノクロマト検査薬と同じものを使用した。

4.3 試験方法

抗原としてリコンビナントA型インフルエンザ核タンパク質 (Imgenex社製) を使用し、リン酸緩衝液に溶解したものをサンプルとした。また、ラインの判定を蛍光リーダー及び目視によって行った。

4.4 結果

表3にテストラインの判定結果を示す。この表に示すように本検査試薬では目視で50 ngまで判定でき、更に蛍光リーダーを用いることで1 ngまで判定が可能であった。このように蛍光型の粒子と着色型の粒子の両方を標識粒子に用いることで簡便な目視判定と高感度な蛍光リーダーによる判定の両方を用いることができる「着色・蛍光両用型イムノクロマト検査薬」の作製が可能であることが確認できた。

表3 着色・蛍光両用型イムノクロマト検査薬の判定結果
Judgemental rating on visual-fluorescence dual
immunochromatographic agent.

A型インフルエンザ 核タンパク質 (ng)	目視判定	蛍光判定
100	+	+
50	+	+
20	-	+
5	-	+
2	-	+
1	-	+
0.5	-	-
0	-	-

5. 保存安定性試験

5.1 目的

蛍光イムノクロマト検査薬の感度が一定の保管期間が経過しても維持されているかを評価するため、蛍光イムノクロマト検査薬の保存安定性試験を実施した。

5.2 試験方法

5.2.1 コンジュゲートパッドの作製方法

コンジュゲートパッドは予めスクロースなどで前処理したパッドを用い、これに抗hCG抗体を結合したQuartz Dotをコンジュゲートパッドに滴下し、60℃で30分乾燥を行いコンジュゲートパッドを作製した。

5.2.2 評価方法

上記のコンジュゲートパッドを用いて作製したhCG検出用蛍光イムノクロマト検査試薬を30℃で保管した。8, 15, 23, 30日経過後に3本ずつ試験を実施し、蛍光スキャナを用いてコントロールラインの強度を求めた。

5.3 結果

図10に示すように、コントロールライン強度は30日間ではほとんど変化が見られず、コンジュゲートパッドに固定されたQuartz Dotが安定であることが確認できた。

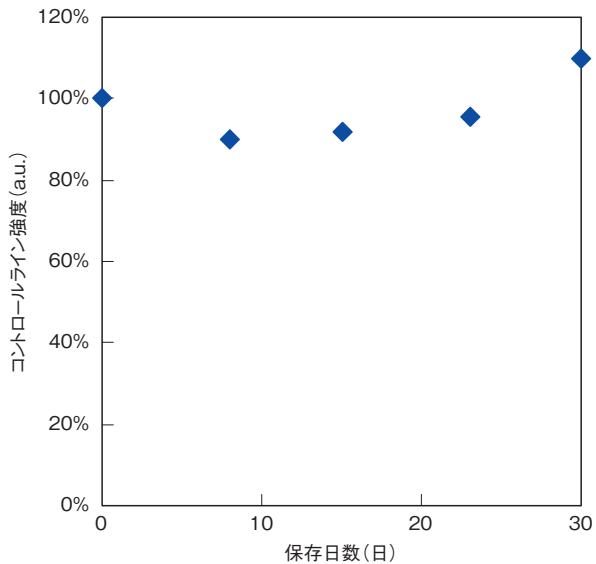


図10 保存安定性試験
Storage stability evaluation.

6. まとめ

イムノクロマト法の高感度化の手法としてQuartz Dotを用いた蛍光イムノクロマト法を開発した。本手法を用いることで従来の目視型のイムノクロマト法より低濃度の検体の検出が可能であり、高感度化に有効な手法であることを確認した。また、

イムノクロマト用蛍光スキャナによって測定したプロファイルから求めたテストラインの蛍光強度により被検物質の定量評価が可能なことも確認した。

本報では詳細に述べていないが、蛍光スキャナを用いて得られる蛍光プロファイルの情報はイムノクロマト検査薬の開発における条件の最適化に非常に有効である。例えばメンブレン部材、メンブレンの前処理方法、抗体の塗布条件などを変更した際には、ライン強度がどの程度増減するか、あるいはバックグラウンドレベルがどのように変化するかについて蛍光プロファイルから定量的なデータが得られる。これは目視型のイムノクロマト法では得られない、条件の最適化に非常に有益な情報である。

今後蛍光イムノクロマト法の他の診断項目への応用を検討し、感染症などの早期診断の新しい手法として社会へ貢献できる技術を提供したいと考えている。

参考文献

- 1) 古河電工時報, 第121号(2008), 17-22
- 2) A. P. Alivisatos: "Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots," Science, **271** (1996), 933
- 3) W. Stöber and A. Fink: "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range," J. Colloid Interface Sci., **26** (1968), 62
- 4) Raphael Wong, Harley Tse(ed.) : Lateral Flow Immunoassay., Humana Press. (2009)