

診断試薬用シリカナノ粒子の開発

Development of Silica Nanoparticles for Diagnostic Testing

会澤 英樹*
Hideki Aizawa

高木 智洋*
Tomohiro Takagi

平山 陽介*
Yousuke Hirayama

大久保 典雄*
Michio Ohkubo

概要 蛍光による生体分子検出技術の高感度化とその診断試薬への適用を目的に、従来から使用されている有機色素と比較して、高輝度であることを特長とする蛍光シリカ粒子の開発を行った。粒子作製では、精密な粒径制御技術によって粒径15～500 nmで均一な蛍光シリカ粒子の合成技術確立した。また粒子表面処理では、交互吸着法を用いた表面修飾法を開発し、凝析防止と同時にカルボキシル基を付与する技術確立した。更に表面に抗体を結合したシリカ粒子は、体外診断試薬であるイムノクロマト検査薬用標識粒子として適用可能であることを確認した。

1. はじめに

蛍光検出技術を用いた生体分子の解析手法は、基礎研究分野における生命現象の解析、医薬品候補化合物のスクリーニング、遺伝子診断・再生医療などの先端医療分野及び簡易診断分野には不可欠なツールである。例えば、DNAチップ、タンパク質チップなどのマイクロアレイでは、基板上のオリゴヌクレオチドやペプチドを蛍光標識し、網羅的な解析に盛んに利用されている。また免疫染色やバイオイメージングでは、特定の物質を蛍光標識し観察することによって細胞内や細胞間の物質の動態を解析することが可能となる。

これら蛍光を用いた解析手法では、ターゲットとなる細胞や抗原、オリゴヌクレオチド、ペプチドなどを標識するための蛍光試薬が用いられている。蛍光試薬に用いられている代表的な蛍光材料は、ナノメートルサイズの有機色素である。有機色素を用いた蛍光試薬は、生体高分子間の相互作用をFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)で解析するもの、特定の環境で発光・非発光が制御できるもの、生体透過性がある近赤外の波長を有し、体表から数センチ内部にある生きた組織を観察するために用いられるものなど様々な種類が開発されている¹⁾。しかし、退色しやすい、輝度が低いなどの問題があり、耐光性や輝度の向上が望まれている。

有機色素に代わる新たな蛍光標識材料として、ナノテクノロジーが応用されたナノ粒子型の蛍光材料が注目を集めている。ナノ粒子型の蛍光材料としてよく知られているのが、半導体ナノ粒子である²⁾。半導体ナノ粒子は、粒径をナノサイズ化することで発現する量子サイズ効果により、可視光での発光を可能とした蛍光粒子である。この半導体ナノ粒子は、表面欠陥由来する発光効率の低下が問題であったが、近年表面技術が向上し非常に発光効率の高い半導体ナノ粒子が開発され、明るく、

耐光性に優れた蛍光材料として、イメージング試薬への利用が始まっている³⁾。しかし、材料に人体に有害なカドミウムなどを用いていることが問題となっている。

2. QUARTZ DOT™

当社は明るく、無害な材料からなる蛍光粒子として蛍光ナノシリカ粒子「QUARTZ DOT」を開発し、新たなバイオメディカル用標識プローブとしての応用を検討した。

QUARTZ DOTは、有機色素分子をシリカ(二酸化ケイ素)粒子内部に固定化した蛍光粒子であり、1個の粒子に有機色素分子を10～数万個含有させることにより、有機色素の弱点であった低発光強度の問題を解決した蛍光材料である(図1)。また合成条件を変え粒子の大きさを調整することで、フローサイトメトリーなど蛍光ラテックスビーズが用いられるアッセイへの応用が可能となる。本章では、蛍光シリカ粒子の合成法及び粒径制御方法について紹介する。

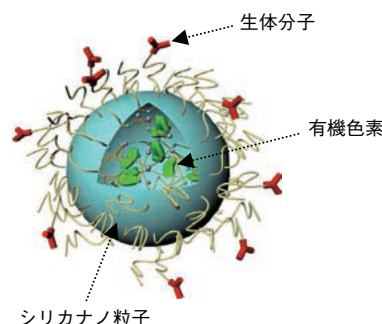


図1 QUARTZ DOTの構造
Structure of QUARTZ DOT.

2.1 シリカ粒子合成法

粒径1 μm以下の微小なシリカ粒子の合成法には、溶液中で

* 研究開発本部 横浜研究所

合成するゾル-ゲル法が古くから知られている。Stöberはアルコール溶媒中で、テトラアルコキシシランをアンモニアなどの弱塩基を用いて重合させ数十nmからミクロンサイズの粒子を得ている⁴⁾。Stöberの報告以来、ゾル-ゲル法によるシリカ粒子合成法は改良がなされ、有機色素を共有結合したシリカ粒子内部に固定したシリカ粒子の合成法とその特性についてvan Blaaderenが報告している⁵⁾。

2.2 有機色素の固定化方法

有機色素を固定化したシリカ粒子は、有機色素とシランカップリング剤を共有結合で結合した色素-シランカップリング剤複合体とTEOSを重合させることで得られる。シランカップリング剤と有機色素を結合する方法としては、図2に示すようなFITC (fluorescein isothiocyanate) やTRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) などのイソチオシアネート基を有する色素とAPS (3-aminopropyltriethoxysilane) をチオウレア結合で結合する方法^{5), 6)} や、NHS (N-hydroxysuccinimide) で活性化されたエステル基を有する色素とAPSをアミド結合で結合する方法⁷⁾が報告されている。有機色素の発光特性は、有機色素とシランカップリング剤の結合方法に影響されるので、合成される粒子の発光強度を大きく左右する。従って有機色素とシランカップリング剤の結合は、非常に重要な工程である。

我々は、APSをアミド結合した色素-シランカップリング剤複合体を用いて蛍光シリカ粒子の合成を検討した。粒子は、色素-シランカップリング剤複合体、及びTEOSを水-アルコール混合溶媒に溶解し、アンモニアを添加して重合させ、室温で数時間から1日混合することで合成される(図3)。本手法により、これまでにフルオレセイン、ローダミン6G、ROX (5(6)-carboxy-X-rhodamine), TAMRA (5(6)-carboxytetramethylrhodamine), クマリンなどの様々な波長の蛍光色素を導入できることを確認している。

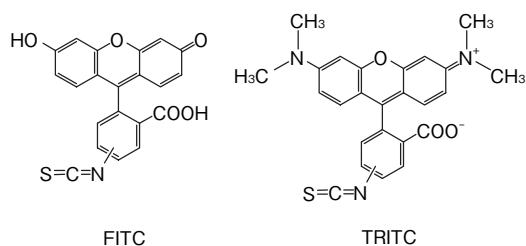


図2 FITC及びTRITCの構造
Structure of FITC and TRITC.

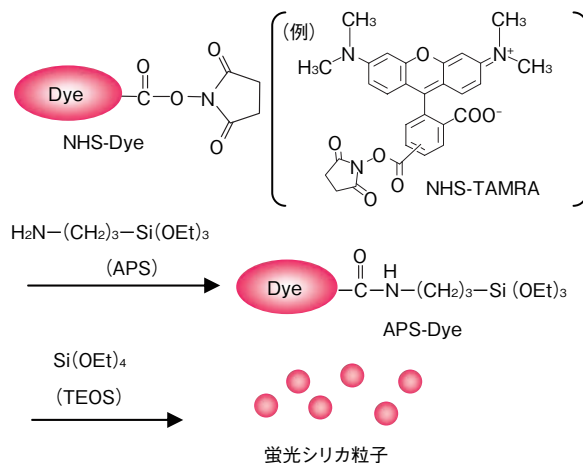


図3 蛍光シリカ粒子の合成法
Synthesis of fluorescent silica nanoparticle.

2.3 粒径制御

バイオ分野における蛍光検出技術では、アプリケーションによって最適な粒径が異なる。例えば免疫染色やイメージングなどの微小領域の観察に用いる場合や、DNAチップ、プロテインチップなどマイクロアレイへの応用には、30 nm以下の微小なシリカ粒子が好ましい。また、イムノクロマト法では30 nm～数100 nmの粒径が用いられ、フローサイトメータを用いたビーズアッセイでは、ミクロンサイズの粒径の粒子が用いられる。

我々は、TEOSの添加量とアンモニア濃度を変えて粒子合成を行い、粒径の作り分け、及び粒度分布の狭窄化の検討を行った。その結果、図4に示すように粒径が15 nm～500 nmで非常に均一性の高い粒子の合成に成功した。

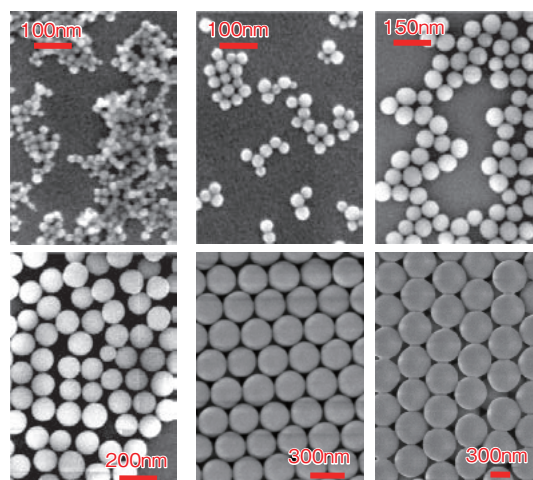


図4 粒径を作り分けた蛍光シリカ粒子
Size-controlled fluorescent silica nanoparticles.

3. 表面修飾法の開発

蛍光シリカ粒子を蛍光試薬として用いるためには、粒子表面をタンパク質やオリゴヌクレオチドなどの生体分子で表面修飾する必要がある。また、蛍光試薬は生理食塩水などの塩を含む緩衝液中で用いられるため、凝析を防止するための表面修飾が

必要である。本章では、これらの表面修飾の目的及び表面修飾法について説明する。

3.1 表面修飾の目的

3.1.1 生体分子を結合するための官能基の導入

蛍光シリカ粒子を蛍光試薬として用いるためには、蛍光シリカ粒子表面に抗体、オリゴヌクレオチド、酵素などの生体分子を結合する必要がある。例えば免疫染色や細胞イメージングでは、細胞の内部や表面に提示された抗原に蛍光試薬を特異的に結合させるために、抗体を表面に修飾した粒子が必要である。

生体分子と粒子を結合させる方法は、物理化学的吸着によって結合する方法と、共有結合によって結合する方法に大別される。

物理化学的吸着は、粒子と生体分子を緩衝液中で数時間から数日混合し、粒子表面にファンデルワールス力やイオン結合によって生体分子を吸着させる方法である。この方法は、操作は簡便であるが、粒子の表面状態や結合させる生体分子の種類によって付き方が一定しないという問題がある。

一方、粒子と生体分子を共有結合させる方法は、粒子表面に導入したカルボキシル基と生体分子のアミノ基を縮合剤を用いてアミド結合で結合する方法、EMCS (*N*-(6-Maleimidocaproyloxy) succinimide) や、分子量数百～数千のポリエチレングリコールをスペーサとする二価架橋剤を用いて架橋する方法(図5)などがある。また近年、高い選択性かつ高い反応性で2種類の化合物を共有結合できる「クリックケミストリー」が共有結合による生体分子の標識方法として注目を集めている⁸⁾。以上のような共有結合による結合方法は、生体分子を定量的、かつ不可逆的に導入するのに適している。

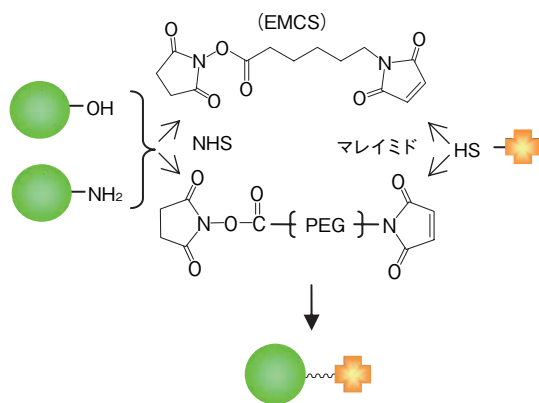


図5 架橋試薬
Cross-linking reagent.

3.1.2 塩を含む緩衝液中での分散安定化

蛍光試薬は、標的となる細胞や抗原、抗体、酵素、DNA、ペプチドなどの生体分子の安定性や活性を保持するために様々な緩衝液中で用いられる。NaClやKClなどの塩が含まれる緩衝液中では、粒子が疎水コロイドとなっている場合、粒子は凝集体を生じ容易に凝析する。これは、粒子同士の静電反発力が電解質によって弱められるために起こる現象である。蛍光シリカ粒子が凝析すると蛍光試薬としての機能が果たせなくなるため、表面修飾によって凝析を防止する必要がある。

3.2 交互吸着法

上述したように、シリカ粒子への官能基導入及び凝析防止のために、シリカ粒子を高分子で被覆する検討を行った。シリカ粒子を高分子で被覆する方法には、シリカ粒子表面に高分子を重合させシリカ粒子のコアを高分子層で覆ったコアシェル粒子にする方法が考えられるが、本研究ではより簡便な方法でシリカ粒子と高分子の複合化を可能とする、交互吸着法(layer-by-layer: LbL)による表面修飾法を検討した。

交互吸着法とは、正の電荷を持つイオン性高分子及び負の電荷を持つイオン性高分子を、基板や粒子の表面に静電的引力によって交互に積層させ、高分子の薄膜を形成する手法である⁹⁾(図6)。本方法を利用すれば、室温、水中などの温和な条件の下、比較的簡便な操作で粒子の表面修飾が可能である。

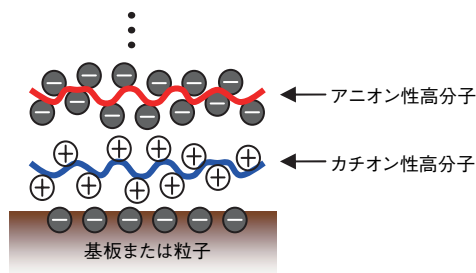


図6 交互吸着法
Layer-by-layer adsorption method.

3.3 交互吸着法による蛍光ナノシリカ粒子の表面修飾

水中に分散している粒子は、そのほとんどが帯電しており、静電的反発力によって分散を維持している。このような帯電した粒子の表面付近では、粒子と反対の符号を持つイオンが集まり、図7に示すような電気二重層を形成している。粒子表面に近い領域では、イオンは粒子の静電的相互作用を強く受けるために束縛されており、固定層またはStern層と呼ばれている。更に外側では、イオンは完全には束縛されず比較的自由に動いている。この領域を拡散層と呼ぶ。固定層と拡散層の境目をすべり面と呼び、無限遠を基準としたすべり面の電位をゼータ電位と呼ぶ¹⁰⁾。粒子の表面電位を直接測定することは困難であるが、ゼータ電位は電気泳動法などによって測定でき¹⁰⁾、液体に分散した粒子の表面状態を知る非常に重要な情報である。

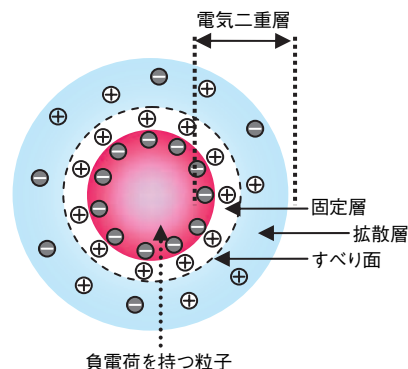


図7 電気二重層
Electrical double layer.

蛍光シリカ粒子のゼータ電位は、蒸留水中で $-45 \sim -55$ mV程度の値であり、負の電位を持っている。そこで、1層目にカチオン性高分子であるポリアリルアミン塩酸塩 (PAH)、2層目にアニオン性高分子であるポリアクリル酸ナトリウム (PAA) を積層することにより、粒子表面に静電的引力を利用した交互吸着処理を行った (図8)。

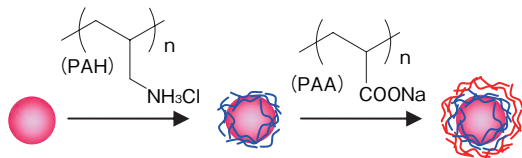


図8 蛍光シリカ粒子の交互吸着処理
Modification of fluorescent silica nanoparticles by Layer-by-Layer adsorption.

交互吸着処理では、粒子と反対の電荷を持つイオン性高分子が静電的に結合することによって、粒子のゼータ電位はマイナスからプラス、プラスからマイナスに反転する。ゼータ電位の符号が反転する過程では、粒子間の静電反発力が一時的に弱められるために、粒子凝集が生じ易くなる。そこで交互吸着処理として、高分子溶液中に徐々にシリカ粒子を滴下し、粒子が速やかに高分子によって被覆される条件を採った。その結果、交互吸着処理プロセスの粒子のゼータ電位は、PAH処理によってゼータ電位がプラスに反転し、更にPAA処理によってゼータ電位がマイナスに反転することが確認でき (図9)、交互吸着処理の過程での凝集が抑制されたシリカ粒子を得ることができた。

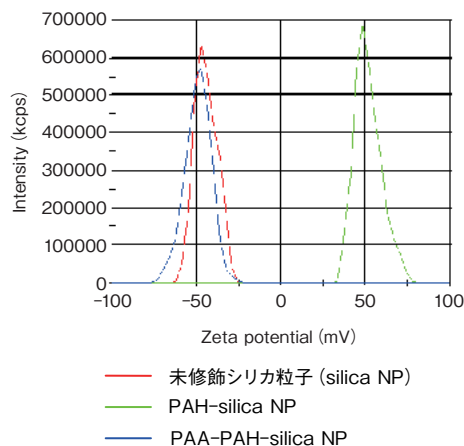


図9 LbL 処理におけるゼータ電位の変化
Changes of ζ -potential in LbL process.

3.4 分散安定性の評価

交互吸着処理の効果を確認するため、得られた粒子のリン酸緩衝液中での分散安定性を評価した。交互吸着処理をした粒子を、0.9%のNaClを含むリン酸緩衝液 (pH7.0) に分散させ室温で放置したところ、30分後に粒子は沈降した。これは、NaClの添加によって、静電的に吸着しているイオン性高分子の静電的引力が弱められ、高分子が粒子から脱離したためと考えられ

る。したがって、塩を含む緩衝液中での分散安定化には、単に交互吸着でイオンの高分子を結合させるだけでなく、共有結合などのより強い結合力で高分子同士を固定化する必要がある。

PAHは高分子鎖の側鎖にアミノ基を、PAAはカルボキシル基を持つ。これらを縮合してアミド結合で結合すれば、高分子の網に覆われた構造を形成し、塩の添加に対して粒子から脱離しなくなると考えられる (図10)。そこで、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) を用いて高分子の縮合処理を行い網構造を形成させたシリカ粒子を、0.9%のNaClを含むリン酸緩衝液 (pH7.0) に分散させ、粒径の経時変化を動的光散乱法 (DLS) で評価した。その結果、46時間後でも粒子は分散を維持しており、安定なコロイドとなっていることが確認できた (図11)。またこの粒子は、表面にカルボキシル基を有していることから、このカルボキシル基を利用して、抗体、アミノ基末端を持つオリゴヌクレオチドあるいは酵素などを結合することが可能である。

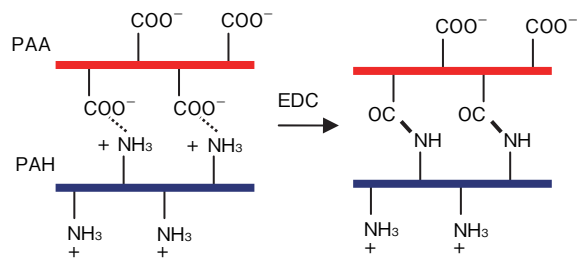


図10 交互吸着層の縮合処理
Condensation between layers.

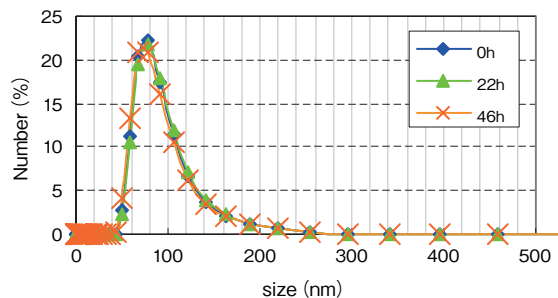


図11 架橋処理した粒子の分散安定性
Dispersion stability of silica nanoparticles after LbL adsorption process.

3.5 吸着の防止

粒子の表面修飾は、不要な物質の吸着を防止するという効果が期待できる。吸着は、蛍光試薬にとって次のような2つの意味を持つ。1つは、基板やメンブレンなどの部材への粒子の吸着である。蛍光試薬がマイクロアレイの基板やプレートアッセイに用いるプレートに吸着すると、ノイズレベルが増大し感度低下を招く¹¹⁾。他の1つは、標的以外の不純物の非特異的吸着である。蛍光検出に用いるサンプルには、細胞培養液や唾液、血清、尿など標的以外の不純物を含むものが多い。それらの不純物との非特異的吸着が生じると、擬陽性などの判定誤りの原

因となる。このような吸着の表面修飾技術による抑制は、蛍光シリカ粒子を蛍光試薬に利用する際の非常に重要な特性となる。

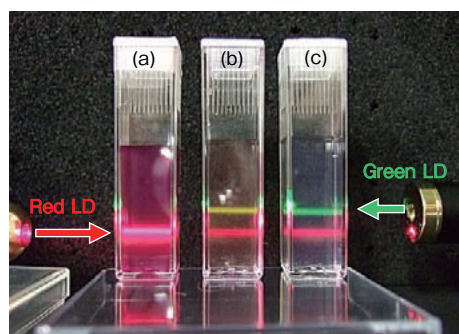
4. 診断試薬用標識材料への応用

4.1 発色ナノ粒子としての応用

有機蛍光色素を含んだ溶液は、色素濃度を高くしていくと、濃度消光によって蛍光が弱くなり、ついには全く蛍光発光を示さなくなる。蛍光シリカ粒子中に固定化される有機色素も同様の現象を示し、シリカ粒子に固定化する色素を増大させていくと、ついには蛍光発光しない粒子となる。一方、濃度増加と共に吸光度は単調に増加するので、色素を高濃度に固定化したシリカ粒子は高発色粒子となる。

図12に、TAMRAを高濃度に固定化した吸光シリカ粒子(左)、蛍光が最大になる濃度でTAMRAを固定化した蛍光シリカ粒子(中央)、及び色素が全く入っていない無色素シリカ粒子(右)のコロイドの写真を示す。左から赤色のLD(650 nm)を照射すると、それぞれのコロイドについて、チンダル現象によって光路が確認できる。一方、右側から緑のLD(532 nm)を照射すると、無色素粒子では緑の光路が見えており、中央の蛍光シリカコロイドでは蛍光によって長波長にシフトした色の光路が確認できる。しかし、吸光シリカ粒子のコロイドでは、吸光シリカ粒子が緑色の光源を完全に吸収してしまい、光路が確認できない。このように、色素を高濃度に固定化した吸光シリカ粒子は非常に高い吸光度を有することが分かる。

そこで我々は、この強い吸光度を有する吸光シリカ粒子を用いることで、発色による陽性・陰性の判定を行うイムノクロマト検査薬への応用を検討した。



(a) 高濃度に色素が含有したシリカ粒子
(b) 蛍光に最適濃度の色素を含有するシリカ粒子
(c) 色素を含有しないシリカ粒子

図12 シリカ粒子の吸発光状態
Absorption and fluorescence properties of silica nanoparticles.

4.2 イムノクロマト法

イムノクロマト法とは、①血清、唾液、尿などのサンプルに含まれる標的物質を、抗体が結合した標識用ナノ粒子が補足、②この標識粒子と標的物質の複合体が毛細管現象によってメンブレン中を移動、③メンブレン中に固定化されたライン状の抗体に複合体が集積することによる発色、この一連のステップにより標的物質の陽性・陰性を判定する簡易検査試薬である

(図13)。

イムノクロマト法は操作が簡便で判定が容易であり、また比較的短時間で判定が可能ことから、インフルエンザ感染の判定や妊娠判定時の非常に有用なツールになっている。また、近年注目されるPOCT (point of care testing) の有用なツールとして、感染症抗体や心筋マーカーなどの様々な診断ターゲットへの開発が進められている。

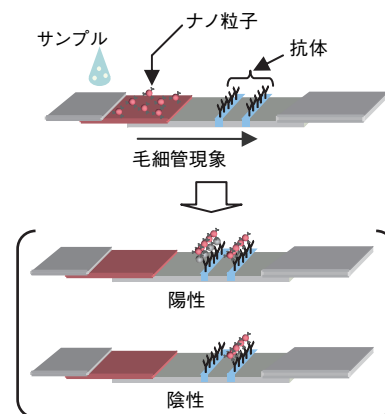


図13 イムノクロマト法
Immunochromatography assay.

4.3 吸光シリカ粒子を用いたイムノクロマト検査薬の調製

本研究では、妊娠検査の際に判定に使用するhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を検出するイムノクロマト試薬用標識粒子の試作を行った。

粒子コロイドは、高濃度にTAMRAを含有させた吸光シリカ粒子に、PAH及びPAAで交互吸着処理を行い、その後EDC及びSulfo-NHS共存下、抗hCG抗体を混合した。この処理は、PAHとPAAの架橋反応と抗体の結合を同時に行うことを意図している。

得られた粒子コロイドを、抗IgG抗体がライン状に塗布されたメンブレンに浸し、粒子を毛細管現象により展開させたところ、図14に示すように抗体のラインが赤く発色した。



図14 シリカ粒子でラインが発色したメンブレン
Line of membrane colored by high-doped silica nanoparticle.

4.4 蛍光イムノクロマトへの展開

現在、イムノクロマト法の標識粒子には、金粒子や着色ラテックス粒子が使用されており、陽性・陰性の判定を目視で行う方法が主流である。イムノクロマト検査薬のアプリケーションの拡大には更なる高感度化が有望視されており、このためには、標識粒子に蛍光粒子を利用し、蛍光発光を検出する方法が有効であると考えられている。

金粒子は、発色が強く発色型のイムノクロマト検査薬には広く使用されているが原理的に蛍光発色しないために、蛍光型イ

ムノクロマト試薬には適さない。一方、ラテックス粒子は、蛍光色素を導入した蛍光ラテックス粒子が市販されているが、粒子表面に抗体が結合しにくく、また疎水結合による非特異結合を起こしやすいといった課題がある。我々が開発する蛍光シリカ粒子は、親水性が高く、また抗体の結合性が高いことを特長としており、蛍光型イムノクロマト試薬用の標識粒子として非常に適していると考えられる。

5. おわりに

新たな生体分子解析用蛍光標識材料として、蛍光シリカ粒子「QUARTZ DOT」を開発した。QUARTZ DOTは、粒径の精密な制御が可能であり、アプリケーションに最適化された特性の粒子が作製可能である。

今後、当社の得意とする光技術と材料技術を組み合わせることで、より高感度な生体分子検出技術を構築し、バイオメディカル分野へ貢献したい。

参考文献

- (a) S. Weiss: "Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules," *Science*, **283** (1999), 1676.
- (b) T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano, and T. Nagano: "Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change," *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006), 15946.
- (c) W. M. Leevy, S. T. Gammon, H. Jiang, J. R. Johnson, D. J. Maxwell, E. N. Jackson, M. Marquez, D. Piwnica-Worms, and B. D. Smith: "Optical Imaging of Bacterial Infection in Living Mice Using a Fluorescent Near-Infrared Molecular Probe," *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006), 16476.
- A. P. Alivisatos: "Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots," *Science*, **271** (1996), 933.
- X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss: "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science*, **307** (2005), 538.
- Stöber, W.; Fink, A: "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range" *J. Colloid Interface Sci.*, **26** (1968), 62.
- A. van Blaaderen and A. Vrij: "Synthesis and Characterization of Colloidal Dispersions of Fluorescent, Monodisperse Silica Spheres," *Langmuir*, **8** (1992), 2921.
- A. Imhof, M. Megens, J. J. Engelberts, D. T. N. de Lang, R. Sprik, and W. L. Vos: "Spectroscopy of Fluorescein (FITC) Dyed Colloidal Silica Spheres," *J. Phys. Chem. B.*; (Article); **103** (1999), 1408.
- L. Wang and W. Tan: "Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation," *Nano Letters*, **6** (2006), 84.
- (a) H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless: "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40** (2001), 2004.
- (b) A. Krasinski, Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb: "In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors," *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005), 6686.
- (c) C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal: "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper (I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides," *J. Org. Chem.*, **67** (2002), 3057.
- (a) S. S. Shiratori, T. Ito, and T. Yamada: "Automatic film formation system for ultra-thin organic/inorganic heterostructure by mass-controlled layer-by-layer sequential adsorption method with 'nm' scale accuracy", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **198-200** (2002), 415.
- (b) Z. Li, D. Lee, M. F. Rubner, and R. E. Cohen: "Layer-by-layer Assembled Janus Microcapsules," *Macromolecules*, **38** (2005), 7876.
- (c) D. Lee, M. F. Rubner, and R. E. Cohen: "Formation of Nanoparticle-Loaded Microcapsules Based on Hydrogen-Bonded Multilayers," *Chem. Mater.*, **17** (2005), 1099.
- 北原文雄, 古澤邦夫: 最新コロイド化学, 講談社, (1990)
- R. P. Bagwe, L. R. Hilliard, and W. Tan: "Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding," *Langmuir*, **22** (2006), 4357.