

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K01958
研究課題名(和文)凝集誘起発光物質を利用した高輝度蛍光ビーズの開発とウイルスの高感度検出への応用

研究課題名(英文) Development of high-brightness luminescent beads using aggregation-induced emission materials and application to highly sensitive detection of viruses

研究代表者
幡野 健 (Hatano, Ken)
埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40332316
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、凝集誘起発光物質をポリスチレンビーズに包含させることにより、高輝度発光するビーズの開発を実施した。その結果、量子収率90%に達するほど高輝度発光するビーズを開発することができた。また、そのビーズをコアとして、表面官能基化、PEG鎖修飾、および抗インフルエンザ抗体の感作を行い、イムノクロマトキット用の標識化抗体とした。この標識化抗体を使い、インフルエンザ用イムノクロマトキットを試作した。金コロイドで標識化した抗体を用いた市販のインフルエンザ用イムノクロマトキットと検出感度を比較したところ、本開発ビーズを用いた検出キットの方が100倍高感度でインフルエンザを検出できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、非常に重要な社会的な意義がある。現在の新型コロナ禍でも同じだが、感染症に感染しているかを判定する迅速・簡便・安価・高感度な検査方法の確立が望まれている。現在、PCR検査は、高感度ではあるが、数時間以上の時間を要し、安価に診断できるような方法ではない。一方、イムノクロマトキットは迅速・簡便・安価ではあるが、感度があまりよくなく、感染しているにもかかわらず、見逃してしまう偽陰性検体が多く、症状が出るまでの間に他に感染させていた疑いが大きい。しかし、本件で開発した高輝度蛍光ビーズを使用すれば、市販品に比べ100倍も高感度化することから、感染拡大防止、医療費削減の形で社会貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed beads that emit light with high brightness by incorporating aggregation-induced emission materials into polystyrene beads. As a result, we were able to develop beads that emit light with high brightness, reaching a quantum yield of 90%. Further, using the beads as a core, surface functionalization, PEG chain modification, and sensitization with an anti-influenza antibody were performed to obtain a labeled antibody for an immunochromatography kit. Using this labeled antibody, an immunochromatography kit for influenza was prototyped. Comparing the detection sensitivity with a commercially available influenza immunochromatography kit that uses an antibody labeled with colloidal gold, it was found that the detection kit using the developed beads can detect influenza with 100 times higher sensitivity.

研究分野：有機ケイ素化学

キーワード：凝集誘起発光 感染症 診断 高感度検出 ウイルス 迅速診断 イムノクロマト 蛍光

1. 研究開始当初の背景

抗体は、抗原と特異的に結合する特性(抗原-抗体反応)を有するため、抗原の有無、その感染場所特定に利用されている。しかし、抗原や抗体自体は発色も発光もしていないため、その場合、抗体側を発色・発光する標識物質でタグをする必要がある。

金は10 nm以下の粒子にすると赤色を呈する。大抵のイムノクロマト法には、この金コロイドが標識物質として利用されている。しかし、金コロイドは発色が良くなく、検査での陽性・陰性の判別が難しいことが問題となっている。これを解決するため、金コロイドに代わる新たな標識物質として量子ドットや蛍光ビーズの開発が現在活発に進められている。

CdE(E=S, Se, Te)系の量子ドットは、幅広い可視領域の発光材料として期待されている。良好な蛍光量子収率(50%)と粒径により発光色が変わることが特徴である。しかし、量子ドットは、表面をガラスで被膜しているが、その内部には毒性の高いCd, SeやTeが使われている。そのため、使用後の廃棄処分には、人体や環境に対する特別な配慮が必要である。

蛍光ビーズとは、内部に蛍光物質を包含した高分子微粒子のことを示す。現在のところ、蛍光物質には、共役の拡張した平面性の高い有機化合物が使用されている。この共役系有機化合物では、高濃度になると蛍光量子収率や輝度の低下を導く『濃度消光』を引き起こしてしまう。そのため、従来の蛍光ビーズでは、その蛍光の強度に限界が出来てしまう。

最近、我々はシロール誘導体の凝集誘発発光(Aggregation-induced emission: AIE)の特性を利用した『ウイルスの見える化』技術の確立に成功、現在、いくつかの企業と試作品の開発を進めている。AIE現象を示す化合物は、外周をフェニル基で覆われた構造的特徴をしている。AIE化合物が分散状態にある時、紫外線照射による光エネルギーは、外周のフェニル基の振動運動により発散され、発光しない。ところが凝集状態では、そのフェニル基がギアのように噛み合い、振動によるエネルギー発散が困難となり、蛍光エネルギーとして外部に放出されるので、強い蛍光が観測される。

AIE化合物は、凝集するほど(=高濃度ほど)高効率でフォトルミネッセンス(PL)発光する。そこで我々は、このAIE効果が濃度消光とは真逆の発光特性であることに着目、AIE化合物をビーズに包含させ、これまで以上に発光する蛍光ビーズを作製することを発案した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの蛍光ビーズの輝度を大幅に上回る高輝度蛍光ビーズの開発を行う。来、蛍光物質に用いられてきた濃度消光をするような有機化合物に代わり、高濃度になると逆に強い蛍光を発する凝集誘発発光物質を利用することが本研究の特長である。これにより、高濃度でビーズ内に蛍光物質を包含させても、濃度消光をせずに高輝度蛍光が達成される。

本研究では、高輝度蛍光ビーズを作製するための基礎研究(凝集誘発発光分子の最適化、ビーズ製造条件の最適化など)を実施したのち、イムノクロマトキットに応用する。市販のイムノクロマトキットに比べ、最少検出感度(検出限界)が大幅に改善する試作品を作製して、本研究で開発する蛍光ビーズの優位性を検証することを目的とする。

本研究期間中には、以下の事項について明らかにする。

- [1] 発光色・粒径の異なるシロール包含蛍光ビーズの調製
- [2] シロール包含蛍光ビーズの高輝度化の検討
- [3] 蛍光ビーズの表面修飾と抗体結合
- [4] 市販イムノクロマトキットとの比較

3. 研究の方法

AIE特性を示すシロール類をビーズ内に包含することで、高輝度な蛍光ビーズの調製を行う。異なる発光色のシロールを合成、蛍光ビーズの合成方法の模索により、発光色および粒径の異なる高輝度蛍光ビーズを作製して、多様な用途に対応できる蛍光ビーズのラインナップを取り揃える。AIE効果をより有効活用できるビーズ製造方法を探索する。具体的には、シロール分子の構造、架橋剤、反応後のビーズの処理温度まで調査する。シロールを包含した高輝度蛍光ビーズに抗体を結合させ、イムノクロマトキットの試作品を作製する。最終的に、市販品と試作品との検出感度を比較して、本研究で開発する蛍光ビーズの優位性を証明するとともに、そのプラットフォーム技術の確立を本研究で行う。

4. 研究成果

本研究では、凝集誘起発光物質をポリスチレンビーズに包含させることにより、高輝度発光するビーズの開発を実施した。その結果、量子収率90%に達するほど高輝度発光する青色発光

する蛍光ビーズを開発することができた。また、当初の方法では、蛍光物質をポリスチレンに対して2%までしか包含することができない上に、長波長発光（黄色・赤色発光）する蛍光物質を包含することが判明した。後者の原因として、この方法はスチレンの乳化重合を応用する合成法のため、ラジカルが系中に存在することからこのラジカルによって蛍光物質が分解したものと考察した。

そこで、これらの問題を解決する新たなビーズの調整法を考え出した（特許出願中）。この方法によって、蛍光物質をポリスチレンに対して10%まで包含させることが可能になり、当初の方法よりも格段に明るく発光する高輝度蛍光ビーズを作成できるようになった。さらに、ラジカル種を用いない新たな方法では、同様にして緑・黄・赤色発光する蛍光ビーズを作成できるようにもなった。これにより、当初の目的（上述[1]及び[2]）を達成できた。

さらに、これらのビーズをコアとして、表面官能基化、PEG鎖修飾、および抗インフルエンザ抗体の感作を行い、イムノクロマトキット用の標識化抗体とした（上記目的の[3]を達成）。

この標識化抗体を使い、埼玉県内のイムノクロマトキット製造メーカーの協力のもと、インフルエンザ用イムノクロマトキットを試作した。金コロイドで標識化した抗体を用いた市販のインフルエンザ用イムノクロマトキットと検出感度を比較したところ、本開発ビーズを用いた検出キットの方が100倍高感度でインフルエンザを検出できることが分かった（当初目的[4]を達成）。

本研究により、イムノクロマトキットで陽性・陰性を判定する標識物質を従来の金コロイドから、本研究で開発した高輝度蛍光ビーズに変更するだけで、高感度検出できることが判明した。したがって、従来、イムノクロマトキットは迅速・簡便・安価な診断方法ではあるが、感度が低く、PCR検査などの精密検査には劣ると認識されてきた。しかし、本研究により、イムノクロマトキットによる診断を高感度化することが証明できたために、迅速・簡便・安価・高感度のすべてを満たすことができた。これにより、近い将来、医療現場での利用が期待されている。現時点で、数社のメーカーと次世代イムノクロマトキットとして、交渉を進めている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤川大輔, 小山哲夫, 松下隆彦, 松岡浩司, 幡野 健
2. 発表標題 濃度消光を引き起こさない新規蛍光微粒子の開発
3. 学会等名 第22回ケイ素化学協会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 銭本直樹, 藤川大輔, 小山哲夫, 松下隆彦, 松岡浩司, 幡野 健
2. 発表標題 溶媒留去法を用いた蛍光ビーズの高感度化および多色化
3. 学会等名 第22回ケイ素化学協会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 幡野 健
2. 発表標題 蛍光量子収率が90%にも達する高輝度蛍光ビーズの開発
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2017 大学見本市
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 幡野 健
2. 発表標題 蛍光量子収率が90%にも達する高輝度蛍光ビーズの開発
3. 学会等名 新技術説明会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡浩司、幡野 健、松下隆彦
2. 発表標題 蛍光量子収率が90%にも達する高輝度蛍光ビーズの開発 他
3. 学会等名 ジャパン・ヘルスケアベンチャー・サミット2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 蛍光液体組成物および蛍光樹脂成形体	発明者 幡野 健、藤川大輔、松下隆彦、松岡浩司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-37215	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考