

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23241037

研究課題名(和文) ナノチューブ近赤外発光を利用した次世代臨床検査システム

研究課題名(英文) Clinical test system utilizing near infrared fluorescence of nanotubes

研究代表者

湯田坂 雅子 (Yudasaka, Masako)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・招聘研究員

研究者番号：70159226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体物質透過性が高い近赤外光を使った免疫検出法の確立をめざして、近赤外光を発光する単層カーボンナノチューブ(CNT)と抗体との複合体の作成法を確立させ、また、近赤外発光計測に最適な計測機器の開発を行った。

本プロジェクトの目的を達成するに当たり、最も重要なCNTと抗体との複合体作製では、CNTの構造・特性が従来化合物と大きく異なることが原因で、様々な問題が生じた。そこで、従来法に改良を加え、また、CNT-抗体複合体の評価法を改良して検討した結果、CNT-抗体複合体が安定に作成できるようになった。また、手のひらサイズでありながら、CNTの近赤外発光を検出できる装置開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aims of this project are to establish the immunoassay system using single-walled carbon nanotubes (CNTs) as a near infrared (NIR) fluorescence label and to make a new NIR fluorescence detection apparatus that is suitable for the clinical test uses.

The most important issue to achieve our purpose was the preparation of complex of CNTs and IgG antibody. Many problems of this preparation which were mostly originated from the unique structures and properties of CNTs were solved, and, as a result, it became possible to make CNT-IgG stably. In addition, we have succeeded in making the palm-sized apparatus for the NIR fluorescence detection with sensitivity high enough to detect the CNTs fluorescence in the immunoassay. Our results will enable to develop new clinical test systems using CNTs as NIR fluorescence labels.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ粒子・ナノチューブ 臨床検査

### 1. 研究開始当初の背景

昨今の技術開発を背景として、各種疾患バイオマーカー探索が進められており、「がん」の検出に役立つ可能性が高い候補分子が相次いで報告されている。産業技術総合研究所の糖鎖医工学研究センターで進めるプロジェクトでも、池原(分担研究者)らが糖鎖分析技術のアドバンテージを最大限に生かして、疾患の発生と進展に伴って出現する未成品糖タンパク質(=糖鎖修飾異性体)を疾患バイオマーカーとする研究を進めて来た。

最近、池原ら(分担研究者)は、肝炎に伴って生じる線維化を測定できる未成品糖鎖バイオマーカーを発見し、侵襲性の高い生検に代わって血液検査での検出評価を可能とした(Kuno, Ikehara et al., Clinical Chem. 2010)。さらに、胆管がんのように発見が極めて難しい悪性腫瘍についても、腫瘍の存在を感度良く検出できる未成品糖鎖バイオマーカーの発見に成功している。今後、同様のアプローチで開発を進めると、動脈硬化やアルツハイマー病の検査診断にも展開可能であると予想される。しかし、血液中に存在する疾患マーカー分子を検出し、これらの疾病の超早期診断を達成するためには、現在の臨床検査における検出感度では不十分なことが多い。

一般に血液をサンプルとする臨床検査では、血球成分(赤血球や白血球、血小板)を遠心分離やフィルター濾過により除去する。しかし、いずれの操作でも除ききれないので、これら生体物質が少なからず混入する事となり、疾患バイオマーカー検出のために使うプローブ分子の光を妨害吸収してしまい疾病検出感度を下げてしまう。同時に、血球成分が非特異的に発光し、プローブ発光検出の際にノイズの原因ともなる。こうした血球成分によるプローブ発光の妨害吸収や自家発光ノイズは、超早期診断を目的としたさまざまな疾患バイオマーカーの高感度検出を邪魔し、その実用化において非常に大きな障害となっている。

近赤外光は生体透過性が高いため、in vivo イメージングや腋窩リンパ節検査などの体内診断をゴールに技術開発が試みられている。血液や体腔液を対象とする臨床検査においても、近赤外光を使えば、上述した問題を回避でき、多種類の疾病マーカーの高感度検出が可能となるが、実現していない。実現のためには、近赤外波長領域で効率良く発光するプローブが必要である。

CNT は、生体物質によって吸収されにくい光(波長 700-800 nm)により励起することができ、その発光波長は生体自家発光のない波長 1000-1200 nm 付近の近赤外高領域にある(図 2)。CNT は、近赤外色素分子や近赤外量子ドットに比べて、10 倍以上の光学的耐久性があり、化学修飾も可能である。つまり、CNT は近赤外発光プローブとしての優位性は比較なく、近赤外光を利用した次世代臨床検査

の実現を可能にする強力な新規材料である。CNT の発光は 2002 年に発見され、これまで、生体内の CNT イメージングなども試みられた(Leeuw et al. Nano Lett. 2007)ものの、そのもっとも有力な応用である臨床検査への検討はこれまで全くなされていない。

CNT の近赤外発光を検出するシステムに関しては、この波長領域が可視光ほど汎用されていないため、適した装置を開発する必要がある。波長 1000 ~ 1500 nm の近赤外光の検出には、通常シリコン電荷積分アンプに接続された InGaAs フォトダイオードアレイを使用するが、室温付近においては、フォトダイオードの暗電流が大きくシリコン IC で許容されるキャパシタンスでは、十分な積分時間が確保できない。フォトダイオードを液体窒素冷却することで解決可能であるが、価格や操作性の問題を鑑みると、臨床検査室での実用化は難しい。これに対して小倉(分担研究者)は、極微弱光の計測が室温付近で可能となるよう、表面電流ブロック層を設けたヘテロバイポーラフォトトランジスタを開発した(Ogura et al. Electronics Lett. 2006)。この素子の特色として、内部増幅作用が大きいので(電流増幅率 ~ 数千)、外部電気回路によるノイズの影響を受けにくいこと、ベース領域に光励起キャリアの蓄積効果を持つため、電荷積分機能を内蔵していること、可視から赤外まで広い波長範囲に感度を有することなどが挙げられ、臨床検査室で近赤外光を高感度に検出できるシステム機器の基盤技術は確立している。

### 2. 研究の目的

現在の血液検査で使われている光の波長は 400-500 nm である。この波長域では、血球などによる強い光吸収と非特異的発光ノイズが、検出されるべき疾患バイオマーカーの蛍光検出を妨害し、疾患検出感度を下げる。そこで、本研究では、血球などに対して透過性が高い近赤外光を使い、臨床検査の高感度化をめざす。この目的に最適な素材は、唯一、単層カーボンナノチューブ(CNT)である。よって、1)CNT を抗体とカップリングさせ新規プローブを作製し、それを用いた ELISA による疾病バイオマーカーの検出法を最適化する。2)次世代型フォトトランジスタを用いて、CNT の発光量計測に最適化した近赤外光検出機器の開発を進める。また、疾患バイオマーカーの高感度検出を実践利用につなげるため、プロトタイプ臨床検査装置を作製する。

### 3. 研究の方法

近赤外光を用いると高感度血液検査が可能となる。しかし、近赤外発光をするプローブはなく、また、臨床検査で使えるような近赤外光検出機器も現存しない。そこで、以下のような研究を行った。

(1) CNT-抗体プローブの作製

(2) CNT-抗体プローブの免疫試験評価  
 (3) CNT の近赤外発光計測用に最適化した近赤外光検出器の作製

#### 4. 研究成果

##### (1) CNT-抗体プローブの作製

近赤外発光する CNT で IgG 抗体をラベルする手法確立させた (図 1)。

具体的には、CNT (CoMoCat CG、図 2) と NHS を末端に持つリン脂質ポリエチレングリコール (DSPE-PEG-NHS、図 3) をリン酸バッファ (PB) 中に入れて、チップ型の超音波発生装置を用いて処理後、遠心分離を行い、単一 CNT が DSPE-PEG-NHS により被覆されて (CNT-PEG-NHS) 分散液となっている上澄み液を採取した。

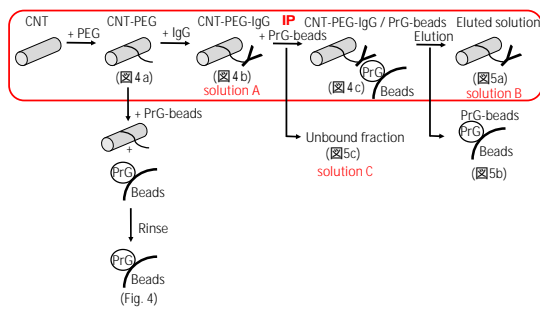


図 1 CNT-PEG-IgG 作成と免疫沈降 (IP) 試験のプロセス。

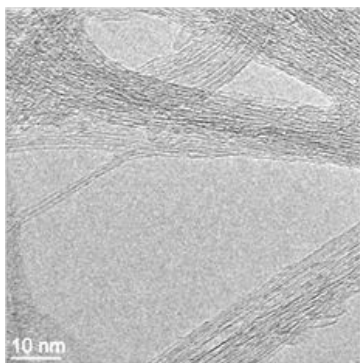


図 2 CNT の透過電子顕微鏡写真

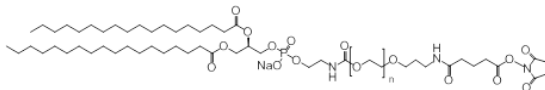


図 3 DSPE-PEG-NHS の分子構造

得られた CNT-PEG-NHS 分散液に IgG を加え、未反応 IgG を濾過にて除去し、CNT-PEG-IgG を作製した。その発光スペクトル (図 4b) は、IgG を付加するまえの CNT-PEG-NHS の発光スペクトル (図 4a) と同様に (7,5) と (7,6) のカイリティを持つ CNT からの発光が確認され、IgG 付加は CNT の近赤外発光に影響を及ぼさないことを確認した。

##### (2) CNT-抗体プローブの免疫試験評価

CNT-PEG-IgG の評価として、IgG と特異的に結合するプロテイン G (PrG) を表面に着けた磁気ビーズを用いて免疫沈降 (IP) 試験を行った。CNT-PEG-IgG 分散液中に PrG 磁気ビーズを入れ、CNT-PEG-IgG を PrG 磁気ビーズに付着させ、磁石にて CNT-PEG-IgG/PrG 磁気ビーズを回収し、洗浄後、発光スペクトルを測定した。発光スペクトルには CNT 由来のピークがみられた (図 4c)。IgG の効果を確認するために、IgG 未付加の CNT-PEG を用いて PrG 磁気ビーズを用いた沈降実験をおこなったところ、磁気ビーズに捕集されることはなく、磁気ビーズのスペクトルに CNT のピークは現れなかった (図 4d)。これらの結果により、CNT-PEG-IgG の IgG は PrG に付着する特性を維持しており、また、IP 操作により CNT の発光が阻害されることもないことが示された。

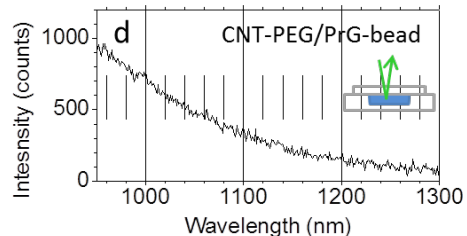
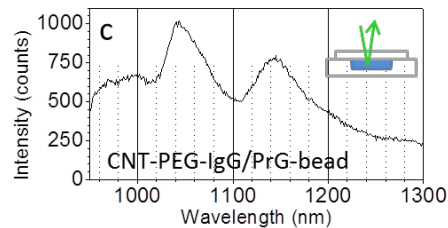
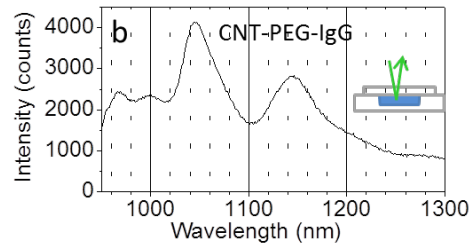
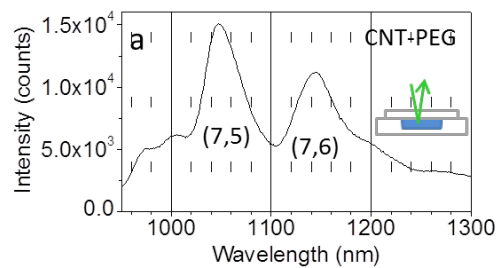


図 4 CNT の近赤外発光スペクトル。a) CNT-PEG と b) CNT-PEG-IgG の BP 分散液 (図 1 の A 液)。c) CNT-PEG-IgG/PrG 磁気ビーズ。d) CNT-PEG/PrG 磁気ビーズ。励起波長: 660 nm。

さらに、CNT-PEG-IgG の IP 試験結果を検討するために、DSPEPEG-OCH<sub>3</sub> を用いて IP 実験を行った。この化合物の PEG 末端はメトキシ基であるために、IgG とは反応しない。図 1 に

示したプロセスと同様にして作製して得たものに対して IP を行い、磁気ビーズの発光スペクトルを測定したが、CNT のピークは観測されなかった。これは、CNT の表面に IgG が物理吸着して IP ポジティブな結果をもたらすことがないことを示している。

IP 試験では、磁気ビーズから抗体を溶出させて、抗体についている蛍光ラベルの発光強度から抗体量を推定されることが多い。本実験でも PrG 磁気ビーズに付着した CNT-PEG-IgG の溶出を試みた結果、SDS を添加し約 100 に加熱することで CNT-PEG-IgG が溶出され、溶出液の発光スペクトルには、CNT の発光ピークが観測された(図 5a)。溶出後の磁気ビーズのスペクトルには CNT の発光ピークは見られなかった(図 5b)。このことから、CNT をラベルとして用いた IP においても、通常の溶出法による定量測定が可能であることが分かった。

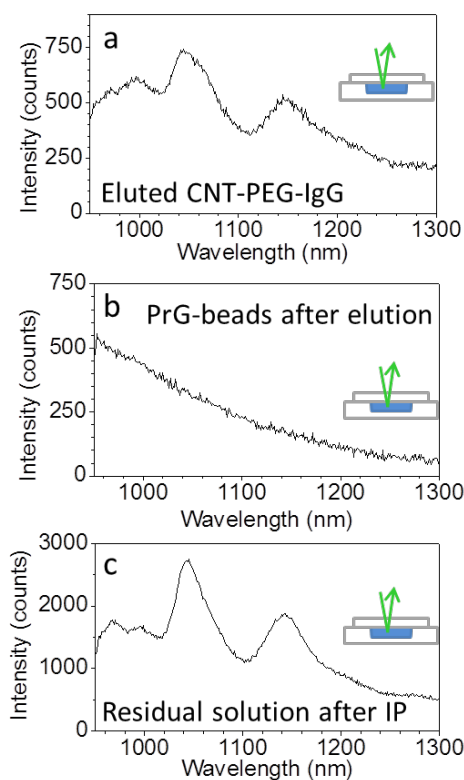


図 5 CNT の発光スペクトル。a) CNT-PEG-IgG/PrG 磁気ビーズからの溶出成分(図 1 の B 液)。b) 溶出後の磁気ビーズ。c) 磁気ビーズ捕集処理後の残液(図 1 の C 液)。

IP 前後の液(図 1 の A, B, C 液)の発光強度比から、CNT-PEG と CNT-PEG-IgG のモル比は、4.8:1 程度となり、CNT-PEG-NHS と IgG との反応率は 17% 程度と見積もられた。(注: PrG 磁気ビーズの PrG の数は付着した CNT-PEG-IgG の数より多かった。)この収率を今後いかに改善するかが課題の一つとなる。

CNT の近赤外発光ラベルを用いた IP 試験で

の抗原検出限界を CNT の発光強度から見積もると約 600 pM となる。この値は、本研究で用いた容器、装置によるものであり、今後、こうした点を改善すると、収率は潜在的にはサブピコモルになると推定され、CNT を免疫試験における近赤外発光ラベルとして用いる際の有効性を確認することができた。

### (3) CNT の近赤外発光計測用に最適化した近赤外光検出器の作製

近赤外光検出器の開発は、可視光領域に比べて遅れているため、本研究では、フォトダイオードを用いて臨床検査に適した検出器(図 6)を作製した。本装置では、横方向から波長 650 nm あるいは 980 nm の半導体レーザー光を 100Hz 程度のパルス光に変換し、装置内に導入し、薄型石英セルの側面側に照射した。石英セルにいた分散液中の CNT の発光は、Si 基板上に形成した干渉フィルタを通して背後の InGaAs 冷却フォトダイオードで検出した。

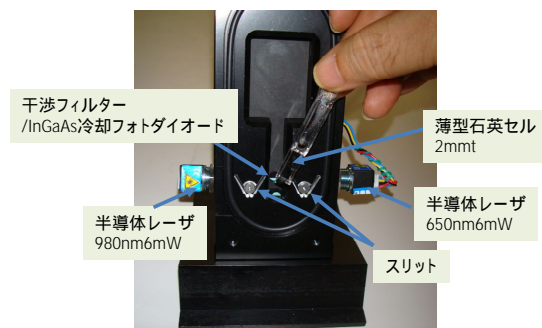


図 6 臨床検査用 NIR 光検出器プロトタイプ

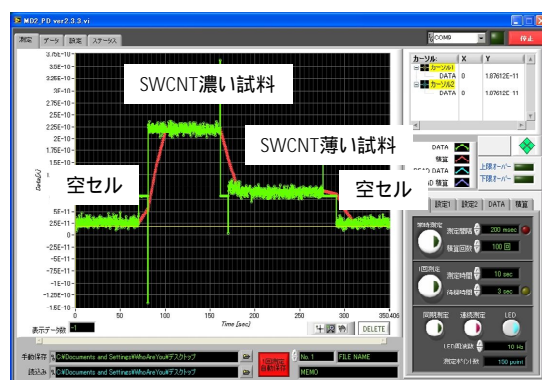


図 7 図 6 の装置で測定した蛍光強度出力

図 7 は、蛍光検出装置の出力を USB インターフェイスを介してパソコンに表示した画面である。レファレンスとして測定した溶媒をいれたセルからの信号に比べて CNT の濃度に応じて有意な信号強度が得られている。

以上の結果により、CNT の蛍光が簡便な装置により定量的に評価できることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yoko Iizumi, Toshiya Okazaki, Yuzuru Ikehara, Mutsuo Ogura, Shinsuke Fukata, Masako Yudasaka. "Immunoassay with Single-Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Fluorescent Labels" Appl. Mater. Interfaces 2013, 5, 7665-7670.

〔学会発表〕(計6件)

飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子「Controlled Functionalization of Carbon Nanotubes with Antibody」第43回フラーレン・ナノチューブ・グラフェンシンポジウム(2012年9月6日、東北大学百周年記念会館、川内萩ホール、仙台)

飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子「カーボンナノチューブと抗体の反応制御」第26回ダイヤモンドシンポジウム(2012年11月20日、青山大学、青山キャンパス、東京)

飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子「抗体のためのカーボンナノチューブ近赤外蛍光ラベル」第12回産総研-産技連LS-BT合同研究会(2013年2月5日、産業技術総合研究所、つくば)

池原譲、島村政基、愛澤秀信、佐藤浩昭、榊田創、金載浩、井上朋、湯田坂雅子、岡崎俊也、小倉睦郎、都英次郎「がんを標的疾患とするバイオイメージング技術の研究開発」第12回産総研-産技連LS-BT合同研究会(2013年2月5日、産業技術総合研究所、つくば)

飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子「Functionalization of Carbon Nanotubes with Antibody for Immunoassay」第44回フラーレン・ナノチューブ・グラフェンシンポジウム(2013年3月11日、東京大学、本郷キャンパス、東京)

飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子「Immunoassay with Single-Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Fluorescent Labels」第45回フラーレン・ナノチューブ・グラフェンシンポジウム(2013年8月5日、大阪大学、豊中キャンパス、大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ナノカーボンを用いた臨床検査

発明者：飯泉陽子、岡崎俊也、池原譲、小倉睦郎、湯田坂雅子

権利者：産業技術総合研究所

種類：特願

番号：2011-106564

出願年月日：2011/05/11

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

湯田坂雅子 (YUDASAKA Masako)

産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・招聘研究員

研究者番号：70159226

(2)研究分担者

池原譲 (IKEHARA Yuzuru)

産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：10311440

(3)研究分担者

岡崎俊也 (OKAZAKI Toshiya)

産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・研究チーム長

研究者番号：90314054

(3)研究分担者

小倉睦郎 (OGURA Mutuso)

産業技術総合研究所・ナノエレクトロニクス部門・招聘研究員

研究者番号：90356717

(4)連携研究員

増田光俊 (MASUDA Mitsutoshi)

産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・形態機能ナノシステムグループ・研究グループ長

研究者番号：70358000

(5)連携研究員

中西速夫 (NAKANIAHI Hayao)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・室長

研究者番号：20207830