

イムノクロマト方式検査キット用の抗体標識物 (高耐性銀ナノプレート)

Antibody Label for an Immunochromatographic Test Kit.
(High Resistance Silver Nanoplates)

スペシャリティ事業部門
スペシャリティ事業部 機能材開発グループ
Speciality Business Div.
Speciality Business Dept.
Functional Materials Development Group



宗 芳和
Yoshikazu SO



光延 愛美
Manami MITSUNOBU



宮澤 雄太
Yuta MIYAZAWA

1. はじめに

感染症は身近に潜む脅威であり、近年では2002年に重症急性呼吸器症候群(SARS)¹⁾、2012年に中東呼吸器症候群(MARS)²⁾、2014年にはエボラ出血熱³⁾が流行し、人々の生活に少なからず影響を与えた。また、2019年に出現した新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の蔓延は日本経済に大きな打撃を与え、2020年度の実質GDPは2019年度比で4.8%(約27兆円)の減少となった⁴⁾。感染症を引き起こすウイルスや細菌は、遺伝子変異により感染力や毒性といった性質が変わるため根絶は困難であり、今後も共生せざるを得ない存在である⁵⁾。

感染を予防または軽症化する有効な手段としてワクチン接種があるものの、感染症に罹患する人は少なくない。現にインフルエンザのワクチン接種が広く行われているにもかかわらず、2017年/2018年シーズンの全罹患患者推計値は1,458万人であった⁶⁾。

こうした状況の中、感染症の早期発見や治療薬の開発は感染による被害を低減する重要な対策の一つである。早期発見は、感染拡大の防止や重症化リスクの軽減が可能であるため、インフルエンザの場合、迅速・簡便に診断が可能なイムノクロマト方式検査キット(Immunochromatographic Test Kit:ICキット)が広

く利用されている。ICキットは、患者から採取した検体⁷⁾を緩衝液で希釈し滴下するだけで10~30分後には診断結果が得られるため重宝されている。陽性と陰性は「検出ライン」と呼ばれる赤色や青色のラインの出現有無で判断される。検出ラインには貴金属ナノ粒子、着色したラテックスナノ粒子およびセルロースナノファイバー粒子などが「抗体標識物」として使用されており、診断薬メーカー各社で様々な検討が進められている。

抗体標識物の一つである貴金属ナノ粒子は、自由電子に由来する局在表面プラズモン共鳴(LSPR:Localized Surface Plasmon Resonance)により光吸収特性を有し⁸⁾、ICキットに広く使用されている。特に化学的安定性の高い金を材質とする赤色の球状金ナノ粒子が広く使用されているが、色のバリエーションに乏しいため、ICキットの検出ラインの色調が限定的となっている。近年、貴金属ナノ粒子を使用したICキットの検出ラインを多色化する方法として、銀を材質とするプレート状の粒子(銀ナノプレート)の適用が報告されている⁹⁾。LSPRは金属の材質やサイズ、形状、周囲の誘電率によって光吸収特性が変化する⁸⁾¹⁰⁾。銀は可視領域でLSPRが確認され、かつ波長の調整が可能のため銀ナノプレートはマルチカラーの表現が可能である⁹⁾。一方で、銀は酸化耐性が低いため、ICキットに使用する緩衝液との接触やICキット製造時の乾燥工程において銀ナノプレートの色調が変化、消失する課題があった。

本報では、ICキットとイムノクロマト試験法、抗体標識物に関する概要を解説する。また、色彩豊かな金属ナノ粒子である銀ナノプレートの酸化や凝集耐性を改良し、ICキットの抗体標識物用に適用した高耐性銀ナノプレートについても解説する。

2. イムノクロマト方式検査キット

2.1 概要

ICキットは、イムノクロマト試験法によって細菌やウイルス、またはホルモンなどの抗原(被検物質)の有無を判定する際に使用する。ICキットにはイムノクロマト試験紙の他に、綿棒などの検体を採取する器具、検体を希釈する緩衝液など試験に必要な一式が含まれている。

前述のように、イムノクロマト試験法は患者から採取した検体溶液を滴下するだけで検査結果が数分で得られる迅速・簡便な手法である。本法は1950年代に基本的な概念が発明された後、1980年代までに部材や抗体に関する様々な周辺技術が洗練され¹¹⁾、1988年にUnipath社が妊娠検査薬として初めて上市した¹²⁾。現在ICキット市場では、病院用としてはインフルエンザウイルスやアデノウイルス、A群β溶連菌、RSウイルスの診断用に、市販用としては妊娠判定用に販売されている¹³⁾。2019年に出現したSARS-CoV-2についても診断にICキットが使用されており、今後感染症分類¹⁴⁾が変更され、すべての病院で診断が可能となった場合には広く利用されることが予想される¹⁵⁾。

2.2 構造

イムノクロマト試験法では幅3~5mm、長さ60~70mmほどの試験紙を使用する。試験紙は以下の五点から構成される。(図1)

- ① サンプルパッド
- ② コンジュゲートパッド
- ③ メンブレン

④ 吸水紙

⑤ ①~④の土台(バックングシート)

①のサンプルパッドはセルロース製、ガラス繊維製、レーヨン製などが使用されており、滴下された検体溶液を保持するために使用される¹¹⁾。

②のコンジュゲートパッドはガラス繊維製やポリエステル製、レーヨン製のもが使用されており、抗体と抗体標識物の複合体を乾燥した状態で保持している¹¹⁾。

③のメンブレンはニトロセルロース製のもが使用されており、液体が展開する速度(Flow Rate)で規格化されている。例えば、90秒/4cm、120秒/4cm、180秒/4cmといったものがあり、試験項目に合わせて選択される。テストライン(検出ライン)には、検体中の抗原と結合する抗体がライン状に塗布、固定化されている。コントロールラインには、抗体と結合する二次抗体がライン状に塗布、固定化されており、検査の成否を確認できる。ナイロン製やポリフッ化ビニリデン(PVDF)製のメンブレンもあるものの使用範囲は限定的である¹¹⁾。

④の吸水紙はセルロース製のもが使用されており、メンブレンを展開した液体を捕集する役割がある¹¹⁾。

⑤のバックングシートは粘着剤のついたポリスチレンなどのプラスチックシートであり、①~④を組み立てる際の土台となる¹¹⁾。

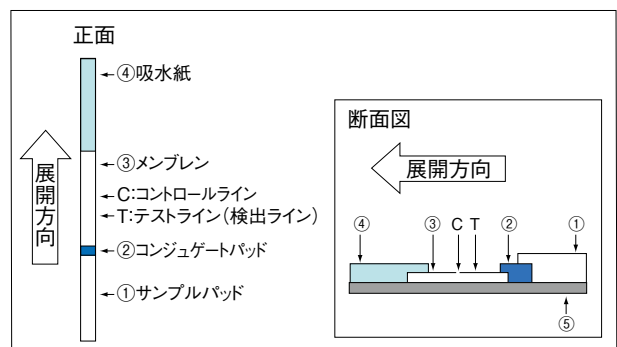


図1 イムノクロマト試験紙の概要

2.3 イムノクロマト試験の仕組み

イムノクロマト試験では初めに被験者から検体を採取する。例えば、インフルエンザ検査の場合、長細く柔軟な綿棒で咽頭部をぬぐい、緩衝液で希釈して検体溶液とする。この検体溶液をサンプルパッドに滴下(図2、

①すると毛管現象により展開が始まり、サンプルパッド→コンジュゲートパッド→メンブレン→吸水紙の順に検体溶液が流れる(図2、②)。コンジュゲートパッド部では「検体用抗体Aと標識物の複合体」が検体と反応しながら展開し、メンブレン上に固定化された検体用抗体B部でサンドイッチ構造が形成されると検出ラインが生じる(図2、③)。多くの場合、コンジュゲートパッドに含まれる「検体用抗体Aと標識物の複合体」と結合するコントロールライン用抗体が検出ラインの下流側に固定化されており、試験の成否を確認することが可能となっている。

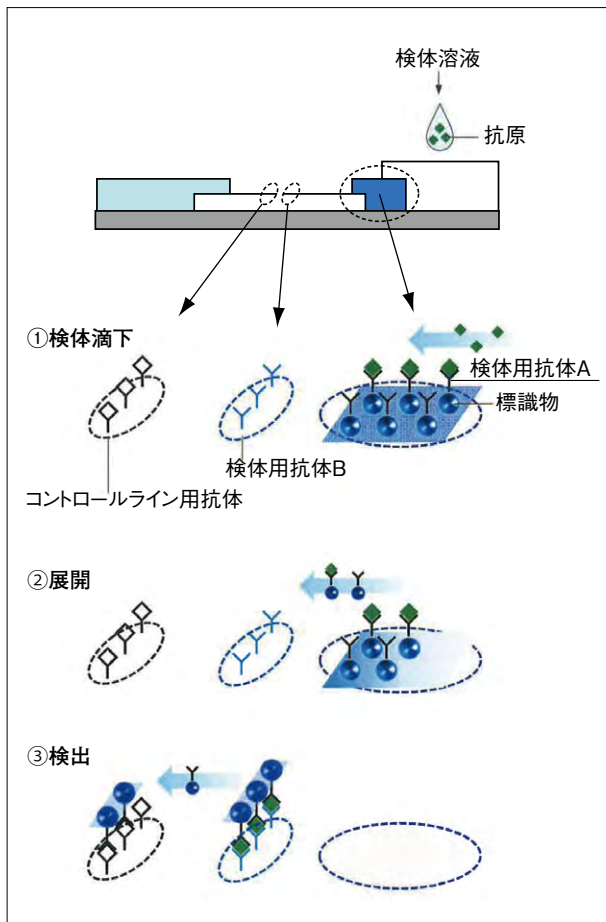


図2 イムノクロマト試験の仕組み

抗体と標識物は種々の化学結合によって複合化する。例えば、疎水性相互作用による吸着、カルボキシル基とアミノ基によるアミド結合、アビジンとビオチンを使用した結合、プロテインAやGを使用した結合など、様々

な方法が挙げられる。貴金属ナノ粒子の場合、抗体と混ぜ合わせるだけで貴金属ナノ粒子の表面に抗体が物理吸着して複合化されるため、操作が簡便であり主流となっている。

3. 抗体標識物

イムノクロマト試験では検査結果を示す「検出ライン」の抗体標識物として貴金属ナノ粒子、着色したラテックス粒子およびセルロースナノファイバー粒子が使用されている。本報では当社で開発を進めている貴金属ナノ粒子について紹介する。

3.1 球状金ナノ粒子(AuSP)

金ナノ粒子は古来よりステンドグラスやリュクルゴスの聖杯¹⁶⁾、江戸切子などのガラスの着色に使用されている安定性の高い粒子である。合成方法としては①テトラクロロ金(III)酸とクエン酸ナトリウムを溶解した水溶液を加熱する方法¹⁷⁾や②テトラクロロ金(III)酸とポリ(β-シクロデキストリン)をエタノールと水の混合液に溶解し紫外線を照射する方法¹⁸⁾など多数の報告がある。着色力や流動性の観点から粒子径が40~50nmの粒子が使われている(図3)。抗体と混合すると物理吸着によって複合体が形成される。複合化されなかった余剰の抗体は、遠心分離により粒子を沈殿させた後、上澄みとともに除去することが可能である。

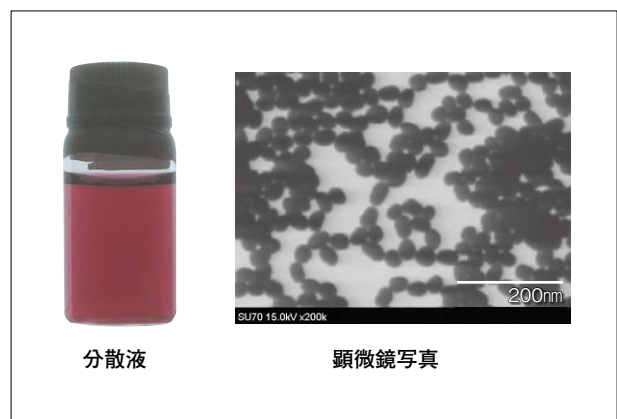


図3. 球状金ナノ粒子

3.2 当社開発品

当社では2013年よりICキット用の貴金属ナノ粒子を開発しており、これまでに「金ナノプレート」、「パラジウム被覆金ナノロッド」、「銀ナノプレート」を開発した。表1に開発品の特長を示す。銀ナノプレートは粒子表面に金を被覆処理しているが金層が薄膜(1.0nm未満)であり、酸化耐性が十分に得られず変色や退色するため、

酸化の影響を受けない(乾燥工程を含まない)ハーフストリップ方式イムノクロマト試験に使用が限定される。当社では2020年に銀ナノプレートの酸化耐性を向上すべく表面処理技術を検討し、一般の製品形態であるフルストリップ方式イムノクロマト試験に使用可能な「高耐性銀ナノプレート」を開発した。

表1 当社開発品の特長

名称	色調	材質	被覆材	形状	粒子径 (nm)	抗体標識法	参考文献番号	図
金ナノプレート	青色	金	—	板状	45	物理吸着	19	4
パラジウム被覆金ナノロッド	黒色	金	パラジウム	棒状	長軸:60 短軸:20	物理吸着	20,21	5
銀ナノプレート	多色 (Yellow, Magenta, Cyanなど)	銀	金 (薄く被覆)	板状	20~60	物理吸着	22,23,24	6
高耐性銀ナノプレート	多色 (黄色、赤色、青色)	銀	金 (厚く被覆)	板状	20~60	物理吸着	26	9

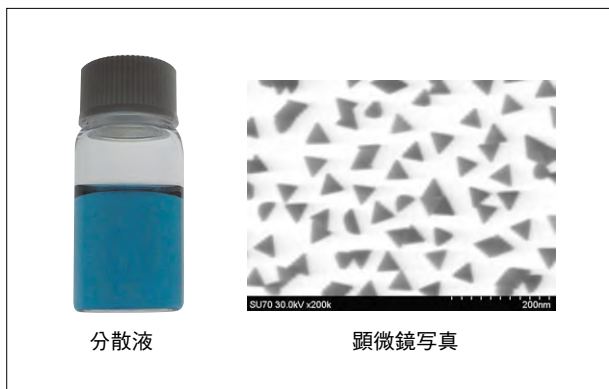


図4. 金ナノプレート

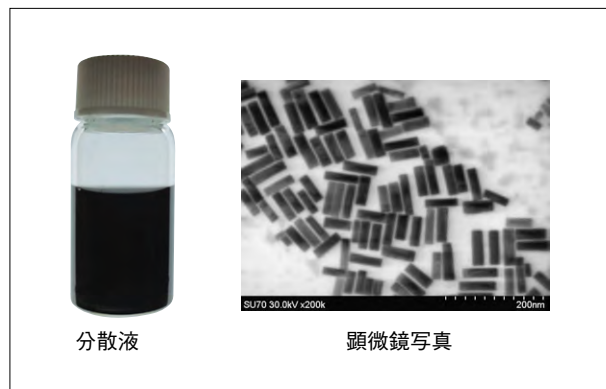


図5. パラジウム被覆金ナノロッド

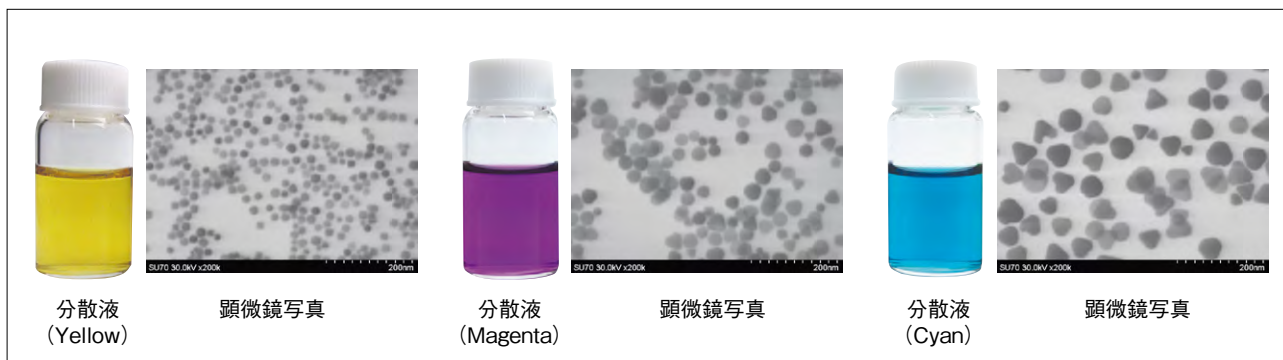


図6. 銀ナノプレート

4. 高耐性銀ナノプレート

4.1 合成

高耐性銀ナノプレートは、当社の従来品(銀ナノプレート)より厚く金を被覆することで酸化耐性を有する。

4.1.1 銀ナノプレートの合成

銀ナノプレートは種粒子を成長させて合成する。銀イオンを穏やかに還元することで積層欠陥を有する平面状の種粒子が合成される^{22, 23, 24}。さらに銀イオンを供給しつつ還元を継続すると、熱力学的に有利ではない三角形や六角形または角の取れたプレート状の銀ナノプレートが合成される。供給する銀イオンの量を一定に保ち、種粒子量を変化させるとプレート状粒子の最大長と厚さの比(アスペクト比)の異なる銀ナノプレートが合成される。銀ナノプレートはアスペクト比を大きくすると長波長側の光を吸収するため色調の異なる銀ナノプレートの合成が可能である。

4.1.2 金被覆の手法

銀ナノプレートに金を被覆する際、金イオンを添加すると銀ナノプレートの中心部に空隙が生じる。この現象は、銀イオンよりも金イオンの還元電位が高いため、金イオンによって銀ナノプレートが酸化を受けることにより生じる。(図7)。このように還元電位の差によって金属原子間に生じる酸化還元反応を「ガルバニック置換反応」という²⁵。これを防ぐため銀ナノプレートに金を厚く被覆する際は金イオンを錯化し還元電位を低下させる方法が報告されている(図8)²⁶。

また、金被覆反応時の銀ナノプレートの粒子濃度と金濃度の比率を調整することで凝集のない単分散の分散液を得ることが可能である。

金を厚く被覆した「高耐性銀ナノプレート」の分散液と高角散乱環状暗視野走査透過顕微鏡法(HAADF-STEM法)で観察した電子顕微鏡像を図9に示す。いずれも、銀ナノプレートの端面全体が金層で完全に被覆されており、(a)粒子径と(b)端面における

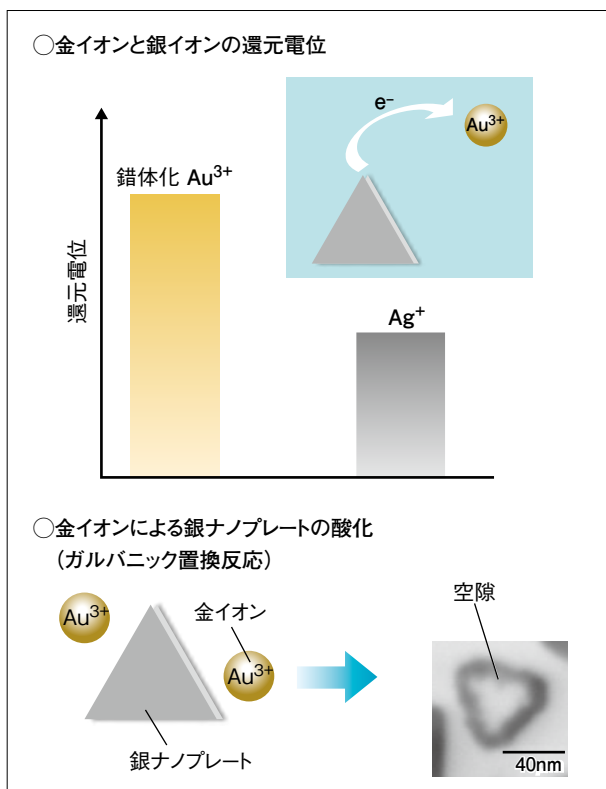


図7 ガルバニック置換反応により空隙が生じた銀ナノプレート

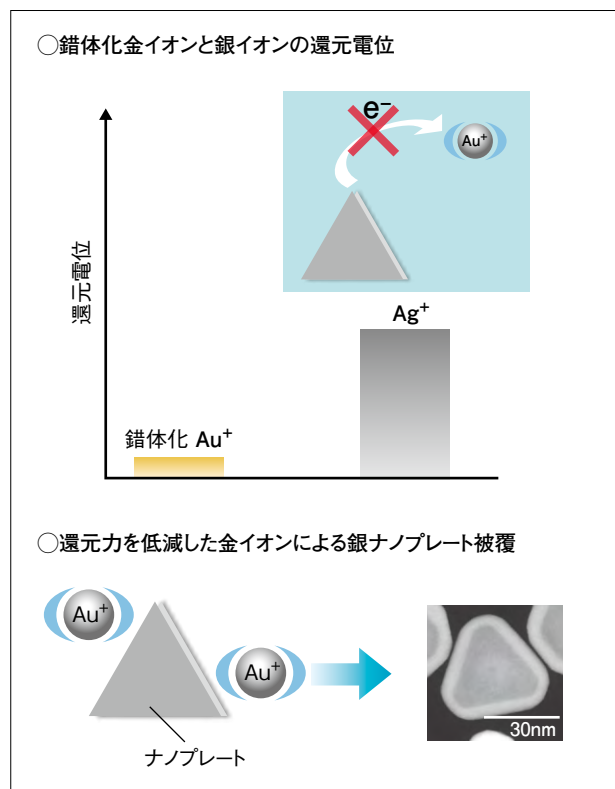


図8 金イオンを錯化し還元電位を低下させる方法による銀ナノプレートの厚金被覆化

金層の平均厚みは、黄色調の銀ナノプレートで(a) 17.1nm、(b) 1.9nm、赤色調で(a) 27.3nm、(b) 3.6nm、青色調で(a) 43.8nm、(b) 5.5nmであった。

合成した①高耐性銀ナノプレート、②従来品および③未処理の銀ナノプレートの塩化ナトリウムに対する耐性試験結果を表2に示す。水中の溶存酸素と塩化物イオン(O_2/Cl^-)の組み合わせは酸化剤として機能し、多

結晶粒子を酸化する効果²⁷⁾や銀ナノプレートの角のエッチング(酸化)²⁸⁾が報告されている。また、塩化ナトリウムは、銀ナノプレート凝集させる効果²⁹⁾がある。5wt%の塩化ナトリウム水溶液中で、②従来品と③未処理の銀ナノプレートは変色および退色したのに対し、①高耐性銀ナノプレートは酸化および凝集せず色調が変化しなかった。

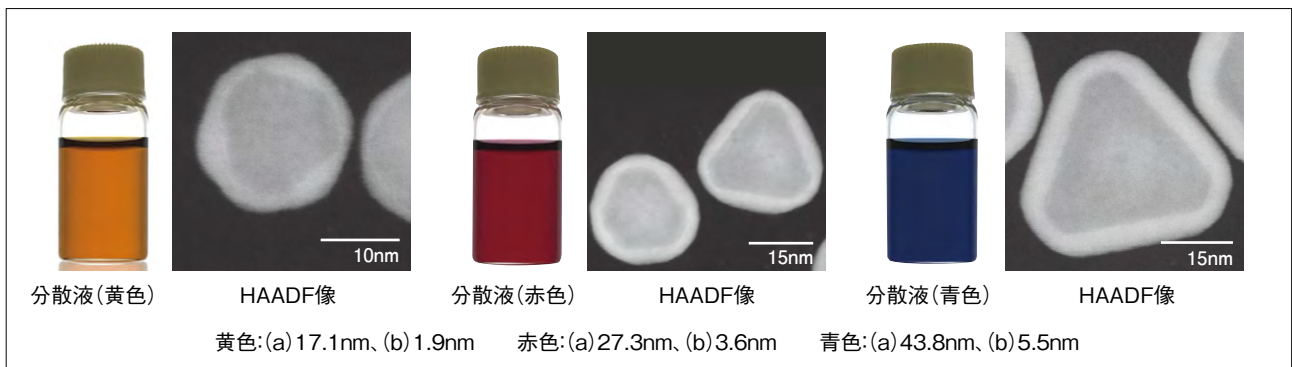






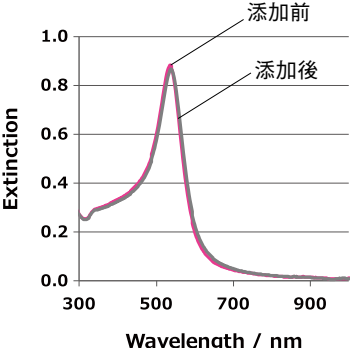
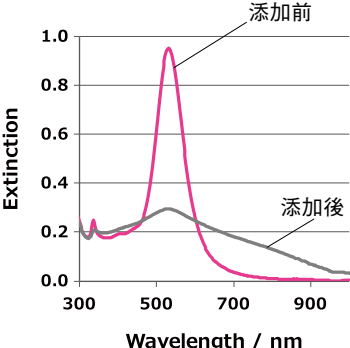
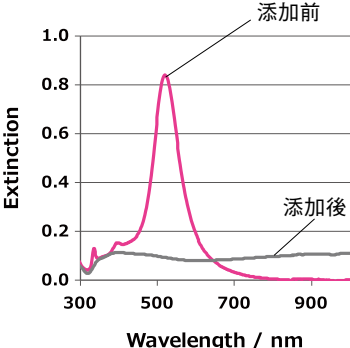


図9 高耐性銀ナノプレート[粒子径(a)、金膜厚(b)]

表2 塩化ナトリウム耐性試験(5wt% 塩化ナトリウム水溶液添加)

	高耐性銀ナノプレート	従来品	銀ナノプレート
金被覆膜厚	厚い	薄い	なし
写真	添加前  添加後 	添加前  添加後 	添加前  添加後 
分光特性			

4.2 イムノクロマト試験

高耐性銀ナノプレートを、妊娠検査薬で使用されている抗ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体に標識し、フルストリップ方式イムノクロマト試験で100mIUのヒト絨毛性ゴナドトロピン(抗原)を検出した結果を図10に示す。高耐性銀ナノプレートの乾燥過程で酸化が抑制されており、分散液と同じ色調の検出ラインの出現(マルチカラー検出)が可能であった。

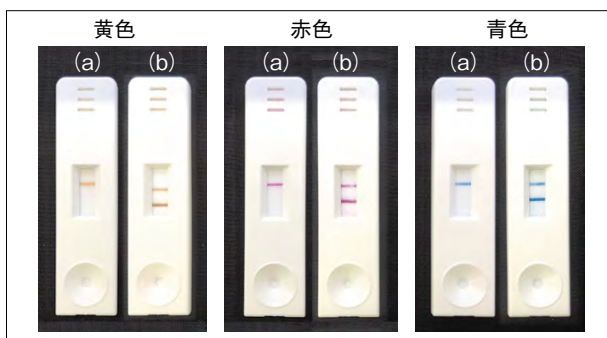


図10 高耐性銀ナノプレートを使用したフルストリップ方式イムノクロマト試験
[抗原量:(a)0mIU、(b)100mIU]

5. おわりに

ICキットと抗体標識物に関する概要を解説した。当社では金ナノプレートやパラジウム被覆金ナノロッドなど、抗体標識物として利用可能な貴金属ナノ粒子を開発している。本報では2020年に当社で開発した高耐性銀ナノプレートについて解説した。

高耐性銀ナノプレートは、銀ナノプレートに厚く金を被覆することによって酸化耐性と凝集耐性が向上し、フルストリップ方式イムノクロマト試験に使用可能である。

イムノクロマト試験の検出ラインの多色化は、例えばSARS-CoV-2や今後発生する未知のウイルスとインフルエンザウイルスなどを同時に検出する際、検査結果の判定を容易とし、日常的に繁忙な医療現場において一助になることが期待される。コロナウイルスの出現により検査の重要性が拡大している中、上記材料を通じて社会貢献を目指す。

参考文献

- 1) 岡部信彦：日医雑誌, 第130巻, 第5号, p805 (2003年9月1日).
- 2) 大曲貴夫：モダンメディア, 61巻, 12号, p383 (2015).
- 3) 横山裕一：慶應保健研究, 33巻, 1号, p15 (2015).
- 4) 内閣府経済社会総合研究所国民経済計算部：2020年10～12月期四半期別GDP速報(2次速報値) (2021年3月9日). (https://www.esri.cao.go.jp/jp/sna/data/data_list/sokuhou/gaiyou/pdf/main_1.pdf)
- 5) 谷口清州：ヘルシスト, 220号, p2 (2013年, 7月10日).
- 6) 26回厚生科学審議会感染症部会：季節性インフルエンザの対策について(2018年9月27日) (<https://www.mhlw.go.jp/content/10601000/000360795.pdf>).
- 7) 池松秀之, 河合直樹, 坂東琢磨：日本臨床内科医会誌, 第35巻, 第2号(臨時付録), p9 (2020年10月23日)
- 8) K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz : J. Phys. Chem. B, 107, p668 (2003)
- 9) 溝口大剛, 宮澤雄太, 室内聖人：DNTコーティング技報, No. 15, p26 (2015年10月10日).
- 10) J. A. Creighton, D. G. Eadon : J.Chem.Soc. FARADAY TRANS., 87, p3881 (1991).
- 11) Brendan O'Farrell : Lateral Flow Immunoassay, p1 (2008).
- 12) Evgeni Eltzov, Sarah Guttel, Adarina Low Yuen Kei, Prima Dewi Sinawang, Rodica E. Ionescu, Robert S. Marks : Electroanalysis, 27, p2116 (2015).
- 13) 株式会社矢野経済研究所：POCT市場の展望 2016年版, p46 (2016年7月29日).
- 14) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の感染症法の運用の見直しについて (2020年9月24日) (<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000675228.pdf>)
- 15) 佐賀新聞：(2020年8月27日). (<https://www.saga-s.co.jp/articles/-/566069>)
- 16) Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax, Catherine Higgitt : Gold Bulletin volume,40, p270 (2007).
- 17) John Turkevich, Peter Cooper Stevenson, James Hillier : Discussions of the Faraday Society, Volume 11, p55 (1951).
- 18) 白石幸秀：山陽小野田市立山口東京理科大学紀要, 1, p17 (2008).
- 19) Leonardo Scarabelli, Marc Coronado-Puchau, Juan J. Giner-Casares, Judith Langer, Luis M. Liz-Marzán : ACS Nano, 8, 6, p5833 (2014).
- 20) Y. Xiang, X. Wu, D. liu, X. Jiang, W. Chu, Z. Li, Y. Ma, W. Zhou, S. Xie : Nano. Lett., 6, 10, p2290 (2006).
- 21) 鈴木重明, 光延愛美, 林堂好紘, DNTコーティング技報, No. 19, p26 (2019年10月10日).
- 22) Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E.Skrabalak, Angew. Chem. Int. Ed. 48, p60 (2009).
- 23) D. Aherne, D.M.Ledwith, M.Gara, J.M.Kelly : Adv.Funct.Mater., 18, p2005 (2008).
- 24) I. Washio, Y. Xiong, Y. Yin, Y. Xia : Adv. Mater., 18, p1745 (2006).
- 25) Gabriella S. Métraux, Yunwei Charles Cao, Rongchao Jin, Chad A. Mirkin : Nano Lett., 3, 4, p519 (2003).
- 26) Hongpo Liu, Tingzhuo Liu, Lei Zhang, Lu Han, Chuanbo Gao, Yadong Yin : Adv. Funct. Mater., 25, p5435 (2015).
- 27) Benjamin Wiley, Thurston Herricks, Yugang Sun, Younan Xia : Nano Lett., Vol. 4, No. 9 (2004).

-
- 28) Jing An, Bin Tang, Xianliang Zheng,
Ji Zhou, Fengxia Dong, Shuping Xu, Ye Wang,
Bing Zhao, and Weiqing Xu :J.Phys.Chem.C,
112, 39, 15176 – 15182(2008).
- 29) Chuanbo Gao, Zhenda Lu, Ying Liu,
Qiao Zhang, Miaofang Chi, Quan Cheng,
Yadong Yin : Angew. Chem. Int. Ed., 51,
5629 –5633 (2012).
-