

マッチング・ファンド方式による産学連携研究開発

新規反応性ナノ微粒子を利用した
超高感度免疫診断システムの開発

研究開発プロジェクト総括研究成果報告書

平成13年5月

総括代表者 片岡 一 則

(東京大学大学院工学系研究科・教授)

企業分担代表者 星 野 信 広

(株式会社ヤトロン成田事業所・課長)

企業分担代表者 横 森 保 彦

(スズキ株式会社横浜研究所・課長代理)

○ 研究開発プロジェクトの背景・経緯と目的

近年のめざましい材料調製技術の発展や測定装置の開発により、臨床検査技術は急速な進歩を遂げているものの、診断の質的飛躍に的確に対処するためには、さらなる高性能化が不可欠の課題である。たとえば免疫学的検査において、測定法の高感度化・高速化や測定装置の簡素化が達成されれば、これまで依頼検査を主体にしてきた方法を、医療機関内部での実施（院内実施）に切り替えることが出来、数日から数週間かかっていた検査を大幅に短縮化する事が可能となる。

医療用診断技術としてはラテックス表面に抗原を担持させ、抗原抗体反応による粒子凝集を光学的に測定するシステムは 1980 年代末にかけて実用化されてきた。しかしながら現状のラテックス診断薬は、i)それ自身の散乱（バックグラウンド） ii)固体表面への抗体担持に伴う変性による感度低下や原材料費の高騰、iii)非特異的反応等、様々な問題点を抱えている。

本開発研究では表層に反応性官能基を有し、光学的に全く透明なコア - シェル型構造を有する高分子ミセル（反応性ナノ微粒子）を作製し、その表層に抗体を担持することにより免疫診断素子およびそのシステムを構築することをねらいとした。このシステム構築によりこれまで問題であった感度および非特異吸着等の問題を回避した超高性能免疫診断システムを構築するとともに、凝集を伴わないあたらしい免疫診断法及びそのシステムに関しても検討を加えた。

○ 共同研究組織

・総括代表者	片岡 一則	（東京大学・大学院工学系研究科・教授）
・研究分担者	長崎 幸夫	（東京理科大学・基礎工学部・助教授）
・ "	原田 敦史	（東京大学・大学院工学系研究科・助手）
・企業分担代表者	星野 信広	（株式会社ヤマトロン・成田事業所・課長）
・研究分担者	松浦 司郎	（株式会社ヤマトロン・成田事業所・課長代理）
・ "	田代 茂	（株式会社ヤマトロン・成田事業所・主任）
・企業分担代表者	横森 保彦	（スズキ株式会社・横浜研究所・課長代理）
・研究分担者	佐野 慶一郎	（スズキ株式会社・横浜研究所・係長）
・ "	今野 裕之	（スズキ株式会社・横浜研究所・係長）
・ "	政木 信親	（スズキ株式会社・横浜研究所・研究員）
合 計	10 名	

- **研究期間** 平成12年3月17日～平成13年3月31日

- **研究開発の実施状況等**

- (1) 研究開発の実施状況

本開発研究の目的を実現するために必要な検討すべき事項は以下の通りである。

光学的に全く透明なコア - シェル型構造を有する高分子ミセル（反応性ナノ微粒子）
の作製

反応性ナノ微粒子表層への抗体の導入

反応性ナノ微粒子表層に導入された抗体の認識挙動とナノ微粒子の物理化学的特性

反応性ナノ微粒子の特性に応じた装置の開発

以上の事項を検討するために東京大学にて反応性ナノ微粒子の作製・物理化学的特性解析及びその表層への抗体分子導入法の確立し、ヤトロンにおいては、反応性ナノ微粒子表層の抗体の抗原認識挙動を評価し、スズキにおいて、反応性ナノ微粒子の新規診断システムとしての実用化のための装置開発の検討を行った。

- (2) 各機関別の研究開発目標、実施方法、成果

- (2-1) 東京大学

- 【目標】

反応性ナノ微粒子を用いた新しい免疫診断システムのための新規反応性ナノ微粒子の調製し、ナノ微粒子を用いた高感度型免疫診断及び免疫エキシマー発光法の開発することを目的とする。

- 【実施方法】

反応性ナノ微粒子を形成するブロック共重合体として、末端に反応基を有するポリエチレングリコール(PEG)と種々疎水性連鎖(ポリ乳酸・ポリスチレン・ポリメチルメタクリレート(PMMA))のブロック共重合体の合成を行った。得られたブロック共重合体から反応性ナノ微粒子(高分子ミセル)を調製し、その表層の反応基(アルデヒド基)へのリガンド分子導入の検討を行った。さらに、ブロック共重合体のリガンド分子を導入する反応基の反対末端への検出のための蛍光プローブ(ピレン)の導入を検討し、ナノ微粒子表層のリガンド分子がレセプター分子を認識した際の、ナノ微粒子の形態変化等の特性解析を行った。

- 【成果】

コアにポリ乳酸、ポリスチレンや PMMA などの疎水性物質を配し、表層に水溶性ポリエチレングリコール(PEG)をブラシ状に有する且つ、PEG 鎖自由末端にアルデヒド基及びアミノ基等のバイオ分子担持に利用しうる官能基を導入した 30nm～500nm 程度の単分散ナノ微粒子の調整法を確立した。また、反応基を自由末端に配する PEG ブラシ表面を有するナノ微粒子(反応性微

粒子)の糖、ESRプローブ、ビオチン、抗体等との反応性を検討し、様々な機能を有するナノ微粒子を調製した。さらに、リガンド-レセプター相互作用により凝集し、本ナノ微粒子が免疫診断に有用であることを示した。

上記の研究で得られた反応性ナノ微粒子の中でもビオチン-PEG/ポリ乳酸-ピレンブロック共重合体については、表層にビオチン、コアにピレン残基を配したコア-シェル型の高分子ミセルを形成することを確認し、コア中のピレンはその限られたスペースのため、その蛍光スペクトルは濃度消光し、新たにエキサイマーに由来する発光が認められた。このビオチン-PEG/ポリ乳酸-ピレンミセル溶液にアビジンを添加し、表層のリガンド-レセプター反応を起こすことにより自己組織化ミセルは崩壊し、コア中ピレンに由来するエキシマー発光が抄出した。これは加えたアビジン濃度に比例し、凝集法に変わる新たな免疫診断法としての道筋をつけた。

(2-2) 株式会社ヤトロン

【目標】

反応性ナノ微粒子を用いることにより、酵素結合免疫吸着法(ELISA法)への2次抗体担持効率化について検討し、反応性ナノ微粒子の診断用素子としての最適化を目的とする。

【実施方法】

臨床検査試薬の測定原理の一つにエンザイムイムノアッセイ(ELISA法)があり、抗体に酵素を標識して抗原抗体反応を行った後、反応に寄与しなかった酵素標識抗体を洗浄除去することによって反応生成物のみとし、反応生成物中の標識酵素を、基質との反応によってシグナルを増幅して微量な抗原を検出しようという方法である。この酵素の代わりに安定で高感度なシグナル物質封入ナノ微粒子を用いた簡単かつ高感度なイムノアッセイについて検討を行った。さらに、疎水末端に蛍光を有するピレンを結合したブロック共重合体から反応性ナノ微粒子を形成させ、親水性表面に低分子ハプテンを結合した試薬を調製し、このハプテンに抗体が結合することによって起こる蛍光量の変化からフリーハプテンの定量について検討を行った。

【成果】

反応性ナノ微粒子を用いて、臨床検査薬を対照とした以下の三つの検討をおこなった。一つ目は、スチレンモノマーと、ポリ乳酸-ポリエチレングリコール-アルデヒドをミセル化した後、重合反応によって安定な粒子としたもので、65nm から 300nm の粒径を持つ、親水性表面を持ち、かつ機能性材料を表面に結合できる素材の凝集反応への応用である。ラテックス粒子に抗原や抗体を感作して抗原抗体反応で凝集を起こさせ、透過光変化から抗原あるいは抗体量を定量する、ラテックス試薬に取って代わる優れた性質を出せるかという点について検討を行った。CRP をモデル材料とした検討結果は、粒径によって測定範囲を選択でき、現状のラテックス試薬を用いた結果と相関が見られるポジティブなものであった。しかしいくつかのリウマチ因子陽性検体において、異常に CRP が高値と測定される結果が得られ、原因を解明しないとすぐには検査試薬として用いることが出来ないということも判明した。二つ目は上記粒子の全く異なる応用で、中心のスチレンポリマーにユーロピウムキレートを封入し、表面のアルデヒド基に測定対象物質に対する抗体を結合して、標識抗体とする方法である。現在用いられている放射性同位元素や、

酵素の代わりとなる優れた標識物質になりうるかというのが検討課題である。CRP や IgE を測定対象物とした結果は、酵素標識よりも感度に優れ、取り扱いも簡便という優れたものであった。三つ目は、疎水末端にピレンを持つブロック共重合体からミセルを形成させ、表面に低分子ハプテンを結合して、その抗体が結合することによりピレン蛍光が変化してハプテンが定量出来るホモジニアスイムノアッセイが構築できないかという課題である。チロキシンを測定対象物とした結果は、競合的にフリーチロキシンを測定できるポジティブなものであった。今後、更なる反応条件が最適化を行うことにより検査試薬への展開を検討して行きたい。

(2 - 3) スズキ株式会社

【目標】

反応性ナノ微粒子を用いた免疫エキシマー発光法の実用化のための装置開発を目的とし、試作品を作製する。

【実施方法】

本装置開発の試みとして、蛍光物質ピレンを担持したナノ微粒子のアビジン - ビオチン反応による崩壊反応を題材に選んだ。アビジン - ビオチン反応は免疫反応の基本系であり、種々の抗原、抗体に結合でき、適用範囲も広い。この基本系を正確に測定できれば、将来、ナノ微粒子を用いた免疫診断の発展は一層高まる。それゆえ、この重要なナノ微粒子の基本反応系における蛍光発光の微細変化を高精度、迅速に検出できる免疫診断装置の開発に目標を定め、本免疫診断装置の構想設計、研究開発、試作まで行った。

【成果】

ナノ微粒子の検出に最適な光源の励起波長と測定波長などを予備実験より決定し、本装置の基本仕様とした。この装置仕様の最適化より、ナノ微粒子の蛍光発光、及びナノ微粒子崩壊反応による微細な蛍光変化を精密に検出できることが確かめられた。さらに、本装置に設けられた専用の攪拌ユニットを用いることにより、予備実験で行った通常の静置反応に比べ、ミセル崩壊反応の著しい促進効果が認められた。この結果より、ナノ微粒子の高速免疫診断において、本装置の高い有意性が初めて確認された。

本研究では、アビジン - ビオチン反応による基本系のみを対象とし、ミセル崩壊反応による診断システムの基礎的知見を得ることができた。今後、臨床検査システムとして実用化するうえでは、測定対象物質の免疫反応系に合わせて、最適反応条件を求めていかなければならない。例えば、抗原抗体反応による人血清中の癌抗原の定量測定では、ビオチンと比較してミセルに結合する癌抗体の分子量は大きいため、ナノミセル粒子径は大きくなることが予想される。抗原抗体反応に適した反応温度についても、アビジン - ビオチン反応とは異なることも考えられる。さらに測定感度向上を必要とする場合、測定標識である蛍光物質を今回使用したピレンから他の蛍光物質へ置き換えられる可能性もある。

将来、様々な測定対象毎の免疫反応系において、本試作装置の基本機能である加温、攪拌、ミセル濃度調整、蛍光測定時のパラメータ選択を併用し、一層、診断反応条件を最適化することにより、更なる超高感度免疫診断が期待される。

○ まとめ

(1) 当該研究開発プロジェクト全体の進捗状況及び成果のまとめ

コアにポリ乳酸、ポリスチレンや PMMA などの疎水性物質を配し、表層に水溶性ポリエチレングリコール(PEG)をブラシ状に有し、且つ、PEG 鎖自由末端にアルデヒド基及びアミノ基等のバイオ分子担持に利用しうる官能基を導入した 30nm ~ 500nm 程度の単分散ナノ微粒子の調整法を確立した。また、PEG ブラシ表面の反応基へ糖、ESR プローブ、ビオチン、抗体等との反応性を検討し、様々な機能を有するナノ微粒子を調製することに成功した。

ビオチン - PEG/ポリ乳酸 - ピレンブロック共重合体については、水中で自己組織化し、表層にビオチン、コアにピレン残基を配したコア - シェル型の高分子ミセルを形成することを確認した。コア中のピレンはその限られたスペースのため、その蛍光スペクトルは濃度消光し、新たにエキシマーに由来する発光が認められた。このビオチン - PEG/ポリ乳酸 - ピレンミセル溶液にアビジンを添加し、表層のリガンド - レセプター反応を起こすことにより自己組織化ミセルは崩壊し、コア中ピレンに由来するエキシマー発光が抄出した。これは加えたアビジン濃度に比例し、凝集法に変わる新たな免疫診断法としての道筋をつけた。この手法は、ビオチン - アビジン結合に限られたものでなく、他の抗原 - 抗体反応についても適用可能であることも確認された。さらに、ビオチン - PEG/ポリ乳酸 - ピレンブロック共重合体の系に関しては、診断システムとして利用するための装置の試作品開発も検討し、新規診断装置としての仕様の最適化も図ることができた。

(2) 今後の展開

本開発研究ではコア - シェル型のナノ粒子を用い、1 . 高感度型免疫診断、2 . 酵素結合免疫吸着法 (ELISA法) への2次抗体担持効率化、3 . 免疫エキシマー発光法の開発及び4 . その装置開発にアプローチし、高い成果をあげることができた。

本研究では免疫法を中心にした分析・定量法の確立が達成され、近い将来の実用化が強く期待されるばかりでなく、これまで達成できなかった高感度分析を元に環境免疫診断や遺伝子診断など新しい市場の開拓が期待される。今後、このような新しい市場開発のため、極微量分析法の高度化にアプローチしていく予定である。

○ 研究成果発表

1. Self-assembly of poly(ethylene glycol) (PEG) based block copolymers for biomedical application.
Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K.; *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, in press
2. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance.

- Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y.; *Adv. Drug Delivery Review* (2001), **47**(1), 113-131.
3. Development of artificial viral vector based on the self-assembly of block copolymers. Kataoka, K.; *Gene & Medicine* (2000), **4**(1), 156-161.
 4. Dynamic wettability study on the functionalized PEGylated layer on a polylactide surface constructed by the coating of aldehyde-ended poly(ethylene glycol) (PEG)/polylactide (PLA) block copolymer. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K.; *Science and Technology of Advanced Materials* (2000), **1**(1), 21-29.
 5. Functionalization of polylactide (PLA) surface using end-functionalized block copolymer of α -acetal-poly(ethylene glycol) (PEG)/PLA. Otsuka, Hidenori; Nagasaki, Yukio; Sakurai, Yasuhisa; Okano, Teruo; Kataoka, Kazunori; *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* (2000), **25**(4), 895-898.
 6. Nanoparticle formulation from polymeric micelles. Kataoka, Kazunori; *Pharm Tech Jpn.* (2000), **16**(8), 1209-1219.
 7. Selective Synthesis of Heterobifunctional Poly(ethylene glycol) Derivatives Containing Both Mercapto and Acetal Terminals. Akiyama, Yoshitsugu; Otsuka, Hidenori; Nagasaki, Yukio; Kato, Masao; Kataoka, Kazunori; *Bioconjugate Chem.* (2000), **11**(6), 947-950.
 8. Novel approaches for the construction of cell specific surfaces using heterobifunctional poly(ethylene glycol) (PEG). Otsuka, Hidenori; Nakashima, Yoshikazu; Nagasaki, Yukio; Kato, Masao; Kataoka, Kazunori; *J. Photopolym. Sci. Technol.* (2000), **13**(1), 25-28.
 9. Synthesis of Poly(ethylene glycol)-block-poly(ethylenimine) Possessing an Acetal Group at the PEG End. Akiyama, Yoshitsugu; Harada, Atsushi; Nagasaki, Yukio; Kataoka, Kazunori; *Macromolecules* (2000), **33**(16), 5841-5845.
 10. Surface Characterization of Functionalized Polylactide through the Coating with Heterobifunctional Poly(ethylene glycol)/Polylactide Block Copolymers. Otsuka, Hidenori; Nagasaki, Yukio; Kataoka, Kazunori; *Biomacromolecules* (2000), **1**(1), 39-48.