



新しいナノ粒子によるバイオ診断 —— 生体環境下で機能するバイオナノ粒子の設計 ——

筑波大学学際物質科学研究センター
工学博士・教授

長崎 幸夫

1. はじめに

数ナノメートルから数百ナノメートルサイズの金ナノ粒子はその表面プラズモン吸収による鮮やかなピンク色を呈し、古くからステンドグラスなどの着色用に使われてきたことは有名である。また、ナノサイズの半導体粒子は量子効果による様々な発光特性が注目されてきている。

1971年、Faulk、Taylorらは透過型電子顕微鏡用の免疫細胞マーカーとして金ナノ粒子を利用することを始めた。これ以来、電子顕微鏡分野では免疫金ナノ粒子は必修ツールの一つとなっている。

ごく最近、この金ナノ粒子や半導体ナノ粒子がさらにホットな話題を集めているのはなぜだろうか。これは上に述べた吸収・発光現象を利用し、免疫診断だけでなく、遺伝子などの様々なバイオ検出のためのツールとしてバイオ関連分野で利用する試みが盛んとなりつつあるためである。本稿では最近の金・半導体ナノ粒子の試みを筆者らの例を中心に紹介する。

2. 金ナノ粒子の調製

塩化金酸 (HAuCl_3) を水溶液中で還元すると金が析出する。クエン酸などの還元剤によって還元すると、光の波長よりも小さな粒子で、しかも沈澱とならずに水の中に分散した状態の粒子が生成する。これはクエン酸が金ナノ粒子の表面に吸着することにより粒子同士がイオン反発して水中で凝集することなく分散しているためである。

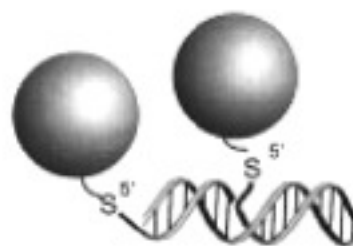
しかしながらこのような吸着分子のイオン反発で

は、高イオン濃度などの厳しい条件下では静電遮蔽が起こって分散性が著しく低下してしまい、容易に凝集してしまうのが現状である。安定化を向上させるため、でんぷんを加えて保護コロイドにする等の試みが行われている。Murrayらはメルカプト基を有するポリエチレングリコール (PEG-SH) を金ナノ粒子表面に修飾し、極めて安定な分散粒子を調製することに成功している^[1]。

3. バイオディテクションのための金ナノ粒子

金ナノ粒子上への抗体の担持は上述の細胞ラベリングから細胞内動態解析、さらには免疫診断用へと

A Head-to-Tail Alignment of Gold Nanoparticle Probes



B Tail-to-Tail Alignment of Gold Nanoparticle Probes

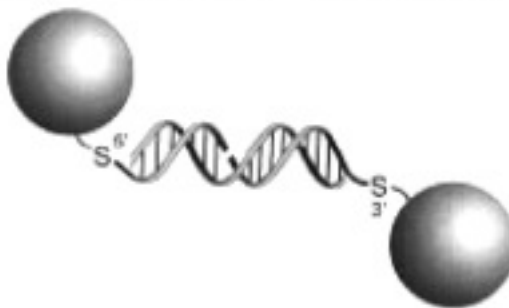


図-1 金ナノ粒子によるオリゴ DNA 相補鎖の検出

展開を見せ、広く利用されるようになってきている。1996 年、Mirkin らは金ナノ粒子を遺伝子検出に展開することを提案した。オリゴ DNA を粒子表面に担持させ、完全相補鎖によるハイブリダイゼーションを粒子の色調変化（ピンク→紫）によって検出でき、遺伝子の一塩基多型の検出にも適応できることを示した^[2]。遺伝子検出はこの後広く展開されてきている。（図 1）

4. 安定金ナノ粒子の分子設計

このように金ナノ粒子はそのナノサイズの特徴、エックス線検出、色調変化等を利用することにより様々な展開をしつつある。しかしながらナノ粒子の分散安定化と表面の機能化は相反する関係にあり、機能性を追究すると安定性が低下するなど、様々な問題を抱えているのが現状である。

金ナノ粒子の分散安定化と機能化を併せ持つ金ナノ粒子はどうやってできるであろうか？筆者らは従来よりバイオ材料の表面設計の観点から両末端に異なる官能基を有するポリエチレングリコール（ヘテロ PEG）の合成を行ってきた。このなかから金表面への配位能の高いメルカプト基やポリアミン鎖を有するヘテロ PEG を利用し、金ナノ粒子の安定化を行った^[3]。つまり、上述したように金表面に PEG ブラシを構築すると、ポリマーのエントロピー効果により表面に電荷がないにも関わらず分散安定化される。しかも末端に官能基導入部位を配することにより高機能な安定分散ナノ粒子が得られるという訳である。

さて、メルカプト基は金と強い結合を形成することが知られている。メルカプト基を有するヘテロ PEG (R-PEG-SH) は市販のクエン酸還元金ナノ粒子と混合することにより金表面にブラシを構築することが可能である。

アミノ基はメルカプト基に比べて配位能が弱いものの、複数のアミノ基を有するブロックポリマーは多点配位するため、興味深い。このブロックポリマーをクエン酸還元金ナノ粒子と混合することにより安定分散粒子の調製が可能であった。さらに興味深いことに、アミノ基が適度な還元能を有しているため、

ブロックポリマー水溶液と塩化金酸水溶液を混和させると還元が起こるとともにポリマーが粒子に配位する。このため、穏和な条件で極めて単分散な金ナノ粒子が構築された^[4]。

このようにして調製した反応性 PEG ブラシ修飾金ナノ粒子の表面ゼータ電位はほぼゼロであるにもかかわらず、図 2 に示したように高イオン濃度下でも極めて安定である。これはナノ粒子の分散がイオン反発によらないためであり、血清のような高イオン強度下でも利用可能であることを意味する。

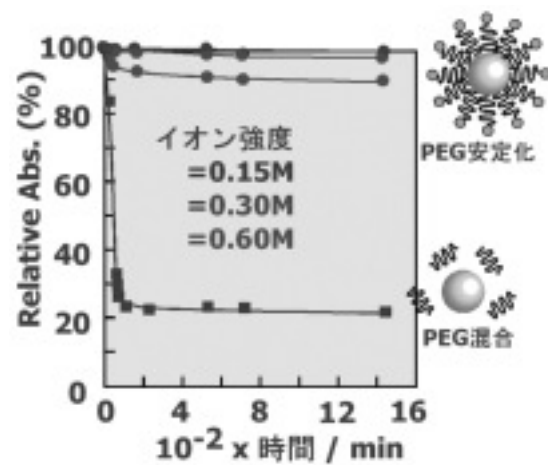


図-2 PEG 化金ナノ粒子の分散安定性

5. 安定金ナノ粒子による分子認識

このようにして調製した PEG 化金ナノ粒子はその表面の PEG 自由末端に官能基を有する。ここにリガンドとして抗体やオリゴ DNA などを導入すれば実用的な診断・分析ナノ粒子として利用できるであろう。

特異的分子認識としてよく知られている糖とレクチン、あるいはビオチンとアビジンなどを用いて粒子の機能化を試みた。図 3 にはラクトースを PEG 末端に導入した金ナノ粒子分散液にラクトース中のガラクトースと選択的に相互作用する RCA レクチンタンパク質を加えたときの溶液の写真を示す。分散状態のナノ粒子が粒子表面のラクトースとレクチンとの相互作用によって凝集し、紫色に変化していることがわかる。これはフリーのガラクトースをこの型に添加することにより再びピンク色に戻ることからこの相互作用が可逆であることを示している。

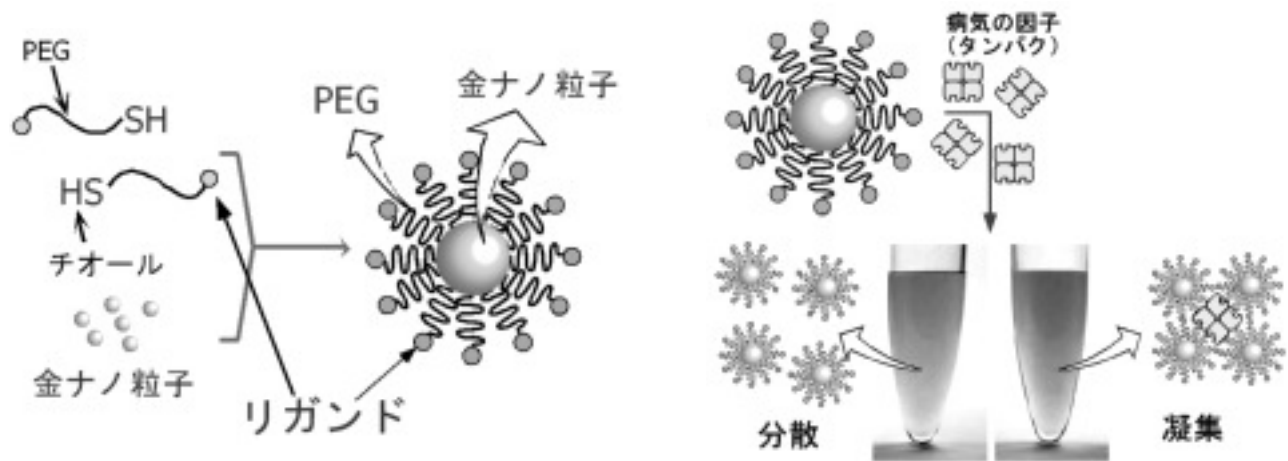


図-3 ラクトース PEG 化金ナノ粒子調製とレクチンとの混和

6. バイオ検出用半導体ナノ粒子

CdS のような半導体ナノサイズの粒子は、そのサイズ依存的に発光挙動を変化させるだけでなく、有機発光体に比較して退色しにくく、白色光で励起できる等の特色がある。Alivisatos ら^[5] 及び Nie ら^[6] は独立にこのような半導体ナノ粒子をバイオ検出に利用することを提案し、世界的に注目された。現在、世界的に半導体ナノ粒子を利用したバイオ検出に関する検討が進められている。しかしながら上述したように、ナノサイズの粒子は分散安定性や表面の非特異吸着の問題があり、この点を十分考慮しなければならない。

7. PEG 分散安定化半導体ナノ粒子の調製と機能

PEG/ポリアミンブロック共重合体は上述したように金属だけでなく、半導体ナノ粒子の安定化にも有効である。我々はブロック共重合体水溶液に CdCl_2 と Na_2S とを混合することにより、数ナノメートルサイズの CdS 半導体量子ドットが精製することを見いだした。これは上述の金ナノ粒子と同様、表層 PEG ブラシによって高い分散安定化能を示すため、ナノ診断の基盤材料として有用である (図 4)^[7]。

調製した PEG 化 CdS 量子ドットの PEG 末端にビオチンを配し、テキサスレッドラベルしたコラーゲン組織をきれいに染色することが可能である (図 4g)。このようにこれらの PEG 化ナノ粒子は新しいバイオナノツールとして期待できる。

8. 将来性

このように我々が作ってきた反応性 PEG 安定化金・半導体ナノ粒子は大型の装置を必要とせずに調製することができ、目視のみによって定性的に分析が可能であるだけでなく、様々な健康状態で大きく異なる血液や尿などの検体などでも非特異的な吸着を抑制して診断できることが期待される。このような目視で判断できる検出システムは、個々の診療所で簡単に検出したり、大型設備の十分でない発展途上国に対して貢献する新しい手法として期待される。

ナノテクノロジーをになう代表的な材料の一つとしてナノ粒子を利用するための一つのツールとしてへテロ PEG 安定化粒子への期待は大きい。

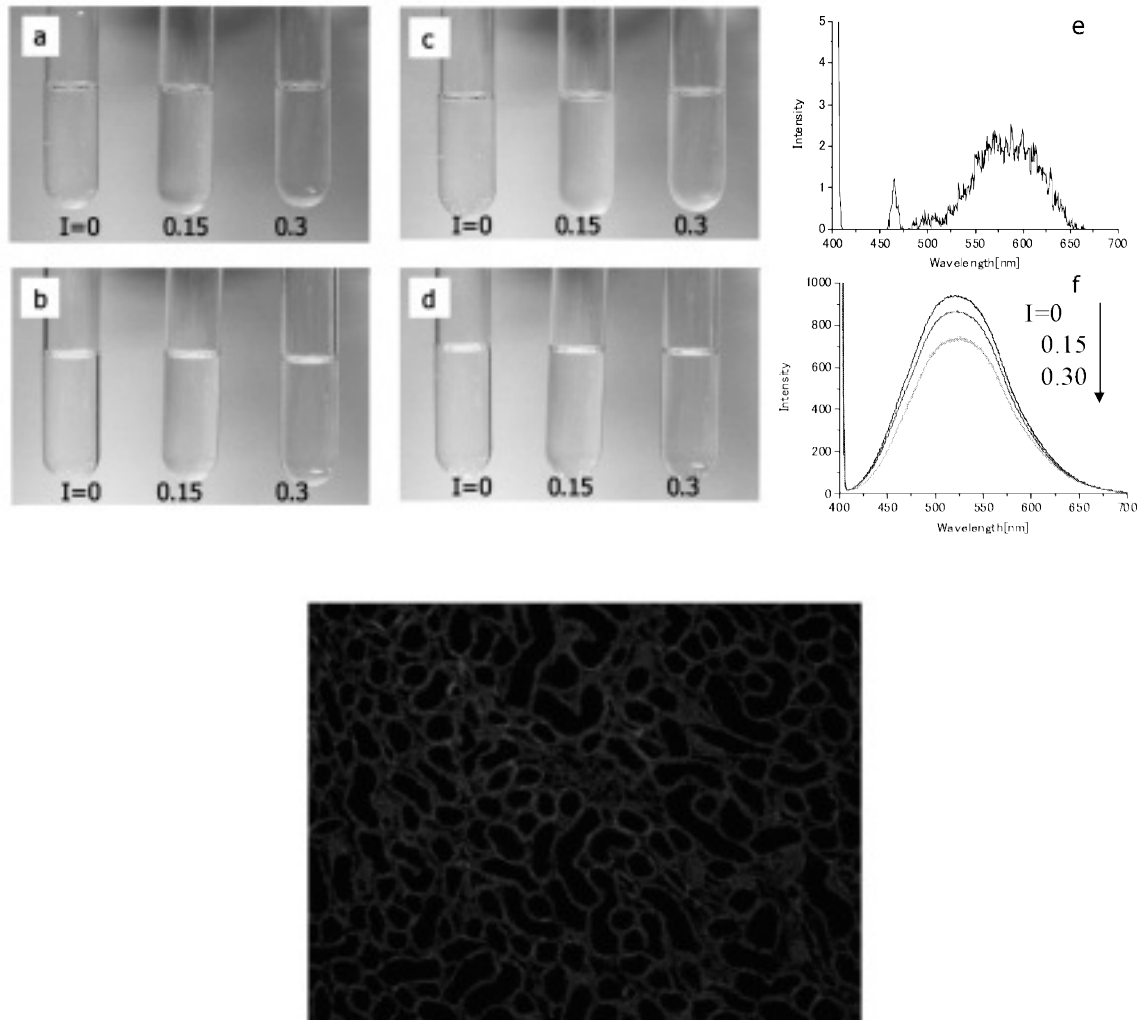
9. 終わりに

これまで進められてきた材料システムから進化し、ナノサイズのテクノロジー、サイエンスを遂行する上で界面の問題は避けて通れない重要な観点の一つである。サイズを小さくすればするほど相対的な界面の影響が増し、今まで考える必要がなかった問題点も多く出現してくる。これはナノ粒子にとどまらず、平面やナノ空間などすべての領域で考慮しなければならない点を忘れてはならない。

10. 参考文献

1. W. Peter Wuelfing, S. M. G., Deon T. Miles, Royce W. Murray, *Nanometer Gold Clusters*

- Protected by Surface-Bound Monolayers of Thiolated Poly (ethylene glycol) Polymer Electrolyte.* Journal of the American Chemical Society, 1998. 120 (48): p. 12696-12697.
2. Chad A. Mirkin, R. L. L., Robert C. Mucic, James J. Storhoff, *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials.* Nature, 1996. 382 (6592): p. 607-609.
 3. Hidenori Otsuka, Y. A., Yukio Nagasaki, Kazunori Kataoka *Quantitative and Reversible Lectin-Induced Association of Gold Nanoparticles Modified with alpha-Lactosyl-omeba-mercapto-poly (ethylene glycol).* Journal of American Chemical Society, 2001. 123 (34): p. 8226-8230.
 4. Takehiko Ishii, H. O., Kazunori Kataoka, and Yukio Nagasaki, *Preparation of Functionally PEGylated Gold Nanoparticles with Narrow Distribution through Autoreduction of Auric Cation by alpha-Biotinyl-PEG-block-[poly (2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate)].* Langmuir, 2004. 20 (3): p. 561-564.
 5. David L. Klein, R. R., Andrew K. L. Lim, A. Paul Alivisatos, Paul L. McEuen, *A single-electron transistor made from a cadmium selenide nanocrystal.* Nature, 1997. 389 (6652): p. 699-701.
 6. Warren C. W. Chan, S. N., *Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection.* Science, 1998. 281 (5385): p. 2016-2018.
 7. Yukio Nagasaki, T. I., Yuka Sunaga, Yousuke Watanabe, Hidenori Otsuka, Kazunori Kataoka, *Preparation of Functionally PEGylated Gold Nanoparticles with Narrow Distribution through Autoreduction of Auric Cation by alpha-Biotinyl-PEG-block-[poly (2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate)].* Langmuir, 2004. 20 (15): p. 6396-6400.



g. Type IV collagen 染色 (ラット腎臓、対物×10)

図-4 PEG/ポリカチオン存在下で調製した CdS 量子ドット。a) CdS のみ、b) 市販 PEG 存在下、c) ポリカチオン存在下、d) PEG/ポリカチオン存在下。e) ポリカチオン存在下(c)で調製した CdS ナノ粒子の発光挙動、ほとんど発光していないことがわかる。f) PEG/ポリカチオン存在下で調製した CdS ナノ粒子の発光挙動。g) 調製した PEG 化 CdS による組織染色例