

## 「見て・診る」ための金ナノ粒子

小さな金の大きなチカラ

金山直樹 Naoki KANAYAMA 信州大学大学院総合工学系研究科准教授

### 1 はじめに

原子番号 79 番の金(Gold, 元素記号: Au)は, 古代より人類を魅了し続ける不思議な魅力を持った物質である。色褪せることのない優雅な金の光沢は, その呼び名である Gold の語源\* になったと言われるほど特徴的であり, 今でも「黄金○○」「ゴールデン△△」といった金にまつわるフレーズには, 何か他とは違う特別なニュアンスが込められる。金の独特な光沢や希少性に加え, 柔らかく加工しやすいという特性もあいまって, 紀元前 6000 年頃から古代シュメール人が装飾品として金を使用し始め, 紀元前 1300 年代には, かの有名な古代エジプトのツタンカーメン王の黄金マスクが作られたとの記録が残る。日本の歴史のなかでも, その時々の権力や文化, さらに富の象徴として金装飾が施された建造物などが造られてきたことは, 読者諸氏もよくご存知のところであろう。

さて, 古くから人々が魅了されてきた金の光沢は, 平たく言えば金の自由電子と外部から入射した光(光子)の相互作用の産物であるが, 金自体のサイズがナノ・メートル(10 億分の 1 メートル, 以下, nm)のオーダーまで微細化すると, 金の自由電子の状態が変化し, この光沢が失われてしまう。しかしながら, 微細化した小さな金は独特の輝きを失ってもなお, 人々の関心を惹きつける大きなチカラを持ち続ける。微細化した金と人類の関わりの歴史は長く, 古代ローマ時代まで遡る。古代ローマでは, ガラスに金を混ぜて着色させる試みが始まっていたと言われ, 4 世紀ローマ時代の遺物とされるリクルゴス酒杯(The Lycurgus Cup)が大英博物館に今も残

\* 印欧祖語で「輝く」を意味する言葉の「ghel」に由来するとの説がある。

る。これが後に, ヨーロッパで発展するステンドグラスの彩色技術, 例えば 17 世紀ドイツの Johann Kunckel の金赤ガラスの製造技術につながったと言われる。当然のことながら, 微粒子・ナノ粒子といった概念が形成される遙か昔の話であり, ガラスに様々な金属を混ぜると鮮やかな色がつくことが試行錯誤の中から経験的に知られていく過程で, 偶然ガラスの中に形成されていた微細な金が放つ鮮やかな赤い光に人々は心を癒されていたのであろう。やがて 19 世紀に入り, 微粒子化した金が赤色を発色することが Faraday により突き止められ,<sup>1)</sup> 色材としても注目を集めることとなる。以来, 今日に至るまで触媒や光・電子機能など, 微細な金を持つ様々なチカラが見いだされてきた。

本稿では, nm スケールまで微細化した金(以下, 金ナノ粒子)の特徴を活かした診断技術, 特に目視で簡便・迅速に診断する(「見て・診る」)技術にフォーカスし, その動向を概説する。

### 2 「見て・診る」プローブとしての金ナノ粒子

金ナノ粒子では, 自由電子の集団的な振動(プラズモン)が表面に局在する, 表面プラズモン現象が起こる。この局在した表面プラズモンが, 可視~近赤外領域の光電場と相互作用するために, この波長域で光の吸収・散乱現象が誘起される。<sup>2)</sup> 例えば 20 nm のサイズの金ナノ粒子の場合, 520 nm 付近に極大を持つ表面プラズモン吸収が生じ, その分散液は鮮やかな赤色を呈する。粒子サイズにもよるが, 表面プラズモン現象に起因する金ナノ粒子の発色は, 有機色素と比べて強く視認性が高い。金ナノ粒子 1 個を 1 分子とすると, モル吸光係数換算で, 一般的な有機色素( $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  程度)と比べて

10~10<sup>4</sup> 倍程度に相当する。これは、血液や尿など有色夾雑物きょうざつぶつが含まれる生体由来成分の中から、特定のターゲットを金ナノ粒子の発色をプローブとして検出・定量するために有利な性質である。また、金ナノ粒子は化学的に安定でほとんど退色せず、様々な生体分子を表面修飾する手法が多く確立されているといった利点もある。これらの金ナノ粒子の特徴は、以下に紹介する「見て・診る」ための分析・診断システムに積極的に取り入れられている。

## 3 抗原抗体反応を「見て・診る」技術

### 1. イムノクロマト法

現在、尿中のヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを判定する妊娠検査キットをはじめ、インフルエンザ感染を判定するキットなど、簡便・迅速性が求められる診断用途において抗体を修飾した金ナノ粒子が、「見て・診る」ためのプローブとして実用化されている。その基本原理となるイムノクロマト法の概略を図1に示す。検体を濾紙上のサンプル滴下部に添加すると、濾紙に含ませておいた抗体修飾金ナノ粒子と複合体を形成する。この複合体は、濾紙上を毛細管現象によって移動し、別の抗体が固定された判定部Aで捕獲される。ここで過剰の金ナノ粒子を標識した抗体は、さらに移動を続け、判定部Bに固定されている抗抗体に結合する。判定部AとB両方に捕獲された金ナノ粒子由来の赤色バンドが観察された場合は陽性(+), 判定部Bでのみ赤色バンドが観察された場合は陰性(-)と判定できる(図1(b))。イムノクロマト法の大きな特徴は、特別な装置を用いずに検査試料の添加から15分程度で目

視による判定が可能な点である。

### 2. ELISA 法

イムノクロマト法は、簡便・迅速な診断が可能である反面、一般的に検出感度はそれほど高くはない。例えば、がんマーカーのように検体中に極微量含まれる成分を対象とする精密診断への適用は難しい。抗原抗体反応を利用した生体物質の精密診断には、酵素結合免疫吸着法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)が広く用いられる。通常 ELISA では、抗体(1次抗体)を固定したプレートを用いてターゲットを高い選択性でサンドイッチ状に捕獲し、酵素を結合させた2次抗体を吸着させた後、酵素反応を利用して基質化合物の発色・発光を促進しシグナル増幅を行う(図2(a))。ELISA は、ターゲット選択性や感度の面で優れているが、酵素反応の至適条件の設定や検出用の装置が必要となる。金ナノ粒子プローブを利用して、ELISA の長所を活かしつつ、病原菌や各種バイオマーカーを簡便かつ高感度に「見て・診る」システムが検討されている。

ここで重要なポイントは、金ナノ粒子の「色の濃さ」ではなく「色の違い」を検出シグナルとする点である。溶液中に分散した金ナノ粒子は鮮やかな赤色を示すが、凝集すると金ナノ粒子間で表面プラズモンがカップリングし、溶液の色が青色に変化する。ターゲットの有無を、この金ナノ粒子の分散・凝集状態に反映させることで「見て・診る」ことが可能となる。Jiangらは、CuO ナノ粒子を結合した2次抗体を用意し、CuO から溶出したCu<sup>2+</sup> が触媒するClick反応を金ナノ粒子の凝集に利用することを提案した(図2(b))。<sup>3)</sup> また Abbasらは、システイン封入りポソームを結合した2次抗体を用い、リポソームから放出されるシステインを粒子の凝集促進剤として利用した(図2(c))。<sup>4)</sup> 一方、RicaとStevensは、ウエル中におけるAu<sup>3+</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による金ナノ粒子の形態を2次抗体に結合したカタラーゼで制御するシステムを提案している(図2(d))。<sup>5)</sup> これらのシステムは、Plasmonic ELISA(Plasmonic Immunoassay)と呼ばれ、試料中に含まれるfM(10<sup>-15</sup>M)からaM(10<sup>-18</sup>M)レベルの病原菌やバイオマーカーを「見て・診る」ことが実現している。

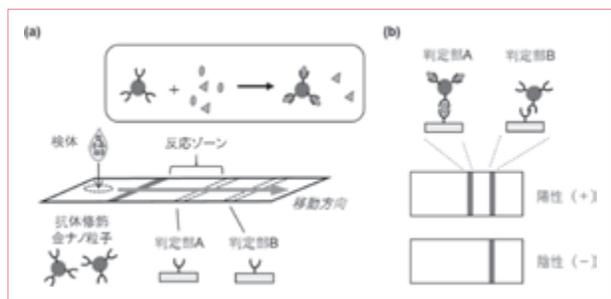


図1 (a)イムノクロマト法の概略。(b)判定結果の模式図。

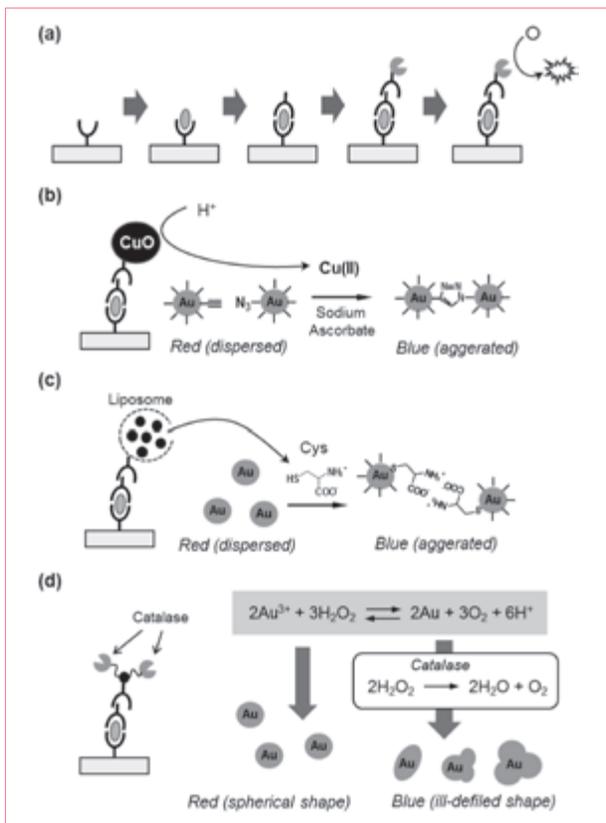


図2 (a)一般的なELISA(サンドイッチ法)の概略図。(b)Click反応を利用したシグナル増幅システム。(c)システインが介在するシグナル増幅システム。(d)金ナノ粒子の生成・成長を指標とするシグナル増幅システム。

## 4 遺伝子の違いを「見て・診る」技術

### 1. 一塩基多型

ヒトゲノムの解読が完了し、その次の段階としてゲノムの機能解析が進行する中で、遺伝子の特定の箇所における一塩基多型(single-nucleotide polymorphism: SNP)の重要性が認識されている。SNPは、様々な生物で高頻度に出現する一塩基置換型の遺伝的変異である。現在、ヒトゲノムにおいては500万以上のSNPが確認されており、各種疾患の罹患リスクや薬剤の感受性・副作用の程度に関与しているものが多く見いだされてきている。<sup>6)</sup> 各個人のSNP部位の塩基配列を判定することをSNPタイピングという。SNPタイピングが、医療の現場で一般的に実施されるようになれば、個人のSNP情報をデータベースと照合し、その結果に基

づいて個人の体質に適した医療を提供するテーラーメイド医療の実現が期待される。

これまでに、様々なSNPタイピング法が考案されており、なかでも標的SNPサイトに隣接して結合したプライマーの一塩基伸長反応を用いるプライマー伸長法は、原理がシンプルであり判定精度も高い。<sup>7)</sup> この手法では、伸長反応後のプライマーの分析(伸長された塩基の同定)によりSNPタイピングするが、反応後のプライマー混合物の中から一塩基伸長鎖の情報を得るためには、高速液体クロマトグラフやキャピラリー電気泳動装置、質量分析計といった大型・高価な分析装置が必要となる。実際の医療の現場で、広くSNPタイピングを普及させるためには、これらの装置を使用することなく、また高度なデータ解析技術を必要としない別なアプローチからの技術開発が求められる。このような背景から、金ナノ粒子の色変化をプローブとする「見て・診る」SNPタイピング法が検討されている。

### 2. 「見て・診る」SNPタイピング

Rothbergらは、金ナノ粒子表面へのDNA鎖の吸着特性を巧みに利用して、サンプルDNA中のSNP配列の有無を金ナノ粒子分散液の色に反映させる手法を開発した。<sup>8)</sup> Mirkinらは、金ナノ粒子表面に一本鎖DNAを高密度に固定化する手法を開発し、それらを架橋する一本鎖DNAに含まれるSNPの有無を金ナノ粒子分散液の色として目視検出することに成功した。<sup>9)</sup> この発見を契機に、一本鎖DNAの架橋凝集に核酸特有の動的特性(鎖交換、可逆的な高次構造形成)を組み合わせる、あるいは核酸関連酵素反応を融合するなどの方法が数多く考案されている。

一方Maedaらは、DNAを修飾したナノ粒子の凝集・分散に伴う色調変化をベースとするSNPタイピング法の開発に取り組む過程で、DNA二重鎖で覆われた金ナノ粒子が高イオン強度環境下において、架橋構造を形成せず自発的に凝集・沈殿する現象を見いだした(図3(a))。<sup>10)</sup> 一本鎖DNAを修飾した金ナノ粒子(ssDNA-GNP)は、粒子間に発生する静電反発や立体斥力などの影響により、高イオン強度の溶液中においても安定に分散状態を保持する。それに対して、DNA二重鎖で覆われた金ナノ粒子(dsDNA-GNP)は、同じ高イオン強度環境では自発

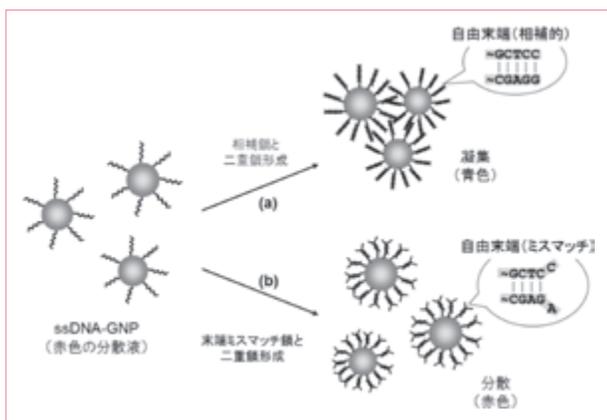


図3 一本鎖DNA修飾金ナノ粒子(ssDNA-GNP)上での二重鎖形成に伴う分散挙動の変化

(a)相補鎖との二重鎖形成。(b)末端ミスマッチ鎖との二重鎖形成。

的に凝集して、溶液の色が赤から青へと変化する。興味深いことに、金ナノ粒子上のDNA二重鎖の最末端が塩基対形成しないミスマッチ、あるいは一塩基突出が存在する場合は、dsDNA-GNPは高イオン強度環境においても非常に安定に分散する(図3(b))。このdsDNA-GNPのユニークな分散・凝集挙動の発見の経緯や、重金属イオン・有機小分子の目視検出への応用に関しては、以前本誌で紹介した。<sup>11)</sup> 詳細については、そちらを参照されたい。

dsDNA-GNPの末端塩基配列に依存した特異な分散・凝集現象の特徴を活かし、「見て・診る」SNPタイピング法が考案された。<sup>12)</sup> 図4に示すように、まず第1ステップでプライマー一塩基伸長反応を行った後、第2ステップでDNA金ナノ粒子の分散・凝集によるSNP判定を行う、というものである。一例として、SNPサイトがA(アデニン)である遺伝子試料を想定した場合の流れを示す。SNPサイトより一塩基上流まで相補的な配列設計をしたタイピングプライマーを用い、伸長反応を4種類のジデオキシリボヌクレオチド三リン酸(ddNTP: ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)がそれぞれ添加されたチューブ内で行うと、SNPサイトに対し相補的なddTTPのチューブでのみ反応が進行する。この反応液を直接、高イオン強度のssDNA-GNP分散液に添加し、その後の色変化を目視で確認する。プローブとなるssDNA-DNAは、伸長反応が進行したサンプルDNAと完全相補となるよう設計されており(図4(a))、ここではddTTPの

チューブでの反応液を添加したssDNA-GNPが赤→青色の変化を示す。他のddNTPを添加したチューブでは伸長反応が進行せず、ssDNA-GNP分散液と混合して形成されるDNA二重鎖の末端は、一塩基突出した構造(ダンダリングエンド)となるために溶液は赤色のまま変化しない。

本手法は、一塩基伸長反応の結果を特別な分析装置を用いずに、金ナノ粒子分散液の色変化に基づいて「見て・診る」ことが可能で簡便である。最近Wangらは、ssDNA-GNPの架橋型の凝集と非架橋型の凝集応答に関して、色変化の迅速性を比較した。<sup>13)</sup> その結果、ssDNA-GNPに対し過剰量のサンプルDNAが系内に存在する場合、非架橋型のほうがより迅速に分散液の色が変化すると結論を得ている。先述した一塩基伸長法で使用するプライマーは合成オリゴDNAであり、ssDNA-GNPに対して予め過剰量用意することに関しては技術的な問題はない。したがって、診断の簡便・迅速化という観点から、一塩基伸長反応とssDNA-GNPの「非架橋型」の凝集応答の組み合わせによる比色SNPタイピングは、理に合ったシステム設計といえる。

### 3. 信頼性向上に向けて

筆者らの研究グループは、このシステムを様々な種類のSNPタイピングに展開し、その汎用性を検証する過程で、SNPサイト近傍の塩基配列によってはdsDNA-GNPの最末端が非ワトソン・クリック塩基対を形成するミスマッチの場合(例えば、G・Aペア)においても粒子凝集による色変化が起こり得ることを認めた。<sup>14)</sup> このことは、本法によるSNPタイピング上での「誤診」の可能性を意味する。そこで我々は、プローブとなるssDNA-GNPの塩基配列を、伸長反応「後」に完全相補(第一世代型、図4(a))から、伸長反応「前」のプライマーに完全相補となるよう変更することで(第二世代型、図4(b))、本法のメリットである簡便性を保持しつつ、非ワトソン・クリック型塩基対形成による誤診の可能性を完全に排除することに成功した。<sup>14)</sup> 以下、具体的な事例を紹介したい。

検討対象のSNPモデルとして、薬剤の代謝と関連するシトクロムP450 2C19遺伝子(CYP; 野生型: G, 変異型: A)、心筋梗塞の発症リスクとの関

連が指摘されている内皮性一酸化窒素合成酵素遺伝子(eNOS; 野生型:T, 変異型:C)を選択した。いずれのSNPタイピングにおいても、SNPサイトに対応した(相補的な)ddNTPを添加したチューブにおいて一塩基伸長反応が進行し、反応溶液をssDNA-GNP分散液と混合すると、伸長反応が進行したものは赤色、伸長反応が進行しなかったものでは青色を示すことを確認した。<sup>15)</sup> 実際の遺伝子診断を想定した場合、対象となる遺伝子試料が野生型、あるいは変異型のホモ接合体とは限らない。診断対象が、野生型と変異型のヘテロ接合体である場合も考えられる。そこで、野生型と変異型の等量混合物から成るヘテロ接合体モデル試料を用い、SNPタイピングを試みた。その結果、CYPおよびeNOSいずれにおいても、野生型および変異型に対応したddNTPを添加したチューブが赤色、それ以外のddNTPを添加したチューブでは青色を示すことを確認した。以上の結果は、本法により野生型のホモ接合体、変異型のホモ接合体、さらには野生型と変異型のヘテロ接合体を「見て・診る」ことが可能であることを意味する。さらに最近、ヒト毛根細胞から抽出した遺伝子試料を用いて本法の有効性が検証された。<sup>15)</sup> 被験者3名に対しCYPのSNPタイピングを行ったところ、2名は野生型のホモ接合体、1名は変異型のホモ接合体との結果を得た。こ

の結果に関して、DNAシーケンサーにより各被験者の当該SNPサイトの塩基配列を確認したところ、本法によるSNPタイピングと結果が完全に一致し、実試料の診断における信頼性が実証された。

また、本SNPタイピングの信頼性向上に向けた別のアプローチとして、dsDNA-GNPの末端塩基配列に依存した分散・凝集メカニズムの解明も進められている。詳細は省略するが、筆者らの研究グループは最近、ブラシ状にDNA二重鎖が固定された2つの界面間において、最末端の塩基配列に依存して全く異なる力(引力/斥力)が発生する現象を見いだした。<sup>16)</sup> dsDNA-GNP間においても、同様の界面間力が働き、末端配列選択的な分散・凝集挙動に反映されたものと考えている。

## 5 おわりに

金ナノ粒子のユニークな発色特性を利用して簡便・迅速に「見て・診る」ことを目指した診断システムの研究動向を紹介した。病気や感染症、個人の体質判定など医療への応用を中心に研究が進められてきた「見て・診る」システムは、今後、環境や食品など多様な分野への展開が期待される。

### 参考文献

- 1) Faraday M., *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 147, 145-181(1857).
- 2) 山田 淳 監修, プラズモナノ材料の開発と応用, シーエムシー出版(2011).
- 3) Qu W. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 3442-3445(2011).
- 4) Bui MP. *et al.*, *Nano Lett.*, 15, 6239-6246(2015).
- 5) Rica R., Sevens M. M., *Nature Nanotech.*, 7, 821-824(2012).
- 6) Bichenkova E. V. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1809, 1-23(2011).
- 7) Nkolauz M. *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 37, 454-459(2009).
- 8) Rothberg H. Li. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14036-14036(2004).
- 9) Storhoff J. J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1959-1964(1998).
- 10) Sato K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8102-8103(2003).
- 11) 金山直樹, 前田瑞夫, *ファルマシア*, 46, 317-322(2010).
- 12) Sato K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 33, e4(2005).
- 13) Wang G. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 28, 270-277(2017).
- 14) Akiyama Y. *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 20, 17420-17425(2014).
- 15) Akiyama Y. *et al.*, *ChemistryOPEN*, 5, 508-512(2016).
- 16) Kanayama N. *et al.*, *Langmuir*, 32, 13296-13304(2016).

### キーワード

金ナノ粒子, 診断技術, 可視化プローブ, 抗原抗体反応, 一塩基多型

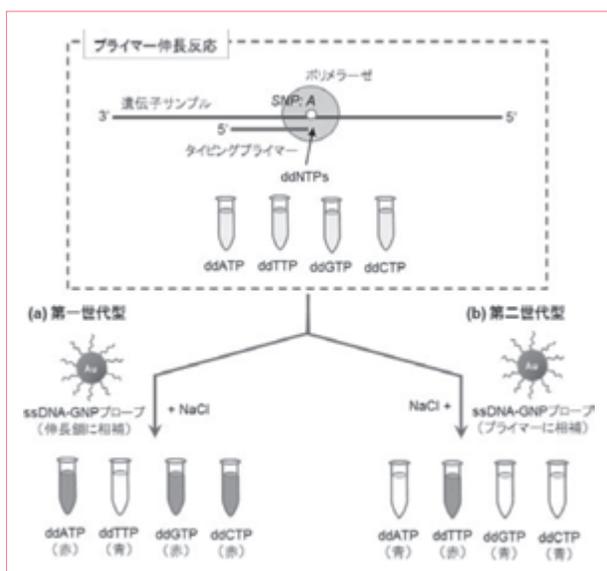


図4 DNA修飾金ナノ粒子の分散・凝集挙動に基づく「見て・診る」SNPタイピング法

(a)第一世代型, (b)第二世代型。

Copyright © 2018 The Pharmaceutical Society of Japan