

課題番号	Q22DS-05
課題名 (和文)	酵素抗体法への臨床応用を目指した抗体結合ナノ多孔粒子の開発
課題名 (英文)	Correlation between porosity and antibody binding to silicon nanoporous particles toward clinical application of enzyme-antibody method
研究代表者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 総合研究所 特任助手 氏名 MYAT ENDRA SWE
共同研究者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 工学部 電気電工学科 教授 氏名 佐藤 慶介
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 東京慈恵会医科大学 基盤研究施設 教授 (退職) 氏名 馬目 佳信
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 氏名
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 氏名

研究成果の概要 (和文)

本研究では、酵素抗体法に用いられるマイクロウェルプレートの代わりに診断基材の開発を目的とし、シリコンナノ多孔粒子と作製とそれに対するアミノ基の修飾及び抗体の結合に成功した。表面加工シリコンナノ粒子では多孔形状、凹凸形状、多孔と凹凸を持ち合わせたハイブリッド形状の3つの形状を作製し、それぞれの形状に対する抗体の結合量を比較したところ、表面積が大きくなるにつれ、アミノ基の修飾面積が大きくなり、それに伴い、抗体の結合量も増えていることが確認できた。

研究成果の概要 (英文)

In this study, we have succeeded in fabricating porous silicon nanoparticles, modifying amino groups on them, and binding antibodies to them, with the aim of developing a diagnostic substrate that can replace the microwell plates used in the enzyme-antibody method. Three shapes of surface-processed silicon nanoparticles were fabricated: porous, concavo-convex, and a hybrid shape that combines both porous and concavo-convex shapes, and the amount of antibody binding to each shape was compared. The results showed that as the surface area increased, the modified area of amino groups increased and the amount of antibody binding increased accordingly.

1. 研究開始当初の背景

病原である抗原と病原を対抗する抗体との結合反応により、病気を簡便かつ効率よく診断できる手法が用いられている。この手法では、主に体内から病原性のある抗原を含んだ細胞を摂取し、抗体が固相された物質に検体を添加させ、抗原と抗体を反応させることで病原体を診断する技術である。抗原や抗体を定量する手法として酵素抗体法（ELISA法：Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）、二重免疫拡散法、ラテックス凝集法などが利用されている。中でもELISA法では、抗体や抗原を固相化したマイクロウェルプレートが使用され、これに検体を添加することで抗原抗体反応させてから、酵素標識された抗体を添加して検体に含まれる抗体や抗原を定量する。その手法が簡便であり、また様々な病原体に対応できることからELISA法は広く用いられる。しかし、マイクロウェルプレートでは、抗体や抗原といったタンパク質の吸着量や表面積の制限があるため、検体中の抗原や抗体の濃度があまりに高いと反応が飽和してしまい、広範囲の濃度に対する抗原抗体反応には対応が難しいという課題もある。そのためあらかじめ固相化した抗原または抗体に対しELISAで対応できる濃度で抗原抗体反応をさせるために、事前に検量線を確認しながら検体を適切な濃度に希釈して使用する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では様々な病原体に対応でき、手軽に広く用いられているELISA法に着目し、前述の課題を改善するために、固相化する抗原あるいは抗体の量を多くしておくことが必要である。そのためにはマイクロウェルプレートにかわる表面積の膨張できる材料の開発と生体物質と結合させる方法に取り組む必要があり、表面積の拡張が可能な試薬の開発を行うこととした。材料には表面加工が容易なシリコンナノ粒子に着目した。シリコンナノ粒子は太陽電池用途に使用されている材料で、シリコンナノ粒子を多孔質化することで表面積が増え、発電に必要なキャリアを多数生成できることでエネルギー変換効率を向上させることが可能であるが、本研究では多孔質化による表面凹凸形態の形成により表面積を拡張したシリコンナノ粒子に対してより多くの抗体を結合させることで体外での抗原抗体反応が高感度で検知できることを想定し、本研究計画を着想するに至った。本研究では検査医学分野において多種多様な癌細胞やウイルスを高感度で検知できる試薬の開発を目指している。

3. 研究の方法

シリコンナノ粒子の表面積を拡張させるため、ナノ粒子に対し、3種類の形状になるように表面加工を実施する。

①表面孔シリコン微粒子（Si-NPPs）の作製

・シリコンナノ粒子の表面積だけでなく、内部も有効活用を考え、多孔形状を作製し、細孔内部への抗体結合が可能かどうか検討する。
・マイクロウェルプレートの課題である表面積の制限を考え、ナノ粒子では多孔形状より表面積の大きい金平糖形状の粒子を作製し、多孔形状（表面孔）

と金平糖形状（微細突起）のどちらが抗体の結合量が多いか検討する。

・多孔形状と金平糖形状の両方の利点を兼ね揃えたハイブリッド形状も作製し、抗体結合量の増加を確認する。

②Si-NPPs に対するアミノ基(NH基)修飾

・シリコンナノ表面加工粒子と抗体結合のため最適な官能基の修飾条件を確認する。本研究ではアミノ基の修飾を行なう。

③Si-NPPs に対し JT-95 抗体の結合

・甲状腺乳頭がんに特異的に結合する抗体を結合させ抗体結合の変化を確認する。

4. 研究成果

3-①作成したナノ多孔粒子の形態を走査型電子顕微鏡(SEM)、多孔構造の細孔径 BET 窒素ガス吸着法を用いて評価した。表面加工した粒子にはそれぞれ多孔形状、凹凸形状、多孔形状と凹凸形状両方を持ち合わせたハイブリッド形状の3種類が形成され、多孔形では100nmの粒子に対し約20~30nmの細孔が確認できた。凹凸形状では凹凸間が約15nmであることが確認できた。ハイブリッド形状においては、凹凸間約15nmと約20nmの細孔両方の確認ができた。

3-②におけるアミノ基修飾状態は縮合反応の完結度テスト（ニンヒドリン試験）より評価した。アミノ基の縮合反応により、アミノ基を修飾していない粒子は無職透明だが、アミノ基を修飾している全ての粒子において紫色に発色した。発色をマイクロプレートリーダーによりλ570nmで吸光度を測定した無多孔粒子をアミノ基修飾した。無多孔の粒子に比べ、表面加工を施したシリコンナノ粒子、多孔形状より凹凸形状、コンペイト形状よりハイブリッド形状の方がアミノ基の修飾量が多いことがわかった。それは表面積が増えたことによるアミノ基修飾可能面積も増加認めたと考えられる。多孔質に関しては細孔の内部にアミノ基が就職できていない可能性がある。しかし、同形状においては、表面積は下がるが、細孔径のサイズが大きくなることにより修飾しやすくなったと考えられる。

3-③ではシリコンナノ粒子にアミノ基修飾ができたことから、アミノ基と抗体との結合を行ったところ、アミノ基架橋剤BS3を用いることで抗体と結合させることに成功した。それぞれの形状の粒子において抗体の結合量はアミノ基の修飾量と似たような結果になった。これによりアミノ基の有無によって、結合できる抗体の量も変化するという位置付けになる。しかし、多孔コンペイトウ形状には、多孔質や、コンペイトウよりは抗体の結合量が増えたがアミノ基修飾結果とは一致しない。その理由として、細孔径が小さいがために粒子内部にアミノ基はあるが、抗体が結合できなかったと考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

- ① 2020年材料学会
- ② 2021年バイオマテリアル国際学会
- ③ 2021年材料学会