

特定の物質を**高効率に濃縮可能**な 機能材料の開発技術

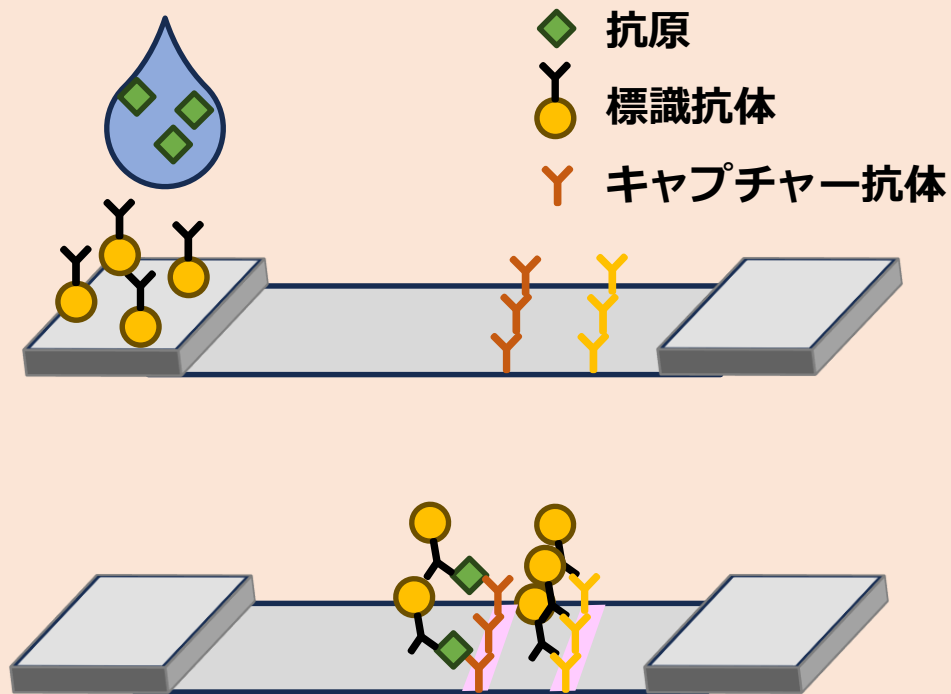


有明工業高等専門学校 創造工学科
教授 大河平 紀司



イムノクロマト法

簡便な方法として普及しているが、検体に含まれる**抗原・抗体の濃度が低く、検出感度が低い**ため誤診につながるケースが後を絶たず、新型コロナウイルスに関する利用は推奨されていない。

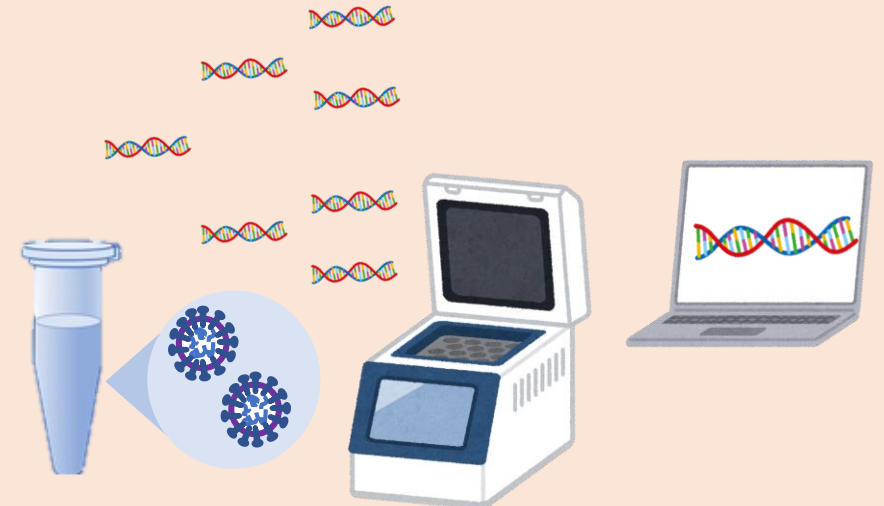


ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法

感度が高いと言われているが、これは遺伝子増幅を何度も繰り返し行うが故であり、**精度を高めるためには十分なウイルス量が重要**となる。



粘液や唾液から
検体を採取



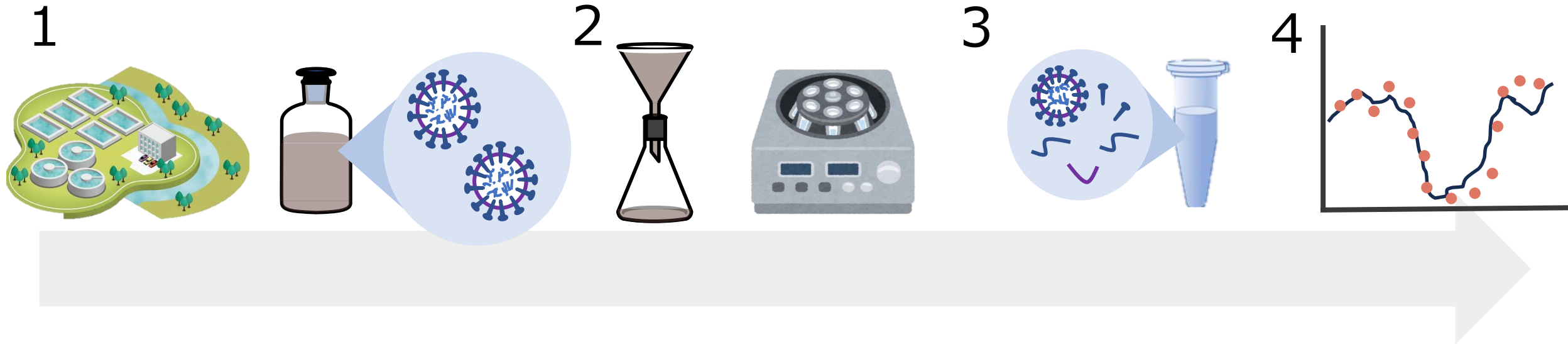
PCRにて増幅

分析機器による
チェック

1 : 下水採取（雨水等で希釈される）

2 : ウイルス濃縮

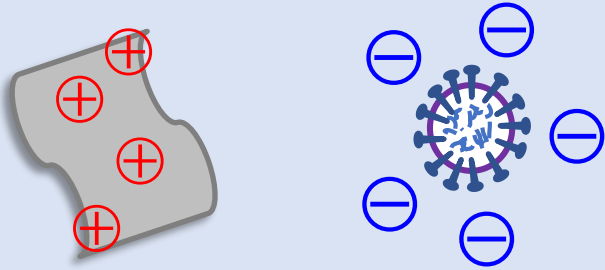
3 : RNA抽出



下水サーベイランスは、下水中に微量存在するコロナウイルスのRNA濃度を測定し、地域の蔓延状況や感染者の推移予測が可能であるとして実施されている事業。

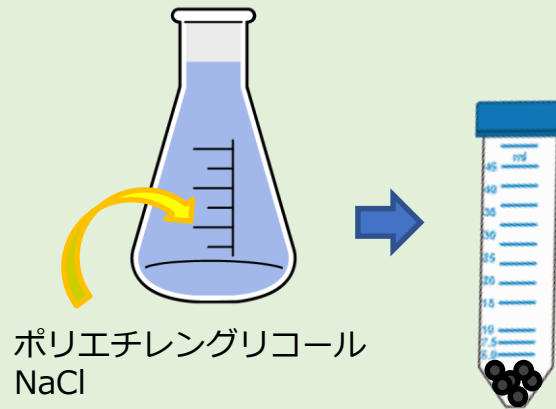
ウイルス濃縮方法

陰電荷膜濃縮法



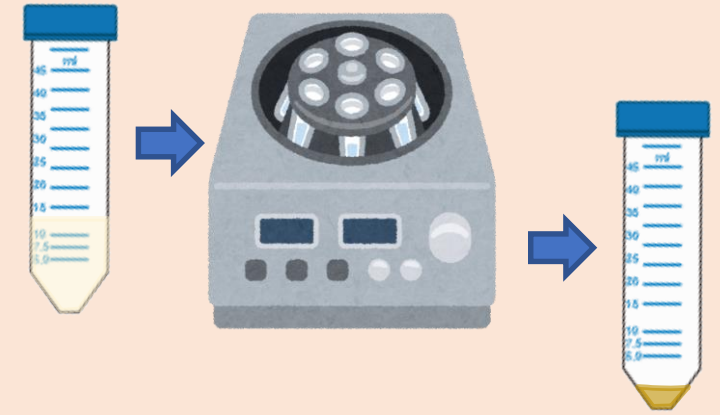
ウイルスの表面電荷がマイナスであることを利用し、逆電荷であるプラスの電荷を付与した膜にて静電吸着を行う方法。
濃縮対象以外のマイナス電荷を帯びた物質（タンパク質等）も吸着してしまう。

PEG沈殿法



ポリエチレングリコール（PEG）及び塩化ナトリウムと混合して振とうし、PEGが水分子を吸着することによってウイルス同士が凝集沈殿する現象（塩析）を利用した方法。雨水等の希釈により効率が低下する。

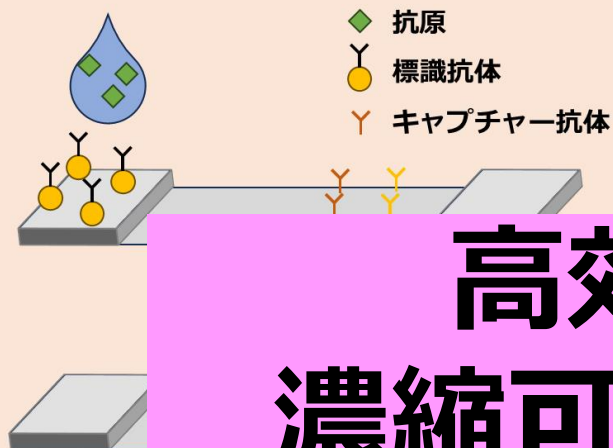
超遠心法



ローターによりサンプルを大きな遠心力で回転させることにより、拡散力による熱運動の影響を打ち消して沈降させる方法。
雨水等の希釈により効率が低下する。高額機器が必要。

イムノクロマト法

簡便な方法として普及しているが、検体に含まれる**抗原・抗体の濃度が低く、検出感度が低い**ため誤診につながるケースが後を絶たず、**新型コロナウイルスに関する利用は推奨されていない**。

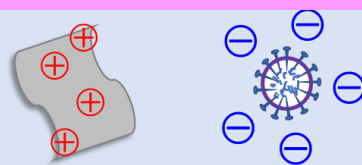


ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法

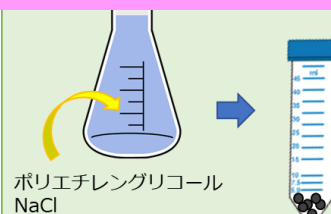
感度が高いと言われているが、これは遺伝子増幅を何度も繰り返し行うが故であり、**精度を高めるためには十分なウイルス量が重要**となる。



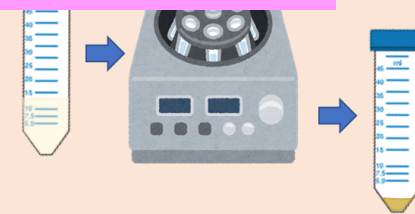
高効率に物質（ウイルス）を濃縮可能な手法（材料）が必要！！



ウイルスの表面電荷がマイナスであることを利用し、逆電荷であるプラスの電荷を付与した膜にて静電吸着を行う方法。
濃縮対象以外のマイナス電荷を帯びた物質（タンパク質等）も吸着してしまう。



高分子であるポリエチレングリコール及び塩化ナトリウムと混合して振とうし、高分子が水分子を吸着することによってウイルス同士が凝集沈殿する現象（塩析）を利用した方法。雨水等の希釈により効率が低下する。



ローターによりサンプルを大きな遠心力で回転させることにより、拡散力による熱運動の影響を打ち消して沈降させる方法。雨水等の希釈により効率が低下する。高額機器が必要。

ポリマーブラシ

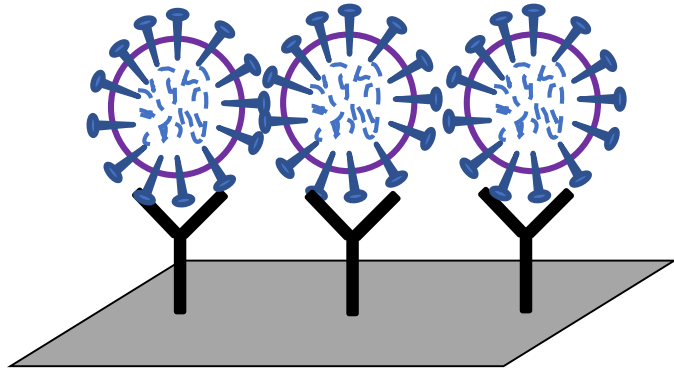


抗原（ウイルス）



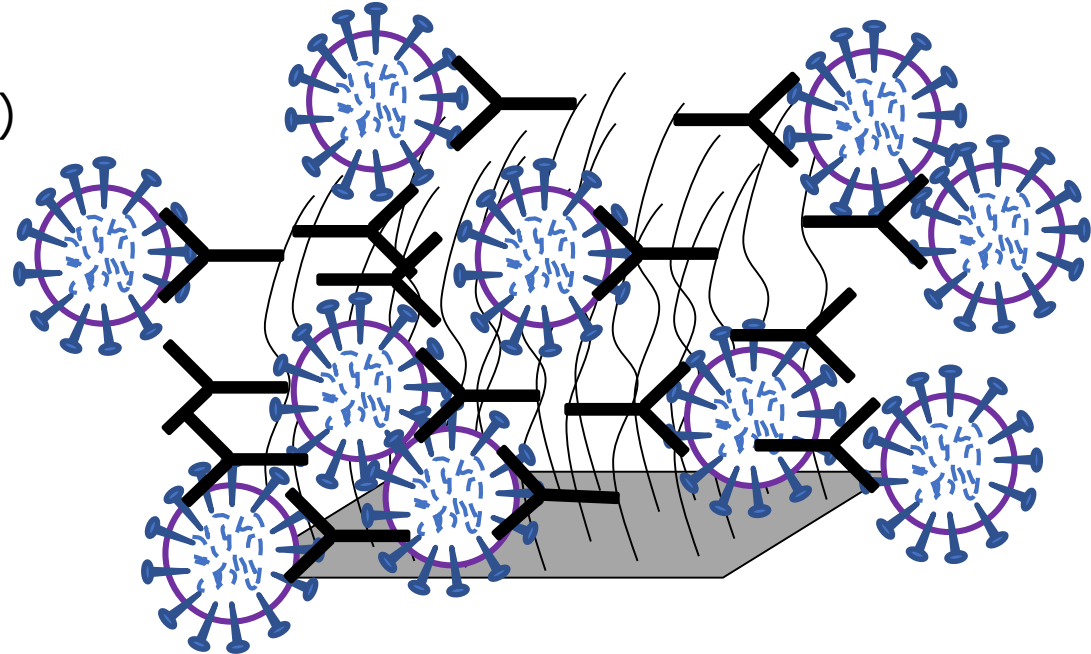
抗体（抗原認識部位）

(A)



従来の固定化法
(単位面積あたり低濃縮率)

(B)

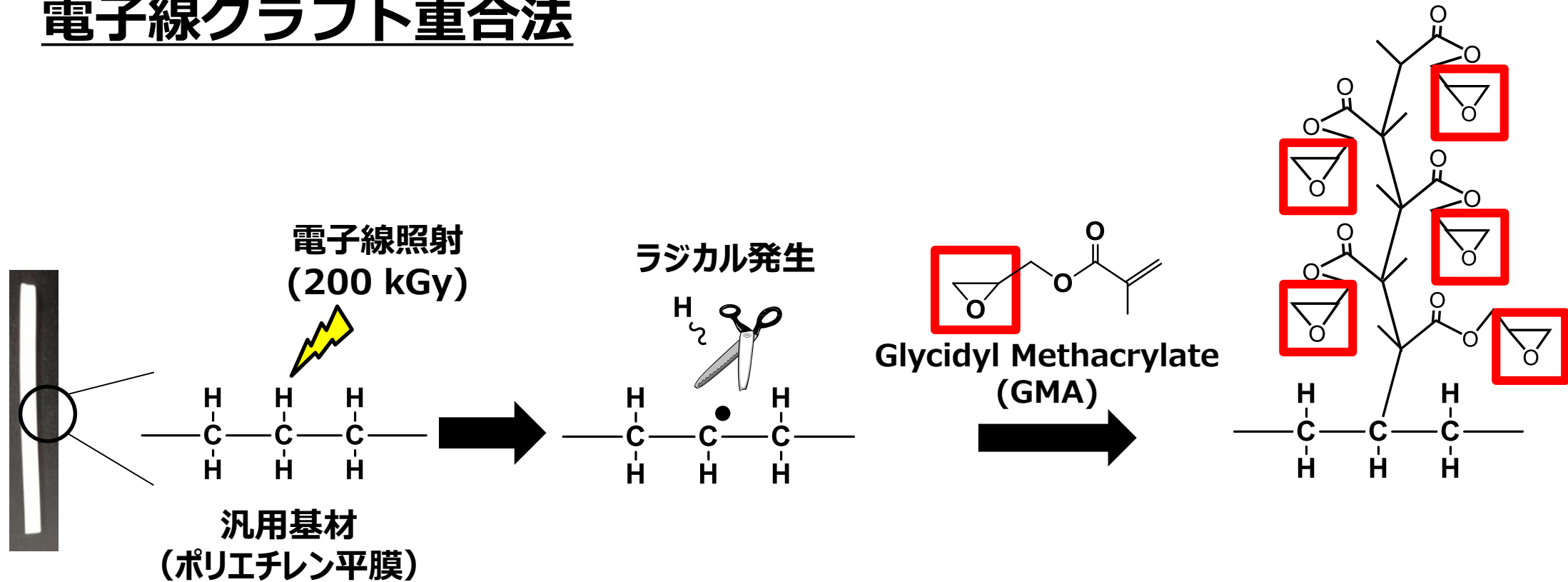


提案する革新的機能材料
(単位面積あたり高濃縮率)



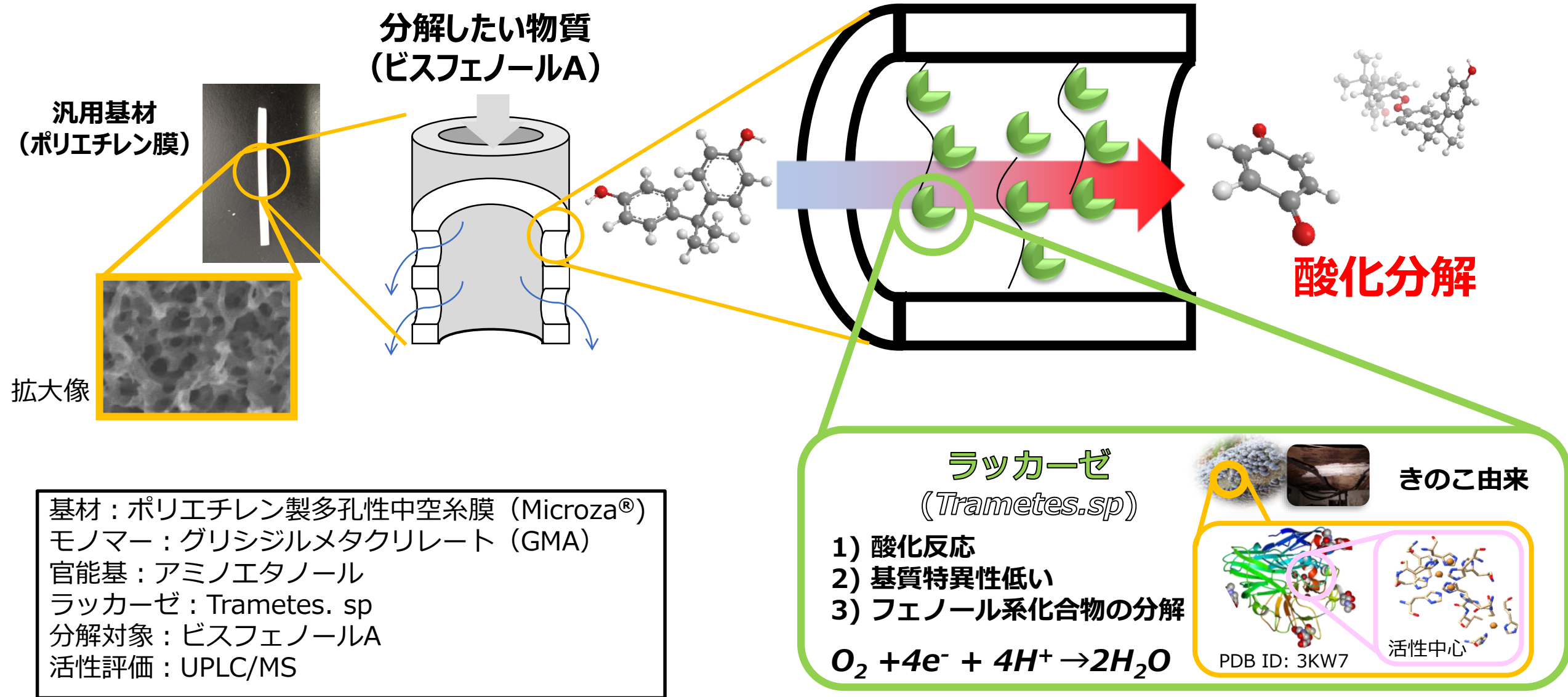
高効率濃縮が可能！！

電子線グラフト重合法

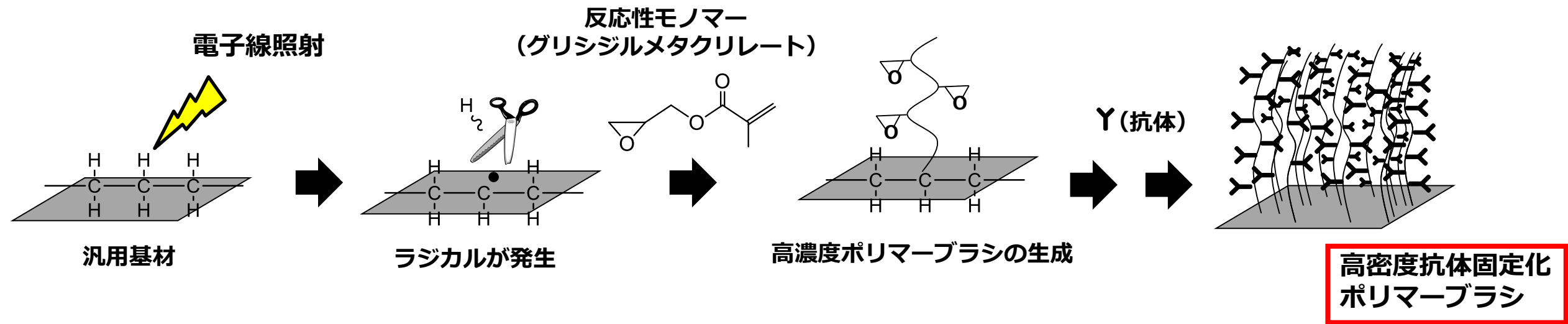


反応性の高い**エポキシ環**に**官能基**を導入することで
様々な機能性の付与が可能

電子線グラフト重合による機能化の例

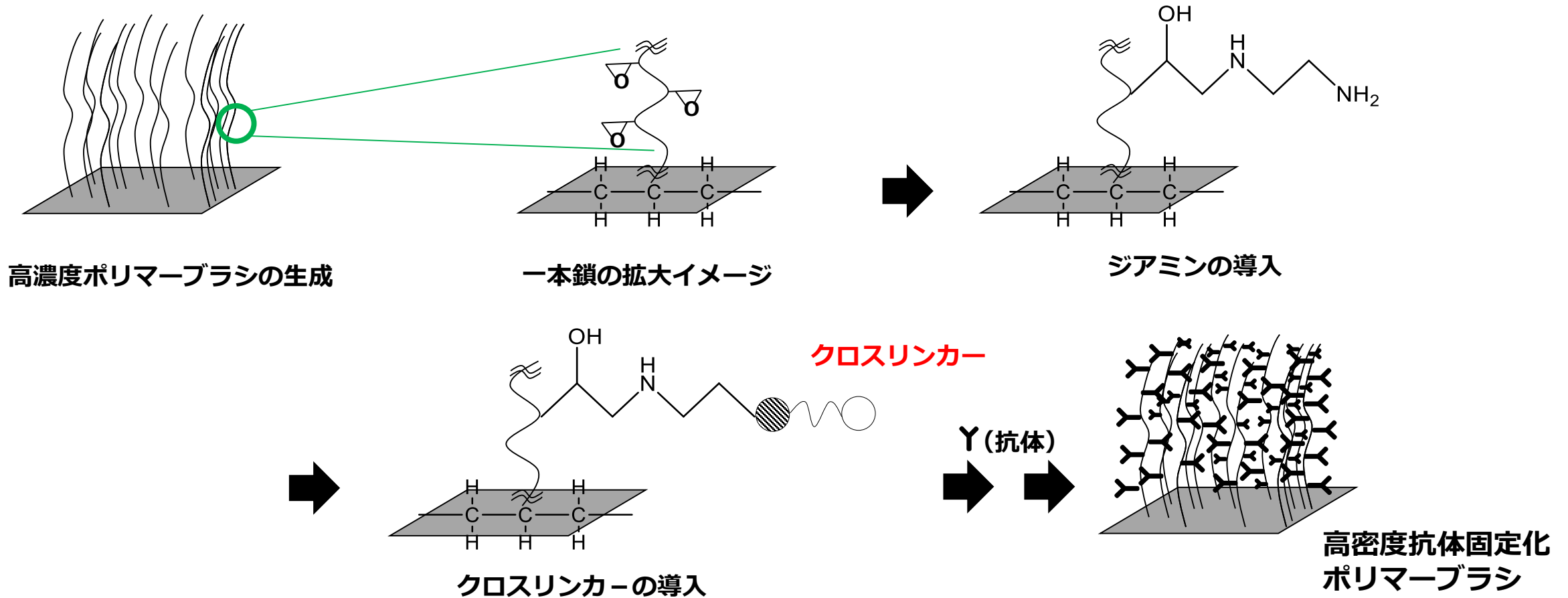


高密度抗体固定化ポリマーブラシ作製スキーム



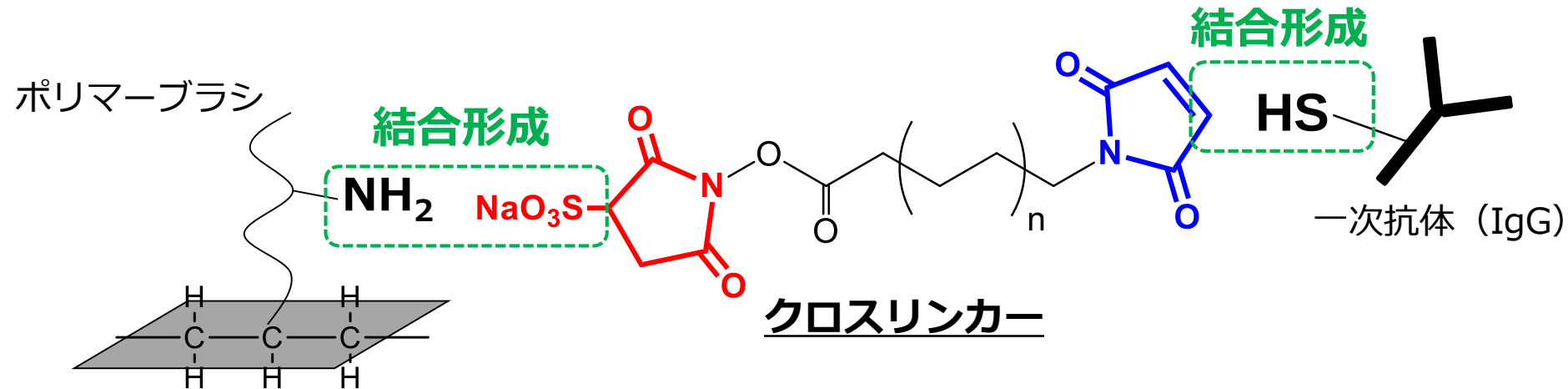
ポリマーブラシに抗体を高密度固定する

高密度抗体固定化ポリマーブラシ作製スキーム



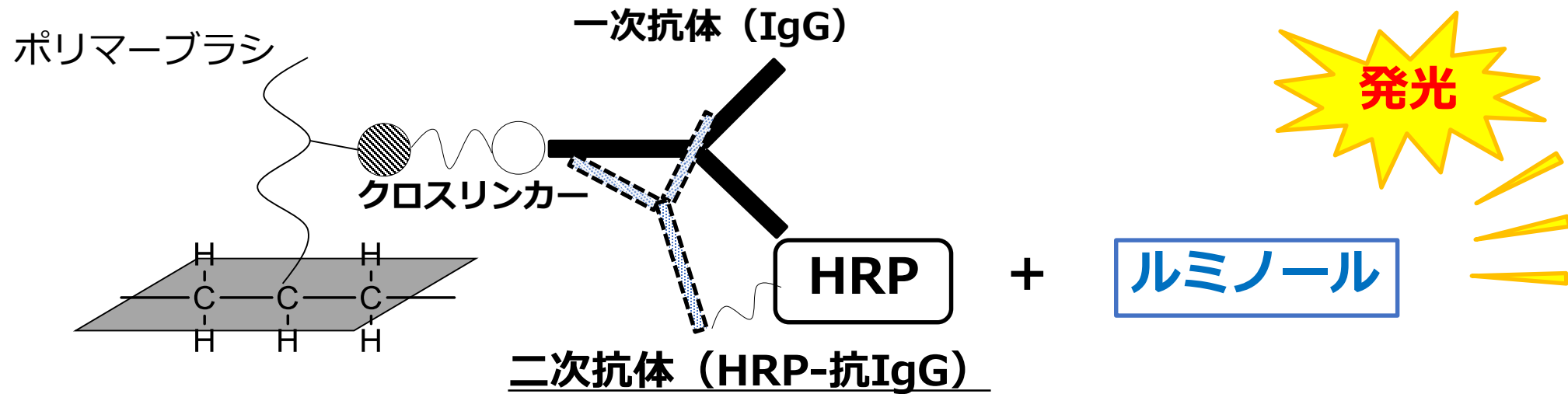
ポリマーブラシに**クロスリンカー**を導入することで、
抗体の高密度固定化を実現

クロスリンカーを用いたIgG抗体の固定化



- ① ポリマーブラシに**アミノ基**を導入し、クロスリンカーの**N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステル**と反応
- ② クロスリンカーの**マレイミド基**とIgG抗体の**チオール基**を反応させて固定化

IgG抗体固定化の確認（発光法）



IgG固定化の可否の評価は
「固定化したIgGを特異的に認識するHRP-抗IgG」
と**ルミノール（基質）**との**発光**により評価

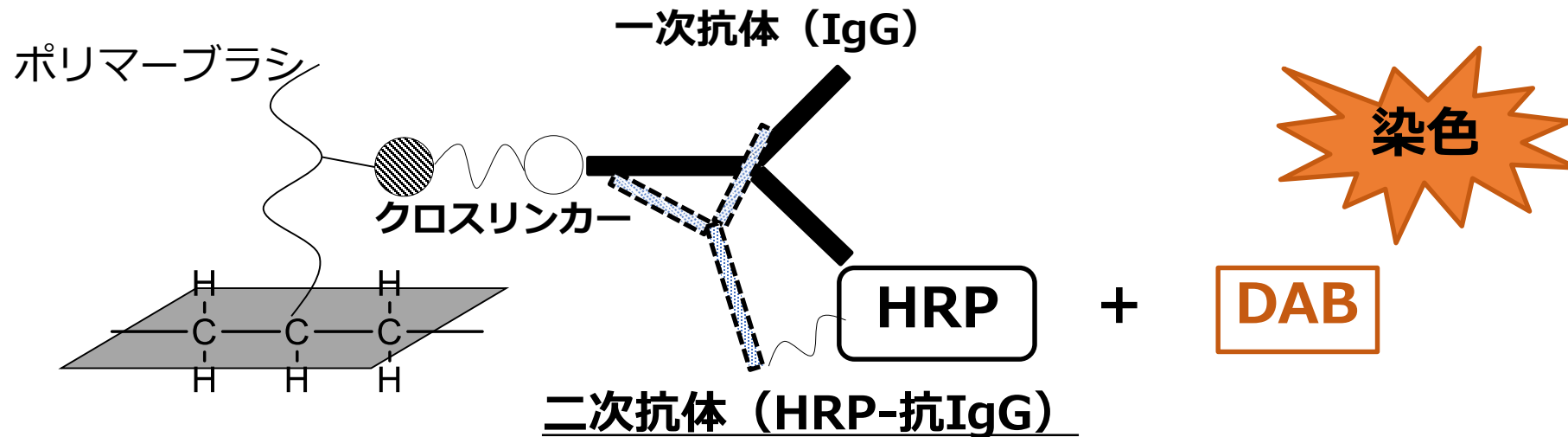
発光法によるIgG導入評価結果

- No.&膜の種類**
- (1) EDA膜
 - (2) KMUS膜
 - (3) IgG膜(0.05mL)
 - (4) IgG膜(0.10mL)
 - (5) IgG膜(0.20mL)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
露光撮影					
発光撮影					

IgG溶液に浸漬させた試料のみ, HRP-抗IgG由来の発光
⇒ Sulfo-KMUSを介したIgG導入に成功

IgG抗体固定化の確認（染色法）

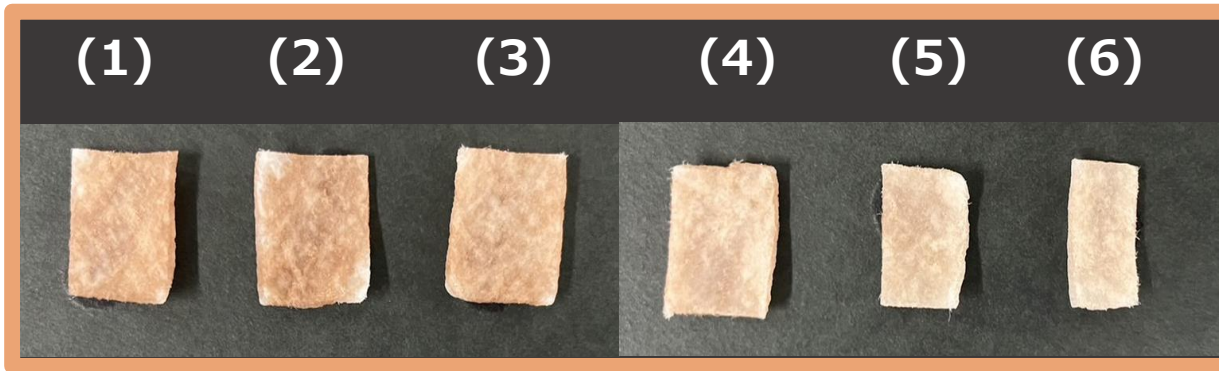


IgG固定化の可否の評価は
「固定化したIgGを特異的に認識するHRP-抗IgG」
とDABによる**染色**により評価

染色法によるIgG導入評価結果

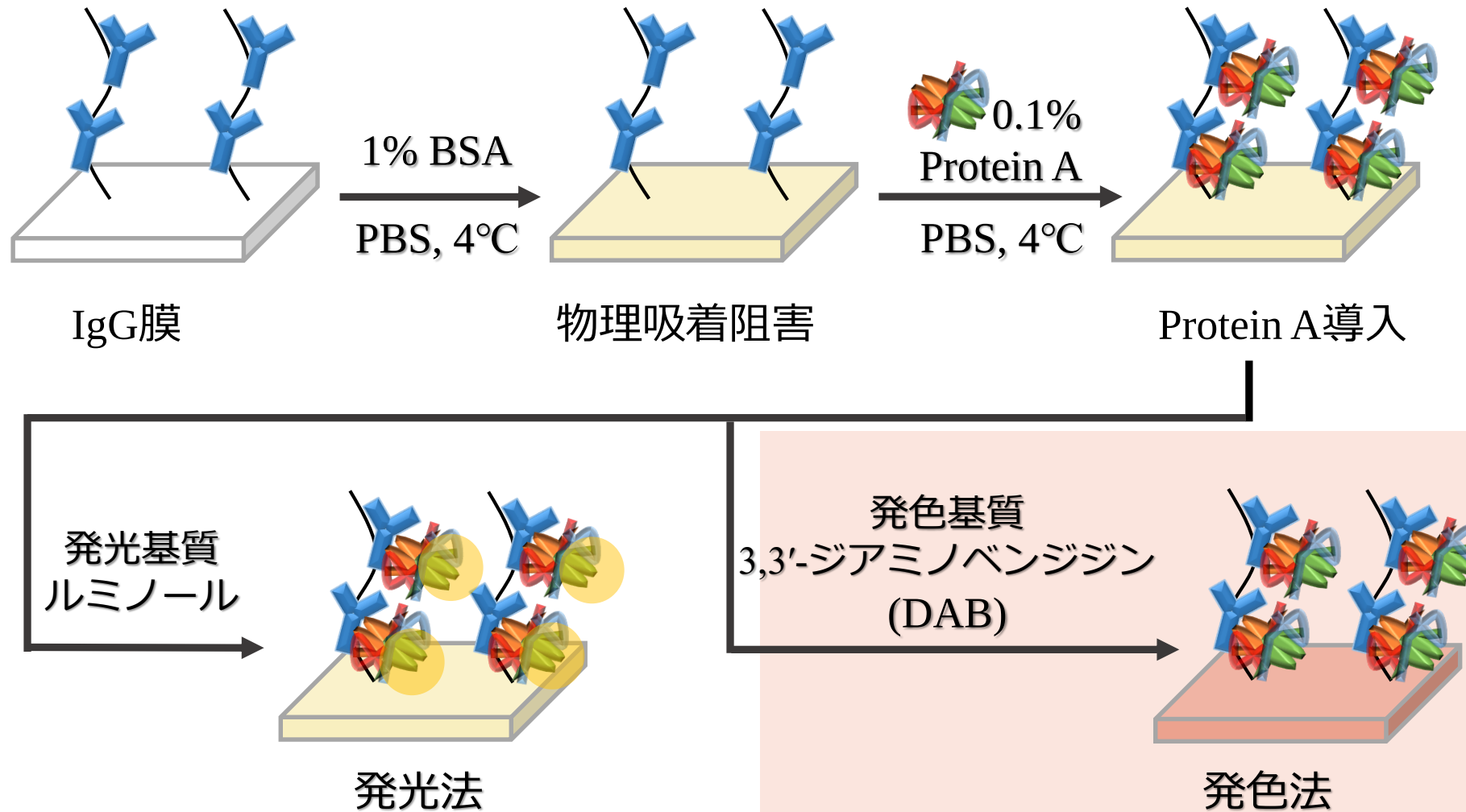
No. & 膜の種類

- (1) 0.1 vol%
- (2) 0.01 vol%
- (3) 0.001 vol%
- (4) 0.0001 vol%
- (5) 0.00001 vol%
- (6) コントロール



サンプル間で異なる発色度
⇒ 抗体導入量に依存した染色を確認

HRP標識Protein Aによる評価

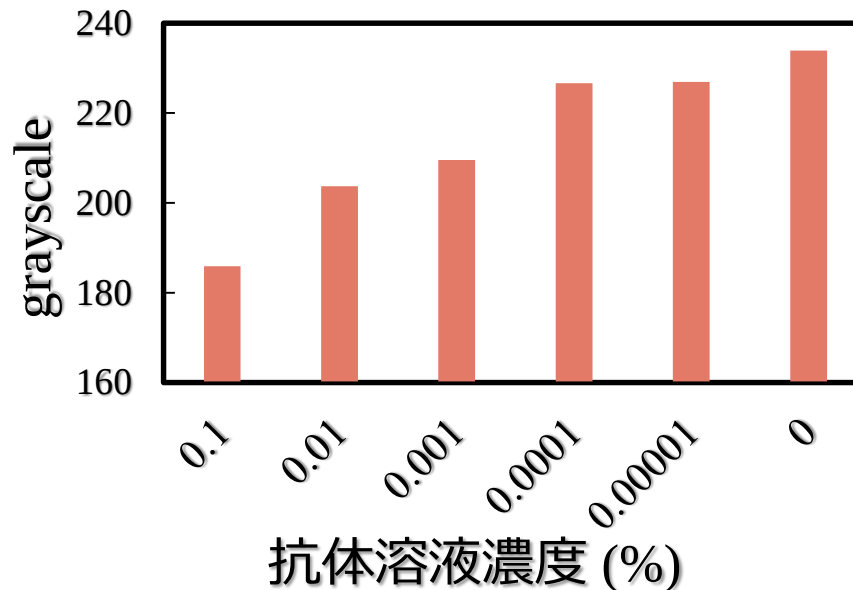


染色法によるHRP標識Protein Aによる評価結果



No.&膜の種類

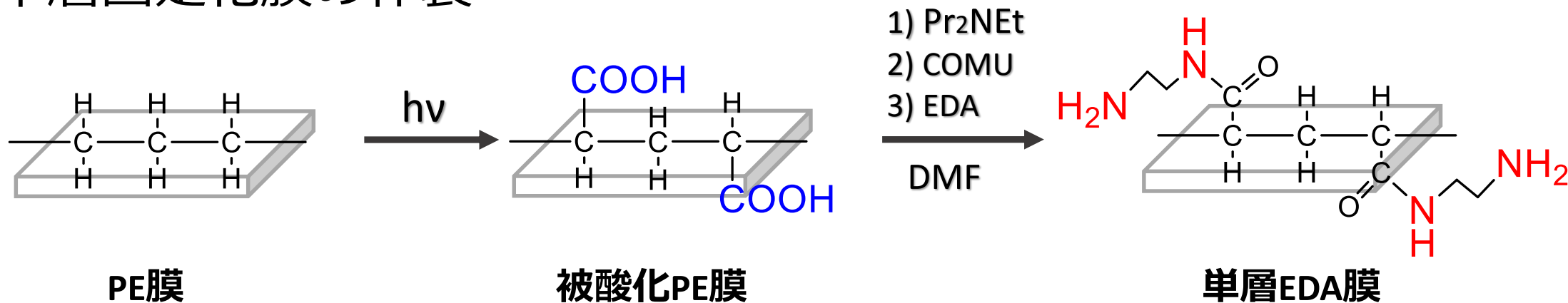
- (1) 0.1 vol%
- (2) 0.01 vol%
- (3) 0.001 vol%
- (4) 0.0001 vol%
- (5) 0.00001 vol%
- (6) コントロール



抗体量依存の吸着量
▶ 膜上での抗原認識能

ポリマーブラシの効果の検証

単層固定化膜の作製



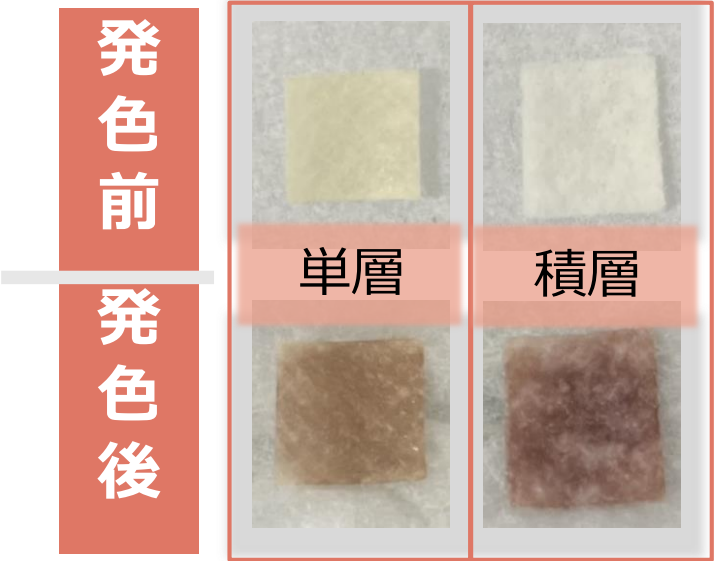
UV照射装置



紫外線の吸収により生成した炭素ラジカルが
連鎖反応を引き起こし, ROOH生成

ポリマーブラシの効果の検証

単層vs積層間の染色比較



単層抗体膜はCOMU縮合操作由来の薄黄色の着色が発色前から見られた



発色操作前後の濃淡差で
抗体量を評価した

Table 1 発色操作前後の各膜の濃淡差

	単層	積層
発色前	193.58	209.93
発色後	118.15	102.42
濃淡差	75.43	107.51

同量のIgGを仕込んだ膜の
発色度に差が生じた

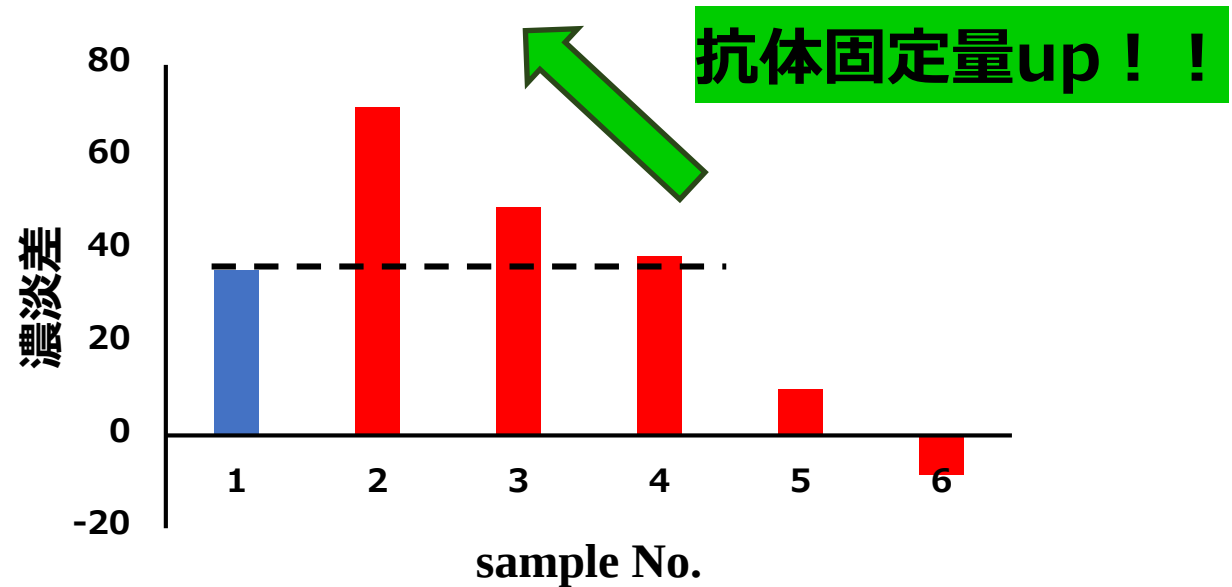
積層膜では抗体量が増加

ポリマーブラシの効果の検証

単層、積層間の染色比較 + IgG仕込み量変化

No. & 膜の種類

- (1) 単層膜 0.1 vol%
- (2) 積層膜 0.1 vol%
- (3) 積層膜 0.01 vol%
- (4) 積層膜 0.001 vol%
- (5) 積層膜 0.0001 vol%
- (6) 積層膜 0.00001 vol%



✓ 単層膜はIgG仕込み量 1/100 の積層膜と同等の濃淡差を示した

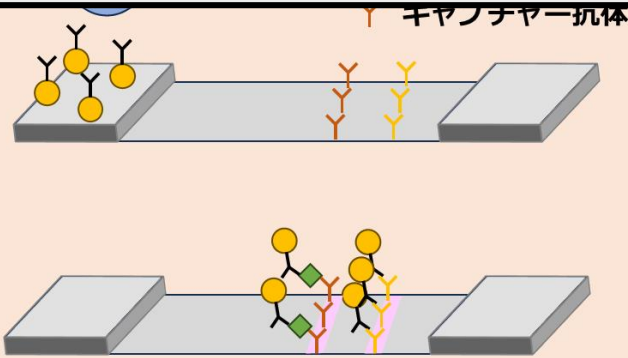
⇒ 積層膜 (ポリマーブラシ) の 有用性

本技術の特徴、想定される用途

イムノクロマト法

簡便な方法として普及しているが、検体に含まれる**抗原・抗体の濃度が低く、検出感度が低い**ため誤診につながるケースが後を絶たず、**新型コロナウイルスに関する利用は推奨されていない。**

感度が大幅にアップ！！



ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法

感度が高いと言われているが、これは遺伝子増幅を何度も繰り返す行いが故であり、**精度を高めるためには十分なウイルス量が重要**となる。

濃縮の実現により解決！！

下水サーベイランス

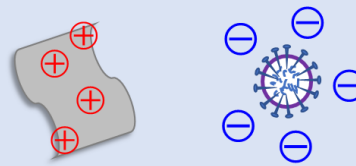
粘液や唾液から検体採取

PCRによる増幅

分析機器によるチェック

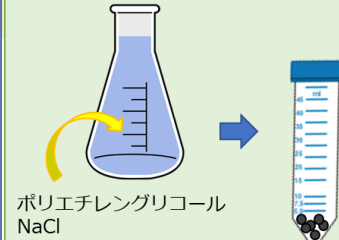
ウイルス濃縮方法

陰電荷膜濃縮法



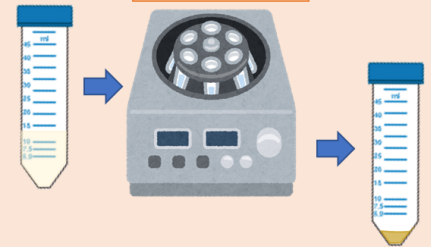
ウイルスの表面電荷がマイナスであることを利用し、逆電荷であるプラスの電荷を付与した膜にて静電吸着を行う方法。
濃縮対象以外のマイナス電荷を

PEG沈殿法



高分子であるポリエチレングリコール及び塩化ナトリウムと混合して振とうし、高分子が水分子を吸着することによってウイルス同士が凝集沈殿する現象。

超遠心法

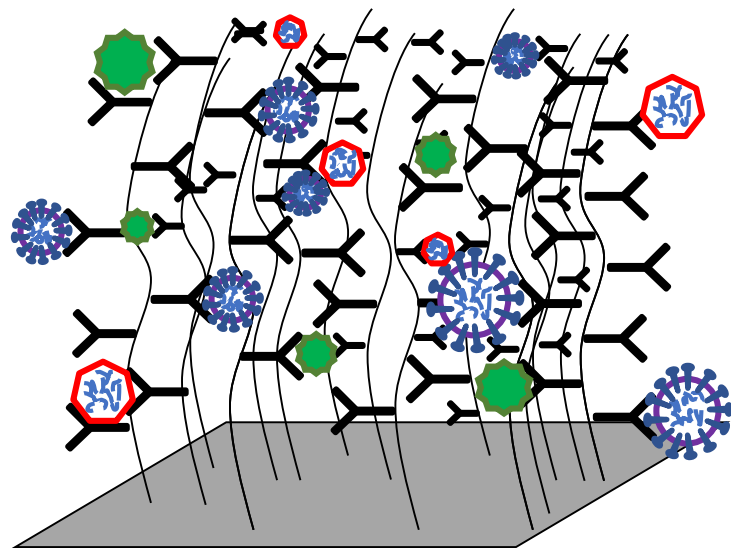


ローターによりサンプルを大きな遠心力で回転させることにより、拡散力による熱運動の影響を打ち消して沈降させる方法。
雨水等の希釈により効率が低下する。高額機器が必要。

新しい濃縮技術として学術的・産業的価値が非常に高い！！

理論的にはどのウイルスにも応用可能！！

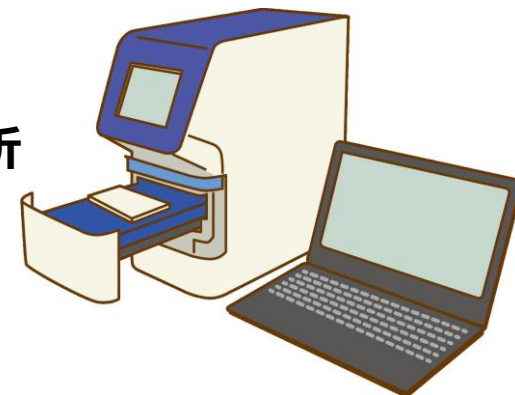
高感度ウイルスマルチプレックス解析



同一基材上のポリマーブラシに
種々の抗体を同時固定

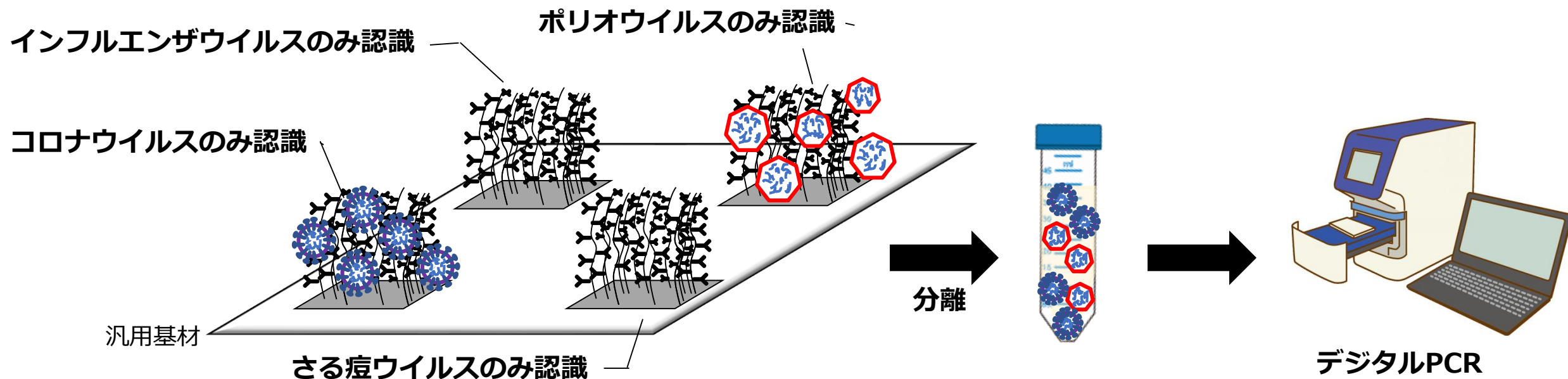


マルチプレックス解析



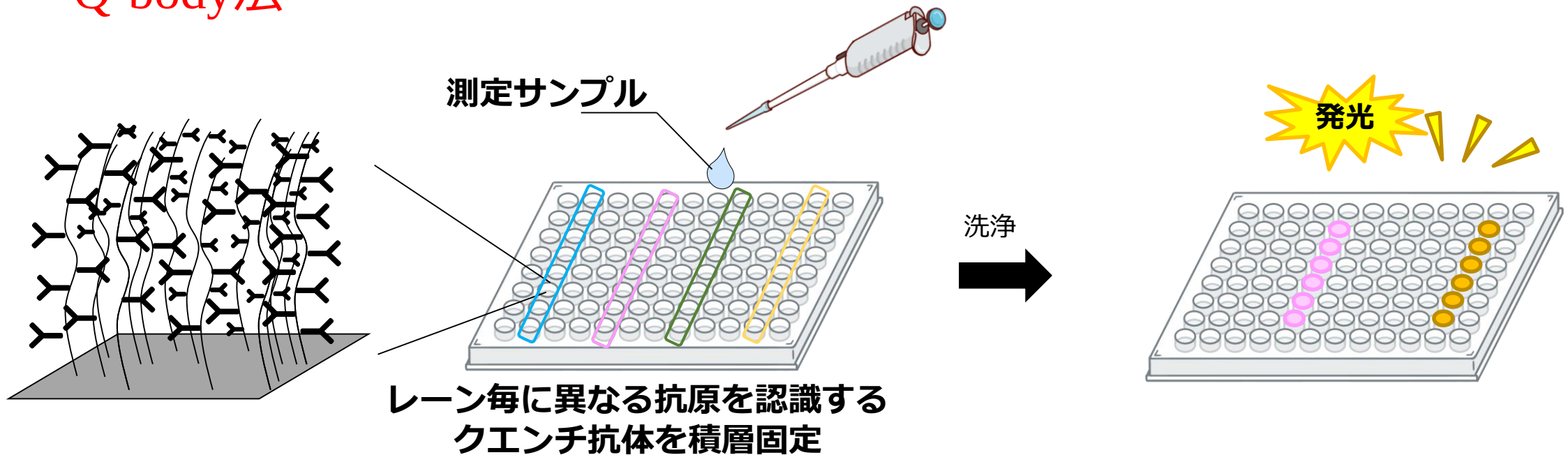
デジタルPCR

高感度ウイルスマルチプレックス解析



高感度ウイルスマルチプレックス解析

Q-body法



Q-bodyは蛍光免疫センサーであるクエンチ抗体を利用した方法であり、特定の抗原と結合することで蛍光を発する

✓プロテインG固定化

→高効率抗体精製材料

✓レクチン固定化

→高感度レクチンアレイ（糖鎖認識材料）

✓酵素固定化

→生体内の反応を人工材料で実現

✓イムノクロマト開発技術を持つ企業とのコラボ

→本技術の有効性、有用性を検証したい

✓サーベイランスの技術を有する企業とのコラボ

→実証に向けた開発・改良を進めたい

✓分析機器の高感度化に関心がある企業とのコラボ

→Q-body法、水晶振動子マイクロバランス法（QCM）、表面プラズモン共鳴法（SPR）等、様々な分析法への応用が期待される

- ✓ 発明の名称 : 機能性成形体およびその製造方法
- ✓ 出願番号 : 特願2023-101839
- ✓ 出願人 : 独立行政法人国立高等専門学校機構
- ✓ 発明者 : 大河平紀司、富永伸明



有明工業高等専門学校

総務課 連携推進係

T E L : 0944-53-8627

F A X : 0944-53-1361

e-mail : souren-staff@ml.ariake-nct.ac.jp