

ウサギ単鎖抗体による 次世代高感度イムノクロマト検査

2025年9月2日

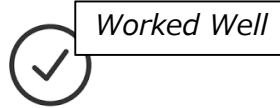
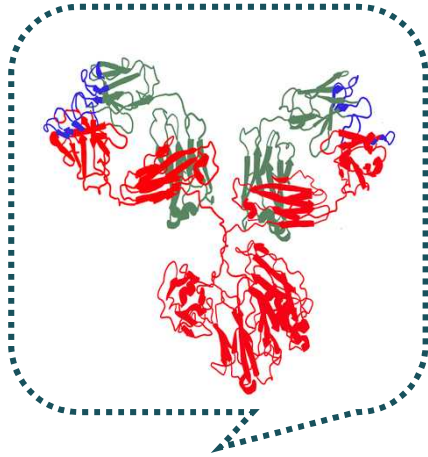


京都工芸繊維大学

分子化学系 教授 熊田 陽一

背景

動物由来抗体を用いた免疫検査



Widely adopted
in commercial diagnostics

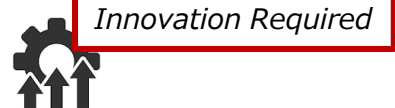
ヒトを対象とした
臨床検査に広く利用



厳格に管理された条件
でのみ実施可能



アニマルフリー試薬への
インセンティブが低い



Global
momentum

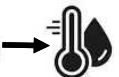


One Health
への貢献

人・動物（ペット・家畜）・食物・環境
を対象とした**広範囲の検査**に対応



過酷な環境下で利用可能な
検査試薬の必要性



アニマルフリー試薬
へのシフトが必要



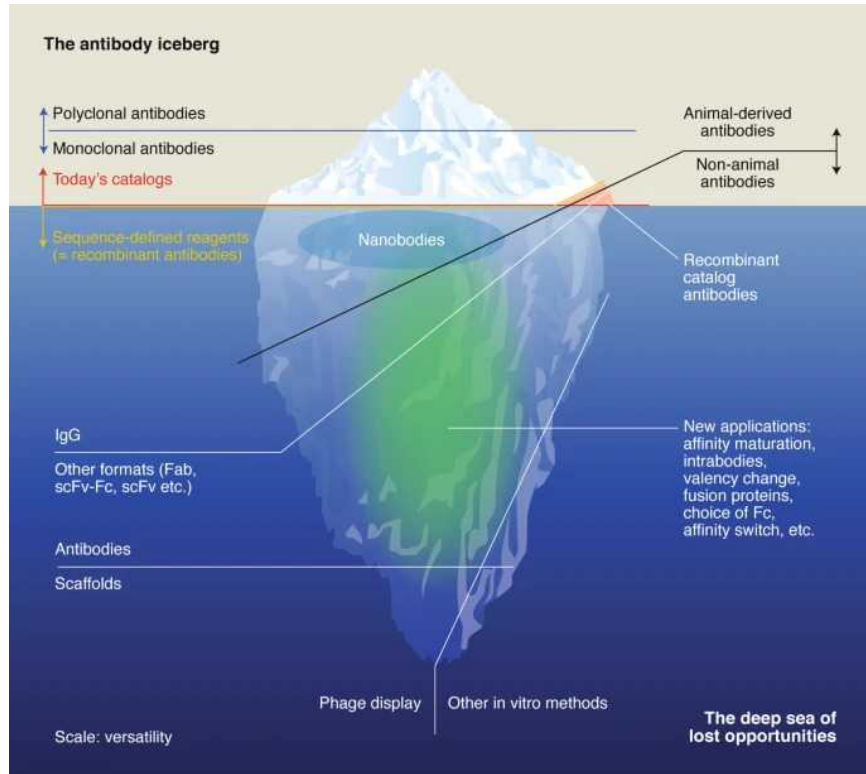
従来技術とその問題点

既に実用化されている免疫検査薬には、以下の課題が顕在化しています。

- ・ 検査試薬の動物倫理問題
- ・ 検査試薬のコストが高い
- ・ 検査キットのロット間差が大きい

以上の理由から、精度の高い検査が幅広い分野に十分に行き届いていない現状があります。

免疫検査試薬の課題1（動物倫理問題）

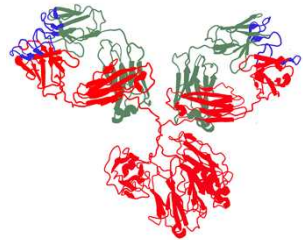


- ・市販の検査用抗体の殆どは実験動物由来。
- ・市販抗体のほとんどはアミノ酸配列不明（高感度化・品質管理に限界）
- ・コスト >> 倫理観の検査薬市場

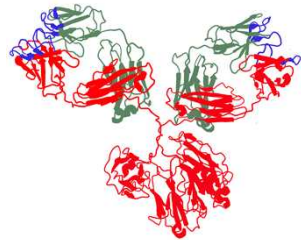
Nature Biotechnology volume 38,
1234–1239 (2020)

免疫検査試薬の課題2 (試薬コスト)

実験動物を用いる製造

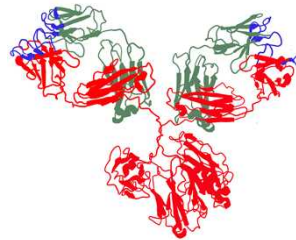


Polyclonal antibody

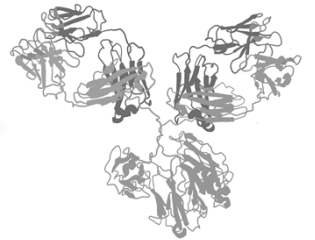


Monoclonal antibody
from hybridoma
(腹水法)

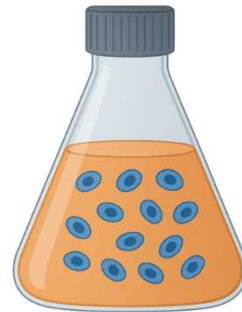
We are here!



Monoclonal antibody
from CHO, HEK293



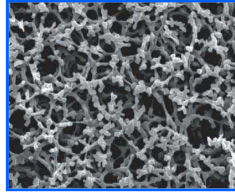
Monoclonal antibody
from Yeast ?



医薬品抗体: 1-10g/L
(流加培養、限られたクローン)

検査用抗体 (多品種に対応)
Hybridoma: 10 - 20 mg/L
CHO (一過性): 10-50 mg/L
→ 更なる改善が必要。

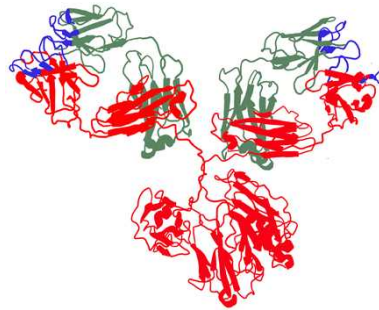
免疫検査試薬の課題3 (ロット間差)



Diagnostic membrane
(Porous membrane)



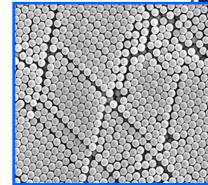
Plastic plate
(Flat plate)



Antibody
150kDa

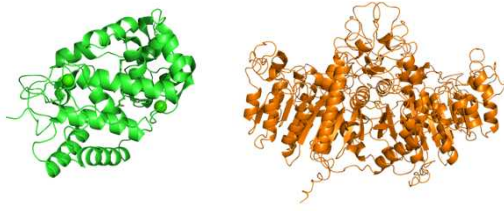


Chromatographic beads
(Porous particle)

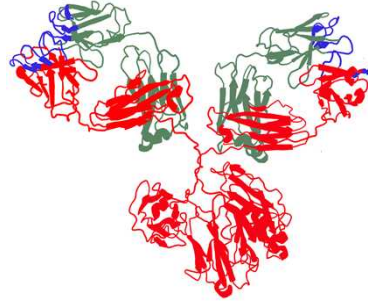


Diagnostic beads
(Non-porous particle)

免疫検査試薬の課題3 (ロット間差)



Enzyme
(Coupling, 2 – 5 nm)



Antibody
150kDa
(10nm)



AuNPs
(Adsorption, 10 – 100 nm)

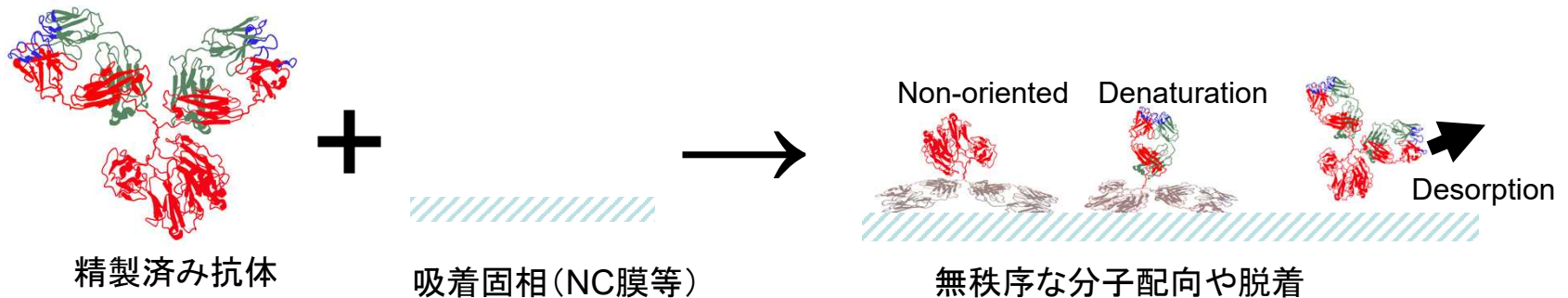
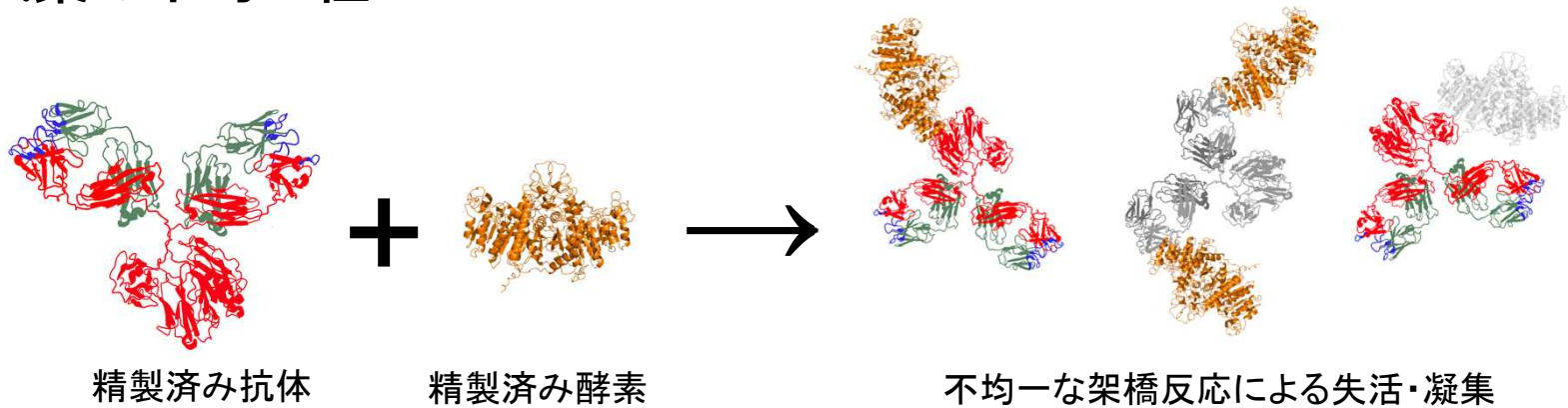


Fluorophore
(Coupling, < 1nm)



Color latex
(Adsorption or Coupling,
100 – 200 nm)

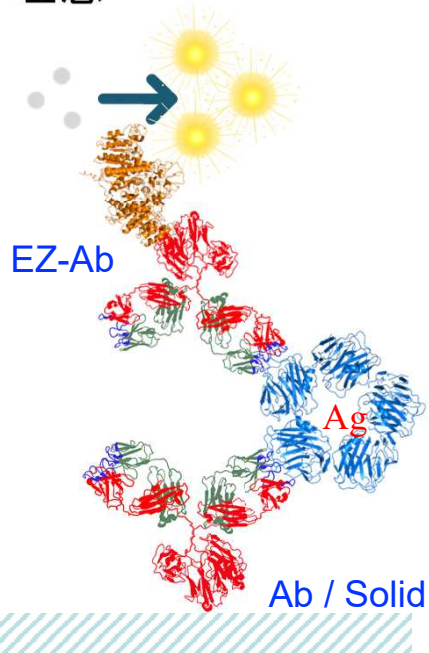
検査試薬の不均一性



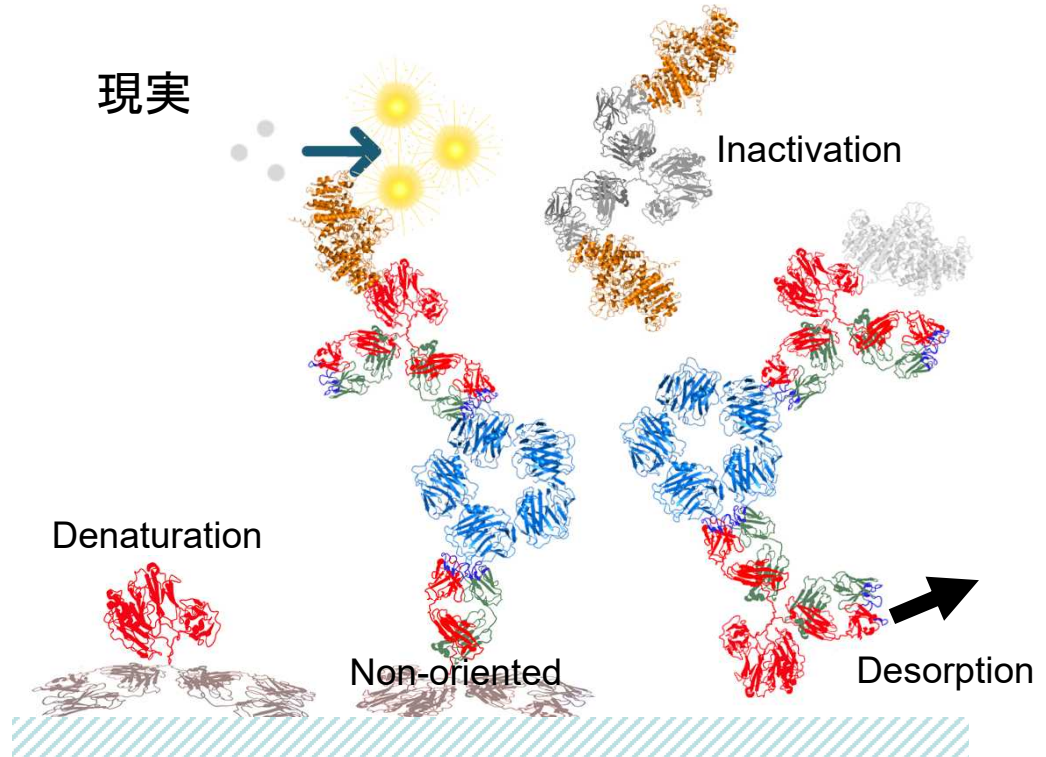
免疫検査試薬開発の課題

従来の免疫検査

理想

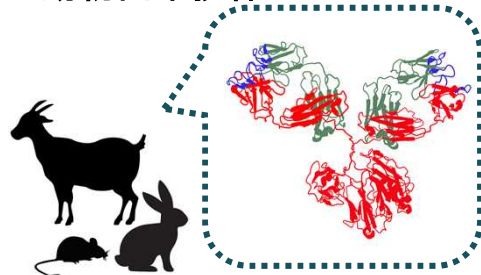


現実



新技術のまとめ

従来法
動物由来抗体



×

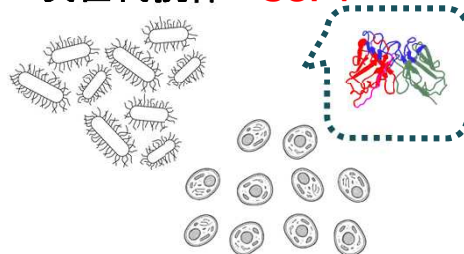
Ethical issue

Limited
sensitivity

Expensive

Unstable

我々の提案
次世代抗体 rscFv



○

Non ethical
issue

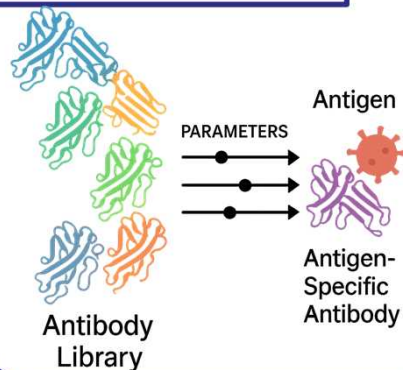
Ultimate
sensitivity

Inexpensive

Stable

次世代検査薬開発プラットフォーム

スクリーニング & 特性解析

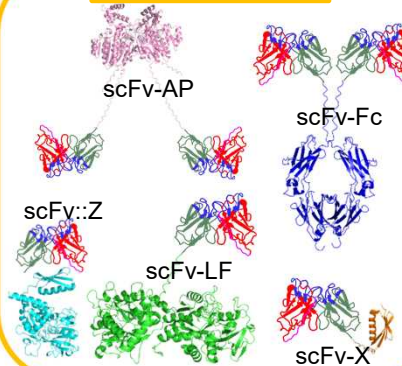


最適化

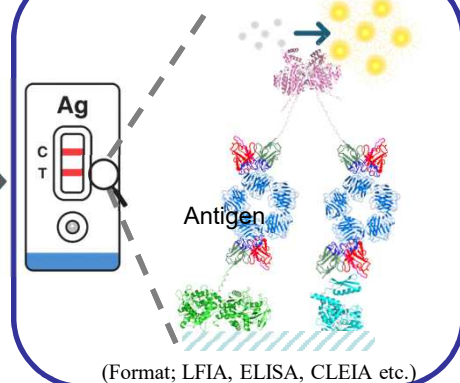
CDR-graft

FR-switch

分子改変 & 製造



検査系開発

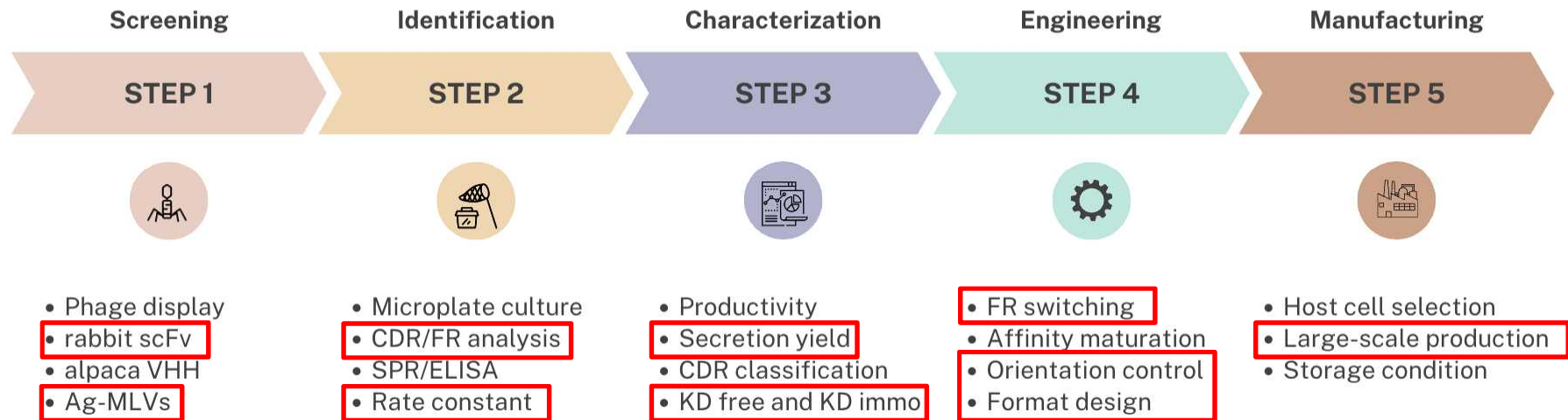


新技術の特徴・従来技術との比較

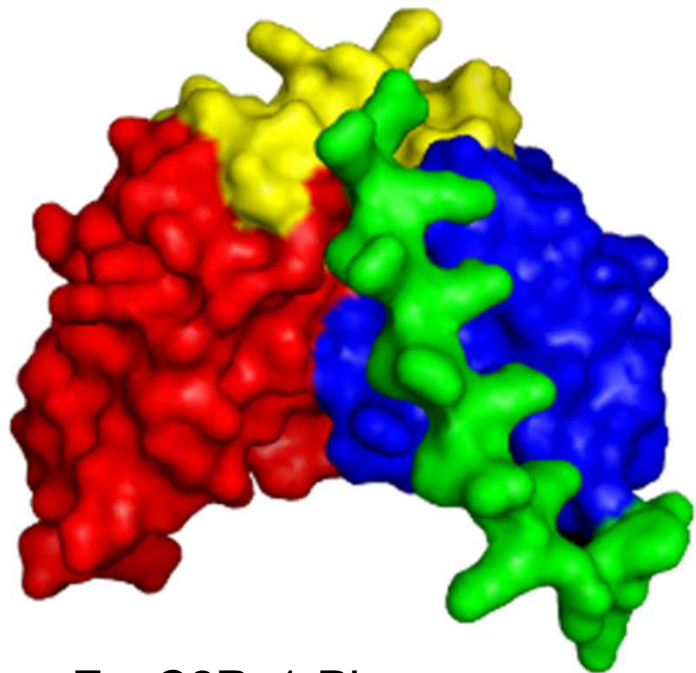
1. 動物倫理問題をクリア
2. 高品質なウサギ単鎖抗体を高効率に単離
3. 抗原特異性・物性を自在に変更・改変
4. 検査項目・系に応じた緻密な分子設計が可能
5. 従来よりも均一・均質な検査試薬を提供
5. 多様な検査系(LFIA, ELISA, CLEIA等)に応用可能。
6. 試薬製造コストを大幅に削減可能。(最大10%以下)
7. 検査フォーマットの統一が可能。
8. 技術の横展開が可能。

次世代型免疫検査試薬開発プラットフォーム

Next-generation immuno-diagnostic agent



当研究室で開発した「scFvビルディングブロック」



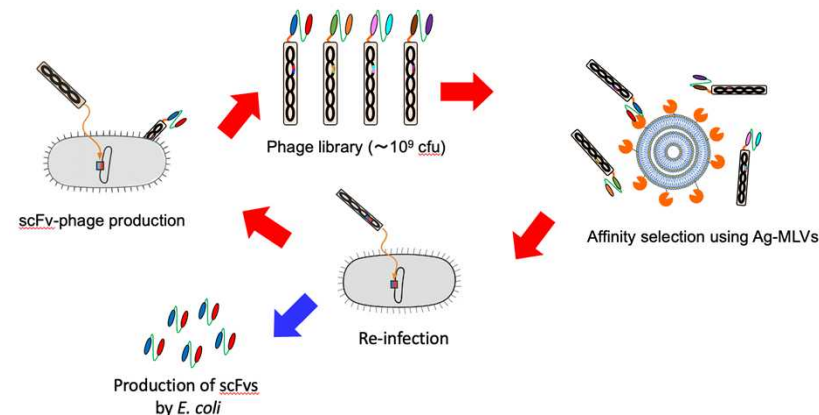
Ex: C2Rv1-PL

特徴

- ・高品質なウサギモノクロー抗体由来
- ・単一遺伝子で発現可能
- ・単一ポリペプチドで高度な分子認識能を保持
- ・安定な単量体を形成(original linker)
- ・リジンフリー
- ・アニマルフリー製造(Ex 大腸菌: 3g/L)
- ・Protein L結合性
- ・高い熱安定性($T_m > 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- ・抗原特異性を自在に変更可能
- ・融合タンパク質のビルディングブロックとして利用可能
(scFv, scFv-Fc, scFv-LF, scFv-AP, scFv-X...)

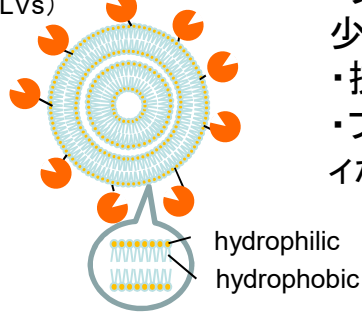
ウサギ単鎖抗体 (rscFv) の高効率スクリーニング法を確立

独自に開発したバイオパニング法



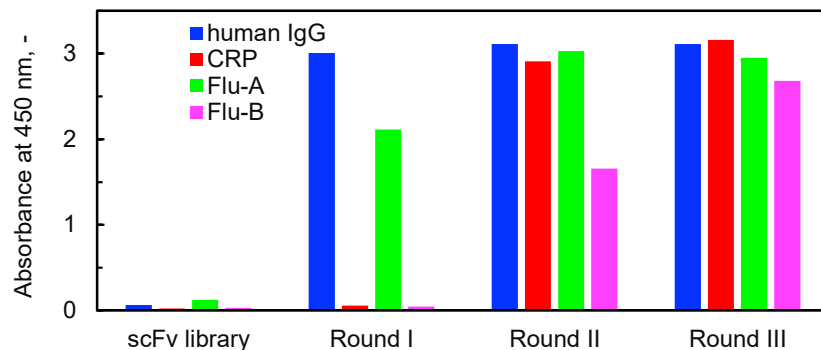
抗原結合多重膜リポソーム (Ag-MLVs)

Antigen-coupled MLVs
(Ag-MLVs)

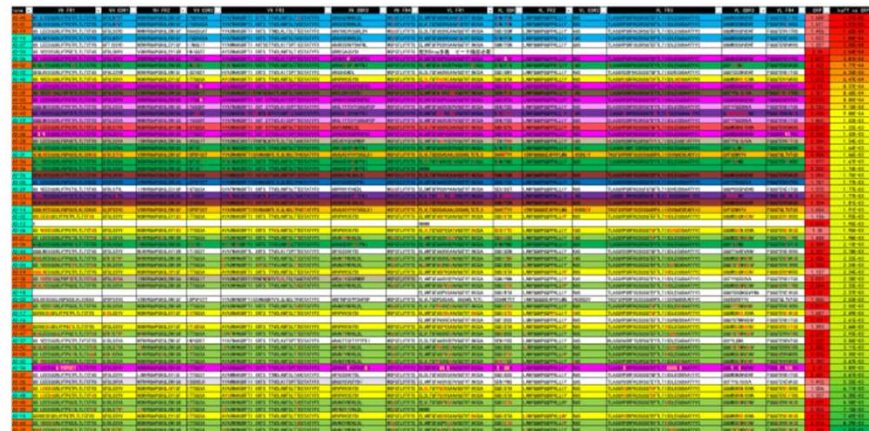


- ・ファージの非特異吸着が少ない。
- ・抗原を安定に提示可能。
- ・ファージのアクセシビリティが高い。

独自バイオパニングにより特異抗体を選択的に濃縮

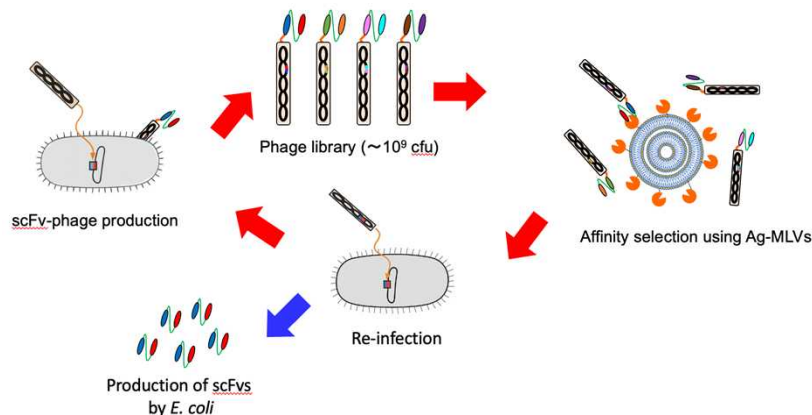


解離速度定数ランキングで候補rscFvを選別



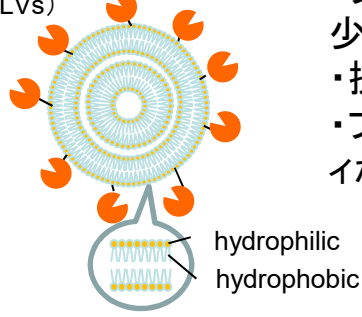
ウサギ単鎖抗体 (r_{sc}Fv) の高効率スクリーニング法を確立

独自に開発したバイオパニング法

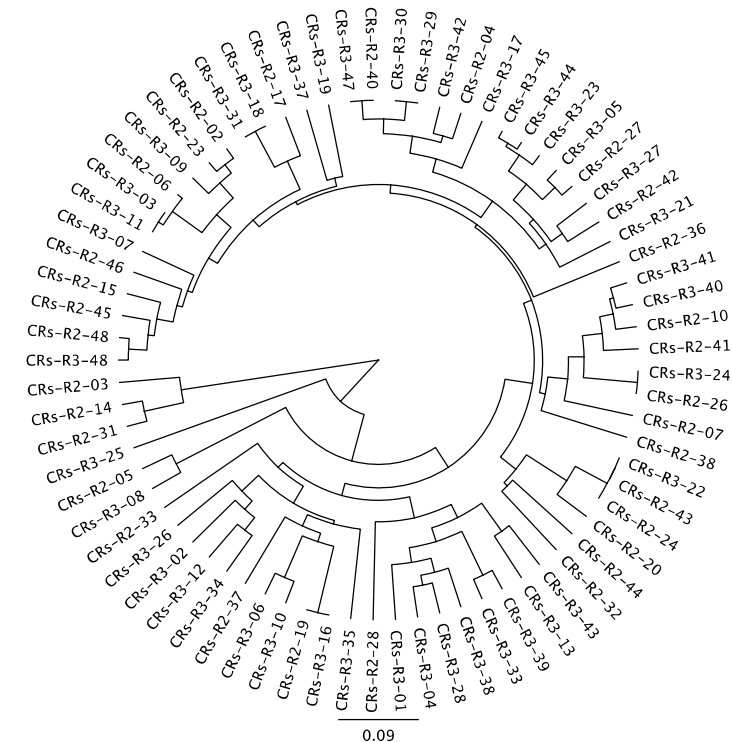


抗原結合多重膜リポソーム (Ag-MLVs)

Antigen-coupled MLVs
(Ag-MLVs)

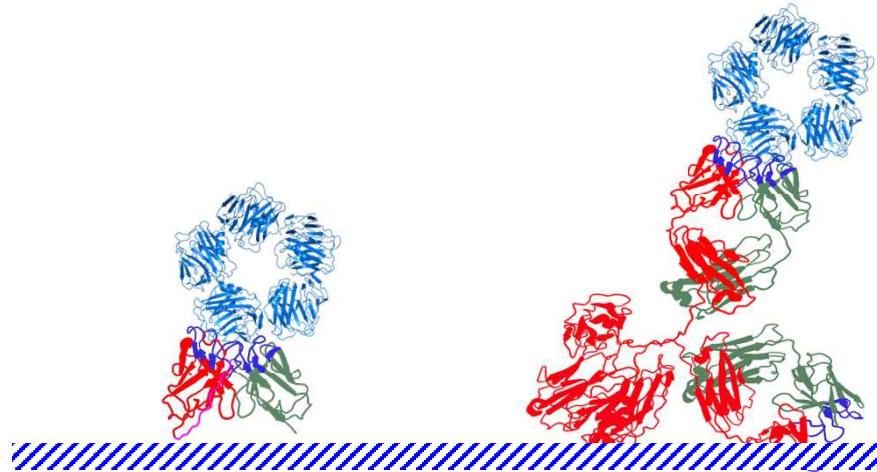
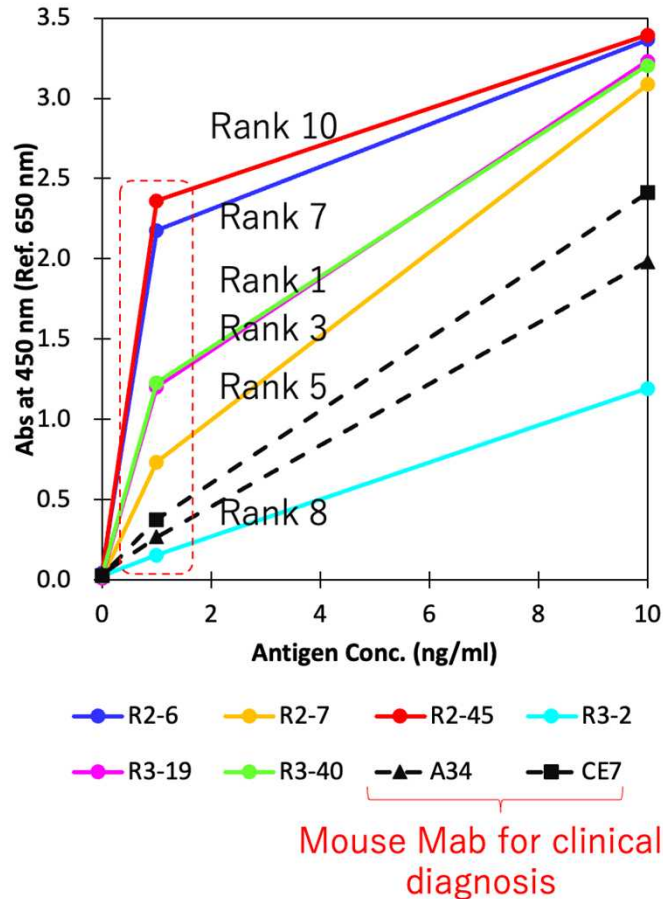


- ・ファージの非特異吸着が少ない。
- ・抗原を安定に提示可能。
- ・ファージのアクセシビリティが高い。



迅速に特異抗体のアミノ酸配列を取得可能

固相化に適した^rscFv候補を迅速に同定・取得可能

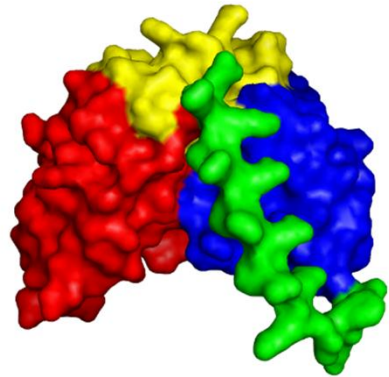


Sandwich ELISA / Maxisorp

CDR-grafting and FR-switching

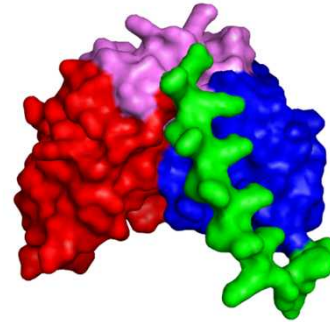
CDR-grafting

scFv A

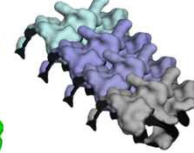


Ag recognition
Physicochemical property

異なるCDR
共通のFramework

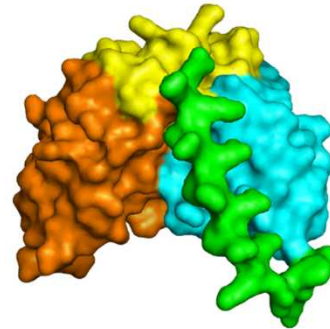


異なる抗原認識
類似の物理化学特性

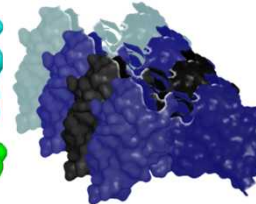


Frame-switching

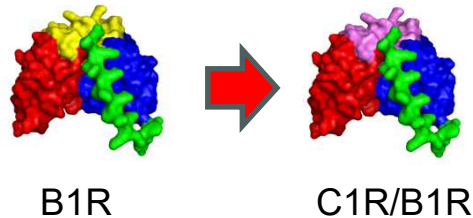
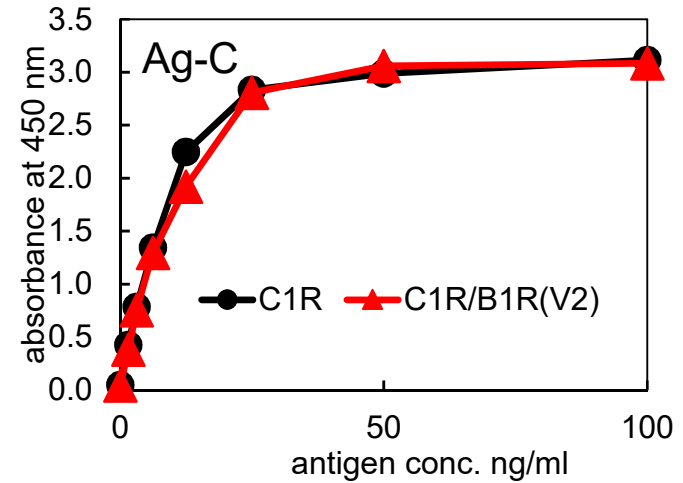
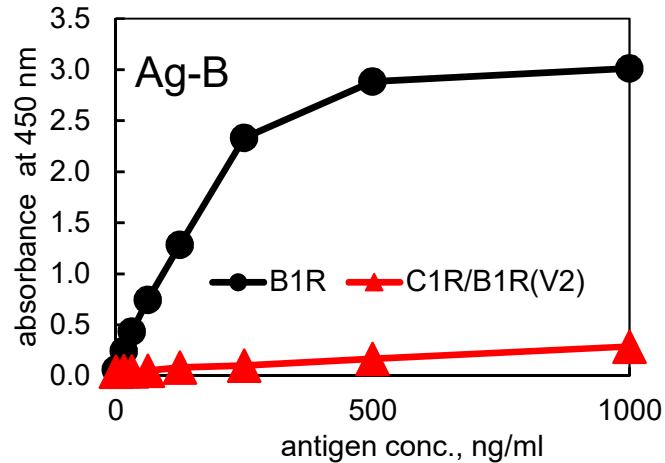
共通のCDRs
異なる Frameworks



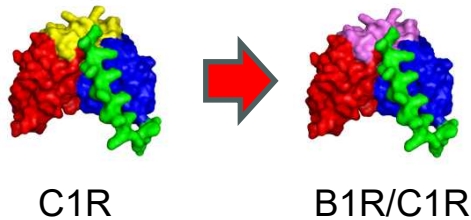
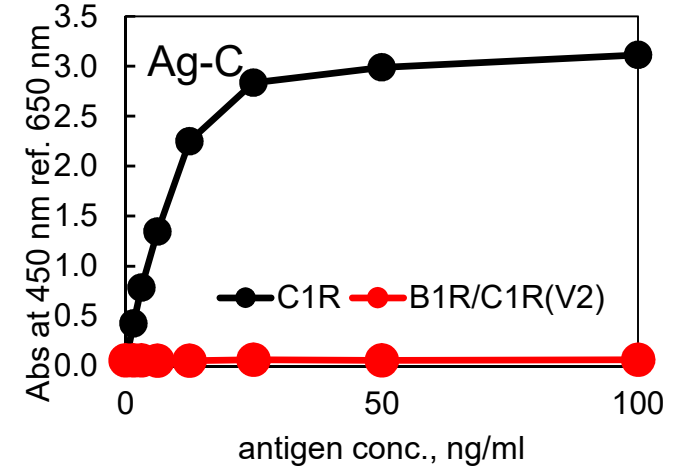
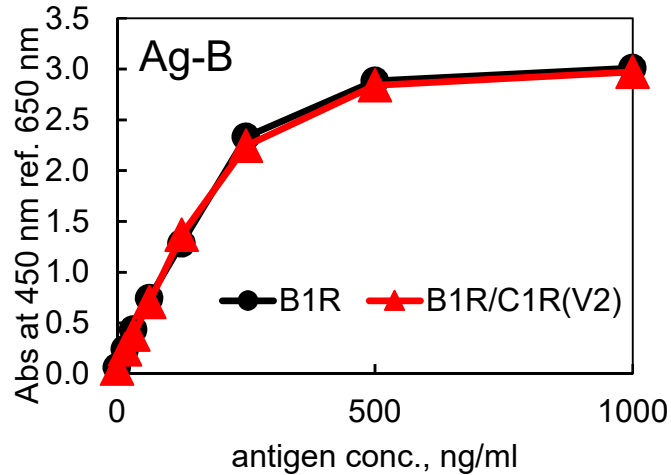
共通の抗原認識
異なる物理化学特性



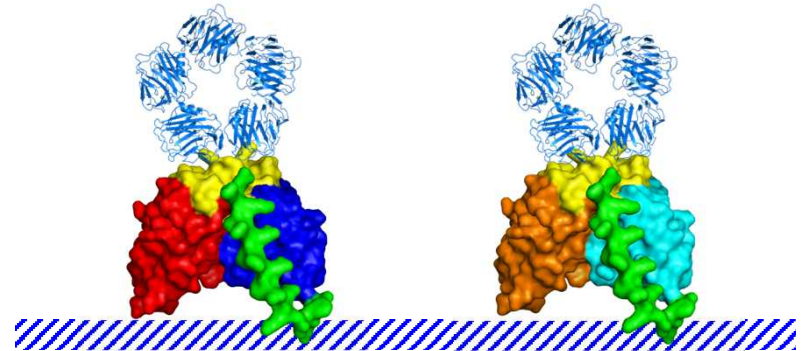
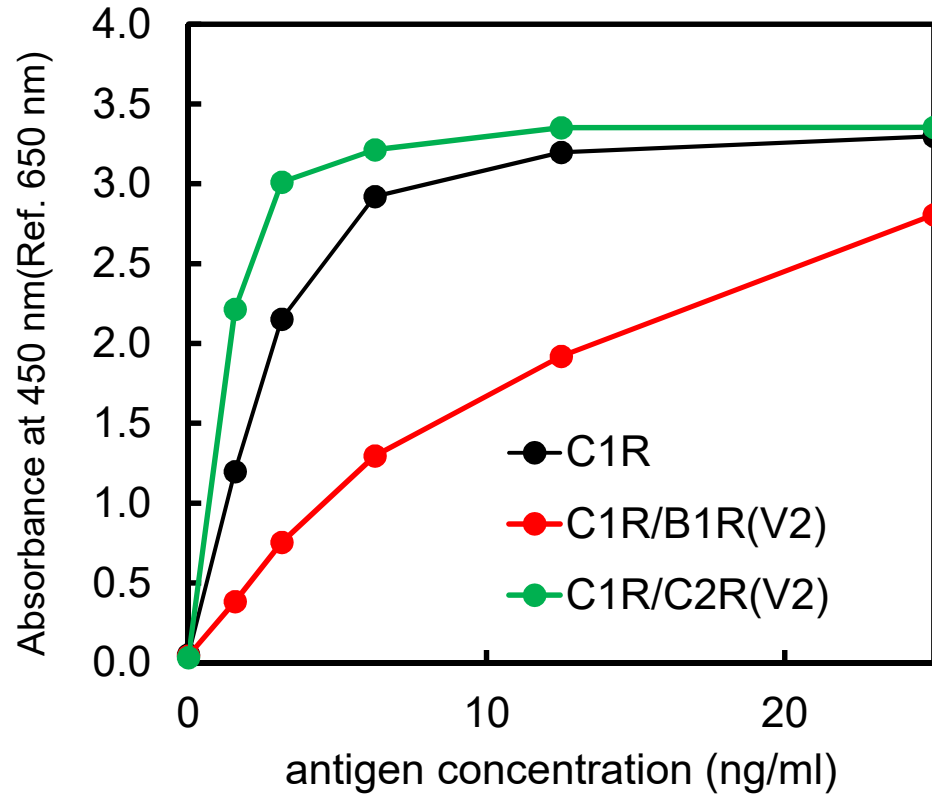
CDR-graftingによる抗原特異性の変換



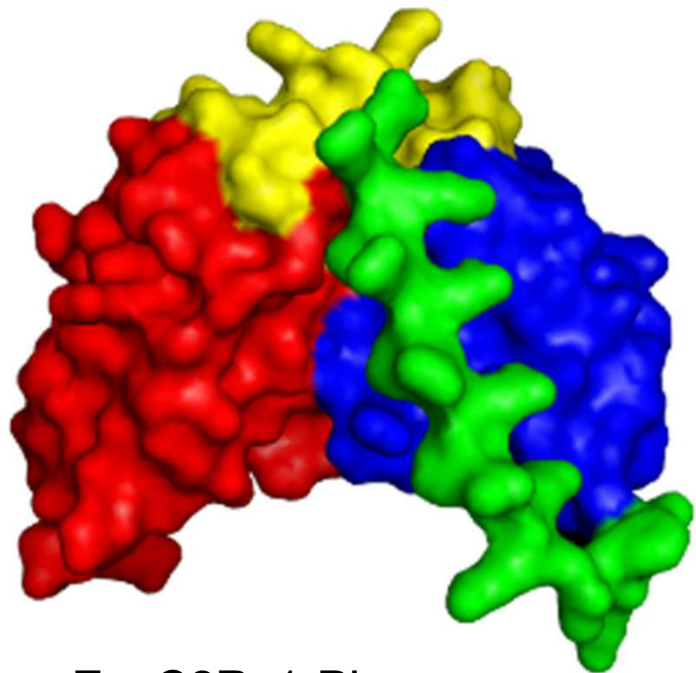
CDR-graftingによる抗原特異性の変換



Frame-switchingによる物理化学特性の変換



当研究室で開発した「scFvビルディングブロック」



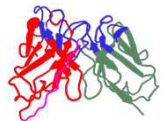
Ex: C2Rv1-PL

特徴

- ・高品質なウサギモノクロー抗体由来
- ・単一遺伝子で発現可能
- ・単一ポリペプチドで高度な分子認識能を保持
- ・安定な単量体を形成 (original linker)
- ・リジンフリー
- ・アニマルフリー製造 (Ex 大腸菌: 3g/L)
- ・Protein L結合性
- ・高い熱安定性 ($T_m > 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- ・抗原特異性を自在に変更可能
- ・融合タンパク質のビルディングブロックとして利用可能 (scFv, scFv-Fc, scFv-LF, scFv-AP, scFv-X...)

当研究室で開発中の次世代検査薬

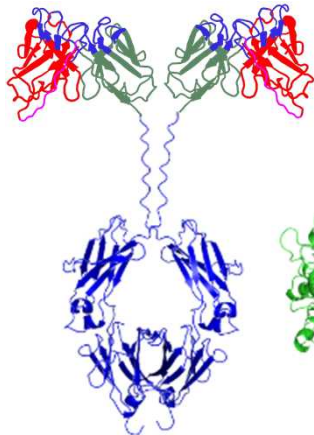
rscFv



> 3 g/L
(*E. coli*)

汎用
(ELISA)

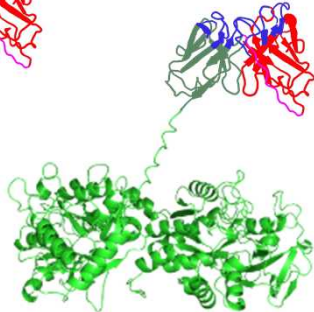
rscFv-Fc



160 mg/L
(CHO)

汎用
(全般)

rscFv-NBP



56 mg/L
(CHO)

吸着固定用
(NC膜)

rscFv-Ez



30 mg/L
(CHO)

抗原検出用
(LFIA, ELISA, CLEIA)

rscFv :: Z



> 3 g/L
(*E. coli*)

吸着固定用
(NC膜)

「scFvおよびその融合タンパク質は多様な宿主で製造可能

Bacteria

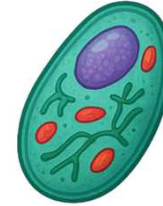
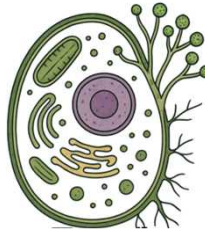
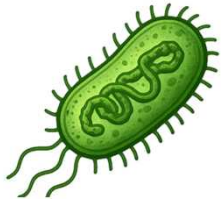
Yeast

Fungi

Plant cell

Insect cell

Mammalian cell



Growth

Fast

Slow

Productivity

High

Low

Complexity

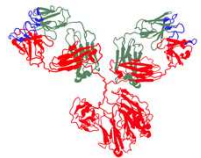
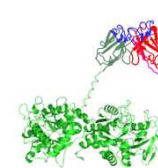
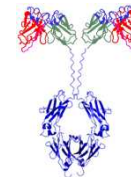
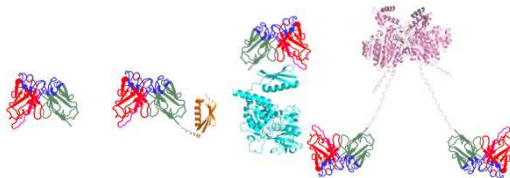
Simple

Complex

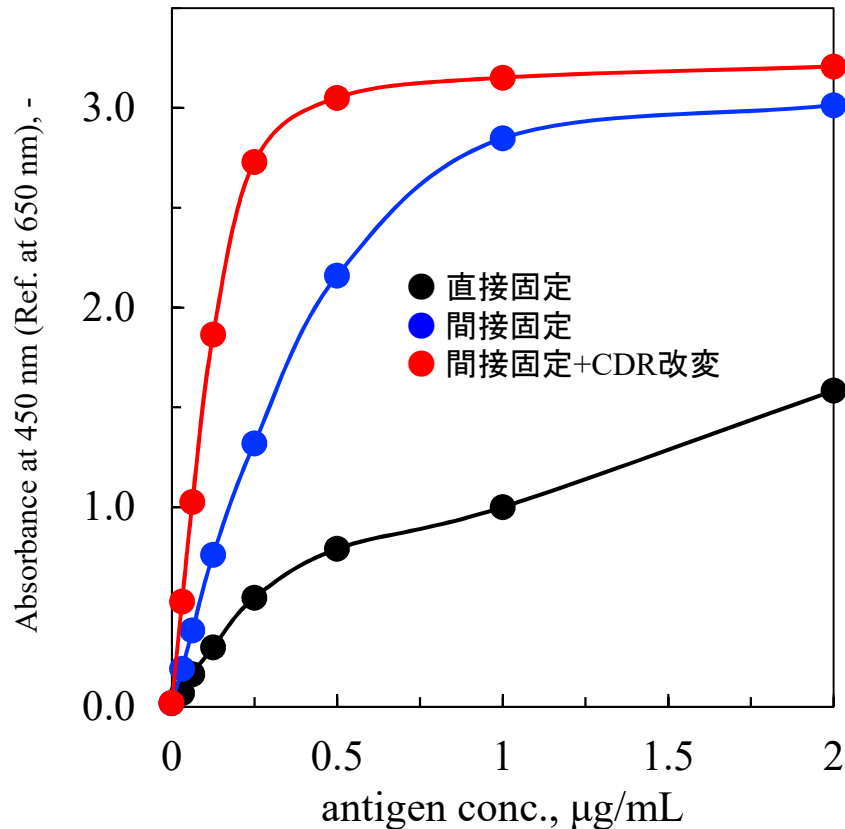
Cost

Low

High



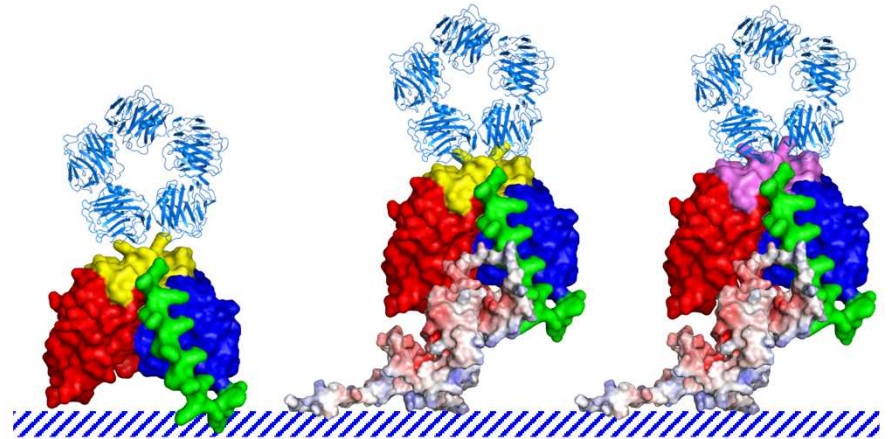
次世代検査薬^rscFvをリガンドとしたSandwich ELISA法



直接固定

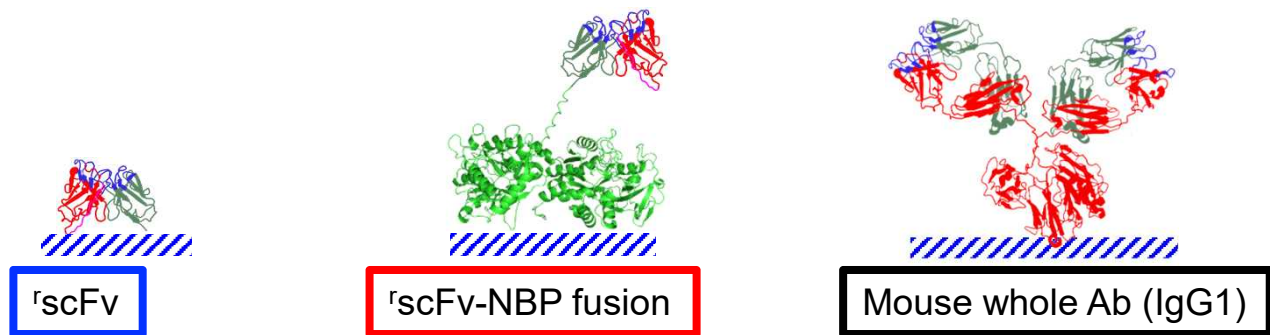
間接固定

間接固定
CDR改変

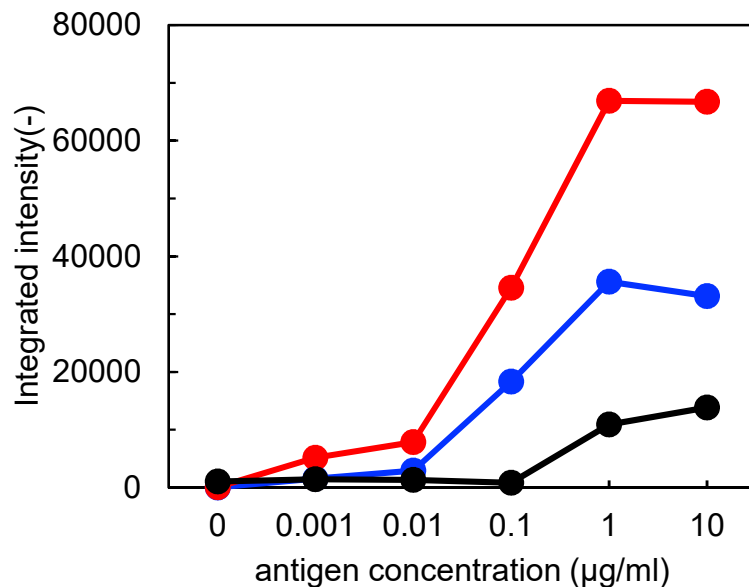


配向制御+分子改変でシグナル大幅アップ

NC膜への固定化に特化した「scFv融合タンパク質



Sample	Antigen concentration (ng/ml)				
	1000	100	10	1	0
Rabbit scFv					
Rabbit scFv-NBP fusion protein					
Whole antibody (mouse IgG1)					



イムノクロマトに適した可変部・定常部のカスタマイズが可能

scFv-Fc
Wild-type

L1

H1

F1

scFv-Fc
Mutant1

L2

H1

F1

scFv-Fc
Mutant2

L2

H2

F1

scFv-Fc
Mutant3

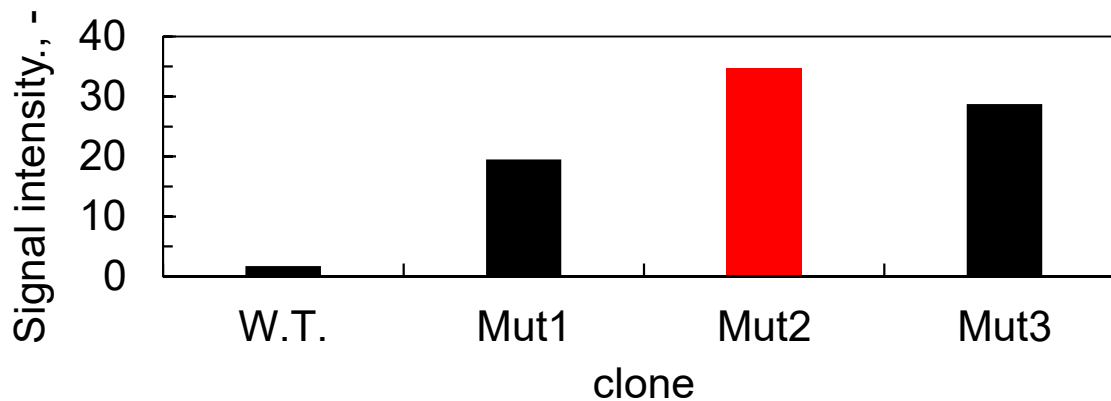
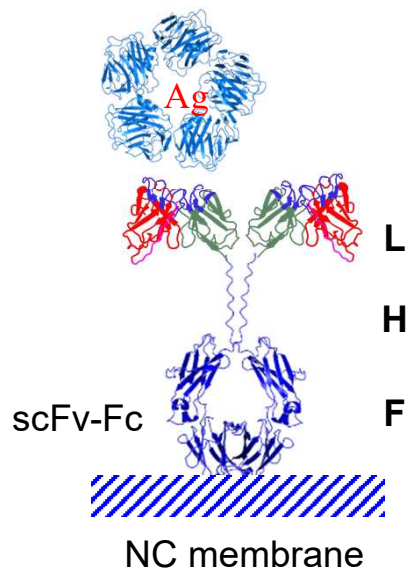
L2

H2

F2

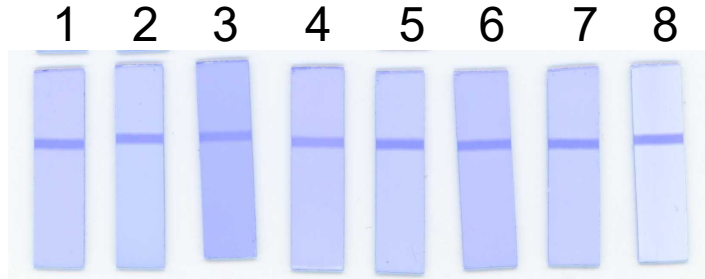


Ag: 10ng/ml

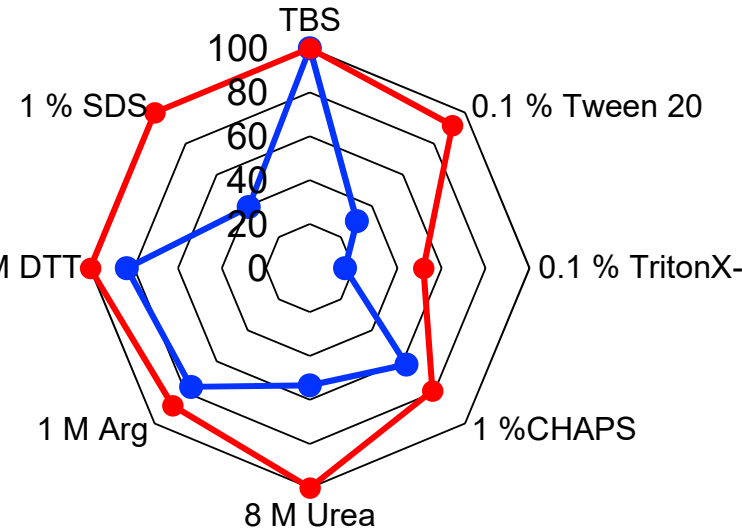
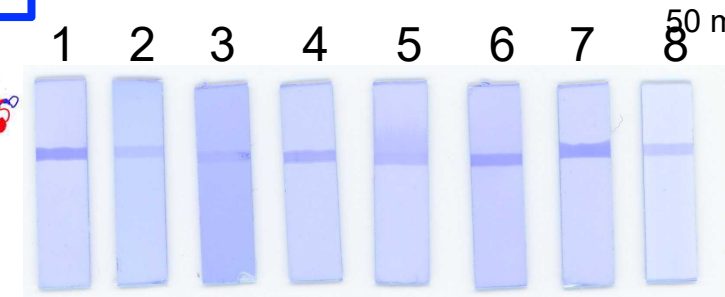
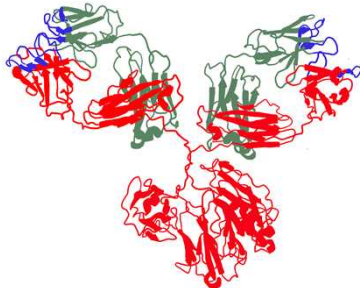


rscFvを間接固定可能なスキヤフォールド分子を開発

rscFv :: Z



Whole Ab

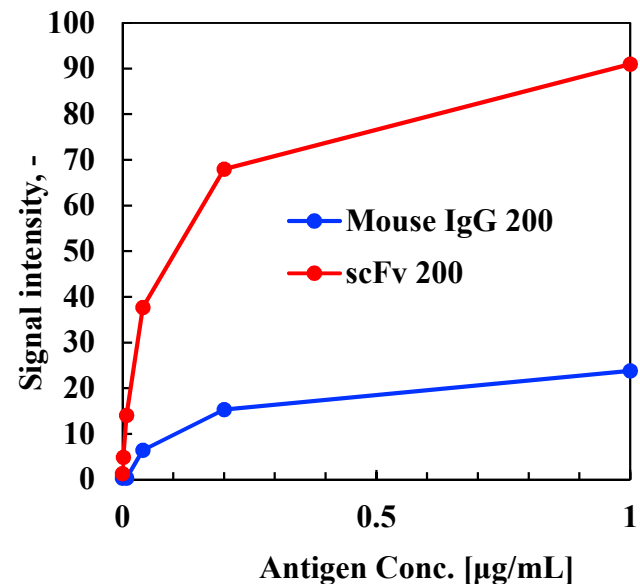
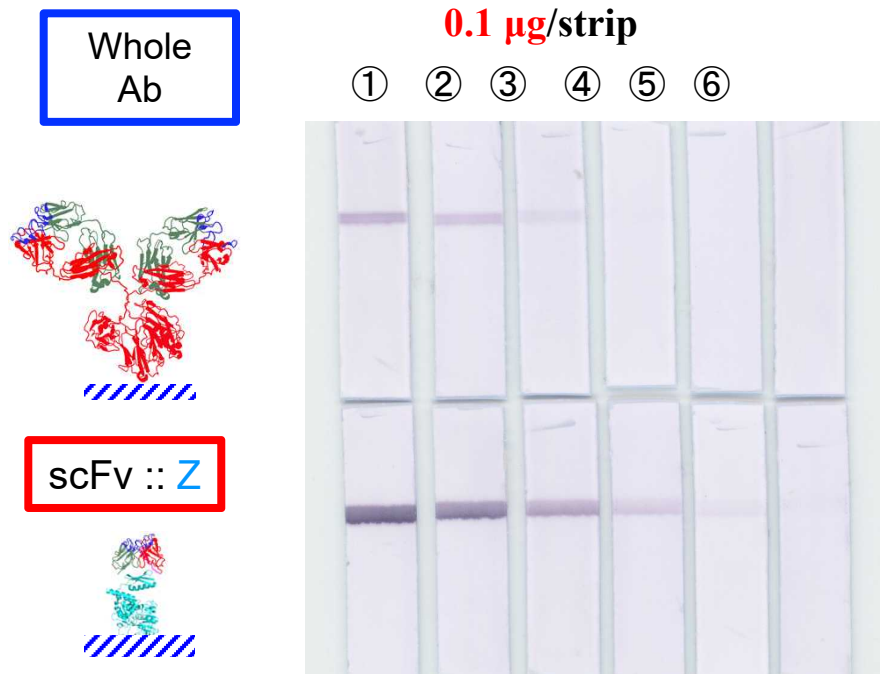


1 : Control (TBS), 2 : + 0.1% Tween 20, 3: +0.1% TritonX-100, 4: +1% CHAPS
5: + 8 M Urea, 6: 1M Arg, 7: 50mM DTT, 8: +1% SDS

Scaffold Z can retain on NC membrane in the presence of surfactants and chaotropic agents.

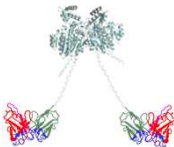
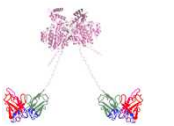
JP2024-127936
JP2025-018739

スキャフォールド分子の導入によって高感度化と低コスト化を同時に達成



①:1000 ②:200 ③:40 ④:8 ⑤:1.6 ⑥: 0 ng/mL

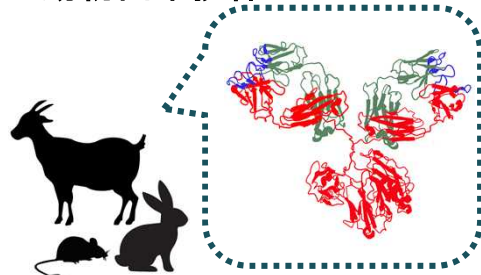
高活性・高品質な酵素融合rscFv(rscFv-Ez)の創生に成功

	antigen concentration (ng/ml)						
	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0
 scFv-EZ1 fusion							
 scFv-EZ2 fusion							
 scFv-CIAP conjugate							
 mAb-CIAP conjugate							

ELISA, CLEIA
にも応用可能

新技術のまとめ

従来法
動物由来抗体



×

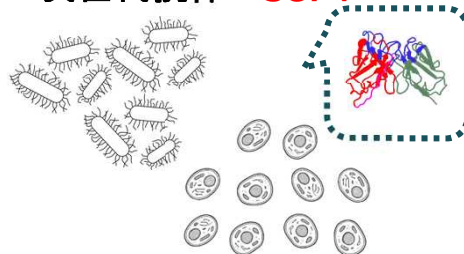
Ethical issue

Limited
sensitivity

Expensive

Unstable

我々の提案
次世代抗体 **rscFv**



○

Non ethical
issue

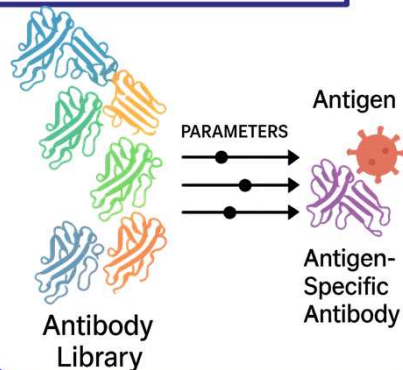
Ultimate
sensitivity

Inexpensive

Stable

次世代検査薬開発プラットフォーム

スクリーニング & 特性解析

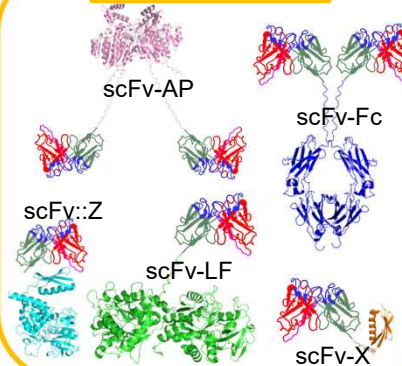


最適化

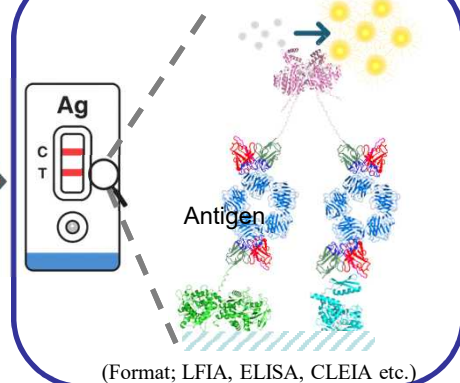
CDR-graft

FR-switch

分子改変 & 製造



検査系開発



新技術の特徴・従来技術との比較

- 抗体のスクリーニング・特性解析・分子改変・製造までを網羅した次世代検査薬開発プラットフォームを開発
- 検査薬のスケールに応じたアニマルフリー製造が可能。
- 検査に適した抗体の分子改変・最適化が可能となった。
- 製造コストの削減と高感度化を同時に実現可能。
- 足場分子と抗体を分離することで検査フォーマットを統一。
- ELISA, CLEIAなど他の検査技術への横展開が可能に。

想定される用途

- ヒトを対象としたPOCT（イムノクロマト、他）
- ペット・家畜など、動物を対象とした簡易検査
- 食物アレルギー検査
- 環境モニタリング
- バイオセンサー
- 固定化触媒、アフィニティ分離剤
- その他、界面の高度な分子認識必要な新規マテリアル

企業への期待

- 幅広い企業様との共同研究・技術連携・ライセンスを希望。
- 特に以下のご感心のある企業様は大歓迎です。
 1. 組換え抗体を試してみたい企業様。
 2. 多彩なタンパク質発現系を保有している企業様。
 3. 特殊な材料基板、センサ等をお持ちの企業様。
 4. 臨床検査、ペット・家畜検査、食品検査、環境測定分野
への新規参入計画中の企業様

企業への貢献、PRポイント

- ・ 業界の課題であった動物倫理問題に対応。
- ・ 検査試薬コストを大幅に削減しつつ、大幅な高感度化が可能。
- ・ 検査対象が変わっても技術の横展開が可能。
- ・ 検査系や利用材料に応じた緻密な分子設計が可能。
- ・ 既存技術の部分的な置換えから本格導入まで幅広く対応。
- ・ 本格導入にあたっての技術指導や知財ライセンスも可能。
- ・ 多様な企業に幅広く技術提供し、ワンヘルスの発展に貢献したい。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：
ラクトフェリン、コンカナバリンA、リゾチーム
及び／またはヘモグロビンを介して抗体等が固定
されたニトロセルロース膜の製造方法及び抗原結
合性等の増強方法
- 出願番号：特願2022-018219
- 出願人：京都工芸繊維大学
- 発明者：熊田 陽一、向井 良介
- 発明の名称：
ラクトフェリンCロープ融合プロテインL
シングルドメイン及びその利用
- 出願番号：特願2025-018739
- 出願人：京都工芸繊維大学
- 発明者：熊田 陽一、山本 陽大

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：

プロテインL結合性ポリペプチド及びその利用

- 出願番号：特願2024-127936

- 出願人：京都工芸繊維大学

- 発明者：熊田 陽一、谷口 遥華、

二田 諒、横山 楓季、

伊藤 匠吾

- 発明の名称：

プロテインLシングルドメイン融合抗体

- 出願番号：特願2024-127938

- 出願人：京都工芸繊維大学

- 発明者：熊田 陽一、谷口 遥華、

二田 諒、横山 楓季、

伊藤 匠吾

産学連携の経歴

- 2022年 JST A-stepトライアウト（発掘型）に採択
- 2023年 JST 大学発新産業創出基金事業 可能性検証（起業挑戦）に採択
- 2025年 JST KSAC GAPファンド事業(PSF)に採択

検査薬・食品・化学・材料メーカーを中心に複数社へのコンサルティング、
共同研究を実施中

お問い合わせ先

京都工芸繊維大学

産学公連携推進センター 知的財産戦略室
(研究推進・産学連携課 知的財産係)

Tel 075-724-7039

Mail chizai@kit.ac.jp

Web <https://www.liaison.kit.ac.jp/>