

病原性変異蛋白質のウルトラハイスループット検査法の確立

研究成果活用プラザ北海道における育成研究 平成14年度採択課題
「病原性変異蛋白質のウルトラハイスループット検査法の確立 - BSEのスクリーニングを目指して - 」



代表研究者：北海道大学・電子科学研究所・超分子分光分野・教授 田村 守

本育成研究では、多検体の病態検出が可能な蛍光相関分光法（FCS）自動分析システムを構築することを目的としている。検出対象は、膨大なサンプル数が想定される牛海綿状脳症（BSE）に的を絞り、自動BSE検査装置とBSE検査キットの実用化を目指す。

■ 研究内容、研究成果

当研究プロジェクトでは、蛍光のゆらぎを利用する蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）を利用した病原性変異蛋白質の検出技術を確立する。FCSは単一分子レベルの検出感度を持つため試料の増幅を必要とせず（高感度）、数秒～数十秒/サンプルで結果を得ることができる（迅速）。また、すべての工程が液相であり、且つ、夾雑物の存在下でも測定できるため、煩雑な分離・洗浄行程を省略できる（簡便）。この簡便性のためFCSは自動化が容易であり、短時間に多量のサンプルを自動的にスクリーニングできるシステムの構築が可能である。当プロジェクトでは、病原体が変異蛋白質である牛海綿状脳症（BSE）に的を絞った、FCSによる多検体の処理が可能な自動化システムの構築を目的とし、BSE検査キットと自動BSE検査装置の実用化を目指す。この自動BSE検査装置には、検体を扱う技術者の二次感染の危険性を減少させ、技術者による測定間誤差を低減できるなどのメリットがある。そこで、本育成研究では、FCS自動分析システムの開発に必要な、1)装置の開発、2)検出系の確立、3)抗体その他プローブの作製、という3つの柱からなる目標を掲げて研究を行った。

1) 装置の開発

FCS、FCCS（蛍光相互相関分光法）による小型の検出装置の開発に成功し、装置を検出部に組み込んだFCS、FCCS自動分析装置の開発を行った。その成果は、2004年の地域先端テクノフェアで発表した。

2) 検出系の確立

検出系の確立には、「ELISAと同等レベルの感度を実現する」、「生前検査に向けたさらなる高感度化へ目処を付ける」という2つの重要な課題があった。プロジェクト発足以前の予想よりも抗プリオン蛋白質（PrP）抗体の力価が低かったため、FCSよりもさらに高感度検出系であるFCCSの導入、高い力価を有する抗体の選択、抗体標識化の最適化、抗原抗体反応条件の最適化等を行う必要が生じた。多くの労力を感度向上に費やしたが、最終的にELISAと同等感度を出すことに成功した（表1）。また、さらなる高感度化（10倍程度）達成の見通しを立てた。また、既存の構造認識抗体を標識化して正常型PrP存在下で異常型PrPを直接検出する「新規検出法」を検討し、抗体と蛍光測定系を用いた実験系においてその開発に成功した。これら高感度化と構造認識抗体の開発により、前処理なし生前検査への展望が開かれた。

表1 検出感度の比較

	r BoPrP (nM)	rBoPrP+脳乳剤 (nM)
cFCCS (本プロジェクト)	0.128 ± 0.03 (n=3)	0.128 ± 0.03 (n=3)
ELISA (現行検査法)	0.145 ± 0 (n=3)	0.145 ± 0 (n=3)

3) 抗体その他プローブの作製

高感度化検出系に使用する抗体を標識化方法の最適化、及び、構造認識システムの構築を目指した。蛍光物質を標識化する際の抗体の力価の低下を最小限に抑えることに成功し、FCS・FCCS測定系に用いることを可能にした。また、既存の構造認識抗体の標識化、新規検出法に用いる標識化正常型PrPの作製に成功した。これにより、正常および異常プリオン蛋白質の識別が可能となった。

■ 今後の展開、将来の展望

FCS・FCCS/BSE検査用キットの製品化

開発した標識化抗体を使用したFCS・FCCS/BSE検査キットは性能、価格、環境対応の面で優れているため製品化を検討している。

自動BSE検査装置

BSE用を含む、抗原抗体反応を用いた一般分析用装置として浜松ホトニクス(株)が製品化を検討している。海外からの引き合いも多いことから幅広い展開が期待される。また、検出ユニット単独での研究支援用FCCS装置として製品化を予定している。

新規蛍光物質の事業化について

当初想定していた範囲ではないが、本プロジェクト中に蛍光標識用の高輝度半導体ナノ粒子も開発し、今後の応用が期待される。

図1

多検体自動処理ユニット



図2

想定検査キットイメージ



図1は自動BSE測定装置の外観を示し、図2は想定されるFCS・FCCS用のBSE検査キットを示す。

■ 研究体制

代表研究者

北海道大学・電子科学研究所・超分子分光分野 教授 田村 守

◆ 研究者

藤井 文彦 (JST)、坂田 啓司 (JST)、荻野 倫子 (JST)、長尾 一生 (JST)、阿部 恵子 (JST)

◆ 共同研究機関

北海道大学・電子科学研究所、北海道大学大学院・薬学研究科、北海道大学大学院・獣医学研究科、北海道立衛生研究所、農業技術研究機構・動物衛生研究所
オリンパス株式会社、(株)ノバスジーン、浜松ホトニクス株式会社、(株)富士レビオ・帯広研究所、シグマジェノシスジャパン株式会社、北海道電子機器株式会社、株式会社イーエスイ

■ 研究期間

平成15年4月 ~ 平成17年9月