



2024年6月26日

大阪公立大学

科学技術振興機構（JST）

幅広い分野への応用が期待！

新型コロナウイルス由来のスパイクタンパク質を 低出力レーザー光濃縮で迅速かつ高感度に検出

<ポイント>

- ◇光濃縮技術により、微量で低濃度なサンプルでも約5分で正確なウイルス計測が可能。
- ◇従来の製造方法では15～18時間かかっていた抗体のコーティング（固相化）を1分に短縮。
- ◇抗原抗体反応の大幅な加速により、さまざまな感染症、がん、認知症などの早期診断に貢献。

<概要>

大阪公立大学 研究推進機構 協創研究センター LAC-SYS 研究所の飯田 琢也所長、床波 志保副所長、理学研究科の叶田 雅俊大学院生（博士後期課程2年）らの研究チームは、抗原抗体反応を検出原理とする検査手法であるイムノアッセイ※¹に、光濃縮技術を取り入れた「光誘導イムノアッセイ技術」を新たに開発しました。研究チームは、500nm という極小のお椀構造（ボウル状構造）を持つ光濃縮基板（ナノボウル基板）を作製。それを用いることで、抗体をわずか1分でコーティング（固相化）し、レーザーポインターと同程度の微弱レーザー照射により超高効率な光濃縮を行い、タンパク質の迅速・高感度検出を実現しました。適用例として、人工唾液中の擬似ウイルス（新型コロナウイルスのスパイクタンパク質で修飾されたナノ粒子）を約5分で選択的に検出できること、また、2回目のレーザー照射（図1（右））無しの場合に比べて10～20倍高感度な計測ができることを実証しました。本研究成果により、煩雑な抗体コーティングのプロセスを短縮し、迅速かつ高感度なタンパク質検出を可能にしました。これにより、さまざまな感染症、がん、認知症などの早期診断に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2024年6月26日（水）（日本時間）に、Springer Nature 社が発行する国際学術誌「npj Biosensing」の創刊号にオンライン掲載される予定です。

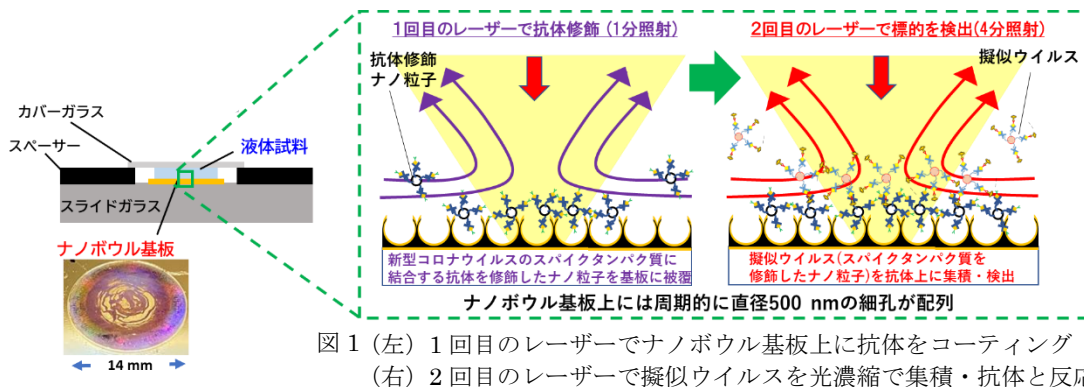


図1（左）1回目のレーザーでナノボウル基板上に抗体をコーティング
（右）2回目のレーザーで擬似ウイルスを光濃縮で集積・抗体と反応

2020年に新型コロナウイルス感染症パンデミックが起こったとき、1日でも早く迅速で高感度な検査法を確立して人類を救いたいと思いました。本技術を普及させ、感染症だけでなく、がんや認知症などさまざまな病気の早期発見に貢献したいと思っています。



叶田大学院生



床波副所長



飯田所長

<研究の背景>

抗原抗体反応は、ヒトや動物の免疫系に不可欠な生物学的化学反応であり、ウイルスやさまざまな疾患の検査に用いられています。新型コロナウイルスやノロウイルスなど、ウイルス由来の感染症に対する迅速かつ高感度な検査法を確立することは、公衆衛生にとって極めて重要ですが、ウイルスは直径約 100nm の微細なナノ粒子であることが検出の妨げとなっています。

例えば、新型コロナウイルス感染症発症者の 30 分間の咳中の呼気から採取した唾液飛沫中のウイルス濃度は、約 1.52×10^{11} コピー/mL^{*2} との報告もあり、従来の技術では発熱などの症状が出てこのような高濃度になってからでないとウイルスを検出できず、発症前の感染者が無自覚に他者と接触して爆発的に感染者が増加しました。ウイルスの RNA やスパイクタンパク質をターゲットとしたさまざまな検出法が開発されています。しかしながら、ウイルスや RNA に着目した従来のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による核酸検出法は、十分な検出シグナルを得るために数時間以上かかります。また、スパイクタンパク質との抗原抗体反応を利用した酵素結合免疫吸着法 (ELISA)^{*3} による検査では、細胞培養用のプレートへの抗体の修飾に 15~18 時間要し、測定自体も抗体とタンパク質の結合 (1 時間) と洗浄 (1 時間) を複数回行うため、合計で 5~6 時間かかります。同様に抗原抗体反応を用いるイムノクロマト法^{*4}を用いた市販の検査キットは、測定結果は数分で出ますが、感度が低いため、体内でウイルス数が十分に増加する前に検査すると、偽陽性や偽陰性の結果が出る可能性があります。これらの現状を打開するためには、超高感度な診断測定系を速やかに構築することが喫緊の課題でした。

<研究の内容>

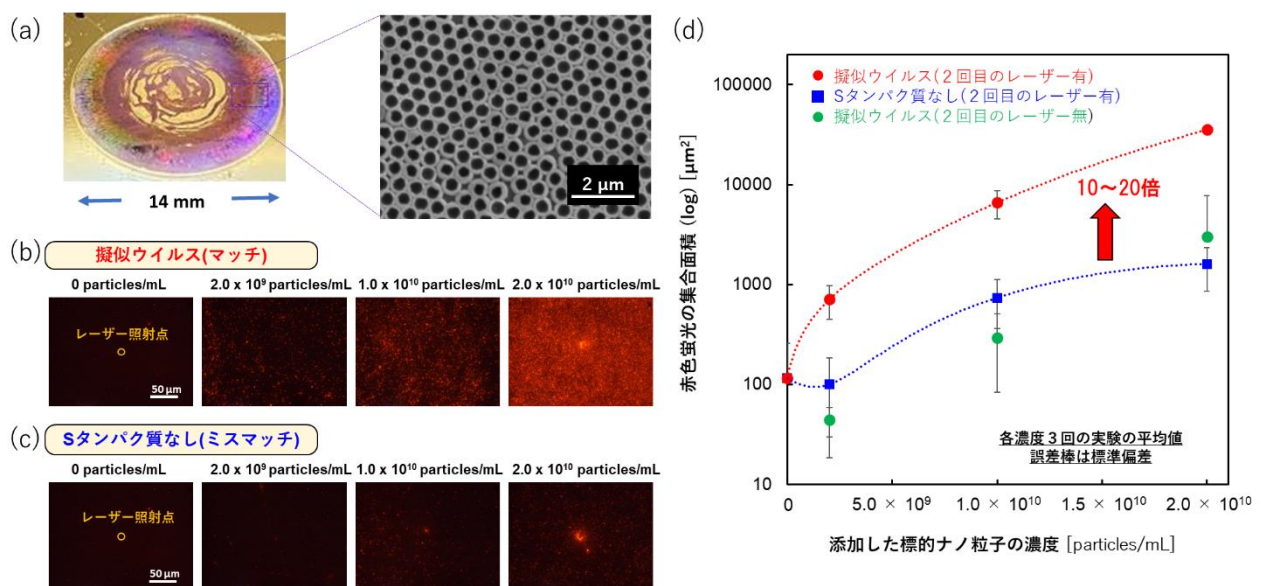


図 2 (a) 作製したナノボウル基板の写真と電子顕微鏡像。(b)、(c) 擬似ウイルスとスパイクタンパク質修飾なしのナノ粒子の濃度をそれぞれ変化させて光濃縮後の蛍光イメージを観察。(d) 赤色の蛍光面積の濃度依存性。

本研究では、500nm の微細なボウル状構造を持つ光濃縮基板 (ナノボウル基板 (NPI-PS)) を作製しました (図 2 (a))。直径 1.4cm の円筒形プラスチック壁で囲まれたガラス基板からなるガラスボトムディッシュ (GBD) を容器として用い、周期的なボウル型構造を光発熱変換効率や光応答の増強のために作製しました。スパッタリング装置を用いて、GBD 上に金薄膜 (厚さ: 50nm) を被覆し、その上に鋳型となる平均直径 500nm のポリスチレン製のナノ粒子を含んだ液体を全面に広げ、その後、この液体を乾燥させると、ナノ粒子が自己組織化^{*5}により周期的に配列し、金薄膜全体を覆います。そして、導電性ポリマーを電解重合して粒子間の隙間を埋めて型取りし、有機溶剤を用いて粒子だけを溶解すると、直径約 500nm のボウル状の構造が得られます。

本研究において開発した光誘導イムノアッセイ技術の具体的な適用例として、まず、NPI-PS上に新型コロナウイルス由来のスパイクタンパク質に選択的に結合する抗体を修飾した直径100nmのナノ粒子（以下、抗体修飾ナノ粒子）の分散液5 μ Lを滴下し、わずか3mWのレーザーを1分間照射することで広範囲に捕捉サイトを形成するようにこの抗体修飾ナノ粒子をコーティングしました。そして、スパイクタンパク質を被覆した赤色の蛍光ナノ粒子（擬似ウイルス）の分散液5 μ Lを滴下し、同出力のレーザーを4分間照射して基板上に光濃縮した後、10秒間洗浄し、蛍光イメージングで面積測定して定量評価するという「2ステップ法」を考案しました（図1）。2回目のレーザー照射なしの場合や、スパイクタンパク質を修飾していないミスマッチのナノ粒子の場合には抗原抗体反応が起こらないため、洗浄するとナノ粒子はほとんど残らず、擬似ウイルスを光濃縮で抗体の上に集積したマッチの場合のみ赤色の蛍光を示す領域の面積が擬似ウイルス濃度に対して正の相関を持つことが明らかになりました（図2(b)-(d)）。このような選択的な検出は、ほぼ原液の唾液に近い夾雑（きょうざつ）物を多く含む人工唾液中でも可能であることも論文の中で報告しています。また、抗原抗体反応が光誘起対流によって加速され（光誘導加速^{*6}）、延べ約5分でレーザー照射なしの場合の10~20倍の高感度なアッセイが可能であることが分かりました。さらに、論文本編で紹介しているバブル収縮法を用いれば、上述の新型コロナウイルス感染者の飛沫中のウイルス数濃度よりも3桁低い濃度の、10⁶個/mLのナノ粒子を数分以内に定量分析できる可能もあります。

<期待される効果・今後の展開>

本研究において、コインサイズのナノボウル基板を用い、光濃縮により観察部位に抗体修飾ナノ粒子を集積させ、人工唾液中でも新型コロナウイルスのスパイクタンパク質を表面に有する擬似ウイルスを高感度かつ短時間で選択的に検出できる可能性を明らかにしました。この発見は、新型コロナウイルスだけでなく、さまざまな感染症や、がん、認知症の早期診断につながるマーカータンパク質の簡便かつハイスループットな検査に新しい選択肢を提供するものです。現在、ナノボウル基板を実装可能な汎用型の光濃縮システムなどソフト・ハード双方の研究開発を進めており、医療機関での実証を経て社会実装を目指しています。また、コンパクトなシステムで迅速かつ低出力のレーザーを用い、さまざまな疾病の関連物質を高感度に計測できるため、医療分野にブレークスルーをもたらすだけでなく、食品中のウイルスや、河川や海洋中の有害ナノ物質の検出など環境計測への水平展開も期待できます。このように、幅広い分野で人類の安全・安心やSDGsの多くの課題への貢献を目指して発展研究を推進していきます。

<資金情報>

本研究は JST 未来社会創造事業「低侵襲ハイスループット光濃縮システムの開発（JPMJMI21G1）」（研究開発代表者：飯田琢也）、JST 創発的研究支援事業「バイオミメティック電極による外場誘導型エコシステムの創成（JPMJFR201O）」（研究代表者：床波志保）、AMED ウイルス等感染症対策技術開発事業「光濃縮による1ステップ超高感度ウイルス感染症検査システムの開発（No.JP20he0622017）」（研究代表者：飯田琢也）、科研費基盤研究（A）（21H04964）（研究代表者：飯田琢也）、科研費特別研究員奨励費「非周期光濃縮基板のボトムアップ的作製法と超高感度バイオ分析技術の開発（No. JP23KJ1851）」（研究代表者：叶田雅俊）、大阪府立大学 キーププロジェクト（「LAC-SYS プロジェクト 一次世代バイオフォトンクスが拓く未来―」）などの支援の下で実施されました。

<用語解説>

※1 イムノアッセイ：タンパク質などの抗原と抗体の選択的な反応（抗原抗体反応）を利用して体液（血液、尿、唾液、汗、涙など）の中に含まれる物質の濃度を測定する生化学的な測定法。

- ※2 コピー/mL : PCR で測定した RNA や DNA などの核酸のコピー数の濃度単位として「コピー/mL (copies/mL)」を用いることが多い。原理的には1コピーが1ウイルス粒子に対応すると考えられるが、空のウイルス粒子や、過剰なウイルス由来の遊離 RNA も存在するため、感染性を持つウイルス量 (ウイルス力価) とは1対1に対応せず、100~1000 コピーに感染性のあるウイルス数は1個程度という報告もある。
- ※3 酵素結合免疫吸着法 (ELISA) : Enzyme-linked immunosorbent assay の略称。抗体を修飾したプレート上に検出対象物質と酵素標識した抗体を含む液体試料を滴下後、静置と洗浄を繰り返し、選択的に抗体に結合した検出対象物質を光吸収により測定する。計測に 5~6 時間必要。
- ※4 イムノクロマト法 : 抗原を含む液体試料を滴下すると、移動相の上流に予め用意された金ナノ粒子などで標識された抗体と抗原が選択的に結合して複合体を形成し、毛管現象で移動する。抗原が多く含まれる場合はテストラインに修飾されたキャプチャー抗体と結合し金ナノ粒子が凝集して目視で見える程度に発色して検出が可能となる。一方、抗原が含まれない場合はさらに下流にあるコントロールラインまで金ナノ粒子標識抗体が到達して発色する。
- ※5 自己組織化 : 物質や生物個体などが自発的に秩序構造を形成する現象を指す。たとえば、液中に分散していた粒子が蒸発などの非平衡な過程を通じて、秩序を持つ大きな集合構造を形成する現象が挙げられる。
- ※6 光誘導加速 : 大面積に光の力や光誘起対流を発生させて生体分子間の衝突確率を飛躍的に高めて分子認識を高効率に引き起こすこと。

<掲載誌情報>

【発表雑誌】 npj Biosensing

【論文名】 High-throughput Light-induced Immunoassay with Milliwatt-level Laser under One-minute Optical Antibody-coating on Nanoparticle-imprinted Substrate

【著者】 Masatoshi Kanoda, Kota Hayashi, Yumiko Takagi, Mamoru Tamura, Shiho Tokonami, and Takuya Iida

【掲載 URL】 <https://doi.org/10.1038/s44328-024-00004-z>

【研究内容に関する問い合わせ先】

大阪公立大学

大学院理学研究科/LAC-SYS 研究所

教授/所長 : 飯田 琢也 (いいだ たくや)

TEL : 072-254-8132

E-mail : t-iida@omu.ac.jp

大学院工学研究科/LAC-SYS 研究所

准教授/副所長 : 床波 志保 (とこなみ しほ)

E-mail : tokonami@omu.ac.jp

【報道に関する問い合わせ先】

大阪公立大学 広報課

担当 : 谷

TEL : 06-6605-3411

E-mail : [koho-list\[at\]ml.omu.ac.jp](mailto:koho-list[at]ml.omu.ac.jp)

科学技術振興機構 広報課

TEL : 03-5214-8404

E-mail : [jstkoho\[at\]jst.go.jp](mailto:jstkoho[at]jst.go.jp)

【JST 事業に関すること】

科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部

幸本 和明 (こうもと かずあき)

TEL : 03-6272-4004

E-mail : [kaikaku_mirai\[at\]jst.go.jp](mailto:kaikaku_mirai[at]jst.go.jp)