

用途に合わせてテーラーメイドで迅速に標的細菌を検出

人工抗体の形成による特異結合型マイクロウェルプレートの開発

大阪府立大学（学長：辻 洋）の大学院工学研究科 椎木 弘准教授、長岡 勉教授と府大発ベンチャー企業のグリーンケム株式会社（代表取締役：山本陽 二郎）（※）らの研究グループは分子インプリンティング技術を利用して標的細胞（抗原）に特異結合する人工抗体を形成したマイクロウェルプレート（解説1）を開発し、細菌のハイスループット検出（解説2）に成功しました。

■本開発のポイント■

標的細胞に高選択的な人工抗体を搭載したマイクロウェルプレートを開発し、抗原のハイスループット検出に成功

■本開発の特徴と効果■

- ・免疫によらず迅速に抗体が作製可能
- ・標的に応じてテーラーメイドで対応可能
- ・標的細胞と人工抗体が自発的に結合
- ・高選択的な検出（選択性 10 倍以上）
- ・多検体を一括検出
- ・検体に含まれる種々の細菌を一括特定
- ・試料採取からの検出時間を大幅短縮（30 分以内）

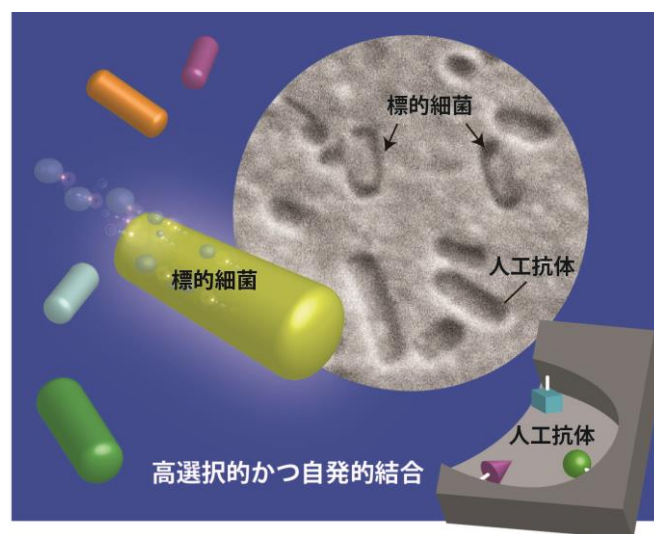


図 人工抗体による標的細菌の認識の概念

微生物、特に細菌の検出は、医療・創薬・公衆衛生や食の安心安全の確保、機能性食品の品質管理などにおいてその重要性が増しています。本開発によれば、市販のマイクロウェルプレートのウェル内壁に細胞鑄型を形成することで、簡単に標的細菌を検出することができます。この細胞鑄型は自発結合性を有しており、人工抗体として機能します。したがって、ウェルに微量（0.040～0.10 mL）の被検試料を滴下し、プレートリーダー（解説3）で光学信号を読み取る簡単な操作で標的細菌を検出することができます。市販のマイクロウェルプレートは 96～384 個のウェルが配列してなっており、それぞれのウェルに人工抗体を形成することで、多くの被検試料を一括して測定することができます。さらに、それぞれのウェルに異なる人工抗体を形成することで、一つの被検試料に含まれる異種の細菌を最大 384 種類検出することが可能です。また、分子インプリンティングポリマー（MIP）技術によって形成される人工抗体はテーラーメイドできるため、新たな微生物（あるいはウイルス）の脅威に迅速に対応する有効な手段となります。今後、マイクロウェルプレートの更なる改良を進め、実用化を目指します。

本開発は王立化学会「Analyst」オンライン版で 2018 年 1 月 23 日に公開されました。なお、4 月に出版される冊子体「Analyst」誌の表紙に選出されました。

※グリーンケム株式会社（HP）<http://www.greenchem.co.jp/>

大阪府立大学大学院 工学研究科 分子認識化学研究グループの研究成果をもとに起業した会社

背景

細菌は生態系の形成に不可欠な構成要素であり、環境浄化や有機栽培、機能性食品など私たちが豊かな生活を営む上で重要な役割を果たしています。一方、セラチア、エンテロバクター、アシネトバクター、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、あるいは腸管出血性大腸菌などは感染症や食中毒の要因となることが知られています。したがって、感染症や食中毒の被害拡散の抑制や製造プロセスにおける品質管理などをはじめとする様々な用途において細菌の迅速な検出が必要です。細菌の検出には、特別な装置が必要なく、簡単に検出できるシート状培地を用いた計数法が広く用いられています。しかし、24時間以上の培養時間を要し、被検試料数や標的の種類に応じて培地を用意する必要があります。そこで、抗原抗体アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）など非培養ベースの検出法が提案されており、実際に利用されています。ELISAはハイスループット検出（解説2）を可能にするマイクロプレート法にも適用できることから、医学診断試験の基礎となっています。ここで使用される抗体（解説4）は免疫の繰り返しにより得られるものであり、その生産には数ヶ月～半年程度要します。抗体作製の迅速化は重要ですが、原理的に有効な手段は人工的なものとなります。

MIP技術は、標的分子の大きさや形だけでなく、その化学構造に相補的な鑄型をポリマーマトリクスにテーラーメイドする技術であり、人工的に抗体を作製できる有用な手法となります（図1）。さらに、ナノ～マイクロメートルサイズの微生物やウイルスに対応する鑄型の形成が可能です。この方法により形成された種々の鑄型を用い、標的物質の分離や回収、あるいはセンサ電極の開発を行ってきました。しかしながら、微生物やウイルスなどの大きなサイズの標的に対する自発結合性が乏しく、鑄型に標的を誘導する技術を組み合わせる必要がありました。したがって、装置が大掛かりになるだけでなく、外部からのノイズに影響されやすいという測定系の欠点がありました。

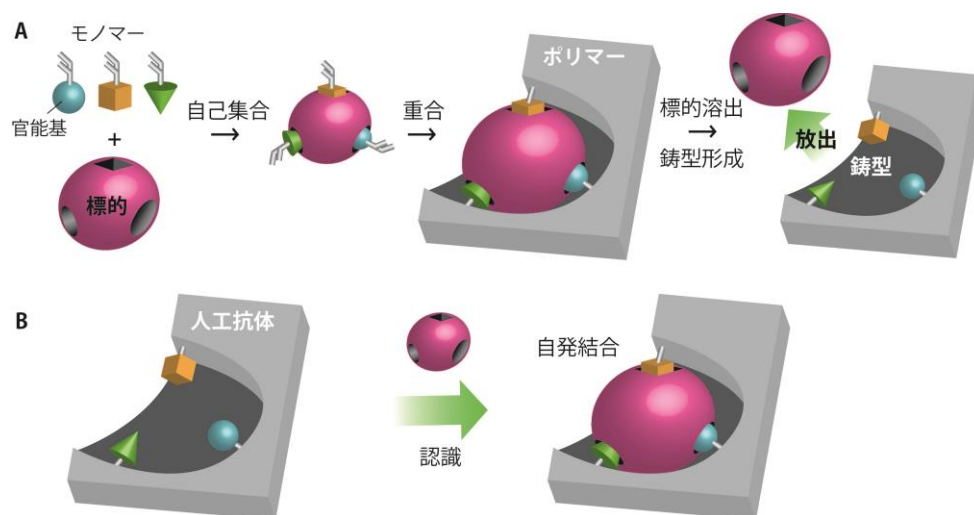


図1 分子インプリンティングポリマー技術の概念. (A) 作製工程と (B) 分子認識

本開発では、マトリクスとしてポリマーコンプレックスを用い、標的細胞への自発結合性を有する人工抗体の形成に成功し、これらの問題を解決しました。また、グリーンケム社の技術によりマイクロウェルプレートのウェル内壁を金ナノ粒子でコートすることで、ウェル内壁に人工抗体を選択的に形成することを可能にしました。

研究内容と成果

市販マイクロウェルプレートのウェル内で重合反応を行った際、ポリマーは反応溶液中に得られ、ウェル内壁には形成されませんでした。ウェル内壁を金ナノ粒子でコートすると、ウェル内壁にポリマー膜が形成されました（図2）。

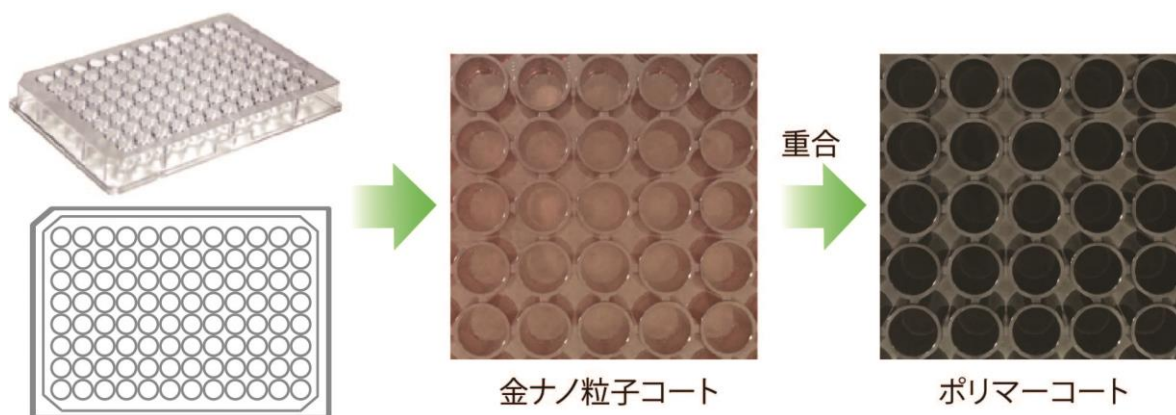
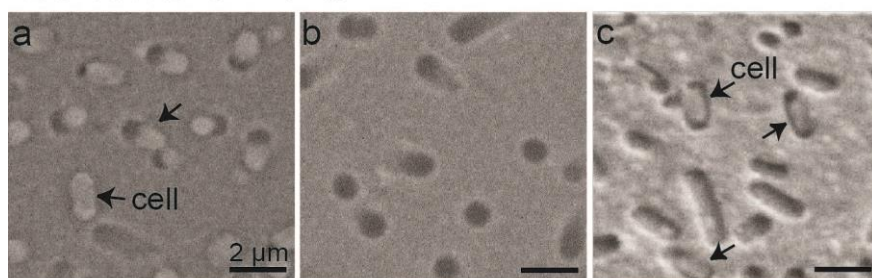


図2 市販マイクロウェルプレートを金ナノ粒子でコートした後、人工抗体を形成

このポリマーを顕微鏡観察すると、あらかじめ重合反応溶液に添加しておいた細菌がポリマーマトリクスに観察されました。ウェルにアルカリ溶液を添加して3時間した後、再度観察すると細菌は完全に消失（溶菌）し、人工抗体が形成されました。抗体作製に要する時間は一日程度であり、免疫による従来法（～半年）にくらべ、所望の抗体を容易に手に入れることができました。ウェルに標的細菌を添加して30分後、人工抗体に細菌が結合した様子が観察されました（図3）。

電子顕微鏡（SEM）像



蛍光顕微鏡像



図3 ウェル内壁の顕微鏡像。ポリマー重合後(a)、溶菌処理後に得られた人工抗体(b)、人工抗体による標的細菌（抗原）の認識の様子(c)

それぞれ異なる人工抗体をウェルに形成し、選択性について評価したところ、いずれの人工抗体も高い選択性（10倍以上）を示しました（図4）。種々の細菌を含む試料においても同様の結果が得られました。また、試料採取から検出までにかかる時間は30分以内であり、 $10^3 \sim 10^6$ 個の細菌の定量も可能でした。

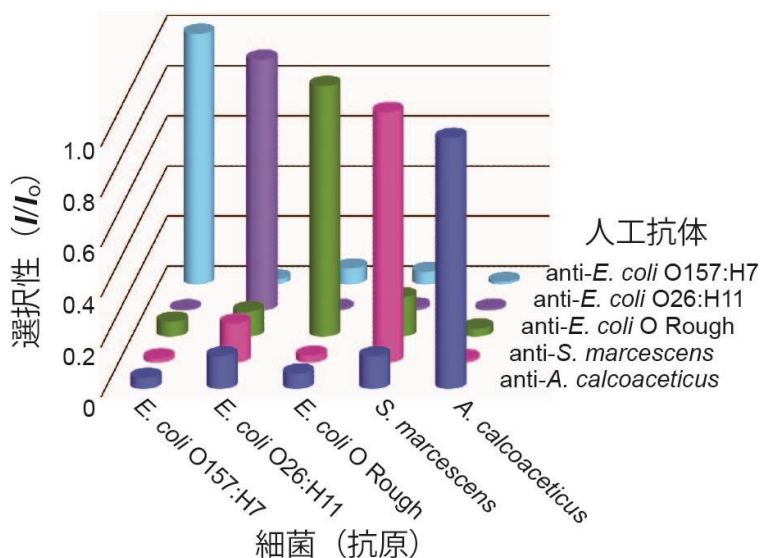


図4 人工抗体マイクロウェルプレートの選択性

本開発の特徴と効果

- ・免疫によらず迅速（一日程度）に抗体が作製できる。
- ・抗原に応じてテーラーメイドできる。
- ・抗原（標的細胞）と人工抗体が自発的に結合する。
- ・高選択的な検出ができる（選択性10倍以上）。
- ・多検体を一括検出できる。
- ・検体に含まれる種々の細菌を一括特定できる。
- ・試料採取から検出まで30分以内である。

研究助成等

本開発は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(25020A)、JST 研究成果展開事業(MP27115662969)により得られた成果に基づき、JSPS 科学研究費補助金(16H04137)からの支援により行われました。

用語解説

（解説1）マイクロウェルプレート：マイクロタイタープレート、マイクロプレートなどとも呼ばれ、プレートの外形は共通であるが、6～9600個のくぼみ（ウェル）の配列からなるプラスチック製の分析器具である。ウェルの数によりその容量は異なるが、よく用いられる96（12×8）ウェルでは0.40 mL、384（16×24）ウェルでは0.050～0.10 mLが一般的である。

（解説2）ハイスルーブット検出：時間と経費を節約するための高速化合物検出系のこと。

（解説3）プレートリーダー：マイクロプレートに入れた多数の試料の光学的性質（吸光や蛍光、化学発光、蛍光偏光）を測定する分析機器である。一度に多くの微量試料を検出することが可能であるため、核酸、タンパク質、細胞などのバイオ分析に広く用いられる。

（解説4）抗体：細菌やウイルスなどの抗原が体内に侵入すると直ちに体内で生産され、抗原に特異結合して体外への排除を促進する（免疫）。ウサギ、ヤギなどの体内に抗原を注射などにより注入すると、体内では抗体がつくられ生体を防御する作用がはたらく。免疫を繰り返し、数ヶ月してから血液を回収して抗体を精製して得られる（ポリクローナル抗体）。特定の抗体を産生する B 細胞を取り出し、培養、増殖させることで単一の抗体（モノクローナル抗体）を得ることができる。動物に抗原を免疫してから、モノクローナル抗体を得るまでには4～6ヶ月を要する。

発表論文

論文名：A rapid and specific bacterial detection method based on cell-imprinted microplates

著者名：Xueling Shan, Takuya Yamauchi, Yojiro Yamamoto, Hiroshi Shiigi and Tsutomu Nagaoka

掲載誌：*Analyst* (Royal Society of Chemistry)

<http://dx.doi.org/10.1039/C7AN02057K>