

ポストコロナ社会を構築する、レーザ改質技術による 感染症抗体検査キットの量産化技術の開発

(国研) 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門
上級主任研究員 瀧脇 雄介
(2020 年度 一般研究開発助成 AF-2020219-B3)

キーワード：ポストコロナ, レーザ改質, 感染症

1. 研究の目的と背景

2020 年の新型コロナ禍で見られたように、その場で感染歴の有無や免疫力の程度を示す中和抗体価を迅速・正確に定量化するための技術は重要である。しかし、普及している既存の抗体検査法は、妊娠検査薬のように検体を滴下してセルロース膜上に表示される線を目視診断するものであり（イムノクロマト法）、感度が低い（擬陽性や擬陰性など）という課題がある。そこで、簡便でありつつより高感度に抗体検査ができる検査デバイスとして、酵素免疫測定法を簡便に実現できる新規な検査チップを開発する。

これまで筆者はレーザ改質技術を駆使して抗原抗体反応による定量検査を迅速に行えるマイクロ流路型の検査チップデバイスを構築してきた¹⁾。プラスチック基板上のマイクロ流路にレーザのパルス波を連続照射することで、プラスチック表面が物理的かつ化学的に改質され、抗体が基板へ強固に固相化されることを可能にした。この技術は、従来法がウェットな環境下で分子自己組織化膜により抗体を基板上に長時間静置して化学的に結合する必要があったのに対し、ドライな状態で迅速かつ連続的に抗体を固定化できるため、歩留まりの向上と量産化に優れる特徴を有している。

しかし、抗体分子の固相化は抗体自身がタンパク分子として比較的安定であるためドライな環境下でも実現可能であったが、本法で行う「抗体検査」ではより不安定な“抗原（リコンビナントタンパク質）”をプラスチック上に固定化する必要がある。そこで、先の本研究助成²⁾で構築したプラスチック面への抗体分子の固定化技術を応用して、リコンビナントタンパク質の固相化をはかる。具体的には、レーザ改質により表面を局部的に親水化することでリコンビナントタンパク質の安定な固定化を実現する。このときレーザ改質されたプラスチック表面の凹凸構造が密集すると、リコンビナントタンパク分子内にある水の表面張力が互いに強く作用するため、タンパク質内の分子がナノスケールの凹凸構造の表面に強く引っ張られ、分子構造が維持できなくなり崩れるリスクが高かった。これに対してセルロース膜上では、リコンビナントタンパク質は安定に固定化されることが知られており、セルロース膜のような親水性でソフトなファイバー材料だとリコンビナントタンパク分子は構造を安定に維持して固相化される可能性が高い。そこでプラスチックのような硬質材料でもレーザ改

質によって親水性を局部的に賦与することで、リコンビナントタンパク分子の膜としての粘弾性を確保できれば、安定性の高い抗体検査用の基板の構築が可能と考えられる。

本研究では、レーザ表面改質技術とインクジェット印刷技術を組み合わせて、新しい抗体検査用の診断チップを作製し、産業界に展開するための製造プロセスの検討を行った。具体的には、プラスチック表面に異なる条件でレーザ改質を行い、その後すぐにインクジェット印刷でリコンビナントタンパク分子溶液を改質表面に塗布・印刷した。塗布後のタンパク分子膜がどのような挙動を示すのかについて評価を行い、粘弾性の観点から考察を行った。本法で作製した診断用チップが量産に適しているか、また診断用チップから得られるデータが分析的な性能として有用であるかどうかについて、既存のマイクロプレート法と比較して検討を行った。

2. 研究方法

2・1 リコンビナントタンパク分子の固定化

プラスチック基板の表面にレーザ照射条件 1 kHz のサファイアレーザー（IFRT, 1 W, 1 mJ/pulse, $\lambda=779$ nm）から 158 fs のパルス波を照射し、選択した領域のみを親水性表面に化学的改質した。最適なレーザ照射パラメータは、先の研究助成の成果²⁾から、レーザフルエンス 1.5-10 J/cm² とスキャン速度 20-1,000 $\mu\text{m/s}$ で検討を行い、1.5 J/cm²・100 $\mu\text{m/s}$ で安定な濡れ性を維持し、酵素免疫測定（ELISA 法）でシグナルを得ることができた。

リコンビナントタンパク溶液の基板への塗布と固定化には、クラスターテクノロジー社製のインクジェット印刷装置（Pulseinjector®）を使用した。リコンビナントタンパクは不安定で高濃度のため、塗布量と位置は精密に制御する必要がある。本法では高粘度のタンパク溶液をハイスループットで塗布するため、使用するインクジェット印刷装置はこれらの要求を満たす必要がある。Pulseinjector はピエゾ駆動により高粘度の液を塗布でき、マイクロスケープで塗布の様子を常時観察できる。また高価なタンパク溶液を使用後に回収できるノズル構造を持つため、繰り返し利用が可能であり、本研究に適用した。

2・2 レーザ改質基板へのリコンビナントタンパク分子と IgG の固着

プラスチック基板にタンパク分子を含む溶液を塗布す

ると、タンパク分子は表面に物理吸着によって固相化される。しかし、物理吸着は固着力が弱いので、安定に固相化される場合とされない場合があり、長期の保存安定性やシグナルの低下・バラツキの要因となりやすい。先の本研究助成の成果から²⁾、プラスチック基板をレーザ改質すると、規則的な周期構造と親水基が基板表面に賦与され、IgG が強固に固相化されやすくなることが分かっている。同じ現象がリコンビナントタンパク分子に対しても有用であるかどうかは不明である。

IgG は複数のユニットで構成される糖タンパク分子であり、各ユニットには4つのポリペプチド鎖が存在する。これらは2本の重鎖(H)と2本の軽鎖(L)で構成され、ジスルフィド結合によってつながっている。H鎖とL鎖は非共有結合性の相互作用と鎖間の共有結合性ジスルフィド結合を組み合わせることで保持しており、左右対称の構造を形成している。このH鎖とL鎖の可変領域には抗原結合部位があり、可変領域が影響を受けなければIgGは抗原と問題なく結合することができる。したがってIgGは比較的安定性の高いタンパク分子であると言えるため、可変領域以外の部位を固着化に利用することができれば、IgGの抗原認識能力が低下することはない。

一方で、リコンビナントタンパク分子は、IgGのような決まった構造はしておらず、様々な影響を受けると考えられる。例えば、レーザ改質されたプラスチック表面ではナノスケールで凹凸構造が密集しており、改質表面に吸着したリコンビナントタンパク分子は分子内にある水分子が凹凸構造間の張力によって強く引っ張られるため、それらの作用によってタンパク分子の高次構造が壊れやすくなる。その結果として、固着したリコンビナントタンパク分子は高次構造を維持できなくなり、IgGと特異的に結合できなくなるため活性が著しく低下する。

これまでIgGについてはレーザ照射条件と固相化量の関係について先の本研究助成²⁾の成果から詳細に検討と評価を行ってきたため、IgGに限らずタンパク分子自体をレーザ改質表面に固着させることは可能と考えられる。しかし、固着した後の表面の膜特性やその分子認識の挙動については未知なことが多い。そこでリコンビナントタンパク分子については、安定に固相化されているかどうか膜挙動も含めてQCM-D (Quartz Crystal Microbalance Dissipation) 法を使って検討することとした。QCM-Dは基板表面の硬質膜やソフト膜などの粘弾性についての結果を得ることができる。この方法を用いて、リコンビナントタンパク分子が改質表面において安定に固相化されているかを詳細に検討する。

2・3 ELISAによる測定方法

抗体検査キットは、筆者が開発したマイクロ流路で構成されるチップデバイスと試薬瓶のセットから成る特許技術を活用している(図1)³⁾。測定操作は流路の入口に液を点着するだけで、ELISA法に従って発色シグナルが得られる仕組みである。この技術により、外部装置や前処理

が不要であり、検体や試薬を滴下するだけで、マイクロ空間内で逐次的に抗原抗体反応が迅速に進行する。そのため、待ち時間が少なく、手軽に検査ができる実用性の高い簡易検査法となっている。

本研究では、SARS-CoV-2のリコンビナントタンパク分子とIgGに、Acro Biosystems社製のSARS-CoV-2 Spike protein RBD (TAS002-C02)とAnti-SARS-CoV-2 Antibody (TAS002-C03)を使用した。また、血清試薬にはRayBiotech社製の不活化処理されたCOVID-19 Serum (CoV-PosA-P-100)を用いた。比較として、中和抗体検査用のイムノクロマト試薬(IC)は、感度の高いLIONRUN製とクラボウ製の2種類を使用した。

測定手順としては、最初に検査チップの入口に洗浄液を2回滴下し、次に検体液を滴下して5分間静置する。続いてヒトIgGを認識するペルオキシダーゼ標識抗体を滴下して5分間待つ。次に洗浄液を5回滴下し、発色基質(TMB)液を滴下してから5分後に発色量を測定する(図1)。

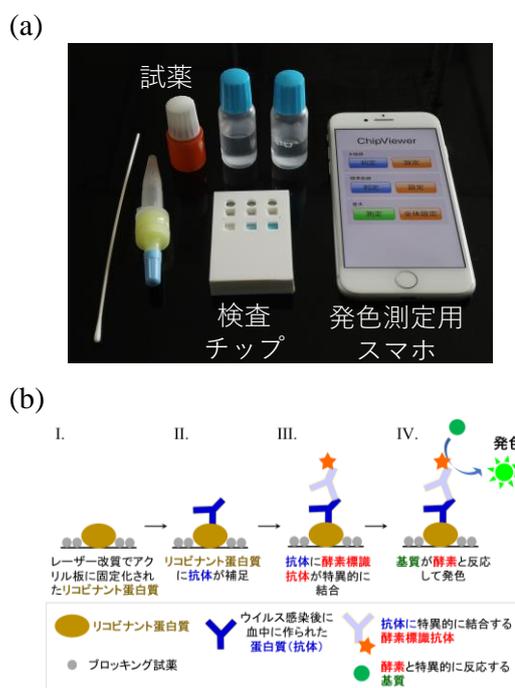


図1 マイクロ流路から構成される抗体検査キットの試作品: (a) 検査チップと試薬瓶と発色測定解析用のスマートフォン、(b) ELISA法に基づくマイクロ流路基板上での抗体検査の測定原理

非特異的な吸着を抑制するために、StabilCoat (XLC製・アイルランド)とChonBlock (90691P, Chondrex社)をブロッッキング試薬として使用した。これらの試薬は、抗原抗体反応に関係ない吸着を抑えることで高いS/N比を得るのに効果的である。調製後の試薬は全て4℃で保存し、使用時には室温に戻してから使用した。また、各試薬は指示された手順に従ってリン酸緩衝液で希釈し、所定の濃度になるようにした。

3. 研究成果

3・1 レーザ表面改質技術と抗体検査用分子認識界面の諸検討

プラスチック表面の極薄層は、様々な方法で改質することで、粘着性、潤滑性、濡れ性、摩擦、生体適合性などの表面特性が大きく変わることが知られている。一般的に用いられる方法としては、無機材料やプラスチックなどの高分子基板上に自己組織化単分子膜やプラズマ放電で親水性や官能性を導入する手法がある。ポリマー分子をプラスチック表面に化学的にグラフト化することで、吸着する分子の官能基が相補的官能基と反応して連結する。しかし、この方法は末端官能基や重合開始剤などの低分子物質を改質基板に安定に付着させる必要があり、基板材料の種類や状態に制約がある上、結合方法も比較的煩雑である。

これに対し、超短パルスレーザー照射は高エネルギー密度をプラスチック表面に集中して当てるため、プラスチック材料の化学結合が分子レベルで切断されることが推測される(図2)。切断された面では水分子を強く引きつける超親水性の層が形成されるだけでなく、IgGなどのタンパク分子が化学的に結合することを促進する効果があることもわかっている^{2,4)}。一般的に、親水性の層はタンパク分子の保存安定性を保つ上で重要であり、非特異的な吸着を洗浄除去する効果も期待できる。こうした特性を科学的に解析していくため、リコンビナントタンパク分子のレーザー改質表面への吸着時の膜特性を QCM-D 法により解析することとした。

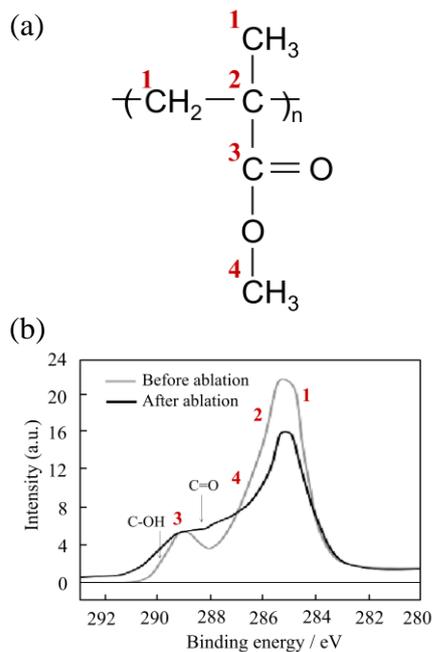


図2 レーザ改質による基板表面の解析：(a)アクリル構造式、(b)レーザー改質後のXPSによるアクリル基板表面の Binding Energy の変化

QCMはセンサ部を共振させたときに得られる周波数の変化(Δf)から、センサ表面の物質膜と液中の滞留する分子の相互作用をリアルタイムに観測できる。さらにQCM-D法では、センサの共振動作を途中で停止させることにより振動が消えていくときの振動数変化(ΔD)も同時に観測できるため、 Δf だけでは測定できなかった膜の粘弾性やソフト膜の膜厚に関連した情報も得ることができる。

QCM-D解析から、特異的結合および非特異的吸着の動態を詳細に観察した。特異的結合の場合、振動数にパルス波のような変化が見られ、これは抗体分子がレーザー改質界面のリコンビナントタンパク分子に特異的に結合した時に得られた。一方、非特異的吸着では振動数が徐々に上昇し、最終的には洗浄によって完全に除去される傾向がある。この結果は、レーザー改質界面が特異的な結合に対して高い選択性を持ちつつも、非特異的吸着を効果的に抑制する能力を有していることを示唆する。さらに共振後の振動数の消散速度から、レーザー改質界面では硬質膜を形成していることが示唆された。つまり、レーザー改質された周期的なナノスケールの凹凸面にリコンビナントタンパク分子が強く結合しているにもかかわらず、IgGを選択的に認識する部位はほとんど影響を受けていないことが予測された。このように、親水性の層でソフト界面ではなく硬質膜が形成されることにより、リコンビナントタンパク分子による吸着界面の安定性と耐久性が向上し、長期間の使用が期待できる。

3・2 流路基板上でのELISAによる抗体検査の評価

本研究で進める抗体検査キットのコア技術は、リコンビナントタンパク分子が安定してIgGを特異的に認識することにある。そのため、レーザー改質面での分子認識能を調べるために、ELISA法に基づいて3種類のSARS-CoV-2に対するIgGの測定を行った。NP(Nucleocapsid Protein)、RBD(Receptor-Binding Domain)、S1(Spike Protein S1)に対するIgGをそれぞれ選択的に捕捉する各リコンビナントタンパク分子溶液をインクジェット印刷によりレーザー改質界面へ塗布・固着させた。リコンビナントタンパク分子が基板に固相化された後、各基材や筐体を貼り合わせて検査チップを作製し、4℃で保存した。

標準試料を用いた検討として、ポジティブコントロールの各IgGをリン酸緩衝液で希釈し、マイクロ流路の入口に滴下して抗原抗体反応を進めた。洗浄液、酵素標識抗体、発色基質を滴下してELISAを完結させ、得られた発色量から感度と正確さを見積もった。性能を比較するために、公定検査で汎用されているマイクロプレートELISAと簡易検査キットのIC法との結果を比較したところ、各IgGの最小検出感度はおおむね10 ng/mlで、マイクロプレートELISAとほぼ同等であった。一方、IC法では検知できなかった。これにより、レーザー改質技術により作製した抗体検査チップは既存のIC法より高い検出感度を有していることが示唆された^{5~9)}。

さらに、感染血清を希釈した液を検体として各 IgG を定量するための検討を行った。血清中の成分は ELISA 法によるシグナルを阻害することが多いが、ブロッキング試薬にウェスタンブロッティング用の Chon Block を使用することで、血清成分によるシグナルの阻害を抑えることができた。血清原液を 10 倍、100 倍、1,000 倍希釈した検体液を使い、マイクロ流路による検査チップと IC 法で最小検出感度を比較した。27 検体について比較した結果、レーザ改質による抗体検査チップでは、すべての血清検体で 10 倍、100 倍希釈は明瞭に IgG を 15 分で検知でき、うち 17 検体は 1,000 倍希釈でも IgG を明瞭に検知した。一方、IC 法では 100 倍希釈で IgG を 15 分で検知できたのは 3 検体であり、1,000 倍希釈ではすべての検体で IgG を検知できなかった。

この結果から、レーザ改質技術によって作製した抗体検査チップは、既存の IC 法による簡易検査キットよりもおおむね 100 倍低い濃度の IgG を 15 分で定量的に検出できることが明らかとなった。これにより、レーザ改質基板にリコンビナントタンパク分子を固相化し、感染血清中の微量の IgG を 15 分で定量化する検査チップとその試薬セットを構築することができた⁵⁻⁹⁾。

3・3 量産化技術の検討

レーザ改質により得られる表面特性の均一性と再現性は、量産化プロセスにおいて重要な要素であり、工業的応用にも適している。特に改質表面に周期構造が作製されていることは、タンパク質溶液のインクジェット印刷において、印刷スタンプのような特徴を持つ。印刷スタンプは、特定のパターンや形状を柔軟な表面に持ち、それらを転写することによって、微細なパターンを基板に賦与する。

レーザ改質によってインクジェット印刷基板の表面に微細なパターンを高精度に形成することは、タンパク分子が固着し固相化に至るプロセスにおいて、表面エネルギーを調整して濡れ性を制御するために重要である。量産化の観点から見ても、本技術によって得られた成果は従来のリソグラフィ技術よりも簡便でコスト効率が良い。また、表面改質により液体が広がる特性を持ち、硬質膜であることから耐久性が高いという特徴も有している。

超短パルスレーザーは高い空間分解能で機材表面に細かいパターンを高精度に作製できるため、高分子材料の薄層表面に新たな機能性を賦与することが可能である。

本研究では、タンパク分子の安定な吸着が困難であったプラスチック材料を親水性に改質し、検体中の IgG を選択的に捕捉できる表面性能に変えた。これらのプロセスは機械のデジタル制御で全て可能であり、工業的な量産化プロセスにとって再現性が高く、有益な成果を本助成で得ることができた。

4. 結論

レーザ改質技術による分子認識界面の形成は、感染症抗体検査キットの性能を大幅に向上させる可能性が示された。特に、リコンビナントタンパク分子が親水層で IgG の特異的な捕捉を迅速かつ正確に行えることから、この技術の有用性は明白になったと考えている。レーザパルス波による分子認識界面技術は、非特異的吸着を効果的に除去するだけでなく、偽陽性の発生を抑制することも可能であり、これにより感染症対策として非常に有望な技術となる。

この技術の最大の強みは、レーザ改質によって作製される表面が分子レベルでの精密な構造を持つため、タンパク分子の安定性が高まり、抗原抗体反応の効率が向上する点にある。また、レーザ改質表面が親水性であるため、タンパク分子の吸着が高い選択性を持ち、非特異的な吸着が最小限に抑えられる。この特性により、偽陽性のリスクが低減され、検査の信頼性が向上する。

今後の課題としては、まず、他の抗原タンパク質に対しても同様の技術が適用可能かどうかを検証する必要がある。これにより、様々な感染症に対応した多様な抗体検査キットの開発が期待される。またレーザ改質技術の産業的応用を考慮し、製造ラインの自動化やプロセスの最適化が望まれる。これらが進むことでより安価で高性能な抗体検査キットの提供が可能となり、公衆衛生の向上に寄与することが期待される。このように、レーザ改質技術による分子認識界面の形成は、感染症抗体検査の分野において革命的な進展をもたらす可能性があり、今後の研究と開発がさらに進むことが強く期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり国立研究開発法人産業技術総合研究所の田中正人博士にはひとかたならぬご協力をいただき、感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Kenji Goya, Yusuke Fuchiwaki: Anal. Sci., 33-38 (2018), 34(1)
- 2) 刈脇雄介: FORM TECH REVIEW, 30 (2021), 93.
- 3) 刈脇雄介: 特 7011865, 2022/01/19
- 4) Yusuke Fuchiwaki: Springer Proceedings in Physics, 37-44 (2023), 298.
- 5) 刈脇雄介: 臨床検査医学会誌, 273 (2023), 71.
- 6) 刈脇雄介: 臨床化学, 170 (2023), 52.
- 7) 刈脇雄介: シーエムシー出版, 164-171 (2022), 978-4-7813-1657-4
- 8) 刈脇雄介・兼田麦穂・林郁恵・藤井理恵・田中正人・山村昌平: 医療検査と自動化, 455 (2022) 47(4).
- 9) 刈脇雄介: 日本臨床検査自動化学会会誌, 416 (2021), 46.