

研究終了報告書

「高密度分子集積ナノ界面による超高感度ウイルス検出」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：砂山 博文

1. 研究のねらい

近年の新型コロナウイルス感染症のパンデミックに代表されるようにウイルス感染症はヒトをはじめとする動物だけでなく、植物や昆虫などの地球環境全体に大きな影響を与える。特にその高い感染力から早期発見・早期対策が感染(汚染)拡大を防ぐ上で重要である。そのためには迅速かつ高感度なウイルス検出法の開発は重要である。現在のスタンダードツールである(RT-)PCRはサンプルの採取・前処理に専門の技術が必要である。また、インフルエンザウイルスをはじめとしたウイルスについては抗体を利用した簡易抗原検査キットが用いられているが、簡便に検査できる反面、感度は低くある程度の症状が出てからでないと検出できないといった課題が挙げられる。

本研究では研究者が検討を続けてきた鑄型重合法と空間選択的な化学修飾技術(*Chem. Commun.*, 2018, 54, 6243-6251)を基盤とするナノ加工技術“ダイナミックモールディング法”を駆使することにより、ウイルス粒子の捕捉と検出をワンステップで可能とする様な迅速センシングナノ界面を構築する。さらに構築したナノ界面の特長を活かした分析法の開発を目指す。

本研究ではウイルスを高感度に検出するための界面設計として鑄型となるコア粒子の設計・合成、生体適合性ポリマーを基本材料としたポリマーマトリクス合成をはじめとした種々の検討から SARS-CoV2 を従来の ELISA ベースのものよりも高い感度で迅速検出可能なセンサの開発を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではダイナミックモールディング(DM)法を用いてウイルスを高感度に検出可能なセンサ界面を構築し、それを用いた高感度・迅速検出に展開すること目的としている。

まず、本技術の基幹となる鑄型の合成について検討を行った。カルボン酸末端を有するコア粒子にジスルフィド結合を有する重合官能基、基板上への固定化のためのヒスチジンタグをアミンカップリングで導入したところ、精製法により修飾粒子の溶液中での分散安定性を大きく改善できることを明らかにした。この粒子を重合開始として Br 基と固定化部位としてニトリロトリ酢酸(NTA)基を導入した基板上に固定した。これを鑄型として周囲に2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリンのポリマー薄膜を表面開始原子移動ラジカル重合法で形成させた後、還元処理により鑄型粒子を除去した。ナノ空孔内に露出したチオール基を利用して、蛍光レポーター分子等の機能性分子を導入してセンサ界面を構築した。この基板にウイルスと同様に脂質二重膜を基本骨格とする細胞外小胞(EV)をモデルとして用いたところ、EV 濃度依存的な応答が得られ、それらは機能性分子の有無に大きく左右されることを確認したことから、本手法により微粒子検出が可能であることが示唆された。また、粒子表面修

飾についての検討から多様な相互作用を利用できることも明らかにした。

以上の知見を基盤としてウイルス粒子検出界面構築について検討をおこなった。上記の手法を参考にセンサ界面を構築した。これにウイルス表面を模倣した粒子を添加したところ検出限界値 pg/mL レベルでの検出が確認され、従来の抗原検査キットと比較して 10 倍以上高感度化を達成した。

以上の様に、本研究ではウイルスを高感度に検出可能な界面に関する要素技術の開発に成功したと考えている。

(2) 詳細

・ウイルスセンサの構築、性能検証

1) 微粒子検出ナノ空孔の構築: カルボン酸が修飾されたコアナノ粒子分散液 100 μL (カルボン酸: 2.5×10^{-3} μmol) の表面に縮合剤を用いたアミンカップリングにより *N*-[2-(2-Aminoethylthio)-ethyl]-2-methacrylamide (重合官能基)、分散安定のために親水性成分としてエチレングリコール鎖を有する化合物と末端にリジン(K)を導入した His-tag を修飾した。この時の反応時間、精製方法(遠心分離、サイズ排除カラム)について検討した。得られた粒子について動的光散乱(DLS)測定装置より、コア粒子の安定性(凝集の有無)について評価を行ったところ、各種反応条件に係わらず、遠心分離での精製では平均粒径の増大が観察され、粒子が凝集していることが示唆された。一方でカラム精製においてはそのような凝集は確認されなかった。このことから分散安定性の高い修飾コア粒子の合成に関して精製法が重要であることを明らかにした。

金コートしたガラス基板に自己組織化単分子膜(SAM)形成を利用して表面にカルボキシ基を導入した。このカルボキシ基を EDC/NHS で活性化し、ここに、表面開始原子移動ラジカル重合(SI-ATRP)の開始基のブロモ(Br)基、His-tag 固定化部位としてニトリロトリ酢酸のニッケル(II)錯体(Ni-NTA)を固定化した。この基板を上記の条件で作製した鑄型粒子溶液(0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に 1 時間浸漬させることで、基板表面に鑄型粒子を固定化した。この基板表面について蛍光顕微鏡(対物レンズ: $\times 100$)を用いて観察した。粒子濃度の増加に伴い、鑄型粒子に由来する輝点の量が増加することが確認され、粒子濃度を調整することで固定化密度を制御できる可能性が示唆された。

この基板上で、SI-ATRP により 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)のポリマー層を形成させた。このポリマー層について還元剤で処理することでジスルフィド結合を開裂し、さらに弱酸溶液で Ni 錯体を解離させ鑄型粒子を除去した。還元剤としては TCEP を用い、溶液中に界面活性剤を共存させることで効果的に鑄型粒子を除去できることを確認した。得られたポリマー薄膜をエリプソメトリ測定により確認したところ平均 11 nm と算出された。

形成されたナノ空孔に露出したチオール基に対してマレイミド基等の SH 反応性基を有する蛍光レポーター分子(AlexaFluor647 C2 maleimide)溶液を滴下し、反応させることで導入した。蛍光分子導入前後で、基板表面の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察したところ、未修飾の基板の蛍光強度と比較して、蛍光分子導入後の基板では有意な蛍光強度の増加が観察されたことから、蛍光分子の導入を確認した。

センサとしての性能確認のためウイルスと同様に脂質二重膜構造を有する球体である細胞

外小胞(EVs)を用いて検討を行った。まず His-tag 修飾 Protein G を導入し、その後表面抗原である CD63タンパク質に対する Anti-CD63 抗体導入した。この基板に各種濃度に調製した EVs (0 - 10 ng/mL)を添加し、その蛍光強度変化を観察した(図 1)

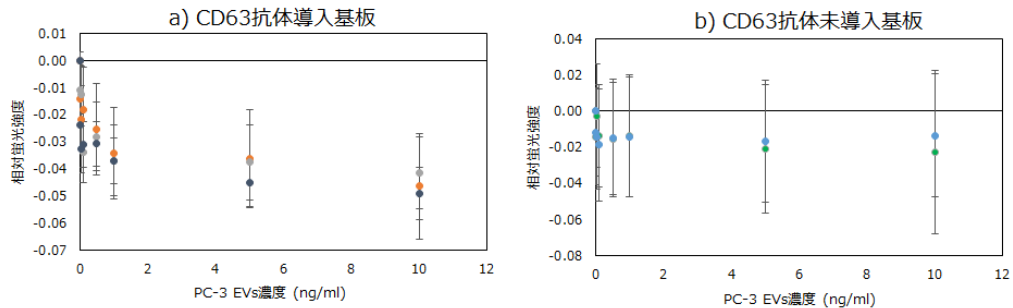


図 1: 作製したセンサの微粒子に対する蛍光応答(a, b)

得られた結果より EVs の濃度依存的な蛍光応答が観察された(図 1a)。一方で抗体未導入の基板では濃度依存的な応答は確認されなかったことから(図 1b)、導入した抗体が EVs 認識に寄与していることが確認された。このことから本鑄型分子を用いることで微粒子センサを構築できることが示唆された。

2) ウイルス検出ナノ空孔の構築: 前項で得られた知見を基に改良を加えてウイルス検出ナノ界面の構築を行った。性能検証に疑似ウイルス粒子を用い、作製したセンサの蛍光応答を確認したところ添加した微粒子濃度に対応した応答が観察され 10 pg/mL と非常に微量な試料に対しても応答することが確認された。市販の抗原検査キットの検出限界は 200-300 pg/mL (感染症誌 79: 138~142, 2005)であることから本システムを用いることで高感度化できることが示唆された。また、参照としてウイルス検出能を持たないセンサ基板を作製し同様に評価したところ蛍光応答はほぼ示さなかった。このことから本センサによってウイルス粒子を高感度に検出できることが示唆される。

3. 今後の展開

上記の様にダイナミックモルディング法を用いてセンサ界面を構築することでウイルス粒子を高感度に検出可能であることは確認された。今後は最終目的としていた SARS-CoV2 ウイルス検出についての検討を行うことで、センサナノ界面の構築を行う。得られたセンサ界面の評価については医学部や附属病院の研究者と連携し実サンプルを用いて行い、適宜材料設計にフィードバックを行う。これまでにタンパク質検出で多くの血液等の体液サンプルについての検討を重ねていることからそれらの知見を基に材料作製を推進する。

4. 自己評価

本研究で得られたセンサの検出限界は従来技術の 10 倍程度と、目標に設定していた超高感度でのウイルス検出は達成できなかったが、本技術が高感度検出可能な界面設計技術としてのポテンシャルを有していることは確認できたと考えている。本研究で開発を目指した高感度ウイルス迅速検出システムは、急激に感染拡大するウイルス感染症の早期

発見や治療効果の確認等に貢献できることから、社会に対して大きな意義がある。特にポストコロナ時代に際し、感染再拡大や新規ウイルス発生などの有事の際では空港等での水際対策が重要となることから、簡易・迅速・高感度にウイルス検出が可能な技術開発は今後も重要であり続ける。また、本技術の様な検出プラットフォームは革新的な生命科学基盤技術を創製することとなり、ウイルス感染症だけでなく種々の疾病や環境の課題について大きなブレイクスルーをもたらすきっかけとなる可能性がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Oshita, A., Sunayama, H.*, Takeuchi, T.*, A Molecularly Imprinted Nanocavity with Transformable Domains That Fluorescently Indicate the Presence of Antibiotics in Meat Extract Samples, *J. Mater. Chem. B*, 2022, 10 (35), 6682–6687.

概要: 本研究では精密に設計された可逆結合基を有する鋳型を用いて高分子材料を作製し、可逆結合の開裂・再形成反応を利用して蛍光性の相互作用部位を導入することで、標的となる抗生物質に対して選択的に蛍光応答を示す材料の作製を行った。構造類似体を用いた選択性実験から、作製した材料は標的分子に対して選択的な蛍光応答を示すことを確認し、またこのセンサが鶏肉抽出物中でも機能することを明らかにした。

2. Sunayama, H., Takeuchi, T., Protein-imprinted polymer films prepared via cavity-selective multi-step post-imprinting modifications for highly selective protein recognition, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, 413, 6183–6189.

概要: 分子鋳型重合によって合成される材料中に形成される空孔は、その性質(親和性)が不均一であることが全体の性能に大きな影響を与えている。本研究ではその空孔の親和性の差をうまく利用することで、高いパフォーマンスを発揮する空孔のみを残し、そのほかの空孔を無効化する方法を開発した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:(省略)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・2022年度 分析化学会 奨励賞受賞
- ・2022年第69回応用物理学会春季学術講演会 Poster Award 受賞
- ・砂山博文, “抗体と交替? —分子インプリント材料”、生物化学工学誌“バイオよもやま話”、2022, 100(7), 375–379.(解説記事)