

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630425

研究課題名(和文)近赤外光を用いた新規迅速免疫測定法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel immunoassay system using NIR luminescent glass

研究代表者

中野 秀雄(Nakano, Hideo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00237348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、迅速な免疫測定を実現するため、洗浄作業が不要である新たな免疫測定法BINGO (Bioluminescent Interference Gathering Optical) assayを開発した。抗体 標識タンパク質融合体(融合体)と、使用を特徴とする。発光の検出方法としては、近赤外蛍光ガラスを使用した方法と使用しない方法を検討した。ビオチン-ストレプトアビジン(SA)結合を利用したモデル系の実験によりBINGO assayの原理を実証し、さらに抗原抗体反応によるE. coli 0157(無毒株)の30分以内での短時間検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel and rapid immunoassay system, named BINGO (Bioluminescent Interference Gathering Optical) assay, without any separation steps. It employs luciferase-antibody complex (LucAb). Initially, antibody-luciferase are uniformly dispersed in the solution. The luminescence excited by the luc was detected by photo-multiplier tube (PMT) for near-infrared light. Localization of antigen-antibody complex to the fluorescent glass increased the PMT signal. Then another system without the NIR-fluorescent glass was also tried. A PMT detector for visible light was equipped under the bottom, so the luminescence by Luc was directly detected. The principle was initially demonstrated in a model system, and it also successively detected E. coli 0157 (toxin-defective) in a 30 min.

研究分野：生物工学

キーワード：免疫測定 近赤外蛍光 ルシフェラーゼ 抗体

1. 研究開始当初の背景

抗体を用いる免疫測定法の測定対象物質は、生体内物質、微生物、環境汚染物質など多岐にわたり、様々な分野で用いられている。代表的アッセイ法として有名な ELISA は、感度は高いものの、洗浄操作等に時間がかかるという欠点がある。一方洗浄操作が必要ない方法としては、ラテックス凝集法、イムノクロマト法が代表的であるが、ともに感度が低く、夾雑物の混入に弱いという欠点を有する。

近赤外光(700nm-2400nm)は生体分子への吸収が少なく透過性の高い光として、近年特に注目を浴びている。そのうち 800-1400nm の光は、有機物質にその吸収は全くなく、「生体の窓」と呼ばれ、これからの利用技術の開発が期待されている。洸らは、「生体の窓」領域の LED を実現する目的で、Yb³⁺、Nd³⁺ 共添加ガラス蛍光体を開発し、中心発光波長 1020nm で半値幅 100nm の発光を得ることに成功した (S. Fuchi, *et al.*, *Jap. J. Applied Physics*, 47, 7932, (2008), S. Fuchi, *et al.*, *Applied Physics Express*, 2, Art. No. 032102 (2009))。さらに、広帯域化を可能とすべく、Sm³⁺添加ガラス (860-1050nm で発光、S. Fuchi, *et al.*, *Physica Status Solidi (c)*, 8, 2653 (2011))、Pr³⁺添加ガラス (760~920nm, 960~1100nm、K. Oshima, *et al.*, *Physica Status Solidi (c)*, 9, 2340 (2012)) の開発も進めている。

代表研究者らは、この波長帯で蛍光を発する近赤外蛍光ガラスをミクロン単位の微細なボール状に粉碎し、そこに抗体を結合させ、微生物を検出することに成功し、すでに特許出願 (特願 2013-103740) している。しかしながらこの測定系の SN 比は、蛍光ガラス粒子の洗浄特性に大きな影響を受ける。そこでこの近赤外蛍光ガラスとルシフェラーゼ (Luc) を組み合わせ、洗浄不要な新規免疫検出法 (BINGO assay) に思い至った。Luc と蛍光団との BRET による発光では、その移動エネ

ルギーは物質間の距離の 6 乗に反比例するため、距離が遠くなると急速に減衰し、10 nm 以上の距離の相互位置関係を測定することはできない。しかし一旦光にしてその光エネルギーを蛍光に変換すれば、到達する光の強度は距離の 2 乗に反比例することになり、より長距離の相互関係を測定することが可能である。しかし受光する側の蛍光団を通常の分子にすると、変換できるエネルギーの割合は極めて小さくなってしまう。その点蛍光ガラスは粒子の大きさを自在に制御でき、無駄なく Luc の発光を受光できるため、発光体からの光を効率よく蛍光に変換できると期待される。

2. 研究の目的

生体物質による吸収が殆ど無く、生体透過性が極めて高い近赤外光を発する蛍光ガラスと、発光タンパク質であるルシフェラーゼとを組み合わせ、洗浄不要で迅速、かつ夾雑物混入に影響されにくい、新規な免疫測定法の諸条件を検討し、その手法を確立する。さらに本測定法に適したルシフェラーゼの選定、近赤外蛍光ガラスの改良、および抗体とルシフェラーゼの結合法などの検討により、高感度化を図ることを目的とした。

3. 研究の方法



図 1 試作した測定装置

本アッセイ系に適したルシフェラーゼおよび色素を検討した。さらに新たな測定機器を

設計、試作した。様々な条件を検討し、抗原を短時間で洗浄操作不要で測定できる手法について、様々な条件を検討した。

4. 研究成果

様々な検討を行い、洗浄無しに抗原を短時間で検出する新たな免疫検査システムを開発し、BINGO (Bioluminescent Interference Gathering Optical) assay と名付けた (図2 原理参照)。本研究で開発した BINGO assay を利用すれば、食品管理現場において、簡便かつ高度な品質管理が可能となる (図3、図4 実施例)。また、BINGO assay は、食品分野以外にも臨床診断など、利用可能な分野は幅広い。

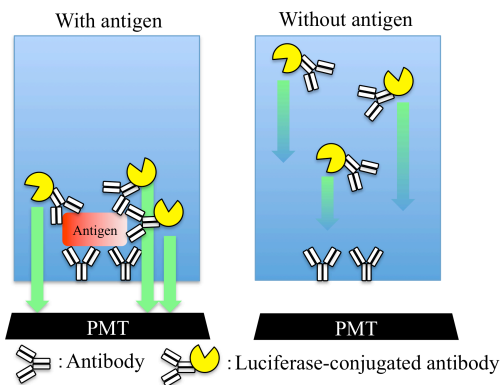


図2 BINGO 法による測定原理

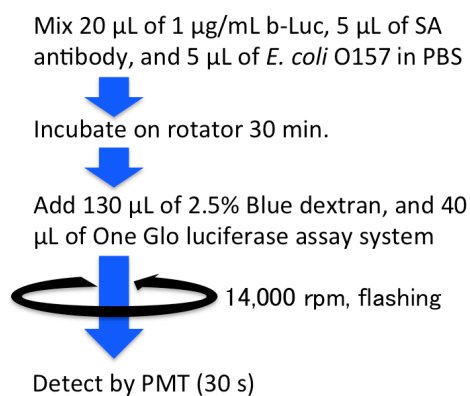


図3 BINGO 法による測定手順

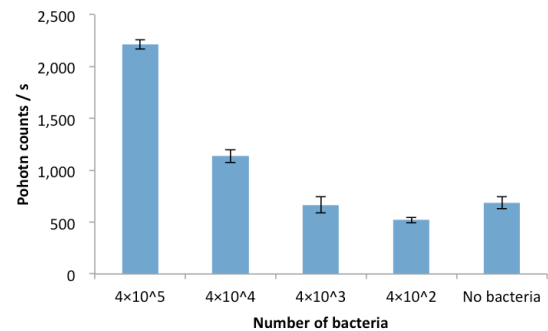


図4 BINGO 法による大腸菌 O157 迅速測定結果

参考資料：森昭博博士論文 2016

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Mori, A., Ojima-Kato, T., Fuchi, S., Kaiya, S., Kojima, T., and Nakano, H. (2017) Development of a rapid immunoassay system: Luminescent detection of antigen-associated antibody-luciferase in the presence of a dye that absorbs light from free antibody-luciferase. J. Biosci. Bioeng. in press

[学会発表] (計 2 件)

1. 森 昭博, 加藤 晃代, 瀧 慎吾, 兒島 孝明, 中野 秀雄. 近赤外蛍光ガラスを用いた新規免疫学的検出手法の開発。第 67 回日本生物工学会大会, 平成 27 年 10 月, 鹿児島

2. Akihiro Mori, Teruyo Ojima-Kato, Shingo Fuchi, Takaaki Kojima, Hideo Nakano. Development of a novel immunosorbent homogeneous assay system using luciferase-antibody complex and dye for luminescence absorption. 251st American Chemical Society National Meeting & Exposition, March, 2016, San Diego, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：免疫測定用キット及び免疫測定法
発明者：中野秀雄、森昭博、瀧真吾、加藤晃代

権利者：国立大学法人名古屋大学、公益財団法人科学技術交流財団

種類：特許

番号：特願 2015-186581

出願年月日：2015 年 9 月 28 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 秀雄 (NAKANO, Hideo)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：00237348

(2) 研究分担者

渕 真吾 (FUCHI, Shingo)
青山学院大学・理工学部・准教授
研究者番号：60432241

(3) 連携研究者

()

研究者番号：