

ニッポンハム食の未来財団 2019 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	HACCP 導入に向けた抗体精密整列化技術による食物アレルギーの超高感度検出法の開発
フリガナ	イイジマ マスミ
代表者名	飯嶋 益巳
所属機関 (機関名) (役職名)	東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	日本農芸化学会 2019 年度大会 (2 件)

研究結果要約

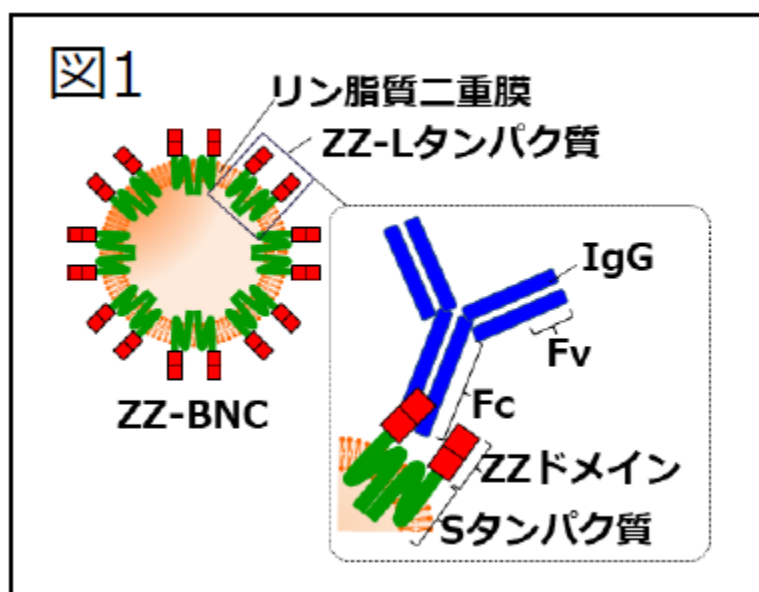
食品製造現場等において HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) の導入が義務化され、食物アレルギーなどの様々な危害因子を、誰でも簡単に、迅速に、感度良く測定できる技術が求められている。特に enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)は広く利用されるが¹⁾、一般的に抗体は希少で高価なものも多いため、使用量を可能な限り少なくし、無駄なく抗原抗体反応に供して高感度化を図る技術開発が急がれる^{2,3)}。近年我々は、B型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質の N 末端領域の一部を、protein A 由来 IgG-Fc 結合ドメイン 2 量体に置換した ZZ-L タンパク質とリン脂質二重膜から形成される直径約 30 nm の ZZ タグ提示型バイオナノカプセル(ZZ-BNC)を作製した²⁾。そして ZZ-BNC が、抗体および Fc 融合受容体のクラスター化と精密整列化を同時に達成できる足場分子であり、各種バイオアッセイの感度を著しく上昇できることを報告した²⁻¹⁰⁾。本研究は、ZZ-BNC の特性を用いて極微量の食物アレルギーをワンステップで超高感度に、安価に検出可能な新規の測定法を開発し、HACCP の迅速化、低コスト化を目指した。まず、市販の食物アレルギー

ン検出 ELISA キットに ZZ-BNC を添加するだけで、従来法の高感度化および抗体使用量の低減を可能にした。さらに、固相化食物アレルギーを検出するイムノスティック法を構築し、ZZ-BNC を使用すると発色強度が増幅し、約 1 時間での簡易検査法として有効なことを示した。今後は、本法を様々な抗原の高感度及び簡易検出技術として展開し、食品分野のブレイクスルーを目指していきたい。

研究目的

食品製造現場において危害分析重要管理点（Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)）導入の義務化が目前となる中で、食物アレルギーをはじめとした細菌・農薬・毒素などの様々な危害要因を、誰でも、簡単に、迅速に、感度良く測定できる技術開発が求められている。現在、食物アレルギーの検出で最も利用されている抗原抗体反応を用いた免疫測定法（イムノアッセイ）は極めて汎用性の高い重要な技術である¹⁾。一方、一般的に抗体は希少で高価なものも多いことから、使用量を可能な限り少なくし、無駄なく抗原抗体反応に供して、さらに高感度化を達成する技術開発が急がれている。そこで近年、固相上に固定する抗体と抗原が効率良く結合できるように、固相上で抗体をクラスター化（最密充填化）し、その配向性を精密に制御して整列固定化（精密整列化）できる足場分子の開発が行われている^{2,3)}。しかし、従来法では両者を同時に達成できる技術はほとんどなかった。そこで申請者は、IgG-Fc 結合 ZZ タグを整列提示するバイオナノ粒子（ZZ タグ提示型バイオナノカプセル：ZZ-BNC (図 1)）^{2,3)}が、液相中および固相上において IgG および Fc 融合受容体の配向性を精密に制御し「クラスター化と精密整列化」を同時に達成できる耐久性の高い足場分子であることを見出し、ELISA、ウェスタンブロット法、水晶発振子微量天秤法などの各種イムノアッセイの高感度化・高機能化、抗体使用量の削減化（低コスト化）を達成してきた²⁻⁹⁾（例：従来比最大約 250 倍⁷⁾）。さらに最近、多様な形状の測定技術に対応可能な ZZ-BNC の粒子構造を破壊した平面膜の開発を行い、イムノアッセイの更なる機能向上を図った¹⁰⁾。申請者は、上記 ZZ-BNC のユニークな特性が、食品製造現場で必要とされる食物アレルギーの汚染・残存防止、残存確認等の様々な課題の解決に貢献できると考えた。そこで本研究は、ZZ-BNC の特性を併せもつ新規の測

定方法を確立し、極微量の食物アレルギーをワンステップで超高感度に、安価に検出可能な技術を開発し、HACCP の迅速化、低コスト化を目指すことにした。さらに食品工場・医療現場等において、誰でも、簡単に、迅速に、感度良く測定できる実用化キットへの展開を目指し、食物アレルギーや食品分野の研究、さらに生命科学領域研究の発展に貢献していきたいと考える。



研究計画及び研究手法

まず、食物アレルギーの検出で最も利用されている ELISA サンドイッチ法における捕捉抗体、検出抗体および酵素標識二次抗体または酵素標識検出抗体を用いた測定系について検討することにした。固相上に捕捉抗体を直接固定（従来法）、または、固相上に ZZ-BNC（ZZ-BNC 法）または ZZ-L 膜（ZZ-L 膜法）を固定した後、捕捉抗体を整列提示した。その後、抗原を結合させ、検出抗体、さらに従来法には酵素標識二次抗体のみ、ZZ-BNC 法および ZZ-L 膜法には予め酵素標識二次抗体を整列提示した ZZ-BNC を添加し、ZZ-BNC と整列化抗体により抗原を二重に挟み込む方法を検討した。しかしながら、従来法における捕捉抗体と検出抗体、酵素標識二次抗体との組み合わせの最適化、さらに ZZ-BNC の有無によるシグナルの増強効果が期待されたものの、非特異的吸着によるバックグラウンドの最適化に難航した。

そこで、並行して、既に ELISA サンドイッチ法の検出系が確立されている市販の ELISA キット

を用いて、ZZ-BNCの有無による従来法の高感度化および抗体使用量の低減を図る検討を行った。さらに、ELISAと比べて定量性はないが、大型の機器設備を必要としないイムノスティック法について、一次抗体と酵素標識二次抗体を用いた固相化抗原の検出を検討した。さらに、抗原抗体反応における反応時間について検討した。

結果と考察

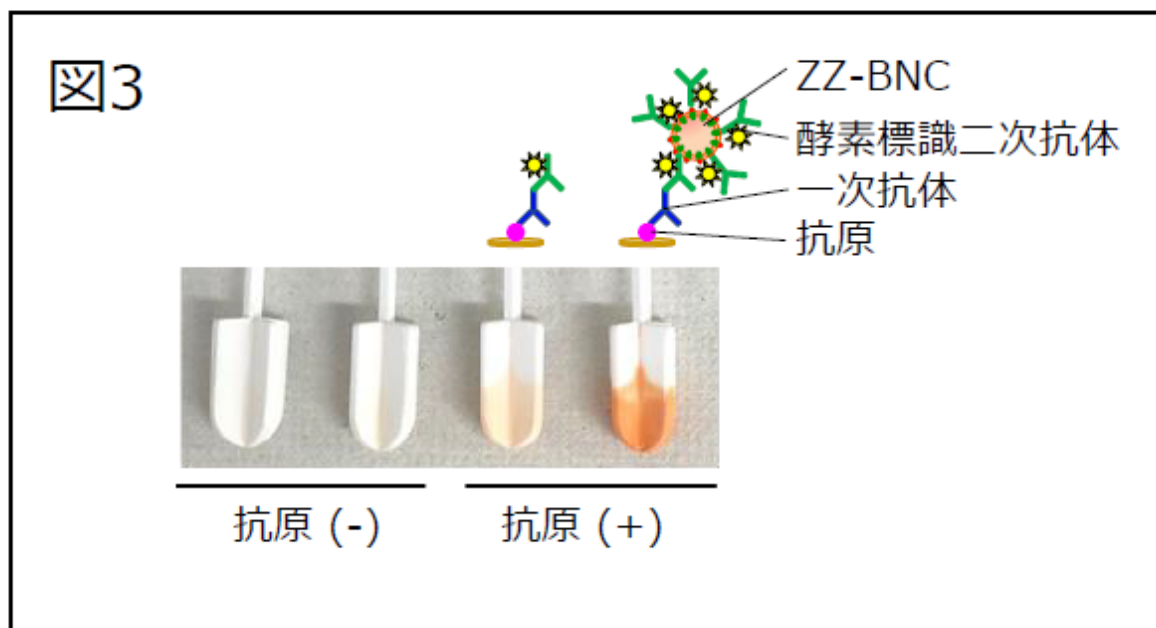
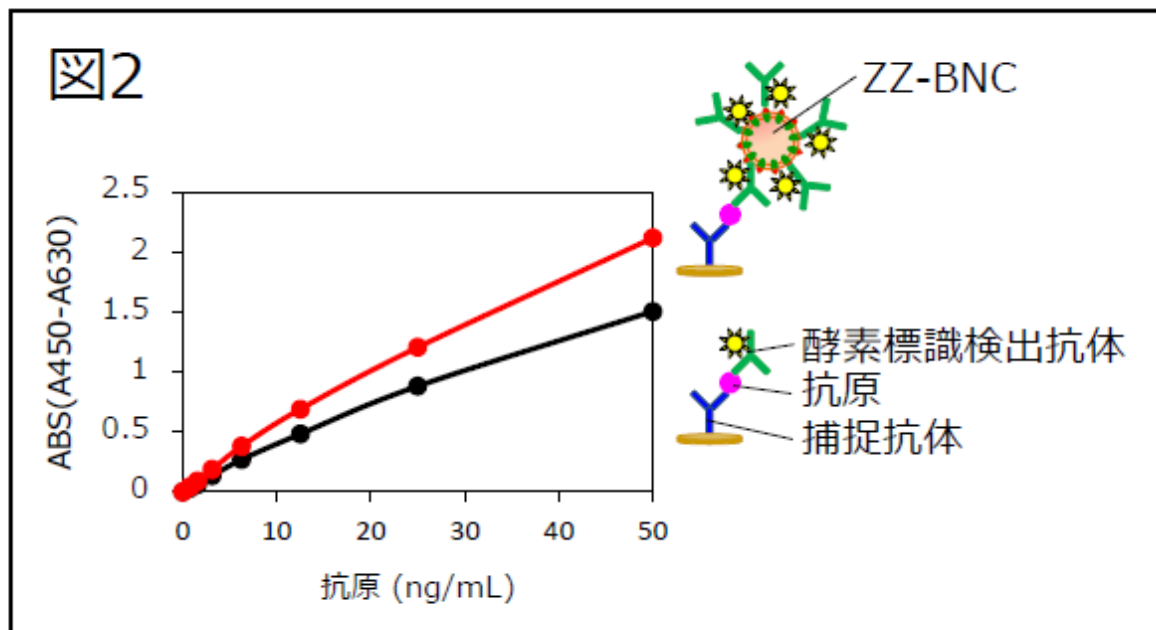
ZZ-BNC または ZZ-L 膜を用いた検出法では、まず、従来法における各種捕捉抗体と検出抗体、酵素標識二次抗体との組み合わせ、反応濃度、反応時間等について検討したが、抗原濃度依存的なシグナル上昇が得られない、または低いことなど、抗原検出系の構築が困難であった。一方、ZZ-BNC および ZZ-L 膜を固定化してから捕捉抗体を提示する系では、ZZ-BNC および ZZ-L 膜の固定化濃度や反応時間の検討、また従来法と同様に各種捕捉抗体と検出抗体、酵素標識二次抗体との組み合わせ、反応濃度、反応時間等について検討したが、バックグラウンドが高く出てしまい、従来法と比較できる程度の抗原濃度依存的なシグナル増強効果が得られなかった。これは、一般的に ELISA サンドイッチ法は、捕捉抗体と検出抗体との間の交差性を減らした抗体ペアを用いる必要があり、自身で構築する検出系はその最適化が困難であること、さらに ZZ-BNC と各抗体の親和性なども考慮する必要があることから、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

そこで、上述の内容と並行して、既に抗体ペアが最適化されている市販の食品検査キットの ELISA サンドイッチ法に ZZ-BNC を応用し、従来法の高感度化および抗体使用量の低減を図ることとした。その結果、ZZ-BNC を添加することで従来法と比べて、最大で約 1.4 倍（図 2：代表例を掲載）シグナルが上昇することを見出した。一方、一部の抗原によっては、シグナルの上昇効果は認められないものも存在した。

そこでさらに、市販の検査キットにおける ZZ-BNC の抗体使用量の低減効果について検討した。その結果、通常量(100%)の酵素標識抗体のみと比較して、80%量の酵素標識抗体-ZZ-BNC 複合体を用いた場合でも約 1.3 倍検出感度が上昇していた。このことから、ZZ-BNC は抗体の使用量を通常よりも 20%以上低減できることが明らかとなった。これら一連の結果は、酵素標識検出抗体

が ZZ-BNC 表層でクラスター化と精密整列化を同時に達成し、抗体一分子当たりの標識酵素の分子数を高めた効果であると示唆された。以上より、ZZ-BNC は既存の ELISA キットに添加するだけで従来の検出感度を改善し、抗体の使用量低減を可能にするユニークな分子であることが示された。また、本技術は、様々な ELISA 測定キットに応用可能であると考えられ、食品検査技術のブレイクスルーが期待できると考えた。しかし、一部の抗原抗体反応については、酵素標識抗体と ZZ-BNC との親和性が低いことや、非特異的な反応でバックグラウンドが高く出てしまうなどの課題も残されており、引き続き抗体の最適化や ZZ-BNC 濃度などの詳細な検討が必要と考えられた。

さらに、ELISA と比べて定量性はないが、大型機器を必要としないイムノスティック法を用いた抗原検出系について検討した。イムノスティックに固定化した抗原の発色強度は、酵素標識二次抗体のみの場合と比べて、酵素標識二次抗体-ZZ-BNC 複合体を使用した場合、最大で約 10 倍増加することを見出した（図 3：代表例を掲載）。さらに、抗原抗体反応における反応時間の検討では、従来法 20 分間と、ZZ-BNC 法 10 分間の発色強度はほぼ同等であることが判明した。このことから、従来法では全体の測定時間が約 2 時間かかる工程を、ZZ-BNC 法を用いることで約 1 時間に短縮できた。以上から、イムノスティック法において ZZ-BNC を用いることで、少なくとも 4 種類の食物アレルゲンについて検出感度の上昇効果が得られることを見出し、短時間で発色強度を増強できることを明らかにした。これは、上述したサンドイッチ法での効果と同様に、ZZ-BNC が酵素標識二次抗体をクラスター化および精密整列化する足場分子として働き、抗体一分子当たりの標識酵素の分子数を高め、高感度検出を可能にしたためと考えられた。本技術は、大型の機器設備が不要であることから、誰でも簡便に、迅速に、感度良く測定できるツールの一つとして、HACCP の迅速化、低コスト化への貢献が期待できると考える。また、食物アレルゲン以外の様々な抗原の高感度検出へ応用することで、食品分野だけでなく医療分野等における簡易検査法への展開も期待できる。



今後の研究活動について

本研究結果から、ZZ-BNC が ELISA サンドイッチ法の高感度化に応用可能であること、さらに、イムノスティック法を用いた高感度・簡便検出が可能であることを見出した。また、ZZ-BNC 表層で抗体が整列化することで、機能しない無駄な抗体を低減できることも判明した。本成果は、学術論文に発表する予定で、ZZ-BNC 法および ZZ-L 膜法の実現に向け大きく進展した内容となった。今

後も、固相化 ZZ-BNC および ZZ-L 平面膜の最適化、使用抗体の組み合わせや濃度の最適化を行うとともに、感度上昇率および抗体削減率の向上を図ることで、引き続き、食品工場・医療現場等において、誰でも、簡単に、迅速に、感度良く測定できる実用化キットへの展開を目指し、食物アレルギーや食品分野の研究、さらに生命科学領域研究の発展に貢献していきたい。

参考文献

- 1) Ross GMS, Bremer MGEG, Nielen MWF. Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassays. *Anal Bioanal Chem*. 2018 Sep;410(22):5353-5371.
- 2) Iijima M, Kuroda S. Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosens Bioelectron*. 2017 Mar 15;89(Pt 2):810-821.
- 3) 飯嶋益巳, 黒田俊一. ナノ界面における生体分子の精密整列固定化技術: バイオナノカプセル バイオセンシングの高感度化に向けて. *化学と生物*. 2018 年 56 巻 9 号 p. 591-5974.
- 4) Iijima M, Matsuzaki T, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Tanizawa K, Kuroda S. Bionanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem*. 2010 Jan 15;396(2):257-61.
- 5) Iijima M, Yamamoto M, Yoshimoto N, Niimi T, Kuroda S. Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(4):843-6.
- 6) Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, Kuroda S. Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase. *Analyst*. 2013 Jun 21;138(12):3470-7.
- 7) Iijima M, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Martin A, Quinn J, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Arakawa T, Hinako F, Kusunoki M, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S. Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials*. 2011 Feb;32(6):1455-64.
- 8) Iijima M, Somiya M, Yoshimoto N, Niimi T, Kuroda S. Nano-visualization of oriented-

immobilized IgGs on immunosensors by high-speed atomic force microscopy. *Sci Rep.* 2012;2:790.

- 9) Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, Kuroda S. Bio-nanocapsule-based scaffold improves the sensitivity and ligand-binding capacity of mammalian receptors on the sensor chip. *Biotechnol J.* 2016 Jun;11(6):805-13.
- 10) Iijima M, Nakayama T, Kuroda S. Two-dimensional membrane scaffold for the oriented immobilization of biosensing molecules. *Biosens Bioelectron.* 2020 Feb 15;150:111860.

以上