

研究ノート

新規なイムノクロマトグラフィー用抗体担持担体の開発

伊藤雅子*¹、森川豊*¹

Preparation of New Antibody-Supported Carrier in Immunochematography

Masako ITO*¹ and Yutaka MORIKAWA*¹Industrial Research Center*¹

セルロースを用いた新規なイムノクロマト用の抗体担持担体を開発し、さらにこの担体を用いたイムノクロマト方式を考案した。イムノクロマト用の基材を通過するサイズのセルロースナノファイバーは、湿式粉碎することで調製できた。反応染料で鮮やかな色合いに染色でき、基材上の移動ラインの目視確認が可能となった。さらに、結晶セルロースに表面処理を行い、抗体の吸着量を高めることを確認した。染色セルロースナノファイバー担持担体に抗体及び抗原を結合させ、基材上での抗原抗体反応を確認した。

1. はじめに

バイオセンサーの一つであるイムノクロマト法では、免疫反応を利用し、疾病や健康管理などに関する診断・検査を簡便に行うことができる。イムノクロマト法を用いた迅速検査キットは、特別な装置は必要なく、容易に目視判定ができ、安定性が高いなどの特長があるが、キットが高価であることが課題となっている。そこで、着色剤として主に使用されている高価な金ナノ粒子の代わりに、天然材料であるセルロースを用いた新規なイムノクロマト用の抗体担持担体の開発を試みた。ターゲットとして卵の主要アレルゲンであるオボアルブミンを用いた。

2. 実験方法

2.1 原料、試薬及び実験材料

セルロースナノファイバーの原料として、結晶セルロース「セオラス®」(旭化成ケミカルズ(株)製)を用いた。抗体は Anti-Ovalbumin in rabbit, IgG fraction (Polyscience 製) を、抗原はアルブミン (和光純薬工業(株)製) を用いた。染料は、ダイロンプレミアムダイ (ダイロンジャパン(株)製) を用いた。表面処理試薬には、シランカップリング剤 (信越化学工業(株)製) を用いた。イムノクロマト用基材として、ガラスファイバー (メルク(株)製)、ニトロセルロースメンブレン (メルク(株)製) 及び TLC アルミニウムシートシリカゲル 60F254 (メルク(株)製) を用いた。

2.2 セルロースのナノファイバー化

結晶セルロースの 1%水懸濁液を、湿式ジェットミル

に通すことでナノファイバー化した¹⁾。処理後の粒子径は粒度分布計 (ベックマン・コールター(株)製 LS13320) を用いて測定し、形状は電子顕微鏡 (日本電子(株)製 JSM-6510A) により観察した。

2.3 セルロースナノファイバーの染色

セルロースナノファイバー (固形分) 5 に対して染料 1 (重量比) の割合で混合し、40°C で染色した。その後、水に対して透析を行い、未吸着の染料を除去した。

2.4 結晶セルロースの表面処理

表面処理は既報²⁾に従い、試料 1g に対して、表面処理試薬 100mg を入れて行った。

2.5 結晶セルロースと抗体の結合

抗体溶液 (80.25 µg 分) を結晶セルロース 10mg に接触させることで結合させた。接触後の溶液のタンパク量を Lowry 法で測定することで結合量を求めた。

3. 実験結果及び考察

3.1 セルロースナノファイバーの調製とセルロースナノファイバーの検出

湿式ジェットミルを用いて、処理条件を変えてセルロースをファイバー化した。加熱粉碎をすることで 1 µm 以下 (ナノサイズ) に粉碎され、さらに、処理回数を多くするとその割合が増加することが認められた。粉碎後の試料を電子顕微鏡で観察し、ファイバー状に粉碎 (ファイバー化) されていることを確認した。

基材及び基材上を移動したセルロースナノファイバーの検出法を検討した。硫酸噴霧・加熱によりセルロースナノファイバーを脱水・炭化させ、黒色検出する方法を

*¹ 産業技術センター 環境材料室

試みたところ、ガラスファイバー及びニトロセルロースメンブレンは基材そのものが黒変するなど検出不可能であった。次に、UVで検出可能なTLCシートを用いての検出を試みた。調製したセルロースナノファイバーをTLCシートに展開後、UVを照射したところ、暗斑を確認できた。本研究における基材をTLCシートとした。また、調製したセルロースナノファイバーの中で、基材上での移動を確認できた180℃、5パスをジェットミルの条件とした。

3.2 セルロースナノファイバーの染色

染色に用いた染料は反応染料であり、染色をアルカリ条件下で行う必要がある。染色後に抗体を結合させるため、中和工程を取り入れたが、セルロースナノファイバーは見た目に鮮やかな色合いに染色され、中和せずに染色した場合と違いは認められなかった。幅1cm×長さ4cmに切ったTLCシートに展開したところ、染色セルロースナノファイバーは基材上で移動し、移動ラインを目視で確認できた。

3.3 結晶セルロースの表面処理と抗体の結合

抗体の吸着量を高めるため、シランカップリング剤を用いて表面処理を行った。未処理の結晶セルロースの抗体吸着量は17.7 μ gとなった。数種のシランカップリング剤を検討したところ、トリフルオロプロピルトリメトキシシランによる処理により、吸着量が36.3 μ gと最も高くなった。表面処理試薬として、トリフルオロプロピルトリメトキシシランを選択した。

これらの結果に基づいて、以下のように、イムノクロマト用担持担体の作製手順を決定し、抗体の結合を確認した。

- (1) ナノファイバー化 (ジェットミル、180℃、5パス)
- (2) 染色 (反応染料、40℃)
- (3) 乾燥、分級後、表面処理 (120℃、2時間)
- (4) 抗体との結合

3.4 新規なイムノクロマト法の開発

本研究において、粉碎後の粒子サイズの違いにより、TLCシートを移動できるセルロースナノファイバーと移動できないセルロースナノファイバーを調製できた。この特徴を生かし、開発したイムノクロマト用担持担体を利用したイムノクロマトの方式を開発した(図1)。染色セルロースナノファイバーに担持された抗原はTLCシート上で抗体と反応し、目視で確認できる赤いラインを形成した。一方で、抗原を結合させていない染色セルロースナノファイバーを対照として展開したところ、抗体

を塗布した位置に赤いラインは認められず、開発した担体で抗原抗体反応が行われることを確認できた。

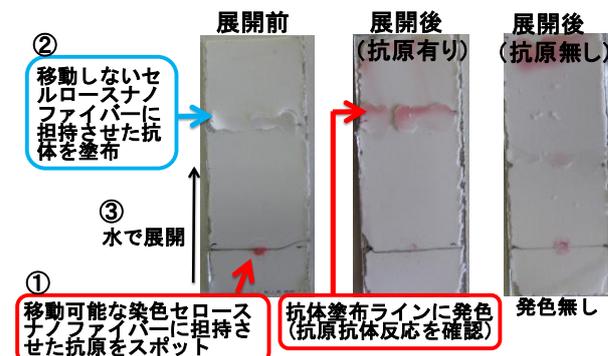


図1 開発担体を利用したイムノクロマトの方式

4. 結び

セルロースナノファイバーを用いた新規なイムノクロマト用の抗体担持担体の開発を試みた。イムノクロマトの基材として選定したTLCシート上を移動するサイズのセルロースナノファイバーを、加熱湿式粉碎することで調製できた。調製したセルロースナノファイバーは、反応染料で染色でき、染色後も基材を移動できた。表面処理を行うことで抗体の吸着量を上げる事ができた。以上より、着色セルロースナノファイバーを用いたイムノクロマト用の抗体担持担体を開発できた。

さらに、開発した担持担体を用いた新たなイムノクロマトの方式を開発した。この方式では、イムノクロマト用基材の構成はTLCシートのみであること、必要な抗体は1種類であること、天然材料であるセルロースを利用し安全性が高いことなどのメリットがある。これらのことから、新たな方式では、製造コストを削減でき、イムノクロマト用キットの低価格化が見込める。今後は、開発したイムノクロマト用担持担体を用いた抗原抗体反応の感度の向上に取り組む。

付記

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) にて実施した内容の一部である。

文献

- 1) 特許第5232976号
- 2) 森川, 伊藤, 阿部: あいち産業科学技術総合センター報告, 1, 14(2014)