

# ウイルス検出のための 糖鎖固定化ポリマー粒子の開発

茨城大学大学院

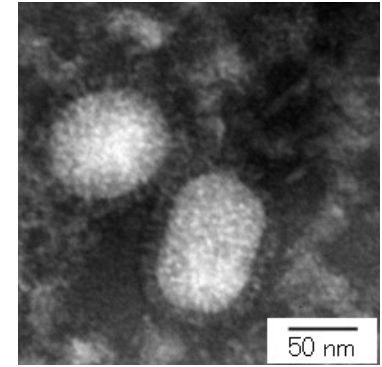
理工学研究科（工学野）物質科学工学領域

講師 山内 紀子

2022年9月15日

# 本技術の概要

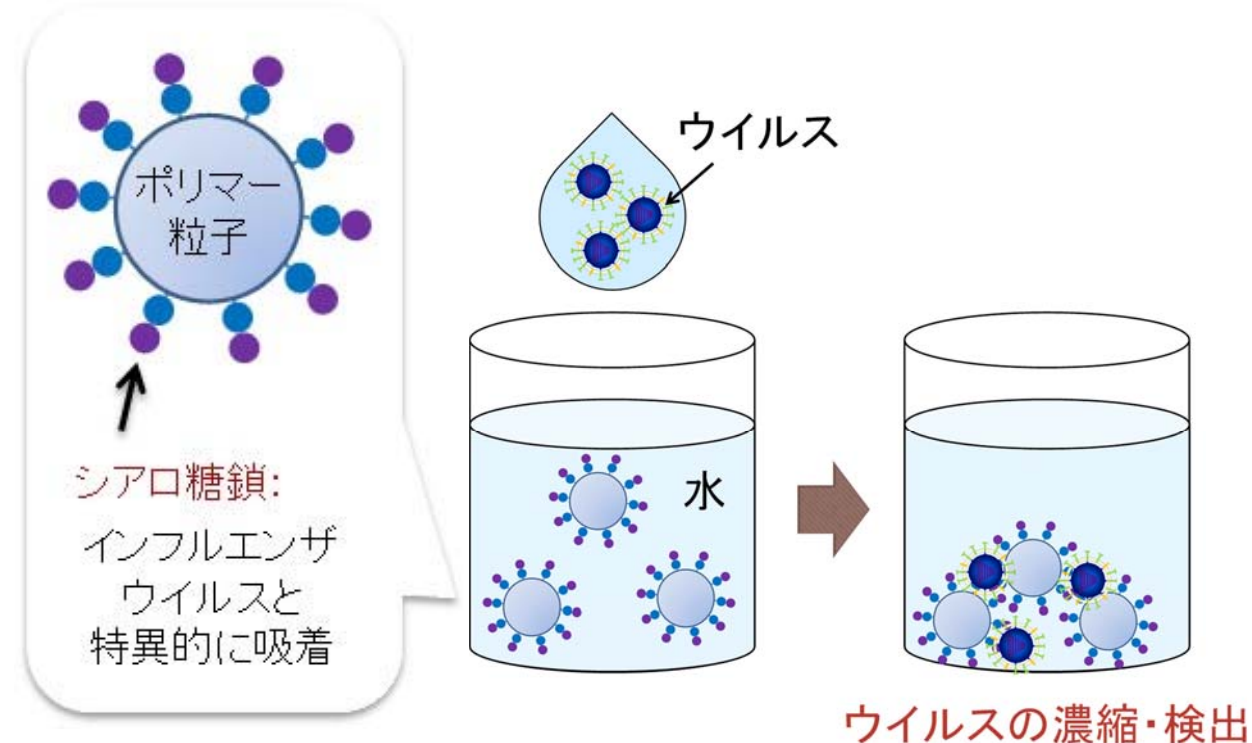
- ウイルス検出リガンドとして「糖鎖」を表面に固定化したポリマー粒子の合成プロセスを開発



ヒト型インフルエンザウイルスのTEM像  
(筑波大川口敦史教授より提供)

## 目指す実用先

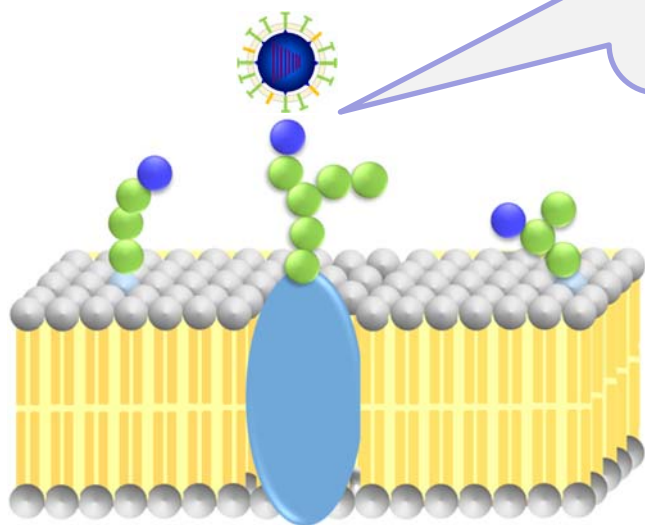
- ウイルス濃縮による、ウイルス感染の判定精度の向上
- ウイルス検出キットの開発



# 本技術の背景

**糖鎖:** 細胞表面に存在し、ウイルスを認識し、ウイルス感染の基点になる。

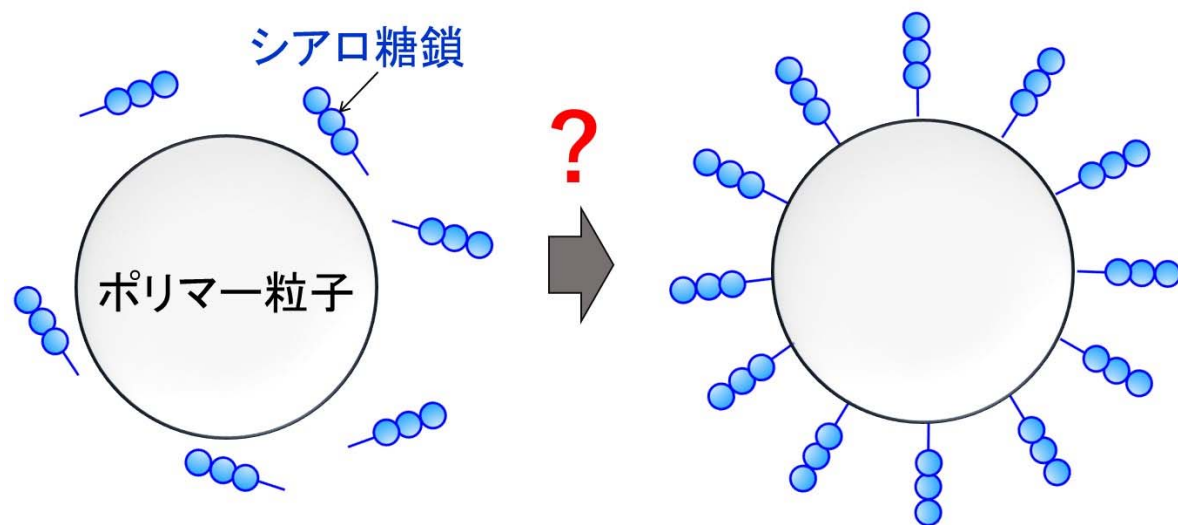
インフルエンザウイルス表面の  
ヘマグルチニン(糖鎖認識部位)が  
細胞表面の**シアロ糖鎖**を認識し、結合することで感染



糖鎖一つのウイルス認識能は低い**が、糖鎖を密に集積することで、ウイルス認識能を大幅に向上させることができる(多価効果)。**

# 本技術

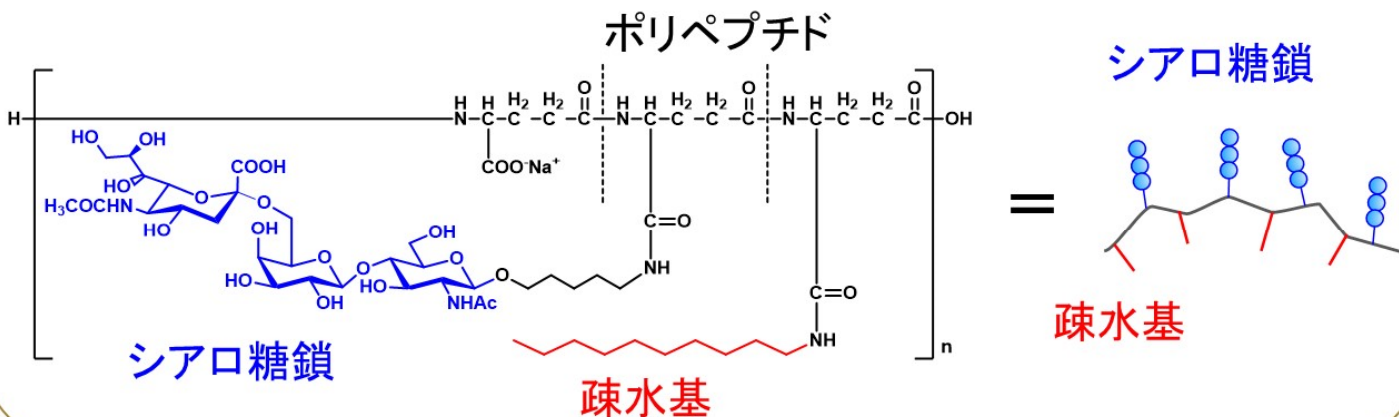
ポリマー粒子表面に、糖鎖を「密に」「強固に」固定化する技術



# 本技術

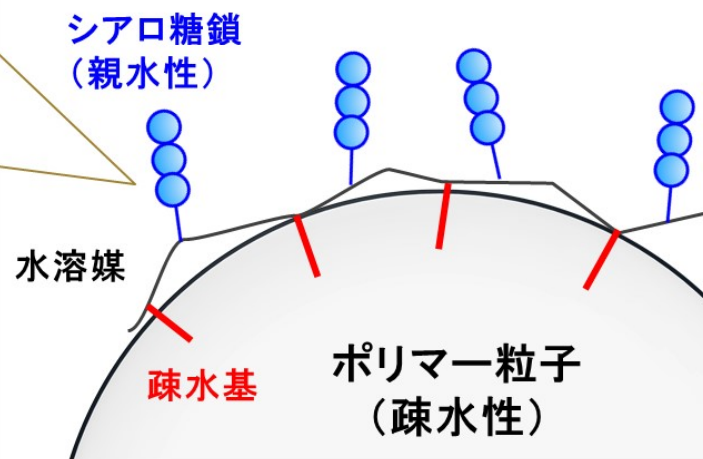
約2000個の糖鎖をもつポリペプチド<sup>(1)</sup>を使用

→ 糖鎖を密に固定化



疎水基をアンカー(錨)として  
ポリマー粒子に埋め込んで  
固定化<sup>(2)</sup>

→ 糖鎖の構造変化なく  
粒子表面に強固に固定化



2021年6月24日 茨城大学と福島大学で共同出願

特願2021-105030

「糖鎖固定化ポリマー粒子及びその製造方法」

山内紀子、小林芳男、永塚実稚、尾形慎

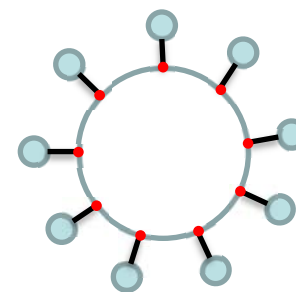
2022年6月22日 国際出願 PCT/JP2022/24625

- 参考文献: (1) M. Ogata, *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2 (2019) 1255-1261  
(2) N. Yamauchi, *et al.*, *Colloids Surf. A*, 604 (2020) 125299

# 従来技術とその問題点

## 〈従来技術〉

機能性分子を、粒子の最表面に固定化（**点**で固定化）



化学反応：共有結合 {  
    メリット：強固に結合  
    デメリット：固定化プロセスが煩雑になることもある

物理吸着：非共有結合（静電相互作用、疎水性相互作用）

{  
    メリット：固定化プロセスが簡便  
    デメリット：結合力が弱く、外れやすい

## 〈求められる方法〉

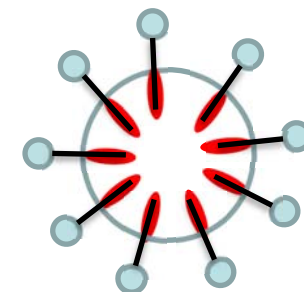
- 物理吸着（非共有結合）を利用した「簡便なプロセス」で、共有結合に匹敵するような「強固な固定化」手法
- 機能性基を「密に固定化」する手法

機能性分子のアンカー部を、粒子内に埋め込んで固定化（面で固定化）

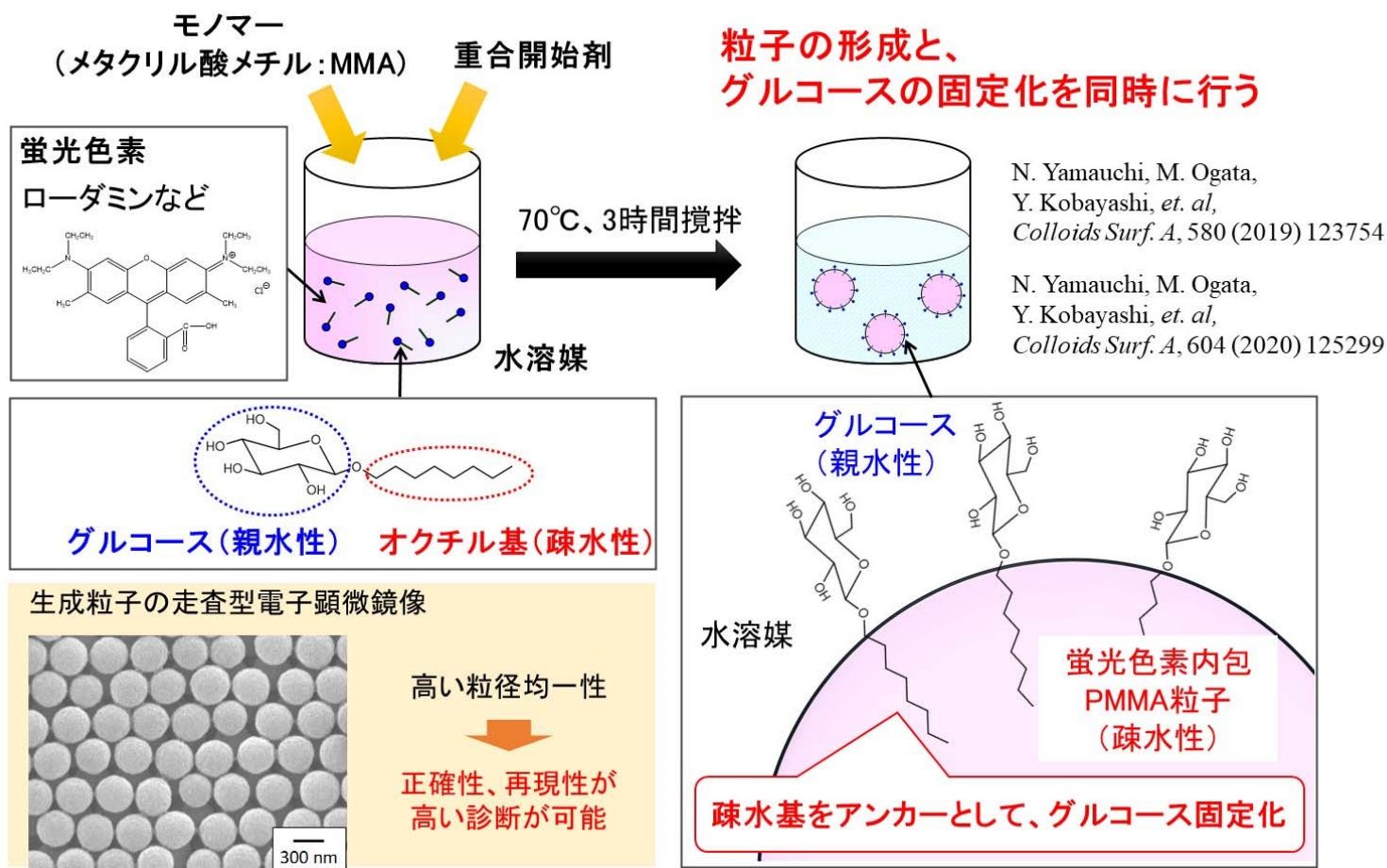
物理吸着：非共有結合（静電相互作用、疎水性相互作用）

メリット { 固定化プロセスが簡便  
粒子とアンカー部の接触面積が大きく、外れにくい

デメリット：密に固定化したい場合、工夫が必要か



＜技術の詳細＞



# 本技術の特徴

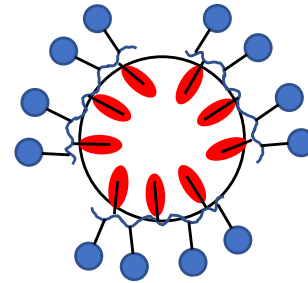
機能性分子のアンカー部を、  
粒子内に埋め込んで固定化（面で固定化）

+

多数の機能性基を側鎖にもつ  
ポリマー鎖を利用

固定化プロセスが簡便

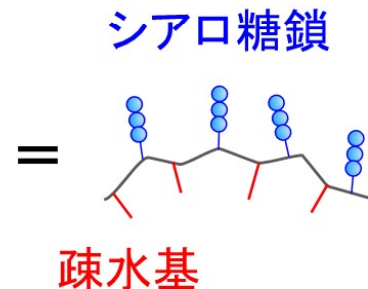
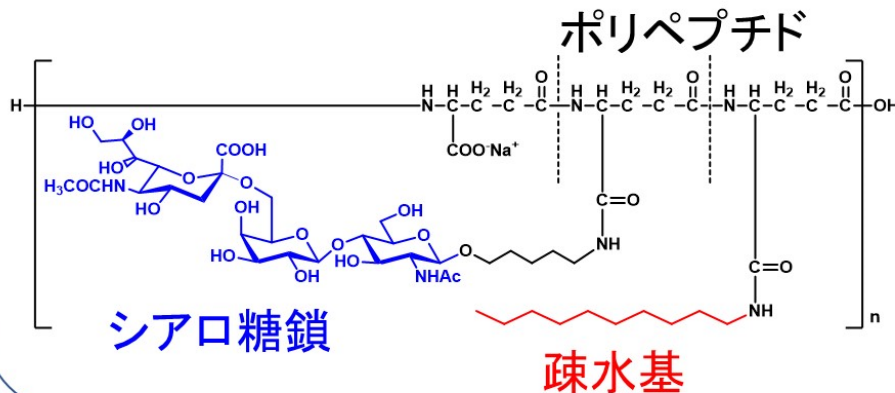
粒子とアンカー部の接触面積が大きく、  
外れにくい



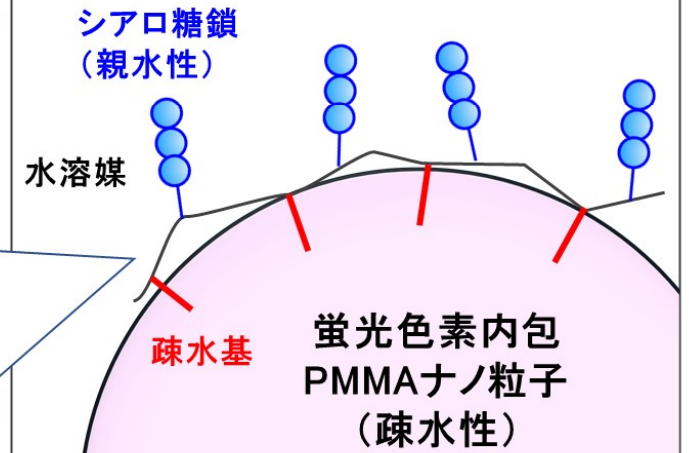
機能性基を密に固定化可能

## <技術の詳細>

数千の糖鎖をもつポリペプチドを利用 → 糖鎖を密に固定化

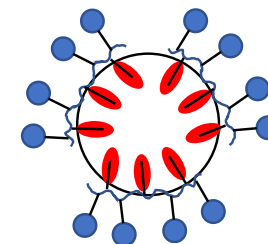
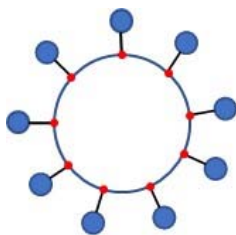


疎水基をアンカー（錨）として、  
PMMA粒子に埋め込んで固定化  
→ 糖鎖の構造変化なく、  
粒子表面に強固に固定化





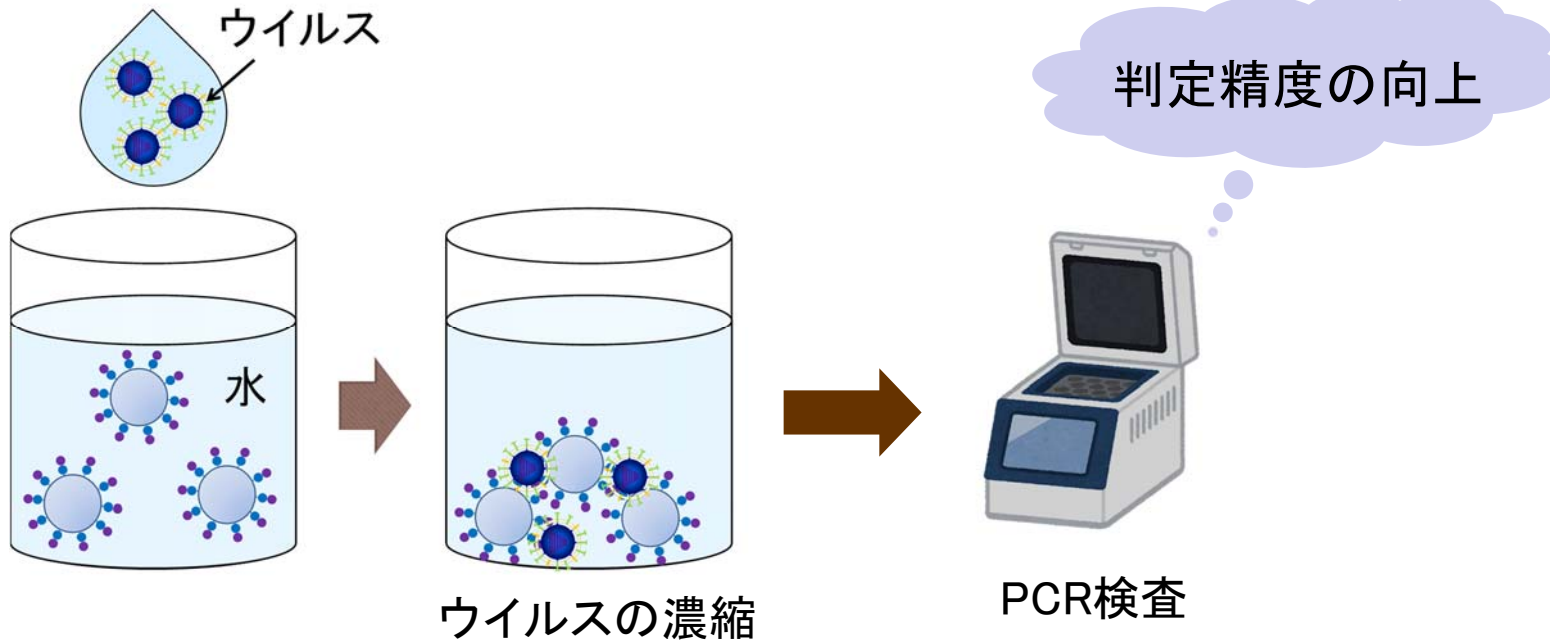
# 新技術の特徴・従来技術との比較



|            | 化学反応による固定化<br>(共有結合) | 物理吸着による固定化 (非共有結合) |                |     |
|------------|----------------------|--------------------|----------------|-----|
|            |                      | 点での固定化             | アンカー埋め込みによる固定化 | 本技術 |
| 機能性基の固定化強度 | ◎                    | ×                  | ○              | ◎   |
| 機能性基の固定化密度 | ○                    | ○                  | ○              | ◎   |
| 製造法の簡便さ    | ×                    | ○                  | ○              | ○   |

# 想定される用途

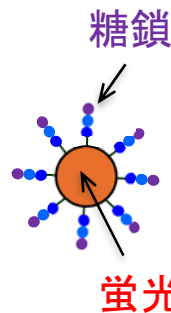
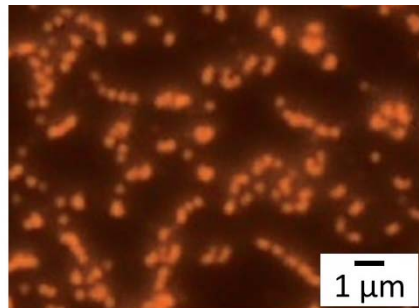
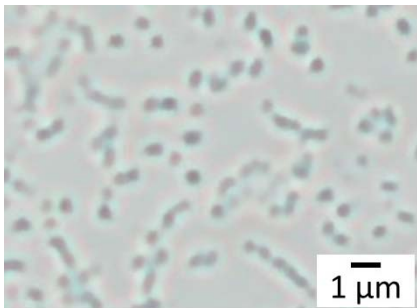
- PCR検査前のウイルス濃縮剤としての利用



- ウイルス検出キットのマーカ粒子としての利用

光学顕微鏡像  
(明視野)

蛍光像



ウイルス吸着後  
蛍光検出が可能

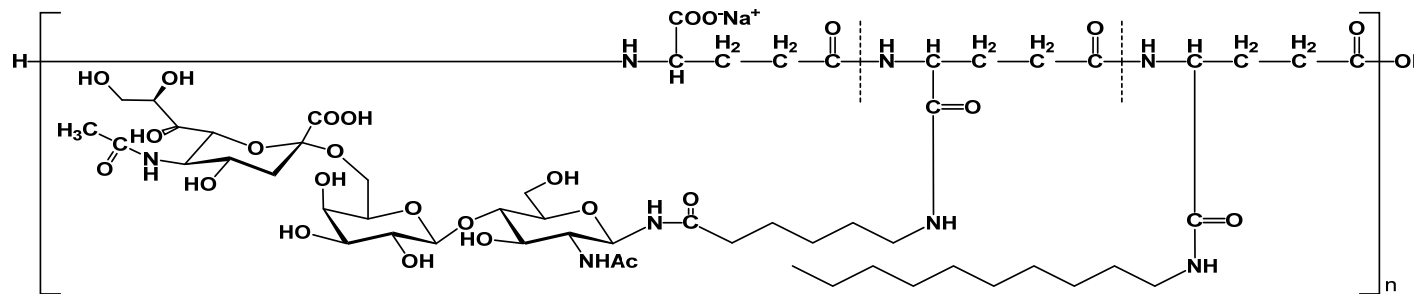
ウイルス検出キットの  
開発

「検出キット及び検出方法(特許出願中)」

# 本研究

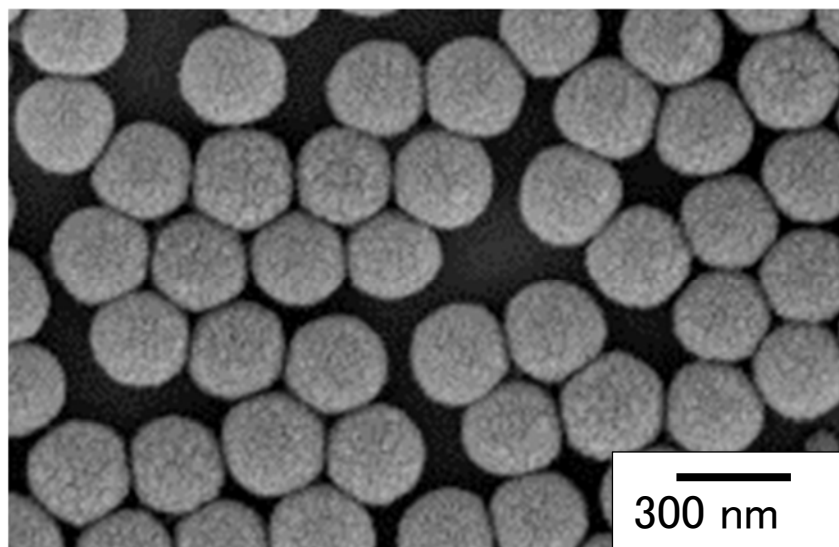
ヒト型インフルエンザウイルスを認識する糖鎖を側鎖にもつ疎水化ポリペプチドを使用して粒子を合成

$\alpha$ -2,6結合シアロ糖鎖：ヒト型インフルエンザウイルスを認識



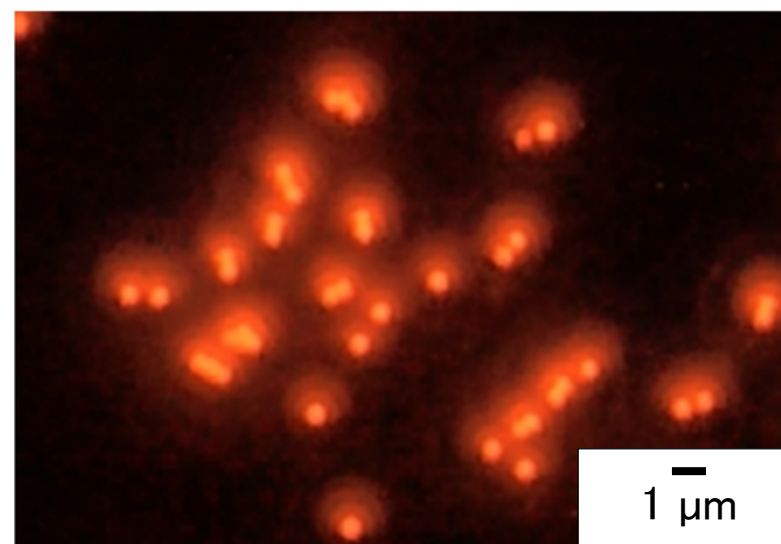
# 生成粒子の顕微鏡像

## 生成粒子の走査型電子顕微鏡像



粒径300 nm程度の  
粒径均一性が高い粒子が生成  
(小粒子を分離済み)

## 生成粒子の蛍光顕微鏡像 (ポリマー粒子内部に 蛍光色素ローダミンBを内包)



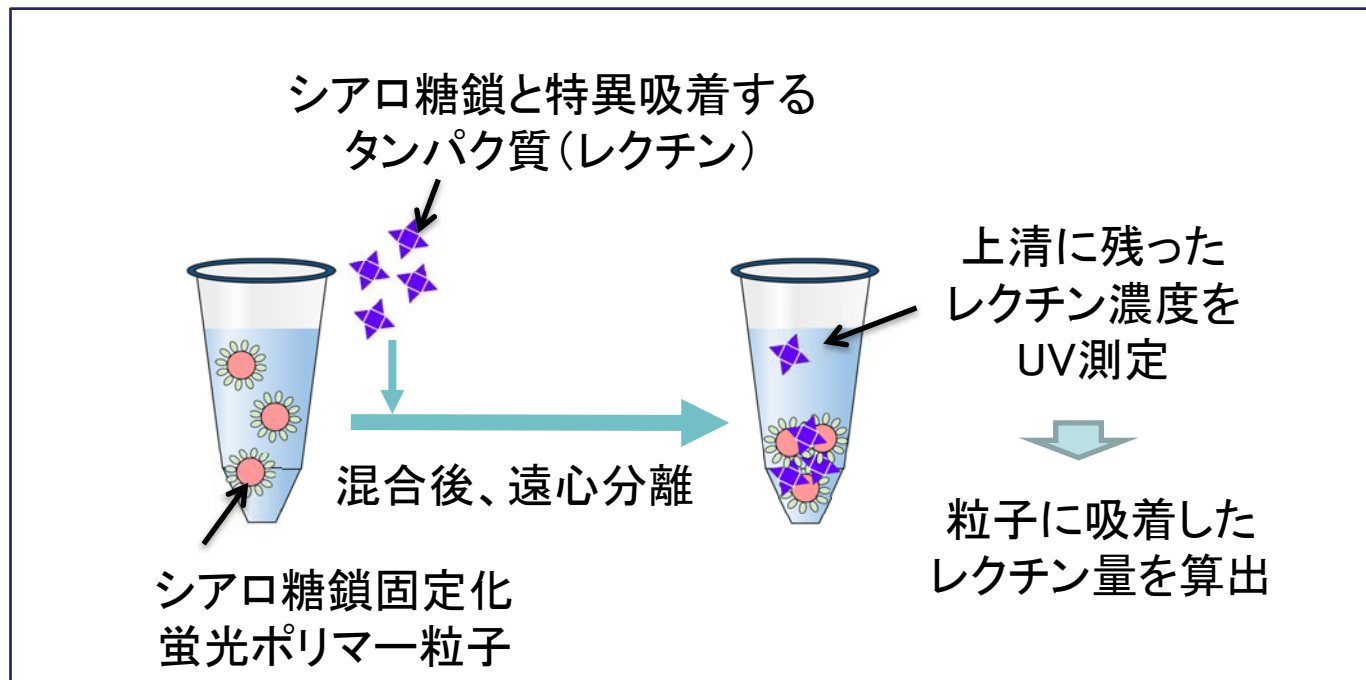
水中での分散性が良好  
蛍光検出も可能な粒子が形成

# 生成粒子表面への糖鎖固定化の評価

糖鎖と特異的に吸着するタンパク質(レクチン)で評価

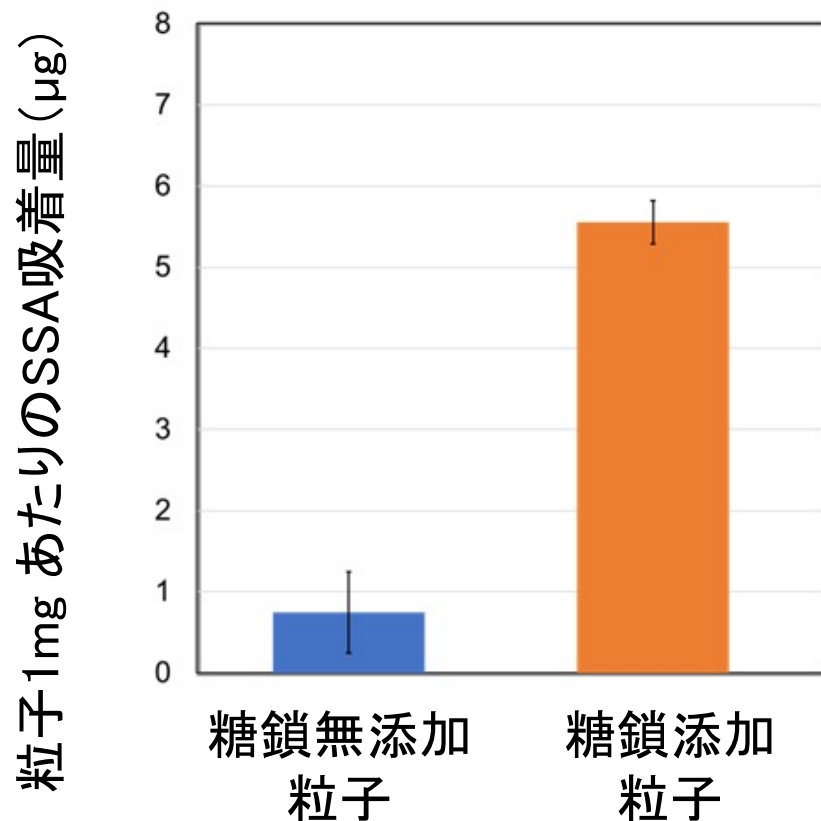
ニホンニワトコレクチン *Sambucus Sieboldiana* Lectin (SSA)

ヒト型インフルエンザウイルス認識シアロ糖鎖 ( $\alpha$  2,6結合型シアロ糖鎖) を認識するレクチン



# 生成粒子表面への糖鎖固定化の評価

糖鎖と特異的に吸着するタンパク質(レクチン)で評価



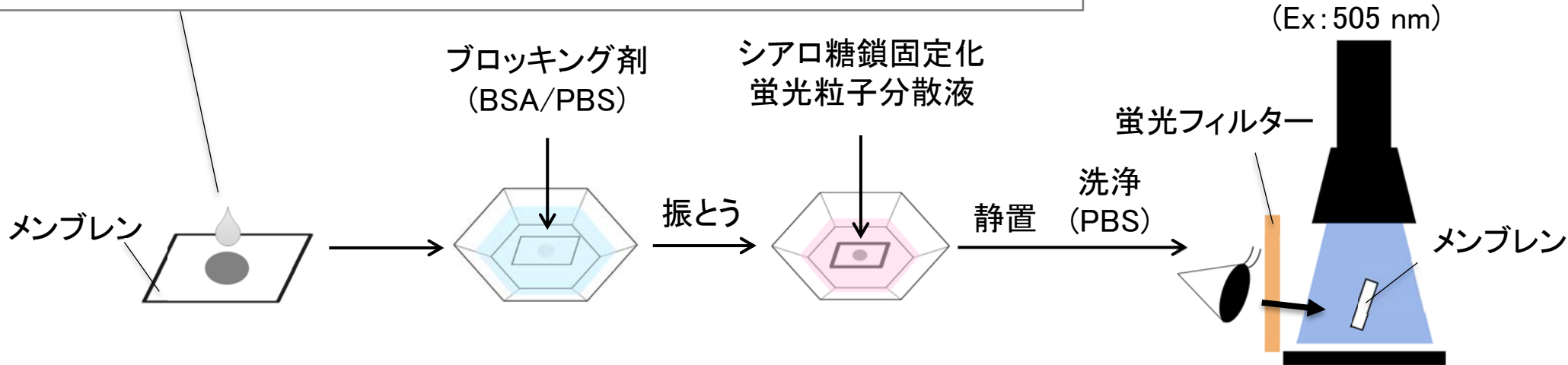
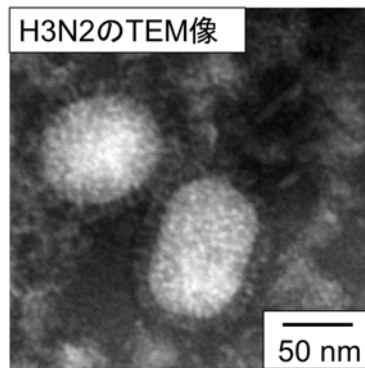
生成粒子表面への糖鎖固定化を確認

# 生成粒子のウイルス吸着能評価

不活化済みのインフルエンザウイルス

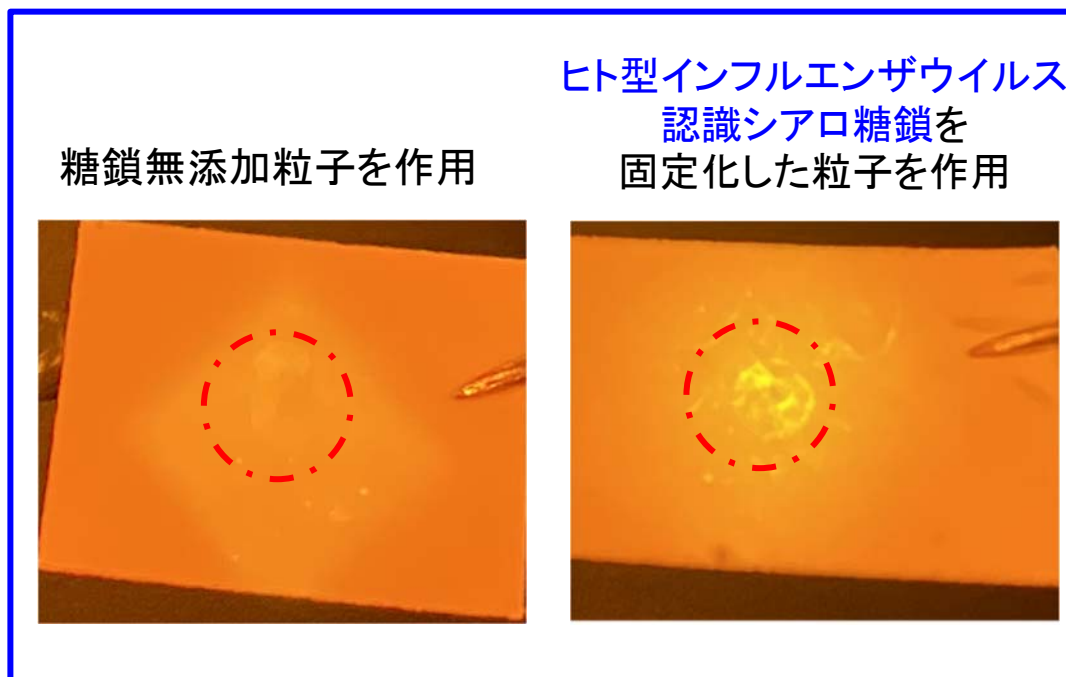
H3N2(ヒト型)、A/Panama/2007/99(PNM)  
(筑波大 川口敦史教授より提供)

H3N2のTEM像



# 生成粒子のウイルス吸着能評価

ヒト型インフルエンザウイルスを塗布したメンブレン



ウイルス塗布部に蛍光発光を確認



本研究で合成したシアロ糖鎖固定化ポリマー粒子が  
ウイルスを認識できることを確認



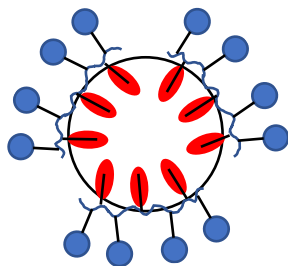
# まとめ

本特許技術： ポリマー粒子表面への機能性基(糖鎖など)の新規固定化技術

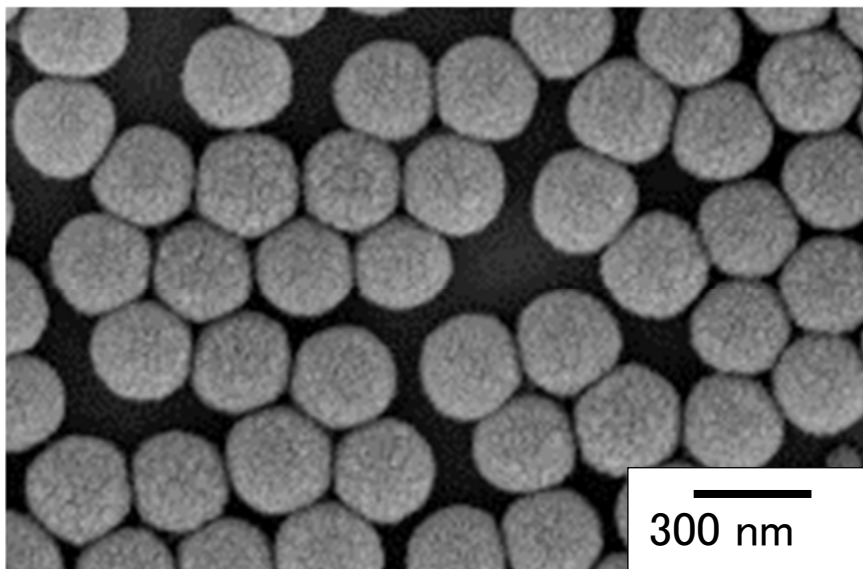
多数の機能性基を側鎖にもつ  
ポリマー鎖を利用

+

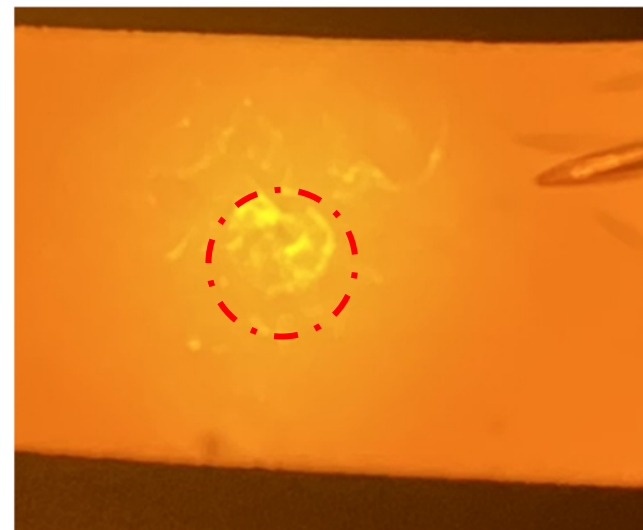
機能性分子のアンカー部分を、  
粒子内に埋め込んで固定化 (面で固定化)



粒径均一性の高い  
糖鎖固定化蛍光ポリマー粒子を合成



ウイルスと吸着している様子を  
蛍光検出できる



# 実用化に向けた課題

- 糖鎖固定化粒子を合成できたので、  
現在、この粒子を実用化するための道筋を検討中。  
(実用化の方向性の一つとして、「検出キット及び検出方法(特許出願中)」)
- 今後、糖鎖の種類を変えて、ヒト以外のインフルエンザウイルスや、  
インフルエンザ以外のウイルスや細菌などの検出に使える粒子も  
開発する。
- 用途に応じて、粒子内蛍光色素の種類や、  
粒径を変えることも検討。

# 企業への期待

- 体外診断薬の開発技術を持つ企業との共同研究を希望。
- 蛍光体を扱っている企業、蛍光検出機器を開発している企業との共同研究を希望。
- 人間の病気だけでなく、畜産業での利用も考えたい。  
(豚や鶏などの家畜の病気の検査)
- 下水疫学への適用も検討したい。  
(下水中のウイルスを検出するためのツールの開発)

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 糖鎖固定化ポリマー粒子及びその製造方法
- 出願番号 : 特願2021-105030  
→ PCT/JP2022/24625
- 出願人 : 茨城大学、福島大学
- 発明者 : 山内紀子、小林芳男、永塚実稚、尾形慎

# 産学連携に向けた経歴

- 2021年度、2022年度  
国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)  
AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム  
「糖鎖固定化蛍光ナノ粒子によるウイルス感染症診断の要素技術」
- AMED (国立研究開発法人日本医療研究開発機構) の革新的医療技術創出拠点  
令和3年度成果報告会 (2022年 2月22日)
- JST イノベーションジャパン2022 大学見本市 (オンライン開催) 出展予定  
「ウイルス感染症のパンデミック抑制のための体外診断薬 (糖鎖固定化粒子) の開発」  
(公開期間 2022年10月4日～10月31日)

# お問い合わせ先

茨城大学

研究・産学官連携センター(日立オフィス)

TEL 0294-38-7281

FAX 0294-38-5240

e-mail [chizai-cd@ml.ibaraki.ac.jp](mailto:chizai-cd@ml.ibaraki.ac.jp)