

SCES 法で作製された抗体固定化不織布の低分子量代謝物の分離・濃縮技術への応用

Application of the antibody-Immobilized fibermats, constructed by the SCES method,
to separation and concentration techniques of low molecular weight metabolites

助成年度 令和04年度研究助成
助成番号 MZR2022007
研究期間 2022/04/01 ~ 2023/09/30
代表研究者 水野 稔久 (Toshihisa Mizuno)
名古屋工業大学 大学院工学研究科 工学専攻

キーワード 不織布、抗体、低分子量代謝物、分子フィルター、トロンビン、ダビガトラン

1. 研究の背景と目的

血液や尿などに含まれる「低分子量代謝物」を指標に、疾病の罹患状況や遺伝子異常などを診断可能とする、メタボロミクスに関する大規模データ構築が進められている。今後は非侵襲的・簡便な診断手法として、これらデータの臨床現場での利用が一層進むと考えられるが、通常これら分子の体液中での含有濃度は μM 以下と低濃度のものが多い(図1)。臨床現場での簡便な診断技術として今後さらに展開させていくためには、通常のメタボロミクス解析で利用するような大規模な分析装置を用いることなく、ターゲットとなる複数の低分子量代謝産物を定量的かつ簡便に分離・濃縮可能となる要素技術開発が大事となる。

本研究では、特別な前処理がなくとも血液サンプルからバイオマーカーとなる特定の低分子量

代謝物を分離・濃縮可能とする、抗体固定化不織布の開発とその有効性の検証を行う。不織布は繊維集積体であり通液が可能のため、スピンカラムなどにセットし利用することを想定している(図2)。また具体的なデモンストレーションとしては、腎疾患患者に対するバイオマーカーとしてよく知られている、クレアチニン(図1)の分離・濃縮を検討した。

抗体固定化不織布は、我々がこれまでに確立している *in-situ* crosslinking during electrospinning (SCES)法とコアシェル紡糸技術の組み合わせによってコアシェル不織布のコア繊維内部に抗体分子が固定化されたものを利用する(図2)。従来からある固定化担体表面に蛋白質を固定化させる方法と異なり、SCES法を用いることで、不織布を構成する“水に不溶な”ナノ繊維の内部に抗体を変性させることなく固定化できる。またSCES法で作製される不織布のナノ繊維は、プロテアーゼなどの分子量が1万を超える高分子は繊維内部に浸透させない一方で、分子量1千以下の低分子量分子は容易に浸透させられる。したがって、夾雑物の影響を避けつつ体液サンプルから低分子量代謝物を分離・濃縮させるには、優れたプラットフォームと期待される。

本研究では、残念ながら予算の都合により血液や尿などからの抗体固定化不織布を用いた、低分子量代謝物の分離・濃縮に関する評価まではできなかったが、今後様々なリガンド結合蛋白質を用い

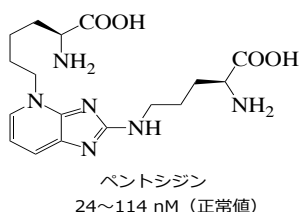
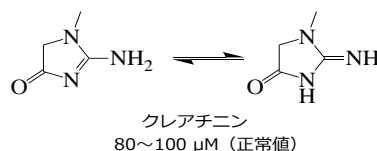


図1 腎疾患患者の診断に利用可能なバイオマーカーとして知られる低分子量有機化合物(クレアチニンとペントシジン)の例

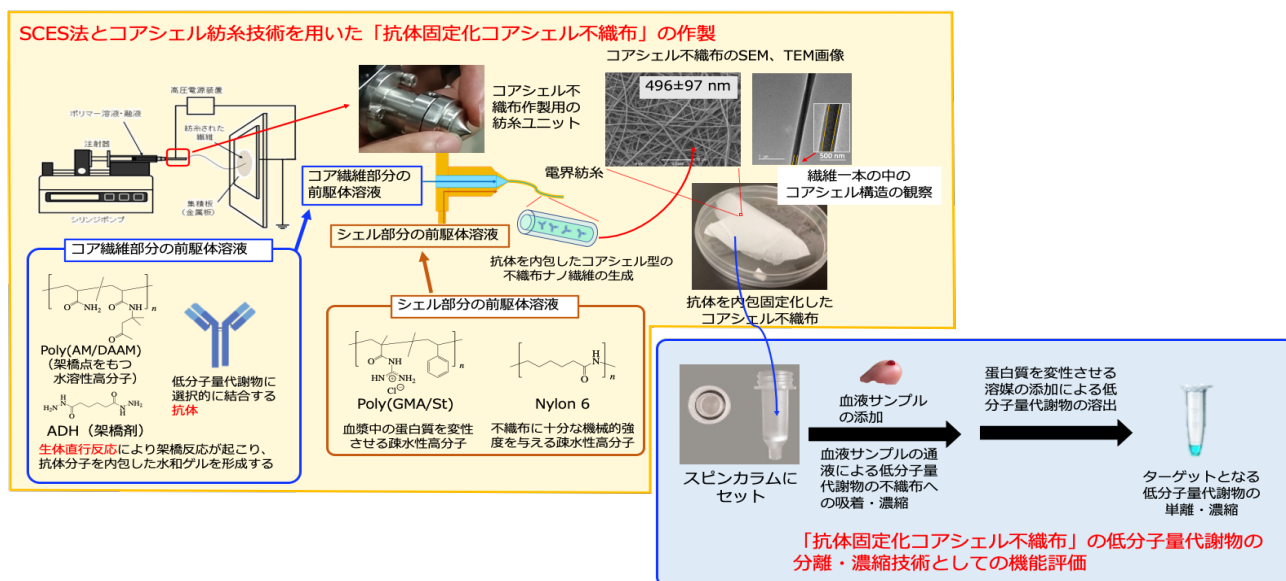


図2 抗体を内包固定化したコアシェル不織布の作成と、これを分子フィルターとして、用いた低分子代謝物濃縮技術への応用

た代謝物の分離・濃縮技術への発展を見越し、類似的結合定数を用いたリガンド結合蛋白質とリガンドのペア（トロンビンとダビガトラン）、あるいはそれよりも低い解離定数を持ったペア（ビオチンとアビジン）を固定化するリガンド結合タンパク質として用いた評価も行なった。クレアチニンと抗クレアチニン抗体間の解離定数は正確なデータは公開されていないものの、 $K_d \approx 1$ nMと示唆されており¹、これはトロンビンとダビガトラン（図3）の間の結合定数（ $K_d = 0.7$ nM）²と類似している。一方でビオチンとアビジンの間の解離定数は、 $K_d \approx 1$ aMと知られている。それぞれのリガンド結合蛋白質を固定化した不織布を作製し、ここにリガンドを結合、溶出させる際の吸着、溶出挙動の検討、さらにここに夾雑物が含まれる際の影響評価を行なうことは、回収対象となる代謝物をリガンド蛋白質を固定化した不織布型を用いて分離・濃縮する上で重要な設計指針を与える。

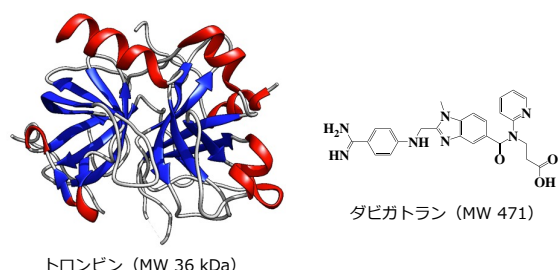


図3 トロンビン（左）とその阻害剤であるダビガトランの化学構造（右）

2. 研究の内容・方法

(1) Poly(HPMA/DAMA)の合成

不織布ナノ繊維のコア部分を構成する高分子部

材として、HPMAとDAMAをモノマーユニットとして持つコポリマー（図4）を新たに開発した。HPMA、DAMAの合成は既報^{3,4}に従って行い（図3）、高分子合成はフリーラジカル重合により行なった。

(2) 電解紡糸によるコアシェル不織布の作製

不織布繊維のコア部分の前駆体溶液として、25 wt% Poly(HPMA/DAMA)の100 mMリン酸緩衝液（pH 7）にADH（DAMAユニットに対して0.5 eq、図5(a)下）を添加したもの、シエル部分の前駆体溶液として10 wt% Nylon 6のTFE溶液を各々準備し、コアキシャルスピナレットを用いて電界紡糸は行なった。スピナレットからコレクターまでの紡糸距離は15 cmとした。トロンビンやアビジン、抗体を内包固定化したコアシェル不織布を作製する際には、コア部分の前駆体溶液に添加して用いた。

(3) SEM、TEM測定による不織布ナノ構造の評価

SEM測定では、表面をオスミニウムコート後、加速電圧3 kVにて測定を行なった。TEM測定では、電解紡糸を行なうときにスピナレットとコレクター間の空間にTEMグリッドをかざすことで不織布ナノ繊維を単独でグリッド上に捕集し、これを測定サンプルとして用いた。

(4) リガンド結合蛋白質を固定化したコアシェル不織布へのリガンド分子の結合評価、溶出条件の検討

作製された不織布を13 mmφの金属性ポンチで切り出し、これを10枚程度重ねてフィルターホルダー（Merck社製、スウィネクス35）へセットした。ここへペリスタポンプを用いて一定流速にて、リガンド溶液、あるいは溶出溶液を流すことで、リ

ガンド分子の結合と溶出挙動の評価を行なった。
(5) 蛍光ラベル化された IgG 抗体を内包固定化したコアシェル不織布の作製と共焦点顕微鏡観察による繊維内部での分布状況の評価

IgG 抗体を内包固定化した不織布の作製には、Alexa647-Goat Anti-mouse IgG 150 μ g をコア部分の前駆体溶液 2 mL に対して添加し、(2) と同様の方法にて不織布の作製は行なった。共焦点顕微鏡観察は、LSM880(Zeiss 社製)を用いて Alexa647 の蛍光発光を観測し、明視野観測で確認できるナノ繊維との位置関係を評価した。

3. 研究の成果

(1) 蛋白質固定化不織布の作製に必要とされる後架橋可能な高分子合成

不織布のコア繊維部分の部材として、ADH に2つ含まれるヒドラジドによる後架橋を可能とする2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド (HPMA) ベースの高分子 poly(HPMA/DAMA) (図5(a)) を新たに設計合成した。Poly(HPMA)は生体毒性の低い生体適合性の高い高分子として知られており、生体サンプルの分析過程で優位性が期待される。

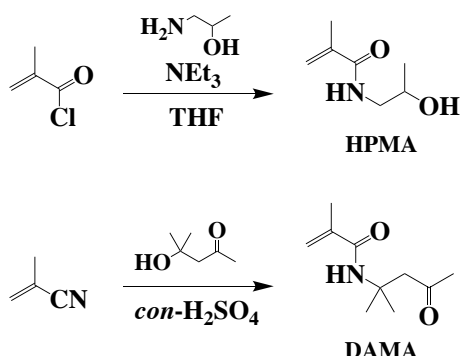


図3 poly(HPMA/DAMA)合成に必要とされる、各モノマーの合成スキーム

各種モノマー (HPMA、DAMA) の合成は、図3のスキームに従い行ない、poly(HPMA/DAMA)の合成は、HPMA、DAMA をモル比 4 : 1 で用いたラジ

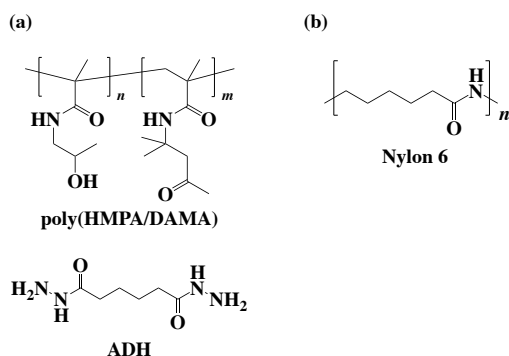


図4 (a) 不織布のコア繊維部分に用いる部材である後架橋可能な高分子 poly(HPA/DAMA)とこれに対して利用可能な二官能性架橋剤 ADH、(b) 不織布のシェル部分に用いた Nylon 6

カル重合により行なった。得られた高分子は GPC 分析より $M_n = 129$ kDa, 分子分散度 1.87 と分かった。一方で ¹H-NMR 分析から、モノマーユニット比は仕込み通りに HPMA/DAMA = 8/2 であることも確認された。

(2) コア繊維部分に poly (HPMA/DAMA)を用いた不織布の電解紡糸による作製とナノ構造評価

ここでは、シェル高分子として Nylon 6 を用いた不織布を用いた (図4(b))。Nylon6 をシェル成分として用いることで、不織布に対して十分な力学的強度を与えられるとともに、親水性の低分子であれば、十分な浸透性が得られることがわかっている。コアキシャルスピナレットを用いた電界紡糸を行うことにより、コアシェル不織布の作製は行なった。得られた不織布の繊維積層構造の観察は SEM 測定により行い 350 ~ 400 nm 程度の繊維径からなる不織布が得られることがわかった (図5左)。一方で繊維内部でのコアシェル構造の形成については TEM 測定により行なったが、シェル層の厚みは 35 nm 程度 (図5右) と十分に薄く作製できていることがわかった。この不織布繊維のナノ構造は、トロロンビン、IgG 抗体などをコア部分に内包して作製されたコアシェル不織布についても、維持された。

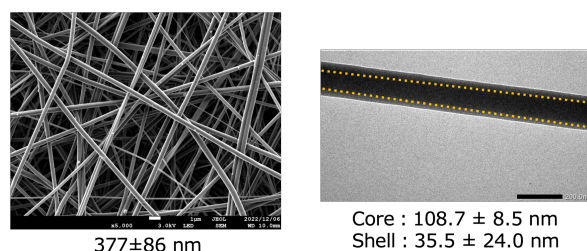


図5 コアシェル不織布の SEM 画像 (左) と TEM 画像 (右)

(3) トロンビン固定化不織布へのダビガトランの吸着・溶出挙動の検討

トロロンビンを固定化した不織布をポンチ (φ13mm) で円形に切り抜き、フィルターホルダーにセットした (図6)。不織布へのダビガトランの結合効率をペリスタポンプを用いて一定流速にて、決まった回数周回通液させる方法で検討した。濃度の異なるダビガトラン溶液 (10⁻⁶ M を 300 μ L、



図6 トロンビン固定化不織布のフィルター化 (13 mmφ) (左) とフィルターホルダーへのセット (右)

10^{-7} M を 3 mL) を 1.67 mL/min で 20 周通液後、蛍光測定により結合量の評価を行なった。その結果、いずれの濃度のサンプルについても 95%以上の回収が可能とわかった (図 7)。

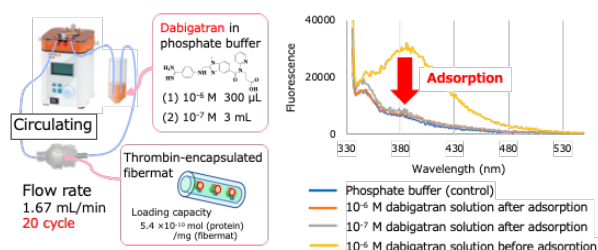


図 7 ペリスタポンプを用いた、トロンビン固定化不織布を用いたダビガトラン回収系のセットアップ (左) と、残留溶液の蛍光強度変化 (右)

次に、吸着されたダビガトランの溶出挙動を検討した。8 M ウレア水溶液、6 M Gdn HCl 水溶液、2M HCl 水溶液などを溶出液として検討したが、そのなかでは 6 M Gdn HCl 水溶液が最適であることがわかり、定量的な溶出が可能となることがわかった (図 8)。この結果は、 $K_d \sim 10^{-9}$ M のリガンド結合蛋白質を用いることで、 10^{-7} M 以上の濃度のリガンド溶液からであれば、リガンドの定量的な回収と溶出が可能となることを示唆した。

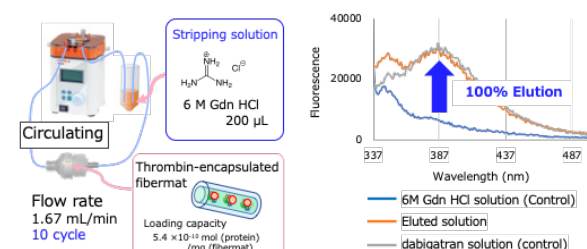


図 8 ペリスタポンプを用いた、トロンビン固定化不織布からのダビガトラン溶出系のセットアップ (左) と、溶出溶液の蛍光強度変化 (右)

(4) アビジン固定化不織布へのビオチンの吸着・溶出挙動の検討

(3) と同様な方法にて、アビジン固定化不織布を用いたビオチンの回収・濃縮を評価した。ここでは FITC で蛍光ラベル化したビオチンを用い、まずは濃度の異なるビオチン溶液 (10^{-7} M を 200 µL、 10^{-8} M を 2 mL) を 1.67 mL/min で 20 周通液後、蛍光測定により結合量の評価を行なった。その結果、95%以上の定量的な回収がトロンビンの場合と同様に可能であることがわかった (図 9 左)。一方で、吸着されたビオチンの溶出を 6 M Gdn HCl 水溶液を用いて検討を行ったが、この場合には全く溶出されなかった (図 9 右)。この結果は、リガンド結合蛋白質を固定化した不織布を用いて、リガンド (す

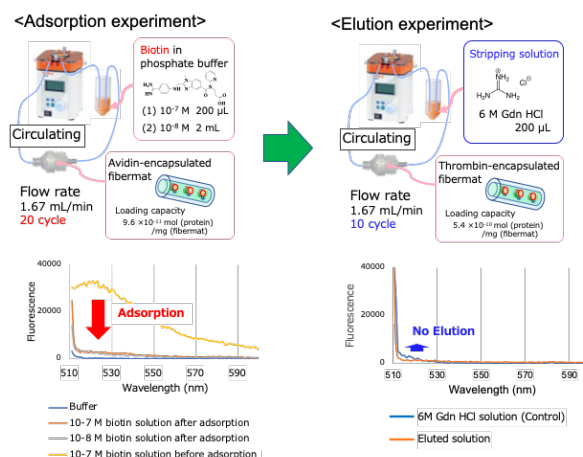


図 9 ペリスタポンプを用いた、アビジン固定化不織布によるビオチン溶液からのビオチンの回収 (左) と溶出 (右) の評価

なわち、標的とする低分子代謝物) の分離フィルターを作製する際には、ただ単に解離定数の高いリガンド結合蛋白質を用いれば良いというわけではないことを示唆した。

(5) トロンビン固定化不織布へのダビガトランの吸着・溶出過程における夾雑物の影響評価

(3) にて評価したダビガトランの溶液中からの回収過程において、体液中に含まれるクレアチニン を夾雑物として含む場合の影響評価を行なった。具体的には、 10^{-6} M のダビガトラン溶液に、夾雑物としてクレアチニンを 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M の濃度で添加したサンプルを準備し、この溶液からのダビガトランの吸着・溶出挙動を評価した。

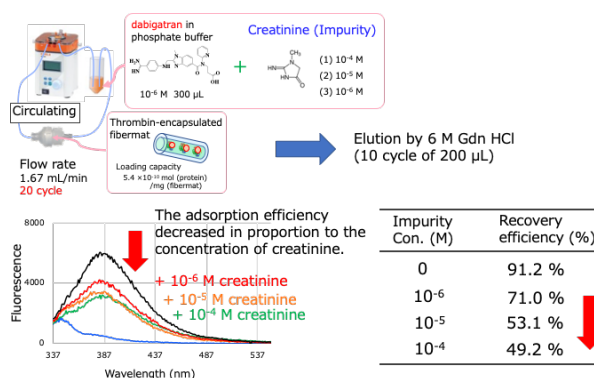


図 10 夾雑物として添加したクレアチニン (10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M) 共存下での、トロンビン固定化不織布を用いたダビガトラン (10^{-6} M) の回収評価

その結果、意外なことに夾雑物であるクレアチニンの存在によってダビガトランの回収率は大きく影響を受け (10^{-6} M のクレアチニン共存下で、ダビガトランの回収率が 70%程度まで低下した)、その効果はクレアチニンの濃度が高まるほど高くなった (図 10 右下)。たまたまトロンビンとクレアチニンが強い相互作用を起こすペアであったことで、本

来のリガンド結合性を邪魔した可能性も否定はできないが、この結果は、不織布の内部に浸透し得る夾雑物が測定サンプルに共存する場合には、その回収・濃縮過程に大きな影響を与えるがあることを示唆した。

(6) アビジン固定化不織布へのビオチンの吸着過程における夾雑物の影響評価

(4) において評価したビオチン溶液中からの回収過程についても、体液中に含まれるクレアチニンを夾雑物として含む場合の影響評価を行なった。具体的には、 10^{-6} M のビオチン溶液に、夾雑物としてクレアチニンを 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M 添加したサンプルを準備し、この溶液からのビオチンの回収率を評価した。

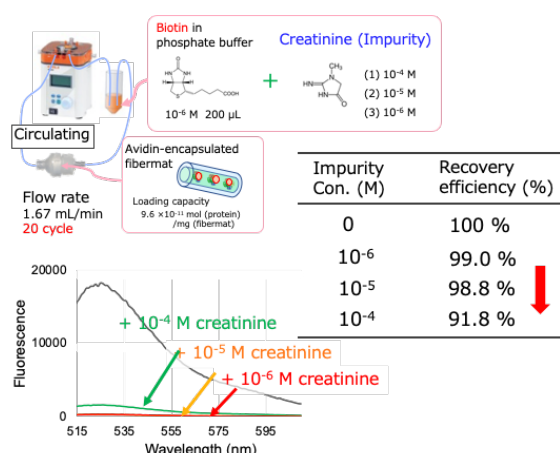


図 11 夾雑物として添加したクレアチニン (10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M) 共存下での、アビジン固定化不織布を用いたビオチン (10^{-6} M) の回収評価

その結果、この場合には、(5)におけるダビガトランの回収の場合と大きく異なり、 10^{-6} 、 10^{-5} M のクレアチニン共存下ではほとんど回収率に影響が見られず、 10^{-4} M の共存下でも 10% 以下の影響しか見られなかった。この結果は、十分な解離定数を持つリガンド結合蛋白質を用いることで、夾雑物の影響を抑えた、選択的な回収が可能となることを示唆した。

(7) IgG 抗体を繊維内部に固定化したコアシェル不織布の作製と繊維内での分布状況の評価

抗体の不織布への固定化とその繊維内での分布状況に関して、検討を進めた。なお Anti-クレアチニン IgG 抗体は非常に高価であったため (73,000 円/0.5 mg)、蛍光ラベルの入った二次抗体 (Alexa647-Goat Anti-mouse IgG) を用いて、まずは評価した。抗体固定化コアシェル不織布の作製についても、不織布作製に用いるコア部分の前駆体溶液に抗体分子を添加し同様な手順で電界紡糸を行

い、作製は行なった。

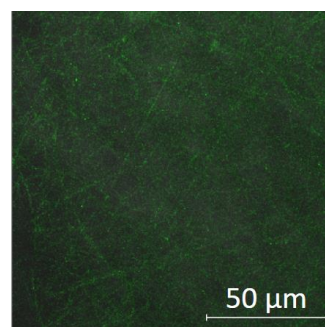


図 12 Alexa647-ラベル化した IgG 固定化コアシェル不織布の共焦点顕微鏡画像

抗体分子の繊維内部での分布状況は、共焦点蛍光顕微鏡観察により評価したが (図 12)、繊維形状に沿って抗体分子由来の蛍光発光が見られた。このことは、抗体分子が不織布繊維のコア部分に均一に内包固定化されていることを示している。

(8) Anti-クレアチニン抗体固定化不織布を用いたクレアチニンの吸着・溶出挙動評価

Anti-クレアチニン IgG 抗体を内包固定化した不織布を準備し (1.0×10^{-10} mol (protein) / mg (不織布))、これをフィルターホルダーにセットした。その後、ここへ 10^{-6} M のクレアチニン溶液を流した時の、上清溶液に残留するクレアチニン濃度を、Anti-クレアチニン IgG を用いて ELISA キットにより定量したところ、76% 程度の回収が可能であった。一方で、6M Gdn HCl を用いることで、この溶出も可能であった。不織布へのクレアチニンの回収割合については、不織布に固定化できた Anti-クレアチニン IgG 抗体の量が微量であることで、通常行う不織布から蛋白質を抽出することによる蛋白質の固定化量の定量ができず、見かけ減少している可能性がある。しかしいずれにしても、抗体を不織布に固定化することで、これに対応する低分子代謝物の回収と、溶出は可能であることがわかった。本来であれば、このクレアチニン溶液に、様々な夾雑物となる物質を含ませた際の影響や、血液サンプルからの直接の

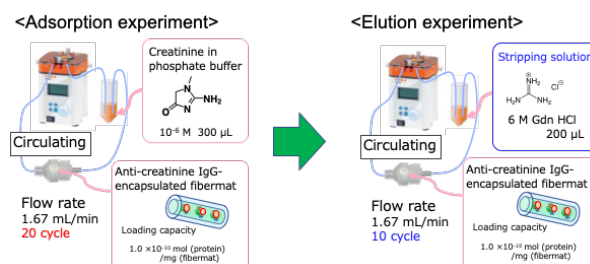


図 13 ペリスタポンプを用いた、Anti-クレアチニン IgG 固定化不織布を用いたクレアチニンの回収と溶出系のセットアップ

濃縮などを試せば良かったのであるが、そこまでの評価はできなかった。

4. 結び

抗体が非常に高価であったため、抗体を用いた代謝物の分離・濃縮に関する検討を、詳細なところまで議論することができなかったが、当初目的となる、我々の研究室で検討を進めている不織布型の蛋白質固定化担体に抗クレアチニン IgG 抗体を内包固定化することにより、そのリガンドとなるクレアチニンの溶液からの回収と溶出が可能と確認することに成功した。この結果は、他の代謝物に対応する IgG 抗体を固定化することによっても、同様に標的とする代謝物の回収が可能となることを示唆した。

一方で、リガンド結合蛋白質を固定化した不織布を用いた様々な代謝物の分離・濃縮においては、今後は抗体に限らず、様々なリガンド結合蛋白質の利用が考えられる。そこでどのような観点から結合蛋白質を選んだら良いのかの指針を得るため、異なる解離定数を持ったリガンド結合蛋白質/リガンドのペアを選択し評価を行なった。具体的には、トロンビンとダビガトランのペア ($K_d = 0.7$ nM)、アビジンとビオチンのペア ($K_d \sim 1$ aM) を用い検討を行なったが、トロンビンとダビガトランのペアの場合には、定量的なリガンド分子の回収と溶出が可能であった。一方でアビジンとビオチンのペアの場合には、回収は可能であったものの、種々溶出条件を検討したものの、リガンドであるビオチンの溶出は不可能であった。一方で、夾雑物の混じったリガンド溶液からの回収能評価として、異なる濃度 (10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M) のクレアチニン共存下で、それぞれのリガンド分子の回収を検討した。その結果、トロンビンとダビガトランのペアの場合には、 10^{-6} M のクレアチニン共存下においても、 10^{-6} M のダビガトラン溶液からのダビガトランの回収率に明らかな影響が見られた (30%程度の回収率の減少が見られた)。これに対して、アビジンとビオチンのペアの場合には、 10^{-4} M のクレアチニン共存下においても、 10^{-6} M のビオチン溶液からのビオチンの回収率は大きくは影響が見られなかった (10%程度の回収率の低下に抑えられた)。これらの結果は、ターゲットとする低分子代謝物の回収・濃縮技術として蛋白質固定化不織布を用いる場合には、利用に適した K_d の範囲があり、目的とするターゲット分子に従って、これを選択して利用することが大事であることがわかった。

5. 今後の研究方向性・課題

研究課題として掲げていた抗体を用いた低分子代謝物の分離・回収が可能であると証明できたことはよかった。しかし一方でこの研究を通して感じたこととして、十分量の低分子代謝物の回収・濃縮技術として実用化させていくには、やはりある程度の量のリガンド結合蛋白質の不織布への内包固定化が必要であり、コスト面を考えると抗体を利用するというのは、必ずしも適切ではないように感じた。したがって今後の研究展開の方向性としては、代謝過程に介在する合成酵素に対して化学的、あるいはアミノ酸変異で酵素活性を失わせた組換え蛋白質を準備し、これを不織布に内包固定化して利用する方法を考えている。一般に酵素分子と、基質分子の間の K_d は、 μ M 以下のものは必ずしも多くないためリガンド結合蛋白質の選択には注意が必要であろうが、これによりコスト面をクリアしつつ、様々な低分子代謝物の濃縮技術として発展させることを目指していきたい。

6. 参考文献

1. R. Arts, S. K. J. Ludwig, B. C. B. Gerven, E. M. Estirado, L.-G. Milroy, M. Merckx, *ACS Sens.*, **22**, 1730-1736 (2017).
2. W. G. Eisert, N. Haeu, J. Stangler, W. Wienen, A. Clemens, J. Ryn, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **30**, 1885–1889 (2010).
3. D. I. Hoke, *J. Polym. Sci. Part A-1*, **9**, 2949-2955 (1971).
4. M. F. Ebbesen, D. H. Schaffert, M. L. Crowley, D. Oupicky, K. A. Howard, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **51**, 5091–5099 (2013).

7. 論文・発表

1. 「SCES 法で作製されたトロンビン内包コアシエル不織布を用いた夾雑溶液からの酵素阻害剤の選択的単離・濃縮」
加藤 百々華、水野 稔久
第 72 回高分子学会年次大会、群馬、2023 年 6 月 25 日、ポスター発表

8. その他

研究期間の延長をお認めいただきありがとうございました。抗体を用いた評価は、予算的に様々な議論するのが難しかったのですが、リガンド結合蛋白質を用いた不織布ベースの分子分離担体作製における基盤となる知見が得られたことに、新ためて感謝申し上げます。