

論文の内容の要旨

氏名：阪本 美里

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題名：増幅機能を利用するバイオセンシング法の高度化に関する研究

第1章 序論

内部に水相を持つ球状の脂質二分子膜をリポソームと呼び、細胞膜と同様の構成であるため人工細胞として生体膜機能の研究に利用されてきた。またカチオンやアニオン、高分子など種々の分子を容易に内部に封入でき、リポソームの脂質二分子膜表面にも多様な機能を付加することができることから、ドラッグデリバリーシステムや免疫アッセイといった分野でも利用されている。免疫アッセイは酵素を用いる酵素結合免疫測定法 (ELISA 法) が汎用されている。しかしながら生体内の疾病に関連する分子は極微量でしか存在しない分子もある。それらを ELISA 法で計測する際は固相抽出や免疫沈降などの濃縮操作が必要であるが、操作の複雑化や回収率の低下といった課題がある。これらの課題の改善には分析装置自体を高感度化する、または検出される応答を増幅することが考えられる。そこで本論文では、リポソームをシグナル増幅に利用した、極微量の分子を定量する新たな高感度免疫アッセイ法の構築を目的とした。第2章では、リポソームの内外で pH 勾配を付加し、溶液中で免疫凝集および一価のカチオンチャネルであるグラミシジンの包埋を行い、ガラス基板上に免疫沈降させて測定する方法を検討した。リポソームには pH 感受性蛍光色素 (BCECF) を封入した。pH 勾配によりグラミシジンチャネルをプロトンが透過し、BCECF の蛍光強度が増加する。この蛍光強度はアナライト濃度に依存しており、1 分子の応答をチャネルを透過する無数の H^+ イオンに変換し増幅する。第3章では、巨大単層リポソーム (GUV) を用いて免疫アッセイのマーカーとする方法を検討した。GUV は第2章で用いたリポソームと比較すると非常に大きな内水相を有している。そのため、大量のマーカー分子を封入でき、免疫アッセイの高感度化が可能であると考えられる。第4章では各章で得られた結果を総括した。

第2章 高感度蛍光リポソーム免疫アッセイの構築

リポソームは免疫アッセイのシグナルを増幅する有用なツールである。リポソーム免疫アッセイでは内水相にマーカー分子を封入し、免疫アッセイを行った後に界面活性剤などで溶解してから漏出したマーカーを計測する。しかし、この方法では各段階で結合したものと遊離のものを洗浄によって除去する、いわゆる B/F 分離をしなければならなかった。一方申請者の所属する研究室では、リポソームを溶解せずに直接測定することが可能なリポソームアレイが開発された。リポソームアレイは B/F 分離を必要とせず、操作を簡略化することが可能である。しかし、リポソームアレイの検出下限は数十 ng/mL であるため、数 pg/mL で存在する生体分子に対しては、より高感度化する必要があった。第2章ではグラミシジンによるシグナル増幅に加え、免疫凝集および免疫沈降の機能を組み込んだ高機能化リポソーム免疫アッセイの構築を目的とした (この分析方法を GIPA 法と命名した)。pH 勾配を付加した BCECF 封入リポソームを溶液中で免疫凝集およびグラミシジンの包埋を行い、ガラス基板上に免疫沈降させて測定する。免疫凝集によりアッセイに関与するリポソーム数を増加させ、免疫沈降ではアナライトの濃縮を促進する。GIPA 法では痛覚に関する神経伝達物質であるサブスタンス P の検出限界は 0.32 pg/mL ($S/N=3$) であり、以前のリポソームアレイよりも約 10^4 倍検出下限が優れていた。ヒト血清中に存在するサブスタンス P は血清タンパク質と非特異的に結合しているため、固相抽出などの前処理によって回収率が低下し正確な濃度の測定が困難となる可能性が示唆されている。GIPA 法を用いて希釈のみ行ったヒト血清を測定した結果、健康人の血清中に含まれるサブスタンス P 濃度と同程度であった。この結果は市販されている競合 ELISA 法での定量結果と一致していた。また、毒素であるストレプトリジン O の測定も可能であった。通常ストレプトリジン O は感染後に抗体が増加してから抗体量を定量するため、直接抗原を測定できる GIPA 法は感染症の診断に有用であると示された。

第3章 ジャイアントリポソームを用いた蛍光イムノアッセイの構築

第2章で使用したリポソームは多重膜リポソームで複数の脂質二分子膜から構成される。一方、1枚の脂質二分子膜で構成されるリポソームは、直径数10 nm以下のリポソームは小さな単層リポソーム (SUV)、直径100~1000 nmのものを大きな単層リポソーム (LUV)、直径1000 nm以上のものをGUVと呼ぶ。GUVは内水相の体積が非常に大きく、LUVの約 1.5×10^6 倍の分子を封入可能である。この大きな内水相をバイオセンシングに利用すれば、分析法のシグナルが増幅され高感度化が期待されるが、GUVをバイオセンシングに応用した研究は限られた例しかない。そこで第3章では、GUVをマーカーとした蛍光イムノアッセイの構築を目的とした。蛍光色素 (R6G) を消光濃度で封入したGUVに抗体を修飾し、抗体を修飾したガラス基板上でサンドイッチイムノアッセイを行う。過剰な試薬はフローシステムによって除去し、GUVを界面活性剤で溶解すると蛍光強度が上昇する。まず抗体を修飾したGUVを回収する方法を検討した。牛血清抗体 (anti-BSA antibody) を修飾したR6G封入GUV (anti-BSA-R6G-GUV) を14,000 gで30分間遠心分離した。遠心分離後の上層と下層について0.1 mg/mLの牛血清 (BSA) 存在下でアッセイを行った結果、蛍光強度の増加率は約32%であり上層の溶液よりも高かったため、多くのGUVが下層に存在していると判断した。この手法では過剰なアミンカップリング剤や未反応の抗体、GUVに封入されなかったR6G、未反応のR6G-GUVは回収液中に含まれたままである。しかし、ガラス基板上でのanti-BSA-R6G-GUVを固定した後の洗浄操作でこれらの化合物は除去される。洗浄開始直後 (0分) および6分後の顕微鏡画像の観測により、外水相の過剰な色素が洗浄されたことを確認した。BSA 0 mg/mLでのTritonX-100添加前後の蛍光強度を測定したところ、蛍光強度に有意な差は無かった。また、GUVを使用せずに架橋試薬とanti-BSA antibodyを混合した溶液を遠心分離した際の下層をアッセイし影響を調べた (negative control)。蛍光強度の増加率はほとんど0%で、残存したままの試薬はアッセイに影響しないことが明らかとなった。したがって蛍光測定の前に行う洗浄操作は妨害物質の除去において効果的であった。BSAの濃度依存性について調べた結果、 $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-12}$ g/mLの範囲でBSAの濃度に依存して蛍光強度の増加率は上昇し、検出限界は4 fg/mL ($S/N=3$)であった。リポカリンファミリーのLCN2についてもBSAと同様に濃度依存性を調べたところ、 $1.0 \times 10^{-13} \sim 1.0 \times 10^{-11}$ g/mLの範囲で蛍光強度の増加率は上昇し検出限界は80 fg/mL ($S/N=3$)であった。本方法を50000倍希釈 (最終希釈倍率) のヒト血清に応用した。LCN2を添加していない場合は0.84 pg/mL、1 pg/mLのLCN2を添加 (spike) した場合は1.9 pg/mLと検量線から算出された。また回収率は $106 \pm 30\%$ ($n=3$)であり許容範囲内であった。ELISA法の結果はこれより低い値であったが、血清中でのLCN2の単量体、ホモまたはヘテロ二量体という形状の違いにより、市販されているイムノアッセイキットは影響されるためであると考えられる。以上のことから、抗体を修飾し、蛍光色素を封入したGUVsをマーカーとして使用することでサンドイッチ型イムノアッセイの高感度化が達成された。

第4章 総括

本論文では、シグナル増幅のツールとして蛍光色素を封入したリポソームを用いることで、新たな高感度リポソームイムノアッセイを構築できることを示した。信号の増幅はイオンチャネルおよび免疫凝集を用いる方法と巨大リポソームを用いることで行った。第2章では、pH感受性蛍光色素であるBCECFを封入したイムノリポソームとアナライトによる免疫凝集およびイオンチャネルであるグラミシジンの包埋、ガラス基板上に免疫沈降させることでイムノアッセイの高感度化が可能なことを示した。第3章では、GUVに蛍光色素を消光濃度で封入し、ガラス基板上でサンドイッチ型のイムノアッセイを行った後に、界面活性剤でGUVを溶解し蛍光強度を測定することでシグナルが増幅される高感度なリポソームイムノアッセイを構築した。第2章および第3章で構築したイムノアッセイはどちらもfg/mLオーダーの検出限界を有しており、従来のリポソームイムノアッセイやELISA法よりも優れた検出感度であった。また、ヒト血清での測定においては希釈して測定できるため、サンプルの使用量を抑えることができる。ELISA法と比較すると、シンプルかつ短時間でアッセイ可能であることから、疾病の早期発見に有効な分析法であると考えられる。その一方で、GUVがイムノアッセイに用いられている研究は非常に少ない。本研究で示されたように、GUVをイムノアッセイに取り入れることで感度が向上すると考えられる。本論文で開発したイムノアッセイがGUVのバイオセンサーに活用されていくことを期待する。

業績リスト

基礎論文

1. Highly sensitive and rapid assay of substance P and streptolysin O in human serum using immuno-liposomes and gramicidin channels. **Misato Sakamoto**, Atsushi Shoji, Masao Sugawara.
Anal. Sci., **29**, 877-883 (2013).
2. Giant unilamellar vesicles containing rhodamine 6G as a marker for immunoassay of bovine serum albumin and lipocalin-2. **Misato Sakamoto**, Atsushi Shoji, Masao Sugawara.
Anal. Biochem., **505**, 66-72 (2016).

関連論文

3. Pore-forming compounds as signal transduction elements for highly sensitive biosensing. Masao Sugawara, Atsushi Shoji, **Misato Sakamoto**.
Anal. Sci., **30**, 119-128 (2014).
4. Visual assay of total iron in human serum with bathophenanthroline disulfonate-accommodated MCM-41. **Misato Sakamoto**, Keita Hizawa, Manabu Hosaka, Masao Sugawara.
Anal. Sci., **32**, 241-244 (2016).

口頭発表

1. 論文題名：グラミシジンを包埋したイムノリポソーム凝集体によるサブスタンス P の超高感度蛍光イムノアッセイ
発表者：○阪本 美里, 東海林 敦, 菅原 正雄
学会名：日本分析化学会第 60 年回
開催場所：名古屋大学東山キャンパス
発表年月日：2011 年 9 月 15 日
2. 論文題名：バソフェナントロリンスルホン酸封入 MCM-41 を用いる血清鉄の目視分析法の構築
発表者：○阪本 美里, 菅原 正雄
学会名：第 75 回分析化学討論会
開催場所：山梨大学甲府キャンパス
発表年月日：2015 年 5 月 23 日
3. 論文題名：ジャイアントリポソームをマーカーとして用いるイムノアッセイの基礎検討
発表者：○阪本 美里, 菅原 正雄
学会名：日本分析化学会第 64 年回
開催場所：九州大学伊都キャンパス
発表年月日：2015 年 9 月 11 日