

平成 28 年度

博士学位論文

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

日本大学大学院 総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

阪本 美里

目次

第 1 章 序論.....	1
1-1 生体内の増幅機能と分析化学における増幅.....	1
1-2 リポソーム.....	1
1-3 イムノアッセイ.....	2
1-4 リポソームによるバイオ分子の分析	3
1-5 本論文の目的	6
第 2 章 高感度蛍光リポソームイムノアッセイの構築	8
2-1 緒言	8
2-2 実験	11
2-2-1 実験試薬.....	11
2-2-2 装置	12
2-2-3 Fab' フラグメントの調製.....	12
2-2-4 イムノリポソームの作製.....	12
2-2-5 ガラス基板への anti-sub P の修飾	15
2-2-6 Anti-sub P-リポソームおよびグラミシジンをを用いた sub P のアッセイ方法	16
2-2-7 ヒト血清アルブミンによる妨害の確認	16
2-2-8 血清中サブスタンス P 濃度の定量.....	17
2-2-9 競合エンザイムイムノアッセイキットでのサブスタンス P の定量	17
2-2-10 スレプトリジン O の定量	20
2-3 結果および考察	21
2-3-1 イムノリポソームの濃度の最適化	21
2-3-2 免疫凝集体の形成とガラス基板への固定化.....	23
2-3-3 pH 勾配がもたらす蛍光強度への影響	25
2-3-4 Sub P の検量線および検出限界の算出.....	27
2-3-5 血清成分による応答の妨害.....	30
2-3-6 血清中の sub P の定量.....	31
2-3-7 競合エンザイムイムノアッセイキットでの sub P 定量の比較.....	34
2-3-8 スレプトリジン O の定量	36
2-4 まとめ	39
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	40

3-1 緒言	40
3-2 実験	43
3-2-1 実験試薬	43
3-2-2 装置	44
3-2-3 R6G を封入した GUV の作製	44
3-2-4 Immuno-GUV の作製	45
3-2-5 ガラス基板への抗体の固定化	46
3-2-6 イムノアッセイ	47
3-2-7 血清タンパク質による応答への影響	49
3-2-8 ヒト血清中の LCN2 の定量	49
3-3 結果および考察	50
3-3-1 GUV 内水相への R6G の封入	50
3-3-2 GUV の機能化と回収	52
3-3-3 Immuno-GUV のガラス基板への固定時間	54
3-3-4 過剰な試薬のイムノアッセイへの影響	55
3-3-5 BSA の濃度依存性	57
3-3-6 LCN2 の濃度依存性	59
3-3-7 イムノアッセイの選択性	61
3-3-8 ヒト血清中の LCN2 の定量	62
3-4 まとめ	64
第 4 章 総括	65
参考文献	68

第1章 序論

1-1 生体内のシグナル増幅機能と分析化学における増幅

生体細胞にはイオンチャネルと呼ばれる膜貫通型のタンパク質が存在している。イオンチャネルは特定のイオンを選択的に透過させて細胞間の情報伝達を行っている。例えば神経細胞では軸索の末端から神経伝達物質が放出され、シナプス後細胞にあるリガンド依存性チャネルに神経伝達物質が結合すると、チャネルが開閉しイオンの流入が起こる。1分子の神経伝達物質を多数のイオンに変換して情報伝達が行われている。酵素は特定の基質と相互作用して大量の生成物を生じる。細胞内のカスケードにおいて、酵素反応生成物が次の段階の反応を連続的に活性化する。この連鎖的な酵素反応により、最初の反応が増幅されて情報伝達される。また、Gタンパク質と呼ばれるタンパク質ファミリーも情報伝達・シグナル増幅機能を有している。グアノシン 5'-三リン酸 (GTP) やグアノシン 5'-二リン酸 (GDP) と特異的に結合し、GTP を GDP に加水分解する酵素活性を持つタンパク質の中で、細胞外シグナル分子が結合すると細胞膜上の受容体と共役しシグナル伝達を行うものを指す。細胞外シグナル分子の結合により Gタンパク質は活性化され、イオンチャネルや細胞膜に結合した酵素を活性化させる。

上述のような信号の増幅は、分析化学、特に物質の検出において高感度を達成するために有用と考えられる。例えば、疾病に関連のある生体分子（バイオマーカー）を計測することは疾病の診断や病後の経過観察に有効である。様々なバイオマーカーが確認されており、生体内の濃度がごく微量である分子も存在する。低濃度のバイオマーカーを測定するには高感度な分析法が必要となる。そのための方法として分析信号を増幅することが考えられる。応答を増幅させるためにはチャネルの情報変換／増幅能の利用や酵素や人工細胞（リポソーム）の利用が有効である。酵素は1分子を多数の生成物に変換し、リポソームは多量のマーカーを内封できるためである。

1-2 リポソーム

1965年、Banghamらはリン脂質を水中に分散させると自発的に集合し、閉鎖小胞を形成することを発見した [1](Fig. 1-1)。この閉鎖小胞は後にリポソーム (liposome) と呼ばれる、内部に水相を持つ球状の脂質二分子膜であった。生体膜はそのほとんどがリン脂質で構成されていることから、リポソームを生体膜の

モデルとして相転移や相分離、膜タンパク質の再構成などの研究が盛んに行われてきた。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。このような特長からリポソームは生体膜機能解明のような基礎的研究のみならず、免疫アッセイやドラッグデリバリーシステム (DDS) などの医療分野での応用研究においても有用性を示している。

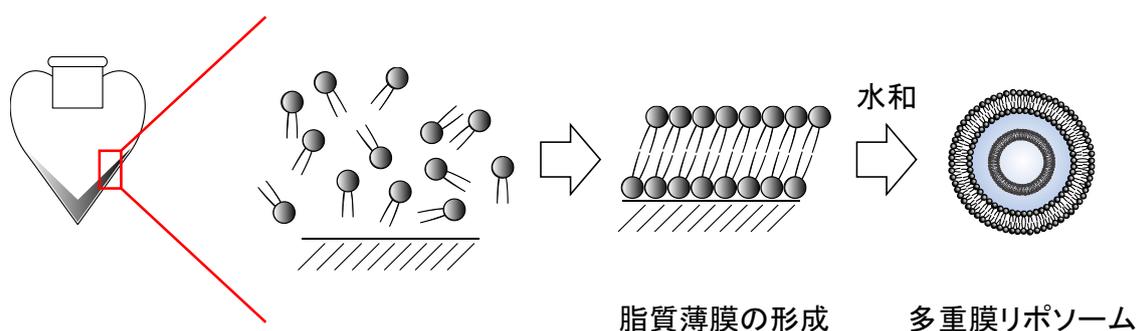


Fig. 1-1. リポソームの形成の模式図

1-3 イムノアッセイ

抗原抗体反応を基盤とした免疫アッセイの研究は 1959 年の Yalow と Berson によるインスリンのラジオ免疫アッセイ (radioimmunoassay, RIA) から始まる [2, 3]。彼らはヨウ素の放射性同位体 I^{131} を標識し、血中のインスリンを検出した。1971 年には放射性同位体の代わりに酵素を使用した酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) および酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) が発表された [4, 5]。RIA や ELISA の開発により、生体物質の検出感度や精度は飛躍的に向上した。現在 ELISA は臨床検査の分野において汎用されており、普遍的な分析方法となっている。

今日、免疫アッセイ技術の研究は世界中で行われ、RIA・ELISA に代わる免疫アッセイも盛んに研究されている。ICP 質量分析法 (ICP-MS)、水晶振動子マイクロバランス (QCM)、表面プラズモン共鳴 (SPR)、ナノ粒子や PCR を利用した免疫アッセイも開発されている [6-10]。ICP-MS やナノ粒子、PCR を利用すると ELISA に比べて感度が向上する。ELISA は抗体や抗原に酵素を標識し呈色試薬で発光させて定量するが、QCM および SPR は質量変化を周波数や光の強さに変換して観測する。そのため、ラベル化することなくリアルタイムでの分析が可能である。

また RIA および ELISA には競合法 (competitive immunoassay) とサンドイ

ツチ型イムノアッセイ (sandwich-type immunoassay) が存在する (ただし、ELISA には直接吸着法という手法もある)。競合法は未標識抗原と標識抗原を含む溶液を使用し、それぞれがどの割合で固定した抗体に結合するかを測定する。この時、標識抗原の量はわかっていることから未標識抗原の量が判明する。サンドイッチ型イムノアッセイは支持体に固定した抗体に結合した抗原に、さらに標識した抗体を結合させて測定する。測定した標識抗体の量が知りたい抗原の量と見積もられる。RIA は 1965 年頃から、ELISA のサンドイッチ型は 1970 年代に発表された [11]。サンドイッチ型イムノアッセイは競合法と比較すると、高い特異性や低い交差反応性、広い測定範囲といった特長を有している [12]。また、競合法は抗体の量が全抗原量より少なくてはいけない。全抗原量より抗体の量が多いとすべての抗原が抗体に結合してしまうためである。一方、サンドイッチ型イムノアッセイでは全ての抗原が抗体に結合できることが望ましい。抗原が全ての抗体に結合しているということは、結合できなかった抗原が存在することを示している。これでは全ての抗原の量を知ることができないため、正確な抗原量を測定することが不可能となってしまう。サンドイッチ型イムノアッセイは現在でも研究が進められており、電気化学ルミネセンス (electrochemiluminescence, ECL) で測定する方法やアガロースを支持体を使用する方法、ナノ粒子に抗体を修飾した方法もある [13–15]。ECL を用いたサンドイッチ型イムノアッセイは感度および回収率に優れ、Sloan らはグルカゴンを測定し、定量限界は 0.14 pM と非常に高感度であった [13]。また、アガロースをマイクロプレートに結合させてヒトフェチュイン A (human fetuin A, HFA) を迅速に定量できる方法を Vashist らは提案した [14]。アガロースを用いることで HFA 抗体をキャプチャーする表面積が増加したためシグナルが増幅された。その結果 30 分以内でアッセイが可能となり、従来の ELISA の約 14 倍も速かった。ナノサイズの構造を抗体にラベルしたサンドイッチ型イムノアッセイも近年増えており、Pei らによると 2002 年から 2011 年の 10 年間で発表された論文は約 1000 件増加した [15]。通常の ELISA は一つの抗体に一つの抗原しか結合できないため検出できるシグナル強度には限界がある。これは立体障害が原因である。一方、ナノマテリアルは体積に対する比表面積が大きく、固有の伝導率を持つなどの利点を有している。そのため、目的に合わせた設計や制御ができる可能性がある。

1-4 リポソームによるバイオ分子の分析

生体内には極微量にしか存在しないが、重要な生理機能を担っている物質も少なくない。例えばサイトカインの一つであるインターロイキン (IL-2) は 0.5

pg/mL、強力な血管収縮作用を持つエンドセリン (ET-1) は 1.5 pg/mL 程度である [16]。またそれぞれ炎症反応や慢性腎不全のバイオマーカーとして期待されている。これらは通常 ELISA 法で定量するが、前処理として固相抽出や免疫沈降法などにより濃縮する場合がある。このような前処理操作は試料からアナライトが失われ、正確な濃度の定量が困難になってしまうと考えられる。そのため前処理を行わずに測定するためには分析方法を高感度化することが重要になってくる。

リポソームの応用研究は化粧品や DDS などの分野にも広がっているが、中でもバイオ分子を計測する研究に盛んに使用されている。1-2 で述べたように、リポソームは幅広い種類の物質を大量に封じ込めることが可能である。さらにリポソームの二分子膜には架橋試薬を用いることで表面を修飾することができる。つまり、リポソームをシグナルトランスデューサーや信号増幅器として使用することができ、分析方法の高感度化が達成される。そのためリポソームの内水相に蛍光色素や電気活性物質を封入し、免疫アッセイに組み込んだ分析方法が多数報告されている [17]。Calcein や carboxyfluorescein (CF) のような蛍光色素を自己消光する濃度で封入したり、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を用いた信号増幅方法は均一免疫アッセイにおいて効果的である。蛍光色素を消光濃度で封入した免疫アッセイでは検出する際に、補体やメリチン、ホスホリパーゼなどによってリポソームを溶解または不安定化する。これによりリポソーム内に封入されていた蛍光色素が漏れ出し、蛍光強度が増強される。例えば Ishimori らは血清中のフェリチンを定量するリポソーム免疫アッセイを開発した [18]。彼らは CF を消光濃度で封入したリポソームにフラグメント化したモノクローナル抗体を結合させフェリチンと反応させた。その後、補体で溶解しプレートリーダーで蛍光強度を測定した。10~1000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で測定可能で、RIA との相関性は優れていた ($r=0.98$)。

リポソーム結合免疫吸着測定法 (liposome-linked immunosorbent assay, LISA) は酵素の代わりにマーカーを封入したリポソームを使用する ELISA 様のアッセイ方法である (Fig. 1-2)。LISA は競合型とサンドイッチ型の2種類ある。競合型では、アナライトを標識した蛍光色素封入リポソームとアナライトを支持体に固定した抗体に競合的に結合させる (Fig. 1-2a)。界面活性剤によって漏出した蛍光色素の蛍光強度はアナライト濃度に反比例する。除草剤の atrazine を定量したアッセイでは検出下限は 0.13 ng/mL であり、ELISA より約 70 倍優れていた (ELISA の LOD ; 10 ng/mL)[19]。サンドイッチ型 LISA は支持体に固定した抗体にアナライトを結合させ、そこに二次抗体を修飾したリポソームを結合させて免疫複合体を形成する (Fig. 1-2b)。これを溶解して漏出したマーカー

を測定することでアナライト濃度に比例した応答を検出できる。Edwards らは蛍光色素であるスルホローダミン B を封入したリポソームを用いて α -thrombin の定量を行った [20]。検出限界は 2.35 ng/mL で、これは Edwards らが以前発表したサンドイッチアプタマーアッセイよりも約7倍優れていた (16.5 ng/mL)。

さらに、リポソームは電気化学的なイムノアッセイにも応用されている。電気化学は感度が良く、速い応答、簡便な分析技術であるために、センサーの分野で汎用されている。電気化学測定にはいくつかの利点がある。まず、電気化学シグナルは素早く簡単に測定できるので安定した感度の高いシグナルを得ることができる。また、電気化学的な装置は大きな検出器を必要としない。つまり、小型化して持ち運び可能なセンサーを作ることができる。そのため、リポソームに電気活性物質を封入したバイオセンサーが構築されてきた。フェロシアン化カリウムやフェロセン、アスコルビン酸などをリポソームに封入し、*Cholera toxin* や *carcinoembryonic antigen (CEA)*、*prostate specific antigen (PSA)* を定量した [21–23]。いずれの研究も電極上に抗体を固定化してその場でイムノアッセイを行い、界面活性剤でリポソームを溶解して電氣的シグナルを検出する。検出限界はそれぞれ、0.1 fg/mL、1 pg/mL、7 pg/mL と非常に高感度であった。このように、リポソームを用いるイムノアッセイ法は内封した蛍光色素や電気活性物質によってシグナルが増幅されるため、高感度および低い検出限界を有している。

信号増幅器としてイオンチャンネルやメソポーラスシリカを利用した研究もされている。Nishio らはテフロンフィルム上の細孔に作製した平面脂質二分子膜にイオンチャンネル物質であるグラミシジンを包埋したバイオセンサーを構築した [24]。グラミシジンは一価のカチオンを透過することができ、一分子の応答を多数のイオン (検出信号) に情報変換できるために応答が増幅される。彼らはチャンネルとレセプター能を分離し、積分電流値をシグナルとするセンサーを開発した。これにより、それまでの研究では nM オーダーの感度であったが、pM オーダーの検出が可能となった。また、Takeuchi らはメソポーラスシリカの MCM-41 を用いたセンシング法を開発した [25]。MCM-41 は細孔が規則的に配向したヘキサゴナル構造を有しており、重量に対する比表面積・体積が非常に大きい。この MCM-41 細孔内に蛍光色素を取り込み高濃度に濃縮させることで、細孔内での蛍光強度の増大を可能とした。細孔入口付近にレセプターを修飾することでアナライトの有無により、蛍光色素の流入を制御していた。この分析法の検出限界は 10 pg/mL であり、アナライトの情報を 10^5 倍に増幅することが可能であった。

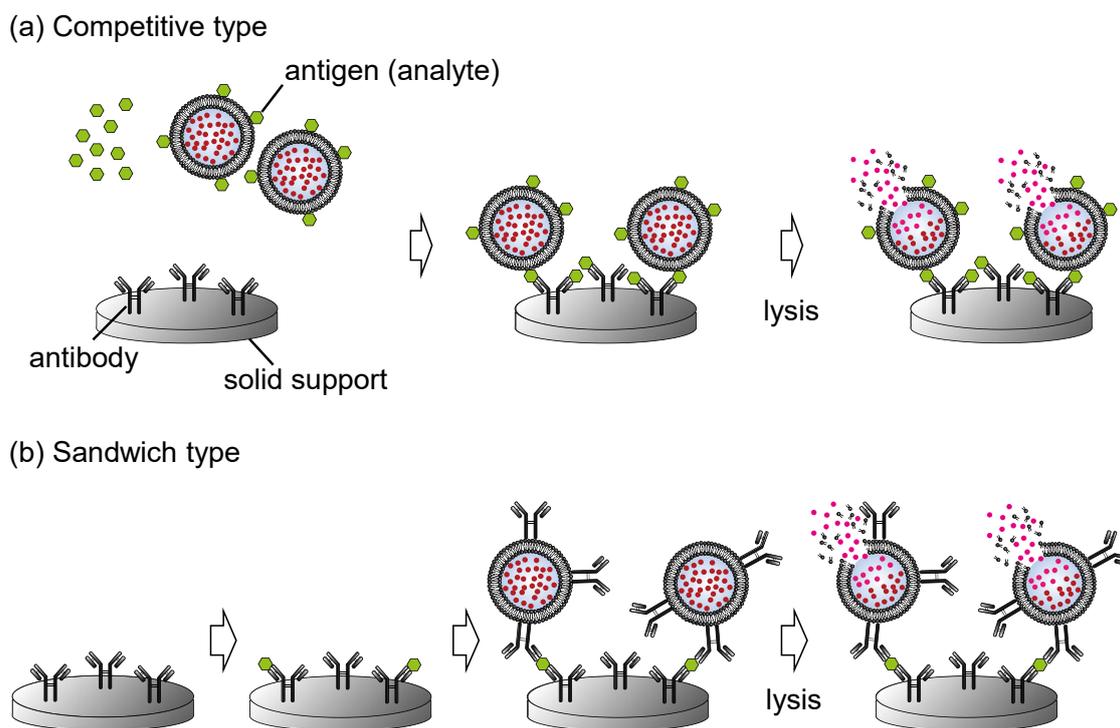


Fig. 1-2. LISA の模式図

(a) 競合法 (b) サンドイッチ型

1-5 本論文の目的

球状の脂質二分子膜であるリポソームは、水中に脂質を分散させるだけで形成できる簡便な細胞膜モデルである。またリポソームは内部に水相を有していることから生体膜の研究のみならず、ドラッグキャリアーや内水相を反応場とした応用研究にも使用されている。生体内には極微量にしか存在していないバイオ分子も確認されており、それらを正確に検出することは疾病の早期発見や治療効果の経過観察するうえで重要となる。現在バイオ分子の計測には ELISA が汎用されているが、操作が煩雑で測定に時間を要することが多い。また低濃度のバイオ分子の定量は限界がある。近年では HPLC や SPR などの計測方法が開発されているが、私はリポソームを用いた高感度免疫アッセイの構築を行った。リポソームの内水相は大量の分子を封入することができる利点を有しているため、蛍光色素を内封し免疫アッセイに利用した。

本論文では、本章に続く以下の4章により構成されている。

第2章「高感度蛍光リポソーム免疫アッセイの構築」では、pH 感受性蛍光色素封入リポソームにイオンチャネルのグラミシジンを包埋して免疫複合体を形成させ、ガラス基板上に固定して濃度依存的な蛍光強度の増大が見られるか検

討を行った。

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」では、通常のリポソームよりも大きな内水相を持つジャイアントリポソームに消光濃度で蛍光色素を封入し、ガラス基板上で抗原抗体反応を行い、アナライト濃度に依存した蛍光強度の増加率が得られるか検討した。

第4章「総括」では、第2章から第3章までの結果を総括し、リポソームを用いたイムノアッセイの高感度化について今後の展望を記述した。

第2章 高感度蛍光リポソーム免疫アッセイの構築

2-1 緒言

Berson と Yalow に始まる免疫アッセイはリポソームの利用により著しく発展してきた。リポソームは水中に分散させるだけで簡単に大量のマーカ分子を封入可能である。また二分子膜表面の表面積が大きく、リポソームを構成する脂質組成を変えることで容易に多様な機能を付加することができる。したがってリポソームは免疫アッセイの高感度化に有用なツールであると言える [17]。リポソーム免疫アッセイは数多く報告されているが、大きく分けて2種類の方法がある。1つはリポソームの内水相にマーカ分子を封入し、免疫アッセイを行った後に界面活性剤などで破壊してから計測する方法である。これは間接法とも言われ、リポソームを破壊することでリポソームから内封したマーカを漏出させている。例えば、スルホローダミン B (SRB) を封入したリポソームを用いて *Cholera toxin B* (CTB) を定量した研究がある [26]。一次抗体を修飾したプレートに CTB を結合させ、二次抗体が修飾された SRB-リポソームを加える。その後、界面活性剤でリポソームを溶解し放出された SRB を測定することで CTB 濃度を算出する。この方法ではダイナミックレンジは 0.43~500 ng/mL で、検出限界は 0.34 ng/mL であった。したがって通常の ELISA よりも検出限界が改善された。しかし、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。

もう1つのリポソーム免疫アッセイは直接法で、リポソームを非破壊で測定することが可能な方法である。本研究室でも直接法によるリポソーム免疫アッセイを開発してきた [27, 28]。リポソームの内水相に pH 感受性蛍光色素である BCECF を封入し、内水相 (pH 5.5) と外水相 (pH 7.8) で pH の勾配を付加する。このリポソームを用いてガラス基板上にアレイを作製し、グラミシジンを追加する。グラミシジンは1価のカチオンを透過するチャネル物質であり、pH 勾配により水素イオンが内水相から外水相へと移動する。その際、内水相の pH が上昇するため、BCECF は強い蛍光を発するようになる。このようにリポソームを直接光らせ、この蛍光強度を測定することでリポソームを破壊することなく分析できる (excitation 488 nm, emission 530 nm)。また ELISA で必須の B/F 分離は行う必要がなく、操作を簡略化することが可能となった。このリポソームアレイを用いたアッセイでは神経伝達物質であるニューロキニン A およびサブスタンス P を同時に 10 ng/mL という検出下限で定量できた。

しかし、生体内には 10 ng/mL 以下の濃度で存在する重要な生理機能を担う生

体物質も存在することが知られている。サブスタンス P でも健常人の血清中では数十 pg/mL から数百 pg/mL で存在する [29–32] といわれ、本研究室で開発してきたリポソームアレイでは感度が不十分である。測定対象の試料が極微量しか採取できない場合、通常抽出や濃縮操作を行ってから測定する。ところが、この抽出・濃縮操作により、試料の損失が起り正確な濃度の測定が不可能になってしまう可能性がある。さらに、操作が煩雑となり時間を要してしまうなどのデメリットが存在する。したがって、抽出や濃縮を行わずに測定するために、定量方法の高感度化が望まれる。

本研究ではリポソームを用いて sub pg/mL でサブスタンス P を定量できる分析法の構築を行った。抗体を修飾したリポソーム (免疫リポソーム) とアナライトおよびグラミシジンとを混合し、次にその複合体を抗体修飾ガラス基板に添加する。ガラス基板と複合体の反応後、遊離の複合体を除去する目的で洗浄操作を行う。この方法では免疫リポソームの免疫凝集反応と免疫リポソームへのグラミシジンの包埋を同時に行うことが可能である。また、ガラス基板との反応では基板上の抗体と複合体が免疫沈降反応を生じ、アナライトが濃縮される。これにより、アナライトの濃度に依存してグラミシジンチャンネルを透過する水素イオンの数、複合体の形成数、ガラス基板上に固定される複合体の量が多くなり蛍光強度の増大が観測される。この方法を Gramicidin-incorporated immunoliposome precipitation assay, GIPA 法と呼ぶことにした (Fig. 2-1)。

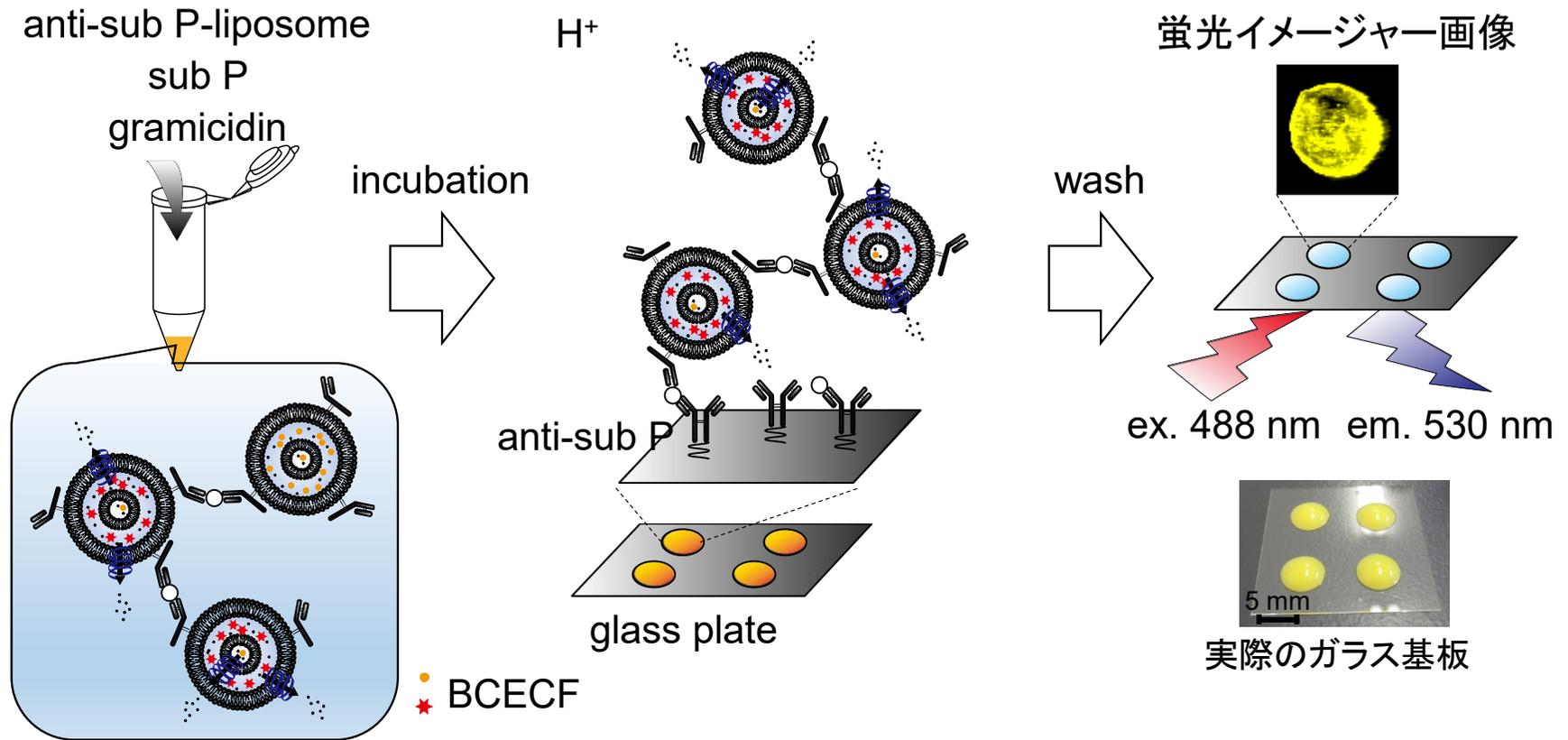


Fig. 2-1. 高感度リポソーム免疫アッセイ (Gramicidin-incorporated immuno-liposome precipitation assay, GIPA 法) の仕組み

2-2 実験

2-2-1 実験試薬

L- α -Phosphatidylcholine (PC, purity > 99%, 50 mg/mL chloroform solution)、L- α -phosphatidylethanolamine (PE, 10 mg/mL chloroform solution)、2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[4-(maleimidophenyl)butyrate] (*N*-MPB-PE, 10 mg/mL chloroform solution) は Avanti Polar Lipids 社 (Alabaster, AL, USA) から購入し、窒素封入後、-20°Cで遮光保存した。ただし、PE および *N*-MPB-PE は chloroform (和光純薬工業, Osaka, Japan) で10倍・100倍と段階希釈して10 μ g/mLの溶液を使用した。また chloroform は Econo-Column[®] (BIO-RAD Laboratories, Inc) に詰めた活性アルミナ (和光純薬工業) に流して不純物を除去した。Cholesterol (chol) は和光純薬工業から購入し、メタノール (和光純薬工業) で3回再結晶して酸化したコレステロールを除去から使用した。2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein (BCECF)、Bis [*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl] fluorescein (Calcein) は Dojindo (Kumamoto, Japan) から購入した。Gramicidin A from *Bacillus brevis* $\geq 90\%$ は SIGMA 社 (St. Louis, MO, USA) から購入し、メタノールに溶解し3.0 mg/mLのものをストック溶液として4°Cの冷蔵庫で保存した。Rabbit Anti human Substance P (anti-sub P, polyclonal antibody, 5.0 mg/mL) は AbD Serotec 社 (Martinsried, Bavaria, Germany) から購入し、PCR チューブに分注して使用するまで-20°Cの冷凍庫で保存した。Substance P (sub P, 白色粉末) はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入し、-20°Cで保存した。また、緩衝液で溶解した1 mg/mLの溶液をストック溶液とし4°Cの冷蔵庫で保存した。Anti streptolysin O (anti-SLO, monoclonal antibody, 1.0 mg/mL) は BioPorto Diagnostics A/S 社 (Hellerup, DK) から購入した。Streptolysin O (SLO) は SIGMA 社から購入した。システアミンは和光純薬工業から購入し、デシケーター中で保存した。3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MTS, >99.9%) は信越シリコーン (Tokyo, Japan) のシラン化剤を使用した。*N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) は Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) から購入した。ヒト血清アルブミン (human serum albumin, HAS, $\geq 97\%$)、 γ -グロブリン (γ -globulins from human blood, $\geq 99\%$) およびヒト血清 (human serum, from human male AB plasma) は SIGMA 社から購入した。他の試薬は全て analytical reagent grade の物を用いた。カバーガラスは Micro cover glass (24×24 mm/thickness 0.25~0.35 mm)、松浪ガラス製 (Tokyo, Japan) の物を使用した。すべての実験に用いた Milli-Q 水は Millipore reagent water system (Millipore, Bedford, MA, USA) から採水した。

2-2-2 装置

全てのリポソームの蛍光画像は FluorImager 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) を使って得られ、蛍光強度は Image Quant (ver. 5.2) で解析した。Shimadzu (Kyoto, Japan) の F-5300PC spectrofluorophotometer を用いて Trapped Volume は算出され、吸光度は Shimadzu spectrometer UV-2500 で測定した。緩衝液を調製する際、Denki Kagaku Keiki (Tokyo, Japan) の glass electrode pH meter で pH を決定した。

2-2-3 Fab' フラグメントの調製

F(ab')₂ の産生には F(ab')₂ preparation kit (Thermo Scientific) を用いた。キットに内包されていた Digestion buffer (20 mM sodium acetate, pH 4.4) を用いて anti-sub P を 0.50 mg/mL (0.50 mL) に希釈した後、ペプシン固定化レジンと共に 37°C で 30 分間攪拌しながら反応させた。その後 PBS buffer (100 mM sodium phosphate 150 mM NaCl, pH 7.2) を用いて anti-sub P とペプシンレジンを分離し、Protein A column で 10 分間ボルテックスし未反応の IgG を除去した。産生した F(ab')₂ (final volume 3.5 mL) は吸光度計を用いて濃度を算出 (A₂₈₀) し、窒素を封入後 4°C の冷蔵庫で保存した。

上記のように産生した F(ab')₂ を還元して Fab' を調製した。F(ab')₂ 溶液 1 mL に対して 100 mM システアミンを 50 μL 添加し、37°C で 1 時間反応させた。そして脱塩カラムを用いて未反応の F(ab')₂ およびシステアミンを除去し Fab' を精製した。Fab' は 280 nm での吸光度を測定した後、Amicon Ultra-0.5 mL 3K Ultracel[®]-3K Membrane (限外濾過フィルターセット)(Millipore) で緩衝液を 10 mM NaH₂PO₄ 100 mM NaCl/NaOH (10 mM リン酸緩衝液, pH 7.8) に交換し窒素封入後、4°C の冷蔵庫で使用するまで保管した。また溶存酸素の酸化によるジスルフィド結合形成を防ぐために、10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)(Dojindo) を添加した。

2-2-4 イムノリポソームの作製

リポソームはリン脂質を水中に分散させることで形成される。Banghum らが発見し、調製した方法 [1] によって多重膜リポソーム (MLV) を以下の手順に従い作製した。

清浄な共栓付き梨型フラスコ (5 mL) に 3 回再結晶したコレステロール 1.5 mg およびリン脂質をシリンジ (Microliter Syringes (500, 250, 100 μL), HAMILTON, Nevada, USA) を用いて順次入れた。この時リポソームの組成は PC : chol : PE :

N -MPB-PE=4 : 1 : 0.001 : 1.25×10^{-4} (molar ratio) で作製した。梨型フラスコを撹拌した後、ロータリーエバポレーターで 10 分間クロロホルムを減圧除去しリップフィルムをガラス表面に形成させた。さらに余分なクロロホルムを取り除くために減圧ポンプで 30 分間吸引した。その後、内封する 0.80 mM BCECF を 10 mM NaH_2PO_4 100 mM NaCl/NaOH (pH 5.5, 内水相) に溶解し、梨型フラスコに 0.50 mL 加えて 10 分間ボルテックスすることで水和・振盪させた。pH 5.5 のリン酸緩衝液で溶解した BCECF 溶液は pH 4.8 であった。次に超音波処理を 15 分間行った後、遠心分離機でリポソームと溶液を分離 (12,000 rpm, 4°C , 5 分) し、リポソームを形成しなかった脂質と過剰な BCECF を除去した。この操作を上清が透明になるまで繰り返した (3~5 回)。最後に 10 mM リン酸緩衝液を 0.50 mL 加えて、窒素封入後 4°C で遮光保存した。リポソームは 1 か月程度使用可能であった。

作製したマレイミドリポソームに 2-2-3 で調製した Fab' フラグメントを修飾し anti-sub P-リポソームとした (Fig. 2-2)。上清を除去したマレイミドリポソーム 200 μL に Fab' 溶液 (0.13 mg/mL) を 400 μL 加え遮光して 4°C で一晩反応させた。その後過剰な Fab' 溶液を取り除き、未反応のマレイミド基を 40 mM システアミン 400 μL でブロッキングした (室温, 1 時間, 遮光静置)。最後に過剰なシステアミンを洗浄除去し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を 200 μL 加えて窒素封入後 4°C で遮光保存した。

今回使用している anti-sub P リポソームの内水相と外水相の pH 差は 3 である。この pH 差が二分子膜を緩め、水素イオンがグラミシジンチャンネルを介さずに透過していたらアッセイが成り立たない。そこで pH 勾配による水素イオンの漏出を確認する実験を行った。pH 勾配を負荷したリポソームにグラミシジンは加えず、sub P (終濃度 100 pg/mL) と複合体を形成した状態で蛍光強度の変化を 24 時間観測した (Fig. 2-3)。計測開始から 24 時間後まで蛍光強度に大きな変化は見られなかった。よって、pH 勾配を負荷しただけでは水素イオンは透過せず安定であることがわかった。

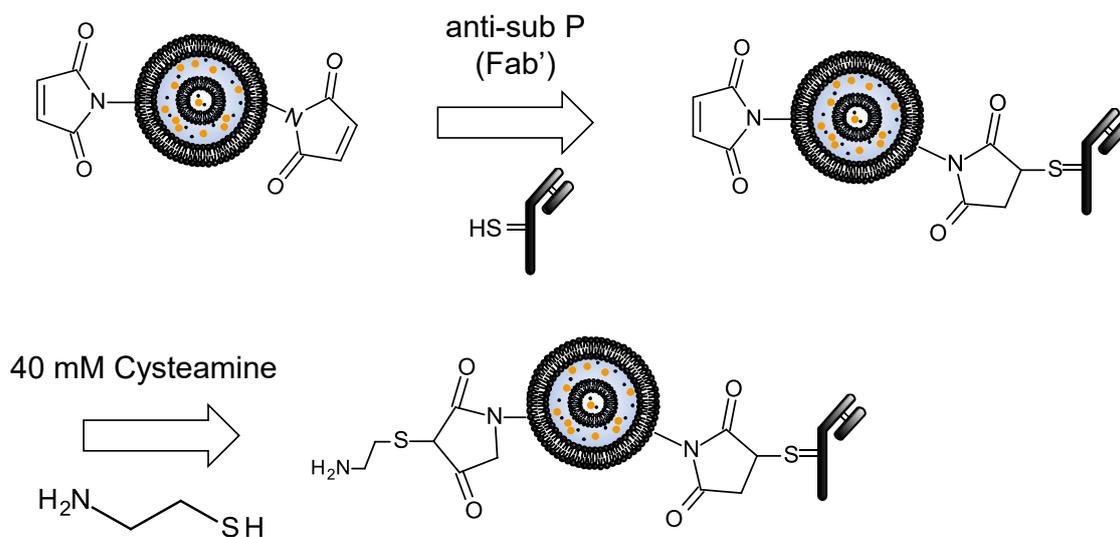


Fig. 2-2. リポソームへの抗体 (Fab') 修飾方法

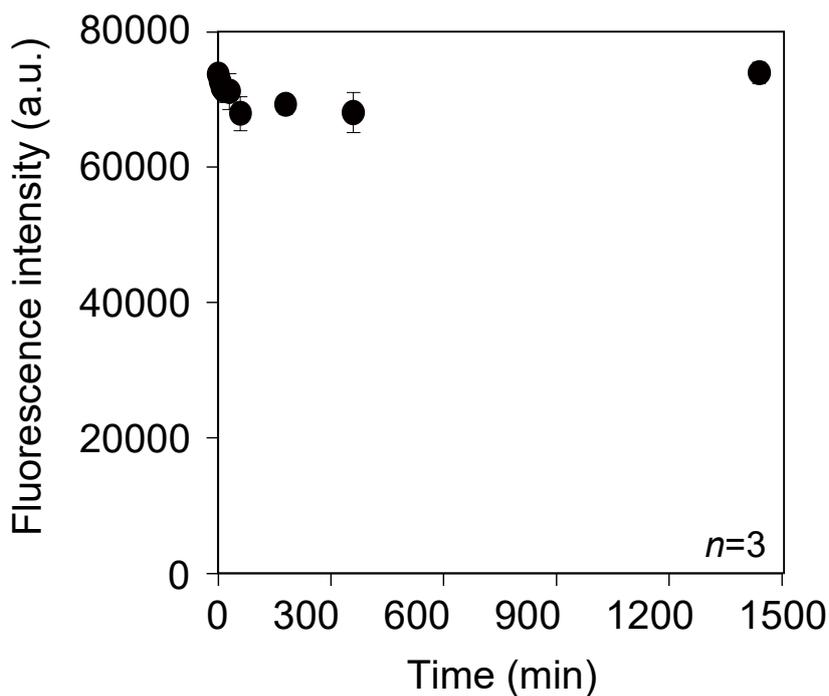


Fig. 2-3. pH 勾配を付加したイムノリポソームの蛍光強度変化

10 mM NaH₂PO₄ 100 mM NaCl/NaOH (pH 5.5) で溶解した BCECF を封入した anti-sub P リポソーム (PC:chol:PE:N-MPB-PE=4:1:0.001:1.25×10⁻⁴ (molar ratio)) に 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を添加した。このイムノリポソームと sub P (終濃度 100 pg/mL) と複合体を形成した状態で蛍光強度の変化を観測した。

2-2-5 ガラス基板への anti-sub P の修飾

抗体を修飾したガラス基板 (anti-sub P-ガラス基板) を作製した (Fig. 2-4)。まず anti-sub P に二価性架橋試薬を用いてピリジルジスルフィド基を導入した (SPDP-anti-sub P)(Fig. 2-4a)。10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) で 1.0 mg/mL に希釈した anti-sub P 200 μ L に 20 mM SPDP (DMSO 溶媒, 和光純薬工業) を 2.5 μ L 添加し、室温で 1 時間反応させた (遮光)。そして未反応の SPDP を Dye Removal Columns (ゲル濾過キット, Dye Removal Resin, Spin Columns, Microcentrifuge Collection Tubes 含む)(Thermo Scientific) を用いて除去した。

次に SPDP-anti-sub P をガラス基板表面に固定した (anti-sub P-ガラス基板, Fig. 2-4b)。清浄なガラス基板にシラン化剤である 50% MTS (v/v, トルエン) を 250 μ L 添加し、チオール基を導入した (室温, 1 時間, 遮光)。余分な MTS をトルエンで洗浄した後、0.10 mg/mL の SPDP-anti-sub P を 20 μ L ずつスポット状に添加し 4°C で反応させた (遮光)。1 時間後に Milli-Q 水で 3 回洗浄し、ガラス基板を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中に浸し使用するまで 4°C で保存した。ガラス基板は 2 日以内に使用した。

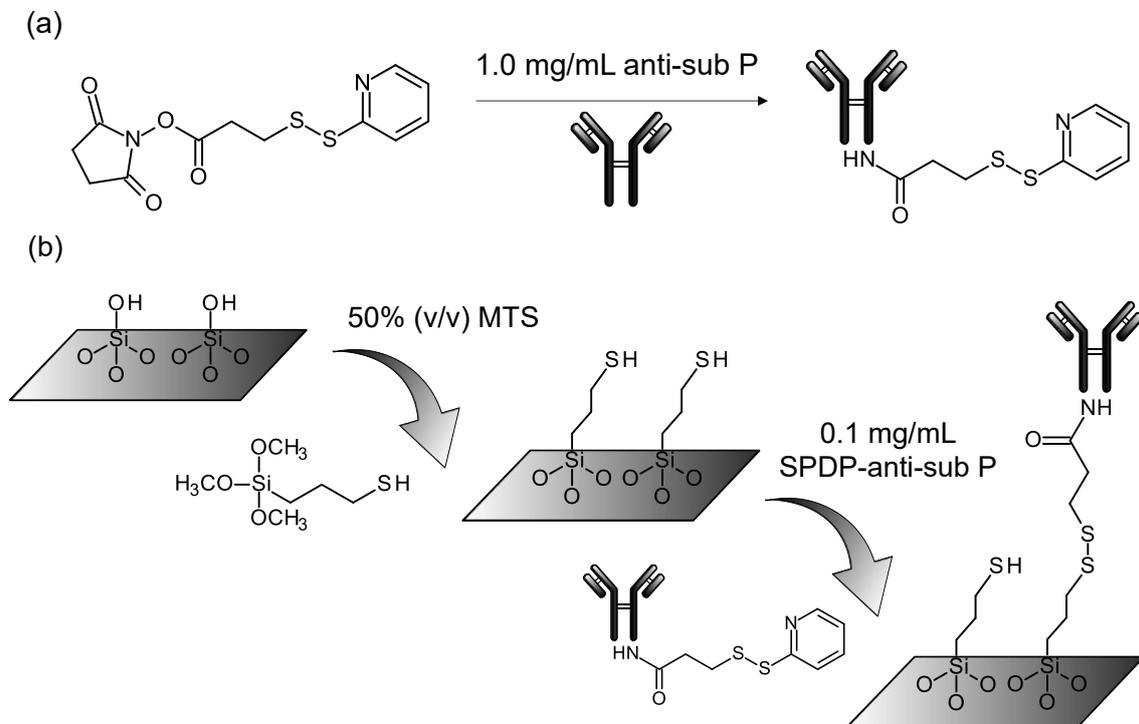


Fig. 2-4. anti-sub P ガラス基板の作製

(a) anti-sub P の SPDP 化 (b) ガラス基板上に MTS を用いてチオール基を導入後、SPDP 化した anti-sub P をジスルフィド結合により固定

2-2-6 anti-sub P-リポソームおよびグラミシジンを用いた sub P のアッセイ方法

Anti-sub P-リポソームのストック溶液 (27 mg/mL) を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) で希釈して 5.4 mg/mL の Anti-sub P リポソーム懸濁液を調製した。また、sub P は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて溶解し、1 mg/mL の濃度の溶液をストックし 400~0.40 pg/mL になるように段階希釈した。グラミシジンは 3.0 mg/mL のストック溶液 (メタノール溶媒) から 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて希釈し、30 µg/mL の濃度の溶液を使用した。エッペンチューブにリポソーム懸濁液 10 µL と各濃度の sub P 溶液 5.0 µL、グラミシジン溶液 5.0 µL を混合し、遮光して 15 分間静置した。sub P は濃度ごとに別々のエッペンチューブで反応させた。この時 Anti-sub P-リポソームは 2 倍、sub P とグラミシジンは 4 倍に希釈され、終濃度はそれぞれ 2.7 mg/mL、100~0.1 pg/mL、7.5 µg/mL であった。

次に Milli-Q 水で軽く洗浄し水分を飛ばした anti-sub P-ガラス基板に、上記の混合溶液を抗体がスポットされている部分に 20 µL ずつ添加した。15 分間室温で遮光静置した後、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) で 3 回洗浄した。洗浄はキムワイプをこより状にしてスポット上の溶液を吸い、10 mM リン酸緩衝液を 20 µL 添加するという手順で行った (スポット洗浄)。洗浄後、蛍光イメージャーを用いてスポットの蛍光強度を測定した (excitation 488 nm, emission 530 nm)。解析は Image Quant を用いて行い、スポットの端を除き平均蛍光強度を算出した。

2-2-7 ヒト血清アルブミンによる妨害の確認

HSA の終濃度が 10、0.50、0.25、0.10、0 mg/mL になるように、sub P 溶液 (終濃度 1.0 pg/mL) と混合して 2-2-6 の方法と同様の手順で GIPA 法でアッセイを行った。イムノリポソームおよびグラミシジンはストック溶液から 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて調製し、アッセイに用いた。終濃度はそれぞれリポソーム 2.7 mg/mL、グラミシジン 7.5 µg/mL であった。イムノリポソームと各濃度の HSA (+ sub P) およびグラミシジンを混合し 15 分間遮光静置した。次に anti-sub P-ガラス基板に、混合溶液を添加し 15 分間静置した。その後 3 回スポット洗浄し、蛍光イメージャーを用いてスポットの蛍光強度を測定した (excitation 488 nm, emission 530 nm)。解析は Image Quant を用いて行い、スポットの端を除いて平均蛍光強度を算出した。

2-2-8 血清中サブスタンス P 濃度の定量

アッセイ方法の詳しい手順は 2-2-6 を参照。免疫リポソームおよびグラミシジンはストック溶液から 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて調製した。また、ヒト血清は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて 125 倍希釈し使用した。リポソームは 2 倍、血清とグラミシジンは 4 倍に希釈され、終濃度はそれぞれ 2.7 mg/mL、500 倍希釈、7.5 μ g/mL であった。

2-2-9 競合エンザイム免疫アッセイキットでのサブスタンス P の定量

この実験は東京薬科大学薬学部の薬物生体分析学研究室および内分泌・神経薬理学研究室に協力を依頼し行った。

Substance P EIA kit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) のものを用いた。操作はキットの説明書通りに行い、まず試薬を調製した。EIA buffer concentrate (10 \times , 1 M phosphate solution containing 1.0 % BSA, 4.0 M sodium chloride, 10 mM EDTA and 0.10 % sodium azide) 10 mL を 90 mL の Milli-Q 水で希釈した。また、Wash buffer は Wash buffer concentrate (400 \times , 4.0 M phosphate solution, pH 7.4) 0.50 mL および界面活性剤 polysorbate 20 0.10 mL と Milli-Q 水 199.4 mL で調製した。次に sub P の標準溶液 (Substance P EIA standard) を 5.0 ng/mL (ストック溶液, 2.0 mL の EIA buffer で溶解) から EIA buffer を用いて各濃度 (3.9 \sim 250 pg/mL) に段階希釈した。この標準溶液は調製してから 24 時間以内に使用した。Substance P AChE Tracer および Substance P Antiserum は 6.0 mL の EIA buffer で溶解し 4 $^{\circ}$ C で保存した。ヒト血清は EIA buffer で 20 倍、15 倍に希釈した。

アッセイは mouse anti-rabbit IgG が修飾された 96 穴プレートを用い、サンプルをどのように添加するか Fig. 2-5 に示し、また各試薬の添加量は Table 2-1 に示した。まず最初に EIA buffer を 非特異吸着 (non specific binding, NSB) ウェルおよび最大結合 (maximum binding, B₀) ウェルにそれぞれ 100 μ L、50 μ L 添加した。次に sub P 標準溶液を S1 \sim S8 (3 列) に 50 μ L ずつ添加した。ウェルに 20 倍・15 倍希釈した 50 μ L ヒト血清を添加した (各希釈倍率ごとに 3 か所ずつ添加)。NSB、B₀、sub P 標準溶液、ヒト血清の各ウェルに Substance P AChE Tracer を 50 μ L ずつ添加した。最後に Substance P Antiserum を B₀、sub P 標準溶液、ヒト血清に 50 μ L ずつ添加し、プラスチックフィルムでウェルに蓋をして 4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。各ウェルは全量 150 μ L となっている。

翌日、基質 (発色) 試薬である Ellman 試薬を Milli-Q 水 20 mL で溶解した。溶解した Ellman 試薬は不安定であるので、アッセイの直前に調製し遮光してお

く。Ellman 試薬での発色過程を Fig. 2-6 に示す。また EIA の模式図を Fig. 2-7 に図示した。4°Cで一晩攪拌したウェルを逆さまにして全ての試薬を捨てた。空になったウェルに Wash buffer を 200 μ L 加えて 30 秒間攪拌し洗浄した。この操作を 5 回繰り返した。その後各ウェルに Ellman 試薬を 200 μ L、全酵素活性 (total activity, TA) ウェルに Substance P AChE Tracer を 5.0 μ L 添加した。そしてウェルに蓋をして遮光しながら攪拌した。90 分後、プレートを手動リーダー (TECAN sunrise) で 405 nm の吸光度を測定し、解析は X Fluor 4 で行った。

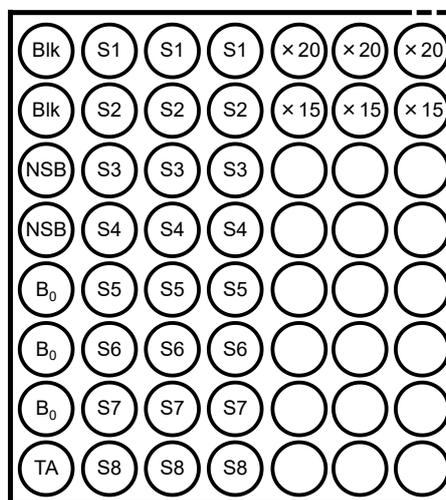


Fig. 2-5. アッセイの形式 (96 well microtiter plate)

Table 2-1. 各ウェルに添加した試薬の体積

well	EIA buffer	std/sample	Tracer ^{*1}	Antibody ^{*2}
Blk	-	-	-	-
NSB	100 μ L	-	50 μ L	-
TA	-	-	5.0 μ L (at devl. step)	-
B ₀	50 μ L	-	50 μ L	50 μ L
std/sample	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L

^{*1} substance P AChE Tracer

^{*2} substance P EIA Antiserum

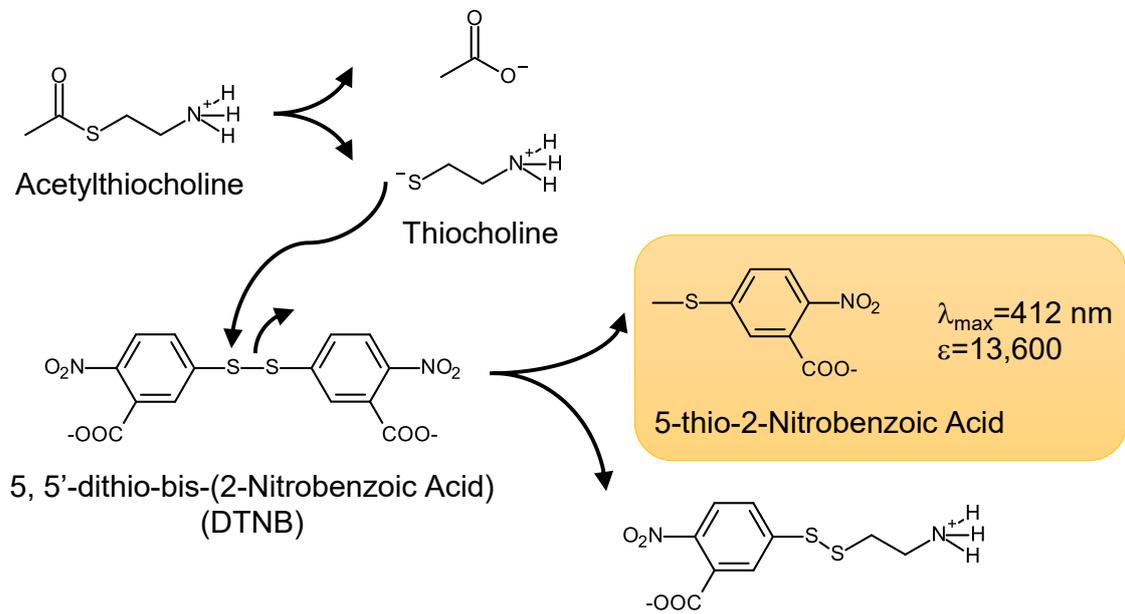
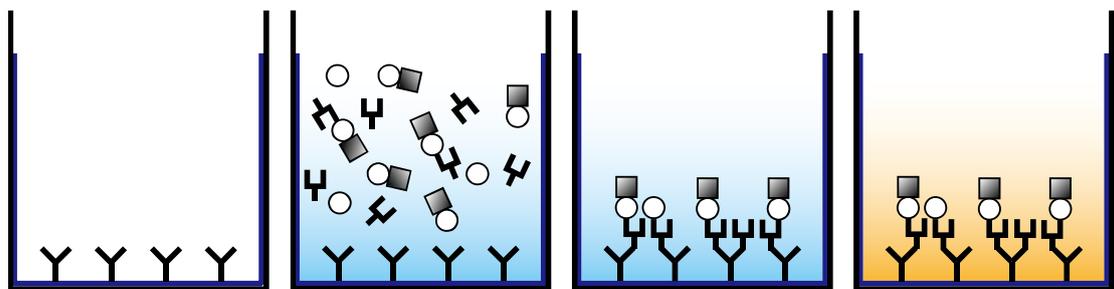


Fig. 2-6. Ellman 試薬による発色反応

Acetylthiocholine が AChE と反応して Thiocholine を産生する。Thiocholine の SH 基と DTNB が反応し、S-S 結合が切断され、5-thio-2-Nitrobenzoic Acid が生成される。この 5-thio-2-Nitrobenzoic Acid の吸光度を測定する。



①プレートには mouse anti-rabbit IgG が吸着されており、タンパク質ブロッキング剤で処理してある。

②Tracer、抗血清、standard (or sample) でインキュベーション。

③結合していない試薬を除去するために洗浄。

④Ellman 試薬でウェルを発色させる。

- Y mouse anti-rabbit IgG
- H 抗血清
- standard (or sample)
- Tracer

Fig. 2-7. EIA 法のアッセイ手順

2-2-10 ストレプトリジン O の定量

Sub P をアッセイした時と同様にしてストレプトリジン O (SLO) についても定量を行った。

Anti-SLO を修飾したリポソームおよびガラス基板は 2-2-4、2-2-5 に記載した anti-sub P-リポソームおよび anti-sub P-ガラス基板作製手順を参考にして準備した。まず 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用いて希釈した 0.010~1.0 pg/mL の SLO で検量線を作製した。次にヒト血清に 0.10 pg/mL および 1.0 pg/mL の SLO を添加して免疫アッセイを行い、検量線から SLO の濃度を算出した。

2-3 結果および考察

2-3-1 イムノリポソームの濃度の最適化

効率の良いアッセイを行うために、まず最適なイムノリポソームの濃度を検討した。anti-sub P-リポソームを 0.027~2.7 mg/mL に希釈し、100 pg/mL の sub P 溶液と混合し得られた免疫複合体を anti-sub P-ガラス基板上に添加し蛍光強度を測定した (Fig. 2-8a)。anti-sub P-リポソームの濃度が上昇するとともに、蛍光強度も増大した (Fig. 2-8a, curve 1)。これにより、anti-sub P-ガラス基板上に免疫沈降したリポソームの量が増加したとわかった。しかし sub P 溶液と混合していない場合、蛍光強度は緩やかに上昇し 1.35 mg/mL で一定となった (Fig. 2-8a, curve 2)。この結果は anti-sub P-リポソームは、anti-sub P-ガラス基板に非特異吸着することを示している。また、anti-sub P-リポソームと sub P の複合体を anti-BSA を修飾したガラス基板に添加した際の蛍光強度 (Fig. 2-8b, column 3) は、anti-sub P-リポソームが anti-sub P-ガラス基板に非特異吸着した際の蛍光強度 (Fig. 2-8b, column 2) と明白な差は見られなかった。したがって、anti-sub P-リポソームはガラス基板上の anti-sub P に特異的に吸着していることが明らかとなった。また、2.7 mg/mL の anti-sub P-リポソームをアッセイに用いることで、著しく蛍光強度が大きくなり効果的にガラス基板へ固定されることがわかった。

Fig. 2-8c, column 1 では anti-sub P-ガラス基板を sub P 溶液でインキュベーションしてから anti-sub P-リポソームを添加した場合の蛍光強度を測定した。免疫凝集を行ってからガラス基板に固定した場合 (Fig. 2-8c, column 2) と比較すると、蛍光強度は小さくなった。この結果は *t* 検定によっても有意差が認められた。つまり、あらかじめイムノリポソームと sub P 溶液を混合し免疫凝集体をガラス基板に固定することの有用性が示された。

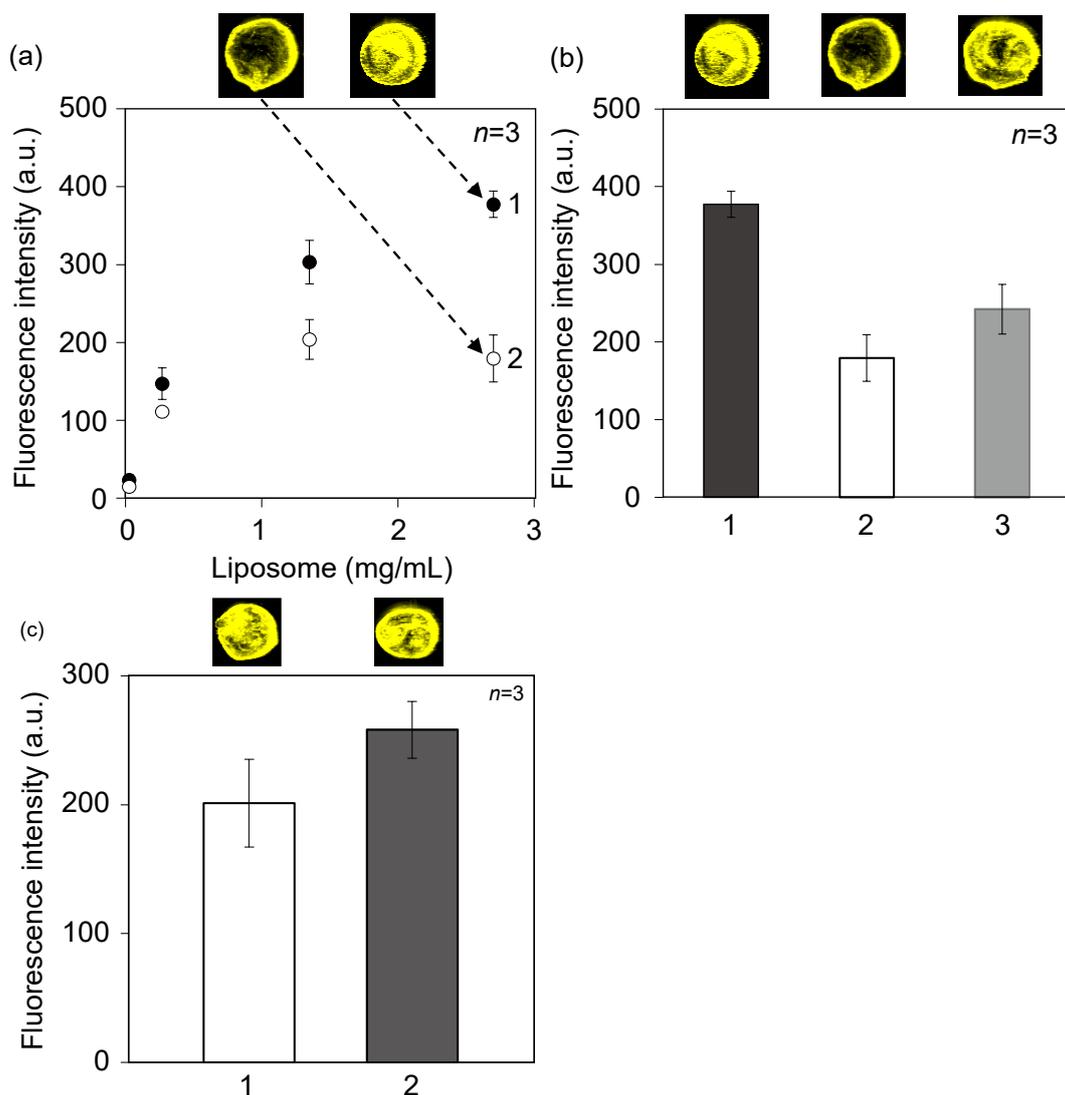


Fig. 2-8. リポソーム濃度に関する基礎検討

写真は蛍光イメージャーで得られた画像

(a) リポソームの濃度変化に対する蛍光強度

リポソーム濃度 0.027~2.7 mg/mL, sub P 100 pg/mL

(1) with sub P (2) without sub P

(b) 異なる抗体を修飾したガラス基板でのアッセイ

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, sub P 100 pg/mL

(1) anti-sub P ガラス基板, with sub P (2) anti-sub P ガラス基板, without sub P

(3) anti-BSA ガラス基板, with sub P

(c) 凝集反応の有無による蛍光強度の差

(1) 非凝集 (2) 凝集

t-test により有意差が認められた.

2-3-2 免疫凝集体の形成とガラス基板への固定化

免疫凝集体の形成に要する時間を検討するために、anti-sub P-リポソームおよび sub P 溶液、グラミシジンを一斉に混合し 5~30 分間反応させた。その後、anti-sub P-ガラス基板上に固定し蛍光強度を測定した (Fig. 2-9a)。混合する時間が長くなるにつれて蛍光強度も増加していき、15 分以降はほぼ一定の値となった。また、グラミシジンの濃度が 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に比べ、7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のグラミシジンを混合した場合は著しく蛍光強度が増加した。一方、7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より高い濃度のグラミシジンをを用いた場合は蛍光強度は減少してしまった。これは濃度が高いためにリポソームに包埋されたグラミシジンの個数が多く、リポソームの二分子膜構造が不安定になってしまったためであると考えられる。

グラミシジンの濃度を 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、anti-sub P-ガラス基板上でのリポソーム複合体の固定時間の検討を行った。ガラス基板上での反応時間を 5~30 分で蛍光強度を測定したところ、固定時間の経過と共に蛍光強度が増大した (Fig. 2-9b)。固定時間が 30 分では蛍光強度の上昇が確認できなかったため、免疫複合体は 15 分程度で十分沈降すると言える。したがって、anti-sub P-ガラス基板上でのリポソーム複合体は 15 分間反応させることとした。

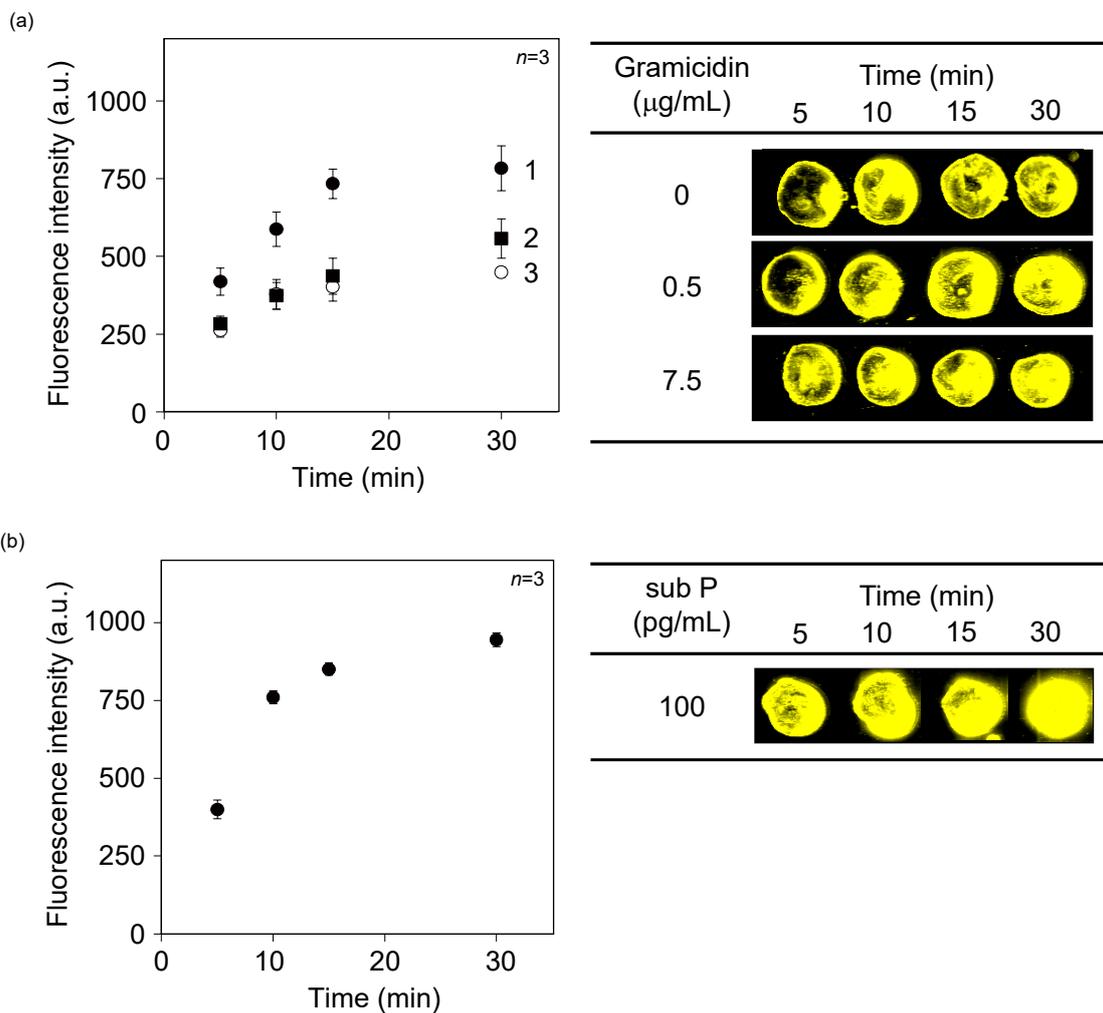


Fig. 2-9. グラムシジン濃度および反応時間の検討

写真は蛍光イメージャーで得られた画像

(a) 各濃度のグラムシジンに対する蛍光強度の時間変化

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, sub P 100 pg/mL

グラムシジン濃度 (1) 7.5 µg/mL (2) 0.5 µg/mL (3) 0 µg/mL

(b) ガラス基板上でのリポソーム複合体の固定時間を変えた際の蛍光強度変化

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, sub P 100 pg/mL, グラムシジン濃度 7.5 µg/mL

2-3-3 pH 勾配がもたらす蛍光強度への影響

GIPA 法ではチャンネルの原理に基づいて、応答の増幅を行っている。pH 感受性蛍光色素 BCECF を封入した anti-sub P-リポソームをアナライトおよびグラミシジンと混合し、生成した複合体をアッセイに用いている。グラミシジンはリポソームの脂質二分子膜に包埋され、二量体を形成することによってチャンネルとして機能する。この時リポソームに負荷された pH の勾配により水素イオンの移動が生じ、BCECF の蛍光強度が変化する。したがって、二分子膜内外で形成された pH 勾配がアッセイにおいて重要な役割を果たしている。そのため、外水相のリン酸緩衝液の最適な pH について検討を行った。

pH 4.8 で BCECF を封入した anti-sub P-リポソームの外水相を pH 6.0~8.5 のリン酸緩衝液としたリポソーム懸濁液を調製した。その後、sub P 溶液およびグラミシジンと混合し、anti-sub P-ガラス基板上に固定し蛍光強度を測定した (Fig. 2-10)。リン酸緩衝液の pH が高くなると BCECF の蛍光強度も上昇し、外水相の pH が 7.8 で最大の蛍光強度を示した。つまり、pH 7.8 で最も効果的に水素イオンがリポソームの内水相から放出されることがわかった。しかし、pH 8.5 ではわずかではあるが蛍光強度が減少し、ばらつきも大きかった。この蛍光強度の減少はリポソームの脂質二分子膜が不安定になってしまったことに起因していると考えられる。以上のことから、リポソームの外水相には pH 7.8 のリン酸緩衝液を使用することとした。

pH 7.8 の外水相のリポソーム懸濁液を sub P 溶液と混合した複合体でアッセイを行った際のグラミシジンチャンネルを透過する水素イオンの個数を算出した。sub P 溶液が 100 pg/mL では、グラミシジンの有無により蛍光強度に約 2.2 倍の差があった。pH に対する BCECF の蛍光強度を示したグラフ (Fig. 2-11) より、リポソームの内水相は pH 4.8 から pH 6.4 に変化したことになる。さらに、Okura の方法 [33] により本アッセイで用いているリポソームの保持体積を算出すると 3.3%であった。1 スポット当たりに対してリポソームは 2 μ L 使用していることから、1 スポット当たりのリポソームの内水相の体積は、

$$2 \mu\text{L (リポソーム)} \times 0.033 \text{ (保持体積)} = 0.066 \mu\text{L} = 66 \text{ nL}$$

となる。また、リポソームの内水相の pH から水素イオンのモルを算出すると次のようになる。

$$\text{pH 4.8 の時} \quad 10^{-4.8} \times 66 \text{ nL} \doteq 105.6 \times 10^{-14} \text{ mol}$$

$$\text{pH 6.4 の時} \quad 10^{-6.4} \times 66 \text{ nL} \doteq 264 \times 10^{-16} \text{ mol}$$

リポソームの内水相が pH 4.8 から pH 6.4 に変化するとき水素イオンの個数は各

pH における水素イオンのモル数から、

$$\Delta \text{水素イオンのモル数} = (1.06 \times 10^{-12} \text{ mol}) - (2.64 \times 10^{-14} \text{ mol}) \doteq 1.03 \times 10^{-12} \text{ mol}$$

$$\Delta \text{水素イオンの個数} = (1.03 \times 10^{-12} \text{ mol}) \times (6.02 \times 10^{23} / \text{mol}) \doteq 6.2 \times 10^{11} \text{ ions/30 min}$$

と算出される。これらの数値と 1 個のグラミシジンチャンネルを 1 秒間に透過する水素イオンの個数は 10^7 個であること [34] を考慮すると、1 スポットあたりのリポソームに包埋されたグラミシジンの個数は、

$$6.2 \times 10^{11} \text{ ions/30 min} \div 1800 \text{ sec.} \doteq 3.4 \times 10^8 \text{ ions/sec.}$$

$$3.4 \times 10^8 \text{ ions/sec.} \div 10^7 \text{ ions} = 34 \text{ 個}$$

となる。この 34 個のグラミシジンがアッセイに関与しているために、GIPA 法では優れたシグナル増幅能を有している。

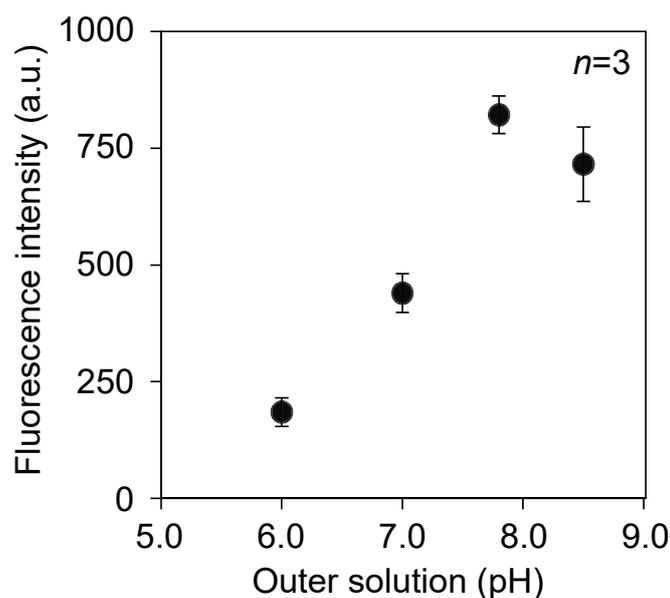


Fig. 2-10. リポソーム外水相の pH ごとの蛍光強度

外水相のリン酸緩衝液の pH 6.0~8.5

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, sub P 100 pg/mL, グラミシジン濃度 7.5 $\mu\text{g/mL}$

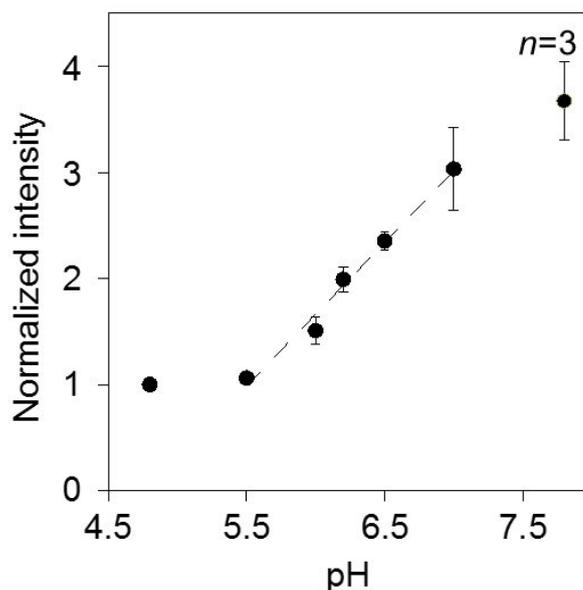


Fig. 2-11. pH に対する BCECF の蛍光強度変化

pH 4.8~7.8 の緩衝液で溶解した BCECF の蛍光強度を pH 4.8 の時の蛍光強度で割り、規格化したグラフ ($y=1.35x-6.4$, $R^2=0.98$)

BCECF 80 μ M

2-3-4 Sub P の検量線および検出限界の算出

終濃度 0.10~100 pg/mL の sub P 溶液を用いてアッセイを行い、検量線を作製した (Fig. 2-12)。測定の結果、sub P 濃度に依存して指数関数的に蛍光強度は大きくなっていった (Fig. 2-12a)。また、sub P 濃度が 0~1.0 pg/mL の範囲では直線的に蛍光強度が増加した。Fig. 2-12a のグラフを濃度算出に利用できるように横軸を log 表記にしたグラフを Fig. 2-12b に示した。Fig. 2-12b では sub P の濃度増大に伴い蛍光強度は直線的に増加した。どちらのグラフでもグラミシジンを追加した場合は添加していない場合に比べて蛍光強度が大きく、応答が増幅されていることが確認できた。GIPA 法での sub P の検出限界は 0.32 pg/mL ($S/N=3$) であり、これは本研究室でこれまで開発してきたリポソームアレイを上回る結果であった。また、Table 2-2 に GIPA 法および他の分析法による検出限界を示した [27, 35-40]。GIPA 法の検出限界は競合免疫アッセイ (0.25 pg/mL) [35] と同等であったが、ラジオ免疫アッセイ (10~20 pg/mL) [38, 39] やボルタンメトリー (54 pg/mL) [40]、キャピラリー電気泳動 (135 pg/mL) [41] より優れた検出限界であった。

次にガラス基板ではなく 96 穴のプレートを用いて anti-sub P-リポソームと各

濃度の sub P (0, 0.10~100 pg/mL)、グラミシジン (終濃度 7.5 pg/mL) を加え 30 分間静置した際の蛍光強度を測定した (Fig. 2-13)。その結果、グラミシジンを添加したことに起因する蛍光強度の増大は確認できた。ところが、sub P の濃度に依存した応答の変化は得られなかった。リポソームに封入した BCECF は低 pH の溶液中でも強い蛍光を発する。ガラス基板上に固定した際は過剰なリポソームを除去できるが、溶液中では遊離の anti-sub P-リポソームも数多く存在している。そのため、アッセイに関与していない anti-sub P-リポソームがバックグラウンドとなり、濃度依存的な変化が確認できなかつたと考えられる。したがって GIPA 法はガラス基板に anti-sub P-リポソームを固定して実験を行うことが必要である。

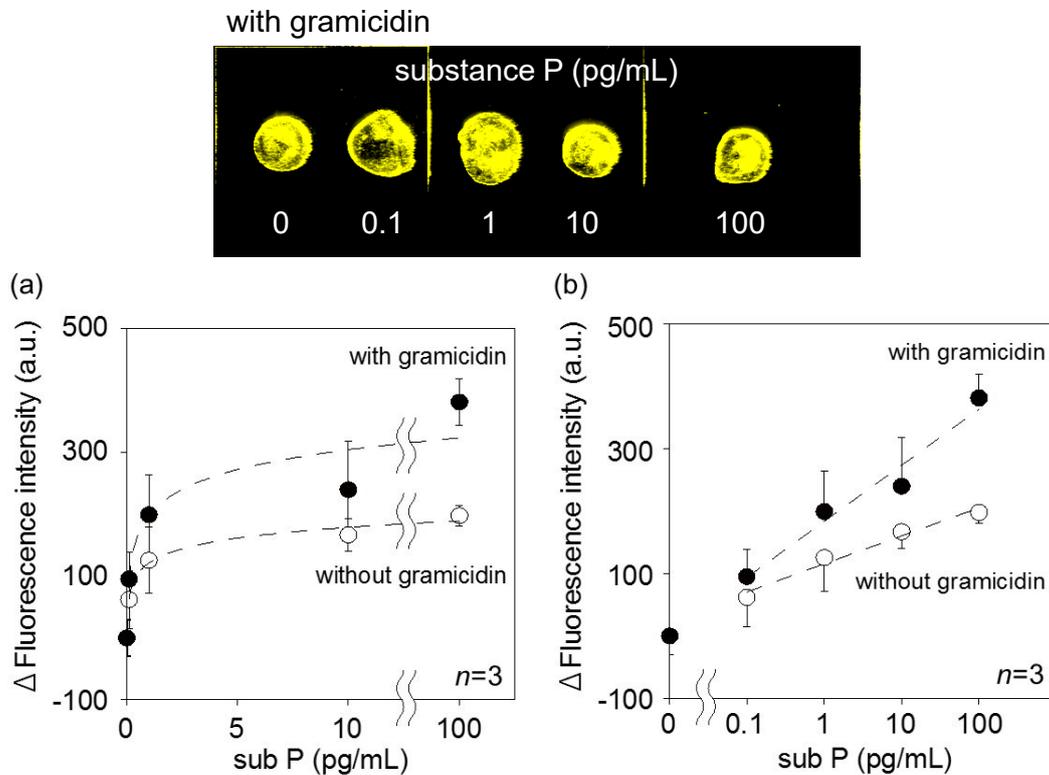


Fig. 2-12. sub P 濃度に対する蛍光強度変化

写真は蛍光イメージャーで得られた画像

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, グラミシジン濃度 7.5 μ g/mL

sub P 0 pg/mL の蛍光強度を各 sub P 濃度での蛍光強度の値から差し引いた値をプロットした。

(1) with gramicidin (2) without gramicidin

(a) 最適条件下での sub P の濃度依存性

(b) (a) を対数表示したグラフ

Table 2-2. sub P を計測した様々な分析法の検出限界

測定法	検出限界	引用文献
GIPA 法 (本研究)	0.32 pg/mL (0.24 pM)	
liposome array (従来法)	10 ng/mL (7.4 nM)	[27]
competitive immunoassay	0.25 pg/mL (0.18 pM)	[35]
solid-phase immobilized epitope immunoassay	6.0 pg/mL (4.4 pM)	[36]
electrochemical immunosensor	10 pg/mL (7.4 pM)	[37]
RIA	10 pg/mL (7.4 pM)	[38]
	20 pg/mL (15 pM)	[39]
voltammetry	54 pg/mL (40 nM)	[40]
capillary electrophoresis	135 pg/mL (100 nM)	[41]

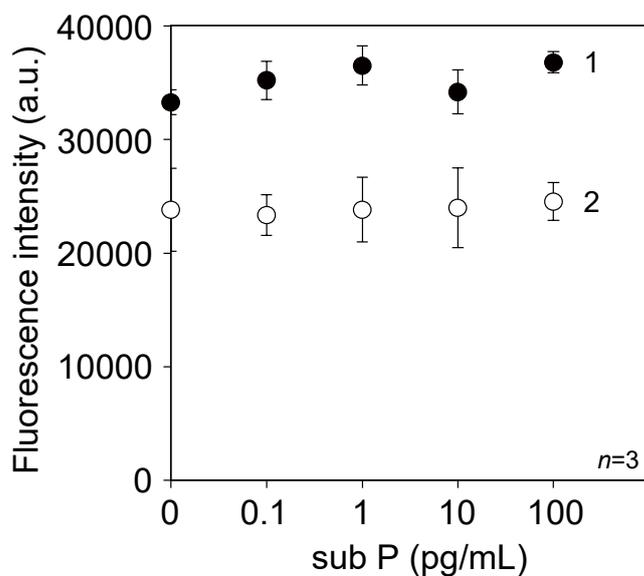


Fig. 2-13. sub P 濃度に対する蛍光強度変化 (溶液中)

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, グラムシジン濃度 7.5 μ g/mL

(1) with gramicidin (2) without gramicidin

2-3-5 血清成分による応答の妨害

サブスタンス P はヒト血清中に在り、血清を測定することで様々な疾病の診断に利用されることが期待されている。しかし、血清には sub P 以外のタンパク質も多数存在する。例えば健常人の血清中にはヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) は 35~50 mg/mL であり、 γ -グロブリンは 7.0~17 mg/mL である [42, 43]。それらの成分が GIPA 法の応答に影響を与えるかどうか確認した。Anti-sub P-リポソームとグラミシジンを sub P と混合する際に、0.10~10 mg/mL の HSA も共存させてアッセイを行った (Fig. 2-14)。最も蛍光強度に差がある 0.10 mg/mL と 0.50 mg/mL で *t* 検定を行った結果、有意差は認められなかった。 γ -グロブリンについても同様の実験を行ったが、蛍光強度に大きな変化は無かった (終濃度 0.5 mg/mL, sub P 1.0 pg/mL)。以上のことから、GIPA 法において HAS および γ -グロブリンは応答を妨害しないことが明らかとなった。

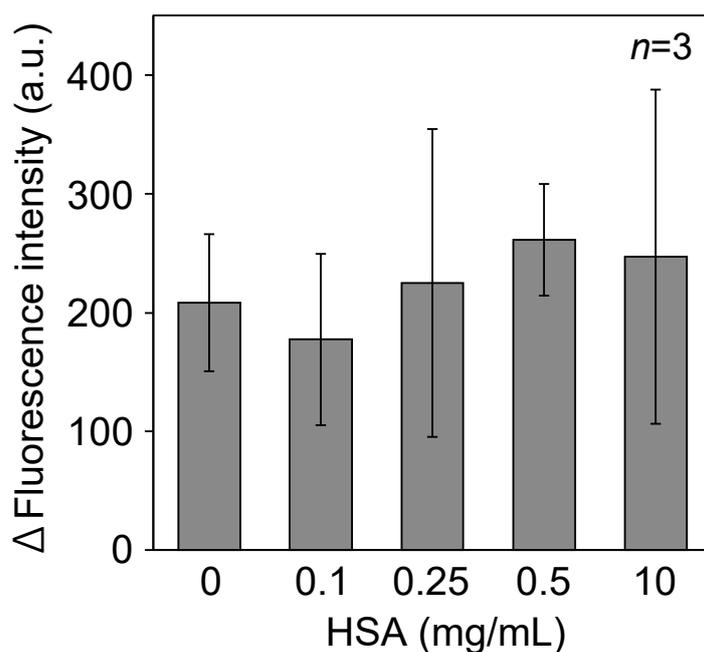


Fig. 2-14. HSA 共存下での sub P 濃度に対する蛍光強度への影響
リポソーム濃度 2.7 mg/mL, sub P 1 pg/mL, グラミシジン濃度 7.5 μ g/mL
t-test により有意差は認められなかった

2-3-6 血清中の sub P の定量

中枢神経系、末梢神経系や腸管神経系などにサブスタンス P(sub P) は存在している。sub P は 11 個のアミノ酸から構成されるペプチドであり、タキキニンファミリーに属する (Fig. 2-15) [44]。痛覚の伝達や呼吸、循環器系のコントロール、また様々な疾病に関与しているといわれている。例えば、炎症疾患や炎症性関節炎、感染症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などである [31, 45-48]。これらの疾病に罹ると sub P の濃度が変化するため、診断や治療の経過を観察するうえで sub P の定量は重要な役割を果たす。

Sub P は血清にも存在し、健常人では 10~220 pg/mL である (Table 2-3) [29-32]。これまでに HPLC やキャピラリー電気泳動、EIA などによって計測されてきた。しかし、研究者によって検出された sub P の値は異なっている。その原因は生体試料や測定方法の違いによるものではなく、血清の前処理の有無に起因していると考えられる。血清の前処理には固相抽出が汎用されているが、sub P は血清タンパク質と非特異的に結合しているため、固相抽出では sub P の回収率が低下してしまう可能性が示唆されている [49]。抽出操作による回収率の低下は血清中の sub P を定量する際に濃度が低く見積もられてしまう可能性がある。Campbell らによると、固相抽出による血清試料の前処理後に sub P を市販の EIA キットで定量したところ、sub P 濃度は 12.7 pg/mL であるのに対して、前処理は行わずに血清試料の希釈後に sub P を定量した場合は 69.3 pg/mL であった [50]。このことは前処理の有無で sub P の濃度が変化することを示しており、血清試料中の sub P の濃度を正しく計測するためには前処理を行わない計測法を考案する必要がある。

一方、免疫アッセイ法は強力な結合定数を有する抗原-抗体反応を分子認識に利用している。そのため血清試料を高倍率で希釈するだけで血清タンパク質と sub P の複合体を解離して、遊離の sub P を定量できる可能性がある。そのためには、免疫アッセイ法の高感度化が必須となる。GIPA 法は非常に高感度であり、血清試料を数十~数百倍に希釈しても十分に sub P を測定することが可能であると考えられる。またそれだけ希釈すれば sub P をタンパク質から解離させることができると予想される。そこで、血清試料を前処理せずに GIPA 法により希釈した血清中の sub P の濃度を定量した。

ヒト血清を 1.25~125 倍まで希釈して sub P 濃度の定量を行った (Fig. 2-16)。希釈倍率が低いと実際の濃度よりも高い濃度で sub P が検出された。血清にはアルブミンやグロブリン以外の様々な血清成分が含まれている。それらが脂質二分子膜を変調させること、もしくは血清成分が sub P と anti-sub P-リポソームを非特異的に凝集させてしまうことが要因であると考えられる。高倍率で希釈

した場合、sub P 濃度は減少し 20 倍希釈以降はほぼ一定の値を示した。希釈率を考慮して元の血清中に存在している sub P 濃度の換算を行ったところ、125 倍希釈した血清では sub P 濃度は $(2.2 \pm 0.6) \times 10^2$ pg/mL であった (Table 2-4)。またこのときの相対標準偏差 RSD は 26% であり、125 倍希釈の血清試料を用いた場合が GIPA 法で最も再現性が高いことがわかった。血清試料の前処理を行わずに sub P 濃度を計測した場合、健常人の血清中には 200~300 pg/mL の sub P が存在していることが報告されており [31, 32]、本研究で得られた sub P 濃度とほぼ一致していた。

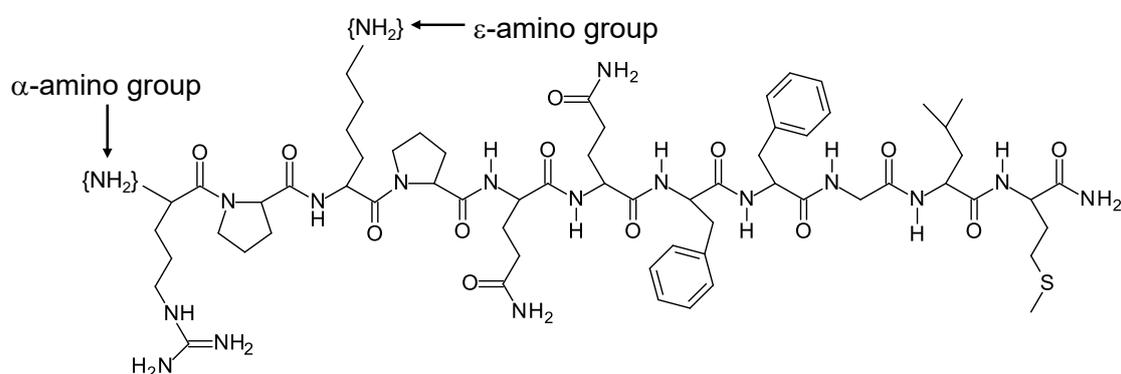


Fig. 2-15. sub P の構造式

Mw 1347.6

Table 2-3. 健常人における血清中の sub P 濃度

Sample	Concentration ^a (pg/mL)	前処理	検出方法	引用文献
serum	38	extracted	EIA	[29]
	12.25	extracted	EIA	[30]
	216.87	unextracted	EIA	[31]
	180	unextracted	EIA	[32]

^a 健常人の平均値

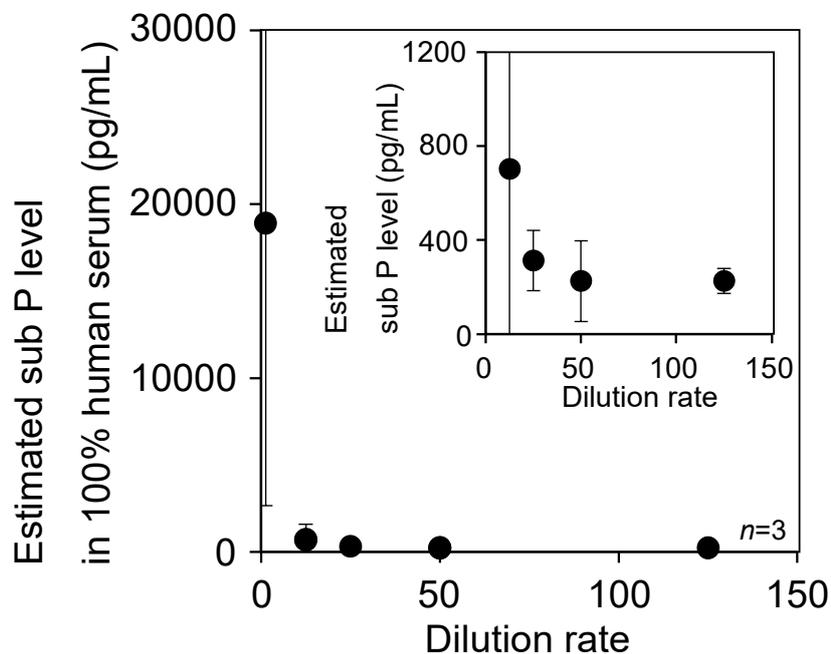


Fig. 2-16. 各希釈倍率の血清に対する sub P 濃度

ヒト血清 (male, type AB) を 1.25~125 倍まで希釈して測定を行い、希釈倍率をもとに 100 % の血清中の sub P 濃度を算出しプロットした。内挿図は 12.5~125 倍希釈した際のプロットを拡大したグラフ。

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, グラミシジン濃度 7.5 μ g/mL

Table 2-4. GIPA 法および競合 EIA キットによるヒト血清中 sub P 定量の比較

Proposed method は GIPA 法を示す。競合 EIA の結果は次の 2-3-7 で詳細を記述した。

	Dilution rate	sub P level (pg/mL)	RDS (%)	Assay time	Detection limit (pg/mL)
Proposed method	50	$(2.3 \pm 1.8) \times 10^2$	78	<1 h	0.32
	125	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^2$	26		
Competitive EIA	15	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^2$	31	<15 h	9
	20	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^2$	12		

2-3-7 競合エンザイム免疫アッセイキットでの sub P 定量の比較

2-3-6 ではヒトの血清を用いて実際に sub P の濃度を定量した。GIPA 法の確度確かめるために、市販のエンザイム免疫アッセイキットで血清中の sub P 濃度の測定を行った。

Sub P 0 pg/mL の時の平均吸光度で標準溶液 (サンプル) の吸光度を割った値を %B/B₀ とし、3.9~500 pg/mL の sub P 標準溶液に対して、%B/B₀ の値をプロットし検量線を作製した (Fig. 2-17)。Fig. 2-17 の検量線から検出限界を求めると、9 pg/mL (S/N=3) であった。GIPA 法の検出限界は 0.32 pg/mL であり、EIA 法と比較すると非常に高感度であることがわかった。

ヒト血清を 15 倍と 20 倍に希釈して EIA キットで測定を行い、検量線から sub P 濃度を算出した結果を Table 2-4 に示した。なお、Table 2-4 に示した sub P 濃度は希釈率を考慮して元の血清中に存在している sub P 濃度である。この *t* 検定によると、15 倍・20 倍希釈のどちらも GIPA 法で得られた値と有意な差は無かった ($p=0.05$)。しかし 15 倍希釈した血清では RSD は 31% であった。よって、GIPA 法で測定した場合の方が再現性は優れていると言える。また GIPA 法は 1 時間弱で定量可能であるが、EIA 法では 15 時間程度かかってしまう。これらの点からも GIPA 法は生体分子の計測に有用な分析方法である。

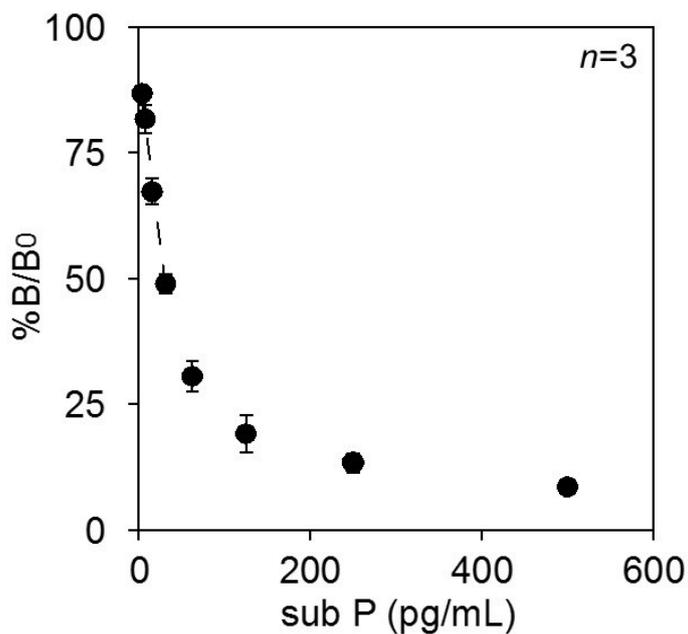


Fig. 2-17. 競合 EIA キットによる sub P の濃度依存性

%B/B₀ は sub P 0 pg/mL の時の平均吸光度で標準溶液 (サンプル) の吸光度を割った値を示す。

sub P の標準溶液は 5.0 ng/mL (ストック溶液, 2.0 mL の EIA buffer で溶解) から EIA buffer を用いて各濃度 (3.9~250 pg/mL) に段階希釈した。発色にはアセチルコリンエステラーゼおよび Ellman 試薬を使用した。

EIA buffer 100 mM phosphate solution containing 0.1 % BSA, 400 mM sodium chloride, 1 mM EDTA and 0.01 % sodium azide

2-3-8 ストレプトリジン O の定量

GIPA 法の汎用性について検討するために、ストレプトリジン O (SLO) でもアッセイを行った。

SLO は 63 kDa の溶血性連鎖球菌から産生される毒素の一種である (Fig. 2-18)。コレステロールを含む脂質二分子膜に融合し、細胞を破壊・溶解してしまう [51, 52]。SLO を産生する溶血性連鎖球菌に感染するとリウマチ熱や糸球体腎炎を発症し、通常血清中の SLO 抗体 (anti-streptolysin O antibody, ASO) の濃度を測定し診断に用いる [53–58]。ASO を測定するということは、ある程度症状が進行して十分 ASO が産生されていないと分析できないということである。その一方で、抗原である SLO を直接定量することができれば、疾患の初期段階でも測定でき早期診断が可能となる。

Fig. 2-19 は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で anti-SLO-リポソームおよび 0.010~1.0 pg/mL の SLO、グラミシジンを混合しアッセイを行った際の蛍光強度を示したグラフである。SLO 濃度に依存して蛍光強度も増大しており、検出限界は 8 fg/mL ($S/N=3$) であった。次にヒト血清に 0.10 pg/mL および 1.0 pg/mL の SLO を添加して免疫アッセイを行い、検量線から SLO の濃度を算出した (Table 2-5)。添加回収実験の結果、回収率は 100% より低かった。恐らく、低分子量のペプチドが SLO に結合したか、SLO がリポソームの脂質二分子膜に相互作用しシグナルの増幅を妨害してしまったことが原因であると考えられる。

SLO の検量線から求めた検出限界は 8 fg/mL で、sub P の場合より低い検出限界であった。これは SLO の方が分子量は大きく、脂質二分子膜中でのグラミシジンのキネティクスが大きく変調したことに起因しているためだろう。また、本研究とは別の方法によって SLO を定量した研究も報告されている [59]。この研究では電気活性マーカーを封入したリポソームを表面に修飾した金電極で SLO を定量する。その際のダイナミックレンジは 5~45 HU であり、 $5.8 \times 10^{-7} \sim 5.8 \times 10^{-6}$ HU である本研究の方がより高感度であると言える。また HU は 37°C で 30 分間培養した後、pH 7.4 のリン酸緩衝食塩水中に 2% 赤血球懸濁液が 50% 溶解する酵素量と定義される。

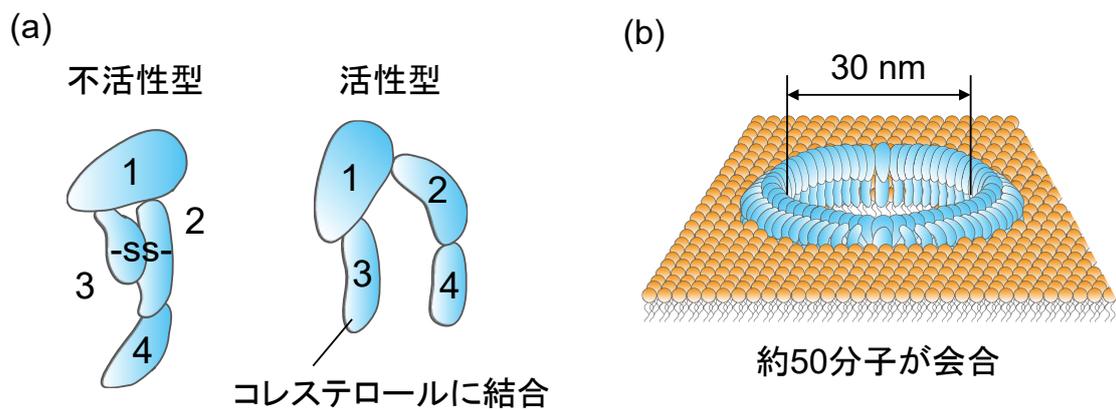


Fig. 2-18. ストレプトリジン O (SLO) の構造と会合状態の模式図

(a) SLO の構造。不活性型のジスルフィド結合を還元すると活性型をとる。

(b) 活性型のドメイン 3 が細胞膜中のコレステロールに結合する。約 50 分子が会合して 30 nm の孔を形成する。

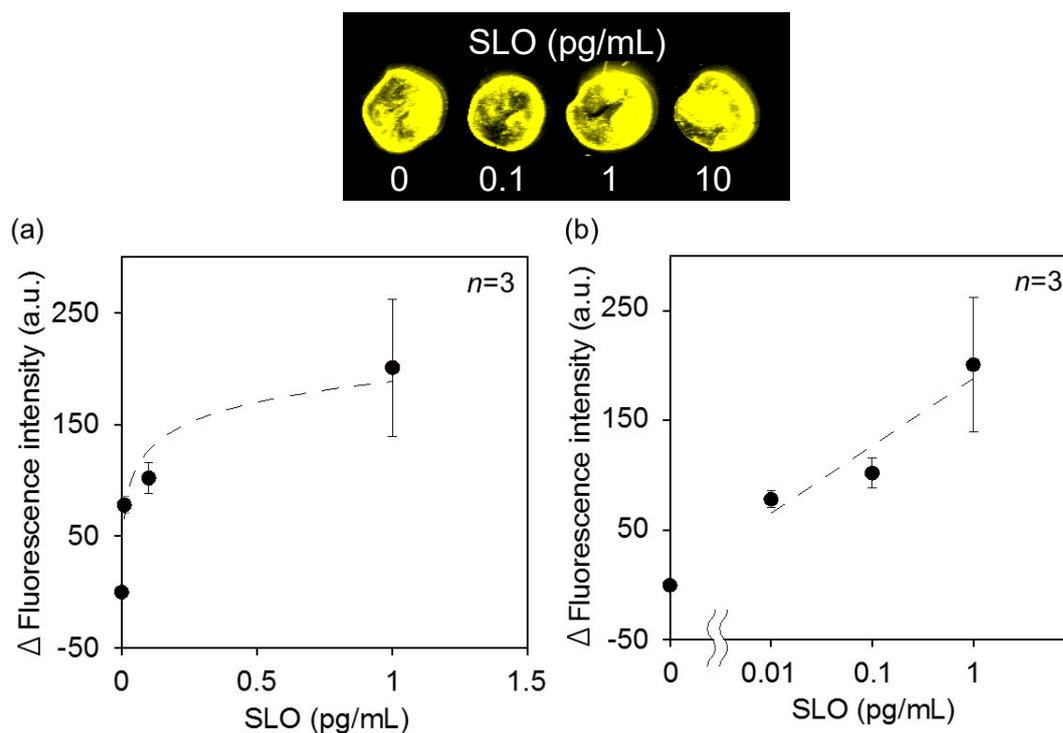


Fig. 2-19. SLO の濃度依存性

写真は蛍光イメージャーで得られた画像

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, グラムシジン濃度 7.5 μg/mL

sub P 0 pg/mL の蛍光強度を各 sub P 濃度での蛍光強度の値から差し引いた値をプロットした。また、SLO は不活性型を使用した。

(a) 最適条件下での SLO の濃度依存性

(b) (a) を対数表示したグラフ

Table 2-5. 健常人の血清に SLO を添加した際の SLO 濃度および回収率

ヒト血清 (male, type AB) に 0.10 pg/mL および 1.0 pg/mL の SLO を添加して免疫アッセイを行い、Fig. 2-19 の検量線から添加した SLO 濃度を算出した。またその SLO 濃度から回収率も算出した (n=3)。

リポソーム濃度 2.7 mg/mL, グラムシジン濃度 7.5 μg/mL, ヒト血清 1 %

SLO spiked (pg/mL)	SLO found (pg/mL)	Recovery (%)
0.10	0.080 ± 0.026	80 ± 26
1.0	0.90 ± 0.20	90 ± 20

2-4 まとめ

第2章では、高感度なリポソームイムノアッセイを構築した。Gramicidin-incorporated immuno-liposome precipitation assay, GIPA 法は以前本研究室で開発したリポソームアレイのシグナル増幅方法を利用し、リポソームを非破壊でアナライトの定量を行うことができる。イムノリポソームとアナライトおよびグラミシジンとを混合し、免疫凝集体を形成する。この複合体を抗体修飾ガラス基板に添加することで免疫沈降反応が生じる。免疫凝集によりアッセイに参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すことになる。これらの仕組みとグラミシジンによるシグナルの増幅によって、GIPA 法は以前のリポソームアレイより 10^4 倍程度検出できる濃度範囲が低くなった。検出限界は 0.32 pg/mL ($S/N=3$) で、競合イムノアッセイとは同程度であったが、ラジオイムノアッセイやボルタンメトリー、キャピラリー電気泳動など多くの他の分析法より優れていた。また、SLO のように別のタンパク質においても同様に定量することが可能であった。つまり、抗体の種類を変更するだけで様々な種類のアナライトに応用することができると考えられる。

以上のことから、本研究で開発した GIPA 法は極微量な生体分子を抽出や濃縮操作を必要とせず、さらに短時間で分析できることから、その場で治療効果を確認し、また疾病の早期発見に貢献することが期待される。

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

3-1 緒言

第2章の研究で球状の脂質二分子膜であるリポソームをイムノアッセイに利用した。イムノアッセイやバイオセンサーにリポソームを使用した研究は盛んに行われてきており、非常に高感度にタンパク質やDNAを検出することができる [60–62, 17]。このような研究にリポソームを応用する理由はいくつかある。ひとつはリポソームは球体をしており内部に水相を持っていることから、酵素や色素など様々な分子を封入できることが挙げられる。また、脂質二分子膜で構成されたリポソームの表面は多様な脂質を利用することで機能化が可能となる点もある。こうした理由からリポソームイムノアッセイは発展してきた。

リポソームにはサイズや構造の違いからいくつかの種類が存在する。複数の脂質二分子膜から構成されるリポソームは多重膜リポソーム (multilamellar vesicle, MLV) という。一方、1枚の脂質二分子膜によるリポソームは直径のサイズによって名称が異なる。直径数10 nm以下の一枚膜リポソームは small unilamellar vesicle (SUV) といい、直径100~1000 nmのものを large unilamellar vesicle (LUV)、直径1000 nm以上のものを giant unilamellar vesicle (GUV) と呼ぶ [63]。中でも GUV は細胞と同程度のサイズであるため、膜融合や膜分裂など生体膜の物理学的特性に関する研究や、膜タンパク質の再構成といった研究に利用されている [64]。GUV の作製には、白金線 [65–67] または透明導電膜ガラス (indium tin oxide, ITO 膜) [68] を用いた electroformation 法、静置水和法 [69, 70]、溶液交換法 [71] など他にも様々な方法が利用されている [72–75]。また GUV は内水相の体積も非常に大きく、例えば 1 mM の色素であれば直径 10 μm の GUV に 3×10^8 もの分子を封入可能である。ところが直径が 100 nm の LUV では 200 分子程度となってしまう (Table 3-1)。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高感度化が期待される。GUV をバイオセンサーに応用した例として、磁性ナノ粒子 (magnetic nanoparticles, MNP) とナノポア形成物質 (α -hemolysin) に基づいて構築されたグルコースまたはエタノールセンサーがある [76]。グルコースまたはエタノール以外の酵素反応試薬とレサズリンおよび MNP を含む GUV を作製し、磁石に添加して固定する。そこへ α -hemolysin を加えて基質を GUV の内水相へ誘導する。GUV の内部で酵素反応が起こり、非蛍光のレサズリンがレゾルフィンに還元されて蛍光を発する

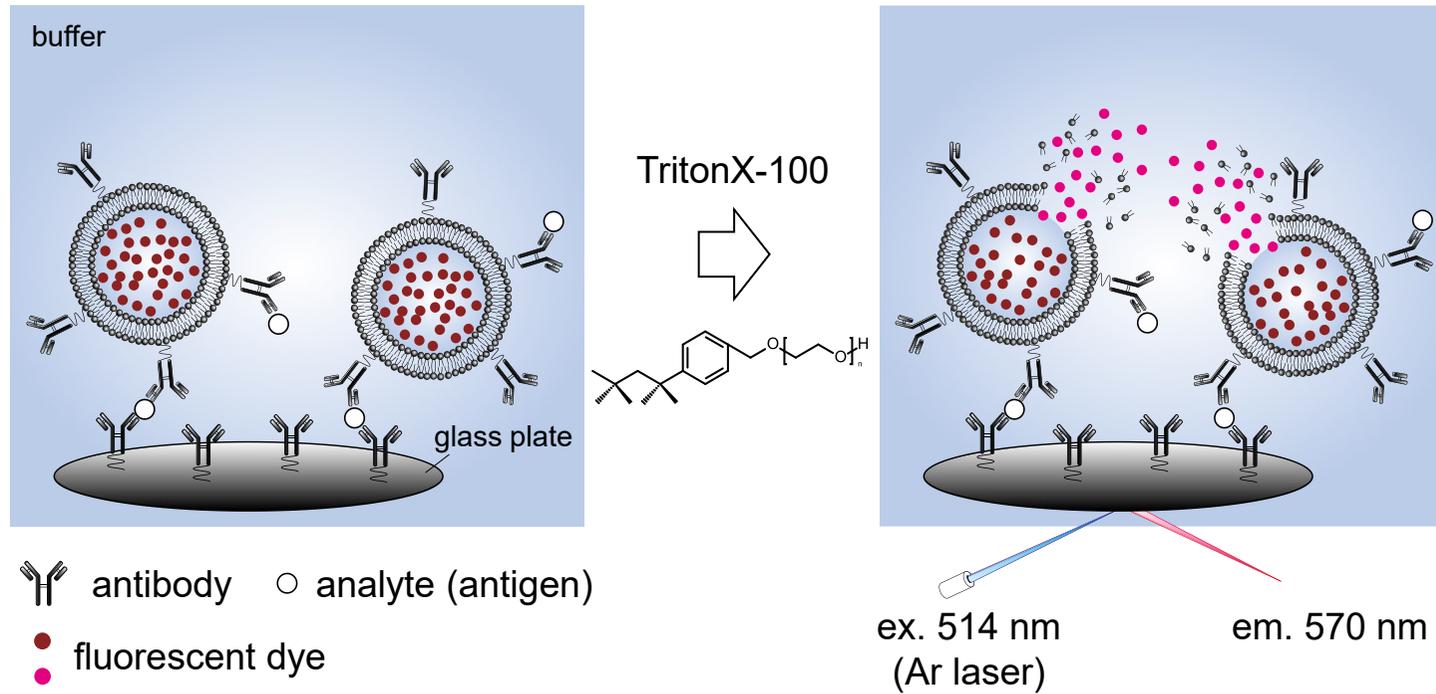
ようになる。この方法は MNP と α -hemolysin を用いた簡便な GUV センサーであった。しかしながらこのように GUV をバイオセンサーに組み込んだ研究は依然として報告数が少ない。

本研究では GUV をマーカーとしたイムノアッセイ法の構築を行った (Fig. 3-1)。大量の分子を封入できる GUV をマーカーとすることで高感度なイムノアッセイ法になると考えた。蛍光色素を含む抗体修飾 GUV を作製し、抗体およびアナライトを修飾したガラス基板上に固定する。過剰な GUV やアナライトは各ステップの洗浄操作で除去する。GUV に消光濃度で蛍光色素を封入すれば、界面活性剤で GUV が破壊されて消光が解消される。そのため、アナライト濃度に依存して蛍光強度が上昇する。これを蛍光イメージャーで測定し、評価を行った。アナライトのモデルとしてウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) およびリポカリン 2 (lipocalin-2, LCN2) を用いた。

Table 3-1. GUVs と LUV の大きさ

1, 2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) を用いた時の概算

	GUVs (直径10 μm)	LUV (直径100 nm)
脂質二分子膜厚 (nm)	6 (DPhPC)	6 (DPhPC)
内水相部分の半径 (μm)	4.994	0.044
内水相の体積 (fL)	522	3.6×10^{-4}
色素1 mM を封入	3×10^8 分子	200分子



利点
大量の分子を封入可能 ⇨ 高感度化につながる

Fig. 3-1. GUVs をマーカーとして利用するサンドイッチ型リポソーム免疫アッセイの模式図

3-2 実験

3-2-1 実験試薬

1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC, 10 mg/mL chloroform solution)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE, 10 mg/mL chloroform solution)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(cap biotinyl) (sodium salt) (powder, B-cap-PE) は Avanti Polar Lipids 社 (Alabaster, AL, USA) から購入し、窒素封入後、-20°Cで遮光保存した。ただし、DOPE は chloroform (和光純薬工業, Osaka, Japan) で10倍希釈して1 mg/mLの溶液を使用した。B-cap-PE はガラスバイアルに秤量し chloroform で溶解して100 µg/mLに調製してから使用した。また chloroform は Econo-Column[®](BIO-RAD Laboratories, Inc) に詰めた活性アルミナ (和光純薬工業) に流して不純物を除去した。Cholesterol (chol)、D(-)-sorbitol、D(+)-glucose、dimethyl sulfoxide (DMSO, dehydrated)、*N*-hydroxysuccinimide (NHS) は和光純薬工業から購入した。chol はメタノール (和光純薬工業) で3回再結晶してから使用した。1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) は Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) から購入した。Anti-BSA antibody (polyclonal, rabbit) (anti-BSA) はフナコシから購入した (Tokyo, Japan)。Albumin from bovine serum (BSA, >97%)、lipocalin-2 (human recombinant)、ヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA, ≥97%)、γ-グロブリン (γ-globulins from human blood, ≥99%)、transferrin human、haptoglobin from pooled human plasma (lyophilized powder)、sucrose およびヒト血清 (human serum, from human male AB plasma) は Sigma-Aldrich Chemical 社 (St Louis, MO, USA) から購入した。Human lipocalin 2/NGAL ELISA kit および Anti-lipocalin-2 antibody (monoclonal) は R&D systems (Minneapolis, MN, USA) から購入した。Rhodamine 6G (R6G) は東京化成 (Tokyo, Japan) から購入した。3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MTS, >99.9%) は信越シリコーン (Tokyo, Japan) のシラン化剤を使用した。*N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) および *N*-ethylmaleimide (NEM) は Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) から購入した。他の試薬は全て analytical reagent grade の物を用いた。カバーガラスは micro cover glass (15 mm/thickness 0.12~0.17 mm)、松浪ガラス製 (Tokyo, Japan) の物を使用した。すべての実験に用いた Milli-Q 水は Millipore reagent water system (Millipore, Bedford, MA, USA) から採水した。

3-2-2 装置

全てのリポソームの蛍光画像は FluorImager 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) を使って得られ、蛍光強度は Image Quant (ver. 5.2) で解析した。緩衝液を調製する際、Denki Kagaku Keiki (Tokyo, Japan) の glass electrode pH meter で pH を決定した。

3-2-3 R6G を封入した GUV の作製

4.2 mg DPhPC、0.22 mg chol、0.021 mg DOPE をモル比 9 : 1 : 0.050 で含む 5 mM の脂質溶液 (chloroform 溶媒) を調製した。この脂質溶液を用いて Electroformation 法によって GUV を作製した。electroformation 法は脂質を塗布した電極間に交流電場を印加して電極からリポソームを作製する方法である。本実験では Vesicle Prep Pro (Nanion Technologies, GmbH, Germany) という装置を用いた (Fig. 3-2)。まず、ITO 膜コーティングガラスに脂質溶液を 20 μ L 添加し溶媒の chloroform を蒸発させて脂質薄膜を形成させた。O-リングを密着し内部に 1 mM R6G を含む 1 M sorbitol 溶液を 300 μ L 添加し、気泡が入らないように ITO 膜コーティングガラスを重ねた。糖溶液は GUV の内水相となる。2 枚の ITO 膜コーティングガラスを Vesicle Prep Pro にセットし Table 3-2 の条件で GUV の作製を行った (Fig. 3-3)。作製後はエッペンチューブに回収し窒素を封入して 4°C の暗所で保存した。R6G を封入した GUV は以後 R6G-GUV と表記する。

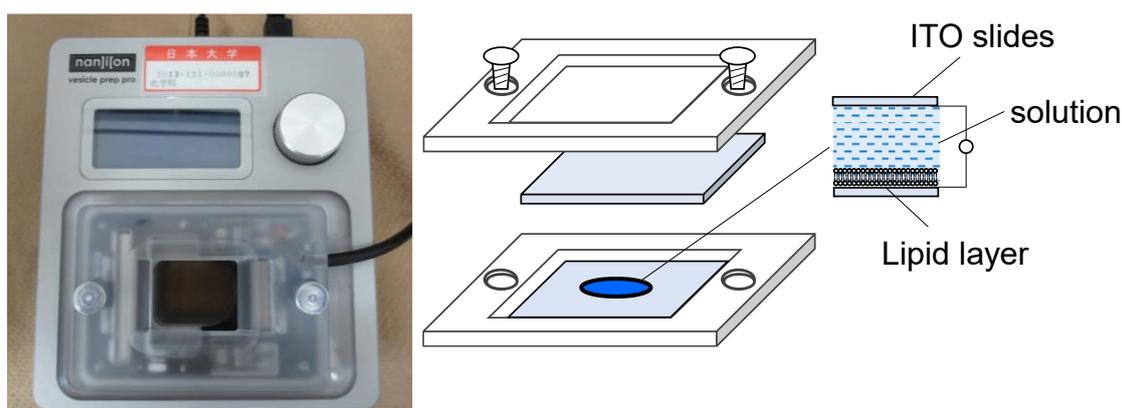


Fig. 3-2. Vesicle Prep Pro の装置外観と ITO 膜コーティングガラス

Table 3-2. GUV 作製時の Vesicle Prep Pro の設定条件

Vesicle Prep Pro の設定	
Freq.	5 Hz
Ampl.	3 V
Temp.	37°C
Rise t.	3 min
Fall t.	120 min
Main t.	5 min

base protocol

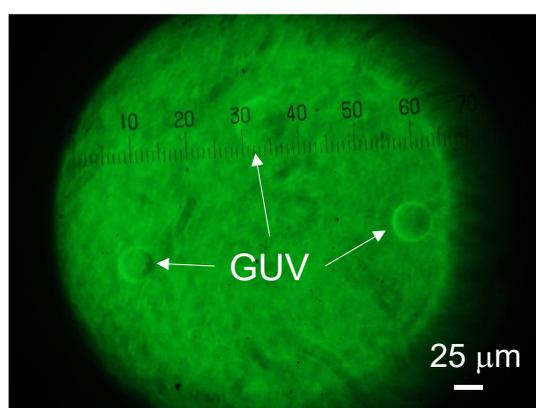


Fig. 3-3. Vesicle Prep Pro で作製した GUV の倒立顕微鏡画像 (R6G 未封入)

3-2-4 Immuno-GUV の作製

ガラス基板上の抗体と結合させるため、使用する GUV には抗体を修飾する必要があった。GUV と抗体はアミンカップリング法を用いて修飾した (Fig. 3-4)。22 mM NHS および 55 mM EDC を含む 16.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-BSA 10 μL を 100 μL の R6G-GUV と混合し 15 分間室温で静置した。次に 14,000 g、20°C で 30 分間遠心分離し、50 μL をピペットでゆっくり吸い出し除去した。残りの 50 μL は窒素を封入後、使用するまで 4°C の暗所で保存した (anti-BSA-R6G-GUV)。Anti-LCN2 についても同様にして R6G-GUV に修飾した (anti-LCN2-R6G-GUV)。

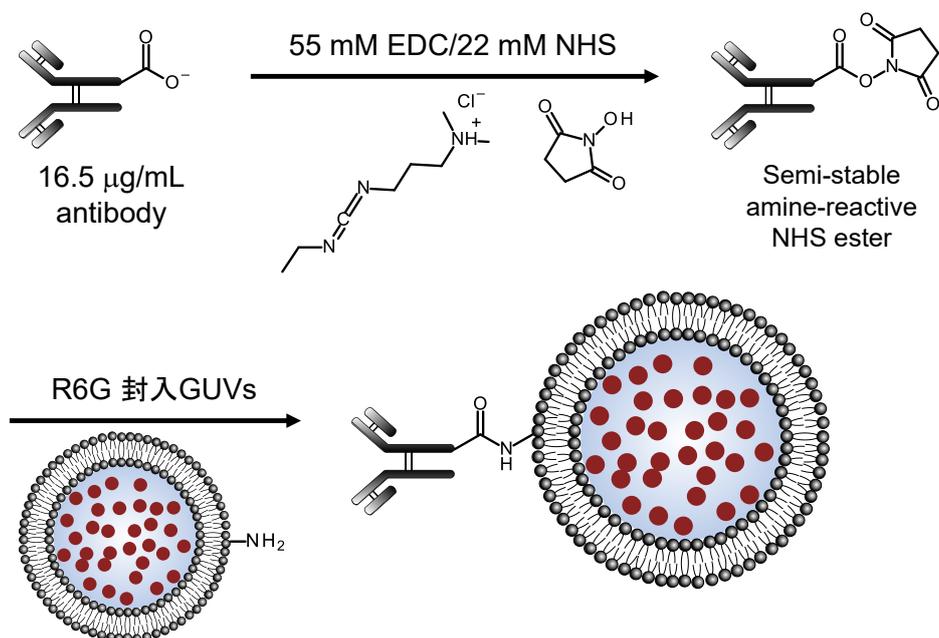


Fig. 3-4. R6G-GUVs への抗体の修飾 (アミンカップリング法)

3-2-5 ガラス基板への抗体の固定化

免疫アッセイに用いる円形のカバーガラス ($\phi=15\text{ mm}$) に抗体を修飾した (Fig. 3-5a)。1 M NaOH に 3 時間以上浸漬したカバーガラスを Milli-Q 水で洗浄し 70°C の乾燥機で乾燥させた。50% (v/v, in toluene) MTS をガラスの片面に 100 μL 添加して 1 時間遮光放置した。Toluene でカバーガラスを洗浄して過剰な toluene を飛ばした後、100 mM NaH_2PO_4 150 mM NaCl buffer (pH 7.2) (PBS buffer) で希釈した 0.1 mg/mL の SPDP 化 anti-BSA 100 μL を滴下したバランスディッシュ上に MTS 修飾面を下にしてカバーガラスを置いた (4°C, 遮光)。Anti-BSA の SPDP 化は以下のように行った (Fig. 3-5b)。まず DMSO で溶解した 20 mM SPDP 2.5 μL を 1 mg/mL の anti-BSA 200 μL に加え遮光して反応させた (室温)。1 時間後、Dye Removal Columns (Thermo Scientific) を用いて 1,000 g、20°C で 30 秒間遠心分離して未反応の SPDP を除去した (SPDP-anti-BSA)。Anti-BSA を修飾したカバーガラスは Milli-Q 水で洗浄して水分を飛ばし、未反応のチオール基を不活性化するために 53 mg/mL の NEM を SPDP-anti-BSA と同様にして修飾した (室温, 遮光)。2 時間後に Milli-Q 水で洗浄し PBS buffer で満たしたバランスディッシュ内に浸漬し 4°C の冷蔵庫で保存した (anti-BSA-ガラス基板)。

Anti-LCN2 についても同様の手順でカバーガラスの修飾を行った (anti-LCN2-ガラス基板)。

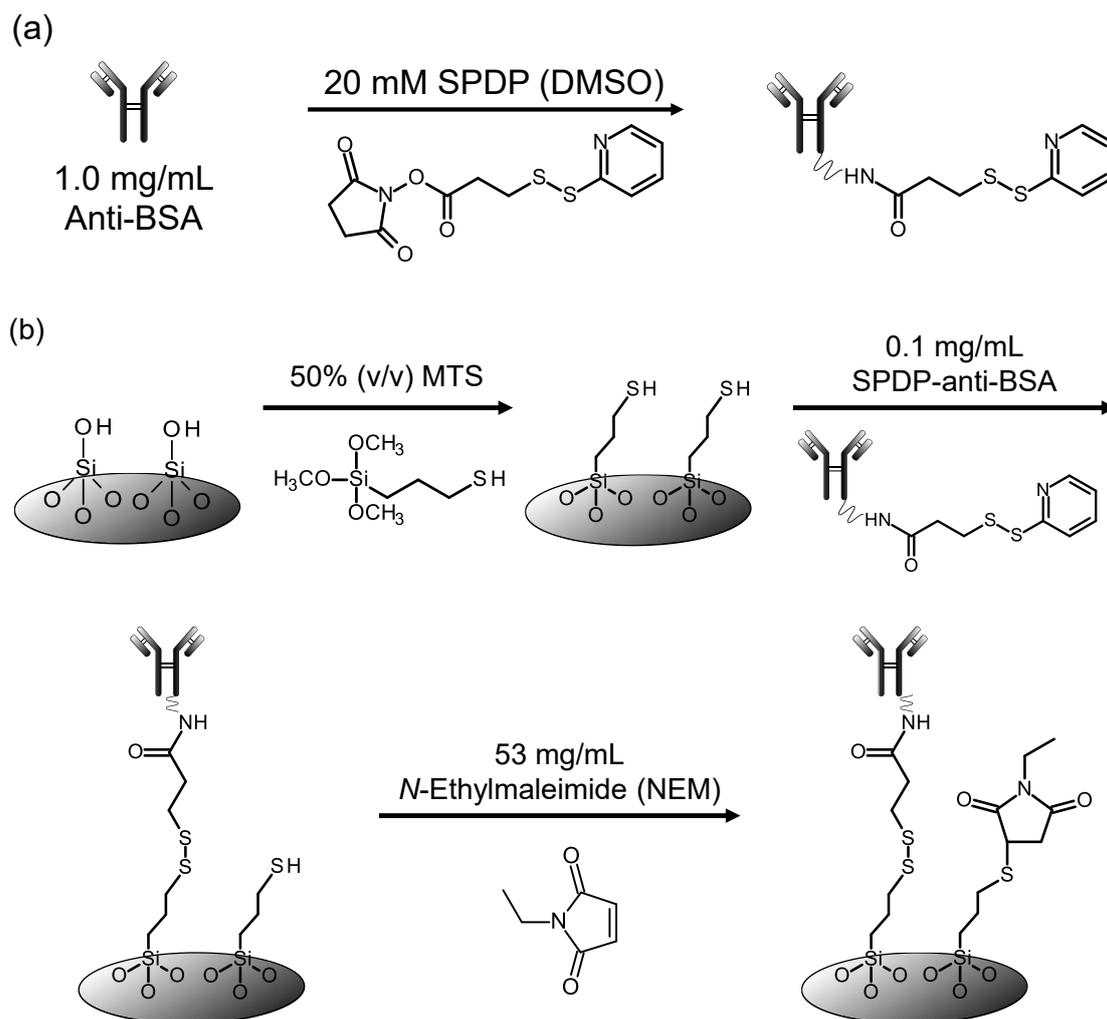


Fig. 3-5. ガラス基板への抗体の修飾方法 (anti-LCN2 も同様の手順)

(a) 抗体の SPDP 化 (SPDP-anti-BSA)

(b) ガラス基板への SPDP-anti-BSA の修飾

3-2-6 イムノアッセイ

免疫アッセイの手順および実験装置の画像を Fig. 3-6, 3-7 に示した。アクリル製のチャンバー内に 10 mM NaH₂PO₄ 10 mM NaCl buffer (pH 7.4) (PB buffer) 585 μ L 添加し、anti-BSA-ガラス基板を置いた。PB buffer で調製した既知濃度の BSA を 15 μ L 加えて 15 分間反応させ、ペリスタポンプを使用して PB buffer を 3 分間灌流して過剰な BSA を除去した (流速 200 μ L/min)。Anti-BSA-R6G-GUV をチャンバー内に 15 μ L 添加して 30 分間静置した。30 分後、PB buffer を 15 分間灌流して過剰な GUV や R6G を除去した。さらにマイクロピペットを用いて PB buffer 600 μ L を溶液交換した。このチャンバーを蛍光イメージャーのス

ステージにセットして蛍光強度を測定した (excitation 514 nm, emission 570 nm)。20% (v/v) の TritonX-100 を 10 μ L 添加してゆっくり攪拌した後に再度蛍光強度を測定した。蛍光強度は Image Quant (ver. 5.2) を用いてチャンバーの端は除いて算出した。解析は下記に示した式に従って行った。

$$\text{Relative fluorescence (\%)} = \frac{F_t - F_0}{F_0} \times 100$$

F_0 は TritonX-100 添加前の蛍光強度、 F_t は TritonX-100 添加後の蛍光強度である。

LCN2 についても BSA と同様の手順でアッセイしたが、チャンバー内に添加する GUV は 2 μ L で行った。

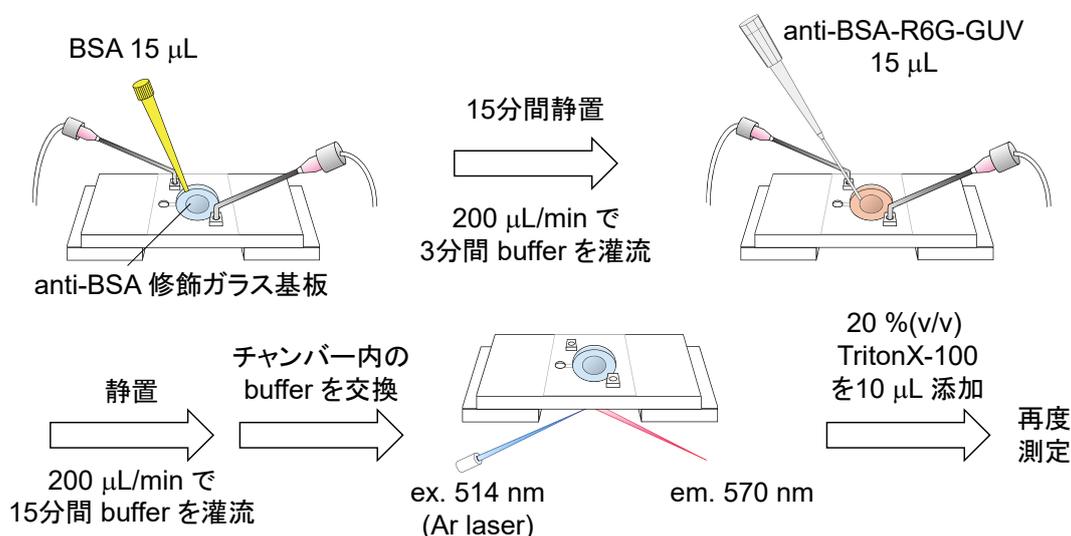


Fig. 3-6. 実験操作の流れ (BSA を測定する際の場合)

LCN2 を測定する際は anti-LCN2-R6G-GUV の添加量は 2 μ L。

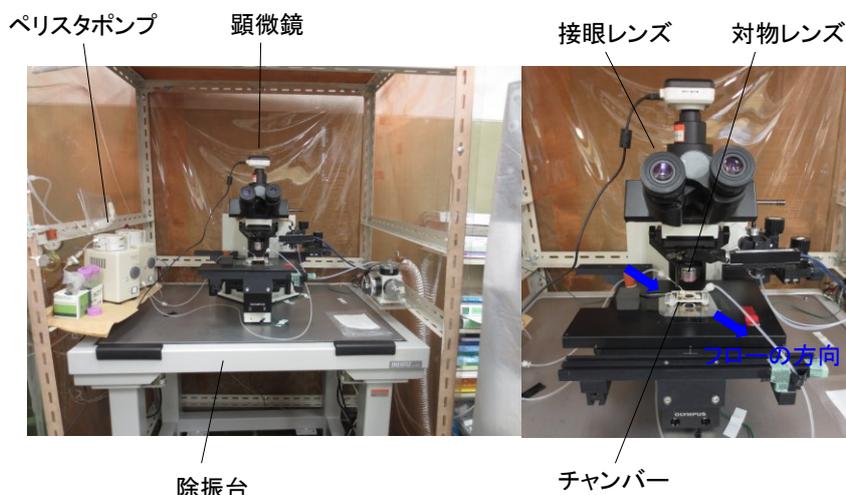


Fig. 3-7. 実験装置の外観

3-2-7 血清タンパク質による応答への影響

1~4 mg/mL の HSA、1.36 mg/mL γ -globulin、0.24 mg/mL Transferrin、0.16 mg/mL Haptoglobin を PB buffer で調製し、80 pg/mL の LCN2 と混合した。各混合溶液を anti-LCN2-ガラス基板を置いたチャンバー内に 15 μ L 添加した。チャンバー内の最終濃度は LCN2 は 1 pg/mL、HSA 12.5~50 μ g/mL、 γ -globulin 17 μ g/mL、Transferrin 3 μ g/mL、Haptoglobin 2 μ g/mL であった。また、LCN2 の最終濃度が 10 pg/mL となるように調製し、最終濃度 12.5 μ g/mL HSA と混合した溶液についても同様に実験した。15 分後に PB buffer をペリスタポンプによって 3 分間灌流し過剰な血清を除去した (流速 200 μ L/min)。Anti-LCN2-R6G-GUV をチャンバー内に 2 μ L 添加して 30 分間静置した。30 分後、PB buffer を 15 分間灌流して過剰な GUV や R6G を除去した。さらにマイクロピペットを用いて PB buffer 600 μ L を溶液交換した。このチャンバーを蛍光イメージャーのステージにセットして蛍光強度を測定した (excitation 514 nm, emission 570 nm)。20% (v/v) の TritonX-100 を 10 μ L 添加してゆっくり攪拌した後に再度蛍光強度を測定した。解析は 3-2-6 と同様にして行った。

3-2-8 ヒト血清中の LCN2 の定量

PB buffer を用いてヒト血清を 1250 倍に希釈し、anti-LCN2-ガラス基板を置いたチャンバー内に 15 μ L 添加した (最終希釈倍率 50000 倍)。15 分後に PB buffer をペリスタポンプによって 3 分間灌流し過剰な血清を除去した (流速 200 μ L/min)。Anti-LCN2-R6G-GUV をチャンバー内に 2 μ L 添加して 30 分間静置した。30 分後、PB buffer を 15 分間灌流して過剰な GUV や R6G を除去した。さらにマイクロピペットを用いて PB buffer 600 μ L を溶液交換した。このチャンバーを蛍光イメージャーのステージにセットして蛍光強度を測定した (excitation 514 nm, emission 570 nm)。20% (v/v) の TritonX-100 を 10 μ L 添加してゆっくり攪拌した後に再度蛍光強度を測定した。解析は 3-2-6 と同様にして行った。

また、1 pg/mL の LCN2 を添加した血清についてもアッセイを行い、回収率を算出した。

3-3 結果および考察

3-3-1 GUV 内水相への R6G の封入

DPhPC : chol : DOPE = 9 : 1 : 0.05 (molar ratio) の脂質組成で、自己消光濃度の 1 mM R6G を含む 1 M sorbitol を内水相とした GUV を electroformation 法で作製した。作製した GUV を PB buffer で 10 倍希釈し、倒立顕微鏡で観察した (Fig. 3-8)。赤い円形のスポットは内水相に R6G が封入された GUV を示している。

Avidin-biotin 結合を利用して GUV を固定し、GUV の内水相に R6G が封入されたことを調べた。まず、DPhPC : chol : DOPE : B-cap-PE = 9 : 1 : 0.05 : 0.025 (molar ratio) の組成の脂質溶液を用いて biotin 化 GUV を作製した (biotin-R6G-GUV)。次にカバーガラスに avidin を修飾した (Fig. 3-9)。1 M NaOH で 3 時間以上浸漬したカバーガラスを Milli-Q 水で洗浄し 70°C の乾燥機で乾燥させた。50 % (v/v, in toluene) MTS をガラスの片面に 100 μ L 添加して 1 時間遮光放置した。Toluene でカバーガラスを洗浄して過剰な toluene を飛ばした後、2 mM sulfo-GMBS 100 μ L を滴下したバランスディッシュ上に MTS 修飾面を下にしてカバーガラスを置いた (4°C, 遮光)。次にカバーガラスを Milli-Q 水で洗浄し、0.1 mg/mL の avidin を sulfo-GMBS と同様にして反応させた。再度カバーガラスを Milli-Q 水で洗浄し、0.5 M ethanolamine で未反応のスクシンイミジル基を不活性化した。30 分後に Milli-Q 水で洗浄し PB buffer で満たしたバランスディッシュ内に浸漬し 4°C の冷蔵庫で保存した (avidin-ガラス基板)。作製した avidin-ガラス基板を PB buffer 585 μ L を加えたチャンバー内に置き、biotin-GUV を 15 μ L 添加した。5 分後に流速 200 μ L/min で PB buffer を 3 分間灌流し、遊離の GUV および R6G を除去した。灌流後、チャンバー内に PB buffer を 590 μ L 添加し、蛍光イメージャーで蛍光強度を測定した (excitation 514 nm, emission 570 nm)。20 % (v/v) TritonX-100 または PB buffer を滴下して再度蛍光強度を測定した。

Fig. 3-10 は avidin-biotin 結合によってガラス基板に固定した GUV の蛍光強度の増加率を示している。TritonX-100 を添加した場合は蛍光強度は約 20 % 増加したが、PB buffer を添加すると 4 % 程度しか増加しなかった。TritonX-100 を加えると、GUV が破壊され内水相に封入されていた R6G が漏出したことで蛍光強度が増加したと考えられる。従って、R6G は GUV の内水相に封入されたと示された。

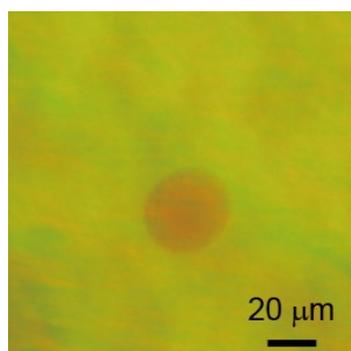


Fig. 3-8. Vesicle Prep Pro で作製した 1 mM R6G-GUV の倒立顕微鏡画像

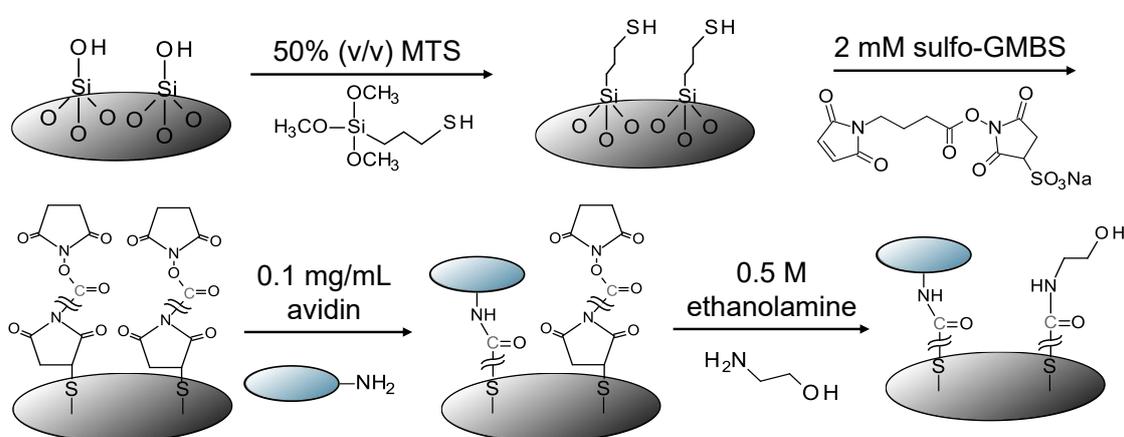


Fig. 3-9. ガラス基板への avidin の修飾方法

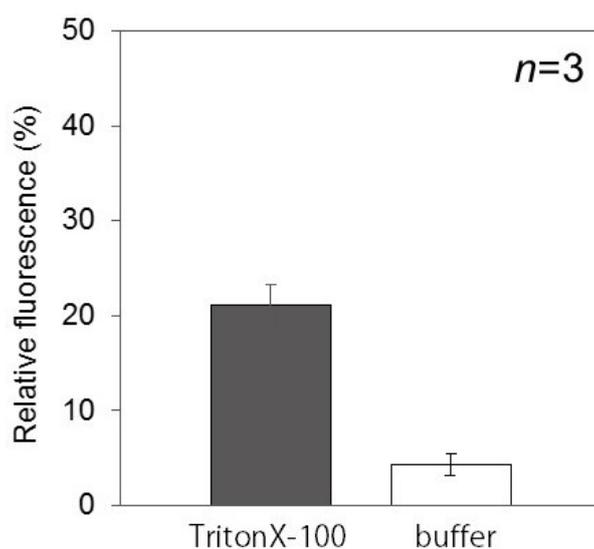


Fig. 3-10. Avidin-ガラス基板に biotin-GUV を固定した際の蛍光強度の増加率
 DPhPC:chol:DOPE:B-cap-PE=9:1:0.05:0.025 (molar ratio)
 Biotin-R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 %(v/v)

3-3-2 GUV の機能化と回収

アミンカップリング法によって表面に anti-BSA を修飾した GUV は、反応溶液から anti-BSA-R6G-GUV を回収する必要があった。通常、抗体を修飾したリポソームはサイズ排除クロマトグラフィーで分離する [77–79]。しかしサイズ排除クロマトグラフィーは 300–500 nm より小さいリポソームしか利用できない [80, 81]。密度勾配遠心分離 [77, 82, 83] や超遠心分離 [84] は単層リポソームの回収に利用されるが、これらの方法は特別な装置と訓練を要する。加えて、機械的な圧力は抗体の凝集を引き起こす可能性がある [85]。つまり、低速での遠心分離がシンプルでかつ抗体修飾 GUV を回収する方法として好ましい。

本実験では anti-BSA-R6G-GUV を 14,000 g で 30 分間遠心分離した。Fig. 3-11a は遠心分離後の GUV を上層および下層に分けた分画を PB buffer で 100 倍希釈し顕微鏡で観察した際の画像である。上層よりも下層の方が GUV の個数が多く観察された。また、anti-BSA-R6G-GUV および未修飾 R6G-GUV を用いて遠心分離後の上層と下層について、0.1 mg/mL の BSA 存在下でアッセイを行った (Fig. 3-11b)。未修飾 GUV の上層でアッセイした場合、蛍光強度の増加率は約 15% でわずかに高い。一方、anti-BSA-R6G-GUV の下層を用いた場合は約 32% であったので、多くの GUV は下層に存在しているといえる。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。

今回作製した GUV は内水相・外水相ともに 1 M の sorbitol を使用した。内水相と外水相の糖の密度を変えて遠心分離した場合に GUV の挙動がどのようになるか実験を行った。内水相が 1 M sucrose (0.988 M の時 $d=1.13$) の GUV を 1 M の D-(+)-glucose (0.944 M の時 $d=1.06$) で 10 倍希釈した溶液を 3-2-2 の実験と同様にして遠心分離した。この溶液を 3 層に分割して回収し、PB buffer で希釈し顕微鏡で観察した (Fig. 3-12)。その結果、GUV は下層にほとんど存在することがわかった。これは抗体を修飾した GUV は sucrose を用いて遠心分離して回収することが難しいことを示している。

以上の結果から、anti-BSA-R6G-GUV および anti-LCN2-R6G-GUV は sorbitol で作製し、14,000 g で 30 分間遠心分離し下層の溶液を使用することにした。

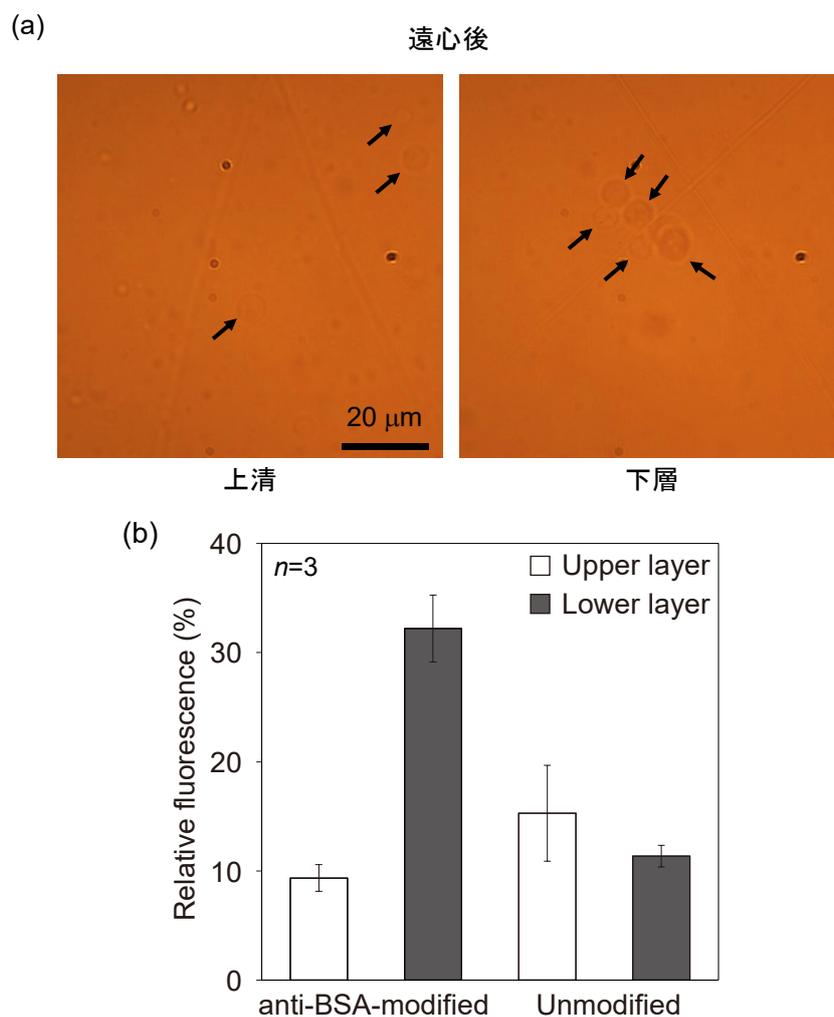


Fig. 3-11. Anti-BSA-R6G-GUV の遠心分離の効果

Anti-BSA-R6G-GUV, R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)

(a) 遠心分離後の anti-BSA-R6G-GUV を上層と下層に分けた際の顕微鏡画像。黒い矢印は GUV の位置を示している。流速 200 μ L/min。

(b) anti-BSA を修飾または未修飾の GUV を遠心分離した溶液の上層と下層をそれぞれアッセイした際の蛍光強度の増加率

□ 遠心分離後の溶液の上層, ■ 遠心分離後の溶液の下層

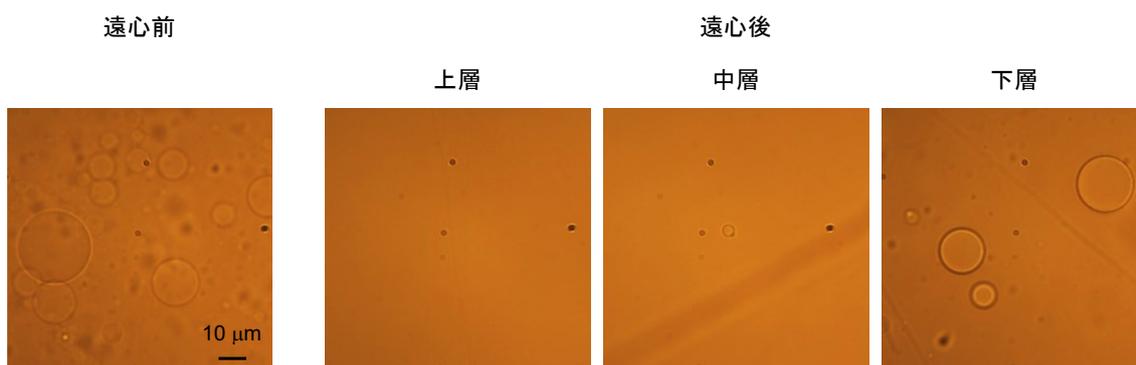


Fig. 3-12. 1 M sucrose GUV を 1 M D-(+)-glucose で 10 倍希釈し、遠心分離前および遠心分離後の各層の顕微鏡画像。

3-3-3 Immuno-GUV のガラス基板への固定時間

Anti-BSA-ガラス基板に anti-BSA-R6G-GUV を固定する時間を調べた (Fig. 3-13)。BSA 0.1 mg/mL 存在下で固定時間を 5~30 分に変えて蛍光強度を測定した。また、BSA 0 mg/mL でも同様の実験を行った。その結果、0 mg/mL では 5~30 分で蛍光強度の増加率は数 % であった。一方、0.1 mg/mL では 5~20 分までは有意な変化は見られなかったが、30 分固定後は約 25 % に上昇した。よって、anti-BSA-R6G-GUV の anti-BSA-ガラス基板上での固定時間は 30 分とした。

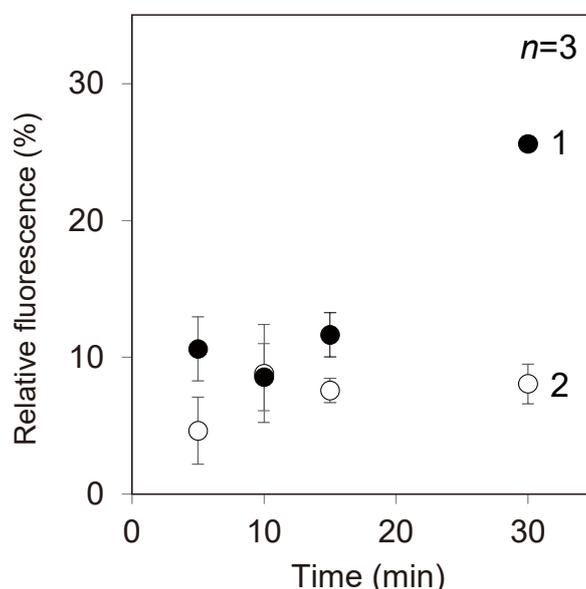


Fig. 3-13. Anti-BSA-R6G-GUV を anti-BSA-ガラス基板上で反応させる時間ごとの蛍光強度の増加率 (○ 0 mg/mL BSA, ● 0.1 mg/mL BSA)

Anti-BSA-R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)

(1) BSA 0.1 mg/mL (2) BSA 0 mg/mL

3-3-4 過剰な試薬のイムノアッセイへの影響

Anti-BSA-R6G-GUV および anti-LCN2-R6G-GUV は遠心分離によって下層に分離され回収されたが、この下層の溶液に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ている。これらの試薬がイムノアッセイに影響するか調べた。

本実験ではチャンバー内で anti-BSA-R6G-GUV を anti-BSA-ガラス基板上で反応させた後、過剰な試薬を除去するためにペリスタポンプを用いて流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ で PB buffer を 15 分間灌流している (チャンバー体積 0.6 mL)。Fig. 3-14a は灌流開始直後 (0 分, 左図) および 6 分後 (右図) の顕微鏡画像である。0 分と 6 分後の画像を比較すると、チャンバー内の溶液の色がオレンジから黄色に変化した。これは外水相の過剰な色素が洗浄されたことを示している。BSA 0 mg/mL での TritonX-100 添加前後の蛍光強度を Fig. 3-14c に、その際の蛍光イメージャーから得た画像を Fig. 3-14b に示した。TritonX-100 添加前後で蛍光強度に有意な差は無かった ($p=0.05$)。

Fig. 3-13 において BSA 0 mg/mL での蛍光強度の増加率は 8% 程度であった。これは少量ではあるが非特異吸着があることを示している。また、経過時間 5~20 分において BSA 0.1 mg/mL と 0 mg/mL では明白な違いはなく、anti-BSA-R6G-GUV とアナライトの間の特異的相互作用は洗浄によって影響しなかったことを示している。洗浄操作は sorbitol を含まない PB buffer で行ったが、洗浄 20 分後まで GUV は破裂しなかった (Fig. 3-15)。

さらに、GUV を使用せずに架橋試薬と anti-BSA 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。

以上の結果より、蛍光測定の前洗浄操作は妨害物質の除去において効果的であった。

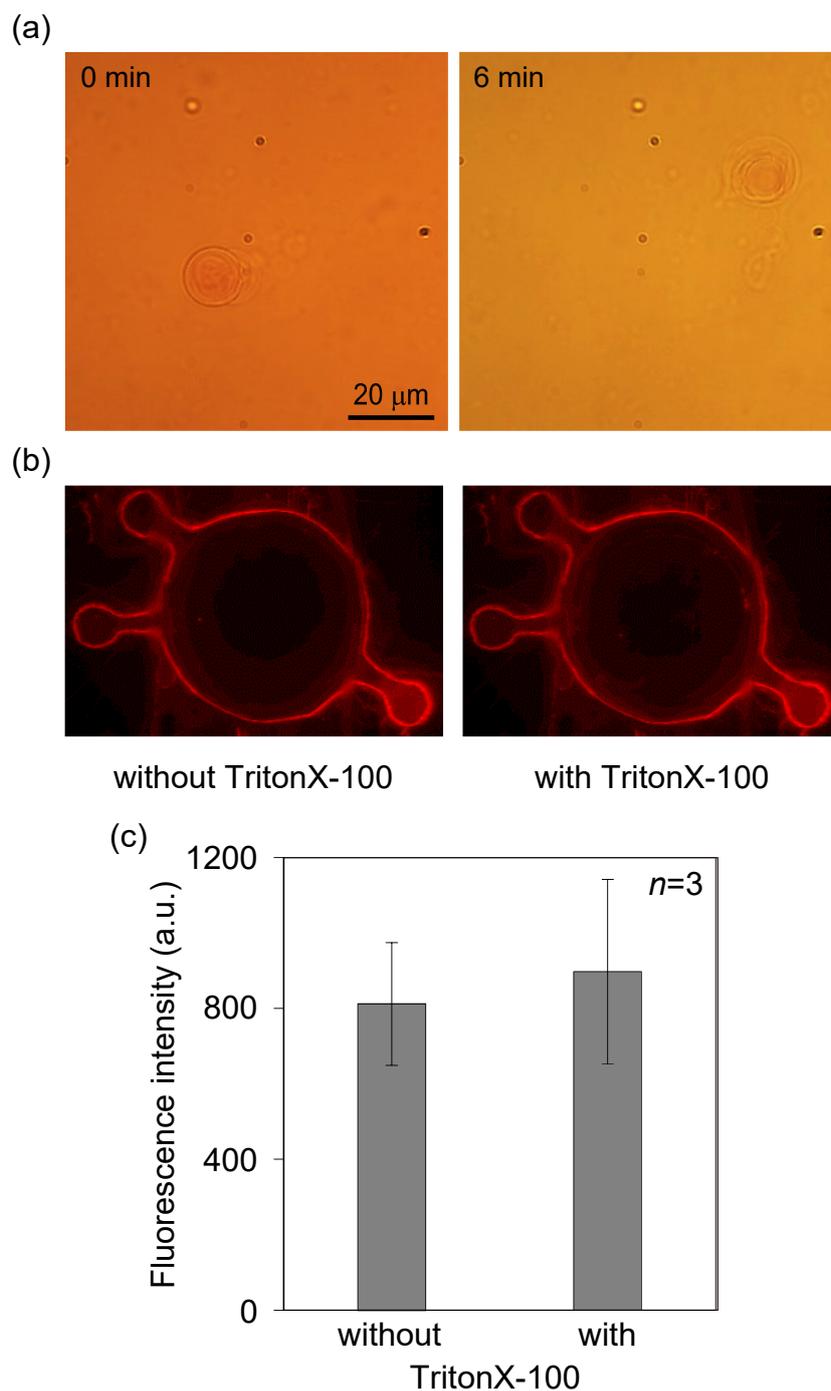


Fig. 3-14. フローによる過剰な試薬の洗浄

Anti-BSA-R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)

(a) anti-BSA-R6G-GUV を anti-BSA-ガラス基板上で静置後に流速 200 μ L/min でフロー (洗浄開始直後と6分後)

(b), (c) BSA 0 mg/mL でアッセイした際の TritonX-100 添加前後の蛍光イメージャー画像および蛍光強度

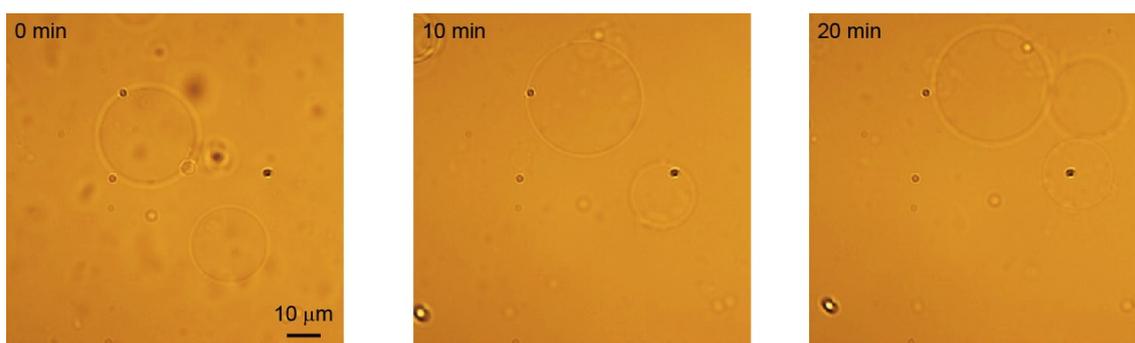


Fig. 3-15. Sorbitol-free buffer で洗浄した際の顕微鏡画像 (洗浄開始直後と 10 分, 20 分後)

3-3-5 BSA の濃度依存性

PB buffer 中の BSA (69 kDa, $pI=4.6\sim 5.1$) [86] の濃度依存性を調べた (Fig. 3-16)。 $1.0 \times 10^{-14}\sim 1.0 \times 10^{-12}$ g/mL の濃度範囲でリニアスケール (Fig. 3-16a) と log スケール (Fig. 3-16b) で図示した。BSA の濃度に依存して蛍光強度の増加率は段階的に上昇し、Fig. 3-16b においては直線的に相関した。BSA 0 mg/mL での蛍光強度の増加率の標準偏差の 3 倍から算出した検出限界は 4 fg/mL ($S/N=3$, $n=3$) であった。また定量限界は 13 fg/mL ($S/N=10$) であった。BSA 0 mg/mL においてわずかに増加した蛍光強度の増加率は anti-BSA-R6G-GUV の非特異吸着を示している。

本実験の検出限界は、channel-based assay (1 ng/mL) [24] や Ag-electrochemistry (0.04 mg/mL) [87] のような電気化学的分析法や、fluorescent anisotropic assay (13.8 μ g/mL) [88]、counter current electrophoresis (60 ng/mL) [89]、spectrofluorometry (4 μ g/mL) [90] のような蛍光分析法より優れていた。しかし、microcontact imprinting method (6.6 ag/mL) [91] は本実験より低い検出限界だった (Table 3-3)。

この低い検出限界は GUV に封入されたマーカの個数が非常に多いために達成された。GUV の表面には多数の認識サイトが存在し、それゆえに感度が低下しているかもしれないが、GUV の大きな体積 (fL レベル) は 1 つの GUV 当たり 10^8 分子封入可能である。溶液中の BSA (アナライト) に対する TironX-100 添加後に放出されたマーカの量 (mol) として蛍光増幅率を算出した。放出されたマーカ (R6G) の量は溶液中での R6G の検量線から求めた。BSA が 0.1 pg/mL の場合、シグナル増幅率は約 10^8 であった。これは高い感度はこの分析法のシグナル増幅能に起因するということを示している。

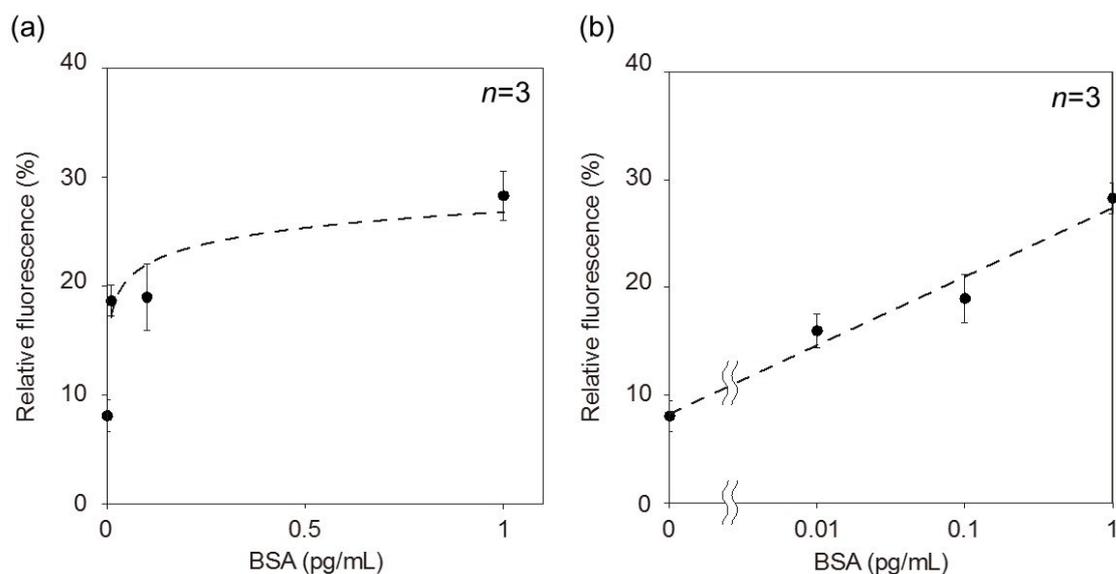


Fig. 3-16. BSA の濃度に対する蛍光強度の増加率
 Anti-BSA-R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)
 (a) リニアスケール (b) log スケール

Table 3-3. 本研究および他の分析法の BSA の検出限界

測定方法	測定範囲	LOD	引用文献
本研究	0-1 pg/mL	4 fg/mL	
lipid bilayer sensor based on gramicidin A	1-100 ng/mL	1 ng/mL	[24]
Ag electrochemistry	0.04-0.12 mg/mL	0.04 mg/mL	[87]
fluorescent anisotropy method	0.1-4.0 mg/mL	13.8 μ g/mL	[88]
counter current electrophoresis		60 ng/mL	[89]
spectrofluorimetry	0-80 μ g/mL	4 μ g/mL	[90]
microcontact imprinting method	0.66 ag/mL-0.66 μ g/mL	6.6 ag/mL	[91]

3-3-6 LCN2 の濃度依存性

LCN2 はリポカリンファミリーに属する 25 kDa の糖タンパク質で、好中球ゲラチナーゼ関連リポカリン (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) として知られている。血清や尿中で単量体 (25 kDa)、ホモ二量体 (45 kDa)、ヘテロ二量体 (135 kDa) の形状で見つかる [92]。近年、急性腎障害やアルツハイマー病、多発性硬化症、うつなど様々な疾病のバイオマーカーとして注目されている [93]。

LCN2 についても BSA と同様に PB buffer 中での濃度依存性を調べた (Fig. 3-17)。ただし、LCN2 では anti-LCN2-R6G-GUV は最終希釈倍率が 300 倍希釈になるようにして行った。リニアスケールは Fig. 3-17a、log スケールのグラフは Fig. 3-17b に示し、 $1.0 \times 10^{-13} \sim 1.0 \times 10^{-11}$ g/mL の LCN2 濃度範囲で蛍光強度の増加率は上昇した。LCN2 0 mg/mL での蛍光強度の増加率の標準偏差の 3 倍から算出した検出限界は 80 fg/mL ($S/N=3$, $n=3$) であった。また定量限界は 267 fg/mL ($S/N=10$) であった。

この検出限界は、conventional ELISA methods (3 pg or 44 pg/mL) [94] や、graphene-based immunoassay (0.7 pg/mL) [95]、the amperometric sensor (1 ng/mL) [96]、particle-enhanced turbidimetric assay (9.43 μ g/mL) [97] より優れていた (Table 3-4)。

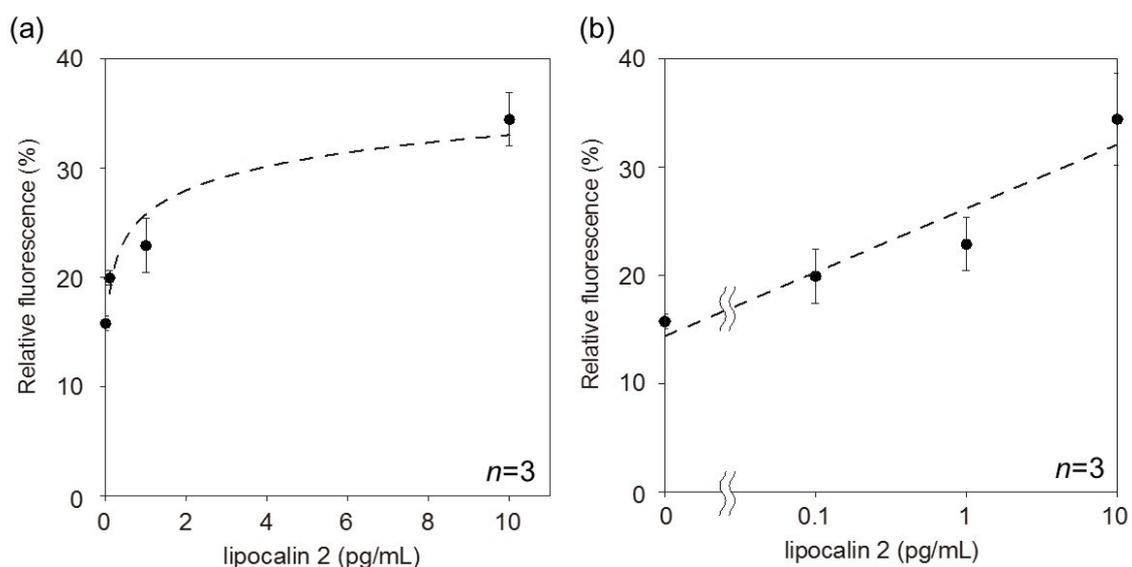


Fig. 3-17. LCN2 の濃度に対する蛍光強度の増加率
 Anti-LCN2-R6G-GUV 40 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)
 (a) リニアスケール (b) log スケール

Table 3-4. 本研究および他の分析法の LCN2 の検出限界

測定方法	測定範囲	LOD	引用文献
本研究	0-10 pg/mL	80 fg/mL	
ELISA (chemical crosslinking of antibody)	2.5-5120 pg/mL	3 pg/mL	[94]
ELISA (conventional method)	40-5120 pg/mL	44 pg/mL	
graphen-based immunoassay	0.6-5120 pg/mL	0.7 pg/mL	[95]
amperometric method	50-250 ng/mL	1 ng/mL	[96]
particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA)	35-4250 μ g/mL	9.43 μ g/mL	[97]

3-3-7 イムノアッセイの選択性

ヒト血清中には様々なタンパク質が存在している。これらが本研究のイムノアッセイに影響を及ぼすかどうか検討する必要がある。代表的な血清タンパク質には human serum albumin (HSA)、 γ -globulin、transferrin、haptoglobin があり、これらの血清中の濃度はそれぞれ 35~50 mg/mL [42]、7.0~17 mg/mL [43]、3 mg/mL [98]、2 mg/mL [99] である。

仮に血清を 1000 倍に希釈して測定する場合、タンパク質も 1000 倍希釈される。そのため、各タンパク質のチャンバー内での最終濃度を HSA 50 μ g/mL、 γ -globulin 17 μ g/mL、transferrin 3 μ g/mL、haptoglobin 2 μ g/mL となるようにして LCN2 1 pg/mL と混合して蛍光強度を測定した (Fig. 3-18a)。また、HSA については 12.5 μ g/mL および 25 μ g/mL の濃度でも測定した。さらに 12.5 μ g/mL HSA と LCN2 10 pg/mL の混合溶液についても測定を行った (Fig. 3-18b)。Fig. 3-18a において LCN2 1 pg/mL のみを測定した場合と比較すると、各濃度の HSA、 γ -globulin、transferrin、haptoglobin とともに蛍光強度の増加率に有意差は無かった ($p=0.05$)。LCN2 の濃度を 10 pg/mL に変えて HSA 12.5 μ g/mL と混合した場合もイムノアッセイへの影響は無かった ($p=0.05$)。

従って血清を 1000 倍希釈する場合、各タンパク質はイムノアッセイに影響を与えなかったため、1000 倍希釈以上の希釈倍率を採用すればヒト血清中の LCN2 を妨害なく測定できると考えられる。

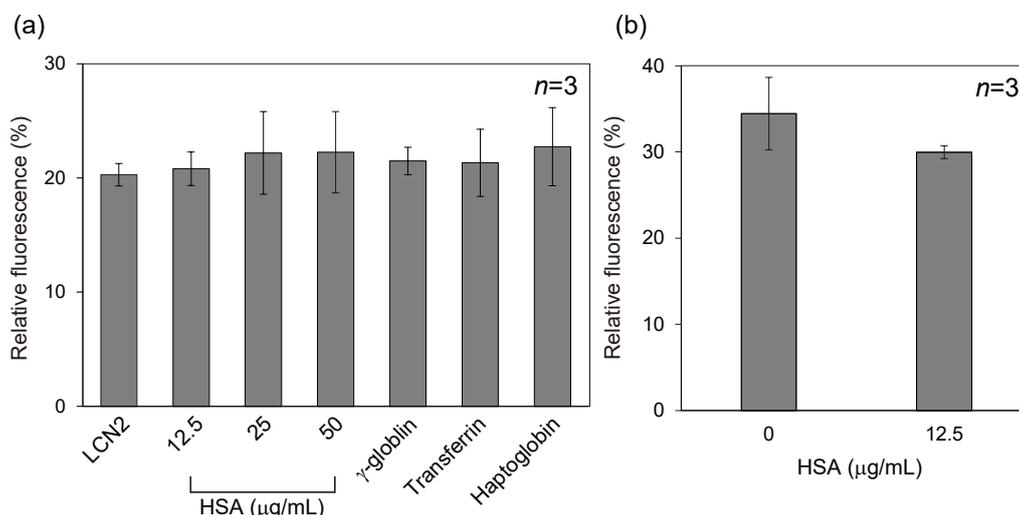


Fig. 3-18. 血清タンパク質による応答への影響

Anti-LCN2-R6G-GUV 300 倍希釈, TritonX-100 0.3 % (v/v)

(a) LCN2 1 pg/mL との各タンパク質の混合溶液中でのアッセイ

HSA 12.5~50 μ g/mL, γ -globulin 17 μ g/mL, Transferrin 3 μ g/mL, Haptoglobin 2 μ g/mL

(b) LCN2 10 pg/mL と HSA 12.5 μ g/mL の混合溶液中でのアッセイ

3-3-8 ヒト血清中の LCN2 の定量

血清中の LCN2 の増加または減少は多様な疾病に関与している [94, 95]。健康な人の血清中の LCN2 の濃度範囲は 50~120 ng/mL であると報告されている [100–103]。

検量線のダイナミックレンジを考慮して、ヒト血清を 50000 倍希釈 (最終希釈倍率) してアッセイを行った。その結果を Table 3-5 に示した。LCN2 を添加していない場合は 0.84 pg/mL、1 pg/mL の LCN2 を添加した場合は 1.9 pg/mL と検量線から算出された。LCN2 を添加していないサンプルでの LCN2 濃度は通常存在する LCN2 濃度を示している。また回収率は $106 \pm 30\%$ ($n=3$) であり許容範囲内であった。

本研究で開発した分析法の確度を確かめるために、ELISA 法によってヒト血清中の LCN2 の定量を行い比較した。ELISA kit は市販されているキット (R&D systems) を購入し、マニュアルに従って測定した。まず、Wash Buffer および Calibrator Diluent RD5-24 (溶液調製用) を Milli-Q 水で希釈して調製した。検量線用の LCN2 (standard) を Milli-Q 水で溶解して 100 ng/mL とし、順次希釈して各濃度の LCN2 を調製した。また測定する血清を Calibrator Diluent RD5-24 で 20 倍希釈した (sample)。Anti-LCN2 が結合したマイクロプレートに Assay Diluent および standard または sample を添加し冷蔵庫で 2 時間反応させた。次に Wash Buffer で洗浄したのちに Human Lipocalin-2 Conjugate を添加し再度冷蔵庫で 2 時間反応させた。Wash Buffer で洗浄し、Substrate Solution (呈色試薬) を添加して室温で 30 分間反応させた。その後反応停止剤として 1 M 硫酸を加えて 450 nm で吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-9000, CORONA ELECTRIC Co., Ibaraki, Japan) で測定した。測定の際、540 nm での吸光度も測定し 450 nm の測定値から差し引き補正した。解析は SF6 で行った。

補正した吸光度から LCN2 0 ng/mL の吸光度を差し引き、濃度に対してプロットしたグラフを Fig. 3-19 に図示した。この検量線から算出した LCN2 濃度を Table 3-5 に示した。LCN2 濃度を希釈倍率を考慮して希釈する前の血清中の濃度に換算すると、本研究の方法では $0.89 \text{ pg/mL} \times 50000 = 44 \text{ ng/mL}$ であるのに対して、ELISA では $0.25 \text{ ng/mL} \times 60 = 15 \text{ ng/mL}$ であった ($n=3$)。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で存在している。市販されている免疫アッセイキットでは固体基板上に固定した抗体の配向がキットごとに異なり、また LCN2 には単量体および 2 種類の二量体が混在するため濃度によって結合の状態は異なることが報告されている [92, 104]。本研究のケースでは異なる血清を用いても有意差なく測定されたことから、より正しい定量が可能である。これは GUV がソフトマテリアルであるために、ELISA で生じる

ような配向の違いによる影響が少ないことが要因であると考えられる。

Table 3-5. 本研究および ELISA 法によるヒト血清中の LCN2 濃度と回収率 ($n=3$)
Table 中の LCN2 濃度は希釈倍率を掛ける前の濃度で表記。

	Dilution rate ^a	Human serum ^b (pg/mL)	Human serum + LCN2 ^c (pg/mL)	Recovery (%)
本研究				
Sample (1) ^d	50000	0.84 ± 0.12	1.9 ± 0.28	106 ± 30
Sample (2) ^e	50000	0.89 ± 0.65		
ELISA ^f				
Sample (2) ^e	60	(ng/mL) 0.25 ± 0.05	—	—

^a human serum (male, type AB) was diluted with a PB buffer (final dilution rate).

^b final concentration of LCN2.

^c LCN2 of 1 pg/mL was added to diluted human serum.

^d human serum sample 1 (male, type AB).

^e human serum sample 2 (male, type AB).

^f assay with a human lipocalin-2/NGAL ELISA kit (R&D systems).

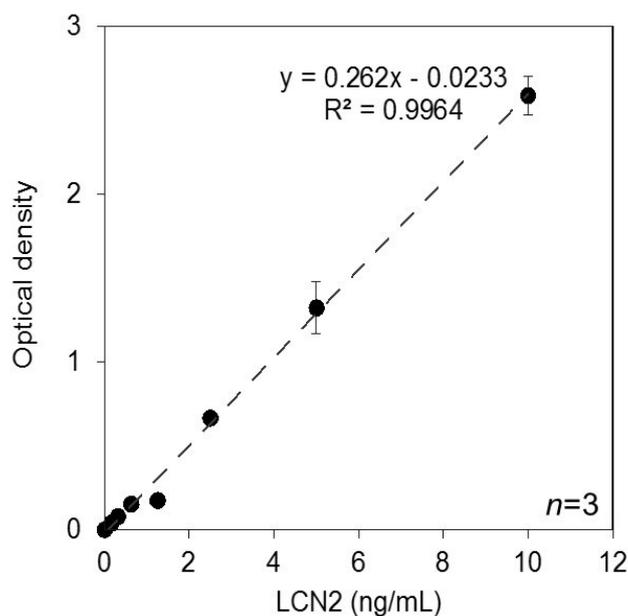


Fig. 3-19. ELISA 法での LCN2 の濃度依存性

Recombinant LCN2 0.156~10 ng/mL。濃度はウェルに添加した際の濃度で表記。

3-4 まとめ

第3章では、抗体を修飾した、蛍光色素を封入した **giant unilamellar vesicles (GUVs)** をマーカーとして使用することでサンドイッチ型免疫アッセイの高感度化を達成した。**R6G-GUV** への抗体の修飾はアミンカップリング法によって行い、遠心分離およびフローシステムによる洗浄操作で過剰な架橋試薬や未反応の **GUV** や抗体を取り除いた。このアッセイ法ではダイナミックレンジは広くないが、検出限界は数十 **fg/mL** と非常に感度が高い。希釈によってサンプルをロスする可能性はあるが、高感度であるためにサンプルを希釈することができる。アッセイ法の応用の限界は **LCN2** のダイナミックレンジが狭いためである。それゆえに希釈倍率の選択は非常に重要である。

だが、このアッセイはシンプルかつ迅速であり、例えば毒素のような疾病の早期段階では低濃度で存在するような化合物の検出に応用できる可能性を有している。

第4章 総括

リポソームは球状の脂質二分子膜であり、細胞と同様の構造をしていることから生体膜機能の研究に多用されてきた。一方で、大きな表面積および内水相を有しているために、薬物担体や免疫アッセイの分野でリポソームを利用してきた。免疫アッセイにおいては、微量な生体分子を計測する分析法を構築するために、リポソームはトランスデューサーや信号増幅器としての役割を期待された。従来の免疫アッセイである ELISA では微量な生体分子を正確に計測するためには濃縮することが重要である。そのため固相抽出や免疫沈降などの前処理操作を必要とすることによって操作が複雑になり、時間を要することが多い。そこでリポソームを信号増幅に用いることで、より簡便で高感度な免疫アッセイ法を構築することができると考えた。本研究ではリポソームに蛍光色素を封入し、ガラス基板上に修飾した抗体と免疫アッセイを行い、蛍光強度を測定する分析法を構築した。応答の増幅はイオンチャン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 を封入した免疫リポソームとアナライトおよびグラミシジン溶液で混合し、抗体を修飾したガラス基板上に固定する方法を提案した (GIPA 法)。溶液中での混合により免疫凝集が起こり複合体を形成する。その複合体をガラス基板上に免疫沈降させることによってアナライトの濃縮を行う。またグラミシジンは以前本研究室で開発したリポソームアレイでも用いたシグナル増幅方法であり、脂質二分子膜中に包埋されたグラミシジンは一価のカチオンを透過させる性質を持っている。リポソームの内水相には BCECF を pH 4.8 で封入し、外水相は pH 7.8 の buffer にすることで pH 勾配を付加してある。そのため、pH 勾配によって水素イオンが内水相から外水相に漏出し、内水相の BCECF の蛍光強度が上昇する仕組みである。グラミシジンおよび免疫凝集、免疫沈降法を組み合わせることで、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 ($S/N=3$) であった。したがって以前のリポソームアレイに比べて感度が向上した。また、実試料としてヒト血清中のサブスタンス P の定量を行い、ELISA kit と結果を比較したところ、2つの測定方法による違いは見られず GIPA 法の正確性が確認できた。またアナライトをストレプトリジン O のように別のタンパク質に変えても同様に定量することが可能であった。つまり、GIPA 法は使用する抗体を変えるだけで他の分析にも応用できると示された。以上のことから、グラミシジンおよび免疫凝集、免疫沈降法を用いることで、免疫アッセイの高感度化が可能であるということが明らかとなった。

第3章では、第2章のGIPA法で用いた多重膜リポソーム(直径数100 nm)と異なり、巨大単層リポソーム(GUV, 直径数 μm)を利用して高感度イムノアッセイの構築を行った。GUVは他のリポソームに比べて、内水相の体積が非常に大きく、大きな一枚膜リポソーム(LUV, 直径数100 nm)の約 1.5×10^6 倍である。つまり、GUVをイムノアッセイのマーカースとすれば、大量のマーカース分子を封入することができるために高感度化が可能であると考えた。GUVには消光濃度でローダミン6G(R6G)を封入する。Electroformation法で作製したR6G-GUVにアミンカップリング法で抗体を修飾し、遠心分離によって抗体修飾R6G-GUVを回収した。イムノアッセイは抗体を修飾したガラス基板上で行い、アナライトを添加後に抗体修飾R6G-GUVを固定し、過剰な試薬はフローシステムによって洗浄した。TritonX-100でGUVを溶解してR6Gを漏出させ、蛍光強度を測定する。この時の蛍光強度が溶解前よりも上昇することでシグナルの増幅が可能となる。この方法において、急性腎障害やアルツハイマー病などのバイオマーカースとして近年注目されているリポカリン2(LCN2)の検出限界は80 fg/mL ($S/N=3$, $n=3$)であった。これはELISA法や他の分析法よりも優れた検出限界であることがわかった。また、ヒト血清中のLCN2について定量したところ、健常人の血清に含まれている量と同程度の値であった。一方、ELISA kitでも同様に実験を行った結果、ELISAではLCN2濃度は低くなってしまった。LCN2は血清中で単量体、ホモおよびヘテロ二量体を形成している。これが抗体の立体配置と影響し本法とELISA kitで異なる濃度になってしまった原因ではないかと思われた。しかしながら、本法は数十 fg/mLの検出限界を有し、シグナル増幅率はウシ血清アルブミンにおいて約 10^8 であった。したがって、GUVをマーカースとして用いることでサンドイッチ型イムノアッセイの高感度化を達成できることが明らかとなった。

本研究によって、リポソームを利用した新しい高感度イムノアッセイ法を構築することができた。イオンチャネルや免疫凝集、またはGUVを用いることで高感度化が可能となった。これらの方法を用いることで、疾病の早期発見や毒素など低濃度で存在する分子の定量に有用なツールになると考えられる。GUVをシグナル増幅に用いる場合、GUVに封入されなかったマーカース分子や過剰な架橋試薬および抗体の分離が必要となる。本研究の場合、遠心分離とフローシステムを用いることで過剰な試薬を除去したが、この方法ではフローシステム以外の応用は難しい。遠心分離によってGUVを回収している方法も発表されているので、遠心分離の条件を検討することでフローシステム以外での応用も可能になると考えられる[105]。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。リポソームイムノアッセイ

の研究は盛んに行われているが、GUV のバイオセンサーは今後の発展が見込まれる分野である。本研究で開発した免疫アッセイ法がこの分野で活用されていくことを期待する。

参考文献

- [1] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 238-252
- [2] R. S. Yalow, S. A. Berson, Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody, *J. Clin. Invest.*, 38 (1959) 1996-2016
- [3] R. S. Yalow, S. A. Berson, Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, 184 (1959) 1648-1649
- [4] B. K. V. Weemen, A. H. W. M. Schuurs, Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Letter.*, 15 (1971) 232-236
- [5] E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 8 (1971) 871-874
- [6] C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays, *Spectrochim. Acta B*, 76 (2012) 27-39
- [7] Y. -J. Chang, Y. -J. Huang, Ni-Co alloy coated QCM immunosensor to immobilize multiplex histidine-tagged proteins for label-free immunoassays, *Sens. Actuators B Chem.*, 222 (2016) 682-687
- [8] S. K. Vashist, M. Saraswat, H. Holthöfer, Comparative study of the developed chemiluminescent, ELISA and SPR immunoassay formats for the highly sensitive detection of human albumin, *Procedia Chemistry*, 6 (2012) 184-193
- [9] X. Wang, R. Niessner, D. Tang, D. Knopp, Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins, *Anal. Chim. Acta*, 912 (2016) 10-23
- [10] L. Chang, J. Li, L. Wang, Immuno-PCR: Au ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection, *Anal. Chim. Acta*, 910 (2016) 12-24

- [11] L. Belager, C. Sylvestre, D. Dufour, Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures, *Clin. Chi. Acta*, 48 (1973) 15-18
- [12] H. Qu, X. Wang, B. Qu, H. Kong, Y. Zhang, W. Shan, J. Cheng, Q. Wang, Y. Zhao, Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin, *Anal. Chim. Acta*, 903 (2016) 149-155
- [13] J. H. Sloan, R. W. Siegel, Y. T. Ivanova-Cox, D. E. Watson, M. A. Deeg, R. J. Konrad, A novel high-sensitivity electrochemiluminescence (ECL) sandwich immunoassay for the specific quantitative measurement of plasma glucagon, *Clin. Biochem.*, 45 (2012) 1640-1644
- [14] S. K. Vashist, E. M. Schneider, J. H. T. Luong, A rapid sandwich immunoassay for fetuin A using agarose-3-aminopropyltriethoxysilane modified microtiter plate, *Anal. Chim. Acta*, 883 (2015) 74-80
- [15] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang, Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels : A review, *Anal. Chim. Acta*, 758 (2013) 1-18
- [16] M. Polanski, N. L. Anderson, A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics, *Biomarker Insights*, 2 (2006) 1-48
- [17] Q. Liu, B. J. Boyd, Liposomes in biosensors, *Analyst*, 138 (2013) 391-409
- [18] Y. Ishimori, K. Rokugawa, Stable liposomes for assays of human sera, *Clin. Chem.*, 39 (1993) 1439-1443
- [19] O. D. Hendrickson, S. N. Skopinskaya, S. P. Yarkov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, Development of liposome immune lysis assay for the herbicide atrazine, *J. Immunoassay Immunochem.*, 25 (2004) 279-294
- [20] K. A. Edwards, Y. Wang, A. J. Baumner, Aptamer sandwich assays : human α -thrombin detection using liposome enhancement, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 2645-2654

- [21] S. Viswanathan, L. -C. Wu, M. -R. Huang, J. -A. A. Ho, Electrochemical immunosensor for cholera toxin using liposomes and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 1115-1121
- [22] S. Viswanathan, C. Rani, A. V. Anand, J. -A. A. Ho, Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 1984-1989
- [23] B. Qu, L. Guo, D. -H. Wu, G. -L. Shen, R. -Q. Yu, An electrochemical immunosensor based on enzyme-encapsulated liposomes and biocatalytic metal deposition, *Anal. Chim. Acta*, 663 (2010) 147-152
- [24] M. Nishio, A. Shoji, M. Sugawara, Planar lipid bilayers containing gramicidin A as a molecular sensing system based on an integrated current, *Anal. Sci.*, 28 (2012) 661-667
- [25] R. Takeuchi, A. Shoji, M. Sugawara, A solid phase-based nanopore sensing system for biomolecules using lipid-loaded mesoporous silica MCM-41 and a fluorescent dye, *Sens. Actuators B*, 181 (2013) 29-37
- [26] K. A. Edwards, J. C. March, GM1-functionalized liposomes in a microtiter plate assay for cholera toxin in *Vibrio cholerae* culture samples, *Anal. Biochem.*, 368 (2007) 39-48
- [27] M. Horie, H. Yanagisawa, M. Sugawara, Fluorometric immunoassay based on pH-sensitive dye-encapsulating liposomes and gramicidin channels, *Anal. Biochem.*, 369 (2007) 192-201
- [28] A. Shoji, E. Sugimoto, S. Orita, K. Nozawa, A. Yanagida, Y. Shibusawa, M. Sugawara, A reusable liposome array and its application to assay of growth-hormone-related peptides, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1377-1381
- [29] W. P. Fehder, W. -Z. Ho, D. E. Campbell, W. W. Tourtellotte, L. Michaels, J. R. Cutilli, M. Uvaydova, S. D. Douglas, Development and evaluation of a chromatographic procedure for partial purification of substance P with quantitation

- by an enzyme immunoassay, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5 (1998) 303-307
- [30] T. Kunt, T. Forst, S. Schmidt, A. Pfützner, S. Schneider, O. Harzer, M. Löbig, M. Engelbach, K. Goitom, T. Pohlmann, J. Beyer, Serum levels of substance P are decreased in patients with type 1 diabetes, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 108 (2000) 164-167
- [31] B. Bondy, T. C. Baghai, C. Minov, C. Schüle, M. J. Schwarz, P. Zwanzger, R. Rupprecht, H. -J. Möller, Substance P serum levels are increased in major depression : preliminary results, *Biol. Psychiatry*, 53 (2003) 538-542
- [32] O. Grimsholm, S. Rantapää-Dahlqvist, S. Forsgren, Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, 7 (2005) R416-R426
- [33] N. Oku, D. A. Kendall, R. C. Macdonald, A simple procedure for the determination of the trapped volume of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 691 (1982) 332-340
- [34] L. Stryer, *Biochemistry, 4th ed.*, W. H. Freeman, NY (1995)
- [35] Y. Suzuki, H. Itoh, T. Abe, F. Nishimura, Y. Sato, M. Takeyama, Comparison of the effects of pantethine and fursultiamine on plasma gastrointestinal peptide levels in healthy volunteers, *Biol. Pharm. Bull.*, 34 (2011) 1640-1643
- [36] P. Pradelles, J. Grassi, C. Créminon, B. Boutten, S. Mamas, Immunometric assay of low molecular weight haptens containing primary amino groups, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 16-22
- [37] J. Horak, B. Enderle, H. Bakirci, G. A. Urban, Amperometric micro-immunosensor for rapid substance-P quantification in biological fluids, *Sensors IEEE*, (2009) 1878-1880
- [38] A. Nemmer, P. Gustin, A. Delaunois, J. -F. Beckers, J. Sulon, Radioimmunoassay of substance P in lung perfusate, *Pharmacol. Toxicol. Methods*, 39 (1998) 109-115
- [39] A. Lambiase, S. Bonini, A. Micera, P. Tirassa, L. Magrini, S. Bonini,

- L. Aloe, Increased plasma levels of substance P in vernal keratoconjunctivitis, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 38 (1997) 2161-2164
- [40] S. A. Brazill, P. Singhal, W. G. Kuhr, Detection of native amino acids and peptides utilizing sinusoidal voltammetry, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5542-5548
- [41] K. L. Kostel, S. M. Lunte, Evaluation of capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection for the determination of substance P and its metabolites, *J. Chromatogr. B*, 695 (1997) 27-38
- [42] R. E. Wang, L. Tian, Y. -H. Chang, A homogeneous fluorescent sensor for human serum albumin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 63 (2012) 165-169
- [43] B. Balikov, D. F. Solometo, Gamma globulin levels in normal human serum, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 61-66
- [44] T. Karasawa, M. Sugawara, A surface plasmon resonance sensor for substance P using gold-modified calmodulin and melittin, *Anal. Sci.*, 21 (2005) 1431-1436
- [45] N. E. Garrett, P. I. Mapp, S. C. Cruwys, B. L. Kidd, D. R. Blake, Role of substance P in inflammatory arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, 51 (1992) 1014-1018
- [46] P. J. Gresch, P. D. Walker, Serotonin-2 receptor stimulation normalizes striatal preprotachykinin messenger RNA in an animal model of Parkinson's disease, *Neuroscience*, 93 (1999) 831-41
- [47] C. Bouras, P. G. Vallet, P. R. Hof, Y. Charnay, J. Golaz, J. Constantinidis, Substance P immunoreactivity in Alzheimer disease : A study in cases presenting symmetric or asymmetric cortical atrophy, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 4 (1990) 24-34
- [48] S. H. Buck, T. F. Burks, M. R. Brown, H. I. Yamamura, Reduction in basal ganglia and substantia nigra substance P levels in Huntington's disease, *Brain Res.*, 209 (1981) 464-469

- [49] N. Corbally, D. Powell, K. F. Tipton, The binding of endogenous and exogenous substance-P in human plasma, *Biochem. Pharmacol.*, 39 (1990) 1161-1166
- [50] D. E. Campbell, N. Raftery, R. 3rd Tustin, N. B. Tustin, M. L. DeSilvio, A. Cnaan, P. P. Aye, A. A. Lackner, S. D. Douglas, Measurement of plasma-derived substance P : Biological, methodological, and statistical considerations, *Clin. Vaccine Immunol.*, 13 (2006) 1197-1203
- [51] E. W. Todd, Antigenic streptococcal hemolysin, *J. Exp. Med.*, 55 (1932) 267-280
- [52] J. B. Zabriskie, Immune complexes and glomerulonephritis in man: the role of streptococci in human glomerulonephritis, *J. Exp. Med.*, 134 (1971) 180-192
- [53] E. Ben-Chetrit, A. E. Moses, N. Agmon-Levin, C. Block, E. Ben-Chetrit, Serum levels of anti-streptolysin O antibodies : their role in evaluating rheumatic diseases, *Int. J. Rheum. Dis.*, 15 (2012) 78-85
- [54] M. A. Gerber, L. S. Caparas, M. F. Randolph, Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptolysin O antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 28 (1990) 413-415
- [55] K. Kubotsu, I. Ushio, K. Yoshikawa, M. Kida, K. shikawa, S. Matsuura, I. Sakurabayashi, Colorimetric liposome lysis for assay of anti-streptolysin O antibody, *Clin. Chem.*, 36 (1990) 1747-1749
- [56] M. Umeda, T. Tomita, H. Shibata, M. Seki, T. Yasuda, Homogeneous liposome lysis assay for determination of anti-streptolysin O antibody titer in serum, *J. Clin. Microbiol.*, 26 (1988) 804-807
- [57] L. A. Heath-Fracica, E. G. Estévez, Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptococcal antibodies, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 8 (1987) 25-30
- [58] T. Kodama, S. Ichiyama, Y. Morishita, T. Fukatsu, K. Shimokata, N. Nakashima, Determination of anti-streptolysin O antibody titer by a new passive agglutination method using sensitized toraysphere particles, *J. Clin. Microbiol.*,

35 (1997) 839-842

- [59] D. Xu, Q. Cheng, Surface-Bound Lipid Vesicles Encapsulating Redox Species for Amperometric Biosensing of Pore-Forming Bacterial Toxins, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 14314-14315
- [60] K. A. Edwards, A. J. Baeumner, Liposomes in analyses, *Talanta*, 68 (2006) 1421-1431
- [61] M. Bally, K. Bailey, K. Sugihara, D. Grieshaber, J. Vörös, B. Städler, Liposome and lipid bilayer arrays towards biosensing applications, *Small*, 6 (2010) 2481-2497
- [62] S. M. Christensen, D. G. Stamou, Sensing-applications of surface-based single vesicle arrays, *Sensors (Basel)*, 10 (2010) 11352-11368
- [63] 寺田弘, 吉村哲郎 編著, 上田一作, 上野雅晴, 奥直人, 勝考, 加藤啓子, 釜谷比羅志, 上農善朗, 加茂直樹, 釘宮慎一, 小林俊秀, 際田弘志, 佐々博紀, 佐藤征, 柴田瑩, 志磨修, 下岡尚, 曾根三郎, 竹口紀晃, 中西真人, 中野善朗, 櫛紀夫, 福沢健治, 前沢重礼, 森井孫俊, 山中樹好, 米瀬政勝, ライフサイエンスにおけるリポソーム-実験マニュアル, 1992年8月1日初版発行, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
- [64] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, Giant Vesicles : Preparations and Applications, *ChemBioChem*, 11 (2010) 848-865
- [65] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81 (1986) 303-311
- [66] T. Pott, H. Bouvrais, P. Méléard, Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions, *Chem. Phys. Lipids*, 154 (2008) 115-119
- [67] L. -R. Montes, A. Alonso, F. M. Goñi, L. A. Bagatolli, Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions, *Biophys. J.*, 93 (2007) 3548-3554

- [68] D. J. Estes, M. Mayer, Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber, *Biochim. Biophys. Acta*, 1712 (2005) 152-160
- [69] J. P. Reeves, R. M. Dowben, Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles, *J. Cell Physiol.*, 73 (1969) 49-60
- [70] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Kinoshita, Jr., Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope, *Biophys. J.*, 71 (1996) 3242-3250
- [71] J. T. Buboltz, G. W. Feigenson, A novel strategy for the preparation of liposomes : rapid solvent exchange, *Biochim. Biophys. Acta*, 1417 (1999) 232-245
- [72] A. Moscho, O. Orwar. D. T. Chiu, B. P. Modi, R. N. Zare, Rapid preparation of giant unilamellar vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 (1996) 11443- 11447
- [73] M. Abkarian, E. Loiseau, G. Massiera, Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design, *Soft Matter.*, 7 (2011) 4610-4614
- [74] A. Weinberger, F. -C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.*, 105 (2013) 154-164
- [75] I. Motta, A. Gohlke, V. Adrien, F. Li, H. Gardavot, J. E. Rothman, F. Pincet, Formation of giant unilamellar proteo-liposomes by osmotic shock, *Langmuir*, 31 (2015) 7091-7099
- [76] T. -M. Hsin, K. Wu, G. Chellappan, Magnetically immobilized nanoporous giant proteoliposomes as a platform for biosensing, *Analyst*, 137 (2012) 245-248
- [77] T. D. Heath, B. A. Macher, D. Papahadjopoulos, Covalent attachment of immunoglobulins to liposomes via glycosphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 640 (1981) 66-81

- [78] S. Shukla, H. Leem, M. Kim, Development of a liposome-based immunochromatographic strip assay for the detection of Salmonella, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401(2011) 2581-2590
- [79] X. Song, S. Shukla, S. Oh, Y. Kim, M. Kim, Development of fluorescence-based liposome immunoassay for detection of Cronobacter muytjensii in pure culture, *Curr. Microbiol.*, 70 (2015) 246-252
- [80] M. Ollivon, A. Walter, R. Blumenthal, Sizing and separation of liposomes, biological vesicles, and viruses by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 152 (1986) 262-274
- [81] S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, M. —T. Paternostre, M. Ollivon, Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity, and dynamic light scattering, *Anal. Biochem.*, 192 (1991) 334-343
- [82] Y. Hashimoto, M. Sugawara, H. Endoh, Coating of liposomes with subunits of monoclonal IgM antibody and targeting of the liposomes, *J. Immunol. Methods*, 62 (1983) 155-162
- [83] K. K. Matthay, T. D. Heath, C. C. Badger, I. D. Bernstein, D. Papahadjopoulos, Antibody-directed liposomes : comparison of various ligands for association, endocytosis, and drug delivery, *Cancer Res.*, 46 (1986) 4904-4910
- [84] I. Dufresne, A. Désormeaux, J. Bestman-Smith, P. Gourde, M. J. Tremblay, M. G. Bergeron, Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments, *Biochim. Biophys. Acta*, 1421 (1999) 284-294
- [85] S. Goswami, W. Wang, T. Arakawa, S. Ohtake, Developments and challenges for mAb-Based therapeutics, *Antibodies*, 2 (2013) 452-500
- [86] S. Kundu, H. Matsuoka, H. Seto, Zwitterionic lipid (DPPC)-protein (BSA) complexes at the air-water interface, *Coll. Surf. B*, 93 (2012) 215-218
- [87] P. M. S. Tchekwagep, C. P. Nanseu-Njiki, E. Ngameni, T. Arnebrant,

- T. Ruzgas, Quantification of BSA concentration by using Ag electrochemistry in chloride solution : extension of the linear range, *Electrochim. Acta*, 135 (2014) 351–355
- [88] R. C. Groza, A. Calvet, A. G. Ryder, A fluorescence anisotropy method for measuring protein concentration in complex cell culture media, *Anal. Chim. Acta*, 821 (2014) 54-61
- [89] A. R. ter Avest, G. van Steenis, A. D. M. E. Osterhaus, A comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and counter current electrophoresis for the detection of bovine serum albumin in virus vaccines, *J. Biol. Stand.*, 15 (1987) 245-250
- [90] Y. Yu, Y. Lai, X. Zheng, J. Wu, Z. Long, C. Liang, Synthesis of functionalized CdTe/CdS QDs for spectrofluorimetric detection of BSA, *Spectrochim. Acta Part A*, 68 (2007) 1356-1361
- [91] G. Ertürk, D. Berillo, M. Hedström, B. Mattiasson, Microcontact-BSA imprinted capacitive biosensor for real-time, sensitive and selective detection of BSA, *Biotech. Reports*, 3 (2014) 65-72
- [92] G. Lippi, G. Cerevelli, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin : a more specific assay is needed for diagnosing renal injury, *Clin. Chim. Acta*, 413 (2012) 1160-1161
- [93] A. C. Ferreira, S. D. Mesquita, J. C. Sousa, M. Correia—Neves, N. Sousa, J. A. Palha, F. Marques, From the periphery to the brain : Lipocalin-2, a friend or foe? , *Prog. Neurobiol.*, 131 (2015) 120-136
- [94] S. K. Vashist, M. Saraswat, H. Holthöfer, Development of a rapid sandwich enzyme linked immunoassay procedure for the highly sensitive detection of human Lipocalin-2/NGAL, *Procedia Chem.*, 6 (2012) 141-148
- [95] S. K. Vashist, Graphene-based immunoassay for human lipocalin-2, *Anal. Biochem.*, 446 (2014) 96-101

- [96] P. Kannan, H. Y. Tiong, D. —H. Kim, Highly sensitive electrochemical determination of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury, *Biosen. Bioelectron.*, 31 (2012) 32-36
- [97] D. Xiang, H. Zhang, J. Bai, J. Ma, M. Li, W. Gao, X. Zhang, J. Gao, C. Wang, Particle-enhanced turbidimetric immunoassay for determination of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin on the Roche Cobas c501 analyzer, *Clin. Biochem.*, 46 (2013) 1756-1760
- [98] L. Feng, D. Zhang, J. Wang, D. Shen, H. Li, A novel quantification strategy of transferrin and albumin in human serum by species-unspecific isotope dilution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Anal. Chim. Acta*, 884 (2015) 19-25
- [99] M. Soejima, N. Sagata, N. Komatsu, T. Sasada, A. Kawaguchi, K. Itoh, Y. Koda, Genetic factors associated with serum haptoglobin level in a Japanese population, *Clin. Chim. Acta*, 433 (2014) 54-57
- [100] S. Yavuz, A. Anarat, S. Acartürk, A. C. Dalay, E. Kesiktaş, M. Yavuz, T. O. Acartürk, Neutrophil gelatinase associated lipocalin as an indicator of acute kidney injury and inflammation in burned children, *BURNS*, 40 (2014) 648-654
- [101] M. Zorlu, M. Kiskac, C. Karatoprak, S. Kesgin, M. Cakirca, K. Yildiz, C. Ardic, M. A. Cikrikcioglu, R. Erkoç, Assessment of serum apelin and lipocalin-2 levels in patients with subclinical hypothyroidism, *Annales d'Endocrinologie*, 75 (2014) 10-14
- [102] A. Yndestad, L. Landrø, T. Ueland, C. P. Dahl, T. H. Flo, L. E. Vinge, T. Espevik, S. S. Frøland, C. Husberg, G. Christensen, K. Dickstein, J. Kjekshus, E. Øie, L. Gullestad, P. Aukrust, Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure, *European Heart J.*, 30 (2009) 1229-1236
- [103] L. Landrø, J. K. Damås, T. H. Flo, L. Heggelund, T. Ueland, G. E. Tjønnfjord, T. Espevik, P. Aukrust, S. S. Frøland, Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients : increase during highly

- active anti-retroviral therapy, *Clin. Exp. Immunol.*, 152 (2008) 57-63
- [104] L. Cai, J. Borowiec, S. Xu, W. Han, P. Venge, Assay of urine levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances, *Clin. Chim. Acta*, 403 (2009) 121-125
- [105] Y. Tamba, H. Terashima, M. Yamazaki, A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles, *Chem. Phys. Lipids*, 164 (2011) 351-358

謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧かつ熱心なご指導・ご鞭撻を賜りました日本大学大学院 総合基礎科学研究科 相関理化学専攻の菅原正雄教授に心より深謝いたします。

東京薬科大学 薬学部 東海林敦講師には本研究において適切なご助言を頂き、心より感謝いたします。

また、本論文の審査にあたり、ご指導・ご助言を頂きました日本大学大学院 総合基礎科学研究科 相関理化学専攻の斎藤稔教授、橋本伸哉教授に心より御礼申し上げます。

円滑に実験が行えるようにご尽力いただきました渡部成美前助手、高橋裕輔助手に深く感謝いたします。

実験装置を設置しご相談に乗っていただきましたバイオリサーチセンター株式会社の西尾将人氏に心より御礼申し上げます。

実験にご協力いただきました保坂学氏、日澤啓太氏に深く感謝いたします。

博士後期課程の研究生活を共に送った、石田祐樹氏、福田裕之氏、日本大学大学院 総合基礎科学研究科 相関理化学専攻 博士前期課程の今村俊裕氏、西下直希氏、座本大河氏、新田雅貴氏、日本大学 文理学部 化学科の荒井麻里氏、伊藤奈央氏、北村翔太氏、高島優美氏、藤沼可南氏、村上恵理氏、並びに卒業生の皆様に謹んで御礼申し上げます。

最後に、私の研究生活を支えてくださいました家族に感謝します。

2016年9月
阪本 美里