

デジタルイムノアッセイによる小分子検出が可能に

近年、暗視野顕微鏡(DFM)を用いた、金ナノ粒子の単一分子イメージングによる高感度デジタルイムノアッセイ(DIA)が報告されています。通常、DIAでは、直径数ミクロンのビーズ表面に修飾した捕捉抗体と、抗原、酵素やナノ粒子などで修飾した標識抗体のサンドイッチイムノアッセイを利用します。ビーズ表面の抗体で抗原を捕捉し、さらに標識抗体で検出する必要があるため、ターゲットとなる抗原は2つの抗体が結合可能な、ある程度の大きさが必要でした。しかし、免疫診断の分野で測定される抗原には、タンパク質のような大きな分子だけでなく、甲状腺ホルモンやステロイドホルモンなどの低分子も存在します。免疫診断において低分子は、濃度の上昇に応じて得られるシグナルが低下する「競合法」と呼ばれる方法により検出されますが、抗原抗体反応の阻害を利用したこの方法は、DIAへの適応が困難でした。

そこで本研究では、DIAの低分子物質への適応を目指し、抗イムノコンプレックス抗体を用いた手法を開発しました。抗イムノコンプレックス抗体は、抗低分子抗体と低分子の免疫複合体(イムノコンプレックス)を特異的に認識する抗体です。この抗イムノコンプレックス抗体を標識抗体として金ナノ粒子に修飾し、ビーズ表面に形成された抗低分子抗体と低分子の免疫複合体に反応させることで、図1に示す暗視野デジタルイムノアッセイ系を構築しました。

低分子ターゲットとしてはエストラジオール(E2)を用いました。E2は主に女性の卵巣で産生・分泌され、特に妊娠中には胎盤で大量に産生されます。男性では副腎皮質と精巣で少量産生されています。E2は、女性の性腺機能だけでなく、男性の性腺機能、骨の成熟、小児期や成長期の骨量維持などにも重要な役割を果たすことが確認されており、E2の高感度測定は、性腺機能の解明、ホルモン補充療法、その他の治療や予防に有用になると考えられています。

磁性微粒子に抗DNP抗体を固定化し、DNPで標識した抗E2抗体を間接的に固定化しました。E2との免疫複合体を形成させた後、金ナノ粒子で標識した抗イムノコンプレックス抗体を反応させ、磁石を用いてB/F分離を行うことで過剰量の抗体修飾金ナノ粒子を除去しました。磁性微粒子表面に形成された金ナノ粒子を含む免疫複合体を、尿素により変性分離させ、磁石を用いて磁性微粒子を除きました。抗体修飾金ナノ粒子をスライドガラス上に吸着させ、暗視野顕微鏡を用いて視野に存在する金ナノ粒子の個数をカウントすることで、E2濃度に応じたナノ粒子輝点のカウント数を得ました(図1)。その結果、1 pg/mLのE2を検出可能であることが分かりました(図2)。

今回の結果は、抗イムノコンプレックス抗体を用いることで様々な低分子抗原の高感度測定系に適応することが可能であることを示しており、DIAを用いた高感度分子検出の可能性がさらに広がることが期待できます。

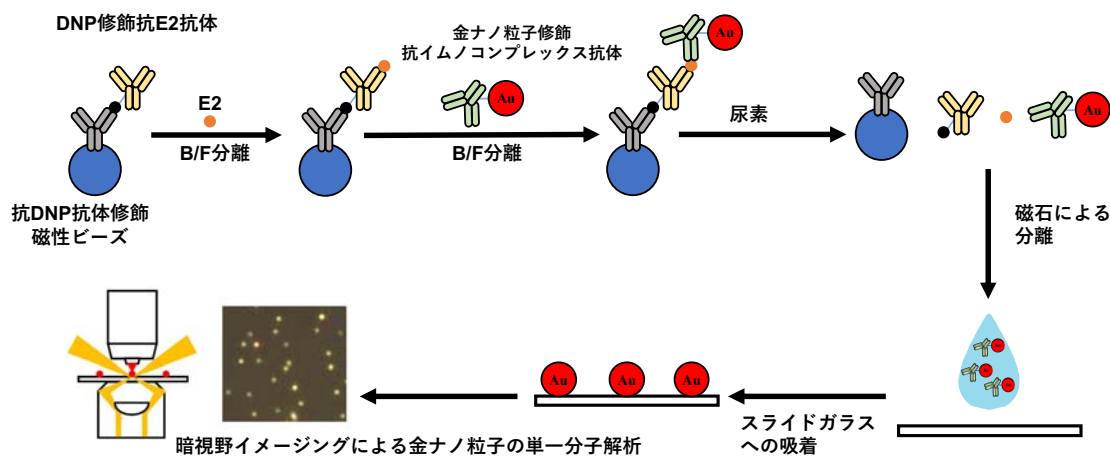


図1 抗免疫複合体抗体を用いたデジタル免疫アッセイによるE2検出

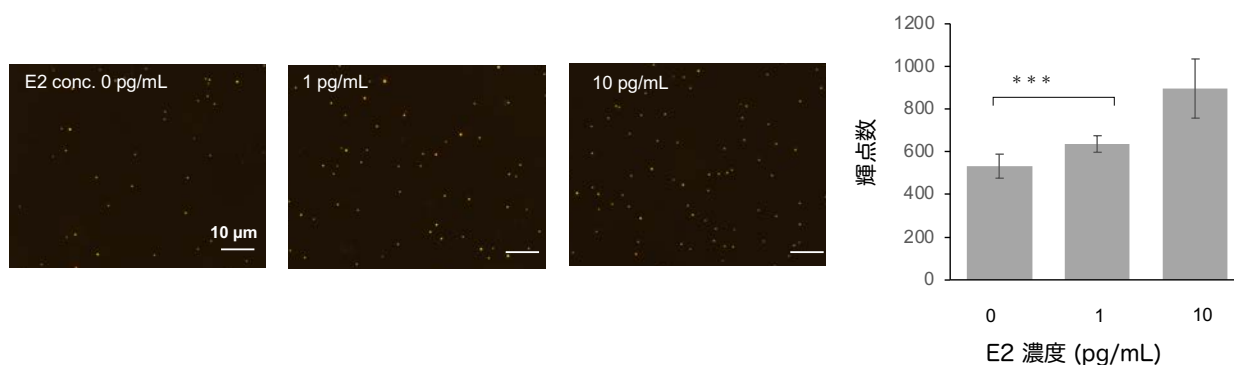
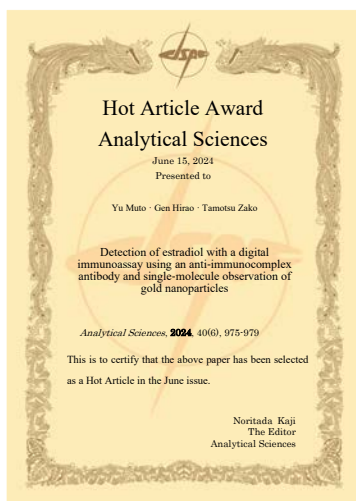


図2 暗視野イメージング像（左）および単一分子解析結果（右）

本研究成果に関する論文は、日本分析化学会の英文誌「Analytical Sciences」2024年6月号に掲載され、同号の Hot Article Award を受賞しました(下図)。



【本件に関する問い合わせ先】

愛媛大学理学部化学コース

教授 座古 保(ざこ たもつ)

Mail: zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp