

28T-am03

超高感度リポソームイムノアッセイによる血清中 サブスタンス P の定量

○東海林 敦¹, 阪本 美里³, 菅原 正雄^{3,2} (¹東京薬大薬, ²日大院総合基礎, ³日大文理)

【目的】生体内には、極微量しか存在していないものの生理機能の中樞を担っていると考えられる生体分子も数多く、これら生体分子を計測するにはシグナル増幅能を有した高感度計測技術の開発が要求される。演者らはこれまでに、pH 依存性色素 (BCECF) を封入したイムノリポソームによる蛍光アッセイ法を開発してきた。この方法では、グラミシジンをリポソームに包埋することでアナライトのシグナルを増幅することが可能であった。本研究では、免疫沈降によるアナライトの濃縮とグラミシジンによるシグナル増幅を利用した超高感度な計測技術を開発し、血清中に存在するサブスタンス P (SP) の定量へ応用した。

【実験】シラン化剤 MTS によりチオール基を導入したガラス基板に二価性架橋試薬 SPDP を修飾した SP 抗体 (Anti-SP) を化学修飾した。BCECF を内封したマレイミドリポソームに Anti-SP の Fab' 断片を修飾し、未反応のマレイミド基をシステアミンでブロッキングした。イムノリポソーム、グラミシジンと血清を溶液中で混合し、Anti-SP 修飾ガラス基板に添加した (15 分間静置)。洗浄後にリポソームの蛍光強度を蛍光イメージャーで測定した (ex.488 nm,em.530 nm)。

【結果および考察】本アッセイ法では、リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中における SP の濃度に依存してリポソームの蛍光強度が増大した。その際の検出限界は 20 fg/mL (S/N = 3) であった。特別な前処理を行わず、血清を単純に 125 倍希釈するだけで SP 濃度を計測できた。また本アッセイ法と競合型 EIA 法により得られた血清中 SP 濃度はほとんど同一の値を示した。本アッセイ法は、市販の ELISA 法や EIA 法と比較して、超高感度にアナライトを計測できるだけでなく、計測に要する時間も 45 分程度と非常に短時間である。