

1分子デジタル ELISA による感染・疾病バイオマーカーの超高感度検出

東京大学大学院工学系研究科
応用化学専攻
飯野亮太

1. 初めに

ウイルスや細菌による感染を超早期に検出可能にする超高感度技術、癌などの疾病を低負担で診断可能にする超高感度技術が待ち望まれている。我々が最近開発した“1分子デジタル ELISA”は、従来の ELISA に比べ 100 万倍以上高い感度で感染や疾病の指標となるバイオマーカーを検出することが出来る。本稿では、1分子デジタル ELISA の原理と適用例を解説する。

2. 酵素結合免疫吸着法 (ELISA)

酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay、ELISA) はウイルスや細菌の感染や癌などの疾病的診断に汎用されている手法である。ELISA ではターゲットとなるバイオマーカー、主にタンパク質に特異的に結合する抗体を用いる。ELISA の一般的な操作を図 1 に示す。まず、バイオマーカーに結合する一次抗体を表面に固定した基板 (96 穴プレートやマイクロビーズ等) に検体溶液を加えバイオマーカーを補足する。その後、バイオマーカーの別の部位に結合する二次抗体を加えてバイオマーカーをサンドイッチし 3 者複合体を形成させる。この二次抗体はあらかじめ酵素と結合されており、この酵素に対する蛍光発生基質 (酵素で分解されると蛍光性になる基質) を加えることで検体中のバイオマーカーを定量することが出来る。

ELISA は、1. 抗体があれば原理的にどんなバイオマーカーでも検出できる、2. バイオマーカーの種類によらず同じ操作で検出できる、3. 手法が確立されていて比較的簡便、といった利点を持つ。これらの利点から ELISA は汎用されており、小規模医院で使われる手作業・目視診断の検査キットから、総合病院や検査機関で使われる全自动検査装置まで幅広く開発されている。

しかしながら ELISA には欠点もある。ELISA による検体溶液中のバイオマーカーの検出下限値は 1~10 pM ($10\text{~}100 \text{ pg/mL}$) であり、感染の超早期診断や疾病的低負担検査には感度が不十分な点である。具体的には例えば、ウイルス感染初期の血中のマーカー分子 (ウ

イルス由来タンパク質) の濃度は 10~100 aM ($0.1\text{~}1 \text{ fg/mL}$) と見積もられており、通常の ELISA では検出することは不可能である。このため、インフルエンザウイルスに感染しても初期には検出できず薬が処方できない、といった問題が生じる。

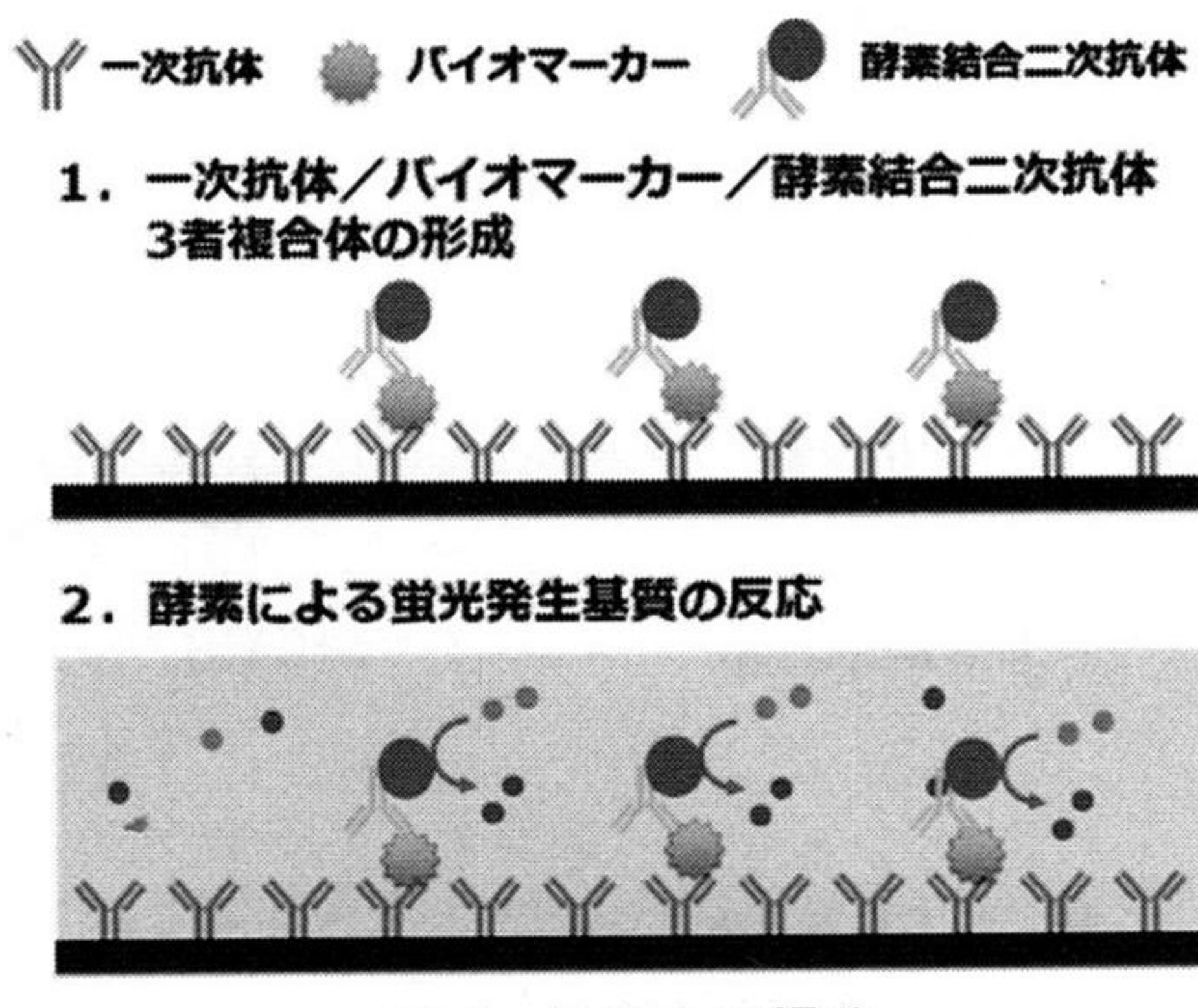


図 1 ELISA の操作

3. 1分子デジタル ELISA の基礎技術：フェムトリッターチャンバーを用いた 1 分子酵素アッセイ

前述のように、ELISA は酵素反応を用いてバイオマーカーを検出する。よって酵素反応を高感度に検出できれば、ELISA の検出下限値を大幅に改善できると期待される。高感度の極限は、1 個 (1 分子) の酵素による反応が検出できることだろう。これは実は、単純なアイデアで容易に達成できる。すなわち、酵素を微小な容積に閉じ込めて反応を行わせるのである[1]。一般的な生化学の測定では、反応を行う体積はマイクロリッター (10^{-6} L) のオーダーである。一方、一般的な酵素の反応速度は 10 s^{-1} 程度である。よって $1 \mu\text{L}$ (1 mm^3) の溶液に 1 分子の酵素が存在する場合には反応生成物の濃度の増加速度は 1 分間に 1 fM (10^{-15} M) にしかならず検出は不可能である (図 2)。一方、同じ酵素が 1 fL ($1 \mu\text{m}^3$) の体積中に存在する場合には濃度の増加速度は 1 分間に $1 \mu\text{M}$ と十分高く、蛍光分光器や蛍光顕微鏡といった従来の方法で容易に検出できそうである。

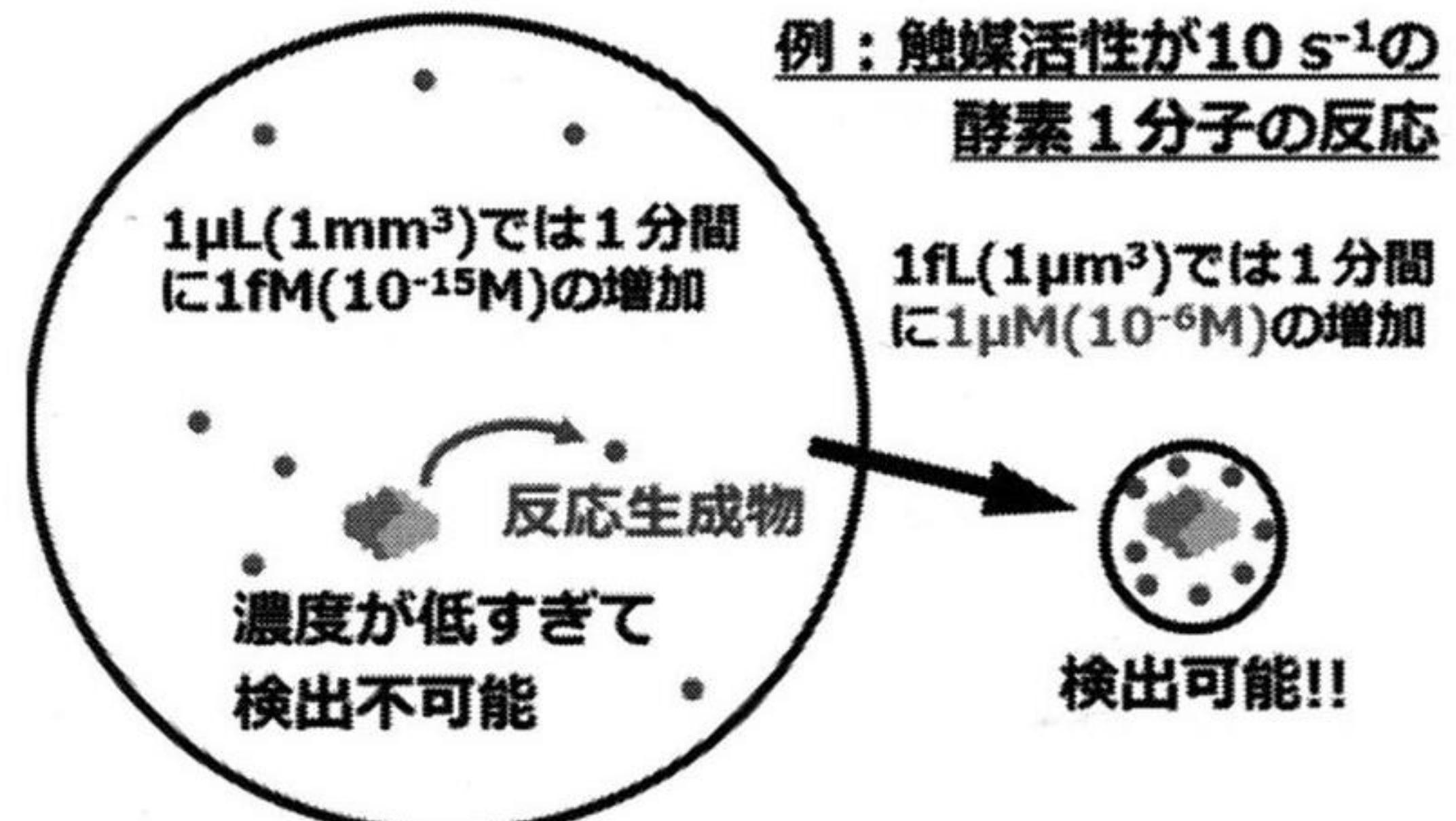


図 2 反応溶液を微小空間に閉じ込め生成物を濃縮

上記のアイデアを実証するため共同研究者の野地らは以前、マイクロメーターサイズの微小な窪みを多数持つシリコンゴム (PDMS) とガラス基板を張り合わせたフェムトリッターチャンバーを開発した[1]。また我々は親水 - 疎水のマイクロパターンを施した基板を利用し、油の中で水溶液のフェムトリッターチャンバーを多数同時に形成させる手法を開発した[2]。

ELISA でよく使われる酵素、 β -ガラクトシダーゼの 1 分子アッセイの例を示す (図 3)。蛍光発生基質には FDG (Fluorescein di- β -D-galactopyranoside) を用いており、 β -ガラクトシダーゼで分解されると蛍光色素 Fluorescein を生じる。フェムトリッターチャンバーに β -ガラクトシダーゼを閉じ込めると、反応開始 1 分後には 1 分子の酵素による反応で生成した Fluorescein が蛍光顕微鏡で容易に検出できている。蛍光強度の増加速度から反応速度を定量計測することも可能である。

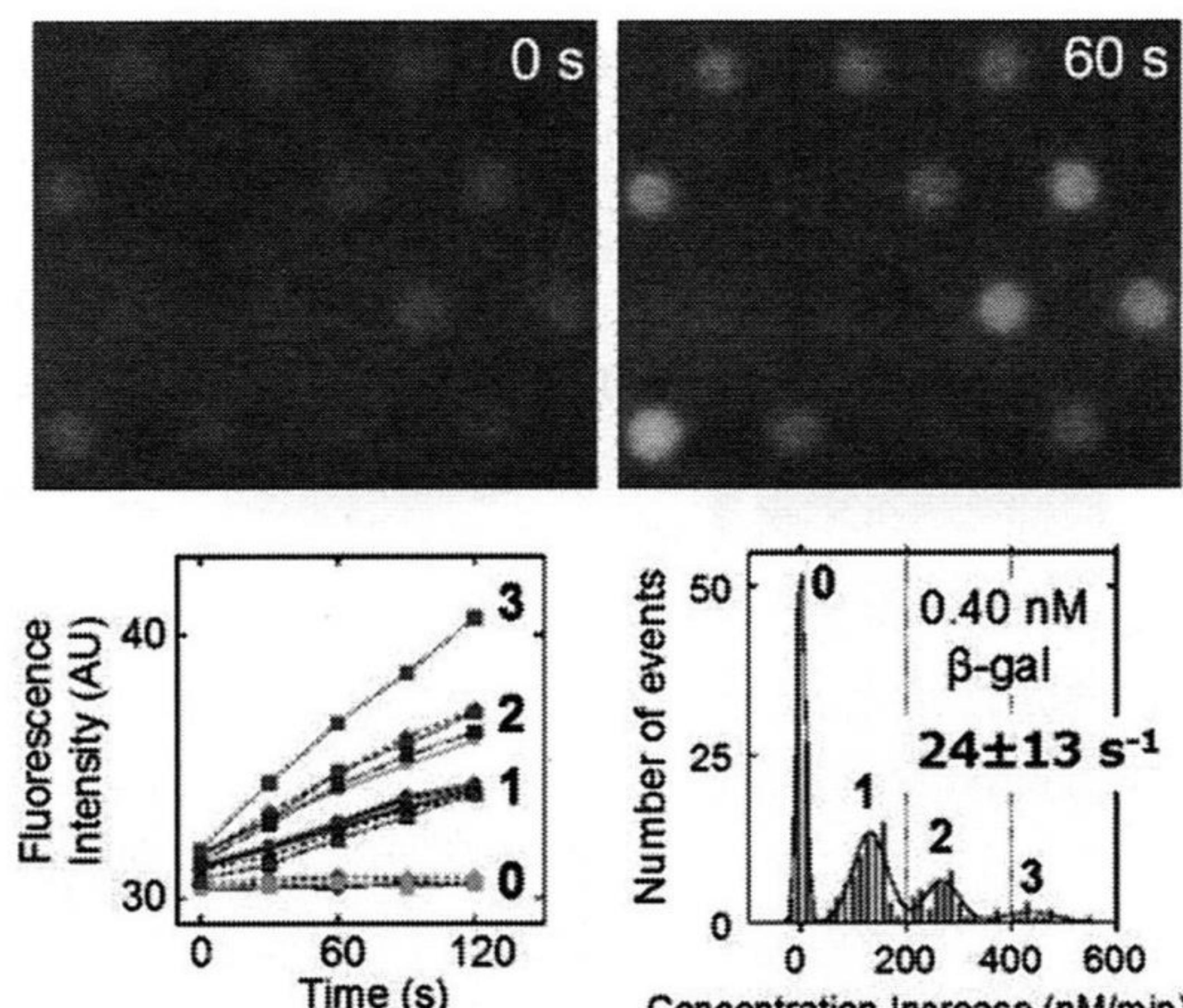


図 3 フェムトリッターチャンバーによる 1 分子酵素アッセイ

4. 1 分子デジタル ELISA の実施例：前立腺癌マーカー PSA の超高感度検出

我々は前述のフェムトリッターチャンバーをさらに改良して 1 分子デジタル ELISA に適用した[3]。具体的には、親水 - 疎水マイクロパターン基板をフローセルに統合し (図 4)、簡便な操作で 100 万個のフェムトリッターチャンバーの並列形成とマイクロビーズの封入が同時に行えるデバイスを作製した。

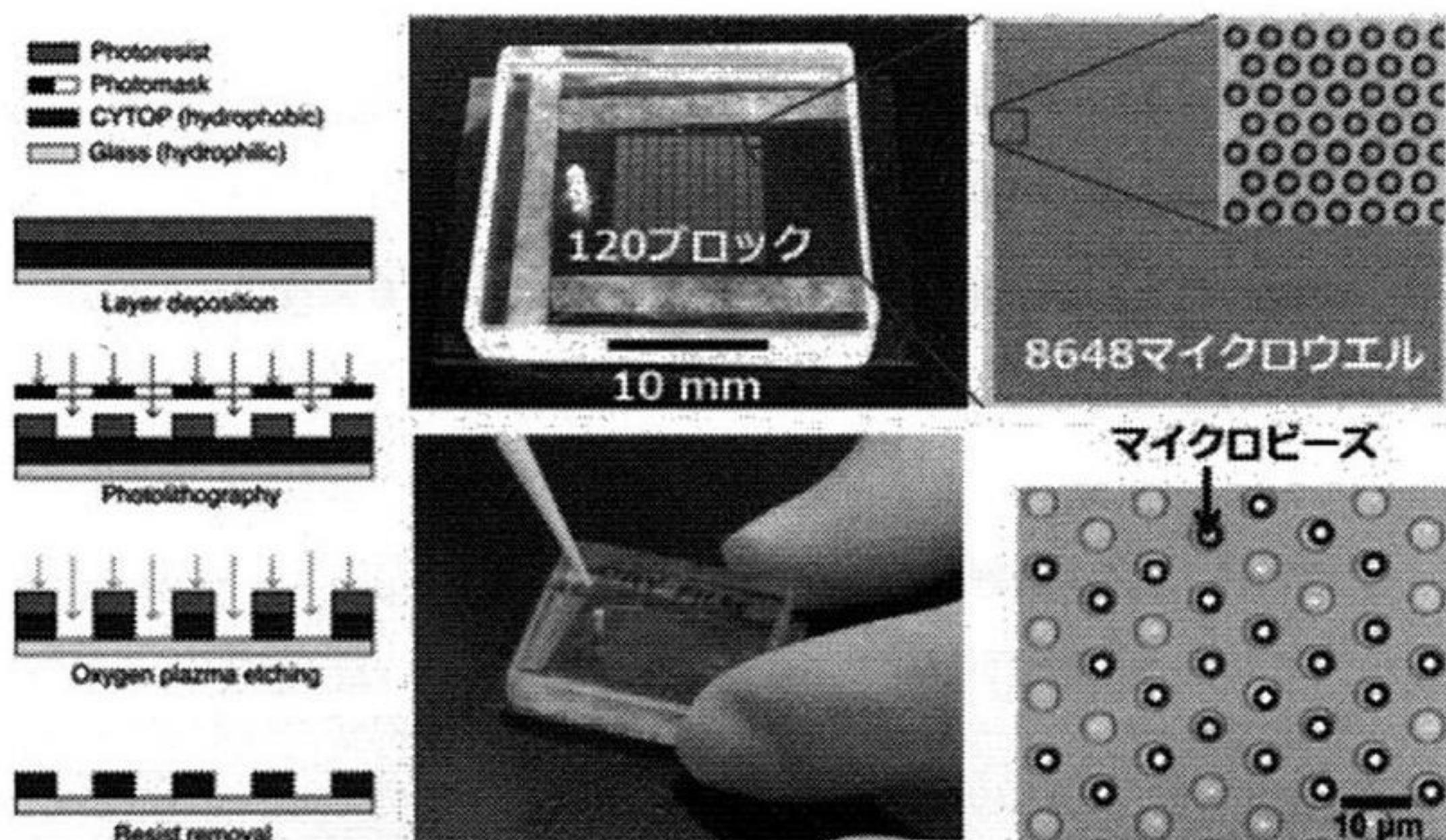


図 4 100 万個のフェムトリッターチャンバーの並列形成とマイクロビーズの封入を同時に行うデバイス

以下では実施例を示す。ターゲットとしたのは、前立腺癌のバイオマーカーである PSA (Prostate Surface Antigen) である。比較のためにまず、マイクロビーズを用いた従来の ELISA による測定を行った (図 5)。従来の ELISA は、一次抗体 / PSA / β -ガラクトシダーゼ結合二次抗体の 3 者複合体を表面に結合したマイクロビーズを多数懸濁させた反応液 (体積は数 100 μ L) を FDG と共に 96 穴プレートに加え、蛍光強度の増加速度を蛍光分光器でモニターすることで行った。PSA 濃度と蛍光増加速度の関係をプロットし、バックグラウンド (PSA 非存在下での蛍光増加速度) から求めた検出下限値は 9 pM (9×10^{-12} M) であった。

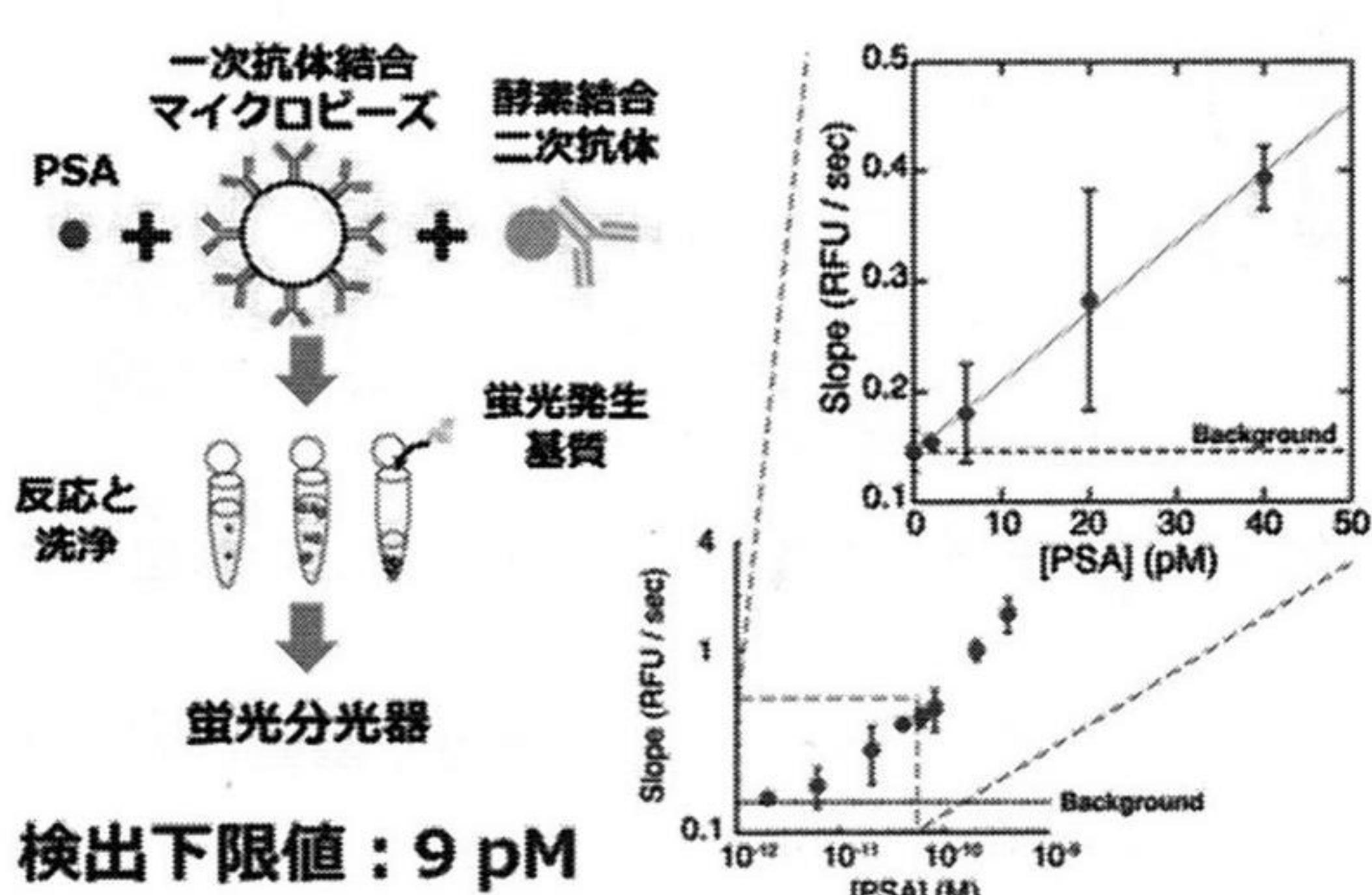


図 5 マイクロビーズを用いた従来の ELISA の測定例

1分子デジタルELISAでは、3者複合体を結合したマイクロビーズの調製までは同様に行う一方、96穴プレートの代わりに個々のマイクロビーズをフェムトリッターチャンバーに閉じ込めて反応させた。PSAが極低濃度では、3者複合体を1つのみ結合したマイクロビーズと、全く結合していないマイクロビーズの両方が存在し、前者のみが蛍光を発生する(図6)。そこで横軸をPSA濃度、縦軸は蛍光を発するマイクロビーズ(水滴)の割合としてプロットを行った。バックグラウンド(PSA非存在下での蛍光を発する水滴の割合)から求めた検出下限値は2aM(2×10^{-18} M)となり、従来法と比べ400万倍以上の検出感度の増加が達成された(図7)。

PSA 200 aM (従来法の検出限界の5万分の1)

明視野像

蛍光像

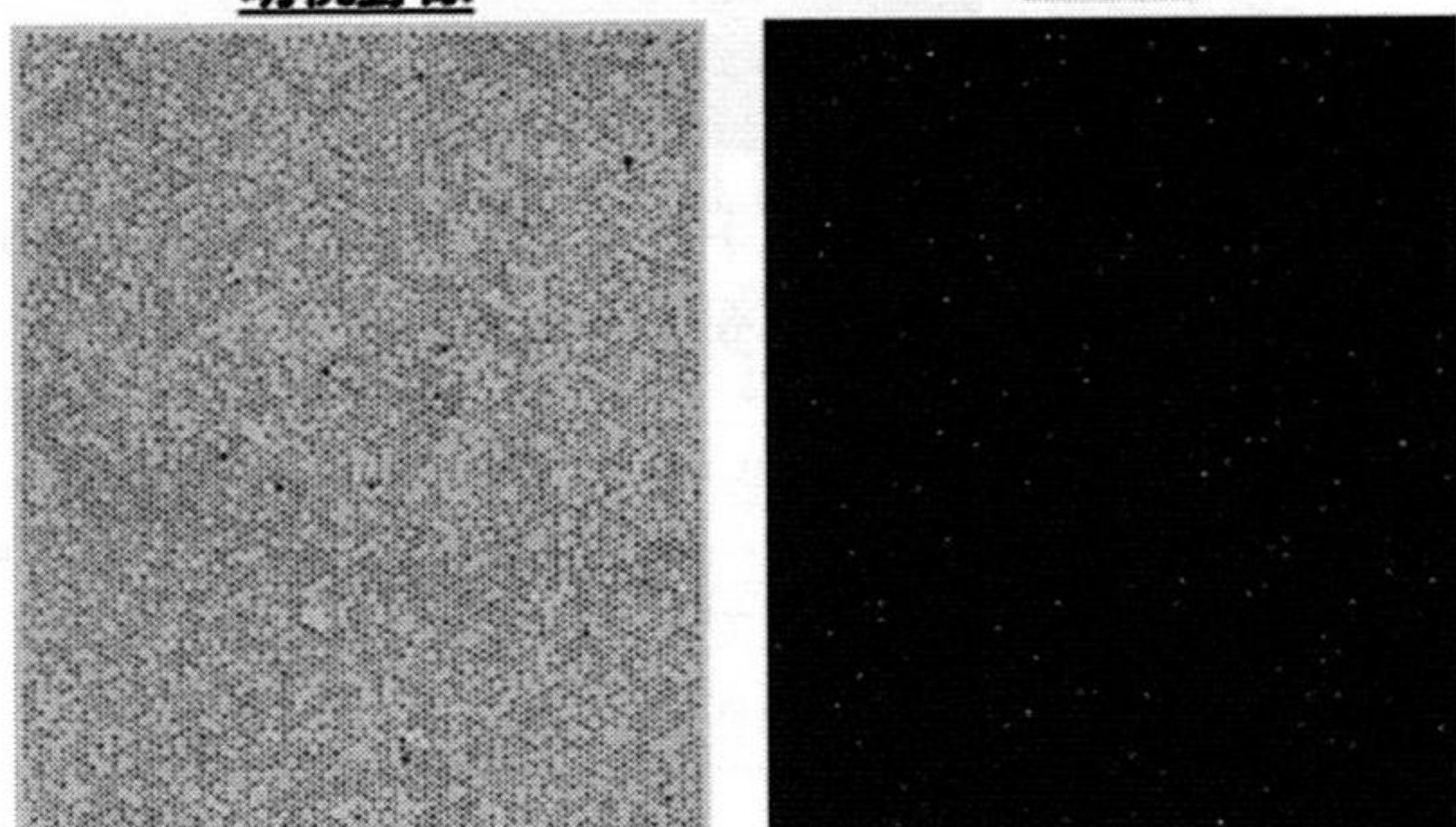


図6 1分子デジタルELISAによるPSAの測定例。100万個あるフェムトリッターチャンバーのごく一部のみを示す

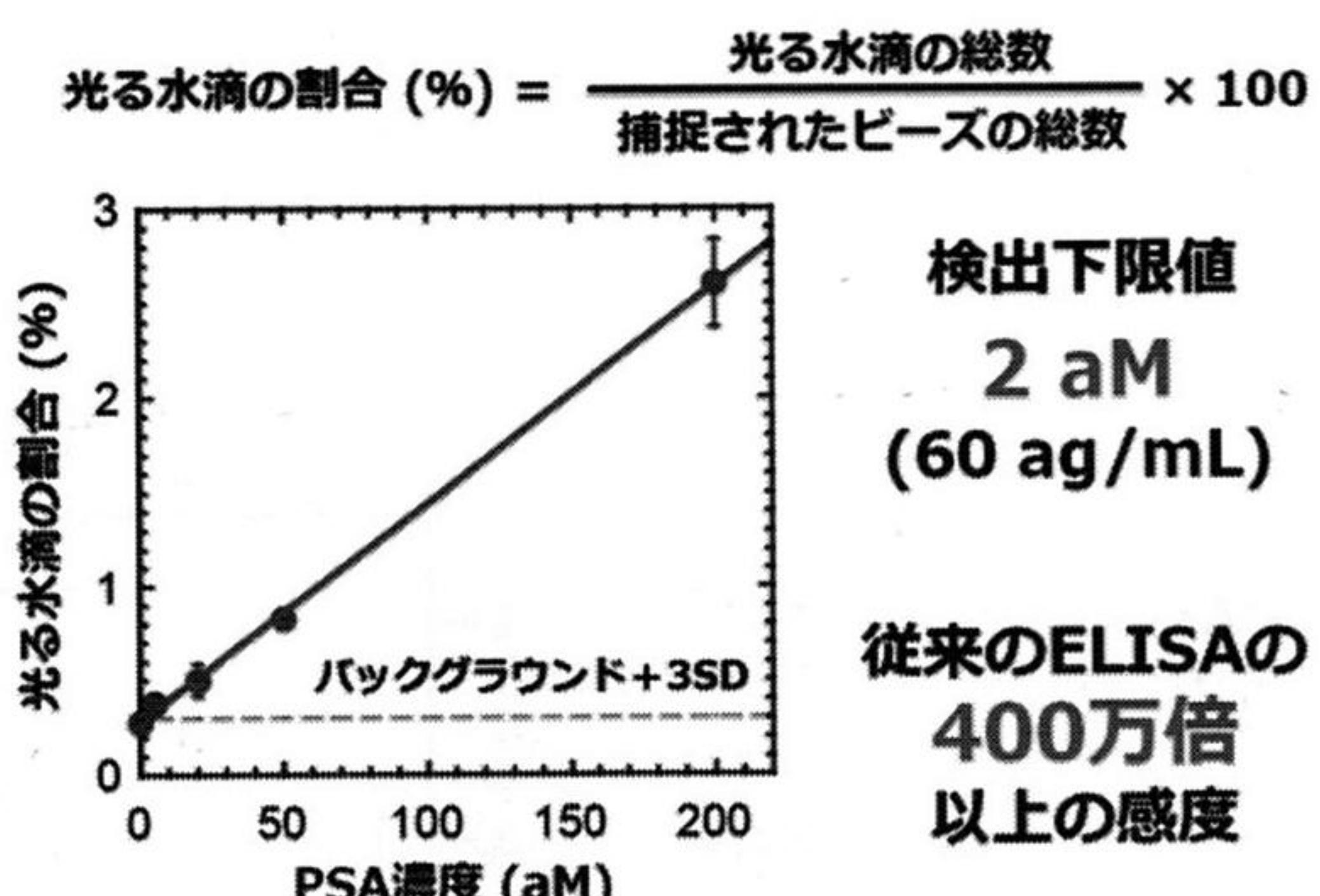


図7 1分子デジタルELISAによるPSAの検出下限値

5. 1分子デジタルELISAの検出下限値はどこまで下げられるのか

上記の様に、1分子デジタルELISAで従来のELISAの400万倍以上のaMレベルの検出下限値を達成する

ことができた。では、1分子デジタルELISAの検出下限値を決定している要因は何だろう。図7をみるとバックグラウンドのレベルは大まかには~0.1% ($\sim 1/10^3$)程度である。基板1枚の上にはフェムトリッターチャンバーが100万個あるので、光る水滴の割合は理想的には $1/10^6$ まで到達できるはずであり、さらに1000倍は改善できそうである。

実際、抗原抗体反応よりも強く特異的な結合を示すストレプトアビシン-ビオチン反応の検出では10zM(10^{-20} M)の検出下限値を達成できた(図8)。よって、1分子デジタルELISAの現状の検出下限値はβ-ガラクトシダーゼ結合二次抗体のマイクロビーズへの非特異的吸着で決まっていると考えられる。現在、検出下限値を更に改善すべく、非特異的吸着を抑える努力を行っている。

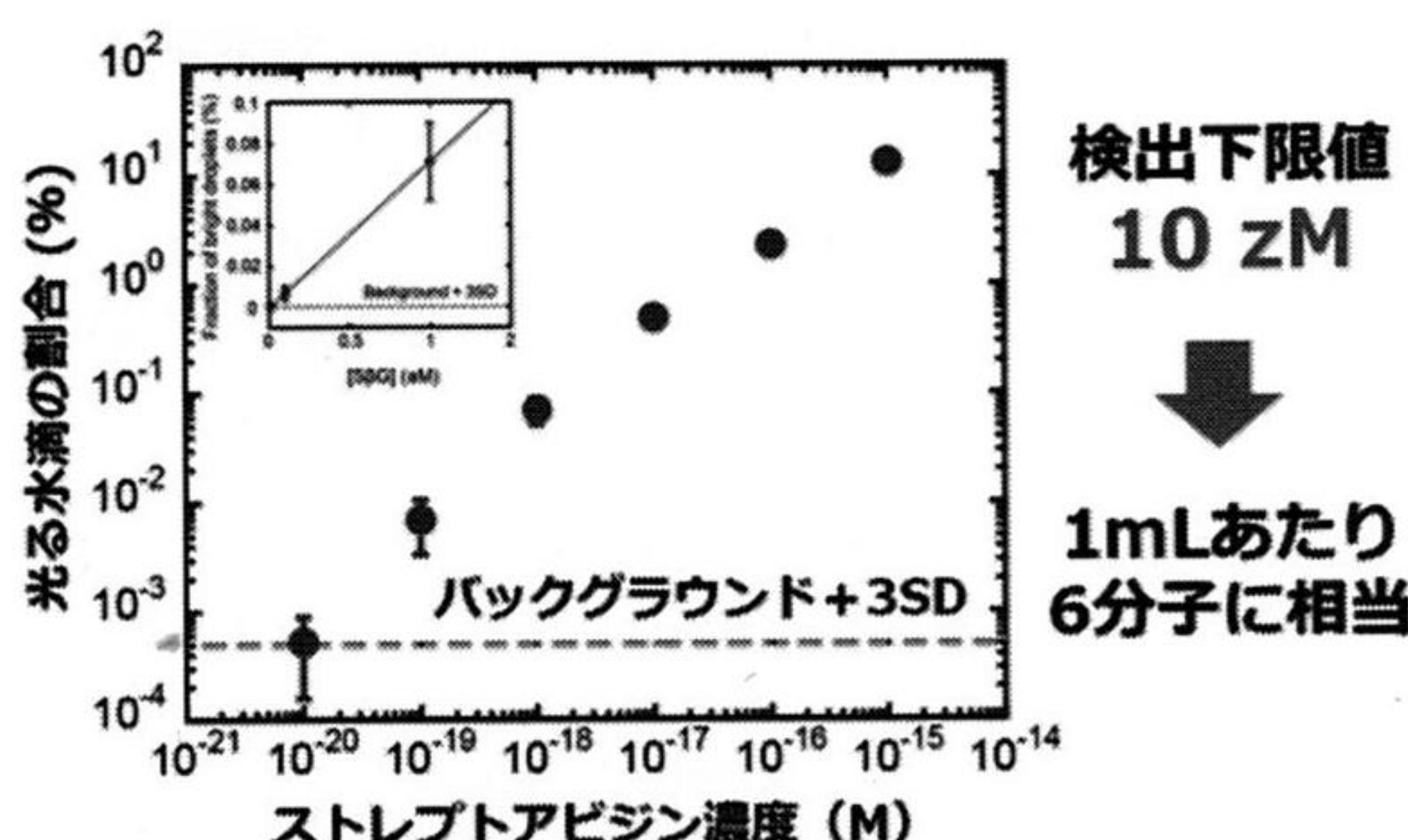


図8 ストレプトアビシン-ビオチン結合の測定例

6. 1分子デジタルELISAで可能になること

以下では、1分子デジタルELISAが実用化されると可能になることを列挙する。

1. ウイルス・病原菌感染の超早期診断

ウイルスや細菌の感染初期(血中濃度10粒子/mL)のバイオマーカーの濃度は10~100aM程度である。これを検出可能になる。

2. 癌摘出後の再発・転移の超早期診断

前立腺癌のバイオマーカーPSAは、前立腺の全摘出後には従来のELISAでは検出不可能である。しかしながら癌が再発するとPSAの濃度は再び徐々に増加する。この再発を早期に検出することが出来る。尚、健常者のPSA濃度は30nM程度と比較的高い。

3. アルツハイマー病の初期診断

発症初期のアルツハイマー病のバイオマーカーは脳脊髄液や血液中では低濃度(<10pM)だと言われている。これを検出可能になる。

4. 血液以外の検体を用いた低負担検査

疾病の検査には通常、血液を検体として用いることが多い。血液の採取は被験者にとって負担となる。採取がより容易な、尿や唾液で検査が可能になると期待される。

5. 新規バイオマーカーの探索

従来のELISAでは検出することができずに見逃していたバイオマーカーの探索が可能になる。

7. 今後の展望

今後は、1分子デジタルELISAの実用化を目指した取り組みを行いたい。具体的には下記の2つである。

1つ目は全自動検査装置の開発である。従来のELISAは自動化が進んでおり、複数のメーカーが開発した全自动検査装置が総合病院や検査機関に導入され日常的に利用されている。これら既存の全自动検査装置への組み込や、専用の全自动検査装置の開発が必要である。

2つ目は小規模医院でも導入可能なコンパクトな検査装置の開発である。我々が用いているフェムトリッターチャンバーの大きさは数 μm であり、CMOSイメージセンサーの個々の素子の大きさと同程度である。この点を生かし、フェムトリッターチャンバーとCMOSイメージセンサーを直接カップリングすることで(図9)[4]、顕微鏡を必要としない手のひらサイズの検査装置の開発を行いたい。

尚、1分子デジタルELISAを適用した検査装置の開発には米国のグループも取り組んでいる[5,6]。検出下限値は我々の手法の方が優れているが、競争相手はベンチャー企業(Quanterix)をすでに起ち上げ精力的に進めている。競争に打ち勝てるよう、鋭意努力したい。

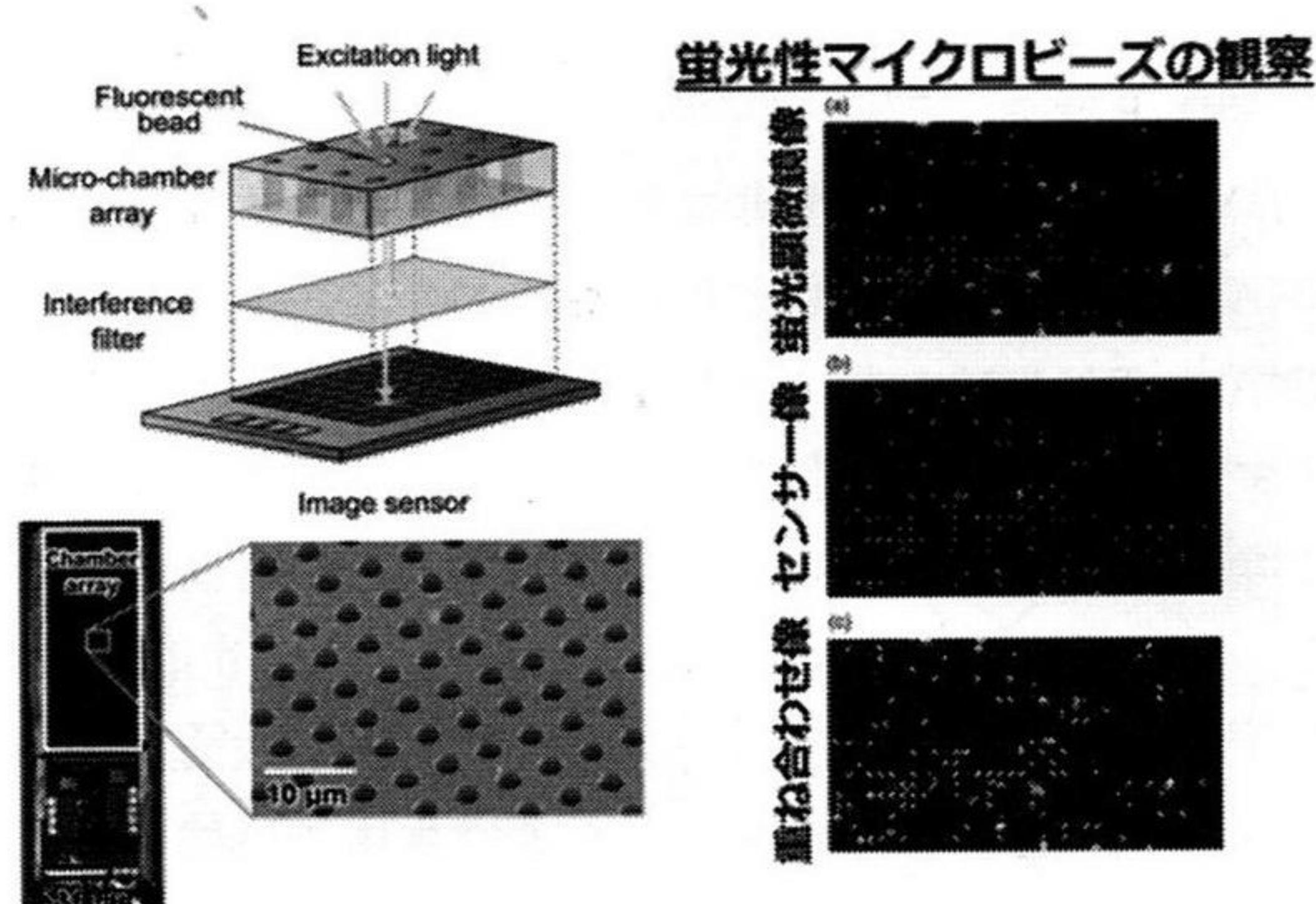


図9 フェムトリッターチャンバーとCMOSイメージセンサーの直接カップリング

謝辞

本研究は、科学技術振興機構(JST)CRESTプロジェクト「生体分子1分子デジタル計数デバイスの開発(研究代表者:野地博行)」の一環として行われ、実用化に向け現在も継続中である。JSTおよび共同研究者の野地博行(東大)、金秀炫(東大)、榎原昇一(阪大)、新木卓(阪大)、岩井信乃(阪大)、太田淳(NAIST)、笹川清隆(NAIST)、徳田崇(NAIST)、野田俊彦(NAIST)各氏に感謝する。

参考文献

- 1) Rondelez Y, Tresset G, Tabata KV, Arata H, Fujita H, Takeuchi S, Noji H. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat Biotechnol.* 23 (2005) 361.
- 2) Sakakihara S, Araki S, Iino R, Noji H. A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array. *Lab Chip.* 10 (2010) 3355.
- 3) Kim SH, Iwai S, Araki S, Sakakihara S, Iino R, Noji H. Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules. *Lab Chip* 12 (2012) 4986.
- 4) Sasagawa K, Ando K, Kobayashi T, Noda T, Tokuda T, Kim SH, Iino R, Noji H, Ohta J. Complementary metal-oxide-semiconductor image sensor with microchamber array for fluorescent bead counting. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51 (2012) 02BL01.
- 5) Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, Piech T, Patel PP, Chang L, Rivnak AJ, Ferrell EP, Randall JD, Provuncher GK, Walt DR, Duffy DC. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 28 (2010) 595.
- 6) Kan CW, Rivnak AJ, Campbell TG, Piech T, Rissin DM, Mösl M, Peterça A, Niederberger HP, Minnehan KA, Patel PP, Ferrell EP, Meyer RE, Chang L, Wilson DH, Fournier DR, Duffy DC. Isolation and detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies. *Lab Chip.* 12 (2012) 977.