

～ 超高感度 ELISA 測定系の自動化～ 確立とその応用

育成研究：JSTイノベーションサテライト徳島 平成20年度採択課題
「超高感度 ELISA 測定系の自動化」

代表研究者：徳島大学 疾患酵素学研究センター
シグナル伝達と糖尿病研究部門
教授 蛭名洋介



■ 研究概要

従来の ELISA 系の感度を 100～1000 倍に上昇させる超高感度 ELISA 測定系を自動化する新規機器を作製した。本機器により、fg-pg の可溶性インスリン受容体が検出可能、さらに超高感度 ELISA 測定系の利便性・汎用性を向上させた。

■ 研究内容、研究成果

従来の ELISA 系は標識 2 次抗体がプレートに非特異的に吸着し、測定 background (ノイズ) を上げてしまうが、共同研究者の橋田らにより開発された超高感度 ELISA 測定系 (immune complex transfer enzyme immunoassay: ICT-EIA) はこれを最小限度に抑えることで超高感度化を実現している (図 1)。しかし、この超高感度 ELISA 測定系は今まで自動化が行われなかったため、臨床検査などで広く普及することはなかった。本研究では超高感度 ELISA 測定系を自動化する新規機器を作製した。

ICT-EIA の原法では ELISA 系に用いる二種類の抗体をそれぞれ固相化したビーズを使用し、免疫複合体を移動させる (転移法)。我々はタンパク質の吸着も可能な磁性体ボールを作製し、自動分注機 (TECAN Evo100: 図 2) に設置されたマグネットアームによる運搬を可能にすることで、ビーズ法の自動化を実現した。

さらに、固相としてビーズからマイクロプレートに代替することで、測定感度が向上することが判明し (図 3)、二種の固相化したマイクロプレートを用いたプレート法の自動化にも成功した。

我々が今回測定対象物として取り組んだものは可溶性インスリン受容体 (soluble Insulin Receptor: sIR) である。我々は血中に sIR が存在すること、糖尿病患者ではそれが増加していることを発見した (Diabetes, 2007)。この sIR はごくわずかであるが尿中にも排出されていることを見出した。さらにこの切断を阻害する化合物は新規糖尿病改善薬となる可能性がある。二種プレート法自動測定を用いることにより、細胞培養液中の極微量な sIR を再現性よく簡便に測定することが可能となった。これによりヒト肝癌細胞由来 HepG2 細胞において高濃度のグルコース刺激が培養液中に sIR を増加させることを見出し、培養細胞系を用いた化合物スクリーニング系の開発に成功した (図 4)。

この二種プレート法は、様々な生体物質に応用可能であり、従来の ELISA 系のほとんどを超高感度 ELISA 系に置き換えることが可能である。微量血液や尿中などに存在する極微量の生体物質の測定が可能となり、その有用性は高い。また ICT-EIA の原法を簡便かつ自動測定にしたことにより、普及性が向上したと考えられる。

■ 今後の展開、将来の展望

測定対象を広げ、従来測定できなかった極微量な生体物質 (未知の低濃度バイオマーカーなど) や癌マーカーの早期検出や微量サンプルからの測定を実現したい。

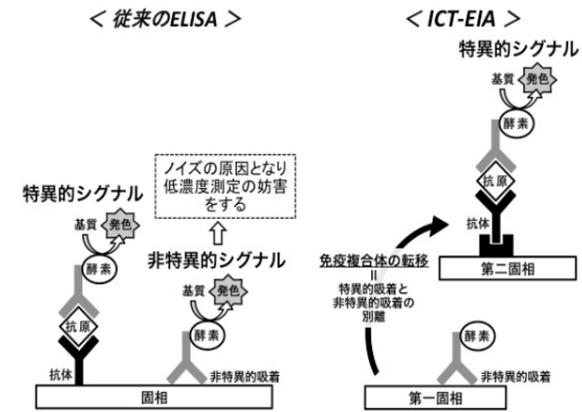


図 1. 超高感度 ELISA 測定 ICT-EIA

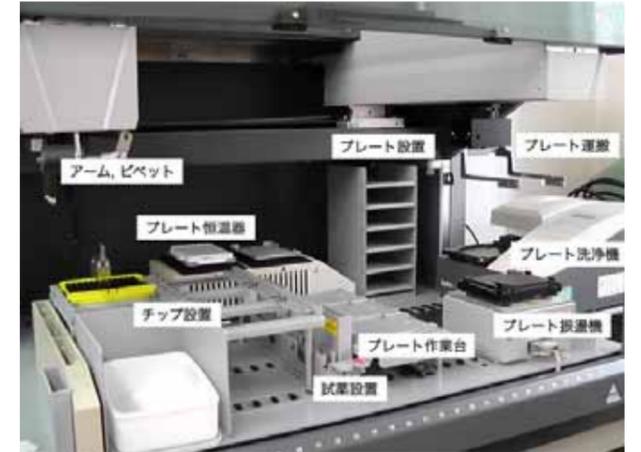


図 2. ICT-EIA 自動化機器 Evo100

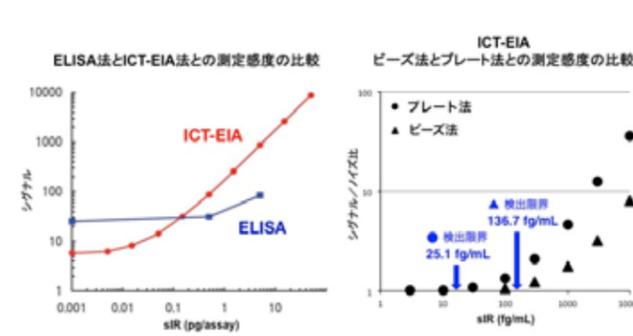


図 3. 従来の ELISA 法及び ICT-EIA ビーズ法、プレート法による測定感度の比較

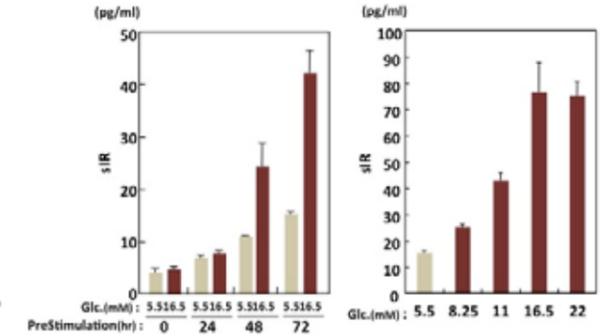


図 4. HepG2 細胞において高グルコース処理により sIR が増加する (測定: 二種プレート法自動測定)

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
徳島大学 疾患酵素学研究センター シグナル伝達と糖尿病研究部門 教授 蛭名洋介
- ◆ 研究者
湯浅智之 (徳島大学)、長屋寿雄 (徳島大学)、阿望幾久子 (徳島大学)、酒井貴久子 (徳島大学)、橋田誠一 (徳島文理大学)、大澤春彦 (愛媛大学)、大沼裕 (愛媛大学)、西田互 (愛媛大学)、高田康徳 (愛媛大学)、川村良一 (愛媛大学)、寺岡孝浩 (テカンジャパン(株))、内田弘毅 (テカンジャパン(株))、山口雅和 (テカンジャパン(株))、小島和夫 (株) 医学生物学研究所)、河野研二 (日立マクセル(株))
- ◆ 共同研究機関
徳島文理大学、愛媛大学、テカンジャパン(株)、(株) 医学生物学研究所、日立マクセル(株)

■ 研究期間

平成 21 年 4 月 ~ 平成 24 年 3 月