

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K06523
研究課題名（和文）多粒子結合イオン液体ナノ粒子を用いた超高感度電気化学発光イムノアッセイ法の開発

研究課題名（英文）Development of an ultra-sensitive electrochemiluminescence immunoassay using multiple particle binding-ionic liquid nanoparticles

研究代表者
武上 茂彦（Takegami, Shigehiko）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70298686
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：超高感度電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）法を構築すべく、イオン液体ナノ粒子（ILNP）を用いたILNP-ECLIAの開発をおこなった。モデル分析対象物質のアビジン（AVI）において、AVI濃度が1～10 μMの間で電気化学発光（ECL）強度との間で直線関係が得られた。ILNP-ECLIAは少し感度の点で劣るものの、粒子状態でECLを観測できるという長所を有するため、簡便にイムノアッセイができる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発したイオン液体ナノ粒子（ILNP）を用いた電気化学発光イムノアッセイ（ILNP-ECLIA）法は、粒子状態で電気化学発光（ECL）を観測できるという点が、本研究成果の学術的意義である。また、ILNP-ECLIA法は原理的には一般的なイムノアッセイ系を用いているため、分析可能なバイオマーカーの適用範囲が広い。したがって、種々の難治性疾患に関与するバイオマーカーを測定できるため、難治性疾患の超早期診断につながる点があるという点が本研究成果の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：In order to establish an ultrasensitive electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method, the ILNP-ECLIA using ionic liquid nanoparticles (ILNP) was developed. The calibration curve for a model analyte, avidin (AVI), had a good linearity over the AVI concentration range of 1 to 10 μM. Although the ILNP-ECLIA is slightly low in the sensitivity, it has the advantage of being able to observe ECL in their particle state, and therefore it has been demonstrated that it may be possible to perform immunoassays easily.

研究分野：分析化学

キーワード：イオン液体 ナノ粒子 電気化学発光 イムノアッセイ リポソーム

1. 研究開始当初の背景

がんを始めとする各種難治性疾患の診断は、その疾患に関連するバイオマーカーを血液中より検出・定量することによりおこなわれている。現在、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA法)が各種バイオマーカーの検出・定量に汎用され、各種難治性疾患の早期診断に活用されている。しかし、早期診断によって治療が早期におこなわれたとしても、難治性疾患の根治は難しいのが現状である。したがって、難治性疾患の根治を達成するには、早期診断のさらに上をいく超早期診断を確立しなければならない。しかし、ELISA法の検出感度は数十pg/mL程度のため、超早期診断には不十分である。また、採血という患者に精神的・肉体的に負担をかけないよう、血液以外の生体液(汗、涙、唾液、尿)を用いたバイオマーカー分析が望まれているが、これらの生体液中のバイオマーカーの量は血液中よりも大幅に少ないため、ELISA法では感度が不十分である。したがって、超早期診断と血液以外の生体液試料を用いた分析という2つの観点からELISA法に代わる新しいバイオマーカーの超高感度分析法の開発が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

以前、ELISA法に代わる新しいバイオマーカーの超高感度分析法として、発光物質を封入したリポソームを信号増幅器として用いた電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)法を開発した¹⁾。しかし将来的に、マイクロデバイスのように試料を流した状態(フロー系)でリポソーム-ECLIA法を用いることを想定したとき、バイオマーカーを補足する部位(補足部位)と発光物質を回収して発光させる部位(検出部位)が異なることが問題になる(図1A)。そこで、『補足と検出を同じ部位でおこなうためにはどのようなECLIA法を構築すればよいか』、『リポソーム-ECLIA法を基盤に、この方法の感度を超える新しい独自性のある超高感度ECLIA法は開発可能か』、という2つの学術的「問い」を同時に解決するのが本研究課題(図1B)である。

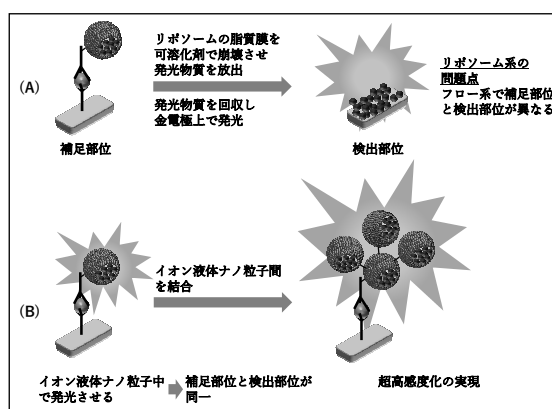


図1. イオン液体ナノ粒子を用いた電気化学発光イムノアッセイ法の信号増幅戦略

前者の「問い」に対しては、これまで遂行してきたイオン液体ナノ粒子(ILNP)を信号増幅器として用い、粒子状態のままILNP中で電気化学発光(ECL)を観測することで解決を試みる。次いで、後者の「問い」に対しては、ILNPを複数個結合させることでECL強度を増加させることで解決可能ではないかと着想した。

そこで本研究の目的は、上記の2つの学術的「問い」を解決した、革新的な超高感度電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)法を構築するために、これまで遂行してきた研究をさらに発展させ、信号増幅器としてイオン液体ナノ粒子(ILNP)を複数個結合させた多粒子結合ILNP(MPB-ILNP)を開発し、MPB-ILNP-ECLIA法の生体試料への応用を目指すことである。具体的な目標として、以下の3点について研究を実施した。

- 1) 予備的試験として、多粒子結合型リポソーム-ECLIA法の構築と血清試料測定への応用
- 2) IL中での発光物質のECL挙動の評価
- 3) 単一のILNPを用いたILNP-ECLIA法の構築およびMPB-ILNPの調製と評価

3. 研究の方法

3.1. 粒子の調製

3.1.1. 多粒子結合型リポソーム(MPB-Lip)の調製

初めに、リン脂質、コレステロール、発光物質であるTris(bipyridine)ruthenium(II) chloride ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$)を基本組成とし、基本組成に一級アミンを有する脂質およびビオチン(BIO)化脂質を加えたリポソーム($\text{BIO}/\text{NH}_2\text{-Lip}$)と、N-hydroxy succinimide esterを有する脂質を加えたリポソーム(NHS-Lip)をExtrusion法にて調製した。次いで、2種のリポソームを任意の割合で混合($\text{BIO}/\text{NH}_2\text{-Lip}:\text{NHS-Lip}=1:0, 1:1, 1:3, 1:5, 0:1$)し、縮合反応を利用してMPB-Lipを得た。

3.1.2. イオン液体ナノ粒子(ILNP)の調製

100 mM N-Butyldiethanolamine(NBEA)を含むIL($[\text{Pyr}1201][\text{Tf}_2\text{N}]$) 1 mLに3 mgの $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を溶解した。この溶液にEgg yolk phosphatidylcholine 90 mg, Dipalmitoylphosphatidylglycerol(DPPG) 30 mg, Cholesterol 5 mg, ポリエチレングリコール(PEG)化DPPG 5 mg, BIO-

phosphatidylethanolamine 8.7 mg をそれぞれ加えた。そこに 10 mL の 1% ショ糖-1.1% PEG 含有の 10 mM HEPES Buffer (pH 7.4) を加え、ホモジナイザーで 45 分間攪拌し、Ru(bpy)₃ と NBEA を封入した ILNP を得た。

3.2. ECL 測定

3.2.1. MPB-Lip-ECLIA 法によるストレプトアビジンの定量分析

一定量のストレプトアビジン (SA) を固定化した金電極を使用し、種々の濃度の SA 溶液と混合した MPB-Lip 懸濁液を滴下し、結合していない MPB-Lip を除去した後、共反応体である NBEA および界面活性剤である Octyl-β-D-glucopyranoside を添加して ECL を測定した。

3.2.2. ILNP-ECLIA 法によるアビジンの定量分析

BIO を固定化した金電極に種々の濃度のアビジン (AVI) 溶液、次いで ILNP 懸濁液を滴下し、結合していない ILNP を除去した後、ECL を測定した。

4. 研究成果

4.1. 多粒子結合型リポソーム-ECLIA 法の構築と血清試料測定への応用

まず、MPB-Lip の ECL 強度の増幅効果について検討した。

その結果を図 2 に示す。リポソームの粒子数が増加するにつれて顕著に Ru(bpy)₃ 由来の ECL 強度も増大した。この結果から、リポソームの粒子間は結合され MPB-Lip が形成されていること、MPB-Lip は ECL 強度を増大させることが明確に示された。次いで、1:0-Lip および 1:5-Lip について検量線を作成した。その結果、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) はそれぞれ、1:0-Lip では 1.84 と 6.30 μg/mL、1:5-Lip では 1.20 と 1.74 μg/mL となった。この結果から、1:5-Lip のような MPB-Lip の方が 1:0-Lip のような単一粒子型よりも LOD および LOQ が低濃度側にシフトし、感度が向上していることが示された。

1:5-Lip について、間接競合法を用いてウシ血清中の SA の添加回収実験をおこない、上記で得られた検量線から SA の定量分析を実施した。その結果を表 1 に示す。いずれの SA 濃度においても、添加された濃度と測定された濃度はほぼ一致しており、回収率は 83-106% であった。また、再現性は 4-14% であった。この結果から、MPB-Lip-ECLIA 法は良好な定量性と再現性を有し、生体試料に対しても有用な測定法であることが示された。

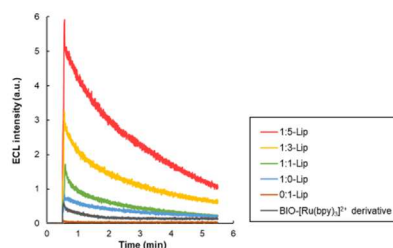


図 2. SA 修飾金電極に滴下された各懸濁液の ECL 曲線

表 1. ウシ血清中への SA 添加回収実験

SA concentration (μg/mL)			
Spiked	Found	Recovery (%)	RSD (%)
2.0	1.8	88	14
4.0	4.2	106	9
8.0	8.1	102	4
16.0	13.3	83	8

4.2. IL 中での発光物質の ECL 挙動の評価

ILNP-ECLIA 法の構築にあたり、まずはアニオンおよびカチオンの組み合わせが異なる 11 種の IL 中での Ru(bpy)₃ の ECL 測定をおこなった。その結果を図 3 に示す。その結果、親水性の高い [BF₄]⁻ や [PF₆]⁻ イオンを有する IL では、Ru(bpy)₃ の ECL がほとんど観測されなかった。それに対し、bis(trifluoromethyl)sulfonylimide [Tf₂N]⁻ イオンを有する IL では、Ru(bpy)₃ の大きな ECL が観測された。これは、[Tf₂N]⁻ イオンは疎水性の高いイオンであり、他のアニオン種と比較して IL 中で自己集散的に疎水的なクラスターを形成している。その疎水的なクラスターに Ru(bpy)₃ が入ることにより、Ru(bpy)₃ が安定化され、エネルギーの浪費となる分子運動が抑制される結果、ECL 強度が増大したのではないかと推測している。一方、カチオンではホスホニウム系 IL において、Ru(bpy)₃ の ECL 強度が高くなる傾向が見られた。他方、100 mM NaCl を含んだ HEPES buffer (pH 7.4) では、Ru(bpy)₃ の ECL はほとんど観測されなかった。これらの結果から、[Tf₂N]⁻ イオンを有する IL は Ru(bpy)₃ の ECL を大幅に増大させることが明らかとなった。

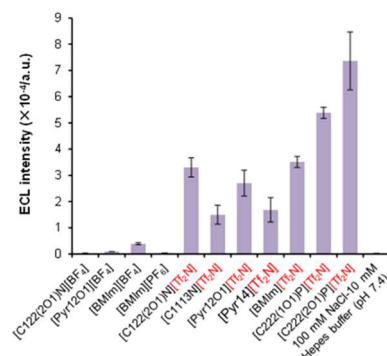


図 3. 各種溶媒中での 10 μM Ru(bpy)₃ の ECL 強度の比較

4.3. 単一の ILNP を用いた ILNP-ECLIA 法の構築および MPB-ILNP の調製と評価

ILNP が ECLIA に適用できるかを調べるために、アビジン-ビオチンの特異的結合をモデル検出系として利用し、ILNP-ECLIA によるアビジン (AVI) の定量を検討した。なお、本研究では IL に [Pyr1201][Tf₂N] を分散質として調製した ILNP を用いた²⁾。種々の濃度の AVI 溶液について、ILNP 懸濁液を添加して測定した ECL 曲線を図 4 に示す。Ru(bpy)₃ 由来の ECL 強度は小さく、ノイズが多く含まれているものの、AVI 濃度に応じて ECL 強度は大きくなった。この結果から、リ

ポソームとは異なり、界面活性剤で粒子を崩壊させる必要もなく、ILNPの状態でも ECL を観測できることが示された。

各 AVI 濃度で得られた ECL の 15 秒間の積算値を計算し、AVI 濃度に対してプロットしたのが図 5 である。AVI 濃度が 10 nM ~ 10 μM の間で良好な直線性が得られた

($r=0.92$)。100 μM の ECL 積算値は、10 μM のそれとほぼ変わらなかったことから、本 ILNP-ECLIA 系では AVI の定量上限は 10 μM であることが示された。一方、AVI の低濃度側では、図 4 に示されたように、100 pM の AVI 濃度存在下では Ru(bpy)₃ の ECL はほぼ観測されなかった。したがって、本検量線は 10 nM ~ 10 μM の間で作成した。この検量線を用いて、LOQ と LOD を算出した。両者の算出は、ベースラインの標準偏差 (S. D.) から、LOQ = 10 × S. D., LOD = 3 × S. D., とした。これらから算出された LOQ と LOD はそれぞれ、1.07 nM と 462 pM であった。以上の結果から、Ru(bpy)₃ と NBEA の両方を封入した ILNP を用いて、粒子状態のまま AVI 濃度を定量できる ILNP-ECLIA を構築することができた。

また、臨床分析の観点から ILNP-ECLIA を腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) の測定に応用した。その結果を図 6 に示す。PSA 濃度が 1 ng/mL ~ 10 μg/mL の間で PSA 濃度が増加すると、ECL 強度も増加した。この結果から、抗原-抗体反応を利用した腫瘍マーカーの測定にも ILNP-ECLIA を利用することができ、臨床上有益な検査情報を得ることが可能であることが示された。

一方で、残念ながら、ILNP を複数個結合させた MPB-ILNP については安定性を向上させることができず、MPB-ILNP-ECLIA 法を構築するには至らなかった。

5. 結論

3 年間の研究期間において、以下の成果を挙げることができた。

- (1) MPB-Lip-ECLIA 法を用いて、従来の ECLIA よりも SA の定量感度を大幅に向上させ、血清試料への応用に成功した。

本研究に関しては現在、論文を投稿中である。

- (2) 発光物質である Ru(bpy)₃ と Coreactant である NBEA を封入した、イオン液体を分散質とした ILNP を調製することができた。ILNP-ECLIA 法を AVI の定量に適用したところ、作成した AVI の検量線から、定量限界 (LOQ) = 1.07 nM, 検出限界 (LOD) = 462 pM が得られた。この結果から、ILNP のような粒子状態のまま直接、ECL を観測して AVI を感度よく定量分析することに成功した。また、腫瘍マーカーである PSA の分析にも応用できることを示した。

本研究に関しては現在、投稿論文を準備中である。

<Reference>

- 1) M. Mayer*, S. Takegami, M. Neumeier, S. Rink, A. J. von Wangelin, S. Schulte, M. Vollmer, A. G. Griesbeck, A. Duerkop, A. J. Baeumner, "Electrochemiluminescence bioassays with a water-soluble luminol derivative can outperform fluorescence assays", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 408-411 (2018). *Equal contributor.
- 2) S. Takegami, K. Watanabe, A. Konishi, T. Kitade, "Formation of ionic liquid submicron particles. ¹H and ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopic studies", *J. Dispersion Sci. Technol.*, **39**, 1040-1046 (2018).

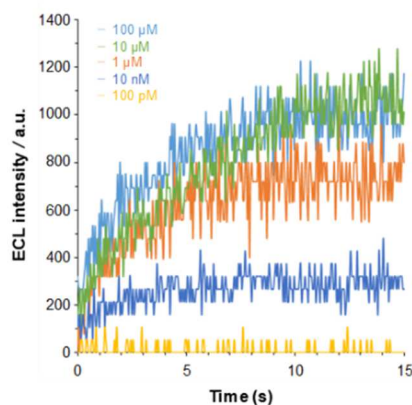


図 4. 種々の AVI 濃度に対する Ru(bpy)₃ 封入 ILNP の ECL 曲線

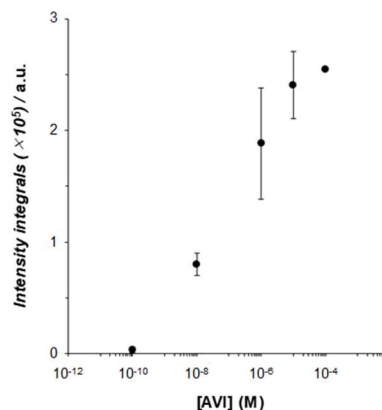


図 5. Ru(bpy)₃ 封入 ILNP を用いた AVI の検量線

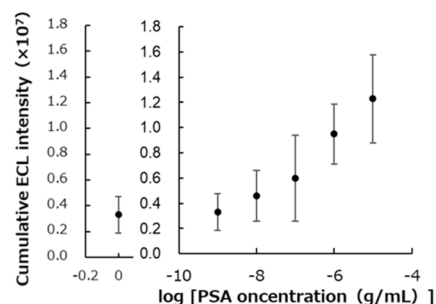


図 6. Ru(bpy)₃ 封入 ILNP を用いた PSA の検量線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takegami Shigehiko, Aramoto Yuki, Konishi Atsuko	4. 巻 38
2. 論文標題 Spectroscopic study of cyclen-based ¹⁹ F NMR probe for detection of hydrogen sulfide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 813 ~ 820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44211-022-00100-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Masaki, Sawada Hikari, Iwata Kazumi, Ibi Masakazu, Asaoka Nozomi, Katsuyama Masato, Shintani-Ishida Kaori, Ikegaya Hiroshi, Takegami Shigehiko, Umemura Atsushi, Yabe-Nishimura Chihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Bortezomib is an effective enhancer for chemical probe-dependent superoxide detection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2022.941180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 小西 敦子、武上 茂彦	4. 巻 2
2. 論文標題 ユニークな感応素子を有する電気化学的バイオセンサーに関する最新の開発動向	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 京都薬科大学紀要 = Bulletin of Kyoto Pharmaceutical University	6. 最初と最後の頁 144 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34445/00000279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiguchi Yuki, Morita Izumi, Yamaki Kouya, Takegami Shigehiko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Framework-Directed Amino-Acid Insertions Generated over 55-Fold Affinity-Matured Antibody Fragments That Enabled Sensitive Luminescent Immunoassays of Cortisol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1661 ~ 1665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takegami Shigehiko、Danzako Minato、Konishi Atsuko	4. 巻 40
2. 論文標題 Detection of dopamine levels using a polydiacetylene liposomal aequorin bioluminescent device with octadecylboronic acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 353 ~ 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00469-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中亜季, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 電気化学発光および水晶振動子マイクロバランス法における多粒子結合型リボソームの信号増幅効果の検討
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本侑季奈, 小西敦子, 中條恵介, 田中亜季, 武上茂彦
2. 発表標題 疎水性イオン液体含有コルチゾールインプリントゲルのワンステップ作製法の検討
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中條恵介, 谷口深琴, 松本侑季奈, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 疎水性イオン液体含有コルチゾールインプリントゲルの調製およびコルチゾール結合量の測定
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井日加里, 西口芽生, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 -グルタミルトランスフェラーゼ検出のためのポリジアセチレンリポソーム型イクオリン生物発光デバイスへのグルタチオンの修飾に関する検討
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川中彩永, 小川泰毅, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 メラミン検出のためのポリジアセチレンリポソーム型イクオリン生物発光デバイスの開発に関する基礎的検討
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中亜季, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 電気化学発光および水晶振動子マイクロバランス法の信号増幅のための多粒子結合型リポソームの調製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中亜季, 武上茂彦
2. 発表標題 電気化学発光イムノアッセイへの多粒子結合型リポソーム適用に関する基礎的検討
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤史帆里, 田中亜季, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 イクオリン生物発光に及ぼすATPの影響
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤田果奈, 田中亜季, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 分子インプリントポリマーとアルギン酸ゲルを組み合わせたワルファリンインプリントゲルに対するワルファリンの吸着に関する検討
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中亜季, 高井涼太, 武上茂彦
2. 発表標題 間接競合法による電気化学発光イムノアッセイへの多粒子結合型リポソームの適用
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目黒絢音, 田中亜季, 武上茂彦
2. 発表標題 電気化学発光における共反応物の探索とルミノフォア - 共反応物の単一分子の設計
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木口裕貴, 森田いずみ, 武上茂彦, 小林典裕
2. 発表標題 解離非依存型CAP法により取得した高親和力変異scFvを用いるコルチゾールの高感度生物発光ELISA
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯沼崇斗, 田中亜季, 木口裕貴, 小西敦子, 武上茂彦
2. 発表標題 サイクレン誘導体を用いた19F-NMRによる硫化水素測定におけるシステインの影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学 分析薬科学系薬品分析学分野 研究内容 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/bunseki/research4.html 京都薬科大学 分析薬科学系薬品分析学分野 研究業績 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/bunseki/Newachievement4.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------