

新規高感度エクソソーム検出方法の開発

○青木洋一, 彼谷高敏
(コニカミルタ株式会社)

目的

近年、様々な疾患診断マーカーとして、血液等に分泌されたエクソソームまたはその構成物質を検出する方法が盛んに研究されている。これまでに報告されているエクソソーム検出方法は、生体試料を対象とした評価における分析感度性能や測定範囲性能が不十分であるため、分析感度性能を確保するために複雑なエクソソーム抽出前処理工程を必要とし、再現性など多くの分析基本課題を抱えている。今後、多様なエクソソームの機能解析や臨床応用検討を進めるためには、上記課題を解決した高感度検出方法の確立が急務であるとする。

そこで本研究では、表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS: Surface Plasmon field-enhanced Fluorescence Spectroscopy) 技術を検出原理とする小型血液検査システムを用いて、高感度かつ幅広い測定範囲性能を高い再現性の下で両立した新規高感度エクソソーム検出方法を開発した。

本発表では、開発したSPFS自動免疫測定システムを用いて、システムの分析感度性能と測定範囲性能について評価した結果について報告する。

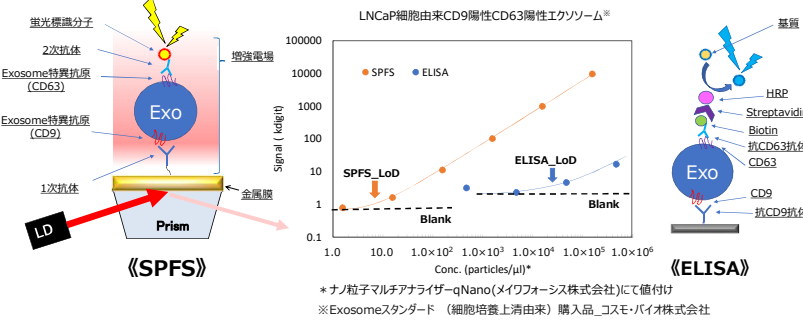
方法

SPFS原理説明



結果

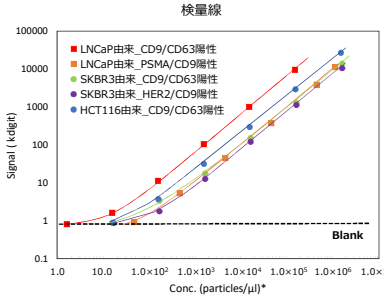
■ SPFSとELISAのエクソソーム検量線比較



ELISAと比較して約3000倍高感度!!

■ 各種細胞由来エクソソームの測定

・検量線、検出感度、再現性、ダイナミックレンジ



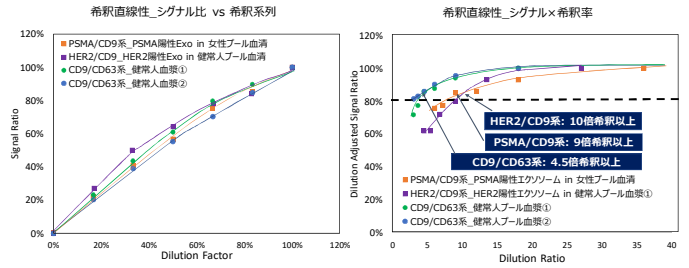
	LoD* particles/μl	濃度 particles/μl	CV (N=10)
LNCAp_CD9陽性CD63陽性Exo	8.3	6.7×10 ¹	6.7%
LNCAp_PSMAR陽性CD9陽性Exo	1.9×10 ²	1.3×10 ⁴	2.4%
SKBR3_CD9陽性CD63陽性Exo	1.4×10 ¹	1.4×10 ³	10.3%
SKBR3_CD9陽性CD63陽性Exo	1.4×10 ¹	4.0×10 ³	6.8%
SKBR3_HER2陽性CD9陽性Exo	7.5×10 ¹	1.2×10 ³	4.7%
SKBR3_HER2陽性CD9陽性Exo	7.5×10 ¹	1.6×10 ⁴	2.5%
HCT116_CD9陽性CD63陽性Exo	4.3×10 ¹	7.0×10 ²	7.5%
HCT116_CD9陽性CD63陽性Exo	4.3×10 ¹	1.3×10 ⁴	4.2%
HCT116_CD9陽性CD63陽性Exo	4.3×10 ¹	2.3×10 ²	6.4%
HCT116_CD9陽性CD63陽性Exo	4.3×10 ¹	1.4×10 ⁴	4.6%

*LoDは下記の式にて算出 (Blankサンプル、低濃度サンプル共N=10測定)
LoB=Average_{blank}+1.645SD_{blank}
LoD=LoB+1.645SD_{低濃度サンプル}

ダイナミックレンジ: 5桁以上!!

高感度かつ高い再現性!!

・血漿/血清サンプルの希釈直線性(必要希釈率の見積もり)



・血漿/血清サンプルへのエクソソーム添加回収試験

	理論値 particles/μl	実測値 particles/μl	回収率
LNCAp_CD9陽性CD63陽性Exo	3.6×10 ⁵	3.5×10 ⁵	97.7%
LNCAp_PSMAR陽性CD9陽性Exo	2.9×10 ⁵	3.3×10 ⁵	112.4%
SKBR3_CD9陽性CD63陽性Exo	4.7×10 ⁵	4.5×10 ⁵	96.5%
SKBR3_HER2陽性CD9陽性Exo	2.6×10 ⁵	2.9×10 ⁵	111.4%
HCT116_CD9陽性CD63陽性Exo	3.6×10 ⁵	3.4×10 ⁵	94.4%

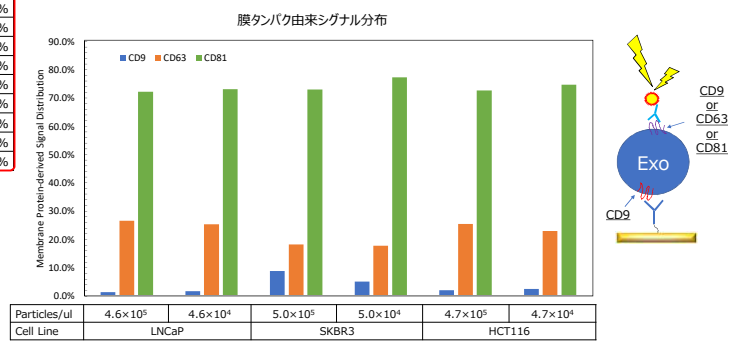
(N=3平均)

PSMAR陽性エクソソーム時は、女性プール血漿を使用。

他は、健康人プール血漿を使用。

**血漿/血清でも
前処理なしで測定可能!!**

■ 機能解析への応用例



エクソソームの質の変化を幅広い濃度域で解析することが可能。

考察と今後の展開

ELISAの系と比較して約3000倍程度高感度であり、さらに幅広い測定範囲を持つことも確認した。また、前処理なしの自動測定であるため簡便かつ高い再現性も実現でき、解析ツールとして有用であると思われる。本システムは、エクソソームをマーカーとした診断以外にも、創薬研究などにおけるエクソソームの分泌抑制効果確認や、各膜タンパク量の増減解析、抗体医薬における薬物投与前の目的エクソソーム量の確認 & 投与量の決定、注入したエクソソームの広範囲なモニタリングなどに適用可能と考えており、エクソソームの解析ツールの一つとしてエクソソーム研究開発の一助となることを期待する。

課題としては、現行の小型タイプではスループット性が低いため、大量のサンプルを測定するためのハイスループット機についても現在開発中である。