

免疫ビーズ上へのウイルス粒子捕捉効率の理論評価と MUNANA 測定

Theoretical and experimental evaluation of virion capturing efficiency of immunobeads

産総研¹ °芦葉 裕樹¹, 安浦 雅人¹, 藤巻 真¹

AIST¹, °Hiroki Ashiba¹, Masato Yasuura¹, Makoto Fujimaki

E-mail: h.ashiba@aist.go.jp

免疫ビーズを用いたバイオセンサにおいて、検出性能の理論検討を行うために、免疫ビーズと標的物質の間の結合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d を評価することが重要である。一般に用いられる抗体等の分子単体の k_a および k_d に対し、免疫ビーズのこれらの値はビーズのサイズに依存する拡散係数の差異や、ビーズ表面の抗体密度やブロッキング条件等によって変化すると考えられる。したがって、理論検討と併せて、実際のビーズ上へのウイルス粒子結合効率を評価することが重要と考えられる。筆者らはこれまでに、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)活性の測定に用いられる 4-(methyumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)を用いて、主に反応上清中のインフルエンザウイルス量の変化から、免疫磁性ビーズ上へのウイルス結合効率の評価を試みた結果を報告した[1]。今回、反応速度論による理論解析、およびビーズ上へのウイルス結合量の直接的な評価を併せて実施した結果につき報告する。

直径 1 μm の免疫磁性ビーズと直径 100 nm のインフルエンザウイルスの結合を考える。拡散運動による粒子同士の衝突頻度を元に k_a を算出し、また k_d を様々なオーダーの値の範囲で変化させ、計算を行った。ここでは衝突すれば結合が生じると仮定した。磁性ビーズ濃度 5×10^8 個/mL における、ビーズへのウイルス粒子捕捉率の時間変化の計算結果を Fig. 1(a)に示す。本結果より、 k_d が $10^{-3} (\text{s}^{-1})$ より小さければ、反応時間 600 s で 80%以上のウイルスが捕捉できることが示された。また実験として、A 型インフルエンザウイルス(IAV)の不活化抗原に対し、モノクローナル抗 HA マウス抗体を固定した直径 1 μm の磁性ビーズを室温で 10 分間反応させた。反応後、磁気分離を行って上清を分取し、残った磁性ビーズを HEPES バッファ中で再分散させた。ビーズ分散液および上清をそれぞれ 200 μM MUNANA 溶液と混合し、37°C で 60 分間反応させた後、0.2 M 炭酸ナトリウム水溶液を加えて反応停止させた。反応液の蛍光強度は蛍光顕微システム（励起波長 385 nm）を用い、ビーズ分散液については磁気分離をした状態で測定した。ビーズ分散液および上清の測定結果から、ビーズ濃度 5×10^8 個/mL のとき、約 50% の IAV がビーズ上に捕捉されていると見積もられた。

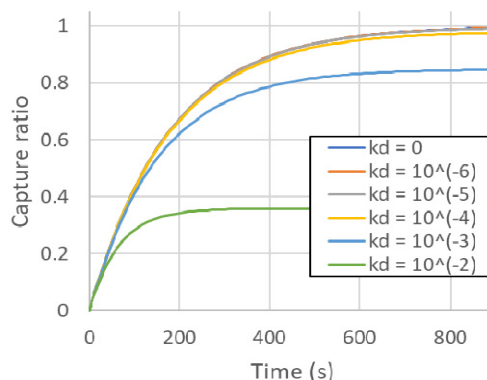


Fig. 1 Theoretical evaluation of influenza virion capturing efficiency of immunomagnetic beads with a diameter of 1 μm .

[1] 芦葉他、第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、8a-Z12-10