

ラテラルフローアッセイに関する最新の研究動向

徳島大学大学院社会産業理工学研究部 水口仁志

はじめに

ヒトの健康管理や食品管理において、その原因あるいは指標となる物質を現場で可能な限り簡便に検出することは、疾病等の早期発見と迅速な処置、食品流通における安全と安心の確保のためには極めて重要である。妊娠した女性の尿中に排出されるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hGC) を迅速に検出できる、いわゆる妊娠検査薬が 1980 年代に上市されて以来、ラテラルフローアッセイ (Lateral flow assay, LFA) は、臨床検査、食品検査、環境分析などのさまざまな分野で広く用いられている。複雑なマトリックスを含む状態であっても液体試料であればそのまま適用できることや、高度な熟練を必要としない優れた操作性、コストパフォーマンスの高さは、今日の LFA の高い汎用性の基盤となっており、先進国だけでなく、高度な検査機器を持たない発展途上国においては特に重要な技術である。

LFA の基本的な原理と構造を図 1 に示す。左から順にサンプルパッド、コンジュゲートパッド、ニトロセルロース膜、吸収パッドで構成され、ニトロセルロース膜にはテストラインとコントロールラインが設けられている。コンジュゲートパッドには、着色粒子等の指示物質で標識された検出用分子 (二次抗体など) が含浸されており、テストラインには分析対象物 (アナライト) を捕捉する分子、コントロールラインには検出用分子を捕捉する分子がそれぞれ固定されている。サンプルパッドに試料液が導入されると毛細管現象によって図 1 の右方向への流れが生じ、試料液がコンジュゲートパッドを通過する際に検出用分子が放出されてアナライトと結合し、その後、テストラインで捕捉される。一方、アナライトと結合しなかった検出用分子はコントロールラインで捕捉される

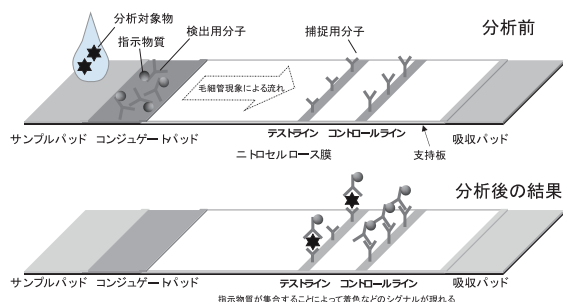


図 1 ラテラルフローアッセイの基本構成

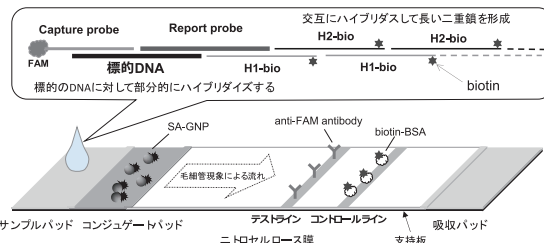
ので、試料液に分析対象物が含まれていればテストラインとコントロールラインの両方に着色が現れ、アナライトが含まれていなければコントロールラインだけが着色する (on/off 判定)。また、テストラインにおける着色の濃淡などのシグナル強度から濃度が見積もられる場合もある (定量分析)。

アナライトに対する結合や、テストライン、コントロールラインにおける標的分子に対する結合では、抗原抗体反応やポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの特異性が用いられ、特に前者はイムノクロマトグラフィー、後者は核酸クロマトグラフィーと呼ばれている。今日すでに多くのタンパク質や遺伝子検出に対して実用化されているが、なお定量性の向上、検出感度の向上、複数種のアナライトの同時検出のように、現場の様々なニーズが当該技術のさらなる向上のモチベーションとなっている。そこで本稿では、ラテラルフローアッセイに関するごく最近の報告例をピックアップして、特に現在どのようなことが研究の対象となっているのかに焦点を当てながら紹介したい。

等温での遺伝子増幅反応を用いる高感度化

標的とする遺伝子を高感度に検出するには増幅反応と組み合わせることが有効であるが、加熱と冷却を繰り返すポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) よりも簡便な、一定温度

LFA操作前



LFA操作後

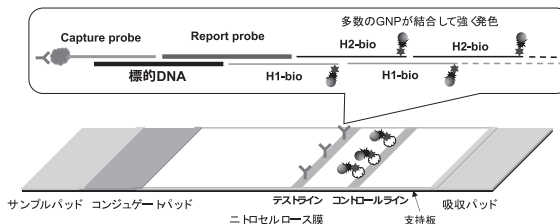


図 2 HCR 増幅を利用する高感度 LFA の原理 [1]

での増幅反応と LFA を組合せた手法が報告されている。

Ying らは標的とする遺伝子の迅速、簡便かつ高感度な検出を目的として、ハイブリダイゼーション増幅反応（HCR）を適用した LFA を報告した [1]。原理を図 2 に示す。本法は、標的 DNA の塩基配列に対して部分的に相補的な配列を持つ Capture probe および Report probe をハイブリダイズさせ、Report probe の残りの塩基配列を起点として無数の H1-bio と H2-bio が自発的に交互にハイブリダイズすることで増幅される手法である。H1-bio および H2-bio はともにビオチンで標識されており、この位置にストレプトアビジン (SA) で標識された金ナノ粒子 (GNP) が結合し、最終的に Capture probe 末端における抗原抗体反応によってテストラインで捕捉される。この場合、1 分子の標的分子に対して多数の GNP がテストラインの着色に関与するため高感度な検出が可能となる。検出限界は 1.76 pM であり、HCR 増幅を用いない（1 分子の標的分子に対して 1 個の GNP が関与する）場合よりも 176 倍優れていた。サルモネラ菌から抽出した 16S rRNA に本法を適用したところ検出限界は 3×10^3 cfu/mL であった。

一方 Cheng らは、ループ介在等温増幅（LAMP）を用いて標的 DNA を増幅させる方法と検出側で DNAzyme を併用する高感度 LFA を報告している [2]。LAMP 法もまた一定温度において高効率で DNA を増幅できる手法である [3]。本研究では遺伝子組換え大豆の 2 種の遺伝子（DP305423 および GTS40-3-2）とレクチン遺伝子を標的として選択した。増幅反応に用いる 5'末端側のインナープライマー（FIP）は上記 3 種ともビオチン標識し、また、3'末端側のインナープライマー（BIP）は、DP305423、GTS40-3-2 およびレクチン遺伝子に対してそれぞれ FITC、Digoxin、Hex で標識し、これらを同時に LAMP 増幅させると、片方がビオチン標識、他方においてはそれぞれの遺伝子に応じて FITC、Digoxin、Hex で標識された二重鎖 DNA が大量に合成される。図 3 に示すように本研究で作製した LFA のプラットフォームは、DP305423、GTS40-3-2 およびレクチン遺伝子を同時に検出することを目的として、サンプルパッドから 3 方向に分岐させ、それぞれにコンジュゲートパッド、テストライン、コントロールラインが設けられている。それぞれのテストラインには、3 種の遺伝子配列を含む二重鎖 DNA をそれぞれに特異的に捕捉するためのアンチ FITC 抗体、アンチ Digoxin 抗体、アンチ Hex 抗体が固定され、コンジュゲートパッドには、ペルオキシダーゼ活性を持つヘミンを包含した DNAzyme とアンチビオチン抗体で修飾された GNP が含浸されている。増幅反応を終えた試料液体をサンプルパッドに導入すると、それぞれの遺伝子配列を持った二重鎖 DNA は、ビオチンを介して GNP と結合し、それぞれのテストラインにおける抗原抗体反応で捕捉された後に、

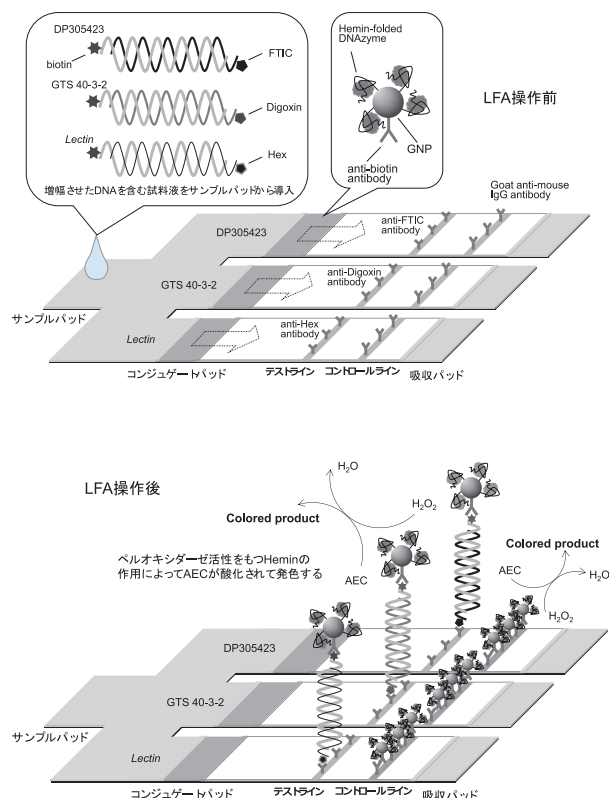


図 3 3 種の DNA の高感度同時検出のための LFA [2]

過酸化水素と 3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）の作用によってさらに増幅された着色が現れる。この結果、遺伝子組換えでない大豆への添加試験における目視検出限界は 0.1%であった。さらに生の大豆、大豆油、豆乳、豆腐、乾燥豆腐において、DP305423、GTS40-3-2 の遺伝子の有無、さらにその交配種を見分けることができた。

新しい指示物質の開発による高感度化

Liu らの研究グループは、無数の GNP を保持したシリカナノロッドを作製し、LFA における指示物質として適用することで従来よりも高感度な検出ができることを報告している [4]。これは、テトラエトキシシランを前駆体とするゾルゲル反応で作製した長さ 3.4~7.0 μm （太さは SEM 像から 200~300 nm のように見える）のシリカナノロッドを水に分散させ、塩化金酸を用いて表面に金粒子をシーディングしてからさらに熟成して作製されたものである。ここではモデルケースとしてウサギ IgG のサンドイッチ法による検出を試みている。LFA のテストラインおよびナノロッド表面にアンチウサギ IgG 抗体を固定し、さらにこのナノロッドをコンジュゲートパッドに含浸させて LFA のプラットフォームとした。その結果、検出限界は 0.01 ng mL^{-1} ($6.7 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$) となり、従来の

金ナノ粒子を用いて検出する場合よりも約 50 倍優れていることがわかった。これはナノロッドを用いたことでウサギ IgG 一分子あたりの検出に参与する GNP の個数が従来手法よりも格段に多くなったことや、1 個のナノロッドに対して複数個の抗体が固定されたことによってテストラインでの捕捉がより強固になり、検出に直接関与できるウサギ IgG の割合が向上したためであると考えられている。また彼らの研究グループでは、立方体の形をした大きさ数 10 nm の金ナノケージを作製して同様の試験を行っており、この場合は、従来の金ナノ粒子を用いる手法に対して 2.5 倍の感度向上が認められた [5]。

さらに同研究グループは、発蛍光性カーボンナノ粒子を用いる一本鎖 DNA の超高感度検出についても報告している [6]。氷酢酸と五酸化ニリンとの反応で生成した粒径約 15 nm 発蛍光性カーボンナノ粒子の表面に、標的 DNA に対して部分的に相補的な塩基配列を持つ検出用 DNA プローブを修飾したのちコンジュゲートパッドに含浸させた。また、テストラインには標的 DNA の残りの部分に対して相補的な塩基配列をもつ捕捉用 DNA プローブが固定されている。すなわち標的 DNA が存在すると、二つのプローブがハイブリダイズすることでテストラインに捕捉される。この結果、テストライン上での蛍光強度は、標的 DNA の濃度の対数に対して 1.0 fM~10 nM の範囲で直線的に増加し、検出限界は 0.4 fM であった。遺伝子増幅や検出側での酵素反応（例えば HRP を用いる反応）などの増幅法を一切適用しないものとしては、今のところ最高感度である。

2 次元クロマトグラフィーによる複数種同時定量

Kim らは敗血症の正確かつ迅速な診断のためのマーカーとなる C 反応性蛋白 (CRP)、プロカルシトニン (PCT) および乳酸を同時に定量できる LFA を開発した [7]。前者 2 つは、いわゆるサンドイッチ型イムノアッセイで検出され、乳酸は酵素反応が用いられる。本研究ではこれらの検出をひとつのプラットフォーム上で同時に行うため、図 4 のような LFA を考案した。コンジュゲートパッドと隣接するニトロセルロース膜の一部を鍵型に切り取り、周囲と隙間ができる大きさのセルロース膜が設置されている。ここには、乳酸オキシダーゼ (LOx)、ペルオキシダーゼ (HRP) および発色試薬としてのヨウ化カリウムが含まれている。乳酸を含む試料液が当該部分に流入すると、LOx 存在下における乳酸と溶存酸素の反応によって過酸化水素が生成し、さらに HRP 存在下でヨウ化物イオンが酸化されてヨウ素が生成して発色する。一方、それ以外の試料液は、毛管現象で鍵型に切り取られた部分の周囲を流れてテストラインに到達する。2 本のテ

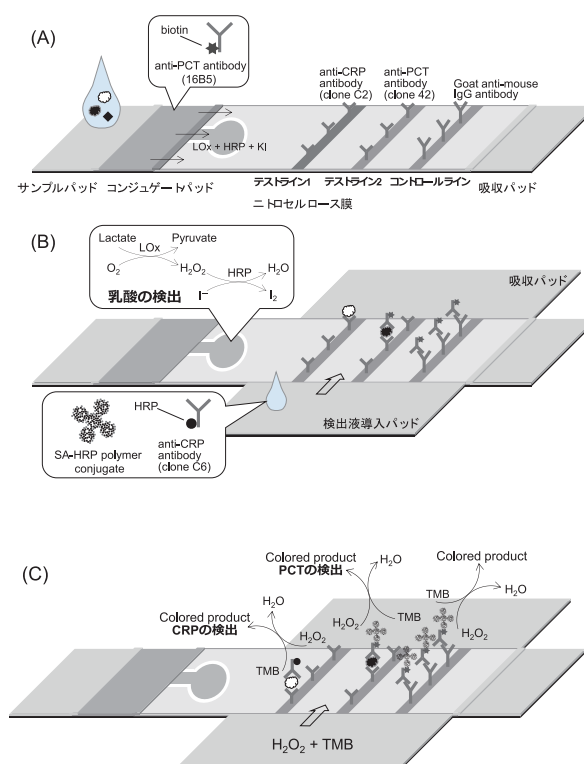


図 4 2 次元クロマトグラフィーによる乳酸, CRP, PCT の同時検出のための LFA[7], (A) 試料液導入, (B) SA-HRP および clone C6 の供給, (C) 過酸化水素と TMB の供給

ストラインのうち、上流側にはアンチ CRP 抗体(clone C2)、下流側にはアンチ PCT 抗体 (clone 42) がそれぞれ固定されている。コンジュゲートパッドには、ビオチンで標識された別のアンチ PCT 抗体 (16B5) が含浸されている。したがって CRP はコンジュゲートパッドをそのまま通過してテストライン 1 で捕捉され、PCT は二つのアンチ PCT 抗体で挟まれた状態でテストライン 2 で捕捉される。続いて、ニトロセルロース膜の横に新たに検出液導入パッドと吸収パッドを取り付け、図 4(B)の下側から HRP で標識された別のアンチ CRP 抗体 (clone C6) およびストレプトアビジン-Poly-HRP (SA-HRP) を供給する。前者はテストライン 1 に捕捉されている CRP と結合してサンドイッチ型を形成し、後者はテストライン 2 において、ビオチンを介してアンチ PCT 抗体と結合する。その後、引き続き図 4(C)の下側より過酸化水素と発色試薬である 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を供給することで増幅された発色反応を得る。この結果、CRP および PCT の濃度に依存してそれぞれのテストラインが着色する。着色強度はスマートフォンのカメラで撮影されたデジタル画像から解析され、敗血症診断に必要な濃度領域をカバーした同時定量分析が達成された。

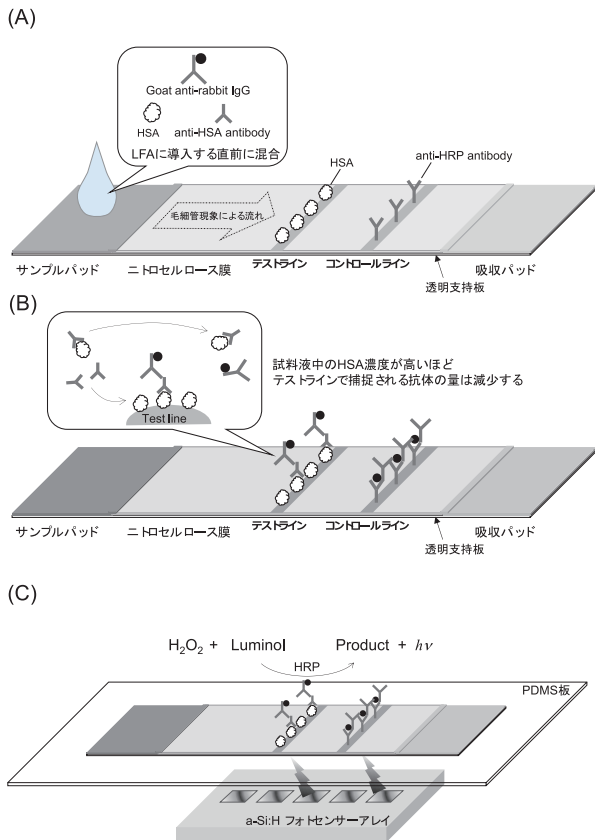


図5 化学発光検出を用いる LFA の概略 [9], (A) 試料導入, (B) ライン形成, (C) 化学発光の検出

化学発光検出によるヒト血清アルブミンの高感度検出

Zangheri らは、独自に開発した小型のアモルファスシリコンフォトセンサーアレイ [8]を用いる LFA-化学発光検出を報告した [9]。本法における LFA は、図 5 に示すように透明な基板上にニトロセルロース膜を設置し、その前後にそれぞれサンプルパッドと吸収パッドが設けられている。テストラインとコントロールラインにはそれぞれヒト血清アルブミン (HSA) およびアンチ HRP 抗体が固定されている。試料液は、LFA 導入の直前にアンチ HSA 抗体および HRP で標識されたアンチ IgG 抗体と混合する。試料液中の HSA は、これらの抗体と複合体を形成しながらニトロセルロース内を流れるので、テストラインではいわゆる競合法となり、もとの試料液中の HSA 濃度が高いほどテストラインで捕捉される HRP の量が減少する。また、過剰のアンチ IgG 抗体は HRP を介してコントロールラインで捕捉される。その後、これらのラインの部分に過酸化水素とルミノールを供給すると、各ラインで捕捉された HRP の量に応じた強度の化学発光が観測される。フォトセンサーアレイはこの LFA の直下に設置されており、テストラインとコントロールラインのそれ

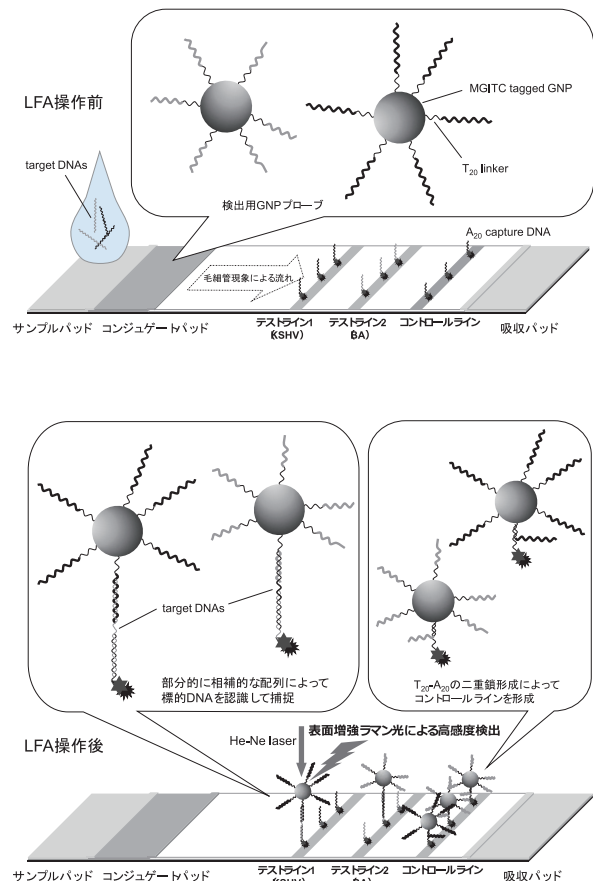


図6 LFA による標的 DNA の分離と表面増強ラマンによる高感度検出

ぞれで観測される発光強度の比を用いることで、ばらつきの少ない安定したデータを収録することができる。この結果、尿中 HSA の検出限界は 2.5 mg L^{-1} となり、上限 850 mg L^{-1} までの広いダイナミックレンジが達成された。なおこの濃度範囲は、健常者 (25 mg L^{-1} 以下)、微量アルブミン尿 ($25 \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$)、顕性アルブミン尿 (200 mg L^{-1} 以上) で検出される範囲をカバーしている。

表面増強ラマン散乱を用いる高感度 DNA 検出

Wang らは、カポジ肉腫 (KS) と細菌性血管腫症 (BA) を迅速に見極める診断のための高感度な LFA について報告している [10]。KS は、免疫力が極度に低下したヒトがカポジ肉腫関連ヘルペスウィルス (KSHV) に感染することで引き起こされる疾患である。BA はバルトネラ菌の感染によって引き起こされる疾患であるが、KS と症状がよく似ているためにしばしば区別が困難である。そこで本研究では、これらの原因となるウィルスや細菌の DNA を迅速に検出できる LFA の開発に取り組んだ。ここでは、マラカイトグリーンイソチオシアネート (MGITC) を吸

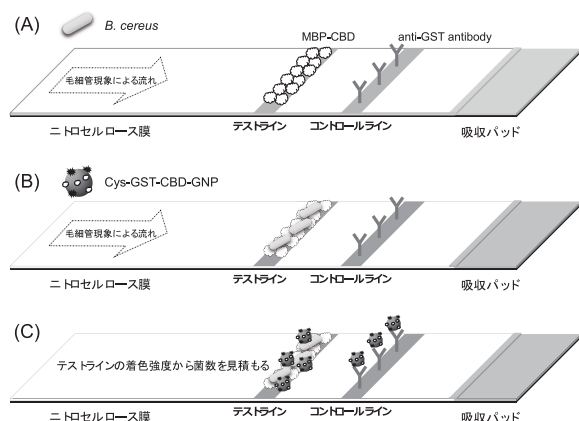


図 7 CBD を用いるセレウス菌検出のための LFA, (A) セレウス菌を含む試料液の導入, (B) Cys-GST-CBD-GNP 分散液の導入, (C) LFA 操作後の状態

着した GNP を指示物質とするサンドイッチ型の機構を採用している (図 6)。標的となる DNA に対して部分的に相補的な塩基配列構造に T_{20} のリンカー部分を追加したものをチオール修飾して GNP に結合させ、コンジュゲートパッドに含浸させる。テストラインには、標的 DNA の残りの部分とハイブリダイズできる配列を持った DNA がビオチン-ストレプトアビジン結合を介して固定されている。これらを KSHV および BA のそれぞれに対して作製しておき、標的 DNA が流入すると、コンジュゲートパッドから放出された検出用の DNA とハイブリダイズして、さらに 2 つのテストラインでそれぞれの標的 DNA の残りの部分が認識されて捕捉される仕組みである。なお、コントロールラインには、検出用 DNA の T_{20} のリンカー部分と結合できる A_{20} の配列を持った DNA が固定されており、テストラインを通過した GNP はここで捕捉される。本研究ではさらに、このテストラインにおける 632.8 nm の He-Ne レーザーを光源としたときの表面増強ラマン散乱の強度 (ラマンシフト 1617 cm^{-1}) から、標的 DNA の濃度を見積もった。その結果、KSHV、BA それぞれの検出限界は 0.043 , 0.074 pM となり、従来の GNP の凝集に伴う着色で測定する手法に比べ約 10000 倍優れた感度で測定できた。本法は特に検査機器に乏しい場所での迅速な診断に有用であると著者らは記している。

細胞壁結合ドメインを用いるセレウス菌の直接検出

バクテリアや菌の検出は、抽出した DNA を PCR 等で増幅したのちに、標的の DNA を検出することが一般的である。これに対して Kong らは、細菌から発現した細胞壁結合ドメイン (CBD) をプローブとして用いる LFA を提

案している [11]。本研究では、セレウス菌 (*B. cereus*) を直接サンドイッチ型で捕捉・検出することをモデルケースとして、その性能について調査した。図 7 に示すように、マルトース結合タンパク質 (MBP) でタグ付けされた CBD を捕捉用分子としてテストラインに固定し、検出用分子にはシステイン-グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (Cys-GST) でタグ付けされた CBD を用い、これを指示物質である GNP に付加して Cys-GST-CBD-GNP とした。この GNP 複合体は、システインに含まれるチオール基と金との結合によって容易に形成される。作製したニトロセルロース膜の一端を試料液に 10 分間浸すことで毛細管現象によってセレウス菌を含む試料を導入し、続いて GNP 分散液に 7 分間浸したのちにテストラインの着色を観察した。着色強度は画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて評価した。その結果、 10^4 cfu/mL 以上においてセレウス菌の濃度とシグナル強度との間で良好な相関関係が得られた。ここで重要なことは、PCR や酵素反応による増幅を使うことなく優れた感度で検出できたことである。この際、テストラインにおいて CBD の単体ではなく、MPB でタグ付けされた CBD を使用することによって感度が 100 倍向上した点は興味深い発見である。

おわりに

本稿は、LFA に関するごく最近に出版された論文をピックアップして話題提供とした。試料を採取した現場において簡単な操作で結果がすぐに分かるという LFA 本来の長所を活かしつつ、実際のニーズに対応した複数種のアナライトの「同時検出」や「高感度検出」という性能も大きく進歩している。特に、検出における小型の外部機器との連携は、LFA の簡便性とあいまって今後さらに重要になると思われる。また、セレウス菌の検出の例に見るように、様々な物質の結合特異性に着目することで、LFA で直接検出できる対象が拡大している点も特筆すべきことである。LFA は様々な測定ニーズ柔軟に対応できる技術である。今後も大いに発展が期待できる。

参考文献

- [1] N. Ying, C. Ju, Z. Li, W. Liu, J. Wan: *Talanta*, **164**, 432 (2017).
- [2] N. Cheng, Y. Shang, Y. Xu, L. Zhang, Y. Luo, K. Huang, W. Xu: *Biosens. Bioelectron.*, **91**, 408 (2017).
- [3] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase: *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 (2000). 栄研化学(株)の HP にて LAMP の原理が解説されている。

<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>

- [4] H. Xu, J. Chen, J. Birrenkott, J. X. Zhao, S. Takalkar, K. Baryeh, G. Liu: *Anal. Chem.*, **86**, 7351 (2014).
- [5] Y. Yang, M. Ozsoz, G. Liu: *Microchim. Acta*, **184**, 2023 (2017).
- [6] S. Takalkar, K. Baryeh, G. Liu: *Biosens. Bioelectron.*, **98**, 147 (2017).
- [7] S.-W. Kim, I.-H. Cho, G.-S. Lim, G.-N. Park, S.-H. Paek: *Biosens. Bioelectron.*, **98**, 7 (2017).
- [8] M. Zangheri, M. Mirasoli, A. Nascetti, D. Caputo, F. Bonvicini, G. Gallinella, G. de Cesare, A. Roda: *Sens. Biosens. Res.*, **7**, 127 (2016).
- [9] M. Zangheri, F. D. Nardo, M. Mirasoli, L. Anfossi, A. Nascetti, D. Caputo, G. D. Cesare, M. Guardigli, C. Baggiani, A. Roda: *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 8869 (2016).
- [10] X. Wang, N. Choi, Z. Cheng, J. Ko, L. Chen, J. Choo: *Anal. Chem.*, **89**, 1163 (2017).
- [11] M. Kong, J. H. Shin, S. Heu, J.-K. Park, S. Ryu: *Biosens. Bioelectron.*, **96**, 173 (2017).