

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05540

研究課題名(和文) 表面プラズモン励起増強蛍光を用いたピペットチップ型腫瘍マーカーイムノセンサの構築

研究課題名(英文) Construction of a Pipette Tip Tumor Marker Immunosensor with a Plasmonic chip based a Surface Plasmon Enhanced Fluorescence detection

研究代表者

高野 恵里 (Takano, Eri)

神戸大学・工学研究科・学術研究員

研究者番号：20634645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、波長オーダーの周期構造を構築して表面プラズモン励起蛍光増強現象(SPF)を利用できる表面に変換した、格子結合型プラズモニック微小反応板を創製した。この微小反応板を内部に組み込むようデザインされたピペットチップを用いて反応・吸着・洗浄・蛍光測定までを自動で行う「ピペットチップ型腫瘍マーカーイムノセンサ」を構築した。このセンシングシステムによりサンドイッチアッセイを行ったところ、1試料20分以内でサブng/mLの標的腫瘍マーカーの検出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：A plasmonic chip base on grating-coupled surface plasmon field-enhanced fluorescence was prepared for the detection of tumor markers. A pipette tip-type immunosensor for tumor markers was constructed using the plasmonic chip, which was comprised of an automatic liquid handling system with fluorescence detection and a pipette tip designed to incorporate the plasmonic chip inside. A sandwich assay using this sensing system resulted in the detection of sub ng / mL target tumor markers within 20 minutes per a sample.

研究分野：生体関連化学

キーワード：イムノセンサ 腫瘍マーカー 表面プラズモン励起増強蛍光 サンドイッチアッセイ

1. 研究開始当初の背景

疾病の早期診断や少量検体での検査では、低濃度領域まで精度よく高感度に測定可能なバイオセンシング技術が必要である。現在、バイオマーカーの検出方法として Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)法が主に用いられているが、試料の分注・洗浄をピペッターの先端チップを交換しながら繰り返し行うため、煩雑な作業が多く時間を要する上に廃棄物も多い。この問題を解決し、省資源・省時間を可能とした分析システムを実現するために、分子認識素子(抗体等)を固定化した微小反応板を内部に組み込めるようデザインされたピペットチップ(反応板内蔵チップ)を考案した。蛍光検出用の光源と検出器を機見込んだロボット型自動分注装置を構築し、この反応板内蔵チップを用いて反応・吸着・洗浄・蛍光測定までを自動で行うことができ、かつ標的マーカーを高感度に検出可能な「ピペットチップ型腫瘍マーカーイムノセンサ」が実現できれば、熟練技術者以外でも操作でき、臨床現場即時検査が可能な簡便で迅速な汎用性の高いセンシングシステムになると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、表面プラズモン励起による蛍光増強可能な波長オーダーの周期構造をもつ格子結合型プラズモニク微小反応板を内部に組み込むようデザインされたピペットチップ(SPF-反応板内蔵チップ)を用いて、反応・吸着・洗浄・蛍光測定までを自動で行う「ピペットチップ型腫瘍マーカーイムノセンサ」を構築する。腫瘍マーカーを補足するための抗体を、プラズモニク微小反応板上に配向性よく高密度で固定化する。最終的に、サブ ng/mL オーダーの腫瘍マーカーを簡便な操作で検出できるよう最適化し、小規模医療現場での臨床現場即時検査に要求される少量異種検体検出用小型・迅速腫瘍マーカーイムノセンシングシステムを実現する。

3. 研究の方法

本研究では、サブ ng/mL オーダーの腫瘍マーカーを簡便な操作で検出できるよう、1. 抗体固定化方法とサンドイッチアッセイ条件の最適化、2. 検出用蛍光ラベル化抗体の最適化、3. 自動化工程の最適化、4. プラズモニクチップ微小反応版による腫瘍マーカーの検出、の4項目について検討を行った。

(1) プラズモニク微小反応版の調整

ナノインプリント用モールドにて、光インプリント法により微小反応版表面上に二次元周期構造を作製した。この微小反応版上にプラズモン励起用金属として Ag、保護層として SiO₂ を成膜し、プラズモニク微小反応版を得た。得られたプラズモニク微小反応版の表面構造は原子間力顕微鏡(AFM)にて観察した。

(2) 腫瘍マーカーのサンドイッチアッセイ

微小反応版を装着した反応内蔵チップを用い、蛍光検出のための光源を組み込んだロボット型自動分注装置(図1)にてサンドイッチアッセイを行った。以下に示すシーケンスを組み、自動分注装置にて蛍光測定を行った。

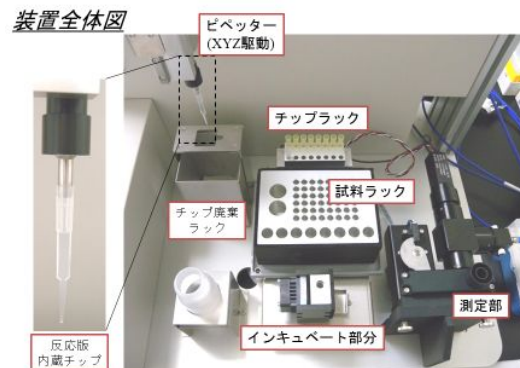


図1. ロボット型自動分注装置

アッセイ用シーケンス

PBS を 150 μ L 吸引しベースの蛍光強度を測定 (I_0)

2 wt% Skim milk PBSを100 μ L吸引して反応させプロッキング処理

0.05 wt% tween20 PBSで150 μ L \times 4回洗浄

補足抗体溶液(PBS)を100 μ L吸引して反応

0.05 wt% tween20 PBSで150 μ L \times 4回洗浄

腫瘍マーカータンパク質溶液を100 μ L吸引して反応

0.05 wt% tween20 PBSで150 μ L \times 4回洗浄

検出抗体溶液(PBS)を100 μ L吸引して反応

0.05 wt% tween20 PBSで150 μ L \times 4回洗浄

蛍光ラベル化2次抗体溶液(1.5wt% BSA

含有PBS)を100 μ L吸引して反応

0.05 wt% tween20 PBSで150 μ L \times 2回洗浄

PBSで150 μ L \times 2回洗浄

PBS 150 μ L を吸引し蛍光測定 / (I)

それぞれ測定基板ごとに、蛍光強度増加分 F は $F=I-I_0$ として求めた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍マーカーのサンドイッチアッセイ

腫瘍マーカー補足抗体の基板への固定化方法の検討

腫瘍マーカー補足抗体の基板への固定化方法として、共有結合による固定化(直接固定化)、プロテイン A を介して固定化、バイオナノカプセル(BNC)を介して固定化した場合について検討した。モデル系として前立腺特異抗原(PSA)を標的腫瘍マーカーとし、金スパッタ反応版上に末端にアミノ基をもつ自己組織化単分子膜を形成させた。両末端に活性エステルを持つ試薬と反応させ、補足抗

体あるいはプロテイン A を基板上に固定化した。バイオナノカプセルの場合については、金スパッタ反応板上に直接物理吸着させた。この反応板を反応内蔵チップに装着し、シーケンスに従いサンドイッチアッセイを行った。アッセイにおける反応時間は、ブロッキング処理(10分)、補足抗体固定化(30分/直接固定化以外)、腫瘍マーカー吸着(60分)、検出抗体吸着(30分)、蛍光ラベル化 2 次抗体吸着(30分)とした。蛍光色素は Alexa647 でラベル化された抗体を用いた。

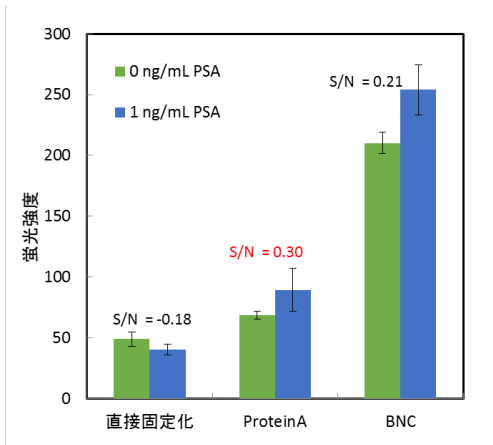


図 2 . 異なる補足抗体固定化方法によるサンドイッチアッセイの結果

異なる方法で補足抗体を固定化した反応板を用いてサンドイッチアッセイを行ったところ(図 2)、直接 PSA 捕捉抗体を固定化した場合には、腫瘍マーカーの濃度が 0 ng/mL の時と 1 ng/mL との蛍光強度に差は見られず、1 ng/mL の PSA を検出することはできなかった。プロテイン A あるいは BNC を介した場合には、蛍光強度に差異が見られ、1 ng/mL の PSA が検出可能であることが示された。BNC を介した場合、最も蛍光強度が高い結果であったが、S/N 比を比較するとプロテイン A を介した場合が最も高くなった。

蛍光ラベル化 2 次抗体の検討

蛍光検出のための蛍光標識 2 次抗体の種類について、抗体の Fc 領域が非特異的吸着に関与している可能性を検討するために、Fc 領域のない Fab フラグメントおよび F(ab')₂ フラグメントを用いて検出を行った。



図 3 . 検出用抗体の種類

1ng/mL の PSA 濃度において、whole IgG と比較し、Fab フラグメントおよび F(ab')₂ フラグメントでは全体的な蛍光強度は減少したものの、非特異吸着が抑えられてバックグラウンドが減少した結果、S/N 比が高くなった(図 4)。

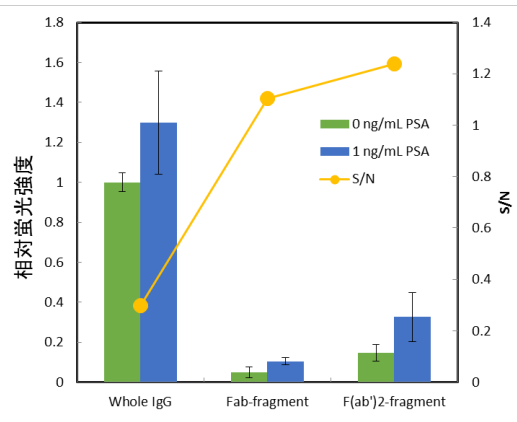


図 4 . 異なる蛍光ラベル化 2 次抗体によるサンドイッチアッセイの結果

自動化工程の最適化(測定時間の短縮)

	短縮前 インキュベーション時間	短縮後 吸引吐出回数(時間)
ブロッキング	10分	5回(約1分)
捕捉抗体固定化	30分	5回(約1分)
腫瘍マーカー捕捉	60分	10回(約2分)
検出抗体によるサンドイッチ形成	30分	5回(約1分)
蛍光標識 2 次抗体の結合	30分	5回(約1分)
インキュベーション総時間	200分	約6分

表 1 . インキュベーション時間比較表

インキュベーションの方法を、試料を吸引した状態で静置する方法から試料の吸引・吐出という方法に変更し、測定時間短縮について検討した(表 1)。短縮前と比較し短縮後は蛍光強度の値は大幅に下がったものの、0 ng/mL での蛍光強度を 1 として相対蛍光強度を比較すると、短縮前後でほぼ同じであった(図 5)。

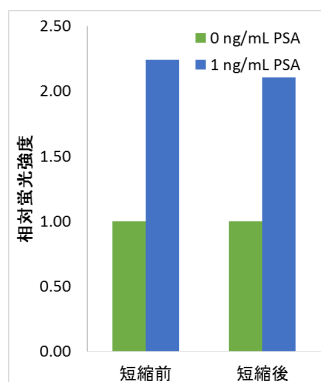


図 5 . インキュベーション時間短縮前後における相対蛍光強度

(2) プラズモニクチップ微小反応版による腫瘍マーカーの検出

プラズモニク微小反応版の調整

微小反応版表面上に二次元周期構造を作製したレプリカ、及び、プラズモン励起用金属としてAg、保護層としてSiO₂を成膜したプラズモニク微小反応版の表面構造を原子間力顕微鏡(AFM)にて観察した。AFM像より、微小反応版上に周期約500nmの二次元周期構造が作成できたことを確認した。

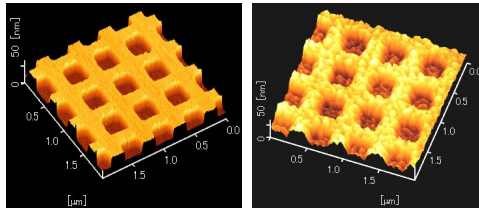


図 6. 微小反応版の AFM 画像(左:レプリカ 右:Ag/SiO₂スパッタ後)

周期構造による蛍光増強効果の確認

標的腫瘍マーカーを肝がんの腫瘍マーカーである α -fetoprotein(AFP)とし、プラズモニク微小反応版上に共有結合にてAFP補足抗体を固定化した。その後、0あるいは1ng/mLのAFP溶液(1mg/mL BSA含有PBS)と60分反応・洗浄後にAlexa647ラベル化抗AFP抗体を吸着(30分)させ、反応版上の蛍光強度を蛍光顕微鏡にて観察したところ、AFPが1ng/mLの時の周期構造内のみ蛍光シグナルが強く観察され(図6,7)、反応版表面上に二次元周期構造を作製することで蛍光シグナルが増強されることを確認した。

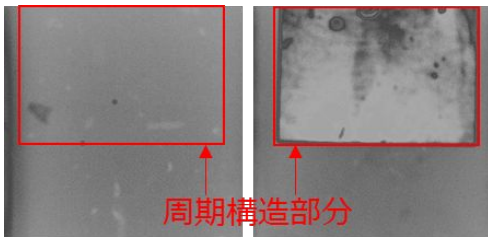


図 7. AFP 吸着後の微小反応版の蛍光顕微鏡画像(左:0 ng/mL AFP 右:1 ng/mL AFP)

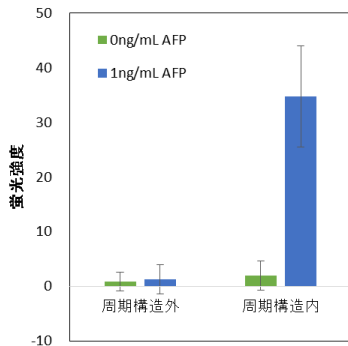


図 8. AFP 吸着後の微小反応版の蛍光強度 (n=3)

プラズモニクチップ微小反応版によるヒト血清中の腫瘍マーカーの検出

(1)にて最適化したサンドイッチアッセイ条件にて、プラズモニクチップ微小反応版によるヒト血清中の腫瘍マーカーの検出を行った。

プラズモニク微小反応版上にシランカップリング剤にてアミノ基を導入後、両末端活性エステル試薬を用いてプロテインAを固定化した。この反応版を反応内蔵チップに装着し、AFP濃度が0、0.1、1ng/mLとなるよう100%ヒト血清中に添加したサンプルを用いて、シーケンスに従いサンドイッチアッセイを行った。周期構造がない場合については0.1ng/mLのAFPは検出できなかったが、周期構造がある場合についてはAFP濃度の増加とともに蛍光強度は増加し、ヒト血清中においても0.1ng/mLのAFPが検出可能であった(図9)。

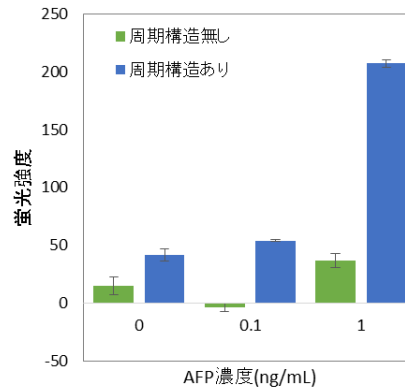


図 9. プラズモニクチップ微小反応版によるヒト血清中AFPサンドイッチアッセイ

以上の結果より、SPF-反応内蔵チップを用いたピペットチップ型腫瘍マーカーイムノセンサにより、1試料20分以内で0.1ng/mLの標的腫瘍マーカーの検出が可能であることがわかった。本システムは、Point of Care Testing(POCT)に要求される少量異種検体検出用小型・迅速バイオセンシングシステムのすべてを満たしていることから、今後ますます重要性が高まってくると考えられる小規模医療現場での迅速な検査が可能となり、POCTへの応用が期待されるほか、早期診断技術の基礎研究の推進にも貢献でき、社会に対する波及効果は高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Takano, E., Shimura, N., Akiba, T., Kitayama, Y., Sunayama, H., Abe, K., Ikebukuro, Takeuchi, T. Pipette tip biosensors for bacterial double-stranded DNA using bioluminescence induced by

zinc finger luciferase, *Microchim. Acta* 2017, 184 (6), 1595-1601. 査読有
DOI: 10.1007/s00604-017-2152-0
Murase, N., Taniguchi, S., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Molecularly Imprinted Nanocavity-Based Fluorescence Polarization Assay Platform for Cortisol Sensing, *J. Mater. Chem. B* 2016, 4, 1770-1777. 査読有
DOI: 10.1039/c5tb02069g.
Yoshizawa, S., Kuwata, T., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Transcription-Type Protein Imprinted Polymers for SPR Sensing Prepared Using Target-immobilized Stamps based on Submicrometer-Sized Particles via Biotin-Avidin Linkage, *Molecular Imprinting* 2016, 3, 26-34. 査読有
DOI 10.1515/molim-2015-0007
Kuwata, T., Uchida, A., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T. Molecularly imprinted polymer arrays as synthetic protein chips prepared by transcription-type molecular imprinting by use of protein-immobilized dots as stamps. *Anal. Chem.* 2015, 87, 11784-11791. 査読有
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03134

〔学会発表〕(計 20 件)

高野 恵里、志村 宣明、竹内 俊文
微小基板内蔵ピペットチップ型自動イムノセンシングシステムによるバイオマーカータンパク質の蛍光検出、応用物理学会第 65 回春季学術講演会、2018
高野 恵里、志村 宣明、竹内 俊文
微小基板内蔵ピペットチップ型自動イムノセンシングシステムによる腫瘍マーカーの高感度検出、第 28 回クロマトグラフィー科学会議、2017
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
微小基板内蔵ピペットチップ型自動イムノセンシングシステムによる腫瘍マーカーの高感度検出、第 66 回日本分析化学会年会、2017
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
センシング基板を内蔵可能なピペットチップ型自動バイオセンシングシステムによる腫瘍マーカーの蛍光検出、第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム、2017
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
ピペットチップ型自動イムノセンシングシステムによるバイオマーカータンパク質の蛍光検出、第 77 回分析化学討論会、2017
松浦 亮、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、田和 圭子、竹内 俊文

分子インプリントポリマー修飾格子結合型プラズモニクチップによるタンパク質の表面プラズモン励起増強蛍光センシング、化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 35 回研究会、2017
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
ピペットチップ型蛍光イムノセンシングシステムによる腫瘍マーカーの高感度蛍光検出、日本化学会第 97 春季年会、2017
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
微小基板内蔵ピペットチップ型自動バイオセンシングシステムによるバイオマーカータンパク質の高感度検出、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017
竹内 俊文、北山 雄己哉、高野 恵里、松本 大樹
がんマーカーセンシングのための微小反応板内蔵ピペットチップ型バイオセンサシステム、工学フォーラム 2016、2016
高野 恵里、志村 宣明、秋場 猛、竹内 俊文
がんマーカーセンシングのための微小反応板内蔵ピペットチップ型バイオセンサシステム、第 27 回クロマトグラフィー科学会議、2016
松浦 亮、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、田和 圭子、竹内 俊文
分子インプリントポリマーを認識素子とするタンパク質の格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光検出、分析化学会第 65 回年会、2016
Matsuura, R., Takano, E., Tawa, K., Kitayama, Y., Takeuchi T.
Fluorescence sensing of proteins using surface plasmon excitation enhancing chips grafted by artificial polymeric receptors, The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), 2016
松浦 亮、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、田和 圭子、竹内 俊文
特異的高分子リガンドを用いた炎症マーカーの格子結合表面プラズモン増強蛍光センシング、第 23 回クロマトシンポジウム、2016
高野 恵里、竹内 俊文
抗体配向固定化微小反応板を内蔵したピペットチップによる腫瘍マーカーの蛍光バイオセンシング、第 76 回分析化学討論会、2016
松浦 亮、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、田和 圭子、竹内 俊文
格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光を用いた分子インプリントポリマーによるタンパク質センシング、第 65 回高分子学会年次大会、2016
松浦 亮、高野 恵里、田和 圭子、砂山 博

文、北山 雄己哉、竹内 俊文
分子インプリントポリマー修飾プラズモ
ニックチップによるヒト血清アルブミン
の高感度プラズモニクセンシング、第
63回応用物理学会春季学術講演会、2016
Takano, E., Shimura, N., Ikebukuro, K.,
Takeuchi, T.

Development of pipette tip-type biosensor
for automated bioluminescence detection of
target genes in pathogens, Pacifichem2015,
2015

高野 恵里、竹内 俊文

抗体を配向固定化した金基板を組み込んだ
ピペットチップ型自動がん腫瘍マーカ
ーアッセイシステムの構築、第26回クロ
マトグラフィー科学会議、2015

高野 恵里、竹内 俊文

抗体を配向固定化した免疫反応場を用
いたピペットチップ型自動アッセイシ
ステムによるバイオマーカーの蛍光検
出、第64回分析化学学会年会、2015

高野 恵里、志村 宣明、北山 雄己哉、
竹内 俊文

免疫反応場を組み込んだピペットチッ
プ型自動腫瘍マーカーアッセイ法の開
発、第75回分析化学討論会、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 恵里 (TAKANO, Eri)

神戸大学・大学院工学研究科・学術研究員

研究者番号： 20634645

(2) 研究分担者

田和 圭子 (TAWA, Keiko)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号： 80344109