

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560731

研究課題名(和文) 界面活性剤によるイムノクロマト法の高感度化

研究課題名(英文) Development of highly sensitive immunochromato method using surfactant

研究代表者

永谷 尚紀(NAGATANI NAOKI)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：90351072

研究成果の概要(和文)：イムノクロマト法は、妊娠診断薬、インフルエンザの簡易検査として広く用いられている、簡便なバイオセンサーの一つである。イムノクロマト法の検出感度を向上させるため、界面活性剤を含んだ希釈液を用いて検討を行った。その結果、3～5%(wt)程度の非イオン性界面活性剤を用いることによって、ストレスマーカーであるだ液中の s-IgA (分泌型免疫グロブリン A)、インフルエンザウイルスが高感度に検出できた。

研究成果の概要(英文)：Immunochromato method that is in widespread use for pregnancy and influenza diagnosis is one of the promising tools for the development of easy-handling biosensors. To improve the detection sensitivity of the Immunochromato method were examined using a diluted solution containing surfactant. As a result, s-IgA (secretory immunoglobulin A) in saliva that was the stress marker and the influenza virus could be detected in high sensitivity by using a diluted solution containing 3~5%(wt) nonionic surfactant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：バイオテクノロジー、生物・生体工学、免疫学、反応・分離工学

キーワード：バイオセンサー、イムノクロマト法

1. 研究開始当初の背景

被検物質の測定法として抗原-抗体反応を利用した測定手法がある。抗体の特異性を利用することで残留農薬、病原性大腸菌、食品中のアレルゲン、インフルエンザウイルス、癌診断マーカー、妊娠診断と環境、食品、医療と様々な分野で利用されている。測定手法としては酵素免疫測定法(ELISA)、イムノクロマト法などが、既に広く利用されている測定技術である。イムノクロマト法は測定機

器を必要とせず目視で被検物質を検出が出来る簡便な方法であるが、測定感度が ELISA に比べ測定感度の点で劣る問題点がある。

申請者は、だ液中のストレスマーカーである分泌型免疫グロブリン A (s-IgA) をイムノクロマト法で測定する場合、1 - 25 %の高濃度の非イオン界面活性剤を用いることで高感度に s-IgA が検出可能であることを見いだした。ELISA で用いる非特異的な結合を除く洗浄液には、0.05 - 0.3 %程度の濃度で界面活性剤が含まれ

ているが、洗浄が主な目的である。イムノクロマト法に1 - 25 %以上の濃度の界面活性剤を使用することによって高感度に測定できる可能性があることが分かった。

2. 研究の目的

界面活性剤への抗原・抗体反応への影響を調べるとともに、高感度で実サンプルが検出可能なイムノクロマト法を検討する。これらの結果を検討し、イムノクロマト法に用いる界面活性剤濃度と実サンプルの関係を最適化し、高感度に食品中の病原菌を検出できるイムノクロマト法を作製することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種界面活性剤が様々な濃度で含まれている希釈液を用いて、実サンプル (s-IgA、IgE、インフルエンザ、大腸菌、ウェルシュ菌) を希釈した場合のイムノクロマト法での検出感度に関して検証を行った。

(2) 界面活性の抗原-抗体反応への影響を調べるために表面プラズモン共鳴を利用した BIACORE®で界面活性剤が、含まれている溶液中での抗原-抗体反応の結合の強さ、選択性の測定を行った。さらに、界面活性剤の種類によるタンパク質の影響を調べるために CD (円二色性) によってヘモグロビンの構造変化を調べた。

(3) 病原菌の高感度検出を実現するために、大腸菌に特異的な遺伝子を増幅 (Polymerase chain reaction) し、イムノクロマト法での検出を行った。

4. 研究成果

(1) 界面活性剤を用いた高感度測定

だ液中のヘモグロビン、s-IgA、血清中のIgEは、非イオン性界面活性剤を用いることによって高感度に測定が可能であることが分かった。ヘモグロビンを各種濃度の異なる界面活性剤 (Tween 20) が含まれた希釈溶液で50ng/mLに調製し、イムノクロマト法で検出を行ったところ、s-IgA同様に界面活性剤濃度が濃くなると、テストライン、コントロールラインが濃くなり高感度に検出が可能であることが分かった (図1)。

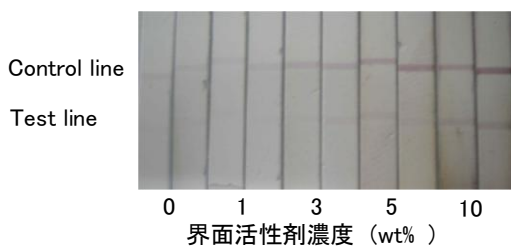


図1 界面活性剤を用いたヘモグロビンの検出

また、テストラインの濃さを画像解析によって測定したところ、界面活性剤を加えない場合に比べ、3% (wt) の界面活性剤を含んだ希釈液で調製した場合には、2倍以上濃くテストラインが表れることが分かった (図2)。ヘモグロビンは、潜血のマーカーであり、界面活性剤を含んだ希釈液で尿、便を希釈し、イムノクロマト法で検査することによって、尿、便中の血液を高感度に検出できる可能性がある。

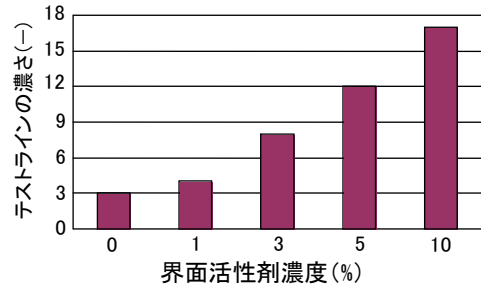


図2 界面活性剤を用いたヘモグロビン検出 (テストラインの濃さ)

次に、花粉アレルギーのマーカーとなる IgE の検出を界面活性剤 (Tween 20) が2.5%含まれた展開液を用いて行った。花粉アレルギーのマーカーとなる IgE の検出は、コンジュゲートパッドにビオチン化アレルゲン (花粉) と金ナノ粒子標識抗 IgE 抗体を乾燥配置し、テストラインに抗ビオチン抗体、コントロールラインに抗 IgG 抗体を固定したイムノクロマトテストストリップを作製し検出を行った (図3)。アレルゲンと反応する IgE がある場合、テストライン上でアレルゲンと共に捕らえられ、金ナノ粒子標識抗 IgE 抗体が集積し、赤色のラインが見えることになる。

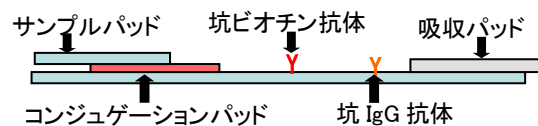
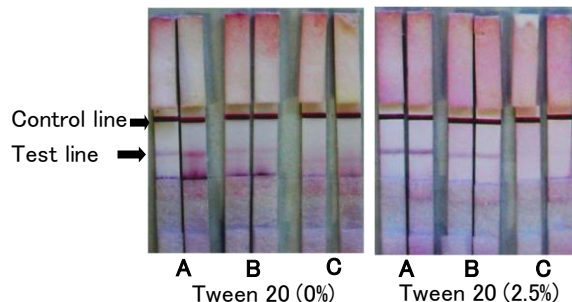


図3 IgE 検出用イムノクロマトテストストリップ

花粉症の症状の異なる3人から提供された血清20μLをサンプルパッドに滴下し、その後、50μLの展開液を更に滴下して検出を行った。



A:花粉症 大、B:花粉症 中、C:花粉症 無

図4 界面活性剤を用いた IgE 検出

その結果、界面活性剤 (Tween 20) を 2.5% 含んだ展開液を用いた方が、テストラインが濃く現れ、花粉症のマーカーとなる IgE の検出が高感度にできることが分かった (図 4)。

更に、インフルエンザウイルスの検出を界面活性剤 (Tween 20) が含まれた希釈液と含まれていない希釈液での検討を行った。インフルエンザウイルスを界面活性剤が含まれている希釈溶液、含まれていない希釈液で濃度 (50ng/mL) に調製した。イムノクロマト法で検出を行ったところ、Tween 20 を 5% (wt) 含んだ希釈液の方は、3 分弱でテストラインが目視で確認でき、Tween 20 が含まれていない希釈液では、テストラインが目視で確認できるまでに 7 分を要した。(表 1、図 5)。

表 1 インフルエンザ検出

	目視でラインが確認できる時間
Tween 20 (5%)	2 分 55 秒
Tween 20 (0%)	7 分

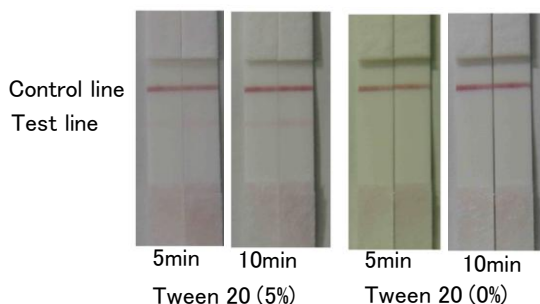


図 5 界面活性剤を用いたインフルエンザの検出

Tween 20 を 5% 含んだ希釈液の場合、短時間でインフルエンザウイルスの検出が可能であるが、30 分以上放置した場合、インフルエンザウイルスを含まないネガティブコントロールでもテストラインに極めて薄くテストラインが現れることが分かった。この問題は、検査時間を指定することで解決できる。実際、市販の酵素の発色によるインフルエンザ検査用イムノクロマトテストストリップも検査時間を指定し、それ以降の発色は、ネガティブ (インフルエンザウイルス無し) とすることとなっている。

次に、大腸菌、ウェルシュ菌のイムノクロマトテストストリップを作製し、界面活性剤を含んだ希釈液で検出を行ったが、界面活性剤を含んでいない希釈液よりは、検出感度が向上するが高感度に検出と言える結果には、ならなかった。s-IgA、ヘモグロビン、インフルエンザの検出では、界面活性剤を使わなくともある程度の検出感度が得られていたが、大腸菌、ウェルシュ菌は、元の検出感度が悪く、元の抗体の抗原に対する特異性が高くないと界面活性剤による効果は、それほど期待できないことが分かった。

(2) 界面活性の抗原-抗体反応への影響

イムノクロマト法の展開液として界面活性剤 (Tween 20) を用いることによって高感度の測定が、なぜ可能であるかを確認するために、Tween 20 を含んだ溶液での抗原-抗体の結合量を IgA で検証した。Tween20 を 3 wt%、7 wt% 含む希釈溶液で IgA を希釈し、抗原の抗体への結合量を Biacore で測定したところ、Tween 20 の濃度に従い結合量も増加することが分かった (表 2)。

表 2 Tween 20 濃度による IgA 結合量

Tween20 濃度 (wt%)	結合量 (RU)
0	0
3	21.3
7	54.5

また、通常は、結合しないイヌの IgA も Tween 20 の濃度に従い結合するようになることも分かった (表 3)。

表 3 Tween 20 濃度による IgA 結合量

Tween20 濃度 (wt%)	結合量 (RU)
0	376.6
3	487.9
7	760.9

これらの結果から、Tween 20 を希釈液、展開液に含めると抗体の特異性が低下し、非特異的な結合を引き起こしていることが推察できる。実際、5% (wt) 以上の Tween 20 を含んだ希釈液で s-IgA、インフルエンザを測定した場合、抗原がなくとも金ナノ粒子が集積し、テストラインに赤いラインが現れる。通常、ELISA などの抗原-抗体反応を用いた測定では、抗体の特異性が高いほど検出感度も高く、特異性が低い場合は、検出感度は低下する。しかしながら、イムノクロマト法の場合、金ナノ粒子がある程度集積しなければ、検出できないという特性があり、特異性が少し低下したことによって、目視で確認が出来ない程度の金ナノ粒子が、Tween 20 による特異性の僅かな低下によって集積していると考えられる。これらの結果より、高感度になる原因は、目視では確認出来ないバックグラウンドを上昇させているためであると考えられる。

Tween 20 の様な非イオン性の界面活性剤を用いた場合には、検出感度の向上が見られたが、イオン性の界面活性剤では、イムノクロマト法での検出感度が低下した。そこで、界面活性剤が抗原 (タンパク質) に与える影響を調べるために、5% (wt) の SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液と Tween 20 溶液でヘモグロビンを希釈して、CD にてタンパク質の二次構造に変化を検証した。Tween 20 が 5% (wt) 含まれた希釈液で調製した場合には、純水で調製した場合の CD スペクトルとほぼ同一であり、タンパク質の二次構造の変化が無いことが分かった (図 6)。しかしながら、5% (wt) の SDS 溶液を用いて調製した場合、CD スペクトルの違いが見られ、二次

構造が変化していると考えられる (図 6)。Tween 20 の様な非イオン性界面活性剤では、タンパク質の二次構造は変化しないことが分かった。

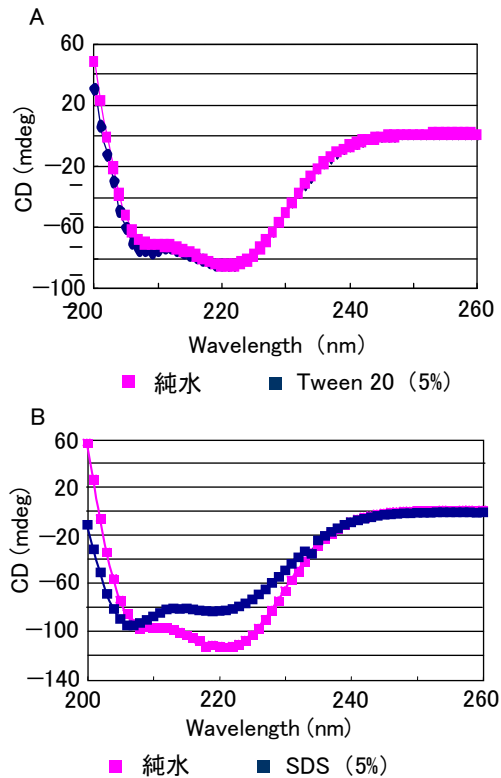


図 6 界面活性剤によるタンパク質への影響

(3) 病原菌の高感度検出

界面活性剤を用いる高感度法では、病原菌 (大腸菌、ウェルシュ菌) に対する抗体の特異性が低く、目的とするイムノクロマト法での高感度検出が達成できなかった。

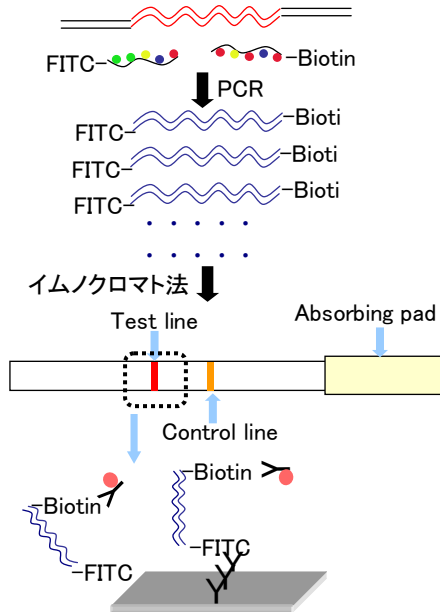


図 7 増幅遺伝子検出原理

そこで、イムノクロマト法での病原菌の高感度検出を達成するために遺伝子増幅 (PCR) で増幅した遺伝子をイムノクロマト法で検出する方法の検討を行った。

増幅遺伝子の検出方法は、ターゲットとなる遺伝子配列を認識する FITC (fluorescein isothiocyanate)、Biotin で標識したプライマーを用いて遺伝子増幅を行い、増幅された遺伝子を金ナノ粒子標識抗 Biotin 抗体と反応させ、テストラインに抗 FITC 抗体を固定したイムノクロマトとテストストリップで検出する方法である (図 7)。

大腸菌では、16srRNA をウェルシュ菌では、 α 毒素の N-terminal domain を認識する FITC、Biotin 標識プライマーで遺伝子増幅を行った。増幅遺伝子を電気泳動法にて確認を行ったところ、大腸菌では 544bp、ウェルシュ菌では 222bp の大きさの遺伝子の増幅が確認でき、ターゲットとなる遺伝子配列を認識し増幅していることが、確認できた。

増幅遺伝子を金ナノ粒子標識抗 Biotin 抗体と反応させ、イムノクロマト法にて検出を行ったところ、病原菌 (大腸菌、ウェルシュ菌) を入れ電気泳動法で遺伝子増幅が確認できた場合には、テストラインに赤色のラインが現れ、病原菌を入れずに遺伝子増幅を行い、遺伝子の増幅が電気泳動法で確認できなかった場合には、テストラインに赤いラインが現れなかった (図 8)。

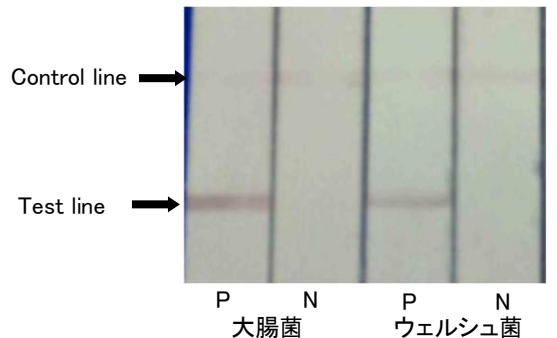


図 8 病原菌増幅遺伝子の検出

大腸菌では、どの程度の大腸菌で遺伝子の増幅が可能であり、増幅遺伝子を検出するイムノクロマト法で検出可能か検出を行ったところ、3 cfu (colony forming unit) の大腸菌を遺伝子増幅することによって検出が可能であった。また、増幅遺伝子をイムノクロマト法で検出する場合、電気泳動法で増幅遺伝子が確認できない場合でも病原菌の有無の確認が可能であった。これは、電気泳動法では、遺伝子増幅後の試料溶液を $3\mu\text{L}$ で有無を判断するのに対して、イムノクロマト法では $40\mu\text{L}$ を用いるため高感度に検出が可能であったと考えられる。この利点を生かして PCR のサイクル数を減らしての検出も可能であった。

本手法を用いれば、極めて高感度に病原菌の検出が可能となる。また、増幅した遺伝子を検

出する技術であり、プライマーの設計を変えることによって病原菌だけでなく、アレルギー、食品中の肉種の検査など様々な測定対象に対して応用できる技術である。

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 1 件)

査読有り

- ① Aki Takahashi, Shigeru Uchiyama, Yuya Kato, Teruko Yuhi, Hiromi Ushijima, Makoto Takezaki, Toshihiro Tominaga, Yoshiko Moriyama, Kunio Takeda, Toshiro Miyahara, Naoki Nagatani, Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as a stress marker, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **10** (2009) 034604 (5pp)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 永谷尚紀、遠藤智史、牛島ひろみ、由比光子、宮原敏郎、界面活性剤を含んだ展開液のイムノクロマト法への影響、日本化学会第 91 春季大会、2011 年 3 月 28 日、神奈川大学 横浜キャンパス
- ② 遠藤智史、高橋亜希、由比光子、牛島ひろみ・永谷尚紀、宮原敏郎、界面活性剤が抗原抗体反応に及ぼす影響、第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2009 年 11 月 8 日、金沢エクセルホテル東急、石川四高記念文化交流館
- ③ 永谷尚紀、遠藤智史、高橋亜希、由比光子、牛島ひろみ、宮原敏郎、界面活性剤の抗原-抗体反応への影響(イムノクロマト法)、第 62 回コロイドおよび界面化学討論会、2009 年 9 月 17 日、岡山理科大学
- ④ 石井仁、高橋亜希、由比光子、牛島ひろみ、森山佳子、竹田邦雄、宮原敏郎、永谷尚紀、イムノクロマト法に対する界面活性剤の影響、2008 年日本化学会西日本大会、2008 年 11 月 15 日、長崎大学
- ⑤ Aki Takahashi, Shigeru Uchiyama, Yuuya Kato, Teruko Yuhi, Hiromi Ushijima, Makoto Takezaki, Toshihiro Tominaga, Yoshiko Moriyama, Kunio Takeda, Toshiro Miyahara, Naoki Nagatani, Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as stress marker, JAIST Nano Technology Symposium 2008, October 24, 2008, Ishikawa high-tech conference center, Ishikawa
- ⑥ Naoki Nagatani, Aki Takahashi, Jin Ishii, Yuuta Toshine, Yuya Kato, Hiromi

Ushijima, Makoto Takezaki, Yoshiko Moriyama, Kunio Takeda, Toshihiro Tominaga, Toshiro Miyahara, Effect of terhalose and surfactant on immunochromatographic assay, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science, October 15, 2008, Honolulu, Hawaii, Hilton Hawaiian Village

- ⑦ 永谷尚紀、高橋亜希、石井仁、利根悠太、由比光子、牛島ひろみ、宮原敏郎、界面活性剤によるイムノクロマト法の高感度化、化学工学会第 40 回秋季大会、2008 年 9 月 26 日、東北大学 川内北キャンパス
- ⑧ 高橋亜希、由比光子、牛島ひろみ、宮原敏郎、永谷尚紀、唾液中バイオマーカー測定用イムノクロマトテストストリップ、第 45 回化学関連支部合同九州大会、2008 年 7 月 5 日、北九州国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ① 農産物・食品検査法の新展開 監修 山本重夫、発行日 2010 年 7 月 26 日、発行 シーエムシー出版、次の項目を担当 第 II 編 サンプルング検査法の技術 第 9 章 イムノクロマト法の高感度技術と新展開、永谷尚紀

[その他]

招待講演

- ① 永谷尚紀、イムノクロマト法を用いるウイルス検査法、第 15 回 OUS 技術セミナー 2009、2010 年 1 月 13 日、岡山国際交流センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永谷 尚紀 (NAGATANI NAOKI)
岡山理科大学・工学部・准教授
研究者番号：90351072