

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700480

研究課題名（和文） 繰り返し利用可能な非分離血中抗体測定法の開発

研究課題名（英文） Development of reusable non-separation immunoassay for blood sample

研究代表者

小川 武人（OGAWA TAKEHITO）

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：10454050

研究成果の概要（和文）：迅速な検査を可能にするためには、その場にて血液中から直接測定を可能とするような技術が望まれる。本研究課題では、蛍光増強免疫測定法を用いた血中物質の直接測定を目的とする。血液中での測定を可能にするため、側面の一面に蛍光試薬を固定化した片面反射型の測定法を開発した。本手法では、ウシ血液中における測定対象と蛍光試薬の結合による蛍光増強が観測され、血液中の生体分子を蛍光増強免疫測定法によって、直接測定することが可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：The development of a convenient assay for blood examination would enable preliminary diagnostic and screening at local clinics and even at the patient's home. The aim of this study is the development of direct measuring method for blood sample by fluorescent enhancement immunoassay. The new cell where one side of the wall was fluorescent probe immobilized glass was used. Using this cell, fluorescent enhancement depending to the interaction between fluorescent probe and measuring target was observed. Therefore it is expected that this fluorescence-enhancement assay will be available for blood tests with a simple one-step measurement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・医用材料工学

キーワード：生体情報・計測、化学工学、生物・生体工学、生体分子、Label-free

1. 研究開始当初の背景

抗原抗体反応を用いた免疫測定法は、その特異性と検出感度の高さから、様々な用途が期待されている。例えば、生体に侵入してきたウイルスなどの異物を高感度に検出することで、診療に応用される。生体内濃度が極

微量なサイトカイン濃度を測定することで、生体免疫機能を調べることができる。また、環境に含まれる内分泌かく乱物質をはじめとした汚染物質の検査にも有用である。これらの ppm オーダーの微量成分を検出するために、生体由来の抗原抗体反応のもつ他にない

選択性と結合能の高さが活かされている。

従来の免疫測定法は、ELISA 法に代表されるように、二次試薬供給や洗浄操作を必要とする煩雑な手法であり、リアルタイムでの測定が困難であった。短時間かつ簡便な免疫測定法として、近年では水晶振動子マイクロバランス法(QCM)や表面プラズモンを利用した測定法(SPR)が開発されている。これらの手法は基板に固定化した抗体に抗原が結合したときの表面変化を検出する方法であり、二次標識抗体を必要としない。しかし、溶液物性の影響を強く受けるため、血中の抗体測定には適していない。また、測定には専用の装置が必要であるため、医療の診断現場や現場での環境物質測定などへは拡大していない。

医療や環境分野において、その場で検査・測定できるような技術はすばやい診断・判断につながる。そのため、迅速で扱いが容易、かつ安価で特殊な装置を必要としない検査手法が望まれている。

申請者はこれまで、生体を模倣したセンサの開発を行ってきた。その一つとして、蛍光増強を利用した免疫測定法について検討してきた。抗体と特異的に結合するプロテイン A を用い、蛍光標識したプロテイン A の蛍光強度が抗体結合時に増強すること、そしてこの蛍光増強から抗体濃度の測定が可能であることがわかった。そこで、この蛍光増強を応用することで、血中における抗体濃度を直接測定する、新規免疫測定法の確立が可能であると考えた。これにより一般的な装置で可能な試薬供給のない(reagent-less)かつ、分離洗浄操作不要(separation-free)な免疫測定法を確立する。

2. 研究の目的

本研究課題では、蛍光増強免疫測定法を用いた非分離血中抗体測定法の開発を目的とする。

(1) まず血中測定を可能とするため、ガラス内側より励起光を入射する装置系を構築する。これまでは、抗体に特異性をもったプロテイン A を用い、このプロテイン A 固定化ガラスを試料溶液中に浸漬して測定していた。この方法では懸濁液である血中での測定は難しい。そこで、ガラスの片面が試料溶液に浸った状態とし、試料溶液のない裏側より励起光を照射および蛍光を測定する。これまでに蛍光増強の得られているリン酸緩衝溶液中で、蛍光標識プロテイン A と抗体との結合による蛍光強度変化を確認する。

(2) 次にフロー式による装置系を構築する。装置系をフロー式とすることにより、連続測定が可能となる。また、フローインジェクシ

ョンの手法を用いることで、必要な試料溶液量を大幅に減らすことが出来る。複数の未知試料を測定する場合にも、フロー式ならば自動化が容易である。そこで、まずは従来の浸漬法をもとにしたフローセルを作製し、このフローセルに FITC-プロテイン A 固定化ガラスを用いて連続測定や流量について検討する。

(3) 構築した測定系により、血中の抗体濃度を測定する。本手法では測定基板に固定化した標識蛍光試薬の蛍光を測定する。そのため、光透過性の低い全血においても、測定基板に固定化した試薬を励起すれば測定できると考えられる。これについて、蛍光標識試薬を固定化した基板を用いて確認する。次に、血中に抗体を添加し、添加抗体濃度と蛍光増強の関係について検討する。これにより繰り返し測定可能な非分離血中抗体濃度測定法を確立する。

3. 研究の方法

(1) まず、試料溶液に浸漬する面と反対側より蛍光を測定する、新規バッチ式セルを作製した。測定基板となるガラスは強酸を用いて洗浄した。洗浄済みガラスを、アミノプロピルトリメトキシシランを含むトルエンで還流することにより、アミノシラン化した。アミノシラン化ガラスにグルタルアルデヒドを介して FITC 標識プロテイン A を固定化したのち、非特異吸着を防ぐために、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いてブロックした。プロテイン A 固定化ガラスを、セル壁面に接着させ、計測用セルとした。

計測用セル内を PBS (pH 7.4, 37°C) で満たし、抗体結合前の蛍光強度を蛍光光度計で測定した。この試料溶液中に抗体を添加したときの蛍光強度変化を測定した。緩衝溶液系で性能について確認した後、ウシ血漿およびウシ血液に IgG を添加したときの蛍光応答性から、血液中でもの直接測定について検証した。

(2) フローセルの構築について検証した。まずは従来の浸漬型のセルに、溶液が流入出できるようにした。このセルを用いて、FITC 標識プロテイン A と IgG の結合・解離・再利用について検証した。解離には PBS に塩酸 (HCl) を加えた酸性溶液と、グリシン-HCl 緩衝溶液を用いた。

(3) 血液中でも測定可能な片面反射型の蛍光増強測定系を応用したフローセルを開発した。測定用のガラス基板に、蛍光試薬として FITC を修飾したプロテイン A (FITC 標識プロテイン A) を固定化した。この FITC 標識プロテイン A 固定化ガラスを側面の一面に配

置した片面反射型フローセルを作製した。まずは、溶媒を緩衝溶液とし、固定化された FITC-プロテイン A の蛍光が、溶媒に IgG を添加したときにどう増強するか検討した。その後、溶媒としてウシ血漿およびウシ血液を用い、血液中 IgG の直接測定について検証した。

4. 研究成果

(1) FITC 標識プロテイン A 固定化ガラス基板の片面が測定溶液に接するようにした蛍光測定用セルを作製した。このセルを用いた蛍光測定によるスペクトルから、FITC に由来する 520 nm のピークが検出された。このセルに試料溶液として抗体（免疫グロブリン G, IgG）を添加したときの抗体濃度と蛍光強度の関係について検討した。その結果、緩衝溶液系において試料溶液中の IgG 濃度と FITC 標識プロテイン A の蛍光強度の増加率の間に相関性が得られた。このことから、セル側面に FITC 標識プロテイン A を固定化したセルを作製できたこと、またこの固定化した FITC 標識プロテイン A と溶液中の IgG の結合による蛍光増強を観測できることが確かめられた。この測定用セルでの蛍光増強率および応答時間はこれまでの浸漬式と近く、同等性能の測定系であった。

測定対象モデルとして免疫グロブリン G (IgG) を用い、この新規に作製した片面反射型のセルで全血液中の対象を測定可能か、ウシ血液を用いてバッチ法にて検討した。結果、緩衝溶液系と比べ、ウシ血漿およびウシ血液中では血液成分による蛍光を含むことが確認された。そこで得られた蛍光強度をバックグラウンド補正し、FITC に由来する 520 nm のピークを得ることで、より正確な蛍光増強測定が可能となった。これにより血液中での FITC 標識プロテイン A と IgG の結合による蛍光増強として、緩衝溶液中に近い増強率を得ることができた。蛍光増強は溶液中の IgG 濃度と相関し、血液中 IgG の非分離測定が可能であることが示された。

(2) 自動化および連続測定を可能とするため、既存の装置系をもとにフローセルを試作し、抗体濃度変化と蛍光強度の応答および解離溶液を用いた繰り返し利用について検討した。その結果、まず従来の浸漬型を元にしたフローセルにおいてセル内抗体濃度に依存した蛍光強度の増加が得られ、増加率はバッチ式と同程度であった。また、応答時間はバッチ式の反応時間と同程度であった。そこで、このセルを用いて、pH 変化による解離と繰り返し使用について検討することにした。

固定化した FITC 標識プロテイン A に IgG を結合させた後に、解離用溶液として

PBS-HCl、およびグリシン-HCl の酸性溶液を送液することで、蛍光強度の減少から IgG とプロテイン A の解離が確認された。また、ここに再び IgG を送液することで、再度の蛍光増強から IgG とプロテイン A の再結合が確認された。再結合での蛍光増強は繰り返す度に低下するが、5 回の繰り返し測定においても蛍光増強は確認された。よって、FITC-プロテイン A を固定化した本測定系において IgG 濃度の繰り返し測定が可能であることが示された。

(3) 片面反射型の蛍光測定基板を用いてフローセルを作製した。このフローセルに緩衝溶液系にて IgG を送液したときの蛍光増強を測定した結果、高流量条件においてはバッチ式と同程度の 10 分でほぼ最大に近い増強が得られた。また、増強幅はこれまでとほぼ同程度である。よってフローセルにおいてもこれまでと同程度の測定が可能であると考えられる。

ウシ血液を溶媒として血液中物質のフロー式蛍光増強免疫測定を行った。まず、ウシ血液を用いた蛍光増強測定によって、血液中 IgG 濃度に依存した FITC-プロテイン A の蛍光増強が測定された。蛍光増強がプロテイン A と IgG の結合によるものか、検証した。血液に含まれる代表的な物質としてアルブミンが影響しないこと、FITC 標識プロテイン A を固定化していない基板を用いた場合は蛍光増強が起こらないことを確認した。作製したフローセルを用い、血液中の IgG と固定化した FITC 標識プロテイン A の結合により蛍光増強することが確認できた。

以上より、蛍光増強免疫測定法を応用することで、血液中の生体分子を非分離にて測定することが可能であることが示された。

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 3 件)

- ① 小川武人、酒井清孝、蛍光増強を利用した免疫測定法の開発、Chemical Sensors、査読無、27 巻、2011 年、2-7
- ② Ayaka Hirano, Ken-ichiro Yamamoto et al. (7 人中 4 番目)、Evaluation of Dialyzer Jacket Structure and Hollow-Fiber Dialysis Membranes to Achieve High Dialysis Performance、Therapeutic Apheresis and Dialysis、査読有、15 巻、2011 年、66-74
- ③ Takehito Ogawa、Sumire Koga et al. (9 人中 1 番目)、Development of a device for chemiluminescence determination of

superoxide generated inside a dialysis hollow-fiber membrane、Journal of Artificial Organs、査読有、13 巻、2010 年、58-62

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 土方康史、フロー式非分離蛍光増強免疫法による免疫グロブリン G(IgG)の繰り返し測定、化学工学会第 42 回秋季大会、2010 年 9 月 6 日、同志社大学(京都府)
- ② 駒井理人、Development of a fluorescent enhancement immunoassay to determine immunoglobulin G in blood、第 49 回日本生体医工学大会、2010 年 6 月 27 日、大阪国際交流センター(大阪府)
- ③ 駒井理人、血中抗体濃度測定を目指した蛍光増強免疫測定法の改良、日本医工学治療学会第 26 回学術大会、2010 年 4 月 3 日、都市センターホテル(東京都)
- ④ 土方康史、フロー式蛍光増強免疫測定法による免疫グロブリン G(IgG)の繰り返し測定の検証、日本医工学治療学会第 26 回学術大会、2010 年 4 月 3 日、都市センターホテル(東京都)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 小川武人、他、南江堂、わかりやすい透析工学—血液浄化療法の科学的基礎—、2012 年、143-149

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 武人 (OGAWA TAKEHITO)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師
研究者番号：10454050