

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310093

研究課題名(和文) アディポカイン迅速測定用マイクロチップの開発と糖尿病早期診断への応用

研究課題名(英文) Development of microchip for rapid detection of adipokines and early diagnosis of diabetes mellitus.

研究代表者

片岡 正俊 (KATAOKA, Masatoshi)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：20224438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円、(間接経費) 4,020,000円

研究成果の概要(和文)：プラスチック製マイクロチップ基板上に幅300 μm 、深さ50 μm のマイクロ流路を作製し微細化インクジェットを用いて流路上にIL-6及びTNF- α に対する各抗体を吐出・固定しマイクロ流路を利用したサンドイッチELISA系を構築した。その結果、0～32pg/mlの範囲で検量線の作製が可能で検出感度はIL-6が0.28pg/mlとTNF- α が0.46pg/mlとなり、既存の96穴プレート法よりも高感度であった。既存法と同様に正確な測定が可能となり、さらに高い日間・日内再現性を確認した。測定時間は約25分であり迅速・高感度かつ正確な血中アディポカイン測定系を構築し早期糖尿病診断への応用が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-6 and TNF- α in the blood are frequently measured by conventional sandwich ELISA using 96 wells plate. However, the conventional assay is time-consuming, and is not suitable for rapid diagnosis. To overcome these drawbacks, we performed a sandwich ELISA on a microchip for simultaneous analysis. The microchip was made of cyclic olefin copolymer with 4 straight microchannels that were 300 μm wide and 100 μm deep. For the construction of the sandwich ELISA for IL-6 or TNF- α , we used a piezoelectric inkjet printing system for the deposition and fixation of the 1st antibody on the surface of each microchannel. This microchip-based assay enabled us to determine simultaneously blood IL-6 and TNF- α with accuracy, satisfactory sensitivity, time saving ability, and low consumption of sample and reagents, and thus will be applicable to early diagnosis of diabetes mellitus.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

科研費の分科・細目：マイクロバイオシステム

キーワード：マイクロチップ基板 サンドイッチELISA 微細化インクジェット IL-6 TNF- α アディポネクチン
糖尿病

1. 研究開始当初の背景

微細加工技術を用いた、抗原抗体反応に基づく血中バイオマーカー検出デバイスは、一次抗体固定ビーズをマイクロ流路に導入する方法(Lab Chip 2008, Sato et al.)、抗体を固相にアレイ上に配列したアレイ法など(Biotechnol J, 2009, Stewart et al.)多くの報告がある。ビーズ法では、マイクロ流路上でビーズを保持させるには複雑な流路構造が必要あるいはビーズのパッケージの難しさの問題がある。抗体アレイ法では、網羅的なバイオマーカー検出に適するが、定量検出への応用には適していない。各種アディポカイン測定に用いられる既存の検出法としては、96穴プレートによるサンドイッチ ELISA 法が用いられている。既存法では定量的な高感度検出が可能で、血液中に pg/ml 単位から数百 ng/ml の濃度で存在する各種アディポカインの正確な測定が行われる。しかしながら一項目の検査あたり 3-5 ml の血液が、さらに抗原抗体反応時間は 3 時間程度必要となり、糖代謝の頑健性を測定するに必要な網羅的・系時的な解析には適さない。既に我々は、マイクロ流路表面上に微細化インクジェットを用いて nl 単位の一次抗体を吐出・固定化することで、マイクロ流路上でサンドイッチ ELISA 法を構築している(図 1)。ペルオキシダゼ標識二次抗体と酵素基質と反応させて化学発光を CCD カメラで測定することで、血液中の骨粗鬆症マーカー PICP を抗原抗体反応時間 30 分(既存法では 3 時間)と迅速な定量検出が可能で、既存法と同様に正確な血中濃度の測定が可能となった(特開 2010-8109, 特願 2008-334179)。このマイクロ流路法を基礎にして各種アディポカインのマルチ検出系の構築を目指す。

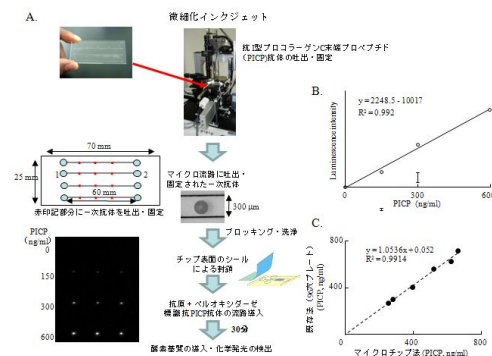


図 1. 微細化インクジェットによる流路表面への抗体固定と化学発光の検出(A)、PICP検量線の作製(B)、既存96穴ELISAプレート法とマイクロ流路法との血中PICP濃度の相関(C)。

2. 研究の目的

近年、日本では肥満を基盤とした末梢組織でのインスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病患者が増加している。患者とその予備軍(境界型糖尿病)の数は 2 千万人を超えており、重篤な合併症と高額な医療費から個人の QOL の低下と社会的な経済的負担が問題となっている。そこで境界型糖尿病患者に着目して、インスリン抵抗性を規定する TNF- α など 6 種

類のアディポカインの血中動態を、系時的・網羅的に定量解析することで糖代謝能の頑健性の測定・解析を行い、境界型から糖尿病への移行を診断する糖尿病超早期診断法の確立を目指す。この目的を可能にするため、微細加工技術を用いたマイクロ空間での、迅速・省サンプルで定量性を有する血中アディポカイン測定用マイクロチップの開発を行う。

3. 研究の方法

各種アディポカインの迅速・省サンプルな定量検出が可能マイクロチップ基板を作製することで、境界型糖尿病患者の糖負荷試験時のアディポカインの系時的・網羅的動態を解析する。これを実現するためには、マイクロチップ基板を用いて血中の各アディポカインの定量検出に加え、従来のサンドイッチ ELISA 法では数時間程度必要とされる抗原抗体反応時間を 15 分に短縮する。さらに、同一マイクロ流路上に各種抗体を固定して、省サンプルなマルチバイオマーカー検出系を実現する。最終的には、10 μ l 以下の血漿サンプルから 6 種類のアディポカインを 15 分で定量検出可能なマイクロチップを構築する。このマイクロチップ基板を用いて、境界型糖尿病患者のグルコース負荷試験時に、15 分間隔で血液を採取し各種アディポカインの系時的・網羅的解析を行う。

現状では、TNF- α 、IL-6 およびアディポネクチンの 3 種類については市販の 96 穴プレートを用いたサンドイッチ ELISA 法をマイクロ流路上に再現できている。特に TNF- α と IL-6 については、臨床的基準値の下限である 1 pg/ml の検出が可能で、臨床的に必要とされる検出限界は確保している。さらに、マイクロチップ法によるヒト血中 IL-6 測定結果を、市販の 96 穴 ELISA 法の結果と比較するとサンプル数は 3 例と少ないものの高い相関が得られ、IL-6 のような数 pg/ml 単位の微量マーカーの測定においても既存の 96 穴プレート法と同様に正確に測定できることを確認している。そこで、マイクロチップ上で TNF- α 、IL-6 およびアディポネクチンの他に、レプチン、高感度 CRP とインスリンの測定のためにサンドイッチ ELISA 法を構築して、これら 6 種類のアディポカインについて開発するマイクロチップ法と既存の 96 穴サンドイッチ ELISA 法との相関を確保する。使用する抗体は、市販されている 96 穴サンドイッチ ELISA 法に使用されている一次および二次抗体を用いることで、開発時間の短縮を図る。ブロッキング、洗浄については TNF- α 、IL-6 およびアディポネクチンで使用し、バックグラウンドを効果的に抑えている現状のブロッキング液と洗浄液を使用する。各アディポカインについて、マイクロ流路上での正確なサンドイッチ ELISA 系の構築を行った後に、抗原抗体反応時間の短縮を目指す。

マイクロ空間では分子拡散による混合効

果が圧倒的になるが、PICPの測定においても既存法の96穴ウェルで3時間の抗原抗体反応時間が、マイクロ流路を利用することで30分に短縮されている。TNF- α 、IL-6およびアディポネクチンのマイクロ流路測定では、抗原抗体反応は2時間必要であるが、流路幅を150 μm 程度に狭めることでより時間短縮を図る。

さらに、対象とするアディポカイン6種類の抗原抗体反応の最適化を図り、それぞれの抗体濃度、測定温度、洗浄条件を検討することで、時間当たりの化学発光量を増加させることで反応時間の短縮を図る。インスリンについては、既存96穴ELISA法では抗原抗体反応は室温で行われているが、反応温度を50°Cにすると、室温反応に比べて化学発光量は4倍に上昇することを確認しており、反応温度の最適化を図ることで大幅な時間短縮が見込める。他のアディポカインについても、それぞれ最適温度の検討を行い、チップ検出の反応温度の最適化を図る。

TNF- α やIL-6は、基準値が数pg/mlと極微量しか血液中に存在しておらず、抗原抗体反応温度の最適化のみでは反応時間の15分への短縮は難しいと予想される。TNF- α およびIL-6測定に用いている一次抗体について、SPRを用いて抗原抗体反応パラメーターの解析を行い、シミュレーションを行った結果、現在用いているマイクロ流路表面に固定化している一次抗体濃度を増加させると抗原抗体反応速度の上昇が期待される結果となった。そこで、微細化インクジェットによる一次抗体の吐出・固定に際して、より高濃度の抗体溶液を用いることで抗原抗体反応速度の増加を目指す。これと同時に、微細化インクジェットによるマイクロ流路表面への抗体吐出・固定法にも改善を加える。現状の微細化インクジェットによる抗体固定では、一液滴65 μl の抗体溶液の計100液滴を同一部位に吐出・固定化を行っている(スポット状配列)。一方、一液滴を別々の部位に吐出固定化した場合、スポット状配列の約2.5倍の化学発光量の増加を認めた。この結果、スポット状配列では、COC基板表面に接していない抗体が洗浄過程等でマイクロ流路から洗い流されていることが示唆される。そこで、微細化インクジェットの吐出過程において、抗体固定の位置決め精度を向上させることで、一液滴をより高密度に固定化することで、より効率的に抗体を流路表面に接触させることで化学発光量の増大が可能になり、結果的に抗原抗体反応時間の短縮が可能になる。

各種アディポカインの検出条件の最適化を行うことで、臨床基準値範囲内での定量性確保と抗原抗体反応時間を15分に短縮させる。さらに、臨床現場でPoint of Care Testingとしての利便性を確保するため、一本の同一流路あるいは同一マイクロチップで6種類のアディポカインを同時に検出する必要があ

る。既に、我々はマイクロ流路上にTNF- α 、IL-6およびアディポネクチン、さらにネガティブコントロールとしてH-FABP(心筋梗塞マーカー)の各一次抗体を固定化することで、ヒト血液中に存在する各マーカーの検出に成功している。この場合、TNF- α とIL-6の同一流路での定量性は確保できるが、アディポカインの定量性は確保されていない。アディポカインは血中に数百ng/mlと高濃度に存在し、市販抗体を用いた検出では血液を300倍程度希釈する必要があるなど、同一流路での検出が困難になる可能性が高い。その際には、血漿導入部は一か所にして途中でマイクロ流路の分岐を行い、それぞれpg/mlとng/ml検出用の流路とすることで、同一マイクロチップ基板で6種類のアディポカインについて10 μl の血漿サンプルから測定時間15分で定量検出を行う。

開発したアディポカイン測定用マイクロチップを用いて、境界型糖尿病患者の糖負荷試験時に系時的に血液採取を行い、各種アディポカインの系時的・網羅的解析を行う。境界型糖尿病患者に対しては、糖尿病発症予防として主に生活習慣改善指導を行うが、10%程度の患者が一年以内に糖尿病に移行することが知られている。しかしながら、境界型の段階で糖尿病の発症リスクを客観的かつ適確に判断する指標はほとんどない。そこで、境界型糖尿病患者に対して経口グルコース負荷試験(空腹状態で75gグルコースを経口投与し、2時間後の血糖値やインスリンを測定することで糖代謝能とインスリン抵抗性を検査する方法)の際に、15分間隔で100 μl の血液を系時的に採取して開発するマイクロチップ基板で各種アディポカインの系時的・網羅的解析を行う。マイクロ流路への導入は数 μl の血漿サンプルがあれば十分であるが、現状では遠心による血球分離操作が必要なこととハンドリングの容易さから、患者が系時的採血に耐えられる程度の血液量100 μl を採取する。糖尿病のような生活習慣病では、遺伝的要因に加え長年の生活習慣による糖代謝能の頑健性の破壊程度が発症要因として大きいと考えられる。そして、アディポカインの系時的・網羅的な解析と年単位の前向き調査を行うことで、糖代謝の頑健性測定による超早期の糖尿病発症診断、あるいは糖尿病の予知診断への応用が可能になり、個人の健康維持と社会的経済損失を防ぐうえで大きく役立つと考えられる。

4. 研究成果

マイクロ流路上に微細化インクジェットを用いた一次抗体の吐出・固定法により、個々のマイクロ流路に抗IL-6抗体(図2)、抗TNF- α 抗体(図3)を固定して、サンドイッチELISA法を構築してそれぞれ0-32pg/mlの範囲で定量検出系を構築した。

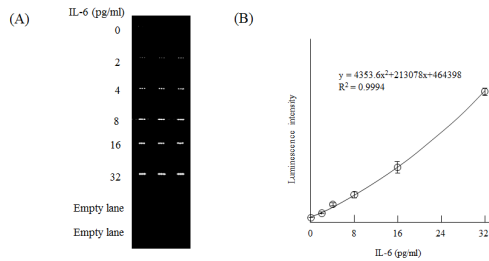


図2. マイクロ流路上でのIL-6定量検出

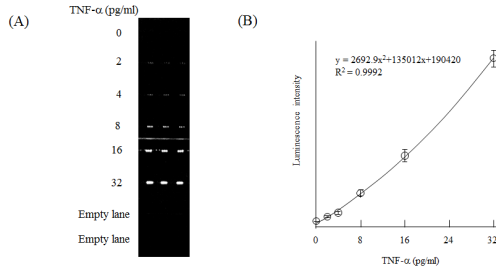


図3. マイクロ流路上でのTNF-α定量検出

開発したマイクロ流路でのサンドイッチELISA系と既存96穴プレートを用いたサンドイッチELISA系の相関を、ヒト血液を用いて検討したところ非常に高い相関が認められ、マイクロ流路での正確な血中アディポカイン測定が可能になった(図4)。

マイクロチップ基板には4本のマイクロ流路が作成されている。この開発したマイクロ流路上でのELISA測定系を、それぞれIL-6とTNF-αを対象に二人分の血液サンプルを用いてマルチ解析系の構築を行った(図5)。その結果、IL-6およびTNF-αともに、2人分の血液は既存96穴プレート法と同様に正確な測定が可能になった。この結果は、PLoS Oneにて誌上発表している。

さらに、マイクロ流路でのサンドイッチELISA測定系では、血中アディポネクチンや高感度CRPなど多くのアディポカインの定量

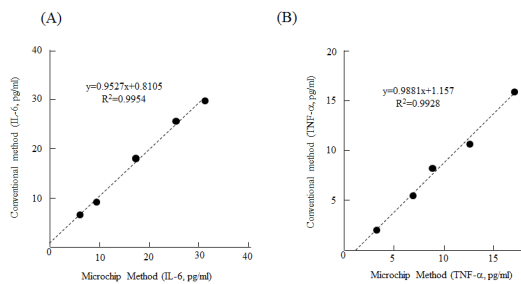


図4. マイクロ流路法と既存96穴プレート法との比較

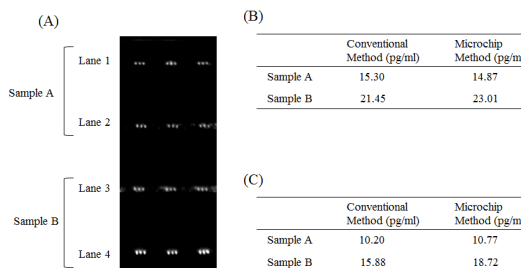


図5. マイクロチップ基板上的マルチマーカー解析

測定が可能であることを確認した(投稿中)。その他、経口グルコース負荷試験時の各アディポカイン測定により、空腹時の血中10- and 12- (Z,E)-Hydroxyoctadecadienoic Acid (HODE)値が耐糖能と高い相関を有し、早期糖尿病診断マーカーとしての可能性を見出している(PLoS One 2013, e63542)。

このように、マイクロチップ基板上に形成したマイクロ空間を利用した血中アディポカイン測定により、極微量の血液からのマルチマーカー測定が可能となり、今後早期の糖尿病診断応用が期待される。

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9件)

1. Simultaneous immunoassay analysis of plasma IL-6 and TNF-α on a microchip. Abe K, Hashimoto Y, Yatsushiro S, Yamamura S, Bando M, Hiroshima Y, Kido J, Tanaka M, Shinohara Y, Ooie T, Baba Y, Kataoka M. PLoS One (2013) e53620. DOI:10.1371/journal.pone.0053620
2. Singlet oxygen induced products of linoleates, 10- and 12- (Z,E)-hydroxyoctadecadienoic acid (HODE), can be potential biomarkers for early detection of type 2 diabetes. Umeno A, Shichiri M, Ishida N, Hashimoto Y, Abe K, Kataoka M, Yoshino K, Hagihara Y, Aki N, Funaki M, Asada Y, Yoshida Y. PLoS One (2013) E63542. DOI:10.1371/journal.pone.0063542
3. Mechanism of interleukin-1α transcriptional regulator of S100A9 in a human epidermal keratinocyte cell line. Bando M, Zou X, Hiroshima Y, Kataoka M, Ross KF, Shinohara Y, Nagata T, Herzberg MC, Kido J. Biochem Biophys Acta (2013) 954-962. DOI:10.1016/j.bbagr.2013.03.010
4. Development of microchip for the analysis of biomarkers in blood. Kataoka M, Abe K, Hashimoto Y, Yamamura S, Yatsushiro S. Rinsho Byori (2012) 1094-1100. http://www.jslm.org/books/journal/60_1_1.pdf
5. Detection of miRNA in cell cultures by using microchip electrophoresis with a fluorescence-labeled riboprobe. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Kataoka M. Sensors (2012) 7576-7586. DOI : 10.3390/s120607576

6. Determination of calprotectin in gingival crevicular fluid by immunoassay on a microchip. Kido J, Abe K, Yatsushiro S, Bando M, Hiroshima Y, Nagata T, Ooie T, Tanaka M, Kataoka M. Clin Biochem (2012) 1239-1244.
DOI:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.009
7. Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Tamiya E, Baba Y, Kataoka M. PLoS One (2012) e32370.
DOI: 10.1371/journal.pone.0032370
8. Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human neutrophils. Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Mihara C, Kataoka M, Murata H, Shinohara Y, Nagata T, Kido J. J Periodontal Res (2012) 554-652.
DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01466.x.
9. Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry. Kido J, Bando M, Hiroshima Y, Iwasaka H, Yamada K, Ohgami N, Nambu T, Kataoka M, Yamamoto T, Shinohara Y, Sagawa I, Nagata T. J Periodontal Res (2012) 488-499.
DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01458.x.

〔学会発表〕(計 1 件)

Quantitative, rapid and high sensitive analysis of adipokine in blood by immunoassay on microchip. Hashimoto Y, Abe K, Obana E, Kataoka M. Advanced in Biodetection & Biosensors. 10-11 March 2014, Berlin, Germany.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡正俊 (Kataoka Masatoshi)
独立行政法人産業技術総合研究所健康
工学研究部門・研究グループ長
研究者番号：20224438

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：