

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510146

研究課題名(和文) 抗原内包樹脂を用いたポータブルELISA分析機の開発

研究課題名(英文) Development of a portable ELISA machine using novel antigen-bound polymer

研究代表者

武尾 正弘 (TAKEO, MASAHIRO)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40236443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内分泌攪乱物質・ノニルフェノール(NP)を測定対象とする、携帯型高感度ELISA分析機の開発を行った。NPを官能基として内包するPMMAベースの樹脂製フィルターを積層型マイクロリアクターに設置し、新規競合ELISA法にてNPの微量分析を実施した。新規に25cm角のケースに収まる自動送液・蛍光検出システムを開発し、これを用いてNPの分析を実施したところ、0.01-1.00 μ g/lの濃度範囲で良好な負の検量線が得られ、その平均変動係数は4.2%であった。これは市販高感度分析機の分析感度や再現性に十分匹敵するものであった。

研究成果の概要(英文)：We developed a portable ELISA machine for the measurement of an endocrine disruptor, nonylphenol. A microfilter, which was made from PMMA-based polymer with nonylphenyl group as a side chain, was set in a vertically-stacked microreactor. The microreactor was set in a newly-developed automatic fluidic and detection system in a 25cm-cubic case and competitive ELISA was performed using this small system. As a result, we could construct a good standard curve with negative correlation in a concentration range of 0.01-1.00 microgram/l and the average coefficient of variation of the data obtained was 4.2%. These results were comparable to the sensitivity and repeatability of commercial sensitive analytical machines.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

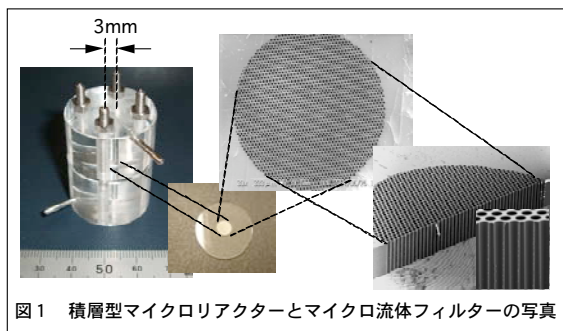
キーワード：ELISA nonylphenol 分析機 内分泌攪乱物質

1. 研究開始当初の背景

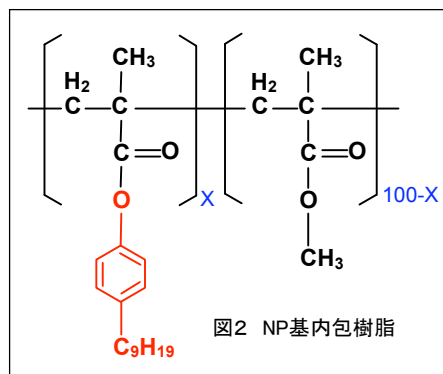
酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA) は、抗原抗体反応の特異性を利用した分析法であり、その特異性の高さ、操作の簡便さ、高感度分析機に匹敵する測定感度から、臨床、生化学分野を中心に幅広い分野で高感度分析法として利用されてきた。一般には、テーブルトップサイズによく自動化された据置き型の ELISA 分析システム (96 穴マイクロタイタープレート、プレートウォッシャー、プレートリーダー) が病院、大学、研究所、分析会社などの分析室に整備されている。装置が据置き型であるため、疾病や健康に関わるバイオマーカーの検査のために、被験者はわざわざそのような機関に赴いて、血液、唾液、尿等のサンプルを採取・提出する必要がある、自宅へ分析結果が届くのに最低数日かかるのが現状である (分析時間そのものは 2 時間程度)。また、近年では、食品や環境の汚染、新型感染症の出現など、我々の健康を脅かす種々の問題が顕在化し、ますますその場での迅速な状況分析と判断・対処が求められるようになってきている。さらに、先進国では、高齢化に伴い、在宅での健康モニタリングの要望も強くなっている。一方、妊娠検査キットやインフルエンザ判定キットのように有無を判定する簡易免疫分析法は広く普及しているが、手軽に持ち運べる高感度 ELISA 分析機は未だ実用化されていない。このような背景から、可搬型の高感度分析機開発の高いニーズが存在する。

2. 研究の目的

我々は、垂直方向に直径 3mm の流路を持ち、多段に反応が可能な積層型マイクロリアクターを開発した (図 1) (特開 2006-068699)。このリアクターに放射光 3 次元リソグラフィ技術 (兵庫県有放射光施設: ニュースバル) で作製した直径 40 μ m の貫通孔を多数有するマイクロ流体フィルターを設置し、これを ELISA の反応場とし、内分泌攪乱物質・ノニルフェノール (NP) の微量分析を実施してきた。当初は、このフィルターに抗体を物理吸着で固定化し、フィルター中で抗原抗体反応を行い、サブ ppb 濃度の NP の微量分析に成功したが、変動係数が 20% を超え、再現性に大きな問題を有することがわかった。その原因として、このような微細構造体に抗体を一定して固定化することができないこと、また、手作業による給液や反応液を蛍光分析機



へ運ぶタイムラグによることが推察された。そこで、本研究では発想を大転換し、まず、マイクロ流体フィルターを構成する樹脂に抗原を官能基として組み込んだ抗原内包樹脂 (図 2) を調製し、これを放射光微細加工することにより、マイクロ流体フィルターを作製した。このフィルターの細孔表面には、均一に抗原が露出していることが期待でき、これを用いて競合 ELISA を実施することにした。

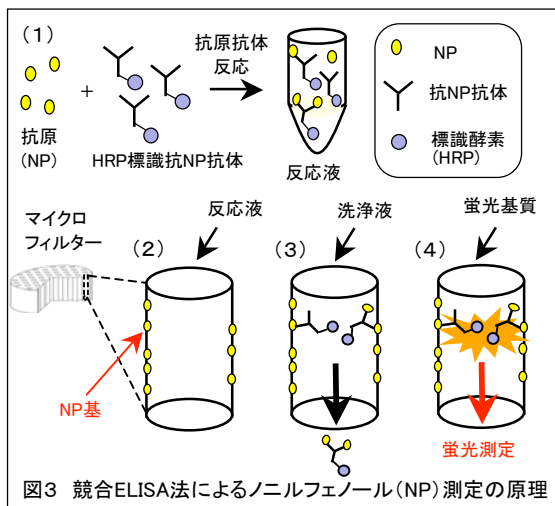


本研究の第一の目的は、この抗原内包樹脂製フィルターを用いてサブ ppb レベルの NP あるいは農薬代謝物である *p*-ニトロフェノール (NiP) を微量定量し、ここで提案する新規競合 ELISA 法の測定原理を実証することにある。また、現状の分析は手分析で実施しているため、分析サイズの微小化に伴って、手分析由来の誤差が大きく影響するため、送液及び蛍光検出の自動化を実施し、さらに、分析系全体を携帯できるサイズへ小型化することを第二の目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、まず、測定対象物質となる NP (内分泌攪乱物質) と NiP (農薬代謝物) を官能基として含むポリメチルメタクリレート (PMMA) ベースの抗原内包樹脂フィルムを合成する。次いで、このフィルムを放射光で加工してマイクロ流体フィルターを作製し、さらにこのフィルターを用いて競合 ELISA 法でこれら物質の高感度測定を試みる。このような抗原内包樹脂を放射光で加工した切断面には、一定の割合で抗原が露出することが期待でき、これを活用すれば競合 ELISA 法で抗体の固定化なしに対象物質を測定できる。その原理は、図 3 に示す通り、まず、(1) 抗原となる NP をそれに対する酵素標識抗体と混合し、あらかじめ小チューブ中で抗原抗体反応させる。次いで、(2) これを抗原の露出するマイクロ流体フィルターへ導入し、細孔表面に露出した抗原と (1) で未反応の抗体を反応させる。(3) 洗浄液で、(1) で反応し、(2) で細孔表面と反応できなかった抗体を除去する。さらに、(4) ここに蛍光基質を導入し、細孔表面に補足された抗体の標識酵素で蛍光発色させる。この原理では、抗原の量が増加するにつれ、細孔表面に補足される酵素標

識抗体が減少するために、負の検量線を与える。

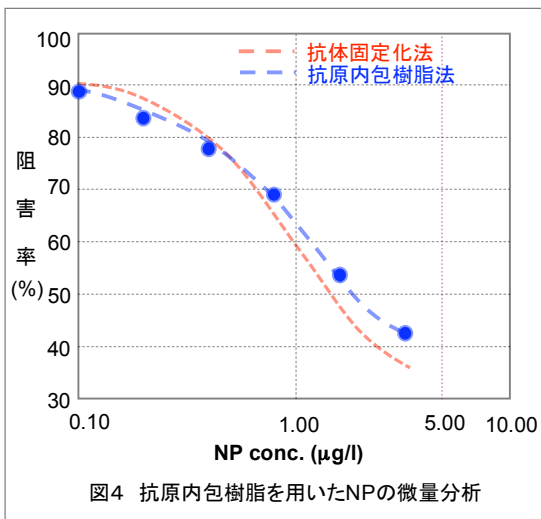


また、本研究では、手分析による誤差を抑えるため、精密シリンジポンプ4台及びペリスタポンプ1台からなる送液系によるプログラム送液を実施し、これに加えて、高輝度LED光源及び光ファイバーパームトップ分光光度計よりなるオンライン蛍光検出系を装備した分析システムを既に構築している。このシステムを用いてNPの自動微量分析を行い、市販ELISAキットの定量下限の10-100倍低濃度域を測定することに成功した。また、この自動化により分析の再現性を大幅に改善した。しかしながら、システムサイズが1m×0.5mのデスクトップサイズであり、また、分析の再現性も市販分析装置の基準にようやく達したところであり、本研究期間において、システムの小型化と分析の再現性を大幅に改善する。

4. 研究成果

NP基を内包するPMMAベースの樹脂を化学合成し、これを放射光微細加工して、NP基内包樹脂製マイクロ流体フィルターを得た。精密シリンジポンプ等からなるデスクトップ自動分析システムにこのマイクロ流体フィルターを設置した積層型マイクロリアクターをつなぎ、競合ELISA法によるNPの微量分析を実施した。その結果、市販ELISAキットの定量下限値5 $\mu\text{g}/\text{l}$ の1桁以上低濃度にあたる、0.10-4.00 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度範囲で、期待した通りの負の検量線を作成することに成功した(図4)。また、この検量線は、先に抗体をフィルターに固定化して得られた検量線(図4抗体固定化法)とほぼ同じ形状であった。ここで、Y軸の阻害率($B/B_0, \%$)とは、各NP濃度で検出されるピークの蛍光カウント積分値(B)をNP濃度0 $\mu\text{g}/\text{l}$ で検出されるピークの蛍光カウント積分値(B_0)で除したものである。これらの結果から、抗原内包樹脂を用いた競合ELISA法(抗原内包樹脂法とする)を、原理実証することに成功した。一方、同様にNiPの抗原内包樹脂の調製を試み

たが、調製した樹脂のNiP基と高分子主鎖とのエステル結合が容易に分解される化学特性があるため、以降の研究についてはNP内包樹脂を用いて進めることにした。また、抗体をフィルターに固定化する方法(抗体固定化法)では、分析の再現性を示す変動係数(CV値)が20%を超えていたが、抗原内包樹脂法では、平均CV値6%とかなり改善された。これは、市販分析機の基準(<10%)のレベルに到達したことを示唆しているが、更なる精度や再現性の改善が必要である。



次に、本分析システムの感度や再現性を維持しつつ、そのサイズをデスクトップからポータブルサイズにサイズダウンさせるため、主に分析システムのサイズを肥大させている、4台の精密シリンジポンプ(New Era社、NE-1000)及び1台のペリスタポンプ(New Era社、NE-9000)を500円玉サイズのピエゾマイクロポンプ(高砂電気工業製、SDMP302, SDMP306, SDMP320, 各2台)6台に置換した(図5)。この置換に伴い、シリンジポンプやペリスタポンプの制御に使用した専用ソフトが使用できないため、新たに制御ソフトウェアを開発し、これをWindowsベースのタブレットPCに移植し、タブレットPCから無線で

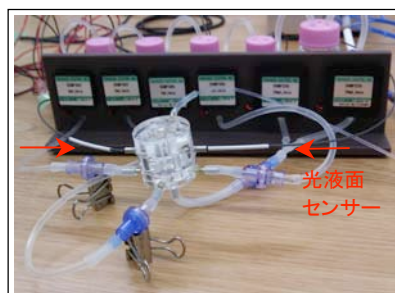


図5 マイクロリアクターと送液ユニット

ポンプ制御を可能とした。また、精密シリンジポンプからピエゾマイクロポンプへの置換で送液の精度が低下するため、フィルター通過直後で送液が停止し、再現よくフィルター中で抗原抗体反応及び酵素反応が実施できるように、光液面センサー(パナソニックFX-501, FT-E13)をフィルター直後の流路に設置した(図5)。以上のような分析システムの大幅な改良により、最終的にタブレット



図6 新自動分析システムの全景(キーボード不要)

PCを除く、全分析システムを25cm角の亚克力ケースに収納することができ、モデル機レベルでポータブルサイズにすることに成功した(図6)。このシステムの改良及び詳細は、39th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2013) のアブストラクトで公開している。

この新自動分析システムを利用して、NPの微量定量を試みたところ、図7に示す通り、0.01~1.00 $\mu\text{g}/\text{l}$ のNP濃度範囲において良好な負の検量線が得られ、その平均CV値は4.2%であった。これは図6の前システムでのNPの検量濃度範囲よりさらに低濃度の領域である。また、NPについては、内分泌攪乱物質としての、メダカ等の魚類に対する予測無影響濃度が0.608 $\mu\text{g}/\text{l}$ と決められているが、国はこの濃度のNPをGC/MSで測定することを求めている。本分析システムを用いて作成したNPの検量線は、本システムがこの予測無影響濃度を無濃縮で測定できる感度を有することを示唆している。

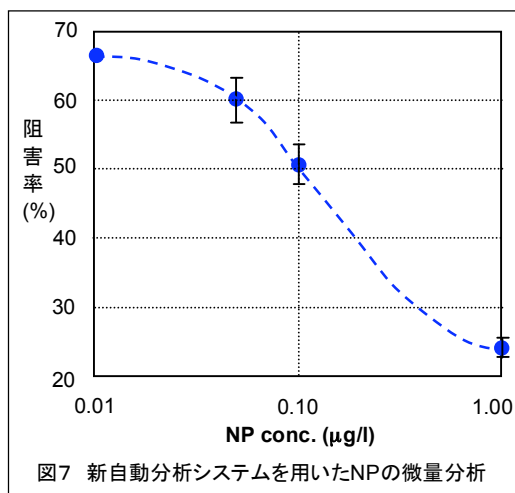


図7 新自動分析システムを用いたNPの微量分析

このNPの分析では、フィルター中での抗原抗体反応時間30分、酵素反応時間25分に設定しているが、測定時間の最適化の結果、前者は5分、後者は20分弱でほぼ同じ結果が得られることがわかった。現在の総分析時間は45分程度で、既存ELISA分析の半分以下である。温度管理やフィルター及び流路の形状の改善等により、さらに分析時間の短縮は可能と考えられる(最終目標15分以下)。

本研究の結論として、まず、デスクトップサイズの前自動分析システムを用いたNPの

微量分析において、我々が提案した抗原内包樹脂を用いた競合ELISA法の原理検証に成功した(平成23年度成果)。また、この方法での測定は、抗体を固定化する従来法と異なることも明らかとなった。次に、測定感度及び再現性を維持しつつ、自動分析システムのサイズダウンに取り組んだところ、シリンジポンプ類をピエゾマイクロポンプに置換する等の改良により、全システムを25cm角の亚克力ケースに収納し、携帯できるサイズにまでサイズダウンすることに成功した(平成24年度-平成25年度前半成果)。さらに新システムを用いてNPの微量分析を実施し、内分泌攪乱物質としての予測無影響濃度を無濃縮で測定できる濃度範囲のNP分析に成功した。これらの結果から、当初の計画目標はほぼクリアーしたと言える。

この研究期間の平成25年度まではシステム開発が主体であったため、分析化学系学術誌に出せる再現性(例えば、CV値)ある分析値を得ていなかったため、主にその開発状況を4つの国際学会で発表した。平成25年度後半に市販分析機器の再現性を十分にクリアーできるCV値が得られたため、今後はその成果を学術誌に公表する予定である。

この研究は、さらに多検体分析、分析時間の短縮、装置のパームトップサイズへのサイズダウンなどを課題として、さらに継続して行く予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

(1) M. Takeo, S. Nii, D. Kato, S. Negoro, S. Yusa, T. Saiki, Y. Takizawa, and Y. Utsumi
Development of a portable fluidic and detection system for ELISA in a 3-dimensional microreactor
Proc. of 39th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2013), p. 171, 16th-19th, Sep., 2013, London, England

(2) M. Takeo, I. Kawaji, A. Nakasuji, T. Tone, Y. Ukita, D. Kato, S. Negoro, S. Yusa, M. Katayama, and Y. Utsumi
Automatic ELISA analytical system for a trace amount of environmental chemicals using a 3-dimensional microreactor with a novel antigen-bound microfilter
Proc. of the 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science ($\mu\text{TAS}2012$), T. 4. 114., 28th, Oct. -1st, Nov., 2012, Okinawa, Japan

(3) M. Takeo, I. Kawaji, A. Nakasuji, T. Tone, Y. Ukita, D. Kato, S. Negoro, S. Yusa, M. Katayama, and Y. Utsumi
Development of automatic ELISA analytical system for a trace amount of nonylphenol

using a novel antigen-bound microfilter
Proc. of 10th International Workshop on
High Aspect Ratio Micro and Nano Structure
Technology (HARMNST2013), p.129,
21st-24th, Apr., 2013, Berlin, Germany
(4) T. Azeta, Y. Ukita, M. Takeo,
N. Nakagawa, S. Yusa, and Y. Utsumi
Three-dimensional Lab-on-CD with
enzyme-linked immunosorbent assay
Proc. of 9th International Workshop on High
Aspect Ratio Micro Structure Technology
(HARMST2011), p.175, 12th-18th, Jun., 2011,
HsinChu, Taiwan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武尾 正弘 (TAKEO, Masahiro)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：4 0 2 3 6 4 4 3

(2) 研究分担者

内海 裕一 (UTSUMI, Yuichi)
兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・
教授
研究者番号：8 0 3 2 6 2 9 8

(3) 研究分担者

遊佐 真一 (YUSA, Shinichi)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：0 0 3 0 1 4 3 2

(4) 連携研究者

根来 誠司 (NEGORO, Seiji)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：9 0 1 5 6 1 5 9

(5) 連携研究者

加藤太一郎 (KATO, Dai-ichiro)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：6 0 4 2 3 9 0 1