

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792494

研究課題名（和文）マイクロチップ基板を用いた歯周病迅速診断デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of rapid diagnostic device for periodontal disease using microchip

研究代表者

阿部 佳織（ABE KAORI）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・産総研特別研究員

研究者番号：60511326

研究成果の概要（和文）：

血中の炎症性サイトカインの測定には 96 穴プレートを用いた Sandwich enzyme-linked immunosorbant assay (Sandwich ELISA)法が主に用いられている。しかし、Sandwich ELISA 法では、1 回の測定に 50 ～100 μ l のサンプルを必要とし、測定に 2 時間以上かかるため、迅速診断には用いることができない。そこで、本研究では微細化インクジェット装置を用いて抗体をマイクロ流路内に固定化し、マイクロ流路内で抗原抗体反応を行うことで、正確に、高感度に、迅速に、省サンプルで血中の炎症性サイトカインである Interleukin-6 (IL-6) と Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)の測定を可能にした。

研究成果の概要（英文）：

In the conventional sandwich enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) system, disposable 96-well microtitration plates are frequently employed to detect inflammatory cytokines in blood. Typically 50~100 μ l aliquots of sample are introduced into the reaction wells of 96-well microtitration plates. Furthermore, this method is time-consuming, for the capture of antigen by the 1st antibody and the determination of the antigen concentration by the 2nd antibody each requires 2 hr or more. So, the conventional sandwich ELISA for the determination of plasma cytokines is not suitable for rapid diagnosis. In the present study, we demonstrated the potential of the sandwich ELISA on a microchip, with the 1st antibody deposited by piezoelectric inkjet printing for the quantitative analysis of Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) which concentrations are very low in the blood of healthy individuals (pg/ml levels). This 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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：マイクロチップ、炎症性サイトカイン、診断

1. 研究開始当初の背景

歯周病の病態形成には炎症性サイトカインやコラゲナーゼなどが重要な役割を果たすことが知られている。近年、歯肉溝滲出液、血漿などに含まれる炎症性サイトカインの測定が注目されている。しかし、これらの測定は主に96穴プレートを用いたELISA法が用いられており、1つのマーカーを測定するために、数十～数百 μl のサンプルを必要とし、測定結果が出るまでに数時間かかるため、診療室で測定して即座に測定結果を治療に生かすことはできない。

一方、マイクロ流路が形成された基板（マイクロチップ基板）上で、通常の実験室で行っている混合、反応、分離、検出などの化学操作を全て行う μTAS (Micro Total Analysis System) の開発が進んでいる。マイクロ流路内のような微小空間（マイクロ空間）では、分子が拡散するのに必要な時間が距離の2乗に比例して短くなる（例：距離を1/5にすることで反応時間は1/25になる）分子拡散効果が期待されるため、化学反応の効率が飛躍的に向上し、反応時間を大幅に短縮することが可能となる。申請者は、pl単位の液滴のハンドリングが可能な微細化インクジェット装置を用いてマイクロ流路内に抗体を固定化する技術を有している（特願2008-334179、特開2010-8109、図1）。

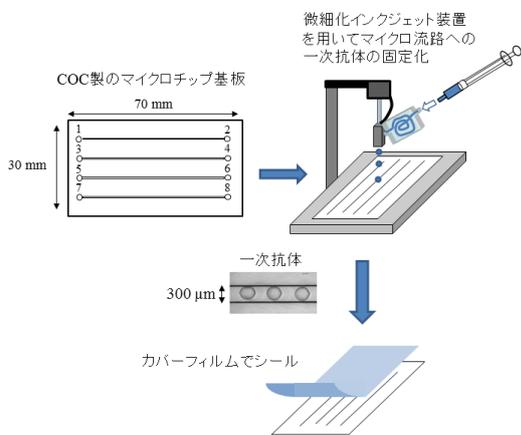


図1. マイクロ流路への抗体の固定化方法

この技術を利用してマイクロ流路内で抗原抗体反応を行い、骨代謝マーカーであるI型プロコラーゲンC末端プロペプチド (PICP) の測定を行った場合、96穴プレートを用いたELISA法では20 μl 必要とする血漿量を1.8 μl に減少し、抗原抗体反応時間も3時間必要としていたものを30分に短縮して定量的な検出が可能なシステムを構築している。

2. 研究の目的

歯周病の診断には、歯周ポケット測定、プロ

ービング時の出血の有無などが用いられているが、測定は術者の熟練度により大きく左右されるという問題がある。一方、近年、各種体液中に含まれるサイトカインなどが歯周病診断の有用なバイオマーカーになると報告されている。しかし、測定操作が煩雑であり、時間がかかることから、診療室では測定されていない。そこで、数cm角のチップ上に微細加工技術を用いて形成された μm 単位の微小な流路（マイクロ流路）内で、高速、高効率に化学操作を行う“ μTAS ”を応用し、診療室でも測定可能な迅速、省サンプル、簡易な歯周病診断デバイスを開発する。

3. 研究の方法

測定対象として炎症性サイトカインであるIL-6とTNF- α を用いる。マイクロ流路内で反応させ、抗原抗体反応時間30分で検出するための最適な条件（抗体濃度、一次抗体の基板への固定化のパターン、ブロッキング条件、抗原抗体反応の温度）を検討する。その後、健常者の血液サンプルを用いて既存法（96穴ELISA法）での測定値とマイクロチップ法での測定値に相関が得られることを確認する。

4. 研究成果

(1) 一次抗体濃度およびHRP標識二次抗体濃度の検討とブロッキング液の検討

一次抗体濃度およびHRP標識二次抗体の濃度を上げることにより、30分で検出できるようになるか確認した。その結果、一次抗体濃度を既存法の250倍の濃度でマイクロ流路に固定化することにより、高感度に検出することが可能になった。また、二次抗体の標識を直接HRPで標識するのではなく、ビオチン標識し、その後、アビジン標識したHRPを反応させることにより、高感度な検出が可能になった。また、流路全体に非特異的吸着が起こらないようにするため、ブロッキング液の種類（BSA、カゼイン、ゼラチン、市販ブロッキング剤：ブロックエース（DSファーマ製）など）とブロッキング時間を検討した。その結果、4%ブロックエースを用いて4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させることで非特異的吸着を抑制できることが分かった。

(2) 一次抗体のマイクロ流路への固定化パターンの検討

化学発光シグナルは、マイクロ流路の底面と一次抗体の接する面積に依存して大きくなる。そこで、この面積ができるだけ大きくなる固定化のパターン（微細化インクジェット装置で吐出する液滴数や液滴を吐出する速度など）の検討を行った。その結果、120 pl

で12滴を吐出し、これを3点まとめて定量することで高感度に検出できることが分かった。

(3) 抗原抗体反応温度の検討

室温、37°C、50°Cで抗原抗体反応を行った結果、37°Cおよび50°Cでは流路全体に非特異的吸着が認められ、室温で反応を行うのが最も高感度に検出できることが分かった。

上記(1)～(3)で決定した条件を用いることにより、抗原抗体反応35分でIL-6とTNF- α の検量線を抗原濃度0～32 pg/mlの範囲で作成することが可能となり(図2, 3)、検出限界はIL-6: 0.28 pg/ml, TNF- α : 0.46 pg/mlであった。

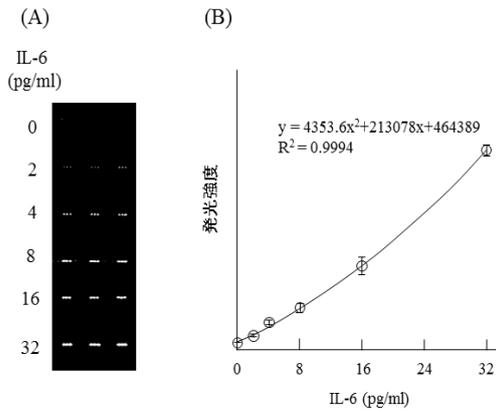


図2. マイクロチップ基板でのIL-6標準品の検出
(A) 検出画像 (B) 検量線

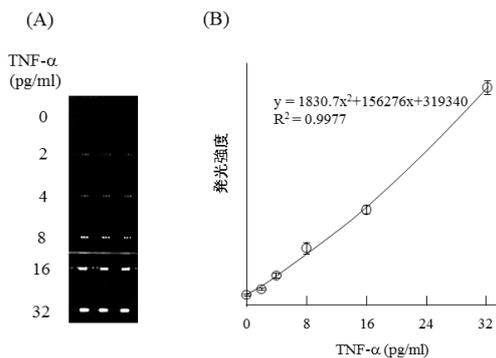


図3. マイクロチップ基板でのTNF- α 標準品の検出
(A) 検出画像 (B) 検量線

また、これらの流路内再現性および流路間再現性はRSD 10%以内となり、非常に良好であった。

(4) 既存法(96穴ELISA法)との相関を確認
健常者から採血した血漿を使用し、96穴ELISA法とマイクロチップ法での測定値に相関が得られるか確認した。その結果、IL-6、TNF- α ともに96穴ELISA法とマイクロチップ法で良好な相関(IL-6: $R^2=0.9954$, TNF- α : $R^2=0.9928$, 図4)が得られた。また、日内再現性と日差再現性を確認したところ、RSDは10%以内であり良好な再現性が得られた(表1, 2)。

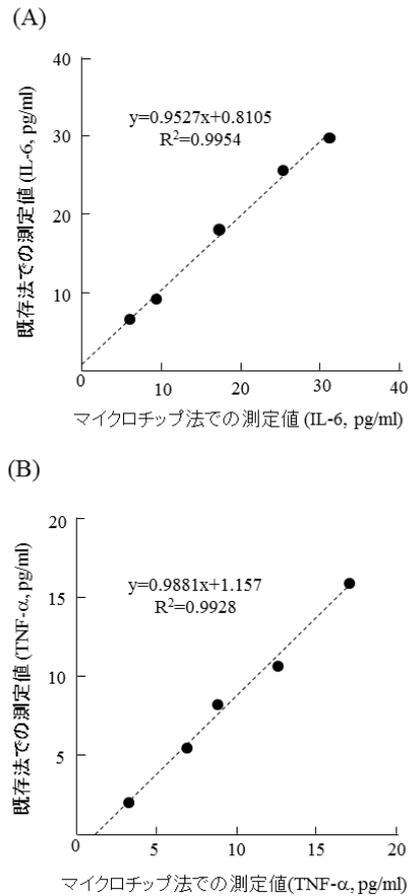


図4. 血漿サンプルの測定における既存法とマイクロチップ法の相関
(A) IL-6 (B) TNF- α

Sample	IL-6	
	Mean \pm SD, pg/ml	RSD, %
Within day, n=3		
1	12.17 \pm 0.70	5.71
2	19.08 \pm 1.39	7.26
3	27.72 \pm 1.43	5.15
Between days, n=3		
4	6.14 \pm 0.26	4.28
5	9.30 \pm 0.67	7.20
6	18.92 \pm 1.73	9.15

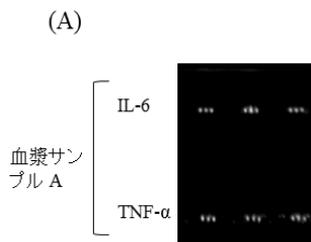
表1. IL-6の血漿サンプル測定における日内再現性および日差再現性

Sample	TNF- α	
	Mean \pm SD, pg/ml	RSD, %
Within day, n=3		
1	6.96 \pm 0.41	5.85
2	11.61 \pm 0.68	5.86
3	19.10 \pm 0.43	2.27
Between days, n=3		
4	6.71 \pm 0.54	8.02
5	12.71 \pm 1.00	7.91
6	15.96 \pm 1.56	9.80

表2. TNF- α の血漿サンプル測定における日内再現性および日差再現性

(5) 1枚のマイクロチップ基板上でIL-6とTNF- α の2種類を同時に検出できるか確認

IL-6とTNF- α の一次抗体を1枚のマイクロチップ基板上の別々の流路に吐出し、それぞれの流路に健常人の血漿を導入し、96穴ELISA法とマイクロチップ法での測定値に相関が得られるか確認した。その結果、IL-6、TNF- α ともに96穴ELISA法とマイクロチップ法で良好な相関(図5)が得られた。



(B)

	既存法での測定値 (pg/ml)	マイクロチップ法での測定値 (pg/ml)	P 値 (Student's t-test)
血漿サンプルA	15.30	14.87	0.51
血漿サンプルB	21.45	23.01	0.27

(C) 図5. 1枚のマイクロチップ基板上でのIL-6とTNF- α の検出
(A) 検出画像 (B) IL-6の測定値 (C) TNF- α の測定値

	IL-6	TNF- α	P 値
血漿サンプルA	10.20	10.77	0.52
血漿サンプルB	15.88	18.72	0.06

図4. 血漿サンプルの測定における既存法とマイクロチップ法の相関
(A) IL-6 (B) TNF- α

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)

- ① Kaori Abe, Yoshiko Hashimoto, Shouki Yatsushiro, Shohei Yamamura, Mika

Bando, Yuka Hiroshima, Jun-ichi Kido, Masato Tanaka, Yasuo Shinohara, Toshihiko Ooie, Yoshinobu Baba, Matatoshi Kataoka

Simultaneous Immunoassay Analysis of Plasma IL-6 and TNF- α on a Microchip
PLOS ONE, 査読有、2013, 8(1), e53620
DOI:10.1371/journal.pone.0053620

[学会発表] (計1件)

- ① 阿部佳織 マイクロチップ基板を用いた血中サイトカインの迅速検出法の構築
第55回春季歯周病学会学術大会、2012年5月18日、札幌コンベンションセンター (北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部佳織 (ABE KAORI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・産総研特別研究員

研究者番号: 60511326