

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288065

研究課題名(和文)コンパクトディスク型マイクロチップを用いるバイオマーカーのイムノアッセイ法の開発

研究課題名(英文)Development of immunoassay for bio-markers using compact disk type microchip

研究代表者

今任 稔彦 (Imato, Toshihiko)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50117066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：イムノアッセイ法は極めて高い感度とすぐれた選択性をもつ分析法であるが、操作が煩雑で長い分析時間を要する点が問題の一つであり、迅速簡便なイムノアッセイ法の開発が期待されている。本研究は、これに応えるべく、コンパクトディスク型マイクロチップを用い、ポンプや注入器、バルブなど不要な新規なフローイムノアッセイ法を開発した。検出法としては、化学発光検出、蛍光検出、及び電気化学検出などについて検討し、バイオマーカーの一つであるイムノグロブリンAや血清中グルコース及び環境中非イオン界面活性剤の測定に本法を適用し、良好な結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Immunoassay is one of the most sensitive and selective analytical methods, which have used for many analytical fields such as environmental monitoring, clinical diagnosis etc. However this method requires somewhat tedious and complicated procedures, such as washing, additions of reagent and simple etc. Therefore immunoassay with more simple and less procedure has been expected for rapid immunoassay. In this project, a simple and rapid immunoassay method was developed by using a compact disk-type microchip with an electrochemical detector, a fluorometric detector or a chemiluminescence detector. The most characteristics of the developed method was the flow of the liquids on the reservoirs on the microchip was achieved by using centrifugal force. In addition, the sequence of the flow could be controlled by the rotation speed of the microchip. The analyses of immunoglobulin A, glucose and nonionic surfactant in environmental water have been achieved by the developed method.

研究分野：分析化学

キーワード：フローイムノアッセイ コンパクトディスク型マイクロチップ バイオマーカー 電気化学検出 蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

免疫測定法は、高い選択結合性を持つ抗体と測定対象成分（抗原）との免疫反応を利用するので、極めて選択性に優れた分析法である。また、抗体や競合させる測定対象成分に酵素や蛍光プローブなどを標識し、その標識物質を吸光、蛍光、化学発光により、あるいは電気化学応答によって検出するので、極めて感度にも優れた分析法である。酵素標識抗原あるいは抗体を用いる免疫測定法（ELISA法）は最も一般的な免疫測定方法であり、医療診断や臨床検査においては数多くの測定キットが利用され、市販されているものもある。このELISA法は、高価なガスクロマトグラフ/質量分析法に匹敵する高感度な分析法であり、多検体試料を同時に測定できるので、このELISA法は環境分析法のスクリーニングに極めて有用な方法となりうる。実際、環境省ではダイオキシン類の分析にELISA法の利用を認めている。将来は、このELISA法がますます重要な分析法となると考えられている。しかしながら、ELISA法の欠点は、種々の試料のウエルへの添加、ウエルの洗浄あるいはウエル表面に結合した抗体や抗原と未反応のそれらの分離などの煩雑な多くの操作が必要で、測定者の高度な技量が不可欠であることである。また、多検体試料の測定は容易であるが、異なる成分を同時に測定することには不向きである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複数成分を同時に、かつ迅速で簡便に測定が可能な免疫測定装置を開発することである。これまで人類が作り出した化学物質は、豊かな社会の建設に貢献してきた。しかしながら、一方、これら人工の化学物質の中には、我々人類にとって有害なものも多く、今日、内分泌かく乱物質として社会問題となっているものもある。これら有害物質による環境汚染成分の計測技術の開発は、安心・安全な社会を構築するために必要不可欠である。また、臨床検査や医療診断においては、バイオマーカーと呼ばれる疾病の指標となる成分から病気を診断する技術も進歩しており、これらバイオマーカーの迅速で高感度な測定法の開発は健康で長寿な社会を構築するためにも必要不可欠である。

著者らは、これまでに抗体固定化磁気ビーズを利用するシークエンシャルインジェクション分析法を開発し、環境水のバイオマーカーとして注目されている雄の魚類中のピテロジェニンというタンパク質の免疫測定に応用するとともに、陰イオン性や非イオン性界面活性剤の免疫測定にも適用している。さらに、企業との共同研究により、上記のアイデアに基づいて、磁気ビーズインジェクション分析装置（Magnetic Microbeads Injection

Analyzer, MMIA 1000）を開発している。本申請課題は、これまでの申請者が開発した方法をポンプを用いず、かつ多成分同時分析法に応用するために、磁気ビーズを用いるコンパクトディスク型マイクロチップフローイムノアッセイ法を開発しようとするものである。

3. 研究の方法

コンパクトディスク（CD型）型マイクロチップは、直径12 cm、厚さ2 mm程度の円盤状のプラスチック板に、溶液を保持するリザーバー（直径3-5 mm）と検出部を幅1 mm、深さ100 μm 程度の細い流路で連結したもので、光リソグラフィ法で作製したテンプレートにポリメチルシロキサンプレポリマーを用いて作製した。CD型マイクロチップの回転には、スリッピングモーターを用いてより、九州計測器（株）に特注して作製した。化学発光検出器は、浜松ホトニクス製ホトンカウンティングユニットによる作製した。電気化学検出には、電気化学アナライザーと用いた。電極はカーボンペースト電極により作製した。CDマイクロチップ上の流体の挙動はファントム社製高速カメラを用いて観測した。

4. 研究成果

1. CD型マイクロ流体基板を用いる非イオン性界面活性剤のフローイムノアッセイ法の開発

溶液リザーバーと検出部およびそれらを連結する幅数100 μm の流路をコンパクトディスク型マイクロチップに作製した流体基板では、1分間に数100から千数百回のスピードで回転することにより、リザーバー中の溶液に加わる遠心力を駆動力として溶液を検出部へと送液することができ、しかもリザーバーを置く位置により遠心力の大きさを変えることができるので、回転速度を制御することにより数か所の溶液リザーバーから溶液を出射させる順序や時間を制御することができる。そこで、CD型マイクロチップを用いる非イオン性界面活性剤（アルキルオキシフェノキシレート、APE）の化学発光/イムノアッセイ法を開発した。

図1のように、マイクロチップに作製したリザーバー1には試料であるAPEとそのHRP標識体の混合試料が、リザーバー2には流路や未反応のAPEとHRP標識APEを洗浄するための溶液が、リザーバー3にはHRPと反応して発光するルミノール溶液が入れている。各リザーバーは流路で連結され、U字型の検出部を通過して排出部に導かれている。U字型の検出部には抗APE抗体を固定化した磁気ビーズが充填されている。

この CD 型マイクロチップを図 2 のような回転数 - 時間のプログラムに従って回転させる。まず 518rpm の回転速度で 10 分間回転し、**リザーバー-1** の溶液を磁気ビーズ部に導入すると、APE と HRP 標識 APE が磁気ビーズ表面の抗 APE 抗体に競合的に結合する。次に、マイクロチップの回転速度を間欠的にゼロと約 700-1400 rpm 間で回転と停止を繰り返して、**リザーバー-2** の洗浄液を少量ずつ検出部に導入し、未反応の APE や HRP 標識 APE を除く。最後に、回転速度を約 1600rpm にして **リザーバー-3** からルミノール溶液を出射すると検出部の抗体に結合した HRP 標識 APE の HRP と反応し、化学発光を発生する。これを検出部上部に配置した光子カウンティングユニットを用いて測定する。

化学発光強度は、ルミノールの導入により徐々に増加し、約 5 分後にはほぼ一定の光強度を示し、そのあと徐々に減少した。化学発光強度の最大値を、それぞれの試料中の APE 濃度の対数に対してプロットすると、APE の濃度の増加に伴って化学発光強度が減少する、いわゆるイムノアッセイに典型的な検量線を得ることができた(図 3)。本法の検出限界は約 10 ppb 程度であり、水道法で定められている水道水中の許容濃度である 20 ppb を十分に満足するものである。

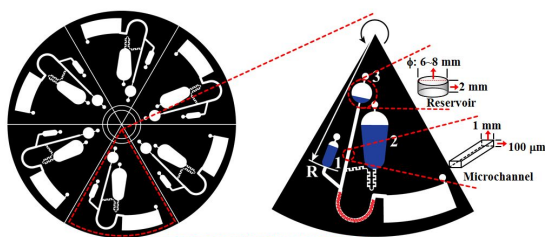


図 1 磁気ビーズを用いる免疫測定のための CD 型マイクロチップ

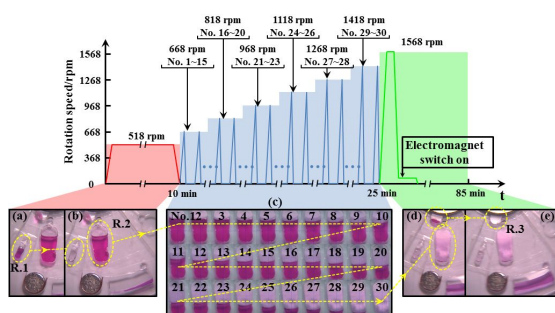


図 2 CD 型マイクロチップを用いる非イオン性界面活性剤の化学発光イムノアッセイ法の回転速度プログラム

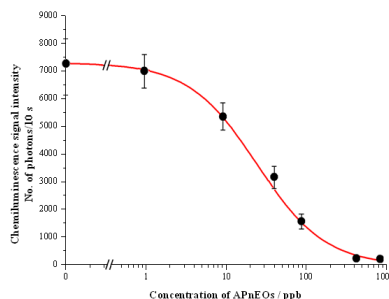


図 3 非イオン性界面活性剤の検量線
2. CD 型マイクロチップを用いるグルコースの酵素電気化学検出法の開発
2-1 マイクロチップへのカーボンペースト電極の作製

過酸化水素は酸化酵素の生成物の一つであるので、これを電気化学的に高感度に測定する技術を開発することは、そのような酵素で標識した抗体を利用する免疫測定法の開発に有用な指針を与える。そこで、カーボンペースト電極 (CPE) 表面を、グラフェン (G) とポリアニリン (PANI) からなるナノコンポジットで修飾する方法を検討した。カーボンペーストは、粒子径約 20 μm のカーボン粒子に、過酸化水素の電極酸化反応を触媒するフタロシアニンコバルト (CoPc) 錯体を混合し、さらに流動パラフィンとポリジメチルシロキサンを混合して作製し、これを深さ 50 μm 、幅 500 μm 、長さ 20 mm の溝に埋め込んでカーボンペースト電極を作製した。一方、ナノコンポジットは、クロロホルムに溶解したアニリンと塩化鉄酸性溶液中で超音波分散したグラフェンを接触させ、その 2 層界面でアニリンの酸化重合で生成したポリアニリンにグラフェンを包埋させて作製した。これを N-メチルピロリドンに分散させ、予め作製したカーボンペースト電極表面に塗布した。その結果、ナノコンポジットで修飾したカーボンペースト電極が未修飾の電極、あるいはコバルトフタロシアニンを含まない電極に比べて、過酸化水素に対して、極めて高い応答感度を示した。図 4 に電極の過酸化水素に対するボルタモグラムを示す。ここで、G-PANI はグラフェン - ポリアニリンナノコンポジットによる修飾を、CoPc はコバルトフタロシアニンを含んでいることを示す。Bare CPE は G-PANI 未修飾で、CoPc を含まない電極を示す。図 7 からわかるように、印加電位が約 0.3 V 付近に過酸化水素の酸化電流ピークが観測されるのに対して、CoPc を含まないカーボンペースト電極では酸化電流はほとんど観測されない。CoPc が過酸化水素に対して電極触媒として作用する。また、G-PANI による修飾は電極における電子移動の活性化を促進するとともに、電極面積を増大させ、電流の増幅に寄与している。

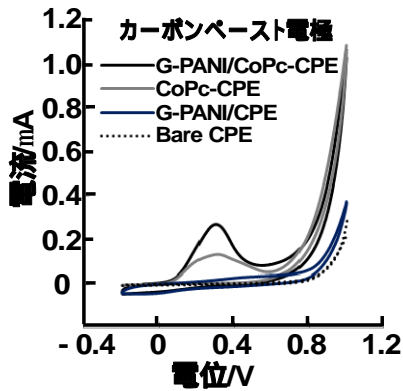


図4 カーボンペースト電極の過酸化水素に対する応答

2-2 CD型マイクロチップにおける過酸化水素に対する電極応答

図5のような、螺旋流路を持つCD型マイクロチップを作製した。リザーバー1, 2には過酸化水素溶液を、リザーバー3にはリン酸緩衝液を入れ、カーボンペースト電極の印加電位を0.4 Vに設定した。CD型マイクロチップを回転台にセットし、30秒で回転速度を約960 rpmにあげ、その後420秒間一定の回転速度に保った。その後、30秒間で回転を止めた。その結果、回転開始から150秒後にはリザーバーから出た過酸化水素溶液はカーボンペースト電極に到達し、短時間で鋭い電流信号が得られた。これは、電極検出器における充電電流でその後すぐに一定の電流を示した。この電流は、いわゆるハイドロダイナミック電流で、過酸化水素に対する酸化電流である。リザーバーの過酸化水素溶液の濃度を変化させて、酸化電流を測定したところ、図10のように酸化電流は過酸化水素濃度の比例することが分かった。



図5 電極検出器を備えたCD型マイクロチップ

2-3 CD型マイクロチップの螺旋流路内におけるグルコースオキシダーゼとグルコースの酵素反応と過酸化水素生成物の電気化学測定

図5のCD型マイクロチップのリザーバー

1に濃度の種々異なるグルコース溶液を、リザーバー2に酵素活性100Uのグルコースオキシダーゼ溶液を、リザーバー3にリン酸緩衝液を入れ、カーボンペースト電極の印加電位を0.4 Vに設定した。上述と同じような回転速度プログラムに従って、回転した。回転によりリザーバー1と2から出射した溶液は螺旋流路中で混合し、酵素反応に伴って過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素は、下流に設置したカーボンペースト電極に到達し、酸化電流が検出される。この過程で得られたカーボンペースト電極における電流応答を図6に示す。スパイク状の充電電流ののち、一定の電流値が観測されており、その電流値はほぼグルコース濃度に比例している。このことは、グルコースオキシダーゼの酵素量はグルコースに対して十分高く、酵素反応で生成する過酸化水素がグルコースに比例していることを示す。この結果をもとに、リザーバー1にノーマルレベルとハイレベルでグルコースを含むコントロール血清中のグルコースを測定した結果、得られたグルコース濃度はコントロール血清の表示値と5%の誤差内で一致することが分かった。

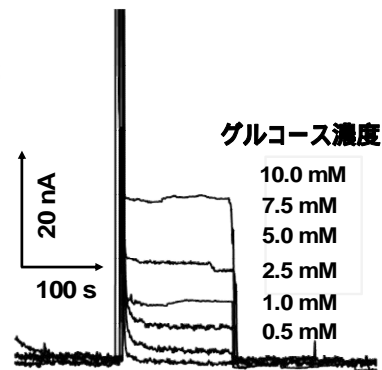


図6 グルコースオキシダーゼ酵素反応を利用したグルコースの検出

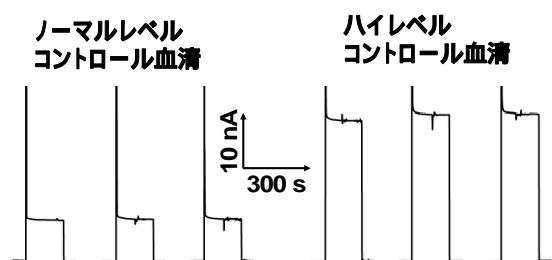


図7 本法によるコントロール血清中のグルコースの定量

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6件)

(1) Shuai GUO, Ryoichi ISHIMATSU, Koji NAKANO, Toshihiko IMATO, “Automated Chemiluminescence Immunoassay for a Nonionic Surfactant using a Recycled Spinning-pausing Controlled Washing Procedure on a Compact Disc-type Microfluidic Platform”, *Talanta*, 133, 100–106 (2015).

(2) Poomrat RATTANARAT, Prinjaporn TEENGAM, Weena SIANGPRON, Ryoichi ISHIMATSU, Koji NAKANO, Orawon CHAILAPAKUL, Toshihiko IMATO, “An Electrochemical Compact Disk-type Microfluidics Platform for Use as an Enzymatic Biosensor”, *Electroanalysis*, 27, 703 – 712 (2015)

(3) Shuai GUO, Ryoichi ISHIMATSU, Koji NAKANO, Toshihiko IMATO, “Application of Carbon Quantum Dots in Electrogenerated Chemiluminescence Sensors”, *Journal of Flow Injection Analysis*, 32, 75-80 (2015).

(4) Shuai GUO, Toshihiko IMATO, “Recent Development in the Fundamental Functions of Compact Disc-type Microfluidic Platform” *Journal of Flow Injection Analysis*, 32, 81-87 (2015).

(5) Shuai Guo, Toshihiko Imato. “Fundamental Performance of Compact Disc-type Microfluidic Platform” *J. Flow Injection Anal.*, 30, 21–27 (2013).

(6) Shuai Guo, Toshihiko Imato, “Application of Compact Disc-type Microfluidic Platform to Biochemical and Biomedical Analysis”, *J. Flow Injection Anal.*, 30, 29–35 (2013).

〔学会発表〕(計12件)

(1) T. Imato, “Electrochemical sensing on compact disk-type microfluidics platform”, 2014 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry (2014年8月)

(2) T. Imato, “Flow-based Analysis on Compact Disk-type Microchip”, TRF Seminar Series in Basic Research CVIII, Analytical Science: Past, Present and Future, (2015年1月)

(3) T. Imato, “Flow analysis using streams driven by centrifugal force”, *Flow Analysis XIII*, Prague, Czech Republic, July 5-10, 2015.

(4) T. Imato, “Electrochemical and optical analysis on compact disk-type microchip”, The Fifteenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry, August 13-16, 2015, Changchun, China.

(5) T. Imato, “Electrochemical sensing on compact disk-type microfluidics platform”, 2015 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry, 2015, October 13-15, Busan, Korea.

(6) H. Tagami, R. Ishimatsu, K. Nakano, Y. Chen, Z. Chen, P. Rattanarat, P. Teengam, O. Chailapakul, T. Imato, “Flow-based chemical analysis using streams driven by centrifugal force”, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015, 15-20, Honolulu, Hawaii, U. S. A.

(7) Ryosuke Tsutusmi, Shuai Guo, Ryoichi Ishimatsu, Poomarat Rattanarat, Prinjaporn Teengam, Chaliapakul Orawon, Koji Nakano, Toshihiko Imato, “Compact disk-type microfluidics equipped with electrochemical detector”, *Matrafured* 2014, 2014, June, 15-20, Visegrad, Hungary.

(8) Poomarat Rattanarat, Prinjaporn Teengam, Chaliapakul Orawon, Ryoichi Ishimatsu, Koji Nakano, Toshihiko Imato, “Fabrication of an electrochemical detector by a screen printing method on a compact disk-type microfluidic platform and its performance”

日本分析化学会第63年会、広島大学、平成26年9月17 - 19日。

(9) 田上裕典、石松亮一、中野幸二、今任稔彦、スパイラル状流路を持つCD型流体基板上での蛍光イムノアッセイ、日本分析化学会第63年会、広島大学、平成26年9月17 - 19日。

(10) 田上裕典、石松亮一、中野幸二、今任稔彦、CD型流体基板上での光固定化法を用いた蛍光イムノアッセイ法の開発、日本分析化学会第64年会、九州大学、平成27年9月9 - 11日

(11) 今任稔彦、磁気ビーズインジェクション法によるフローイムノアッセイ、日本分析化学会第63年会、広島大学、平成26年9月17 - 19日。

(12) Poomarat Rattanarat, Prinjaporn Teengam, Chaliapakul Orawon, Ryoichi Ishimatsu, Koji Nakano, Toshihiko Imato, “Electrochemical sensing on compact disk-type microfluidics platform”, 寧夏大学及び北方民族大学講演会 平成26年9月25日、26日寧夏省銀川市。

〔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

[http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatola
b/index-j.html](http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatola/b/index-j.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

今任稔彦（INATO TOSHIHIKO）

九州大学大学院・工学研究院・教授

研究者番号：50117066