

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26889025

研究課題名(和文)バイオマーカー早期検出のための表面プラズモン増強型蛍光バイオセンサの開発

研究課題名(英文)Development of surface plasmon-enhanced fluorescence biosensor for early detection of biomarkers

研究代表者

當麻 浩司(Toma, Koji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40732269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、疾患などの可能性を探る指標になる生体分子を、高感度に測定することができる光センサを開発することであった。26年度にはセンサチップの作製にあたり、シミュレーションを用いて最適な構造や材料を検討行うとともに、装置や装置を動かすためのシステムの開発を行った。27年度には、炎症性疾患、自己免疫性疾患、悪性腫瘍などとの関連性が報告されているマイクロパーティクルのモデルサンプルを測定し、濃度に応じた出力を観察した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to develop an optical biosensor that enables sensitive measurement of marker biomolecules which are used to estimate a potential risk of diseases. In fiscal year 2014, a proper structure or material of a sensor chip were investigated by simulation, and an experimental setup and its controlling system were developed. In fiscal year 2015 year, along with optimizing and tuning the development of the setup and the system, a model sample of microparticles which correlate to inflammatory diseases, autoimmune disorder, and malignancies was measured. It was observed that the sensor output increased with increased concentration of the sample.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：表面プラズモン バイオセンサ 蛍光

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降のゲノミクスやプロテオミクス、バイオインフォマティクスの急速な発展により疾病の原因やバイオマーカーとなる生体分子が数多く発見されてきた。例えば直径が0.1~1 μm程度の膜小胞であるマイクロパーティクルは、親細胞由来のタンパク質、脂質、核酸などを含み、それらを輸送することで炎症性疾患、自己免疫性疾患、悪性腫瘍、血栓性疾患、心疾患など様々な疾病に関わっていると考えられている。現在マイクロパーティクルの検出に広く使用されている方法として、フローサイトメトリーや酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)などがある。蛍光活性化セルソーター(fluorescence activated cell sorting, FACS)を含むフローサイトメトリーでは、光の散乱や蛍光を通してマイクロパーティクル数を定量的に計測する。しかしながら、フローサイトメトリーを行う前にはマイクロパーティクルを予め様々な成分を含んだ血液などのサンプルから分離・抽出しておく必要があることや、両方法に共通する問題点として、訓練を受けた専門技術者や研究施設で特別な装置を用いる必要があり、一般的には正確な結果を得るために数時間から数日かかってしまう。そのため、マイクロパーティクルの検出には時間や場所の制限を受けるとというのが現状である。さらに測定感度などの問題から注射器を使った採血などの侵襲的な方法で多量のサンプルを集める必要があるため、被験者にかかる精神的・肉体的な負担が大きい。以上のような理由から、高い選択性を有し、超高感度かつ簡便に検体を検出できる技術が求められている。特に非侵襲的に採取した少量のサンプルから分離することなく、そのままその場でマイクロパーティクルを検出できれば、被験者の負担が少ない新たな早期疾病診断法へ応用することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高感度・リアルタイム測定が可能な表面プラズモン増強型蛍光バイオセンサを開発し、疾病の指標であるバイオマーカーを簡便に検出できる要素技術を構築することである。金属薄膜-誘電体界面に誘起される伝搬型の表面プラズモンポラリトン(surface plasmon polaritons, SPPs)を用いた、バイオセンサは界面における分子吸着を高感度に測定する手法として広く用いられている。また更に高感度な測定を可能にする方法として、SPPsによる蛍光増強(surface plasmon-enhanced fluorescence, SPF)を利用した測定技術がある。SPFでは、SPPsによって増強された金属界面近傍の電場が蛍光色素分子の蛍光放出量を増加させる。また同時に、SPPsは金属表面から垂直方向200 nm程度に局在されているため、それより離れたところを浮遊している蛍光色

素分子は励起されない。つまり表面に吸着した分子のみを励起するため、光ノイズが低減し、信号対ノイズ(signal to noise, SN)比が向上する。採取サンプルから分離・抽出することなく、リアルタイム・高感度に検出することが可能になれば、疾病の早期発見・治療が可能となり、予防・完治への多大な貢献が期待される。本研究では特に、炎症性疾患、自己免疫性疾患、悪性腫瘍などとの関連性が報告されているマイクロパーティクル(microparticle)の検出を試みる。膜の外側に存在するホスファチジルセリン(phosphatidylserine, PS)に特異吸着するアネキシンA5(Annexin A5)などのタンパク質を利用し、表面プラズモンによって高感度化された蛍光バイオセンサによる超低濃度検出システムを構築し、新しい疾病診断法への応用を目指す研究であった。

3. 研究の方法

(1) SPFを利用した蛍光バイオセンサの高感度化を実現するために、蛍光シグナル増強に最適な表面プラズモンを励起するための構造、材料などを検討した。検討方法としては、有限要素法(finite element method, FEM)などのシミュレーションや数値計算を用いた。それらの方法を通じて、電場増強率、作製の簡単さ、蛍光アッセイ中で用いる波長に応じた表面プラズモン励起のために最適な構造(平坦・グレーティング)や材料(金・銀・アルミニウム)などを検討した。

(2) 表面プラズモン増強型蛍光バイオセンサを使って実験を行うための装置やその制御・解析システムを構築した。基板の配置にはもっとも広く使われているクレッチマン配置を採用し、全反射測定法(Attenuated Total Reflection, ATR)を用いて表面プラズモン励起した。光源にはレーザー、もしくは白色光源を利用し、フォトダイオード(photo diode, PD)検出器で反射光を検出することにより、蛍光と同時に非標識検出も可能にした。蛍光標識から放出された蛍光はレンズを通して光電子増倍管(photomultiplier tube, PMT)に集光し、その強度を計測した。センサ基板表面にフローセルを装着することで、サンプル吸着速度を調整したり、リアルタイムのサンプル交換やリンスを行うことができる。制御システムはC++やPythonを用いて構築し、解析プログラムはWolfram Research社のMathematica等を用いて組み上げた。これらの装置やシステムにより、作製した基板の光学的性質の同定や、バイオセンシングを可能にした。

(3) マイクロパーティクルのモデルサンプルとして表面上にPSが現れている単層リポソームを用いて、構築した表面プラズモン増強型蛍光バイオセンサの感度・検出時間・選択性の検証を行った。表面修飾法は以下の二

つを検討した。①センサ表面を PS が含まれた脂質二分子膜で修飾後、アネキシン A5 二量体を吸着させた。片方のアネキシン A5 でマイクロパーティクルを補足後、蛍光標識したアネキシン A5 で検出した。この時脂質二層膜を形成するためにセンサ表面は二酸化ケイ素 (SiO_2) 層で覆った。②センサ表面をポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG)・ピオチン混合チオール自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer, SAM) で修飾し、その後ストレプトアビジンが結合した補足アネキシン A5 を SAM のピオチン部に吸着させた。マイクロパーティクルの補足後に蛍光標識したアネキシン A5 を吸着させ、その蛍光を検出した。

4. 研究成果

(1) SPF には最も作製が簡易であり、バイオセンサのための表面修飾法が多数考案されている金平膜を用いることとした。また金は化学的にも安定で、生体試料の様な過酷な環境下でも使用できるため、都合が良い。シミュレーションには FEM を使い、金平膜に対して様々な波長と入射角で分散関係を調べたところ、波長が近赤外に近づくにつれ、プラズモン特性は良くなる結果が得られた。しかし、実験に使用する光源や、蛍光色素を勘案し、可視光である波長 633 nm の励起光を採用することとした。数値計算の結果、ガラス基板 (屈折率 $n_g = 1.845$)、金 (膜厚 50 nm、 $n_{\text{Au}} = 0.16 + 3.6i$)、水 ($n_w = 1.333$) の積層構造に、入射角を変えながら波長 633 nm の光を照射すると、入射角が 51.2 deg の時に共鳴による光の吸収が起こる (Fig. 1a)。また、励起された金-誘電体界面の SPPs によって、電場強度が約 50 倍増強することも確認された (Fig. 1b)。蛍光分子からの蛍光強度は、その励起光強度に比例することから、SPPs を用いない場合に比し 50 倍程度高い蛍光シグナルが得られることが予想される。次に SPF バイオセンサの構築を行った。クレッチマン配置用のプリズムや基板ホルダー、フローセルなどをデザイン・作製し、光学系を配置した。

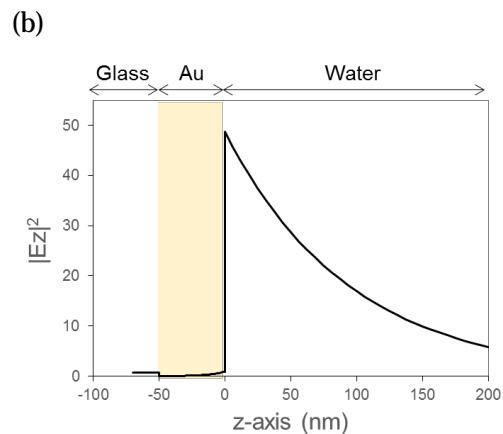
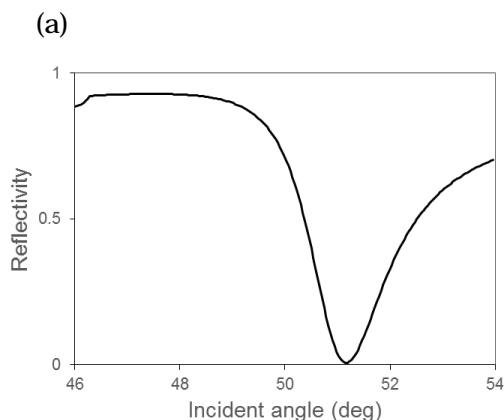


Fig. 1(a) ガラス基板中にて励起光の入射角を変化させた時の反射率の変化。(b) 共鳴角におけるガラス基板、金薄膜、水中の電場強度の垂直方向成分

(2) SPF バイオセンサの構築では、制御システムや得られたデータを解析するシステムを構築し、測定に必要な角度スキャン、キネティクス測定、ステージ移動の制御が可能となった。ハードウェア面でも、反射光と蛍光との同時計測を可能にし、フローセルを装着することで、サンプルのリアルタイムな交換やリンスを行うことができるようになった。

(3) マイクロパーティクルのモデルサンプルである小型単層リポソーム (SUV) を用いた SPF バイオセンサの評価を行った。はじめに①センサ表面 (SiO_2 表面) に脂質ベシクルを付加したところ、支持脂質二分子膜の形成に伴い、出力 (反射率) が上昇する様子が観察された。そこへ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアネキシン A5 の二量体を結合させたところ、出力が飽和する様子が観察された。SUV を付加し、リンス後に蛍光色素 (Cy5) で標識されたアネキシン A5 を付加したところ非常に高い出力が得られた。しかしながら、対照実験として、SUV を加えずに Cy5 標識アネキシン A5 を付加したところ、高い蛍光出力が観察された。これは SUV 検出用のアネキシン A5 も、補足用と同様に PS を認識して結合するため、 SiO_2 表面に形成した脂質に分子膜へも結合してしまうことが原因と考えられる。その結果、高いノイズ (低い SN 比) となることが分かり、このアッセイにてマイクロパーティクル検出することは困難であることが明らかとなった。

続いて②センサ表面 (金薄膜表面) をポリエチレングリコールとピオチン混合チオールの自己組織化単分子膜で修飾し、ストレプトアビジンが結合したアネキシン A5 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をピオチンへ吸着させた。その後、蛍光色素標識され、ホスファチジルセリンが表面上に現れている SUV (1-10 ng/mL) を測定した。その結果、アネキシン A5 の吸着に

伴い共鳴角のシフトが見られた。また、SUVがセンサ表面上のアネキシン A5 へ結合する様子が、蛍光の増加として観察されたことから、構築した SPF バイオセンサの有用性が示された。

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)

[学会発表] (計 5 件)

① Toma K, Kano H, Offenhausser, A, Label-free high resolution surface plasmon microscopy for quantitative cell-gold interface investigation, Pacificchem 2015, December 19, 2015, Hawaii (USA).

② Toma K, Miki D, Yoshimura N, Miyajima K, Arakawa T, Yatsuda H, Mitsubayashi K, Repetitive immunosensing with a highly stable protein monolayer and surface acoustic wave device for allergen monitoring, Pacificchem 2015, December 16, 2015, Hawaii (USA).

③ Toma K, Miki D, Yoshimura N, Miyajima K, Arakawa T, Yatsuda H, Mitsubayashi K, Repetitive immunoassay with a regeneration resistant protein and surface acoustic wave device for allergen monitoring, EuroAnalysis September 8, 2015, Bordeaux (France).

④ Toma K, Kano H, Offenhausser A, Label-free measurement of cell-gold cleft gap distance using surface plasmon microscopy, Pittcon 2015, March 08, 2015, New Orleans (USA).

⑤ Toma K, Kano H, Offenhäusser A, Label-free investigation of cell-electrode interface with surface plasmon microscopy, International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications (Bio4Apps) 2014, November 17, 2014, Shanghai (China).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

當麻 浩司 (TOMA, Koji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号 : 4 0 7 3 2 2 6 9