

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24245013

研究課題名(和文)次世代診断チップの開発とその臨床診断への応用

研究課題名(英文)Development of next-generation diagnostic chip and its application to clinical diagnosis

研究代表者

渡慶次 学 (Tokeshi, Manabu)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60311437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症診断のための、パネル化診断チップの開発を行った。糖尿病性腎症のバイオマーカーのパネルとして、MCP-1、L-FABP、Angiotensinogen、CTGFおよびCollagen IVを選定した。標準試料および患者検体を用いて、開発したパネル化診断チップの性能評価を行ったところ、わずか12分の測定時間で、試料・試薬量0.5 μ Lで、従来のELISA法と同様な結果を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a diagnostic chip with a five biomarker panel for diabetic nephropathy. The biomarker panel of MCP-1, L-FABP, Angiotensinogen, CTGF, and Collagen IV was adopted for diabetic nephropathy. With standard and patient samples, we evaluated the performance of the panel diagnostic chip. For the detection of biomarkers, we confirmed the chip provides rapid analysis (total assay time of 12 min) with high sensitivity and it uses small volumes of the sample and reagent (0.5 μ L each), and the obtained results correlated with that of conventional ELISA.

研究分野：マイクロ化学システム

キーワード：チップ分析 免疫分析

1. 研究開始当初の背景

血中や尿中のバイオマーカーは、疾病診断や疾病管理に広く利用されており、極めて有効な診断指標である。現在では様々なバイオマーカーが臨床において用いられており、新規バイオマーカーの探索が世界中で繰り広げられている。申請者は、1998年から微量検体中のバイオマーカーを迅速かつ高感度に検出するためのビーズ充填型の免疫分析チップの開発に取り組んできた。流路内に導入したビーズの表面を抗原抗体反応の反応場として利用することで、迅速・高感度分析を可能にした (*Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).)。また、このチップを用いて血清サンプルの分析に世界で初めて成功した (*Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).)。これらの成果は世界的にも高く評価されており、免疫分析チップの開発では世界のトップレベルにある。しかし、このビーズ充填型のプラットフォームは、1検体1項目測定を基本としており、1検体多項目測定を行うには、複数のチップ・測定機器類が必要になる。そこで申請者は、1検体多項目測定が可能な光硬化性樹脂を利用した新規免疫分析チップを開発した (NEDO 産業技術研究助成事業: H19-21)。このチップは、抗体が固定化された微小ビーズが多数包埋されているハイドロゲル構造体がマイクロ流路内に構築されており、その構造体を抗原抗体反応の反応場に利用する。このプラットフォームは、ビーズ充填型に比べると、微量 (試料・試薬量: 0.25 μL)、迅速 (測定時間: 4分)、高感度、簡便 (試料導入・排出はピペットのみ) であり、必要試料・試薬量および測定時間は申請者が知る限り世界最高性能である (*Lab Chip*, **10**, 3335 (2010).)。このチップは、僅か 0.25 μL で1検体の分析が可能なることから、複数流路を配置したマイクロチップを用いることで、超微量検体で複数項目の同時測定が可能である。申請者は、このチップを用いることで、血中・尿中のバイオマーカーを含むたんぱく質の同時測定による統計解析が実現できると着想した。疾病は多因子が複雑に関与して進行しており、1つのバイオマーカーのみが血中・尿中に放出されるわけではない。したがって、統計解析により、病態ステージ・病期ステージに強く相関したマーカー群を抽出できれば、それらをパネル化して搭載した革新的な診断チップを構築することができる。これが実現すれば、診断精度の向上のみならず、疾病の早期発見、疾病の重篤化の予想など、さまざまなメリットを有する診断法となりうる。

2. 研究の目的

本研究では、超微量試料中の複数のたんぱく質 (5~20種類) を簡便かつ迅速に定量分析が可能な分析チップを開発する。具体的には、5 μL 以下の血液・尿をサンプルとして、測定濃度領域が大きく異なる複数のたんぱく質を、10分程度で同時測定することが可能

な分析チップを開発する。糖尿病性腎症をモデルとして、様々な病態ステージの糖尿病性腎症患者の血液・尿サンプルに対してバイオマーカー候補群を用いて測定・統計解析し、病態ステージごとに強く相関するバイオマーカーの組合せを抽出する。抽出されたバイオマーカーセットをパネル化して搭載した診断チップを開発することを最終目的とする。これにより、未だ有効な診断技術のない糖尿病性腎症に対する診断法を確立できれば、臨床医学的にも大きなブレイクスルーとなる。

3. 研究の方法

本研究では、先に述べた研究目的を達成するために、先行研究で開発した免疫分析チップの高感度化と高性能化、並列化を行うことで、測定濃度領域が大きく異なる複数のたんぱく質 (5~20種類) を、10分程度で同時測定することが可能な分析チップを開発する。さらに、開発チップを用いて、様々な病態ステージの糖尿病性腎症患者の血液・尿サンプルを、バイオマーカー候補群を用いて測定・多変量解析し、病態ステージごとに強く相関するバイオマーカーの組み合わせを抽出する。抽出されたバイオマーカーセットをパネル化して搭載した診断チップを試作し、その性能評価を行い、未だ有効な診断技術のない糖尿病性腎症に対する診断法の開発を目指す。

具体的には、研究目的を達成するために、(1) 解析チップの開発、(2) バイオマーカー候補群の選定、(3) バイオマーカー群のパネル化、(4) パネル化診断チップの試作と評価、(5) 実用化のための要素技術開発、を実施する。

4. 研究成果

(1) 解析チップの開発

チップの高感度化を目的として、高性能ラベル化剤の検討と、抗原-抗体反応の反応場の最適化を行った。

高性能ラベル化剤の検討

従来の有機系蛍光色素に代わる新しい蛍光ラベル化剤として、量子ドットの使用を検討した。CRP のサンドイッチアッセイを評価モデルとして、量子ドットを標識した二次抗体を用いて、免疫分析を行った。評価結果より、量子ドット標識二次抗体は、マイクロ流路内に構築したハイドロゲル構造体の内部に浸透しにくいということが分かった。ゲルのポアサイズ (数 100 nm) を考慮すると、使用した量子ドットのサイズではなく、使用した量子ドットの化学的性質によるものだと考えられる。量子ドット標識二次抗体のゲル内への導入効率を向上させるためには、量子ドットの表面処理が必要になると考えられる。

抗原-抗体反応の反応場の最適化

従来の免疫分析チップ(Lab Chip, 10, 3335 (2010).)では、直径 1 μm のポリスチレンビーズの表面に一次抗体を物理吸着により固定化していた。この場合、抗体はビーズ表面にランダムかつ直接吸着するため、吸着した抗体の中には、抗体の抗原認識部位が抗原と反応しにくい配置で吸着するものも多数存在すると考えられる。そこでこれらを改善する目的で、化学結合で抗体を固定化できるアフィニティービーズの使用について検討し

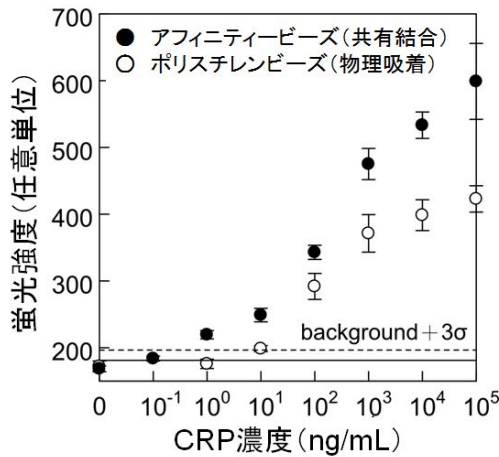


図1 CRPの検量線(アッセイ時間:12分、試料量 0.5 μL)

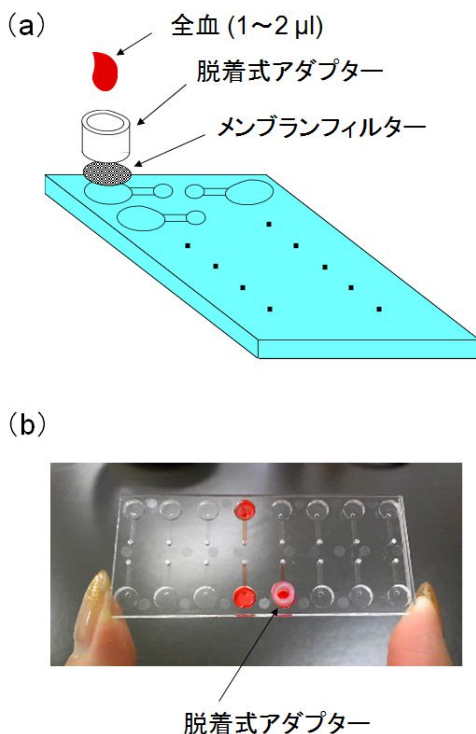


図2 血球分離用フィルター付きアダプター (a)概略 (b)写真

た。直径 1 μm のアフィニティービーズが手に入らなかったため、直径 5 μm のビーズを使用した。アフィニティービーズでは、ビーズ表面を修飾するポリマーのアミノ基と共有結合させることで、抗体の運動の制約が大幅に減少し、抗原との結合に有利な配向を取ることができると考えた。CRP を評価モデルとして、開発した免疫分析チップの性能評価を行った。図1にCRPの検量線を示す。比較のために、従来のポリスチレンビーズ(物理吸着)の結果も示す。期待したように、アフィニティービーズを用いた場合の感度が従来のポリスチレンビーズの場合より高くなった。検量線から得られた検出限界(LOD)は、それぞれ 0.1 ng/mL (アフィニティービーズ)と 10 ng/mL (ポリスチレンビーズ)となった。

また、血液および尿を前処理せずに直接チップに導入できるように、チップの試料導入口に接続できる着脱式の血球分離用フィルター付きアダプターを開発した(図2)

- (2) バイオマーカー候補群の選定
- (3) バイオマーカー群のパネル化

糖尿病性腎症の尿中バイオマーカーの候補群として、予備実験および文献を参考にし、MCP-1、L-FABP、Angiotensinogen、CTGF および Collagen IV を選定した。また、糖尿病性腎症診断用チップの開発においてリファレンスとして不可欠な糖尿病性腎症モデル尿検体ライブラリーの構築を行った。具体的には、糖尿病性腎症の病期(ステージ:0、1、2、3A、3B、4期)の異なる患者から尿を採取し、尿中の MCP-1、L-FABP、Angiotensinogen、CTGF および Collagen IV の濃度を市販の抗体を用いた ELISA により測定した(図3)。これにより、各バイオマーカーの濃度が明らかな糖尿病性腎症ステージ

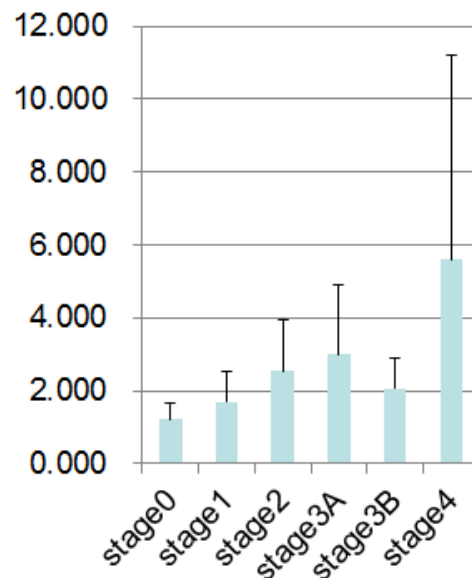


図3 MCP-1濃度とステージの相関(グラフの縦軸は尿中クレアチニン濃度で規格化)

別モデル検体ライブラリーを構築した。さらに、血液検体の収集作業にも着手し、糖尿病性腎症ステージ(0、1、2、3A、3B、4期)の患者から血漿を採取・保存し、リファレンス用血液検体ライブラリーの構築も行った。

(4) パネル化診断チップの試作と評価

選定したバイオマーカーをパネル化した診断チップを試作し、標準試料およびステージの異なる患者検体を用いて試作した診断チップの性能を評価した。図4にL-FABPの例を示す。患者検体(尿)の測定結果は、標準試料の検量線に対応した濃度に良く一致した。図4の検量線から求めた検出限界(LOD)は、20 pg/mLであった。また、図5に試作した診断チップとマイクロタイタープレートの測定結果の相関を示す。患者検体数が十分ではないが、両者の結果は良い相関を示した。その他のマーカーについても同様に、良い結果を得ることに成功した。

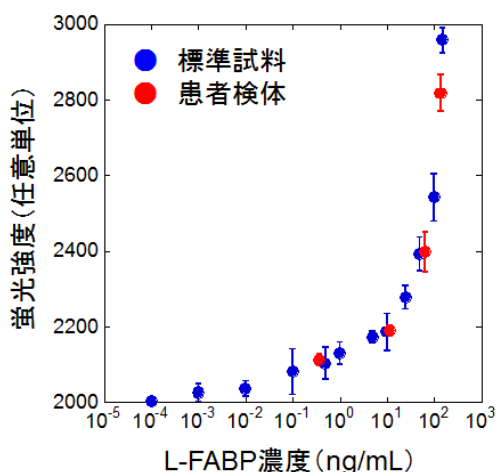


図4 L-FABPの検量線

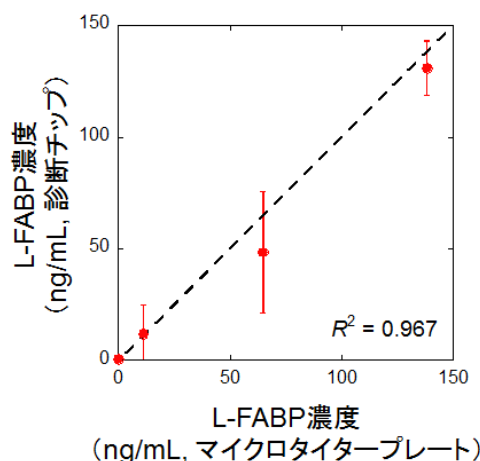


図5 診断チップとマイクロタイタープレートの測定結果の相関

(5) 実用化のための要素技術開発

(4)で開発した診断チップ用の小型蛍光検出器の概念設計を行った。また、概念設計した小型蛍光検出器で検出しやすいハイドロゲル構造体の形状についても検討した。

さらに、簡便に検出するという点を考慮して、構造体全体で均一な蛍光強度を得るために、ビーズに抗体を固定化するのではなく、構造体を構成するポリマーの表面に直接抗体を固定化する方法についても検討した。

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)

[雑誌論文](計13件)

Toshihiro Kasama, Mai Ikami, Keiko Yamada, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Rapid, Highly Sensitive, and Simultaneous Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Milk by Using Immuno-Pillar Devices, Analytical Methods, 7, 5092-5095 (2015). 査読有
DOI:10.1039/C5AY00698H

西脇奈菜子、笠間敏博、石田晃彦、谷博文、馬場嘉信、渡慶次学、イムノピラーデバイスの高性能化：抗体固定化担体の改良、分析化学、64巻、329-335 (2015)、査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/64/5/64_329/_pdf

Toshihiro Kasama, Yutaka Hasegawa, Haruyuki Kondo, Tsutomu Ozawa, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Development of Immuno-Wall Devices and a Mobile Fluorescence Reader for On-Site Sample-to-Answer Immunoassay, Proc. MicroTAS 2014, 1, 935-937 (2014). 査読有

Nanako Nishiwaki, Toshihiro Kasama, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Yoshinobu Baba, Manabu Tokeshi, Development of 3rd Generation Immuno-Pillar Device for High Sensitive Detection of Disease Markers, Proc. MicroTAS 2013, 1, 1164-1166 (2013). 査読有

http://www.rsc.org/images/loc/2013/PDFs/Papers/390_0674.pdf

Miaomiao Sun, Toshihiro Kasama, Noritada Kaji, Shin-ichi Akiyama,

Yukio Yuzawa, Seiichi Matsuo, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Rapid Urine-Based Clinical Diagnosis of Diabetic Nephropathy with Femto-Molar Sensitivity by Immuno-Pillar Devices, Proc. MicroTAS 2012, 1, 812-814 (2012).
査読有
<http://www.rsc.org/images/loc/2012/pdf/M.8.185.pdf>

[学会発表](計 36 件)

Nanako Nishiwaki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Toshiriro Kasama, Yoshinobu Baba, Manabu Tokeshi, Simultaneous Detection of Multiple Disease Markers Using Immuno-Wall Devices, 7th International Symposium on Advanced Plasma Science and Its Applications for Nitrides and Nanomaterials/8th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (ISPlasma2015/IC-PLANTS2015), 2015 年 3 月 30 日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

Manabu Tokeshi, Point-of-Care Diagnostics and Biomedical Applications Using Microfluidic Devices, Lab-on-a-Chip ASIA, 2014 年 11 月 21 日, Singapore (Singapore)

Nanako Nishiwaki, Toshihiro Kasama, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Yoshinobu Baba, Manabu Tokeshi, Development of 3rd Generation Immuno-Pillar Device for High Sensitive Detection of Disease Markers, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), 2013 年 10 月 29 日, Freiburg (Germany)

Nanako Nishiwaki, Toshihiro Kasama, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Yoshinobu Baba, Manabu Tokeshi, Development of Immuno-Pillar Chip for Biomarker Detection in Clinical Diagnosis, The 5th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2013), 2013 年 5 月 18 日, Xiamen (China)

Miaomiao Sun, Toshihiro Kasama, Noritada Kaji, Shin-ichi Akiyama, Yukio Yuzawa, Seiichi Matsuo, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Rapid Urine-Based Clinical Diagnosis of Diabetic Nephropathy with Femto-Molar Sensitivity by Immuno-Pillar Devices, The 17th International Conference on

Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), 2012 年 10 月 29 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

[その他]

ホームページ等

http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/tokeshi_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡慶次 学 (TOKESHI, Manabu)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 60311437

(2) 研究分担者

湯澤由紀夫 (YUZAWA, Yukio)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 00191479

秋山 真一 (AKIYAMA, Shinichi)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号: 20500010

(3) 連携研究者

谷 博文 (TANI, Hirofumi)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 10271644

石田 晃彦 (ISHIDA, Akihiko)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 20312382