

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288071

研究課題名(和文) 機能性粒子によるシグナル増幅法を採用した超高感度バイオマーカーの免疫アッセイ

研究課題名(英文) Highly-sensitive Immunosensing Based on Signal Amplification Systems by Functional Particles

研究代表者

水谷 文雄 (Mizutani, Fumio)

兵庫県立大学・物質理学研究科・教授

研究者番号：80118603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：迅速、簡便および高感度な免疫測定法の開発を行った。抗体による測定対象物質の認識現象を高度に標識することにより高感度化を行った。マイクロウェルアレイ電極を用いた銅の電解酸化により大量一括に酵素を包括したアルギン酸ゲル粒子を作製し、粒子内に包括された酵素の活性を電気化学顕微鏡により計測した。酵素反応生成物をレドックスサイクリングと変換蓄積法による化学増幅法で高感度に検出し免疫計測に適用できた。誘電泳動を用いると作製したゲル粒子をマイクロ電極先端に捕捉できた。ゲル粒子表面に抗体修飾することにより、抗原の存在下におけるゲル粒子の捕捉を可能にした。

研究成果の概要(英文)：The rapid, simple and highly-sensitive immunosensing have been developed. The recognition behavior of target molecules by the antibody was labeled with a large number of enzymes. The particles of alginate gel with glucose oxidase were fabricated by the electrochemical oxidation of metallic copper to copper ions in the microwell array electrodes. The enzyme activity enclosed in particles were estimated by the electrochemical microscopy. The products generated by the enzyme reaction were sensitively detected by the chemical amplification system including the redox cycling of electroactive species and accumulation of the oxidation reaction of electroactive species. The amplification system can be applied to measure marker protein. The gel particles fabricated was captured at the tip of microelectrode by using the dielectrophoresis. The gel particles with the antibody was captured at the tip modified with the antibody in the presence of antigen.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：ゲル粒子 高感度免疫アッセイ 酵素 電解酸化 誘電泳動

1. 研究開始当初の背景

血中の疾病マーカーを計測できるバイオチップの開発が精力的に進められている。マーカーの迅速で簡便な計測チップの開発は、重篤な疾病の早期発見と予後予測に直結し、治療方針の適切な決定だけでなく、超高齢者社会における医療コスト低減が期待できる。マーカー血中濃度は多くの場合 pM レベルであり、迅速性と簡便性を失うことなく検出感度を向上することが要求されている。現在の酵素免疫アッセイ法は、検出下限濃度が 1 nM 前後、検出に要する時間が 2 時間程度、手作業による複数回の洗浄工程を要するために熟練者が必要な状況である。

通常の酵素免疫アッセイ法では、酵素標識抗体が用いられる。抗体の分子認識能により固体表面に捕捉された測定対象物質を酵素ラベルし、酵素反応で生成される生成物を計測する。高感度化のアイデアは大きく 2 つに大別される。1 つは 1 つの免疫認識反応の結果からのシグナル分子生成を向上させることである。これには、酵素の活性を遺伝子工学的に向上させる、固定化担体（カーボンナノチューブやナノ粒子等）に複数の酵素を固定化する、金属ナノ粒子をラベルとしイオン化する等の方法が報告されている。もう 1 つはラベルの反応生成物を化学増幅する方法である。これには、反応生成物を電気化学的酸化還元や酵素反応を利用して再生（サイクリング）させる手法や生成物を別の酸化還元反応と組み合わせ不溶性物質に変換して濃縮する方法がある。しかし、感度向上のために、計測に要する時間が長期化し手順が複雑化する傾向にある。

そこで、本研究では、酵素内包型アルギン酸ゲル粒子の作製と免疫ラベルへの応用、酵素サイクリングと変換蓄積法によるラベル酵素反応生成物の化学増幅、ゲル粒子の誘電特性の評価と免疫計測への展開を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3 つのシグナル増幅法と誘電泳動による細胞操作を融合した迅速、簡便および検出感度の向上をキーワードとした免疫測定デバイスの開発にある。酵素内包ゲル粒子（1,000 個を含む）をラベルとして使用（第 1 増幅）し、反応生成物を酵素サイクリング（第 2 増幅）と変換濃縮法（第 3 増幅）を用いて、通常の酵素免疫アッセイの高感度化を実現する。長時間反応と煩雑な操作を要する不均一免疫反応に、誘電泳動による微粒子集積化技術を活用し迅速性と簡便性を確保する。

内包ゲル粒子の作製に、100 万個のマイクロ電極アレイを用いた電解法による多価金属イオン生成を利用し、大量一括に酵素内包アルギン酸ゲル粒子を作製する手法を開発する。

酵素反応生成物を酸化する際、金属イオン

を含む溶液に対極を浸漬し対極表面に金属粒子を析出させる。この金属粒子を酸化溶出により電荷シグナルへと変換する。これは、変換型クーロメトリー法に相当し、ファラディックな電流の蓄積効果がある。さらに、電解酸化した生成物（酸化体）は、酵素反応または電気化学反応による再生により増幅する。

酵素内包ゲル粒子表面に抗体を固定化し誘電泳動挙動を解明にする。正の誘電泳動（引力）を用いて抗体固定化電極基板上にゲル粒子を集積化して免疫反応により捕捉し、負の誘電泳動（斥力）を用いて未反応のゲル粒子を排除できることを明らかにする。

以上の 3 項目を詳細に調査し、迅速、簡便、高感度な免疫測定法の確立を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

電気化学制御型の酵素内包アルギン酸ゲルの粒子の作製

銅基板上にマイクロホールアレイを有する電極を作製し、アルギン酸 Na 溶液を展開した。銅電極に一定酸化電流を与え、金属銅を銅イオンに酸化溶出した。溶出した銅イオンによって局所領域においてアルギン酸のゲル化を誘発させ、微小な酵素内包型ゲル粒子を得た。グルコース酸化酵素（GOx）を含むアルギン酸 Na 溶液を用い、酵素内包型のゲル粒子を作製した。吸光光度法および電気化学法を用いて酵素活性の評価を行った。さらに、ゲル粒子内への最大包括量を見積もった。

サイクリング法と変換蓄積法による酵素活性の高感度計測法の確立

酵素反応生成物を高感度に計測するために電極で酸化した酵素反応生成物を酵素反応または電極反応により還元再生するレドックスサイクリング法と、変換型クーロメトリー法を組み合わせた。酵素生成物の酸化反応と銀イオンの還元反応を組み合わせ、電極表面上に金属銀を析出させた。この析出した銀を酸化溶出することにより高感度に酵素反応生成物を計測した。これにより、アンペロメトリーによる電流計測では判別不可能なファラディックな電流を析出金属へと「変換蓄積」し、酵素反応生成物量に対応した電気信号を計測できる。

誘電泳動を用いた迅速、簡便な免疫計測法の開発

誘電泳動を用いて作製した酵素内包ゲル粒子の誘電泳動特性を調査する。ニードル型のマイクロ電極を ITO 電極基板上に配置したアルギン酸ゲル粒子の近傍に設置した。ITO 電極基板に対してマイクロ電極に各周波数の交流電圧を印加し、その際の粒子の動きを観察した。正の誘電泳動（p-DEP）の作用する周波数を用いて電場強度の強いマイクロ

電極先端に粒子を捕捉し、負の誘電泳動 (n-DEP) を用いて電極先端から解放した。また、抗体修飾を行ったゲル粒子を用いて同様のゲル粒子操作を行い、免疫計測を行った。

4. 研究成果

蛍光微粒子 (直径 $0.5 \mu\text{m}$) を含むアルギン酸 Na 溶液 (2.0 wt%) を銅基板上に作製したマイクロホール (直径 $10 \mu\text{m}$) アレイ上に展開した。銅電極に定電流を印加し、銅基板上の溶液を蒸留水で希釈しながら回収して経過すると、ゲル粒子を得ることができた (図 1 左)。これは、銅の酸化反応による銅イオンの溶出反応によりアルギン酸のイオン架橋反応によるゲル化に起因する。このゲル粒子からは、強い緑の蛍光が観察された (図 1 右)。

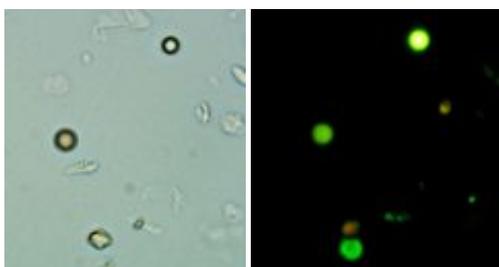


図 1. アルギン酸ゲル粒子の (左) 顕微鏡イメージおよび (右) 蛍光顕微鏡イメージ。

次に、ゲル粒子を作製する際の印加電流および印加時間の検討を行った。シングルウェルの体積とアルギン酸 Na の濃度からウェル内に存在するアルギン酸イオン (1 ユニット相当) の物質量は約 50 fmol なので、その同等量の銅イオンを生成可能な $300\text{-}600 \mu\text{C}$ の電荷を与えた。印加電流が $4 \mu\text{A}$ の場合、印加時間を $90, 120, 150 \text{ s}$ と増加するに伴って得られる粒子数が増加した。印加時間が短い場合は、球状の微粒子が得られたが、印加時間の増加により、細長い形状のゲル粒子が観察された。これは、ウェル内のアルギン酸がゲル化した後、ウェル外に銅イオンが拡散してゲル化するため、形状が制御されず様々な形の細長いゲル粒子が得られたと考えられる。印加電流を小さくすると、得られたゲル粒子の均一性が減少し、複雑な形状の粒子が多数観察された。これは、単位時間当たり析出する銅イオンが少ないことと生成した銅イオンがウェル外に拡散することにより、ウェル内の銅イオン濃度が低いことに起因する。このことから、このサイズのウェルを用いた場合には、均一なゲル粒子を作製するために $4 \mu\text{A}, 120 \text{ s}$ の条件が最適とわかった。

GOx (5 mg/mL) を含むアルギン酸 Na 水溶液を用いて、銅の電解酸化による銅イオンの生成による酵素包括アルギン酸ゲル粒子 (直径 $10 \mu\text{m}$) の作製を行った。得られた最適化条件を用いると、一括で大量のゲル粒子を得ることができた。電気化学顕微鏡を用いてこの粒子に包括された酵素活性を評価した。ゲ

ル粒子近傍に白金マイクロ電極を設置し、酵素反応で生成する過酸化水素の酸化電流を計測した。溶液中にグルコースを添加すると過酸化水素の酸化電流は増加した。また、マイクロ電極の位置を z 方向にスキャンするとゲル粒子 - 電極間距離の増加に伴って酸化電流が減少した (図 2)。この電流応答を解析し、単一粒子あたりの過酸化水素生成速度を決定した。さらに、単一ゲル粒子あたりの酵素活性は、約 100 nU と算出された。

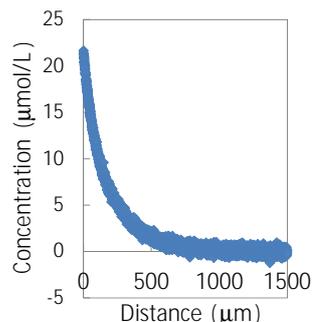


図 2. 酵素包括ゲル粒子から酵素反応により生成する過酸化水素の濃度プロファイル

癌胎児性抗原 (CEA) に対する抗体を固定化した微粒子懸濁液に異なる濃度の CEA を反応させた。捕捉された CEA を β -ガラクトシダーゼ修飾抗体で標識し、基質である 4-aminophenyl β -D-galactopyranoside (PAPG) を添加した。酵素反応により生成する p-aminophenol (PAP) を交互くし型マイクロバンド電極で酸化した。このくし型電極は、銀イオン溶液中に浸漬したグラッシカーボン (GC) 電極と接続されており、GC 電極上では、銀イオンの還元反応が進行し銀粒子が析出した。また、もう片方のくし型電極では、PAP の酸化反応で生成したイミン体の還元による PAP の再生に使用した。所定時間後、GC 電極の表面上に還元析出した銀を酸化溶出し、得られた酸化電流応答から酵素反応により生成された PAP 濃度を定量した。濃度の異なる PAP を銀へ変換濃縮 (10 分) し得られた金属銀を酸化溶出した。電極電位を正の方向に挿引すると、 0.18 V に電極表面に濃縮された銀の酸化溶出に伴う電流応答が観測され、その後ほぼゼロに戻った。よって、このシステムを用いると、IDA 電極で酸化された PAP を銀に変換して電極表面に蓄積できることがわかった。銀の蓄積量を示す応答電荷量は、PAP 濃度の増加に伴って増加した。交互くし型電極を用いた PAP/QI のレドックスサイクリングを利用すると、電荷量は 10 nM から $100 \mu\text{M}$ の PAP 濃度領域において直線的に増加した。これは、レドックスサイクルを利用しない方法と比較して 2 桁高感度に PAP を計測できる。また、化学増幅法を用いない場合と比較すると感度は約 1,000 倍となった。

微粒子表面上に免疫反応で捕捉された標識酵素により生成された PAP の検出を行った。CEA 濃度の増加に伴い電荷量は増加した。これは CEA 濃度の増加により、微粒子表面に捕捉された CEA および酵素標識抗体濃度の増加に起因する。この方法を用いると、0.1 – 100 ng/mL (0.56 – 560 pM) の範囲で CEA の検出が可能であった (図 3)。

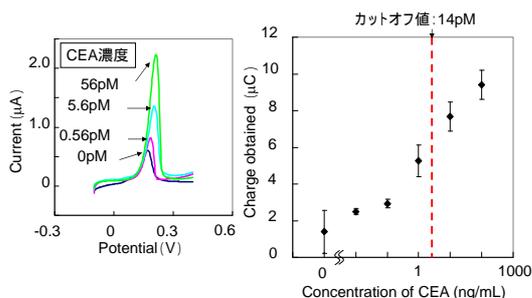


図 3. (左) ラベル酵素により生成した PAP の参加により生成した銀の酸化溶出ボルタモグラム。(右) 化学増幅システムを用いて得られた CEA 濃度に対する電荷量。

アルギン酸ゲル粒子 (直径 10 µm) の誘電泳動挙動を調査した。ITO 電極上の粒子に金マイクロ電極を近接させ交流電圧を印加すると、10 kHz から 1 MHz の周波数領域で、粒子に p-DEP が作用した。ゲル粒子の近傍にマイクロ電極を設置し、交流電圧を印加すると粒子は徐々にマイクロ電極の先端部に移動し、マイクロ電極の先端部に到達して捕捉された (図 4)。この後、交流電圧の印加を停止すると捕捉されていたゲル粒子は電極表面から脱離した。1 MHz 以上の高周波数では粒子に DEP が作用せず、20 MHz までで n-DEP の作用は観測されなかった。また、印加周波数が 100 kHz の場合、粒子を動かすために必要な電圧は 18 V であった。

ゲル粒子表面と電極に抗体 (抗マウス IgG 抗体) を固定化し、同様に DEP を用いてゲル粒子の捕捉を行った。抗原 (マウス IgG) の存在下 (1 µg/mL) で粒子を電極先端に捕捉した場合、電圧印加を停止しても粒子は電極先端に捕捉されていた。一方、抗原が存在しない場合には、電圧印加の停止により微粒子は電極先端から脱離した。これにより、ゲル粒子を用いた免疫アッセイが可能であることを示した。

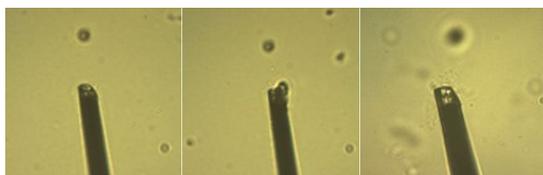


図 4. 誘電泳動による微粒子の捕捉と解放。

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 16 件)

T. Hokuto, T. Yasukawa, R. Kunikata, A. Suda, K. Y. Inoue, K. Ino, T. Matsue, F. Mizutani, Simultaneous Immunosensing of different analytes in multiple specimens based on an imaging of enzyme activity by Bio-LSI, *Biotechnol. J.*, 2016, 11, 838-842, 査読有.
DOI: 10.1002/biot.201500559

Y. Igaki, F. Mizutani, T. Yasukawa, Oxygen consumption of contractile C2C12 myotubes investigated by scanning electrochemical microscopy, *Chem. Lett.*, 2015, 44(7), 1031-1032, 査読有.
DOI: 10.1246/cl.150371

T. Yasukawa, Y. Kiba, F. Mizutani, A Dual Electrochemical Sensor Based on a Test-Strip Assay for the Quantitative Determination of Albumin and Creatinine, *Anal. Sci.*, 2015, 31, 583-589, 査読有.
DOI: http://doi.org/10.2116/analsci.31.583

T. Yasukawa, Y. Yamashita, R. Moede, D. Nakayama, S. Iijima, F. Mizutani, A DNA hybridization sensor based on catalytic response by platinum deposition, *Analyst*, 2015, 140, 1014-1018, 査読有.
DOI: 10.1039/c4an01561d

Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, T. Yasukawa, Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, 2014, 86, 6818-6822, 査読有.
DOI: org/10.1021/ac5015996

T. Horii, M. Yamamoto, T. Yasukawa, F. Mizutani, Rapid Formation of Cell-Particle Complexes via Dielectrophoretic Manipulation for the Detection of Surface Antigens, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 61, 215-221, 査読有.
DOI: org/10.1016/j.bios.2014.05.019

Y. Yoshimura, C. Fujii, M. Tomita, F. Mizutani, T. Yasukawa, Array of single-cell pairs on a microwell array based on positive dielectrophoresis, *Chem. Lett.*, 2014, 43(7), 980-981, 査読有.
DOI: 10.1246/cl.140195

T. Hokuto, T. Yasukawa, R. Kunikata, A. Suda, K. Y. Inoue, T. Matsue, F. Mizutani, Electrochemical Activity Imaging of Enzymes Immobilized on Substrates Based on a Bio-LSI System, *Chem. Lett.*, 2014, 43(6), 758-759, 査読有.
DOI: 10.1246/cl.140055

〔学会発表〕(計 90 件)

T. Yasukawa, T. Tanaka, F. Mizutani, Pickup and relocation of individual cells based on dielectrophoresis using a microdisk electrode with microcavity, MRS-J, 12 December, 2016, 波止場会館 (神奈川県横浜市) .

T. Yasukawa, T. Tanaka, F. Mizutani, Relocation of individual cells to form patterns based on dielectrophoresis using microdisk electrode with cavity, 27th 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 28-30 November, 2016, 名古屋大学 (愛知県名古屋市) .

T. Yasukawa, F. Mizutani, Rapid Formation of Single-Cell Pairs for Hybrid Cells, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science, 2-7 October, 2016, Honolulu, USA.

T. Yasukawa, Y. Yoshikura, M. Tomita, F. Mizutani, Rapid and highly-effective formation of precise single-cell pairing based on dielectrophoresis, Pacificchem 2015 Bio/chemical Approaches for Single Cell Biosensing Technologies, 18 December 2015, Honolulu, USA.

T. Yasukawa, F. Mizutani, Formation of cell-particle complexes by negative dielectrophoresis for rapid discrimination of an expression of surface antigen, 11th Asian Conference on Chemical Sensors, 16 November, 2015, Penang, Malaysia.

T. Yasukawa, Y. Minakuchi, H. Hatanaka, F. Mizutani, Negative dielectrophoretic separation of cells based on the expression of specific surface antigen, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 5 October 2015, Taipei, Taiwan.

〔図書〕(計 6 件)

T. Yasukawa, F. Mizutani, Springer, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 5, Discrimination of Cells with Specific Antigens Expressed on a Membrane Based on the Dielectrophoresis, Springer, 2015, 69-78.

安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動を利用した細胞配列, 三次元ティッシュエンジニアリング技術最前線, 第1編第3章第5節, 株式会社エヌティエス, 2015, 149-158 .

水谷文雄, バイオセンシング技術の市場

動向から読み解くバイオセンサの将来像と方向性, 10年後の市場・技術予測とそこから読み解く必然の研究テーマ, 技術情報協会, 第2部第5章第2節, 2014, 266-269 .

水谷文雄, バイオセンサー, 化学便覧 応用化学編第7版V, 日本化学会編, 丸善, 第23章第3節4, 1416-1419, (2014).

水谷文雄, 売れる医療用バイオセンサ開発に向けたアプローチ, 次世代医療・ヘルスケア機器のデバイス技術と最新開発事例集, 第2章第4節, 技術情報協会, 2014, 74-78.

水谷文雄, 今後の製品開発に向けた売れるバイオセンサーへのアプローチ手法, バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発, 2部3節, 技術情報協会, 2014, 59-62 .

〔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.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水谷 文雄 (MIZUTANI, Fumio)
兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・教授
研究者番号 : 80118603

(2)研究分担者

安川 智之 (YASUKAWA, Tomoyuki)
兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・准

教授

研究者番号： 4 0 3 6 1 1 6 7

(3)連携研究者

末永 智一 (MATSUE, Tomokazu)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機
構・教授

研究者番号： 7 0 1 7 3 7 9 7