

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550109

研究課題名(和文) 磁気分離を利用したバイオセンシング用実試料前処理法の開発

研究課題名(英文) Development of real sample preparation method for biosensing using magnetic separation

研究代表者

永谷 尚紀 (NAGATANI, Naoki)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：90351072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： 磁性微粒子を用いて測定試料を前処理することによりバイオセンシングの高感度化を目的に検討を行なった。磁性微粒子での前処理は、測定対象のタンパク質、遺伝子の分離、濃縮に有効であった。磁性微粒子とバイオチップ技術を用いることによって遠心分離機を使わず濃縮、分離が可能であり、測定試料の前処理行程を短縮でき、さらに、イムノクロマト法を用いることで迅速で高感度の検出が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this research aims for high sensitivity biosensing by pretreatment of the measurement sample using magnetic particles. The pretreatment using magnetic particles is effective in separation and concentration for protein and genomic DNA. Separation and concentration are possible without using a centrifuge by biochip technology and magnetic microparticles, and the pretreatment processes of the measurement sample can be reduced. Furthermore, rapid and sensitive detection can be possible by using immunochromatography method for biochip technology and magnetic particles.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：複合科学・分析化学

キーワード：バイオテクノロジー バイオセンサー 試料処理 分離分析

1. 研究開始当初の背景

1) 血液、唾液などの実試料から簡便に測定対象を測定あるいは検出可能なバイオセンシング技術が、研究、開発されている。その代表例として妊娠診断薬やインフルエンザウイルスの簡易検査で使用されているイムノクロマト法がある。イムノクロマト法は測定機器を必要とせず目視で被検物質を検出が出来る簡便な方法であるが、測定感度がELISA (酵素免疫測定法) に比べ測定感度の点で劣り、インフルエンザウイルスに感染した初期の段階では検出できないなどの問題点もある。イムノクロマト法の高感度検出技術としては、酵素標識抗体を用いて発色により感度を増感する方法や銀による増感などの技術も開発されているが、発色試薬の展開などが必要であり、誰もが利用できる手法とはなっていない。研究代表者は、イムノクロマト法の高感度化に関する技術としてテストライン上に予め発色しない程度の金ナノ粒子を固定することで高感度に測定対象物を測定する手法を開発し (*Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 1414- 1420)、さらに希釈液に界面活性剤を含んだ溶液を用いることで高感度に検出する手法を開発している (*Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2009, 10, 034604(5pp))。しかしながら、測定対象のみの測定では高感度の測定が可能であるが、実サンプルでは、測定感度、精度が大きく低下する場合がある。これは、実サンプルに含まれる夾雑物が影響していると考えられ、さらなる高感度化を目指すには、簡便な実サンプルの前処理法が必要であると考えられる。また、研究代表者は、PCR (Polymerase chain reaction) 後の増幅遺伝子の検出方法として、インターカレーターを電気化学的指標とした簡便な検出方法を開発しているが、増幅遺伝子中にプライマーダイマーが生じた場合、検出対象である遺伝子が増幅していない場合でも電流値の低下が認められ、検出が正確に行えない場合がある。これは、プライマーダイマーとインターカレーターが結合し遺伝子が増幅した場合と同様に、インターカレーターからの電流値が低下するためである。これらの問題点を解決する手段としては、磁性微粒子を用いた測定対象あるいは夾雑物を分離または濃縮し測定することによって高感度、高精度のバイオセンシングが実現できると考えられる。例えば、唾液中には、ムチンが多く含まれ、唾液の粘性にも関与し、分泌量もヒトによって異なり、イムノクロマト法を用いた検出では、感度の低下に大きく関与していると考えられる。ムチンに対する抗体で標識した磁性微粒子を用いて簡便に唾液を処理することによって、ムチンの影響が抑えられ検出感度の向上が期待できると考えられる。また、プライマーダイマーを含む増幅遺伝子の検出法においても、抗体で認識できる物質をプライマーに標識し、その抗体で標識した磁性微粒子での増幅遺伝子の分

離、あるいは、非対称PCR で一本鎖を増幅させ、増幅遺伝子の相補鎖を磁性微粒子に標識することで簡便に高精度の検出が可能となると考えられる。研究代表者は、カチオン性クリボソームでコートされた磁性微粒子を用いて遺伝子を培養細胞に導入し、遺伝子導入細胞を効率的に磁石で分離する手法を報告しており (*Biotechnol. Tech.*, 1998, 12, 552-528)、磁性微粒子による簡便な対象物の分離には、熟知しており磁性微粒子による分離、濃縮を発想するに至った。

2. 研究の目的

実試料を対象に測定を行うバイオセンシング技術では、測定対象のみの実験室レベルの測定では高感度の測定が可能であるが、多くの夾雑物を含んだ実試料から測定対象を測定する段階で測定感度が大きく低下する 경우가多くある。そこで、本研究課題では、測定対象あるいは夾雑物を磁気分離により選択的に分離、濃縮を行う実試料の簡便な前処理法の検討を行い、高感度のバイオセンシング技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 磁性微粒子による夾雑物の分離

磁性微粒子による夾雑物分離のモデルケースとして、唾液中のムチンの分離によるイムノクロマト法の高感度化の検討を行なった。唾液中ストレスマーカーの一つである分泌型免疫グロブリン A (s-IgA) をイムノクロマト法で検出する場合、ELISA での測定値と比較し、明らかに濃度が異なる唾液がある。この原因は、唾液中に最も多く含まれるタンパク質であり、唾液の粘性にも関係するムチンが原因であると考え、唾液中のムチンの分離を行なった。実験方法は、抗ムチン抗体とプロテイン A 被覆磁性微粒子を反応させ、ムチン分離用磁性微粒子を作製し、一定量の唾液に対してムチン分離用磁性微粒子を加える量を増やしてムチンの分離を行ない、イムノクロマト法にて s-IgA の検出を行ない検出感度へのムチン分離の効果を調べた。

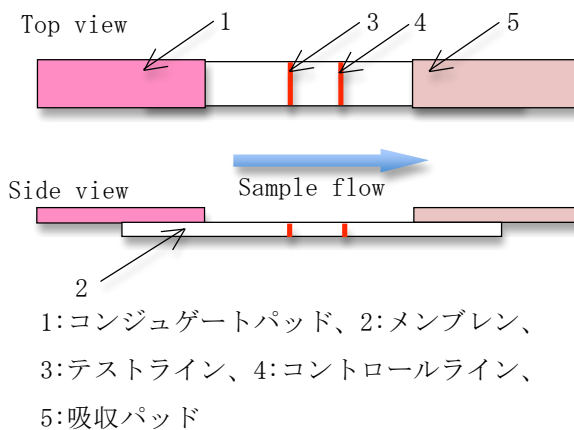


図1 イムノクロマトテストストリップ

図1にイムノクロマト法でのs-IgAの検出に使用したイムノクロマトテストストリップの構造を示す。コンジュゲートパッドには、金ナノ粒子標識抗s-IgA抗体が乾燥した状態で保持されている。そこにs-IgAを含んだ希釈した唾液（試料）を加えると、抗原抗体反応をしながらメンブレン上を液が吸収パッドの方へ展開していく。テストラインには抗s-IgA抗体、コントロールラインには抗s-IgA抗体を捉える抗体が固定されている。テストライン上では、金ナノ粒子標識抗s-IgA抗体 - s-IgA - 抗s-IgA抗体の様にサンドイッチ状に抗原抗体反応し、金の粒子の集積によってテストラインは赤色に発色し、検出、反定量が可能な仕組みとなっている。コンジュゲートパッドの金ナノ粒子標識抗s-IgA抗体は過剰量含まれておりコントロールラインでは、金ナノ粒子標識抗s-IgA抗体 - 抗体の反応によってテストライン同様に赤色に発色する。コントロールラインの発色によってテストストリップによって正しく測定されているか、測定終了後のテストストリップで有るか無いか分かる仕組みとなっている。

(2) 磁性微粒子による測定対象の分離

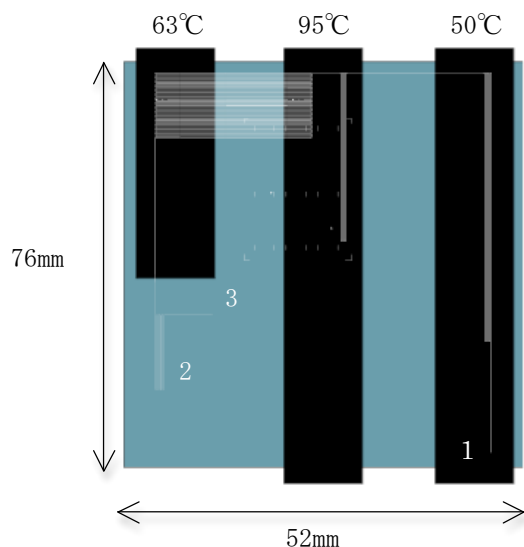
測定対象の分離のモデルケース、分離用バイオチップの条件検討として、IgAの分離を磁性微粒子によって行なった。

実験方法は、抗s-IgA抗体をビオチン化し、ストレプトアビジン被覆磁性微粒子を反応させ、IgA分離用磁性微粒子を作製し、一定量のIgAに対してIgA分離用磁性微を加え、IgAの分離を行ない、IgAの分離の確認をイムノクロマト法、タンパク質濃度測定法、発色法で行なった。

(3) バイオチップによる遺伝子増幅と検出

磁性微粒子による分離後の応用としてバイオチップによる遺伝子増幅、イムノクロマト法での検出を行なった。実験方法は、インフルエンザウイルスRNAをモデルケースとしてRT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) をRT-PCRチップ(図2)によって増幅し、イムノクロマト法で増幅遺伝子の検出を行なった。遺伝子増幅に使用したRT-PCRチップは、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ の流路に送液出口付近に熱による送液からの気泡の発生を防ぐ $50\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ の加圧チャンネルを備えている。送液によってRT-PCRチップの下に設置されたヒートブロックによって 50°C でRNAからDNAの逆転写が行なわれ、 95°C 、 63°C のヒートブロックが設置された部分を送液が流れることによって遺伝子が増幅される仕組みになっている。通常の方法で増幅した遺伝子は、イムノクロマト法での検出が困難なため、遺伝子増幅に使用するプライマーの5'末端にFITC (fluorescein isothiocyanate)、Biotinを標識したプライマーを使用し、テストラインに

抗FITC抗体を固定し、金ナノ粒子標識抗Biotin抗体を用いてイムノクロマトテストストリップにて検出を行なった。



1: Inlet、2: Pressurizing-channel、3: Outlet

図2 RT-PCRチップ

(4) 磁気分離チップによるDNAの分離

DNAがオカトロピック剤の存在下でシリカに吸着することを利用してシリカ磁性微粒子と磁気分離チップ(図3)を用いて食品中のDNAを分離後、PCRによって小麦の検出を行なった。磁気分離チップは、アクリル樹脂性で $26\text{mm} \times 76\text{mm}$ のスライドガラスと同等の大きさで、中央に $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ の流路、流路内に流路幅が広がった2カ所のトラップゾーンを持った構造となっている。

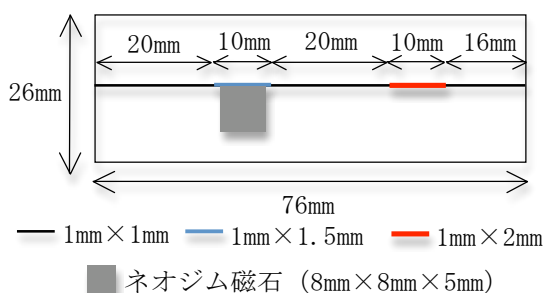


図3 磁気分離チップ

実験方法は、まず、ビスケットを砕き、DNA抽出液と混合し、上澄み液を分取してオカトロピック剤を加えシリカ磁性微粒子に抽出DNAを吸着させた。図3の様にネオジウム磁石(403mT)をトラップゾーンに配置し、シリカ磁性微粒子を含んだ混合溶液を磁気分離チップに流し、シリカ磁性微粒子をトラップした。磁気分離チップに70%エタノールを流し、洗浄後にネオジウム磁石を外し、TE (Tris/EDTA) 緩衝液を流してシリカ磁性微粒子を磁気分離チップより回収した。回収されたシリカ磁性微粒子に吸着していた抽出DNAはTE緩衝液中に溶出するため、上澄み液でPCRを行なった。PCRに使用したプライマ

一は、5'末端にFITC、Biotinが標識されており、電気泳動法、イムノクロマト法での遺伝子増幅の確認を行なった。

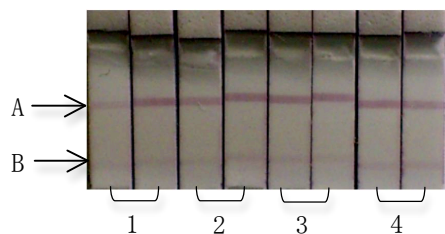
(5) 磁気分離チップによる大腸菌の分離

病原菌の検出には、培養法が用いられている。培養法では結果が得られるまで2~10日程度の日数を必要とするため、近年、PCRを用いた病原菌の検出も開発されている。しかしながら、PCRを行なうにも菌体の濃縮のために遠心分離機が必要となる。そこで、大腸菌(JM.109)をモデルとして磁気分離チップ(図3)を用いた簡便な前処理方法の検討を行った。実験方法は、抗大腸菌抗体とプロテインA被覆磁性微粒子を反応させ、大腸菌分離用磁性微粒子を作製し、大腸菌と混ぜ反応させた後に磁気分離チップで大腸菌が結合した磁性微粒子をトラップし、PCRによって大腸菌の存在の検出を行なった。

4. 研究成果

(1) 磁性微粒子による夾雑物の分離

抗ムチン抗体を標識した磁性微粒子、ムチン分離用磁性微粒子を用いて唾液中の分離を行なった。ヒトから採取した唾液40 μ Lに対してムチン分離用磁性微粒子を10、50、100 μ L加えてムチンの磁気分離を行なった後に、分離後の溶液が140 μ LになるようにPBS(リン酸緩衝液)を加えてイムノクロマト法でs-IgAの検出を行なった。



A: Control Line B: Test Line
 1: 唾液 40 μ L+PBS 100 μ L
 2: 唾液 40 μ L+磁性微粒子 10 μ L+PBS 90 μ L
 3: 唾液 40 μ L+磁性微粒子 50 μ L+PBS 50 μ L
 4: 唾液 40 μ L+磁性微粒子 100 μ L

図4 唾液中ムチン分離効果
(イムノクロマト法)

図4に示すようにムチン磁性微粒子を加え唾液中のムチンを分離した方が、わずかではあるがテストラインが濃くなっている。しかしながら、唾液中の夾雑物であるムチンを分離した効果は、大きくなく夾雑物を分離して高感度に検出が可能となったとは言えない程度である。これは、唾液中のムチンの濃度が濃いため磁性微粒子を加えて分離を行なったとしても十分にムチンが分離できていないためだと推測される。そこで、夾雑物ではなく、測定対象の分離を磁性微粒子によって行ない、高感度のセンシングの検討を行なう方針とした。

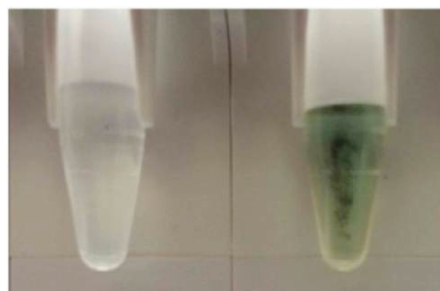
(2) 磁性微粒子による測定対象の分離

測定対象の分離のモデルケース、分離用バイオチップの条件検討として、IgAの磁性微粒子による分離を行なった。抗IgA抗体をビオチン化(Biotin Labeling Kit-NH₂:同仁化学研究所)シストレプトアビジン被覆磁性微粒子と反応させたIgA分離用磁性微粒子を用いて検討をおこなった。1mg/mLのIgA溶液40 μ Lに対してIgA分離用磁性微粒子を10、50、100 μ L加えてIgAの磁気分離を行なった後に、分離後の溶液が140 μ LになるようにPBS(リン酸緩衝液)を加えて、タンパク質濃度測定を濃なつたところ、表1の様に磁性微粒子を加える量を多くすることでタンパク質濃度が、下がりIgAが分離されていることがわかる。また、IgA分離用磁性微粒子を増やしたとしても比例的に分離されるのではなく、少量で分離効果が大きいことが分かる。

表1 磁気分離後のタンパク質濃度

条件	タンパク質濃度
磁性微粒子 0 μ L	0.374 (mg/mL)
磁性微粒子 10 μ L	0.280 (mg/mL)
磁性微粒子 50 μ L	0.138 (mg/mL)
磁性微粒子 100 μ L	0.100 (mg/mL)

IgA分離用磁性微粒子にIgAが結合しているか確認するために磁気分離後の磁性微粒子を洗浄し、HRP(horseradish peroxidase)で標識された抗IgA抗体(二次抗体)と反応させ、洗浄後に発色液を加えたところ発色し、IgA分離用磁性微粒子にIgAが結合していることが確認できた(図5)。



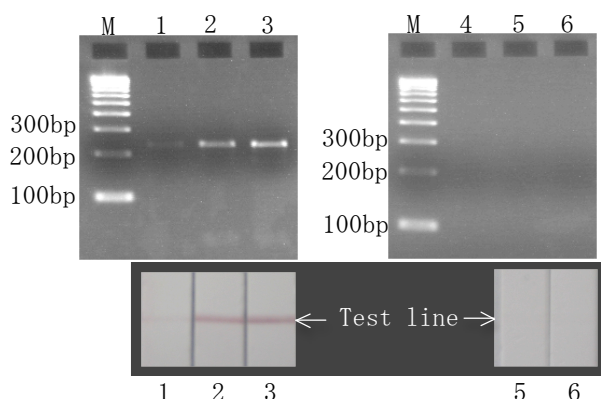
磁性微粒子無し 磁性微粒子有り
 図5 磁性微粒子へのIgAの結合

この結果より、測定対象を磁気分離する場合、磁性微粒子は少量でも効果的に分離することが可能であり、センシングの高感度化に期待できることが分かった。

(3) バイオチップによる遺伝子増幅と検出

磁性微粒子による分離後の応用としてバイオチップによるインフルエンザウイルスRNAの増幅とイムノクロマト法による検出を行なった。0.16pg/ μ LのインフルエンザウイルスRNAを含んだRT-PCR反応液をRT-PCRチップ(図2)に0.5 μ L/minの送液速度で流し込み、RT-PCRから流れ出てくる反応液を15-20、20-25、25-30minの間隔

で回収し、電気泳動法とイムノクロマト法で確認を行なった(図6)。その結果、15-20minで回収した反応液にて電気泳動法で232bpにインフルエンザウイルスRNAの遺伝子増幅産物の確認ができ、イムノクロマト法でも薄いテストラインに赤色のラインが確認できた。回収した反応液20-25、25-30minでは、電気泳動法では濃いバンドが、イムノクロマト法では濃い赤いラインが確認できた。イムノクロマト法による検出は、漏れ出した回収液1μLを40倍希釈して検出したが、イムノクロマトテストストリップに反応液を染み込ませて2-3minで目視での検出が可能であった。磁性微粒子によって分離後にRT-PCRチップ、遺伝子増幅産物のイムノクロマト法による検出を行なうことで、迅速に高感度な検出が行なえることが分かった。

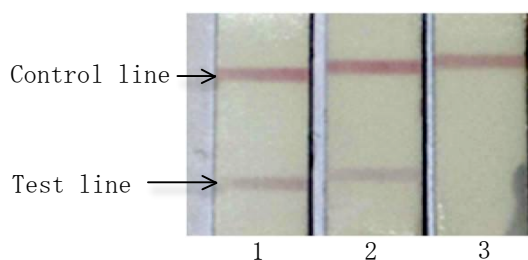


1:15-20min、2:20-25min、3:25-30min
4:15-20min、5:20-25min、6:25-30min
1-3:インフルエンザウイルス RNA 有り
4-6:インフルエンザウイルス RNA 無し

図6 バイオチップによる遺伝子増幅と検出
(電気泳動法、イムノクロマト法)

(4) 磁気分離チップによるDNAの分離

磁気分離チップによる測定対象の前処理としてビレット中のDNAの分離を磁気分離チップ(図3)、シリカ磁性微粒子を用いて行なった。ビレットを砕きDNA抽出試薬(DNAすいすい-S:株式会社リーズ)と混ぜ、上澄みを別のチューブに移して、カオトロピック剤を加えた後に400μLの溶液に対して3μLのシリカ磁性微粒子(MagExtractor™ - Genome:TOYOBO)を加え、磁気分離チップ(図3)に流しシリカ磁性微粒子をトラップさせた。トラップされシリカ磁性微粒子は、磁気分離チップ内にて70%エタノールで洗浄、ネオジウム磁石を外し25μLのTE緩衝液でシリカ磁性微粒子を回収し、PCRを行なった。遺伝子増幅の確認をイムノクロマト法によって行なったところ、DNA抽出方法として一般に用いられているCTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide)法で抽出したDNAのPCRと同様にテストラインに赤色のラインが確認できた(図7)。



1:CATB法、2:磁気分離チップ、
3:磁気分離チップ(抽出DNAなし)

図7 磁気分離チップによるDNA分離
(イムノクロマト法)

この結果より、シリカ磁性微粒、磁気分離チップを用いることで遠心分離機、有機溶剤を必要とするCATB法と同様の結果が迅速に得られることが分かった。

(5) 磁気分離チップによる大腸菌の分離

磁気分離チップ(図3)と抗大腸菌抗体を標識した磁性微粒子を用いて大腸菌の分離を行なった。1.1×10⁴CFU/mLの大腸菌を含んだ溶液100μLに0.5μLの大腸菌分離用磁性微粒子を加え、その溶液を磁気分離チップに0.5mL/mLの流速で流し、大腸菌分離用磁性微粒子をトラップした。ネオジウム磁石を外し、50μLのPCR溶液で大腸菌分離用磁性微粒子を回収し、そのままPCRを行なった。

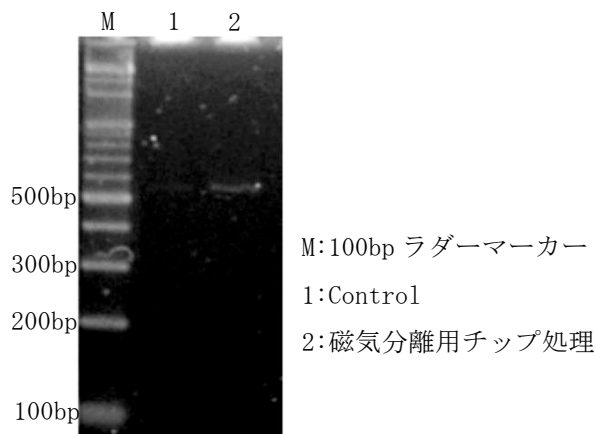


図8 磁気分離チップを用いた大腸菌の分離

電気泳動法で遺伝子増幅の確認を行なったところ、大腸菌遺伝子の増幅を示す544bpのバンドが確認できた(図8)。対照(Control)として行なった1.1CFUの大腸菌を用いたPCRと比較し、磁気分離チップで分離を行なった方がバンドも濃くなっていることから、磁気分離用磁性微粒子には、十分な大腸菌が結合し分離できたとと言える。この結果より、磁気分離チップと大腸菌分離用磁性微粒子を用いることにより大腸菌の分離が簡便に行なえ、遠心分離機を使わず菌体を濃縮できることが分かった。大腸菌以外の菌体でも抗体を選ぶことで他の菌体の検出にも使用可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Naoki Nagatani, Keiichiro Yamanaka, Hiromi Ushijima, Ritsuko Koetsu, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Masato Saito, Toshiro Miyahara, Eiichi Tamiya, Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip, *Analyst*, 査読有り, 137, 2012, 3422-3426

[学会発表] (計 2 件)

- ① Naoki Nagatani, Yutaka Ogido, Keiichiro Yamanaka, Masato Saito, Eiichi Tamiya, Seiichi Katayama, Toshiro Miyahara, Gold nanoparticles based-biosensor for amplified DNA, The 4th Asian Symposium on Advanced Materials-Chemistry, Physics & Biomedicine of Functional and Novel Material, Taipei, Taiwan, October 24, 2013
- ② 永谷尚紀、味能直弘、荻堂 裕、牛島ひろみ、宮原敏郎、磁性微粒子による唾液中タンパク質の分離と検出、電気化学会第79回大会、2013年3月31日、浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永谷 尚紀 (NAGATANI, Naoki)
岡山理科大学・工学部・准教授
研究者番号：90351072