

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 23日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710003

研究課題名（和文）環境アレルゲンの動態評価のための連続計測技術に関する研究

研究課題名（英文）Immunological monitoring technique for dynamic analysis of environmental allergens

研究代表者

宮島 久美子 (MIYAJIMA KUMIKO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・技術職員

研究者番号：10516298

研究成果の概要（和文）：

コナヒョウヒダニ由来の *Der f1* を検出対象とした、化学蛍光法による光ファイバ型免疫計測システムを開発した。本システムでは、LED 光源を励起光とし、光ファイバプローブ端面近傍の免疫複合体由来の蛍光を光電子増倍管にて検出した。プローブ端面に捕捉抗体を固定化し計測したところ、7.8-250 ng/ml の範囲で定量が可能であり、本システムが環境中アレルゲンの *on-site* モニタリング計測に有用な基盤技術となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A fiber-optic immunoassay system based on chemifluorescence detection for *Der f1* derived from *Dermatophagoides farinae*. In this system, a light emitting diode (LED) was used as an excitation light source, and a photomultiplier was used as a fluorescence detector. Capture antibodies were immobilized on the end face of the optical fiber probe, and immunocomplexes were formed and labeled with fluorophores. Calibration range of the system for *Der f1* defined by the fluorescence intensities was 7.8-250 ng/ml. The study proved that the immunoassay system was useful in the basic technology for the *on-site* monitoring of environmental allergens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：環境計測

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息やアトピー性皮膚炎、花粉症等のアレルギー疾患を有する患者は国民の 30% 以上にものぼり年々増加傾向にある。近年では、小児や若年成人のみならず高齢患者層における患者数の増加も明らかになっており、大きな社会問題となっている。アレルギー疾患の発症機序や病態は未だ十分に解明されておらず、現状では根治的な治療法が確立されていないため、対処療法を中心とした治療

が行われている。特に、生活環境や生活習慣の改善によるアレルゲン（アレルギー疾患惹起物質）の回避や疾患状態の客観的な評価に伴う予防は有効な対処法であるが、個人レベルでの十分な疾患管理は行われていない。

生活環境におけるアレルゲン計測は、アレルギーの日常管理に有効な情報を提供することが可能な技術である。アレルゲンは、温度や湿度、季節などの影響を受けてその分布が変動するのみならず、特に花粉やハウスダ

スト等の吸入性アレルゲンは、生活環境中に浮遊・拡散して存在する場合も多く、回避することは容易でない。こうしたアレルゲン動態を個人レベルでの確に評価し、健康管理に活用するためには現在主に行われている測定業者による一時的な分析ではなく、簡便に連続計測できるセンサシステムが必要不可欠である。現時点では、家庭での使用用途に耐えるほど小型で簡便なセンシングシステムは確立されておらず、技術開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小型軽量の光学実験系を構築して蛍光免疫測定法による環境因子の測定技術を開発し、まず、液相中での測定を実現し、さらに気相中の浮遊環境因子の計測に展開することである。測定対象としては、吸入性アレルギー疾患の代表的アレルゲンである、コナヒョウヒダニ由来の *Der f1* を用いて、生活環境における時間的・空間的なアレルゲン動態の評価技術を実現する。

研究期間終了時まで、まず、小型蛍光検出システムの構築を行い、構築したシステムによる免疫計測技術を確立し *Der f1* 計測に適用する。さらに、挑戦的課題として、作製した蛍光免疫計測システムによる気相中 *Der f1* 計測について検討し、アレルギー疾患のための生活環境管理技術としての可能性を明らかにする。本研究計画における免疫計測システムは、適宜抗体を選択することで様々な対象の測定が考えられることから、アレルゲン以外の日和見感染菌やバイオマーカー等の動態評価への応用展開についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 化学蛍光法による免疫計測システムの原理

化学蛍光法では、酵素標識した検出抗体に、基質を反応させて生じる蛍光物質を検出することで抗原を計測することから、高感度に抗原を検出できる可能性がある。本研究では、標識酵素にストレプトアビジンペルオキシダーゼ、基質に 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を用い、反応生成物である resorufin を蛍光検出することとした。

図 1 に、光ファイバを用いた免疫蛍光検出システムの構成と原理を示す。本システムでは、発光ダイオード (LED) からの励起光をバンドパスフィルタ (BPF: MX0570, 朝日分光 (株)) 及び光ファイバを介して試料溶液に照射し、試料内の resorufin の蛍光を蛍光用 BPF を介して光電子増倍管 (PMT; H7421, 浜松ホトニクス (株)) にて検出し *Der f1* を測定した。なお蛍光用として複数の BPF を用い、光学系の最適化を図った。

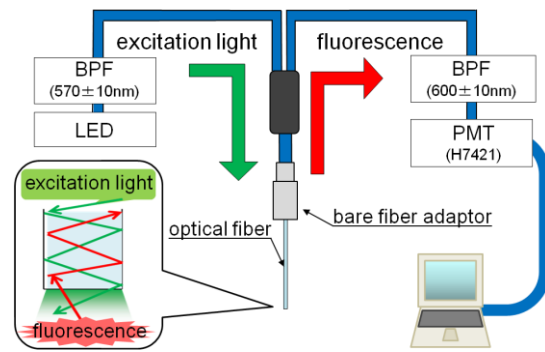


図 1. 光ファイバ型蛍光免疫検出システムの構成図

(2) 光ファイバ型免疫検出システムの構築

検出用の光ファイバプローブは、安価で使い捨て可能なポリスチレン製光ファイバ (PS ファイバ; polystyrene plastic optic fiber, Shenzhen Corporeal Photoelectric, Co., Ltd.) を切断し、端面を鏡面研磨処理することで作製した。まず粗研磨用のシリカフィルム (粒子径: 30 μm) にて 30 秒間乾式研磨し、研磨面を洗浄した後、次に粒子径 9 μm のシリカフィルムにて 30 秒間湿式研磨を行い、最後に仕上げ研磨用のアルミナフィルム (粒子径: 0.3 μm) にて 15 秒間の湿式研磨を行う事で端面を鏡面処理した。

また、蛍光測定時のノイズ成分を抑制するため、励起光側および蛍光側バンドパスフィルタ (BPF) を選定した。さらに異なる 2 種の LED 光源 ($\lambda_p = 530 \text{ nm}$, 20000 mcd; $\lambda_p = 570 \text{ nm}$, 500 mcd) を用いて *Der f1* 検出時の蛍光出力の違いを調べ、光源の選定を行った。

(3) 免疫検出システムを用いた *Der f1* 測定

実験では、まず光学系及び反応系の評価を目的に I. 捕捉抗体を固定化した測定セルを使用し、抗原、HRP 標識抗体、蛍光基質の順に反応させ、溶液の蛍光を光ファイバにて評価し、次に II. 捕捉抗体を端面に固定化した光ファイバプローブを使用することで *Der f1* モニタリングへの応用の可能性について調べた (図 2)。捕捉抗体固定化セルとしてマイクロタイタープレート (greiner bio-one Co. Ltd. 655061) の各ウェルを利用した。実験では、上記セルに抗 *Der f1* 抗体溶液 (Anti-*Der f1* mAb 6A8, Lot 31022, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 80mmol/l carbonate - bicarbonatebuffer, pH 9.5, 100 μl) を分注して抗体を固定化し (4 $^{\circ}\text{C}$, over night)、ブロッキング処理 (室温, 1 時間) の後、標準抗原液 (*Der f1* 抗原: Purified Natural *Der f1*, Lot 30074, 0.49-250 ng/ml in BSA-T-PBS, 100 μl , 室温 1 時間)、ビオチン化抗 *Der f1* 抗体溶液 (Anti-*Der f1*, mAb 4C1, Lot 30068, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in BSA-T-PBS, 100 μl , 室温 1 時間)、スト

レプトアビジンペルオキシダーゼ溶液 (Streptavidin-Peroxidase, S5512, Sigma, 0.25 $\mu\text{l/ml}$ in BSA-T-PBS, 100 μl , 室温 30 分) を順次加え複合体形成を行った。I. の評価では、蛍光基質溶液 (QuantaRed™ Enhanced Chemi- fluorescent HRP Substrate, Enhancer Solution, Stable Peroxide Solution= 1:50:50, 100 μl) を分注し 15 分間反応させ、反応停止薬 10 μl を加えた後、プローブ端面をセル溶液に浸漬し、PMT にて蛍光強度を測定した。

次に、II. 捕捉抗体固定化光ファイバを使用し *Der f1* の検出を行う方法ではまず、先端を封じたウルトラマイクロチップに抗 *Der f1* 抗体溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 μl) を分注し、プローブ端面を浸漬して抗体を固定化した。ブロッキング後、*Der f1* 抗原溶液 (7.8 -250 ng/ml, 50 μl)、ビオチン化抗 *Der f1* 抗体溶液、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ溶液の順に浸漬し、免疫複合体をプローブ端面に形成し、蛍光計測では基質溶液を分注したマイクロプレートウェルにプローブを浸漬し、攪拌 (200 rpm) しながら 15 分間反応させた後反応停止薬を加え、蛍光検出システムにファイバを接続し、蛍光強度を測定した。

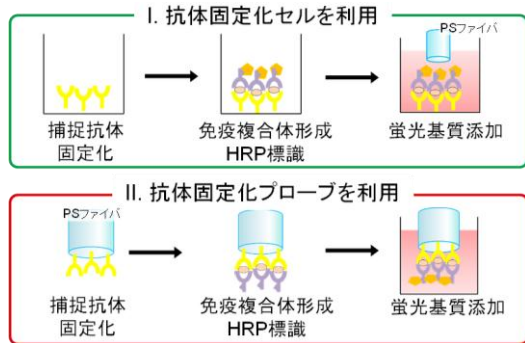


図 2. *Der f1* 計測での 2 種の実験方法 I、II

4. 研究成果

(1) 光ファイバ型免疫検出システムの構築と評価

図 3 は切り出した PS ファイバを鏡面研磨した際の、各研磨工程におけるファイバ端面を示した画像である。研磨フィルムの粒子径が小さくなるに従い表面が平滑化し、粒子径 0.3 μm のアルミナフィルム研磨後は、良好な平滑性面が観察された。研磨処理後の PS ファイバプローブの蛍光検出能を標準 Cy5 溶液を用いて調べたところ、 $10^0 - 10^6$ nmol/l の範囲で定量可能で、市販のガラスファイバプローブと同等な蛍光検出能を有することが確認された。

また、ノイズを抑制して蛍光検出を行うため、システムに用いる BPF の選定を行った。励起光側を resorufin のピーク励起波長である 570 nm に中心波長を有するフィルタ (570

± 10 nm) に固定し、蛍光側 BPF として、5 種のフィルタ (①580 ± 10 nm, ②590 ± 10 nm, ③600 ± 10 nm, ④610 ± 10 nm, ⑤620 ± 10 nm) について、ノイズレベルを調べた。その結果 (表 1)、励起側フィルタ 570 ± 10 nm に対して③蛍光側フィルタ 600 ± 10 nm にて、励起光成分が効果的に除去され、最もノイズレベルを低減できた。

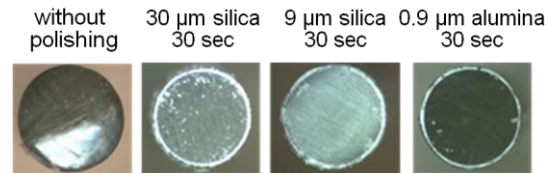


図 3. 各研磨処理後の PS ファイバ端面写真

表 1. フィルタの組み合わせによるノイズの比較

center wavelength of BPF (nm)	580	590	600	610	620
noise intensity (counts)	46016	920.2	26.87	76.13	51.17

また異なる 2 種の LED 光源 ($\lambda_p = 530$ nm, 20000 mcd; $\lambda_p = 570$ nm, 500 mcd) について、*Der f1* 検出時に得られる蛍光強度を比較したところ (図 4)、輝度の高い光源 ($\lambda_p = 530$ nm, 20000 mcd) にて、より大きな蛍光出力が得られたことから、以降の実験では、この光源を用いた。

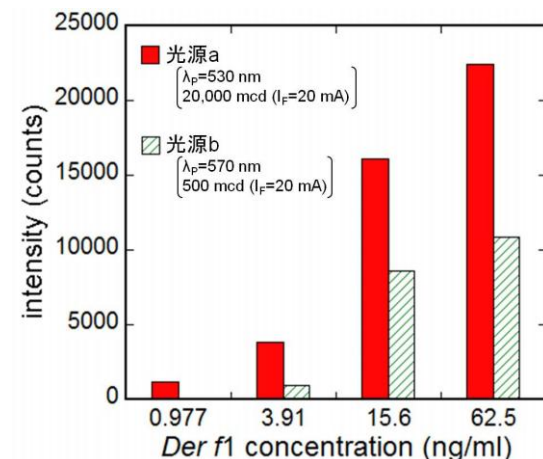


図 4. 2 種の LED 光源における *Der f1* 蛍光出力の比較

(2) 光ファイバ型免疫検出システムでの *Der f1* 計測

I. セル内面に抗 *Der f1* 抗体を固定化し、2 種類の光ファイバプローブ (PS ファイバ、市販ガラスファイバ) にて蛍光測定を実施し、特性を比較した。図 5 に 2 種の光ファイバプローブにより得られた *Der f1* 定量特性を示

す。この図に示すように、本システムにより 0.49-250 ng/ml の範囲で *Der f1* の定量が可能であった。

この結果は、市販ファイバ（図 5 破線）を用いた場合（0.49-62.5 ng/ml）、や既存の ELISA 法にて計測した場合（0.49-250 ng/ml）と同等の定量性であった。なお PS ファイバプローブ間のバラツキは変動係数が 14.3%（125 ng/ml, n=5）と大きく、その原因として、手作業で研磨処理したファイバを接続しているために光学系のミスアラインメントが生じやすいことが考えられる。

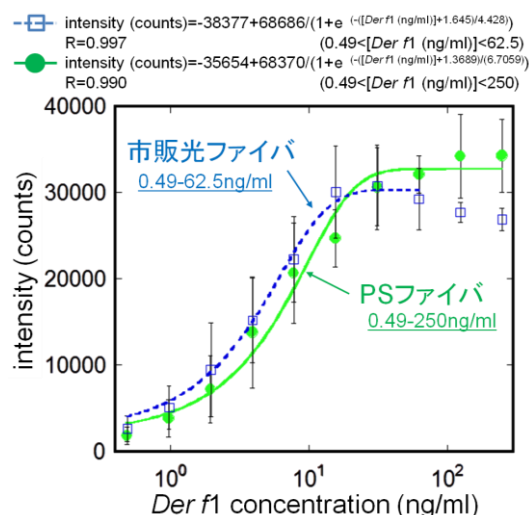


図 5. I. 抗体固定化セルによる *Der f1* 定量特性

II. 上記の結果を踏まえ、PS ファイバプローブ端面に抗 *Der f1* 抗体を固定化することでより *on site* 計測に適した光ファイバ型アレルギーセンサを構築し評価を行った。図 6 に固定化光ファイバにより *Der f1* の測定を行った結果を示す。この図からわかるように、I. のセル内に抗体を固定化する場合に比して同濃度の *Der f1* に対する出力は 20-30% 程度となるものの、次式の通り *Der f1* の定量性が確認され、定量範囲は 7.8-250 ng/ml であった。

蛍光出力が低下した主な原因として、ファイバ端面への固定化が十分でないことが考えられ、ファイバへの抗体固定化条件の改善により固定化密度を向上させることで、蛍光強度の増加と検出感度の向上が図れるものとする。

本システムは光ファイバの端面でアレルギーを計測できることから、*on-site* アレルギーモニタリングにおいて、住環境などの多様な条件下での利用が可能で、アレルギーの発生源の調査や日内変動の評価に有効であるものと期待される。

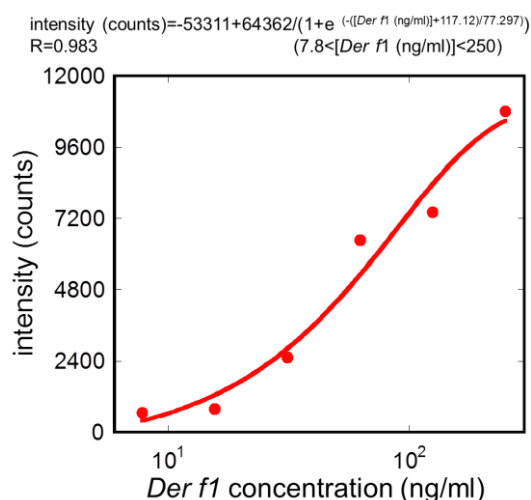


図 6. II. 抗体固定化ファイバによる *Der f1* 定量特性

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) Miyajima K, Koshida T, Arakawa T, Kudo H, Saito H, Yano K, Mitsubayashi K, Fiber-optic fluoroimmunoassay system with a flow-through cell for rapid *on site* determination of *Escherichia coli* O157:H7 by monitoring fluorescence dynamics, *Biosensors*, 3(1), pp.120-131, 2013. (査読有り)
- (2) Kudo H, Wang X, Suzuki Y, Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K, Fiber-optic biochemical gas sensor (bio-sniffer) for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 161(1), pp.486-492, 2012. (査読有り)
- (3) Arakawa T, Ando E, Wang X, Miyajima K, Kudo H, Saito H, Mitani T, Takahashi M, Mitsubayashi K, A highly sensitive and temporal visualization system for gaseous ethanol with chemiluminescence enhancer, *Luminescence*, 27, pp.328-333, 2012. (査読有り)
- (4) Chu MX, Miyajima K, Takahashi D, Arakawa T, Sano K, Sawada S, Kudo H, Iwasaki Y, Akiyoshi K, Mochizuki M, Mitsubayashi K. Biomedical soft contact-lens sensor for *in situ* ocular biomonitoring of tear contents,

Biomedical Microdevices, 13, pp.603-611, 2011. (査読有り)

- (5) Chu MX, Miyajima K, Takahashi D, Arakawa T, Sano K, Sawada S, Kudo H, Iwasaki Y, Akiyoshi K, Mochizuki M, Mitsubayashi K. Soft contact lens biosensor for in situ monitoring of tear glucose as non-invasive blood sugar assessment, *Talanta* 83, pp.960-965, 2011. (査読有り)
- (6) Miyajima K, Itabashi G, Koshida T, Tamari K, Takahashi D, Arakawa T, Kudo H, Saito H, Yano K, Shiba K, Mitsubayashi K. Fluorescence immunoassay using an optical fiber for determination of *Dermatophagoides farinae* (*Der f* 1), *Environmental Monitoring and Assessment*, 182, pp.233-41, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計7件)

- (1) Miyajima K, Tamari K, Kiyomiya E, Arakawa T, Kudo H, Shiba K, Mitsubayashi K, Fiber-optic fluoroimmunoassay system for *on site* monitoring of house dust mite allergen, *International Conference on BioElectronics, BioSensors, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2012 (Bio4Apps 2012)*, Singapore, Nov. 2012.
- (2) Miyajima K, Tamari K, Kiyomiya E, Hayashi M, Arakawa T, Kudo H, Shiba K, Mitsubayashi K, Fiber-optic fluoroimmunoassay system for *on site* determination of the indoor allergen, *Pacific Rim Meeting on Electrochemical and solid-state Science (PRIME2012)*, #2024, Hawaii, USA, Oct. 2012.
- (3) 宮島久美子, 玉利佳子, 清宮枝理世, 荒川貴博, 工藤寛之, 芝紀代子, 三林浩二, 住環境におけるアレルゲンの連続計測をめざした光ファイバ式蛍光免疫計測法に関する研究, 日本分析化学会第61年会, K3019, 金沢, 2012年9月.
- (4) 宮島久美子, 玉利佳子, 清宮枝理世, 荒川貴博, 工藤寛之, 芝紀代子, 三林浩二, 環境アレルゲン動態評価のための蛍光免疫計測システムに関する研究, 16p-F8-17, 第59回応用物理学会連合講演会, 東京, 2012年3月.

- (5) Miyajima K, Tamari K, Kiyomiya E, Arakawa T, Kudo H, Shiba K, Mitsubayashi K. Fiber-optic fluoro-immunosensor for monitoring of indoor allergens, 9th Asian Conference on Chemical Sensors, C1_5, Taipei, Taiwan, Nov. 2011.
- (6) Miyajima K, Tamari K, Arakawa T, Kudo H, Shiba K, Mitsubayashi K. Fiber-optic fluoroimmunoassay system for determination of dust mite allergen to improve indoor environment, 2nd International Conference on Bio-Sensing Technology 2011, P107, Amsterdam, Netherlands, Oct. 2011.
- (7) 宮島久美子, 玉利佳子, 清宮枝理世, 荒川貴博, 工藤寛之, 芝紀代子, 三林浩二. 環境アレルゲン動態評価のための光ファイバ式蛍光免疫計測システムに関する研究, PHS-11-031, 電気学会研究会センサ・マイクロマシン部門総合研究会, 東京, 2011年6月.

[その他]

- (1) センサエキスポジャパン 2012 次世代センサ展示コーナー, 東京, 2012年10月.
- (2) BioJapan 2011, アカデミックシーズ発表会, 「アレルゲン物質の住環境における動態評価のための光ファイバ式蛍光免疫計測システムに関する研究」, パシフィコ横浜, 2011年10月.
- (3) センサエキスポジャパン 2011 次世代センサ展示コーナー, 東京, 2011年10月.
- (4) 次世代センサ協議会 第61回研究会「東京医科歯科大学生体材料工学研究所の見学と研究会」, 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, 2011年9月.
- (5) 第44回モノづくり受発注商談会 in 大田」, 大田区産業プラザ (PiO) 4F コンベンションホール, 2011年2月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮島 久美子 (Miyajima Kumiko)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
技術職員
研究者番号: 10516298

(2) 研究協力者

三林 浩二 (Mitsubayashi Kohji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授
研究者番号：40307236

工藤 寛之 (Kudo Hiroyuki)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
講師
研究者番号：70329118

荒川 貴博 (Arakawa Takahiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教
研究者番号：50409637