

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390022

研究課題名(和文) イムノセンシング界面構築に関する研究

研究課題名(英文) Studies on Fabrication of Immunosensing Interface

研究代表者

田中 睦生 (Tanaka, Mutsuo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・グループ長

研究者番号：70344108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオセンサーとしての導波モードセンサーのパフォーマンス実証を目的に研究を展開した。表面がガラスであるセンシングチップにセンシング界面を構築するためのトリエトキシシラン誘導体表面修飾材料を開発し、抗レプチン抗体を固定化してセンシング界面を構築した。レプチンの検出限界値を検討したところ、PBS中では数十ng/mL、ヒトコントロール血清中では100ng/mL、二次抗体を用いた増感では数ng/mLのレプチンを検出できることを見だし、タンパク質の非特異吸着を効果的に抑制できたことから、導波モードセンサーが実用的なバイオセンサーとして有望であることを実証できた。

研究成果の概要(英文)：We studied on performance of the waveguide-mode sensor as a biosensor. Various triethoxysilane derivatives were synthesized to modify the surface of sensing chip, and the sensing interface for the sensor was fabricated to immobilize anti-leptin antibody on the modified chip. The detection limit of leptin was examined with modified sensing chips using various triethoxysilane derivatives, and the detection limits of leptin were several tens of ng/mL in PBS, 100 ng/mL in human serum, and several ng/mL in PBS with secondary antibody enhancement, respectively. The fabricated sensing interface showed an excellent potential against non-specific adsorption of proteins. These results suggests that the waveguide-mode sensor has potential for practical use as a biosensor.

研究分野：有機材料化学

キーワード：表面修飾材料 抗原抗体反応 バイオセンサー 導波モードセンサー

## 1. 研究開始当初の背景

イムノセンシング法は、タンパク質のような高分子生体関連物質の認識には抗体が適すること、疾病マーカーとなるタンパク質の発見、種々のタンパク質に対する抗体作製技術の進歩などによって大きく発展してきた、代表的な生体関連物質検出法である。しかしイムノセンシング法には、抗体の安定性や測定値の再現性に欠けるといふ、定量を目的としたセンサーに用いるにあたって本質的な問題がある。その原因として、抗体が基板に非特異吸着されることによる抗体の失活、抗体が不適切な配向で基盤に固定化されることによる抗体の機能不全という二種類が考えられている。抗体の基板への非特異吸着を防ぐには、抗体と抗体の間隙を PEG や BSA など、タンパク質と相互作用しにくい分子で埋めるとよいことが報告されている。また、界面構築の際に抗体の配向を制御する方法として、抗体の Fc 領域と選択的に結合するプロテイン A やプロテイン G 等を用いることによって抗体の配向を制御でき、不適切な配向による抗体の機能不全を回避して感度を向上できることが報告されている。検出物質であるタンパク質は分子量が大きいために拡散速度が遅く、バッチ系では抗原抗体反応が平衡に達するまで時間がかかることが知られている。そのためイムノセンシング法を用いたバイオセンサーでは、流路を用いてフロー系を構築して抗原抗体反応が迅速に平衡に達するような工夫が必要である。さらには、フロー系にすることによって測定試料の揺らぎによるノイズが低減されてセンサーの応答性が安定することが知られている。抗体の固定化法には物理吸着固定化法と化学結合固定化法があるが、フロー系がセンサーへの展開に有効であるという背景から、試料溶液の流れによる抗体の脱離を抑制できる化学結合による抗体固定化法の開発が求められている。

抗体の化学結合固定化に用いる代表的な表面修飾材料として、メルカプト化合物とシラン化合物がある。メルカプト化合物は金表面上に自己組織化単分子膜を形成することから、SPR や QCM などのバイオセンサーのセンシング素子表面修飾材料として種々のメルカプト化合物が報告されている。しかしメルカプト化合物では、混合自己組織化膜形成後の分子移動による凝集化が報告されていることから、修飾表面の安定性という視点から分子レベルで構造制御したセンシング界面構築材料としては限界がある。その一方でシラン化合物は、表面を親水処理することによって多様な基板を表面修飾できる材料として知られている。特にガラスやITOをはじめとする透明な基板を表面修飾でき

ることから、目的とするタンパク質を高感度検出できる ELISA を用いた化学発光法をはじめとした、発光や着色などの光学的検出センシング界面の構築に有用である。しかしシラン化合物によるセンシング界面構築では、抗体固定化に至るまでに多段階を必要として表面修飾法にノウハウ的な要素が色濃く、しかも抗体の固定化機能やタンパク質の非特異吸着抑制機能を持つシラン化合物の報告例は数少ない。結果として、ガラス基板に分子レベルで構造制御して表面修飾を行い、イムノセンシング界面を構築し、抗体の安定性や測定値の再現性に関する問題の解決を目指したイムノセンシング界面構築法の研究はなされていない。さらには、実試料測定で不可避である検出タンパク質以外の物質の非特異吸着に由来する応答の低減法を統合的に検討した研究もなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、イムノセンシング法における抗体の安定性や測定値の再現性に欠けるといふ問題の解決を目的に、ガラス基板に分子レベルで構造制御したイムノセンシング界面を構築し、界面構造と抗体機能の相関を検討する。ガラス基板を表面修飾するセンシング界面構築材料には、抗体固定化機能やタンパク質の非特異吸着抑制機能を有するシラン化合物を用い、抗体の配向制御にはプロテイン A やプロテイン G を用いる。さらには、検出感度向上を目的に、抗体の配向制御による増強法、および金粒子で標識した二次抗体を用いた増幅法の開発を、実試料測定で不可避である検出タンパク質以外の物質の非特異吸着に由来する応答の低減法と統合して試みる。

## 3. 研究の方法

抗体の基板への非特異吸着を抑制したセンシング界面の抗体の安定性を、抗体固定化分子の鎖長、非特異吸着抑制分子の鎖長、抗体固定化分子と非特異吸着抑制分子のモル比を変化させ、界面構造と抗体安定性の相関を検討する。抗体の配向を制御するために、プロテイン A、あるいはプロテイン G をセンシング界面に固定化して抗体を導入し、抗体の配向が測定値の再現性と抗体の安定性に及ぼす影響を明らかにする。さらには、抗体配向の制御による増強効果、標識二次抗体を用いた増幅効果、血清における非特異吸着由来の応答低減法について統合的に検討する。これら一連の検討には、抗レプチン抗体およびセンシング素子表面がガラスである導波モードセンサーを用いる。

## 4. 研究成果

ガラス表面に抗体を固定化する場合、アミノプロピルトリエトキシシランを用いた表面アミノ化、カルボキシル化、活性エステル化、抗体固定化といった、多段階反応が必要である。この工程を一段階で完結できるように抗体固定化表面修飾材料として、スクシンイミドエステルを導入したトリエトキシシランを設計・合成した(図1)。同様に測定試料に含まれるタンパク質の非特異吸着や抗体の非特異吸着を防ぐ非特異吸着抑制表面修飾材料として、メトキシオリゴエチレングリコールを導入したトリエトキシシランの設計・合成も行った(図2)。オリゴエチレングリコール鎖は鎖長によって非特異吸着抑制機能が異なることが知られているので、2~5ユニットのオリゴエチレングリコールを用い、それらの鎖長に合わせてスクシンイミドエステル誘導体にC12、C16、C20三種類の鎖長のアルキル鎖を導入した。

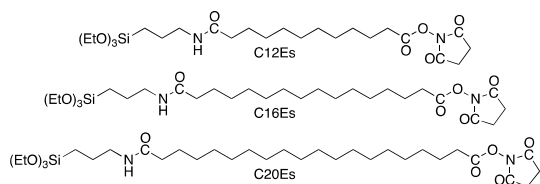


図1: 抗体固定化表面修飾材料

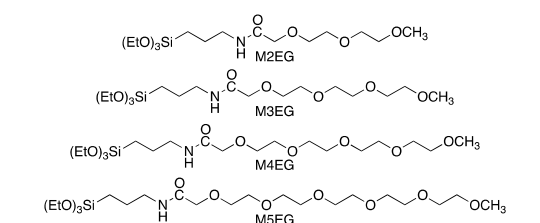


図2: 非特異吸着抑制表面修飾材料

合成した表面修飾材料を用いて、図3に示すような抗体固定化表面修飾材料と非特異吸着抑制表面修飾材料の混合比を調整して抗体固定化濃度が異なるセンシング界面や、界面を構成する分子鎖長が異なるセンシング界面を構築し、抗原抗体反応による応答がどのように変化するかを検討した。

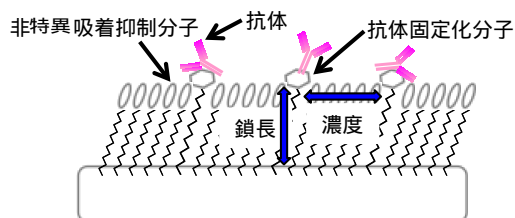


図3: センシング界面の構築

まず図3に示した単分子膜状修飾表面が形成されるような表面修飾条件を、M3EGを用いて探索した。センシング基板はガラスであるので、XPSを用いた表面元素分析では、表面修飾が進行するに従って窒素原子の割合が増加する。修飾表面が多層であれば窒素原子の割合はケイ素原子と窒素原子の和

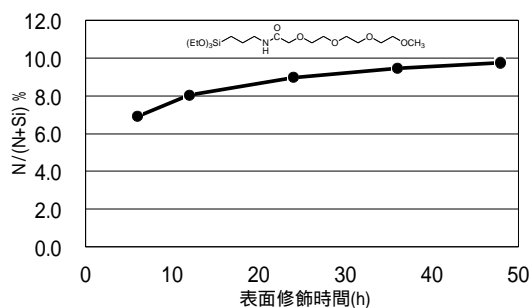


図4: 修飾表面のXPS解析

の50%になり、単層であれば窒素原子の割合は5~15%程度で頭打ちになることを先の研究で見いだしている。M3EGの1mMトルエン溶液を用い、50で表面修飾を行った場合のXPS解析結果を図4に示す。表面修飾時間と共に窒素原子の割合は増加するが、10%程度で頭打ちとなる傾向が観察された。同様な傾向はすべての表面修飾材料で見られたことから、本研究で合成した表面修飾材料は、単分子膜状に表面修飾する性質があることが明らかとなった。さらには、鎖長が長くなると反応性が著しく低下するため、鎖長が長い表面修飾材料で密に表面修飾するためには、酢酸を添加するなどの工夫が必要であることが明らかになった。

このようにして単分子膜状表面修飾を行い、ヒトコントロール血清を用いて非特異吸着の抑制効果を比較検討したところ、M2EGからM5EGへと鎖長が長くなるに従って非特異吸着の抑制効果は高まり、M3EG~M5EGでは界面活性剤含有PBSで洗浄することによって非特異吸着は検出限界以下に抑制できることが見いだされた。

以上の表面修飾材料の反応性を踏まえて、抗体固定化表面修飾材料と非特異吸着抑制表面修飾材料の混合比による応答変化を検討した。抗体には糖尿病のプレマーカーとして知られているレプチンを検出できる抗レプチン抗体を用いた。図5に示すように、応答は抗体固定化表面修飾材料の割合に比例して大きくなり、やがて頭打ちとなる傾向が見られた。この結果は、抗体固定化表面修飾材料の割合と共にセンシング界面に固定化される抗体濃度が増加して応答が増大するが、ある程度以上では表面が抗体で単分子膜状に覆われて飽和状態になるため頭打ちに

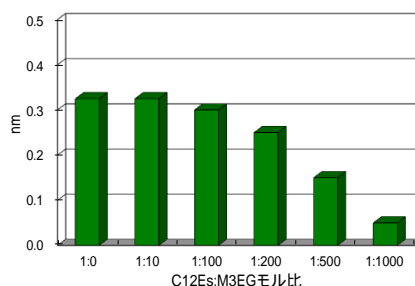


図5: 修飾表面材料構成比と応答

なることを反映していると考えられる。

次に様々な鎖長の抗体固定化表面修飾材料と非特異吸着抑制表面修飾材料の組み合わせを検討した。その結果を図6にまとめた。いずれの鎖長の組み合わせにおいても応答は抗体固定化表面修飾材料の割合に比例して増加する傾向が見られた。表面修飾条件はM3EG、あるいはM4EGに合わせたため、M3EGの場合はC16EsとC20Es、M4EGの場合はC20Esの反応性が低いために抗体固定化表面修飾材料の割合が減少し、応答は低くなっている。その一方で、非特異吸着抑制表面修飾材料(M4EG)の鎖長が抗体固定化表面修飾材料(C12Es)より長い場合には、まったく応答が見られないという結果が得られた。この結果は、抗体固定化表面修飾材料のスクシンイミドエステル部位が非特異吸着抑制表面修飾材料に埋もれてしまい、抗体と結合することができず、結果として抗体が固定化されないため応答が見られなかったと解釈できる。以上の結果より、抗体固定化表面修飾材料と非特異吸着抑制表面修飾材料を混合して表面修飾を行う場合には、反応性を考慮した最適の混合割合と、鎖長を考慮した組み合わせを検討する必要があることが明らかになった。

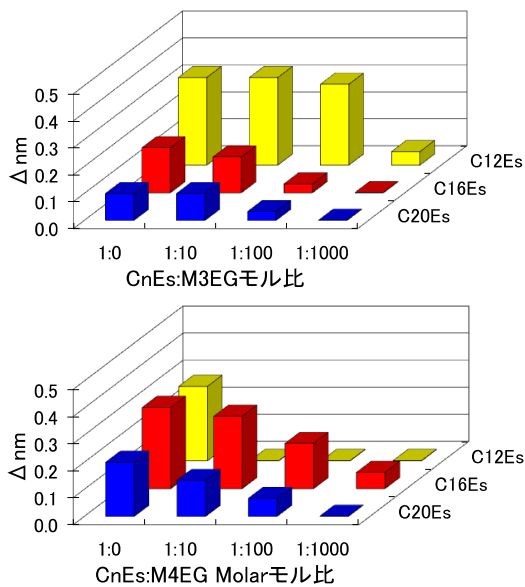


図6: 修飾表面材料構成比・組み合わせと応答

以上の結果を踏まえて、C12EsとM3EGを用いて表面修飾を行い、抗レプチン抗体を固定化してPBS中のレプチン検出を行った。その結果、図7に示すように、導波モードセンサーの理論検出限界値に近い数十ng/mLの濃度のレプチンが検出できることが明らかになった。

同様な条件下で、ヒトコントロール血清中のレプチン検出を行った。図8に示すように、100ng/mLまでのレプチンは検出可能であったが、それ以下の濃度ではヒトコ

ントロール血清に含まれるタンパク質の非特異吸着の影響が顕著になり、ベースラインが上昇して検出は困難になることが明らかになった。PBS中での検出限界が数十ng/mLであることを考慮すると、M3EGは非常に優れた非特異吸着抑制効果を発揮しているといえる。そこでM3EG-C12Es修飾表面上に固定化した抗体の安定性を評価するために、抗体を固定化したセンシングチップを4週でPBS中保存し、その応答の経時変化を検討した。その結果、保存4週間でも全く応答は変化しないことが確認され、M3EG-C12Es修飾表面上では抗体の非特異吸着による失活が効果的に防止できることが示唆された。

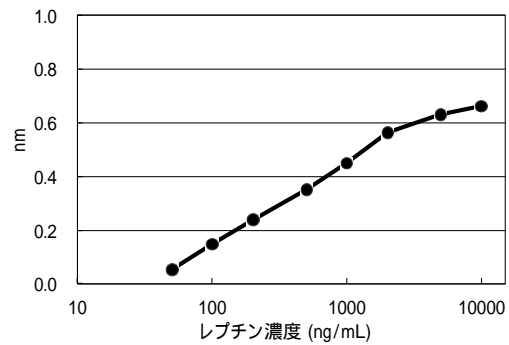


図7: PBS中のレプチン検出

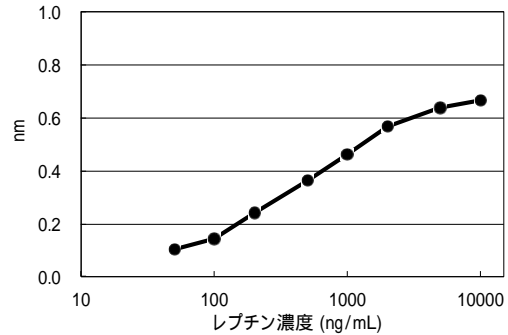


図8: 血清中のレプチン検出

非特異吸着の抑制効果は、M3EG < M4EG < M5EGであったので、M5EGとC20Esを用いて混合表面修飾を行い、同様にヒトコントロール血清中のレプチン検出を検討した。結果は予想に反し、500ng/mLの濃度のレプチンでも非特異吸着のため検出困難であった。そこで非特異吸着抑制表面修飾材料と抗体固定化表面修飾材料の組み合わせの他に、抗体固定化表面修飾材料のみでも表面修飾を行って抗レプチン抗体を固定化し、レプチン濃度50ng/mLのヒトコントロール血清に対する応答を比較検討した。その結果を、比較のため一番左にPBS中でレプチン濃度50ng/mLの場合の応答を加えて図9に示した。ここでPBS中での応答より大きな応答における増加分は、ヒトコントロール血清に由来するタンパク質の非特異吸着による応答である。図9より明らかなように、非特異吸着による応



答はM3EG-C12Esで最小であり、M4EG-C16Es、M5EG-C20Esと増大していくことが明らかになった。さらに注目すべきは、抗体固定化表面修飾材料が非特異吸着を誘起することで、C12Esは最も非特異吸着を誘起しにくいことが示されている。すなわち、非特異吸着抑制表面修飾材料は鎖長が長いほど非特異吸着を抑制するが、抗体固定化表面修飾材料は逆に非特異吸着を誘起し、両者のバランスの結果としてM3EG-C12Esが最良の修飾表面であることが明らかになった。

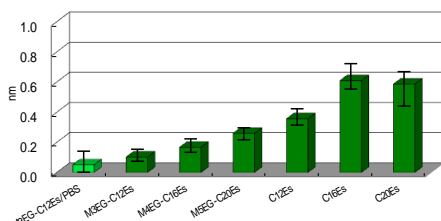


図9: 組み合わせによる非特異吸着抑制効果

免疫センシングでは、様々な増感法が試みられている。二次抗体を用いた増感法は、その中で最も汎用されている手法である。そこでM3EG-C12Es修飾表面を用い、二次抗体による増感効果を検討するためPBS中のレプチン検出を行った。図10より明らかなように、数ng/mLのレプチンが検出できることが見いだされ、二次抗体を用いることによって約10倍の増感が可能であることを見いだした。

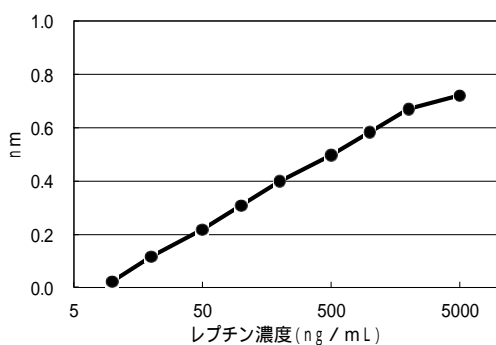


図10: 二次抗体を用いたPBS中のレプチン検出

抗原抗体反応の増感法の一つに、抗体の抗原との結合領域FcとFb領域を測定試料側に向けるように配向を制御して固定化する方法がある。その目的のために抗体のFc領域と選択的に結合するプロテインA、あるいはプロテインGが用いられている。本研究では、M3EG-C12Es修飾表面にプロテインA、あるいはプロテインGを固定化し、さらに抗レプチン抗体を導入したセンシング界面を構築してPBS中のレプチン検出を行った。しかしいずれも数十ng/mLのレプチンが検出できるという程度にとどまり、明確な増感効果は見られなかった。この結果は、M3EG-C12Es修飾表面に固定化されたプロテインAやGの配向性がラ

ンダムであるために抗体の配向性制御の効果が薄れてしまったためと考えられる。

導波モードセンサーの特徴の一つは着色した物質を高感度で検出できることであり、感度は数千倍になるという特性がある。そこでこの特性を利用した高感度検出を検討するために、金粒子で着色標識した二次抗体の調整を実施した。しかし非特異吸着を抑制するためにオリゴエチレングリコールを用いて金粒子に表面修飾を施すと、導波モードセンサーが応答しなくなることが判明し、この系は実施不可能であることが明らかになった。

## 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7件)

M. Tanaka, K. Yoshioka, Y. Hirata, M. Fujimaki, M. Kuwahara, O. Niwa, Design and Fabrication of Biosensing Interface for Waveguide-Mode Sensor, Langmuir, 査読有、29、2013、13111-13120.

DOI:10.1021/la402802u

M. Yoshimoto, Y. Yuda, M. Tanaka, S. Kurosawa, Behavior of QCM Energy Dissipation in Polyethylene Glycol Solutions, J. Oleo. Sci., 査読有、63、2014、75-82.

DOI:10.5650/jos.ess13122

D. Kato, A. Oda, M. Tanaka, S. Iijima, T. Kamata, M. Todokoro, Y. Yoshimi, O. Niwa, Poly-□-Lysine Modified Nanocarbon Film Electrodes for LPS Detection, Electroanalysis, 査読有、26、2014、618-624.

DOI:10.1002/elan.201300542

R. Funayama, Y. Nakahara, S. Kado, M. Tanaka, K. Kimura, A Single-Molecule Force-Spectroscopic Study on Stabilization of G-Quadruplex DNA by a Telomerase Inhibitor, Analyst, 査読有、139、2014、4037-4043.

DOI:10.1039/c4an00439f

M. Yoshimoto, K. Honda, S. Kurosawa, M. Tanaka, Dynamic Properties of Self-Assembled Monolayers of Mercapto Oligo(ethylene oxide) Methyl Ether on Oscillating Solid-Liquid Interface, J. Phys. Chem. C, 査読有、118、2014、16067-16073.

DOI:10.1021/jp411186n

A. Oda, D. Kato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Kamata, M. Todokoro, O. Niwa, Fluorinated Nanocarbon Film Electrode Capable of Signal Amplification for

Lipopolysaccharide Detection、  
Electrochimica Acta、査読有、197、2016、  
152-158.

DOI:10.1016/j.electacta.2015.12.100

M. Yoshimoto、D. Matsunaga、M. Tanaka、  
S. Kurosawa、Determination of  
Thermodynamic Parameters for Enolization  
Reaction of Malonic and Methylmalonic Acids  
by using Quartz Crystal Microbalance、Anal.  
Chem. Res.、査読有、8、2016、9-15.

DOI:10.1016/j.ancr.2016.03.002

〔学会発表〕(計4件)

第62回高分子学会年次大会、田中睦生、  
吉岡恭子、平田芳樹、藤巻真、シラン化合物  
を用いた抗原抗体反応界面の構築、2013  
年5月30日、京都国際会館(京都府京都市)

第62回高分子討論会、田中睦生、澤口隆  
博、平田芳樹、笹川知里、田和圭子、表面修  
飾材料の金粒子水分散性と非特異吸着抑制  
機能、2013年9月13日、金沢大学角間  
キャンパス(石川県金沢市)

第63回高分子学会年次大会、田中睦生、  
吉岡恭子、平田芳樹、藤巻真、導波モードセ  
ンサー感度増強界面の構築、2014年5月  
28日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

第64回高分子学会年次大会、田中睦生、  
澤口隆博、平田芳樹、丹羽修、田和圭子、笹  
川知里、蔵岡孝治、表面修飾材料と生体適合  
性、2015年5月28日、札幌コンベンシ  
ョンセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/hri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 睦生 (TANAKA, Mutsuo)

産業技術総合研究所 健康工学研究部門  
グループ長

研究者番号: 70344108