

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420207

研究課題名(和文)多サンプル測定マイクロチップを用いたユビキタス・検査システムの創製

研究課題名(英文)Development of an ubiquitous inspection system using ELISA chips to identify multiple allergen proteins simultaneously

研究代表者

長谷川 忠大 (Hasegawa, Tadahiro)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10340605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギータンパク質を定量した 1mmのニトロセルロース膜をマルチレイヤリソグラフィによりチップ内に内包し、複数反応場の多サンプル測定ELISAチップを開発した。本チップを用いて、直列に接続した反応場から特定のアレルギータンパク質のみをコンタミネーションなく検出可能であること、1次抗体量50ng以上、2次抗体量50ng以上のときに従来のマクロな系でのドットプロット法と同程度の発色が得られること、1次抗体量により発色の定量的な変化が得られることを実証した。また、検査時間の全工程を30分に短縮することに成功した。さらに、空気圧駆動による順次送液システムのプロトタイプを試作し、順次送液を検証した。

研究成果の概要(英文)：The ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) chip to detect multiple allergen proteins simultaneously was developed successfully. This chip (27x10mm²) consists of multiple nitrocellulose membrane with 1mm diameter that immobilized several allergen proteins with 50ng amount only. The experimental results demonstrated that 1) the specific allergen protein, and 2) the quantitative change of the antigen-antibody reaction depending on amount of antibody were able to be detected without contamination. The detection procedure that is only to inject antibodies in order into the chip is easy. The time for the whole procedure is short with 30 min. Moreover, the prototype of a sequence supply system for ELISA method was fabricated and verified whether it is able to supply reagents in order. This ELISA chip that can specify the allergen protein that causes the patient's allergic disease is useful for the hyposensitization therapy.

研究分野：ロボット工学

キーワード：アレルギータンパク質 ELISA マイクロ化学チップ

1. 研究開始当初の背景

食品衛生関連法令により、食品中のアレルゲン物質の表示が義務づけられ、アレルゲン物質の検出や、環境に含まれるダイオキシン等の化学物質の検出、狂牛病や HIV 感染症の検査に ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）法が広く適用されている。また、ELISA 法は、精密分析前のスクリーニングとして適用されるため、1) 簡易操作、2) 短時間検査、3) 少サンプル・試薬量、4) 多サンプル同時測定、5) 高感度検出が求められる。しかし、ELISA 法は、1) 複数の工程があり、2) 反応系の拡散距離が数 mm～数 cm あり測定時間が長く、3) 大量のサンプルや試薬、4) 検出用の高価な装置が必要で、キット化した製品はあるものの一般の方が適宜使用することは難しい。一方、マイクロ流路にマイクロビーズを充填することにより、マイクロチップにおいて ELISA 法を適用した報告がある[1]。マイクロ流路の反応系は、分子拡散距離が短くかつ比表面積が大きいことから反応効率が良く、測定時間の大幅な短縮に成功した。しかし、ビーズに対する前処理が煩雑かつ測定結果がビーズの充填状態に依存するため実用化は難しい。

以上のことから、チップ内で ELISA 法を用いたスクリーニング検査が簡易にできる検査システムが開発できれば、少子高齢化先進国として自身のスマートライフケアを支援する検査ツールの 1 つとなり、技術的インパクトが期待できる。

2. 研究の目的

ELISA^{*1}法は定量・特異性に優れ、環境物質、食品、疾患等のスクリーニングに広く利用され、キット化した製品もある。しかし、操作スキルや複数工程、検査時間も長く一般の方の利用は難しい。そこで、少子高齢化先進国として、セルフライフケアを支援する ELISA 法を用いたユビキタス・検査システムを提案・開発する。本課題では、厚生労働省が重要課題としているアレルギー疾患の検査を対象とし、シングル流路にて多種類あるアレルゲンを一度に測定可能なマイクロチップと、簡易操作の検査システムを開発する。これにより、微量の血液で多種類あるアレルゲンの短時間検査を実現し、セルフライフケア用の簡単かつ正確な検査ツールを提供する。

^{*1} ELISA は、試料中に含まれる抗体または抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法。本研究での抗原はアレルギー疾患の原因物質であるアレルゲンタンパク質である。

3. 研究の方法

本課題の目標は、マイクロ反応場に抗原（アレルゲンタンパク質）を固定化し、シングル流路にて多サンプル測定できるマイクロチップと、ELISA 法を簡単な手動操作で実

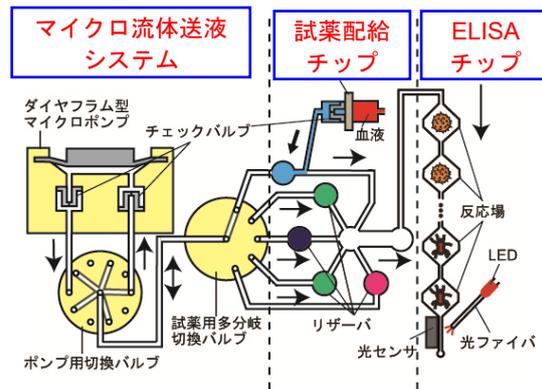


Fig.1 ELISA法を用いた検査システムの概要図

施できる空気圧駆動順次送液システムを開発することである。以下に、目標を整理する。

- 【目標1】シングル流路にて多サンプル測定できるマイクロチップの開発
- 【目標2】ELISA法を簡単な手動操作で実施できる空気圧駆動順次送液システムの開発

Fig.1 に本課題の目標とする測定システムの概要図を示す。上記の目標に対し3つの具体的研究項目を設定し、3ヶ年計画にて達成する。

<平成26年度の研究計画・方法>

- 【研究項目1】マイクロ反応場におけるアレルゲンタンパク質の確実な固定化

これまで、いくつかの親水化処理と4℃の環境での乾燥時間の条件を組合せた固定化などを試みてきた。しかし、セルロース膜を用いた従来のドットプロット法と比較して、本課題のマイクロチップを用いた抗原抗体反応は発色が悪い。顕微鏡下にて観測したところ、全てのアレルゲンタンパク質が確実に固定化されず、抗体に溶け出しマイクロ反応場外（またはマイクロチップ外）に排出されており、これを解決する必要がある。確実にタンパク質を固定化することにより、少ない一次抗体量（目標の2μL）での反応を実現する。

- 【研究項目3】空気圧駆動による順次送液システムの開発

微量一定量の試薬を送液する場合、一般的に非圧縮性の緩衝液を介して行う。しかし、ポンプ等の送液部にも緩衝液が注入され汚染を回避するため使用後に洗浄が必要になり手間がかかる。一般の医療機器でも同様の課題を持っているが、空気は高圧縮性で流体の送液・制御が難しい。すでに、基盤なるチップ群の実証機は開発済みであり、それらを適用した空気圧駆動での順次送液システムを開発する。また、駆動ユニットのディスクを手動回転させる等の単純操作のみで送液可能とする。

<平成27年度以降の研究計画・方法>

【研究項目2】検出感度の最小値

現在、抗原量(アレルゲンタンパク質) 1 μ L, 一次抗体(血液) 4 μ L, 他の試薬も 4 μ L として、暫定的に実験を実施している。しかし、無痛針で穿刺し採血することを想定した場合、2 μ L の一次抗体で反応を実現していく。

研究項目1, 3もスケジュールに従い実施していく。

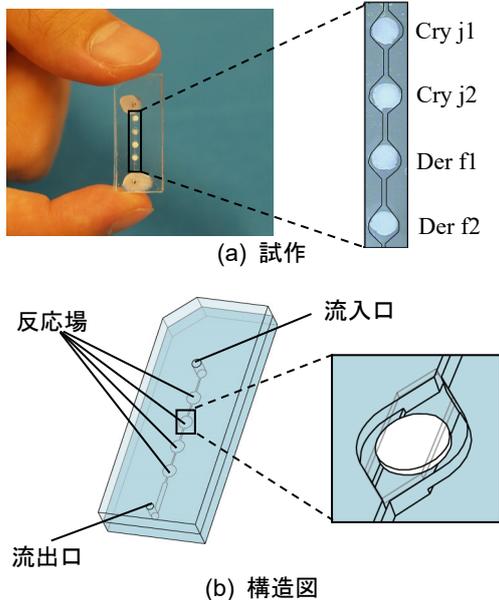


Fig.2 多サンプル測定 ELISA チップの試作

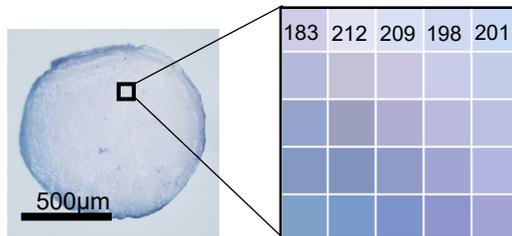


Fig.3 発色輝度の取得

4. 研究成果

4-1. 多サンプル測定 ELISA チップの開発

マイクロ流路内に ELISA の直接吸着法を適用する場合、検査したいアレルゲンタンパク質のマイクロ化学チップ内への固定が課題となる。そこで、タンパク質を吸着できるニトロセルロース膜を ϕ 1mm に加工し、定量したアレルゲンタンパク質を吸着させた後に、チップ内の反応場に内蔵した。これにより、アレルゲンタンパク質をチップ内に固定し、アレルゲンタンパク質を固定する反応場を流路に対し直列に接続して一括に抗原抗体反応を行う。定量したアレルゲンタンパク質を吸着させたニトロセルロース膜を、マルチレイヤリソグラフィにより 4 個の反応場にハイブリッドした ELISA チップを作製した (Fig.2)。また、マイクロリソグラフィ技術により微細構造を製作した場合、深さ 30

μ m 程度の反応場になってしまい、厚さ 150~180 μ m あるニトロセルロース膜を内蔵できる反応場を作製できない。そこで、高アスペクト比の構造物の作製が可能なマイクロ光造形法を用いて鋳型を作製し、信越シリコン社製 RTV シリコンゴム「KE-1603-A/B」を流し込んで流路チップを作製した。そして、アレルゲンタンパク質を固定したニトロセルロース膜を反応場へ挿入して、O₂ プラズマ処理を施したカバーを接着させ、ELISA チップを完成された。また、反応場の中を試薬が適正に流入して充填されるよう検証・改良がなされている。そして、本 ELISA チップの検証のために、日本人の約半数が罹患するアレルギー性鼻炎・花粉症で、最も罹患者数の多いスギ花粉症患者の 9 割以上が病原とするスギ花粉アレルゲンタンパク質 Cry j1, Cry j2 と、室内中の総ダニ数の半数以上を占めているヤケヒョウヒダニに含まれるダニアレルゲンタンパク質 Der f1, Der f2 を検査対象とし、4 つの反応場を持つチップとしている。さらに、抗原抗体反応を発色で確認できるように、酵素基質としてテトラメチルベンジジン (TMB) を使用する。TMB は溶液中でペルオキシダーゼが作用することにより酸化を受け、強い青色の化合物へ変化する。また、本研究では、HLS 色空間における輝度 L (Luminance) の、発色領域内における平均値を発色強度の指標として利用し検出感度を評価する。画像処理プログラムは、Microsoft Visual C++ および OpenCV2.4.9 を使用し、プログラムの輝度抽出手順は以下に示す通りである。

- 1) 配列データとして撮影画像データを取込
- 2) 色空間を RGB から HLS に変換
- 3) 発色領域のみを対象とした処理を行うためマスク画像を生成
- 4) 発色領域の画素数をカウントし輝度 L の合計値を算出
- 5) 平均値、標準偏差を計算して出力

この輝度は、0~255 の値をとり、0 が最も暗い状態、255 が最も明るい状態を示す。よって、この輝度の値が小さいほど、発色が強いということになる (Fig.3)。

4-2. ELISA チップを用いた抗原抗体反応の検証実験

上述した多サンプル測定 ELISA チップを用いて、試薬を順次送液することにより直接吸着法による抗原抗体反応を実施し、以下の検証を行った。

- 1) 1 次抗体量を変化させ、チップ内における発色強度の定量的変化
- 2) 4 種のアレルゲンタンパク質からコンタミネーションなく特定のアレルゲンタンパク質のみの検出

表 1 に示す実験条件により、以下の手順で行った。

- ① 1 次抗体の送液
マイクロチューブ内に、1 次抗体を表 1 に

表 1 実験条件

アレルゲン タンパク質	抗原名	量
	Cry j1	50ng
	Cry j2	50ng
	Der f1	50ng
	Der f2	50ng
1次抗体	抗体名	量
	抗 Cry j1 抗体	100ng
	抗 Cry j2 抗体	100ng
	抗 Der f1 抗体	200ng
	抗 Der f2 抗体	200ng
2次抗体	抗体名	量
	抗 IgG 抗体	100ng
洗浄液	試薬名	
	TTBS	
発色試薬	試薬名	
	TMB	

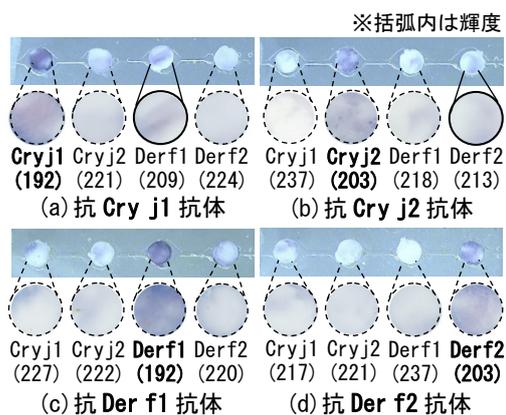


Fig.4 ELISA チップ内での抗原抗体反応による発色

示す目標量を滴下する。シリコンチューブを ELISA チップに接続し、マイクロチューブ内の 1 次抗体を吸引する。ELISA チップ内に 1 次抗体を流入させ、チップ内で 1 次抗体を往復させることで震盪する。反応時間は 5 分とする。以降は、同様の手順で試薬を送液し、震盪する。

② 洗浄

10 μ l の TTBS を送液し 5 分間震盪することで、アレルゲタンパク質と反応しなかった余分な 1 次抗体を除去する。

③ 2 次抗体の送液

洗浄後、2 次抗体を送液し 5 分間震盪することで、1 次抗体と 2 次抗体を結合させる。

④ 洗浄

1 次抗体と結合しなかった余分な 2 次抗体を除去するために、10 μ l の TTBS を送液し 5

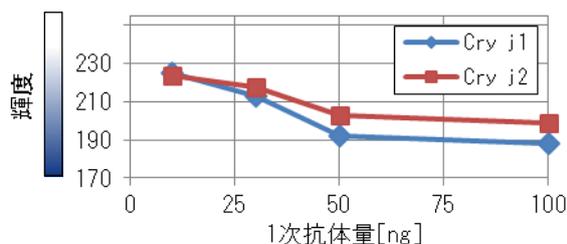


Fig.5 チップ内での発色輝度の定量的な変化

分間震盪して洗浄する。

⑤ 洗浄

1 次抗体と結合しなかった余分な 2 次抗体を除去するために、10 μ l の TTBS を送液し 5 分間震盪して洗浄する。

⑥ 発色試薬の送液

洗浄後、10 μ l の TMB を送液し、10 分間震盪することで発色させる。このとき、TMB は光によって分解を起こすため、発色後に遮光して顕微鏡で撮影する。

発色の様子を Fig.4 に示す。コンタミネーションせず特定のアレルゲタンパク質のみに発色反応を示すことが実証できた。このことから、多サンプル測定においても抗体量を増やす必要がないことが分かる。また、1 次抗体量による発色輝度の変化を Fig.5 に示す。マイクロ流路内においても 1 次抗体量により定量的に発色輝度が変化することも実証できた。以上のことから、直列に接続した 4 つの反応場から特定のアレルゲタンパク質のみをコンタミネーションなく検出可能であること、1 次抗体量 50ng 以上、2 次抗体量 50ng 以上のときに従来のマクロな系でのドットブロット法と同程度の発色が得られること、1 次抗体の量により発色の定量的な変化が得られることを実証した。また、試薬を震盪することで、検査時間の全工程を 30 分に短縮することに成功した。

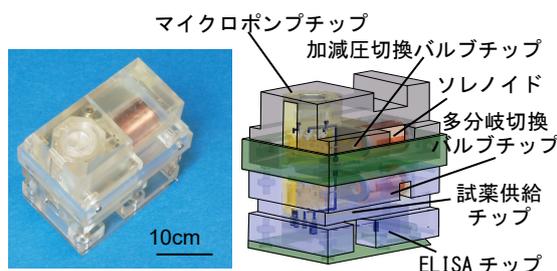


Fig.6 順次送液システムの試作

4-3. 順次送液システムの試作と検証

ELISA 法は、試薬等を順次送液するなど操作スキルや複数工程があり、検査結果のばらつきや低減や操作の自動化が望まれる。これに対して、いつでも・どこでも・誰でも ELISA 法を用いたスクリーニング検査ができる測定システムを提案してきた (Fig. 1)。これに対して、Fig. 6 に示す、ELISA の直接吸着法をチップ内で実施する空気圧駆動による順次送液システムのためのモジュラーチップ

のプロトタイプを試作し、順次送液を検証した。受動素子のみで試薬を順次送り込む試薬供給チップは機能しているものの、ポンプやバルブを含めた全体システムでは、デッドボリューム等による空気の圧縮の影響を受け、想定している動作通りに順次送液にならないことがあった。そのため、今後は、マイクロポンプの出力性能の向上と、デッドボリュームをさらに低減したチップ構成の検討が必要である。

<引用文献>

[1] K.Sato, et.al., Anal. Chem., 72, pp 1144 - 1147 (2000)

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0件)

[学会発表] (計6件)

- ① 不破敦宣, 曾根冬馬, 長谷川忠大, 山下光雄, “複数のアレルゲンタンパク質の同時検査のためのELISAチップの開発”, 第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 20pm3-P026, 2014年10月20日
- ② 長谷川忠大, “ユビキタス・マイクロ化学デバイスとアレルゲン検査への応用”, イノベーション・ジャパン 2014, 2014年9月11-12日
- ③ 不破敦宣, 曾根冬馬, 長谷川忠大, 山下光雄, “多サンプル測定ELISAチップの開発”, 第32回日本ロボット学会学術講演会, 2G2-09, 2014年9月6日
- ④ 不破敦宣, 長谷川忠大, 山下光雄, “アレルギー検査のためのELISA法を用いたマイクロ化学チップの開発”, 生体医工学シンポジウム 2015 (2015)
- ⑤ 不破敦宣, 長谷川忠大, 山下光雄, “複数のアレルゲンタンパク質を一括特定できるELISAチップの開発”, 第54回日本生体医工学会大会 (2015)
- ⑥ 長谷川忠大, 不破敦宣, 山下光雄, 安部悠紀, “アレルゲンタンパク質特定のための多サンプル測定ELISAチップ”, 生体医工学シンポジウム 2016

[図書] (計1件)

- ① 長谷川忠大 他, 「特集 医療用 uTAS への応用を見据えた MEMS 技術」中の「マイクロ化学チップを用いたアレルゲン検査のための多サンプル測定ELISAチップ」, 月刊 機能材料, 第36巻, 第7号, 通巻419号 (2016年7月5日発行) ISSN 0286-4835

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 忠大 (HASEGAWA, Tadahiro)
芝浦工業大学・工学部・教授
研究者番号: 10340605

(2) 研究分担者

山下 光雄 (YAMASHITA, Mitsuo)
芝浦工業大学・工学部・教授
研究者番号: 40220347

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()