

ノート (若手初論文)

マイクロ流体デバイスを利用した下痢性貝毒オカダ酸の 蛍光偏光免疫分析におけるブロッキング剤添加の影響

千田 駿亮¹, 高橋 和希¹, 福山 真央², 粕谷 素洋³,
真栄城 正寿⁴, 石田 晃彦⁴, 谷 博文⁴, 重村 幸治⁵,
Anatoly V. ZHERDEV⁶, Sergei A. EREMIN^{6,7}, 火原 彰秀², 渡慶次 学^{*4}

マイクロ流体デバイスを利用した分析では、流路壁面への試料等の吸着が問題になる場合がある。特にポリジメチルシロキサン (PDMS) 製デバイスを用いた免疫分析では、抗体や測定対象等の吸着が測定性能に大きく影響する。そこで本研究では、下痢性貝毒であるオカダ酸 (OA) を測定対象として、蛍光偏光免疫分析によるオカダ酸の検出感度における二種類のブロッキング剤添加の影響について検討した。また、得られた検量線から抗体とトレーサーに対する解離定数を算出した。

1 緒言

微量試料を迅速かつ簡便に測定できるマイクロ流体デバイスは、オンサイト分析や POCT (Point-of-Care Testing) に適しており、環境分析や食品分析¹⁾、臨床診断²⁾へ応用されている。マイクロ流路内での化学プロセス (反応や抽出、分離など) は、従来のマクロな系に比較すると高効率である反面、試料 (体積) に対する流路壁面が接している割合、比界面積、が大きいため、試料や試薬等の吸着が分析結果に大きく影響する場合がある³⁾。特に免疫分析においては、抗体や試料等の非特異吸着の影響を受けやすい⁴⁾。

著者らは、マイクロ流体デバイスを利用した蛍光偏光免疫分析法 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA) の開発に取り組んでいる。これまでに液晶を利用した小型蛍光偏光測定装置及びポリジメチルシロキサン (PDMS) 製マイクロ流体デバイスを開発し^{5)~7)}、カビ産生毒素であるデオキシニバレノール (DON) の検出に成功した⁸⁾。

FPIA は、均一系免疫分析法の一種であり、トレーサーと呼ばれる蛍光標識測定対象と測定対象の抗体に対する競合反応を利用している⁹⁾。フリーのトレーサーとトレーサー-抗体複合体の液中での回転運動の速さが大きく異なるため、偏光度を指標にして、試料中の測定対象の濃度定量を行う。トレーサーや抗体の流路壁面への吸着は回転運動を阻害するため、トレーサーや抗体が流路壁面に吸着すると、分析結果に大きく影響する。

そこで本研究では、下痢性貝毒であるオカダ酸 (OA) を測定対象として、蛍光偏光免疫分析による OA の検出感度における 2 種類のブロッキング剤添加の影響について検討した。ブロッキング剤として BSA と General Block を用いて、検出感度の比較を行った。測定対象として選択した OA は下痢性貝毒の一種であり、ホタテやカキ、アサリなどの二枚貝に含まれることがある。そのためそれらの貝の産地では、生産者による出荷前自主検査が行われている¹⁰⁾。我が国の OA の公定検査法は LC/MS/MS 法であるため、現在オンサイト分析は行われていない。オンサイト分析によるスクリーニング検査が実現できれば、これまで以上に安全かつ高効率な下痢性貝毒のリスク管理体制が構築できると考えられる。

2 実験

2.1 試薬類

OA とウシ血清アルブミン (BSA)、メタノールは富士フイルム和光純薬から購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) は Thermo Fisher 社より購入した。抗 OA 抗体 (マウス由来のモノクローナル抗体) は Abcam 社より購入した。ブロッキング剤の比較として使用した General Block は

* E-mail: tokeshi@eng.hokudai.ac.jp

¹ 北海道大学大学院総合化学院: 060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

² 東北大学多元物質科学研究所: 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1 西 1 号館 S212

³ 公立小松大学 生産システム科学部 生産システム科学科: 923-8511 石川県小松市四丁町ヌ 1 番地 3

⁴ 北海道大学大学院工学研究院: 060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

⁵ Tianma Japan 株式会社: 212-0058 神奈川県川崎市幸区鹿島田 1-1-2

⁶ ロシア科学アカデミーバイオテクノロジー研究センター A. N. Bach 生化学研究所: 119071 ロシア連邦モスクワ市レニンスキープロスペクト 33

⁷ M. V. Lomonosov モスクワ国立大学化学学部化学酵素学科: 119991 ロシア連邦モスクワ市レニンスキーゴローリ 1

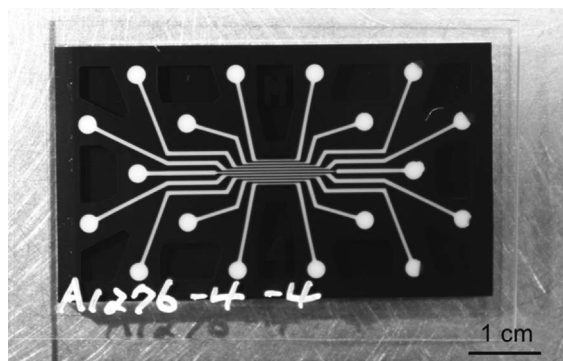


Fig. 1 Photograph of a microfluidic device
The width and depth of microchannels in the detection area are 200 μm and 900 μm , respectively.

ImmunoChemistry Technologies 社より購入した。トレーサーは、コスモバイオ社に依頼して合成した。

2.2 トレーサーの合成及び反応性の確認

2.2.1 トレーサーの合成 トレーサーは OA のカルボキシ基に対し、蛍光色素 (Tide Fluor 5WS) のアミノ基を縮合させることで合成した。オカダ酸 : DIC (1,3-ジイソプロピルカルボジイミド) : HOAt (1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール) : NMM (N-メチルホルモリン) を (1:1:1:0.5eq.) の比率になるように、1 mL DMF に溶解して混合し、5 分後にオカダ酸と同モル量のアミン色素 (Tide Fluor 5WS) を DMSO 少量で溶解して混入し、2 時間転倒混和した。その後、逆相 HPLC で目的物を分取精製し、凍結乾燥した。

2.2.2 結合活性試験 最初に合成したトレーサーと抗 OA 抗体の反応性を評価した。抗体溶液は PBS で希釈することにより、0~10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度範囲で 8 種類の抗体溶液を調製した。1% BSA 溶液は、PBS に BSA を溶解することで調製した。80 μL の PBS に、トレーサー溶液 (10 ng mL^{-1}) を 10 μL 加えたのち、抗 OA 抗体溶液を 10 μL 加えて 100 μL とした。BSA を添加する場合、70 μL の PBS に、1% BSA 溶液を 10 μL とトレーサー溶液 (10 ng mL^{-1}) を 10 μL 加えたのち、抗 OA 抗体溶液を 10 μL 加えて 100 μL とした。偏光度 (P 値) 測定には、マイクロ流体デバイス (Fig. 1) 及び以前に開発した小型蛍光偏光測定装置 (Fig. 2) を使用した^{5)~7)}。使用したマイクロ流体デバイスは、9 本のマイクロ流路が作製されているが、今回はそのうちの 8 本の流路を用いて FPIA 測定した。マイクロ流路に、抗体濃度が異なる 7 種類のサンプル溶液と 1 流路に抗体が含まれていないコントロール溶液を各 20 μL をピペティングにより導入した。測定は、3 個のデバイスを使用して、各濃度 3 回ずつ測定した。測定時間は、5 分とした。



Fig. 2 Photograph of fluorescence polarization measurement apparatus

2.3 オカダ酸の検出

OA は、1 mg mL^{-1} の濃度になるようにメタノールで溶解した。それを PBS で希釈することにより、0~20000 ng mL^{-1} の濃度範囲で 8 種類の OA 濃度の OA 溶液を調製した。70 μL の PBS に対して、各 OA 溶液を 10 μL 添加したのちに、10 ng mL^{-1} のトレーサー溶液と 750 ng mL^{-1} の抗 OA 抗体溶液をそれぞれ 10 μL 加えた。ブロッキング剤を添加する場合、60 μL の PBS に対して 1% BSA 溶液を 10 μL 、各 OA 溶液を 10 μL 添加したのちに、10 ng mL^{-1} のトレーサー溶液と 750 ng mL^{-1} の抗 OA 抗体溶液をそれぞれ 10 μL 加えた。その後、マイクロ流体デバイスを用いて、1 本の流路に 20 μL のコントロール溶液を導入し、7 流路に OA 濃度が異なる 7 個のサンプル溶液をそれぞれの流路にピペティングにより導入し、3 回測定した。測定時間は、5 分とした。

2.4 抗体の解離定数の算出

2.2.2 にて得た結果を用いて、抗体のトレーサーに対する解離定数を以下のように算出した。

溶液中のトレーサーの物質収支は、以下のように表される。

$$C_{\text{tracer}} = [\text{T}] + [\text{Ab-T}] \quad (1)$$

ここで、 C_{tracer} はトレーサー全濃度、 $[\text{T}]$ は遊離トレーサー濃度、 $[\text{Ab-T}]$ は抗体-トレーサー複合体濃度である。

また、トレーサー-抗体反応での解離定数は、

$$K_d = \frac{[\text{Ab}][\text{T}]}{[\text{Ab-T}]} \quad (2)$$

と表される ($[\text{Ab}]$: 遊離抗体濃度)。

偏光度は、

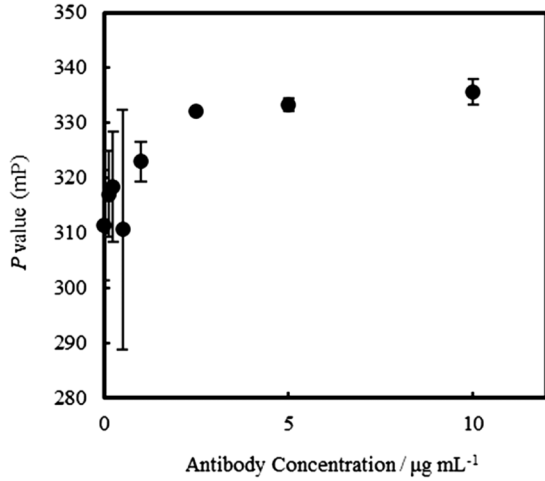


Fig. 3 Binding activity test between the synthesized tracer and anti-OA antibody

$$P = \frac{P_{Ab-T}I_{Ab-T} + P_T I_T}{I_{Ab-T} + I_T} \quad (3)$$

のように表され, ここで P は任意の $[Ab]$ における偏光度, P_{Ab-T} は複合体の偏光度, P_T は遊離トレーサーの偏光度, I_{Ab-T} は複合体の蛍光強度, I_T は遊離トレーサーの蛍光強度である.

遊離しているトレーサー及び複合体の蛍光強度がそれぞれの濃度に比例し, 比例定数が同じと仮定すると, 式(3)は,

$$P = \frac{P_{Ab-T}[Ab-T] + P_T [T]}{[Ab-T] + [T]} \quad (4)$$

と表すことができる.

ここで, P_{max} は最大の P ($[Ab] = \infty, [T] = 0$ の状態), P_{min} は最小の P ($[Ab] = 0, [T] = C_{tracer}, [Ab-T] = 0$ のとき) とすると, $P_{max} = P_{Ab-T}$ 及び $P_{min} = P_T$ となるので式(4)は, 式(1)と組み合わせると,

$$P = \frac{P_{max}(C_{tracer} - [T]) + P_{min} [T]}{C_{tracer}} \quad (5)$$

となり, 式(1)と式(2)より,

$$C_{tracer} = \frac{[Ab][T]}{K_d} + [T] \quad (6)$$

となる. 式(5)に式(6)を代入して整理すると, 解離定数 K_d は, 以下のように表される.

$$K_d = \frac{P_{max} - P}{P - P_{min}} [Ab], \quad (7)$$

ここで式の簡素化のために,

$$Y = \frac{P_{max} - P}{P - P_{min}} \quad (8)$$

とすると, 式(7)は,

$$K_d = Y[Ab] \quad (9)$$

となり, C_{Ab} (抗体の全モル濃度) を使うと, 抗体の物質収支は,

$$C_{Ab} = [Ab] + [Ab-T] \quad (10)$$

と表される. 式(9)と式(10)より,

$$K_d = Y(C_{Ab} - [Ab-T]) \quad (11)$$

となり, 式(1)と式(10)を式(2)に代入すると,

$$K_d = \frac{(C_{Ab} - [Ab-T])(C_{tracer} - [Ab-T])}{[Ab-T]} \quad (12)$$

となる. 式(11)と式(12)より,

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{K_d} C_{Ab} - \frac{C_{tracer}}{(1+Y)K_d} \quad (13)$$

となる. $1/Y < 1$ であるとき, 式(13)は

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{K_d + C_{tracer}} C_{Ab} \quad (14)$$

と近似することができるため, 得られた測定データに対して式(14)に対応したプロットを作成することで解離定数を求めることができる.

3 結果と考察

3.1 結合活性試験

Fig. 3にトレーサーと抗OA抗体の結合活性試験の結果を示す. 抗体濃度の増加に伴う偏光度変化は確認できたが, 測定誤差が大きく, 反応性を検証することが困難であった. 特に低濃度側で測定誤差が大きくなっていることから, トレーサーの流路壁面への非特異吸着の可能性が示

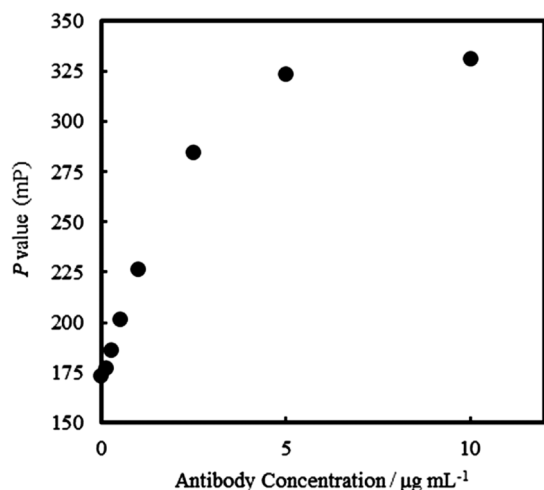


Fig. 4 Binding activity test between the synthesized tracer and anti-OA antibody under BSA-added conditions

唆された。そこで非特異吸着を抑制するために、サンプル溶液に BSA を添加した。Fig. 4 に BSA を添加したサンプル溶液の結合活性試験の結果を示す。期待されたように測定誤差が小さくなり、抗体濃度の増加に伴う偏光度変化を確認することができた。BSA の添加によりトレーサーの非特異吸着を抑制することが可能となり、合成したトレーサーが抗 OA 抗体に対し結合活性を有していることを確認できた。

3・2 OA の FPIA 測定

3・2・1 OA の定量 OA の FPIA 測定についても、最初に BSA を添加せずに行った (Fig. 5)。点線はコントロール溶液 (OA を含まないサンプル) の値を示している。OA 濃度の増加に伴う偏光度変化が測定されたが、低濃度側の測定誤差が大きく、正確な定量が困難であった。この原因は、3・1 の結合活性試験の場合と同様に、トレーサーの流路壁面への非特異吸着によるものだと考えられたため、BSA 添加サンプル溶液を用いて、再度 FPIA 測定を行った。その結果も Fig. 5 に示す。図中の点線と短破線は、それぞれ BSA を添加しなかった場合と添加した場合のコントロールの値を示している。BSA の添加により、非特異吸着が抑制され測定誤差が小さくなり、より低濃度側の測定が可能となった。検出限界 (Blank + 3σ) は、1.2 ng mL⁻¹ となった。

3・2・2 ブロッキング剤の比較 BSA を添加することで流路壁面への非特異吸着を抑制することができたことから、市販のブロッキング剤である General Block についても検討した。General Block を添加した場合の FPIA の結果も Fig. 5 に示す。BSA の結果と比較すると、コントロールの値が General Block (長波線) より BSA (短破線) を添

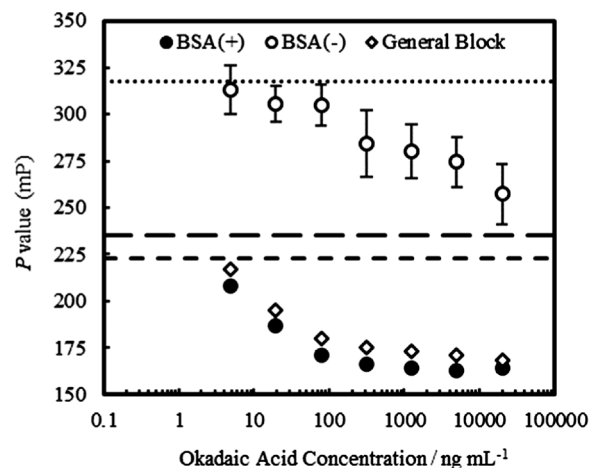


Fig. 5 Comparison of calibration curves for okadaic acid with BSA (●), without BSA (○) and with General Block (◇)

The short dashed, dotted, and long dashed lines are controls with BSA, without BSA and General Block, respectively.

加したサンプルのほうが低い。また、BSA 添加両者のほうが General Block 添加より低濃度領域が測定できる。これらのことから、今回検討した OA の FPIA の系では、BSA 添加のほうが General Block 添加より、良好な結果を与えることがわかった。この理由については明らかではないが、今後ほかのブロッキング剤による検討などを実施することで、明らかにしていきたい。

3・2・3 実験条件の最適化 最後に、FPIA 測定の実験条件の最適化を行った。BSA を添加した条件で、OA 溶液濃度及び抗 OA 抗体濃度を検討した。検討の結果、PBS : 1 % BSA 溶液 : OA 溶液 : トレーサー溶液 (2.5 ng mL⁻¹) : 抗 OA 抗体溶液 (300 ng mL⁻¹) = 60 μL : 10 μL : 10 μL : 10 μL : 10 μL の条件が最もよい検量線が得られた (Fig. 6)。Fig. 6 より得られた検出限界は 1.0 ng mL⁻¹ となった。OA の公定基準値は 16 ng mL⁻¹ (0.16 mg kg⁻¹ 可食部) であり¹¹⁾、本法が実サンプル中の OA の測定ができる可能性が示された。今後は、ホタテやカキなどの二枚貝を使った OA の添加回収試験を実施する予定である。

3・3 抗体の解離定数の算出

抗体のトレーサーに対する解離定数を算出した。Fig. 4 から得られた Y (式(8)) の逆数を抗 OA 抗体濃度に対してプロットしたグラフを Fig. 7 に示す。このプロットを式(14) でフィッティングすることで算出した解離定数は 0.75 nM となった。

4 結 言

OA を測定対象として、FPIA の系を構築した。ブロッキ

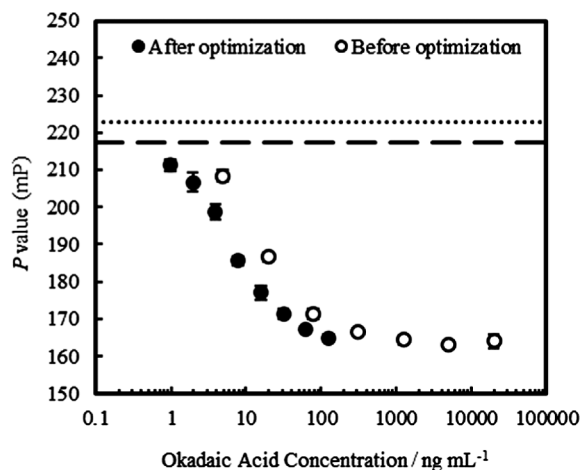


Fig. 6 Comparison of calibration curves for okadaic acid after optimization (●) and before optimization (○)

The dashed and dotted lines are controls after and before optimization, respectively.

ング剤を添加しない条件では、トレーサーの流路壁面への非特異吸着の影響で、測定が困難であった。一方で、ブロッキング剤を添加すると、OA濃度に応じた偏光度変化を測定することが可能であった。BSAとGeneral Blockの2種類のブロッキング剤添加の影響について評価した結果、BSA添加のほうが良好な結果を示した。最適化された実験条件では、実サンプル中のOAを十分測定できる感度を有していることが示された。今後は、二枚貝の実サンプルを用いた添加回収試験を実施し、本法によるオンサイト分析の可能性を検討していく予定である。

謝 辞

本研究は、農林水産省の戦略的国際共同研究推進事業 (JPJ008837) 及び Russian Science Foundation (project 20-43-07001) の助成を受けたものである。

文 献

1) L. S. A. Busa, S. Mohammadi, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, M. Tokeshi : *Micromachines*, **7**, 86 (2016).

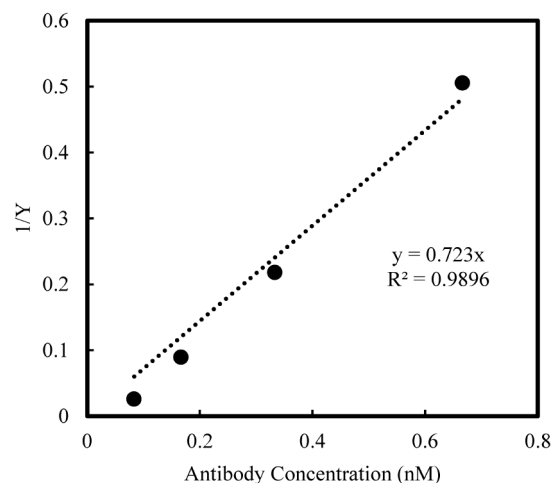


Fig. 7 Dependence of okadaic acid concentration on $1/Y$

- 2) W. Jung, J. Han, J.-W. Choi, C. H. Ahn : *Microelectron. Eng.*, **132**, 46 (2015).
- 3) H. Liu, M. Fukuyama, M. Kasuya, S. Onose, K. Shigemura, M. Tokeshi : *Proc. μ TAS 2021*, 1429 (2021).
- 4) 館 知也, 加地範匡, 渡慶次 学, 馬場嘉信 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 521 (2007).
- 5) O. Wakao, K. Satou, A. Nakamura, K. Sumiyoshi, M. Shirokawa, C. Mizokuchi, K. Shiota, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi : *Rev. Sci. Instrum.*, **89**, 024103 (2018).
- 6) O. Wakao, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, A. Hibara, M. Tokeshi : *Sens. Actuators B*, **285**, 418 (2019).
- 7) O. Wakao, K. Satou, A. Nakamura, P. A. Galkina, K. Nishiyama, K. Sumiyoshi, F. Kurosawa, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, M. A. Proskurnin, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi : *Lab Chip*, **19**, 2581 (2019).
- 8) A. Nakamura, M. Aoyagi, M. Fukuyama, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi : *ACS Food Sci.*, **1**, 1623 (2021).
- 9) O. D. Hendrickson, N. A. Taranova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, S. A. Eremin : *Sensors*, **20**, 7132 (2020).
- 10) 鈴木敏之 : 計測と制御 (*Keisoku To Seigyō*), **60**, 590 (2021).
- 11) <https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/gyokai/g_kenko/busitu/01b_kisei.html>.

Effects of Addition of Blocking Agents on Fluorescence Polarization Immunoassay of Okadaic Acid Using a Microfluidic Device

Shunsuke CHIDA¹, Kazuki TAKAHASHI¹, Mao FUKUYAMA², Motohiro KASUYA³,
Masatoshi MAEKI⁴, Akihiko ISHIDA⁴, Hirofumi TANI⁴, Koji SHIGEMURA⁵,
Anatoly V. ZHERDEV⁶, Sergei A. EREMIN^{6,7}, Akihide HIBARA² and Manabu TOKESHI^{*4}

* E-mail : tokeshi@eng.hokudai.ac.jp

¹ Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, Kita 13 Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

² Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8577

³ Faculty of Production Systems Engineering and Sciences, Komatsu University, Nu 1-3, Shicho-machi, Komatsu-shi, Ishikawa 923-8511

⁴ Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita 13 Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

⁵ Tianma Japan, Ltd., 1-1-2, Kashimada, Saiwai-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 212-0058

⁶ A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospect 33, 119071 Moscow, Russia

⁷ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, 119991 Moscow, Russia

(Received December 6, 2022; Accepted December 27, 2022)

In analysis using microfluidic devices, adsorption of samples and other substances on the channel walls can be a problem. Especially in immunoassays using polydimethylsiloxane (PDMS) devices, the adsorption of antibodies and other substances to be measured greatly affects measurement performance. In this study, we investigated the effect of the addition of two blocking agents on the detection sensitivity of okadaic acid (OA), a diarrheal shellfish poison, by fluorescence polarization immunoassay. In addition, the dissociation constants for the antibody and tracer were calculated from the obtained calibration curve.

Keywords: microfluidic device; polydimethylsiloxane; fluorescence polarization immunoassay; okadaic acid.