



Title	イムノピラーデバイスの高性能化 : 抗体固定化担体の改良
Author(s)	西脇, 奈菜子; 笠間, 敏博; 石田, 晃彦 他
Citation	分析化学, 64(5), 329-335 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.64.329
Issue Date	2015-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59522
Type	journal article
File Information	Tokeshi-BK64.pdf



年間特集「生」：報 文

イムノピラーデバイスの高性能化：抗体固定化担体の改良

西脇奈葉子^{1,2}, 笠間 敏博^{2,3}, 石田 晃彦⁴, 谷 博文⁴, 馬場 嘉信^{2,3,5,6}, 渡慶次 学^{*2,4,5}

著者らはこれまでに、光硬化性樹脂と抗体を固定化したビーズを組み合わせた、イムノアッセイによる疾病マーカー検出のためのイムノピラーデバイスと呼ばれるマイクロデバイスの開発を行ってきた。しかし、臨床診断に応用するためには、さらなる性能の向上が求められていた。そこで、イムノピラーデバイスの高性能化を目指し、抗体固定化担体の改良に取り組んだ。従来のイムノピラーデバイスはポリスチレンビーズに抗体を物理吸着により固定化してきた。本研究では、化学結合によりビーズ表面に抗体を固定化することのできるアフィニティビーズを用いたイムノピラーデバイスを作製し、C反応性タンパク質（CRP）の検出を試みた。インキュベーション時間とピラーの直径の検討を行った結果、全測定時間 23 分で、検出限界 0.1 ng mL^{-1} の CRP を測定することが可能となり、従来のデバイスよりも感度が 100 倍高いことが明らかとなった。本イムノピラーデバイスの長期保存安定性の評価を行ったところ、9 か月以上保存可能であることが分かった。以上により、従来よりも優れた感度を有する、高性能なイムノアッセイ用マイクロデバイスを開発することができた。

1 緒 言

臨床検査では、尿や血液などの検体中の病気の指標となる疾病マーカー濃度に基づき診断を行っている。疾病マーカーの測定には抗原と抗体の特異的な結合を利用したイムノアッセイが広く用いられている。しかし、現在のマイクロタイプレートを用いた臨床検査は、測定に時間がかかり、迅速な診断が行うことが難しい。また、比較的大量の検体が必要で、患者の負担となり、測定を行うには特殊な技術を持った専門技術者を必要としている。多くの検体を一度に測定できる大型の自動分析装置は、非常に高価なため、一部の大病院や分析センターに導入されているのみである。このような問題点から、より少量の検体で、迅速に診断を行うことができる、ユーザーフレンドリーで安価な臨床診断機器の開発が求められている¹⁾。

近年、検体及び分析試薬の少量化、測定の高速度化、装置

の小型化、低コスト化などを実現できることから、マイクロデバイスを用いたイムノアッセイの研究が盛んに行われている^{2)~16)}。著者らはこれまでに、光硬化性樹脂と抗体を固定化したビーズを用いた柱状の構造物をマイクロ流路内に構築した、イムノピラーデバイスと呼ばれるイムノアッセイのためのマイクロデバイスの開発に取り組んできた¹⁷⁾¹⁸⁾。アッセイの高速度化、操作の簡便化、低コスト化、試料の少量化は実現されたが、臨床検査に応用するためにはさらなる感度の向上が必要であった。そこで本研究では、デバイスの高感度化を目指し、イムノピラーデバイスの改良に取り組んだ。デバイスの性能を評価するために、臨床検査で広く一般的に炎症マーカーとして用いられている C 反応性タンパク質（CRP、カットオフ値： $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ）¹⁹⁾²⁰⁾を計測した。CRP は、より低濃度領域（ $10 \sim 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ）で動脈硬化などのマーカーにもなることが知られており、炎症マーカーとしての CRP と区別するために高感度 CRP と呼ばれている¹⁹⁾。化学結合により抗体の配向性を制御して固定化することのできるアフィニティビーズを用いた新たなイムノピラーデバイスを作製し、インキュベーション時間、ピラーの直径の検討を行い、デバイスの測定性能及び長期保存安定性の評価を行った。さらに、ヒト血清中の CRP の計測に応用した。

2 実 験

2・1 イムノピラーデバイスの作製

作製したイムノピラーデバイスを Fig. 1 に示す。デバイ

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

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

² 愛知県「知の拠点」重点研究プロジェクト：470-0356 愛知県豊田市八草町秋合 1267-1

³ 名古屋大学大学院工学研究科応用化学専攻：464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

⁴ 北海道大学大学院工学研究院生物機能高分子部門：060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

⁵ 名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター：464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

⁶ 独立行政法人産業技術総合研究所健康工学研究部門：761-0395 香川県高松市林町 2217-14

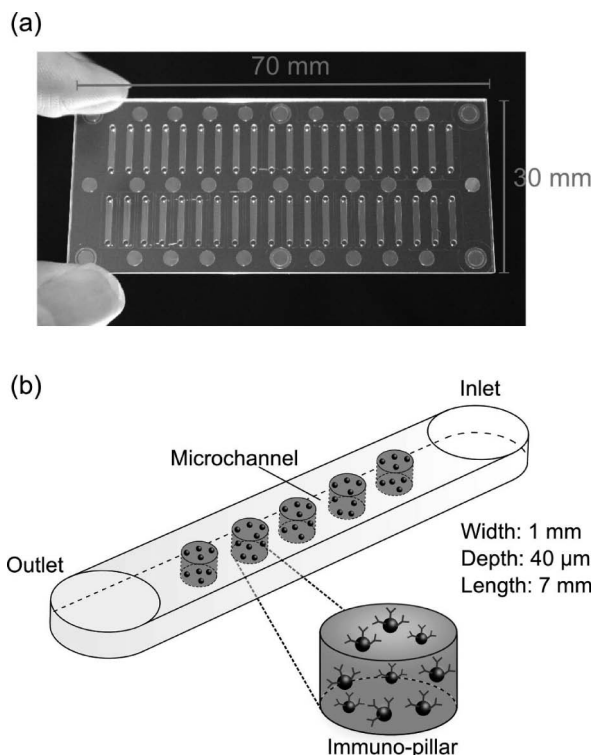


Fig. 1 Photograph (a) and schematic (b) of the immuno-pillar device

スの基板材料には環状オレフィンポリマー (COP) を採用した。従来用いられてきたマイクロ流体デバイスの基板材料には、シリコン、ガラス、ポリジメチルシロキサン、アクリル樹脂などがあるが、それらと比較して COP は安価で軽量であり、365 nm の紫外線に対して高い透明性を持つ。さらに、射出成形機と金型で大量生産が容易であり、加工精度にも優れているため、次世代の免疫診断用のディスプレイデバイス素材としてのポテンシャルを持っている。著者らは、射出成形機により溝と二つの貫通穴 (溶液の導入口及び排出口) が加工された COP 基板と、何も加工されていない COP 基板を貼り合わせることで、マイクロ流路を作製した。イムノピラーデバイスのサイズは幅 30 mm × 長さ 70 mm × 厚さ 1.25 mm であり、40 本のマイクロ流路が構築されている。各流路は、幅 1 mm × 深さ 0.04 mm × 長さ 7.0 mm で、両端に直径 1.0 mm の導入口及び排出口を持つ。この流路内に、フォトリソグラフィ技術によって光硬化性樹脂と抗体を固定化したビーズを用いて柱状の構造体 (イムノピラー) を以下の手順により作製した。

イムノピラーの作製手順を Fig. 2 に示す。一次抗体としてヤギ抗ヒト CRP 抗体 (Bethyl Laboratories, Inc. 製) を固定化したビーズ、1 % BSA-PBS [PBS に 1 % のウシ血清アルブミン (BSA) を含む溶液] (Thermo Fisher Scientific Inc. 製)、ポリエチレングリコールベースの光硬化性樹脂

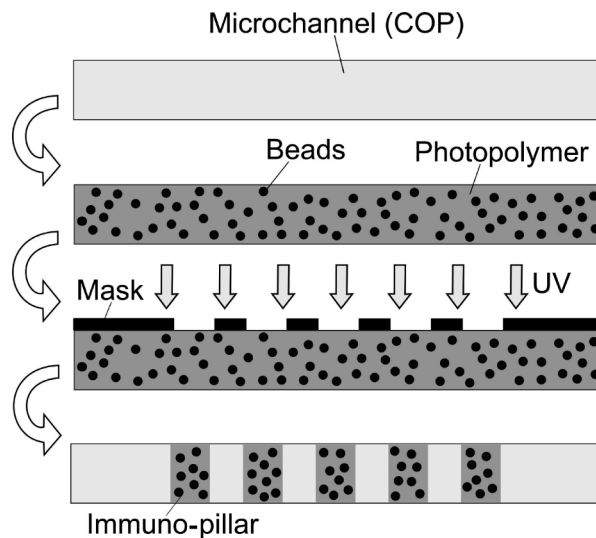


Fig. 2 Fabrication procedure of the immuno-pillar device

(関西ペイント製, ENTG3800) 及び重合開始剤 (関西ペイント製, PIR-1) の混合溶液をマイクロ流路に導入した。溶液の導入は、毛管現象を利用してマイクロピペットを用いて行った。次に、デバイスの基板の上にフィルム製のフォトマスク (マイクロ化学技研製) を重ね、紫外線露光装置 (ユニオン光学製, PEM-800) を用いて、365 nm の紫外線を照射した。紫外線が照射された部分の樹脂のみが硬化するため、フォトマスクのパターンに応じたイムノピラーを流路内に形成することができる。著者らは直線状に 500 μm の間隔で並ぶ 5 本のイムノピラーをマイクロ流路内に構築した。未硬化の溶液を吸引により除去したあとに、1 % BSA-PBS を用いて、流路の洗浄と抗体や抗原の非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行った。1 % BSA-PBS をマイクロ流路内に加えた状態で、蒸発防止用に導入口及び排出口をマスキングテープ (日東電工製) で封止して、デバイスを 4 °C で保存した。

ビーズへの抗体固定化法を検討するために、従来の物理吸着による固定化法と化学結合による固定化法を比較した。従来の物理吸着による抗体固定化法: PBS (Gibco 製, pH 7.4) により洗浄を行った直径 1 μm のポリスチレンビーズ (Polysciences, Inc. 製) にヤギ抗ヒト CRP 抗体を加えた。2 時間室温下で転倒混合し、一晩 4 °C で静置した。次に、PBS により洗浄を行い、1 % BSA-PBS を加え 1 時間室温下で転倒混合することで、ビーズ表面への非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行った。化学結合による抗体固定化法: 直径 5 μm のアフィニティビーズ (住友ベークライト製, BS-X9905) に抗 CRP 抗体及びタンパク質固定化用緩衝液 (住友ベークライト製) を加え、4 時間 37 °C で転倒混和した。次に 0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich,

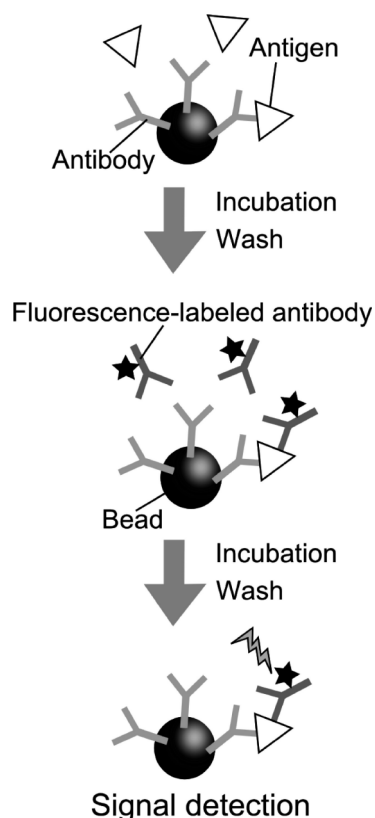


Fig. 3 Assay procedure with the immuno-pillar device

Inc. 製)を含むPBSを用いてビーズを洗浄し, 不活性化用緩衝液(住友ベークライト製)を加え, 室温下で1時間混合した。その後, PBSでビーズを洗浄し, 抗体固定化アフィニティビーズとした。アフィニティビーズはポリマーで表面処理されており, ポリマーの活性エステル基と抗体のアミノ基が共有結合することで, 抗体が固定化される²¹⁾。

2.2 アッセイ手順

イムノピラーデバイスによるアッセイ手順をFig. 3に示す。マイクロ流路内の1% BSA-PBSを除去し, 1% BSA-PBSで希釈したCRP (Scipac Ltd. 製) 溶液をマイクロ流路内に導入し, 一定時間室温でインキュベーションを行った。そのあとに, 溶液を吸引除去し, 1% BSA-PBSでマイクロ流路の洗浄を行った。続いてAlexa488ラベリングキット (Life Technologies, Inc. 製) で蛍光標識を行ったヤギ抗ヒトCRP抗体(二次抗体)をチャンネルに導入し, 一定時間室温暗所でインキュベーションを行った。その後1% BSA-PBSで洗浄を行い, イムノピラーの蛍光画像をCCDカメラ(浜松ホトニクス製, ORCA-R2)と倒立蛍光顕微鏡(ニコン製, ECLIPSE Ti-U, 励起レーザー波長: 488 nm, 蛍光波長: 519 nm)を用いて取得し, ソフトウェア(浜松ホトニクス製, Aqua Cosmos)により画像解析を行った。蛍光

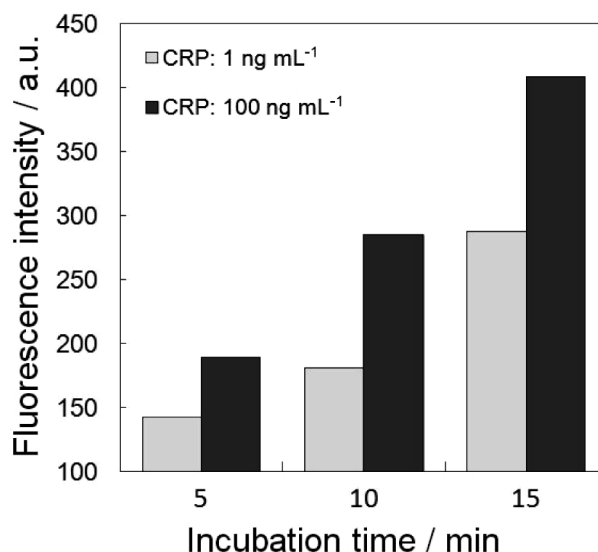


Fig. 4 Incubation time dependence of fluorescence intensity

強度は, イムノピラー全体の輝度の合計をピラーの面積で割った値とした。

3 結果と考察

3.1 インキュベーション時間の検討

測定時間の短縮を目的に, CRP 検出の抗原及び二次抗体のインキュベーション時間依存性を検討した。ここでは化学結合による抗体固定化法を用いたアフィニティビーズにより作製したイムノピラーデバイスを使用した。Fig. 4にインキュベーション時間と蛍光強度の関係を示す(ピラー直径: 200 μm)。インキュベーション時間が長くなるほど, 蛍光強度が増加することが分かった。これは, インキュベーション時間が長くなることで, 一次抗体と反応した抗原及び抗原と反応した二次抗体の量が増加したためと考えられる。また, CRP の検出限界は, インキュベーション時間が5分で100 ng mL^{-1} , 10分で10 ng mL^{-1} , 15分で0.1 ng mL^{-1} となり, インキュベーション時間が長くなるほど感度が向上した。この結果から, CRP アッセイは5分, 高感度CRP アッセイは10分のインキュベーション時間で十分であると考えられる。しかし, 迅速診断のためには, 短時間で疾病マーカーの検出を行わなければならない。また, カットオフ値の低い, ほかのマーカーにイムノピラーデバイスを応用するためには, 高感度な検出が求められる。これらより, 短いインキュベーション時間で高感度検出可能なデバイスにする必要があり, 効率的に抗原や二次抗体をイムノピラー内に拡散させるために, 次にイムノピラーの直径の検討を行った。

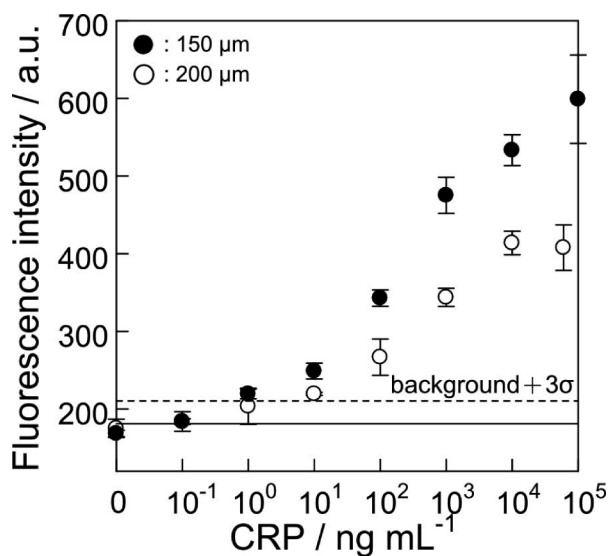


Fig. 5 Standard curves of CRP with pillars of 150 (filled circle, solid line) and 200 μm (open circle, dash line) in diameter

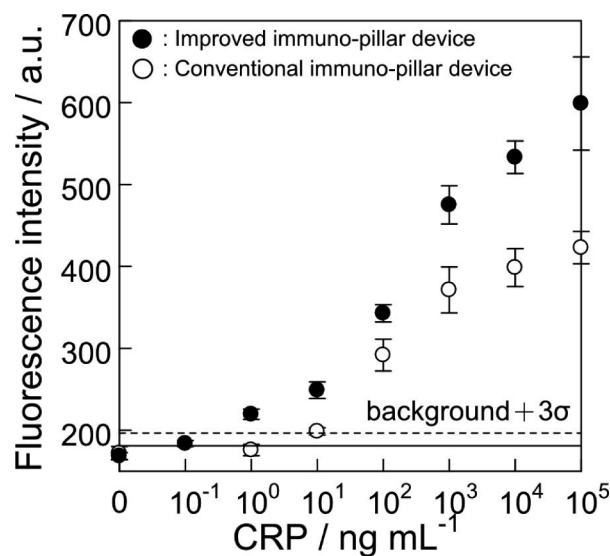


Fig. 7 Standard curves of CRP with the developed (filled circle, solid line) and conventional (open circle, dash line) immuno-pillar devices

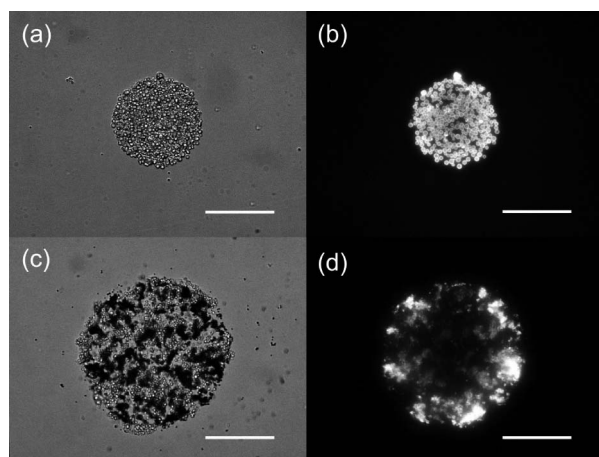


Fig. 6 Photographs of the developed immuno-pillars (150 μm diameter) using affinity beads (a, b) and the conventional immuno-pillar (200 μm diameter) using polystyrene beads (c, d)

(a, c), bright filed images; (b, d), fluorescence images. The scale bars represent 100 μm .

3.2 イムノピラーの直径の検討

インキュベーション時間と同様に測定時間の短縮を目的に、イムノピラーの直径の検討を行った。直径の大きなイムノピラーはピラー内部に抗原や二次抗体が拡散しにくく、また、ピラー内部の洗浄が難しいという問題点がある。逆に直径の小さなイムノピラーは、物理強度が弱く洗浄等の操作で崩壊することがある。そこで100～200 μm の直径のアフィニティビーズを用いたイムノピラーを作製し、検討を行った。直径200 μm 及び150 μm のイムノピラー

を用いてインキュベーション時間を10分としたときのCRPの検量線をFig. 5に示す。いずれもCRP濃度に応じた蛍光強度が得られ、ピラーの直径が200 μm のデバイスの検出限界は10 ng mL^{-1} 、直径150 μm では0.1 ng mL^{-1} となった。150 μm よりも直径の小さなピラーは物理強度が不足していたことや、直径が150 μm のピラーを用いてインキュベーション時間を5分としたときの検出限界が1.0 ng mL^{-1} であったことから、ピラーの直径が150 μm でインキュベーション時間が10分を最適値とした。なお、このときの全測定時間〔インキュベーション(10分)2回、洗浄、蛍光画像取得に要する時間の合計〕は23分であった。先のインキュベーション時間の検討において、200 μm のピラー径ではインキュベーション時間15分のときに0.1 ng mL^{-1} の検出限界であったことから、ピラー径を150 μm にすることで、高い感度を維持したまま全測定時間を10分短縮することが可能となった。

3.3 従来のデバイスとの比較

従来の物理吸着により抗体を固定化したポリスチレンビーズを用いたイムノピラーデバイスと、本研究で開発した共有結合(化学結合)により抗体を固定化したアフィニティビーズを用いて、CRP測定を行った。デバイスのイムノピラーの明視野像と蛍光画像をFig. 6に、CRPの検量線をFig. 7に示す。ポリスチレンビーズを用いたイムノピラーでは、ポリスチレンビーズが凝集しているため、ピラー内に不均一に分布している。CRPの検出限界はアフィニティビーズを用いたデバイスでは0.1 ng mL^{-1} (全測定時間23分)、ポリスチレンビーズを用いたデバイスは最適

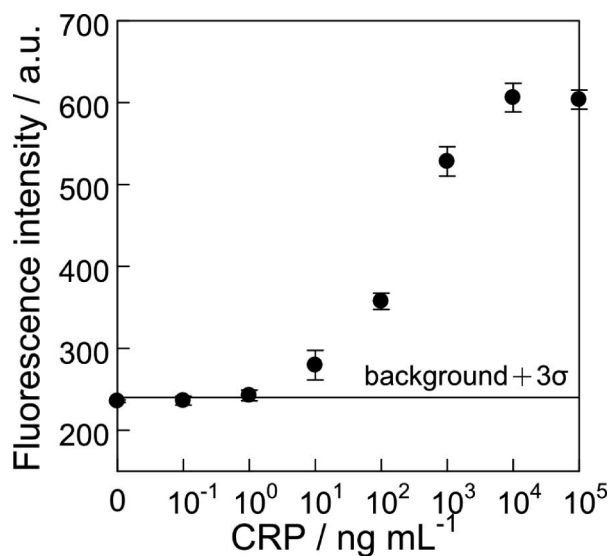


Fig. 8 Standard curve of CRP in human serum

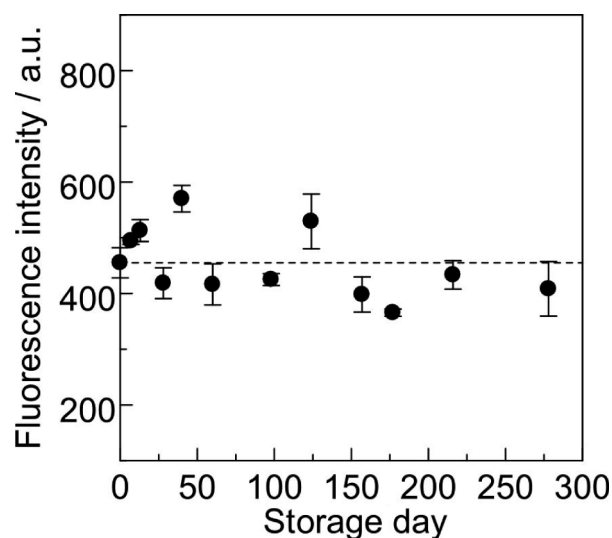


Fig. 9 Long-term stability of immuno-pillar device

条件下で 10 ng mL^{-1} (全測定時間 33 分) であった。これらの結果により、アフィニティビーズを用いたイムノピラーデバイスの感度が従来のポリスチレンビーズに比較して、100 倍高感度であり、短時間で測定を行えることが明らかとなった。アフィニティビーズを用いたデバイスの感度が高くなった理由として、ビーズ表面に固定化した抗体の配向の自由度が増大した可能性が挙げられる¹⁾。ポリスチレンビーズに物理吸着により抗体を固定化した場合、ビーズ表面の抗体は不規則な方向を向き、かつビーズ表面に直接結合することでその動きに制約が加わるため、抗原と結合することの難しい抗体が存在することになる。一方アフィニティビーズでは、ビーズ表面を修飾するポリマーのアミノ基と共有結合させることで、抗体の運動の制約が大幅に減少し、抗原との結合に有利な配向をとることができたものと考えられる。また、アフィニティビーズは表面上のポリマーを介してより多くの抗体を固定化することができる。これらの結果、従来よりも高い感度を持つイムノピラーデバイスを作製することができたと考えられる。

3.4 血清中の CRP 測定

血清中の検出対象以外のタンパク質などがイムノピラーデバイスによる疾病マーカー検出に与える影響を調べるため、CRP フリーヒト血清 (Hytest, Ltd. 製) を用いて CRP 標準液を希釈し、血清中の CRP の検出を行った。その結果を Fig. 8 に示す。検出限界は 1 ng mL^{-1} であり、1 % BSA-PBS 中に調製した CRP の検出下限値よりも感度が低下した。血清は粘度が高いため、インキュベーション中の抗原の移動距離が小さくなり、1 % BSA-PBS 中の CRP よりも抗体と結合できる抗原が少なかったためと考えられる。し

かし、血清中の CRP の検出限界は高感度 CRP のカットオフ値を下回っており、高感度 CRP の臨床診断に本デバイスを用いることができると考えられる。

3.5 イムノピラーデバイスの長期保存安定性の評価

イムノピラーデバイスを臨床診断に応用するためには、デバイスが作製されてから実際に使用されるまで長期間の保存が可能であることが求められる。そこで、イムノピラーデバイスの長期保存安定性の評価を行った。デバイスを作製し、乾燥防止のためマスキングテープを流路の導入口と排出口に貼ったあと、 4°C で保管した。一定期間保管したのち、 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ の 1 % BSA-PBS 中に調製した CRP 溶液を用いて、イムノピラーの蛍光強度を測定した。Fig. 9 に示すように、測定した 278 日間、一次抗体の失活による蛍光強度の減少が見られなかった。この結果より、イムノピラーデバイスが少なくとも 9 か月の保存が可能であることが分かった。

4 結 論

アフィニティビーズの使用により、従来よりも優れた性能を持つイムノピラーデバイスを開発することができた。今後は、ほかの疾病マーカーの検出を行い、臨床診断の応用へ向け、全血などの実サンプル中の疾病マーカーの検出などに取り組んでいく。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 24245013 の助成を受け行われたものである。また、本研究を遂行するにあたり、マイクロ化学技研(株)の田澤英克氏及び関西ペイント(株)から、多大なご

協力をいただいたことに対して感謝の意を表する。

文 献

- 1) D. Wild, R. John, C. Sheehan, S. Binder, J. He : “*The Immunoassay Handbook*”, Fourth Edition, (2013), (Elsevier).
- 2) H. Jiang, X. Weng, D. Li : *Microfluid. Nanofluid.*, **10**, 941 (2011).
- 3) 舘 知也, 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 521 (2007).
- 4) T. G. Henares, F. Mizutani, H. Hisamoto : *Anal. Chim. Acta*, **611**, 17 (2008).
- 5) C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, G.-B. Lee : *J. Lab Autom.*, **15**, 253 (2010).
- 6) A. H. C. Ng, U. Uddayasankar, A. R. Wheeler : *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 991 (2010).
- 7) K. N. Han, C. A. Li, G. H. Seong : *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **6**, 119 (2013).
- 8) K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori : *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).
- 9) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori : *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
- 10) 森岡和大, 中嶋 秀, 辺見彰秀, 曾 湖烈, 内山一美 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **62**, 65 (2013).
- 11) T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba : *Anal. Sci.*, **25**, 149 (2009).
- 12) T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba : *Lab Chip*, **9**, 966 (2009).
- 13) T. Ohashi, K. Mawatari, K. Sato, M. Tokeshi, T. Kitamori : *Lab Chip*, **9**, 991 (2009).
- 14) R. Kurita, K. Arai, K. Nakamoto, D. Kato, O. Niwa : *Anal. Chem.*, **82**, 1692 (2010).
- 15) T. Tachi, T. Hase, Y. Okamoto, N. Kaji, T. Arima, H. Matsumoto, M. Kondo, M. Tokeshi, Y. Hasegawa, Y. Baba : *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2301 (2011).
- 16) H. Okada, K. Hosokawa, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **27**, 237 (2011).
- 17) M. Ikami, A. Kawakami, M. Kakuta, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba : *Lab Chip*, **10**, 335 (2010).
- 18) W. Jun, K. Yamada, M. Ikami, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Atsumi, M. Mizutani, A. Murai, A. Okamoto, T. Namikawa, Y. Baba, M. Ohta : *J. Microbiol. Methods*, **92**, 323 (2013).
- 19) U. S. Food and Drug Administration : “*Review Criteria for Assessment of C Reactive Protein (CRP), High Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP) and Cardiac C-Reactive Protein (cCRP) Assays*”, available from <<http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm077167.htm>>, (accessed 2014 9 26).
- 20) 金井正光監修 : “臨床検査法提要”, 第 33 版, 奥村伸生, 戸塚 実, 矢富 裕編, (2010), (金原出版).
- 21) 住友ベークライト : “*アフィニティビーズのご紹介*”, available from <<https://www.sumibe.co.jp/ww-attaches/937.pdf>>, (accessed 2014 9 26).

Development of High-performance Immuno-pillar Devices: Improvement of Antibody-immobilized Solid Support

Nanako NISHIWAKI^{1,2}, Toshihiro KASAMA^{2,3}, Akihiko ISHIDA⁴, Hirofumi TANI⁴,
Yoshinobu BABA^{2,3,5,6} and Manabu TOKESHI^{*2,4,5}

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

¹ Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, Kita13-Nishi8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

² The Knowledge Hub of AICHI, 1267-1, Aikai, Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0356

³ Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

⁴ Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita13-Nishi8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

⁵ FIRST Research Center for Innovative Nanodevices, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

⁶ Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2217-14, Hayashi-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0395

(Received October 15, 2014; Accepted December 11, 2014)

In order to realize ultra-early diagnosis of disease in practical applications, we have fabricated next-generation immuno-pillar devices with higher sensitivity. In the newly developed devices, capture antibodies were immobilized on affinity beads based on chemical bonding, while in the previous-generation ones, polystyrene beads were used for physical adsorption-based immobilization. To evaluate the sensitivity of the next-generation immuno-pillar device, we quantitatively analyzed C-reactive protein (CRP). The limit of detection was estimated to be 0.1 ng mL^{-1} (total assay time, 23 min), which was two orders of magnitude lower than that obtained by using the previous-generation immuno-pillar device, and was low enough to perform the CRP test. In addition, we investigated the storage stability of the immuno-pillar device, and confirmed that the device can retain its performance for over 9 months.

Keywords: immunoassay; point-of-care testing; disease marker; microfluidic device; affinity beads.