

タンパク質センシングシステムの検出技術検討

Investigation of the Fundamental Measuring Techniques for Protein Sensing System

曹 勝 鎮*	有 村 龍 人*	清 水 裕 一 郎*
Seung-Jin Cho	Tatsuhito Arimura	Yuhichiro Shimizu
北 川 俊 明*	伴 和 夫*	赤 木 与 志 郎*
Toshiaki Kitagawa	Kazuo Ban	Yoshiroh Akagi

要 旨

本稿ではアレルギー原因物質を例として、特定タンパク質を迅速かつ高感度に測定可能なマイクロチップ型センシングシステムに必要な検出技術の検討を行った。プラスチック製のマイクロチップと表面プラズモン共鳴装置を用いたセンチメートルクラスの検出系とPDMS (Polydimethylsiloxane) マイクロチップと電気化学方法および熱レンズ顕微鏡を用いた数100ミクロンのマイクロ検出系での検出感度の比較を行った。タンパク質定量法としては酵素免疫測定法を用いた。マイクロチップを用いた系ではマクロ系より反応時間が大幅に短縮でき、微小空間内では反応効率性が良いことが分かった。電気化学的な手段による酵素免疫測定法による特定タンパク質検出の検出限界濃度は光学方法と並ぶ0.1 ng/mlであった。

Fundamental experiments for a sensitive and rapid protein sensing system were investigated comparing macro-system with micro-system. Microtiter plate and SPR (Surface Plasmon Resonance) were used for macro-system and PDMS (Polydimethylsiloxane) microchips combined with electrochemical method and thermal lens microscope were used for micro-system. A PDMS micro chip for a measurement of protein was fabricated using lithography method and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) was introduced to determine the protein concentration. The electrochemical sensing system has a detection limit of 0.1 ng/ml and dynamic linear range from 1 to 100 ng/ml with response times of less than 30 minutes for the entire procedure.

まえがき

生活の多様化と共に様々なタンパク質が身の回りに増加している。例えば近年、様々な物質によるアレルギー症状を訴える人が増加している。アレルギー原因物質アレルゲンにはホルムアルデヒドの様な低分子からタンパク質の高分子まで多数の種類がある。これらのアレルゲンを迅速かつ簡便に測定することが重要になっており、従来は表面プラズモン共鳴装置 (SPR; Surface Plasmon Resonance)^{1) 2)}、やアンペロメトリックバイオセンサ³⁾、マイクロタイタープレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)^{4) ~8)} およびキャピラリ電気泳動⁹⁾ などがあった。しかしこれらの測定方法は反応系が数mmから数cmとなるため、大量のサンプルや試

薬が必要となり、高価で大型の装置が使用されることとなる。また拡散距離が長い為、測定時間が長くなるなど短所がある。

近年、MEMS (Micro Electro Mechanical System) 技術の発展と共に、マイクロチップを用いた測定システムの開発が盛んになっている^{10) ~14)}。様々な生物や化学プロセスを集積するために、ガラス、高分子樹脂やシリコン基板上に数 μm ~ 数100 μm の複数の微細な流路を形成し、その流路内で送液、抽出、濃縮、混合、反応、分離、検出などを行う。このように作られたデバイスは、マクロ化学チップ、マイクロチップなどと呼ばれ、このデバイスを用いた化学システム・分析システムは、 μ -TAS (Micro Total Analysis System)、集積化化学システム、Lab-On-a-Chipなどと呼ばれている。マイクロ系を用いて分析などを行うことにより下記の

* 技術本部 バイオセンシングシステム研究所 第1研究室

メリットがある。

- ①微量なサンプルや試薬量で測定可能
- ②短い拡散距離により反応時間が短縮
- ③体積比 (S/V) が大きいため反応効率が高い
- ④微小空間で反応が行うため反応制御などが容易
- ⑤分析システムの集積化や小型化が可能など

本稿では、免疫反応を用いた特定タンパク質測定用マイクロチップ型センサの要素技術の検討を行った。タンパク質の検量のため、マクロシステム（マイクロタイタープレート及び表面プラズモン共鳴装置）を用いた測定とマイクロシステム（マイクロチップを熱レンズ顕微鏡と電気化学測定法と組み合わせ）を用いた測定の比較を行い、マイクロシステムの有効性の検証を行った。またPDMSを用いたマイクロチップや微細電極の作製技術に関して述べる。

1. マクロ系での抗原抗体法による特定タンパク質の定量測定

1・1 マイクロタイタープレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA)

特定タンパク質量を定量測定するためには従来より図1の1に示すようなツールを用いてELISA法で検量を行っている。



図1 マイクロタイタープレート1 (125 × 5 × 15mm) とPDMSマイクロチップ2 (20 × 12 × 3mm)

Fig. 1 A photograph of microtiter plate 1 (125×5×15mm) and PDMS microchip 2 (20×12×3mm).

マイクロタイタープレートの各ウェル内面に一次抗体を物理吸着により固定化させるため、抗体の一種であるモノクローナル抗体溶液 (5 μg/ml) を100 μl ずつ各ウェルに分注し、37℃で1時間静置した。抗原の非特異的な吸着を防ぐため、各ウェルから抗体溶液を取り除き、ブロッキング溶液 (1%w/v BSA (Bovine Serum Albumin) PBS (Phosphate Buffer Solution)) を300 μl 入れ

25℃で1時間静置した。界面活性剤 (Tween20) 0.05% v/v を含むPBSで2回洗浄を行った。洗浄後、抗原抗体反応させるため、各濃度の抗原溶液を100 μl ずつ各ウェルに分注し、25℃で1時間静置した。0.05% v/v Tween20を含むPBSで2回洗浄を行った後、酵素修飾のため、0.1 μg/ml のHRP (Horseradish Peroxidase) 修飾二次抗体溶液100 μl を分注し、25℃で1時間静置し、抗原と反応させた。0.05% v/v Tween20を含むPBSで4回洗浄後、酵素と反応する基質であるSAT Blue (N, N-Bis (2-hydroxy-3-sulfopropyl) tolidine, disodium salt, 同仁化学研究所 (株), 3M SAT3) 200 μl をウェルに添加し、20分間遮光し発色反応させた。ELISA法による特定タンパク質の測定手順は図2に示す。

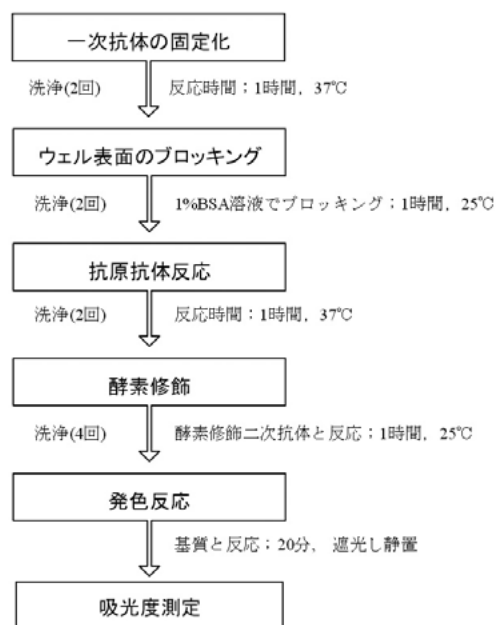


図2 マイクロタイタープレートを用いたELISA法の手順
Fig. 2 Protocol of ELISA using microtiter plate.

酵素基質反応を停止させるため、1M HClを添加した後、マイクロプレートリーダーを用いて450nm波長で各ウェルの吸光強度を測定した。その結果を図3に示す。

特定タンパク質として用いたアレルゲンタンパク質検量範囲濃度は1 ng/ml ~ 100 ng/mlであり、測定限界濃度は1 ng/mlが得られた。またマイクロプレートELISA法の場合、一次抗体を固定化してから抗原を測定するまで約4時間程度かかった。

1・2 表面プラズモン共鳴装置 (SPR)を用いた特定タンパク質の測定

従来、特定タンパク質の定量は前章に述べたよう

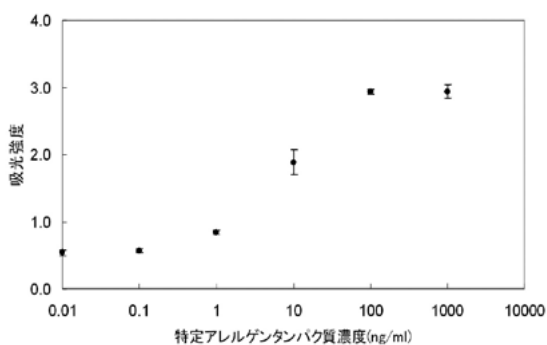


図3 マクロタイタープレートを用いた特定タンパク質の検量線

Fig. 3 Calibration curve for specific allergen protein(Cryj1) using microtiter plate.

にマクロプレートを用いた酵素標識抗原抗体法により行ってきたが、測定時間がかかる事、酵素修飾が必要になる事及び装置が大掛かりとなる事などからこれらに代わる方法の検討が行われてきた。分子間相互作用の観察が可能であるSPRは、非標識で免疫反応やDNAの結合などが簡便に測定できることから分析手段としてよく使用されている。本研究では、Biacore社のSPR装置を用いて抗原（スギ花粉アレルゲンCryj1）とモノクローナル抗体（Anti-Cryj1 IgG）との親和力および反応条件などを検討し、特定タンパク質の検量を行った。その結果を図4に示す。

モノクローナル抗体をSPRセンサチップ（CM5）に固定化し、ビオチン修飾抗原濃度を1.95～1000ng/mlまで変化させ、結合量を測定した。Langmuir吸着等温式より解離係数（ K_D ）値を算出すると $4 \times 10^{-9}M$ が得られた。この結果から特定タンパク質Cryj1と抗体は極めて高い親和力を持っていることが分かった。SPRを用いた特定タンパク質の検量濃度は7.81～1000ng/mlであり、測定限界濃度は1.95ng/mlであった。測定

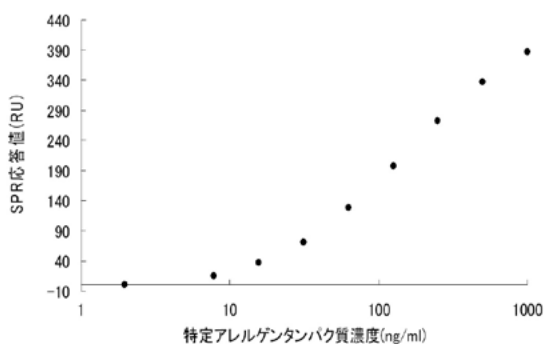


図4 表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた特定アレルゲンタンパク質の検量線

Fig. 4 Calibration curve for specific allergen protein(Cryj1) using Surface Plasmon Resonance.

時間は約1時間であった。

2. マイクロチップを用いた特定タンパク質センシングシステムの概要

以上で述べたプレート法及びSPR法によるマクロな系での免疫反応計測系に比べて反応部全系を数10～数100ミクロン領域に形成したマイクロ反応系について詳細を述べる。本研究ではマイクロ反応系のチップ作製のため熱硬化性シロキサン系ポリマー PDMS (Polydimethylsiloxane) を用いた。PDMSを用いて数100μm程度の流路を形成し、反応部と検出部が設けられたマイクロチップを作製した。マイクロチップ内に抗体を固定した担体（スチレンビーズおよびゲル）を充填し、ターゲットと反応をさせた。さらに酵素修飾抗体を結合させ、基質と酵素反応による変化を検出手段である熱レンズ顕微鏡および電極を用いて検出することによってターゲット物質の検量が可能な系とした。

2・1 ビーズへの抗体の固定化

カルボキシル基が修飾された直径14.3μm ポリスチレンビーズ (Magsphere社, USA) に抗体 (Anti-Cryj1 rabbit IgG fraction, アサヒフードアンドヘルスケア, m.w. 150 kDa)を共有結合で固定化し、遠心分離でビーズを沈殿させた後、上澄みを除去し、ビーズを回収した。ビーズへの抗体の固定化量の定量を行った結果、 $2.4 \pm 0.4pg/bead$ であった。

2・2 PDMS (Polydimethylsiloxane) マイクロチップの作製

PDMSは、良い生体適合性や作製工程の簡便性からマイクロチップの材料としてよく用いられる。図5は、リソグラフィによるPDMS作製工程を示す¹⁶⁾。シリコン基板にスピニングによるレジスト (SU-8) を塗布後、コンタクトアライナーを用いて露光し、レジストパターンを形成した。パターンが形成された基板の上にPDMSを流し込んでチップの型を取り、熱によるPDMSを硬化させた後、基板からPDMS型を剥離した。また流路などが形成されたPDMSチップと電極などが形成されシリコン基板の張り合わせは、PDMSとシリコン基板の表面を洗浄し、酸素プラズマ処理により行った。プラズマ処理によるPDMS表面におけるC-HがO-Hに変化し、親水性の表面となる。この状態で基板面とPDMSを張り合わせると半永久的な接着力が得られた。図1には、マイクロタイタープレートとPDMSマイクロチップの比較写真である。マイクロプレート (図1-1) は96の反応部があり一つの反応部は直径7mm、深さ10mm程度でプレート全体は125mm

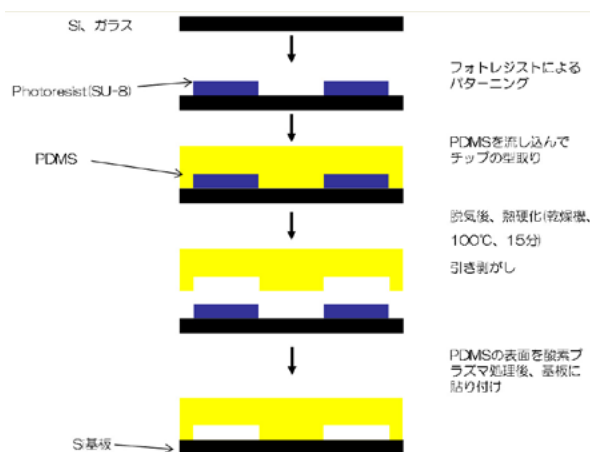


図5 リソグラフィによるPDMSマイクロチップの作製
Fig. 5 A schematic diagram of PDMS microchip fabrication.

×85mm×15mmである。PDMSマイクロチップ(図1-2)の反応部は6mm×300μm×50μmであり、流路は幅300μm×50μmである。

2・3 電気化学測定用くし型電極作製

微量サンプル測定のため、レドックスサイクルを利用し電流値の増幅が可能な微小くし型電極を採用した。微小くし型電極はくし状の電極が2つあり、くしの歯が交互に噛み合った構造をしている。レドックスサイクルとは、一方の電極で酸化させ、隣り合うもう一方の電極で還元させることにより測定対象物を繰り返し酸化還元させることを意味する。そのため電流値を増幅することが出来る¹⁷⁾。

電極は従来の露光プロセスを用いて作製した。シリコン基板の上に性質の異なるフォトレジストを2層塗り、まず上部のフォトレジスト(PFI)にステップを用いて電極パターンを露光、現像する。次に上部レジストに作製した電極パターンをフォトマスクとして、下部レジスト(PMGI-SF11)をDeep-UV露光し、現像する。フォトレジストで出来た電極パターンの上から電極材料となる金属をEB蒸着した。シリコン基板との密着性のよいTi(500Å)を蒸着してから、その上にPt(500Å)を蒸着することによりシリコン基板上にPtの金属膜を形成した。

作用電極(Ti/Pt: 500Å/500Å)、対極電極(Ti/Pt: 500Å/500Å)、参照電極のパターンを上記作製方法で作製したあと参照電極部にAg/AgClインクを塗布・乾燥することによりAg/AgCl参照電極を作製した。作用電極は、幅: 8μm、長さ: 2mmであり、電極間のギャップは7μmで、酸化・還元電極を65本ずつ配置した。

3. 熱レンズ顕微鏡(TLM; Thermal Lens Microscope)を用いた特定タンパク質の測定

前述したようにマイクロ系を用いた特定タンパク質の検量は長い反応時間などの問題点を改善するため、マイクロチップと熱レンズ顕微鏡を組み合わせ、アレルゲン検量を行った。熱レンズ顕微鏡の原理は、測定試料の吸収波長にあわせた波長の励起光と試料が吸収を持たないプローブ光の2本のレーザー光を用いる。測定試料により吸収された励起光のエネルギーが熱として放出されると、レーザーの強度分布および熱拡散により焦点付近に光軸に温度勾配が生じることによって屈折率が変化する。この屈折率の変化によりプローブ光が焦点し強度の変化が現れる。屈折率の変化は試料の濃度と比例するので試料の検量が可能になる¹⁸⁾。熱レンズ顕微鏡は高感度の測定が可能であるので、近年分析手段として用いられる研究が多くなっている^{19) 20)}。本研究では、マイクロチップはマイクロ化学技研(株); Institute of Microchemical Technology (IMT) のガラスチップを用いた。ガラス基板上に幅220μm、深さ100μmの流路が形成され、流路の中央部には固定担体をせき止める段差が設けられている。抗体の固定化担体はNHS Hi Trap HNS-activated HP (General Electronics, USA)を用いて行った。抗体が固定されているゲルを流路内に導入し、せき止め部で定着させる。抗原を流し、抗体と反応させた後、HRP (Horseradish peroxidase)修飾の二次抗体を結合させる。HRPの量により、次に導入される基質SAT Blueの発色強度が比例するので、発色の強度を熱レンズ顕微鏡を用いて計測することによって抗原の濃度を検量することが可能になる。図6に示した結果のように、特定タンパク質検量濃度範囲は10ng/ml ~ 1000ng/ml (流速は4μl/min)で、測定時間は約10分であった。

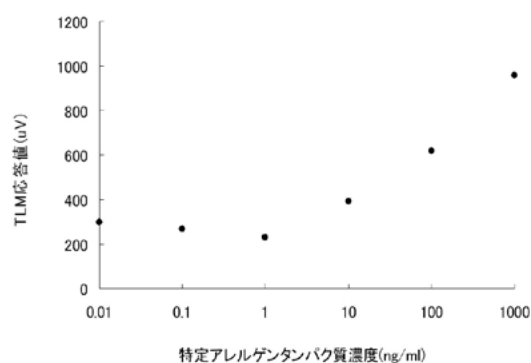


図6 熱レンズ顕微鏡を用いた特定アレルゲンタンパク質の検量線

Fig. 6 Calibration curve for specific allergen protein (Cryj1) using Thermal Lens Microscope.

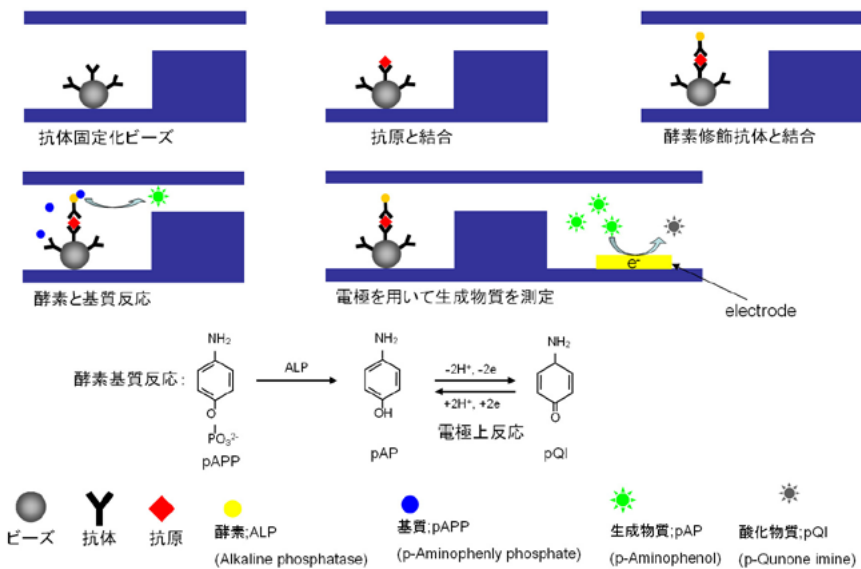


図7 サンドイッチ免疫アッセイの原理

Fig. 7 A schematic diagram for the principle of sandwich immunoassay.

4. 電気化学法を用いたアレルギータンパク質の測定

本研究では測定システムの集積化を図るため、検出方法としてクロノアンペロメトリ法を用いた。この方法は、基質が酵素によって分解され、生成した物質を電極上で酸化還元反応による電流値の変化を計測することによってターゲット物質を検量する方法である。特定タンパク質センシングシステムは、①流体をマイクロチップ内に送液するシリンジポンプ、②サンプルや試薬を導入するレオダイナバルブ、③微細電極が設けられたセンシング用マイクロチップ、④電気化学測定のためのポテンシostatと⑤制御パソコンで構成されている。

ビーズ上に抗体を共有結合によって固定し、そのビーズを電極が配置されたマイクロチップの流路内に詰めた。ポンプを用いてランニングバッファー(100mM Tris buffer, 137mM NaCl, pH9.0)をチップ内に送った。レオダイナバルブを介しサンプル抗原を導入した。抗原は抗体と結合させた後、更にアルカリフォスファターゼ (ALP) 修飾二次抗体を抗原と反応させた。二次抗体に修飾されている酵素 (ALP) によって基質 (pAPP; p-Aminophenyl phosphate) が分解され pAP (p-Aminophenol) が発生する。その pAP を酸化電極 (電位: 100mV) を用いて検出し、pAP は電極上で pQI (p-Quinone Imine) に変化するので、再び還元電極 (電位: -200mV) を用いて還元させることで感度よく抗原を測定することが可能になった。図7には、酵素免疫

測定法の原理に関する全体的な模式図を示す。

図8には、クロノアンペロメトリ法で特定タンパク質を検量した結果を示す。特定タンパク質検量濃度範囲は0.1 ~ 100ng/mlであり、測定時間は約30分であった。

以上の結果をまとめ表1に示したように、マクロ系ではマイクロタイタープレートとSPRを用い検量を行った結果、①マイクロタイタープレートの場合: 検量濃度範囲は1 ~ 100ng/mlであり、測定時間は6時間程度であった。②SPRの場合: 7.81 ~ 1000ng/mlであり、測定時間は1時間であった。一方マイクロチップを用いた測定システムでは、①ガラスチップと熱レンズ顕微鏡組み合わせの場合: 検量濃度範囲は10 ~ 1000ng/

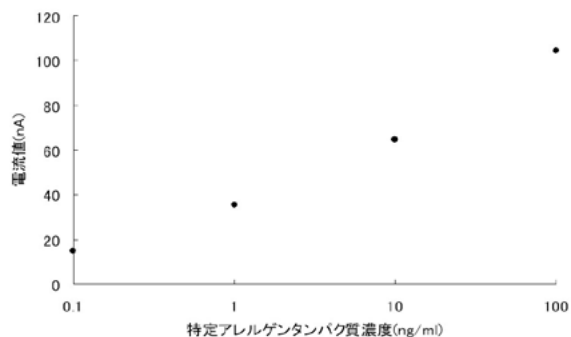


図8 電気化学測定法を用いた特定アレルギータンパク質の検量線

Fig. 8 Calibration curve for specific allergen protein(Cryj1) using electrochemical methods.

表1 特定タンパク質測定におけるマクロシステムとマイクロシステムの比較

Table 1 Comparison of specific allergen protein determination using the macro system and the micro system.

検出手段	マクロ系		マイクロ系	
	タイトープレート	SPR	熱レンズ顕微鏡	電気化学法
検出限界濃度	1ng/ml	1.95ng/ml	10ng/ml	0.1ng/ml
検出時間	約4時間	約1時間	約10分	約30分
サンプル量	100 μ l	1000 μ l	5 μ l	5 μ l

mlであり、測定時間は約10分であった、②PDMSマイクロチップと電極を用いられた場合：0.1～100ng/mlであり、測定時間は30分であった。

マイクロチップを用いたことでサンプル及び試薬量が1/20～1/200まで減り、微小空間内の反応効率の上昇により測定時間が1/2～1/24に大幅短縮された。システムの集積化を図るため、電極を用いて測定を行った結果、熱レンズ顕微鏡を用いた場合より、高感度で装置構成が簡便で測定が可能になった。

むすび

特定タンパク質を測定するシステムの構築のため、マイクロ系の有効性の検討を行った。特定タンパク質をマクロ系とマイクロ系を用いて測定し、その結果を比較した結果、マイクロ系での反応効率がマクロ系より高いことが分かった。

謝辞

本研究にあたり、電極の作製方法などについて多大なご指導並びにご協力を頂きました技術本部基盤技術研究所第2研究室に心から感謝致します。

参考文献

- 高橋, 大橋, “表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した空中花粉アレルゲンのリアルタイム測定”, アレルギー, 51, 1, pp. 24 - 29 (2002)
- Anna J. Tudos, Elly R. ZLucas-ban den Bos, Edwin C. A. Stigter, “Rapid Surface Plasmon Resonance-Based Inhibition Assay of Deoxynivalenol”, J. Agric. Food Chem., 53, pp. 1309 - 1316 (2005).
- Mohammed I., Mullett W. M., Yeung J. M., “Is biosensor a viable method for food allergen detection?”, Anal. Chim. Acta, 444, pp. 97 - 102 (2003).
- M. Keining, R Niessner, M. G. Weller, “Sandwich immunoassays fro the determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods”, J. Agric. Food Chem. 53, pp 3321 - 3327 (2005).
- J. Ramirez, J. A. Carpizo, H. Ipsen, M. Lombardero, “Quantification in mass units of Bet v 1, the mail allergen of Betula verrucosa pollen, by a monoclonal antibody based-ELISA”, Clinical and Experimental Allergy, 27, pp 926 - 931 (1997).
- M. Riediker, T. Koller, C. Monn, “Determination of birch pollen allergens in different aerosol sizes”, Aerobiologia, 16 pp 251 - 254 (2000).
- Oscar A. Duffort, F. Polo, M Lombardero, D. Barber, “Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under Physiological conditions”, J. Agric. Food Chem. 50, pp 7738 - 7741 (2002).
- E. Mstsukuma, Z. Kato, K. Omoya, N. Kondo, “Devolvement of fluorescence-linked immunosorbent assay for high throughput screening of interferon-r”, Allergology Internation 55, pp49 - 54 (2006).
- V. Pacakova, J. Pechancova, K. Stulik, “Size-exclusion liquid chromatography and capillary electrophoresis of pollen allergens”, Journal of Chromatography B, 681, pp 47 - 53 (1996).
- K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, “Determination of carcinoembronic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for caner diagnosis”, Anal. Chem., 73, pp 1213 - 1218 (2001).
- K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori, “Integration of an immunosorbent assay system: Analysis of Secretory Human Immunoglobulin A on Polystyren Beads in a Microchip”, Anal. Chem., 72, pp 1144 - 1147 (2000).
- D. Erickson, D. Li, “Integrated microfluidic devices”, Analytica Chimica Acta, 507, pp 11 - 26 (2004).
- D. R. Reyes, D. Iossifidis, P-A. Auroux, A. Manz, “Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology”, Anal. Chem., 74, pp 2623 - 2636 (2002).
- D. R. Reyes, D. Iossifidis, P-A. Auroux, A. Manz, “Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications”, Anal. Chem., 74, pp 2637 - 2652 (2002).
- C-H. Ann, J-W. Choi, G. Beaucage, J. H. Nevin, J-B. Lee, J. Y. Lee, “Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-Care Clinical Diagnostics”, Proceedings of The IEEE, 92, 1, pp 154 - 173 (2004).
- J-W. Hong, K. Hosokawa, T. Fujii, “Microfabricated Polymer Chip for Capillary Gel Electrophoresis”, Biotechnol. Prog. 17, pp 958 - 962 (2001).
- S-K. Kim, J. H. Tomas, W. R. Heineman, “Comb interdigitated arrays (IDA) electrodes for more rapid and sensitive bead-based immunoassay”, Proceeding of IEEE 2003 International conference on MEMS, Kyoto” pp 435 - 438 (2003).
- 火原, 渡慶次, 北森, “熱レンズ顕微鏡”, 光技術コンタクト, 39, pp. 212 - 215 (2001)
- T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato, “Thermal Lens Microscopy and Microchip Chemistry” Anal. Chem., 76, 3, pp. 53A - 60A (2004).
- S. Hiki, K. Mawatari, A Hibara, M Tokeshi, T. Kitamori, “UV Excitation Thermal Lens Microscope for Sensitive and Nonlabeled Detection of Nonfluorescent Molecules”, Anal. Chem. 78, pp. 2859 - 2863 (2006).

(2006年6月14日受理)