

心疾患マーカー検出用マイクロセンシングチップ

表面プラズモン共鳴法による高感度酵素免疫測定用センサの開発

心疾患のマーカーとして注目される「脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)」を検出できるマイクロセンシングチップを開発した。チオールを生成する酵素標識抗体を作製し、この酵素から生成されるチオールの濃縮に伴う表面プラズモン共鳴角の変化を微小流路内で観測することで、血液中にごく低濃度で存在する BNP (15fg) を 30 分ほどで迅速に、安全に計測することに成功した。

心疾患マーカー：脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)

現在、国内ではガンに続いて心疾患によって亡くなる人が多く年間15万人に達している。特に心疾患は「働き盛りの突然死」として、家族にも精神的・経済的負担をもたらす大きな問題である。近年、「脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)」という心筋細胞で生合成・分泌される心臓ホルモンが、心疾患の診断や予知、予後観察に大きな効果があると期待されている。しかし、その血中濃度は健常者で10pg/mL (3pM) 程度ときわめて濃度が低いため、その測定には従来のイムノクロマトグラフィ法が使えず、ラジオイムノアッセイ法や蛍光検出システムなどの大型機器が使われている。心疾患のような緊急を要する現場において、BNPのような疾患マーカーを迅速に測定するには、小型装置の開発と極低濃度の試料でも測定できる高感度検出法を新たに開発する必要がある。

超高感度免疫測定法の開発

分子末端にSH基をもつチオール化合物が金などの金属表面に結合し、緻密な配向性の単分子膜を形成することが知られている。この金-チオール結合現象により、溶液中のわずかなチオール化合物が金表面にきわめて高濃度に濃縮されていることになる。そこで、この濃縮された膜を測定すれば、これまでのバイオセンサ感度をはるかに超えることが期待される。そこで、チオールの一種であるチオコリンを生成する酵素アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を標識した抗BNP抗体 (AChE-anti BNP) を合成し、この酵素標識抗体によって生成されるチオコリンを金の表面に濃縮させ、携帯型表面プラズモン共鳴測定器により測定する新しい免疫センサシステムを考案した。

栗田 僚二 くりたりょうじ

r.kurita@aist.go.jp

生物機能工学研究部門
バイオセンシング技術研究グループ
研究員 (つくばセンター)

2004年に産総研入所。これまでに、微細加工技術を用いた電気化学分析用マイクロチップの研究開発を行うとともに、開発したマイクロチップを用いて、神経細胞から放出される神経伝達物質のリアルタイム計測と解析を行ってきた。特に近年は、電気化学だけでなく表面プラズモン共鳴法をベースとしたマイクロセンシングチップや、新しい免疫測定手法の研究開発を行っている。研究向けから医療応用を目指した新しいバイオセンシング技術の開発に取り組んでいる。

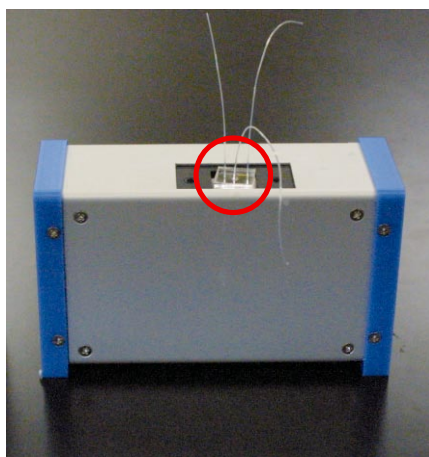


図1 携帯型表面プラズモン共鳴センサ。
○部がマイクロセンシングチップ。

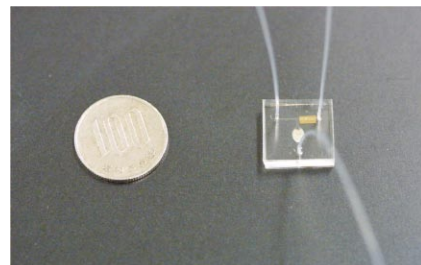


図2 マイクロセンシングチップの拡大写真

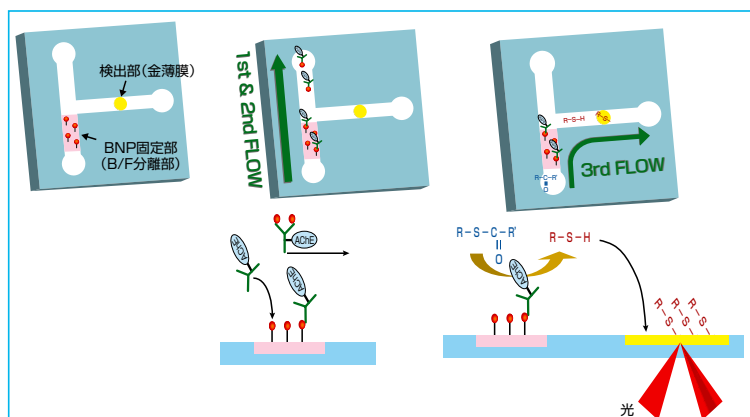


図3 チオコリン濃縮を利用した酵素免疫測定法

まず、酵素標識抗体と血液試料を混合し、図の方向に10分間送液する(1st flow)。5分間洗浄(2nd flow)した後、アセチルチオコリン溶液を別方向に15分間送液する(3rd flow)。

携帯型表面プラズモン共鳴測定器とマイクロセンシングチップ

図1、2に、今回開発した免疫センサシステムの写真を示す。図3はセンサの測定原理を示した模式図である。マイクロセンシングチップは、表面にBNPが固定化されたB/F分離部と検出用の金薄膜をもつガラス基板(16×16 mm)と、T型の微小流路(深さ20μm、幅1mmと2mm)をもつシロキサンポリマー基板で構成される。BNPの検出は以下のように行った。

まず、血液試料とアセチルコリンエステラーゼ標識抗BNP抗体(AChE-anti BNP)を混合し、図3中央の矢印の方向に混合試料溶液を10分間流す(1st flow)。この際に、血液中のBNPと結合済みのAChE-anti BNPはB/F分離部上のBNPとは結合しないためそのまま流れるが、未反応のAChE-anti BNPはB/F分離部上のBNPと結合して捕

捉・回収される。その後、バッファ溶液を5分間流して洗浄する(2nd flow)。次に、アセチルチオコリン溶液を図の方向に送液する(3rd flow)。この時、B/F分離部上に捕捉されているAChE-anti BNPによってアセチルチオコリンが加水分解され、生成したチオコリンは下流の金薄膜表面に吸着、濃縮される。チオコリン吸着量は金薄膜の表面プラズモン共鳴角度の変化(誘電率上昇)として測定される。

実際に、BNP濃度の上昇に伴い、表面プラズモン共鳴角度変化量が減少する様子が観測された。これは、試料中のBNPが増加すると、B/F分離部に捕捉されるAChE-anti BNPが減少、つまりアセチルコリンエステラーゼ活性が低下するために、生成するチオコリンが減少し、吸着による金薄膜表面の誘電率の変化が小さくなったためである。一般的に、表面プラズモン共鳴測

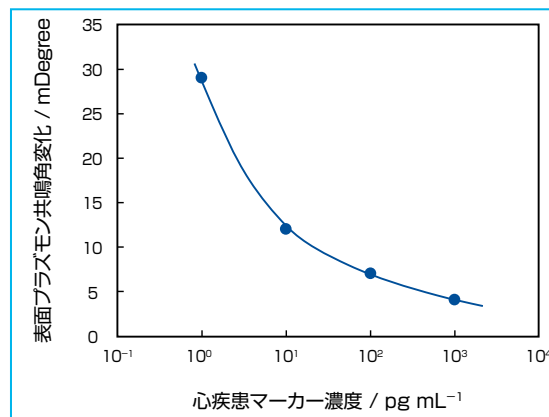


図4 心疾患マーカーを検出した際の検量線

定ではBNPのような小分子量のペプチドに対する感度は低く、数μg/mL程度であった。ところが、このセンシングチップではpg/mLオーダーのきわめて高感度な免疫測定が可能であった(図4)。これは、抗原抗体反応を直接表面プラズモン共鳴法で測定するのではなく、金表面に「濃縮」したチオコリン単分子膜を測定したことによる。加えて、これらの反応を微小流路中で行うことで、試料の量の減少や各反応時間の短縮、濃縮効果などを向上させることができたためである。このマイクロセンシングチップは、検出下限濃度が5pg/mLときわめて高感度を示し、また安全・低電力・簡便に測定できることから、BNPだけでなく様々なベッドサイド測定用センサとして有効であると考えられる。

関連情報：

- 共同研究者：丹羽修（産総研）、水谷文雄（兵庫県立大）
- 参考文献：R. Kurita et al., Analytical Chemistry, Vol. 78, No. 15, p. 5525-5531 (2006)
- 関連特許：栗田僚二 他、表面プラズモン共鳴法による免疫測定、特願 2005-067857
栗田僚二 他、酵素免疫測定方法及びそのための酵素免疫センサ、特願 2005-209598
- 新聞報道：日刊工業新聞 2006年7月5日：「心疾患30分で測定／標的タンパク質を高感度検出」