

電力中央研究所報告

ナノ・マイクロテクノロジーを利用した 生物計測技術の開発（その2）

－電気化学インピーダンス法に基づく非標識抗体を用いたイムノアッセイ－

研究報告：V10031

平成23年5月

R **CRIEPI**



ナノ・マイクロテクノロジーを利用した
 生物計測技術の開発（その2）
 -電気化学インピーダンス法に基づく非標識抗体を用いた
 イムノアッセイ-

伊達 安基^{*1} 寺門 真吾^{*2} 佐々木 和裕^{*2}
 青田 新^{*3} 松本 伯夫^{*4} 大村 直也^{*5}

キーワード：非標識抗体

電気化学インピーダンス
 マイクロ流体デバイス
 簡易計測
 ポリ塩化ビフェニル

Key Words : Label free antibody

Electrochemical impedance spectroscopy
 Microfluidic device
 Rapid measurement
 Polychlorinated biphenyl

Development of biosensor using nano-micro technology (Part 2)
- Label free immunoassay using electrochemical impedance spectroscopy -

**Yasumoto Date, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Arata Aota,
 Norio Matsumoto and Naoya Ohmura**

Abstract

Immunoassay has been served as a useful measurement technique in medical field. We are developing flow-based immunoassay as a rapid and cheap measurement tool in environment and food fields for heavy metals and various chemicals. In many types of immunoassay, labeling of antibody is required to detect antigen-antibody reaction from the reaction-dependent changes of physical and/or chemical signals. While, labeling often leads change of antibody binding character. A label-free method applicable to immunoassay to detect antibody is therefore desired. Recently electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using modified electrode is proposed to detect biomolecule such as protein without any labeling. Here we describe construction of flow-based label free immunoassay using for polychlorinated biphenyl (PCB) using EIS detection.

The modification of micro fabricated electrode was successfully prepared by electrochemical deposition of chitosan onto the selected surfaces of electrode, followed by chemical immobilization of PCB ligand to chitosan. The modified electrode showed a clear response of resistance based on EIS, depending upon anti-PCB antibody concentrations. This corresponding response enabled to estimate PCB concentration through quantification of the unliganded antibody. The micro flow cell using modified electrode was proposed as flow-based label free immunoassay after optimization for flow conditions. The proposed assay exhibited working range for PCB from 0.4mg/kg to 11.1mg/kg. PCB concentration for IC50% in flow type was three times lower than that in batch type.

(Environmental Science Research Laboratory Rep.No.V10031)

(平成 23 年 3 月 23 日 承認)

- ^{*1} 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 研究員
^{*2} 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 主任研究員
^{*3} 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 特別契約研究員
^{*4} 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 上席研究員
^{*5} 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 上席研究員・領域リーダー

背景

環境や食品などの管理に役立つ化学物質の簡易測定技術として、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイが注目されており、当所でも高感度な測定が期待できるフロー式イムノアッセイを開発してきた。一般に、イムノアッセイでは反応の検出のために、抗体を金コロイド等で標識する必要があるが、標識化による費用の増加や抗体機能の劣化が懸念されることから、標識を必要としない検出法の開発が望まれている。一方、電気化学インピーダンス法^{注1)}は、非標識の生体分子を検出可能な手法として注目され、イムノアッセイへの応用が期待されている。

目的

電気化学インピーダンス法に基づく、非標識抗体を用いたフロー式イムノアッセイを構築し、その測定性能を評価する。

主な成果

イムノアッセイの構築にあたり、PCB (ポリ塩化ビフェニル) 抗体を例として用いた。

1. 抗体捕捉分子を固定化した修飾電極の作製

非標識抗体を検出する修飾電極を作製するために、抗体捕捉分子の固定化法を開発した。フォトリソグラフィ^{注2)}により作製した電極に還元電位を印加することで、部位特異的にキトサンを固定し、続いて抗体捕捉分子を化学修飾することで、均一な修飾電極を作製できた (図1)。

2. 修飾電極を用いた非標識抗体の検出

修飾電極に対して種々の濃度で抗体を含む試料を滴下した結果、抗体と電極表面の結合によると考えられる、抗体濃度依存的な抵抗値変化が観測された (図2)。従って、抵抗値変化から、PCB と反応せず修飾電極と結合した抗体の量が求められ、これにより試料中の PCB 濃度を決定できた。

3. 非標識抗体を用いたフロー式イムノアッセイの構築

マイクロフローセルに修飾電極を組込んだフロー式イムノアッセイを構築した (図3)。測定条件を最適化した結果、測定範囲は0.4~11.1 ppb であった。また、その測定感度は非フロー式^{注3)}と比較して約3倍であり、標識化抗体を用いたフロー式イムノアッセイに近い感度で試料中の PCB を検出できた (図4)。

今後の展開

測定感度と測定精度の向上を目指し、マイクロフローセルの構造と修飾電極の作製方法を改良する。また、本測定法の重金属測定への適用に向けた検討を行う。

- 注1) 電極に交流電位を入力することで、電極表面への分子の結合等を抵抗値の変化から観察する手法。
 注2) 光と感光性樹脂を利用して半導体等のマイクロスケールの構造物を作製する手法。
 注3) 非フロー式の測定では、修飾電極に対して50 μ Lの抗体を含む試料を直接に滴下した。

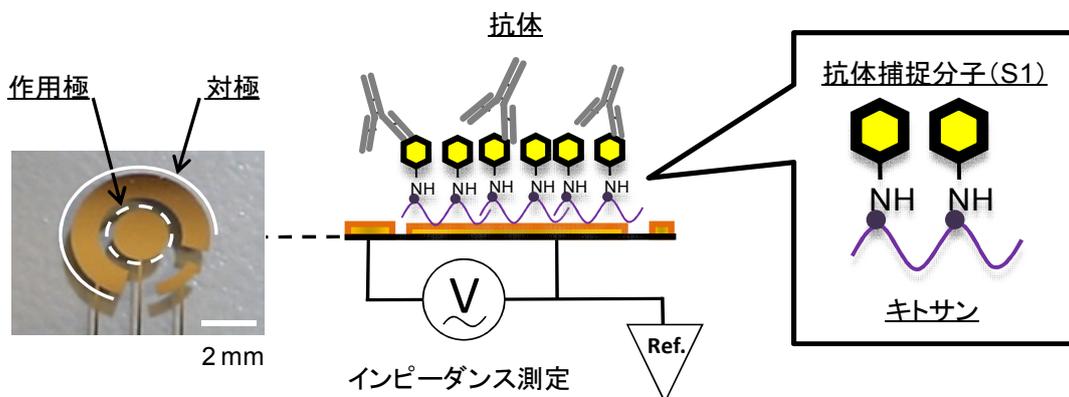


図1 修飾電極を用いた非標識抗体の検出原理

電極上に電着したキトサンを介して抗体捕捉分子を特異的に固定化することで、インピーダンス測定により、抗体捕捉分子と非標識抗体の結合に由来する電気抵抗の変化が観測される。

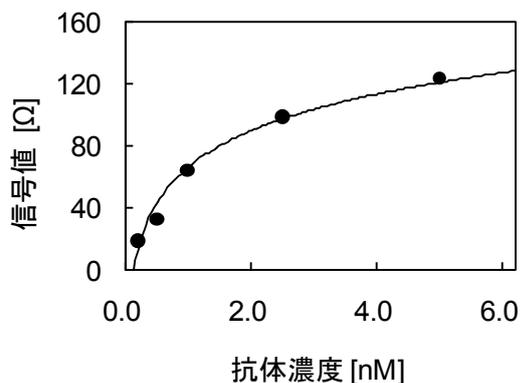


図2 非標識抗体の検出

抗体濃度に依存した抵抗値の変化が観測された。

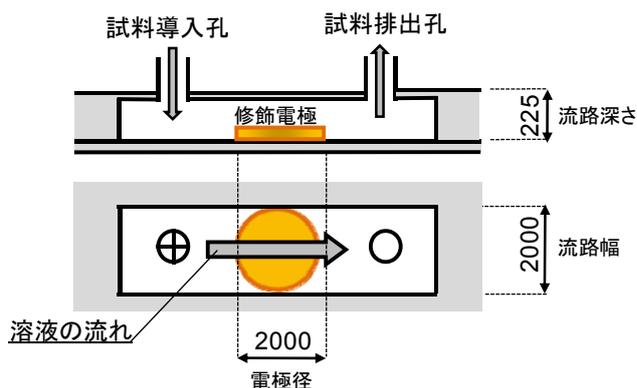


図3 マイクロフローセル一体型修飾電極の概要図
 (図中の数字の単位は μ m)

	IC50 [μ g/L]
非フロー式	9.2
フロー式	3.1
(標識化法)	0.9

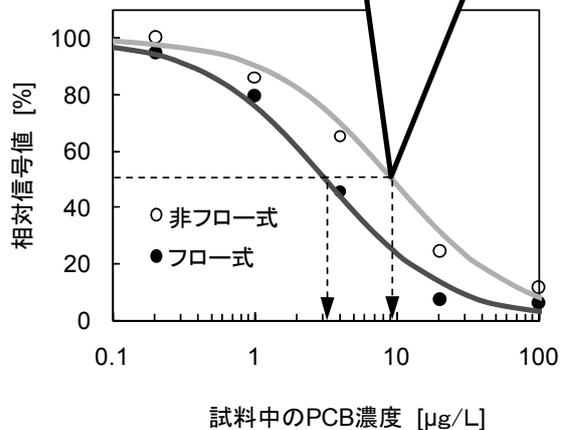


図4 非標識抗体を用いたフロー式免疫アッセイ

IC50を測定感度の指標とした。修飾電極をマイクロフローセルに組込むことで、非フロー式と比較して感度が約3倍向上した。また、標識化法の結果は、金コロイド標識抗体を用いたフロー式免疫アッセイにより決定した。この値を本報告における測定感度の目標値とした。

目 次

1. はじめに	1
2. 材料と方法	1
2.1 材料	1
2.2 微小電極の作製	2
2.3 マイクロフローセルの作製	3
2.4 修飾電極の作製	3
2.5 電気化学インピーダンス測定	4
2.6 抗原抗体溶液の調整	5
2.7 イムノアッセイの方法	5
2.8 イムノアッセイの解析	5
3. 結果と考察	6
3.1 修飾電極の作製と評価	6
3.1.1 電着に用いるキトサンの選択	6
3.1.2 修飾電極の評価	6
3.2 非フロー式イムノアッセイの構築	6
3.2.1 非フロー式イムノアッセイの測定に関わる因子の最適化	6
3.2.1.1 キトサンの電着時間の検討	7
3.2.1.2 抗体反応時間の検討	7
3.2.2 非フロー式イムノアッセイによる PCB の測定	7
3.3 フロー式イムノアッセイの構築	7
3.3.1 フロー式イムノアッセイの測定に関わる因子の最適化	8
3.3.1.1 抗体濃度の検討	8
3.3.1.2 送液量の検討	8
3.3.1.3 送液速度の検討	8
3.3.2 フロー式イムノアッセイによる PCB の測定	9
3.4 考察	10
4. 結論	10
謝辞	11
参考文献	11

1. はじめに

生物の機能を利用した計測は、迅速性と経済性に優れた測定手法である。特に、免疫アッセイは生物が有する抗原抗体反応のしくみを利用することで、微生物などの細胞からタンパク質といった高分子、さらには、低分子化合物までを幅広く測定対象とすることが可能であり、その簡易測定法としての有用性に期待が寄せられている。一方、当所においても、抗体の結合・解離反応を平衡解離定数まで評価可能な、結合平衡除外に基づく独自のフロー式免疫アッセイ技術を開発し¹⁻²⁾、この測定方法を利用して、これまでは困難とされてきたポリクロロビフェニル（以下、PCBと略称する）をはじめとする低分子化合物や、重金属を抗原として、特異的結合を示す種々の抗体を作製してきた³⁻⁵⁾。さらに、これら種々の抗体を応用し、絶縁油中のPCBを高感度に測定しうる測定技術⁵⁻⁶⁾や、免疫クロマトグラフィーによる米中のカドミウムの迅速かつ簡便な測定技術⁷⁾を提案してきた。

一般に、多くの免疫アッセイでは反応の検出のために、金コロイド、蛍光物質、磁性粒子、酵素等により抗体を標識する必要がある。しかしながら、抗体の標識は費用と手間がかかること、さらに抗体分子に対して不可逆な変化を与えるため、抗体が有する抗原に対する親和性や特異性、保存性の低下が懸念されている。そのため、免疫アッセイにおいて、標識を必要としない検出法が望まれており、これまで、表面プラズモン共鳴（SPR）法⁸⁻⁹⁾や、音波を利用したアコースティック法¹⁰⁻¹¹⁾などが提案されている。これらの非標識抗体の検出技術が、これまで以上に高感度化、簡便化されれば、さらに簡易測定法としての免疫アッセイの活用が進むと考えられる。

さらに、近年になって非標識のタンパク質をはじめとした生体分子を検出する手法として、

電気化学インピーダンス測定が提案されている¹²⁻¹³⁾。この測定は、基板上の電極表面に交流電位を印加することで、電極表面と分子の結合を抵抗（電荷移動抵抗）の変化として検出するものであり、抗体などの高分子を標識する必要がない。このため、これまでも非標識の抗体を用いた免疫アッセイへの応用が検討されており、簡便な測定と実用性が期待されている。一方で、この測定は高感度測定には不向きであるとされてきたが、当所技術である、結合平衡除外に基づくフロー式免疫アッセイへの応用により、高感度化が可能であると考えた。

また、近年免疫アッセイへの微細加工技術の応用が進み、測定に用いる検出系の簡便化や集積化による多検体同時測定が検討されている。以上から、微細加工により集積化した免疫アッセイに活用が可能であり、抗体の標識を必要としない検出法が注目されている。

そこで、本報告ではフロー式免疫アッセイにおける結合平衡除外効果¹⁻⁶⁾を利用した測定に、電気化学インピーダンス測定を用いた検出系を組み合わせることで、抗体の標識を必要としない高感度な免疫アッセイを検討した。

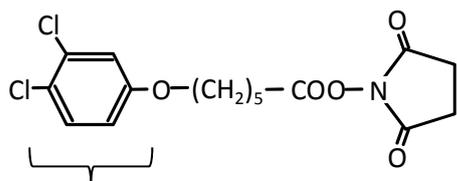
はじめに、多糖類であるキトサンの化学的性質を利用して抗体捕捉分子を固定化した修飾電極を新規に作製した。次に、非標識抗体の電極表面への捕捉と、補足した抗体の電気化学インピーダンス測定による検出を検討した。さらに、均一な試料の送液を達成しうるマイクロフローセルに修飾電極を組み込んだフロー式免疫アッセイを構築し、測定の高感度化を検討した。

2. 材料と方法

2.1 材料

3種類のキトサン（low molecular weight、medium molecular weight、high molecular weight）

はシグマアルドリッチジャパンより購入した。ポジ型フォトレジスト S1818、および現像液 CD-26 Developer はロームアンドハース社から購入した。ネガ型フォトレジスト SU-8 フィルムおよび現像液 SU-8 Developer は化薬マイクロケム（株）から購入した。PCB の標準物質としてカネクロール（以下、KC と略称する）を GLサイエンス（株）より購入し、KC300、KC400、KC500、KC600 を等量混合物したものを KCMix として実験に用いた。抗 PCB 抗体として、K2A 抗体を京都電子（株）より購入した。抗体補足分子として、PCB に類似した構造を含む既報の 2-ジクロロフェノール誘導体である S1⁶⁾ を用いた。（図 1）



PCBの一部に類似した構造

図 1 抗体捕捉分子 (S1) の構造

2.2 微小電極の作製

フォトリソグラフィとリフトオフ工程により、円形の作用極（直径 2 mm）と対極を有する金電極基板を作製した（図 2(A)）。まず、ガラス基板（28 mm×76 mm、松波ガラス（株））をピラニア溶液（過酸化水素：硫酸 = 1：3）に 15 分浸漬し、続いて基板を蒸留水で洗浄した後、イソプロパノール中で超音波洗浄した。洗浄した基板は窒素ガスで乾燥し、フォトレジスト S1818 をスピコート（3000 rpm、30 秒）した。スピコートした基板は露光前ベイク（65℃：1 分、95℃：6 分）した後、マスクアライナー（MA-20、ミカサ（株））を用いて基板にフォトマスクを重ね、波長 365 nm の高圧水銀ランプで露光した。露光後の基板は現像液（CD-26 Developer）で現像し、露光部分を除去した。現像された基板を十分に洗浄乾燥した後、スパッタリング装置（L-332S-FH、アネルバ（株））を用いて金薄膜（膜厚：150 nm）を製膜した。ここで、ガラスと金薄膜の密着性を向上するよう、チタンおよびパラジウムをバインダーとして用

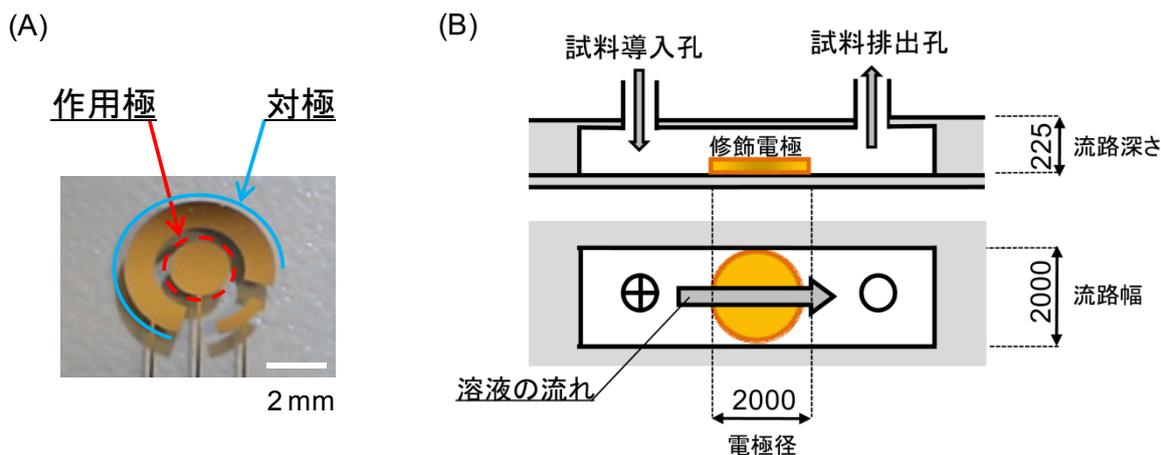


図 2 検出用電極とマイクロフローセルの概要図

(A) 微細加工技術により作製した金電極

(B) マイクロフローセルの概要図

金電極は微細加工技術（フォトリソグラフィ、およびスパッタリング）により、ガラス基板上に作製した。円形（直径 2 mm）状の電極が検出用の作用極である。試料導入孔から導入された抗体を含む試料は、マイクロフローセル内に配置された電極表面に送液される。

いた。スパッタにより金属薄膜を製膜した基板はアセトンに浸漬し、残存するレジストとレジスト上の金属薄膜をリフトオフした。

2.3 マイクロフローセルの作製

電極表面に対して抗体を含む試料を連続的に通液しうるマイクロフローセルを作製した(図2(B))。マイクロフローセルは一般的なフォトリソグラフィ工程を利用して作製した鋳型と、ポリジメチルシロキサン(以下、PDMSと略称する)(SILPOT184、東レダウコーニング(株))を用いて作製した¹⁴⁾。マイクロフローセルの鋳型は、シリコンウェハ上に作製した。予め45℃に加温したシリコンウェハ上にフィルムレジスト(SU-8 Film 50 μm、化薬マイクロケム(株))を積層した。マスクアライナー(MA-20、ミカサ(株))を用いてウェハにフォトマスクを重ね、波長365 nmの高圧水銀ランプで露光した。露光したウェハを95℃で加熱した後、現像液(SU-8 Developer、化薬マイクロケム(株))に浸

漬し、未露光部のレジストを除去した。現像後のウェハは2-プロパノールで数回洗浄した。鋳型表面を疎水化するために、減圧下の気相でシランカップリング剤(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl trichlorosilane、信越化学工業(株))と30分間反応させた。PDMSモノマーと硬化剤を10:1(重量比)で混合し、減圧により気泡を除去した後、疎水化した鋳型上に流し込んだ。鋳型に流し込んだPDMSを80℃で2時間加熱することで重合させ、硬化させた。硬化したマイクロフローセルを鋳型から剥離し、溶液インレットおよび溶液アウトレットを作製した。

2.4 修飾電極の作製

図3に修飾電極の作製方法を示す。はじめに、研磨用アルミナ(0.05 μm、BAS(株))と研磨パッド(BAS(株))を用いて金電極を研磨した。研磨した電極は純水とエタノールの混合溶液中で超音波洗浄した後、窒素ガスで乾燥させた。

続いて、抗体捕捉分子の足場となるキトサン

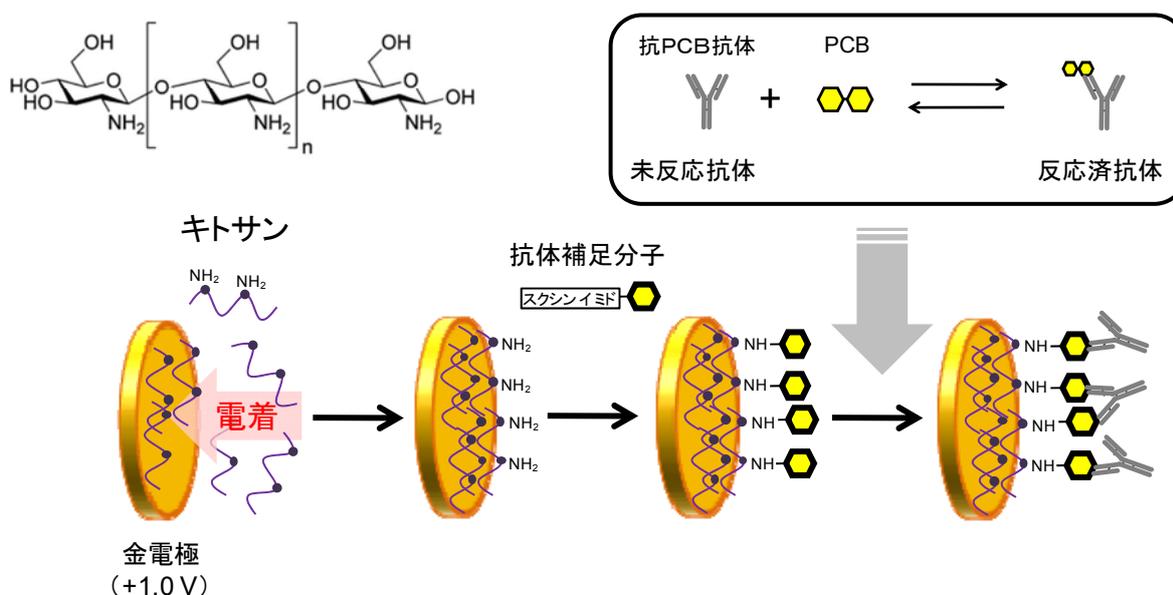


図3 修飾電極の作製

金電極にキトサンを電着し、続いてキトサンのアミノ基を介して抗体捕捉分子を結合させた。修飾電極には試料中の未反応抗体が結合するため、電極の抵抗値の変化から未反応抗体量が求められる。

の電極上へ電着を行った。電着に用いるキトサンとして、分子量の異なる low molecular weight、medium molecular weight、high molecular weight の三種類について検討を行った。各々のキトサンは、はじめに、0.2 wt% の各キトサン溶液 (pH4.0) を電極上に滴下し、ポテンショスタット (ALS-600、BAS (株)) を用いて作用極に-1.0 V (vs. 銀塩化銀電極) の電位を印加することで作用極上にキトサンを電着した。キトサンの可溶性は pH 依存的であることが報告されており、負電圧に保持された電極表面近傍における pH の低下によって、電極表面に電着される¹⁵⁾。キトサンを電着した電極基板は純水で洗浄し、常温で乾燥させた。

次に、抗体補足分子である S1 を DMSO に溶解し (1 mg/ml) S1-DMSO 溶液とした。続いて 10 μ L の S1-DMSO 溶液を乾燥させたキトサン被覆電極上に滴下し、時間反応させた後、DMSO とエタノールで洗浄した。キトサン分子はアミノ基を有し、S1 はアミノ基と結合しうるスクシンイミド基を有することから、S1 はキトサン分子を介して電極上に固定化される。免疫アッセイの際には、電極上に抗体溶液を供給することで、S1 に抗体が結合する。

2.5 電気化学インピーダンス測定

電気化学インピーダンス測定は、溶液中の電極に対して、波長の異なる交流電位を連続して入力することで得られる出力値から、電極表面における分子の吸着や結合、化学反応に関する多くの情報を取得できる¹⁶⁾。測定は電気化学アナライザー (ALS-600、BAS (株)) を用い、作用極、対極、参照極を用いる三電極法で行なった。全ての測定は電解質として 100 mM KCl を含み、酸化還元プローブとして 4 mM フェロシアン/フェリシアンカリウム ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) を含む測定溶液中で行った。電極電位を、測定溶液の

フォーマル電位付近である 0.23 V (vs. 銀塩化銀電極) とし、電位の振幅は 5 mV、測定周波数は 10 Hz から 10^5 Hz として電気化学インピーダンス測定を行った。

測定値であるインピーダンスは実数と虚数の和として式(1)で示すインピーダンス Z として記録される。

$$Z = Z' + jZ'' \quad (1)$$

そこで、インピーダンススペクトルの一種である、実数部分を横軸、虚数部分を縦軸としたナイキストプロットとして示した (図 4(A))。ここで、 R_{sol} は溶液抵抗値、 R_{ct} は電荷移動抵抗値、 C_{dl} は電気二重層容量、 Z_{w} は物質拡散を示すワルブルグインピーダンスである。

インピーダンススペクトルは電極表面を電気回路に模した等価回路によって解釈される。等価回路として、電極反応を生じる電極において一般的なモデルを用いた (図 4(B))¹⁷⁾。この等価回路で示されるインピーダンススペクトルは、実数部分 Z' および虚数部分 Z'' が、それぞれ式(2)および式(3)に示す理論式で記述される。

$$Z' = R_{\text{sol}} + \frac{\left(R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-\frac{1}{2}}\right)}{\left(C_{\text{dl}}\sigma\omega^{\frac{1}{2}}\right)^2 + \omega^2 C_{\text{dl}}^2 \left(R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-\frac{1}{2}}\right)^2} \quad (2)$$

$$Z'' = \frac{\sigma\omega^{-\frac{1}{2}}(C_{\text{dl}}\sigma\omega^{\frac{1}{2}} + 1) + \omega C_{\text{dl}} \left(R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-\frac{1}{2}}\right)^2}{\left(C_{\text{dl}}\sigma\omega^{\frac{1}{2}}\right)^2 + \omega^2 C_{\text{dl}}^2 \left(R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-\frac{1}{2}}\right)^2} \quad (3)$$

σ は物質拡散に関する定数、 ω は角速度である。 R_{sol} (溶液抵抗値)、 R_{ct} (電荷移動抵抗値)、 C_{dl} (電気二重層容量)、 Z_{w} (ワルブルグインピーダンス) の各パラメータは、測定により得られたインピーダンススペクトルを、式(2)お

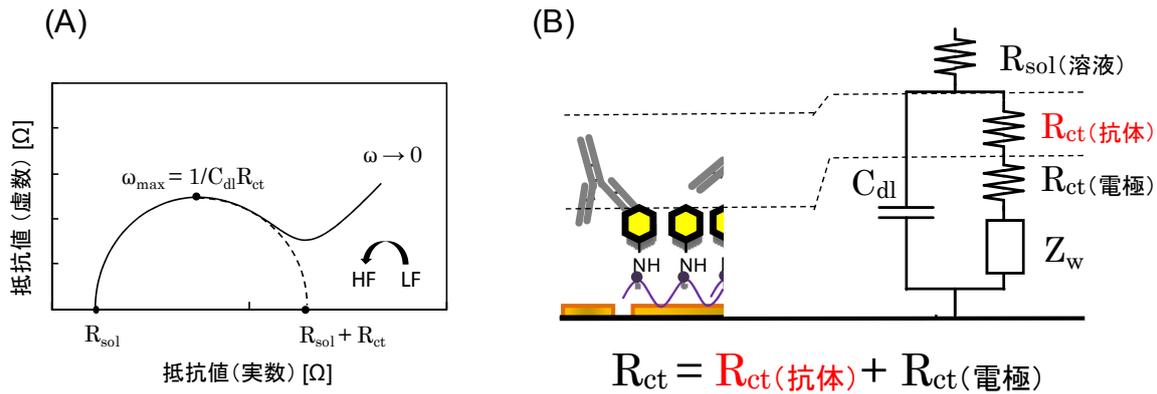


図4 修飾電極のインピーダンススペクトルおよび等価回路
 (A) インピーダンススペクトル (ナイキストプロット)
 (B) 電極表面に関する等価回路

R_{sol} は溶液抵抗値、 R_{ct} は電荷移動抵抗値、 Z_w はワルブルグインピーダンス、 C_{dl} は電気二重層容量を示す。測定により得られるインピーダンススペクトル中の半円の直径は電荷移動抵抗値 R_{ct} を示す。本報告の電極修飾では、電荷移動抵抗を示す R_{ct} は電極固有の R_{ct} (電極) と結合した抗体による R_{ct} (抗体) の和である。

よび式(3)と最小二乗法による近似を行なうことで決定した。近似計算には表計算ソフトとして、Microsoft Excel 2007 (マイクロソフト (株)) を用いた。

本報告では、等価回路におけるパラメーターのうち、電極表面への分子の結合により大きく変化する電荷移動抵抗値 R_{ct} の変化量を信号値として用いた。電荷移動抵抗値 R_{ct} は (図 4(B)) に示すように、電極固有の R_{ct} (電極) と結合した抗体による R_{ct} (抗体) の和であり、物理的には電極表面における酸化還元プローブの電気化学反応の反応速度に関わる因子である。

2.6 抗原抗体溶液の調整

各濃度に段階希釈した 30 μ L KCMix に対して 30 μ L DMSO を添加し、続いて、1440 μ L 0.2% の Tween20 を含む PBS 緩衝液 (pH7.4) (以下、PBST と略称する) を加えた。さらに、抗 PCB 抗体 (K2A 抗体) を含む 1500 μ L を PBST 加え、穏やかに 30 分混和することで、測定に用いる結合平衡液とした。

2.7 イムノアッセイの方法

フロー式イムノアッセイを構築するにあたり、前段階として修飾電極を用いた非フロー式イムノアッセイを構築した。修飾電極に対して PDMS 製ウェル (直径 7 mm) を設置した。修飾電極に対して、各濃度の PCB と抗体を含む試料を 50 μ L の滴下し、室温で反応させた。反応後の電極は、PBST で 2 回、PBS 緩衝液で 1 回洗浄し、電気化学インピーダンス測定を行った。修飾電極を評価する際も同様の操作を行った。

フロー式イムノアッセイでは、シリンジポンプ (KDS-200、Kd Scientific (株)) を使い、修飾電極と一体化したマイクロフローセルに各濃度の PCB と抗体を含む試料を送液した。試料を送液した後、マイクロフローセルと分離した修飾電極を PBST で 2 回、PBS 緩衝液で 1 回洗浄し、測定を行った。

2.8 イムノアッセイの解析

イムノアッセイの解析には、シグモイド状の曲線を表わす以下の近似式を用いた。

$$y = (1 - x)(A/x + B) \quad (4)$$

y は抗体溶液中の PCB 濃度、x は PCB を含まない抗体溶液を 100 %とした時の相対信号値である。A および B は近似パラメーターである。以上から、校正曲線は、式 (4) を近似式として最小二乗法を用いて作成した。また、校正曲線において、相対信号値が 50%である場合の試料中の PCB 濃度である IC50 を感度を示す値として用いた。

3. 結果と考察

3.1 修飾電極の作製と評価

修飾電極を作製する上で、電極を安定かつ均一に被覆可能で、抗体捕捉分子を固定に適するキトサンを選択する必要がある。そこで、分子量の異なる 3 種類のキトサンを用いた検討を行った。次に、キトサンを電着した後に抗体捕捉分子を固定化した修飾電極に対して、抗体を含む試料を滴下し、インピーダンス測定による検出を検討した。

3.1.1 電着に用いるキトサンの選択

分子量の異なる 3 種類 (low molecular weight、medium molecular weight、high molecular weight) を電極に電着し、顕微鏡観察によって膜の均一性を検討した。電着に用いたキトサンは、いずれも 0.2 wt % とし、pH4.0 に調整した溶液を用いた。その結果、低分子量キトサンを用いて電着した場合に、もっとも均一なキトサン膜を得られた。以上から、以降の検討では低分子量キトサンを用いることとした。

3.1.2 修飾電極の評価

作製した修飾電極を用い、標識していない抗体を検出できるか確認した。まず、電極にキト

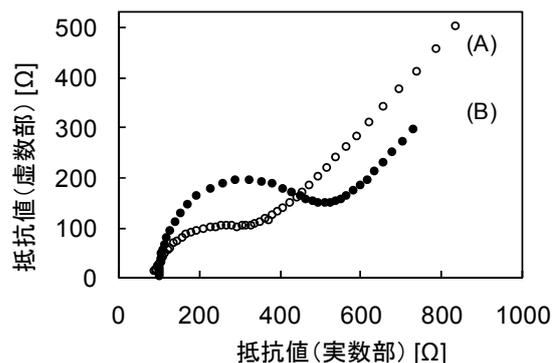


図 5 修飾電極の反応によるインピーダンススペクトルの変化
(A) 修飾電極
(B) 抗体を含む試料溶液の添加後

サン分子を 60 秒間電着し、次に抗体捕捉分子である S1 を固定化した修飾電極と、修飾電極に対して標識していない抗体を含む試料を滴下し、2 時間反応させた後のインピーダンススペクトルを示す (図 5)。各インピーダンススペクトルから算出された電荷移動抵抗値は、それぞれ 320、500 であった。反応後に増加した抵抗値は、抗体と修飾電極の反応により、電極表面での酸化還元プローブの反応速度の減少を示している。この結果から、反応後の抵抗値の増加量を指標とした、試料中における抗体量の測定の可能性が示された。

3.2 非フロー式免疫アッセイの構築

3.2.1 非フロー式免疫アッセイの測定に関わる因子の最適化

修飾電極を用いた免疫アッセイを行うためには、信号値である抵抗値変化量が大きいほど望ましい。そこで、抵抗値変化に作用すると思われるキトサンの電着時間を検討した。また、非フロー式の免疫アッセイでは、抗体を含む試料と修飾電極の間の反応が平衡に達する必要があることから、抵抗値変化の増加を指標として、修飾電極と試料が平衡に達するまでの反応時間を検討した。

3.2.1.1 キトサンの電着時間の検討

キトサン溶液の電着時間は 15、30、60、90、120 秒とした。キトサンと S1 分子を固定化した修飾電極に対して 5.0 nM の抗体溶液を滴下し、室温で 1 時間反応後、PBST で 2 回、PBS 緩衝液で 1 回洗浄した後に測定した信号値を図 6 に示す。信号値は電着時間の増加に従って増加し、60 秒で最大値である 142 Ω を示した。また、電着時間が 90 秒以上では、信号値は減少したことから、過剰な厚さのキトサンは、抗体と電極の距離を広めるために、電気化学インピーダンス測定による検出に適さないと考えられた。以上の結果から、修飾電極の作製においてキトサン溶液を電着する時間は 60 秒とした。

3.2.1.2 抗体反応時間の検討

修飾電極に対して、5.0 nM の抗体溶液を滴下し、室温で 0、1、2、3 時間反応後、PBST で 2 回、PBS で 1 回洗浄した後に測定を行った結果を図 7 に示す。反応時間の増加に伴って信号値は増加し、反応時間 2 時間以上でほぼ一定値を示した。従って、修飾電極と滴下した抗体溶液が十分に平衡状態に達するまでの反応時間は 2 時間であることから、非フロー式のイムノアッセイの反応時間を 2 時間とした。

3.2.2 非フロー式イムノアッセイによる PCB の測定

フロー式イムノアッセイを構築するにあたり、前段階として修飾電極を用いた非フロー式イムノアッセイを構築した。

PCB を含まない抗体溶液で得られた信号値に対する百分率を相対信号値として、PCB の校正曲線を作成したところ、試料中の PCB 濃度に依存した相対信号値の変化が得られた (図 8)。相対信号値が 10~90 % に相当する校正曲線における濃度範囲を検出範囲とすると、それぞれの検出範囲は、0.8 ppb ~ 83.5 ppb であった。ま

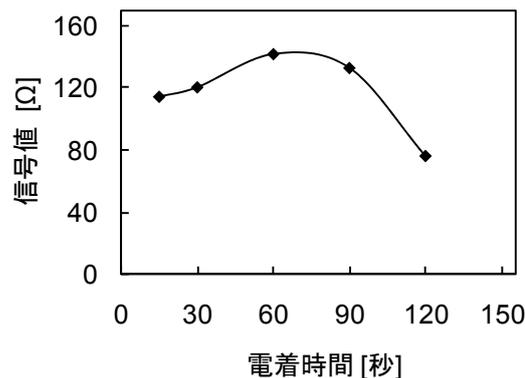


図 6 キトサンの電着時間が信号値に与える影響

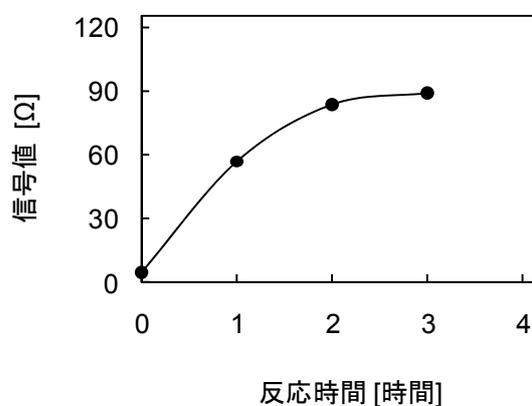


図 7 非フロー系イムノアッセイにおける反応時間が信号値に与える影響

た、校正曲線から得られた IC₅₀ は 9.2 ppb であった。以上から、インピーダンス測定に基づく非フロー式イムノアッセイが構築できた。一方、測定感度の指標となる IC₅₀ は抗体の結合解離定数 (0.9 ppb) の 9 倍程度と改良の余地が示されたことから、次に、より高感度な測定が期待されるフロー式によるイムノアッセイを構築した。

3.3 フロー式イムノアッセイの構築

フロー式イムノアッセイにおいて、抗体濃度が抗原 (PCB) 濃度に対して十分に小さいとき、結合平衡除外効果により、抗体の結合解離定数までの理想的な測定が期待できる⁶⁾。

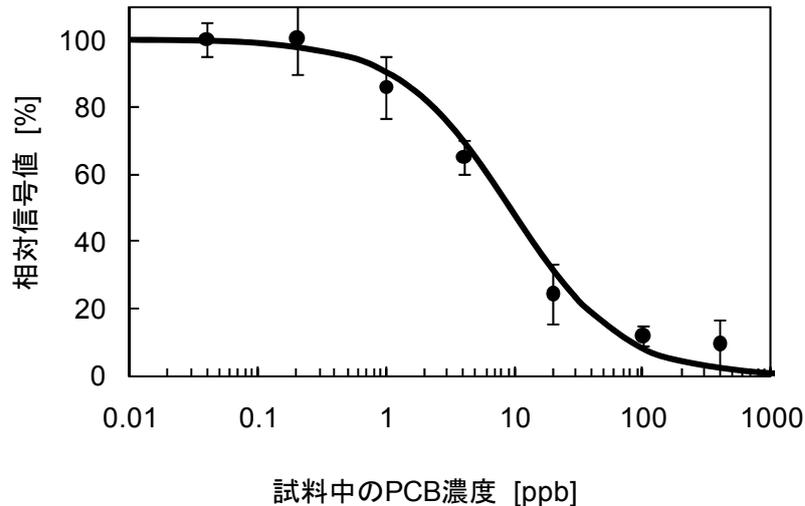


図8 非フロー式免疫アッセイの校正曲線

測定範囲は 0.8 ~ 83.5 ppb (IC₅₀=9.2 ppb) であった。相対信号値は PCB を含まない試料を測定した際の信号値を 100% として算出した。測定溶液の抗体濃度は 5 nM、反応時間は 2 時間とした。測定点は 3 回測定した平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。

そこで、電極表面に対して抗体を含む試料を連続的に送液しうるマイクロフローセルを作製し、電極基板と一体化することで、フロー式免疫アッセイが可能なマイクロフローセル一体型修飾電極を作製した (図 2(B))。

3.3.1 フロー式免疫アッセイの測定に関わる因子の最適化

フロー式免疫アッセイにおいて、測定の定量性と感度に関わる因子として、抗体濃度、送液量、送液速度が知られており、それらを最適化することで、高感度な測定が可能となる。そこで、それぞれの因子を順に検討した。

3.3.1.1 抗体濃度の検討

PCB の量を測定するためには、測定液中に含まれる PCB 濃度に応じて変化する未反応の抗 PCB 抗体の濃度を電極表面に捕捉される未反応抗体量から信号値として観測する必要がある。すなわち、抗体溶液中の未反応の抗 PCB 抗体濃度と信号値が正の直線関係にあることが望ましい。そこで、種々の濃度で抗体を含む PBST 緩

衝液 3.0 mL を送液速度 400 μ L/min でマイクロフローセルに通液した。その結果、得られた信号値は、1.0 nM まで抗体濃度と正の直線関係を示し (図 9(A))、信号値から測定液中の未反応抗体濃度を定量できることが示された。よって、以下の実験では抗体濃度は、信号値と正の直線関係が成立する 1.0 nM とした。

3.3.1.2 送液量の検討

次に、同様にマイクロフローセルに 1.0 nM の抗体を含む PBST 緩衝液を 400 μ L/min で送液し、送液量と信号値との関係を調べた。送液量は 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL とした。その結果、送液量 3.0 mL までは信号値と送液量は正の直線関係を示した (図 9(B))。これは、測定溶液中の未反応抗体が粒子上に接触時間に応じて一定の割合で捕捉され続けることで捕捉量が増加することを示しており、以下の実験では送液量を 3.0 mL とした。

3.3.1.3 送液速度の検討

最後に、これまでと同様に作製したマイクロ

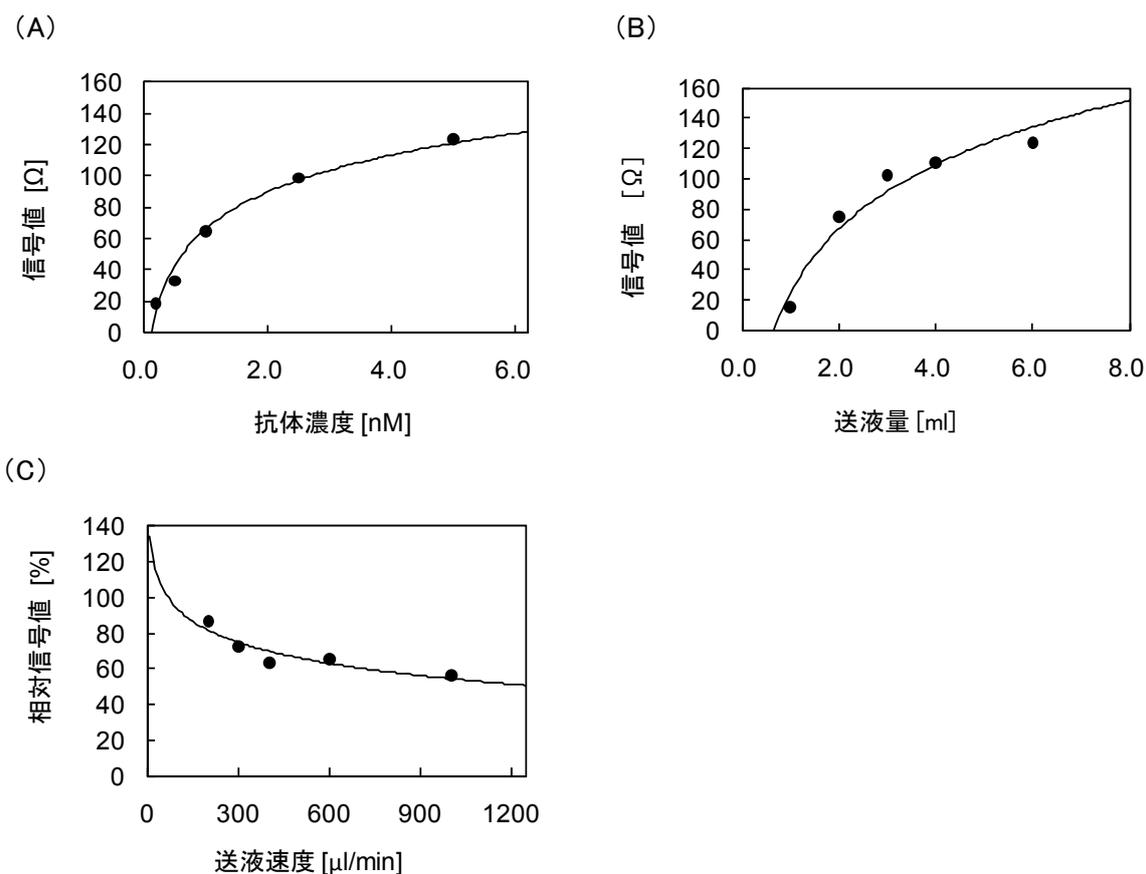


図9 フロー式免疫アッセイの測定条件の検討
 (A) 抗体濃度と信号値の関係 (流速は $400 \mu\text{l}/\text{min}$, 流量は 3.0 ml)
 (B) 試料の送液量と信号値の関係 (抗体濃度は 1.0 nM , 流速は $400 \mu\text{l}/\text{min}$)
 (C) 試料の流速と信号値の関係 (抗体濃度は 1.0 nM , 流量は 3.0 ml)

フローセルに 1.0 nM の抗体を含む 3.0 mL の PBST 緩衝液を $200, 300, 400, 600, 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ で送液した場合の信号値を測定した。また、同様の実験操作で PCB を 5 ppb 添加した 1.0 nM の抗 PCB 抗体溶液でも行った。その結果、相対信号値は送液速度 $400 \mu\text{l}/\text{min}$ 以上において、 60% から 70% の範囲を示し、送液速度が変化しても顕著な影響を受けなかった。(図 9(C)) 以上より、マイクロフローセル一体型電極を用いたフロー式免疫アッセイの測定条件は、送液量抗体濃度 1.0 nM 、 3.0 mL 、送液速度 $400 \mu\text{l}/\text{min}$ と決定した。

3.3.2 フロー式免疫アッセイによる PCB の測定

PCB を含まない抗体溶液で得られた信号値に対する百分率を相対信号値として、PCB の校正曲線を作製した (図 10)。その結果、相対信号値が $10\sim 90\%$ に相当する校正曲線における濃度範囲を検出範囲とすると、それぞれの検出範囲は、 $0.4 \text{ ppb} \sim 11.1 \text{ ppb}$ であった。また、校正曲線から得られた IC_{50} は 3.1 ppb であり、非フロー式 ($\text{IC}_{50} = 9.2 \text{ ppb}$) と比較して 3 倍程度の感度での免疫アッセイが可能となった。

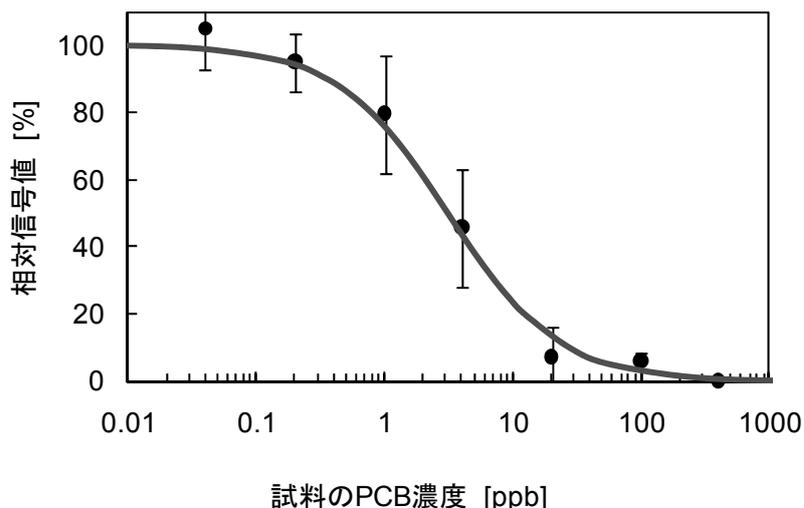


図 10 フロー式イムノアッセイの校正曲線

測定範囲は 0.4～11.1 ppb ($IC_{50}=3.1$ ppb) であった。測定条件は、送液量 3.0 mL、送液速度 400 μ L/min、抗体濃度 1.0 nM とした。相対信号値は PCB を含まない試料を測定した際の信号値を 100% として算出した。測定点は 3 回測定した平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。

3.4 考察

フロー式のイムノアッセイでは、結合平衡除外に達しうる理想的な条件で行われた場合、校正曲線の IC_{50} は抗体が有する結合解離定数とほぼ一致することが知られている⁶⁾。報告されている抗 PCB 抗体 (K2A) の結合解離定数 ($K_d =$ 約 0.9 ppb) であることから、マイクロフローセルと修飾電極を組合せたイムノアッセイは、依然として理想的な感度での測定はできなかった。一方、予備的に実施した金コロイド標識抗体と、担体粒子を用いた従来のフロー式イムノアッセイでは、校正曲線の IC_{50} は結合解離定数とほぼ一致 ($IC_{50} = 0.9$ ppb) した。そのため、感度が十分でない主な原因として、設計したマイクロフローセルを用いた場合では、平坦な電極表面に対する試料の流れが均一でないことが考えられた。よって、さらなる高感度化にはマイクロフローセルの流路構造の検討が必要と考えられた。

また、測定精度を示す変動係数は測定範囲に

おいて最大で 39% と高い値を示した。この結果から、精度の高い測定を実施するには改善の余地があり、安定した検出が可能な修飾電極の作製方法を検討する必要性が示された。

4. 結論

本報告では、非標識抗体を用いた高感度なイムノアッセイ法として、電気化学インピーダンス法を利用したフロー式イムノアッセイを提案し、その原理的な検証を行った。

はじめに、電極に対して、新規の手法により抗体補足分子を部位特異的に固定化した修飾電極を作製した。続いて、修飾電極と抗体分子の結合に由来する抵抗値変化を利用し、PCB を対象とした非フロー式イムノアッセイの構築に成功した。さらに、抗体溶液を連続的に送液しうるマイクロフローセルを修飾電極と組み合わせることで、非フロー式と比較して、高い感度での測定が可能なフロー式イムノアッセイを実現した。

今後は、測定感度の向上に必要と考えられるマイクロフローセルの構造を検討するとともに、安定した検出が可能な修飾電極の作製方法を検討する。また、ニーズの増加が予測される食品分野や土壌分析等における重金属の簡易測定法として、当所が有する重金属抗体の本測定法への適用を検討する。

謝辞

本報告における実験にあたり、微細加工装置を使用させて頂いた、東北大学大学院環境科学研究科の末永智一教授に感謝いたします。また、本報告を丁寧に査読頂き、助言を下さった、環境リスク領域の中園聡上席研究員、バイオテクノロジー領域の斎藤宏仁主任研究員に感謝いたします。

参考文献

- 1) N. Ohmura, S. J. Lackie, H. Saiki: *Analytical Chemistry*, 73, 3392-3399 (2001)
- 2) N. Ohmura, Y. Tsukidate, H. Shinozaki, S. J. Lackie, H. Saiki: *Analytical Chemistry*, 75, 104-110 (2003)
- 3) K. Sasaki, T. R. Glass, N. Ohmura: *Analytical Chemistry*, 77, 1933-1939 (2005)
- 4) 佐々木和裕, 俵田啓, 大村直也: 電力中央研究所報告 V08007 (2009)
- 5) K. Sasaki, S. Oguma, Y. Namiki, N. Ohmura: *Analytical Chemistry*, 81, 4005-4009 (2009)
- 6) 大村直也, Thomas R. Glass, 佐々木和裕, 城孝司, 妙見幸弘, 横堀尚之, 寺門真吾: *分析化学(Bunsekikagaku)*, 55, 519-523 (2006)
- 7) 佐々木和裕, 俵田啓, 奥山亮, 香山不二雄, 阿部薫, 奥畑博史, 丸山幸直, 荒金玉実, 宮坂均, 藤川敬, 大村直也: *分析化学(Bunsekikagaku)*, 56, 29-36 (2007)
- 8) H. J. Y. Sinclair S., G. Gauglitz: *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 54, 3-15 (1999)
- 9) M. A. Cooper: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 834-842 (2003)
- 10) S. T. Pathirana, J. Barbaree, B. A. Chin, M.G. Hartell, W. C. Neely, V. Vodyanoy,: *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 135-141 (2000)
- 11) J. E. Roederer, G. J. Bastiaans: *Analytical Chemistry*, 55, 2333-2336 (1983)
- 12) X. Cui, R. Pei, Z. Wang, F. Yang, Y. Ma, S. Dong, X. Yang: *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 59-67 (2003)
- 13) R. Maalouf, C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saïkali, O. Vittori, A. Errachid, J. P. Cloarec, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault: *Analytical Chemistry*, 79, 4879-4886 (2007)
- 14) D. C. Dufy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides: *Anal. Chem.*, 70, 4974-4984 (1998)
- 15) J. Gong, X. Hu, K. Wong, Z. Zheng, L. Yang, W. Lau, R. Du: *Advanced Materials*, 20, 2111-2115 (2008)
- 16) 板垣昌幸: 電気化学インピーダンス法, 丸善株式会社 (2008)

R **CRIEPI**



電力中央研究所報告

[不許複製]

編集・発行人

財団法人 電力中央研究所
環境科学研究所



千葉県我孫子市我孫子 1646
電話 04 (7182) 1181 (代)

e-mail esrl-rr-ml@criepi.denken.or.jp

発行所

財団法人 電力中央研究所
東京都千代田区大手町 1-6-1
電話 03 (3201) 6601 (代)

印刷所

株式会社 ユウワビジネス
東京都千代田区神田須田町 1-1
電話 03 (3258) 9380

ISBN978-4-7983-0549-3

