

総合論文

臨床検査のためのラテックス圧電素子イムノアッセイと
と圧電素子バイオセンサーの開発

邨次 誠*¹®, 黒澤 茂*^{2,3}, Hedayat O. GHOURCHIAN*⁴, 加茂 直樹*⁴

Development of latex piezoelectric immunoassay and piezoelectric
biosensor for laboratory tests

Makoto MURATSUGU*¹®, Shigeru KUROSAWA*^{2,3}, Hedayat O. GHOURCHIAN and Naoki KAMO*⁴

*¹ Osaka Prefectural College of Health Sciences, 3-7-30, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583

*² National Institute of Materials and Chemical Research, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

*³ National Institute for Advanced Interdisciplinary Research, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

*⁴ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo-shi, Hokkaido 060

(Received 17 July 1997, Accepted 20 October 1997)

We developed several acoustic-wave sensors for clinical tests. Piezoelectric quartz crystals (AT-cut, 9 MHz) were used as a sensor device. (1) A piezoelectric immunosensor for microalbumin with an anti-human albumin-immobilized crystal was sufficiently sensitive to monitor the levels of microalbumin in urine. This sensor does not require any radioisotope- or enzyme-labeled antibody, a second antibody, which is essential for ordinary immunoassay, like an immunoradiometric assay or an enzyme-linked immunosorbent assay. (2) Latex piezoelectric immunoassay (LPEIA) is a new immunoassay that requires no immobilization of an antigen or antibody on the crystals. LPEIA was used for the detection of the C-reactive protein (CRP), antistreptolysin O (ASO) and rheumatoid factor (RF), and is sufficiently sensitive for clinical applications. (3) Human collagen Type I-immobilized quartz crystals responded successfully to the adhesion of human platelets onto the crystals. The platelet adhesion sensor can monitor the adhesion of platelets without radioisotope labelling or a dye-staining method. These sensors are simple in operation and are cost-effective.

Keywords : acoustic wave sensor; piezoelectric immunosensor; latex piezoelectric immunoassay; piezoelectric sensor for platelet adhesion; clinical tests.

*¹ 大阪府立看護大学医療技術短期大学部: 583 大阪府羽曳野市はびきの 3-7-30

*² 工業技術院物質工学工業技術研究所: 305 茨城県つくば市東 1-1

*³ 併任, 産業技術融合領域研究所: 305 茨城県つくば市東 1-1

*⁴ 北海道大学薬学部: 060 北海道札幌市北区北 12 条 6 丁目

1 緒 言

近年, 種々の化学センサーが医療の分野, 特に臨床検査の分野での応用を目指して開発されてきている¹⁾化学センサーは, 二つの部分から構成されている. 一つは目的とする物質のみを認識する部分 (認識部位) であり, もう一つは認識したという情報を電気的な信号などに変

換する部位 (情報変換部位) である。認識部位に生体由来の物質を用いたセンサーはバイオセンサーと呼ばれている。認識部位に用いる生体由来物質としては、酵素、抗体、レクチン、ペプチド、オリゴヌクレオチドなどから細胞内器官、微生物、組織切片といったものまで利用されている。抗体や抗原を認識部位に用いて、抗原抗体反応を利用したバイオセンサーをイムノセンサーと呼んでいる。これらの生体由来物質を認識部位に用いる理由は、それぞれの分子あるいは分子集合体が、固有の反応特異性を持っているからである。従って、バイオセンサーを用いると、理想的には分析対象物を他のきょう雑物から分離することなく直接試料を分析することができる。情報変換部位には、膜電位、電極電位、圧電性、光学的特性の変化などを検出する系が利用されている。

圧電性の変化を利用したセンサーは、音響波センサー (acoustic wave sensor) と呼ばれている。これは音波の伝わる方向によって二つのタイプに分かれる。一つはバルク音響波センサー (bulk acoustic wave sensor, 略称: BAW センサー) で、もう一つは表面音響波センサー (surface acoustic wave sensor, 略称: SAW センサー) である²⁾。BAW センサーは、圧電素子面の法線方向へ音波が伝わるが、その面に物質が吸着などとすると、その周波数が変化することを利用したセンサーである。又、SAW センサーは、音波が圧電素子表面上を伝わるが、その表面への物質の吸着などによって、その周波数が変化することを利用したセンサーである。

BAW デバイスとして水晶振動子がある。Sauerbrey は³⁾、水晶振動子の表面に物質が付着したとき、質量変化 Δm と周波数変化 ΔF との間に次のような関係式を導いた。

$$\Delta F = -\frac{F^2 \Delta m}{NA\rho} \quad (1)$$

ここで、 F は基本周波数、 N は周波数定数、 A は電極の面積、 ρ は水晶の密度である。この式は物質が付着して、振動子上の質量が変化すると周波数が減少することを示している。これ以後、水晶振動子が分析化学の分野で利用されるようになり、ガスセンサーとしての応用が始まった⁴⁾。1980年、野村ら⁵⁾が水晶振動子は溶液中でも使用できることを報告して以来、臨床検査 (診断)、環境化学、発酵工学をはじめとしたいろいろな分野への応用が始まった。

近年、著者らも臨床検査の分野での利用を目的とした水晶振動子を用いたセンサーの開発を行ってきた^{6)~10)}。

① 糖尿病性じん (腎) 症では、早期にアルブミンが尿

Latex Agglutination Reaction

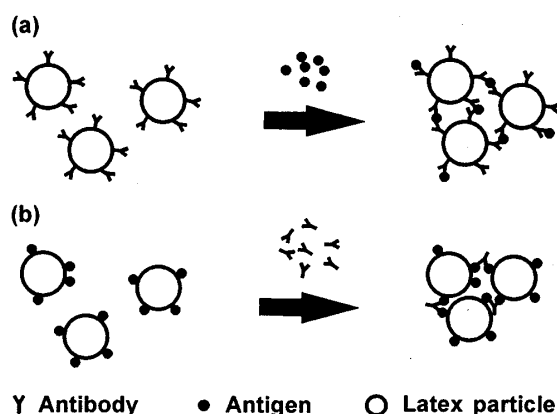


Fig. 1 Latex agglutination reaction upon addition of antigen to antibody-coated latex particles (a) and antibody to antigen-coated latex particles (b)

に微量に出現することが分かり、糖尿病性腎症の早期診断のために、微量アルブミンの測定が重要となっている¹¹⁾¹²⁾。血清中のアルブミンの定量には、色素結合法¹³⁾などが用いられるが、この方法では尿中の微量アルブミンの存在量は検出限界以下のため用いることができない。そこで一般には、ラジオイムノアッセイ^{14)~17)}や酵素免疫測定法¹⁸⁾¹⁹⁾が利用されている。水晶振動子を用いたセンサーは感度が非常に高いことが知られているので、抗アルブミン抗体結合水晶振動子を用いて、微量なアルブミンを検出するセンサーの開発を試みた⁶⁾。ここでは、このタイプのセンサーを圧電素子イムノセンサー (piezoelectric immunosensor) と呼ぶが、圧電素子バイオセンサー (piezoelectric biosensor) の一種である。

② 臨床検査の分野の測定法では、種々の抗原や抗体を検出するために、抗原抗体反応に基づいた凝集反応を利用することがある。そして感度を上げるためにラテックスなどの粒子に抗原や抗体を結合したものがよく用いられ、このラテックス粒子の凝集を検出している (Fig. 1)。現在では一般にこの凝集の程度を肉眼あるいは適当な光学的方法によって測定することが多い。著者らは世界で初めて、このラテックス凝集反応を水晶振動子でセンシングできることを発見し、この方法によるアッセイ法をラテックス圧電素子イムノアッセイ {latex piezoelectric immunoassay (LPEIA)} と名付けた。LPEIA法で、C反応性タンパク (CRP)⁷⁾、抗ストレプトリジンO抗体 (ASO)⁸⁾、リウマチ因子 (RF)⁹⁾のセンシングが可能であった。血清中のCRPの測定は、原則として特

定疾患の診断には利用されないが、急性期タンパクの一つとして、疾患の活動性、重症度、経過、予後などの指標としての有用性があり、日常的な検査として行われている²⁰⁾。ASOは溶血性連鎖球菌(溶連菌)のうちA群に属する溶連菌が産生する菌体外毒素であるストレプトリジンOに対する抗体である。従って、血清中のASOが高値であることはA群溶連菌の感染があったことを示しており、溶連菌感染の既往の証明のために日常的に行われている検査である²¹⁾。RFは慢性関節リウマチ患者血清中に高率に検出され、自己のIgGのFc部分と反応する自己抗体である。RFは慢性関節リウマチの診断に重要な検査項目となっている²²⁾。

③血小板の最も重要な機能の一つは止血である。この過程における初期の反応に血小板の粘着が関係しており²³⁾、血小板の粘着能を評価することは重要である。現在ではガラスビーズを充てんしたカラムに血液を通過させ、通過後の血小板の数を算定して、粘着率を見る方法などが臨床的に用いられている^{24)~26)}。一方、基礎研究においては、ラジオアイソトープ標識した血小板を用いたり、種々の基材に粘着した血小板数を染色後、光学顕微鏡下で算定する方法などが用いられている²⁷⁾²⁸⁾。著者らは血小板のコラーゲンへの粘着を検出するセンサー(コラーゲンを水晶振動子にコーティングした圧電素子バイオセンサー)の開発を試みた¹⁰⁾。

本論文では、著者らが開発した微量アルブミン、CRP、ASO、RFに対するセンサー及び血小板粘着能センサーの臨床検査の分野における意義について総合的に議論する。

2 実 験

2.1 アルブミンセンサー⁶⁾

Fig. 2のような水晶振動子(ATカット, 9 MHz)の片面に水晶の薄片をシリコン樹脂ではり付け、片面の電極のみが溶液に接するようにする。この処理で、溶液中での発振周波数を安定にすることができる(野村俊明教授からの私信)。この水晶振動子を片面封止水晶振動子、あるいは単に片面封止振動子と呼ぶことにする。なお、煩雑さを避けるため図には描かれていないが、振動子のリード線などはシリコン樹脂で覆うことにより、電極間は完全に絶縁されている。片面封止振動子の表面への抗ヒト血清アルブミン(HSA)抗体の結合は物理吸着法で行った。すなわち、片面封止振動子を 1.6 mg ml^{-1} の抗HSA抗体のPBS(phosphate-buffered saline)溶液に12時間浸した(4°C)。その後、片面封止振動子をPBSでよく洗浄し、ガラス製のフローセルに取り付け

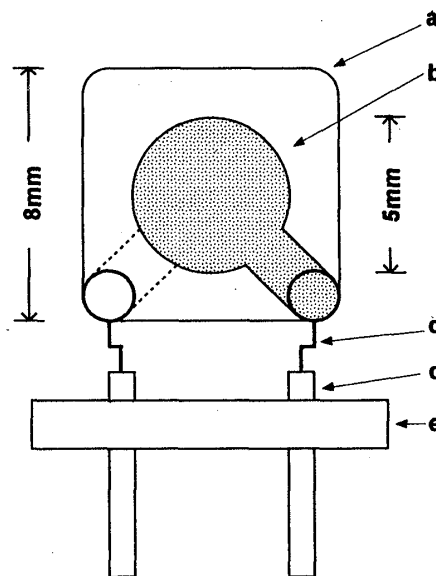


Fig. 2 Piezoelectric quartz crystal with silver or gold electrodes

Silver or gold are deposited on both sides of the quartz wafer. (a): quartz crystal; (b): electrode; (c), (d): conducting leads; (e): insulator

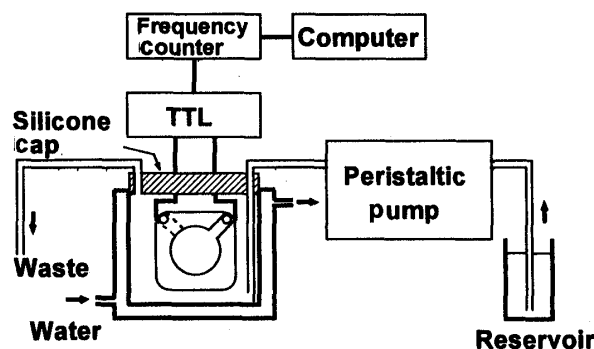


Fig. 3 Schematic diagram of experimental setup of piezoelectric immunosensor

Various solutions were applied to the one-side-sealed piezoelectric quartz crystal by a peristaltic pump. TTL: transistor-transistor logic circuit

発振回路に接続した。周波数は周波数カウンターで測定し、そのデータはパーソナルコンピュータに取り込み、測定終了後解析した。溶液の送液及び交換はペリスタポンプで行った。測定は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った (Fig. 3)。

2.2 LPEIA^{7)~9)}

測定システムは、アルブミンセンサーで用いたものと基本的に同じである。CRPの測定にはフロー型の測定セル (Fig. 4) を使用し、ASO及びRFの測定にはバ

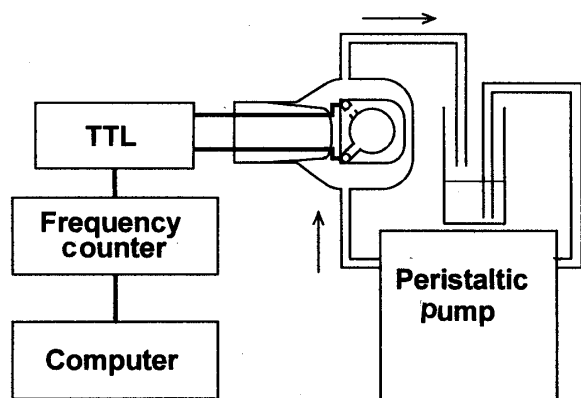


Fig. 4 Schematic diagram of experimental setup of the latex piezoelectric immunoassay (LPEIA) for C-reactive protein (CRP)

The latex suspension was circulated over the one-side-sealed piezoelectric quartz crystal by a peristaltic pump. TTL: transistor-transistor logic circuit

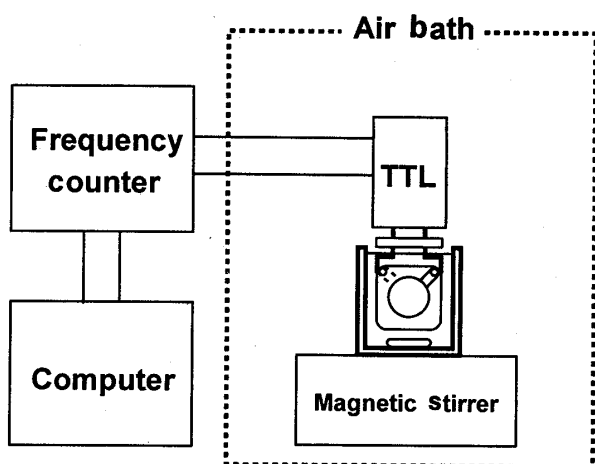


Fig. 5 Schematic diagram of experimental setup of the LPEIA for antistreptolysin O (ASO)

The one-side-sealed piezoelectric quartz crystal was immersed in the latex suspension which was stirred with a magnetic stirrer. The sample was applied with a micropipette. TTL: trapistor-transistor logic circuit

ッチ型 (それぞれ Fig. 5, 6) の測定セルを使用した。CRP 及び ASO の測定には片面封止振動子を用い、RF の測定には片面封止振動子を用いず、水晶振動子の片面のみに溶液が接するように次の工夫したセルに振動子を装着して用いた。すなわち、電極と同じ大きさの穴のあいたシリコンシートで振動子を挟み込みアクリルセルに固定した。

まず、抗体や抗原を結合したラテックス懸濁液に水晶

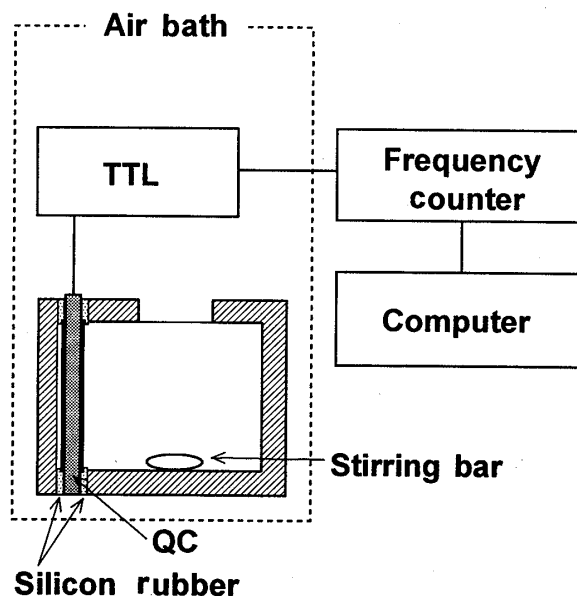


Fig. 6 Schematic diagram of experimental setup of the LPEIA for rheumatoid factor (RF)

Only one side of the piezoelectric quartz crystal (QC) was exposed to the latex suspension which was stirred with a magnetic stirrer. The sample was applied with a micropipette

振動子の片面のみが接するようにしておき、周波数が安定したところで、対応する抗原や抗体を含む試料を添加し、周波数変化を記録した。

抗 CRP 抗体、ストレプトリジン O、ヒトイムノグロブリン G (IgG) をそれぞれ結合した市販のラテックス粒子懸濁液を用いた。

2・3 血小板粘着能センサー¹⁰⁾

血小板の調製は、PRP (platelet-rich plasma) から Handa らの方法²⁹⁾を修正した方法で行った。調製の最後の段階で、血小板をアッセイ緩衝液 {150 mmol l⁻¹ NaCl, 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4), 5 mmol l⁻¹ グルコース, 2 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA), 40 ng ml⁻¹ プロスタグランジン E₁} に分散させた。調製はすべて 22°C で行った。

水晶振動子 (円形型, AT カット, 9 MHz) をヒト由来のコラーゲン Type I でコーティングした。振動子の片面に 50 μg ml⁻¹ コラーゲンの酢酸溶液を 0.1 ml 載せ、湿潤箱中で数時間放置した (22°C)。リン酸緩衝液で 3 回洗浄後、0.5% BSA のリン酸緩衝液に 3 時間浸ける (22°C)。リン酸緩衝液で 3 回洗浄後振動子を Fig. 7 のようなバッチ型セルに取り付け、周波数変化はネッ

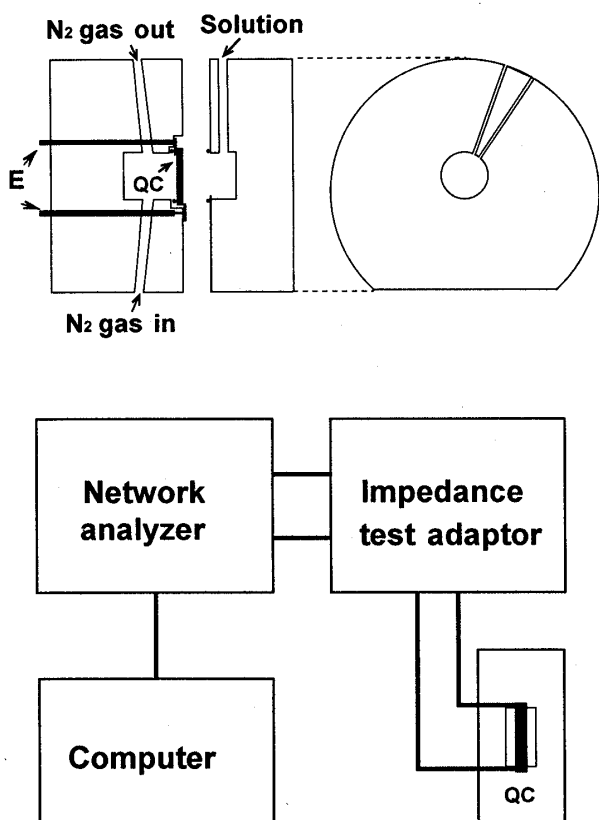


Fig. 7 Schematic diagram of the measurement cell incorporating the circular piezoelectric quartz crystal (QC, AT-cut, 9 MHz, diameter=1.37 cm) and electrode (E) connected to the network analysis system. Only one side of the piezoelectric quartz crystal (QC) was exposed to solution. The sample was applied with a Pasteur pipette.

トワークアナライザーで測定した (22°C) (Fig. 7).

3 結果と考察

最初に, 各センサーごとに結果を述べて考察し, 3・4項で総合的に議論する.

3・1 アルブミンセンサー⁶⁾

Fig. 8 は抗 HSA 抗体固定振動子に BSA あるいは HSA 溶液を流した場合の周波数変化の一例である. 前もって抗 HSA 抗体を固定した片面封止振動子を発振回路に取り付け, PBS 中で周波数が安定化するのを待つ. 一般のイムノアッセイで行われるように, タンパクの非特異的吸着を防ぐ (ブロッキング) ために BSA を流すと, 周波数は最初のレベルから減少した. PBS で洗浄してもこのレベルは変化しなかった. これらの結果は, BSA が振動子に吸着していることを示している. PBS

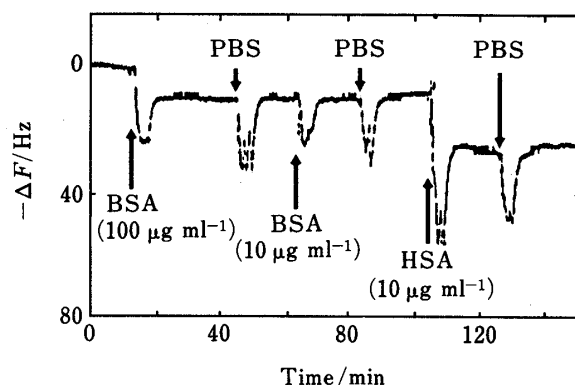


Fig. 8 Typical frequency changes on the addition of HSA or BSA to the crystal precoated with anti-HSA.

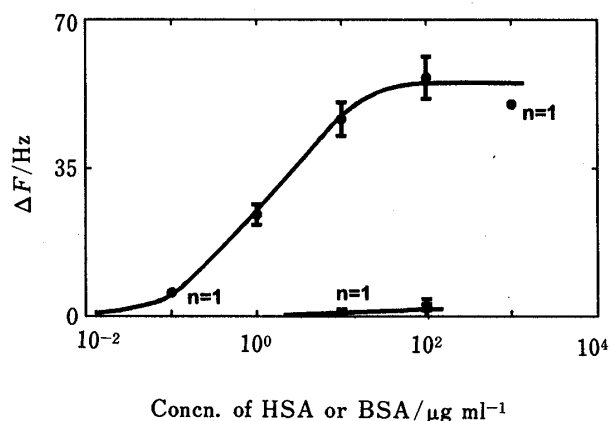


Fig. 9 Relationship between the concentration of HSA or BSA and frequency change (ΔF). ●: HSA; ■: BSA. The vertical bars designate the standard deviation for the mean of the experiments ($n=2$).

で洗浄後 BSA を再度流しても周波数の減少は認められなかった. これに対し, HSA を流すと周波数の減少が起こり, PBS で洗浄しても元のレベルには戻らなかった. これらのことから, HSA は振動子上の抗 HSA 抗体と抗原抗体反応により特異的に結合したと考えられる. なお, 周波数の測定は送液を止めた状態で測定している. 最初 BSA を流したとき, 一過性の周波数の大きな減少が見られるが, HSA や PBS のみでもこのような変化が生じていることから, 変化の原因は溶液交換時に溶液が不均一に混じりあっているため, そして溶液交換時はポンプを止めていないので流れの影響があるためと考えられる.

HSA や BSA の濃度を変えて振動子の応答を調べたところ Fig. 9 のような結果が得られた. Fig. 9 から明

Table 1 The theoretical and the experimental values of $|\Delta F/\Delta M|$

	$ \Delta F/\Delta M /$ $\text{Hz ng}^{-1} \text{cm}^{-2}$
Theoretical value	0.183
Anti-HSA ($n=15$)	0.375 ± 0.012
HSA ($n=10$)	0.716 ± 0.066

$P < 0.01$

らかなように、濃度が 0.1 から $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲で HSA を測定できることが分かった。尿中の HSA の正常濃度は $8.8 \pm 9.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ とされており³⁰⁾、このセンサーは尿中微量アルブミンの測定のために十分な感度を持っている。

次に、周波数変化と振動子上の抗 HSA 抗体及び HSA の結合量との関係を調べた (HSA は振動子上に吸着した抗 HSA 抗体との抗原抗体反応による結合量である)。結合量の評価はラジオアイソトープ標識したタンパク質を用いて行った。すなわち、抗 HSA 抗体及び HSA にクロラミン T 法³¹⁾で ^{125}I を標識した。標識タンパク質の濃度を変え、 1 cm^2 当たりの結合量 (ΔM) を求めた。この実験に並行して行った水晶振動子の実験からタンパク質の結合による周波数変化を求め、 1 cm^2 当たりの結合量に対してプロットすると、ほぼ直線関係が得られた。この傾きの絶対値を $|\Delta F/\Delta M|$ とした。ここで $\Delta M = \Delta m/A$ である。 $F=9 \text{ MHz}$ 、 $N=167 \text{ kHz cm}$ 、 $\rho=2.65 \text{ g cm}^{-3}$ 、 $A=0.196 \text{ cm}^2$ とすると Sauerbrey の式(1)は

$$\Delta F = -0.183 \Delta M \quad (2)$$

となる。Table 1 に式(2)から求められる理論値とともに実験値を示した。抗 HSA 抗体での $|\Delta F/\Delta M|$ の値は、理論値より約 2 倍大きく、HSA では約 4 倍大きかった。式(1)は、気相中では成立するが、液相中では必ずしも成立しないことが指摘されてきている³²⁾。すなわち、液相中での振動子の周波数変化は、界面におけるいろいろな因子、例えば表面の粗さ³³⁾³⁴⁾、界面における分子のすべり³⁴⁾³⁵⁾、親水性や疎水性³⁶⁾などや溶液の電気伝導度⁵⁾によって影響される。HSA は親水性タンパク質であるが、ここで使用した抗 HSA 抗体は IgG クラスで、親水性のドメインと疎水性のドメインが一分子中に存在することが知られている³⁷⁾。抗 HSA 抗体のみが結合している場合と、HSA が抗原抗体反応で結合した場合とで $|\Delta F/\Delta M|$ の値が異なることは、界面におけ

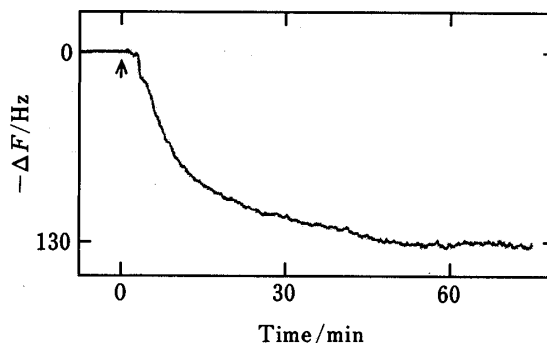


Fig. 10 Typical data showing frequency decrease when CRP to a final concentration of $56 \mu\text{g dl}^{-1}$ was added

る疎水性/親水性の効果との関連を示唆している。

3.2 LPEIA

3.1 項で述べたアルブミンセンサーのような圧電素子イムノセンサーでは、検出対象物質に対する抗体を振動子へ固定化しなければならない。抗体や抗原が結合したラテックス粒子の凝集反応に水晶振動子が応答すれば、振動子への抗体や抗原の固定化の操作を省くことができる。

3.2.1 CRP⁷⁾ 片面封止振動子を装着したフローセル (Fig. 4) 内に、抗 CRP 抗体結合ラテックス懸濁液 ($5.56 \times 10^{-3}\%$, 9 ml) を循環させる (5.7 ml min^{-1})。周波数が安定してから、CRP 標準液を 0.1 ml 添加する (添加直後の濃度は $56 \mu\text{g l}^{-1}$) と周波数が減少した (Fig. 10)。CRP 添加後約 1 時間で一定となった。9 個の片面封止振動子について上述と同じ実験を行ったところ、周波数の変化の平均値は 105 Hz で、標準偏差 (SD) は 20 Hz 、相対標準偏差 (RSD) は 19.3% であった。このばらつきは、片面を封止する操作が振動子ごとに異なっているためと考えられた。そこで、Kanazawa ら³⁸⁾³⁹⁾ 及び Bruckenstein ら⁴⁰⁾ が独立に導いた式

$$\Delta F = -K\sqrt{\rho\eta} \quad (3)$$

に基づいて、実験的に感度係数 K を求めた。ここで、 ρ は溶液の密度、 η は溶液の粘度である。すなわち、5 あるいは 10% のシヨ糖溶液での周波数変化から K を定めた (K 値の RSD は 5.7% ($n=10$))。CRP による振動子の応答を $-\Delta F/K$ で表現することにより、RSD が 9.3% と小さくすることができた。この $-\Delta F/K$ と CRP 濃度の関係を Fig. 11 に示した。CRP 標準血清の代わ

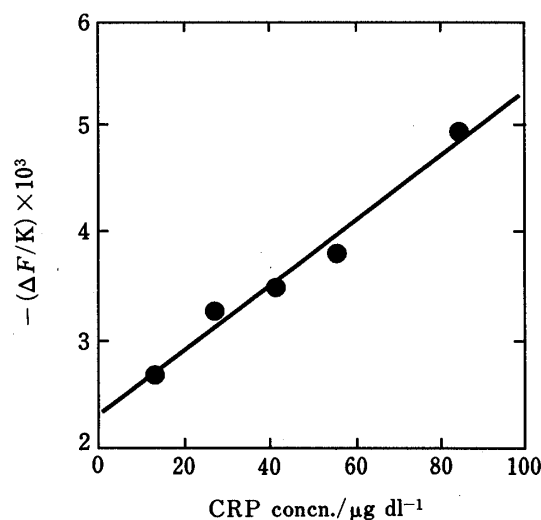


Fig. 11 Calibration curve for determination of CRP

りに正常血清 (CRP を含んでいない) を 0.1 ml 添加した場合の周波数の変化は, たかだか 20 Hz 程度であった. これは血清中の物質が振動子に吸着したためと考えられる. この結果と, ここで用いた抗 CRP 抗体結合ラテックス粒子が CRP により凝集することを考慮すると, CRP 添加による周波数の変化が, CRP による抗 CRP 抗体結合ラテックス粒子の凝集と関連していると考えられる. Fig. 12 は 90 μl の血清を使った本 LPEIA 法では 10~100 μg dl⁻¹ の範囲で測定可能であることを示している. なお, Fig. 11 において検量線が原点を通らないのは, 血清中の CRP 以外の物質が非特異的に振動子に吸着していることを示している. 成人健常者でのカットオフ値はおよそ 300 μg dl⁻¹ (ラテックス免疫定量法) とされており²⁰⁾, 本 LPEIA 法は臨床検査の分野で十分使用できる感度を持っていた. このことは, 上述したようなごくわずかな非特異吸着があっても実際の使用目的には影響がないことを示している. CRP の測定系では, 測定セルがフロー型であるために液量が多量に必要であること, 測定時間が長いという欠点があった. そこでこれらの欠点を改善を考慮して次のセンサーを開発した.

3・2・2 ASO⁸⁾ 片面封止振動子を Fig. 5 のようなバッチ型セルに装着し, ストレプトリジン O 結合ラテックス懸濁液を加え, 周波数を測定する. このセルでは溶液量を 1.2 ml にすることができた. この容量は CRP の測定に用いたフローセル型での液量の約 1/8 であった. 片面封止振動子を使用しているため, 周波数の変化は $-\Delta F/K$ で表すことにする. $-\Delta F/K$ が安定になってから, ASO を含む血清を添加すると $\Delta F/K$ が減少

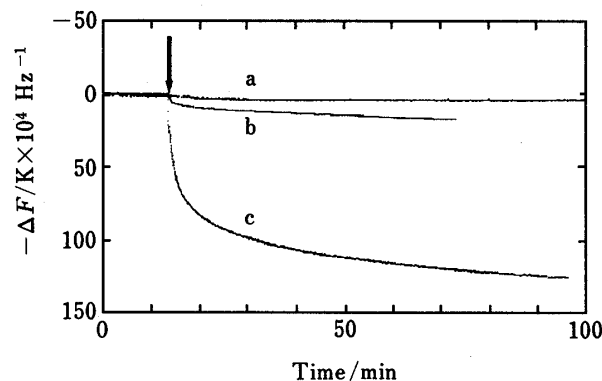


Fig. 12 Typical frequency changes on the addition of serum to latex suspension

a: addition of CRP serum (5.3 mg dl⁻¹) to streptolysin O-latex; b: addition of ASO serum (1040 IU ml⁻¹) to anti CRP-latex; c: addition of ASO serum (1040 IU ml⁻¹) to streptolysin O-latex. Each serum (0.02 ml) was added to 1.2 ml of each latex suspension at the arrow

した (Fig. 12). 一方, ASO は含まないで CRP を含む血清を添加した場合は Fig. 12 の (a) のようにほとんど $-\Delta F/K$ は変化しなかった. 又, 抗 CRP 結合ラテックス懸濁液に CRP を含まないが ASO を含む血清を添加した場合は Fig. 12 の (b) のように $-\Delta F/K$ の変化はごくわずかであった. これらの結果は, ASO 添加によりストレプトリジン O 結合ラテックス粒子が凝集した結果として周波数が変化したことを示していた. ASO 添加後の周波数変化の初期過程を更に解析した. データをコンボリューション法⁴¹⁾によってスムージングするとともに各測定点の微係数を求め, その時間変化をプロットした (Fig. 13). その結果, この初期過程は二つの変化からなることが分かった. 最初の速い変化は, 血清タンパク質のラテックス粒子への吸着と考えられ, それに続く遅い変化がラテックス凝集に伴う変化と考えることができた. そこで, この遅い変化のこう配を初速度 $V = \{(-\Delta F/K)/\text{time}\}$ と定義した. V と ASO の濃度関係は, ASO が 130 から 1040 IU ml⁻¹ の間で直線関係であった (Fig. 14). このように V を測定することにより測定時間を短縮することができた (2~3 分). ASO が陰性及び陽性の血清 ($n=24$) を LPEIA 法で測定した値と, 臨床検査で用いられている方法 (比濁法) で測定した値を比較した (Fig. 15). その結果, 相関係数は 0.950 ($P < 0.01$) で従来法とよく相関していた. 本 LPEIA 法の測定限界は 130 IU ml⁻¹ であった. ASO のカットオフ値 (ラテックス免疫定量法) は成人で 160, 小児で 250 IU ml⁻¹ である²¹⁾ので, 本 LPEIA 法

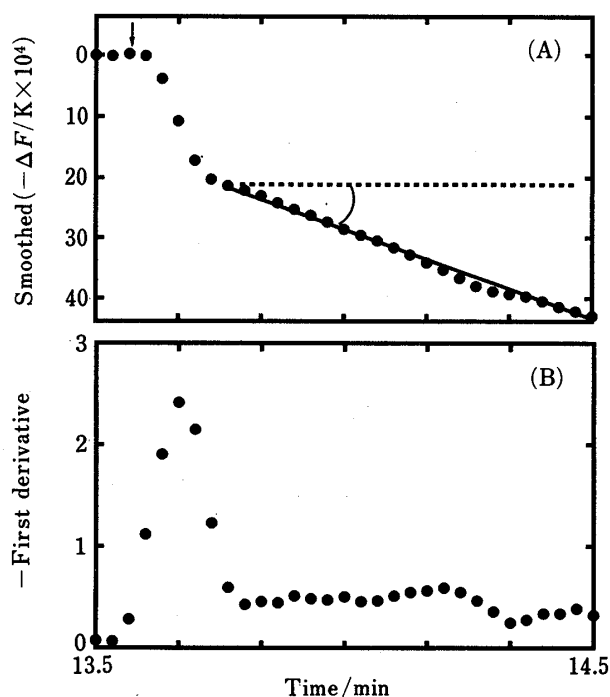


Fig. 13 Determination of the initial rate of frequency change

(A) Smoothing of a part of the data of the trace c in Fig. 12. The arrow indicates the addition of serum to the latex suspension. The slope of the exhibited line is an initial rate (V). (B) First derivatives of the smoothed data in (A)

は感度の点でも臨床検査の目的に十分である。

3・2・3 RF⁹⁾ CRP 及び ASO の検出には片面封止振動子を用いた。この方法は振動子の片面のみを溶液に接するための方法としては基本的には簡便である。又、片面封止振動子はどのような形状の測定セルにも使用できる (例えば Fig. 3~5) という利点がある。しかし、現在の封止技術は実験者の熟練度に依存している。すなわち、出来上がった個々の片面封止振動子の応答性が若干異なっている。前述したように、この問題を避けるために著者らは感度係数を導入した。片面封止振動子の個体差の問題を避けることと、更に測定液量が少量で済むように測定セルを改良し、RF に対するセンサーを開発した。Fig. 6 のように測定セルを改良した (2・2 項参照)。このセルを用いることにより、測定に必要な液量を 0.4 ml にすることができた。ASO で用いたセルでの必要液量の 1/3 であり、CRP でのフローセルの必要液量の実に約 1/23 となっている。このバッチ型のセルは必要に応じて液量 0.1 ml でも測定が可能である。このセルで測定した例を Fig. 16 に示す。緩衝液中での周

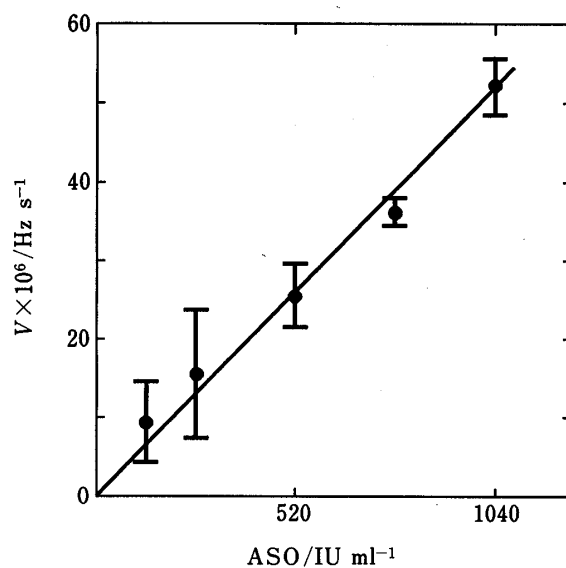


Fig. 14 Calibration curve for determination of ASO

V represents the initial rate of the frequency change. The vertical bars designate the standard deviation for the mean of the experiments ($n=2\sim 5$)

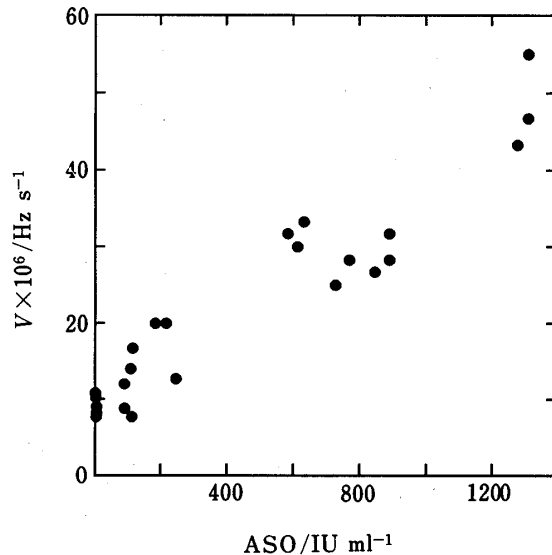


Fig. 15 Correlation of V with ASO values measured with the turbidimetry

The correlation coefficient (r) was 0.950 ($P < 0.01$, $n=24$)

波数が安定になってから RF 陽性血清を添加した。センサーシステムを構築するとき、センサーが再利用可能かという問題も重要である。もし、以下に述べるような処

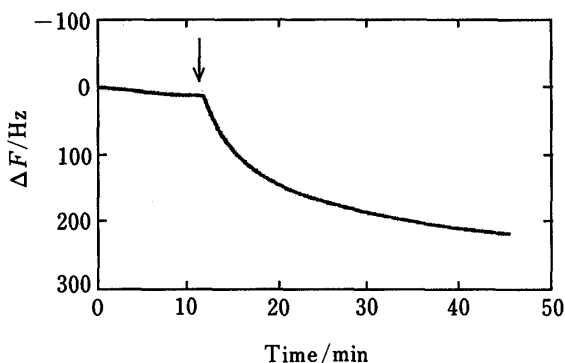


Fig. 16 Typical frequency change on the addition of RF to latex suspension

Ten microliters of latex solution ($2.5 \mu\text{g l}^{-1}$) was added to 360 μl of buffer solution. After frequency stabilization, 12 μl of rheumatoid factor (72 IU ml^{-1}) was added to the buffer solution. The arrow shows the addition moment of the RF in the solution

理を行わないとアッセイ後再利用したときの振動子の応答は40ないし50%減少していた。アッセイの終了ごとに振動子を純水で洗い、続いてエタノールで洗浄した。次に約 200°C で5分間加熱し、室温で冷却した。室温で一晩放置後、使用前に再度5分間加熱した。6個の振動子を使って、アッセイを行うごとに加熱処理を行った。それぞれの振動子について6回繰り返したときの周波数変化のSDは $85\sim 187 \text{ Hz}$ であった。そこで、RSDを求めると $0.00095\sim 0.0021\%$ となり、繰り返し測定による周波数の変動は振動子の基本周波数(9 MHz)に比べ無視できるものであった。この結果から、加熱処理により振動子の再利用が可能であることが分かった。これは、加熱処理により吸着した生体物質やラテックス粒子(3・2・4項参照)などが除去されていることを示している。このような加熱処理を行った振動子を使ってRF測定のための検量線を求めるとFig. 17のようになった。四つの異なる振動子を用いてもその周波数変化はほぼ同じであり、この処理により再現性が非常にようになった。 5 IU ml^{-1} 以下でも測定可能であった。現在最も感度が高いとされているラテックス免疫比濁法でのカットオフ値はおよそ 6.0 IU ml^{-1} であり、本LPEIA法は十分な感度を持った測定法である。LPEIA法は圧電素子イムノセンサーと異なり、振動子表面への抗原や抗体の固定化を要しないアッセイ法で、今後臨床検査の領域での利用が期待される。

3・2・4 LPEIAにおける周波数変化の機構⁴²⁾ 周波数の変化は、古くから質量変化あるいは粘度や密度の変化によると考えられてきたが、近年では3・1項でも

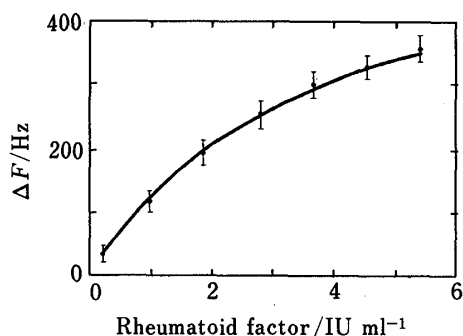


Fig. 17 Calibration curve for determination of RF
Vertical bars stand for the standard deviation ($n=4$)

述べたように界面でのいろいろな因子や液相の電気伝導度の影響を考えなければならないことが指摘されてきている^{5)32)~36)}。ここでは、著者らが開発したLPEIAにおける周波数変化の機構について議論する。振動子(金電極)の表面を、水及びエタノールによる処理、低温プラズマによる処理、酸による処理などを行ってから、RFに対するLPEIAの応答を調べた。その結果、応答の大きさは、プラズマ処理、水-エタノール処理、酸処理の順であった。酸処理ではほとんど応答がなかった。しかし、これは振動子自身が応答しなくなったわけではない。これらの結果は、LPEIAの応答に振動子の表面の状態が大きく関与していることを示唆していた。次に振動子の金電極表面をドデカンチオールの単分子層でコーティングした。この表面は疎水的である。更にこの単分子層の上にデシルアミン、ドデカン酸、1-デカノール、1-デカノールを重層して、表面を親水性にした。これらの振動子を用いてRFのLPEIAの応答を調べると、親水性処理をしたほうがより大きな応答が得られた。振動子の金電極表面にスパッタリング法により酸化シリコンの皮膜を蒸着した。この皮膜は親水性であるが大きな応答は得られなかった。このオキシドに γ -N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピル-トリメトキシシランを反応させ、アミノ基を表面に導入すると大きな応答が得られた。又、アミノ基表面をグルタルアルデヒドで処理しても応答は処理前に比べてそれほど減少しなかった。ポリエチレンイミンで振動子をコーティングしたが、大きな応答は得られなかった。この表面をグルタルアルデヒド処理すると大きな応答が得られた。以上の結果から、LPEIAの応答には振動子の表面の状態が重要であることが分かる。もし、ラテックス懸濁液の粘度や密度がラテックスの凝集によって変化しているならば、表面

の状態を変えた振動子で粘度・密度を変えると応答に差がでるはずである。そこで、LPEIA の応答の大きなものと小さな表面構造の振動子を選び、ショ糖で溶液の粘度・密度を変えて実験したところ、粘度・密度に対する振動子の応答は表面修飾に依存しなかった。一方、ラテックス懸濁液を添加後、周波数が安定 (432 Hz) してから静かにアスピレーターでラテックス懸濁液を吸い出し、緩衝液のみを入れたところ、106 Hz だけ周波数が上昇した。更に最初と同じ濃度になるようにラテックスを添加すると、周波数は元の値に戻った。このことはラテックス粒子が振動子表面に吸着していることを示している。以上の結果から、LPEIA での周波数の変化にはラテックス粒子の振動子表面への吸着が重要であることが分かった。

3・3 血小板粘着能センサー¹⁰⁾

水晶振動子を用いて血小板の粘着能を検出するセンサーを開発した。

Fig. 18 に示したようにアッセイ緩衝液中のコラーゲン結合振動子の周波数が安定になってから、血小板の懸濁液を注入すると、周波数が増加する方向へ一過性に大きく振れた後、徐々に減少し一定になる。再度アッセイ緩衝液に置き換えると、同じような一過性の周波数の変化が起こった後、一定値を示した。一方、BSA のみを吸着させた振動子を用いた場合は、血小板懸濁液を注入すると、コラーゲン結合振動子の場合と同じように一過性の大きな変化が起こったが、周波数の減少はごくわずかであった。アッセイ緩衝液で洗浄すると、やはり一過性的な変化は認められるもののほぼ洗浄前のレベルに戻り一定となった。これらの結果は、明らかに血小板が特異的にコラーゲン Type I に結合していることを示している。又、一過性的な変化は対照実験でも観察されることから、血小板の粘着に関係したものではないと思われる。

血小板とコラーゲン Type I の結合機構は、分子レベルで明らかにされてきている^{23)43)~46)}。すなわち、血小板の膜上の糖タンパク質である GpIa-GpIIa ($\alpha_2\beta_1$ -インテグリン) が、コラーゲン Type I のアミノ酸配列のうち -Asp-Gly-Glu-Ala- の部分に Mg^{2+} 存在下で結合する。そこでアッセイ緩衝液に EDTA を添加して同じ実験を行うと、周波数の有意な減少は見られなかった (Table 2)。更に、アッセイ緩衝液から Mg^{2+} を除いてもやはり周波数の有意な減少は見られなかった (Table 2)。これらの結果は、血小板がコラーゲンに特異的に結合した結果として周波数が変化したという上述の考え方を支持している。なお、BSA コーティング振動子の場

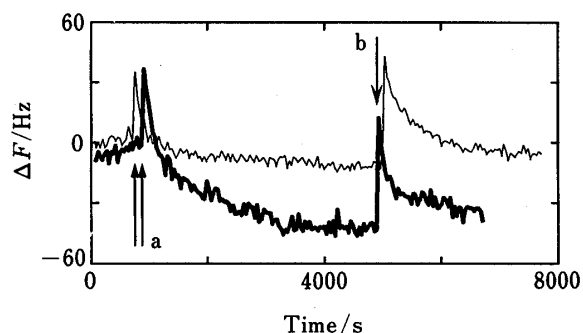


Fig. 18 Changes in frequency for platelet adhesion to collagen attached to a quartz crystal

Bold and fine solid lines represent results for collagen and BSA-treated devices, respectively. Arrows designate replacement of liquid by platelet suspension (a) or assay buffer (b)

合にも小さな周波数の減少が見られる (Table 2) が、これは血小板の非特異吸着と考えられる。なぜなら、従来から用いられている ^{51}Cr 標識法でも、BSA への血小板の非特異吸着が観測されているし、どちらの実験条件下でも血小板以外の血液細胞や試料由来の血清タンパク質は含まれていないからである。

このセンサーの実験と同じ条件下で、 ^{51}Cr で標識した血小板は水晶振動子上のコラーゲンに接着したが、BSA コーティングした水晶振動子には有意に接着しなかった。又、血小板 1 個の湿重量を求めると 16 ± 1.4 ($n=4$) pg であった。血小板の接着による周波数の変化が Sauerbrey の式に従うとして、上で求めた湿重量を用いて周波数変化を求めると、本実験条件下では約 9000 Hz になるはずである。この値は今回の実験結果の約 200 倍以上大きかった。この結果は、Gryte ら⁴⁷⁾ がアフリカ緑ザルの腎臓由来の細胞の水晶振動子への接着による周波数の変化が、Sauerbrey の式から得られる変化より 200 から 400 倍小さいと報告した結果と矛盾していない。血小板などの細胞はアルブミンのような単純な分子ではなく、複雑な分子集合体であるので、周波数変化の原因を述べることは現段階では困難である。もし、原形質が水のように作用すると仮定するならば、水中では主に生体膜が周波数変化に寄与することになる。当然、血小板の乾燥重量は湿重量より小さく、やはり血小板での周波数変化を質量のみの負荷で説明することはできない。つまり、血小板やある種の細胞ではそれらが水晶振動子に付着しても、Sauerbrey の式に従うような応答が起こらず、周波数変化は質量のみに依存しているのではなく、その他の因子を考慮しなければならないことを示

Table 2 Summary of changes in series resonant frequency for adhesion of platelets to collagen and BSA-coated surfaces

Surface ^{a)}	Solution condition ^{b)}	Frequency (± 2 Hz) ^{c)}	
		Platelet-suspension	Assay buffer
Col	AB	43	35
BSA	AB	13	6
Col	AB	45	43
BSA	AB	11	7
Col	AB+EDTA	8	4
Col	AB-Mg ²⁺	16	11

a) Col: collagen Type 1; BSA: bovine serum albumin. b) AB: assay buffer; AB + EDTA and AB-Mg²⁺: mean AB containing 2 mmol l⁻¹ EDTA and assay buffer without the usual 2 mmol l⁻¹ Mg²⁺, respectively. c) Standard deviation represents values measured for a large number of points on a frequency plateau.

峻している。

3・4 総括

臨床検査は、疾患の診断をはじめとし、その原因、程度、進行度などを明らかにするために必須の手段である。臨床検査は、生理学的検査と非生理学的検査に大別することができるが、非生理学的検査とは、血液、血清、尿、組織などを対象とした検査で、いわゆる検体検査と呼ばれているものである。ここでは、この検体検査のみを臨床検査と呼ぶことにする。臨床検査で使用される検査法は、迅速で、操作が簡便、感度や再現性がよく、そして経済性が高いことが望ましい。血液、血清、尿についての検査は日常頻繁に行われる検査であり、その検査項目は非常に多くの種類がある。例えば血清一つをとっても、その中に多種類のタンパク質、糖質、脂質や電解質などが含まれている。このように多成分が含まれた試料の中で、ある成分のみを分析対象とするときその成分を他の成分から分離することなく検出できることが望ましい。緒言で述べたことから分かるように、バイオセンサーは原理的にこの特徴を備えているので、検査の対象となっている成分に対するバイオセンサーを開発する意義がここにある。

著者らは水晶振動子を利用したバイオセンサー（圧電素子バイオセンサー）により、尿中微量アルブミン程度のアルブミン濃度の検出が可能であることを示した。このセンサーは水晶振動子表面に抗アルブミン抗体をコー

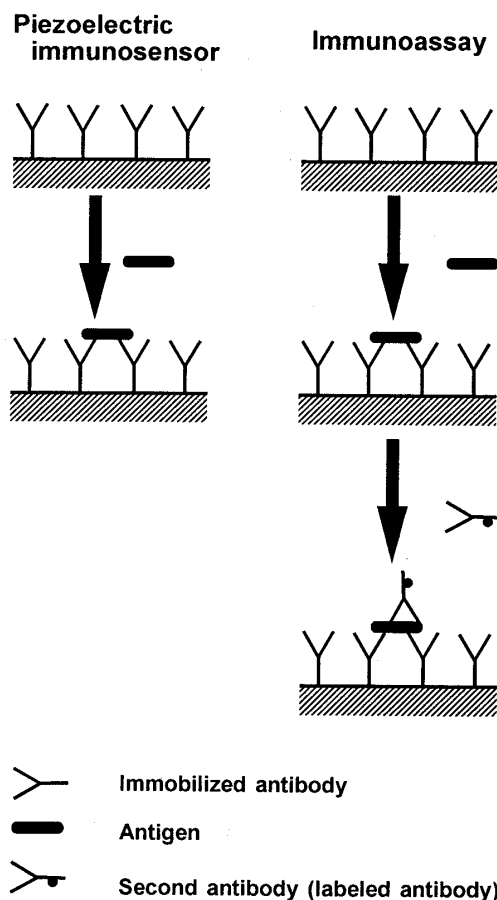


Fig. 19 Concept of piezoelectric immunosensor and immunoassay

Ordinary immunoassay requires the second antibody labeled with radioisotope or enzyme and the piezoelectric immunosensor does not

ティングしたイムノセンサーの一つである。ラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法では、ラジオアイソトープや酵素を抗体に標識したものを、第2抗体として使用しなければならない (Fig. 19)。一方、圧電素子イムノセンサーでは、Fig. 19に示したようにこの標識第2抗体を必要としない。このことは、測定操作が簡便になり、迅速な測定が行えることを意味している。更に、高価な標識抗体を使う必要がなく経済的であり、臨床検査で有用なバイオセンサーである。しかし、第1抗体を振動子表面上に固定化しなければならないという煩雑さがある。もし、このような操作を省略することができれば更に便利であろう。

次に、臨床検査でよく利用されているラテックス凝集反応を直接水晶振動子のみ（振動子表面に特別な認識部位がない）で検出できないかを検討し、CRP, ASO や RF が従来法と比較して少なくとも同程度の検出限界で

Table 3 Commercially available immunological latex reagents

Molecule immobilized on latex	Target/Aim
Anti-C-reactive protein (CRP)	Detection of CRP in serum
Streptolysin O	Detection of antistreptolysin O (ASO) in serum
Human immunoglobulin	Detection of rheumatoid factor (RF) in serum
Anti-human immunodeficiency virus (HIV)	Detection of AIDS virus in serum
Anti-hepatitis B surface antigen (HBs)	Detection of HBs virus in serum
Anti-ferritin	Detection of ferritin in serum
Anti-growth hormone (hGH)	Detection of hGH in serum
Anti-human chorionic gonadotropin	Detection of hCG in urine/pregnancy diagnosis
Anti-estrogen	Detection of estrogen in serum
Anti-fibrinogen	Detection of fibrin and fibrinogen degradation product (FDP)
Anti- β_2 -microglobulin	Detection of β_2 -microglobulin/kidney dysfunction
Anti-human serum albumin (HSA)	Detection of HSA in urine/kidney dysfunction
Anti- α -fetoprotein (AFP)	Detection of AFP/cancer diagnosis
Anti-human IgE	Allergic contact dermatitis inspection

検出可能であることが分かった。このアッセイ法を LPEIA 法と呼ぶことにした。又、測定セルを検討することにより、測定液量を 0.1 ml でも測定することが可能であった。このことは血清などの試料が少量で良いことを示している。臨床検査の分野では、検体量が少量ですむということは重要な問題である。例えば、測定に使う血清量が少量でよければ採血量が少なくて済み、患者（特に小児の場合には、元々大量に採血することが不可能）に与える苦痛を和らげることができる。更に測定に要する時間は 2~3 分で、迅速を要する臨床検査において有用と思われる。LPEIA 法では、前述したように水晶振動子にもって抗体などを結合しておく必要がないことが大きな特徴である。又、Table 3 に示したように抗体や抗原を結合したラテックス粒子の多くが市販されており⁴⁸⁾、これらの検査項目には LPEIA 法を適用できると考えられる。更にラテックス凝集反応は、古くから用いられている⁴⁹⁾ことから分かるように、ラテックス粒子への抗原・抗体の結合法はほぼ確立されているので、新規の抗原や抗体をラテックス粒子へ結合するのは容易と考えられる。

ラテックス凝集反応が水晶振動子で検出可能であることが分かったので、血小板の凝集能（臨床検査項目）の検出にも応用できると考えたが、この凝集が起こる前に血小板は水晶振動子に接着（粘着）するはずである。又、血小板の粘着能も重要な検査項目であるので、水晶振動子にコーティングされたコラーゲンへの粘着能の検出を検討した。その結果、選択的に血小板のコラーゲンへの接着を検出できた。このセンサーを血小板粘着能センサーと呼ぶが、圧電素子バイオセンサーに分類される

ものである。血小板の粘着能は、ある基材に付着した血小板の数を数えるという、いわば肉眼的な方法で以前から行われてきた。著者らが開発した血小板粘着能センサーはプロトタイプではあるが、より客観的に定量的な粘着能の評価が可能であること示している。又、センサーを用いる最大の利点は、リアルタイムに応答の変化を追跡できることである。試料などの添加時に生じた大きな周波数変化 (Fig. 18) を除去するために測定セルを改良すれば、血小板粘着能センサーで血小板の粘着過程を追跡できると考えられ、基礎研究においても利用できると思われる。3.3 項でも述べたが、血小板をラジオアイソトープで標識する必要がないことも大きな利点である。血小板粘着能センサーは、生きた細胞などの機能の評価に利用できる音響波センサーの新しい試みである。

以上著者らは、アルブミンセンサー、血小板粘着能センサー及び LPEIA 法を開発した。前者二つは、前述したように圧電素子バイオセンサーであるが、後者の LPEIA 法では前もって認識部位を構築する必要がなく、前者二つに比べて取り扱いが非常に簡単である。しかし、圧電素子バイオセンサーでは LPEIA 法（ラテックス粒子の懸濁液に試料を添加する）に比べてフロータイプのシステムを組みやすいといった利点がある。すなわち、臨床検査においていずれの方法が有用であるかを比較することはできず、測定対象や目的に応じて使い分けが必要と思われる。しかし、水晶振動子をセンサーのデバイスとして用いると、測定システムは非常に簡単で、従来から臨床検査で用いられてきた複雑で高価な光学システムを用いる必要がないし、デバイス自身も

低価格であることから, 経済的なメリットが大きいと考えられる。

臨床検査で対象となる試料の多くは液相である。アルブミンセンサーの実験結果(3・1項)からも明らかのように, 液相中での周波数変化は Sauerbrey の式に従わないことが多く, 界面での種々の因子の効果を検討しなくてはならない^{32)~36)}。又, 溶液中の電気伝導度も影響することが知られているが⁵⁾, 本研究での測定溶液はいずれも塩濃度が高く試料添加による電気伝導度の変化は無視することができる。Thompson らはある種のペプチドと RNA の相互作用において, 周波数が増える方向に変化する現象を見いだしている(投稿中)。このように周波数の変化の機構はまだ議論の余地が残されているが, 水晶振動子を用いたセンサーは, 本論文でも述べたように従来のアッセイ法にはない幾つかの特徴を持っており, その長所を生かすことにより, 今後も臨床検査の分野で有用なセンサーが考案され, 実用化の研究も行われることが期待される。

アルブミンセンサーに関する研究は, 日立化成研究所の太田文彦博士との共同研究であり, 血小板粘着能センサーに関する研究は, トロント大学(カナダ)の M. Thompson 教授との共同研究(大阪府在外研究費による)であり, 深謝いたします。

文 献

- 1) C. L. Morgan, D. J. Newman, C. P. Price: *Clin. Chem.*, **42**, 193 (1996).
- 2) G. J. Bastiaans: "Chemical Sensors", Edited by T. E. Edmonds, p. 295 (1987), (Chapman and Hall, New York).
- 3) G. Sauerbrey: *Z. Physik*, **155**, 206 (1959).
- 4) W. H. King, Jr.: *Anal. Chem.*, **36**, 1735 (1964).
- 5) 野村俊明, 嶺村昭子: 日本化学会誌, **1980**, 1621.
- 6) M. Muratsugu, F. Ohta, Y. Miya, T. Hosokawa, S. Kurosawa, N. Kamo, H. Ikeda: *Anal. Chem.*, **65**, 2933 (1993).
- 7) S. Kurosawa, E. Tawara, N. Kamo, F. Ohta, T. Hosokawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1117 (1990).
- 8) M. Muratsugu, S. Kurosawa, N. Kamo: *Anal. Chem.*, **64**, 2483 (1992).
- 9) H. O. Ghourchian, N. Kamo, T. Hosokawa, T. Akitaya: *Talanta*, **41**, 401 (1994).
- 10) M. Muratsugu, A.D. Romaschin, M. Thompson: *Anal. Chim. Acta*, **342**, 23 (1997).
- 11) D. W. Miles, C. E. Mogensen, H. J. G. Gundersen: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **26**, 5 (1970).
- 12) C. E. Mogensen: *N. Eng. J. Med.*, **310**, 356 (1984).
- 13) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 14) H. Keen, C. Chlouverakis: *Lancet* *ii*, 913 (1963).
- 15) J. Woo, M. Floyd, D. C. Cannon, B. Kahan: *Clin. Chem.*, **24**, 1464 (1978).
- 16) G. C. Viberti, R. D. Hill, R. J. Jarrett, A. Argypoulos, U. Mahmud, H. Keen: *Lancet*, 1430 (1982).
- 17) M. Gaizutis, A. J. Pesce, J. E. Lewy: *Microchem. J.*, **17**, 327 (1972).
- 18) B. A. Fielding, D. A. Price, C. A. Houlton: *Clin. Chem.*, **29**, 355 (1983).
- 19) B. Feldt-Rasmussen, B. Dinesen, M. Deckert: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **45**, 539 (1985).
- 20) 大谷英樹: 日本臨床, **53** (増刊), 233 (1995).
- 21) 加野象次郎: 日本臨床, **53** (増刊), 121 (1995).
- 22) 吉野谷定美: 日本臨床, **53** (増刊), 422 (1995).
- 23) J. Roskam: "Biochemistry of blood platelets", Edited by E. Kowalski, S. Niewiarowski, p.3 (1967), (Academic Press, London).
- 24) E. W. Salzman: *J. Lab. Clin. Med.*, **62**, 724 (1963).
- 25) J. R. O'Brien, J. B. Heywood: *J. Clin. Pathol.*, **20**, 56 (1967).
- 26) M. B. Zucker, J. McPherson: *Ana. N.Y. Acad. Sci.*, **283**, 128 (1977).
- 27) T. J. Kunicki, D. J. Nugent, S. J. Staats, R. P. Orckowski, E. A. Wayner, W. G. Carter: *J. Biol. Chem.*, **263**, 4516 (1988).
- 28) E. U. M. Saelman, H. K. Nieuwenhuis, K. M. Hese, P. G. de Groot, H. F. G. Heijnen, E. H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H. R. Gralnick, J. J. Sixma: *Blood*, **83**, 1244 (1994).
- 29) M. Handa, K. Watanabe, Y. Kawai, T. Kamata, T. Koyama, H. Nagai, Y. Ikeda: *Thromb. Haemost.*, **73**, 521 (1995).
- 30) 山縣邦弘, 岡 裕爾, 中川真也, 宮崎三弘, 小山哲夫: 基礎と臨床, **25**, 4465 (1991).
- 31) A. E. Bolton, W. M. Hunter: "Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1 Immunochemistry", Edited by D. M. Weir, L. A. Herzenberg, C. Blackwell, L. A. Herzenberg, p. 26.1 (1986), (Blackwell, Oxford).
- 32) M. Thompson, A. L. Kipling, W. C. Duncan-Hewitt, L. V. Rajakovic, B. A. Cavic-Vlasak: *Analyst* (London), **116**, 881 (1991).
- 33) R. Schumacher: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **29**, 329 (1990).
- 34) R. Schumacher, G. Borges, K. K. Kanazawa: *Surf. Sci.*, **163**, L621 (1985).
- 35) F. Ferrante, A. L. Kipling, M. Thompson: *J. Appl. Phys.*, **76**, 3448 (1994).
- 36) W. C. Duncan-Hewitt, M. Thompson: *Anal. Chem.*, **64**, 94 (1992).
- 37) 岡野光夫, 西山聖二, 篠原 功, 赤池敏宏, 桜井靖久: 高分子論文集, **36**, 209 (1979).
- 38) K. K. Kanazawa, J. G. Gordon II: *Anal. Chem.*, **57**, 1770 (1985).
- 39) K. K. Kanazawa, J. G. Gordon II: *Anal. Chim. Acta*, **175**, 99 (1985).
- 40) S. Bruckenstein, M. Shay: *Electrochim. Acta*, **30**, 1295 (1985).

- 41) A. Savitzky, M. J. E. Golay: *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).
- 42) H. O. Ghourchian, N. Kamo: *Anal. Chim. Acta*, **300**, 99 (1995).
- 43) L. S. Zijenah, L. F. Morton, M. J. Barnes: *Biochem. J.*, **268**, 481 (1990).
- 44) S. A. Santoro, M. M. Zutter: *Thromb. Haemostasis*, **74**, 813 (1995).
- 45) S. A. Santoro: *Cell*, **46**, 913 (1986).
- 46) W. D. Staatz, K. F. Fok, M. M. Zutter, S. P. Adams, B. A. Rodriguez, S. A. Santoro: *J. Biol. Chem.*, **266**, 7363 (1991).
- 47) D. M. Gryte, M. D. Ward, W.-S. Hu: *Biotechnol. Prog.*, **9**, 105 (1993).
- 48) S. Kurosawa, M. Muratsugu, H. O. Ghourchian, N. Kamo: "Immunochemical Technology for Environmental Applications", Edited by D. S. Aga, E. M. Thurman, p. 185 (1997), (American Chemical Society, Washington, D.C.).
- 49) J. M. Singer, C. M. Plotz: *Am. J. Med.*, **21**, 888 (1956).

要 旨

疾患の診断に利用される種々の生体物質の検出や細胞の機能評価のために水晶振動子を用いたバイオセンサーを開発した。① 微量アルブミン: 従来のラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法などと異なり、標識第2抗体を必要としない特徴がある。② C-反応性タンパク、抗ストレプトリジンO抗体、リウマチ因子: ラテックス凝集反応をセンシングするもので、振動子表面にあらかじめ抗体などを結合する必要がない。このセンシングシステムをラテックス圧電素子イムノアッセイ {latex piezoelectric immunoassay (LPEIA)} と名付けた。③ 血小板粘着能: 従来法のように、血小板をラジオアイソトープで標識したり、染色した血小板数を顕微鏡下で数える必要がない。又、リアルタイムに粘着過程の追跡も可能である。以上のセンサーには、操作の簡略化、コストの低減化などのメリットがある。本論文では、これら三つのセンサーの臨床検査の分野における意義について総合的に議論する。