

表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた 高感度免疫測定システムの開発

High-Sensitivity Immunoassay Based on Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy

彼谷 高敏*
Takatoshi KAYA

松尾 正貴*
Masataka MATSUO

石田 賢治*
Kenji ISHIDA

須田 美彦*
Yoshihiko SUDA

要旨

近年の分子生物学の進展は、癌種に応じた分子標的薬などの新たな医療をもたらした。それに伴い、疾患の早期発見や薬効予測も可能とする診療マーカーを用いた臨床検査の必要性が高まっており、診断・診療精度を十分満足する感度と幅広いダイナミックレンジが両立する検出技術が求められている。我々が検討した表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) 免疫測定法は、抗原抗体反応により捕捉された標識蛍光分子を、金膜極表面に誘起された局在場光により極めて効率的に励起し、その蛍光シグナルを検出する方法である。試作した SPFS 自動測定装置は、従来法よりも高感度かつ幅広いダイナミックレンジ性能を示し、新たな診断価値を創出する基盤技術が確立されたと考える。

Abstract

Recent progress in molecular biology has brought about new medical treatments such as molecular target drugs corresponding to a cancer's type. At the same time, clinical examinations have improved with diagnosis marker inspections that enable early detection of diseases and the prediction of a drug's efficacy. In such clinical examinations, there is a need for detection technologies in which the tradeoff between high sensitivity and wide dynamic range is minimized to satisfy accuracy in diagnosis and treatment.

To meet that need, we developed new immunoassay technology based on surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS) involving a method for efficiently detecting fluorescence signals, which signals are generated by exciting fluorophores that are surface-confined by an antigen-antibody reaction. The fluorophores are excited with extreme efficiency by near-field light induced very close to the gold membrane surface. This technology is employed in an automated SPFS immunoassay system that features higher sensitivity and wider dynamic range than conventional systems, creating a new diagnostic tool of great value.

1 はじめに

臨床検査の院内実施の増大と専用施設を持たない病院での検査実現のために、ラジオアイソトープ免疫測定法 (RIA) の代替法として現在主流となっている酵素標識化学発光法 (CLEIA) が開発された。CLEIA は、分散磁性微粒子を免疫反応場とする効率的な抗原捕捉と、酵素反応による信号増幅機構により RIA 同等の感度を有するものの、酵素反応以降が律速となり、検出ダイナミックレンジは直接標識法である RIA ほど広くない。しかし、近年の医療革新は検査性能向上に寄せる期待も高めており、我々は、CLEIA 以上の検出感度と RIA 同等の検出ダイナミックレンジ性能を両立する方法として、近接場光学を応用した蛍光直接標識法である表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) に着目し、免疫測定システムを開発した。本稿では、SPFS 測定の原理とその特長を効果的に発現するための SPFS センサ表面の設計と評価結果を報告する。また、試作した SPFS 自動測定装置による SPFS 免疫測定のパフォーマンス評価結果についても併せて報告する。

2 表面プラズモン共鳴 (SPR) と SPFS 測定原理

プラズモンとは、金属中の自由電子が集団的に振動して擬似的な粒子として振る舞っている状態を指す²⁾。Fig. 1 (a) のような誘電体界面に金属膜が存在する条件においては、全反射条件で入射された光子と金属膜中の自由電子との間に相互作用が起こる。この相互作用現象を表面プラズモン共鳴 (SPR) と言い、光 (電場) が金属膜極近傍の狭い空間に閉じ込められることで、ある入射角度条件において入射光反射率が大きく低下する。この SPR の発生条件としては入射光波長や金属および誘電体の屈折率だけでなく、金属膜近傍 (金膜上方数 100nm 内外) の屈折率も大きく影響を与える。例えば Fig. 1 (a) のように、金属膜近傍に配置された Target A および Target B に対しては、SPR の作用範囲内である Target A の存在は信号出力に影響を与えるが、作用範囲外の Target B は信号にまったく影響を与えない。このため、金属膜極近傍の物質変動を測定することが可能で、反応速度や物質吸着挙動等を非標識で評価できる方法として一般化され、様々なマーカーが理化学分析機器として製品化している。

一方、表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) 測定は、金属薄膜に光をプラズモン共鳴角で入射した際に発

* コニカミノルタテクノロジーセンター(株)
光学バイオ技術開発室

生する局在場光により、金属膜極近傍に配置された蛍光分子からの蛍光を測定する方法である (Fig. 1 (b))。センサ表面にリガンド分子(特定分子と結合する受容体分子)を配置することにより、様々な対象物質の高感度蛍光検出が可能となる方法である。その多くの特徴はSPR測定と同様であるが、蛍光測定であるSPFS測定は、金属膜極表面層で発生するエネルギー移動に起因する金属消光現象により、励起場として利用できる局在場光の分布が複雑化する (Fig. 1 (b))。この複雑化した局在場光を最大限に活用し、高い再現性を確保するリガンド分子密度やその配置には、金属膜極近傍をナノスケールで制御する技術が要求される。そのため、これまでも様々な対策検討がなされてきたものの実用化には至っていない²⁾³⁾⁴⁾。

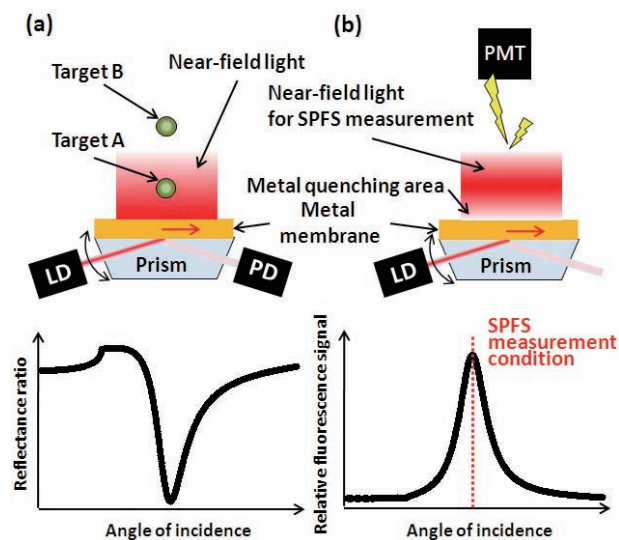


Fig. 1 The principles of (a) surface plasmon resonance (SPR) and (b) surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS).

3 SPFS センサチップの作製と評価

3.1 SPFS センサチップ作製方法

SPFSの原理的特長を最大限に引き出す上で、最も重要な構成要素がセンサ表面の設計である。我々は、SPFSセンサの表面設計に際して、最終的な測定対象である血液検体の特性も念頭に、生体親和性の高い親水性高分子を主材料とするセンサ表面を形成することにより、局在場光の最大限の活用だけでなく、免疫測定にも配慮したセンサ表面形成技術を開発した。Fig. 2 にSPFS免疫測定センサの作製手順を示す。まず、金薄膜(膜厚45nm程度)が成膜されている基板(ガラスもしくは樹脂)に対して、アミノ基末端のチオール分子による自己集合単分子膜(SAM)を形成させることで金薄膜表面に有機反応基点を準備した。次に、生体親和性が極めて高い親水性高分子をアミドカップリング反応により化学的に架橋することでリガンド分子の固定化支持体層を形成させた。最後に抗体などのリガンド分子を種々の化学結合を用いて固定化し、未反応活性基やタンパク質の非特異吸着サイトを

をウシ血清アルブミン含有のトリヒドロキシアミノメタン緩衝溶液(TBS-BSA buffer)でブロック処理することでSPFSイムノセンサチップを作製した。

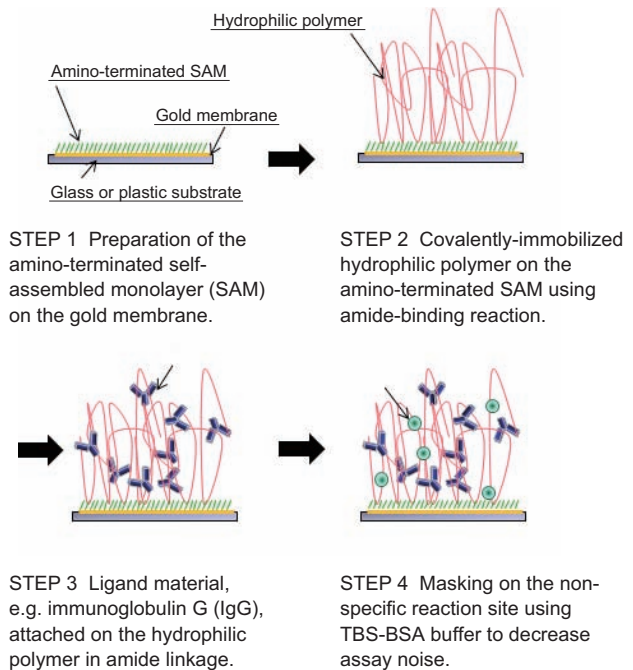


Fig. 2 Fabrication of the SPFS immuno-sensor chip.

3.2 センサ表面の構造解析

作製したSPFSイムノセンサチップの表面状態を原子間力顕微鏡 (AFM) により評価した。Fig. 3 に親水性高分子層形成前後の金基板表面のAFMイメージを示す。親水性高分子層形成前後 (Fig. 3 (a), (b)) のイメージ比較により、親水性高分子が金基板表面に固定化されたことによる表面性状の明確な変化が確認できる。また、乾燥状態ではあるものの、親水性高分子層厚はおよそ15~25nm程度と見積もられ、AFMイメージから比較的平坦かつ一様な親水性高分子の分布状態が確認された (Fig. 3 (b))。

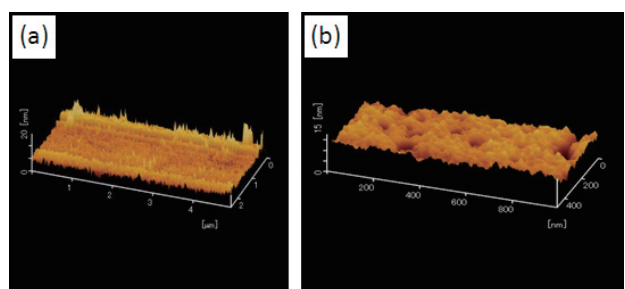


Fig. 3 Atomic force microscopy (AFM) images of the gold membrane surface (a) before and (b) after treatment with the hydrophilic polymer reaction.

3.3 親水性高分子層の特性評価

AFM測定により、親水性高分子層が比較的均一な分布状態であったことから、フローセル型の水晶振動子マイクロバランス (QCM-d) 測定により水溶液中での親水性

高分子層厚や粘弾性評価を検討した。Fig. 4に、親水性高分子層形成過程 (Fig. 2, STEP 1からSTEP 2)をQCM-d測定によりリアルタイム計測し、親水性高分子層の形成過程を膜厚の経時変化として解析した結果を示す。(a)は共振周波数変化から算出される物質換算の膜厚解析値であり、親水性高分子層厚は約20nmと見積もられ、AFM測定結果と良い相関が確認された。一方、共振周波数の減衰から粘弾性を考慮した膜厚解析値(b)では、親水性高分子層厚がおよそ80nmと解析され、SPFSイムノセンサチップが使用される水溶液中においては親水性高分子が多くの水分子を抱えることで膨潤し、高い粘弾性を有していることが確認された。今回評価対象とした親水性高分子の分子量換算から想定される分子鎖長は約100nmであり、親水性高分子が分子鎖の途中あるいは、複数の架橋点でセンサ基板上に固定化されていると考えられる。一般的に高い粘弾性を示す表面は、抗原補足や非特異吸着防止などイムノアッセイ性能に極めて有利に寄与する重要特性であることが知られており、高感度測定を実現する重要基盤技術が確立されたと考えられる。

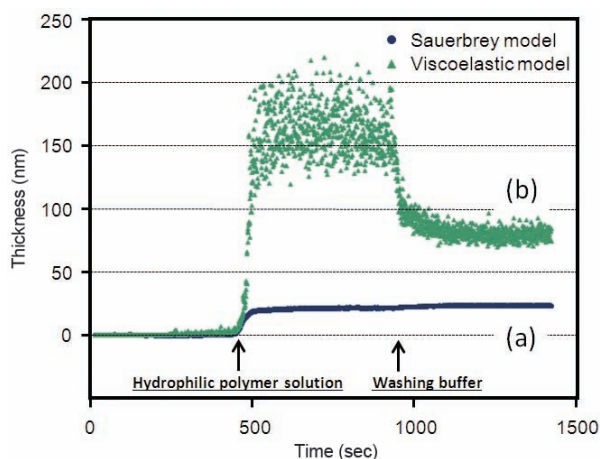


Fig. 4 Results of QCM-d (quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring). Thickness of hydrophilic membrane from (a) resonance frequency, and (b) dissipation of resonance frequency.

Table 1 Correlation between sensor surface matrix formation and a list of elementary parameters.

	Type A (conventional formation)	Type B (3D disposition of ligand molecules)
Schematic view of sensor surface matrix formation		
Immobilized ligand molecular density	Low	High
Nonspecific reaction noise	High	Low
Adequacy of SPR measurement	Inadequate	Adequate
Adequacy of SPFS measurement	Inadequate	More than adequate

親水性高分子の分子量や濃度、反応時の液組成などの諸条件による親水性高分子層の形成状態検討から、膨潤時80nm程度の均一膜厚である親水性高分子層が、センサ基板極表面に局在する複雑なSPFS励起場分布に対して、金属消光の回避と最適な増強励起場内での蛍光励起を両立する界面であることを示唆する結果が得られた (Table 1)。また、センサ表面に形成した親水性高分子の反応基をリガンド分子の固定化点とすることで、平面基板型のセンサ構造でありながらリガンド分子の3次元配置により (Table 1, Type B)、従来型 (Table 1, Type A) よりも極めて高いリガンド分子密度を達成し、高感度SPFS測定を可能とするセンサ表面を構築した。

4 SPFSイムノアッセイ

4.1 SPFSイムノアッセイシステムの構築

反応液中で均一分散する微小磁性粒子を反応場とするCLEIA等では、リガンド分子を反応溶液中全体に展開することからアナライトの捕捉効率が極めて高い。一方、基板型の反応場であるSPFS測定は反応効率の点で不利であり、高感度測定系の構築に際しては高効率な反応促進技術が必要となる。基板に対する反応効率向上法として微小流路の応用が一般的に考えられる。しかし、被送液体である血液検体は粘度だけでなく浮遊物や夾雑物などの組成にもバラツキがあり、再現性確保や製造コスト削減も考慮し、極端な微細加工技術に頼らない高効率な送液技術の確立を目指した。Fig. 5に開発した往復攪拌送液法によるSPFSイムノアッセイの原理図 (a)を示す。往復攪拌送液は、微細加工技術のスケールとしては比較的大きな (流路幅数mm, 流路高さ100 μ m) 扁平薄層流路と非対称形状の混合容器を流路の一端に配置し、他端に設置したシリンジポンプによる吸引吐出動作の繰り返しにより効率的な反応を実現する技術である。扁平薄層流路内での反応により形成されるアナライト分子の濃度分布を送液時に逐次解消する混合効果と、往復送液による供給回数の増加により、従来法であるマイクロ流路 (流路幅数mm, 流路高さ10 μ m) 反応と比較して同等以上の高効率な反応促進技術を確立した (Fig. 5 (b))。

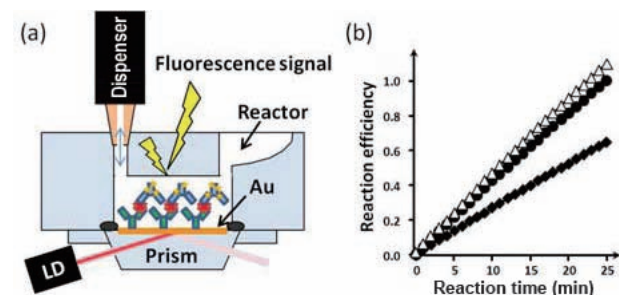


Fig. 5 (a) schematic of SPFS chip, and (b) reaction efficiency of reciprocating liquid with agitation reactor (Δ), and conventional microchannel flow without agitation reactor (microchannel height: 10 μ m (\bullet), and 100 μ m (\blacklozenge)).

性能評価には自社開発したSPFS自動免疫測定装置 (Fig. 6, サイズ: 650(W)×510(D)×610(H))を用いた。装置の基本使用条件は、検体量50 μ lの1チップ1項目測定であり、1測定の所要時間は約20分である。

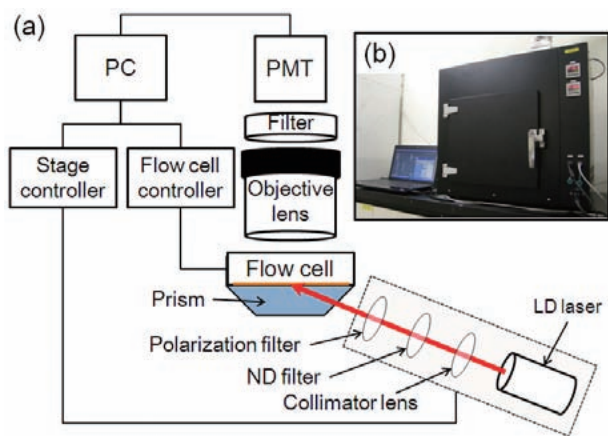


Fig. 6 (a) schematic of automated SPFS immunoassay machine, and (b) photo of the machine.

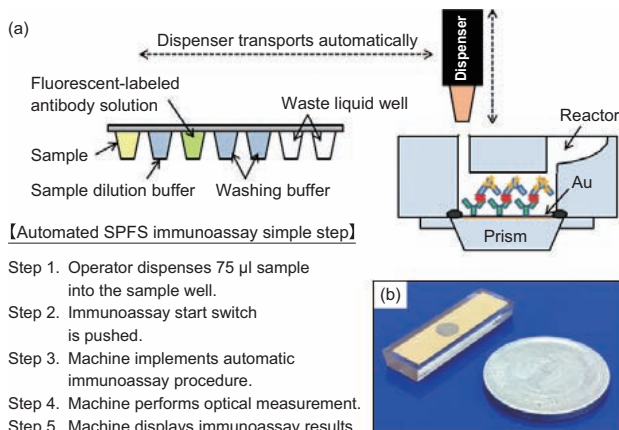


Fig. 7 (a) schematic of automated SPFS immunoassay steps, and (b) photo of SPFS sensor plastic prism beside a one yen coin.

SPFS免疫アッセイ測定時には、樹脂製プリズム (Fig. 7 (b))を採用したSPFS免疫アッセイチップと蛍光標識抗体溶液や洗浄液等の各種試薬があらかじめ分注された試薬チップを装置に装填し、実施される。装置内で各種試薬の分注や送液、測光に至る種々の測定操作が自動で実施され、測定値を出力する (Fig. 7 (a))。

4.2 SPFS免疫アッセイシステム性能評価

SPFS免疫アッセイ評価のモデル項目として α -フェトプロテイン (AFP)を用いた。AFPは肝細胞癌患者の約80%で血中濃度の上昇が認められることから、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして代表的なタンパク分子であり、補助診断や胎児管理の指標に有用とされている。

Fig. 8に、同一の市販抗AFP抗体およびAFP抗原を材料として用いた時のSPFS免疫アッセイ (a)および96ウェルプレートによるCLEIA (b)による検量線結果を示

す。尚、CLEIAは、市販アッセイキットの指定標準法に従って実施し、反応時間や温度などの条件はCLEIA性能が最大発揮する反応条件で実施した。その結果、SPFS免疫アッセイにおいては、AFP検出下限値は約0.1 pg/mlであり、直線性範囲は0.5 pg/ml~10 ng/mlであった。一方、CLEIA測定のAFP検出下限値は約40 pg/mlであり、直線性範囲は40 pg/ml~100 ng/mlであった。両手法の比較から、SPFS免疫アッセイが現在汎用されているCLEIA法と比較しても、100倍以上の高い検出感度と1ケタ以上の定量ダイナミックレンジ性能が検証された。

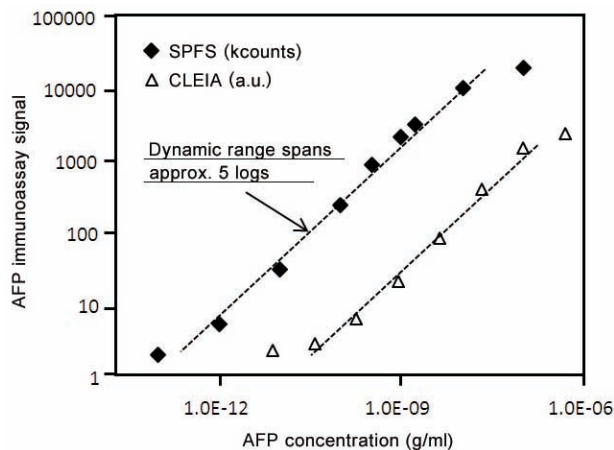


Fig. 8 Calibration curves of α -fetoprotein (AFP) obtained through SPFS immunoassay (◆) and CLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay) (△). SPFS immunoassay clearly has higher sensitivity and wider dynamic range than CLEIA with a plate composed of 96 wells.

5 おわりに

本稿では、長年コニカミノルタが培ってきた高分子層形成技術を発展的に応用したセンサ表面設計と、デバイス光学設計技術などを基盤とするSPFS免疫測定の自動化システムおよびその評価を中心に紹介した。SPFS測定を用いた免疫測定システムは世界的にも稀な試みであるものの、現時点において既にCLEIAなど他法の感度・再現性・ダイナミックレンジ性能を凌駕する特筆すべき性能が検証されている。

今後、病院や診療所を対象とした小型装置としてだけでなく、測定のハイスループット化により大病院や検査センターへの市場参入も可能になると考えている。また、従来法では評価ができなかった分子間相互作用の反応解析能も高く、精度を必要とする医薬・バイオマーカー探索を指向した理化学研究機器としての展開も期待できる。

●参考文献

- 1) 湯浅保仁, 渋谷昌史 “Cancer Biology” 羊土社
- 2) W. Knoll, Ann. Rev. Phys. Chem. 49, 569 (1998)
- 3) Y. Arima et. al., Method in Molecular Biology; Biosensor and Biodetection, 503, 3 (2009)
- 4) F. Yu et. al., Anal. Chem. 75, 2610 (2003)