

表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた 糖鎖マーカー定量による前立腺癌診断法の開発

Development of a Prostate Cancer Diagnostic System Based on Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy

金子 智典* 彼谷 高敏* 小島 駿* 中村 幸登* 須田 美彦**
Tomonori KANEKO Takatoshi KAYA Shun KOJIMA Yukito NAKAMURA Yoshihiko SUDA

要旨

先進国を中心とした高齢化、途上国における食生活の欧米化により、近年、前立腺癌患者は急激に増加している。前立腺は男性の膀胱出口部に尿道を包むように位置するクルミ大の臓器であり、前立腺癌はこの前立腺に発生する癌である。現在、前立腺癌の診断方法の1つとして前立腺特異抗原 (PSA: Prostate specific antigen) 血液検査が汎用されている。しかし、PSA値は前立腺肥大症などの良性疾患においても上昇するため、前立腺癌に対する低い特異性が大きな課題となっている。

糖鎖は、細胞表面やタンパク質上に存在し、生体内で発生や分化等の重要な役割を担っている。近年の研究により細胞の癌化に伴い、様々な糖鎖構造変化が報告されており、糖鎖は癌を特定するマーカーの1つとして期待されている。前立腺癌においてもPSA分子上の糖鎖構造変化 (GalNAc β 1-4GlcNAc: LacdiNAc) が増加することが知られている。

癌特異的な糖鎖構造変化を伴ったPSA (LacdiNAc-PSA) の定量には、従来、分離精製と濃縮を必要とし、操作が煩雑で多くの時間を要するため臨床検査への応用が困難であった。我々は、LacdiNAc-PSAを定量する方法として自動化が可能な簡便な反応ステップと、表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS: Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy) 法という高感度な蛍光検出技術を融合した新規自動免疫測定システムを開発した。

本システムは従来法に対してLacdiNAc-PSAを1000倍程度高い感度で定量することが可能であり、前立腺疾患患者70例の測定結果から、癌症例が非癌症例と比較して有意な高値傾向を確認した ($P=0.00006$)。さらに、LacdiNAc-PSAは前立腺癌悪性度指標であるグリーソンスコアとの良好な相関が認められ、本システムによるLacdiNAc-PSA測定が癌鑑別診断だけでなく癌悪性度評価にも有用である可能性が見出された。これは、針生検を中心とした現行の前立腺癌診療を大きく変革できるポテンシャルをLacdiNAc-PSA測定が有していることを示唆しており、今後の臨床評価に期待が高まる。

Abstract

With the ageing of society and the Westernization of dietary habits, incidences of prostate cancer (PC) have significantly increased in the past few years. PC begins in a man's prostate gland. Prostate specific antigen (PSA) screening helps identify early-stage cancer, when treatment is most effective. However, PSA lacks cancer specificity, as it can also be elevated in conditions such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and chronic prostatitis. Due to the low specificity of PSA screening and the resultant high number of false positives, a large number of unnecessary biopsies are performed each year in order to obtain definite diagnoses.

Just such a cancer-specific marker may be the structural change in carbohydrate chains produced by cell changes during carcinogenesis. That same cancer-specific change was also found on PSA, which was conventionally detected by using column chromatography combined with the ELISA method. This satisfies all specificity requirements for quantitative analysis of a PSA-containing, cancer-specific carbohydrate (LacdiNAc-PSA) in serum. However, it is impractical for clinical use because it takes an excessive amount of time and labor.

We have developed an automated immunoassay system employing surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS), one of the most sensitive fluorescence detection technologies today. The performance of LacdiNAc-PSA immunoassay with SPFS showed high sensitivity. Clinical evaluation revealed that the level of LacdiNAc-PSA in serum was significantly higher in cases of PC than in cases of BPH. Further, the level of LacdiNAc-PSA in serum correlated positively with the progression of cancer. Thus, a PSA carbohydrate marker in serum may eliminate the need for a needle biopsy in cases of suspected prostate cancer.

* 開発統括本部 要素技術開発センター 第3開発室 32G
** 開発統括本部 要素技術開発センター 第3開発室

1 はじめに

前立腺は男性だけに存在し、膀胱の出口部分に尿道を包むようにあるクルミ大の臓器である。前立腺癌はこの前立腺に発生する癌である。近年、最も増加している男性の癌として注目されており、特に欧米で発症頻度が高く、米国では男性の癌のうち罹患者数は1位、死亡数は2位となっている。国内においても前立腺癌の罹患者数は増加傾向にあり2020年には罹患者数10万人を超え、胃癌・肺癌・大腸癌を超えると予想されている¹⁾。これは、高脂肪食などの食生活の欧米化や社会全体の高齢化が要因といわれている。

現在、前立腺癌はPSA検査の普及により、限局性の早期前立腺癌として発見することができるようになってきている。PSAは前立腺の腺管から分泌されるタンパク質分解酵素であり、射精後の精液の液状化に関係し、受精に欠かせないタンパク質の1つである。前立腺に異常があると血液に漏れ出し、血液中のPSA値が上昇する。現在、PSA検査のカットオフ値は4ng/mLに設定されており、これより高値を示す場合、前立腺癌の疑いがあると判断される。しかし、PSAは前立腺組織特異的なタンパク質であり、決して癌特異的なタンパク質ではない。そのため、前立腺炎や肥大症といった良性疾患においても血中のPSA値は上昇する。特に、PSA検査の値が4~10ng/mL(グレーゾーン)における癌罹患率は20~30%程度と低くPSA検査の癌発見に対する特異度は非常に不良であることが知られている²⁾。

PSA検査でカットオフ値を超えた場合、前立腺癌の確定診断のために前立腺針生検が施行される。この検査は前立腺に直腸等から針を刺すことで(通常は6~8本、多い場合は14本以上)前立腺細胞を採取して、癌の有無を確認する病理組織検査である。また、癌が存在した場合には癌組織の状態を観察し、癌の生物学的悪性度の評価も行うため、とても重要な検査である。しかし、しばしば直腸出血、血尿、まれに感染症による前立腺炎といった合併症が生じる侵襲性の高い検査である。

また、前立腺癌は進行が遅く生命に影響を及ぼさない癌から、高悪性度の癌まで経過が多様な癌であり、治療戦略を立てる上で癌の生物学的悪性度を把握することが極めて重要である。PSA検査では癌の悪性度を判断することは難しく、病理組織検査によるグリーソンスコアが悪性度を示す指標として利用されている。そのため、悪性度判断には針生検や手術が必要である。この点においても血液検査のような低侵襲検査によって生物学的悪性度を判断できるバイオマーカーの開発が求められている。

そこで我々は糖鎖バイオマーカーに注目した。糖鎖は核酸・タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれ、タンパク質や脂質に結合して存在し、生体内でとても重要な役割を担っている。細胞の発現する糖鎖は発生、分化の過程で顕著に変化することが知られており、性質の異なる細胞ではそれぞれ特徴的な糖鎖構造を発現する。癌に

おいても同様で、正常細胞から癌細胞になると、細胞表面の糖鎖の構造が大きく変化し、癌特異的な糖鎖の発現が増加することが報告されており、さらにその糖鎖は癌の転移に関係することも報告されている。そのため、糖鎖は癌を特定するとともに悪性度を反映するバイオマーカーとしてとても有力な分子と考えられている。実際に、現在臨床検査で使用されているCA19-9、CA125に代表される血液腫瘍マーカーの多くは糖鎖をターゲットとしたものである。

前立腺癌においてもPSA上の糖鎖構造が変化し癌特異的な糖鎖(GalNAc β 1-4GlcNAc:LacdiNAc構造)が増加することが知られている³⁾。従来、PSA上の癌特異的な糖鎖(LacdiNAc-PSA)の定量にはカラムクロマトグラフィーとELISA法を組み合わせられた手法が用いられてきた。この手法はカラム操作が煩雑であり、分析時間が長く、サンプルによってはELISA測定前に濃縮操作を必要とする。そのため、迅速・簡便かつ再現性を要求される臨床検査の手法としては適していない。

そこで我々はSPFS技術を用いた高感度免疫測定システムにてPSA上の癌特異的な糖鎖の自動測定法の開発に取り組んだ。本稿では、SPFS原理および自動測定システムの構成、PSA上の癌特異的な糖鎖を簡便に測定するための手法開発、そして臨床検体を用いた評価結果について報告する。また、臨床検体評価から新たに見出された、PSA糖鎖マーカーによる悪性度予測の可能性についても併せて報告する。

2 研究結果と成果

2.1 SPFS原理と測定方法

最初に、表面プラズモン共鳴現象とSPFS測定原理の特徴について簡単に説明する。詳細は2012年コニカミノルタテクノロジーレポートVOL.9を参照いただきたい⁴⁾。Fig.1のように誘電体界面に金属膜が存在する条件において、全反射条件で光が入射されると界面に生じるエバネッセント波と金属膜中の自由電子が相互作用し、表面プラズモン共鳴現象(SPR)が発生する。SPFSはSPRにより生じる局在電場により、金属膜近傍に存在する蛍光分子を効率的に励起し蛍光を検出する方法である。

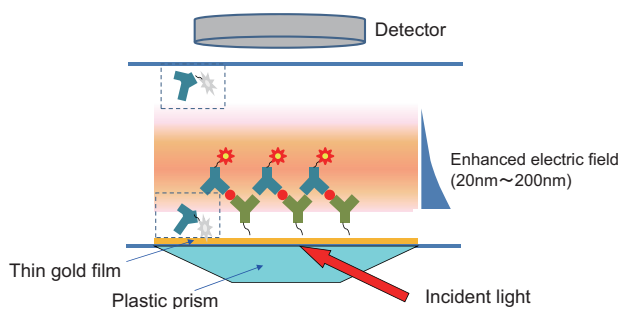


Fig.1 The principle of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS).

SPFSにはバックグラウンドの低下に寄与していると考えられる2つの特徴がある。1つは局在場光により蛍光が増強されるため、励起光の出力を低光量に抑えることが可能であり、光学バックグラウンドノイズの低減が期待できること。もう1つは、SPRにより発生する局在電場は金膜の極近傍にのみ存在するため、局在電場外の非特異的に結合した蛍光標識分子の影響を排除できることである。これら特徴により、SPFSは従来の蛍光検出技術よりもバックグラウンドを低く抑えることが可能であり、高感度性能が期待できる。

この蛍光検出技術と免疫反応を組み合わせることで、血液中の抗原分子の高感度定量を実現している。具体的には金膜上部に抗体などのリガンド分子を固定化し、そこで免疫反応により抗原を捕捉した後、蛍光標識分子にて抗原検出を行う仕組みとなっている。

2.2 ディスポーザブルセンサーチップおよび自動測定装置の開発

我々は臨床検査への応用を見据えて、検体間のキャリーオーバー、コンタミネーションを抑制するため樹脂製のディスポーザブルセンサーチップを作製した。独自に開発した高い再現性を有する射出成型技術とSPFS測定に適した光学設計技術により、再現性と感度を両立したSPFSセンサーチップの開発に成功した⁴⁾。

また、自動免疫測定装置は光学検出ユニットと試薬分注ユニットから構成されており、測定時には、検体、SPFSセンサーチップ、試薬カートリッジをセットするだけで測定が実施できる。装置内では、各種試薬の分注、送液、検出器による測光に至るすべての測定操作が自動で実施され、測定結果が出力される仕組みとなっている (Fig. 2)。

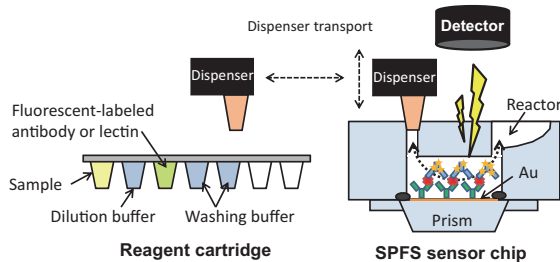


Fig. 2 The automatic SPFS immunoassay system with a disposable plastic sensor chip.

Fig. 3 (b) に、SPFS 自動免疫測定の高感度性能を従来技術である ELISA 法と比較した結果を示す。Fig. 3 (a) に示すように抗 PSA 抗体 2 種によるサンドイッチ法によって血清検体中の PSA 濃度測定を実施した。各濃度の検体は PSA フリー的女性血清をベースに精製 PSA を設定濃度となるよう添加して調製した。3SD 法にて求めた検出下限値を比較すると 100 μ L の血清検体において SPFS では 0.04 pg/mL に対して ELISA では 20 pg/mL となり、SPFS は ELISA に比べて感度が 500 倍程度高いことが確認された。SPFS ではバックグラウンドが非常に低く抑えられて

いるため、pg/mL を下回る抗原量においてもブランクに対して有意なシグナルとして検出できていると考えられる。また、上限に関しても 100 ng/mL 程度までは十分定量可能であり、この結果から SPFS は少なくとも 6 桁以上の幅広いダイナミックレンジを有することも確認された。

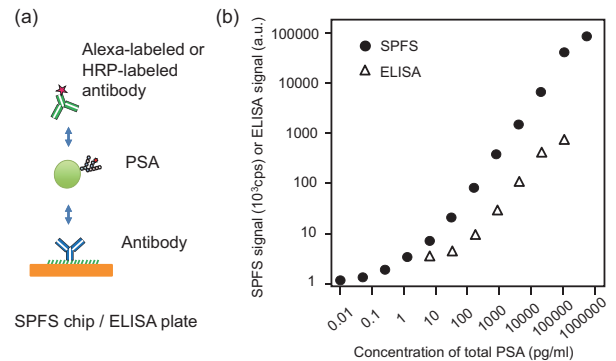


Fig. 3 (a) Schematic view of sandwich immunoassay on an SPFS chip and ELISA plate, and (b) calibration curves of total PSA in female serum derived from SPFS (●) and ELISA (Δ). The SPFS immunoassay has both higher sensitivity and a wider measurement range than those of ELISA.

他社の自動免疫測定システムの測定原理および PSA 測定範囲に関してまとめたものを Table 1 に示す。各社様々な測定原理により PSA の高感度測定システムを構築しているが、SPFS 測定システムはこれらに比べても高い検出感度を有していることが確認できる。

Table 1 Performance of six automated immunoassay systems that perform total PSA tests.

Instrument	Company	Assay method	Measurement range (pg/ml)
—	Konica Minolta	SPFS	0.04 – 100000
ARCHITECT	Abbott	CLIA	8 – 100000 ⁵⁾
Unicel	Beckman	CLIA	8 – 150000 ⁶⁾
IMMULYZE	Siemens	CLEIA	5 – 20000 ⁷⁾
ECLusys	Roche	ECLIA	2 – 100000 ⁸⁾
AIA	Tosoh	FEIA	10 – 100000 ⁹⁾

CLIA: chemiluminescence immunoassay
 CLEIA: chemiluminescence enzyme immunoassay
 ECLIA: electro chemiluminescence immunoassay
 FEIA: fluorescence enzyme immunoassay

2.3 LacdiNAc-PSA 測定法と検出性能

タンパク質上の糖鎖を定量する方法として、タンパク質部分を抗体で捕捉し、その上で変化した糖鎖部分をレクチンで検出するレクチンサンドイッチ免疫法がある (Fig. 4a)。この方法は、迅速・簡便だが、レクチンの結合力が低いため十分な感度が得られないことと、血液を対象とした場合に夾雑糖タンパク質の影響で特異性が大幅に低下してしまうため、臨床検査分野でほとんど利用されてこなかった。我々はレクチンの結合力を補うために高感度蛍光検出技術である SPFS を応用し、血液中の非特異因子の影響を抑制するために専用検体希釈液の開発を試み、レクチンサンドイッチ免疫法の課題を解決するに至った。

LacdiNAc構造に特異的に反応するレクチンであるノダフジレクチン(WFA: *Wisteria floribunda* agglutinin)を用いたレクチンサンドイッチ免疫測定系の模式図をFig. 4aに示す。LacdiNAc-PSAのスタンダード抗原として、前立腺癌細胞から抽出したLacdiNAc-PSAを用いて、LacdiNAc-PSA測定の検出性能評価を実施した。前立腺癌細胞から抽出したLacdiNAc-PSAを1%BSA含有リン酸緩衝液へ各濃度で添加することでスタンダード溶液を調製し、SPFS自動免疫装置にて測定し検量線を作成した。Fig. 4bに示す通り、開発したLacdiNAc-PSA測定法は3SD法で求めた検出下限値が20 pg/mLであることが確認できた。これは、同じ抗体・レクチン材料を用いて実施した、従来のELISA法の検出下限値である20 ng/mLに対して1000倍高感度であった。これは、標識レクチンに適した洗浄技術と、SPFSの低いバックグラウンドの効果、レクチンの反応温度特性が要因と考える。レクチンは反応温度が上昇すると解離速度が大幅に上昇するという温度特性を有している。そのため、比較的高い温度で効率が良いELISAの酵素増幅反応とレクチンは相性が悪く、ELISAによるレクチン-糖鎖の検出反応では高感度を実現することが困難と考えられる。

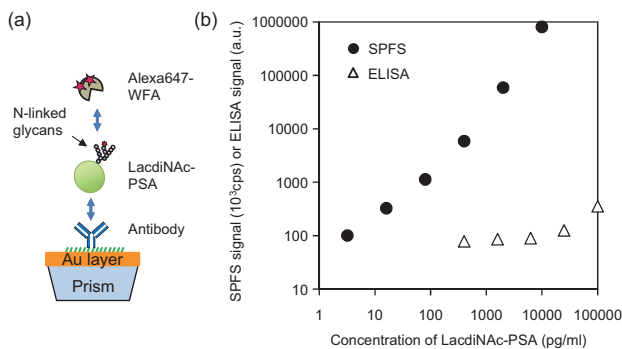


Fig. 4 (a) Lectin sandwich immunoassay with SPFS and (b) calibration curves of LacdiNAc-PSA using lectin sandwich immunoassay with SPFS (●) and with ELISA (△). The limit of detection (LOD) of LacdiNAc-PSA using automated SPFS was 20.0 pg/ml. The LOD of LacdiNAc-PSA using ELISA was 20 ng/ml. The automated SPFS immunoassay clearly had higher sensitivity than that of the ELISA immunoassay.

2.4 癌鑑別診断性能の評価

グレーゾーンを含むtotal PSAが4-20 ng/mLの患者を対象に、SPFS自動免疫測定装置にて血清中のLacdiNAc-PSAの測定を行った。癌患者39例、前立腺肥大症31例の患者血清の測定結果をFig. 5に示す。total PSAの値では癌患者群と肥大症患者群で統計学的な有意差がなく ($P = 0.8949$) 鑑別することは困難であるが、SPFS法にて測定したLacdiNAc-PSAの値では癌患者群において肥大症患者群に対して統計学的に有意であることが確認できた ($P = 0.00006$)。本稿の統計学的な解析はStatFlex 6.0 (株式会社アーテック <http://www.statflex.net/>)にて実施した。各群間の比較解析はMann-Whitney U検定

を用いてP値を算出した。P値が小さいほど両群間の差がより確実であることを表し、一般的に有意水準として0.05 (5%) や0.01 (1%) が用いられる。

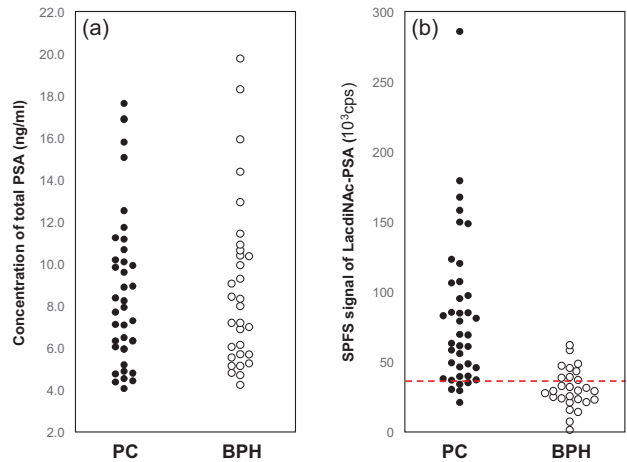


Fig. 5 (a) Measured values of total PSA using ELISA and (b) plot of the measured values of LacdiNAc-PSA using lectin sandwich automated SPFS immunoassay for prostate cancer (PC) (N = 39) and benign prostate hyperplasia (BPH) (N = 31) in the gray zone (total PSA concentration: 4 – 20 ng/ml).

Fig. 6に受信者操作特性 (ROC: Receiver Operator Characteristic) 曲線による解析結果を示す。ROC曲線は、縦軸を真の陽性率、横軸を偽陽性率 (1-特異度) としてプロットしたグラフである。ROC曲線による解析を数値比較するため、ROC曲線の積分値つまり曲線下面積 (AUC) が検査項目の性能を表す指標として用いられている。ROC曲線のAUCは理想的な検査では1になり、判別能力のない検査項目では0.5になる。本検討においては、total PSAはAUC=0.559であるのに対して、LacdiNAc-PSAはAUC=0.823となり、LacdiNAc-PSAの癌特異性が明確に優れていることが確認できた。

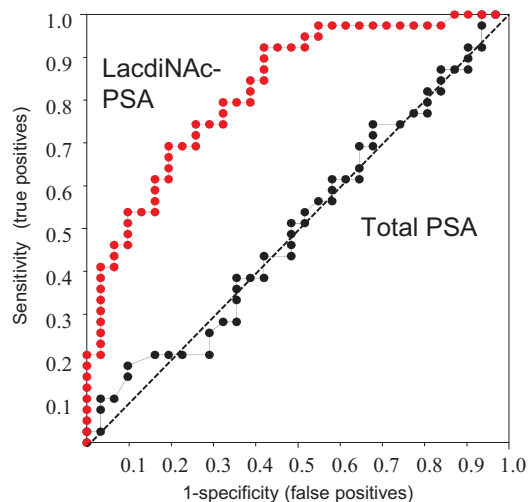


Fig. 6 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for LacdiNAc-PSA (●) and total PSA (●). The area under the ROC curve for LacdiNAc-PSA (0.823) was significantly greater than the area under the total PSA curve (0.506).

既存の前立腺癌診断マーカーに関して、文献情報を基に癌診断感度を90%と95%に設定した場合の特異度およびROC解析によるAUC値をTable 2に示した。文献情報はtotal PSAが4-10ng/mLの症例を対象に解析したデータであり、LacdiNAc-PSAに関しても同様のtotal PSA範囲の症例に絞って再解析を実施した。既存検査であるtotal PSAは95%癌診断感度で特異度が7.5%、%fPSAは9.9%、Phiは14.1%であるのに対して¹⁰⁾、我々の検討しているLacdiNAc-PSAは52%と最もパフォーマンスが優れている。今回の評価は症例数が少なく、さらなる検討の余地があるが、SPFS自動免疫測定によるLacdiNAc-PSA測定は、%fPSA、Phi、等の米国FDAにて既に承認を得ている前立腺癌診断マーカーと比較しても優れた診断性能を示しており、期待できるマーカーと考えられる。簡便な血液検査であるLacdiNAc-PSA検査を生検前に実施することで、不必要な生検を50%以上の割合で回避することができる可能性があり、患者のQOL向上に貢献するとともに、生検施行による高額な医療費の抑制という効果も期待できる。

Table 2 Diagnostic serum marker performance. In the 4 to 10 ng/ml PSA range at 90% and 95% sensitivity, both the specificity and the area under the ROC curve (AUC) of the LacdiNAc-PSA exceeded those of total PSA, %fPSA, and Phi. (AUCs LacdiNAc-PSA 0.866, PSA 0.516, %fPSA 0.648 and Phi 0.708).

Markers	95% Sensitivity		90% Sensitivity		ROC analysis AUC
	Cut off	%Specificity	Cut off	%Specificity	
LacdiNAc-PSA	27650	52.0	32800	66.0	0.866
total PSA	4.2	7.5	4.4	10.8	0.516
%fPSA	27.9	9.9	24.1	19.8	0.648
Phi	22.1	14.1	27.0	31.1	0.708

2.5 悪性度予測の可能性

前立腺癌の癌組織は、その腺構造や浸潤増殖パターンによってグレード1からグレード5の5段階に分類することができる(グリーソン分類)。グリーソンスコアは、顕微鏡で病理組織を観察し、最も大きな面積を占める組織像についてグリーソン分類に基づき付与したグレードと、その次に大きな面積を占める組織像のグレードを合計した値である。一般的に、グリーソンスコアが2~6の場合は悪性度が低く、7の場合は中程度、8~10の場合は悪性度が高いとされており、グリーソンスコアが7以上であるかそうでないかが悪性度診断上重要な目安と言われている。

グリーソンスコア(GS)とLacdiNAc-PSA値の関係を評価するため、高悪性度前立腺癌(GS \geq 7)14例、低悪性度前立腺癌(GS \leq 6)10例、前立腺肥大症(BPH)14例、前立腺炎(Prostatitis)7例、健常成人男性(HMC)4例を対象にSPFS自動免疫測定装置にてLacdiNAc-PSA値の測定を実施した。各症例のtotal PSA値をFig. 7aに、LacdiNAc-PSA値の測定結果をFig. 7bに示す。total PSAでは各群有意差は認められないが、LacdiNAc-PSA値で

は健常者、前立腺炎患者と比較して、肥大症、癌患者では有意に高値を示しており、さらにグリーソンスコアが7以上の癌患者では6以下の癌患者および肥大症、前立腺炎患者に比べてLacdiNAc-PSA値が有意に高値を示すことが確認された。前立腺組織の腺構造が乱れ、浸潤増殖が進むような性質の細胞へと変化することで、PSA上の糖鎖が変化している可能性が示唆される結果である。

これまで、前立腺癌の悪性度を血液検査で予測できるという報告は少なく、治療方針決定のためには生検や手術を必要としていたが、侵襲性の低い血液検査で有効な治療法の選択ができる可能性がある。今後は、症例数を増やすとともに、組織の分化度、病期、転移性、再発リスク、等のグリーソンスコア以外の診断指標との関係性についても解析を進めていく予定である。

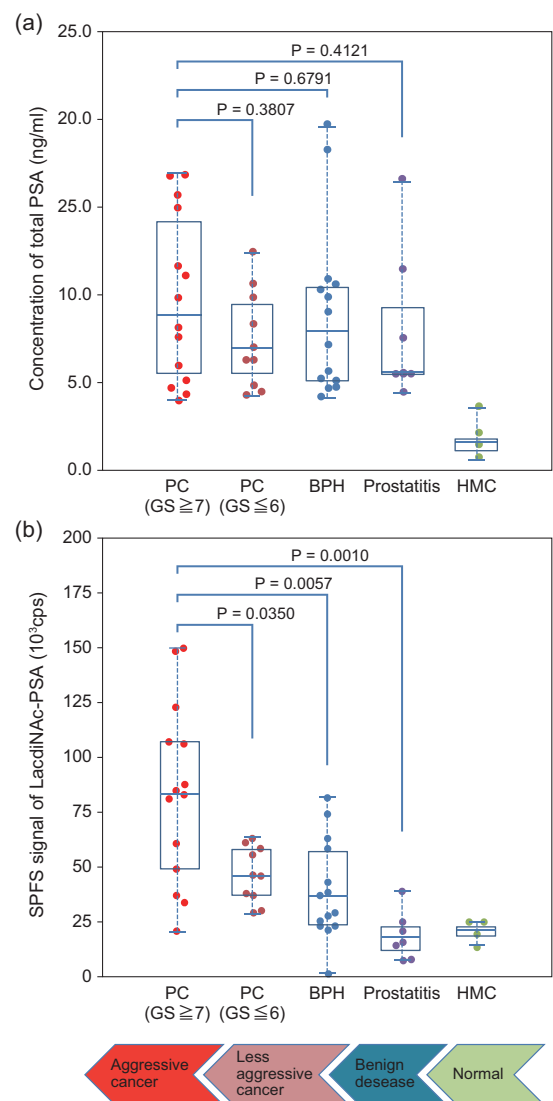


Fig. 7 LacdiNAc-PSA serum levels correlated with tumor Gleason scores (GS) of PC patients. The LacdiNAc-PSA serum levels were significantly higher in PC (GS \geq 7) serum than in PC (GS \leq 6) serum (P=0.0350): (a) Plot of the measured values of total-PSA using ELISA and (b) plot of the measured values of LacdiNAc-PSA using SPFS immunoassay for PC (GS \geq 7 (N=14), GS \leq 6 (N=10)), BPH (N=14), and prostatitis (N=7) in the gray zone (total PSA concentration: 4–20 ng/ml), healthy men control (HMC) (N=4).

3 まとめ

我々は糖鎖バイオマーカーの検査システムとして、レクチンサンドイッチ SPFS 自動免疫測定システムの開発に成功した。本システムを用いて、PSA 上の癌特異的な糖鎖を定量する簡便な方法を確立し、前立腺癌を他の良性疾患から高い感度・特異度で鑑別することができる結果を得た。さらに PSA 上の糖鎖変化と前立腺癌の悪性度との間に相関性が示唆されるデータも得られた。本稿の結果は、前立腺針生検を基本とする前立腺癌診断フローを大きく変革することができる可能性がある。現在、複数施設による臨床評価を計画中である。本システムの診断性能のさらなる向上とともに、様々な臨床シーンにおける応用検討を進め、前立腺癌診療を改革する体外診断薬として上市を目指していきたい。

4 謝辞

本研究をすすめるにあたり、糖鎖構造解析技術に関して多くの有益なご助言をいただいた、横浜市立大学医学部客員教授山下克子先生に感謝申し上げます。

●参考文献

- 1) がん・統計白書2004 篠原出版新社 大島明(編)
- 2) 前立腺がん検診テキスト 前立腺研究財団編
- 3) Fukushima, K et al. *Glycobiology*, 20, 4, 452-460 (2010)
- 4) KONICA MINOLTA Tech. Rep., Vol. 9, 95-98 (2012)
- 5) 前立腺特異抗原キット アーキテクト®・PSA (体外診断用医薬品 添付文書)
- 6) 前立腺特異抗原キット アクセスハイブリテック PSA (体外診断用医薬品 添付文書)
- 7) 前立腺特異抗原キット シーメンス・イムライズ HS-PSA II (体外診断用医薬品 添付文書)
- 8) 前立腺特異抗原キット エクルーシス®試薬 PSA II (体外診断用医薬品 添付文書)
- 9) 前立腺特異抗原キット Eテスト「TOSOH」II (PSAII) (体外診断用医薬品 添付文書)
- 10) Loeb, S et al. *J Urol.* Apr; 193 (4), 1163-1169 (2015)
- 11) Kaya, T et al. *Anal.Chem.* 87, 1797-1803 (2015)