

高感度腫瘍マーカー検出アッセイの開発 「プラズモニックチップ」 x 「二重特異性抗体」 ～その場診断を目指して～

登壇 2011年3月25日(金)セッション: 12.7 生物・医用工学・バイオチップ、講演番号: 25p-CB-6

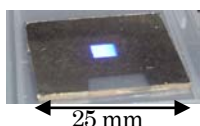


Fig. 1 プラズモニックチップ

産業技術総合研究所 健康工学研究部門 田和 圭子
東北大学大学院工学研究科 梅津 光央, 熊谷 泉

高齢化社会に突入した日本では、様々な疾患に対して早期診断を実現するために、**簡単操作で低濃度まで精度よくマーカーが計測できる、その場診断用小型機器の開発**が望まれている。

本研究ではこのような現状に対応できるよう、①小型かつ安価な機器及び②安価なチップによる③高感度・④迅速マーカー検出が⑤簡単操作のできるシステム開発を目指して、産総研と東北大とが共同研究(特願 2010-020998)を進め、腫瘍マーカータンパク質である上皮細胞増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) の**迅速(10分)・高感度検出 ($700 \text{ fM} = 7 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$)**を実現した。

【高感度腫瘍マーカー検出アッセイを実現するアプローチ】

1. プラズモニックチップ (①②③④⑤に寄与)

ピッチ 350nm の周期構造 (Fig. 2) をもつ基板に銀と酸化亜鉛の薄膜を成膜してプラズモニックチップを作製した (Fig. 1)。プラズモニックチップは、入射光をチップ界面にカップリングさせて増強電場として局在化させることができ、チップに結合した蛍光標識マーカーの蛍光を増強させることによりマーカーの高感度検出を実現する。

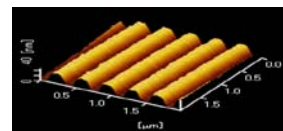


Fig. 2 周期構造の走査型プローブ顕微鏡像

プラズモニックチップと従来法との比較

Fig. 3 に示すように、我々のプラズモニックチップを利用した蛍光計測法の特徴を、マーカー検出法として代表的な表面プラズモン共鳴法 (SPR) と酵素免疫吸着測定法 (ELISA) と比較する。

その場診断への応用という視点から記述すると、

SPR は操作が簡単で迅速性があるが、感度不足と装置やチップの価格に問題がある。一方、ELISA では、高感度で装置やチップの価格は安価ではあるが、迅速性や操作性に問題がある。プラズモニックチップでは、感度や迅速性がありながら、操作性のよい安価なチップと小型装置が期待でき、その場診断機器への展開が有望である。

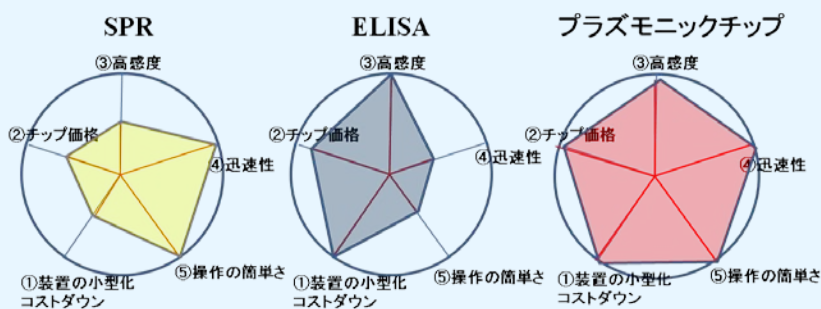


Fig. 3 SPR・ELISA とプラズモニックチップの特徴の比較

2. 酸化亜鉛コーティング (②③に寄与)

これまで酸化亜鉛はバイオセンサーに利用されてこなかったが、酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップでは、特別な基板修飾を行うことなく非特異吸着を抑制することができ、チップ作製プロセスにおいて有利、かつ、マーカの高感度検出に貢献する。

3. 二重特異性抗体 (③④⑤に寄与)

マーカ検出感度を向上させるためには、抗体をチップに高密度結合させることが重要である。東北大では、酸化亜鉛表面にだけ選択的に結合するペプチドおよびペプチドの数百倍の結合力を持つ抗体断片を取得してきた。本研究では、抗EGFR-抗酸化亜鉛 二重特異性抗体を調製し、酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップ表面に従来法より簡単かつ高密度に抗体を結合させることができた。これは検出感度の向上とともに、迅速性や操作の単純化にも貢献する。

【本研究成果】

蛍光色素 Cy5 で標識した EGFR (Cy5-EGFR) をチップに注入して 10 分後、レーザー光 (波長 633nm) をチップの背面から共鳴角で入射し、表側から検出角に対して蛍光強度を計測した (Fig.4)。

- 蛍光強度比較 @10 nM (= 1×10^{-8} mol/L) Cy5-EGFR
プラズモニックチップ **300 倍** ≫ 酸化亜鉛コーティング
ガラス基板

➤ 定量限界

酸化亜鉛コーティングガラス基板 : 10 nM ≪ プラズモニックチップ : 700 fM

感度の 5 桁向上に成功

- 高濃度ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下で Cy5-EGFR の蛍光強度不変⇒チップの実用性

【今後の展開】

酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップ x 二重特異性抗体を用いた本アッセイでは、特別な表面修飾を行わずに非特異吸着を抑制でき、簡単な光学系で迅速・高感度な腫瘍マーカー検出が可能であることを示すことができた。

今後は装置の小型化について検討しつつ、サンドイッチアッセイを使った腫瘍マーカー以外の様々なマーカーに対する実用化を目指した展開も考えていきたい。

【謝辞】

本研究は科研費基盤研究 (B) (No. 22310076)によりサポートされた。

【問い合わせ先】 〒563-8577 大阪府池田市緑丘1丁目 8-31

独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 主任研究員 田和圭子
TEL:072-751-9243, E-mail: tawa-keiko@aist.go.jp

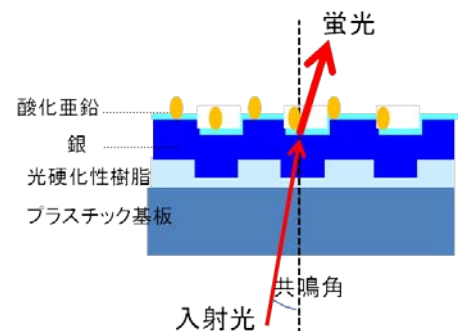


Fig. 4 プラズモニックチップ断面と光学系