

家畜用迅速診断を目指した フィールド型多機能診断判定器の実用化研究

金木 則明 [室蘭工業大学情報工学科／助教授]

島田 浩次 [室蘭工業大学情報工学科／助手]

伊藤 敬三 [株式会社フロンティア・サイエンス／技術研究所長]

今任 稔彦 [九州大学大学院工学院／教授]

浅野 泰一 [九州大学大学院工学院／非常勤研究員]

尾上 貞雄 [北海道立畜産試験場／科長]

奥田 篤 [北海道立工業試験場／研究職員]

背景・目的

北海道は我が国最大の畜産原料・製品供給基地で、特に乳用牛については全国最大の飼育地となっている。乳牛の飼育においては、乳房炎やヨーネ病などの疾病、繁殖の早期診断や乳汁中の抗生物質や環境汚染化学物質の残留・蓄積は、酪農家にとって大きな問題になっている。現在、これらの診断や検出は、原因菌遺伝子を解析するPCR法、抗原抗体反応を利用するELISA法などのラボレベルでの分析法が中心で、比較的高価な機器を用い1、2日費やして実施されている。従って、家畜の疾病的診断や乳中の残留物の検出を簡便に現場で実施できる携帯型測定器の開発が望まれている。

1990年代になって金を蒸着したプリズムの表面で起こる表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用した生体膜相互作用解析法が有機物の新しい計測法として話題を呼んでいる。この方法は、測定対象に選択的に応答する抗体などの感應物質を金蒸着膜に固定化した膜界面で起こるSPRを計測することによって、分子の吸着を選択的に、リアルタイムにセンシングするものである。そこで、本研究では抗原抗体結合反応を感度良く検出できる表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用する計測技術に着目し、この技術を家畜の疾病・繁殖診断や乳汁中の残留物の検出を安価で簡便にon site計測できる携帯型表面プラズモン免疫センサ開発のための基礎開発技術の確立を図ることを目的としている。

内容・方法

牛の疾病診断や乳中残留物の検出を表面プラズモン共鳴(SPR)免疫センサで検出するには、図1に示している金蒸着膜に各測定対象物に対応する抗体を固定化すると対象物の検出可能となる。抗体の固定化技術は検出性能に重要な要素になるが(特に感度、精度や非特異的反応の有無等)、各測定対象物に対応する抗体は現状では高額であり、特異的抗体を開発するためには時間が必要となるので、本開発ではまず潤沢に実験に供給可能なIgGをモデル抗体として用い、最

適な固定化条件等を検討してSPR免疫センサを検証した。また、本SPR免疫センサはフィールド対応技術も重要な要素となる。SPRは図1に示すように一般にはフロー系であるが、このタイプはフィールド対応に不向きである。そこで本開発では、フィールド対応としてのセンサセル化、ダブルビーム化(差動式)および小型化について検討した。また、疾病診断や抗生物質の検出などに有効と考えられる多点同時計測できるマルチチャンネルSPRの試作についても検討した。

2-1 光インターフェイス膜

従来のSPR測定では、測定の都度、センサにマッチングオイルを塗らなければならず、フィールド計測には向かない。また、再現性の良好なSPR信号を得るためにセンサセル構造をプリズムとの密着性という観点からも、マッチングオイルに代わる光インターフェイス膜としてPVC(ポリ塩化ビニル)膜を検討・試作し測定を行った。尚、この測定においては従来のシングルタイプのセンサを用いた。

(PVC膜の作製方法) :

塩化ビニルポリマー(重合度:約1020)をテトラヒドロフラン(THF)で溶解し、可塑剤としてタル酸-2-エチルヘキシリ(DOP)とリン酸トリトル(TCP)を加えた。この溶液をシャーレに流し入れ、80°Cで3~4時間加熱乾燥させて作製する。

2-2 複合化センサセルと差動式SPR装置

本開発では、オンサイト計測するため、測定方式の化学センサ化と装置の手のひらにのるほどの小型及び差動化を目的として、安価な差動式パームサイズSPR計測装置の開発を行った。

また、従来のセンサセルは、シングルタイプであったため、参照を同時に測定することが出来なかった。そこで、本開発ではセンサセルを複合化して上記問題点を解決するという観点から、設計・試作し改良した。これにより2点同時に測定することによって、温度補償・リアルタイム観測としての使用方法が考えられる。

2-3 SPR免疫センサ

(i) 大きなSPR信号を得るために、金の表面にチオールを用いて自己組織化单分子膜(SAMs)を効率的に形成させ、高密度、かつ強固に抗体を固定する必要十分な条件についてIgG抗体を用いて検討した。

(試薬の調製)

・Piranha溶液 $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$

・リン酸塩 pH(7.33)標準溶液(Buffer) NaCl、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 の濃度がそれぞれ10、8.664、30.31mMになるように純水に溶解させる。

・SAMs活性化溶液 N-Hydroxysuccinimideと1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide、hydrochlorideを各々0.11mM、0.125mMの濃度に

なるように90%の1,4-Dioxaneで溶解させる。

(免疫センサチップ作製方法)

- ①金薄膜に高密度にSAMsを形成させるためには、金表面がきれいなことが必要であるため、Piranha溶液に金薄膜を浸漬後、純水で洗浄し、風乾する。
 - ②使用するチオール化合物を任意の使用量、エタノールに溶解したものに金薄膜を浸漬後、エタノール、純水の順で洗浄し、風乾する。この操作によって金表面にSAMsが形成される。
 - ③SAMs膜を活性化するために、SAMs活性化溶液に浸漬後、純水で洗浄する。
 - ④抗体を固定化させるため、抗体Buffer溶液(濃度10mg/リットル)にSAMs活性化後の金薄膜を浸漬させる。
- (ii) (i)で定められた条件に従って、抗体を固定化したSPR免疫センサを試作・検討を行った。

2-4 マルチチャンネルSPR測定装置

同時多点計測を目指したマルチチャンネルSPR測定装置を試作した。予め免疫反応の起こる一定の角度に入射角度を固定しておき、光源からの光をプリズム上に縦列に配置したマルチセンサに線焦点を結ぶように照射すると、測定対象の濃度によってSPR信号の大きさが異なるため、マルチセンサからの反射光の延長線上に受光素子を配置しておけば、SPR法による多点計測が実現できると考えた。

また、スクロース溶液を用いてこの試作したマルチチャンネルSPR装置の基本性能評価を行った。

結果・成果

3-1 光インターフェイス膜の検討

PVC膜をマッチングオイルに代わる光インターフェイス膜として使用するためには、(i)無色透明で、粘着性が高いこと、(ii)屈折率がマッチングオイルに近く、SPR信号が等しいこと、(iii)濃度変化による角度応答が等しいことなどを考慮しなければならない。これらの条件を満たすために、2-1で述べた方法でPVC膜を作製し、検討した。

その結果、PVC 0.2gに対してDOPとTCPの量がそれぞれ0.5gの組成でPVC膜を作製することにより、マッチングオイルに屈折率が近く、無色透明で粘着性のある光インターフェイス膜を作製することができた(表1)。

3-2 複合化センサセルと差動式SPR装置の検討

フィールドで安価で簡便にon site計測するために、センサセル化とパームサイズ差動SPRの試作を試みた。差動SPRはLED(770nm)、シリンドリカルレンズ、ミラー、2048pixelリニアCCDを用いて、プリズム上に線焦点を結像させることによって、線焦点上の2点で生じるSPRを分割ミラーで2分・差動化することに特徴を持つ一光源一受光素子方式により開発した。それはパー

ムサイズ(160x100x55mm)で携帯型差動SPR計測装置を実現した。その開発した複合化センサセルと差動式SPR装置を図2、3に示す。

3-3 SPR免疫センサの検討

(i) SAMsを高密度に形成するカルボキシアルカンチオールの種類の検討

SAMsを高密度・高配位に形成する条件を決定することは低分子有機物を測定するために必要なことである。そこでまず、3種類のカルボキシアルカンチオールを用い、前述した免疫センサチップ作製方法に従ってSAMsを形成後、抗IgG抗体固定化膜を作製し、そのSPR応答の比較検討を行った。

SAMs形成に使用したカルボキシアルカンチオールは10-Carboxy-1-decanethiol、7-Carboxy-1-heptanethiol、5-Carboxy-1-pantanethiolの3種類である。それぞれ0.1mMの濃度で調製し、金薄膜を2時間浸漬させ、SAMsを形成させた。また、抗体固定化は50mg/リットルの抗IgG Buffer溶液で1時間行った。これらのSPR免疫センサチップで測定した 4.7×10^{-8} MのIgGのSPR応答結果を図4に示す。

この結果より、使用した3種類のカルボキシアルカンチオールのうち、10-Carboxy-1-decanethiol、つまり、最も分子量が大きい(アルキル鎖が長い)ほどSPR応答が大きくなることが分かった。

(ii) SAMs形成時のカルボキシアルカンチオールの濃度検討

続いてSAMs形成に用いた10-Carboxy-1-decanethiolの濃度を変えたときのIgG(6.7×10^{-8} M)のSPR応答について比較検討を行った。その結果を図5に示す。

この図より、SAMs形成時に用いるカルボキシアルカンチオールの濃度は高くなるにつれてSPR応答も大きくなり、1mMのときに最大になることが分かった。(i)の結果も併せるとSAMs形成時に高密度・高配位にするカルボキシアルカンチオールの種類と濃度について条件を確立することができた。

(iii) SPR免疫センサチップによるIgG検出の検討

(i)、(ii)で最適化された条件で作製されたSPR免疫センサチップを用い、IgGの濃度に対するSPR応答の測定を行った。結果を図6に示す。

この結果より、 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ MでのIgGの濃度測定は可能であると考えられる。

3-4 マルチチャンネルSPR測定装置の検討

2-4で述べた概念により、5チャンネルのSPR測定装置が試作された(図7)。この装置の基本性能を評価するため、濃度を変えたスクロース溶液の測定を行った。この5チャンネルSPR装置は、濃度の異なるスクロースによって各チャンネルで起った

SPRに基づく反射光が検出された。この結果、従来基本的に単成分測定であったSPR計測のリアルタイム・マルチチャンネル同時計測化の可能性が明らかにされた。

今後の展望

本研究で開発されたSPR免疫センサシステムは従来の同性能機器に比べ安価(約1/10)でしかも小型化(170×100×50mm)されているため、オンライン計測に有効であることが明らかになりました。今後、家畜の疾病診断や乳中の残留物に対応し

た抗体とマルチチャンネルSPRを組合した携帯型マルチチャンネルSPR免疫センサの開発を進めることができます。オンライン計測に適した機器であること特性を生かすことによって、家畜の感染症や出産時期の予測診断時にその場で同時検査ができる、検査終了後(約10-20分)すぐに対処・治療ができることが予想できます。このような機器装置開発を行うことにより、北海道の畜産分野において有効な計測機器として期待されます。

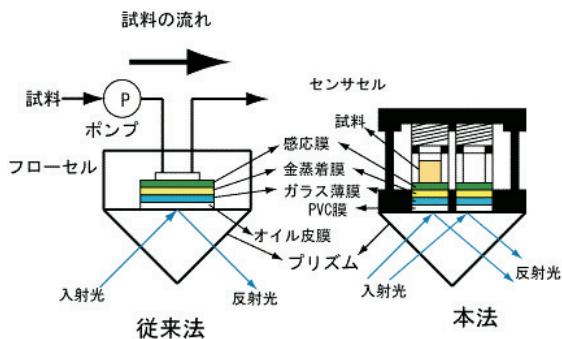


図1 従来法と本法のSPR免疫センサ

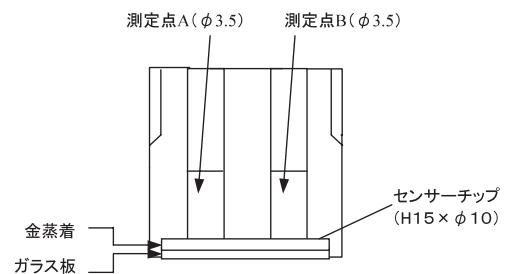


図2 複合化センサセル

| Compositon of PVC membrane | | | n_D | SPR spectral |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------------|
| PVC(g) | DOP(g) | TCP(g) | | |
| 0.2 | 0.5 | 0.5 | 1.5211 | obtained |
| 0.25 | 0.625 | 0.625 | 1.5218 | obtained |
| 0.3 | 0.75 | 0.75 | 1.5224 | obtained |
| 0.4 | 1.0 | 1.0 | 1.5241 | obtained |
| 0.5 | 1.25 | 1.25 | 1.5244 | not obtained |
| Matching oil | | | 1.5150 | - |

表1 各組成におけるPVC膜の屈折率とSPR信号



図3 差動式SPR検出器装置図

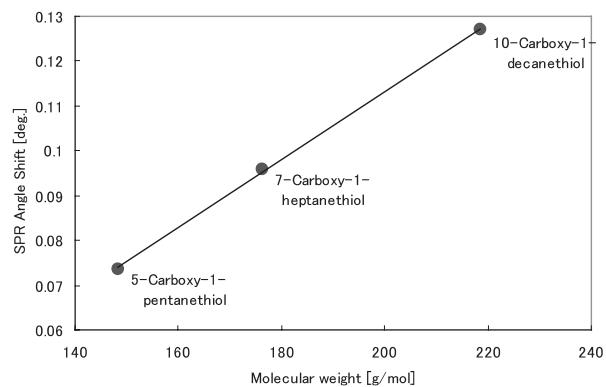


図4 カルボキシアルカンチオールの種類とSPR応答との関係

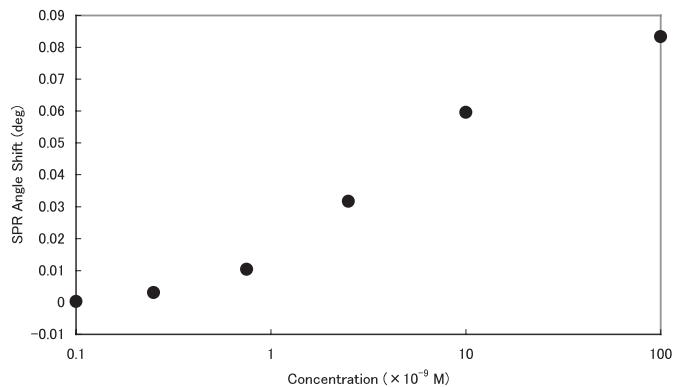


図6 試作したSPR免疫センサを用いたIgGの検量線

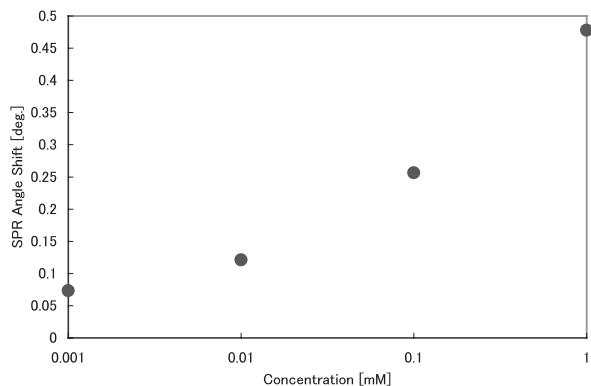


図5 10-Carboxy-1-decanethiolの濃度とSPR応答との関係

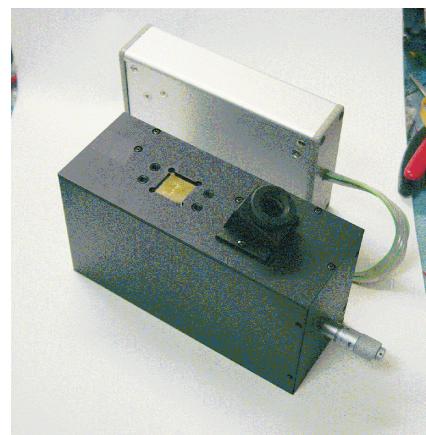


図7 マルチチャンネルSPR測定装置