

抗体 / 酸化グラフェン複合体固定化ゾルゲルシリカモノリス に基づく超高速 1 ステップマルチ診断デバイスの開発

大阪府立大学大学院 工学研究科 久本秀明

Development of Ultra Rapid and Single Step Multiplexed Diagnosis Device Based on
Sol-Gel Silica Monolith Immobilizing Antibody-Graphene Composite

Hideaki Hisamoto

Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

抗体 / 酸化グラフェン複合体を固定したゾルゲルシリカモノリスを作製し、蛍光標識抗体がグラフェン表面に近接することを原理としたイムノアッセイ法を検討した。ゾルゲルシリカモノリスを作製し、抗体 / 酸化グラフェン複合体の固定を試みたところ、作製したシリカモノリスの背圧が極めて高く、固定化は困難であった。そこで次に 2-ヒドロキシエチルメタクリレートにグラフェンを包含させたシート状材料を新規に開発し、抗原抗体複合体とフリーの蛍光標識抗体を分離する機能を付与するアプローチを試みた。その結果、抗原として IgM を用いた場合に蛍光標識抗体選択的なポリマー層透過と引き続くグラフェン表面への吸着に伴う蛍光消光を実現でき、新しいシングルステップイムノアッセイデバイスが開発できることを明らかにした。

Preparation of a sol-gel silica monolith with antibody/graphene oxide complex and an immunoassay method based on the principle that the fluorescently labeled antibody is brought close to the graphene surface was investigated. We tried to immobilize the antibody/graphene oxide composite by preparing a sol gel silica monolith, and found that the back pressure of the prepared silica monolith was extremely high, and immobilization was difficult. Then, a new sheet-type material containing graphene in 2-hydroxyethyl methacrylate was newly developed, and an approach was tried to impart the function of separating antigen-antibody complex and free fluorescent-labeled antibody. As a result, it was clarified that new single step immunoassay device can be developed by using fluorescence-labeled antibody selective polymer layer permeation and subsequent fluorescence quenching due to adsorption to graphene surface when IgM is used as antigen.

1. はじめに

本研究ではごく最近我々が見出した超高速タンパク検出技術である、「抗体 / 酸化グラフェン (Graphene oxide: GO) 複合体を用いる蛍光消光型超高速イムノアッセイ」¹⁾を、ゾルゲルシリカモノリスの大きな表面積と細孔制御特性に着目して高性能化すること、および、1 ステップマルチ診断デバイス作製を目指した。これらは、現在医療診断の現場で要求されている患者のベッドサイドにおける迅速マルチタンパク測定や、救急搬送中の病態不明患者の鑑別診断、さらには開腹手術で得られた検体を検査室に送らずその場で診断で

きるタンパク分析ツール開発につながることを期待される。

本研究ではまず、メタクリロイルオキシプロピトリエトキシシランを原料としたゾルゲルシリカモノリス²⁾を作製後、抗体固定化酸化グラフェンを固定し、イムノアッセイデバイスを作製するアプローチを試みた。次に、Fig.1に示す、

グラフェン含有ハイドロゲルシートの作製により、抗原抗体混合溶液からフリーの蛍光標識抗体のみを透過させて蛍光消光させ、抗原濃度を定量するアプローチを試みた。最終的に蛍光標識抗 IgM 抗体を含む可溶性膜をコーティングしたポリジメチルシロキサン (PDMS) 製マイクロ流路アレイと組合せ、IgM を抗原とした 1 ステップイムノアッセイデバイス開発を試みた。

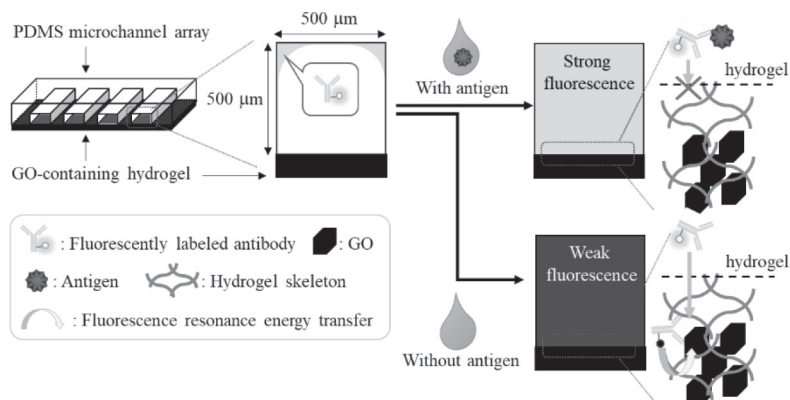


Fig.1 Schematic diagram of one step immunoassay based on graphene-containing hydrogel sheet.

2. 実験方法

2.1 ゾルゲルシリカモノリスの作製

予備検討として、メタクリロイルオキシプロピトリエトキシシラン 820mg、0.12M HCl 水溶液 220mg、トルエン 1000mg (開始剤濃度 5%) を混合し、内径 100 μm 角の角形キャピラリー内に注入後、80 $^{\circ}\text{C}$ 5 時間重合させ、ゾルゲルシリカモノリスの作製を試みた。

2.2 グラフェン含有ポリマーシートの作製と評価

酸化グラフェン 2.5mg、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) 200~700mg を分散させた 900 μL の超純水をシャーレに移し、そこへ 100 μL の超純水中に過硫酸アンモニウム (APS) を 10mg 添加した水溶液を添加し、70 $^{\circ}\text{C}$ に加温・重合後、超純水で洗浄してグラフェン含有ポリマーシートを作製した。ここでは HEMA 量と蛍光標識抗体透過能の関係および、タンパク吸着能を評価した。

2.3 キャピラリーアレイ型分析デバイスの作製と蛍光応答測定

幅・深さ 500 μm の PDMS 製マイクロ流路アレイをモールディング法で作製した。ここに、FITC 標識抗 IgM 抗体を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む可溶性膜溶液 (PEG 20000: 1mg/mL、PDMS-PEG: 1%、グリセロール: 5%) を導入・乾燥させ、2.2 で作製したシートと組み合わせて分析デバイスとした。各種試料溶液導入後の蛍光画像を解析し、性能評価を行った。

3. 結果と考察

3.1 ゾルゲルシリカモノリスの作製

Fig.2 に、内径 100 ミクロン角の角形キャピラリー内に試作したゾルゲルシリカモノリスの典型的な顕微鏡画像を示す。この材料は作製後に収縮が見られる場合があり、Fig. 1

左は作製したゾルゲルシリカモノリスが一部収縮しており、Fig.1 右では密に充填されていることがわかる。トルエン濃度の条件変更等、いくつかの条件変更を試みたが、密に詰まったゾルゲルシリカモノリスを再現よく得られる割合は極めて低く、また、密に詰まった場合にも、作製したゾルゲルシリカモノリスの未反応モノマーを洗浄するためのメタノール溶液導入時の背圧が極めて高いことから、現実的に抗体固定化グラフェンを内部まで導入・固定させることは困難であることがわかってきた。そこで次に、グラフェンを2-ヒドロキシエチルメタクリレートに包括させたシート状材料に基づくイムノアッセイの可能性を模索することとした。

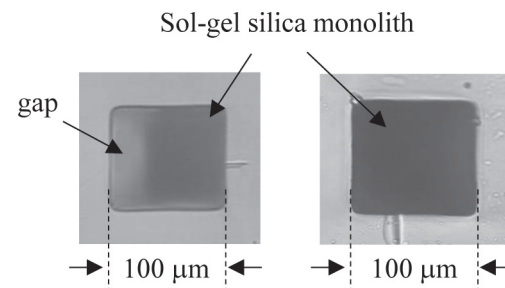


Fig.2 Sol-gel silica monolith prepared within square glass capillary.

3.2 グラフェン含有ポリマーシートの作製と評価

Fig.3 (A)に、試作したハイドロゲルシートの写真を示す。混合時の HEMA 濃度を調整すると、抗体分子の透過を制御できると考え、HEMA 濃度を調整して作製したハイドロゲルシートに蛍光標識抗体溶液 (Anti-human IgG-FITC) を接触させ、その際の蛍光強度を評価した結果、Fig.3 (B)に示すように、HEMA 濃度の増大に伴って、蛍光強度が増加することが明らかになった。これは HEMA 濃度増大に伴い、ゲルの網目密度が大きくなり、Anti-human IgG-FITC をゲル内に取り込みにくくなってしまったからだと考えられる。本測定原理では未反応の蛍光標識抗体が取り込まれ、蛍光消光することが前提であり、また抗原抗体複合体は分子ふるい分離することで、ゲルに取り込まれないことが重要であるため、最適な濃度は蛍光消光する条件でかつ、十分に網目密度が高いことである。従って 50% を最適な HEMA 濃度とした。

次に、シートが溶液中の蛍光標識抗体を吸着する際、共存するタンパクの影響を受けるかどうか確認するため、一定濃度の蛍光標識抗体にウシ血清アルブミン (BSA) を添加した溶液を接触させ、蛍光消光を評価し

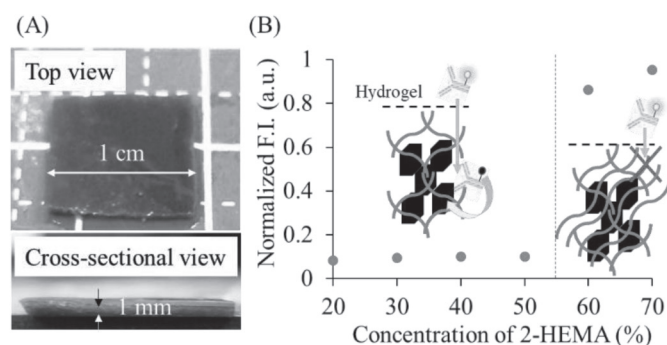


Fig.3 The prepared graphene-containing hydrogel sheet (A) and the relation between the fluorescence-labeled antibody permeation characteristic and the HEMA concentration (B).

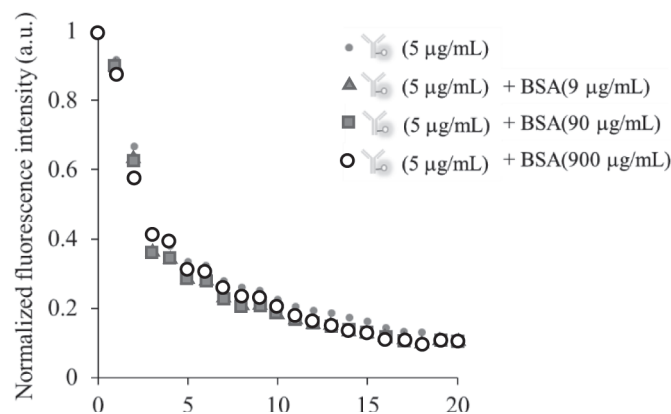


Fig.4 Fluorescence quenching profiles obtained by introducing fluorescently-labeled antibody solutions containing varied amounts of BSA onto GO-containing hydrogel.

た。Fig.4 に結果を示す。BSA 量を約 180 倍にしても蛍光消光挙動は変わらないことから、今回作製したゲルシートは非常に高いタンパク吸着能があることが明らかとなった。これらの結果は、ゲル中の GO によって提供される表面積が、マイクロチャネル中に存在する全てのタンパク質を吸着するのに十分な表面積であることを示唆している。900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA を使用した条件下では、マイクロチャネル(長さ 1cm $\times$ 幅 500 μm $\times$ 高さ 500 μm)では、抗体と BSA の絶対量は $1.25 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ と $2.25 \mu\text{g}$ である。一方、ゲルシート(長さ 1cm $\times$ 幅 500 μm $\times$ 厚さ 1mm)は約 15 μg の GO を含有している。IgG および BSA の単分子あたりの面積は、それぞれ 56.81 nm^2 および 34.8 nm^2 であると報告されているため^{3),4)}、これらの量の IgG および BSA が占める総面積は、それぞれ約 0.03 cm^2 および 7 cm^2 と算出される。一方、報告されている 2630 m^2/g の表面積を使用すると、15 μg の GO によって得られる表面積は約 400 cm^2 と計算される⁵⁾。したがって、GO はチャネル内に存在するタンパクを吸着するのに十分な表面積を有するといえ、イムノアッセイの実現に十分な機能のあることが明らかになった。

3.3 キャピラリーアレイ型分析デバイスの作製と蛍光応答測定

ここでは PDMS 製流路内にコーティングする可溶性膜の組成を検討した。開発当初、PEG 20000 と PDMS-PEG を材料とするコーティングを検討したところ、Fig.5 (a) - (c) に示すように、乾燥固定したコーティングの再溶解が不均一になることが明らかとなった。そこで、常温で液状のグリセロールの混合を検討したところ、Fig.5 (d) - (f)

に示すように、乾燥固定・再溶解ともに均一であることが明らかとなった。そこで、この組成を用いて蛍光標識抗体を固定し、マイクロ分析デバイスの作製を試みた。試料溶液をマイクロチャネルに導入する前、蛍光標識抗体はマイクロチャネルの角に残っているため、マイクロチャネルの中心に蛍光は観察されない。一方、試料溶液をマイクロデバイスに導入すると、蛍光標識抗体は完全に拡散し、その後免疫複合体を形成する。実際に PDMS マイクロチャネ

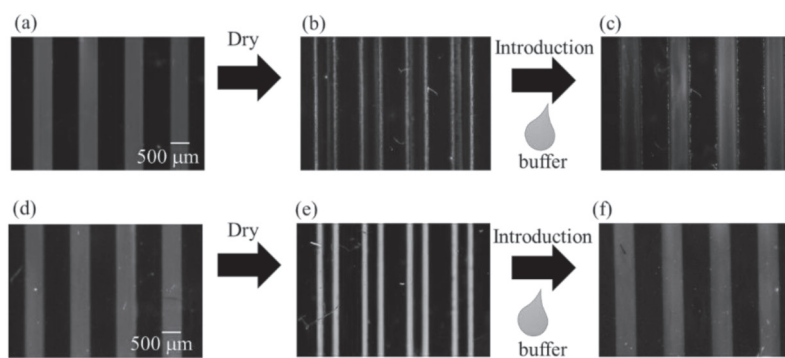


Fig.5 (a, b) Immobilization of coating containing reagents without glycerol onto PDMS microchannel and (c) non-uniform release of reagents. (d, e) Immobilization of coating containing reagents with glycerol onto PDMS microchannel and (f) uniform release of reagents.

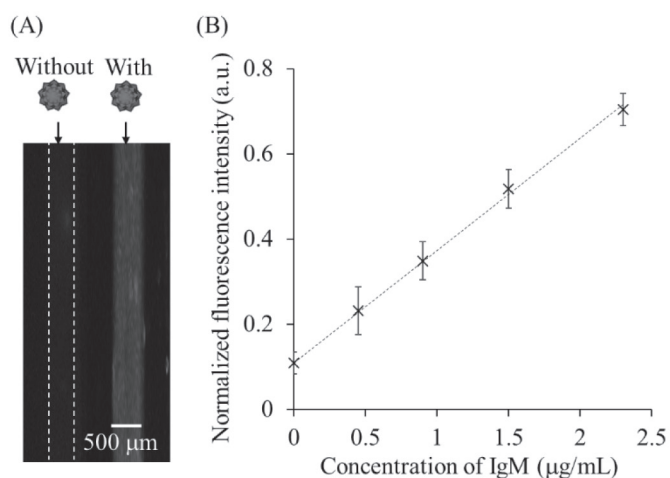


Fig.6 (A) Fluorescence images of typical response (B) Standard curve.

ルと GO 含有ゲルを組み合わせ、シングルステップイムノアッセイマイクロデバイスを製造したところ、Fig.6 (A)に示すように、ヒト IgM を含まない試料溶液を導入すると、蛍光標識抗体がゲルを通して拡散浸透した後、GO 表面に直接吸着して蛍光消光した。ここでは約 90% の FRET 効率が達成された。一方、ヒト IgM を含有する試料溶液を導入した場合、蛍光標識抗体との複合体は、そのサイズのためにゲルを容易に

透過することができず、高い蛍光強度を維持した。さまざまな濃度のヒト IgM を測定したところ、IgM 濃度と蛍光強度は直線関係を示し、 $0.29 \mu\text{g/mL}$ の検出限界を持つ検量線が得られた(Fig.6(B))。各 IgM 濃度(0、0.45、0.9、1.5、 $2.3 \mu\text{g/mL}$)の変動係数(CV)値は、それぞれ 0.24、0.24、0.13、0.087、0.054 であった。

蛍光応答プロファイルを図 7 に示す。応答プロファイルは、マイクロチャネルの中心(30×450 ピクセル)の蛍光強度をモニターすることによって測定した。蛍光強度は、フリーの蛍光標識抗体の溶解と、引き続くゲルへの浸透および GO 表面への直接吸着により、一旦上昇したのちに減少する傾向を示した。応答時間を「試料導入時間を含むアッセイ時間」として定義すると、全体の応答時間は約 20 分であった。

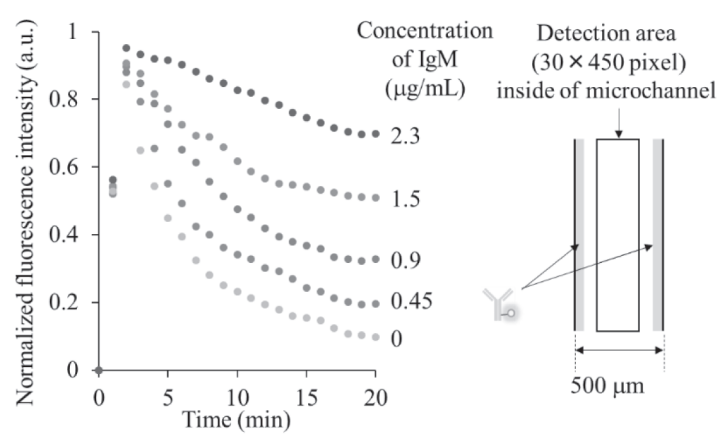


Fig. 7 Fluorescence response profile of the present immunoassay microdevice.

4. 結論

本研究ではゾルゲルシリカモノリスの作製・評価、グラフェン含有ゲルシートの作製・評価、および蛍光標識抗体を含むコーティングを有する PDMS マイクロチャネルの作製・評価を行い、最終的にグラフェン含有ゲルシートと PDMS マイクロチャネルを組み合わせたシングルステップイムノアッセイマイクロデバイスを開発した。

抗原の非存在下では、遊離の蛍光標識抗体はゲル中を浸透・蛍光消光した(FRET 効率: 90%)。免疫複合体が形成される場合、蛍光標識抗体はゲルネットワーク構造の透過が妨げられ、蛍光強度は維持された。操作手順は非常に単純な毛細管現象による少量の試料溶液導入であり、その際の応答時間は約 20 分であった。

従来のサンドイッチ型イムノアッセイは 2 種の抗体を必要とするのに対し、本研究のイムノアッセイは 1 種の抗体で済む点に優位性がある。今回は当初目的であった目的分子の IgM 測定に成功した。本法は、単に蛍光標識抗 IgM 抗体を別の蛍光標識抗体に変更することによって、多様な免疫血清学的試験およびウイルス診断に適用される大きな可能性を有する。

5. 謝辞

本研究は、2016 年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) A. Shirai, T. Henares, K. Sueyoshi, T. Endo, and H. Hisamoto, *Analyst*, 141, 3389 (2016).
- 2) M.T. Dulay, J.P. Quirino, B.D. Bennett, M. Kato, and R.N. Zare, *Anal.Chem.*, 73, 3921 (2001).
- 3) M. R. Nejadnik and W. Jiskoot, *J. Pharm. Sci.*, 104, 698 (2015).
- 4) T. Wangkam, S. Yodmongkol, J. Disrattakit, B. Sutapun, R. Amarit, A. Somboonkaew and T. Srihirin, *Curr. Appl. Phys.*, 12, 44 (2012).
- 5) M. D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An and R. S. Ruoff, *Nano Lett.*, 8, 3498 (2008).