

回折格子結合型表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (GC-SPFS) を用いた肝細胞癌マーカー (AFP) の免疫測定系の開発

Development of immunoassay system for α -fetoprotein (AFP) with Grating Coupled Surface Plasmon field-enhanced Fluorescence Spectroscopy (GC-SPFS)

○永江 剛典¹、彼谷 高敏¹、中村 幸登¹、野崎 昭俊¹、井出 陽一¹、石田 賢治¹、
須田 美彦¹、田和 圭子²

(1. コニカミノルタ (株)、2. 産総研)

○Kosuke Nagae¹, Takatoshi Kaya¹, Yukito Nakamura¹, Akitoshi Nozaki¹, Youichi Ide¹, Kenji Ishida¹,
Yoshihiko Suda¹, Keiko Tawa²

(1.Konica Minolta Inc., 2.AIST)

E-mail: kosuke.nagae@konicaminolta.com

【緒言】近年臨床検査の分野では、生体内のタンパク質を高感度に検出し疾病を早期診断する種々の技術が開発されており、その一つとして表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光法 (Surface Plasmon field-enhanced Fluorescence Spectroscopy, SPFS [1]) が挙げられる。ナノスケールの回折格子を利用した SPFS (GC-SPFS, [2]) は、プリズムを利用した SPFS (PC-SPFS) と同様、ELISA 等の従来検出法と比較してより高感度な測定が可能だけでなく、PC-SPFS に比べて装置小型化やセンサーコスト低減などのメリットが期待できる。固液反応効率の点においてはマイクロ流路を用いた測定系が非常に有効だが、煩雑な送液系が必要となる。POCT 向けの小型診断装置や、検査センター向けの高スループット機器に応用するには、送液系及びアッセイ工程を簡略化できるウェル型の測定系が有効と言える。本発表では、肝細胞癌マーカーである α -フェトプロテイン (AFP) をモデルとして、ウェル型 GC-SPFS による免疫アッセイ系の感度検証を実施したので報告する。

【実験方法】GC-SPFS 実験装置の概略図を Fig.1 に示す。センサチップ表面を回転中心として、投光系及び受光系が鉛直面内を回転する構造となっている。光源にはレーザーダイオード (中心波長 637nm) を用い、バンドパスフィルターにより波長帯を制限した。回折格子溝方向が光学系回転面に垂直になるように設置したセンサチップに対し、P 偏光させた励起光を入射した。反射光検出には CCD、蛍光検出には光電子増倍管を使用した。センサチップは以下の手順で作製した。まず、電子線描画によりシリコンウェハ上に作成した回折格子 (ピッチ約 430nm, 溝深さ約 30nm) を、UV ナノインプリントを利用して樹脂基板へ転写し、格子表面へ Cr 及び Au を蒸着した。次に、Au 膜表面にアミノ基末端チオール試薬を用いた自己集合単分子層を形成し、アミド結合により親水性高分子カルボメチル化デキストランの層を作成した。さらに架橋剤を用いて抗 AFP IgG 抗体をアミド結合により固定化した。上記チップを直径 8mm/20mm の 2 段型ウェルに固定し、反応工程では 8mm 部分を使用、メニスカスによる光路のずれを低減するため反射光及び蛍光測定は 20mm 部分までバッファを満たして実施した。蛍光測定においては、まずアッセイ実施前に投光系と受光系を同時にスキャンして反射率を測定し、反射率が極小となる入射角 (共鳴条件) を決定した。次に、AFP 抗原の 5 倍希釈系列 (1.6pg/ml ~ 1ng/ml) を準備し、AFP 抗原溶液の反応、Alexa647 で標識した抗 AFP IgG 抗体による蛍光標識、の順でアッセイを行った。最後に、共鳴条件において励起光を入射し、受光系をスキャンして得られた蛍光のピーク値をシグナルとした。

【結果】Fig. 2 に示すのは、シグナル平均値 (プロット) 及び最大/最小値 (エラーバー)、ゼロ濃度におけるシグナル平均値 (実線) 及び最大/最小値 (破線) である (N:4)。本結果より、ウェル型 GC-SPFS を用いた免疫測定系の検出限界は 8pg/ml 付近であることが示された。ウェル型 PC-SPFS との比較は、口頭発表において示す。

[1] T. Kaya et. al., *Anal. Chem.*, in press.

[2] K. Tawa et. al., *Optics Express*, Vol. 16, Issue 13, pp. 9781-9790 (2008)

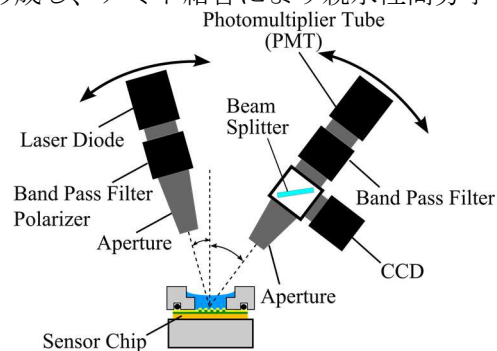


Fig. 1 Schematic view of GC-SPFS system

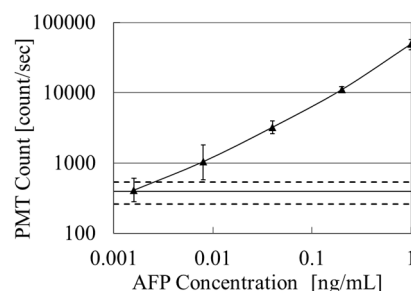


Fig. 2 Dose-response curve of the AFP assay