

プラズモニクセンサーチップを用いたヒト唾液検体中の 口腔カンジダ菌の定量検出

Development of the Plasmonic Sensor Chip for Quantitative Detection of Oral Candida in Human Saliva

関西学院大理工¹, 信州大医², °志水 星歌¹, 栗田 浩², 田和 圭子¹

Kwansei Gakuin Univ.¹, Shinshu Univ.², °Seika shimizu¹, Hiroshi Kurita², Keiko Tawa¹

E-mail: ktawa@kwansei.ac.jp

唾液中の口腔カンジダ菌が免疫力評価の重要なマーカーであることが示されてきたが¹⁾、口腔カンジダ菌数計測には従来法である ELIZA や細菌培養法に代わる迅速かつ簡便な検出方法が求められている。これまでに我々のグループでは、プラズモニクチップ（波長オーダーの周期構造レプリカに金属薄膜を成膜したチップ）上で生成される表面プラズモン共鳴（SPR）場を利用した蛍光増強法、格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光法（GC-SPF）法を用いた口腔カンジダ菌を高感度検出に取り組み、カンジダ菌アッセイの開発と界面調製の検討を行ってきた。本研究では開発した測定系を用い、カンジダ菌の細胞壁に存在するカンジダマンナンを検出マーカーとしてヒト唾液検体に含まれるカンジダ菌の定量評価を行った。

ピッチ 500 nm の周期構造を持つ 2 次元ホールアレイ型のレプリカを UV ナノインプリント法で作製し、スパッタ法で Ti/Ag/Ti/SiO₂ を成膜してプラズモニクチップとした。チップにポリスチレン溶液をスピコートして界面を疎水化し、ポリドーパミン膜を調製した。界面に抗体結合タンパク質を結合させた後、抗カンジダマンナン抗体を固定化した。熱処理したヒト唾液検体を希釈してカンジダ菌含有量の異なる溶液 (0.67, 0.4, 0.27, 0.07 U/mL) を作製し、この溶液をサンプルとして注入した後、Alexa 647 標識抗体を検出抗体としてサンドイッチアッセイを構築した。カンジダ菌計測では波長 633 nm のレーザー光を用い、反射率計測により SPR 角を決定後、入射角を SPR 角に固定し、検出角に対する蛍光強度スペクトルを測定した。

異なるカンジダ菌濃度に対する蛍光強度のプロットを図 1 に示す。測定した蛍光強度はカンジダ菌濃度との相関性が見られ、開発した測定系でのヒト唾液中のカンジダ菌の定量検出に成功した。

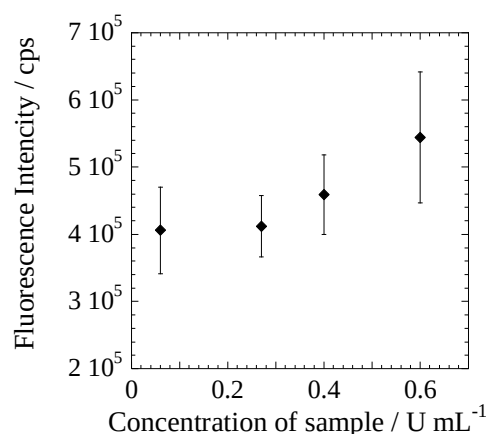


Fig.1 Fluorescence intensity plotted against Candida bacteria concentration in sample solutions.

[謝辞] 光硬化性樹脂を提供頂いた東洋合成工業株式会社、抗カンジダマンナン抗体を提供頂いたニプロ株式会社に感謝いたします。

1) Hayashi K., Kurita H et al., Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 29, 65. (2017)