

メチルパラチオン計測のための表面プラズモン共鳴 イムノセンサーの開発

田中, 真由美
矢部川電気工業株式会社

阪本, 一平
矢部川電気工業株式会社

中嶋, 秀
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

宗, 伸明
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

他

<https://hdl.handle.net/2324/7324464>

出版情報 : BUNSEKI KAGAKU. 56 (9), pp.705-712, 2007. The Japan Society for Analytical Chemistry
バージョン :
権利関係 : © 2007 The Japan Society for Analytical Chemistry

報 文

メチルパラチオン計測のための表面プラズモン共鳴 イムノセンサーの開発

田中真由美^{1,2}, 阪本 一平¹, 中 嶋 秀², 宗 伸 明²,
中野 幸二², Duck-Hwa CHUNG³, 今任 稔彦^{®2}

表面プラズモン共鳴現象 (SPR) を利用したオンサイトで簡便に残留農薬を計測できるフロー型イムノセンサーの開発を目的とし, メチルパラチオン (MP) の間接競合イムノアッセイ法を確立した. 牛血清アルブミン (BSA) に MP を化学結合した MP-BSA コンジュゲートを SPR センサーチップ上に物理吸着によって固定化し, これをフローシステムに組み込み, MP に対する応答性を検討した. SPR センサーチップは, 50 ppm MP-BSA コンジュゲート溶液をセンサーチップへ導入し, 続いて 10 mg/mL BSA 溶液を導入し, 非特異吸着を防ぐために未修飾のチップ表面をブロッキングして作製した. MP-BSA コンジュゲートのセンサーチップへの固定化密度を, 飽和吸着量の約 20% として作製したセンサーチップを用いて, 間接競合法により 60 ppm 抗 MP 抗体を含む MP 溶液 (1~5000 ppb) を SPR センサーに導入し, SPR センサーの共鳴角度変化を測定した. 本法による MP の検出限界は, MP 濃度ゼロにおける角度変化の 85% における MP 濃度とすると, 10 ppb であった. また, ペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液をセンサーチップに導入することによって, センサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートと結合した抗 MP 抗体を解離させることができ, 1 枚のセンサーチップを用いて少なくとも 20 回繰り返し測定が可能であることが分かった.

1 緒 言

近年, ダイオキシン類や人工低分子有機物による環境汚染が我々の生活環境の脅威となっている^{1)~5)}. 安心・安全の社会を構築するためには, 生活環境の安全性を確認するための迅速・簡便で, 高感度な分析・計測法の開発が求められている. 特に, 食品中に残留する農薬は, 我々の健康に直接的な影響をもたらすので, 迅速で高感度な測定法が要求されている. 現在, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁾⁷⁾やガスクロマトグラフ/質量分析法 (GC/MS)^{8)~12)}による一斉分析法が有効な方法と考えられている. これらの方法は, 高感度ではあるが, 試料の前処理やクリーンアップなどが必要である. 一方, 酵素免疫測定法 (ELISA 法)^{13)~16)}によるイムノアッセイ法などが簡便な分析法と考えられるが, 測定に長時間要することがあり, 着色試料については前処理が必要なこともある. したがって, ELISA 法に代わる迅速で簡便な, しかもオンサイトで使用可能な小型の簡易測定機器の開発が望まれている.

近年, ELISA 法に代わるイムノアッセイ法として, 表

面プラズモン共鳴現象 (SPR) を利用する, いわゆる SPR 免疫測定法が注目されている^{17)~21)}. SPR 測定装置は, 分子間の相互作用に伴うセンサーチップ上の屈折率変化を SPR 測定装置の共鳴角度の変化として測定することができるので, ELISA 法で必要とされる標識が不要であるため簡便で, 分子間の相互作用をリアルタイムで観測できる. タンパク質間やタンパク質と DNA などの分子間のみならず抗原-抗体間の相互作用の研究に活用されている^{22)~26)}. 現在市販されている ELISA 法に残留農薬簡易測定キットによるアッセイに要する時間は 90 分であり, それに対し SPR におけるアッセイに要する時間は 18 分であることが報告されている²⁷⁾. これより SPR 法が迅速であると言えるが, 更なる迅速さ, 簡便さが求められている. SPR 測定装置を用いてイムノアッセイ法を行う方法としては, サンドイッチ法²²⁾²³⁾や直接法²⁴⁾²⁵⁾あるいは間接競合法²¹⁾²⁸⁾がある. 前二者の方法は, 分子量が大きい物質に対しては適用が容易であるが, 低分子量の物質に対しては, 抗原-抗体反応に伴うセンサーチップ上の屈折率変化が小さいので, 目的物質に対する感度が十分ではない場合が多い. したがって, 本報のように, 測定対象物質が農薬のような低分子化合物である場合, 高感度に検出するためには, 抗原-抗体反応により大きな屈折率変化を引き起こすことができる, 間接競合法の適用が有効であると考え

¹ 矢部川電気工業株式会社: 836-0844 福岡県大牟田市浄真町 11

² 九州大学大学院工学研究院応用化学部門: 819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

³ Graduate School of Gyeongsang National University: Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

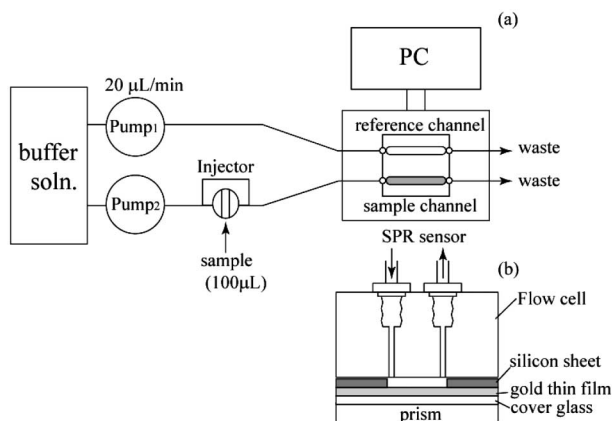


Fig. 1 Flow system with SPR sensor
(a) Flow system; (b) Flow cell

られる²¹⁾²⁸⁾。すなわち、間接競合法では、測定対象物質のコンジュゲートをセンサーチップ上に固定化し、そこに一定濃度の抗体を含む測定対象物質（抗原）の溶液を導入する。抗体がセンサーチップ上のコンジュゲートと同一溶液内にある抗原との間で競合的に免疫反応を起こし、結果的にセンサーチップ上のコンジュゲートに分子量の大きな抗体が結合することによって変化する SPR 信号を測定するものである。

本研究は、メチルパラチオンを測定対象として、これを間接競合法に基づいて高感度に測定するための SPR イムノセンサー測定法の開発を目的としている。メチルパラチオンは有機リン系殺虫剤のひとつであり、強力な殺虫剤として使用されていたが、強い急性毒性をもつとして、現在日本では農薬としての使用が禁止されている。しかし、海外からの野菜などの日本への輸入は増加しており、輸入された野菜の残留農薬も問題となっている。メチルパラチオンの日本での検出規定値は対象試料により異なるが 0.05～5 ppm である。例えば、穀類・豆類は 1.0 ppm、一般野菜は 1.0 ppm、果実類は 0.2 ppm、肉類は 0.05 ppm であり²⁹⁾、これらを計測可能である分析法を目指し、構築する必要がある。本報では、メチルパラチオンを測定対象としているが、得られた知見は他の農薬測定にも適用が可能であると考えられる。

2 実 験

2.1 試 薬

水はすべて ADVANTEC 製純水製造装置より精製した脱イオン水を使用した。リン酸水素二ナトリウム（無水）、リン酸二カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸、塩酸、30% 過酸化水素、エタノール、メタノール、牛血清アルブミン（BSA）及び豚胃由来ペプシン（酵素活性：3400 units/mg）は和光純薬製のものを用いた。グリシン

は BIO-RAD Laboratories のを用いた。メチルパラチオン（MP）、合成された MP-BSA コンジュゲート³⁰⁾及び抗 MP 抗体は韓国慶尚大学農学部の Chung 教授より提供されたものを用いた。

2.2 溶液の調製

0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）は 0.20 g KH_2PO_4 、1.14 g Na_2HPO_4 、8.0 g NaCl 及び 0.20 g KCl を 1 L の脱イオン水に溶解して調製し、オートクレーブで滅菌した。0.1 M リン酸緩衝液を用いて、種々の濃度の MP-BSA コンジュゲート溶液（50, 110, 180, 260, 350, 450 ppm）及び種々の濃度の BSA 溶液（10, 50, 100, 200, 300, 400, 600 ppm）を調製した。MP 溶液は、100 ppm MP メタノール溶液をメタノールで 10 ppm に希釈し、この溶液を 0.1 M リン酸緩衝液で希釈し、所定濃度の MP 溶液（1～150 ppb）を調製した。pH 2 HCl-glycine 溶液は、glycine 0.75 g を脱イオン水に溶解し、0.1 M HCl で pH 2 に調節し、50 mL にメスアップして調製した。

2.3 SPR センサー測定システム

SPR センサーはメビウスアドバンテクノロジー製の DUAL SPR DSPR-200 差動式小型 SPR センサーを用いた³¹⁾。SPR センサーによる測定のためのフローシステムを Fig. 1 (a) に示す。システムは、SPR センサー、フローセル、ポンプ（参照側は Carvo 3000X、試料側は JASCO PU-1580 HPLC 用ポンプ）及びインジェクター（Rheodyne, 7125、ループ容積は 100 µL）より構成した。SPR センサーの信号は参照側と試料側の共鳴角度の差として計測した。フローセルはアクリル製で、二つの流路（幅 3 mm × 長さ 8 mm）を持つ厚さ 0.5 mm のシリコンシートをカバーガラス上の 45 nm の金を蒸着してある金薄膜（センサーチップ）に挟むようにして組み立てた [Fig. 1 (b)]。センサーチップ（16 mm × 16 mm × 0.15 mm）はエリオテック製である。組み立てたフローセルを SPR センサーのプリズム上に固定した。この際、屈折率 1.5616 のマッチングオイルをセンサーチップのカバーガラス背面とプリズムの間に塗り、センサーチップとプリズムを密着させた。すべての測定は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の空気恒温槽中で行った。

2.4 金薄膜の洗浄

センサーチップはピランハ溶液（30% 過酸化水素水：濃硫酸 = 1 : 3）に 10 分間浸漬後、純水及びエタノールで 3 回洗浄し、窒素ガスにより金表面に残る水分を乾燥させた。乾燥後、センサーチップを速やかに SPR センサーのフローセルにセットした。

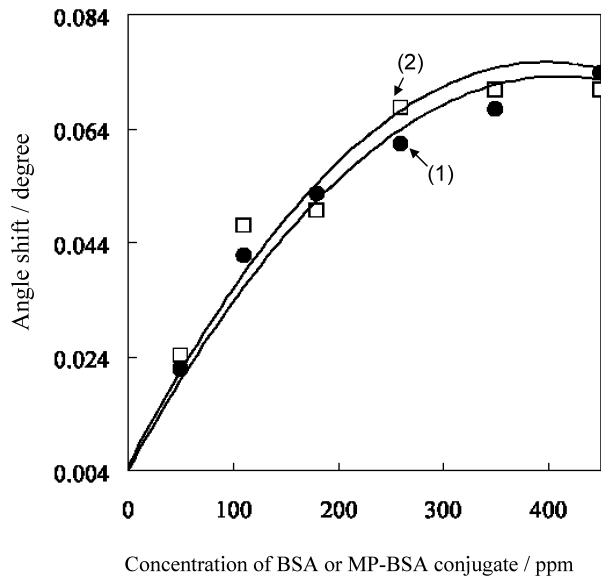


Fig. 2 Relationship between angle shift and concentration of BSA solution and MP-BSA conjugate solution

(1) ●: BSA, Injected sample: 50, 110, 180, 260, 350, 450 ppm; (2) □: MP-BSA, Injected sample: 50, 110, 180, 260, 350, 450 ppm; Carrier solution and flow rate: pH 7.4 PBS, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$

2.5 センサーチップへのMP-BSAコンジュゲートの固定化の検討

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を流量 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液しながら, インジェクターから 100 μL の MP-BSA コンジュゲート溶液 (50, 110, 180, 260, 350, 450 ppm) を注入した. センサーチップ表面への MP-BSA コンジュゲートの物理吸着に伴う SPR センサーの共鳴角度の変化を測定した. この場合, 同一のセンサーチップを用い, 低い濃度の MP-BSA コンジュゲート溶液から順に逐次的に注入して SPR センサーの信号を測定した. MP-BSA コンジュゲートのセンサーチップへの固定化状態を評価するために, 十分な試料がある BSA を MP-BSA コンジュゲートの代替として用い, BSA のセンサーチップへの吸着平衡を検討した. MP-BSA コンジュゲートの固定化の場合と同様に, 同一のセンサーチップを用いる場合について検討した. MP-BSA コンジュゲート溶液と同様の濃度で行った.

2.6 SPR センサーによるメチルパラチオン免疫測定

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で送液しながら, 50 ppm MP-BSA コンジュゲート溶液 100 μL をインジェクターから注入し, センサーチップ表面に MP-BSA コンジュゲートを物理吸着により固定化した. 続いて, 10 mg/mL BSA 溶液 100 μL を注入し, センサーチップの未修飾部分を BSA によりブロッキングをした. ブロ

ッキングによる SPR センサーの共鳴角度がほぼ一定になるまで BSA 溶液の注入を数回繰り返した. 最後に, あらかじめ調製しインキュベートしておいた 60 ppm 抗 MP 抗体と種々の濃度の MP 溶液を混合しておいた試料溶液 100 μL をインジェクターから注入した. 試料溶液中の抗 MP 抗体がセンサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートに結合することに伴う SPR センサーの共鳴角度変化を測定し, 試料中の MP 濃度と SPR センサーの共鳴角度の変化の関係から検量線を作成した. 測定後, 1 ppm ペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液 100 μL を注入し, センサーチップ上の抗 MP 抗体を解離させ, センサーチップの再生を行った.

2.7 マトリックスの影響の検討

本法を野菜などの食品中の MP 測定に適用するために, 試料のマトリックスの影響を検討した. マトリックスとしては市販のキャベツを用いた. キャベツをはさみで約 5 mm \times 5 mm に切り刻み, 乳鉢でペースト状にした. ペースト状にした試料 5 g を遠心管にはかり取り, メタノール 25 mL を加え 30 分間振とう抽出した. その後, 脱脂綿を詰めたシリンジに抽出した溶液を 5 mL 注ぎ込み, 120 ppm 抗 MP 抗体に同体積の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 及び同体積のキャベツ抽出液を加えた 2 種類の混合溶液を, MP コンジュゲートを固定化したセンサーチップに導入し, それぞれの場合の SPR 角度変化を測定した. また, 150 ppb の MP 溶液に抗 MP 抗体を含むキャベツ抽出液を加えた試料について同様の操作を行った.

3 結果及び考察

3.1 MP-BSA コンジュゲートのセンサーチップへの固定化

本法による間接競合免疫測定法においては, MP-BSA コンジュゲートを固定化したセンサーチップを用いる方法を採用している. したがって, センサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートの固定化状態は, 抗 MP 抗体との免疫反応の反応性に大きな影響を与えると考えられる. そこで, BSA 溶液と MP-BSA コンジュゲート溶液の 2 つの溶液で BSA の吸着状態を調べた. 1 枚のセンサーチップに逐次的に異なる濃度の BSA 溶液及び MP-BSA コンジュゲート溶液を注入した場合, センサーチップ上の BSA 及び MP-BSA コンジュゲートの吸着に伴う SPR センサーの共鳴角度の変化をそれぞれ Fig. 2 (1) 及び (2) に示す. いずれの場合も, 濃度の増加とともに共鳴角度が増加していることが分かる. 一般に, 金薄膜表面へのタンパク質の物理吸着は比較的強く, ラングミュア型の吸着等温式に従うことが知られている. 例えば, 濃度 [BSA] の BSA 溶液がセンサーチップ表面で吸着平衡にあり, BSA の吸着定数を K

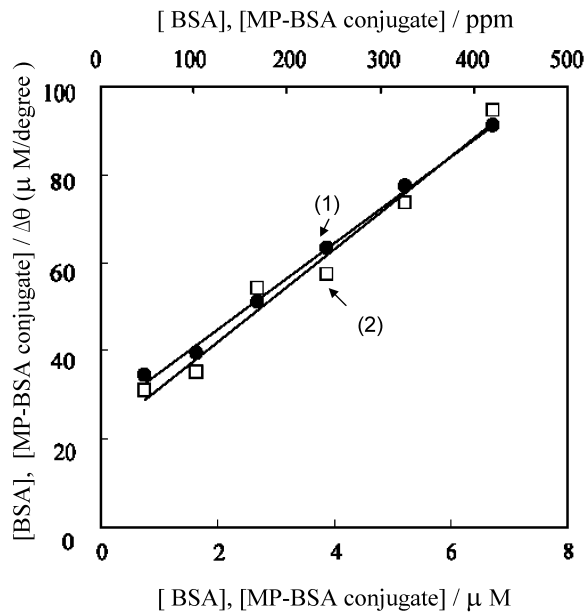


Fig. 3 Relationships between [BSA] and [BSA]/ $\Delta\theta$ and between [MP-BSA] and [MP-BSA]/ $\Delta\theta$ for verification of Langmuir adsorption isotherm

とすると、BSAの吸着に伴うSPRセンサーの共鳴角度変化 $\Delta\theta$ は式(1)で与えられる²¹⁾。

$$[\text{BSA}] / \Delta\theta = [\text{BSA}] / \Delta\theta_{\text{max}} + 1 / \Delta\theta_{\text{max}} K \quad (1)$$

ここで、 $\Delta\theta_{\text{max}}$ はBSAがセンサーチップ上に飽和吸着しているときの共鳴角度変化である。BSA及びMP-BSAコンジュゲートのセンサーチップへの吸着がラングミュア型の吸着等温式に従うならば、Fig. 2で得られたデータを用いて、 $[\text{BSA}] / \Delta\theta$ を $[\text{BSA}]$ に対してプロットすれば、傾きが $1/\Delta\theta_{\text{max}}$ で、y切片が $1/(\Delta\theta_{\text{max}} K)$ の直線が得られる。実際、Fig. 3のように、 $[\text{BSA}] / \Delta\theta$ と $[\text{BSA}]$ の間に良好な直線関係が得られ、本系に対してラングミュア型等温吸着式が成立することが分かる。得られた直線の切片と傾きから、 $\Delta\theta_{\text{max}}$ 及び K に対してそれぞれBSAでは $\Delta\theta_{\text{max}} = 0.10^\circ$ 、 $K = 3.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 及びMP-BSAコンジュゲートでは $\Delta\theta_{\text{max}} = 0.095^\circ$ 及び $K = 5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ が得られた。このことより、MP-BSAコンジュゲートのセンサーチップへの吸着定数や飽和吸着密度はBSAのそれらとほぼ同じであると言える。BIACORE社のSPR装置の仕様によれば、 0.1° の共鳴角度変化はタンパク質の吸着密度が 1 ng/mm^2 に対応するので、例えば、MP-BSAコンジュゲートが飽和吸着する場合はMP-BSAコンジュゲートが 0.95 ng/mm^2 の密度で、すなわち $1.4 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2$ の密度で吸着するものと推測される。BSAの分子量 67 kDa と、一般的なタンパク質の密度³²⁾ (1.4 g/cm^3)から、BSA1分子の体積を算出すると $7.8 \times 10^{-20} \text{ cm}^3$ であり、球形と仮定する

と半径は $2.7 \times 10^{-6} \text{ mm}$ と推定される。このBSAがセンサーチップに単分子吸着した場合の 1 mm^2 当たりの密度を算出すると $7.4 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2$ となる。したがって、SPRセンサーの共鳴角度から推定した $1.4 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2$ とほぼオーダー的には一致している。現実的にはBSAの等電点が4.9であることと、溶液のpHが7.4であることを考慮すると、BSAは負に荷電しており、分子間の静電的な反発などが考えられるので、分子径から算出した最密充填状態での吸着密度より小さくなるのは合理的である。実際、大島らは水晶振動子マイクロバランス(QCM)法での測定により、分子量 146 kDa のタンパク質において $1 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2$ の密度で吸着していることを報告している³³⁾。BSA分子量が大島らが用いたタンパク質より小さいことを考慮すると、 $1.4 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2$ のBSAの吸着密度は合理的な値と言える。センサーチップ上に固定化されたMP-BSAコンジュゲートが密である場合には、抗MP抗体の結合に対して立体障害により抗MP抗体との反応性が低下するものと考えられる。MP-BSAコンジュゲートの限られた試料のために、MP-BSAコンジュゲートの固定化密度に対する抗MP抗体の反応性に関する実験的検討は行っていないが、本報ではセンサーチップ上のMP-BSAコンジュゲート間に十分な空間を保つために、MP-BSAコンジュゲートのセンサーチップ上での固定化量が飽和吸着量の約20%になるように50 ppmのMP-BSAコンジュゲート溶液を注入した。

3・2 繰り返し測定の検討

MP-BSAコンジュゲートを固定化したセンサーチップが繰り返し測定に使用できれば、センサーチップごとのばらつきを考慮することもなく、繰り返し再現性のみならずコストの面においても有利である。そこで、センサーチップの再生法について検討した。すなわち、免疫アッセイを行った後のMP-BSAコンジュゲートに結合している抗MP抗体を解離する方法について検討した。Fig. 4に再生できなかった場合のセンサーグラムを示している。洗浄したセンサーチップを取り付けたSPRセンサーにMP-BSAコンジュゲート溶液を導入すると、MP-BSAコンジュゲートのセンサーチップ表面への吸着に伴って共鳴角度が増加している{Fig. 4(a)}。次に抗MP抗体溶液を導入すると、センサーチップ上のMP-BSAコンジュゲートとの結合に伴って共鳴角度が増加している{Fig. 4(c)}。三浦らは²⁹⁾、センサーチップ上で生成した抗原-抗体複合体の解離にペプシンを含むHCl-glycine溶液を用いているので、本系にもこの溶液を適用した。その結果、Fig. 4(d)に示すように、この溶液がセンサー表面を通過する際に、いわゆるバルク効果と言われる注入された溶液の屈折率がキャリヤー液より低いために負のピークが見られるが、HCl-glycine

溶液が通過した後も共鳴角度は注入する以前と同じである。すなわち、共鳴角度は MP-BSA コンジュゲートを固定化したときに示す共鳴角度に戻っていない。この一つの理由は、MP-BSA コンジュゲートに結合した抗 MP 抗体が完全に解離していないことが考えられる。もう一つの理由として、MP-BSA コンジュゲートのセンサーチップへの固

定化量を前述のように飽和吸着量の約 20% にしているため、センサーチップの未修飾部分の金薄膜表面に抗 MP 抗体が非特異的吸着し、これがペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液では除去できないためと考えられる。そこで、MP-BSA コンジュゲートを固定化させた後に、BSA で金薄膜表面の未修飾部分をブロッキングすることにした。すなわち、センサーチップ上に MP-BSA コンジュゲートを固定化した後、10 mg/mL BSA 溶液をセンサーチップ上に導入した。その際の SPR センサーの共鳴角度の変化を Fig. 5 (b) に示す。BSA ブロッキングにより約 0.1° の共鳴角度の増加が見られ、未修飾部分に BSA が吸着していることを示唆している。その後、60 ppm 抗 MP 抗体を含む MP 試料溶液をセンサーチップに導入したところ [Fig. 5 (c)], 約 0.048° の角度上昇があり、これはセンサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートに抗 MP 抗体が結合したことを示している。更にその後、ペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液を導入すると、BSA でブロッキングした後の共鳴角度 (0.17°) よりもやや低下している (0.12°)。この理由は、現段階では明確ではないが、センサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートと結合している抗 MP 抗体が解離したうえに、更に比較的濃度の高い BSA 溶液でブロッキングした際に多重吸着している BSA が脱離したのではないかと考えられる。実際、次のステップで、更に抗 MP 抗体と MP 溶液の混合液をセンサーチップに導入することにより共鳴角度が増加し、再びペプシン

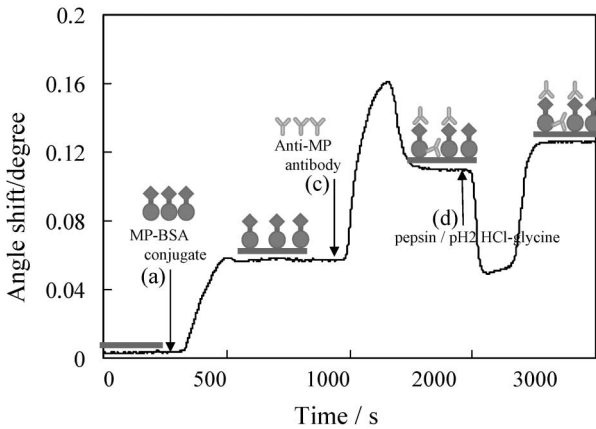


Fig. 4 Regeneration of the sensor chip by injecting dissociation solution

Injected solution: (a) 50 ppm MP-BSA conjugate; (c) 60 ppm anti-MP antibody; (d) pH 2 HCl-glycine containing 1 ppm pepsin; Injected volume: 100 μ L; Carrier solution and flow rate: pH 7.4 PBS, 20 μ L/min

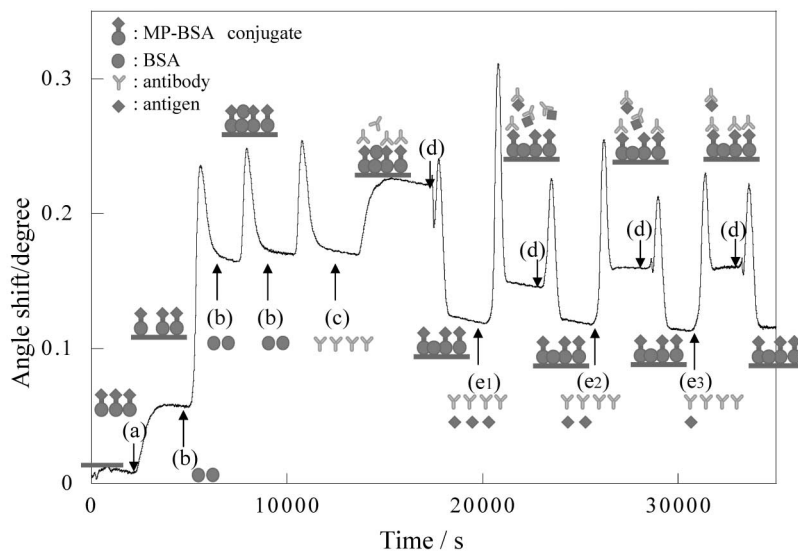


Fig. 5 Regeneration of the sensor chip by injection dissociation solution

Injected solution: (a) 50 ppm MP-BSA conjugate; (b) 10 mg/mL BSA solution; (c) 60 ppm anti-MP antibody; (d) pH 2 HCl-glycine solution containing 1 ppm pepsin; (e₁) 150 ppm MP solution containing 60 ppm anti-MP antibody; (e₂) 100 ppm MP solution containing 60 ppm anti-MP antibody; (e₃) 80 ppm MP solution containing 60 ppm anti-MP antibody; Injected volume: 100 μ L; Carrier solution and flow rate: pH 7.4 PBS, 20 μ L/min

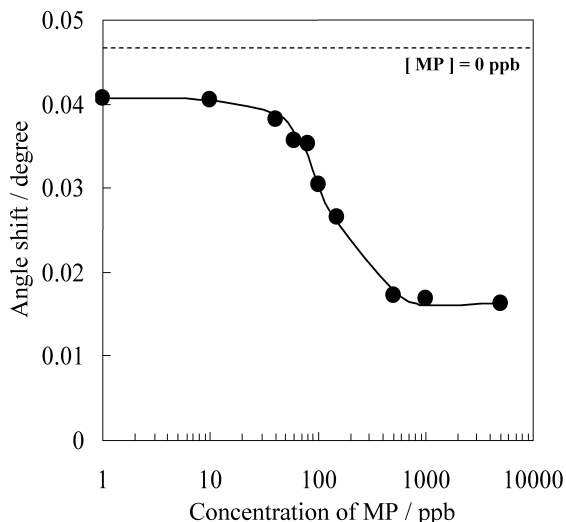


Fig. 6 Calibration curve for MP obtained by competitive assay method

Injected sample: MP (1, 10, 40, 60, 80, 100, 150, 500, 1000, 5000 ppb) solution containing 60 ppm anti-MP antibody; Carrier solution and flow rate: pH 7.4 PBS, 20 μ L/min

を含む pH 2 HCl-glycine 溶液を導入すると、先の共鳴角度に戻っている。このことは、ブロッキングした BSA の更なる脱離なしに抗 MP 抗体を解離できていることを示している。その後、同操作を 20 回繰り返し戻しても同様にベースラインに戻ってくることが確認できた。このことより、1 枚のセンサーチップで繰り返し測定ができることが分かった。センサーチップの再生について、他に 0.1 M HCl 溶液や 0.1 M NaOH 溶液などを用いて試みたが、再生はできなかった。ペプシンはタンパク質の分解酵素であるので、センサーチップ上に固定化している MP-BSA コンジュゲートやブロッキング剤の BSA の脱離も促進する可能性も考えられたが、1 ppm 程度のペプシンを再生溶液として使用してもその後固定化膜の活性は落ちておらず、繰り返し使用でき、ペプシンによる影響はないことが言える。

3.3 検量線の作成

以上のような検討により、Fig. 5 に示す実験条件で、MP に対する検量線を作成した。すなわち、MP-BSA コンジュゲートをセンサーチップ上に固定化し、間接競合法による MP に対するイムノアッセイを行った。MP の測定濃度範囲を 1~5000 ppb とし、60 ppm の抗 MP 抗体を含む試料に対して SPR センサー応答を調べた。各試料に対する測定の後に、ペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液を注入することによってセンサーチップを再生し、MP 濃度が薄い順から測定を行った。得られた検量線を Fig. 6 に示す。試料注入によって変化した SPR センサーの共鳴角度

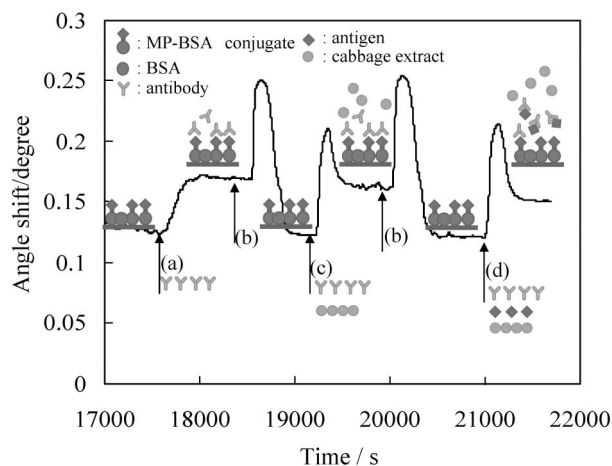


Fig. 7 Calibration curve for MP obtained by competitive assay method

(a) 60 ppm anti-MP antibody; (b) pH 2 HCl-glycine solution containing 1 ppm pepsin; (c) 60 ppm anti-MP antibody in cabbage extract; (d) 150 ppm MP solution containing 60 ppm anti-MP antibody in cabbage extract; Injected volume: 100 μ L; Carrier solution and flow rate: pH 7.4 PBS, 20 μ L/min

の変化と試料濃度の間で間接競合法で見られるシグモイド型の検量線の関係が得られている。 $n = 4$ における相対標準偏差は 5~44% であった。相対標準偏差 (RSD) は大きいものの、検量線は良好なシグモイド型の検量線が得られている。検量線より、MP 濃度がゼロのときの共鳴角度の 85% における共鳴角度を示す MP 濃度を検出限界濃度とすると、本法の検出限界濃度は 10 ppb である。この検出下限濃度は同じ抗 MP 抗体を用いた蛍光偏光免疫測定法で得られた値とほぼ同程度である³⁴⁾。また、GC/MS を用いたメチルパラチオンの測定検出限界濃度は 1 ppb と報告されている³⁵⁾。GC/MS に比べて本 SPR 法の感度は劣るが、食品中の残留メチルパラチオンの規定値である 0.05~5 ppm (対象物質により異なる) は十分に測定可能である。

3.4 実サンプルのマトリックスの影響

実際の食品中の残留農薬分析において、そのマトリックスからの影響について検討しておく必要がある。そこで、上述の実験条件と同様の操作でキャベツから抽出した溶液について免疫測定を行った。60 ppm 抗 MP 抗体の 0.1 M リン酸緩衝液及び 60 ppm の抗 MP 抗体を含むキャベツ抽出液についてのセンサーグラムを Fig. 7 (a) 及び Fig. 7 (c) に示す。両者の場合の試料注入に伴う角度変化はいずれも 0.04° であり、キャベツ抽出液によるマトリックスの影響はほとんどないということが分かる。また、60 ppm 抗 MP 抗体を含む溶液に 150 ppb の MP 溶液を添加したキャベツ抽出液についてのセンサーグラムを Fig. 7

(d) に示す. この場合の試料注入に伴う角度変化は 0.029° であり, キャベツ抽出液を含まない場合の角度変化, すなわち, Fig. 6 の検量線の値 (0.028°) とほぼ同じ角度変化である. したがって, キャベツ抽出液に 150 ppb の MP を添加した試料についても, マトリックスの影響はほとんど無いと言える.

4 結 言

本論文において, MP-BSA コンジュゲート固定化したセンサーチップを用いて, 間接競合法による MP の SPR センサー免疫測定法を検討し, 10 ppb の検出可能濃度を持つ MP の測定法を確立することができた. センサーチップ上に固定化する MP-BSA コンジュゲートの固定化密度については, BSA のラングミュア型の等温吸着式の解析から, 飽和吸着密度の約 20% になるようにした. 本報では, 固定化密度とセンサーチップ上の MP-BSA コンジュゲートと抗 MP 抗体の結合性の関係について実験的な検証は行っていないが, 今後十分な検討を行いたい. また, イムノアッセイ後に MP-BSA コンジュゲートと結合した抗 MP 抗体はペプシンを含む pH 2 HCl-glycine 溶液によって解離させることができ, 1 枚のセンサーチップを繰り返し測定に利用することが可能であった. また, 実サンプル由来のマトリックスからの影響を検討したところ, マトリックスの影響はほとんどないことが分かった.

間接競合法を行う上でセンサーチップへの抗原の固定化法としてタンパク質コンジュゲートの物理吸着を利用する方法が簡単であり, コンジュゲート溶液の濃度を調節することにより, センサーチップへの固定化密度をコントロールして, 抗原-抗体反応の際の立体障害の影響を避けることができる. しかし, センサーチップは測定の度に抗原固定化センサーチップを調製するのは不便であり, 実用化に当たってもあらかじめ固定化されたセンサーチップを供給されるほうが都合がよい. センサーチップの長期保存などを考慮すると, タンパク質を介した物理吸着ではタンパク質の変性や金薄膜からの剥離などの負の要因が挙げられる. それに対し, 抗原を固定化のためにアルカンチオール末端の硫黄原子を介し金薄膜との共有結合をさせ, 自己組織単分子膜を形成させる方法²¹⁾は, 化学結合による強い結合により長期保存の可能性が考えられる. SPR センサーの普及と実用化に向けては, センサーチップの安定性と活性の高い固定化法の検討が必要である.

本研究を行うに当たり, 平成 17 年度経済産業省新連携体構築支援事業補助金及び(財)九州・山口地域企業育成基金より研究助成をいただいた. ここに厚く感謝申し上げます.

文 献

1) F. S. vom Saal, S. C. Nagel, B. G. Timms, W. V.

- Welshons: *Toxicol.*, **212**, 244 (2005).
- 2) D. Schlenk, D. M. Stresser, J. Rimoldi, L. Arcand, J. McCants, A. C. Nimrod, W. H. Bensor: *Marine Environ. Res.*, **46**, 59 (1997).
 - 3) S. F. Arnold, J. M. Bergeron, D. Q. Tran, B. M. Collins, P. M. Vonier, D. Crews, W. A. Toscano, J. A. McLachlan: *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, **235**, 336 (1997).
 - 4) F. S. vom Saal, W. V. Welshons: *Environ. Res.*, **100**, 50 (2006).
 - 5) G. D. Charles, C. Gennings, B. Tornesi, H. L. Kan, T. R. Zacharewski, B. B. Gollapudi, E. W. Carney: *Toxico. Appl. Pharm.*, **218**, 280 (2007).
 - 6) J. Guifang, B. Chenglu, W. Qiuxia, Q. Jing, Z. Wenjing, Z. Zhiqiang: *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 423 (2006).
 - 7) H. Katsumata, A. Fujii, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta: *Talanta*, **65**, 129 (2005).
 - 8) S. Grimalt, O. J. Pozo, J. V. Sancho, F. Hernández: *Anal. Chem.*, **79**, 2833 (2007).
 - 9) G. F. Pang, Y. Z. Cao, J. J. Zhang, C. L. Fan, Y. M. Liu, X. M. Li, G. Q. Jia, Z. Y. Li, Y. Q. Shi, Y. P. Wu, T. T. Guo: *J. Chromatogr. A*, **1125**, 1 (2006).
 - 10) C. Y. Juan, G. O. Thomas, K. T. Semple, K. C. Jones: *Chemosph.*, **39**, 1467 (1999).
 - 11) U. Bolz, W. Körner, H. Hagenmaier: *Chemosph.*, **40**, 929 (2000).
 - 12) T. Küchler, H. Brzezinski: *Chemosph.*, **40**, 213 (2000).
 - 13) G. M. Chuiko, D. E. Tillitt, J. L. Zajicek, B. A. Flerov, V. M. Stepanova, Y. Y. Zhelmin, V. A. Podgornaya: *Chemosph.*, **67**, 527 (2007).
 - 14) Y. Sugawara, S. J. Gee, J. R. Sanborn, S. D. Gilman, B. D. Hammock: *Anal. Chem.*, **70**, 1092 (1998).
 - 15) G. Shan, W. R. Leeman, S. J. Gee, J. R. Sanborn, A. D. Jones, D. P. Y. Chang, B. D. Hammock: *Anal. Chim. Acta*, **444**, 169 (2001).
 - 16) E. Zacco, M. I. Pividori, S. Alegret: *Anal. Chem.*, **78**, 1780 (2006).
 - 17) D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, S. J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura: *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1313 (2006).
 - 18) S. Townsend, W. J. J. Finlay, S. Hearty, R. O'Kennedy: *Biosen. Bioelectro.*, **22**, 268 (2006).
 - 19) R. F. Dutra, R. K. Mendes, V. L. Silva, L. T. Kubota: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1744 (2007).
 - 20) M. Farré, E. Martínez, J. Ramón, A. Navarro, J. Radjenovic, E. Mauriz, L. Lechuga, M. P. Marco, D. Barceló: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 207 (2007).
 - 21) N. Soh, T. Tokuda, T. Watanabe, K. Mishima, T. Imato, T. Masadome, Y. Asano, S. Okutani, O. Niwa, S. Brown: *Talanta*, **60**, 733 (2003).
 - 22) Y. Teramura, Y. Arima, H. Iwata: *Anal. Biochem.*, **357**, 208 (2006).
 - 23) S. D. Mazumdar, M. Hartmann, P. Kämpfer, M. Keusgen: *Biosen. Bioelectro.*, **22**, 2040 (2007).
 - 24) P. T. Charles, L. C. S. Lake, S. C. Francesconi, A. M. Churilla, J. G. Rangasamy, C. H. Patterson, J. R. Deschampsand, A. W. Kusterbeck: *Immunol. Meth.*, **284**, 15 (2004).
 - 25) K. E. Sapsford, P. T. Charles, C. H. Patterson, F. S. Ligler: *Anal. Chem.*, **74**, 1061 (2002).
 - 26) D. R. Shankaran, K. V. Gobi, N. Miura: *Sens. Actuat. B*, **121**, 158 (2007).
 - 27) K. V. Gobi, S. J. Kima, H. Tanaka, Y. Shoyama, N.

- Miura: *Sens. Actuat. B*, **123**, 583 (2007).
- 28) K. V. Gobi, H. Tanaka, Y. Shoyama, N. Miura: *Sens. Actuat. B*, **111**, 562 (2005).
- 29) 財団法人日本食品化学研究振興財団, 基準値データベース.
- 30) M. J. Kim, H. S. Lee, D. H. Chung, Y. T. Lee: *Anal. Chim. Acta*, **493**, 47 (2003).
- 31) A. Hemmi, T. Imato, Y. Aoki, M. Sato, N. Soh, Y. Asano, C. Akasaka, S. Okutani, S. Ohkubo, N. Kaneki, K. Shimada, T. Eguchi, T. Oinuma: *Sens. Actua. B*, **108**, 893 (2005).
- 32) H. Fischer, I. Polikarpov, A. F. Craievich: *Protein. Sci.*, **13**, 2825 (2004).
- 33) K. Oshima, H. Nakajima, S. Takahashi, Y. Kera, M. Shimomura, S. Miyauchi: *Sens. Actua. B*, **105**, 473 (2005).
- 34) A. Y. Kolosava, J.-H. Park, S. A. Eremin, S.-J. Kang, D.-H. Chung: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1107 (2003).
- 35) S. R. Rissato, M. S. Galhiane, M. V. de Almeida: *Food Chem.*, **101**, 1719 (2007).

Development of Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Determination of Methyl Parathion

Mayumi TANAKA^{1,2}, Kazuhira SAKAMOTO¹, Hizuru NAKAJIMA², NOBUAKI SOH²,
Koji NAKANO², Duck-Hwa CHUNG³ and Toshihiko IMATO²

¹Yabegawa Electric Industry Ltd., 11, Jyosin, Omuta-shi, Fukuoka 836-0844

²Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, 744, Motooka, Nishiku, Fukuoka-shi, Fukuoka 819-0395

³Division of Applied Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam, 660-701, Korea

(Received 13 April 2007, Accepted 13 June 2007)

A surface plasmon resonance (SPR) sensor for the determination of methyl parathion (MP) was developed using an indirect competitive immunoassay. A sensor chip was prepared by immobilizing a MP-BSA conjugate on a gold film on the sensor chip, followed by blocking with BSA to prevent the non-specific adsorption of MP and an anti-MP antibody onto the unmodified surface of the sensor chip. An evaluation of the adsorption equilibrium of MP-BSA onto the sensor chip by measuring the SPR angle shift revealed that the adsorption equilibrium was expressed by a Langmuir-type adsorption isotherm equation. The adsorption constant and the adsorbed amount of MP-BSA onto the sensor chip were found to be $5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and 0.95 ng/mm^2 , respectively. An MP solution (1 ~ 5000 ppb) containing 60 ppm anti-MP antibody was introduced into the SPR sensor chip, and then the SPR angle shift was measured. The detection limit, defined as the angle shift of 85% for the blank, was found to be 10 ppb. The anti-MP antibody bound to the MP-BSA conjugate on the sensor chip was able to be dissociated by introducing an HCl-glycine solution (pH 2) into the sensor chip. Duplicate measurements with a single sensor chip were possible for at least 20 times.

Keywords : surface plasmon resonance ; methy parathion ; immunoassay.