

表面プラズモン共鳴センサを利用した免疫グロブリンGのフローインジェクション分析

石松, 亮一
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

張, 瑞峰
九州大学大学院工学府応用化学専攻

桐野, 侑子
九州大学大学院工学府応用化学専攻

中野, 幸二
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

他

<https://hdl.handle.net/2324/7325095>

出版情報 : Journal of flow injection analysis. 31 (2), pp.111-114, 2014. フローインジェクション
分析研究懇談会
バージョン :
権利関係 :



表面プラズモン共鳴センサを利用した 免疫グロブリンGのフローインジェクション分析

石松 亮一, 張 瑞峰, 桐野 侑子, 中野 幸二, 今任 稔彦*

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

Flow Injection Analysis of Immunoglobulin G Using Surface Plasmon Resonance Sensor

Ryoichi Ishimatsu, Ruifen Zhang, Yuko Kirino, Koji Nakano and Toshihiko Imato*

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University,
744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

Direct detection of immunoglobulin G (IgG) by using a surface plasmon resonance (SPR) sensor through an antigen-antibody interaction was described. An anti-IgG antibody was chemically immobilized on a sensor chip through a self-assembled monolayer (SAM) in order to enhance the recognition of an IgG antigen. By assuming the Langmuir adsorption isotherm, maximum amount of adsorbed anti-IgG antibody on the sensor chip and an apparent binding constant of the IgG antigen to anti-IgG antibody were estimated. The amount of the IgG antigen bound to the anti-IgG antibody, which was immobilized onto the sensor chip through the SAM was three times higher compared with the amount of the IgG antigen bound to the anti-IgG antibody, which was immobilized directly to the sensor chip through physical adsorption.

Keywords : SPR, Immunoassay, FIA, SAM

1. 緒 言

抗体と抗原の特異的な相互作用を利用した免疫測定法は選択性に優れており、実際に種々の医療診断や環境測定などのため、幅広い検査機関で用いられている分析法である。免疫応答を検知するためには、一般に、抗原や抗体を放射性同位体元素、蛍光分子、あるいは酵素などの物質によって化学的に標識する場合が多い[1,2]。例えば、固相担体に抗体を固定した競合イムノアッセイ法では、放射性同位体や蛍光分子を修飾した標識抗原を用いる場合、抗体に結合する標識抗原と目的抗原の相対量に応じて放射線量や蛍光強度が変化するので、その変化量によって目的抗原の量を算出することができる。一方、酵素標識した抗体を用いる場合では、イムノアッセイの後に、基質を導入し、酵素反応で生成する生成物の蛍光強度、吸光度、あるいは酸化還元電流の大きさによって抗原の量を算出する。これらの方法は極めて高選択的、かつ高感度であり、容易に ppb レベルの抗原の定量が可能であるが、結合/非結合抗原の分離や洗浄および基質の導入などのプロセスが必要なので操作がやや煩雑になり、さらに免疫反応や酵素反応の時間も要するのでこれらの手法の迅速化や自動化が望まれている。

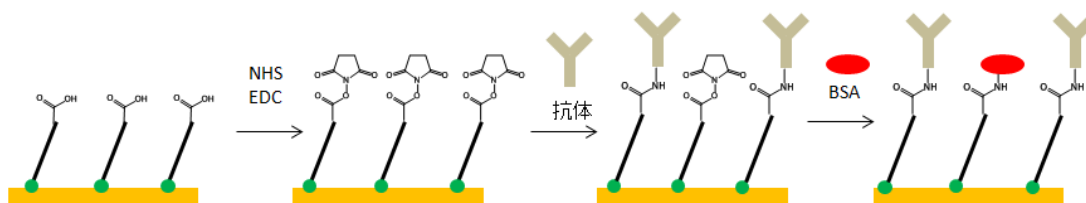
そこで、著者らは、金属表面における吸着現象を直接かつ高感度に検出できる表面プラズモン共鳴 (SPR) セン

サ[3]に着目し、これによる免疫測定への応用について検討した。SPR センサの検出原理は金属表面の媒質の誘電率（あるいは屈折率）による SPR の共鳴角度変化に基づく。したがって、金属表面にある物質が特異的に吸着する場合には、SPR センサの共鳴角度 (SPR 角度) 変化がより大きくなる。そこで本報告では、抗体を物理吸着させた SPR センサチップ (金基板) をフローセルに取り付け、種々の濃度の抗原を導入した時の SPR 角度変化をモニタリングすることによって、金表面の抗体に対する抗原の反応性を評価した。さらに、SPR センサの抗原に対する応答性の向上を目的として、金基板表面に自己組織化単分子膜 (SAM) を形成させ、アミノカップリング法によって抗体を化学的に修飾したチップを用いて、抗原に対する応答性を評価した。本研究では SPR 検出のモデルケース構築を目的とし、抗原には、血中に多く存在している免疫グロブリン G (IgG, 分子量 : 約 145000、血中濃度 : 約 1.2 mg ml⁻¹) を用い、抗体には抗 IgG 抗体を用いた。

2. 実 験 方 法

2.1 SPR センサ

金薄膜が蒸着されたセンサチップを piranha 溶液で洗浄し、SPR センサ (DKK 社製、Kretschmann 配置の検出部を有する) の検出部に取り付けた。



スキーム 1. SAM 上への抗体固定化の模式図.

2.2 物理吸着した抗 IgG 抗体に対する SPR 免疫応答

シリンジポンプを用いてキャリア溶液 (0.1 M トリス塩酸塩, pH = 8.0) を送液し、インジェクタを通して、抗 IgG 抗体溶液 (100 ppm)、ブロッキング溶液として牛血清由来アルブミン (BSA, 1000 ppm) 溶液を注入した。その後、キャリア溶液を 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH = 7.2) に変更し、2, 5, 10, 20, 40, 60 ppm の IgG 抗原溶液を注入した。各濃度の IgG 抗原を注入する前に、センサチップ上の抗体と結合した抗原を解離させるために、解離溶液として、0.05 M グリシン塩酸塩 (Gly-HCl, pH = 2.0) 溶液を注入した。流量は $20 \mu\text{L min}^{-1}$, 注入量は $50 \mu\text{L}$ とした。

2.3 SAM 表面への化学的修飾による抗 IgG 抗体の固定化

金表面に SAM を形成するために、500 ppm carboxy-hexa(ethylene glycol)undecanethiol エタノール溶液 (以下チオール溶液と略記) を注入した。チオール溶液が金チップ上に到達する (SPR 角度変化が最大となる) と同時にポンプを停止し、0-120 分間静置した。その後、送液を再開して余分なチオール溶液を洗い流し、キャリア溶液を 0.1% Tween 20 を含むイミダゾール塩酸緩衝液 (pH = 7.0) に変更して送液を行った。続いて、0.2 M N-hydroxysuccinimide (NHS) と 0.8 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) の混合溶液を注入して SAM 末端のカルボキシ基を活性化した後、抗 IgG 抗体 (100 ppm) を注入することによって SAM 表面に抗 IgG 抗体を化学的に修飾した。未反応の活性化末端は BSA 溶液を注入して処理した。金表面への抗体固定化に伴う模式図をスキーム 1 に示してある。

2.4 抗原抗体反応の SPR 検出

金表面に物理吸着あるいは SAM 上に化学的に修飾して抗 IgG 抗体を固定化したセンサチップをフローセルにセットし、2.0、5.0、10、20、40、60 ppm の IgG 抗原溶液を注入し、SPR 角度変化を測定した。各濃度の IgG 抗原溶液を注入した後は 2.2 項と同様に解離溶液としてグリシン塩酸塩 (pH = 2.0) 溶液を注入した。

3. 結果と考察

3.1 金表面への抗 IgG 抗体の吸着

Piranha 溶液で洗浄したセンサチップをフローセルにセットし、種々の濃度の抗 IgG 抗体溶液を注入した。その際の SPR センサのセンサグラムを図 1 (a) に示す。抗 IgG 抗体を注入すると、低濃度の場合では、ゆるやかに SPR 角度が上昇し、その後、ほぼ一定となっている。高濃度

の場合は、SPR 角度は急峻に増加している。これは低濃度では、抗 IgG 抗体の金表面への吸着が遅いことを示している。高濃度では、注入後に極大値が観察され、その後、角度はほぼ一定となっているが、この極大値が観察された理由は、注入した抗 IgG 抗体の一部は吸着せずに流出することが原因であると考えられる。SPR 角度変化がほぼ一定に達した時間における値を、注入した抗 IgG 抗体の濃度に対してプロットして得られた吸着等温線を図 1 (b) に示す。ここで、吸着量は、一般的なタンパク質の吸着量と SPR 角度変化の関係 ($0.1^\circ = 1 \text{ ng mm}^{-2}$) を用いて算出した。図 1 (b) より、吸着量は抗 IgG 抗体の濃度が 100 ppm 付近でほぼ一定になっていることが分かる。ここで、Langmuir 吸着モデルを仮定すると、吸着等温線は (1) 式の様に記述できる[4]。

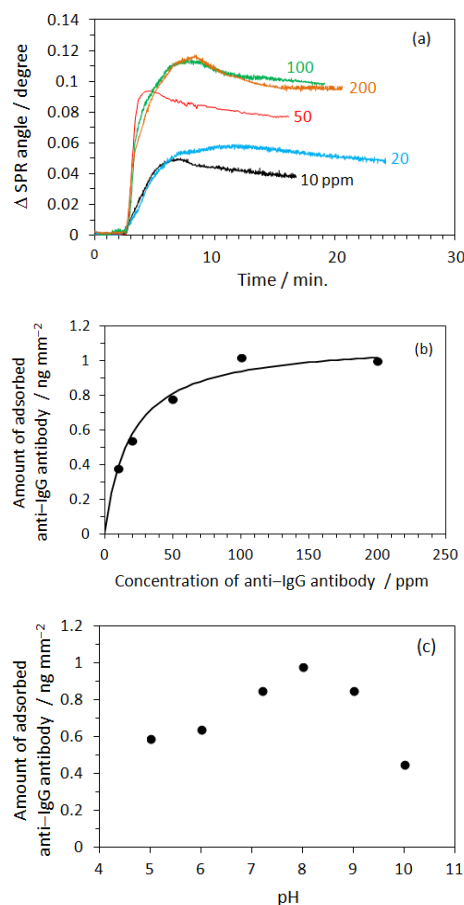


図 1. (a) 金表面への抗 IgG 抗体の吸着による SPR 角度変化と (b) その吸着等温線、及び (c) 抗 IgG 抗体の吸着量の pH 依存性。

$$\frac{[AB]}{\Delta\theta} = \frac{[AB]}{\Delta\theta_{\max}} + \frac{1}{\Delta\theta_{\max} K_{\text{ad}}} \quad (1)$$

ここで[AB]は抗 IgG 抗体溶液の濃度、 $\Delta\theta_{\max}$ はセンサチップ表面に抗 IgG 抗体が飽和吸着した際の最大角度変化、 K_{ad} は吸着定数である。(1) 式の最小二乗法によって算出した抗 IgG 抗体の $\Delta\theta_{\max}$ および K_{ad} はそれぞれ 0.11° (最大吸着量 $\Gamma_{\max}^{\text{AB}} = 1.1 \text{ ng mm}^{-2}$ に相当) および $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ である。この値を用いて描写した吸着等温線を図 1 (b) に実線で示している。実験値と計算値はよく一致していることが分かる。吸着量は抗体の電荷状態に依存すると考えられるので、次に、溶液の pH を変化させて、抗 IgG 抗体の金薄膜表面への吸着量と pH の関係を検討した。

図 1 (c) に 100 ppm 抗 IgG 抗体溶液を注入した場合の吸着量の pH 依存性を示している。これより、キャリア溶液の pH が 8 付近で吸着量が最大になることが分かる。これは抗 IgG 抗体の等電点 (PI) が 8 付近であることと合致しており [5]、表面に吸着した抗 IgG 抗体間の静電反発が減少し、これにより抗体の吸着量が最大になったものと考えられる。よって、以降の実験では pH = 8 の 100 ppm 抗 IgG 抗体溶液を同じ pH キャリア溶液に注入して金表面に吸着させ、その後抗原抗体反応を行った。

3.2 抗原抗体反応の SPR 検出

上記の条件で固定化した抗 IgG 抗体上に、IgG 抗原溶液を注入し、その時の SPR 応答を測定した。センサグラムを図 2 (a) に示す。2–60 ppm の IgG 抗原溶液を注入すると、SPR 角度は増加し、その後一定となっている。これは抗原が金表面の抗体と結合し、複合体を形成していることを示している。Gly-HCl 溶液の屈折率がキャリア溶液のそれと比べて低いので、Gly-HCl 溶液の注入によって金表面の屈折率が大きく低下するために、SPR 角度

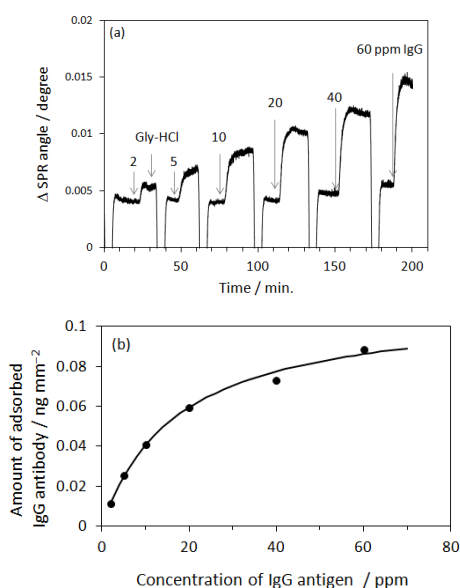


図 2. (a) 金薄膜上における IgG 抗原に対する抗原抗体反応の SPR 応答. 図中の矢印は注入した時間を示す. (b) (a) より得られた IgG 抗原に対する吸着等温線. 実線は (1) 式を用いるフィッティングによって得られた値を用いて描写した。

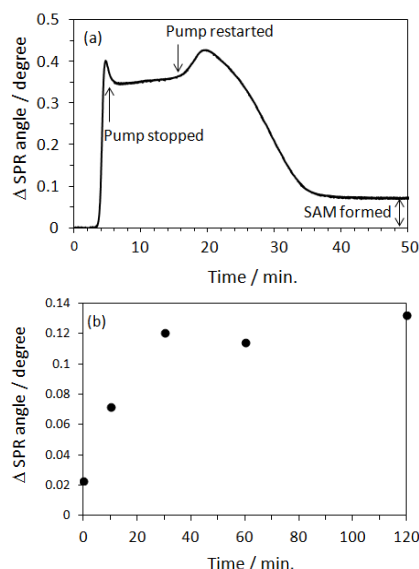


図 3. (a) SAM 形成に伴う SPR センサグラム. (b) ポンプ停止時間と SPR 角度変化量の関係。

が大きく減少するが、その後、SPR 角度は抗体注入前とほぼ同じ値に回復しており、Gly-HCl 溶液の注入によって複合体から抗原が解離していることが分かる。金表面に吸着した抗体が抗原の吸着サイトであると仮定し、(1) 式を用いて抗原の最大結合量 ($\Gamma_{\max}^{\text{AG}}$) とみかけの結合定数 (K_b^{AG}) を算出したところ、それぞれ 0.11 ng mm^{-2} ($7.5 \times 10^{-16} \text{ mol mm}^{-2}$) と $8.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ である。得られた K_b^{AG} はこれまでに報告された値と同程度であるが [4,6–7]、 $\Delta\theta_{\max}$ から換算される IgG の抗原抗体反応量 (0.11 ng mm^{-2} 程度) は抗 IgG 抗体の吸着量 (1.1 ng mm^{-2} 程度) に比べて非常に小さいことが分かる。これは金表面に物理吸着している抗 IgG 抗体の約 10% 程度しか抗原抗体反応に寄与していないことを示しており、即ち、抗 IgG 抗体がランダム (無配向的) に金表面に吸着することによって、抗原認識部位が抗原結合のために十分に機能していないことが分かる。

そこで、抗 IgG 抗体の抗原認識部を配向的に金表面に均一に固定化し、抗原認識部の有効性の向上することを目的とし、自己組織化単分子膜上への抗 IgG 抗体の化学修飾を行った。まず、金基板表面とのチオール溶液と接触時間と SPR 角度変化について検討した。図 3 に SAM 形成時における SPR センサグラムを示す。注入したチオール溶液が金基板上に到達したところで、ポンプの送液を停止した。一定時間経過後、ポンプの送液を再開し、チオール溶液を流出させた。ここで、SPR 角度はポンプ停止とともにやや減少し、ポンプ再開とともにやや増加している。この減少の詳細は不明であるが、チオールの吸着とそれに伴う溶液濃度の変化によってもたらされると推察している。ポンプの送液再開後、チオールが流出するとともに SPR 角度は減少したが、チオールの注入前後で SPR の角度はやや増加している。ポンプ停止時間、

すなわち金基板とチオール溶液の接触時間と最終の SPR 角度変化の関係を図 3 (b) に示す。これより、SPR 角度は 60 分程度で一定になっていることが分かる。よって以降の実験では金基板とチオール溶液との接触時間を 60 分とした。なお、チオールの吸着量と SPR 角度変化の関係はタンパク質のそれと異なることが知られており、より正確な吸着量の算出には水晶振動子マイクロバランス (QCM) 等による見積もりが必要になる。著者らは、現在までにこのチオールを用いると、多結晶の QCM 金センサチップ上に 4 ng mm^{-2} (8 pmol mm^{-2}) 程度吸着することを見出している。これは Au(111)面に形成したアルカンチオールの SAM の吸着量 (11 pmol mm^{-2}) と同じ程度である[9]。従って、QCM と SPR で得られた値の関係式から 0.1° の SPR 角度変化が 1.8 ng mm^{-2} ($\sim 0.35 \text{ nmol mm}^{-2}$) 程度に相当する。

SAM 形成後、末端のカルボキシ基にアミノカップリング法を用いて抗 IgG 抗体を固定化し、その後、抗原抗体反応を行った。得られた SPR センサグラムを図 4 に示す。最初にカルボキシ基を活性化した SAM 上に 50 ppm 抗 IgG 抗体溶液を注入すると、SPR 角度は 0.084° ($\Gamma^{\text{AB}} = 0.84 \text{ ng mm}^{-2}$ に相当) 増加している。この角度変化から算出される吸着量は抗 IgG 抗体の金表面への吸着量と同程度である。次に、1000 ppm BSA 溶液を注入し、SAM 上の未修飾の部分と反応させることによって表面の未修飾部分を不活性化し、抗原が化学的に固定化されるのを防止した。BSA 溶液を 3 回注入した。最初の注入では SPR 角度変化が緩やかに増加し、時間経過後も高いままである。

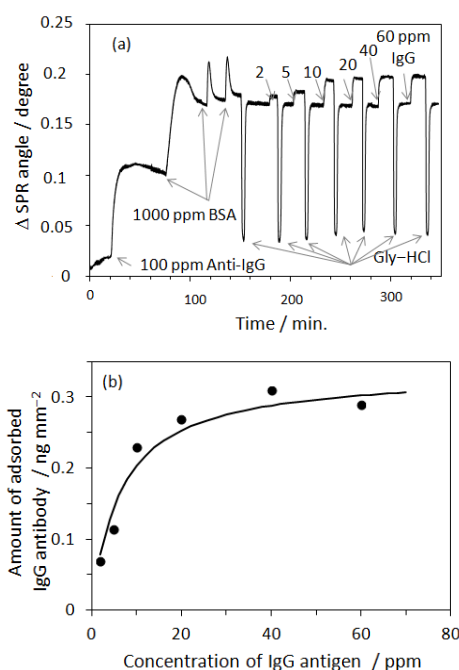


図 4. (a) SAM 上への抗 IgG 抗体固定化、BSA によるブロッキング、及び IgG 抗原に対する抗原抗体反応の一連の SPR センサグラム. (b) SAM 上での IgG 抗原の吸着等温線. 実線は (1) 式のフィッティングより算出した。

これは注入した BSA 溶液が SAM 表面に化学的に結合したためであると考えられる。その後の 2 回の注入では一般的なフローインジェクション的応答が得られており、この段階では SAM 表面に BSA がほとんど結合していないことが分かる。その後、IgG 抗原溶液を注入するとそれらの濃度に応じて SPR 角度が変化している。この時の抗原の吸着等温線を図 4 (b) に示す。これまでの解析と同様に、Langmuir 型の吸着等温モデルを用いて $\Gamma_{\text{max}}^{\text{AG}}$ と K_b^{AG} を算出したところ、金表面に物理的に抗 IgG 抗体を吸着させた場合と比較して、結合定数は同程度であったが、最大吸着量は 3 倍程度に増加している (表 1)。このことから SAM 上に化学的に修飾した抗体は、金表面に物理吸着によって固定化した場合に比べて、抗体の抗原認識部の有効性が向上することが分かった。抗体と抗原が 1 : 1 で反応するとした場合、金表面に物理吸着した場合は、吸着した抗体の 10% 程度が抗原と結合する能力があるのに対し、SAM 上に化学修飾することによって固定化した全抗体の約 35% が抗原認識能を持つことが分かった。

4. 結 論

表 1 金表面に物理吸着した抗体及び SAM を介して固定化した抗体に対する IgG 抗原の結合定数

	$\Gamma_{\text{max}}^{\text{AG}} / \text{ng mm}^{-2}$	$K_b^{\text{AG}} / \text{M}^{-1}$	$\Gamma_{\text{max}}^{\text{AG}} / \Gamma^{\text{AB}}$
Au	0.11	8.6×10^6	0.10
SAM	0.33	2.3×10^7	0.35

以上の様に、SAM を介して抗体を固定化した場合に、抗原に対する認識能が、金表面に物理的に吸着した場合に比べて 3 倍程度向上し、これに伴って抗体の抗原に対する見かけの結合定数も増加することが分かった。しかしながら 60% 程度の SAM 上に固定化した抗体が抗原抗体反応に寄与しておらず、より高感度検出に向けて、SAM 上へ固定化される抗体の配向性や最大吸着量を向上させる必要がある。

参考文献

1. A. Voller, A. Bartlett, D. E. Bidwell, L. J. Clin. Pathol., 31, 507 (1978)
2. N. Soh, M. Tanaka, K. Hirakawa, R. Zhang, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato, Anal. Sci., 27, 1069 (2011).
3. J. Homola, Anal. Bioanal. Chem., 377, 528 (2003).
4. G. Sakai, S. Nakata, T. Uda, N. Miura, N. Yamazoe, Electrochim. Acta, 44, 3849 (1999).
5. C. Prin, M. C. Bene, B. Gobert, P. Montagne, G. C. Faure, Biochim. Biophys. Acta, 1243, 287, (1995).
6. R. Zhang, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Masadome, K. Nagata, K. Sakamoto, T. Imato, Anal. Chim. Acta, 600, 105 (2007).
7. Y. Li, J. Ren, H. Nakajima, B. K. Kim, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Talanta 77, 473 (2008).
8. R. Ishimatsu, A. Naruse, R. Liu, K. Nakano, M. Yahiro, C. Adachi, T. Imato, Talanta, 117, 139 (2013).
9. T. Kakiuchi, H. Usui, D. Hobara, M. Yamamoto, Langmuir, 18, 5231 (2002).

(Received January 30, 2015)

(Accepted February 4, 2015)