

富山大学水素同位体科学研究センター研究報告 33 : 1-7, 2013.

総 説

誘電泳動による微粒子操作を応用した迅速な免疫測定

安川 智之

兵庫県立大学大学院物質理学研究科
〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

Rapid immunosensing based on dielectrophoretic manipulation of particles

Tomoyuki Yasukawa

Graduate School of Material Science, University of Hyogo
3-2-1, Kouto, Kamigori, Ako, Hyogo 678-1297, Japan

(Received March 13, 2014; accepted May 23, 2014)

Abstract

A rapid immunosensing method for measuring two tumor markers, alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA), based on particle manipulation by negative dielectrophoresis (n-DEP) was developed. When microparticles modified with different antibodies were subjected to n-DEP manipulation by the application of an AC voltage, they accumulated in particular positions in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) fluidic channels modified with corresponding antibodies within 1 min. The presence of a specific antigen, AFP or CEA, allowed the irreversible capture of microparticles via the formation of immuno-complexes. Uncaptured microparticles redispersed after the AC voltage was switched off. The fluorescent intensity from the irreversibly captured microparticles allowed us to determine the concentration of AFP and CEA in the sample. The range for both AFP and CEA assays was 0.1–100 ng/mL, which was sufficient to cover the concentration required for medical diagnoses. Our system measured the concentrations of AFP and CEA simultaneously in a single device with two channels modified for different antibodies. Since n-DEP was used for the rapid manipulation of the microparticles toward the PDMS surface, the time required for the assay was substantially short: 1 min for forcing and 5

min for redispersion of microparticles and sensing.

1. 緒言

腫瘍マーカー、ペプチド、ホルモン等の計測に使用されている酵素免疫測定法では、溶液中の分析対象物質および酵素標識抗体をマイクロタイタープレートに固相化した抗体により捕捉し、標識酵素の活性を測定している。しかし、プレートに固相化された抗体と溶液中の分子間の免疫複合体形成反応は拡散制限のため比較的長時間(30分-1時間)を必要とするとともに、未反応物質の除去操作も必要とする。よって、迅速性と簡便性を有する新規測定法の開発が切望されている。現在では、比表面積の大きさに優位性を有するマイクロ流路や微粒子を用いて拡散距離を短縮し、迅速性の向上が行われている¹⁾。

誘電泳動 (dielectrophoresis, DEP) は、局所領域に形成された不均一電場とそれにより誘起された微粒子および溶媒の双極子モーメントとの相互作用により、微粒子に力が作用する現象である^{2, 3)}。作用する力の強度および方向は、対象粒子のサイズ、導電率および誘電率、分散溶媒の導電率および誘電率、外部より印加される交流電圧の周波数に依存する。微粒子が電場強度の強い領域へ誘導される正の誘電泳動 (positive-DEP, p-DEP) と電場強度の弱い領域へ誘導される負の誘電泳動 (negative-DEP, n-DEP) が存在する。近年、p-DEP を用いた細胞やプローブ微粒子の免疫反応による迅速な捕捉が報告された⁴⁻⁶⁾。我々は、以前、マイクロ流路デバイスに n-DEP による微粒子の捕捉技術を組み合わせた免疫測定法を開発した^{1), 7)}。しかし、この方法は、複雑な電極デザインおよび段階的な免疫反応と洗浄のためのシリンジポンプによるフローシステムを必要とし、また、約 40 分の測定時間を必要とした。

そこで、n-DEP を用いた微粒子の迅速 (数秒レベル) な配列化技術を利用し、数分レベルで免疫測定が可能なシステムを開発した⁸⁾。交互くし型マイクロアレイ (IDA) 電極に、n-DEP が作用する周波数領域の交流電圧を印加すると、微粒子は反発力を受けて鋳型である IDA 電極と対向する基板上に配列する。しかし、印加電圧

を停止すると、この配列構造は崩壊し溶液中に再分散する。作製された配列体を維持するためには、基板と微粒子間を化学結合する、または、ゲル等のマトリックスに包括する必要がある^{9),10)}。そこで、この微粒子の配列体を維持するために免疫反応を組み込んだ。免疫反応により微粒子-基板表面間で免疫複合体が形成されると微粒子は基板表面上に捕捉される。これにより、迅速で未反応物質の除去操作（BF 分離）を必要としない新規免疫測定法の開発を行った。また、異なる抗体を固定化した基板を用いたマルチ分析システムへと応用した^{11), 12)}。ここでは、腫瘍マーカーである alpha-fetoprotein (AFP)と carcinoembryonic antigen (CEA)同時検出のモデルターゲットとした。

2. 実験

2.1. 誘電泳動デバイスおよび抗体固定化微粒子の準備

インジウム-すず酸化物製の IDA 電極とポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流路を組み合わせて誘電泳動デバイスを作製した。Fig. 1 に、作製したデバイスの顕微鏡写真を示す。IDA でバンド電極の長さ、幅および電極間ギャップを、それぞれ 1.0 mm, 20 μm および 50 μm とした。

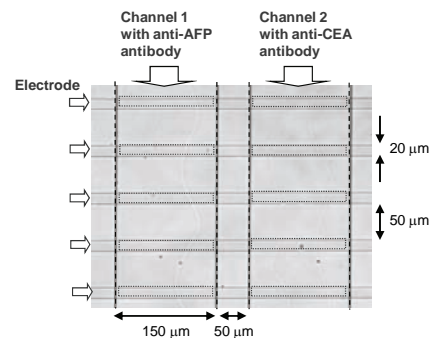


Fig.1 A microscopic image of the IDA electrode.

PDMS 製マイクロ流路は、レジスト (SU-8) の鋳型から転写して得た。流路幅、ギャップおよび高さを、それぞれ 150 μm , 50 μm および 14 μm に設定した。この PDMS 製流路を別の PDMS 基板の上に配置し、流路 1 および流路 2 に、抗 AFP 抗体溶液 (10 ng/mL) および抗 CEA 抗体溶液 (10 ng/mL) をそれぞれ導入して抗体を物理的に吸着させた。洗浄後、PDMS 製のマイクロ流路を IDA 電極上に配置した。この際、IDA バンドとマイクロ流路を直交させた。ポリスチレン微粒子 (直径 2 μm) 懸濁液に、抗 AFP 抗体溶液 (10 ng/mL) または抗 CEA 抗体溶液 (10 ng/mL) を混合し吸着させた。

2.2. 微粒子のマニピュレーションおよびn-DEPによる微粒子の免疫捕捉

抗 AFP 抗体固定化微粒子と抗 CEA 抗体固定化微粒子の懸濁液 (1.2×10^9 particles/mL) に異なる濃度 (0.1 ng/mL–10 μ g/mL) の AFP および CEA を混合した。この混合液を誘電泳動デバイスに導入した。IDA 電極に交流電圧 (10 V_{pp}, 2 MHz) を印加し、n-DEP を用いて PDMS 基板上へ微粒子を集積化した。免疫反応により微粒子を捕捉するために、交流電圧を 1 分間印加した。その後、電圧印加を停止し、電圧印加停止直前と停止 5 分後の蛍光強度の差を調査した。

3. Results

微小流路中に IDA 電極を配置したデバイスを用いると n-DEP による微粒子の配列が可能である。Fig. 2 に、n-DEP を用いた微粒子操作と免疫捕捉の概念図を示す。交流電圧を印加すると分散状態の抗体修飾微粒子は、抗体が固定化されている流路の上面にライン上に配列

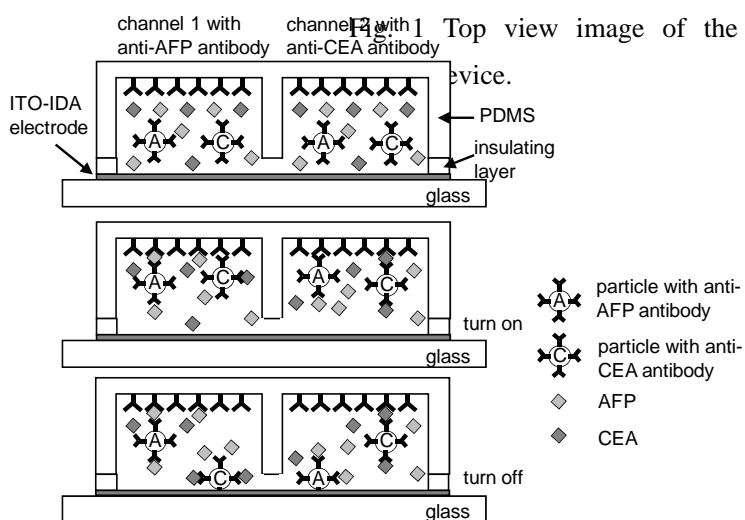


Fig. 2 Schematic representation (cross-sectional view) of the immunosensing based on the n-DEP particle manipulation.

される。微粒子には n-DEP により電場に対する反発力が生じ、流路デバイス空間内において最も電場強度の低い IDA 電極の真上の領域に移動する。電圧印加を停止すると、抗 AFP 抗体を固定化した流路 1 に配列化された抗 AFP 抗体修飾微粒子は免疫反応により捕捉されるが、抗 CEA 抗体修飾微粒子は捕捉されず再分散する。また、抗 CEA 抗体を固定化した流路 2 では反対の現象が起こる。よって、流路 1 および流

路 2 で捕捉されたそれぞれの微粒子の蛍光強度を計測することにより、サンプル溶液中に含まれる AFP および CEA を同時に検出することが可能となる。免疫反応で捕捉されず再分散した微粒子は PDMS 表面から散逸するため、蛍光シグナルとして検出されない。すなわち、未反応微粒子の自動的な分離が達成されるため、洗浄工程を必要としない極めて簡便な計測システムとなる。

流路 1 を 1.0 ng/mL 抗 AFP 抗体で、流路 2 を 10 ng/mL 抗 AFP 抗体で処理した基板を用いて、抗 AFP 抗体固定化粒子の捕捉を行った。ここでは、AFP の濃度を 1.0 ng/mL とした。

Fig. 3A および 3B に、電圧印加停止直前と停止 5 分後の配列化微粒子の蛍光顕微鏡写真を示す。交流電圧を印加すると、分散状態にあった微粒子は瞬時に IDA 電極上のマイクロ流路の天井部分に集積化された (Fig. 3A)。1 分

後に電圧印加を停止すると、一部の微粒子は PDMS 流路に捕捉されていたが、配列化されていた微粒子の一部は再分散状態に戻った。これは、PDMS に固定化された抗体と微粒子に固定化された抗体により AFP が認識捕捉され免疫複合体を形成したためである。免疫複合体を形成しない微粒子は、DEP による規制力を失うため再分散される。電圧印加停止 5 分後の流路 1 および流路 2 から得られた微粒子の蛍光強度は、印加停止前の蛍光強度の 23% および 56% であった。よって、流路に抗体を固体化する際の濃度を制御することにより、AFP の計測濃度領域を制御できる可能性がある。溶液内に AFP が存在しない場合には、ほとんどすべての微粒子が再分散状態に戻るため、微粒子は免疫反応を介して PDMS 流路に捕捉されることがわかる。

流路 1 に抗 AFP 抗体、流路 2 に抗 CEA 抗体を固定化したデバイスに、濃度の異なる AFP と 20 ng/mL CEA を含む抗体修飾微粒子懸濁液を導入し同時検出を行った。Fig.

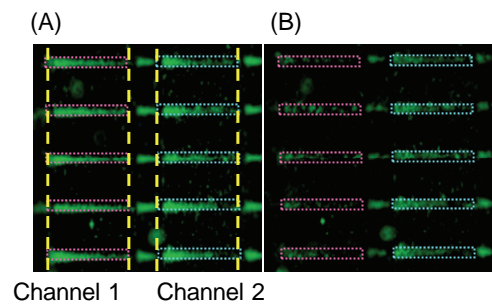


Fig. 3 AFP assay using the n-DEP device. (A) Fluorescent images of the microparticles (A) before and (B) 5 min after the AC voltage was turned off in the presence of 1.0 ng/mL AFP.

4に、AFP濃度に対する蛍光強度を示す。Fig. 4AおよびFig. 4Bは、それぞれAFPを検出するための流路1およびCEAを検出するための流路2から同時に得られた蛍光強度である。流路1から得られた蛍光強度はAFP濃度の増加に伴って増加するが、流路2から得られた蛍光強度はほぼ一定である。CEAを含むサンプルを用いて得られたAFP測定の結果は、CEAを含まないサンプルを用いて得られたAFP測定(Fig. 4C)の結果とほぼ一致す

る。すなわち、他のターゲット分子(この場合はCEA)や他のターゲット分子のためのプローブ微粒子(この場合は抗CEA抗体修飾微粒子)がサンプルに含まれている場合でも、正確にAFPを検出することが可能であることを示している。AFP濃度を固定した場合でも、同様に正確なCEAの検出が可能であった。ここで、特筆すべき点は、このn-DEPを応用したマルチアッセイは、免疫反応と微粒子の再分散のために必要とする時間がトータルで数分と極めて迅速であるということである。さらに、未反応物質の分離および洗浄操作を一切必要としない。マルチ抗体アレイの作製により複数種類のターゲットを極めて迅速に、簡便に計測できる可能性がある。

4. Conclusions

本研究では、DEPを用いた微粒子の迅速な集積・配列化技術を用いて、2種類の腫瘍マーカーであるAFPとCEAの同時検出を行った。この手法では、表面に固定化された抗体分子と溶液中の抗原およびプローブ(蛍光微粒子)の反応に、DEPによる微

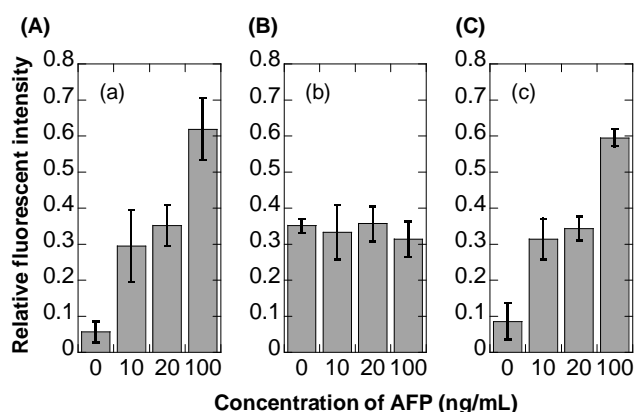


Fig. 4 Relative fluorescent intensities as a function of AFP concentrations. Fluorescent intensities were simultaneously obtained from (A) channel 1 for AFP and (B) channel 2 for CEA of a multi-sensing device injected with sample solutions containing various concentrations of AFP and 20 ng/mL CEA. (C) Intensities obtained from the sample containing only AFP.

粒子の位置規制技術を組み込み反応の迅速性を獲得している。免疫反応により流路に捕捉された微粒子の蛍光強度から免疫測定が可能になる。これは、未反応の蛍光微粒子が流路表面から流路内に散逸するため、表面に捕捉された微粒子を未反応微粒子と分離して計測できることに由来する。よって、未反応物質の分離工程（BF 分離）や洗浄操作を行うことなく計測が可能であるという簡便性を兼ね備えている。今後は、微粒子の微小化および電気化学検出法を組み込み、迅速性および簡便性に加え高感度化の達成を目指したい。

References

- (1) T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Sekiya, H. Shiku and T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, 2730-2736 (2007) 22.
- (2) T.B. Jones, *Electromechanics of particles*, Cambridge University Press, 1995.
- (3) H.A. Pohl, *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, 1978.
- (4) J. Auerswald, D. Widmer, N.F. de Rooij, A. Sigrist, T. Staubli, T. Stokli and H.F. Knapp, *Electrophoresis*, 3697- 3705 (2005) 3697.
- (5) L. Yang, P.P. Banada, M.R. Chatni, K.S. Lim, A.K. Bhunia, M. Ladisch and R. Bashir, *Lab. Chip*, 896-905 (2006) 6.
- (6) J. Suehiro, A. Ohtsubo, T. Hatano and M. Hara, *Sens. Actuators B: Chem.*, 319-326 (2006) 119.
- (7) J. Ramón-Azcón, R. Kunikata, F.-J. Sanchez, M.-P. Marco, H. Shiku, T. Yasukawa and T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, 1592-1597 (2009) 24.
- (8) H.J. Lee, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, 1000-1005 (2008) 24.
- (9) M. Suzuki, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku and T. Matsue, *Langmuir*, 11005-11011 (2004) 20.
- (10) M. Suzuki, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue, *Langmuir*, 4088-4094 (2007) 23.
- (11) H.J. Lee, S.H. Lee, T. Yasukawa, J. Ramon-Azcon, F. Mizutani , K. Ino, H. Shiku and T. Matsue, *Talanta*, 657-663 (2010) 81
- (12) J. Ramón-Azcón, T. Yasukawa, H.J. Lee, T. Matsue, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco and F. Mizutani, *Biosens. Bioelectron.*, 1928-1933 (2010) 25.