

# 表面プラズモン共鳴センサを用いた疑似尿中ホモバニリン酸の検出

野寄 朋彦<sup>\*1</sup> 枝田 拓也<sup>2</sup> 小野寺 武<sup>3</sup> 都甲 潔<sup>2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>JOHNNAN)(九州大学 <sup>2</sup>大学院システム情報科学府 <sup>3</sup>味覚・嗅覚センサ研究開発センター)

## 1 はじめに

がんは、昭和 56 年から平成 27 年に至るまで、日本人の死因の第一位となっている[1]。がんの治療・治癒には早期発見が最重要であるにもかかわらず、日本ではがん検査の受診率が低い値に留まっている。その原因として、血液採取や胃や大腸の内視鏡等で痛みを伴うことや腫瘍マーカーの測定に時間がかかることなどが、受診の妨げになっている。そこで、簡便に検査でき、高精度でがんを検出する方法が求められている[2]。本研究では、尿中に存在する腫瘍マーカーであるホモバニリン酸(HVA,  $C_9H_{10}O_4$ , 分子量 182.17)に着目し、短時間で検出可能な表面プラズモン共鳴(SPR)センサと抗原抗体反応を組み合わせた SPR 免疫センサで、間接競合法を用いて疑似尿中の HVA の検出を行った[3]。

## 2 実験方法

### 2.1 表面プラズモン共鳴(SPR)センサ

表面プラズモン共鳴(SPR)は、プリズムを介して金薄膜に、ある角度で光が入射された時に金表面のプラズモン波と全反射に伴うエバネッセント波が共鳴を起こす現象である。SPR センサは、共鳴が最大となる入射光の角度を共鳴角として、共鳴角の変化から金薄膜上の誘電率の変化を高感度に検出することができる。共鳴角の測定は、楔形の光を入射し反射光を受光素子で捉えることで行われる。

本実験では、抗原抗体反応と SPR センサ(BiacoreJ)との組合せにより、共鳴角変化を抗体結合量として算出した[3]。抗体は、HVA とロコガイヘモシアニン(CCH)を結合させたものを免疫原として得られた、ウサギ由来抗HVA-CCHポリクローナル抗体(以下、抗HVA抗体)を用いた[5]。

### 2.2 センサ表面作製

センサ表面の金薄膜上には、間接競合法で測定するための抗HVA抗体の結合部位として、HVA類似物質である 4-hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride (HMB,  $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$ , 分子量 189.64)を固定化した。その手順として、まず、金薄膜上に PEG6-COOH aromatic dialkanethiol を用いてカルボキシル基末端の自己組織化単分子膜を形成させた。次に非特異吸着の抑制を向上させるために 8 : 2 の混合比で Amino-dPEG8-acid 溶液と Amino-dPEG4-alcohol 溶液を金薄膜に浸潤し結合させ、アミノ基を有する HMB をアミンカップリングによりセンサ表面に固定化した。

### 2.3 疑似尿作製

尿中 HVA を検出する前段階として尿の主要成分を集めた疑似尿を作製した。その理由として尿の主要成分が HVA の検出へ与える影響を確認するためである。作製した疑似尿成分を表 1 に示す。主な特徴は、無色、無臭で pH7.3 である[6]。

表 1 疑似尿成分

|               |        |
|---------------|--------|
| Milli-Q water | 1.0 l  |
| NaCl          | 7.6 g  |
| 尿素            | 24.0 g |
| クレアチニン        | 2.3 g  |

## 3 実験結果

SPR免疫センサ測定は、間接競合法を用いて行った。終濃度 45 ppm の抗HVA抗体を 5 分間流入し、その時のセンサグラムを  $\Delta \theta_0$  とする。その後再生溶液を 3 分間流入し、その後に抗HVA抗体と HVA との混合溶液を 5 分間流入し、その時のセンサグラムを  $\Delta \theta_1$  とする。測定したセンサグラムを用いて抗HVA抗体と HVA との結合率を  $(\Delta \theta_1 / \Delta \theta_0) \times 100$  により求めた。測定は、HVA 終濃度を 0.01 ppm ~ 100 ppm まで 10 倍間隔で行い、それを 3 回繰り返した。その平均値で作成した検量線を図 1 に示す。

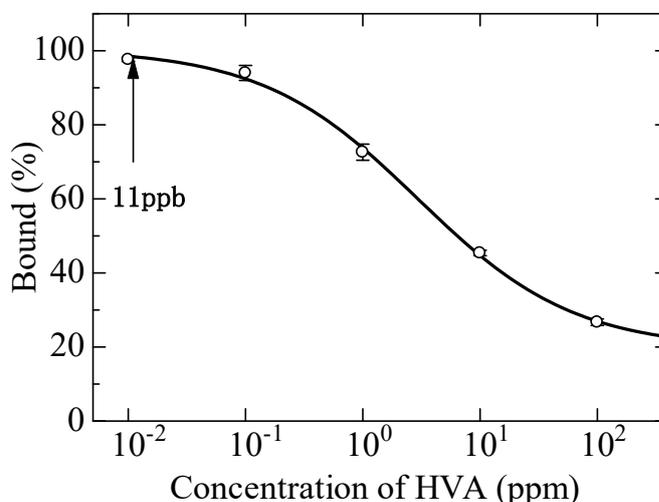


図 1 疑似尿中 HVA の検量線(間接競合法)

## 4 まとめ

本実験では、小児がんの一種として知られる神経芽細胞腫の腫瘍マーカーであるホモバニリン酸(HVA)を対象として SPR免疫センサを用いて疑似尿中 HVA 検出を行った。その結果、検出限界は 11 ppb となり、疑似尿中においても HVA を検出可能であることがわかった。

## 参考文献

- [1] 厚生労働省, "平成 27 年人口動態統計月報年計(概数)の概況", pp.10-13 (2015)
- [2] 厚生労働省, "平成 25 年国民生活基礎調査の概況", p.29 (2013)
- [3] 京都大学医学部附属病院 検査部・病理診断部・輸血細胞治療部・薬剤部, "検体検査標準値一覧表 Ver. 4.00" (2013)
- [4] 永田和宏, 半田 宏, "生体物質相互のリアルタイム解析実験法—BIACORE を中心に", シュプリンガー・フェアラーク東京(1998)
- [5] S. Nakamura, R. Yatabe, T. Onodera, and K. Toko "Sensitive detection of capsaicinoids using a surface plasmon resonance sensor with anti-homovanillic acid polyclonal antibodies," Biosensors, Vol. 3, pp.374-384 (2013)
- [6] 岡野栄之 植村慶一監訳, "オックスフォード生理学原書 3 版", pp.387-388 (2009)