

水晶振動子を用いる免疫センサの開発（第1報）

奥田 篤，山本 寧，勝世 敬一

Development of Piezoelectric Crystal Immunosensor System (Part I)

Atsushi OKUDA, Yasushi YAMAMOTO, Keiichi KATSUSE

抄 録

多クローン性免疫グロブリン異常症・M蛋白血症などの免疫疾患の診断には免疫グロブリンクラス(IgG, IgA, IgM)の検査結果が使われているが, 免疫グロブリンクラス定量の迅速性・簡便性の向上が望まれている。そこで, 抗IgG・抗IgA・抗IgMの各抗体を水晶振動子表面に固定化して免疫グロブリンセンサを開発した。

その結果, IgGについては $0.1\sim 10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度範囲で, IgAについては $0.05\sim 10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度範囲で, IgMについては $0.05\sim 5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度範囲で, それぞれ定量的に測定可能であることを明らかにした。

1. 緒 言

圧電素子は, 電気的エネルギーを機械的エネルギーに, あるいは機械的エネルギーを電気的エネルギーに変換する機能を有しており, 最近ではエレクトロニクス用デバイスとして欠くことのできないものとなっている。主な用途としては, コンピュータのクロック, 携帯電話の発信器, カラーテレビのフィルタなどがあり, 精密な基準周波数やシャープなフィルタ特性を必要とする機器などに多く使われている。北海道には, 大手圧電素子メーカーが函館市, 三笠市, 北見市に生産拠点を構えており, 先端技術産業の一翼を担っている。これらの圧電素子メーカーは水晶振動子を主に生産しているが, より付加価値の高い製品の開発を望んでいる。

一方, あらゆる機器にコンピュータが組み込まれるようになり, これまでは想像もしなかった様々な分野で新しいセンサのニーズが現れている。工業計測等に使用される長さ, 重さ, 温度などの物理センサはすでに技術的に確立されているが, 今後, 医療, 環境計測, 健康管理, 食品, その他日常生活などにおいて, 目的の化学成分を迅速にモニタできる化学センサのニーズが増加するものと期待されている^{1,2)}。

例えば, 体液性免疫機構を担っている免疫グロブリン(Ig)の質的・量的検索は, 体液性免疫機構異常を知る大きな手がかりとなる^{2,3)}。特に, 3つの大クラス(IgG・IgA・IgM)の測定は, 多くの免疫疾患の確定診断あるいは鑑別診断に用い

られているが, その際には血清を試料として用い3つの大クラスが同時に定量される³⁾。その測定に利用されているゲル内免疫拡散法²⁻⁵⁾・比ろう法^{2,3,6,7)}ともに煩雑な操作や時間あるいは高価な試薬を必要としており, より簡便かつ迅速な測定法が求められている^{2,3)}。

この様な観点から, 本研究では圧電素子の中から水晶振動子を取り上げ, その高付加価値化を図るとともに, 本道におけるセンサデバイス技術を構築することを目的として, 免疫グロブリンに特異性を持つ抗体を固定化したATカット水晶振動子を用いて, 免疫グロブリン測定用センサの開発を行った。その結果として得られた知見について報告する。

2. 測定システムの構成および振動挙動の評価

2.1 水晶振動子を利用した免疫測定の原理

水晶振動子は, 水晶板の両面に電極が取り付けられた構造をしている。電極に電圧を印加すると, 圧電体である水晶は機械的な歪を生じる⁸⁾。歪が生じた状態で電圧の印可を止めると, 歪が元に戻り, 逆に電極間に電圧を発生する。この電圧は再び水晶板に歪を生じさせ, これが一定の周期の振動となって繰り返されていくことになる。ただし, このままでは摩擦抵抗により振動は減衰してしまうので, 電極の電圧を検出してフィードバックさせ, 再び電圧を印可して連続的な振動を行なわせる為に, 発振回路を用いる。発振回路と組み合

わせることにより、水晶振動子固有の精度の高い周波数信号を、安定して引き出すことができる。このような特徴を利用して、水晶振動子は時間の計測に汎用されている。それ以外の水晶振動子の用途としては、真空蒸着機の膜圧モニタへの利用が良く知られている。この場合は、発振周波数の安定性が高いという特徴に加えて、水晶振動子上に物質が付着した際に発振周波数が変化する現象が利用されている。

水晶振動子はカット面によって多くの種類があるが、そのうちAT面に沿ってカットしたものがATカット水晶振動子であり、水晶板に水平の方向にせん断歪を生ずる（図1）。ATカット水晶振動子の共振周波数は、基本的には水晶板の厚さによって決定されるが、振動子表面の重量変化によっても共振周波数が変化することが明らかになっている。すなわち、水晶振動子が水平方向へ振動するモデルに基づく水晶板表面の振動の式より、以下に示す水晶振動子表面の重量変化に対する共振周波数変化の式が求められている⁹⁾。

$$\Delta F/F = \Delta m/\rho \cdot d \cdot t \cdot A \quad (1)$$

ここで、 ΔF :周波数変化、 F :共振周波数、 Δm :表面の重量変化、 ρ :水晶の密度、 d :水晶板の厚さ、 A :電極面積である。

式(1)は、水晶振動子表面に生ずる薄膜が弾性的である場合には実験結果と良く一致することが明らかにされており、重量変化を捉えるトランスデューサとして水晶振動子を用いる際の基本的原理となっている。

抗原または抗体は、鍵と鍵穴の組み合わせに例えられる様に、それぞれ対応する抗体・抗原とのみ吸着する選択的な特性を有している。すなわち、ある抗体はそれに対応する特定の抗原とのみ結合する。抗原-抗体反応の特徴としては、抗原・抗体が極めて低い濃度でも反応して結合し、その結合物は比較的安定で解離しにくい点も挙げられる^{1),2)}。従って、測定対象物質と選択的に反応する抗原あるいは抗体を水晶振動子上に固定化してセンサを構成し、測定液中で測定対象物質と抗原抗体反応を行なわせ、その結果として起こる結合物の形成に伴う振動子表面の重量変化を周波数応答として測定することで、測定対象物質の定量が行ない得ると考える。

2.2 システムの構成

測定システムは、水晶振動子、振動子を安定に振動させる

ための発振回路と電源、振動子を支持しリードを取るためのホルダー、共振周波数を測定するための周波数カウンタ、これらをコントロールしデータを記録するためのパーソナルコンピュータから構成した(図2)。それぞれの詳細について以下に述べる。

水晶振動子(図3)はマックステック製のATカット水晶振動子を使用した。白金電極を持つ共振周波数5MHzの振動子である。その諸元を表1に示す。必要により振動子上に抗体を固定化して、あるいは固定化せずに用いた。

振動子は、発振回路内蔵型のホルダー(図4、マックステック)により支持される。振動子を頭部に同定して支持すると同時に、振動子の裏面で両側の電極とリードを取っている。従って、振動子の表面片側に液体が接する状態で振動を行なう形状となる。

構成したシステム全体を図5に示す。前述したように、システムは振動子とホルダー・電源・周波数カウンタ・パーソナルコンピュータから構成されているが、このうち振動子を取り付けたホルダーは台座に固定して発砲スチロール製の恒温槽に入れ(図6)、雰囲気温度の影響を排除するため温度調

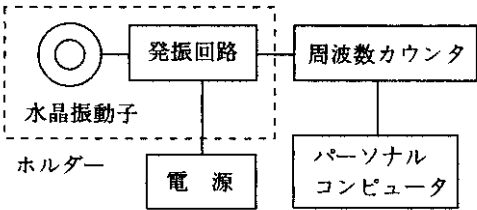


図2 測定システムの構成



図3 使用した水晶振動子

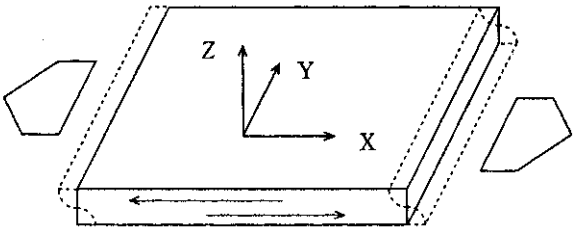


図1 ATカット水晶振動子の振動モデル

表1 使用した水晶振動子の諸元

振動子直径	2.54 cm
電極直径	13 cm
電極金属	白金
共振周波数	5 MHz

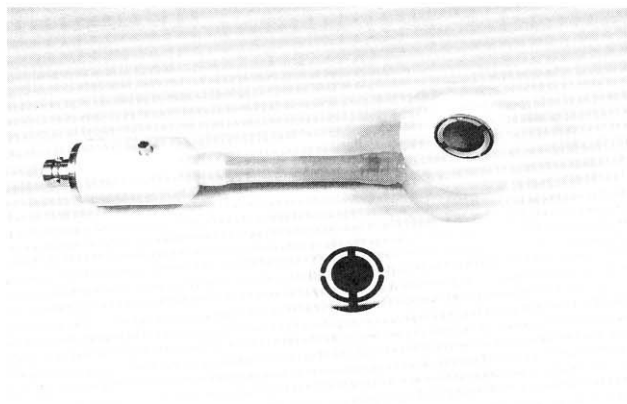


図4 水晶振動子および振動子ホルダー



図5 構成したシステム全体

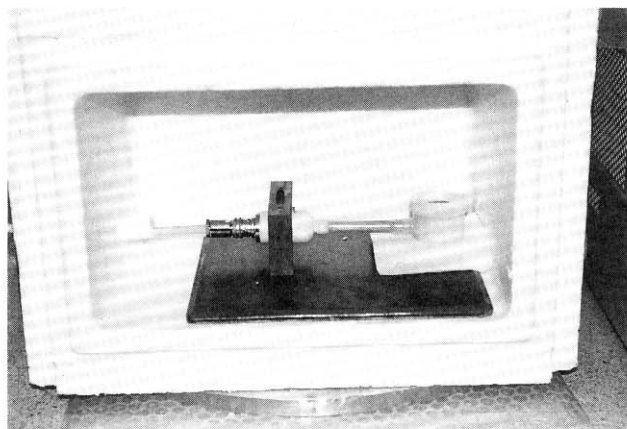


図6 恒温槽内に固定された振動子ホルダー

整を行ないながら共振周波数を測定した。

2.3 振動挙動の評価

2.3.1 液体中に於ける水晶振動子の発振

液体中でのATカット水晶振動子の発振については幾つかの研究が成されており、共振周波数シフトと液体の導電率および密度との関係式が導かれている^{10,11)}。さらに、ねじれ波と減衰したねじれ波の水晶中および液体中での振舞いについ

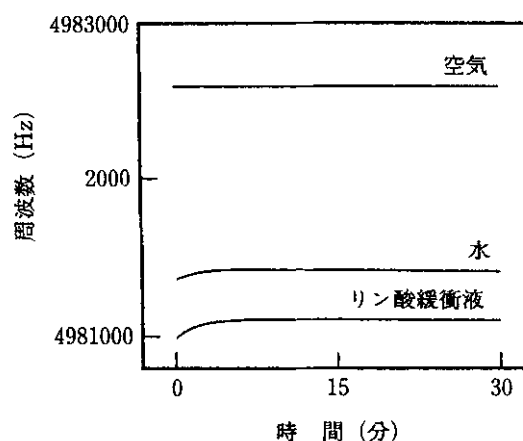


図7 構成したシステムの共振周波数応答

ての物理モデルから、液体の粘性と密度との関係式が導かれている¹²⁾。すなわち、水晶板が液体に対して水平方向へ振動するために液体との間の剪断応力を生じることから、ニュートンの粘性の式と水晶振動子の振動の式より、液体の粘性による周波数変化として次式が導かれている。

$$\Delta f = -f_0^{3/2} (\rho_L \eta_L / \pi \rho_Q \eta_Q)^{1/2} \quad (2)$$

ここで、 f_0 は水晶の共振周波数、 η_L および ρ_L は液体の粘性および密度、 η_Q および ρ_Q は水晶の弾性率および密度である。

式(2)から明らかなように、共振周波数は溶液の密度・粘性・温度・導電率の影響を受ける。しかしながら、これらの要素すべての振舞いを推定することはできない。実際に、それぞれのパラメータがどの程度共振周波数シフトに影響するかは、共振中の振動子それぞれの特質により変化し得る。式(2)では、これらの効果については述べられていない。

そこで、構成したシステムを用いて、振動子が空気・水およびリン酸緩衝液と接している状態で周波数応答を測定し、システムの振動特性を評価した。

2.3.2 試薬および測定系

抗体固定化などの操作を加えていない水晶振動子を用いて測定システムを構成した。このシステムを用いて、振動子上に水およびリン酸緩衝液(pH7.0, 0.05M)をそれぞれ1ml滴下した場合と、振動子上に液体を滴下しない場合、すなわち振動子表面が空気と触れている場合について、それぞれ周波数応答を測定した。水・リン酸緩衝液とも液温は25℃とした。また、恒温槽内の温度も25℃に調整している。脱イオン後、2回蒸留した水を実験に使用した。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2.3.3 結果と考察

構成したシステムの空気中あるいは水・リン酸緩衝液と接する状態での共振周波数応答を図7に示す。振動子表面が空気と触れている場合では、振動開始時から安定に振動してい

る。水あるいはリン酸緩衝液を振動子上に滴下した場合は、振動開始後5分から10分の間、わずかな周波数シフトが認められるが、それ以降は安定に振動している。空気あるいは何れの液体を用いた測定の場合でも、振動安定期に於ける周波数シフトはピークトゥピークで数ヘルツ程度であり、共振周波数の再現性も良好であった。

以上の結果から、構成したシステムが、液体と接する状態で安定に振動を行ない得ること、および振動子表面での質量付加を検出するデバイスとして用いるのに十分な振動特性を有していることが明らかになった。

3. 水晶振動子上への抗体固定化法の検討

3.1 抗体固定化法の検討

酵素・抗体などの生体由来物質の担体上への固定化は化学的あるいは物理的な方法が数多く提案されており¹³⁾、物理的吸着法・共有結合法・架橋法・重合付着法については水晶振動子上への抗体の固定化法として用い得ることが示唆されている¹⁴⁾。それらの中でも、担体へのアミノシラン誘導体の導入とグルタルアルデヒドによる架橋を組み合わせた固定化法は酵素などの固定化にも広く利用されており、簡便で効率の高い固定化法とされている。一方、より固定化効率の高い架橋法として水溶性カルボジイミドによる固定化も提案されている。そこで、水晶振動子上へ抗ヒト免疫グロブリンG(IgG)抗体をグルタルアルデヒド及びカルボジイミドを用いて固定化して抗体固定化水晶振動子を調整し、それら振動子の諸特性を測定してアルデヒドカップリング及びカルボジイミドカップリングの特徴を検討した。

3.2 実 験

3.2.1 抗体および試薬

抗ヒトIgG抗体はジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社から、ヒトIgGはICNバイオメディカルズ社から入手した。ヒトアルブミンはシグマ社から購入した。(γ-アミノプロピル)トリエトキシシラン(γ-APTES)は信越化学から、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドハイドロクロライド(EDC)は同人化学研究所から、N-ヒドキシサクシンイミド(NHS)はナカライテスク社からそれぞれ購入した。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。脱イオン後、2回蒸留した水を実験に使用した。

3.2.2 抗体固定化水晶振動子の調整および測定系

0.1M 硫酸水溶液(20ml)中で振動子上の白金電極に電位2.5V(vs. 銀/塩化銀電極)を印可して電極表面を陽極酸化(11mA・cm⁻², 30分)した。その後、振動子を5% γ-APTES-アセトン(20ml)中に漬けて(25℃, 1時間)、電極表面をシラン化しスペーサを介してアミノ基(アミノサポート)を

導入した。自然に乾燥した振動子を5%グルタルアルデヒド-リン酸緩衝液(pH7.0, 0.05M)中に浸し(25℃, 3時間)、次いで1mg・ml⁻¹抗IgG抗体-リン酸緩衝液(pH7.0, 0.05M)中に漬けて(25℃, 1時間)、抗体・電極表面間を架橋する。さらに、0.1M グリシン水溶液中に漬けて(25℃, 1時間)、残存する未反応のアルデヒドをブロックして抗体を固定化した振動子を得た。これを抗体固定化振動子Iとする。

同様にシラン処理して電極表面にアミノサポートを導入した振動子を、1mg・ml⁻¹抗IgG抗体・1.5mg・ml⁻¹EDC・0.9mg・ml⁻¹NHSを含む0.9% NaCl水溶液(pH4.5)中に浸し(25℃, 24時間)、抗体・電極表面間を架橋する。さらに、1mg・ml⁻¹グリシン・5mg・ml⁻¹EDC・3mg・ml⁻¹NHSを含む0.9% NaCl水溶液(pH4.5)中に浸し(25℃, 2時間)、未反応のアミノサポートをブロックして抗体を固定化した振動子を得た。これを抗体固定化振動子IIとする。

抗体固定化振動子IおよびIIを測定システムの振動子ホルダーに取り付けて測定に供した。振動子上に試験液1mlを滴下して測定を行なった。試験液には0.05M リン酸緩衝液(pH7.0)を用い、25℃に液温を保った。測定時以外はリン酸緩衝液中に浸し、25℃で保存した。

3.3 結果と考察

3.3.1 抗体固定化振動子Iの特性

抗体固定化振動子I上に試験液を滴下して測定した共振周波数応答を図8に示した。測定を開始した直後には僅かに周波数がシフトしているが、5ないし10分程度で定常状態に達した後は安定に振動しており、周波数のシフトは数ヘルツ程度である。

この振動子の5mg・ml⁻¹IgG添加に対する共振周波数応答と5mg・ml⁻¹アルブミン添加に対する共振周波数応答とをそれぞれ図9に示す。試験液中へのIgGの添加直後から、IgGと抗体との吸着に伴い、共振周波数が速やかに減少して

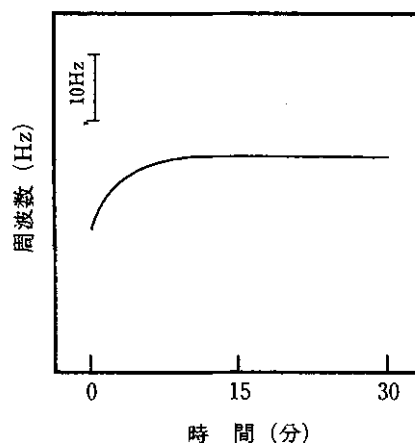


図8 抗体固定化振動子Iの試験液中に於ける共振周波数応答

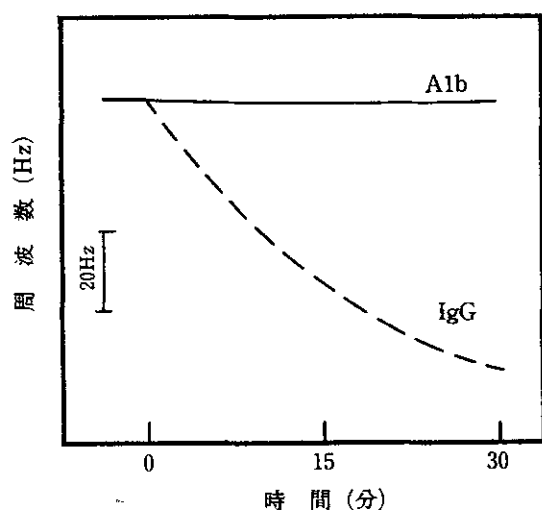


図9 抗体固定化振動子IのIgGおよびアルブミン添加に対する共振周波数応答

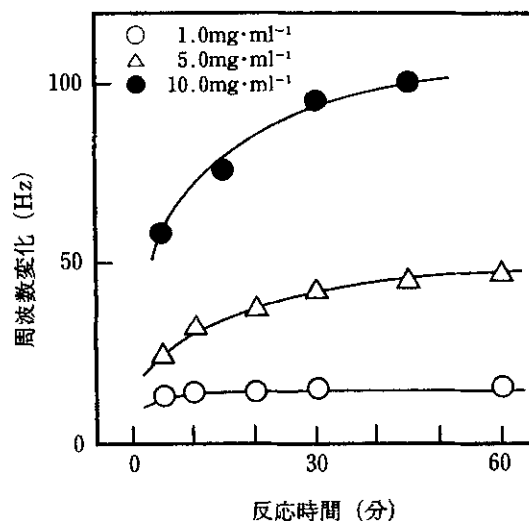


図11 抗体固定化振動子Iの定常共振周波数と反応時間の関係

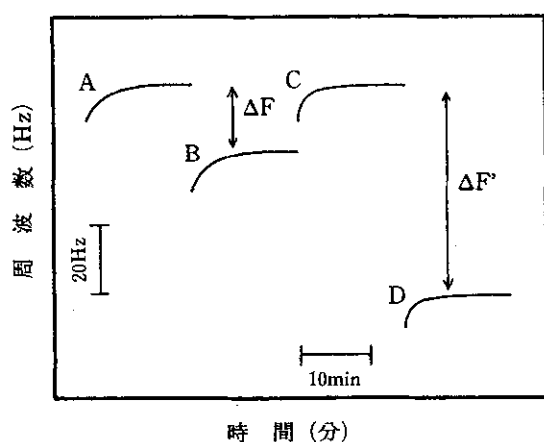


図10 抗体固定化振動子Iの校正曲線を求めた際の典型的な共振周波数シフト

- A : 反応前の周波数応答
B : 反応後の周波数応答
C : 吸着IgG除去後の周波数応答
D : 再度の反応後の周波数応答

いる。一方、抗体との特異性を持たないアルブミンを添加した場合では、共振周波数のシフトは認められない。従って、この振動子のIgGに対する選択性が期待した通りに現われていることが明らかである。

この振動子を用いてIgG濃度に対する共振周波数応答の校正曲線を求めた際に得られた典型的な共振周波数シフトを図10に示す。曲線AおよびBは、IgG ($2\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)と抗体との反応の前後での共振周波数応答を示している。曲線Aと曲線Bの間に現われている定常共振周波数の減少は電極表面に固定化されている抗体へのIgGの吸着に由来している。グリシン-塩酸緩衝液(pH2.4, 0.1M)で振動子表面を洗浄し吸着しているIgGを取り除いた後、周波数応答(曲線C)

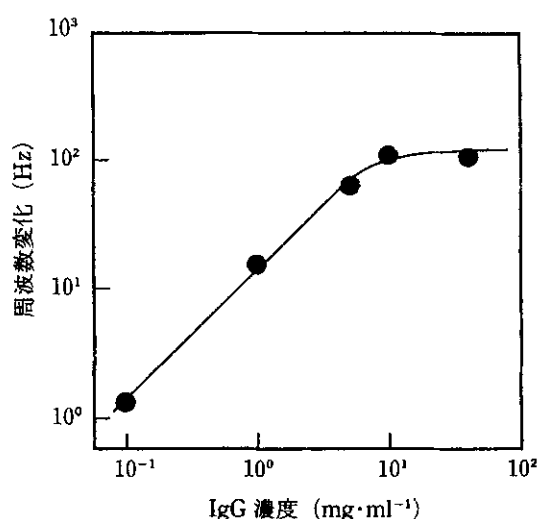


図12 抗体固定化振動子IのIgG濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線

を測定すると、定常共振周波数は反応前の状態に戻っている。曲線Dは再度IgG ($5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)と反応させた後の共振周波数応答を示しており、IgGと抗体の吸着に伴う周波数変化が再び現われている。以上の結果から、この振動子はグリシン-塩酸緩衝液による洗浄を行なうことで再利用が可能であること、および定常共振周波数の減少量はIgG濃度に比例していることが明らかである。

いくつかのIgG濃度に対する共振周波数応答の測定を種々の反応時間について行なって得られた反応時間と反応前後での定常共振周波数シフトの関係を図11に示す。図中に示されているいずれのIgG濃度についても、反応前後での定常共振周波数の減少量は反応時間の増加に伴って増加しているが、反応時間60分程度以降ではほぼ一定に成っている。従っ

て、以降の実験は反応時間を 60 分として行なった。

抗体固定化振動子 I の IgG 濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線を図 12 に示す。定常共振周波数応答と濃度の間には $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ まで直線関係が成立している。 $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 以上の濃度に於いても、応答は濃度の増加に伴って増大しており、 $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 程度までの IgG の定量が可能である。検出下限濃度は $0.1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ と見積られた。

3.3.2 抗体固定化振動子 II の特性

抗体固定化振動子 II の $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgG 添加に対する共振周波数応答と $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ アルブミン添加に対する共振周波数応答とをそれぞれ図 13 に示す。試験液中への IgG の添加直後から、IgG と抗体との吸着に伴い、共振周波数が速やかに減少している。一方、抗体との特異性を持たないアルブミンを添加した場合では、共振周波数のシフトは認められない。従って、この振動子の IgG に対する選択性が期待した通りに現われていることが明らかである。

抗体固定化振動子 I の場合と同様に反応時間と反応前後での定常共振周波数シフトとの関係を求めた。定常共振周波数の減少量は反応時間の増加に伴って増加するものの、反応時間 30 分程度以降ではほぼ一定になっていた。従って、以降の実験に於ける反応時間は 30 分とした。

抗体固定化振動子 II の IgG 濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線を図 14 に示す。定常共振周波数応答と濃度との関係より $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 程度までの IgG の定量を行ない得ることが明らかである。検出下限濃度は $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ と見積られた。

3.3.3 抗体固定化振動子 I および II の比較

抗体固定化振動子 II の検出下限は抗体固定化振動子 I の検

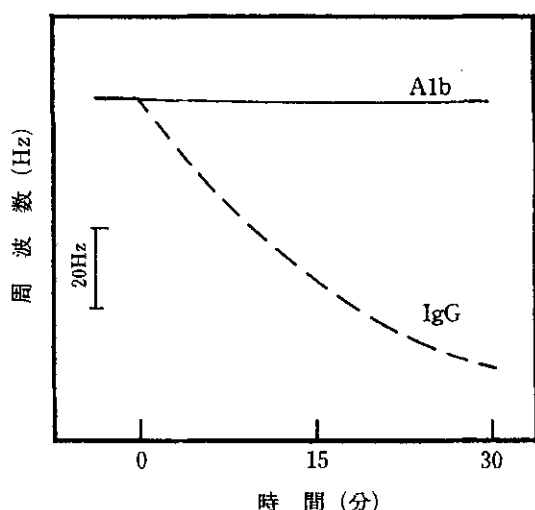


図 13 抗体固定化振動子 II の IgG およびアルブミン添加に対する共振周波数応答

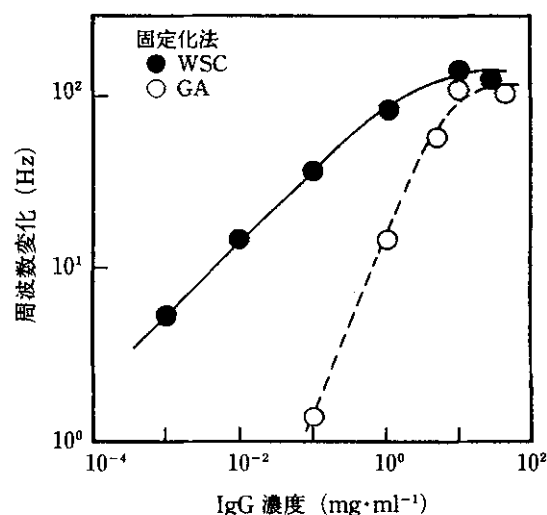


図 14 抗体固定化振動子 II の IgG 濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線

出下限に比べて 2 桁程度増大している。しかしながら、高濃度側の測定上限と、単位濃度変化当りの定常共振周波数応答変化するすなわち分解能については、2 つの振動子は同様の特性を示している。

振動子 II が定常共振周波数応答の測定に要する反応時間は振動子 I が要する反応時間に比べて半減している。これらの結果より、カルボジイミドカップリングがアルデヒドカップリングに比べて効率良く抗体を固定化できると考えられる。従って、以降の実験に於ける抗体の固定化はカルボジイミドによる固定化法を用いた。

4. 免疫グロブリンセンサの試作

4.1 免疫グロブリン定量の意義と既存定量法

血漿蛋白は、少なくとも 100 余種の異なった成分が混在して出来上がっている。このうち免疫グロブリン(Ig)は細胞内皮系の細胞で合成され、血漿蛋白のもつ生理的機能の中では抗体活性に関与している。すなわち抗体活性を持った免疫グロブリンにより体液性免疫機構が遂行されている。従って、免疫グロブリンの量的・質的検索は体液性免疫機構異常を知る大きな手がかりとなる^{2,3)}。

免疫グロブリンは物理化学的あるいは免疫学的性質により 5 つのクラス (G・A・M・D・E) に分類されており、そのうち IgG・IgA・IgM の 3 つの大クラス (血中濃度が生理的に高いもの) の測定は、多クローン性免疫グロブリン異常症・M 蛋白血症 (単クローン性免疫グロブリン異常症)・低 (無) 免疫グロブリン血症 (体液性免疫不全症) などの多くの免疫疾患の確定診断あるいは鑑別診断に用いられているが、その際には血清を試料として用い IgG・IgA・IgM の 3 者が常に同

時に定量される³⁾。

現在 IgG・IgA・IgM の定量・定性はゲル内免疫拡散法²⁻⁵⁾ (なかでも、一元放射状免疫拡散法^{2,3,15-17)}) あるいは比ろう法^{2,3,6,7)} により行なわれている。一元放射状免疫拡散法はゲル内沈降反応によって抗原を定量する方法である。一定の濃度の抗体を一様に含む寒天ゲルの層に円形の穴をあけ、抗原溶液を入れて反応させると沈降物が穴を中心に円形を生成する。この沈降物の面積が抗原濃度に比例するため、面積を測定すれば抗原濃度を知ることができる。この方法は大量の検体の処理に向いており、半定量的ではあるが日常検査にもっとも普及している。しかしながら、微量成分の測定には難点がある。また、ゲル層の作製などの前処理を要する上、測定の際にも煩雑な操作・時間を必要としている。一方、比ろう法は抗原抗体結合物による光の散乱を利用した測定法である。レーザー光を試料に照射し、散乱強度の最も強い角度での波長変化を伴わない散乱光を測定して抗原抗体結合物量を定量する。この方法は、測定に要する時間が短く再現性が良い点に特徴があり、自動化に向いていることから日常検査にも導入されつつある。しかしながら、この方法で得られる抗原抗体結合物量は相対値であり、血清中の抗原の測定には標準血清と比ろう法用の抗血清が必要となる。さらには、検体の血清中に凝集した免疫グロブリンが存在したり、脂質の濃度が高いときなどには、正確な測定値が得られない。したがって、測定に用いる血清・抗血清の凍結溶融に注意を要し、かつ凝集免疫グロブリンや脂質を除去するためのフィルタリング等の前処理が必要となる。

この様に、一元放射状免疫拡散法・比ろう法のいずれの測定法に於いても煩雑な操作や時間あるいは高価な試薬を必要としており、より簡便かつ迅速な測定法が求められている。そこで、IgG に特異性を持つ抗 IgG 抗体、IgA に特異性を持つ抗 IgA 抗体、IgM に特異性を持つ抗 IgM 抗体をそれぞれ固定化した水晶振動子を用いて IgG 測定用センサ・IgA 測定用センサ・IgM 測定用センサを構成し、これら 3 種のセンサを用いて、血清中に於いて免疫グロブリン各クラスの定量を試みた。得られた知見について以下に報告する。

4.2 実 験

4.2.1 抗体および試薬

抗 IgG 抗体・抗 IgM 抗体はジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社から、抗 IgA 抗体はオルガノン・テクニカ社から入手した。ヒト IgG・ヒト IgM は ICN バイオメディカルズ社から、ヒト IgA はオルガノン・テクニカ社から入手した。ヒト血清 (IgG・IgA・IgM マイナス) はオルガノン・テクニカ社から入手した。 γ -APTES は信越化学から、EDC は同人化学研究所から、NHS はナカライテスク社からそれぞれ購入した。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。脱イオン後、2 回蒸留した水を実験に使用した。

4.2.2 抗体固定化水晶振動子の調整および測定系

水晶振動子上への抗体の固定化は前述したカルボジイミドによる固定化法を用いた。すなわち、0.1M 硫酸水溶液 (20 ml) 中で振動子上の白金電極に電位 2.5V (vs. 銀 / 塩化銀電極) を印加して電極表面を陽極酸化 ($11\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 分) した。その後、振動子を 5% γ -APTES-アセトン (20ml) 中に漬けて (25℃, 1 時間)、電極表面にアミノサポートを導入した。自然に乾燥した振動子を $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 抗 IgG 抗体・ $1.5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $0.9\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 24 時間)、抗体・電極表面間を架橋する。さらに、 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ グリシン・ $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 2 時間)、未反応のアミノサポートをブロックして抗体を固定化した振動子を得た。これを抗体固定化振動子 III とする。

同様にシラン処理して電極表面にアミノサポートを導入した振動子を、 $0.4\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 抗 IgA 抗体・ $1.5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $0.9\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 24 時間)、抗体・電極表面間を架橋する。さらに、 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ グリシン・ $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 2 時間)、未反応のアミノサポートをブロックして抗体を固定化した振動子を得た。これを抗体固定化振動子 IV とする。

同様にシラン処理して電極表面にアミノサポートを導入した振動子を、 $1.0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 抗 IgM 抗体・ $1.5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $0.9\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 24 時間)、抗体・電極表面間を架橋する。さらに、 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ グリシン・ $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDC・ $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ NHS を含む 0.9% NaCl 水溶液 (pH4.5) 中に浸し (25℃, 2 時間)、未反応のアミノサポートをブロックして抗体を固定化した振動子を得た。これを抗体固定化振動子 V とする。

抗体固定化振動子 III・IV および V を測定システムの振動子ホルダーに取り付けて測定に供した。振動子上に試験液 1ml を滴下して測定を行なった。IgG・IgA・IgM いずれも取り除いた血清を試験液として用い、25℃に液温を保った。測定時以外はリン酸緩衝液中に浸し、25℃で保存した。

4.3 結果と考察

4.3.1 抗体固定化水晶振動子の各 Ig クラスに対する選択性

抗 IgG 抗体固定化振動子 (振動子 III) の $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgG 添加に対する共振周波数応答と $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgA 添加に対する共振周波数応答とをそれぞれ図 15 に示す。試験液中への IgG の添加直後から、IgG と抗体との吸着に伴い、共振周波数が速やかに減少している。一方、抗体との特異性を持たない IgA を添加した場合は、共振周波数のシフトは認められない。従って、この振動子の IgG に対する選択性が期待した通りに現われている。

抗 IgA 抗体固定化振動子 (振動子 IV) の $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgA 添

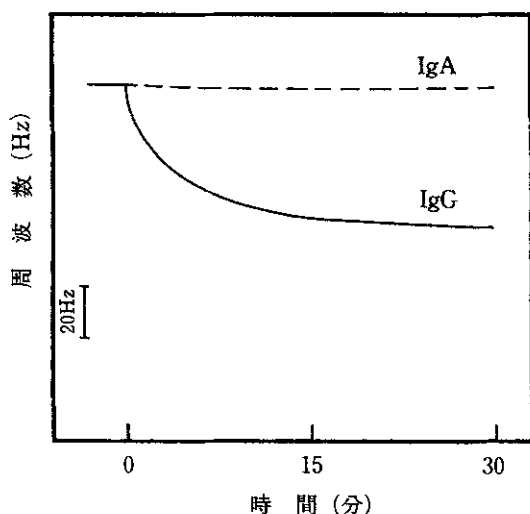


図 15 抗体固定化振動子Ⅲの IgG および IgA 添加に対する共振周波数応答

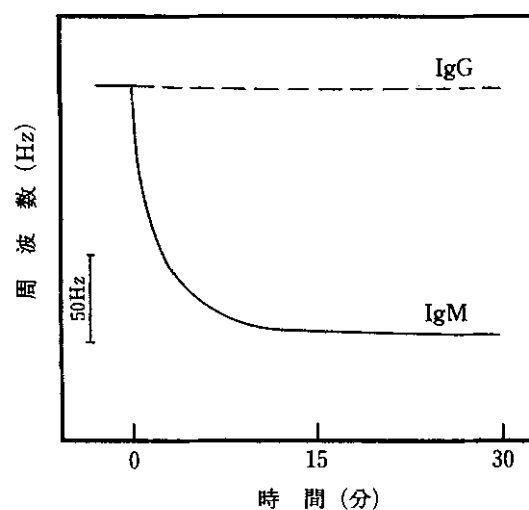


図 17 抗体固定化振動子Ⅴの IgM および IgG 添加に対する共振周波数応答

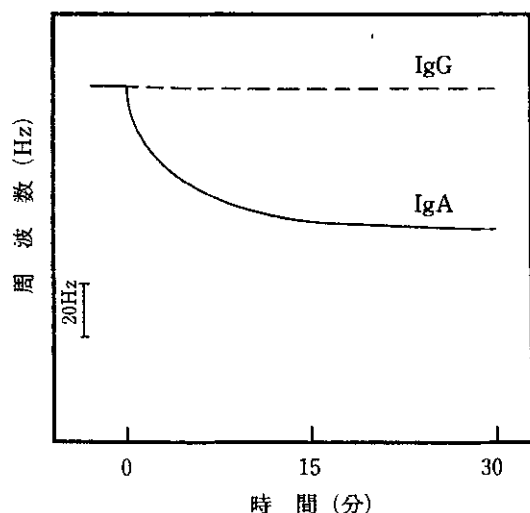


図 16 抗体固定化振動子Ⅳの IgA および IgG 添加に対する共振周波数応答

加に対する共振周波数応答と $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgG 添加に対する共振周波数応答とをそれぞれ図 16 に示す。試験液中への IgA の添加直後から、IgA と抗体との吸着に伴い、共振周波数が速やかに減少している。一方、抗体との特異性を持たない IgG を添加した場合では、共振周波数のシフトは認められない。従って、この振動子の IgA に対する選択性が期待した通りに現われている。

抗 IgM 抗体固定化振動子（振動子 V）の $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgM 添加に対する共振周波数応答と $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ IgG 添加に対する共振周波数応答とをそれぞれ図 17 に示す。試験液中への IgM の添加直後から、IgM と抗体との吸着に伴い、共振周波数が速やかに減少している。一方、抗体との特異性を持たない IgG を添加した場合では、共振周波数のシフトは認められ

ない。従って、この振動子の IgM に対する選択性が期待した通りに現われている。

4.3.2 各抗体固定化水晶振動子の各 Ig クラスに対する共振周波数応答

振動子 III・IV・V を用いて各々対応する Ig クラス濃度に対する共振周波数応答の校正曲線を、前述の測定法に従ってそれぞれ求めた。すなわち、測定液中に於いて共振周波数応答を測定し定常共振周波数を求める。ついで測定液中に所定の濃度の Ig クラスを添加し所定の時間反応させた後、再度測定液中で共振周波数応答を測定し、得られた定常共振周波数と反応前の定常共振周波数との差異を求める。その後、グリシン－塩酸緩衝液（pH2.4, 0.1M）を用いて振動子表面を洗浄し吸着している Ig クラスを取り除いた後、再度の使用に供した。

それぞれの振動子について、各々対応するクラスとの反応時間と反応前後での定常共振周波数シフトとの関係を求めた。いずれの振動子に於いても、定常共振周波数の減少量は反応時間の増加に伴って増加するものの、反応時間 30 分程度以降ではほぼ一定になっていた。従って、以降の実験に於ける反応時間は 30 分とした。

抗 IgG 抗体固定化振動子（振動子 III）の IgG 濃度に対する定常共振周波数応答、抗 IgA 抗体固定化振動子（振動子 IV）の IgA 濃度に対する定常共振周波数応答および抗 IgM 抗体固定化振動子（振動子 V）の IgM 濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線をそれぞれ図 18 に示す。

振動子 III に於いては、定常周波数応答と IgG 濃度との間には少なくとも $0.1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ から $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 程度までは直線関係が成立していた。IgG の正常値範囲は $8\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ から $15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 程度であり、試料を 2 倍程度に希釈することで全域が測定可能である。

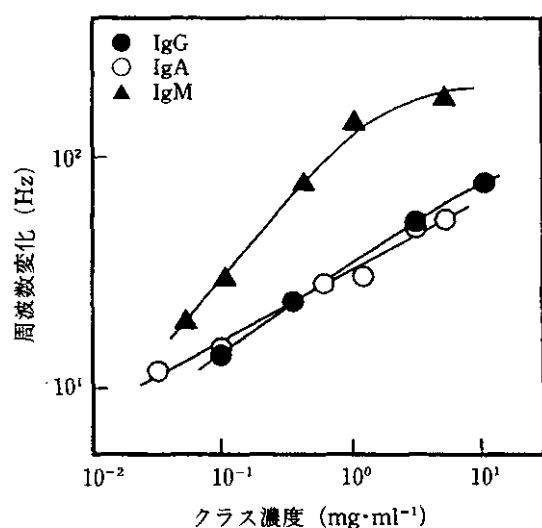


図 18 抗体固定化振動子Ⅲ・Ⅳ・Ⅴの各クラス濃度に対する定常共振周波数応答の校正曲線

振動子Ⅳに於いても、定常周波数応答とIgA濃度との間には0.05mg・ml⁻¹から10mg・ml⁻¹程度まで直線関係が成立していることが明らかであり、正常値範囲(2mg・ml⁻¹から3mg・ml⁻¹)を含む広い範囲にわたってIgAの測定が可能である。

振動子Ⅴに於いても同様に、定常周波数応答とIgM濃度との間には0.05mg・ml⁻¹から1mg・ml⁻¹程度まで直線関係が成立しており、1mg・ml⁻¹を越える濃度範囲でも5mg・ml⁻¹程度まではIgM濃度の増加に伴って定常周波数応答が増加しており、正常値範囲(0.05mg・ml⁻¹から1.5mg・ml⁻¹)を含む広い範囲にわたってIgMの測定が可能である。以上の結果から、これらの抗体固定化振動子に用いて血清中の免疫グロブリンクラスの定量が行ない得ることが明らかである。

5. 結 言

圧電素子の高付加価値化と迅速かつ簡便な免疫測定法への要望を踏まえて、道内にメーカーの多い水晶振動子を取り上げ、水晶振動子を用いる免疫センサの開発を行った。

水晶振動子を利用して測定システムを構成し、振動子が空気・水・リン酸緩衝液と接している状態に於ける振動特性の評価を行ない、システムが液体と接する状態で安定に振動を行ない得ること、および振動子表面での重量付加を検出するデバイスとして用いる為に十分な振動特性を有していることを明らかにした。

さらに水晶振動子上への抗体固定化法として、アミノシラン誘導体によりアミノ基を導入した振動子表面と抗体との間の、アルデヒドカップリング及びカルボジイミドカップリングについて検討を行ない、カルボジイミドカップリングの

優位性を明らかにした。

各種免疫疾患の診断にはいくつかの免疫グロブリンクラス(IgG, IgA, IgM, その他)の検査結果が使われているが、その迅速性の向上を目的として、抗IgG・抗IgA・抗IgMの各抗体を振動子表面に固定化した免疫グロブリンセンサを開発した。

その結果、IgGについては0.1~10mg・ml⁻¹の濃度範囲で、IgAについては0.05~10mg・ml⁻¹の濃度範囲で、IgMについては0.05~5mg・ml⁻¹の濃度範囲で、それぞれ定量的に測定可能であることを明らかにした。いずれのクラスについても、正常値を含む広い測定範囲が得られており、実用化が可能であると考えられる。さらに、今後の実用化技術の開発に向けて、抗体固定化法・システム構成法などの多くの知見と要素技術を獲得した。

最近、生化学的物質の検査薬として数多くのモノクローナル抗体が開発されている。本研究で得られた技術はそれらにも適用可能である。また、医療、健康管理、環境、食品など数多くの分野から新しいセンサを求める声が聞こえているが、実用化されている免疫センサは数少ない。今後、本研究をもとに、新しいセンサの開発に向けて取り組む予定である。

参考文献

- 1) バイオセンシングとそのシステム, 日本化学会, 学会出版センター.
- 2) 分子免疫学Ⅲ(新生化学実験講座12), 日本生化学会, 東京化学同人.
- 3) ハンディ臨床検査法・小酒井望ら, 宇宙堂八木書店.
- 4) "Methods in Immunology and Immunochemistry", ed. by C.A.Williams, M.W.Chase, Vol.3, p.103, Academic Press, New York (1981).
- 5) J.Oudin, "Methods in Enzymology", ed. by H. Van Vunakis, J. J. Langone, Vol.70, p.166, Academic Press, New York (1980).
- 6) K. Hoffken, C. G. Schmidt, "Methods in Enzymology", ed. by J.J. Langone, H. Van Vunakis, Vol.74, p.628, Academic Press, New York (1981).
- 7) 飯村康夫・櫻林郁之介, 河合忠, "臨床免疫 handbook", 日本臨床, 510号, 1209 (1984).
- 8) 村松宏ら, 計測技術, 7, 35 (1989).
- 9) G.Sauerbrey, Z. Physik., 155, 206 (1959).
- 10) 野村俊明ら, 日化誌, 1980, 1621 (1980).
- 11) T.Nomura, et al., Anal.Chim.Acta, 142, 281 (1982).
- 12) K.K.Kanazawa et al., Anal. Chim. Acta, 175, 99 (1985).
- 13) 固定化酵素, 千畑一郎, 講談社サイエンティフィック.
- 14) G. G.Guilbault et al., Bio/Technology, 7, 349 (1989).

- 15) G.Mancini, A.O.Carbonara, J.F.Heremans, Immunochimistry, 2, 235 (1965).
- 16) J.L.Fahey, E.M.Mckelvery, J.Immunol., 94, 84 (1965).
- 17) J. P. Vaerman, "Methods in Enzymology", ed. by J.J. Langone, H. Van Vunakis, Vol.73, p.291, Academic Press, New York (1981).