

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08632

研究課題名(和文) 磁気検出法によるホモジニアスアッセイの深化と微量血液検査システムの開発

研究課題名(英文) Development of micro blood clinical examination with deepening of homogeneous assay by magnetic detection

研究代表者

隈 博幸 (Kuma, Hiroyuki)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：40435136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸化鉄と抗体分子からなる検出用磁気マーカーと感度の高い磁気検出センサーの組合せによる磁気的免疫検査法について、その各構成要素の深化による簡便かつ高感度な磁気的免疫分析システム(ホモジニアスアッセイ)の構築を行った。すなわち、B/F (Bound/Free)分離の洗浄工程を不要とする高感度な液相免疫検査法の確立と、試作機を用いた磁気的免疫検査法による検査実験を通して、本手法の有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)：We have developed the magnetic immunoassay system using magnetic markers consist of Fe₃₀₄ beads and antibody molecules, and SQUID magnetic sensor by constructing a simple, and highly sensitive magnetic homogeneous assay with deepening their components. We have also demonstrated that the ability for our method through the experiments using our prototype machine without the washing step of B / F (Bound / Free) separation.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：磁気マーカー 免疫検査システム 抗原抗体反応

1. 研究開始当初の背景

免疫検査法は、抗体と抗原の特異的結合反応を利用した物質の同定・定量法であり、臨床検査・医薬品開発のみならず、環境汚染分析や異物混入検査等、幅広い分野において一般的に用いられている代表的な分析法の一つである。医療診断分野では、アレルギー疾患をはじめとする多種多様の検出項目があり、いくつものメーカーから汎用検査機器が販売されている。そのほとんどが化学発光物質・蛍光物質を標識した抗体による抗原検出法を用いており、微量物質を検出するためにはある程度の試料溶液を確保する必要がある。一方、我々は抗体に標識した 50~100 nm の微小な酸化鉄粒子から発生する磁気信号を、高感度磁気センサーにより検出し定量する新規の手法を開発し、高感度性と高速性を実証してきた。しかしながら、この磁気的検査法の臨床応用にはまだ解決すべき課題を多く残しており、検査システムの高度化・高性能化を図る必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、磁気的免疫検査法の各構成要素の深化による簡便かつ高感度な磁気的免疫分析システム（ホモジニアスアッセイ）の構築を目的とする。すなわち、B/F (Bound/Free) 分離の洗浄工程を不要とする高感度な液相免疫検査法の確立と、それを構成する(1)磁気マーカー、(2)磁気印加システムの高度化、及び(3)新規検出物質の定量性の証明を目指し、臨床検査に資する検査システムの試作を行う。また、試作機を用いた磁気的免疫検査法による検査実験を通して、本手法の有効性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 磁気検出技術：磁場印加機構の開発

浮遊した捕捉体の検出に最適な磁場（強度・時間）を印加するためのパルス磁場印加機構を開発した。最適な磁場印加条件を明らかにするとともに、試料が磁石直上を通過する時にタイミングを合わせ最適な強度の磁界を印加する機構を開発した。また、これら要素技術を統合し、臨床検査室における自動化を目的とした検査システムの構築を行った。

(2) 微粒子改良：磁気マーカーの粒径制御技術の開発

磁気/高分子複合粒子の粒径制御技術を開発し、全体のサイズが 100 nm 程度かつ溶液中において高い分散性を示す複合ナノ粒子の作製プロセスを確立した。また、分散安定性を改善するためには、磁気マーカー表面の状態を制御する必要がある。

(3) 臨床評価：検査プロトコルの確立と総合的臨床評価

過去に実証してきた各種蛋白質（免疫グロブリンやサイトカイン）及びカンジダ菌に加え、スギ花粉抗原（Cry J1, Cry J2）の検出実験を通して、磁気的検査のための検査工程を開発し、BF 分離不要な液相での磁気的検査法の定量性を確立した。

4. 研究成果

(1) 磁気検出技術の高度化：新規磁場付加システムの検討

測定時の磁場印加、及び遠心力による沈殿の影響を除去するため、新しい磁場印加装置を開発した（図 1）。本装置は、測定前に 30 分の事前磁場印加を行うことにより、抗原測定時に印加する磁場を大幅に減少（300 ガウス 50 ガウス）しても、磁気マーカーの持つ残留磁気を保持させることができる。このことにより、測定時の容器回転に伴う遠心力や磁場印加によって生じるマーカーの沈殿を防ぐことが可能となり、この沈殿マーカーからの非特異的な磁気信号を大幅に減らすことができた（図 2）。

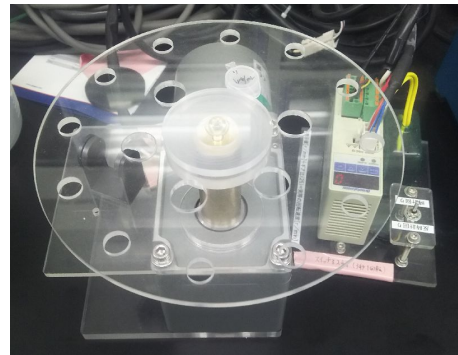


図 1. 事前磁場印加装置

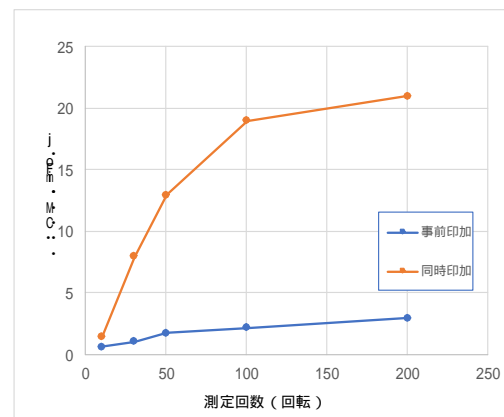


図 2. 非特異マーカーからの磁気信号の差

(2) 微粒子改良：磁気マーカーの粒径制御
我々が開発した磁気マーカーを用いたホモジニアスアッセイは、図 3 のように液相中

で抗原抗体反応を行い、未結合マーカ（点線中）のブラウン緩和を利用した、洗浄が不要の抗原検出法である。

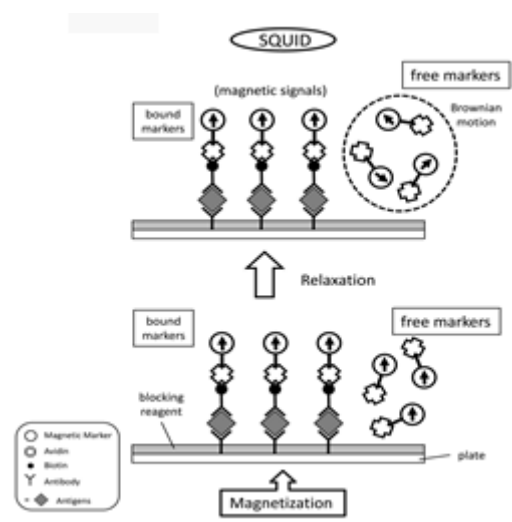


図 3 : 磁気的ホモジニアスアッセイ

したがって未結合マーカからの磁気シグナルは0となるのが理想であり、そのための液中分散性が優れたマーカが必須となる。これまで我々が用いていた磁気マーカはFG beads (多摩川精機)は、購入直後の液中分散性は良好であったが、抗体付加後、抗原測定時には磁場の影響と遠心力により沈殿が生じ、結果沈殿マーカからの非特異な磁気信号が検出されていた。そこで、より高度な分散性を得るため、いくつかの市販マーカを試してみた。その結果、肝造影剤であるリゾピスト注(富士フィルムRIファーマ)の分散性、均一性が最も高く、磁気強度とのバランスがとれていたため、この粒子を使用することとした。また、本粒子への抗体の結合反応は有機合成的反応で行い、合成試薬としてトリアジン系縮合剤であるDMT-MM、カルボジイミドであるWSC及びDCCの3種を用いた。その結果、粒子への抗体付加分子数(2~5分子/粒子)及び抗体付加粒子の水系反応液への再分散性から、WSC(water-soluble carbodiimide)を用いた粒子が測定に最も適していることが分かった。

(3) 臨床評価

本研究では、環境汚染分野への応用を目指し、スギ花粉抗原(Cry J1, J2)の検出実験を行った。スギ花粉抗原では、フェムトモルレベル(0.01ng)の検出感度を得ることができた。これは磁気マーカの高度化と磁場印加の深化による非特異シグナルの減少が大きく寄与していると考えられる(図4)。

また、Cry J2については、J1より感度が低い(10ng程度:データ非公開)ものであったが、抗体を変えることで感度を向上させることができると考える。またこれまでCry J2

については検出ができなかったが、本システムを用いるとCry J2が検出可能であることを初めて示すことができた。このように、一定量のスギ花粉抗原の検出が実証されたことから、空気中に浮遊するスギ花粉の検出に一定のメドがついたとも考えられる。現在、スギ花粉そのものを用いた大気浮遊の花粉の検出法を検討し実験を行っている。これらの成果については、現在論文を準備中である。このように、花粉の収集法が定めれば、従来のレーザー法に取って代わる新しい分析方法となる可能性を示すことができた。

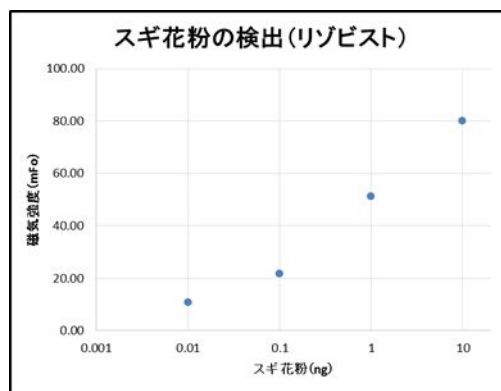


図 4 : 磁気マーカによるCry J1 (スギ花粉)抗原の検出

さらに、これまでの研究で既に検出可能なことを示してきた蛋白質(IL-8、IgE等)や真菌であるカンジダ菌(C.albicans)について、今回用いた新たな磁場印加装置による測定を行い、検出感度が向上しているかどうかの検証を行う必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguel Y, Hatae H, Kuma H, et al., Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3, *Science* 350: 680-684, 2015 (査読有)

DOI : 10.1126/science.aaa4335

Shinohara K, Hamasaki N, Takagi Y, et al., Multianalyte Conventional Reference Material (MacRM): A Useful Tool for Nationwide Standardization of Laboratory Measurements for Medical Care-A Model Study in Japan, *Clinical Chemistry* 62: 392-406, 2016 (査読有)

DOI : 10.1373/clinchem.2015.245621

Matsukawa Y, Asano E, Tsuda T, Kuma H, et al., Genotyping analysis of protein S-Tokushima (K196E) and the involvement

of protein S antigen and activity in patients with recurrent pregnancy loss, *Eur J Obstet Gynecol Peprod Biol* 211, 90-97, 2017 (査読有)

DOI : 10.1016/j.ejogrb.2017.01.056.

Kurano M, Nishikawa M, Kuma H, Jona M, Yatomi Y, Involvement of Band 3 in the efflux of sphingosine 1-phosphate from erythrocyte, *PLoS One* 12: e0177543, 2017 (査読有)

DOI : 10.1371/journal.pone.0177543.

〔学会発表〕(計4件)

高安 結, 東牧里奈, 円福敬二, 隈 博幸: 磁気的免疫検査システムを用いたスギ花粉抗原の検出, 日本薬学会第 137 年会 (2017 年 3 月 24 - 27 日), 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

隈 博幸, 太田一寿, 浦田美秩代, 隈 美智代, 濱崎直孝: プロテイン S 比活性測定, 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 (2016 年 9 月 1 - 4 日), 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

隈 博幸: 新しいVTE: プロテイン S 活性, 及びプロテイン S 比活性測定, 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (2017 年 6 月 8 - 10 日), 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

楢先玲奈, 高安 結, 波多江日成子, 円福敬二, 隈 博幸: 改良型磁気検出システムを用いたスギ花粉抗原の検出法 (2018 年 3 月 25 - 28 日), 金沢もてなしドーム (石川県金沢市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

(長崎国際大学薬学部臨床検査学研究室 HP)
<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/cclm/immunoassay.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隈 博幸 (KUMA, Hiroyuki)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号: 40435136

(2) 研究分担者

濱崎 直孝 (HAMASAKI, Naotaka)

長崎国際大学・薬学部・客員教授

研究者番号: 00091265

(4) 研究協力者

塚本 晃 (TSUKAMOTO, Akira)

超伝導センシング技術研究組合
研究員