

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18112

研究課題名(和文)術後の急性心筋梗塞予防のための周術期心筋マーカーモニタリング用センサの創製

研究課題名(英文)Development of a biosensor for perioperative monitoring of cardiac marker to prevent postoperative acute myocardial infarction

研究代表者

當麻 浩司(TOMA, Koji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40732269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、手術後の主な死亡原因の一つである急性心筋梗塞を予防するために、光バイオセンサを利用した周術期血中心筋マーカーモニタリングシステムの要素技術を構築することであった。血中の心筋マーカー濃度を連続計測できれば急性心筋梗塞の予測・早期発見にむすびつくと考え、研究を進めてきた。28年度には繰り返し免疫測定が可能な光バイオセンサの構築を行うとともに、モデル実験によるセンサシステムの評価・改良を行った。29年度には、引き続きマウス、抗マウス抗体によるモデル実験を行い、装置の最適化や、システムの修正などを行うとともに、本センサによる繰り返し測定の可能性を検証した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to develop an optical biosensor that can be used for perioperative monitoring of cardiac marker to prevent postoperative acute myocardial infarction. In fiscal year 2016, an optical biosensor for repeated measurement was developed, and it was characterized by a model experiment. In fiscal year 2017 year, along with optimizing and tuning the development of the setup and the system, characterization with a model sample, mouse and anti-mouse antibodies, were continued. It showed increase of the sensor output depending on concentration of anti-mouse antibody along with high reproducibility in a repeated measurement of the antibody.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：プラズモン 心筋梗塞 モニタリング 免疫センサ

1. 研究開始当初の背景

現在、心臓手術後を受けた患者の2-15%が、また非心臓手術を受けた年間2億人の患者の内100万人が、術後30日以内に急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction, AMI) を発症し、死亡している。AMIは冠動脈が血栓で急激に閉塞され、心筋組織が壊死を起こす疾患であり、術後AMIは、炎症状態・術中のストレス・組織の損傷に起因する凝固性亢進による血栓の形成が要因の一つだと考えられている。AMIの診断基準は、(a)虚血の症状の出現に加え、(b)心電図の異常と(c) creatine kinase-MB (CK-MB) や cardiac troponin (cTn) などの心筋マーカー濃度の上昇と定めている。しかし実際には、術後に鎮静状態にある患者から虚血の症状や心電図の異常を見極めるのは困難であるため、正常と診断された患者がAMIを発症する事例が多く発生し、必ずしも診断基準が適正でないことが指摘されている。例えば、術後30日以内に心筋障害を発症した中で、胸部の不快感や息切れなどの虚血自覚症状を呈した患者は約16%しかいなかったという報告もある (F. Botto et al., Anesthesiology, 2014)。そこで、欧米の心臓学会 (ESC、ACCF、AHA、WHF) は、周術期におけるAMIを予測するために術前と術後48時間、72時間において心筋マーカーを測定することを推奨している。つまり、周術期における心筋マーカー濃度の時間変化情報が、術後AMIの発症の発見、もしくはリスクの予測を行う上で非常に有効だと考えられる。

心筋マーカー検出に広く用いられている方法として、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) やイムノクロマトグラフィー法などがある。しかしながら、ELISAは測定に長い時間がかかり、イムノクロマトグラフィー法は感度が低い。また、両方法は共通してバッチ計測であり、連続的な測定を行うことはできない。そのため従来法では、血中心筋マーカー濃度の術前・中・後における経時変化をモニタリングすることは困難であり、正確なAMIの発見・予測を行うことができない。以上の理由から、高い感度、選択性を有し、連続的にcTnなどの血中心筋マーカーを測定可能な技術が求められている。特に、心筋マーカー濃度の周術期にわたる経時変化は未知であり、モニタリングを行うことで新たな医学的知見の獲得と、それに基づくAMIの早期発見・予測・予防を実現させる新規の医療診断技術へと応用することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、手術後の主な死亡原因の一つである急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction, AMI) を予防するために、表面プラズモン共鳴バイオセンサを利用した周術期血中心筋マーカーモニタリングシステムの要素技術を構築することであった。現在

AMIを診断するために行われている免疫測定法はバッチ法であり、一度の測定にしか使用できない。そのため cardiac troponin (cTn) などの血中心筋マーカー濃度の経時変化を連続的に把握することは困難であり、AMIの発症を見逃す可能性が高かった。本研究では、センサ表面を pH 変化に高い耐性を有する膜タンパク ORLA85 タンパク質などで修飾することで、繰り返しの免疫測定を可能にし、連続的な心筋マーカーの測定を試みた。周術期にわたる血中心筋マーカー濃度の経時変化を捉えることで、AMIの早期発見・予測・予防を実現させる、新規の医療診断技術への応用を目指す研究であった。

3. 研究の方法

(1) 周術期モニタリングシステムを実現するために、免疫測定法で抗体・抗原の結合・解離が高い再現性で繰り返し行えるセンサ表面をもった、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したバイオセンサを構築した。検討方法としては、金薄膜で覆われたセンサ表面を polyethylene glycol (PEG) チオールと ORLA85 タンパク質にて修飾する。PEGにより非特異吸着を阻害し、ORLA85により再生可能な表面が得られると期待した。また、表面プラズモンポラリトン (SPP) 励起に最適な波長を有限要素法や数値解析などを用いて検討し、高感度化を図った。さらに、連続の免疫測定を少量のサンプルで可能にするために、フローセルを設計・作製した。

(2) mouse IgG, anti-mouse IgG を使ったモデルサンドイッチアッセイを行うことで、構築した SPR バイオセンサの基礎特性を評価するとともに、センサシステム全体の評価・改良を行った。初めに ORLA85 にてセンサ表面を修飾し、その後 mouse IgG, anti-mouse IgG の順で結合させた。アッセイ後に塩酸を加えることで IgG を解離させ、センサ表面を再生した。この操作中は、励起光の入射角および波長を固定し、励起光反射率の時間変化を測定することで、分子吸着の kinetics 測定を行った。また、ORLA85 の protein G を、BS(PEG)₅ などの架橋剤を用いることで、一次抗体 (mouse IgG) と protein G をクロスリンクさせ、mouse IgG をセンサ表面上に固定化可能だと考えられる。光学系やフローセルに関しても S/N 比やサンプル量に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) はじめに SPR バイオセンサのシステムを構築した。サンプルは SPP の励起に必要な金基板上にフローセルを装着することで、ポンプにより送液される。図1にグリセリン溶液 (屈折率 $n = 1.3404$) を送液・負荷した際のセンサ応答を示す。図1aでは同一センサチップへ5回連続的にグリセリン溶液を負荷したが、負荷に伴う励起光反射率

(reflectivity)の上昇と、水へ切り替えた際の出力のベースラインへの回帰が観察され、5回の出力(ΔR)の変動係数(C.V.)は0.11%と非常に優れた再現性を示した。また、フローセルは polydimethylsiloxane (PDMS)にて作製したが、そのバラツキはセンサ出力の再現性に影響を及ぼすため、5個のフローセルを作製し、それぞれにグリセリン溶液を送液した際のセンサ出力を比較した(図1b)。その結果出力のC.V.は0.14%であり、異なるフローセルを使用することによる誤差は無視できる程度であることが明らかとなった。

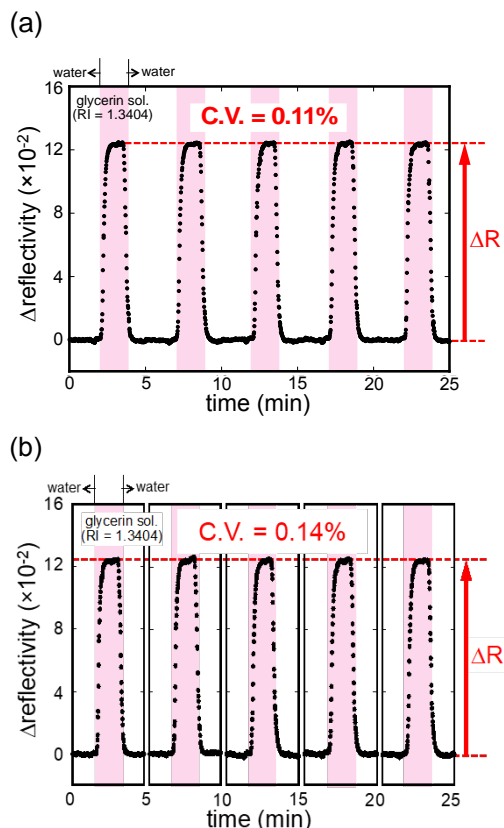


図 1(a)グリセリン溶液を連続で負荷した時のセンサ応答および(b)異なるフローセルにてグリセリン溶液を負荷した際のセンサ出力。

(2) 次にモデルサンプルである mouse IgG と anti-mouse IgG を用いた SPR バイオセンサの基礎特性評価を行った。センサ表面の修飾には pH 体制に優れた ORLA85 と PEG チオールの自己組織化単分子膜の形成を行った。その後、ORLA85 に融合した protein G へ 1 次抗体である mouse IgG を結合・固定化した。図 2 に mouse IgG の固定化した際の様子を示す。Mouse IgG を負荷することで結合に伴う反射率の上昇が観察された。その後架橋剤である PEGylated bis(sulfosuccinimidyl)suberate [BS(PEG)₅] をセンサ感応部へと負荷することで mouse IgG と protein G を架橋し、mouse IgG の固定化を行った。架橋後は 100 mM の HCl を負荷し、未架橋の mouse IgG を感応部から

除去した。この時、HCl 負荷前後の反射率変化量の比 ($\Delta a / \Delta b$) を抗体固定化率として定義したところ、1 回目の架橋処理にて 84.3%であった固定化率が、3 回架橋処理を繰り返すことで 96.3%に向上した。これは一度結合した mouse IgG の内、ほぼ全てが固定化されたことを示す。

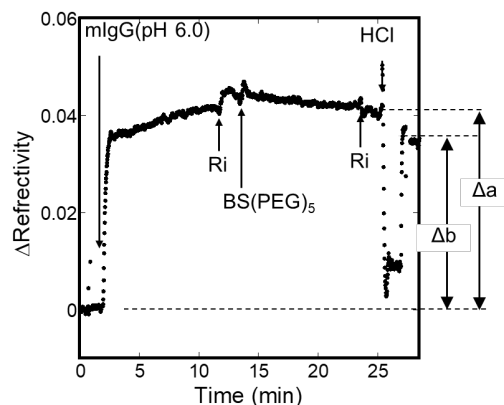


図 2 一次抗体である mouse IgG 固定化時の反射率変化の様子。図中 mIgG, mouse IgG の負荷; Ri, リンス; BS(PEG)₅, 架橋剤の負荷; HCl, 塩酸処理。

次に作製した SPR バイオセンサを用いて、anti-mouse IgG を測定し、特性評価を行った。図 3 に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の anti-mouse IgG を負荷した際の出力応答を示す。Anti-mouse IgG と mouse IgG が親和性による特異結合を起こした結果、出力の上昇が観察された。その後、100 mM の HCl を負荷することで結合した anti-mouse IgG を解離・除去し、その結果反射率がベースラインへ回帰した。このことから、本手法により、測定から感応部の再生まで行えることが示され、本 SPR バイオセンサによるモニタリングの可能性が示された。

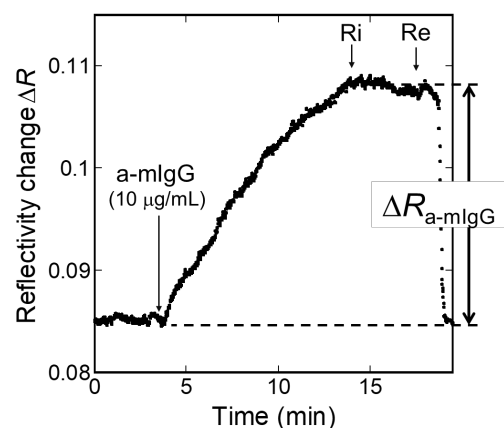


図 3. モデルサンプルである Ani-mouse IgG をセンサ感応部に負荷した際の出力応答。a-mIgG, anti-mouse IgG.

その後、様々な濃度の anti-mouse IgG にて

測定を行いセンサ出力 (ΔR_{a-igG}) を求めたところ、60 ng/mL-31.5 μ g/mL (0.4-210 nM) の範囲で anti-mouse IgG の定量が可能であった。

最後に、本 SPR バイオセンサを anti-mouse IgG の繰り返し測定に供したところ、10 回の測定におけるセンサ出力が C.V. = 7.5%を示し、非常に高い再現性にて繰り返し免疫測定が行えることが示された。本研究にて明らかとなったセンサ特性から、開発した SPR バイオセンサのモニタリング応用への高い可能性が示され、周術期にわたる心筋マーカーモニタリングによる AMI 予防技術の実現が期待される。

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)

[学会発表](計3件)

Toma K, Kishikawa C, Arakawa T, Mitsubayashi K, Regenerable and antibody-immobilized surface architecture on surface plasmon biosensor for continuous immunosensing, 5th International Conference on Bio-Sensing Technology, 2017.5.7-10, Riva del Garda, Italy.

Toma K, Kishikawa C, Arakawa T, Mitsubayashi K, Regeneratable surface plasmon resonance immunosensor for monitoring in medical care and environmental medicine, 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9), 2017.6.26-28, Kanazawa, Japan.

Toma K, Arakawa T, Mitsubayashi K, Continuous antigen sensors "Immunowatchers" for prevention of bioaerosol-associated and acute diseases, The 4th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on "Biomedical Materials and Engineering", 2018.1.12-12, Bangkok, Thailand.

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者

當麻 浩司 (TOMA, Koji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40732269