

平成 21 年 3 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18360199  
 研究課題名(和文) 磁気マーカを用いた BF 分離不要の新機能を有する高速・高感度免疫検査システムの開発  
 研究課題名(英文) Magnetic Immunoassay system without BF separation for rapid and sensitive detection of biological targets  
 研究代表者  
 円福 敬二 (ENPUKU KEIJI)  
 九州大学・システム情報科学研究所・教授  
 研究者番号：20150493

研究成果の概要：免疫検査は医療診断や医薬開発の分野で必要となる種々の蛋白質を抗原-抗体の結合反応を用いて検出する方法であり、バイオ計測において基盤となる検出法である。本研究では、磁気マーカー抗体と SQUID 磁気センサを用いた新規な磁氣的検出法により、B/F(Bound/Free)分離不要の新機能を有する溶液中での免疫検査法を開発した。本検査法の基礎となる溶液中での磁気マーカー抗体のブラウン緩和特性を定量的に明らかにするとともに、この緩和特性を利用した BF 分離不要の SQUID 検査システムを開発した。また、本システムを用いて human IgE 呼ばれるタンパク質やカンジダ菌などの検出実験を行い、本手法の有効性を実証した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
19年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
20年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：免疫検査、磁気マーカー、ブラウン緩和、BF 分離、SQUID、液相検査

## 1. 研究開始当初の背景

免疫検査は医療診断や医薬開発の分野で必要となる種々の蛋白質を抗原-抗体の結合反応を用いて検出する方法であり、バイオ計測において基盤となる検出法である。近年、多種類の微量な蛋白質を高速・高感度に検出する重要性が高まっており、そのための免疫検査システムの開発が切望されている。例えば、プロテオミクス

研究により報告されてきている疾患由来の微量な蛋白質の同時多項目検査が可能になれば、これを利用した新たな臨床診断方法が開発できると期待されている。

このため種々の検出法が研究されているが、その中の一つに、蛋白質を磁氣的に検出する新規な検出法がある。本手法は抗原-抗体の結合反応を磁気マーカー抗体と SQUID 磁気センサを用いて検出する新

しい検出法であり、従来の光学的手法にはない超高感度性や B/F(Bound/Free)分離不要の新機能が期待されている。この磁気的手法を用いれば、微量な蛋白質の高速・高感度検出が可能となるため、医療・医薬分野での次世代の診断・解析機器として、SQUID センサを用いた磁氣的検出システムの開発に大きな期待が寄せられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、液相での免疫検査に必要な種々の要素技術を開発し、高速・高感度な磁氣的検査システムを開発することを目的としている。また、本手法を用いた蛋白質の検出実験を行い、本手法の有効性を実証する。すなわち、

- (1) 磁気/高分子複合ナノ粒子を用いて液相検出に適した磁気マーカーを開発するとともに、その磁気・化学・流体力学的特性を最適化し、マーカーの高性能化を達成する。
- (2) 液相での検出の基本となる磁気マーカーの溶液中でのブラウン運動を解明するとともに、その制御法を開発する。
- (3) 多種類の試料を高速・高感度に検出するために、マイクロ反応容器と SQUID センサ装置を一体化した磁氣的マイクロシステムを開発するとともに、液相での高感度検出法を開発する。
- (4) B/F分離なしでの液相での蛋白質の検出実験を行い、本手法の高速・高感度性を実証するとともに、本方法の定量性と信頼性を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 磁気マーカー

液相での免疫検査に利用するためには、磁気マーカー全体のサイズが 100 nm 程度で、大きな磁気信号を発生し、溶液中で高いブラウン回転運動を示す必要がある。このため、ナノ粒子に適した磁性材料を検討するとともに、その粒子サイズを高精度に制御する方法を開発する。次に、磁気ナノ粒子表面への高分子の被覆法を開発し、液相用に適した磁気マーカーを試作する。

さらに、液相での免疫検査の基本となる、磁気マーカーのブラウン運動特性や磁氣的・化学的特性を解明する。溶液中でのブラウン運動の程度は磁気マーカーの粒子径や溶液の粘度に大きく依存するため、これらの関係を定量的に調べ、液相法に最適化

するための磁気マーカーの条件を明らかにする。また、実際の試料では磁気マーカーの大きさが分布するため、この分布がブラウン運動に及ぼす影響を明らかにする。

### (2) SQUID 免疫検出装置の開発

B/F(Bound/Free)分離なしでの免疫検査を液相で行うために、結合(Bound)マーカーからの磁気信号を感度良く検出し、未結合(Free)マーカーからの雑音を除去できる高感度な検出法を開発する。すなわち、磁気マーカーのブラウン運動の度合いに応じてマーカーの励磁法(印加法、磁界の大きさ、及び励磁時間)を最適化し、液相検出に適した磁化機構を開発する。また、未結合マーカーからの雑音の大きさは、ブラウンの緩和時間と励磁してから測定するまでの待機時間に大きく依存する。このため、作製した種々の磁気マーカーについて両者の関係を定量的に明らかにし、効果的な雑音の除去法を開発する。

これにより、微量な磁気マーカーから発生する 1 ピコテスラ( $10^{-12}$  T)程度の微弱磁界を検出できる SQUID 免疫検出装置を開発する。

### (3) 磁氣的免疫検査法の開発

開発した測定システムを用いて液相法での免疫実験を行う。この結果をこれまでの固相法で得られている結果と比較することにより、B/F 分離なしでの検出機能を高度化するために必要な要因を明らかにする。特に、未結合マーカーからの雑音の除去の度合いと免疫検査の感度との関係を明らかにする。この結果を SQUID 検査装置にフィードバックし、高感度検出を可能とする。

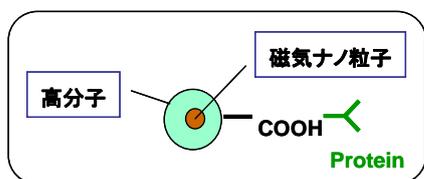
## 4. 研究成果

### (1) 磁気マーカー抗体の開発と特性評価

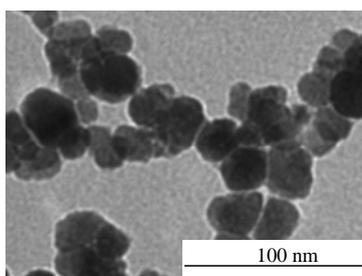
磁氣的な免疫検査法の性能は、使用する磁気マーカー抗体の特性に大きく依存する。このため、大きな磁気信号を発生し、溶液中で高い分散性を示す磁気マーカー抗体を開発した。図 1(a)に示すように磁気マーカー抗体は、磁気ナノ粒子を核としてこれを高分子で包み、その表面に抗体を結合することにより作製される。本研究では、直径が 25 nm 程度の  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  微粒子へ高分子を精密にコーティングした磁気/高分子複合ナノ粒子を製作する方法を開発した。図 1(b)に作製した磁気/高分子複合ナノ粒子の電子顕微鏡写真を示す。

磁気的な免疫検査では、磁気マーカーの溶液中のブラウン緩和特性を利用する。このため、開発した磁気マーカーのブラウン緩和特性を明らかにした。図 1(c)に動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) 法で測定した、磁気マーカーの粒度分布を示す。同図に示すように磁気マーカーのサイズは 50 nm から 400 nm で分布しており、平均粒径は 110 nm となっている。これは、磁気マーカーの作製過程で粒子同士が凝集したためと考えられる。しかしながら、110 nm の粒子直径は免疫検査に使用するには十分に小さなサイズである。

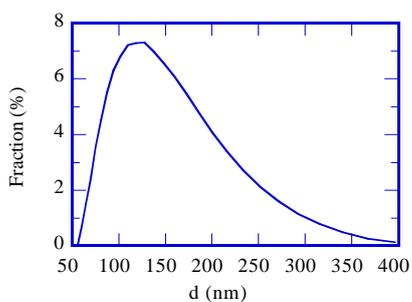
この磁気マーカーの溶液中での磁化率測定を行った結果を図 1(d)に示す。図で○印と●印は磁化率の実部 ( $\chi'$ ) と虚部 ( $\chi''$ ) の周波数依存性の測定結果である。また、実線はブラウン緩和から予想される理論値を示す。同図に示すように、実験結果と理論値はよく一致しており、磁気マーカーの磁気特性がブラウン緩和により支配されていることが分かる。なお、磁化率の虚部は周波数  $f=300$  Hz でピーク値を示す。ブラウン緩和の理論を用いると、この周波数から磁気マーカーの粒子直径を 110 nm と見積もることが出来、この結果は DLS の測定結果と一致する。



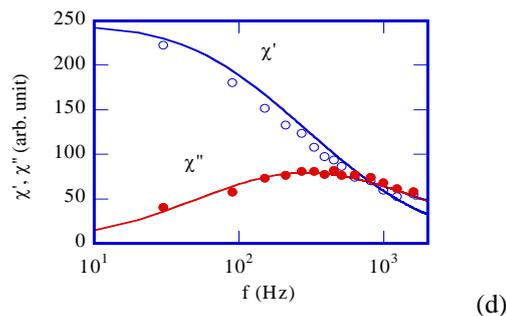
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 1. Magnetic marker. (a) Schematic figure, (b) TEM image, (c) Size distribution measured by DLS, and (d) Frequency dependence of the susceptibility in solution.

## (2) BF 分離なしでの液相検査法の開発

本研究では磁気マーカーの溶液中でのブラウン緩和特性を利用した BF 分離不要の検査法を開発した。図 2 に示すように抗原と結合した磁気マーカー (Bound マーカー) と未結合の磁気マーカー (Free マーカー) が共存した状態で、結合マーカーのみを検出する検査法である。図 2 に検査の原理を示す。最初に図 2(a) に示すように外部磁界  $H$  を印加すると、全ての磁気マーカーの磁気モーメントは磁界  $H$  の向きに揃う (磁化過程)。この後に磁界をゼロとすると、図 2(b) に示すように未結合マーカーはブラウン緩和を始め、それぞれの磁気モーメントの向きはランダムになる (緩和過程)。この結果、未結合マーカーからの磁気信号は時間とともに急激に減衰する。この緩和時間はブラウンの緩和時間  $\tau_B$  で与えられる。従って、磁化してから  $\tau_B$  に比べて充分時間が経過した後では、未結合マーカーからの磁気信号はゼロとなり、結合マーカーからの磁気信号のみが残ることになる。このため、BF 分離をしなくても両者を磁気的に識別できることになる。

本研究で使用した磁気マーカーの大きさは 110 nm であり、このマーカーのブラウン緩和時間は  $\tau_B=0.6$  ms と評価される。従って磁化してから  $T_w=1$  s 後に測定すれば、BF 分離なしでの液相検査が可能となる。

本研究で開発した免疫検査装置の模式図を図 3 に示す。磁気マーカーを磁化するための磁化機構と磁気マーカーからの信号を検出するための SQUID センサから構成されている。検出は、磁化、ブラウン緩和、信号測定 の 3 ステップからなる。最初に  $\mu_0 H=40$  mT の励起磁界により磁気マーカーを磁化する。その後、容器を回転すると未結合マーカーのブラウン緩和が開始される。磁化から測定までの待ち時間は  $T_w=1$  s としており、この間にブラウン緩和は完了し、未結合マーカーから

の信号はゼロとなる。試料が SQUID センサの真上に到達した時点で、結合マーカーからの信号が SQUID により検出される。なお、SQUID センサとしては、図 3 に示す様な液体窒素温度で動作する高温超伝導 SQUID を用いている。また、SQUID センサと試料との距離を 1 mm 程度にまで近接することにより高感度計測を可能にしている。

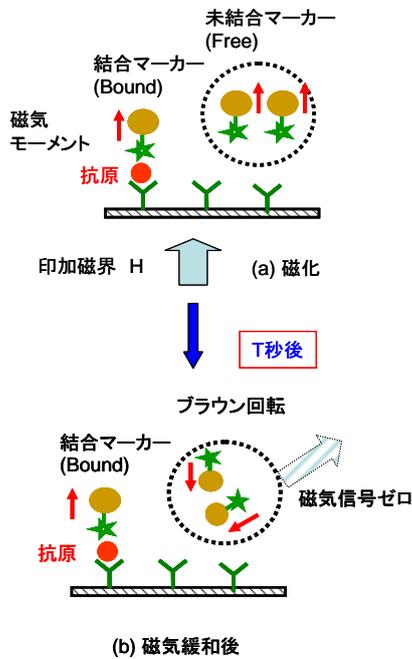


Fig. 2. Detection principle of liquid phase immunoassay using Brownian relaxation of magnetic markers.

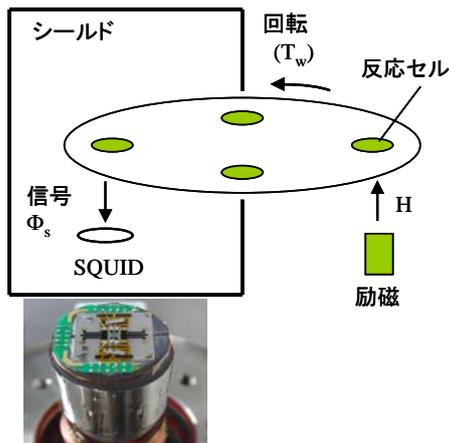


Fig. 3. SQUID system for liquid phase immunoassay

(3) 免疫反応検出実験  
SQUID と磁気ナノマーカー抗体を用いた

BF 分離なしでの磁気的免疫検出実験を行った。最初に human IgE 呼ばれるタンパク質の測定結果を示す。図 4(a) に測定結果を示す。図の横軸は IgE の量をモル数で表したものであり、縦軸は SQUID センサの出力である。また、△印は従来の BF 分離を用いた固相法の結果であり、○印は図 2 の液相法を用いた結果である。同図に示すように両方の測定法の結果は互いに良く一致している。この結果は、本研究で開発した手法を用いれば未結合マーカーが共存した状態でも結合マーカーのみを検出できることを示しており、BF 分離なしでの液相検査法の有効性を実証している。また、検出感度としては 4 アトモル ( $4 \times 10^{-18}$  モル) が得られている。この感度は従来の光学的手法に比べて 10 倍高感度であり、本手法の高速・高感度性を実証している。

次にカンジダ菌の測定結果を示す。カンジダ菌の大きさは数マイクロンであり、この場合には磁気マーカー抗体を直接カンジダ菌に結合させる。BF 分離なしでの液相での検査結果を図 4(b) に示す。図の横軸は菌の数であり、縦軸は SQUID センサの出力である。同図に示すように 300 個までの菌を検出出来ている。なお、システムを改良すれば数 10 個の菌の検出は可能である。

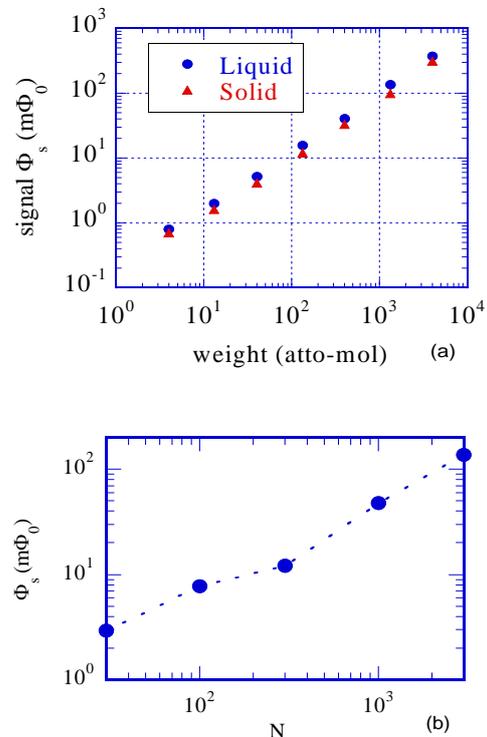


Fig. 4. Detection of biological targets using liquid phase immunoassay. (a) protein called IgE and (b) *Candida albicans*

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 20 件)

- ① K. Enpuku, Y. Sugimoto, Y. Tamai, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, H. Kanzaki, N. Usuki, K. Yoshinaga, Y. Sugiura, H. Kuma, and N. Hamasaki, “Liquid-phase detection of biological targets with magnetic marker and superconducting quantum interference device”, IEICE Trans. Electron. Vol. E92-C, pp. 315-322 (2009) 査読有り
- ② K. Enpuku, T. Tanaka, Y. Tamai, F. Dang, N. Enomoto, J. Hojo, H. Kanzaki and N. Usuki, “Size distribution of magnetic marker estimated from ac susceptibility in solution for biosensor application”, Jpn. J. Appl. Phys., vol. 47, pp. 7859-7865 (2008) 査読有り
- ③ K. Enpuku, T. Tanaka, T. Matsuda, F. Dang, N. Enomoto, J. Hojo, K. Yoshinaga, F. Ludwig, F. Ghaffari, E. Heim and M. Schilling, “Properties of magnetic nanoparticles in the Brownian relaxation range for liquid phase immunoassays”, J. Appl. Phys. vol. 102, pp. 054901 1-7 (2007) 査読有り
- ④ K. Enpuku, K. Soejima, T. Nishimoto, M. Matssuda, H. Tokumitsu, T. Tanaka, K. Yoshinaga, H. Kuma, and N. Hamasaki, “Biological Immunoassays without Bound/Free separation utilizing magnetic marker and HTS SQUID”, IEEE Trans. Appl. Supercond. Vol. 17, pp. 816-819 (2007) 査読有り
- ⑤ K. Enpuku, K. Soejima, T. Nishimoto, H. Tokumitsu, H. Kuma, N. Hamasaki and K. Yoshinaga, “Liquid phase immunoassay utilizing magnetic marker and high  $T_c$  superconducting quantum interference device”, J. Appl. Phys. vol. 100, pp. 054701 1-5 (2006) 査読有り

[学会発表] (計 45 件)

- ① K. Enpuku, H. Tokumitsu, Y. Sugimoto, H. Kuma, N. Hamasaki, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, H. Kanzaki and N. Usuki, “Fast detection of biological targets with magnetic marker and SQUID”, Applied Superconductivity Conference (ASC) (2008. 10)
- ② K. Enpuku, “Biological immunoassay using

SQUID (invited)” International Symposium on Superconductivity (ISS) (2007.11)

- ③ K. Enpuku, K. Soejima, T. Nishimoto, H. Tokumitsu, H. Kuma, N. Hamasaki and K. Yoshinaga, “Biological immunoassay without Bound/Free separation utilizing magnetic marker and HTS SQUID”, Applied Superconductivity Conference (2006. 8)

[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

<http://www.sc.kyushu-u.ac.jp/~enlab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

円福 敬二 (ENPUKU KEIJI)

九州大学・システム情報科学研究院・教授  
研究者番号：20150493

(2) 研究分担者

柁川 一弘 (KAJIKAWA KAZUHIRO)

九州大学・システム情報科学研究院・准教授  
研究者番号：10294894

能崎 幸雄 (NOZAKI YUKIO)

九州大学・システム情報科学研究院・准教授  
研究者番号：30304760

(3) 連携研究者

吉永 耕二 (YOSHINAGA KOHJI)

九州工業大学・工学部・教授  
研究者番号：00040436

隈 博幸 (KUMA HIROYUKI)

長崎国際大学・薬学部・講師  
研究者番号：40435136