

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860364

研究課題名(和文)疾患マーカーの迅速・高感度・同時多項目測定法の開発：蛍光磁性ビーズによる実現

研究課題名(英文)Development of Rapid, Sensitive and Concurrent Multiple Immunoassay of Disease Markers: Construction by Using Fluorescent Magnetic Beads

研究代表者

田中 俊行(TANAKA, Toshiyuki)

信州大学・医学部・産学連携特任研究員

研究者番号：30641576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：疾患診断における迅速性や感度、特異度の向上に向けて、蛍光磁性ビーズを利用した疾患マーカーの同時多項目免疫測定法の開発を目指した。まず、種類の異なる蛍光色素を個別に封入した複数の蛍光磁性ビーズを開発した。次に、抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗原固定化プレートの組合せによる競合測定法を開発した。更に、異なる蛍光色素を封入した蛍光磁性ビーズ2種を利用して、2項目の疾患マーカーの同時免疫測定を試みた。蛍光のクロストークを補正することにより正味の疾患マーカーの濃度の測定が可能となった。同時免疫測定においても磁気捕集により10分以内に測定可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：For improvement of rapidity, sensitivity and specificity of disease diagnosis, we aimed development of a concurrent multiple disease marker immunoassay using fluorescent magnetic beads. First, we developed several fluorescent magnetic beads encapsulating different fluorescent pigments respectively. Next, we constructed a competitive immunoassay using a combination of antibody immobilized fluorescent magnetic beads and an antigen coated plate. Furthermore, using two different colored fluorescent magnetic beads, we concurrently measured two disease markers. As the result of a fluorescent crosstalk correction, the net concentration of each disease maker was correctly measured. Using a magnetic collection of fluorescent magnetic beads, the concurrent multiple immunoassay detected the disease markers within 10 min.

研究分野：病態検査学

キーワード：蛍光磁性ビーズ 疾患マーカー 免疫測定 競合測定 同時多項目測定

1. 研究開始当初の背景

疾患の早期診断や患者負担の軽減などのため、臨床検査では迅速かつ高感度な測定が求められている。しかし、酵素免疫測定法 (ELISA) を始めとした従来の疾患マーカーの免疫測定法では、感度を高くするために抗原抗体反応や酵素反応などに時間を掛けており、測定が完了するまでに1時間程度を必要としていた。そこで、迅速かつ高感度な測定を実現するために、蛍光と磁性の両方の機能を有するナノサイズのビーズ (蛍光磁性ビーズ、図1) を利用した免疫測定法 (図2) を開発してきた。蛍光磁性ビーズを使用することで疾患マーカーを次のように測定できる。すなわち、蛍光磁性ビーズが目的の疾患マーカーを効率的かつ特異的に捕捉した後、磁石で疾患マーカーが結合した蛍光磁性ビーズをプレート上に磁氣的に捕集することで迅速にサンドイッチ複合体の形成を行い、最後に励起光を照射することによりプレート上の蛍光磁性ビーズから発した強い蛍光を測定することにより高感度に疾患マーカーを測定する。これにより、10分以内に疾患マーカーが測定できることが示されている (Sakamoto et al., 2014)。

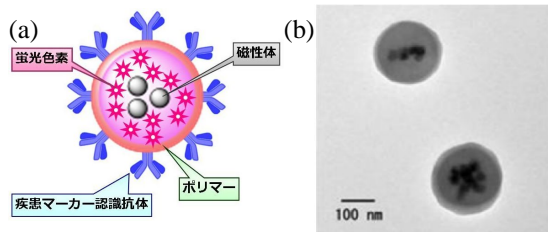


図1 蛍光磁性ビーズ (a) 模式図、(b) 電子顕微鏡写真

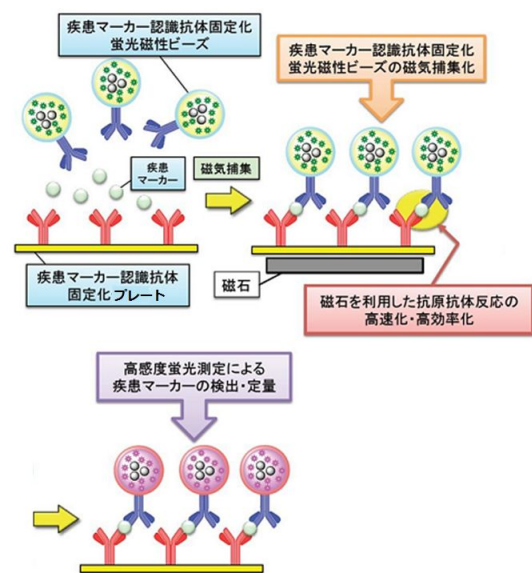


図2 蛍光磁性ビーズを利用した迅速・高感度免疫測定法

一方、疾患診断の感度や特異度の向上のために複数の疾患マーカーの測定が行われている。例えば甲状腺疾患では複数の疾患マーカーの測定結果を組み合わせることで甲状腺亢進症、甲状腺機能低下症、甲状腺産生ホルモン産生腫瘍などの可能性を判定している。そのため、Luminex や MUSTag のような微量の検体から多項目の疾患マーカーを同時かつ高感度に測定する技術が開発されている。しかしながら、これらの方法は測定を完了するまでに2~3時間かかるという問題があり、同時多項目測定での迅速化は実現していなかった。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、疾患マーカーの迅速・高感度・同時多項目測定を実現するには、蛍光磁性ビーズを利用した免疫測定法を元に、異なる蛍光色素を封入した蛍光磁性ビーズを利用して蛍光波長の違いから個別の疾患マーカーを区別して測定すればよいと考えた。そこで本研究では、(1)種類の異なる蛍光色素を個別に封入した複数の蛍光磁性ビーズの開発すると共に、(2)蛍光磁性ビーズでタンパク質だけでなく低分子の疾患マーカーも測定する方法を確立し、最終的に(3)異なる色素を封入した複数の蛍光磁性ビーズを使って複数の疾患マーカーの迅速・高感度・同時多項目測定を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

目的に掲げた項目を達成するために以下に示す研究を行った。

(1) 種類の異なる蛍光色素を個別に封入した蛍光磁性ビーズの開発

磁性ビーズへの封入に適した蛍光色素を複数選定し、有機溶媒を用いて磁性ビーズへ含浸させる方法で封入を行った。蛍光色素の封入量は有機溶媒にて溶出させてその濃度を測定することで定量した。

(2) 低分子疾患マーカーの免疫測定法の確立

一般的に低分子の疾患マーカーは二つの抗体が結合することが困難であるためサンドイッチ法が適用できない。そこで、蛍光磁性ビーズに固定化した抗原またはプレートに固相化した抗原と疾患マーカーとを競合的に抗体に結合させて測定する競合法の開発を行った。具体的には抗原固定化蛍光磁性ビーズと抗体固相化プレートの組合せと抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗原固相化プレートの組合せのそれぞれを評価し比較した。更に、測定感度に対する蛍光磁性ビーズ上の抗原または抗体の固定化量の影響を調べた。

(3) 蛍光磁性ビーズを利用した迅速・高感度・同時多項目測定の確立

上記(1)で作製した蛍光磁性ビーズから二種類を選定し、前立腺癌の疾患マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) と肝臓癌の疾患マーカーである フェトプロテイン (AFP) の同時測定を行った。具体的には次のように行った。まず、捕捉用の抗 PSA 抗体と抗 AFP 抗体を混合して固相化したプレートに対して種々の濃度の PSA と AFP の混合溶液を分注した後に、蛍光色素が異なる検出用の抗 PSA 抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗 AFP 抗体固定化蛍光磁性ビーズを混合した溶液を分注して反応させた。次いで、磁石を用いて蛍光磁性ビーズをプレート上に磁気捕集してサンドイッチ複合体を形成させた。最後に、未反応の蛍光磁性ビーズを洗浄除去し、プレートリードにてそれぞれの蛍光磁性ビーズの蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) 種類の異なる蛍光色素を個別に封入した蛍光磁性ビーズの開発

磁性ビーズへの封入に適した蛍光色素として、疎水性が高くかつ濃度消光が生じないようなストークスシフト (励起波長と蛍光波長の差) が大きい化合物を選定した。その結果、ピチオフェン骨格の蛍光色素 1~6 (Wakamiya et al., 2007, 図3) が候補となり、これらの蛍光色素はいずれも磁性ビーズ (多摩川精機 (株) 製) に封入することができた (図4)。また、いずれの蛍光色素も 30,000~50,000 個の分子が1個の磁性ビーズに封入できていることが確認できた。

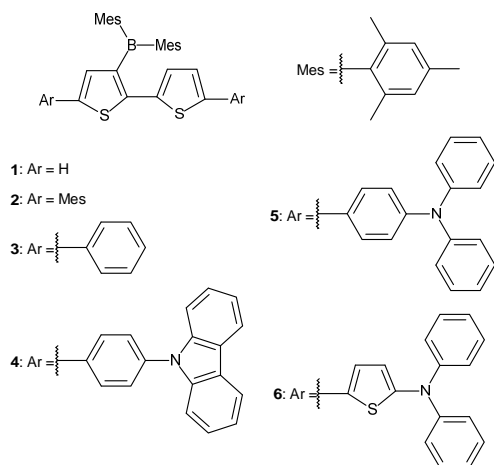


図3 選定したピチオフェン骨格蛍光色素

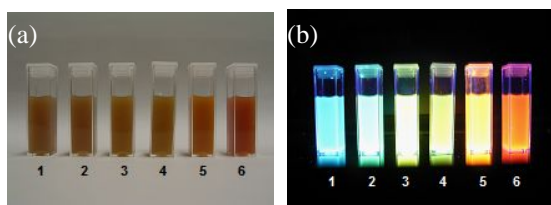


図4 ピチオフェン骨格蛍光色素封入蛍光磁性ビーズ (a)可視光下、(b)紫外光下

(2) 低分子疾患マーカーの免疫測定法の確立

まず、抗原固定化蛍光磁性ビーズと抗体固相化プレートの組み合わせと抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗原固相化プレートの組み合わせについて疾患マーカーの競合測定を行い比較した。その結果、後者の組み合わせにおいて高感度測定の可能性が示唆された。この結果を元に、抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗原固相化プレートの組合せにおいて、測定感度に対する蛍光磁性ビーズ上の抗体の固定化量の影響を調べた。その結果、抗体の固定化量を約 1/100 にすることで疾患マーカーの 50%阻害濃度が約 1/10 となった (図5)。これにより、競合測定法において抗体の固定化量を少なくすることで高感度測定ができることが明らかとなった。また、競合測定法においても蛍光磁性ビーズの磁気捕集により 10 分以内に疾患マーカーが測定可能であることが確認できた。

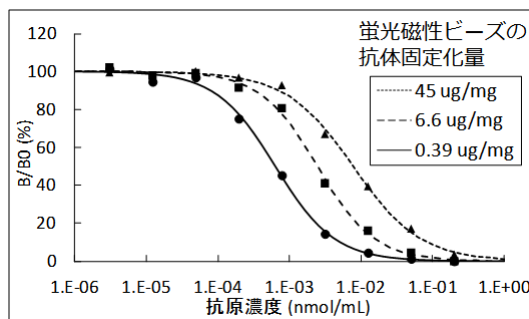


図5 抗体固定化蛍光磁性ビーズと抗原固相化プレートの組合せによる競合測定結果

(3) 蛍光磁性ビーズを利用した迅速・高感度・同時多項目測定法の確立

AFP には蛍光色素 3 封入蛍光磁性ビーズ、PSA には蛍光色素 5 封入蛍光磁性ビーズを適用し実験を行った。この際、プレートリードには励起光用に 355 nm、AFP に対する蛍光検出用に 550 nm、PSA に対する蛍光検出用に 600 nm の各光学フィルタを取り付けて測定を行った。実験の結果、PSA については PSA 濃度の増加に従って蛍光強度が高くなる一方で AFP 濃度の増加によっても蛍光強度が高くなった (図 6(a))。AFP についても同様の結果が得られた。他方の疾患マーカーの存在によって蛍光強度が高くなる原因として、他方の蛍光磁性ビーズからの蛍光も光学フィルタを通して検出するクロストーク現象が生じたためと考えられた。そこで、それぞれの蛍光磁性ビーズについて双方の光学フィルタを通して得られた蛍光強度値を用いてクロストークの補正を行った。その結果、他方の疾患マーカーの濃度に関わらずほぼ同様の値となり、正味の疾患マーカーの測定値が得られることが明らかとなった (図 6(b))。また、同時多項目測定においても蛍光磁性ビーズの磁気捕集により測定時間 10 分以内に疾患マーカーが定量でき、迅速測定が可能であることが示された。

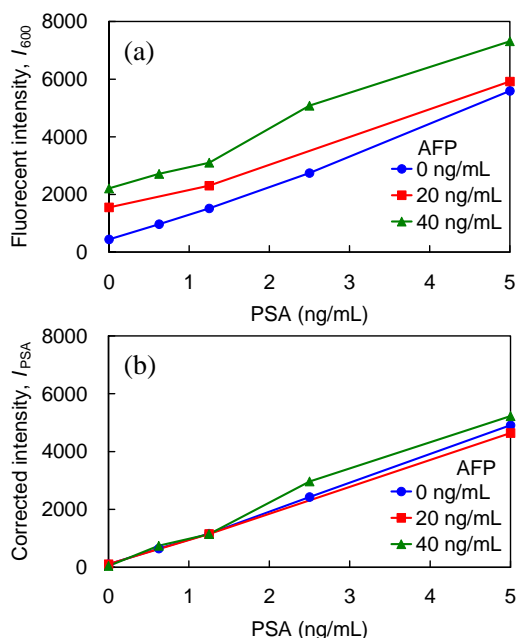


図6 同時多項目測定による PSA の測定結果 (a)クロストーク補正前、(b)クロストーク補正後

< 引用文献 >

S. Sakamoto et al., Magnetically Promoted Rapid Immunoreactions Using Functionalized Fluorescent Magnetic Beads: A Proof of Principle, Clin. Chem., vol. 60, pp. 610-620 (2014).

A. Wakamiya et al., 3-Boryl-2,2'-bithiophene as a Versatile Core Skeleton for Full-Color Highly Emissive Organic Solids, Angew. Chem. Int. Ed., vol. 46, pp. 4273-4276 (2007).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

K. Terada, T. Tanaka, N. Hanyu, T. Honda, H. Handa, Rapid and sensitive detection of alpha-fetoprotein by a magnetically promoted shake-free immunoassay employing fluorescent magnetic nanobeads, Int. J. Anal. Bio-Sci., vol. 2, pp. 101-107 (2014). (査読有)

[その他]

ホームページ
 信州大学医学部メディカルシーズ推進室
 研究開発チーム
<http://www.shinshu-msp.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 俊行 (TANAKA, Toshiyuki)
 信州大学・医学部・産学連携特任研究員
 研究者番号：30641576