

機関番号：37303

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20689013

研究課題名 (和文) 磁気検出法を用いた高速・高感度な定量的免疫検査法の開発

研究課題名 (英文) Quantitative immunoassay using magnetic detection for rapid and high sensitive clinical biochemistry

研究代表者

隈 博幸 (KUMA HIROYUKI)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：40435136

研究成果の概要 (和文)：免疫検査法は、抗体の抗原に対する特異的な結合を利用したアッセイ法であり、臨床検査においては最もメジャーな物質検出法の一つである。本研究においては、磁気を発生する微粒子と磁気検出装置の組み合わせによって、簡便かつ高感度なホモジニアスアッセイ法を開発した。また、本手法の臨床検査への応用と実用化に向けて、種々の標的蛋白質や真菌の検出実験を行い、その有効性を実証できた。

研究成果の概要 (英文)：Biological immunoassay is one main detection system used in the field of clinical chemistry. In this study, we developed a new detection method utilizing a magnetic marker and magnetic sensor has enabled rapid and sensitive. Also, we demonstrated the ability for markers to measure biological targets. This detection system has great potential for use as the next generation's analytical system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：磁気検出法、磁気ナノマーカー、臨床検査、免疫検査、ナノデバイス

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。近年、その多様性・汎用性から、多種類の微量物質を高速かつ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。住宅内に存在するアレルギー性化学物質（ハウスダスト）の検出や、生鮮食品・輸入食品の安

全性試験（細菌検出試験）などはその代表的な例であり、また、医療診断分野においては、最近のプロテオミクス研究により報告され始めた疾患由来の微量蛋白質の同時多項目検査が可能となれば、これを利用した新しい臨床診断法が開発できると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、超伝導磁気検出法によりサンプル中に微量に存在する物質（蛋白質、細胞、細菌等）を簡便かつ迅速に定量検出するシステムを構築することを目的とする。そのため

には、

(1) 強い磁気をもつ検出用マーカーの開発
(2) 磁気検出装置の高性能化
(3) 分析システム及び測定手法の開発
の3課題についてそれぞれ検討する必要があると考えた。本研究では、主として磁気検出装置（磁気センサー）の高性能化、および分析システムと測定手法の開発、に的を絞り、現存の検出感度を凌駕する高性能な分析システムの開発について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ホモジニアスアッセイによる微量蛋白質の検出法の確立と反応条件の最適化

これまでの我々の研究成果から、プレートに一次抗体を固定化した「準液相法」では検出物質とマーカーの磁気強度との間に良い相関が得られていた。そこで、本研究では「液相法（ホモジニアスアッセイ）」による免疫的アッセイ法を開発を行う。

これまで反応容器に直接附着させていた一次抗体をマーカーに比べて十分に大きい（ μm オーダー）ポリスチレンビーズに結合させ、抗原抗体反応の効率化を図るとともに、操作時間の短縮化と手法の単純化およびシステムの高感度化を図る。具体的な検討項目は、

①磁気微粒子表面のポリマーコーティング材を検討し、より分散性の高い（沈殿しにくい）マーカーを作製することにより、未結合マーカーからの雑音信号を減少させる。
②反応溶液の組成を最適化し、抗原抗体反応の効率を最大限に高めるとともに、余剰の磁気マーカーからの信号を極力減らすことで最大検出感度を向上させる。

③一次抗体結合用のポリスチレン（またはその他の素材から成る）ビーズの大きさと結合抗体数の検討を行い、抗原結合マーカーと未結合マーカーの区別化に最適な条件を探索する。

である。これらにより、液相中において未結合（Free）マーカーからの雑音が結合（Bound）マーカーに比べて $1/10^4$ 以下に減衰する検出法を確立し、BF 分離なしでの高速・高感度検出を目指す。また、磁気マーカー・ポリスチレンビーズへの種々の抗体（蛋白質）の結合法を開発しその安定性・信頼性を確立する。

(2) 生体試料中の蛋白質検出法及び病原菌検出法の検討

ホモジニアス法による蛋白質の検出条件が整い次第、その手法を利用した実際のヒト検体（血液・尿）中に存在する微量蛋白質の定量試験を行い、実際の病院検査室で実施されている生化学検査と同等以上の感度で定量検出が可能か否かを調べる。これまで我々が開発した手法（準液相法）では、血清のみ

ならず溶血液・全血中での total IgE 測定がサンプルの前処理なしに可能であることを既に証明済みである。従って液相法においても同様の測定が充分可能であると考えている。モデル蛋白質としては従来我々が使用している IL8, IgE を想定しているが、順次他の蛋白質についても検討を始める。

さらに、上記の蛋白質検出法の条件検討と並行して、病原菌や細胞の検出法の確立を目指す。一般的な細胞や細菌類の大きさはマイクロメートルオーダーであり、ホモジニアス法とほぼ同様の条件下での検出が可能であると考えられる。すなわち、一つの細胞に対して数十～数百個のマーカーが結合可能であるため、細胞の表面抗体があれば液相法での直接的測定が可能である。その際、従来のような細胞培養・血液培養を行わずに検出できるかどうかを重要視する。

これらの検証結果に基づいて、総合的な検出システムの再構築と条件設定を行いながら、想定される様々な条件下における最適な磁気的免疫検査システムの開発を目指す。

また、この検出系において、溶液中での磁気マーカー抗体と抗原の結合過程を定量的に明らかにし、磁気的検出法の定量性と信頼性を高める。これらの結果より、本システムが医療・バイオ分野における最先端バイオセンシングシステムとなることを示す。

4. 研究成果

(1) ホモジニアスアッセイによる微量蛋白質の検出法の確立と反応条件の最適化

本研究では、磁性微粒子・磁気検出装置の組み合わせにポリスチレンビーズを新たに技術要素として取り入れ、短時間で高感度に効率良く定量検出を行うことのできるシステムを構築した。サンドイッチ法は、一次抗体を物理的にプレート（固相）に固定化する手法であり、これが迅速性と再現性を妨げる要因の一つである。そのため、一次抗体をポリスチレンビーズにペプチド結合で固定すれば、試験者はそれを混和するだけの作業で済み、また、ビーズはある程度の流動性があるために抗原（ターゲット）との結合時間の短縮も期待できる。具体的には、粒子の大きさによるブラウン運動の自由度の違いによる発生磁気の緩和（磁気緩和）の時間差を利用して、磁気マーカー（100～200nm）に比べ十分に大きな粒子（3～6 μm ）に一次抗体を導入した（図1）。

このような考えの下、既に固相法で実績のあるヒト IgE, IL-8 をターゲットとし、ポリスチレンビーズによる磁気検出を行い、抗原抗体反応の速度論的解析と反応条件の最適化に関して検討した。その結果、固相法と比べて検出感度を下げることなく、最短 20 分程度での検出が可能であることが示された。

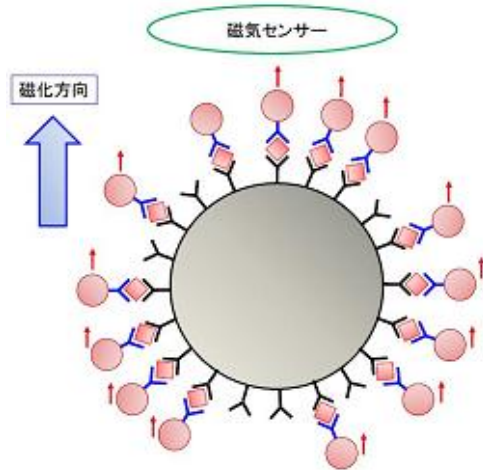


図1. 磁気的ホモジニアスアッセイの検出イメージ

このときの最小検出感度は、ヒト IL-8、IgE ともに約 4 アトモルであった (図 2)。この感度は現存法と同程度 (IgE) またはそれ以上 (IL-8) であり、本手法の有効性が実証されたと考えている。また、臨床検査に応用する場合、ターゲットとなる蛋白質の種類を増やす必要があるが、本研究では感度がやや悪いながら (既存法の約 1/10)、TSH (甲状腺刺激ホルモン) と pTH (副甲状腺ホルモン) の検出にも成功した。今後は知的財産権の取得に向け、さらなる感度向上とシステム改良に取り組む必要がある。

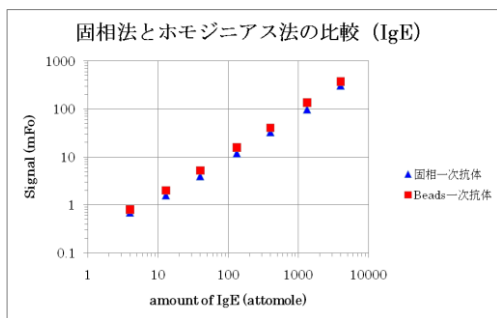


図2. 固相法とホモジニアス法による IgE 検出実験

(2) 生体試料中の蛋白質検出法及び病原菌検出法の検討

病原菌のモデルケースとして、日和見感染の原因菌であるカンジダ菌の検出の検討を行った。検出原理は、ポリビーズを用いたホモジニアスアッセイと同様である。今回、カンジダ菌を用いた理由は、取り扱いが比較的容易である、ヒト常在菌である、及び菌の球径がポリビーズとほぼ同じ (5~7 μ m)、ということであった。カンジダ菌の菌数については、顕微鏡により直接カウントを行った。

定量的検出実験の結果としては、300 個程

度であれば、同じ真菌である酵母 (Yeast) との識別が可能であるということを示すことができた (図 3)。

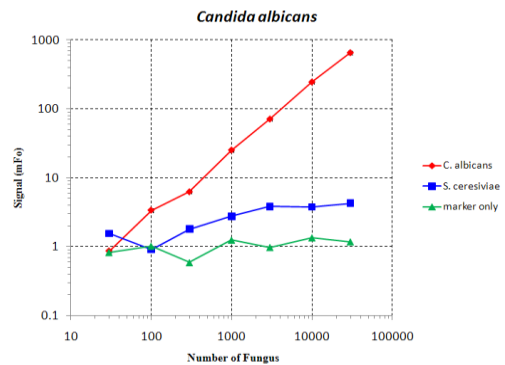


図3. カンジダ菌と酵母の検出実験

また、直径 3 μ m 程度のビオチン結合ポリスチレン粒子を疑似細菌に見立て、ストレプトアビジン結合磁気ビーズによる検出実験を行った。その結果、少なくとも 100 個以下のビーズを検出することが可能であるとのデータを得た。このことは、これまで原因菌の特定において不可欠であった培養の操作が不要であるシステムを構築できる可能性があることを示唆しており、今後さらなる研究の必要性がある。その一方で、本手法は、その超高感度性と高速性の特長を生かすことにより、医療診断のみならず、食品衛生分野における安全検査や環境汚染因子の測定、保菌者 (と疑われる人物) の出入国ゲートでの迅速検査など幅広い応用できる可能性を示すことができたと考えている。

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 7 件)

- ① H. Kuma, H. Oyamada, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, Y. Sugiura, K. Yoshinaga, K. Enpuku and N. Hamasaki, "Liquid Phase Immunoassays utilizing magnetic marker and SQUID magnetometer", *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48 (9): 1263-1269, 2010 (査読有)
- ② A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, H. Kuma, N. Hamasaki, H. Kanzaki, N. Usuki, K. Yoshinaga and K. Enpuku, "Development of a SQUID System Using Field Reversal for Rapidly Detecting Bacteria", *IEEE Trans. Appl. Supercond.*, 19 (3): 853-856, 2009 (査読有)
- ③ K. Enpuku, H. Tokumitsu, Y. Sugimoto, H. Kuma, N. Hamasaki, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, K. Yoshinaga, H.

Kanzaki and N. Usuki, "Fast Detection of Biological Targets with Magnetic Marker and SQUID", *IEEE Trans. Appl. Supercond.*, 19 (3): 844-847, 2009 (査読有)

- ④ K. Enpuku, Y. Sugimoto, Y. Tamai, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, N. Usuki, H. Kanzaki, 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. on Electronics*, E92C (3): 315-322, 2009 (査読有)
- ⑤ 隈 博幸, 円福 敬二, 濱崎 直孝, "磁気マーカーを用いた免疫検査システム", 検査と技術 37 (2), 174-177, 2009 (査読無)

[学会発表] (計5件)

- ① 隈 博幸 「磁気検出法を用いた高感度な免疫検査技術の開発」, 第32回日本薬学会九州支部コロキウム (招待講演), 2010年10月
- ② 隈 博幸, 濱崎 直孝 「磁気検出法による定量的免疫検査システム」, 第49回日本臨床化学会年次学術集会, 2009年9月
- ③ 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年10月

[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 (長崎国際大学薬学部薬学科・臨床検査学研究室)

<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/cclm/index.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・講師
研究者番号: 40435136

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し