

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590716

研究課題名(和文) 磁気検出を利用した定量的なホモジニアス免疫検査システムの開発

研究課題名(英文) Development of homogenous and quantitative immunoassay system with 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁気マーカー、検出用ポリスチレンビーズ及び超伝導磁気センサー(SQUID)を用いたホモジニアスな定量的免疫検査システムを開発できた。
本システムにおいて適切な検出手法を開発し、種々のタンパク質、真菌類、スギ花粉抗原の検出実験を行い、ナノモル～アトモルレベルでの微量検出が可能であることを示すことにより、本手法の有効性と高感度性を実証した。これにより、臨床検体だけでなく、環境汚染因子や食物検査などへの応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed the homogenous and quantitative immunoassay system with magnetic marker, polystyrene beads and SQUID sensor.
We also demonstrated the ability for magnetic markers to measure various biological targets (proteins, fungus, cedar pollen) without BF separation. This system has potential for use not only in clinical and laboratory immunoassays but also for medical inspections, identification of environmental pollution factors, and configuration of food examination tests.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：磁氣的免疫検査システム ホモジニアスアッセイ 磁気マーカー SQUID 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。特に医療診断分野では、アレルギー疾患・肝炎ウイルス・免疫不全症候群(AIDS)から梅毒・食中毒(0-157 他)まで多種多様の検出項目があり、その必要性は極めて高い。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、そのための新しい免疫的検査法の研究・開発が世界各国で競うように行われている。また、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非侵襲的診断技術の開発やテララーメイド医療に対する応用が期待でき、患者の肉体的・精神的負担を減らしながら、体質に応じた医療行為が期待できると考えられる。

これらの観点から、種々の検出法が開発・実用化されているが、我々は抗原物質を磁氣的に検出し定量する新しい検出法を開発中である。本手法は、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、高感度な SQUID 磁気センサーにより検出し定量する新規の手法(図 1)である。申請者は、これまで九州大学システム情報科学研究院や日立製作所と共同研究体制をとり、研究チームの一員として磁氣的検出に必要な SQUID センサー装置や分析手法の研究開発に取り組んだ結果、これらの要素技術を世界に先駆けて発表できた。また、本手法による蛋白質(ヒト IgE, Interleukin 8)の検出・定量実験を行い、(1)アトモル(10^{-18} モル)レベルの極微量の抗原検出が可能であること、(2)現在主流である光学的(酵素反的)手法にはない高感度性(現時点で ELISA 法の 10~100 倍・ラテックス法の 3000 倍高感度)を持つこと、(3)BF (Bound/Free)分離不要の新機能性・高速性を実証し、世界的に高い評価を得ている。この磁氣的手法を用いることにより、光学的測定系では検出困難な微量物質の高速検出が可能になると考えている。

このため、医療・医薬分野、環境解析分野における次世代の診断・解析システムとして、磁氣的手法による新規検出技術の開発に大きな期待が寄せられている。これらの成果を契機として、国内外での磁氣的検出システムの開発が加速しつつあるのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、磁気検出法による簡便かつ高感度な免疫的分析システム(ホモジニアスアッセイ)の構築である。申請者らのこれまでの研究結果から、磁氣的手法を用いた免

疫検査の高感度性と BF 分離不要による簡便性・高速性は確立されつつある。しかしながら、臨床検査への応用を目指すには、誰が、いつ、どこで測定しても同じデータを得ることができる普遍的なシステムを構築する必要があり、そのためにクリアすべき課題が残っていた。具体的には、(1)測定値の再現性、(2)測定値の定量性、(3)測定手法の簡素化(ホモジニアス化)である。これらの問題を解決するため、検出技術をより高度化することが必要不可欠であった。

本研究では、これらの問題点に対する解決法を見出し、理想的な免疫的臨床検査システムを構築すると同時に、実用化への見通しをつけること、また、蛋白質(抗原)以外の環境汚染物質等の検出実験を行い、申請者らの提案する手法が理論的に正しいことを実証することを優先課題とした。

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する。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、解析した。また、要素技術を統合し、医療機関においてエンドユーザーによる測定が可能な迅速検査システムを開発することとした。

(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する。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。高分子と抗体との結合状態を表面化学の観点から明らかにした。

(3) 臨床評価：検査プロトコルの確立と総合的臨床評価

各種蛋白質(免疫グロブリンやサイトカイン)及びカンジダ菌等の検出実験を通して、磁氣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氣的検査法の定量性を確立した。これにより、抗原の量と磁気信号の関係を明らかにし、診断の際に必要な定量的な検量線を得ることができた。

4. 研究成果

本研究では、磁気/高分子複合粒子の粒径制御について検討を行い、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作製の可能性について、市販の磁気マーカーとの比較検討を行いながら吟味した。検討点は、(1)コーティング剤(高分子繊維素材)の材質検討、(2)粒子に付着

させる電荷の検討、(3) マーカー液の添加剤(有機的分散剤、界面活性剤、pH等)であった。その結果、現状で市販のマーカーと同程度の性能をもつマーカーは作製可能であったが、理想とする分散性を持つマーカーの作製という点において、目標を達成できなかった。

臨床評価という点においては、各種蛋白質(免疫グロブリンやサイトカイン)、及びカンジダ菌等の検出実験を通して、磁氣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氣的検査法の定量性を確立することができた。現在、IL-4、IL-8、IgG、IgE、TSHについては安定的な検量線が得られており、かつ一次抗体固定化ビーズを導入することにより大幅な手間と検出時間の短縮が成果として挙げられる。加えて、がん関連物質であるIL-2R、ホルモンであるpTHの微量検出についてもフェムトモルレベルで成果を得た。これにより、本システムではB/F分離を必要としない抗原抗体反応の検出システムの構築が実証できた(図1)。

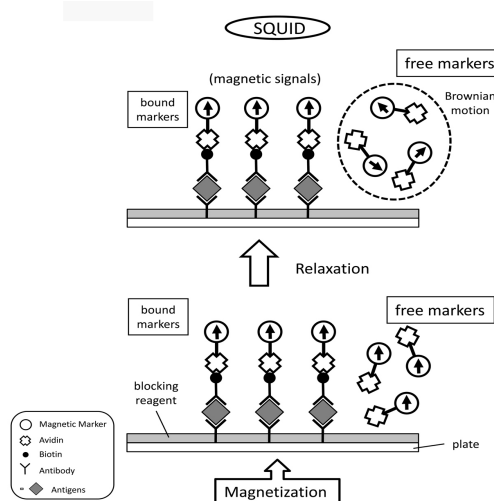


図1: 磁氣的免疫検査システム

さらに、環境汚染分野への応用を目指し、スギ花粉抗原の検出実験を行った。スギ花粉抗原では、ピコモル程度(1ng)の検出感度を得られたが、今後さらなる高感度化ならびにスギ花粉そのものの検出実験が必要であると思われる。そのためには、スギ花粉表面抗原であるCry J1の高い親和性を持つ抗体(モノクローナル抗体が望ましい)の作製と物理的性質の解析、および磁気マーカーのより一層の高性能化が望まれる。しかしながら、一定量のスギ花粉抗原の検出が実証されたことから、空气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。本成果については、現在論文を準備中である。

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5件)

濱崎直孝 “国際的な標準化活動とJSCC”
臨床検査 58(2): 150-155, 2014(査読有)
ISID: 1542103799

<http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.11477/mf.1542103799>

隈博幸 “磁気検出法を用いた高速・高感度な免疫検査システム”
生物化学的測定研究会年報 18巻: 25-36, 2014(査読無)

DOI: なし

Hamasaki N, Tsuda H, Kuma H, “Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia”, *Ann. Lab. Med.* 33(1): 8-13, 2013(査読有)

DOI: 10.3343/alm.2013.33.1.8

Kuma H, Nagashima R, Hatae H, Tsuda T, Hamasaki N, “Beneficial effect of EPA (20:5 n-3 PUFA) on preventing venous thromboembolism: a rat tail thrombosis model experiment.”, *Thromb. Res.* 131(1): 107-108, 2013(査読有)

DOI: 10.1016/j.thromres.2012.09.014

Enpuku K, Watanabe H, Higuchi Y, Yoshida T, Kuma H, Hamasaki N, Mitsunaga M, “Characterization of magnetic markers for liquid-phase immunoassay using Brownian relaxation”, *Jpn. J. Appl. Phys.* 51: 023002-1-7, 2012(査読有)

DOI: 10.1143/JJAP.51.023002

[学会発表](計4件)

濱崎直孝 “APC凝固制御異常と血栓性素因”
第36回日本血栓止血学会(2014年5月30日): 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

隈博幸 “磁気検出法を用いた高速・高感度な免疫検査システム”
第18回生物化学的測定研究会学術集会(2013年6月7日): キャンパスプラザ京都(京都府京都市)

Maeda C, Hisamatsu K, Mitsuse K, Egashira S, Hamasaki N, Enpuku K, Kuma H, “Homogenous quantitative analysis of human parathyroid hormone by use of magnetic markers and SQUID magnetometer”
IFCC EuroMedlab 2013(2013年5月20日~23日): ミラノ(イタリア)

Higashijima A, Mizunoe S, Nakahara K, Kuma H, Hagae H, Hamasaki N, “Beneficial effect of phosphatidylethanolamin on preventing venous thromboembolism: a rat tail thrombosis model experiment”
IFCC EuroMedlab 2013(2013年5月20日~23日): ミラノ

(イタリア)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ

(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