

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02008

研究課題名(和文) 血中抗体医薬品のPOC分析を可能にするマイクロ流体系基板センサー

研究課題名(英文) Microfluidic thread-based sensor for the detection of therapeutic antibodies in blood at point-of-care

研究代表者

チッテリオ ダニエル (CITTERIO, Daniel)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：00458952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Point of Care (POC)での定期的な血中治療薬物濃度モニタリングは、毎日の通院を必要とせずに、患者個々に最適な薬物投与を可能にする。本研究では、抗体医薬品のPOCでの分析法の開発を目的として、指先の穿刺により1滴の血液を滴下し、スマートフォンによるカメラ撮影のみで抗体濃度測定を可能にする安価、簡便、使い捨ての糸基板マイクロ流体分析デバイス(microfluidic thread-based analytical devices; μ TADs)を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物を投与する際には、期待する効果と副作用が現れるが、患者ごとに薬物動態が異なり、限られた有効血中濃度範囲に管理することが重要である。そのために、治療薬物モニタリングが行われており、患者は普通、通院しなくてはならない。本研究で開発した抗体医薬品の分析技術は、微量の血液サンプルで複雑な操作、高価な装置を必要とせず血中濃度をモニタリングできるため、Point of Care (POC)での定期的な血中治療薬物濃度モニタリングへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Regular monitoring of blood drug levels at point-of-care (POC) would allow personalized drug dosage without involving centralized laboratories or the need for daily hospital visits. In this research, as a new analytical method to quantify therapeutic antibodies at POC, we developed fully integrated, rapid, low-cost, disposable and simple-to-use microfluidic thread-based analytical devices (μ TADs) for bioluminescence-based antibody detection from a single drop of blood with a digital camera or a smartphone.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体医薬品 POCT 糸基板センサー 生物発光 マイクロ流体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物を投与する際には、期待する効果と副作用が現れるが、患者ごとに薬物動態が異なり、限られた有効血中濃度範囲に管理することが重要である。そのために、治療薬物モニタリングが行われており、患者は普通、通院しなくてはならない。Point of Care (POC)での定期的な血中治療薬物濃度モニタリングは、毎日の通院を必要とせずに、患者個々に最適な薬物投与を可能にする。抗体医薬は特定の標的を選択的に攻撃できるため、有効性・安全性の高い治療により患者の quality of life (QOL) 向上に貢献でき、特に、がん、炎症性疾患に有効であることが示されている。抗体医薬品も薬物動態およびクリアランスは患者ごとに異なり、定期的な治療薬物モニタリングが必要である。しかしながら、現在の抗体測定法 (ELISA 法など) は、複雑な操作、所要時間が数時間と長く、また数回に及ぶインキュベーションや洗浄操作を必要とし、マイクロプレートリーダーのような高価な分析機器が必要であるため、POC への応用には適していない。そのため、POC での分析を可能にする既存の分析法に取って代わる新しい抗体医薬品の分析法の開発が望まれており、以下のような条件が求められている。高価な分析機器を必要としない、試薬の混合などの操作不要、分析に必要なサンプル量が微量、結果がすぐにわかる、専門的な知識が必要ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、指先の穿刺により 1 滴の血液を滴下し、スマートフォンによるカメラ撮影のみで抗体濃度測定を可能にする安価、簡便、使い捨ての“sample-in-answer-out”型デバイスシステムを開発することである。安価、簡便、使い捨ての糸基板マイクロ流体分析デバイス (microfluidic thread-based analytical devices; μ TADs) を開発する。抗体濃度によって生物発光センサータンパク質由来の発光シグナルが変化し、スマートフォンのカメラによって、「色のシグナル」として検出することで定量できる。分析に必要な全ての試薬は、デバイスに組み込まれており、開発するデバイスは、ピペッティングによる正確なサンプリングや混合操作を必要としないために、血糖自己測定機のように、非常に簡単に POC での抗体医薬品の定量分析を、達成することができる。分析に必要な全ての機能は、デバイスに組み込まれている (サンプル量の調整、血液の抗凝固、血球分離)。3D プリンターで生物発光分析のために、外部の光を遮るスマートフォン用アダプターを作製し、データの読み込み、分析、結果の出力まで全てをスマートフォンで行えるような分析システムとする。

この研究で取り組んだ課題は、マイクロ流体系基板上で、少量の全血からの血球の分離から、生物発光シグナル検出までを達成できるデバイス開発、デバイス上で長期間安定に保存可能な新規生物発光基質フリマジン (FMZ) 誘導体の創製である。

3. 研究の方法

(1) 空気中での酸化安定性に優れた新規生物発光基質フリマジン誘導体の創製

生物発光基質 FMZ は容易に酸化されるため、酸化に寄与する C-3 位のカルボニル基に保護基を導入した FMZ 誘導体を合成した (図 1)。安定性を高速液体クロマトグラフィーで評価した。

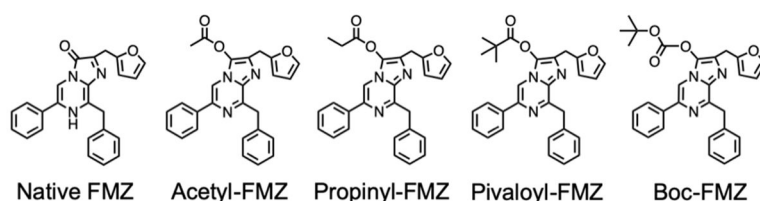


図 1 開発したフリマジン誘導体の構造式

(2) POC 分析を可能にするマイクロ流体系基板センサー

簡便な抗体定量検出が可能な生物発光酵素タンパク質、LUMABS(LUMinescent AntiBody Sensor)を本研究のセンサータンパク質として用いた。LUMABS は2つの発光タンパク質で構成され、抗体量に応じた発光色変化により定量的な血中濃度分析を可能にする。6つの抗体濃度を同時に測定できる μ TADには、HIV、ヘマグルチニン tag (インフルエンザ)、デングウィルス-1のマーカ抗体を検出できるLUMABSを用いた。血中抗体医薬品濃度のモニタリング(TDM)用 μ TADには、抗がん剤セツキシマブを検出できるLUMABSを用いた。

6つの抗体濃度を同時に測定できる μ TAD

この μ TADは、ラミネートフィルム、血液分離膜、ブラックマスク、およびLUMABSとフリマジンが乾燥状態であらかじめ染み込ませてある糸層の5層からなり、それらが混合されないように2本の糸が絡み合っていて空間的に分離された状態となっている(図2)。生物発光は、暗所でのデジタルカメラまたはスマートフォンのカメラで測定した。標的抗体が存在すると、生物発光の緑から青への色変化をもたらし、RGB値から抽出したHUEパラメータで定量化した。

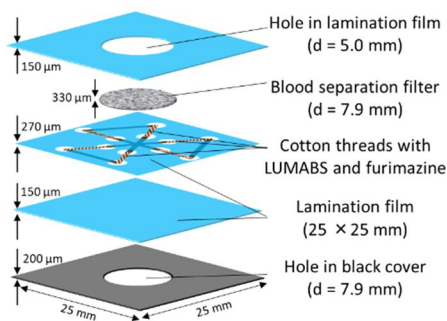


図2 デバイスデザイン

血中抗体医薬品のPOC分析を可能にする μ TADs

デバイス中の糸は、血球分離試薬であるNaClが配置された2本の糸に、それぞれLUMABS・基質フリマジンを滴下した後、巻き合わせて作製された。滴下された全血は毛細管力により自発的に糸中を浸透し、その過程でNaClにより血漿のみが分離される。最終的に糸末端において、血漿中のセツキシマブとLUMABS、フリマジンが混合され、セツキシマブ量に応じた緑色から青色への発光色変化が確認される(図3)。これをカメラで撮影・色解析することでセツキシマブの定量濃度分析を行った。

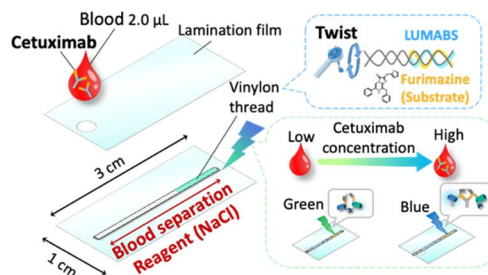


図3 デバイスデザインと検出原理

4. 研究成果

(1) 空気中での酸化安定性に優れた新規生物発光基質フリマジン誘導体の創製

保護基には、生体内のエステラーゼおよび水により脱保護可能な、アシル系保護基の Acetyl 基、Propinyl 基、Pivaloyl 基、およびカルバメート系保護基である *tert*-butoxycarbonyl (Boc) 基を選択した。エタノール中での安定性を評価したところ、全ての FMZ 誘導体は、FMZ に比べて高い安定性を示し、嵩高い保護基ほど安定化効果が大きいことが確認された。また、バッファ中での安定性評価では、アシル系保護基の場合は、Acetyl-<Propinyl-<Pivaloyl-FMZ の順で、保護基が嵩高くなるほど安定性が高くなった。それに対して、Boc-FMZ は、水により速やかに脱保護されることがわかった。このように、エタノールのストック溶液中では安定に保存することができ、保護基の種類を変えることで、脱保護の反応速度を調節できることがわかった。水がない条件では、フリマジン誘導体は安定であるため、デバイス上で長期保存が可能であり、血液などの生体サンプルを滴下することで、脱保護され生物発光基質としての機能を発揮できることがわかった。

(2) POC 分析を可能にするマイクロ流体系基板センサー

6 つの抗体濃度を同時に測定できる μ TAD

抗 HIV、抗ヘマグルチニン (HA)、抗デング (DEN) の 3 種類のモデル抗体を $5\mu\text{L}$ の全血に添加し、5 分後にデジタルカメラで生物発光応答を得た (図 4)。糸に FMZ と LUMABS を近接させたことにより、迅速な生物発光信号の放出だけでなく、必要血液量の大幅な低減が達成された。また、糸のパターンの柔軟性により、6 つのシグナルを同時に検出することが可能となった。3D プリンターで作製した外部の光を遮るスマートフォン用アダプターを使用することで、スマートフォンのカメラで定量的に生物発光シグナルを取得することが可能となった (図 5)。得られた応答曲線は、カメラの種類に依存するが、1 滴の全血試料から抗体を定量できることが示唆された。

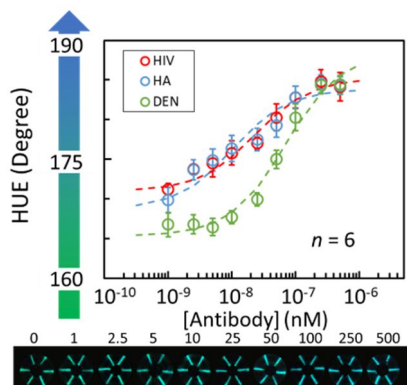


図 4 応答曲線

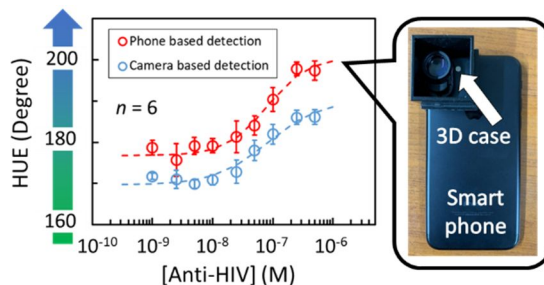


図 5 スマートフォンでの測定結果

血中抗体医薬品の POC 分析を可能にする μ TADs

綿糸、ビニロン糸を用いてサンプルの浸透距離を比較し、より高親水性を示したビニロンを採用した。また、発光を吸収する血球を除去するために配置した NaCl により、イオン強度が変化することで浸透過程で赤血球が凝集し、その凝集塊が糸の細孔を塞ぐことで糸中での血球分離に成功した。各試薬を配置し 2 本の糸を巻き合わせたデバイスに全血 $2\mu\text{L}$ を滴下すると、2.5 分後に患者の血中セツキシマブ濃度範囲において濃度に応じた発光色変化が確認された (図 6)。またこのデバイスは、指先から得られる $2\sim 10\mu\text{L}$ の血液量に依存しない測定を達成した。

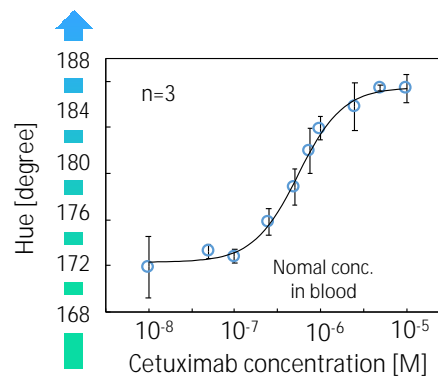


図 6 セツキシマブの応答曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Shimazu Riho, Tomimuro Kosuke, Ni Yan, Malegori Cristina, Hamedpour Vahid, Hiruta Yuki, Oliveri Paolo, Merkx Maarten, Citterio Daniel | 4. 巻 352 |
| 2. 論文標題 Microfluidic thread-based analytical devices for point-of-care detection of therapeutic antibody in blood | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical | 6. 最初と最後の頁 131002 ~ 131002 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2021.131002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yuki Mizui, Masatoshi Eguchi, Masanobu Tanaka, Yuma Ikeda, Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa, Daniel Citterio, Yuki Hiruta | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Long-term single cell bioluminescence imaging with C-3 position protected coelenterazine analogues | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry | 6. 最初と最後の頁 579-586 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob02020f | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tomimuro Kosuke, Tenda Keisuke, Ni Yan, Hiruta Yuki, Merkx Maarten, Citterio Daniel | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Thread-Based Bioluminescent Sensor for Detecting Multiple Antibodies in a Single Drop of Whole Blood | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ACS Sensors | 6. 最初と最後の頁 1786 ~ 1794 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.0c00564 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Tenda Keisuke, van Gerven Benice, Arts Remco, Hiruta Yuki, Merkx Maarten, Citterio Daniel | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Paper-Based Antibody Detection Devices Using Bioluminescent BRET-Switching Sensor Proteins | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition | 6. 最初と最後の頁 15369 ~ 15373 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201808070 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tomimuro Kosuke, Tenda Keisuke, Hiruta Yuki, Merx Maarten, Citterio Daniel | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Microfluidic thread-based analytical devices for antibody detection in whole blood using bioluminescent sensor proteins | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2018 | 6. 最初と最後の頁 1018 ~ 1021 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 13件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 化学・生化学センシングのための機能性色素および紙基板分析デバイスの開発 |
| 3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Paper-based analytical devices (PADs) Ultimate Simplicity |
| 3. 学会等名 Asianalysis: Asian Conference on Analytical Sciences (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Analytical assays on paper and thread platforms: as simple as it can get |
| 3. 学会等名 JSPS International Workshop on Symbiosis of Biology and Nanodevices (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Paper-based analytical devices for naked-eye (semi)quantitative signal readout |
| 3. 学会等名 Pacifichem: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kosuke Tomimuro, Keisuke Tenda, Yuki Hiruta, Maarten Merkx, Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 抗体検出のための生物発光タンパク質を用いたマイクロ流体系基板型分析デバイスの開発 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会関東支部若手交流会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kosuke Tomimuro, Keisuke Tenda, Yuki Hiruta, Maarten Merkx, Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Thread-Based Analytical Device for Antibody Detection in Whole Blood by Using Bioluminescent Sensor Proteins |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Riho Shimazu, Kosuke Tomimuro, Yan Ni, Yuki Hiruta, Maarten Merkx, Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Microfluidic Thread-Based Analytical Devices for Point-of-Care Detection of Therapeutic Antibodies in Blood |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Riho Shimazu, Kosuke Tomimuro, Yan Ni, Yuki Hiruta, Maarten Merkx, Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Microfluidic Thread-Based Analytical Devices for Point-of-Care Detection of Therapeutic Antibodies in Blood |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Microfluidic Paper-Based Analytical Devices - More than Simple Test Papers |
| 3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Riho Shimazu, Junnosuke Kawahara, Kosuke Tomimuro, Kazushi Misawa, Yan Ni, Yuki Hiruta, Maarten Merkx, Daniel Citterio |
| 2. 発表標題 Single-Step Bioluminescence Lateral Flow Immunoassays for Diagnostics |
| 3. 学会等名 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019)（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomimuro Kosuke, Tenda Keisuke, Merkx Maarten, Hiruta Yuki, Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Paper- and thread-based immunoassay devices with colorimetric bioluminescence signaling |
| 3. 学会等名 Pittcon 2019, Philadelphia, USA（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tenda Keisuke、van Gerven Benice、Arts Remco、Hiruta Yuki、Merkx Maarten、Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Paper-based analytical device for the detection of antibodies in biological samples |
| 3. 学会等名 PERCH-CIC 2018, Pattaya, Thailand (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Simple and low-cost optical detection of clinically relevant targets at point-of-care |
| 3. 学会等名 International Workshop on Photonics Polymer for Innovation (IWPPi), Suwa, Japan (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizui Yuki, Tanaka Masanobu, Tenda Keisuke, Iwasawa Naoko, Hiruta Yuki, Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Development of stable bioluminescent substrates activatable by hydrolysis |
| 3. 学会等名 Royal Society of Chemistry - Tokyo International Conference 2018 (RSC-TIC 2018), Makuhari Messe, Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomimuro Kosuke, Tenda Keisuke, Hiruta Yuki, Merkx Maarten, Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Microfluidic thread-based analytical devices for antibody detection in whole blood using bioluminescent sensor proteins |
| 3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018), Kaohsiung, Taiwan (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Citterio Daniel |
| 2. 発表標題 Capillary flow-driven analytical devices for sample-in-signal-out assaying of clinically relevant analytes |
| 3. 学会等名 Flow Analysis 2018, Bangkok, Thailand (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|--------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 Detection device for bioluminescent detection of biomarkers from a biological fluid sample using luminescent sensing proteins | 発明者 Citterio, Merckx et al. | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/EP2018/072758 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 蛭田 勇樹 (HIRUTA Yuki) (60710944) | 慶應義塾大学・理工学部(矢上)・専任講師 (32612) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|------------------------------------|--|--|--|
| オランダ | Eindhoven University of Technology | | | |
| イタリア | University of Genova | | | |