

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K13763
研究課題名（和文）投薬量最適化のための免疫抑制剤血中濃度モニタリングを目指した連続式センサの創製

研究課題名（英文）Development of a biosensor for monitoring of immunosuppressant in blood for optimal dosage

研究代表者
當麻 浩司（Toma, Koji）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40732269
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、臓器移植治療や自己免疫疾患治療などに用いられる免疫抑制薬による副作用の軽減・効能の最大化を実現するために、血中免疫抑制剤モニタリングシステムのセンサ技術を構築することであった。免疫抑制薬の濃度変化を連続的に捉えることで、個別に薬剤投与量の微調整が可能となり、副作用と薬効が最小かつ最大化された全で有効な治療法へ繋がる技術にむすびつくと考え、研究を進めてきた。2018年度には高感度な測定が期待できる表面プラズモン増強蛍光センサを構築し、蛍光溶液からの出力を確認した。2019年度には、マウス、抗マウス抗体によるモデル実験を行った後、免疫抑制剤であるシクロスポリンAの測定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、免疫抑制薬による副作用の軽減と効能の最大化を実現する免疫抑制剤モニタリングシステムのセンサ技術を検討した。得られた研究成果により、高感度な蛍光測定と免疫測定の高い可能性が示され、今後のセンサ技術発展の礎となる知見が得られた。将来、本センサを組み込んだ免疫抑制剤モニタリングシステムが開発されれば、投薬前後にわたり個別に血中薬剤濃度をモニタリングすることで、心身への負担を抑えながら高い薬効を得る新たな医療技術が提案できる可能性がある。またその技術を日常生活に展開することで、薬の飲み忘れや過剰摂取を予防するセンサデバイス開発への波及も期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research was to develop a sensor technology that allows to monitor immunosuppressant in blood for minimum side effects and maximum medicinal efficacy. In fiscal year 2018, a surface plasmon-enhanced fluorescence sensor was constructed for sensitive measurement. Sensor characterization with fluorophore solution showed that sensor output is dependent on the fluorophore concentrations. In fiscal year 2019, first, the surface plasmon-enhanced fluorescence immunosensor was developed and characterized with mouse and fluorophore-labeled anti-mouse antibodies. The dynamic range of 0.6-10000 ng/mL was achieved. Afterwards, measurement of immunosuppressant, cyclosporine A, was demonstrated.

研究分野：医工学

キーワード：免疫センサ 免疫抑制剤 モニタリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カルシニューリン抑制剤や代謝拮抗薬、副腎皮質ステロイドなどの免疫抑制剤は、免疫反応において主要な役割を果たすリンパ球の増殖や機能を抑える薬剤で、臓器移植治療や自己免疫疾患治療などに用いられている。例えば世界で年間13万件程度行われている臓器移植では、移植後の臓器に対する拒絶反応を抑えるために用いられ、ほとんどの場合、生涯にわたり服用し続けなければならない。免疫抑制剤は薬効が高い反面、血中濃度が高過ぎると腎疾患や骨髄機能障害、感染症などの副作用が認められ、低過ぎると拒絶反応が生じる。薬剤の中には投薬による副作用が55%に達するという報告もある(Thong N, et al., *The American Journal of Surgical Pathology*, 2009)。加えてこの血中濃度の有効治療域は狭く、薬効にも個人差があることから、投薬量は随時適切に調節しなければならない。そのため投薬の際には、治療薬物モニタリング(therapeutic drug monitoring, TDM)を行い、個々の患者に応じて血中濃度が定常的に有効治療域内に収まるか確認し投薬量を決定している。2012年の診療報酬改定により、カルシニューリン抑制剤のtacrolimus(TAC)およびcyclosporin(CyA)に加え、代謝拮抗薬のmycophenolate mofetil(MMF)製剤も新たに保険適用可能なTDM対象薬に加わり、TDMの重要性がますます認識されている。TDMでは投薬直前の血中濃度(トラフ値)、投薬後の最大血中濃度(ピーク値)および体内に取り込まれた薬剤量の指標となる血中濃度-時間曲線下面積(area under the blood concentration time curve, AUC)などを利用している。つまり、血中薬濃度の時間変化情報が、薬効の最大化そして副作用の最小化を実現する上で非常に有効だと考えられる。

免疫抑制剤の血中濃度計測に広く用いられている方法として、chemiluminescent immunoassay(CLIA)やliquid chromatograph mass spectroscopy(LC/MS)などがある。しかしながら、LC/MSは装置が大型で操作が煩雑となり臨床の現場で利用するには適していない。それに比しCLIAは簡便ではあるが、両手法は共通してバッチ計測であり、連続的な測定を行うことはできない。そのため従来法では、血中の免疫抑制剤濃度の経時変化を詳細にモニタリングすることは困難であり、離散的なデータを解析モデルにて補完した推定値に基づいて薬剤量を調節するため、薬効と副作用のバランスが崩れるリスクが常にある。以上の理由から、連続的にTACなどの血中薬濃度を測定し、実測値に基づく正確な薬剤量調節が可能な技術が求められている。特に、様々な薬剤を組み合わせた際の個別事例における血中薬濃度の詳細な経時変化は未知であり、モニタリングを行うことで新たな医学的知見の獲得と、それに基づく安全で有効な治療法へと繋がる新規の医療技術へと応用することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、感応部の再生が可能な表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance, SPR)バイオセンサを用いることで、繰り返しの免疫測定を実現し、血中の免疫抑制剤濃度を連続的に計測するモニタリングシステムの要素技術を構築することであった。感応部表面を繰り返し再生し、1枚のセンサチップにて繰り返しかつ迅速(半連続的)に免疫測定が可能なセンサ技術を構築し、血中濃度の高次な時間情報が得られる次世代TDMへの展開を試みる。

3. 研究の方法

(1) 免疫抑制剤モニタリングシステムを実現するために、免疫測定法で抗体・抗原の結合・解離が再現良く繰り返し行える感応部をもった、SPRバイオセンサを構築した。金薄膜で覆われた感応部は、表面をpolyethylene glycol(PEG)チオールと高いpH耐性を持つ膜タンパクにて修飾することで、防汚性に優れ再生が可能な表面を構築した。また、免疫抑制剤は非常に低分子(MW~1 kDa)であるため、屈折率変化に基づくSPRバイオセンサによる非標識計測は困難だと考えられた。そこで高感度な蛍光検出が期待される表面プラズモン増強蛍光(SPF)センサを利用できるよう光学系の改良・構築を図った。

(2) 構築したSPFセンサの性能を、マウス・アンチマウス抗体を用いて評価し、標準免疫抑制剤サンプルを測定する系を表面弾性波(SAW)デバイスにて確認した。SPFセンサに対しては表面修飾をした感応部表面に補足抗体を模したマウス抗体を固定化してバイオセンサを作製し、その後蛍光分子Alexa Fluor 647($\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 665 \text{ nm}$)で修飾したアンチマウス抗体を感応部へ負荷した。測定は励起光の入射角および波長を固定し、蛍光強度の時間変化を測定した。SAWデバイスに対しても同様の表面修飾を行った後、免疫抑制剤であるシクロスポリンA(CyA)を対象成分として補足抗体を固定化し、その後CyAを結合させた。

4. 研究成果

(1) はじめにSPFセンサを構築した。本センサは励起光源である波長633 nmのHeNeレーザー、ガラスプリズム、SPRチップ、フローセルを兼ねたライトパイプ、蛍光検出用のMulti-Pixel Photon Counter(MPPC)から構成される。SPRチップは、はじめにガラス基板上に接着層として膜厚約3 nmのチタン、続いてプラズモン励起のための膜厚45 nmの金をスパッタ法にて製膜することで作製した。その後、ガラスプリズムへマッチングオイルを介して接合し、金表面へPDMSとアクリル製のライトパイプにて作製したフローセルを装着した。サンプル溶液はフローセルへ接続したポンプによって送液される。本センサでは対象分子を測定するためにSPFを採用しており、レーザー光をプリズムへSPR角にて入射することで表面プラズモンポラリトンによる増強場を金表面に局在誘起し、近傍の蛍光分子を高効率に励起する。放出された蛍光はライトパイ

イプによって高効率に集光され、MPPCにて検出される。

構築後に Alexa Fluor 647 溶液と phosphate buffered saline (PBS) 溶液を交互に送液することで、蛍光出力の確認と再現性の評価を行った。その結果、Alexa Fluor 647 溶液の負荷に伴う蛍光出力の増加と PBS 溶液による出力の回復が観察され、5 回の繰り返し測定における変動係数 (C.V.) は 0.46% と優れた再現性が得られた (図 1 a)。つづいて、SPF センサへ種々の濃度の Alexa Fluor 647 溶液を負荷し、感度を評価したところ、1.0–10000 nM の範囲で定量が可能であった (図 1 b)。以上より、本 SPF センサシステムのバイオセンサ応用への可能性が示された。

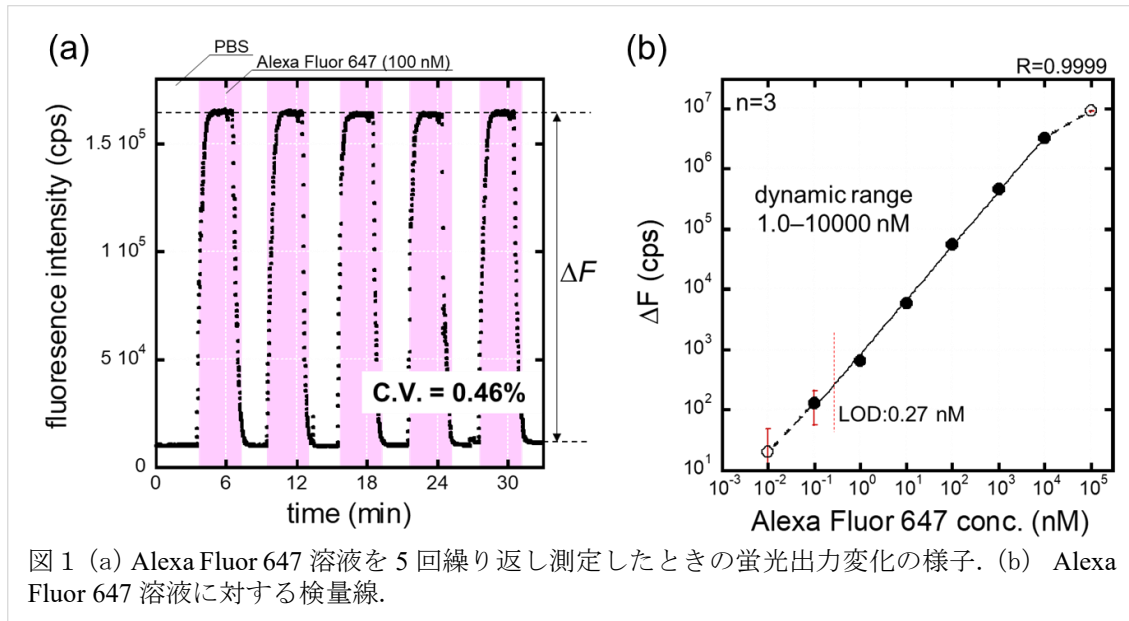


図 1 (a) Alexa Fluor 647 溶液を 5 回繰り返し測定したときの蛍光出力変化の様子. (b) Alexa Fluor 647 溶液に対する検量線.

次に、マウス抗体を固定化した SPF センサに対し、Alexa Fluor 647 修飾したアンチマウス抗体を付加するモデル実験により、バイオセンサとしての特性評価を行った。アンチマウス抗体の負荷に伴う蛍光の増加と、フォトブリーチングによる指数関数的な減少が観察され、10 分の結合反応後に PBS によってリンスすることで余剰のアンチマウス抗体を除去した。その際の蛍光強度と初期値の差をセンサ出力 ΔF として、特性を評価した。また測定後は pH 1.0 の塩酸処理にてアンチマウス抗体を解離させ、感応部の再生を行った (図 2 a)。種々の濃度のアンチマウス抗体を負荷し、感度を評価したところ 0.66–10⁴ ng/ml の範囲で定量が可能であった。

最後に、同様の表面修飾法を SAW デバイスに施し、免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CyA) を対象サンプルとして抗 CyA 抗体を固定化後、CyA の測定を試みた。予想通り CyA だけでは分子量が小さく、出力が得られなかったため、CyA の補足後に CyA と特異的に結合するシクロフィリン B (CypB) を感応部に負荷したが、明瞭な出力は得られなかった (図 2 b)。反応系の原因が考えられることから、今後 CypB をはじめに固定化するなど感応部の改善を図っていく。

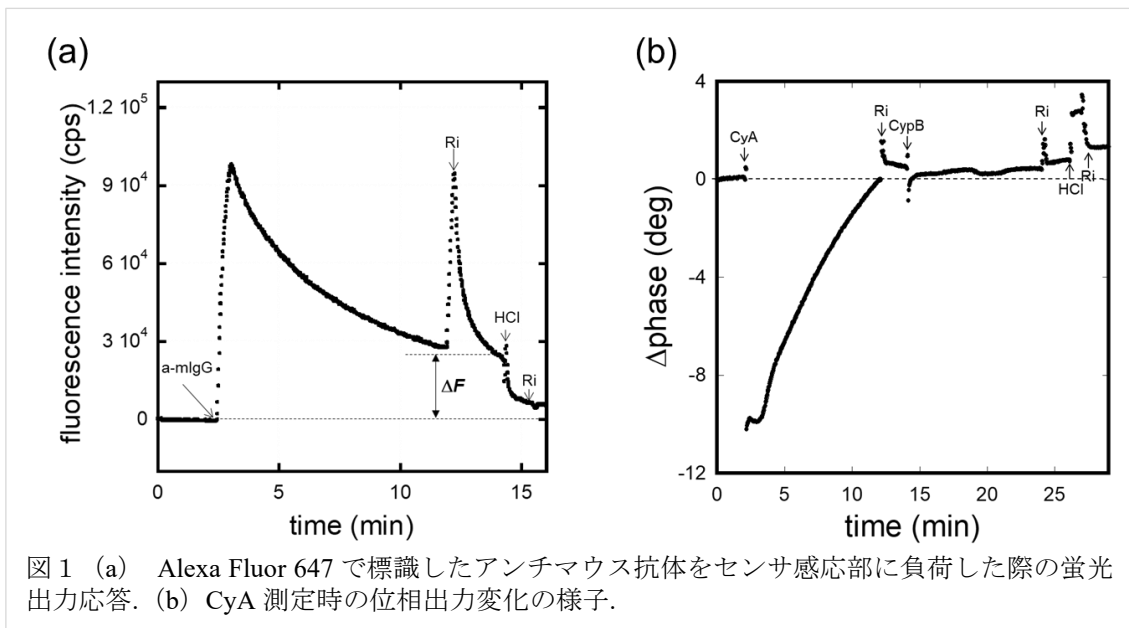


図 2 (a) Alexa Fluor 647 で標識したアンチマウス抗体をセンサ感応部に負荷した際の蛍光出力応答. (b) CyA 測定時の位相出力変化の様子.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Toma Koji, Oishi Koki, Kato Misato, Kurata Kanako, Yoshimura Naoyuki, Arakawa Takahiro, Yatsuda Hiromi, Kanamori Kiyoko, Mitsubayashi Kohji | 4. 巻 296 |
| 2. 論文標題 Precipitate-enhanced SAW immunosensor for sensitive monitoring of mite allergens | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical | 6. 最初と最後の頁 126579 ~ 126579 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2019.05.056 | 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 Toma Koji, Oishi Koki, Yoshimura Naoyuki, Arakawa Takahiro, Yatsuda Hiromi, Mitsubayashi Kohji | 4. 巻 203 |
| 2. 論文標題 Repeated immunosensing by a dithiobis(succinimidyl propionate)-modified SAW device | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Talanta | 6. 最初と最後の頁 274 ~ 279 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2019.05.080 | 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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toma K, Kato M, Kurata K, Yoshimura N, Arakawa T, Yatsuda H, Kanamori K, Mitsubayashi K |
| 2. 発表標題 Precipitate-enhanced surface acoustic wave immunosensor for on-site monitoring system of mite allergen |
| 3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics & BioElectronics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toma K, Oishi K, Wanotayan S, Arakawa T, Mitsubayashi K |
| 2. 発表標題 Regeneratable SPF (Surface Plasmon-enhanced Fluorescence) immunosensor for monitoring of cardiac troponin |
| 3. 学会等名 13th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2019) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toma K, Oishi K, Kodaira K, Yoshimura N, Arakawa T, Yatsuda H, Kanamori K, Mitsubayashi K |
| 2. 発表標題 Precipitate-assisted signal amplification of surface acoustic wave immunosensor for mite allergen |
| 3. 学会等名 17th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2018) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |