

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07951

研究課題名(和文)磁気的ホモジニアスアッセイによる新規臨床検査システムの構築

研究課題名(英文)Construction of new clinical laboratory test by magnetic homogenous assay

研究代表者

隈 博幸 (Kuma, Hiroyuki)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40435136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、直径100nm前後の磁気マーカーと高感度な磁気検出センサーの組み合わせにより、従来より用いられている光学的手法にない特性と高感度を持つ磁気検出の免疫検査法を確立し、これを用いた臨床検査システムの可能性を示した。また検出技術を高度化し、最短50分程度で測定が可能な要素技術や、ユーザーフレンドリーな測定方法を確立した上で、蛋白質から細胞、花粉粒子まで幅広い物質を定量的に測定できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法はサンプルの濁度や光散乱の影響を受けないため、検体の前処理を必要とせず、捜査を簡略化できるため自動化に適した手法である。また今回、蛋白質だけでなく細胞や花粉粒子なども定量的に測定することにより、測定対象の広さを示すことができた。このことから、従来用いられてきた抗原抗体反応による免疫検査法に磁気検出システムを導入できることを明らかにし、ラテックス法の後継技術として今後の分析技術の発展に大いに寄与できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed magnetic immunoassay system using magnetic markers (-100nm) and highly sensitive magnetic sensors, which has the characteristics and high sensitivity that are not found in conventional optical methods. Then we also have shown the possibility of new clinical test system with this system. In addition, we developed the elemental technologies with user-friendly methods, and it made be able to measure within 50 minutes. These results indicated that our system can be measured a wide range of biological substances from proteins to cells and pollen particles quantitatively.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：磁気マーカー 免疫検査システム イムノアッセイ BF分離不要

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原と抗体の特異的結合反応(抗原抗体反応)を利用した物質の同定・定量法は、一般的な分析技術として幅広く用いられている。特に医療診断分野では、アレルギー疾患・肝炎ウイルス・免疫不全症候群から梅毒・食中毒まで多種多様の検出項目があり、その需要は極めて高い。現在、多くのメーカーからこの免疫検査法を利用した汎用検査機器が販売されているが、そのほとんどが化学発光物質・蛍光物質またはラテックスを標識した抗体による光学的抗原検出法を用いており、微量物質を検出するためにはある程度の試料溶液を確保し光学的なコンタミネーションを除去する等、煩雑な前処理を必要とするものが少なくない。このため、老人や乳幼児などの患者に大きな負担をかけることや溶血した血液試料などは測定が困難などの問題点が存在する。一方、我々は抗体に標識した50~100 nmの微小な酸化鉄粒子から発生する磁気信号を、高感度磁気センサーにより検出し定量する新規の手法を開発し、その高感度性と高速性を実証してきた。しかしながらこの磁気的検査法の実用化と臨床応用にはまだ解決すべき課題を残している。特に、分析や検査の生命線とも言える再現性の実現のためには、検出用磁気マーカーの高性能化と検査システムの高度化は必須であり、自動化のためには試料処理・検出手法の簡素化は欠かすことの出来ない要素技術である。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した磁気的免疫検査法の各構成要素を高度化し、従来の光学的手法を凌駕した高感度な免疫検査システム(ホモジニアスアッセイ)の確立を目的としている。すなわち、B/F (Bound/Free)分離を不要とする液相免疫検査法の構築と、そのために必要な磁気検出技術の改良、及び新規検出物質の多様性と定量性の証明を目指し、臨床検査に適した検査システムの試作と臨床評価を行うことによって本手法の有用性を実証する。

3. 研究の方法

本研究は、前述の目的を達成するため、以下の方法により実施した。

(1)磁気マーカーの最適化と粒子特性:本手法の基盤となる磁気微粒子について、高い水中分散性と均一な磁気特性及び複数の検出用抗体結合基を持つ磁気微粒子を作成し、その特性を定量的に評価する。

(2)磁気検出技術の改良:改良した磁気マーカーと印加技術について精査し、分析手順の最適化と検出感度の向上を図りながら同時に定量用プログラムを開発する。これらの結果を統合し測定時間短縮と単純化・再現性を確立するとともに装置の自動化に対する問題点をピックアップしていく。

(3)検出システムの臨床評価:これまで磁気検出装置で測定できた生体関連物質を本手法で再分析し、本システムによる検査工程の評価を行う。すなわち、種々の抗原に対する抗原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て、診断用検査としての有用性・優位性を実証する。また、新規に抗体を作成または購入し、新たな検査項目に対する応用性を検証する。

4. 研究成果

(1)磁気マーカーの最適化と粒子特性

免疫検査システムに使用する磁気マーカー(磁気微粒子)の模式図を図1に示す。磁気微粒子は直径が100nm程度であるが、図に示すようにコアとなる酸化鉄粒子(比重=5)のマーカーに占める体積の割合は10~20%程度である。磁気マーカーの分散性(=凝集力)と磁気特性はこの酸化鉄粒子の状態及び特性に依存する。これまでの我々のグループの研究結果から、磁気微粒子の凝集性は酸化鉄が密集しているほど強く、また磁気強度も密集度に依存していることが分かっている。このことから、逆に分散性を上げるためには原料酸化鉄のある程度のばらつきが必要であり、磁気強度とのバランスから図1の状態が最適であることが明らかとなった。

また、これまでに本手法で使用してきた市販マーカー(フェルカルボトラン:PDRファーマ製)は分散性に優れていたが、被膜物質にカルボキシ基が1つないし2つしか存在しないため、抗体分子との結合性が悪かった。そのため、被膜物質として分子量の比較的小さい(=鎖長の短い)

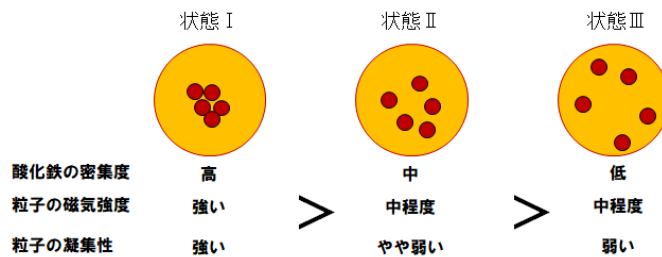


図 1. 磁気マーカーの概略と内部酸化鉄粒子の状態による凝集特性

カルボキシデキストランを用いて、状態 II に相当する酸化鉄粒子を内包することにより、磁気マーカーの改良を行った。この磁気マーカー（CMDM）の作製は、名糖産業（株）に依頼した。

図 2 に CMDM マーカーと、ストレプトアビジンを結合させた CMDM-SA マーカーのリン酸緩衝液中における分散性を示す。

分散マーカー緩衝液を試験管に入れ、1～96 時間静置後に上清の吸光度を 600nm で測定し評価した。静置直後の粒子濃度を 100 としたときの 96 時間後の上清濃度は 93.7（CMDM）と 89.4（CMDM-SA）であり、いずれも良好な分散性を示した。ただし、放置 1 時間後にどちらも一時的な沈降がみられた。この原因はまだ不明である。

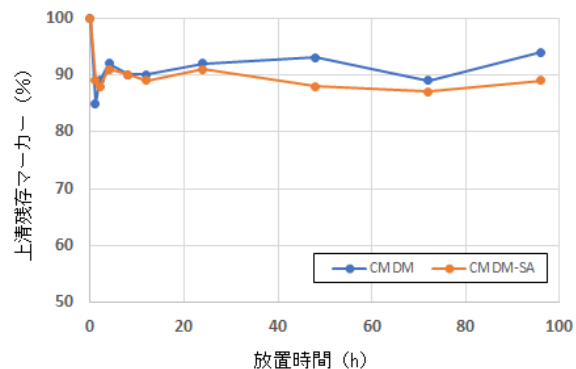


図 2. 作製磁気マーカーの分散性評価

また、動的光散乱装置（ゼータサイザー Nano; Malvern Panalytical, U.K.）を用いて CMDM-SA の粒子径を測定したところ、CMDM の直径は 101nm、CMDM-SA の直径は 156nm と、ストレプトアビジンが結合することにより、約 55nm 粒子径が大きくなっていた。

この CMDM-SA の 1 粒子当たりのストレプトアビジン分子の結合量を HRP-ビオチンを用いて推定すると、平均 7.3 分子 / 粒子であることが判明した。これらの結果から、市販のフェルカルボトランマーカーの長所はそのままに、欠点を補う磁気マーカーを作製することができた。

(2) 磁気検出技術の改良

今回作製した磁気マーカーを以前の研究で開発した磁気印加装置によって事前に磁化することにより磁気強度を付加し、フェルカルボトランとの磁気強度比較を行った。またこの際、WINDOWS で作動する新規磁気強度測定プログラムを用いて動作確認を実施した。

図 3 に示すように、プログラムは問題なく動作し、磁気強度 () は数値として定量的に示されることを実証できた。また CMDM は 1μg あたり約 8500 〇、フェルカルボトランは 1μg あたり約 4000 の 〇の磁気強度を持つことが判明し、今回作製した新規の磁気マーカーは従来の市販品に比べ 2 倍以上の磁気強度を持つことが示された (図 4)。

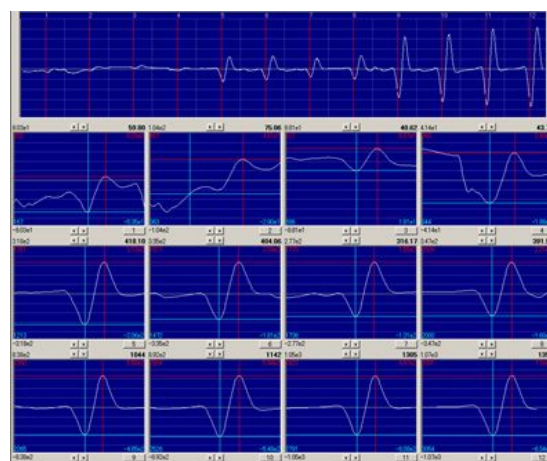


図 3. 磁気測定プログラムによる定量

また、CMDM 粒子の事前磁気印加による分散性の低下については特に観察されず、残留磁気の保持能力や非結合（浮遊）マーカーからの磁気信号もフェルカルボトランと優位な差は見られなかった（Data not shown）。これらの結果から、我々の提案する磁気的免疫検査システムに必要な要素技術の高度化をある程度達成できたと考えられた。

ただし、今回示した磁気測定プログラムは測定した磁気強度をそのまま数値として示すものであり、実際には浮遊マーカーからの非特異的な磁気シグナルが約 3m 〇程度発生するが、それ

も含んだ数値が測定される。理想的には未結合マーカーからの信号はゼロになるが、実際にプランクから生じる信号を差し引く機能や検量線から抗原量を計算し表示する機能を付加する必要がある。

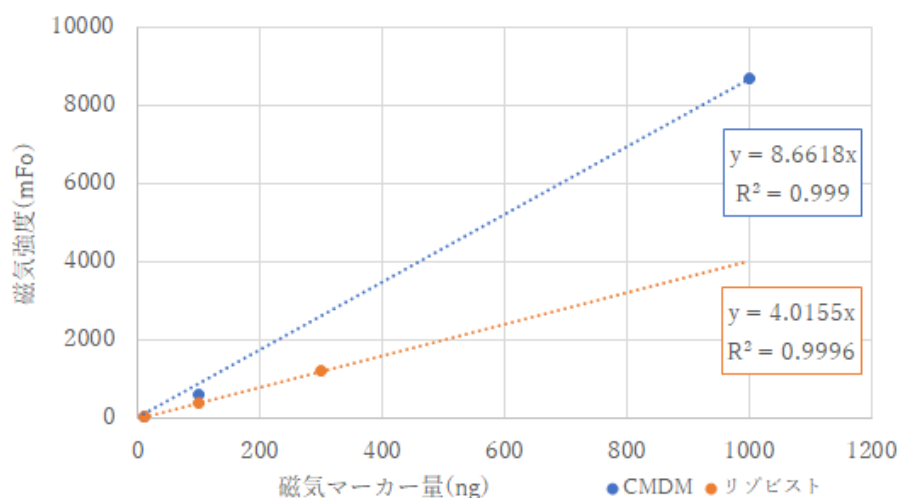


図 4. CMDM, フェルカルボトラン粒子の質量 - 磁気強度相関

(3) 検出システムの臨床評価

これまで開発してきたシステムのプロトコルを用いて、測定項目の候補となる蛋白質や細胞など生体関連物質 (total IgE, C.albicans, Alpha-fetoprotein) の緩衝液中及び血清中の検出実験を再度行い、その有用性及び優位性を検討した。最小検出感度はtotal IgEで約0.01pg(緩衝液中)と従来の3倍の感度を得た。このことはマーカー自身の磁気強度と分散性の向上、地場印加技術の開発によるノイズの低下、等によって達成できたと考えられる。また検体前処理の手法を見直すことによって、試料の測定に必要な時間を10分程度短縮し、準備から測定終了までの時間を約50分とすることができた。これらの成果から、検査の自動化に重要な要素技術についても必要十分な検証ができたと考えられる。

しかしながら、新規の検査項目の実証実験と感度測定、及び既測定物質に対する再現性の十分な検証については、折からの新型コロナウイルス感染症拡大による研究室閉鎖や大学閉鎖などの影響により、研究の進捗に遅れがみられ期間内に実施することができなかった。この点は大いに反省すると共に、今年度以降に実施発展させる必要がある。

従来法と同等またはそれ以上の感度と定量性を持ち、かつ検体の種類を問わない分析手法を実証できたことにより、本手法によって最新の免疫検査システムの実現が可能であることを示し、ラテックス法の後継技術として先端医療技術の進展ならびに21世紀の国民福祉向上に大きな貢献ができると考えている。

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 Jin Xiuri, Kinoshita Sachiko, Kuma Hiroyuki, Tsuda Tomohide, Yoshida Tatsusada, Kang Dongchon, Hamasaki Naotaka	4. 巻 27
2. 論文標題 Reduced Activity of Protein S in Plasma: A Risk Factor for Venous Thromboembolism in the Japanese Population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10760296211033908	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 Sato Yoshihiro, Sugi Toshitaka, Sakai Rie, Kuma Hiroyuki	4. 巻 150
2. 論文標題 The role of epidermal growth factor-like domain-related abnormalities, protein S Tokushima, and anti-protein S autoantibodies in pregnancy loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2022.103476	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳留千優、波多江日成子、円福敬二、隈博幸
2. 発表標題 磁気検出システムを用いた肝腫瘍マーカーAFPの定量的検出
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等
 (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/cc1m/immunoassay.html>

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	波多江 日成子 (Hatae Hinako) (00551582)	長崎国際大学・薬学部・助教 (37303)	

	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
研究協力者	塚本 晃 (Tsukamoto Akira)		
研究協力者	浦田 美秩代 (Urata Michiyo)		

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