

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12626

研究課題名(和文) ホーン型ESRによるアルツハイマー病血液バイオマーカーの検出

研究課題名(英文) Detection of blood biomarkers for Alzheimer's disease by horn-type ESR

研究代表者

上田 徹 (Kamida, Tohru)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90315333

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)：発症前アルツハイマー病(AD)の末梢血サンプルにおいて、フリーラジカル関連バイオマーカーを開発し、新規の周波数掃引仕様電磁ホーン型ESR装置での定量化を試みた。コロナ禍により、ESRバイオマーカー検出キットの作製はできなかった。一方、磁場/周波数掃引QD法コルゲートホーン型ESR装置を考案し、ハード面でHEMTとコルゲートホーンにより大幅な信号増大と計測の優位性が得られた。ソフト面では積算とFFTフィルタ処理でHEMT増幅時のノイズ幅を減らしS/N比で10倍程度の感度が向上した。Sパラメータ計測ESR手法も検討し、実用化に向けて基礎開発法が確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電磁ホーン型ESR装置は、バイオマ - カ - 検出キットごとESR計測が可能である。しかしながら既存の装置では測定感度が十分でなく、実用的でなかった。本研究の成果として、従来の10倍程度に感度が向上した。今後、ESRバイオマーカー検出キットが開発されれば、本手法が、アルツハイマー病の早期発見の一指標となる可能性があり社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We developed free radical-related biomarkers in presymptomatic Alzheimer's disease (AD) peripheral blood samples and attempted to quantify them using a novel frequency sweeping electromagnetic horn ESR device. Due to COVID-19, we were unable to produce an ESR biomarker detection kit. On the other hand, a magnetic field/frequency sweep QD method corrugated horn type ESR device was devised, and in terms of hardware, a large signal increase and superiority in measurement were obtained by HEMT and corrugated horn. On the software side, integration and FFT filter processing reduced the noise width during HEMT amplification and improved the sensitivity by about 10 times in the S/N ratio. The S-parameter measurement ESR method was also examined, and a basic development method was established for practical use.

研究分野：ESR計測の医学応用

キーワード：ADの早期診断方法 ESRバイオマ - カ - 検出キット 磁場/周波数掃引QD法 コルゲートホーン型ESR装置 Sパラメータ計測ESR手法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ADの早期診断方法の一つとして、コア・バイオマーカーである脳脊髄液A β の有用性は早くから確立されているが、非侵襲的かつ簡易的でないことから、一般臨床の現場では普及していない。したがって、現在では非侵襲的かつ簡易的な末梢血サンプルにおけるバイオマーカーの開発が期待されている。血液中のA β はADで上昇傾向にあるが、健常対照群と比較すると有意差はないという報告もあり、それ単独では早期診断の有力なバイオマーカーとはならない。本研究では、A β の凝集に蛋白そのものから発生したフリーラジカルが関与していることに着目し、ラジカル化された末梢血の凝集A β 42を新たなバイオマーカーのターゲットとする。

2. 研究の目的

- (1) ADの早期診断方法を確立するため、AD発症前の末梢血サンプル（血漿）における新たなバイオマーカーの開発を行うこと
- (2) 新規バイオマーカーの測定のため、感度・操作性などを向上した小型化周波数掃引仕様電磁ホーン型ESR装置を開発すること

3. 研究の方法

(1) ESR バイオマーカー検出キットの開発

現在、 β アミロイド蛋白の検出に使われているキット（ELISA; サンドイッチ法）を参考に新たなキットを作製。発色液の代わりに、スピントラップ剤を使う。

(2) 小型化周波数掃引仕様電磁ホーン型ESR装置を開発

電磁ホーン型 ESR 装置を小型化するために、磁場掃引電磁石よりも、均一性のよい小型固定磁石を用い周波数掃引ホーン型 ESR 仕様にする。

(3) ハード的 ESR 測定感度の向上

- ① QD法ホーンESRの単純ホーンを国立天文台で作製のコルゲートホーンに交換しマイクロ波サイドローブの発生を抑え、装置内の自己発生ノイズを低減し2~3倍の感度向上を図る。
- ② HEMT(高電子移動度トランジスター)をQIFMのRF端子前に設置し、同時に機器のシールド・電波吸収体・(バンドパス)フィルターの更なる設置で外部擾乱ノイズを低減し、HEMTで微弱信号を大増幅する。当増幅器の雑音温度のカタログ値から現状より室温で8倍、液体窒素温度で20倍程の感度向上が可能で、外部ノイズ抑制の結果、実質5-10倍の感度向上を図る。
- ③ アイソレーションのよいサーキュレーターの採用で感度2倍を図る。
- ④ マイクロ波透過型ホーンESR仕様で誘電ロスの大い生体試料のHEMTによる高感度増幅を図る。

4. 研究成果

従来のバイオマーカー検出キットを作製している企業と提携して研究を推進することにしてはいたが、コロナ流行のため新規 ESR バイオマーカー検出キットの作製まで至らなかった。

他研究費と合同で、磁場/周波数掃引 QD 法コルゲートホーン型 ESR 装置を開発し、ハード面で HEMT とコルゲートホーンにより大幅な信号増大と計測の優位性が得られた。また ソフト面では積算と FFT フィルタ - 処理で HEMT 増幅時のノイズ幅を減らし S/N 比で 10 倍程度の感度が向上した。最終年度では、S パラメータ計測 ESR 手法も検討し、感度向上は不十分だが実用化に向けて幾つかの基礎開発法が確立できた。また、電磁ホーン型 ESR 装置で通常の ESR 計測が出来るよう一部改造した。

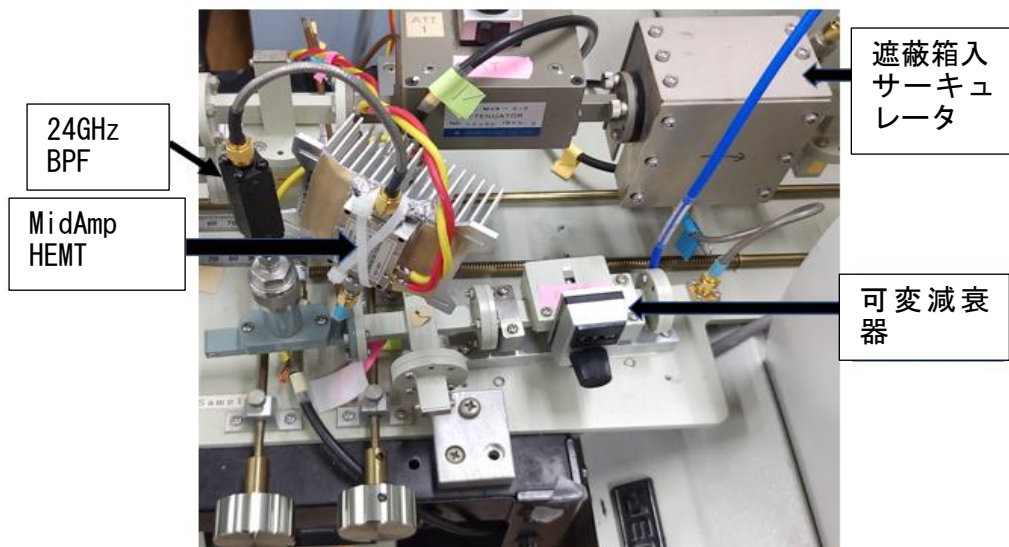


図1 新たに Mid Amp 仕様 HEMT の設置で 5-10 倍の ESR 信号強度の増幅。K-band マイクロ波反射仕様 QD 法コルゲートホーン型 ESR の場合、マイクロ波はサーキュレータから可変減衰器、24GHz の BPF (バンドパスフィルター) 経由で Mid Amp 仕様 HEMT で 5-10 倍増幅され、QIFM (IQ ミキサ-) に入力。LNA 仕様 HEMT に替えて Mid Amp HEMT を用い、Mid Amp に放熱板を設置する。LNA 仕様 HEMT は実験室周辺のノイズ環境の悪さで使用出来ない。Mid Amp への供給電圧は定格 DC 8V で行っているが、10V 以上で ESR 計測を行ったところ 10 倍程の ESR 強度の増加が認められた。

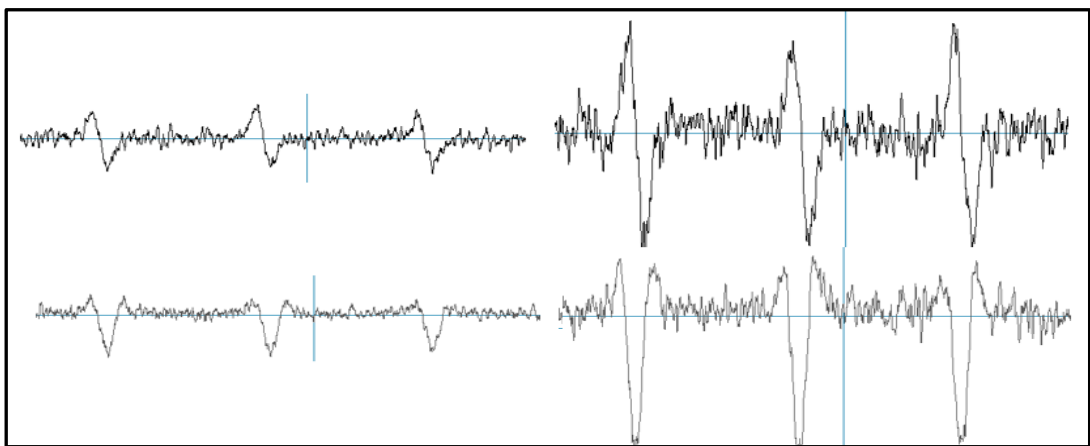


図2 磁場掃引仕様 QD 法コルゲートホーン型 ESR で得た 0.0001M 濃度 TEMPO 水溶液中の NO・ラジカルの複素 hfs ESR スペクトル。上図は吸収スペクトル、下図は分散スペクトル。図左側は HEMT 増幅器なしでの測定。図右側は HEMT 増幅器設置での計測。積算回数 1 回。吸収 (上図)・分散 (下図) スペクトルから共振器型 ESR で得る peak to peak 強度より、より正確に ESR 強度が評価できる下図の磁場掃引 ESR パワースペクトルを算出する。

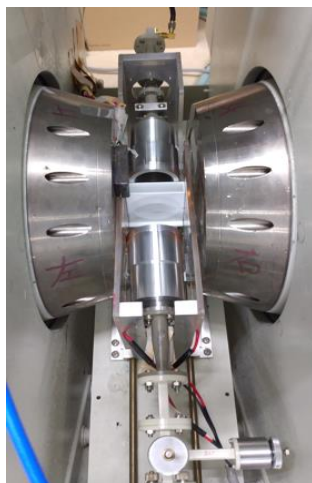
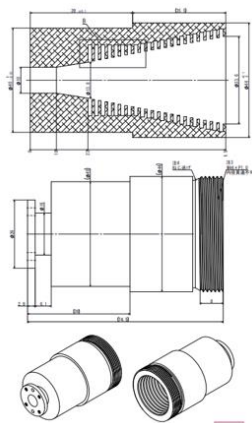


図3 図左に示す送信用と受信用の2つのコルゲートホーンを設置したK-band QD法コルゲートホーン型ESR装置の試料設置部周辺機器(右図)。中央に設置した白色のものは凹面型試料容器。透過ホーンからの、あるいは反射ホーンからの同軸線が、QIFMへのSMAコネクタへの入力交換だけでマイクロ波透過型仕様にもマイクロ波反射型仕様にも簡単に仕様変更できる。

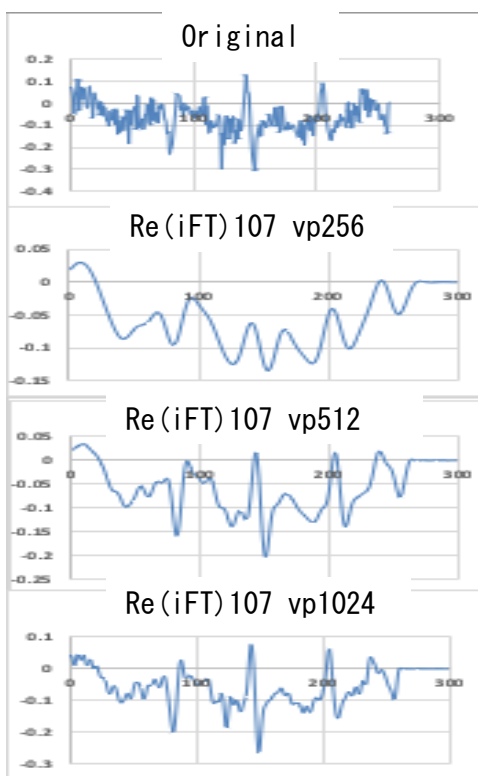


図4 0.0001M濃度のTEMPO水溶液を凹面型試料容器に入れ、ステップスキャン周波数掃引仕様QD法コルゲートホーン型ESRにて4回積算で得た複素ESRスペクトルの実部(CH1)が最上図のOriginalスペクトルである。この積算スペクトルを更にFFTフィルター処理でノイズ低減したのが下図の3つのスペクトルで、FFT処理でVP係数を上から順に256、512、1024に変えて処理した。VP係数は全データ点をNとしたとき、フーリエ変換した波形では信号に関わる成分が1番目の付近と、N番目の付近に広がっているので、各々VPの拡がりを見込みで拾い上げている。

Originalの4回積算の元データのVP係数を小さくして、FFTフィルター処理すると、積算処理と異なり短時間でノイズの大きなスペクトルは平滑化できるが、VPを256の様に小さくし、かけすぎるとESR強度が小さくなり、また微細な信号はつぶれてしまう。今回のFFTフィルター処理ではVP係数が1024の場合が適度なフィルタリング処置であり、強度もOriginalとほぼ同じで、周波数軸で信号のない所のノイズ幅の比で3~4倍に向上した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onishi Kouhei, Kamida Tohru, Fujiki Minoru, Momii Yasutomo, Sugita Kenji	4. 巻 34
2. 論文標題 Anticonvulsant and antioxidant effects of lamotrigine on pilocarpine-induced status epilepticus in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001859	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 -

〔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 小林 正, 上田 徹, 小野澤 晃, 藤井 泰範, 鶴澤 佳徳, 水田 幸男, 高原 文雄
2. 発表標題 電磁ホーン型/コルゲートホーン型ESR装置の改良と応用
3. 学会等名 第61回 電子スピンスサイエンス学会年会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	小林 正 (Kobayashi Tadashi) (30100936)	大分大学・理工学部・名誉教授 (17501)	

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
---------	---------