

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360199

研究課題名（和文）磁気マーカーを用いた高速・高感度な多項目バイオ免疫検査システムの開発

研究課題名（英文）Liquid-phase detection of biological targets with magnetic markers

研究代表者

圓福 敬二（ENPUKU KEIJI）

九州大学・超伝導システム科学研究センター・教授

研究者番号：20150493

研究成果の概要（和文）：

本研究では、磁気マーカーと SQUID センサを用いた B/F 分離を必要としない高速・高感度なバイオ免疫検査システムを開発した。最初に、本手法の基礎となる磁気マーカーの溶液中でのブラウン緩和特性を定量的に明らかにするための新しい解析手法を開発し、これにより免疫検査に適した磁気マーカーの指針を明らかにした。次に、固定用ポリマービーズを用いた B/F 分離不要の液相検査法を高性能化するとともに、SQUID センサを用いた高感度なバイオ検査システムを試作した。本システムを用いて B/F 分離なしでの蛋白質の検出実験を行ない、本手法によりアトモルレベルの微量な検出が可能であることを示し、本手法の高感度性を実証した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a liquid-phase immunoassay technique using Brownian relaxation of magnetic markers. First, we quantitatively characterized the properties of the magnetic markers in order to find the markers suitable for the application. Next, we developed a detection method using large polymer beads to fix the biological targets, where bound and free markers were magnetically distinguished using the difference in their Brownian relaxation. Therefore, we can omit a time consuming washing process called bound/free separation. We also developed a detection system using high  $T_c$  SQUID sensor, and demonstrated the high sensitivity detection of biological targets called biotins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：免疫検査、磁気マーカー、SQUID センサ、磁気ナノ粒子、ブラウン運動、バイオ検査機器

## 1. 研究開始当初の背景

免疫検査は医療診断や医薬開発の分野で

必要となる種々の蛋白質や病原菌などのバイオ物質を抗原-抗体の結合反応を用いて

検出する方法であり、バイオ計測において基盤となる検出法である。

近年、多種類の微量な蛋白質や病原菌を高速・高感度に検出する重要性が高まっており、そのための免疫検査システムの開発が切望されている。このため種々の検出法が研究されているが、その中の一つに、蛋白質や病原菌を磁氣的に検出する新規な検出法がある。本手法は抗原-抗体の結合反応を磁気マーカー抗体と SQUID 磁気センサを用いて検出する新しい検出法であり、従来の光学的手法にはない超高感度性や B/F (Bound/Free) 分離不要の新機能性が期待されている。この磁氣的手法を用いれば、微量なバイオ物質の高速・高感度検出が可能となるため、医療・医薬分野での次世代の診断・解析機器として、その開発に大きな期待が寄せられている。

## 2. 研究の目的

申請者等は、磁気マーカーの溶液中でのブラウン回転運動を利用した液相免疫検査法を開発してきた。すなわち、磁気マーカーと固定用ポリマービーズを用いて、B/F 分離のための洗浄工程が不要な、新規な液相検査法を考案・開発してきた。本研究ではこれまでの成果を発展させ、液相での免疫検査手法を高度化するとともに、多種類のバイオ物質の高速・高感度な多項目検査を可能とする磁氣的免疫検査システムを開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究では、磁気マーカーを用いた液相免疫検査法の高性能化を以下の方法により行った。

- (1) 最初に、本手法の基礎となる磁気マーカーの溶液中でのブラウン緩和特性を定量的に明らかにするとともに、磁気マーカーの特性解明のための新しい解析手法を開発した。
- (2) 次に、SQUID センサを用いた磁氣的免疫検査装置を試作するとともに、固定用ポリマービーズを用いた B/F 分離不要の液相検査法を高性能化した。
- (3) 最後に、本システムを用いて B/F 分離なしでの液相での蛋白質の検出実験を行ない、本手法の有効性を実証した。

## 4. 研究成果

### (1) 磁気マーカーの特性解明

免疫検査に用いられる磁気マーカーの模式図を図 1 に示す。同図に示すように磁気ナノ粒子の凝集体を高分子で被覆し、その表面意に抗体を結合している。このため、磁気マーカーの磁気特性はナノ粒子自身の特性とともに粒子間の磁氣的相互作用に強く依存する。このため、凝集体の特性解明のための新たな解析手法を開発し、この手法を用いて

種々の磁気マーカーを評価した。これにより、免疫検査応用に適した磁気マーカーの開発指針を明らかにした。

本研究で開発する液相免疫検査法は溶液中での磁気マーカーのブラウン緩和を基本としている。磁気マーカーの粒子径  $d$  は溶液中でのブラウン緩和時間を決め、磁気モーメント  $m$  は磁気信号の強さを決める。このため、この二つが磁気マーカーの性能を決めるキーパラメータとなる。

磁気マーカーの交流磁化率の周波数特性と磁化(M-H)特性を解析することにより粒子径  $d$  と磁気モーメント  $m$  を求める手法を新たに開発した。解析手法の詳細は項目 5 の論文①と④を参照されたい。

図 2 に 5 つの磁気マーカーについて得られた結果を示す。図 2(a) は粒子径  $d$  の分布であり、図 2(b) は磁気モーメント  $m$  の分布である。図に示すように、マーカー内での  $d$  と  $m$  の値の分布は大きい。例えば、マーカー 1 については粒子径の平均値は 110 nm であるが、70 nm から 250 nm の範囲で分布している。また、磁気モーメントも平均値  $m = 6 \times 10^{-24}$  Wb m を中心に広く分布している。従って、磁気マーカーを使用する場合には、マーカー内の  $d$  と  $m$  の分布を考慮することが必要となる。

図 3 には粒子径  $d$  の平均値と磁気モーメント  $m$  の平均値の関係を示している。同図に示すように、 $d$  と  $m$  の間にはほぼ比例の関係が成り立つ。この関係は単一粒子における関係 ( $m$  は  $d$  の 3 乗に比例) とは大きく異なる。これは磁気マーカーがナノ粒子の凝集体で作製されているためである。

また、図中のマーカー 1 と 4 では粒子径  $d$  はほぼ等しいが、磁気モーメント  $m$  には大きな違いがあることが分かる。これは、粒子間の磁氣的相互作用の大きさが異なるためである。

上述したように、磁気マーカーを免疫検査に応用する場合には粒子径  $d$  と磁気モーメント  $m$  がキーパラメータとなる。図 2 と 3 に示した結果を用いることにより磁気マーカーの性能評価を行なうことが出来る。

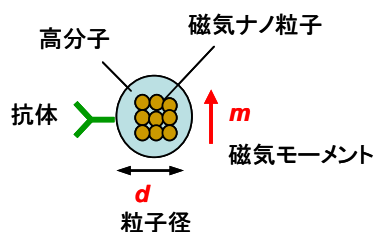


図 1. 磁気マーカーの模式図

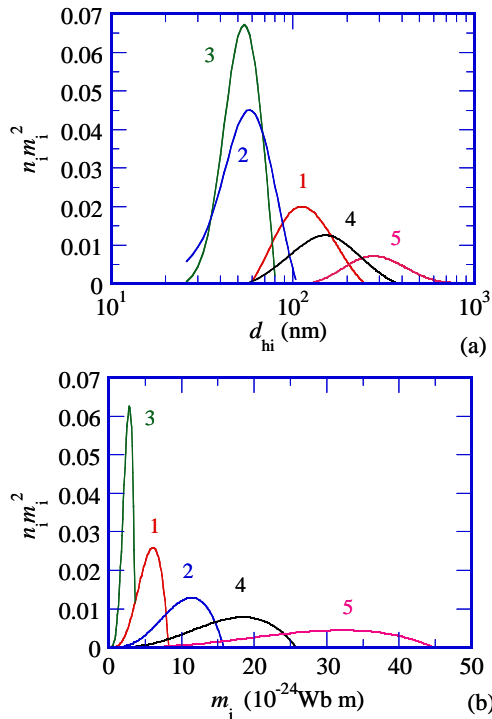


図 2. (a)磁気マーカー内の粒子径  $d$  の分布。(b) 磁気モーメント  $m$  の分布。5つのマーカーについての結果を示している。

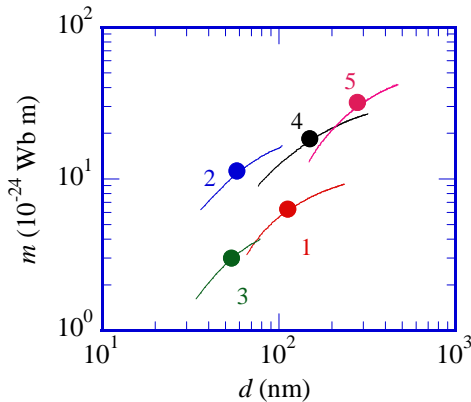


図 3. 各種磁気マーカーの粒子径  $d$  と磁気モーメント  $m$  の値の関係。

### (2) 液相免疫検査法の開発

図4に本研究で開発した、固定用ポリマービーズを用いたB/F(Bound/Free)分離なしでの液相免疫検査法の原理図を示す。図に示すように、検出するバイオ物質(target)をポリマービーズの表面に固定する。この後に、磁気マーカーを投入すると、一部はtargetと結合する。この磁気マーカーを結合(Bound)マーカーと呼ぶ。これに対して未結合のマーカーを未結合(Free)マーカーと呼ぶ。溶液サンプル中には

これらの二つのマーカーが共存している。本検出法では、以下に示すように溶液中での磁気マーカーのブラウン緩和特性の違いを利用して、両者を磁氣的に識別する。

図5に開発した液相免疫検査システムの模式図を示す。測定の手順は以下に示すように、(1) 磁化、(2) ブラウン緩和、(3) 検出の3つからなる。

まず、(1) 液体サンプルに外部磁界を印加する。この磁化過程では、図4に示すように結合・未結合マーカーの磁気モーメントは全て外部磁界の方向を向く。

次に、(2) 容器を回転する。このときには外部磁界がゼロとなるため、磁気マーカーのブラウン回転が始まる。ブラウン回転時間 $\tau_B$ はマーカーの粒子径 $d$ により以下のように与えられる。

$$\tau_B = \frac{\pi \eta d^3}{2 k_B T} \quad (1)$$

ここで、 $\eta$ は溶液の粘性係数であり、水の場合は $\eta = 10^{-3} \text{ kg/ms}$ となる。直径が $d = 120 \text{ nm}$ の未結合マーカーの場合には $\tau_{Bm} = 0.6 \text{ ms}$ となる。このため、未結合マーカーは溶液中で容易に回転する。一方、ポリマービーズに結合した結合マーカーのブラウン回転時間はポリマービーズの粒子径 $d_p$ により決められ、 $d_p = 3.3 \mu\text{m}$ の場合には $\tau_{Bp} = 14 \text{ s}$ となる。

このブラウン回転により、図4に示す様に磁気マーカーの磁気モーメントの向きは次第にランダムとなる。その結果、磁気マーカーからの磁気信号は次式に示す様に時間とともに指数関数的に減衰する。

$$B_s(t) = B_0 \exp(-t / \tau_B) \quad (2)$$

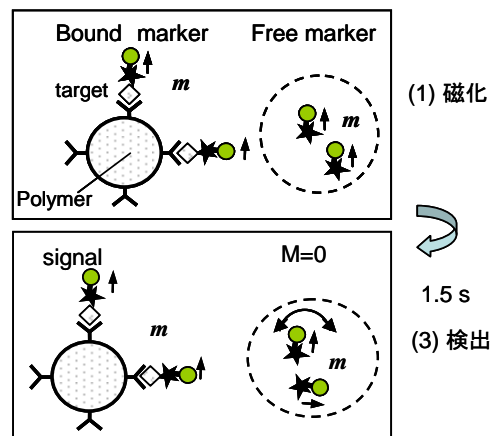


図 4. 結合マーカーと未結合マーカーのブラウン磁気緩和。緩和時間の差を利用して両者を磁氣的に識別する。

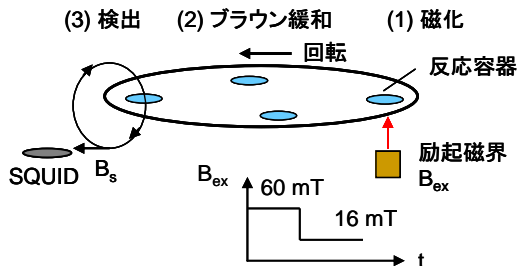


図 5. ブラウン磁気緩和を用いた液相免疫検査法の測定手順

未結合マーカの緩和時間は $\tau_{Bm} = 0.6$  ms であるため、未結合マーカからの信号は時間とともに急速に減衰しゼロとなる。これに対して、結合マーカの緩和時間は $\tau_{Bp} = 14$  s と長いため、結合マーカからの信号は保持されることになる。

従って、(3) サンプルが SQUID センサの真上に到達した時には結合マーカからの磁気信号のみを検出することになる。すなわち、未結合マーカを洗い流す洗浄工程(BF分離)なしでの、液相検出が可能となる。なお、磁化してから測定までの待ち時間  $T_w$  は  $\tau_{Bm} \ll T_w \ll \tau_{Bp}$  となるように設定すれば良く、本実験では  $T_w = 1.5$  s とした。測定の詳細については、項目 5 の論文②、⑤、⑥を参照されたい。

なお、未結合マーカからの信号は理想的にはゼロであるが、実際には、未結合マーカの凝集のため磁気信号が若干残り、この残留分が免疫検査の感度を劣化させる。このため、図 5 に示すように、励起磁界を 2 段階に分けて印加する方法を開発した。すなわち、最初の短時間だけ 60 mT の大きな磁界を印加しサンプルを磁化する。その後の測定においては 16 mT の弱い磁界を印加する。この磁界印加法により、未結合マーカからの擬似信号を抑制することが出来る。

### (3) 液相での免疫検査実験

本検出手法を用いて、ビオチンと呼ばれる蛋白質の検査実験を行なった。図 4 に示すように、直径が  $3.3 \mu\text{m}$  のポリマービーズにビオチンを固定し、これにアビジンを付加した磁気マーカを結合させた。実験では、図 3 に示す磁気マーカ 1 を用いた。

アビジン・ビオチンの結合反応により磁気マーカはポリマービーズに固定される。図 6 の SEM 写真に示すように、ポリマービーズの表面には 1 個当たり 1,000 から 2,000 個のビオチンが固定されており、これに磁気マーカが結合している。

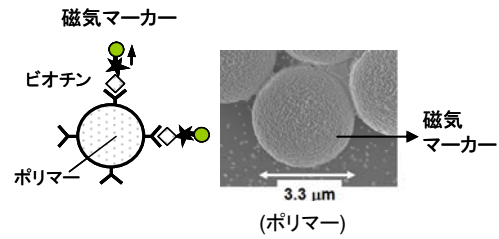


図 6. ポリマー表面に固定したビオチンに結合した磁気マーカ。模式図と SEM 写真。

図 7 にビオチンの検出結果を示す。図の横軸はビオチンの個数であり、縦軸は SQUID により検出した磁気信号である。なお、磁気信号は磁束量子  $\Phi_0 = 2.07 \times 10^{-15}$  Wb の単位で表している。同図に示すように両者はほぼ比例しており、B/F 分離無しでの液相免疫検査が正常に行なわれていることを示している。また、この実験では  $10^5$  個/ $40 \mu\text{l}$  のビオチンの検出に成功した。モル濃度に換算すると  $4 \times 10^{-18}$  mol/ml (4 アトモル/ml) であり、液相検査法によりこの高感度を達成したのは本研究が初めてである。

図 8 には異なる磁気マーカを用いた場合の結果を示している。図 3 に示すマーカ 1 と 4 を用いた場合を比較している。図 3 に示す様に、マーカ 4 の磁気モーメントはマーカ 1 に比べて大きく、このマーカを用いれば免疫検査における信号を大きくできることが期待できる。図 8 に示すように、免疫検査の実験結果はこの期待通りであり、マーカ 4 において大きな信号が得られている。従って、免疫検査においては磁気モーメント  $m$  の大きなマーカを用いることが高感度化の有効な方法であることが分かる。

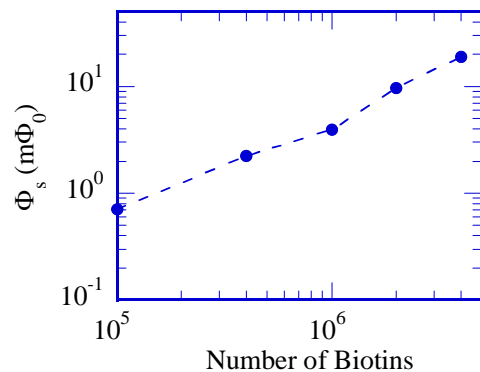


図 7. 液相免疫検査実験の結果。ビオチンの数と検出信号の関係。

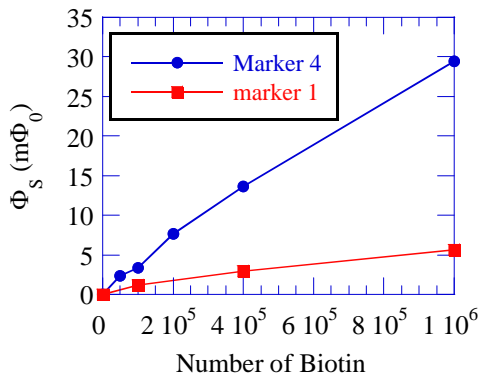


図8. 2種類のマーカーを用いた場合の免疫検査実験の比較。

## 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 17 件)

- ① K. Enpuku, H. Watanabe, Y. Higuchi, T. Yoshida, H. Kuma, N. Hamasaki, M. Mitsunaga, H. Kanzaki, and A. Kandori “Characterization of magnetic markers for liquid-phase immunoassays using Brownian relaxation”, Jpn. J. Appl. Phys. 51 (2012) 023002. 査読有り
- ② A. K. Bhuiya, T. Mitake, M. Asai, T. Ito, S. Chosokabe, T. Yoshida, K. Enpuku and A. Kandori, “Liquid-phase immunoassays using Brownian relaxation of magnetic markers”, IEEE Trans. Magn. 47 (2011) 2867. 査読有り
- ③ H. Kuma, H. Oyamada, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, Y. Sugiura, K. Yoshinaga, K. Enpuku and N. Hamasaki, “Liquid phase immunoassays utilizing magnetic markers and SQUID magnetometer”, Clin Chem Lab Med 48 (2010) 1263. 査読有り
- ④ K. Enpuku, Y. Tamai, T. Mitake, T. Yoshida and M. Matsuo “ac susceptibility measurement of magnetic markers in suspension for liquid phase immunoassay”, J. Appl. Phys. 108 (2010) 034701. 査読有り
- ⑤ K. Enpuku, H. Tokumitsu, Y. Sugimoto, H. Kuma, N. Hamasaki, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, K. Yoshinaga, H. Kanzaki and N. Usuki, “Fast detection of biological targets with magnetic marker and

SQUID”, IEEE Trans. Appl. Supercond. 19 (2009) 844. 査読有り

- ⑥ A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, H. Kuma, N. Hamasaki, H. Kanzaki, N. Usuki, K. Yoshinaga and K. Enpuku, “Development of a SQUID system using field reversal for rapid detecting Bacteria”, IEEE Trans. Appl. Supercond. 19 (2009) 853. 査読有り

[学会発表] (計 30 件)

- ① K. Enpuku, “Diagnostics and Immunoassays --Magnetic-marker Based SQUID Biosensor--”, Superconductivity Centennial Conf., 2011. 9. 20, Haag (Netherlands).
- ② A.K. Bhuiya, T. Mitake, M. Asai, T. Ito, S. Chosakabe, T. Yoshida, and K. Enpuku, “Liquid-phase immunoassays using Brownian relaxation of magnetic markers”, Int. Magn. Conf (INTERMAG 2011), 2011.4. 26, Taipei (Taiwan).
- ③ K. Enpuku, S. Chosokabe, H. Watanabe, M. Matsuo and T. Yoshida, “Liquid-phase detection of biological targets with magnetic marker and SQUID”, Applied Superconductivity Conf. (ASC2010), 2010.8. 6, Washington DC (USA).
- ④ K. Enpuku, Y. Tamai, T. Mitake, T. Yoshida and M. Matsuo, “AC susceptibility measurement of magnetic markers for liquid phase detection of biological targets”, 8<sup>th</sup> Int. Conf. Sci. Clin. Appl. of Magnetic Carrier, 2010. 5. 27, Rostock (Germany).
- ⑤ Y. Tamai, T. Mitake, S. Chosokabe, M. Matsuo, K. Enpuku, H. Kuma, N. Hamasaki, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, H. Kanzaki and N. Usuki, “Detection of biological targets using Brownian relaxation of magnetic markers” 12<sup>th</sup> Int. Superconductive Electronics Conf. (ISEC2009), 2009. 6. 17, Fukuoka (JAPAN).

[その他]

ホームページ等

<http://www.sc.kyushu-u.ac.jp/~enlab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

圓福 敬二 (ENPUKU KEIJI)

九州大学・超伝導システム科学研究センター・教授

研究者番号：20150493

### (2) 研究分担者

井上 昌睦 (INOUE MASAYOSHI)

九州大学・システム情報科学研究院・准教

授

研究者番号：80346824

(3) 研究分担者

隈 博幸 (KUMA HIROYUKI)

長崎国際大学・薬学部 講師

研究者番号：40435136

(4) 研究分担者

吉田 敬 (YOSHISA TAKASHI)

九州大学・システム情報科学研究所・助教

研究者番号：30380588

(H22 から参画)

(5) 研究分担者

能崎 幸雄 (NOZAKI YUKIO)

九州大学・システム情報科学研究所・助教

研究者番号：30304760

(H21 のみ参画。H22 から慶応義塾大学に異動のため分担者から除外)