

磁気マーカーを用いたSQUID液相免疫検査法の開発

長曾我部, 隼一

九州大学大学院システム情報科学府電気電子工学専攻

渡邊, 英樹

九州大学大学院システム情報科学府電気電子工学専攻

圓福, 敬二

九州大学大学院システム情報科学府電気システム工学部門

<https://doi.org/10.15017/19867>

出版情報：九州大学大学院システム情報科学紀要. 16 (1), pp.17-21, 2011-03-25. 九州大学大学院システム情報科学研究所

バージョン：

権利関係：

磁気マーカーを用いた SQUID 液相免疫検査法の開発

長曾我部隼一*・渡邊英樹*・圓福敬二**

Development of Liquid Phase Immunoassay Using SQUID by Magnetic Marker

Shunichi CHOSOKABE, Hideki WATANABE and Keiji ENPUKU

(Received January 20, 2011)

Abstract: We have developed a liquid-phase magnetic immunoassay using SQUID. In this method, the antibodies, which specifically bind with antigen, were labeled with magnetic marker. In order to generate the signal from magnetic markers, it is necessary to apply strong external field. However, it causes the aggregation of magnetic markers, which results in the noise of the free markers. In order to solve this problem, we investigated a new method for magnetic field application. In the new method, a strong field was applied for a short time for excitation of markers, while a weaker field was applied during the measurement. It was shown that this two-step application of the external field prevents aggregation of magnetic markers and effectively reduces the noise from the free markers. We demonstrated the detection of 4.7~11.9 femto-mol/l of biotin with this method.

Keywords: SQUID, Immunoassay, Magnetic marker, Nanoparticle, Brownian relaxation

1. はじめに

免疫検査とは病原菌や環境有害物質などのバイオ物質(抗原)の種類や量を測定する方法のことで、血液検査等の医療診断に用いられている。この免疫検査では、測定対象である抗原に対して特異的に結合する抗体との結合反応が用いられるが、この際、抗体はマーカーと呼ばれる物質で標識されており、マーカーからの信号をセンサで検出することで抗原・抗体の結合を測定することができる。

現在主流な免疫検査法は、光を発するマーカー(光学マーカー)を用いた光学的手法である。この手法は既に医療や食品衛生など様々な分野に広く使用されている。代表的なものとしては ELISA が挙げられる。しかし、検査に時間を要する、感度が低い、検査工程が複雑などの問題点があり、性能改善が望まれている。

そこで近年注目を集めているのが、磁気を発するマーカー(磁気マーカー)を用いた磁気的手法である。我々は、センサに超高感度磁気センサである SQUID を使用することで検査の高感度化を、液相サンプルの測定法の開発により検査の高速化を実現した。

磁気的手法の優位点としては、前述の高速・高感度な測定が可能である点以外に、ダイナミックレンジが広い、光を透過しない試料の測定が可能という点がある。例えば、全血での検査では光が透過しないため、光学的な検査では測定が不可能だが、磁気的な検査は可能である。なお、血中には磁性体であるヘモグロビンが含まれるが、ヘモグロビンと磁気マーカーの磁性の違いを利用すれば、磁気マ-

ーカーからの磁気信号のみを検出することができる。

2. 磁気マーカーについて

磁気マーカーは Fig. 1 に示すように磁性ナノ粒子を高分子ポリマーで被い、その表面に検査試薬(免疫検査では抗体)を結合したもので構成されている。この磁気マーカーのバイオ分野への応用が注目を集めており、ハイパーサーミア(温熱療法)、ドラッグデリバリー(薬剤輸送)、磁気イメージングなど多岐にわたる研究が行われている。なお、磁気マーカーはその粒子の大きさによって様々な磁気特性を示すため、応用に依じて磁気マーカーを最適化する必要がある。

我々が免疫検査に用いている磁気マーカーでは、磁性ナノ粒子は直径が 20~25 nm の Fe_3O_4 であり、マーカー全体の直径はおよそ 100 nm である。免疫検査での使用に適している磁気マーカーというのは、1つのマーカーから出る信号が大きく、凝集が起こりにくく、加工が容易である(試薬を取り付けやすいなど)ものである。この様な条件を満たす磁気マーカーの選定も現在取り組んでいる課題の1つである。

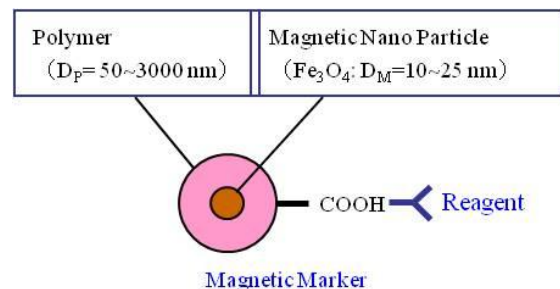


Fig. 1 Schematic figure of magnetic marker.

* 電気電子工学専攻修士課程

** 電気システム工学部門

3. 液相免疫検査法

従来の検査法（光学的手法）は検査，特に試料作製に長い時間を要していた．その作製工程を以下に示す．

1. 一次抗体（固定用抗体）を基板に固定する．
2. 基板に固定されていない余分な抗体を洗い流す．
3. 抗原を投入し抗体と結合させる．
4. 結合していない抗原を洗い流す．
5. 二次抗体（検出用抗体）を投入し抗原と結合させる．
6. 結合していない抗体を洗い流す．
7. 乾燥させる．

上記の工程中には複数回の洗い工程が存在し，それが試料作製の長時間化の原因であった．免疫検査では疾病等の早期発見の観点から，検査の高速化が強く求められている．

そこで我々が開発したのが，洗い工程を省略した液相試料の免疫検査法である．この方法では，**Fig. 2** に示すように抗原を含む溶液と抗体（マーカー）を含む溶液を混合するだけで測定試料が完成するため，非常に迅速に測定が行える．しかし，ここでは抗原に対しマーカーは十分多く投入されているため，抗原と結合したマーカー（結合マーカー）と，結合していないマーカー（未結合マーカー）が混在しており，それぞれから磁気信号が発生する．免疫検査では抗原の量を測定するため，結合マーカーからの磁気信号のみを検出する必要がある．

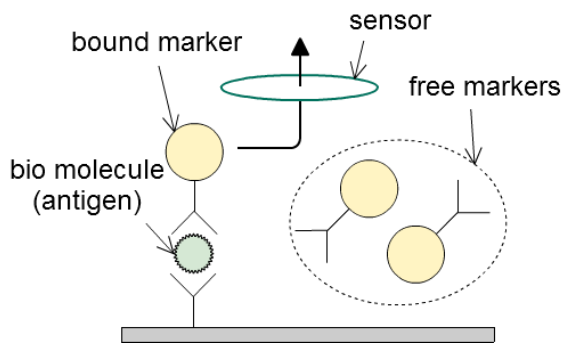


Fig. 2 Schematic figure of liquid phase immunoassay using magnetic markers.

そこで液中の粒子は直径が大きいものほど遅く，小さいものほど早く回転するというブラウン回転運動を利用した．

Fig. 3 にブラウン回転を利用した測定方法の模式図を示す．測定試料は円盤状プレートのくぼみに入れられ，永久磁石により磁化される．同図に示すように磁気マーカーを含む溶液に外部磁界を印加すると，結合マーカーと未結合マーカーの全ての磁気モーメントの向きが外部磁界の向きに揃う．その後，プレートを回転させて外部磁界をゼロにすると，ブラウン回転運動により溶液中のマーカーが回転を始める．この回転により，磁気モーメントの向きがランダム

になるため，マーカーからの磁気信号は時間とともに減衰していき，最終的にはゼロとなる．このようにブラウン回転により磁気信号が減衰していくことをブラウン緩和といい，緩和するまでの時間をブラウン緩和時間 τ_B という．定式は次に示す．

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

ここで， d は粒子の直径， η は溶液の粘度， k_B はボルツマン定数， T は絶対温度である．

我々の測定法では抗原は比較的粒子径の大きなポリマービーズ（3.3 μm ，6.7 μm ）に固定されており，この抗原と結合したマーカーは大きな粒子として振る舞う．一方，未結合マーカーの直径はおよそ 100 nm で結合マーカーと比較して十分小さい．このため，(1)式から結合マーカーの緩和時間は約 0.35 msec，未結合マーカーの緩和時間は約 100 sec となり，両者に大きな差が生じることになる．

したがって，プレートが半回転する間に未結合マーカーからの信号がゼロ，結合マーカーからの信号が残るようにプレートの回転速度を調整すれば，結合マーカーからの信号のみを SQUID センサで検出できることになる．

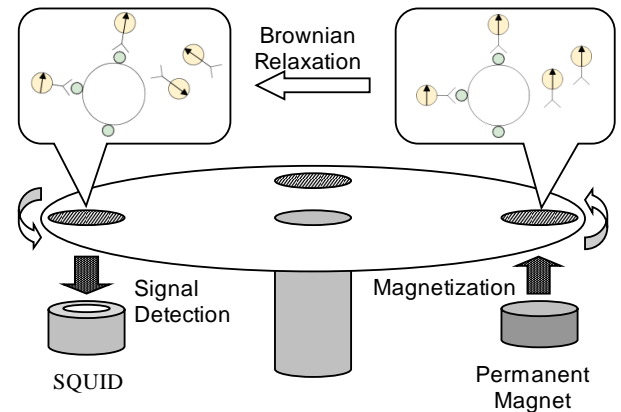


Fig. 3 Measurement principle for liquid phase immunoassay using Brownian relaxation of magnetic markers.

4. 新しい磁界印加法

Fig. 4 に乾燥させた 2 種類の磁気マーカーからの信号と印加磁界との関係を，**Table 1** に各磁気マーカーの諸元をそれぞれ示す．同図に示すように磁気マーカーから十分大きな信号を得るためには，ある程度大きな外部磁界を印加する必要がある．過去の実験では，我々は測定試料の入ったプレートを回転させ，永久磁石により強い磁界を印加しながら測定を行っていた．しかし，強い磁界を長時間印加し続けることで未結合マーカーの凝集を引き起こしてしまい，それが雑音増加の原因となっていた．

この問題を解決するため，新しい磁界の印加方法を開発した．まず，比較的強い磁界（ $B_{ex}=60\sim 100$ mT）で試料を励

起した後、測定中は弱めの磁界 ($B_{ex}=10\sim 20$ mT) でプレート一回転中に減衰した分の磁気モーメントを補償しながら測定を行うという方法である。この方法により、試料へ強い磁界をかける時間は短く済むため、未結合マーカー同士の凝集を防ぐことができる。

液相試料にまず 60 mT の磁界を印加した後に、磁石を 16 mT のものに交換して測定する実験を行った。Fig. 5 に示すように、60 mT の磁石を外すと信号の減衰が始まるが、16 mT の磁石を入れると信号はもとのレベルまで復帰する。この実験により、磁気マーカーはヒステリシスを持つことと、新たな磁界の印加法が免疫検査に利用可能であることが確認された。

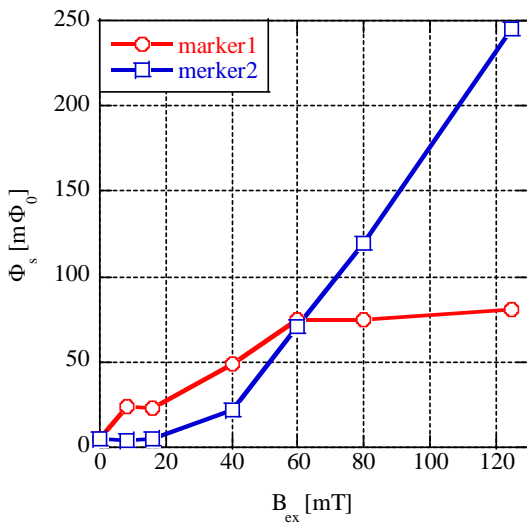


Fig. 4 Relationship between applied field B_{ex} and magnetic signal Φ_s from dried magnetic markers.

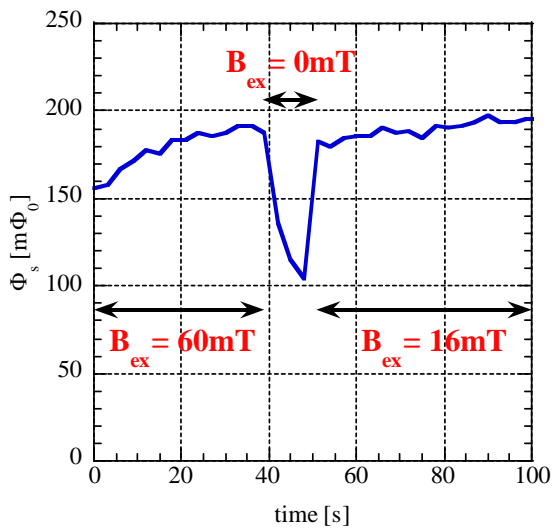


Fig. 5 Response of magnetic marker when the applied field was changed from 60 mT to 16 mT.

Table 1 Specification of two type magnetic markers.

	marker1	marker2
Magnetic nanoparticle	Fe_3O_4	Fe_3O_4
Diameter of magnetic nanoparticle	20~25 nm	50 nm
Average diameter of magnetic marker	110 nm	50 nm

5. 免疫検査測定

測定対象の抗原としてビオチンが固定されたポリマービーズの検出実験を行った。ビオチンと特異的に結合するアビジンを抗体としてマーカーに固定してある。ここでは、ポリマービーズの個数 N_p と検出された磁気信号 Φ_s を比較する。この実験ではより少ないビオチンの検出と、抗原数と検出信号の線形的な関係性が望まれる。

5.1 新しい磁界印加法の検証

従来の磁界印加法(強い磁界を励起しながら測定を行う)と、新しい磁界印加法(強い磁界で短時間マーカーを励起した後、弱い磁界をかけながら測定を行う)の2種類の方法で実験を行い比較した。従来の印加法では 60 mT を、新しい印加法では強い磁界に 60 mT と弱い磁界に 16 mT の磁石を使用した。

結果を Fig. 6 に示す。同図より、従来の方法と新しい方法で結果にほぼ違いがないことがわかる。この結果から、測定前に磁気マーカーを 60 mT で一度励起すれば、測定中は 16 mT という低い磁界に変えても従来の方法と変わらない結果が得られることがわかった。

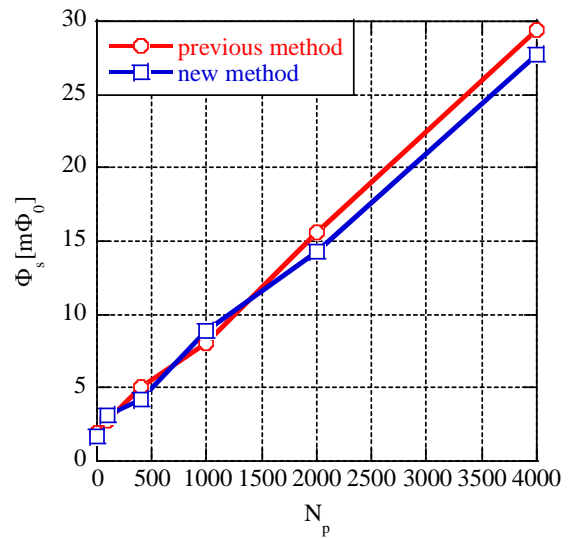


Fig.6 Comparison between previous and new methods for applying excitation field.

5.2 磁気マーカーの濃度依存性

測定に用いる試料に含まれる磁気マーカー（酸化鉄： Fe_3O_4 ）の濃度を変えて測定を行った。比較したのは酸化鉄の濃度が $1.69 \mu\text{g}/\text{well}$ と、 $5.06 \mu\text{g}/\text{well}$ の2種類の資料である。1 well には $35 \mu\text{l}$ の試料が入っている。Fig. 7 に測定結果を示す。同図より、マーカー濃度が変わっても検出信号はほぼ変わらないことがわかる。

これに対して、 $N_p=0$ の場合の未結合マーカーからの雑音に大きな違いがみられた。Fig. 8 にポリマー数 $N_p=0$ の場合の信号（オフセット）と $N_p=4000$ の場合の信号を比較した結果を示す。 $N_p=4000$ の場合の信号は磁気マーカーの濃度に関わらずほぼ一定であったが、オフセットは濃度が濃い試料の方が大きくなった。また、一度測定した試料を20分間放置した後、再度測定した時の結果も Fig. 8（右）に示す。20分後、どちらの濃度の場合でもオフセットが増加したが、特に濃度が濃い試料の方が大きく増加した。この結果から、より少ない抗原の検出のためには、磁気マーカーの濃度を薄くすることが有用であると考えられる。

時間経過により信号が増加する原因として、一度励磁されたことによる未結合マーカー同士の凝集（ $N_p=0$ の信号増加）や、結合マーカーと未結合マーカーの凝集（ $N_p=4000$ の信号増加）が生じたのではないかと考えられる。ビオチンとアビジンの結合反応は非常に素早く行われるということから、放置された20分間にさらに結合反応が進んだということは考えにくい。

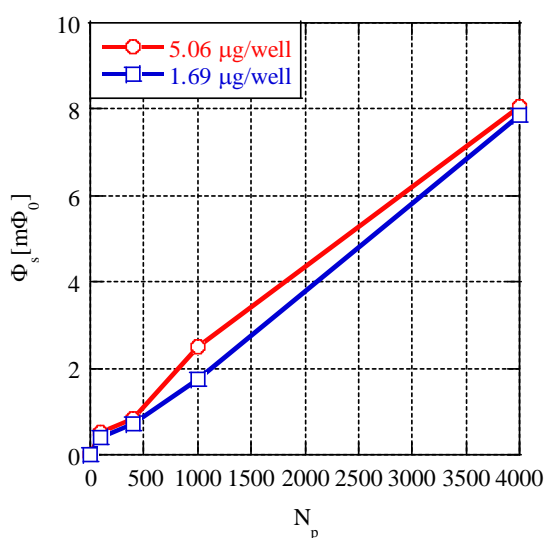


Fig. 7 Relationship between numbers of biotin-conjugated polymer beads and detection signal. The results are shown when the concentration of magnetic marker was changed.

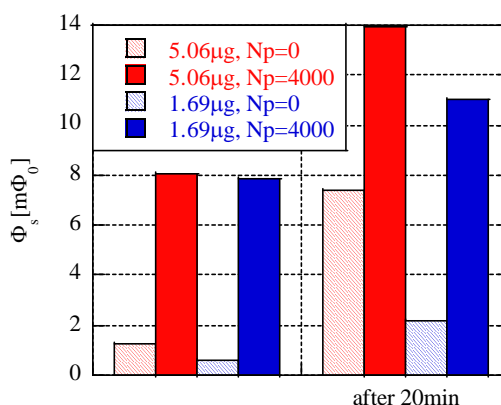


Fig. 8 Comparison between the signal from high and low concentration samples.

5.3 2種のマーカーを用いた測定

磁気的免疫検査を行う上で、使用する磁気マーカーの選定は非常に重要なことである。そこで、2種類の磁気マーカーを用いた免疫検査実験の測定結果を Fig. 9 に示す。marker1, marker2 は4節で述べたものと同様である。同図より、2種類の磁気マーカーを用いた実験結果は marker1 の場合の方が若干検出信号は大きかったが、大きな差は見られなかった。この差はマーカーに使用されている磁気微粒子の形状や大きさで決まる磁気特性の違いや、1つのマーカーあたりに固定されている抗体（アビジン）の数などによって生じると考えられる。

また、 $N_p=0$ の場合の信号と $N_p=4000$ の場合の信号を比較した図を Fig. 10 に示す。marker1 はオフセットの信号、 $N_p=4000$ の信号とともに増加しているのに対し、marker2 はどちらもほぼ変化していない。これらの結果より、免疫検査実験には marker2 の方が適しているように考えられる。

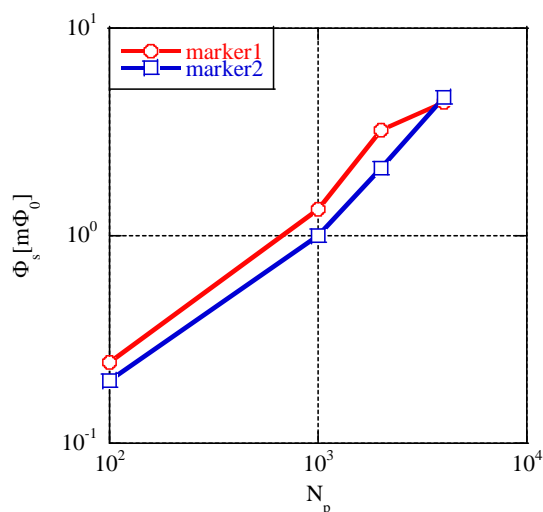


Fig. 9 Result of immunoassay measurement with two types of magnetic marker.

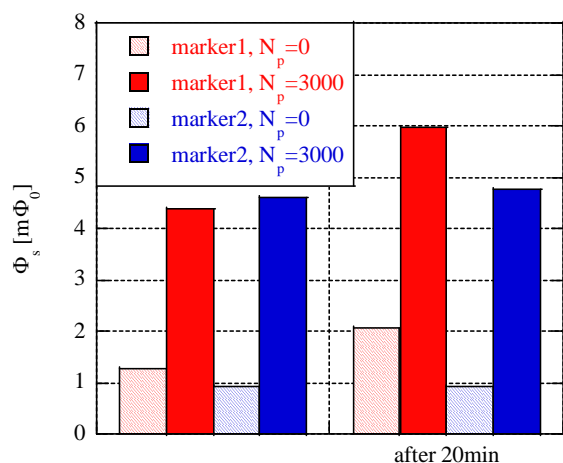


Fig. 10 Comparison between offset signal and the signal of $N_p=4000$ sample for two types of magnetic marker.

5.4 ビオチンの検出限界

Fig. 11 に $3.3 \mu\text{m}$ と $6.7 \mu\text{m}$ のポリマービーズを使用した免疫検査実験の測定結果を示す. この結果から, $3.3 \mu\text{m}$ で 100 個, $6.7 \mu\text{m}$ で 50 個のビーズの検出に成功したことがわかる. $3.3 \mu\text{m}$ のビーズには 1000~2000 個, $6.7 \mu\text{m}$ のビーズには 3000~5000 個の抗原 (ビオチン) が固定されている. つまり, 我々の測定で $3.3 \mu\text{m}$ のポリマービーズを用いた場合には $1 \sim 2 \times 10^5$ 個, $6.7 \mu\text{m}$ の場合では $1.5 \sim 2.5 \times 10^5$ 個のビオチンを検出することができたと言える. モル濃度に換算すると, $4.7 \sim 11.9 \text{ fM}$ ($M = \text{mol/l}$) を達成した. これは光学的な検査法と比較しても十分高感度であると言える. また, 抗原数と検出された磁気信号の大きさの線形性もよく取れている.

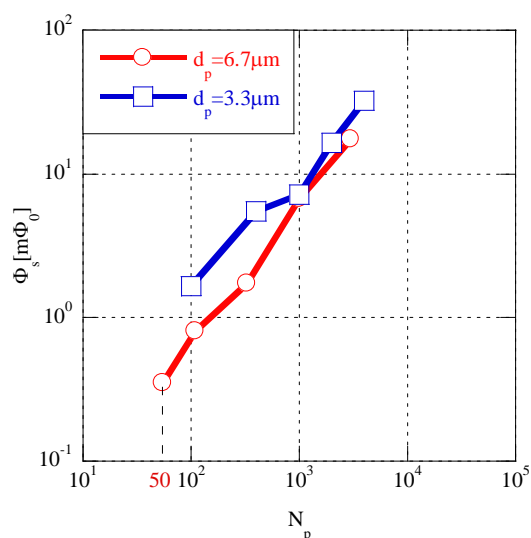


Fig. 11 Detection limit by using $3.3 \mu\text{m}$ and $6.7 \mu\text{m}$ polymer beads.

6 まとめ

磁気的な液相免疫検査法を高感度化するためには, 磁気マーカーの凝集により発生する雑音を低減することが重要である. 磁気マーカーの凝集の発生原因が測定中の印加磁界が強すぎることでありと考へ, 磁気マーカーの励起のために測定前に短時間強い磁界を印加し, 測定中は弱い磁界で磁気マーカー内の磁気モーメントの向きを校正するという新たな磁界印加法を開発した. 強い磁界をかけながら行った測定結果と, 測定中は弱い磁界をかけた結果がほぼ変わらなかったことから, 新しい磁界の印加方法はマーカーの凝集による雑音を防ぎながら, 従来の測定法と同等の磁気信号が得られることが確認された.

また, 測定試料中の磁気マーカーの濃度を変えて行った実験で, 磁気マーカー濃度が低い方がオフセットの信号が出にくいことから, より少ない数の抗原を測定するためには試料中の磁気マーカー濃度は低くしたほうがよいことがわかった.

このシステムによるビオチンの検出限界はモル濃度換算でおよそ $4.7 \sim 11.9 \text{ fM}$ となった. これは従来の光学的な免疫検査法と比較して十分高感度であると言える.

参考文献

- 1) K. Enpuku et al, Liquid-Phase Detection of Biological Targets with Magnetic Marker and Superconducting Quantum Interference Device, IEICE TRANS. ELECTRON, vol.E92-C, no.3, pp. 315-322, March 2009.
- 2) I. Koh et al, Magnetic Nanoparticle Sensors, Sensors, vol.9, pp.8130-8145, 2009.
- 3) C. R. Tamanaha et al, Magnetic labeling, detection, and system integration, Biosensors and Bioelectronics, vol.24, pp.1-13, 2008.
- 4) C. Sun et al, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, vol.60, pp.1252-1265, 2008.
- 5) M. Suto et al, Heat dissipation mechanism of magnetic nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, vol.321, pp.1493-1496.
- 6) D. Eberbeck et al, Quantification of specific bindings of biomolecules by magnetorelaxometry, Journal of Nanobiotechnology, vol.6, no.4, 2008.