

MRセンサを用いた液相免疫検査法の高感度化

野口, 晃平

九州大学大学院システム情報科学府電気電子工学専攻 : 修士課程

吉田, 敬

九州大学大学院システム情報科学研究院電気システム工学 : 准教授

圓福, 敬二

九州大学大学院システム情報科学研究院電気システム工学 : 教授

<https://doi.org/10.15017/1660366>

出版情報 : 九州大学大学院システム情報科学紀要. 21 (1), pp.1-6, 2016-01-28. 九州大学大学院システム情報科学研究院

バージョン :

権利関係 :

MR センサを用いた液相免疫検査法の高感度化

野口晃平*・吉田敬**・圓福敬二**

Highly Sensitive Liquid-Phase Immunoassay Using Magneto-Resistive Sensor

Kohei NOGUCHI*, Takashi YOSHIDA** and Keiji ENPUKU**

(Received December 24, 2015)

Abstract: We have been developing a magnetic immunoassay method using magnetic markers and magneto-resistive (MR) sensor for liquid-phase detection of biological targets. In this method, bound and unbound (free) markers can be magnetically differentiated by using the difference in their Brownian relaxation times. In order to improve the detection sensitivity, we developed two methods. First, we clarified how the signals from the bound and free markers are affected by the concentration of the magnetic markers. We found the most suitable concentration was 25 $\mu\text{g/mL}$. Next, we developed dispersion process after applying the excitation field. With this dispersion process, we can dissolve agglomerate of the free markers caused by the excitation field. As a result, blank signal from the free markers can be much decreased. Using the developed methods, we performed the liquid-phase detection of biotins. The minimum detection number of biotins was as low as $N_{B,\min} = 1.3 \times 10^5$ existing in 60 μL sample solution. The molecular number concentration was 3.6×10^{-18} mol/ml, indicating high sensitivity of the present method.

Keywords: Magnetic marker, Immunoassay, MR sensor, Brownian relaxation, Dispersion process

1. はじめに

磁気ナノ粒子とは、強磁性体をナノメートルサイズの粒子状に分割したものであり、その磁気特性を用いて医療分野への応用が期待されている。これらの応用では、磁気ナノ粒子はポリマーで被覆されその表面に抗体が付着されており、磁気マーカーとも呼ばれている。磁気ナノ粒子の応用例としては、磁気粒子イメージング、ハイパーサーミア、ドラッグデリバリーなどがあるが、本研究では磁気的免疫検査法を扱っている。免疫検査とは、病原菌や環境有害物質の種類や量を測定する検査法であり血液検査や水質調査など多くの検査分野で用いられている。

現在用いられている主流な免疫検査法としては、光を発するマーカー(光学マーカー)を用いた光学的な手法があり、代表的なものとして ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)¹⁾が挙げられる。この手法では、抗原と結合しなかった未結合マーカーを取り除くために数回の洗い工程が必要である。また、試料を乾燥させて測定を行うため、乾燥工程が必要である。この数回の洗い工程と乾燥工程に多くの時間と手間がかかるといった問題点があった。

そこで近年注目を集めているのが、磁気信号を発するマーカー(磁気マーカー)を用いた磁気的な手法²⁻¹⁴⁾である。この手法では、液相試料中にある磁気マーカーからの磁気信号を磁気センサで測定することによって抗原の検出を行っている。この磁気的手法では、抗原と結合したマーカー(結合マーカー)と抗原と結合しなかったマーカー(未結合マ-

カー)とのブラウン緩和時間の差を利用することにより、両者を磁気的に識別することが可能であり、時間と手間のかかる洗い工程と乾燥工程を省くことが出来る。これにより、検査時間の短縮とシンプルな検査工程が可能になる。

我々はこれまで、磁気マーカーと磁気抵抗(Magneto-Resistive: MR)センサを使用した液相での免疫検査法を開発してきた¹⁰⁾。本研究では、本手法を高感度化するため、検査手法の改善と最適化を行った。最初に、様々な磁気マーカーの濃度で検査実験を行い、結合マーカーからの信号と未結合マーカーからの信号(ブランクシグナル)のマーカー濃度依存性を明らかにした。この結果を基に、マーカー濃度の最適化を行った。次に、磁気マーカーを強い磁界(励起磁界)で磁化した際に発生する磁気マーカーの凝集を低減する手法を開発した。すなわち、マーカー同士の凝集を分散させるための分散処理法を開発した。この方法を用いることにより、これまで問題であった未結合マーカーの凝集^{5,7)}を大幅に低減できることを示した。最後に、本手法を用いてビオチンの検出実験を行い、 1.3×10^5 個/60 μL の検出感度を得た。

2. 液相磁気免疫検査法

本章では液相磁気免疫検査法で用いられるブラウン磁気緩和と測定法について説明する。本測定法で用いられる結合マーカーと未結合マーカーの模式図を Fig.1 に示す。この検査方法では、溶液中における磁気的性質(ブラウン磁気緩和)を用いる事で、測定時に結合マーカーと未結合マーカーを磁気的に識別することが可能となる。このため、結合マーカーと未結合マーカーの分離のために必要だった洗い工程を省略することが可能になり、迅速かつシンプルな免疫検査法が実現できる。

平成 27 年 12 月 24 日受付

* 電気電子工学専攻修士課程

** 電気システム工学部門

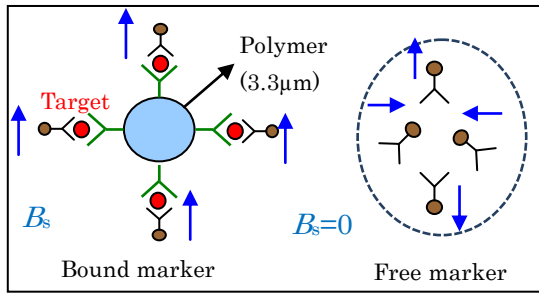


Fig. 1 Principle of liquid-phase detection. Bound and free markers are magnetically distinguished by using the difference in their Brownian relaxation times.

2.1 ブラウン磁気緩和

溶液中の磁気ナノ粒子に外部磁界を印加すると、磁気モーメントの向きが磁界の方向に揃う。その後外部磁界の印加を絶つと、粒子は不規則な回転運動(ブラウン回転運動)を行う。その結果、磁気緩和が発生し、緩和を終えると磁化のモーメントの和がゼロとなる。この緩和が終わる時間(ブラウン緩和時間)は、粒子の直径が大きいものほど遅く、小さいものほど速いという特性がある。

ブラウン緩和時間 τ_B は、次式で与えられる。

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

ここで、 η : 溶液粘度、 V : 粒子の体積、 k_B : ボルツマ定数、 T : 絶対温度、 d : 粒子直径である。

本研究ではサンプル抗原としてビオチンを用いている。ビオチンは、粒子直径が約 $3.3 \mu\text{m}$ の大きなポリマービーズに固定されているものを使用している(Spherotech 社製 TP30)。また、磁気マーカーはポリマーコーティングされた磁気ナノ粒子に抗体としてストレプトアビジンが付加されたものを使用しており、粒子直径は 200 nm である(多摩川精機製 FGbeads)。

従って、未結合マーカーの粒子径 (200 nm) を (1) 式に代入すると、未結合マーカーのブラウン緩和時間 $\tau_{B,F}$ は $\tau_{B,F} = 3.8 \text{ msec}$ となる。一方、結合マーカーのブラウン緩和時間 $\tau_{B,B}$ はポリマービーズの粒子径 ($3.3 \mu\text{m}$) で決まり、 $\tau_{B,B} = 13 \text{ sec}$ となる¹⁴⁾。これにより、結合マーカーの緩和時間は、未結合マーカーの緩和時間より十分大きいことになる。

本方法では、測定試料を磁化してから 3.0 s 後に試料からの磁気信号をセンサで測定している。この時間は未結合マーカーのブラウン緩和時間 ($\tau_{B,F} = 3.8 \text{ msec}$) に比べて充

分長いいため、未結合マーカーからの信号は測定時にはゼロとなる。一方、結合マーカーの緩和時間 ($\tau_{B,B} = 13 \text{ sec}$) は長いので、測定時には信号が保持されている。このため、結合マーカーからの磁気信号のみを検出出来ることになる。これにより、液相での免疫検査が可能になり、洗い工程と乾燥工程を省く事ができる。

2.2 液相磁気免疫検査法

液相での磁気免疫検査の模式図を **Fig. 2** に示す。始めに試料作製として、ビオチンが固定されたポリマー溶液と、磁気マーカー溶液を混合し、 $B_{re} = 1.5 \text{ mT}$ の磁場中で 60 分間だけ抗原抗体反応させる。その後、抗原抗体反応させた測定試料 $60 \mu\text{L}$ を円盤状プレート上の直径 5 mm の反応ウェルに入れる。

試料を磁化させるために、**Fig. 2** に示す様に、(i) 励起磁界 B_{mag} と(ii) 測定磁界 B_{mea} の 2 段階で外部磁界を印加している⁵⁾。

(i) 励起磁界

$B_{mag} = 40 \text{ mT}$ の強い永久磁石を用いて、 k_{mag} 回だけプレートを回転させて磁気マーカーを磁化させる。1 回当たりの磁化時間は約 0.2 sec である。この強い励起磁界によりそれぞれの磁気マーカー内部の磁気モーメント m の向きは励起磁界の向きに揃う。

(ii) 測定段階

次に $B_{mea} = 1 \text{ mT}$ の弱い永久磁石を用いて測定を行う。測定試料が磁石の上にある場合には、 $B_{mea} = 1 \text{ mT}$ で試料が磁気励起され、それぞれの磁気マーカーの磁気モーメント m の向きが揃う。この時、(i) 段階とは違い、ブラウン回転によりそれぞれのマーカー自身が回転することにより磁気モーメント m が揃う。この測定磁界を用いて 72 回加算平均を行い測定している。

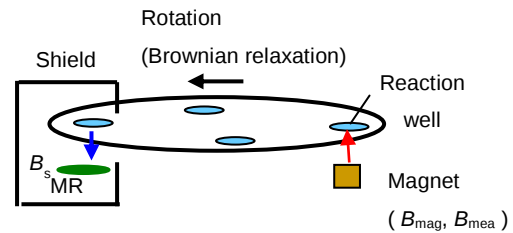


Fig. 2 Measurement procedure. Magnetization field $B_{mag} = 40 \text{ mT}$ is used to magnetize the sample, while measurement field $B_{mea} = 1 \text{ mT}$ is used for the measurement.

Fig. 2 に示している通り、測定磁界を印加して 3 秒後に MR センサの真上をサンプルが通る。3 秒後には未結合マーカーはブラウン緩和を終えているので、結合マーカーの

信号のみを MR センサで測定することにより、検出対象の有無や量を調べている。なお、プレートを 36 回転させた後に測定磁界の方向を正負逆にし、計 72 回分の加算平均を取っている。これにより雑音低減を図っている。

3. 磁気マーカーの濃度の最適化

本章では、使用する磁気マーカーの濃度の最適化について説明する。磁気マーカーの濃度が高ければ高いほど抗原・抗体の結合反応は早くなり、結合マーカーからの信号は増加する。しかしながら、未結合マーカー同士の凝集も多くなり、本来信号が出ないはずの未結合マーカーからの信号（ブランクシグナル）が増大してしまう。そこで様々な濃度の磁気マーカーを用いることによって、結合マーカーからの信号とブランクシグナルの信号の違いを検証し、最適な濃度値を決定した。

3.1 結合信号の濃度依存性

結合マーカーからの信号の濃度依存性を Fig. 3 に示す。実験では、試料溶液に投入する磁気マーカーの濃度を、8.3 $\mu\text{g/mL}$ から 166.6 $\mu\text{g/mL}$ まで変化させた場合の結合信号を測定した。なお、抗原抗体反応の時間を $B_e = 1.5 \text{ mT}$ の磁場中で 60 min に固定した。また、ビオチンが固定されたポリマーの数は、3000 個/60 μL に固定して実験を行った。

図に示すように、結合信号はマーカー濃度と共に増加し、83.3 $\mu\text{g/mL}$ 以降は飽和していることが分かる。濃度を上げるにつれて信号が増加しているのは、濃度が高くなるにつれて抗原と抗体の反応が進んでいるためである。

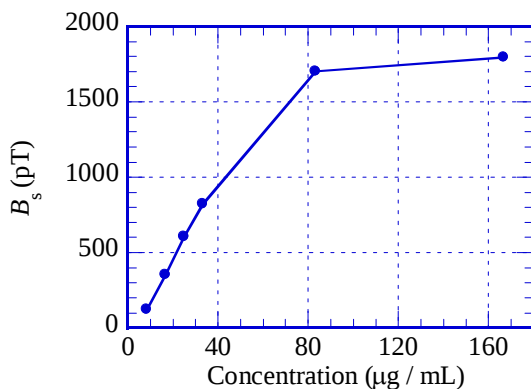


Fig. 3 Dependence of the bound signal on the concentration of the markers.

3.2 ブランクシグナルの濃度依存性

次に、未結合マーカーからの信号について説明する。磁場中での抗原抗体反応中に未結合マーカーの凝集が進行し、

凝集体が形成される。この凝集体は粒子直径が大きくなりブラウン緩和時間が長くなる。したがって未結合マーカーの凝集体は磁気緩和をせずに信号が生じてしまう。このブランクシグナルのマーカー濃度の依存性を調べるために、上記の結合信号の場合と同様に、マーカー濃度を 8.3 $\mu\text{g/mL}$ から 166.6 $\mu\text{g/mL}$ まで変化させた場合のブランクシグナルを測定した。

ブランクシグナルの濃度依存性を Fig. 4 に示す。実験では抗原抗体反応時間を $B_e = 1.5 \text{ mT}$ の磁場中で 60 min に固定した。図に示すように、未結合マーカーからの信号は濃度 33.3 $\mu\text{g/mL}$ 以降で大幅に増加し、マーカー濃度の 2 乗に比例している事が分かった。濃度が高くなるにつれてマーカー同士の凝集が進んでいるためである。

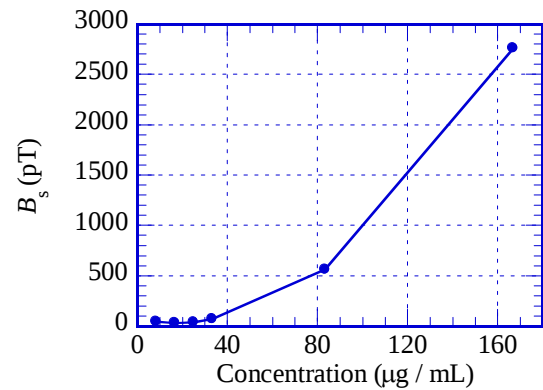


Fig. 4 Dependence of the blank signal on the concentration of the markers.

3.3 免疫検査感度の濃度依存性

免疫検査の感度を表す式として、感度指標 *Ratio* を次式のように結合信号とブランクシグナルの比と定義している。

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Bound signal}}{\text{Blank signal}} = \frac{\text{polymer}(N_p) - \text{polymer}(0)}{\text{polymer}(0)} \quad (2)$$

$\text{polymer}(N_p)$ はポリマー数 N_p の時の信号、 $\text{polymer}(0)$ はポリマー数 0 個の時のセンサでの検出信号を表す。

免疫検査において、より少ない検出対象物を識別するためにはこの(2)式の *Ratio* を大きくすることが重要である。免疫検査での *Ratio* の濃度依存性を Fig. 5 に示す。グラフに示すように、マーカー濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ が最適であることが分かる。この濃度より低い場合は抗原抗体反応が十分ではなく、高い場合は未結合マーカーの凝集が支配的になっていると考えられる。

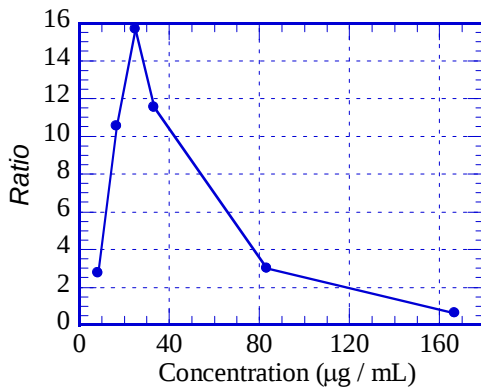


Fig. 5 Relationship between *Ratio* and concentration of the markers.

4. 励起磁界印加後の分散処理

本章では、磁気マーカーを励起磁界 B_{mag} で磁化した後に、分散処理を行うことにより磁気マーカー同士の凝集を再分散させる手法について説明する。分散処理によって未結合マーカーの凝集が分散される様子を Fig. 6 に示す。これにより、未結合マーカーからのブランクシグナルの減少に繋がり、感度指標 *Ratio* が大きく改善されることが期待できる。始めに、励起磁界の印加回数を増やした時に、分散処理を行った場合と行わなかった場合について比較する。次に、両者の条件において免疫検査を行い比較する。

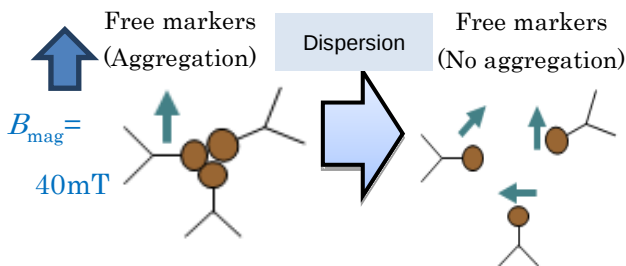


Fig. 6 Dispersion process in order to dissolve the agglomerate caused by the excitation field B_{mag} .

4.1 分散処理有無によるブランク信号と結合信号の変化

磁気マーカーを磁化させるための励起磁界 ($B_{\text{mag}} = 40 \text{ mT}$) の印加回数を $k_{\text{mag}} = 0, 1, 5$ 回と増やしていった時に、分散処理した場合としない場合で磁気マーカーからの信号がどのように変化するかを調べた。結果を Fig. 7 に示す。(a)がブランクシグナル、(b)がポリマーが $N_p = 3000$ 個時の結合信号を表す。

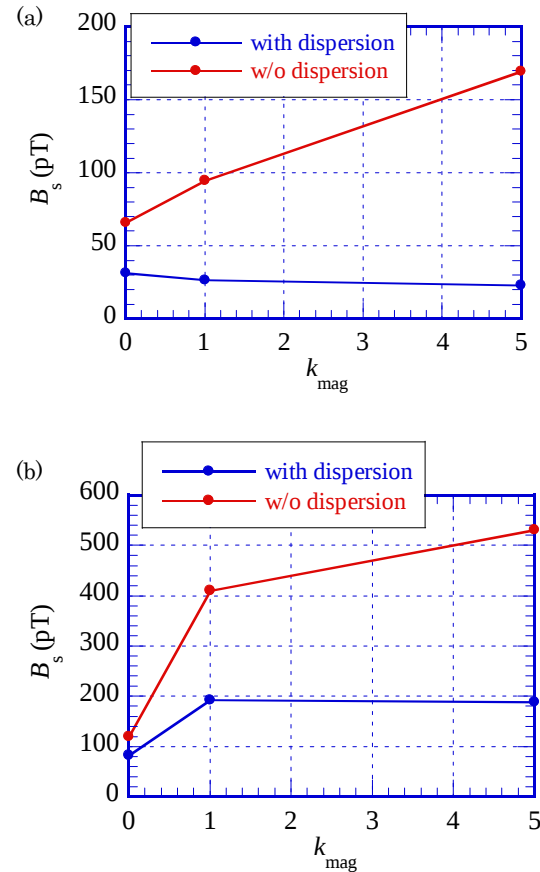


Fig. 7 Relationship between the number of magnetization k_{mag} and the signal. (a) Blank signal at $N_p = 0$, and (b) bound signal at $N_p = 3000$.

実験では $B_{\text{re}} = 1.5 \text{ mT}$ の磁場中で 60 分間反応させた。Fig. 7(a) に示す様に、励起磁界を印加した後に分散処理を行わない場合には、印加回数 k_{mag} が増える毎にブランクシグナルが増加していく。これは印加回数 k_{mag} とともにマーカー同士の凝集が進行したためである。これに対して分散処理を行った場合には、印加回数 k_{mag} を増やしてもブランクシグナルは変化しない。このことは、励起磁界によって生じた凝集を分散処理で再分散させる事が出来ていることを示している。

また、Fig. 7(b) に示す様に、結合信号においても励起磁界を 1 回印加することによって信号を増幅する事が出来ている。分散処理無しの場合に比べて信号が低下しているが、結合マーカーに凝集した未結合マーカーを再分散させることが出来たためだと言える。

4.2 免疫検査の信号の比較

分散処理を行った場合と行わなかった従来の場合について、免疫検査を行った時の信号を Fig. 8 に示す。実験では

$B_e = 1.5\text{mT}$ の磁場中で 60 分間反応させた。どちらの場合も $B_{\text{mag}} = 40\text{ mT}$ の励起磁界を $k_{\text{mag}} = 1$ 回印加している。図に示す様に、分散処理を行うことによって、ポリマー数が $N_p = 0$ 個の時のブランクシグナルを 2 倍以上低減出来ている。また、分散処理に依る結合信号の低下は少ない。このため、感度を表す *Ratio* も改善した。すなわち、 $N_p = 3000$ の時の *Ratio* が、分散処理無しの場合は 6.51 であったのに対し、分散処理を行うことにより 11.27 にまで改善することに成功した。

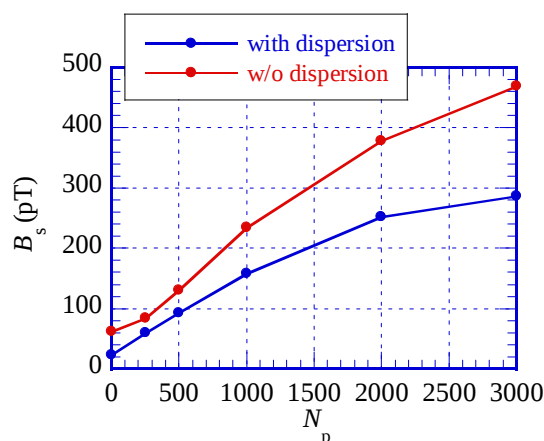


Fig. 8 Relationship between the detected signal and the number N_p of biotin coated polymer beads. Results obtained with and without dispersion process are shown.

5. 液相免疫検査実験

本章では今回導入を行った分散処理を用いた液相免疫検査法により、ビオチンの検出実験を行った。その結果を **Fig. 9** に示す。横軸は検出対象であるビオチンを固定化したポリマー数 N_p 、縦軸は MR センサで検出した信号磁界 B_s を表す。実験では反応磁場 ($B_e = 1.5\text{mT}$) 中で 60 分間抗原・抗体反応を行い、励起磁界 $B_{\text{mag}} = 40\text{ mT}$ を $k_{\text{mag}} = 1$ 回印加した。励起磁界印加後に分散処理を行った。磁気マーカーとして FGbeads を濃度 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ で使用した。

Fig. 9 に示す様に、ポリマー数 N_p が増加するにしたがって信号 B_s も比例的に増加しており、ビオチンが定量的に検出できていることが分かる。また従来の検出ではポリマー数 $N_p = 250$ 個/ $60\text{ }\mu\text{L}$ が検出限界であったが¹⁶⁾、分散処理を導入することによりポリマー数 $N_p = 100$ 個/ $60\text{ }\mu\text{L}$ まで検出可能になった。これをビオチンの数に直すと約 130,000 個まで検出可能であり、モル濃度は $3.6 \times 10^{-18}\text{ mol/mL}$ である。この結果は、洗浄工程を用いない液相検査で高感度な検出が可能であることを示している。

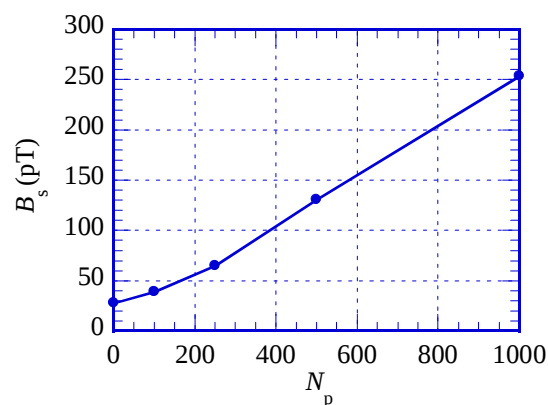


Fig. 9 Relationship between the detected signal and the number of biotin coated polymer beads N_p .

6. ま と め

MR センサを用いた液相での磁気免疫検査法の感度改善のための手法を開発した。まず使用する磁気マーカーの濃度依存性を調べた。結合信号とブランクシグナルをそれぞれの濃度ごとに測定し、を比較した。磁気マーカー濃度 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ が最適であることが分かった。

次に励起磁界を印加した後に分散処理を行い未結合マーカーの凝集を再分散させる方法を開発し、これによりブランクシグナルの低減を図った。分散処理によってブランクシグナルを半分以下に抑えることが出来た。また、検査感度を表す *Ratio* も 2 倍近く改善することが出来た。

最後に最適化した濃度と分散処理システムを用いて免疫検査を行った。従来の最小検出個数よりも 2 倍以上少ない 130,000 個のビオチンを検出することが出来、検出感度を向上させることに成功した。ただし、測定回数がまだ少ないためデータの標準偏差は明らかでない。今後は標準偏差を議論するとともにこれを小さくする手法を開発し、測定の信頼性を高める必要がある。

参 考 文 献

- 1) A. J. Cunningham: Introduction to Bioanalytical Sensors, First ed. John Wiley&Sons, Inc., 1988.
- 2) N. T. K. Thanh: MAGNETIC NANOPARTICLES From Fabrication to Clinical Applications, CRC Press, 2012, pp.243-276.
- 3) X. Zhang et al: Molecular sensing with magnetic nanoparticles using magnetic spectroscopy of nanoparticle Brownian motion, Biosensors and Bioelectronics 50(2013) pp.441-446.

- 4) J. B. Weaver et al: Measurement of magnetic nanoparticle relaxation time, Medical Physics 39 2765(2012) 3701775.
 - 5) K. Enpuku et al: Liquid-phase immunoassay utilizing binding reactions between magnetic markers and targets in the presence of a magnetic field, Applied Physics Express 7 097001(2014).
 - 6) S. Uchida et al: Highly Sensitive Liquid-Phase Detection of Biological Targets With Magnetic Markers and High Tc SQUID, Applied Superconductivity 24(2014)1600105.
 - 7) K. Enpuku et al: Fast Detection of Biological Targets With Magnetic Marker and SQUID, Applied Superconductivity 19(2009) pp.844-847.
 - 8) H. Kuma et al: Liquid phase immunoassays utilizing magnetic markers and SQUID magnetometer, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 48(2010) pp.1263-1269.
 - 9) Y. R. Chemla et al: Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay, PNAS 97(2000) pp.14268-14272.
 - 10) T. Hirata et al: Liquid-Phase Immunoassay Using Relaxation Measurement of Magnetic Markers, Research Reports on Information Science and Electrical Engineering of Kyushu University 18(2013) pp.1-6.
 - 11) R. S. Gaster et al: Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays, nature nanotechnology 6(2011) pp.314-320.
 - 12) J. Devkota et al: Detection of low-concentration superparamagnetic nanoparticles using an integrated radio frequency magnetic biosensor, Applied Physics 133 104701(2013).
 - 13) Y. Li et al: External-field-free magnetic biosensor, Applied Physics 104 122401(2014).
 - 14) K. Enpuku et al: to be published in IEEE Trans.Magn.
 - 15) D. F. He et al: An anisotropic magneto resistive sensor with set/reset field, review of scientific instruments 82 094703(2011).
 - 16) T. Sakakibara et al: Magnetic Liquid-Phase Immunoassay using Magneto-Resistive Sensor, Research Reports on Information Science and Electrical Engineering of Kyushu University 20(2015) pp.1-7.
- ~~~~~