九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

磁気マーカーを用いた液相でのバイオ物質検出

高藤，佳嗣
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

入江，康太
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部門 ： 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部門 ： 教授

https://doi.org/10.15017/1905194

出版情報：九州大学大学院システム情報科学紀要. 23 (1), pp.1-7, 2018-01-25. 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：

九州大学大学院
システム情報科学紀要
第 23 巻　第 1 号　平成 30 年 1 月

Research Reports on Information Science and
Electrical Engineering of Kyushu University
Vol.23, No.1, January 2018

磁気マーカーを用いた液相でのバイオ物質検出

高藤佳嗣*・入江康太*・吉田敬**・圓福敬二**

Liquid-Phase Detection of Biomaterial Using Magnetic Markers

Yoshitsugu TAKAFUJI*, Kohta IRIE*, Takashi YOSHIDA** and Keiji ENPUKU**

(Received November 17, 2017)

Abstract：We have been developing a liquid-phase immunoassay using magnetic markers and a superconducting quantum interference device (SQUID). In this method, bound and free markers are magnetically differentiated by using the Brownian relaxation of the free markers. Hence, the time consuming washing process that is needed in the conventional optical method for Bound/Free (B/F) separation can be eliminated. Using the method, we demonstrated a detection of C-reactive protein (CRP). We obtained good correlation between the detected signal flux and the concentration of CRP. The minimum detectable concentration was 1 pg/mL. Since the present sensitivity is limited by the blank signal caused by the aggregation of free markers, much improvement will be possible if this problem is solved.

Keywords: Magnetic marker, Liquid-Phase immunoassay, SQUID, Brownian relaxation, CRP

1. は　じ　め　に

近年，疾患由来の蛋白質（バイオマーカー）を利用した医療診断技術（バイオセンシング）が発展している．これらの蛋白質の検出は免疫検査と呼ばれる手法によって行われており，これらの蛋白質を検出する事により，様々な疾患の有無と程度が診断されている．

免疫検査では,測定対象である蛋白質等のバイオ物質(抗原と総称）に対し特異的に結合する検査試薬（抗体）が用いられる．両者の間の結合反応（抗原・抗体結合反応）を検出するため，抗体には信号を発するマーカーが標識されており，このマーカーからの信号を測定することにより免疫検査が行われる．現在，幅広く使用されている方法に，光を発するマーカーを用いた光学的手法がある．しかしこの方法では，抗原と結合していないマーカーを分離するための洗浄工程を必要とするため，手間と時間がかかるという問題点がある．そのため，迅速かつ簡便に検査ができる手法の開発が求められている．

近年，光学マーカーを磁気マーカーに置き換えた磁気的な免疫検査法が注目されている[1-6]．この磁気的手法では，ブラウン緩和という現象を用いることにより，抗原に結合したマーカー(Bound marker)と未結合マーカー(Free marker)を磁気的に識別できるという特長がある．この特長を用いれば,結合マーカーと未結合マーカーの分離（B/F 分離）のために従来必要とされていた洗浄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．

我々はこれまで，磁気マーカー抗体と SQUID 磁気センサを用いた，洗浄工程を用いない液相での免疫検査システムを開発してきた[7-9]．このシステムを用いて，バイオ物質としてビオチンを用いた検出実験をおこない，本手法の有効性を示してきた．今回，より応用に近いバイオ物質として CRP（C 反応性タンパク質）を用いて，液相での検出実験を行った．なお，CRP は体内で炎症反応や組織の破壊が起きているときに血中に現れる蛋白質であり，血液検査による疾患の検査に用いられている．最初に，様々な磁気マーカー濃度で検査実験を行い，マーカー濃度の最適化を行った．この結果を基にサンプルの滴下量の最適化や測定の際の回転速度の最適化を行い CRP の最小検出濃度として 1 pg/mL を達成した．これにより，洗浄工程を用いずに極微量な CRP の検出が可能であることを示した．

2. 磁気的液相免疫検査

本章では磁気的液相免疫検査で用いられる磁気マーカーとブラウン緩和，及び測定原理について説明する．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. 図に示す様にバイオ物質(target)は直径が約 3.3 μm のポリマービーズに固定化され, このターゲットに磁気マーカーが結合する．このマーカーを結合マーカー(Bound marker)と呼ぶ. 溶液中には未反応のマーカーも共存し, このマーカーを未結合マーカー(Free marker)と呼ぶ. 磁気的検査方法では，後述するように，溶液中における磁気的性質（ブラウン緩和）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．

2.1　磁気マーカーとブラウン緩和

本研究では，バイオ物質を磁気信号で検出する際に磁気マーカーを用いている．磁気マーカーとは，酸化鉄微粒子 Fe_3O_4 を高分子で被覆し，その表面に検査用抗体を結合させたものである．磁気マーカーには，様々な種類や特性が

平成 29 年 11 月 17 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

©Kyushu University

存在するが，我々は FG beads （多摩川精機製）を用いて実験を行っている．

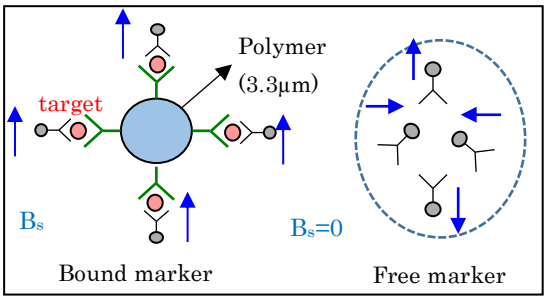


Fig. 1　Principle of liquid-phase immunoassay. Bound and free markers are magnetically distinguished by using the difference in their Brownian relaxation times.

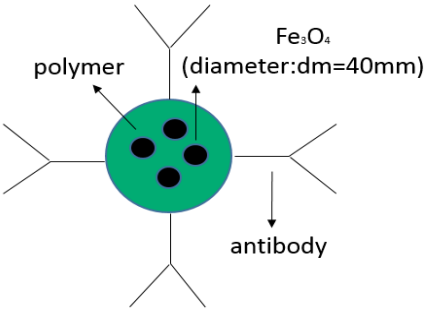


Fig. 2　Magnetic marker.

FG beads の概略図を **Fig. 2** に示す．この磁気マーカーは，酸化鉄微粒子をポリマーコーティングしている．本研究では，ターゲットとして CRP の検出を行っているため，ポリマー表面にはそれと特異的に結合する C2 抗体が付着している．また，磁気マーカーの平均粒子直径は 140 nm であり，これは後に述べる信号緩和現象においてブラウン緩和時間を決定する数値である．

溶液中の磁気マーカーは，外部から磁界を印加する事により，マーカー内の Fe_3O_4 のもつ磁気モーメントが外部磁界と同方向に向くように回転する．これによりマーカーが磁化され，検出可能な信号となる．その後，外部からの磁界を断つと，磁気モーメントの向く方向に強制力が無くなり，磁気マーカー全体がランダムな方向に回転する．この回転運動のことをブラウン回転運動という．

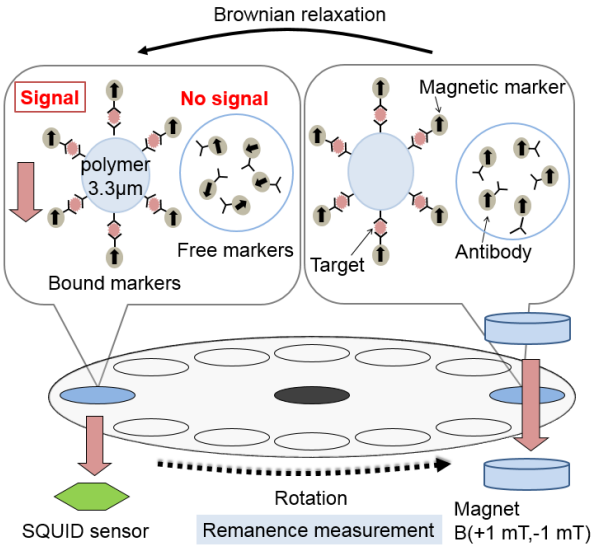
この現象が溶液内の複数の磁気マーカーで生じるため，個々にランダムな方向に向いた磁気モーメントの総和をゼロと見なすことができる．このブラウン運動による磁気信号の緩和をブラウン緩和といい，磁気信号の減衰の様子は次式で表される [10,11]．

$$M(\mathrm{t}) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_\mathrm{B}}\right) \qquad (1)$$

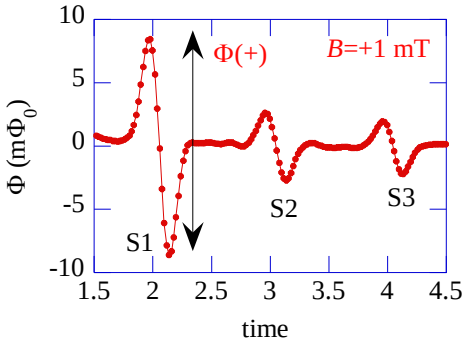
ここで τ_B はブラウン緩和時間と呼ばれ磁化飽和値より 1/e の大きさに減衰するまでの時間を表す．ブラウン緩和は，粒体の回転による信号緩和を意味しているため，ブラウン緩和時間は次式で表される．

$$\tau_\mathrm{B} = \frac{\pi \eta d_\mathrm{H}^3}{2 k_\mathrm{B} T} \qquad (2)$$

ここで η は溶液の粘度，d_H は粒子の直径，k_B はボルツマン定数，T は絶対温度である．この式から，ブラウン緩和時間は，磁気マーカーの粒子直径に強く依存する事が分かる．



(a)



(b)

Fig. 3　Liquid-phase immunoassay using magnetic markers. (a) Detection system using remanence measurement. (b) Waveform of the magnetic field detected by a SQUID sensor when the sample stage is rotated.

2.2　洗浄工程不要の測定法

磁気マーカーからの信号を測定する手法としては，磁化率測定，磁気緩和測定，及び残留磁気測定などが挙げられる．本研究では，磁気マーカーからの残留磁気信号を測定することで免疫検査を行っている．

©Kyushu University

Fig. 3 に本手法における測定システムの概要図を示す．最初に CRP 濃度の異なるサンプルを以下の手順で作成した．

①PBS に精製水, N101, tween を混ぜて PBST を作製．
②CRP(6.2 mg/ml) を PBST で希釈し, CRP 溶液を作製．
③C2 抗体ポリスチレンビーズ (10 mg/ml) を PBST で希釈し，ポリマー溶液を作製．
④C6cc 抗体 FGbeads(10 mg/ml) を PBST で希釈し，磁気マーカー溶液を作製．

CRP は実験の用途に合わせて濃度を変化させるが, 一回の実験では CRP の原液を希釈し，それをさらに希釈することを繰り返すことで低濃度の CRP 溶液を作成している．

このサンプルを用いて以下に測定の手順を示す. 最初に, サンプルは, 直径約 3.3 μm の抗体付きポリマー溶液 30 μL に CRP 溶液 120 μL と磁気マーカー30 μL を混ぜ合わせて作製する．これらを 60 分間磁場中結合反応させると, サンプル中には **Fig. 1** に示す様に，抗原と反応した結合マーカーと未反応の未結合マーカーの 2 種類が存在する．ここで磁場中結合反応とは弱い励起磁界(1 mT)を印加しながら抗原抗体反応をおこなうことである [12]．

次に反応終了後のサンプルに強い励起磁界(40 mT)を 1 回印加し，その後分散処理を施す．強い励起磁界は磁気マーカーの磁気モーメントの向きを揃える目的でおこなうが, 同時に未結合マーカーが凝集を引き起こすため，分散処理を施すことにより凝集を抑制する．前述の磁場中結合反応はある程度サンプルの磁気モーメントの向きを揃えておくことにより強い励起磁界の印加回数を 1 回に抑えるために行っている．

分散処理を施したサンプルを素早く **Fig. 3(a)**に示すステージにセットし，外部から永久磁石を用いて磁気マーカーに測定磁界（1 mT）を印加する．その後，ステージを回転させる．この時には，サンプルは永久磁石の影響を受けなくなるため，磁気マーカーのブラウン緩和が生じる．この際，サンプル中では結合マーカーと未結合マーカーとでそれぞれ粒子の直径が異なるため，ブラウン緩和時間も大きく異なる．具体的に(2)式に当てはめると，結合マーカーのブラウン緩和時間は約 13.6 sec であり，未結合マーカーのブラウン緩和時間は約 3 msec である．

Fig. 3(a)に示すように, ステージを回転してから 1.5 s 後にサンプルは SQUID の直上に到達する．この時には，未結合マーカーのブラウン緩和は完了しており，未結合マーカーからの磁気信号はゼロとなる．これに対して，結合マーカーからの磁気信号は保持されている．このため，液相中で抗原と結合した磁気マーカーからの信号のみを検出することができる．

Fig. 3(b)にステージを回転した場合に SQUID センサで測定される信号の時間波形を示す．図に示す様に，サンプルが SQUID の真上を通過するときに信号が計測される．信号波形の peak-to-peak 値がサンプルからの信号磁束Φを表す．ステージには 12 個の測定用セルがあり，ステージを回転することにより 12 個のサンプルを一度に測定することが出来る．

この様に, このブラウン緩和時間の差を利用することで, 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出来る．このため, 従来の光学的手法に用いられていた B/F 分離のための手間と時間がかかる洗浄行程が不要となり，より高速に免疫検査を行う事が出来る．

3. 実際のサンプルの磁気信号

前章では理想的な場合の磁気的免疫検査法の原理を説明した．しかしながら，実際のサンプルには様々な状態のマーカーが存在する．実際のサンプルにおける磁気マーカーの模式図を **Fig. 4** に示す．図に示す様に，結合マーカーとしては溶液中に浮遊するもの(suspended)と容器底面に沈殿したもの(precipitated)の 2 種類が存在する．未結合マーカーとしては，溶液中に浮遊するものと容器底面に沈殿したものに加えて，凝集体(agglomerate)が存在する．

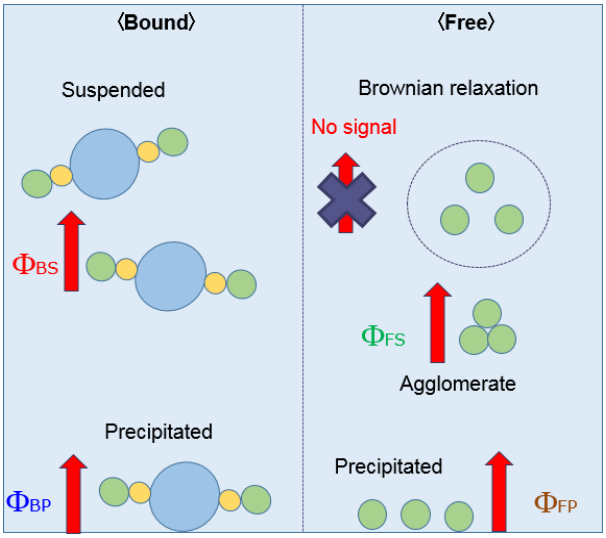


Fig. 4 Schematic drawing of actual sample. Five types of magnetic markers exist. Bound markers consist of suspended and precipitated ones. Free markers consist of suspended, precipitated and agglomerated ones.

これらの中で，溶液中の未結合マーカーからの磁気信号はブラウン緩和のためゼロとなるが，その他のマーカーは

©Kyushu University

磁気信号を発生する．Fig. 4 では，溶液中に浮遊する結合マーカーからの信号をΦ_{BS}，容器底面に沈殿した結合マーカーからの信号をΦ_{BP} としている．また，未結合マーカーの凝集体からの信号をΦ_{FS}，容器底面に沈殿した未結合マーカーからの信号をΦ_{FP} としている．

この内，未結合マーカーの凝集体からのΦ_{FS} はブラウン緩和の不完全さによって発生する．すなわち，ブラウン緩和時間は粒子直径に依存しているため凝集により直径が大きくなった未結合マーカーの凝集体は測定までに完全にブラウン緩和しきれずに磁気信号を発してしまうのである．この磁気信号は抗原に関係のないものであり，ブランクシグナル(blank signal)と呼ばれる．実際のサンプルでは，このブランクシグナルを抑えることが課題である．

溶液中に浮遊するマーカーと容器底面に沈殿したマーカーは以下に示す測定手順により分離することが出来る．すなわち，**Fig. 3** に示す様に，測定の際に印加する測定磁界はとして+1 mT と－1 mT の 2 通りを使用する．この測定法を測定磁場反転法と呼んでいる．

測定磁界として+1 mT を印加した時の信号値を $\Phi(+)$とし，－1 mT を印加した時の信号値を $\Phi(-)$とすると，それぞれは

$$\begin{aligned}\Phi(+) &= \Phi_{BS} + \Phi_{BP} + \Phi_{FS} + \Phi_{FP} \\ \Phi(-) &= -\Phi_{BS} + \Phi_{BP} - \Phi_{FS} + \Phi_{FP}\end{aligned} \tag{3}$$

で表される．これは浮遊しているマーカーのみが測定磁界の正負により反転するためである．(3)式より次式が求められる．

$$\begin{aligned}\Phi_{BS} &= \frac{\{\Phi(+) - \Phi(-)\}}{2} - \Phi_{FS} \\ \Phi_{BP} &= \frac{\{\Phi(+) + \Phi(-)\}}{2} - \Phi_{FP}\end{aligned} \tag{4}$$

従って，(4)式により，Φ_{BS}(浮遊している結合マーカー)とΦ_{BP}(沈殿した結合マーカー)を求めることが出来る．

Fig. 5 に実験結果の例を示す．グラフの横軸は CRP 濃度を，縦軸は信号磁束を表している．グラフから Φ_{BS} と比べて Φ_{BP} は 1/10 程度の値しか示していないことが分かる．すなわち，結合マーカーのほとんどは溶液中に浮遊していることを示している．従って，以下では Φ_{BP} は無視し，Φ_{BS} のみの結果を信号値として表すこととする．

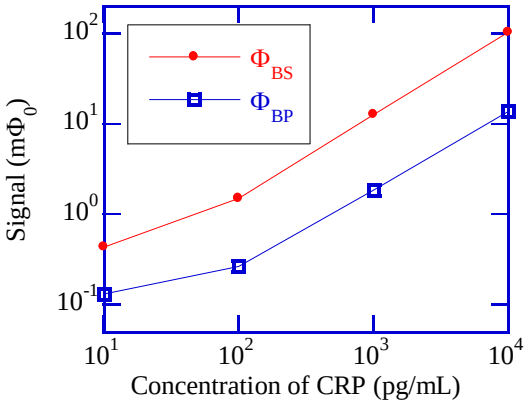


Fig. 5　Relationship between signal from the bound makers and concentration of CRPs. Here, Φ_{BS} and Φ_{BP} represent the signal from suspended and precipitated markers, respectively.

4. CRP の検出実験

4.1　磁気マーカー濃度の最適化

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．そこで異なる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．

4.1.1　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. 6** に示す．グラフの縦軸は信号磁束，横軸は CRP 濃度を示している．実験では，試料溶液に投入する磁気マーカーの濃度が，1.0 μg/60 μL と 2.0 μg/60 μL の場合の結合信号を測定した．図に示すように，結合信号はマーカー濃度が 2.0 μg/60 μL の場合のほうが大きいことが分かる．これは磁気マーカー濃度が大きいことにより抗原と結びつくマーカーの量が多くなったからである．

©Kyushu University

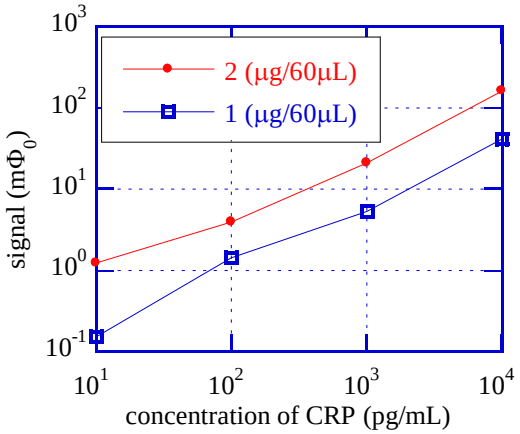


Fig. 6 Dependence of the bound signal on the concentration of CRPs. Results obtained for two concentrations of the markers are shown.

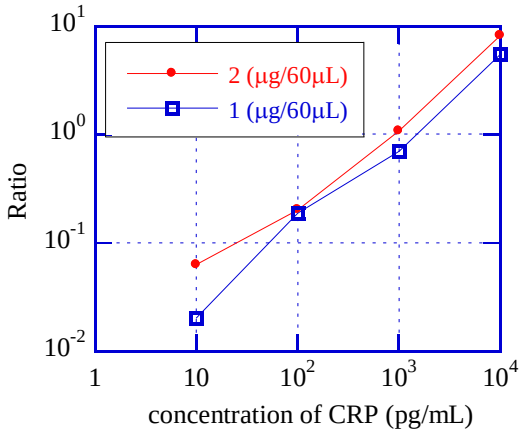


Fig. 7 Relationship between Ratio and concentration of CRPs for each concentration of markers.

4.1.2 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 1.0 μg/60 μL と 2.0 μg/60 μL まで変化させた場合のブランクシグナルを測定した．

ブランクシグナルは，1.0 μg/60 μL の時に 5.2 mΦ0 となった．これに対して，2.0 μg/60 μL の時には 19.6 mΦ0 となり，1.0 μg/60 L の時に比べて 4 倍ほど高い結果になった．これは磁気マーカー濃度が高いとマーカー同士の凝集が進んでいるためである．

4.1.3 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，結合信号とブランクシグナルの比(Ratio)を以下のように定義した．

$$\mathrm{Ratio} = \frac{\text{Bound signal}}{\text{Blank signal}}$$

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 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. 7** に示す．グラフの縦軸は Ratio，横軸は CRP 濃度を示している．グラフに示すように，マーカー濃度 2.0 μg/60 μL のほうが適していることがわかる．

4.2 免疫検査実験の再現性

実際に医療現場で応用していくにあたり，免疫検査の再現性は極めて重要である．本研究でも再現性の向上のためにサンプルの濃度や測定方法，サンプル作り，サンプル滴下方法など細かい点まで注意して実験を行っている．今回は，FG Beads 濃度を前節で考察した 2.0 μg/60 μL とした場合の実験を 4 度行い，再現性の確認を行った．1 回の実験の流れは 2.2 節に示してある。その結果を **Fig. 8** に示す．グラフの縦軸は信号磁束，横軸は CRP 濃度を示している．各実験において CRP 濃度と信号磁束の関係を測定した．図では，各実験の結果を異なる色で示している．図に示す様に，各実験では CRP 濃度と信号磁束の間に明瞭な相関があり CRP が検出出来ていることが分かる．2 回目の実験からは CRP 濃度 1 pg/mL の検出にも挑戦し成功した．

しかしながら，図に示す様に実験間では測定結果にばらつきがある．実験 1, 2, 3 の結果を見ると，高濃度側ではかなり数値が安定してきていることが分かる．一方，低濃度側は信号が小さいためにブランクシグナルの影響を受けやすく信号が安定しにくい．また，実験 4 では磁気信号が他の実験に比べて大きくなった．

実験間の測定結果のばらつきの原因として，作製した CRP サンプルの濃度がばらついていることが考えられる．これは，極微量な CRP サンプルを作製するために CRP を最大約 4.1×10^{9} 倍に希釈しており，作製時にばらつきが生じやすいためである．また，FG Beads の中には凝集した粒子が一部存在し，実際に反応に寄与する濃度がばらつくためである．この実験間の CRP 濃度や FG Beads 濃度のばらつきを除くため，**Fig. 8** の結果を CRP 濃度 1000 pg/ml で規格化したグラフを **Fig. 9** に示す．このグラフを見ると結果がかなり安定していることが分かる．従って，計測シ

©Kyushu University

ステム自体の再現性は高いと思われる．今後は，サンプル作製時のばらつきを小さくし、検出の再現性を高めることが課題である．

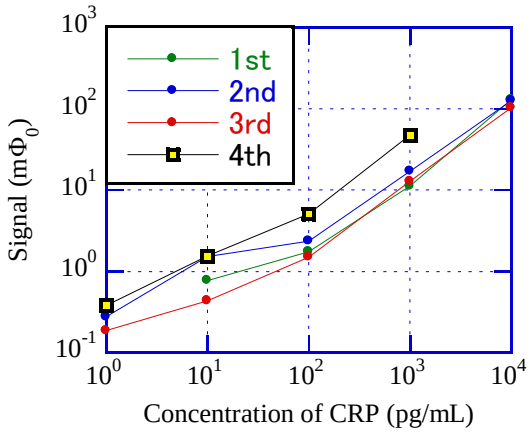


Fig. 8　Relationship between signal and concentration of CRPs. The results obtained with four experiments are shown.

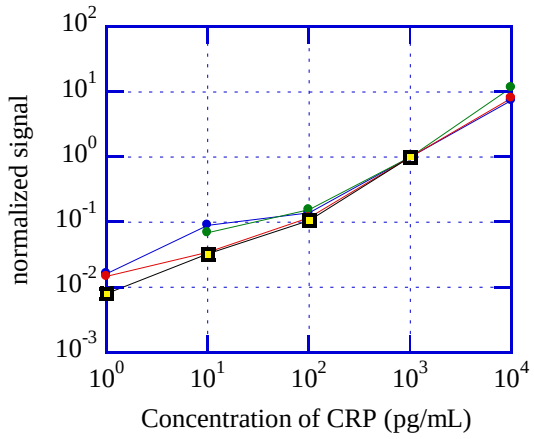


Fig. 9　Relationship between normalized signal and concentration of CRPs. The vertical axis represents the value normalized by the value at CRP concentration of 1000 pg / mL.

5. ま　と　め

磁気マーカーと HTS SQUID を用いた洗浄工程無しでの免疫検査を行った．今回，抗原として新たに CRP を導入し検出を行った．サンプルに投入する磁気マーカー濃度について最適化を行い，磁気マーカー濃度は 2.0 μg/60 μL が適しているという結果となり，最小検出抗原数は 1 pg/mL を達成した．再現性に関しては高濃度側では安定しているが低濃度側ではまだ不安定であるという結果になった．

今後の課題としては，ブランクシグナルを小さくし，結合信号を安定させることにより再現性を高めるために，未結合マーカーの凝集を抑制する方法を模索することが挙げられる．

参　考　文　献

1) NTK. Thanh Ed, Magnetic nanoparticles from fabrication to clinical applications CRC Press New York 2012.

2) RS. Gaster, L. Xu, SJ. Han, RJ. Wilson, l DA. Hal, SJ. Osterfeld, H. Yu and SX. Wang, “Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays”, Nature Nanotech. 6 314-320 2011.

3) S. Schrittwieser, B. Pelaz, WJ. Parak, S. Lentijo-Mozo, K. Soulantica, J. Dieckhoff, F. Ludwig, A. Guenther, A. Tschöpe and J. Schotter, “Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels”, Sensors 16 828 2016.

4) F. Öisjöen, JF. Schneiderman, AP. Astalan, A. Kalabukhov, C. Johansson and D. Winkler, “A new approach for bioassays based on frequency- and time-domain measurements of magnetic nanoparticles”, Biosens. Bioelectron. 25 1008-1013 2010.

5) SY. Yang, JJ. Chieh, CC. Yang, SH. Liao, HH. Chen, HE. Horng, HC. Yang, CY. Hong, MJ. Chiu, TF. Chen, KW. Huang and CC. Wu, “Clinic Applications in Assaying Ultra-Low-Concentration Bio-Markers Using HTS SQUID-Based AC Magnetosusceptometer”, IEEE Trans Appl. Supercond. 23 1600604 2013.

6) K. Enpuku, Y. Tsujita, K. Nakamura, T. Sasayama, andT. Yoshida, “Biosensing utilizing magnetic markers and superconducting quantum interference device”, Supercond. Sci. Technol. 30 053002 2017.

7) H. Kuma, H. Oyamada, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, A. Kandori, A. Sugiura, K. Yoshinaga, K. Enpuku and N. Hamasaki, “Liquid phase immunoassays utilizing magnetic markers and SQUID magnetometer”, Clin. Chem. Lab. Med. 48, 1263–1269 2010.

8) S. Uchida, Y. Higuchi, Y. Ueoka, T. Yoshida, K. Enpuku, S. Adachi, K. Tanabe, A. Tsukamoto and A. Kandori, “Highly sensitive liquid-Phase detection of biological targets with magnetic markers and high T_c SQUID”, IEEE Trans. Appl. Supercond. 24 1600105 2014.

©Kyushu University

9) M. Ura, K. Noguchi, Y. Ueoka, K. Nakamura, T. Sasayama, T. Yoshida and K. Enpuku, “Improved liquid-phase detection of biological targets based on magnetic markers and high-critical-temperature superconducting quantum interference device”, IEICE Trans. Electronics E99C 669-675 2016.

10) JL. Dormann, D. Fiorani and E. Tronc, Advances in Chemical Physics 98, I. Prigogine and S. A. Rice, Eds. Wiley New York 1997.

11) WT. Coffey, PJ. Cregg and Yu P Lalmykov, Advances in Chemical Physics 83, I. Prigogine and S. A. Rice, Eds. Wiley New York 1993.

12) K. Enpuku, Y. Ueoka, T. Sakakibara, M. Ura, T. Yoshida, T. Mizoguchi and A. Kandori, “Liquid-phase immunoassay utilizing binding reaction between magnetic markers and targets in the presence of a magnetic field”, Appl. Phys. Express, 7 097001 2014.

©Kyushu University