

磁気マーカーと磁気緩和測定法を用いた液相免疫検査法の開発

平田, 智一
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

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

<https://doi.org/10.15017/26519>

出版情報：九州大学大学院システム情報科学紀要. 18 (1), pp.25-30, 2013-01-25. 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：

磁気マーカーと磁気緩和測定法を用いた液相免疫検査法の開発

平田 智一*・吉田 敬**・圓福 敬二**

Liquid-Phase Immunoassay Using Relaxation Measurement of Magnetic Markers

Tomokazu HIRATA, Takashi YOSHIDA and Keiji ENPUKU

(Received November 16, 2012)

Abstract: We have developed a liquid phase immunoassay technique using the Brownian relaxation of magnetic markers. In order to achieve this, we used large polymer beads to fix the bound markers. The bound and unbound (free) markers were magnetically distinguished using the difference in their Brownian relaxation. We used MR (magneto-Resistive) sensor for the signal detection. In order to achieve high sensitivity and low noise of the sensor, we used a modulation technique called set/reset operation. Using this method, magnetic field resolution of the MR sensor was improved by about three times. We also set up a magnetic shield to prevent the influence of an environmental magnetic field. We show that the present system could detect 20 ng of magnetic markers. We also demonstrate the detection of 13.8 amol/ml of biotin with the present liquid-phase immunoassay technique.

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

1. はじめに

免疫検査とは疾患由来の蛋白質や病原菌などのバイオ物質を検出する検査法であり、医療診断において幅広く用いられている。例としては、血液検査による病原菌・ウイルスなどの感染症の検査、腫瘍マーカーの検出による癌細胞の早期発見などが挙げられる。

免疫検査においては、測定対象である抗原と抗体が特異的に結合する抗原-抗体反応が利用されている。この抗体はマーカーと呼ばれる物質で標識されているため、抗原と結合している抗体のマーカーからの信号を検出することで、抗原量の測定が可能となる。免疫検査には様々な手法があるが、現在主流な方法としては、発色・発光するマーカーを用いた ELISA¹⁾法が挙げられる。この手法は医療・食品といった分野で幅広く利用されているが、結合 (Bound) マーカーと未結合 (Free) マーカーを分離 (BF 分離) するための“洗い工程”が何段階も必要となる。このため検査工程が複雑で時間がかかることが問題点として挙げられる。

そこで近年注目を集めているのが、磁気マーカーを用いた磁気的な検査手法²⁻⁵⁾である。この手法では磁気マーカーからの磁気信号を磁気センサによって測定することで抗原量の測定を行う。我々は、磁気抵抗 (Magneto-Resistive: MR) センサを用いた液相での免疫検査法の開発を行っている。

る。本手法では磁気マーカーの溶液中でのブラウン回転運動を用いることにより、結合マーカーと未結合マーカーを磁気的に識別できる。このため、両者の分離に必要な手間と時間のかかる洗い工程を省略でき、検査の高速化が可能となる。

本論文では、最初に液相免疫検査法の測定原理を示す。次に信号磁界検出のための MR センサシステムの高感度化について述べ、本システムで 20 ng の磁気マーカーの検出が可能であることを示す。最後に、本システムを用いた液相での免疫検査実験 (ビオチン検出) について述べ、検出限界が 13.8 amol/ml と高感度な検出が可能であることを示す。

2. 液相免疫検査法

従来の固相免疫検査法の課題点である試料作製の長時間化を解決するために我々が開発したのが、洗い工程を省略した磁気的液相免疫検査法である。この方法では、Fig. 1 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が十分多く投入されているため、試料溶液中には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。免疫検査で抗原量を測定するためには、結合マーカーからのみの磁気信号を検出することが必要となる。

平成 24 年 11 月 16 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

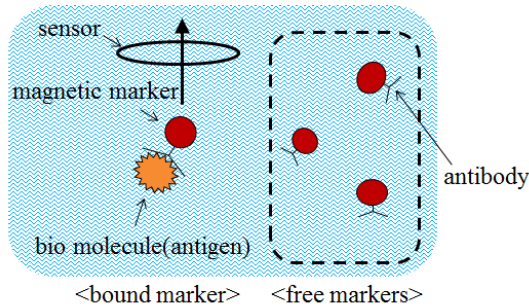


Fig. 1 Schematic figure of liquid phase immunoassay using magnetic markers.

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。このブラウン回転による磁気緩和を用いることにより、結合マーカーからのみの磁気信号を検出する方法を開発した。Fig. 2 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の状態にすると、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、1つ1つの磁気マーカーの磁気モーメントの向きが徐々にランダムになっていくため、マーカーからの磁気信号は時間とともに減衰していき、最終的にはこの磁気信号は0になる。この磁気緩和をブラウン緩和と呼ぶ。緩和するまでの時間をブラウン緩和時間 τ_B と呼び、次式で与えられる。

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

ここで、 d : 粒子直径, η : 溶液粘度, k_B : ボルツマン定数(1.38×10^{-23} J/K), T : 絶対温度である。我々の測定法では抗原は粒子径の大きなポリマービーズ ($3.3 \mu\text{m}$) 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、上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 13 sec となり、両者の粒子直径の違いにより、ブラウン緩和時間にも大きな差が生じる。したがって、試料を磁化させ、 0.35 ms 以上経った後に MR センサで試料からの磁気信号を測定でき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 MR センサで検出することができる。

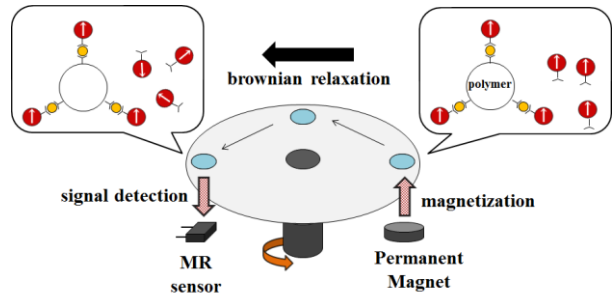


Fig. 2 Measurement principle for liquid phase immunoassay.

3. MR センサシステム

3.1 センサの雑音

磁気マーカーからの信号の検出には MR センサを用いた。MR センサには大きな磁界が印加されるとセンサの薄膜粒子にその磁化履歴が残ってしまい、薄膜粒子表面の磁気モーメントの向きがバラバラの状態となり、センサの感度が低下してしまうという問題点が挙げられる。そこで Fig. 3 のように MR センサの薄膜粒子にパルス電流を印加し、ある方向に磁化させることで薄膜粒子を乱れのない状態にする set/reset strap⁹⁾ を MR センサに付加させた。これによりセンサを高感度に保つことが出来る。

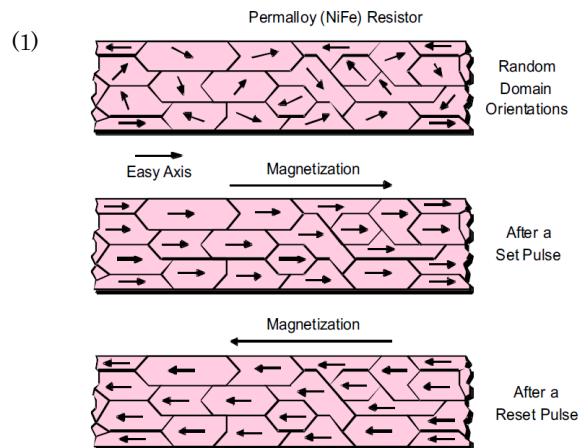


Fig. 3 Magnetic domain orientation of MR sensor.

MR 素子を4個用いたブリッジ回路を Fig. 4 に示す。それぞれの抵抗は印加磁界 B により次式のように変化する。

$$R_i = R_{i,0}(1 \pm KB) \quad (2)$$

ここで、 $R_{i,0}$ は磁界が $B=0$ の時の抵抗値であり、 K は磁界に対する抵抗の変化率を示す。なお、Fig. 4 のブリッジでは抵抗1と4では $+K$, 2と3では $-K$ となるように設定されている。ブリッジの端子電圧は

$$V_{AB} = \frac{R_2 R_3 - R_1 R_4}{(R_1 + R_2)(R_3 + R_4)} V_B = \frac{R_{2,0} R_{3,0} - R_{1,0} R_{4,0}}{(R_{1,0} + R_{2,0})(R_{3,0} + R_{4,0})} V_B + \frac{R_{2,0} R_{3,0} + R_{1,0} R_{4,0}}{(R_{1,0} + R_{2,0})(R_{3,0} + R_{4,0})} 2KBV_B = V_{off} + V_s \quad (3)$$

となる。第1項はブリッジ抵抗が揃っていないためのオフセット電圧であり、第2項が磁界に対応した信号電圧となる。この様子を Fig. 5 に示す。

抵抗の値が一定であれば、オフセット電圧 V_{off} も安定しているが、抵抗値が温度ドリフト等により低周波で揺らぐため、オフセット電圧 V_{off} には低周波雑音が発生することになる。このため、端子電圧 V_{AB} にも低周波雑音が発生し、低周波での高感度な計測が困難となる。

この問題を解決するための1つの方法として set/reset パルスを用いて K の値を反転する方法がある。Fig. 5 に示すように K の値が反転するため、set の状態と reset の状態の端子電圧が変化する。両者の差分を取れば、

$$V_{AB}(\text{set}) - V_{AB}(\text{reset}) = 2V_s \quad (4)$$

となり、オフセット電圧 V_{off} の揺らぎの影響を除去することが出来る。すなわち、出力電圧が抵抗値の低速ドリフトなどの温度変化による影響をあまり受けなくなるため、センサの雑音信号は低減する。

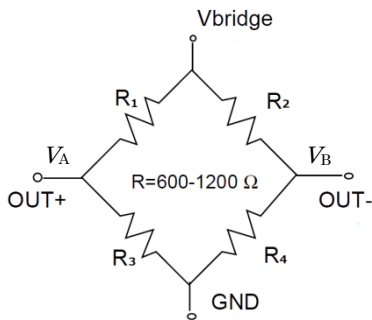


Fig.4 Bridge circuit using 4 MR sensors.

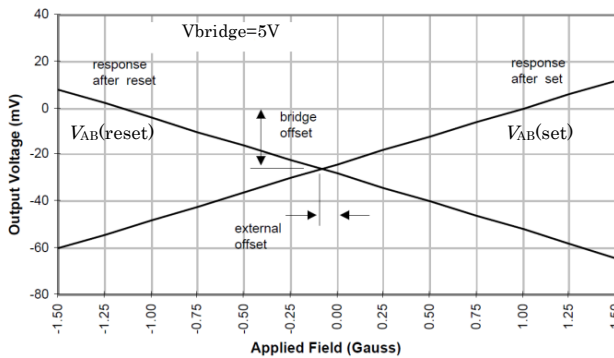


Fig.5 Output voltage vs. applied magnetic field.

set/reset 動作の有無において、センサ雑音信号をロックインアンプで増幅し、加算平均をとった波形を Fig. 6 に示す。Fig. 6 に示すように、set/reset 動作無しの場合、MR センサの雑音信号の波形は peak-to-peak で約 6 mV(0.1 nT)程度だった。一方 set/reset 動作有の場合、約 2mV(0.03 nT)程度と set/reset 動作無しの場合と比較して約半分程度の雑音信号であることが確認できる。また、信号も比較的 set/reset 動作有のほうが安定していることが確認できる。

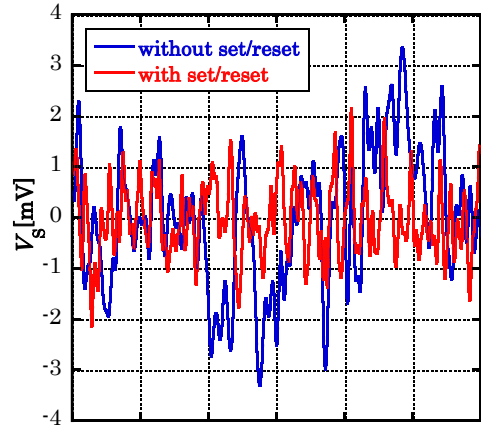


Fig. 6 Output signal V_s of MR sensor with and without set/reset operation.

3.2 磁気シールドの設置

磁気的液相免疫検査において、環境磁界が液相試料に印加されると、結合マーカーの磁気モーメントのふらつきによる信号低下や、未結合マーカーからの信号が生じてしまうため、雑音信号の原因となる問題がある。したがって、測定の際に生じる外部磁界を出来る限り排除することが磁気的液相免疫検査の高感度化に必要である。

そこで Fig. 7 のような円筒状の磁気シールド内に MR センサを設置し、プレートが磁気シールド内を回転するような機構にした。磁気シールドの設置を行うことで、液相試料への環境磁界を遮断し、免疫検査高感度化を図った。



Fig. 7 Experimental equipment for liquid phase magnetic immunoassay.

未結合磁気マーカーから生じる信号に及ぼす磁気シールドの効果調べた。実験では、R&D と nanomag と呼ばれる粒子径の異なる 2 つの磁気マーカーと溶媒として用いる PBS(リン酸緩衝生理食塩水)の 3 つを用いた。液相試料中の磁気マーカー量と容量を **Table 1** に示す。このプレートに入れた液相試料を永久磁石による磁化をせずにプレートを回転させ、液相試料から生じる信号を MR センサによって測定した。この測定を装置に磁気シールドを施した場合と、していない場合の二通り行うことで、環境磁界が未結合磁気マーカーの信号にどのような影響を与えるか調べた。その実験結果を **Fig. 8** に示す。

Table 1 Weight and volume of marker and PBS.

sample number	sample
1, 7	R&D(2.33 μ g/60 μ l)
2, 8	none
3, 9	nanomag(2.33 μ g/60 μ l)
4, 10	none
5, 11	PBS(60 μ l)
6, 12	none

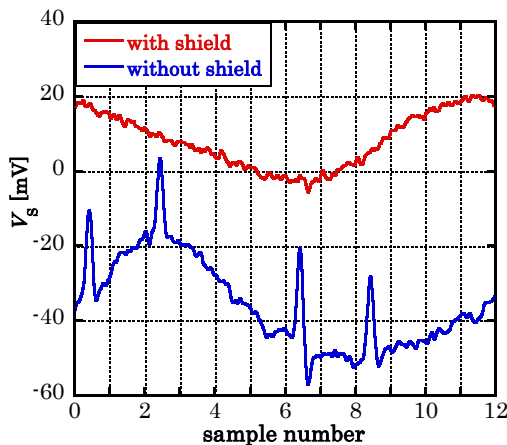


Fig. 8 Waveform of the detected signal for magnetic nanoparticle and PBS.

Fig. 8 より、装置に磁気シールドを施していない場合、R&D, nanomag の両方の磁気マーカーから 20 mV(3 nT) 程度の信号が、永久磁石による磁界印加をしていないにもかかわらず発生していることが確認できる。一方、装置に磁気シールドを施した場合では、磁気マーカーからは信号がほとんど発生していない。このことから、装置に磁気シールドを施すことで環境磁界を遮断し、それによって生じていた未結合磁気マーカーからの信号発生を低減できていることが確認できる。

4. 磁気マーカーからの残留磁気信号

磁気マーカー溶液を乾燥させた固相の試料を作成し、磁気シールドの設置と set/reset strap の付加を行った MR センサを用いた検出システムで磁気マーカーからの残留磁気を測定した。磁気マーカー溶液を薄めて濃度の異なる試料を作り、磁気マーカーの量と検出信号の大きさの関係を調べた。各々の試料を回転プレートに入れて乾燥させ、40 mT の永久磁石で試料を磁化して測定した。磁気マーカー溶液を乾燥させることでブラウン緩和が無くなり、全ての磁気マーカーを結合マーカーと同様とみなすことができる。よって液相での結合マーカーの個数と磁気信号の大きさの関係を推測することができる。今回測定を行った固相試料中の磁気マーカーの質量量を **Table 2** に示す。横軸に試料中の磁気マーカーの質量 W_M を、縦軸に信号電圧 V_S をプロットしたものを **Fig. 9** に示す。

Table 2 Weight of magnetic markers in samples.

sample number	weight W_M [ng]
1, 7	100
2, 8	80
3, 9	60
4, 10	40
5, 11	20
6, 12	0.0

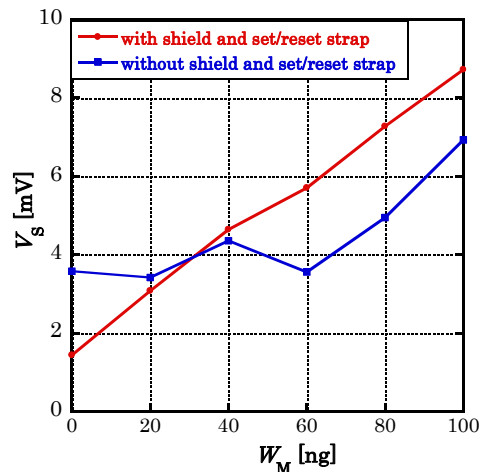


Fig. 9 Relationship between the detected signal V_S and the weight of magnetic nanoparticle.

Fig. 9 の赤線に示すように、磁気マーカーの質量と磁気信号の大きさが比例している。また、今回磁気シールドを設置と set/reset strap の付加を行ったことで雑音信号が set/reset strap 無の場合の約半分程度となり、20ng の磁気

マーカー量まで線形性が保たれていることがわかる。また、set/reset strap の付加によりセンサが高感度に維持されていることで、試料から検出される信号も大きくなっていることが確認できる。

さらに、Fig. 9 の実験結果で得られた試料から測定した信号を雑音である磁気マーカー量 0g の試料から得られた信号で割ってプロットしたものを Fig. 10 に示す。Fig. 10 の赤線に示すように、set/reset strap の付加により雑音に対する信号の比が大きくなっており、高感度に測定ができていることが分かる。

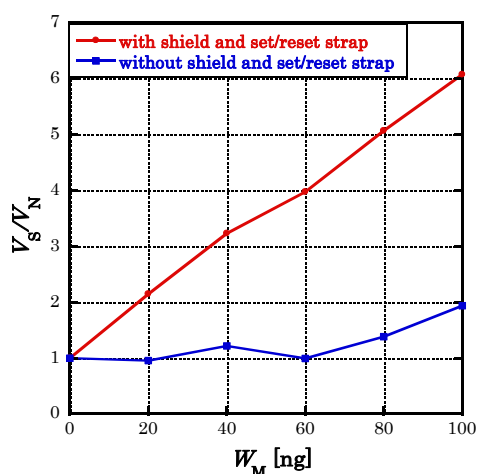


Fig. 10 Signal to noise ratio of the detected signal.

5. 液相免疫検査実験

今回改善した MR センサによる検出システムを用いて液相磁気免疫検査実験を行なった。プレートに磁気マーカー (2.33 $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$) とポリマー粒子 (ポリマー数/20 μl) を反応させた試料 60 μl を入れた。このサンプルを 40 mT の永久磁石で磁化した後の磁気信号を MR センサで測定した。なお測定では、プレートを 36 回転させて加算平均を取った。各試料中のポリマー数を Table 3 に示す。この試料の測定結果を、横軸にポリマー粒子の数 N_p を縦軸に信号電圧 V_s としてプロットしたものを Fig. 11 に示す。

Fig. 11 の赤線に示すように、MR センサを用いた検出システムでの液相免疫検査実験において液相試料中のポリマーの個数と信号の大きさが比例していることがわかる。今回の実験でのポリマー粒子の検出限界数は 500 個となっている。なお、ポリマー粒子 1 つには 1000 個のビオチンが結合しているため、ビオチンの検出限界数は 5.0×10^5 個となり、検出感度としては濃度と質量の 2 通りで換算するとそれぞれ、13.8 amol/ml, 1.38 pg/ml となる。これは従来の光学的手法と比較しても高感度といえる結果である。

磁気シールドを設置していない以前の結果では、マーカーの磁気モーメントの向きが、環境磁界によって乱される

ことで、図の青線に示すように信号が低下していた。今回磁気シールドを設置することで環境磁界の影響が小さくなり、それによって結合マーカーから得られる信号が大きくなったと考えられる。

Table 3 Number of polymer beads in samples.

sample number	number of polymer beads N_p
1, 7	5000
2, 8	3000
3, 9	2000
4, 10	1000
5, 11	500
6, 12	0

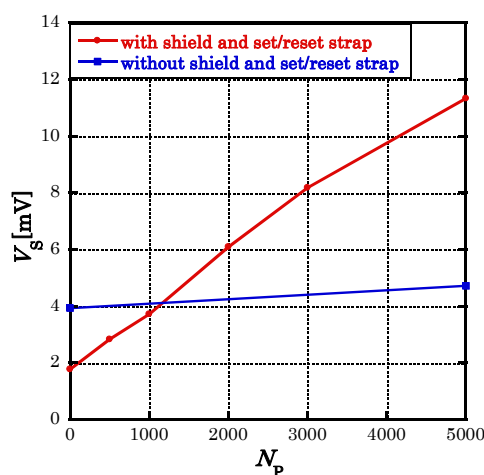


Fig. 11 Relationship between the detected signal V_s and the number of polymer beads N_p .

さらに、Fig. 11 の実験結果で得られた試料から測定した信号を雑音信号で割ってプロットしたものを Fig. 12 に示す。Fig. 12 の赤線に示すように以前 (青線) よりも雑音に対する信号の比が大きくなっており、高感度に測定ができていることが確認できる。この結果は磁気シールドを設置することで未結合マーカーからの信号発生が小さくなるとともに結合マーカーからの信号が大きくなったことと、及び、set/reset strap を付加することで MR センサ自体の雑音が小さくなったことが要因として考えられる。

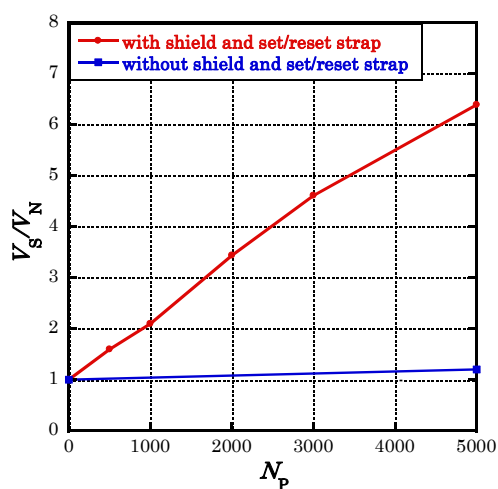


Fig. 12 Signal to noise ratio of the detected signal V_s .

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、雑音の低減と磁気マーカーからより大きな信号を得ることが重要となる。そこで、MR センサの雑音信号の低減とセンサを高感度に維持するために、MR センサに set/reset strap を付加させた。set/reset strap の付加により MR センサの雑音信号は約 2 mV(0.03 nT) と以前の半分程度に減少し、信号が安定することが確認できた。

また、測定環境における外部磁界の液相試料への印加が招く、信号の低下と雑音信号の増加を防ぐために磁気シールドの設置を行った。

この検出システムにおいて、乾燥させた磁気マーカーの

検出限界量は 20ng となった。また、液相免疫検査においては、ビオチンの検出限界数は 5.0×10^5 個、検出感度を濃度換算した場合には 13.8 amol/ml となった。これは従来の光学的手法と比較しても高感度であると言える。

参考文献

- 1) Cunningham, A.J.: "Introduction to Bioanalytical Sensors", First ed. John Wiley&Sons, Inc., New York. 1988.
- 2) Hans-Joachim Krause et al.: "Magnetic particle detection by frequency mixing for immunoassay applications", Journal of Magnetism and Magnetic Materials 311 (2007) 436-444.
- 3) K. Enpuku et al.: "ac susceptibility measurement of magnetic markers in suspension for liquid phase immunoassay", Journal of Applied physics 108, 034701(2010).
- 4) K. Enpuku et al.: "Fast Detection of Biological Targets With Magnetic Marker and SQUID", Applied Superconductivity 19(2009) 844-847.
- 5) S.Y. Yang et al.: "Independency of Fe ions in hemoglobin on immunomagnetic reduction assay", Journal of Magnetism and Magnetic Materials 321(2009) 3266-3269.
- 6) D. F. He et al.: "An anisotropic magneto resistive sensor with set/reset field", review of scientific instruments 82, 094703(2011).