Development of a Magnetic Beads Quantitative Detection System for Fast Diagnosis

Yujiro Yamamoto Non-member (Asahi Kasei E-materials Corporation)

Tomohiro Morishita Non-member (Asahi Kasei Microdevices Corporation)

Kenji Matsuyama Non-member (Asahi Kasei Corporation)

Kenji Takasa Non-member (Asahi Kasei Corporation)

Ichiro Shibasaki Member (The Noguchi Institute)

Keywords : magnetic beads, magnetic sensor, semiconductor magnetic resistance, immunoassay

We developed a novel detection system for magnetic beads, suitable for rapid diagnostic detection system. The system consists of a semiconductor based magneto-resistance sensor for beads detection and a lateral flow kit.

Fig. 1 shows the immunoassay principle. Anti-bodies, which react with the target antigens, are adsorbed on reaction surface of the apparatus. Both target anti-gen and magnetic beads labeled antibody, which react with the antigen are added on the reaction surface which is furthermore washed after immunoassay. By washing the reaction surface, only reacted beads will remain, and by measuring the number of remained magnetic beads adsorbed on the reaction surface with a magnetic sensor, the quantity of antigens can be determined.

Fig. 2 shows a lateral flow kit, developed for immunoassay.

The immunoassay occurs when a target anti-gen is injected to the injection area and flows to the reaction surface by capillary phenomenon, reacting with the anti-body which is labeled with magnetic beads. Fig. 3 shows the magnetic beads detection system. In the developed system, an SMR (Semiconductor Magnetic

Resistance) magnetic sensor was used, because of its low cost, popularity and stability.

After immunoassay reaction, the lateral flow kit (containing adsorbed beads) is attached to the machine and afterwards move to the SMR sensor, while the reaction surface is scanned and counted by the system. Using this technique, the quantity of magnetic beads, adsorbed on the reaction surface can be measured.

Fig. 4 shows the evaluated result of the developed system. Detection of anti-gen of H.influenza at concentration of 0.1ng/ml was performed with satisfactory sensitivity, showing the system to be promising for high-speed immunoassay.

Fig. 1. Principle of immunoassay

Fig. 2. Lateral flow kit for immunoassay

Fig. 3. Magnetic beads detection system

迅速診断のための磁気ビーズ定量システムの開発

非会員 山本裕二郎*

非会員 森下 朋浩**

非会員 松山 健二***

非会員 高佐 健治***

正員 柴崎 一郎****

Development of a Magnetic Beads Quantitative Detection System for Fast Diagnosis

Yujiro Yamamoto*, Non-member, Tomohiro Morishita**, Non-member, Kenji Matsuyama***, Non-member, Kenji Takasa***, Non-member, Ichiro Shibasaki****, Member

This paper reports the development and performance of a detection system for magnetic beads. The system consists of a semiconductor based magneto-resistance sensor for beads detection and a lateral flow kit. Detection of anti-gen of H.Influenza at concentration of 0.1ng/ml was performed with satisfactory sensitivity, showing the system to be a promising for immunoassay.

キーワード：磁気ビーズ，磁気センサ，半導体磁気抵抗素子，免疫反応

Keywords：magnetic beads, magnetic sensor, semiconductor magnetic resistance, immunoassay

1. はじめに

臨床現場で検査を行い，その結果を診療に反映させ，適切な治療に役立てることを目的とした迅速診断キットの開発には，多くのメーカーが注力しており，またその市場も拡大を続けている。このような迅速診断キットは 100 種類以上あり⁽¹⁾，インフルエンザウィルス診断キットなどがある。

迅速診断キットの測定法には，「イムノクロマトグラフィー法」「ラテックス凝集法」「酵素免疫法」があり，陽性・陰性の評価は一般に目視で行われる⁽²⁾。

迅速診断キットには，「簡便」「迅速」の利点がある一方で，目視検査であるために，

- ・微弱陽性では陽性・陰性の判定が検査技師に依存する
- ・健常者にも存在する被検出物質を対象とした場合には，定量化できないため，陽性・陰性の判断ができない

などの欠点がある。

このような現状に対し，我々は「定量化可能な迅速診断」という将来ニーズを見据え，「磁気ビーズ」と「磁気センサ」を用いた「迅速診断システム」の開発を行った。本稿では，磁気ビーズ測定システムとその性能について報告する。

迅速診断キット測定法としてイムノクロマトグラフィー法が広く使用されている。イムノクロマトグラフィーで用いられる反応原理を Fig. 1 に示す。反応部位に，抗体を固定化しておき，一方，金コロイド，ラテックスといった，粒子状の物質で，二次抗体を標識化しておく。抗原を含む検体液が，添加されると，抗原と粒子標識化二次抗体が結合し，更に反応部位でサンドイッチ反応が発生し，結果的に，反応部位に標識粒子が凝集する。この凝集を観測することによって，抗原の有無を判断する。

イムノクロマトグラフィー法とは，検体から被検出物質を抽出した液を診断キットに滴下し，毛細管現象を利用して液輸送を行い，反応部で免疫反応を行う方法である。被検出物質の有無を評価するために用いる標識物質には，金コロイドや色素含有ラテックスビーズが用いられる。この

Fig. 1. Principle of immunoassay

* 旭化成イーマテリアルズ (株)
〒416-8501 静岡県富士市鮫島 2-1
Asahi Kasei E-Materials Corporation
2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka 416-8501

** 旭化成エレクトロニクス (株)
〒416-8501 静岡県富士市鮫島 2-1
Asahi Kasei Microdevices Corporation
2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka 416-8501

*** 旭化成 (株)
〒416-8501 静岡県富士市鮫島 2-1
Asahi Kasei Corporation
2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka 416-8501

**** (財)野口研究所
〒173-0003 東京都板橋区加賀 1-8-1
The Noguchi Institute
1-8-1, Kaga Itabashi-ku, Tokyo 173-0003

方法では、検出している物理量は「金コロイド・色素の吸収」であり、装置を用いることで被検出物質の定量は可能となる。しかしながら、「検出系感度」の観点では、標識物質自体が信号を発するわけではないので、高感度化は困難である。

今回我々は、従来の光検出法に対し、「磁気ビーズ」を標識物質とし、磁気センサを用いる磁気検出法に着目した。この場合、信号発生源が「磁気ビーズ」自体であるために、磁気センサの選択・信号処理回路の最適化により、検出系感度の向上が期待でき、また装置としても安価である。

磁気検出法で使用する磁気センサとしては、ホール素子やピックアップコイル、半導体磁気抵抗素子などがある。ホール素子やピックアップコイルでは、磁場発生源として電磁石を用いるが、コイルのインダクタンスによる発熱が大きく装置の信頼性の点に課題がある。

以上を踏まえ、我々は「簡便性」「高汎用性」「定量可能」「システムの小型化」「安価」の観点から、半導体磁気抵抗素子 (Semiconductor Magnetic Resistance, 以下 SMR 素子) を磁気センサとして選択し、「被検出物質量を定量化可能な迅速診断システム」の開発を行った。

本稿では、磁気ビーズ検出の基本原則、プロトタイプシステムの開発、ラテラルフローキットの開発、最終的な迅速診断システムの開発について報告する。

2. 磁気ビーズ検出システムの基本原則

〈2・1〉 磁気ビーズを用いた免疫反応原理 イムノクロマトグラフィー法で、標識物質として用いられる金コロイドやラテックスビーズの粒径は 10nm–100nm であるのに対し、磁気ビーズの粒径は数 100nm–数 1000nm あり、抗体の大きさの数十倍–数百倍と非常に大きい。

そこで、磁気ビーズを標識物質とした場合の免疫反応性について検証した。抗体に磁気ビーズを標識するには、ピアース社製 EZ-link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit 試薬を用いて、Anti-C-Polysaccharide 抗体のビオチン化を行い、ビオチン化した抗体とアビジン-磁気ビーズを、PBS (Phosphate Buffered Saline) 中で反応させて得る、といった方法がある³⁾。反応原理は Fig. 1 で述べた抗原抗体反応を用いている。反応表面に、被検出物質である抗原に反応する抗体を吸着させており、この表面に抗原と磁気ビーズを標識した抗体とを添加する。反応終了後には、洗浄液で反応表面を洗浄する。抗原がない場合は、磁気ビーズの付着はなく、抗原が存在する場合は、抗原濃度に応じて磁気ビーズが反応表面に吸着される。

Fig. 2 に反応後の表面を CCD カメラで評価した結果を示す。今回の検討では、疎水性に改質した約 5mm 角の Si ウェハ表面を反応表面とし、磁気ビーズには Dynal 社製 M-270 (粒径 2.8μm) を用いた。Fig. 2 の黒い凝集が、磁気ビーズの凝集であり、高濃度品で、直径約 3mm である。Fig. 2 に示すように、抗原濃度依存した結果が得られ、磁気ビーズを標識物質とした場合においても、免疫反応により抗原

Fig. 2. Results of immunoassay, using magnetic beads

の検出が可能であることを実証した。

〈2・2〉 磁気ビーズの選定 磁気ビーズを用いた検出システムでは、磁気センサ測定感度の点からは、「磁性体材料の磁化率の高さ」「磁性体含有量が高いこと」が磁気ビーズの特性として要求される。一方、免疫反応性の点からは、より反応性のよい、比較的小さな磁気ビーズが好ましい。

そこで「測定感度」と「免疫反応性」の 2 点を両立する磁気ビーズの選定を行った。

磁気ビーズの選定にあたっては、「粒径」「磁性体含有量」の異なる数種の磁気ビーズを標識物質として用い、疎水性に改質した Si ウェハ表面上で免疫反応を行い、評価した。磁気センサとしては、SMR 素子を用い、信号出力を比較した。検討の結果、本システムの磁気ビーズとして、Dynal 社製 MyOne (粒径 1μm, 磁性体含有量 26%) を採用した。

〈2・3〉 磁気ビーズ検出原理 先に述べたように「簡便性」「高汎用性」「定量可能」「システムの小型化」の観点から磁気センサとして、SMR 素子 (村田製作所製) を用いた。

SMR 素子は、磁場変化を感じる半導体薄膜からなる感磁部、磁場を与えるバイアス磁石から構成される。

磁気ビーズ検出原理を以下に説明する。Fig. 3(a)に示すように、各抵抗が R1, R2 である感磁部を直列に接続し、外部電圧 Vcc 印加すると、中点電位 V1 は、

$$V1 = \frac{R1}{(R1 + R2)} \times Vcc \dots\dots\dots (1)$$

となる。

Fig. 3(b)に示すように、一方の感磁部直下に磁気ビーズが存在した場合には、磁気ビーズによりバイアス磁石からの磁場は収束され、ローレンツ力の作用により各感磁部の抵抗は、R1 が R3 へ、R2 が R4 へと変化する。中点電位 V2 は、

$$V2 = \frac{R3}{(R3 + R4)} \times Vcc \dots\dots\dots (2)$$

となる。

その結果、感磁部直下に磁気ビーズが存在する際の検出信号強度 V は、

$$V = V1 - V2 \dots\dots\dots (3)$$

で表される。

つまり、SMR センサに対して、磁気ビーズを一方向に走査すると、Fig. 3(c)に示すような、波形が得られることとな

Fig. 3. Principle of detection of magnetic beads

る。磁場の収束による磁束密度が変化が磁気ビーズの量により変化するため、磁気ビーズ量の定量が可能となる。

3. プロトタイプシステムの試作

2 種類のプロトタイプシステムを試作し、評価した。

Fig. 4(a)に示すように、プロトタイプ I では、SMR 素子に対して、磁気ビーズサンプルを一方方向に走査し、磁気ビーズ信号を検出する。プロトタイプ II では、SMR 素子に対して、磁気ビーズサンプルを同心円上に回転させて、磁気ビーズ信号を検出する。

SMR 素子からの検出信号は、信号処理回路内で約 18 万倍増幅し、S/N 向上のためにバンドパスフィルタによるノイズ除去を行った。また、25 回積算を行うことでノイズ除去し、磁気ビーズからの信号出力とした。

〈3・1〉 プロトタイプ I 評価 表面を疎水化した Si ウェハ表面に、免疫反応により磁気ビーズを吸着させたサンプルを用い、プロトタイプ I の信号出力を評価した。

免疫反応の被検出抗原には、S.pneumoniae 菌及び H.Influenza 菌を用いた。Fig. 5(a)は S.pneumoniae 菌の検出例、Fig. 5(b)は H.Influenza 菌の検出例である。

Fig. 5 に示すように、信号強度は抗原濃度によって変化しており、今回試作したプロトタイプ I を用いれば、検体中の抗原濃度を定量できることを実証した。

しかしながら、試作したプロトタイプ I は、単純で簡便な測定方法である一方で、磁気ビーズサンプルの加速・減

Fig. 4. Prototype systems for beads detection

Fig. 5. Results of anti-gen detection with prototype I

速のために一定距離が必要なため、装置サイズが大きくなる点、駆動部のベアリングの耐久性などの課題があるため、我々はプロトタイプ II についても評価を行った。

〈3・2〉 プロトタイプⅡ評価 上記のプロトタイプⅠに想定される課題に対し、プロトタイプⅡの長所は、磁気ビーズサンプルを回転させて信号出力を得るために、加速・減速のための距離を必要とせず、駆動部のベアリングの劣化も軽減できる点にある。

プロトタイプⅠの評価時と同様に、免疫反応により磁気ビーズをSiウェハ上に吸着させ、信号強度を評価した。

その結果、プロトタイプⅠと比較して、プロトタイプⅡでは、信号強度が低下した。

プロトタイプⅠに対し、プロトタイプⅡでは接触ノイズの発生を防ぐために、磁気ビーズサンプルとSMR素子間の距離を広く設定していることが要因と考えられる。

Fig. 6(a)には、磁気ビーズ量の異なる3種類のサンプル(強, 中, 弱)について信号強度のSMR素子と磁気ビーズ間距離依存性を示す。全てのサンプルで強い距離依存性が観測された。Fig. 6(b)には、距離300 μ mの際の信号強度で規格化した際の結果を示す。この結果から、SMR素子の出力信号は磁気ビーズ量に関わらず、SMR素子と磁気ビーズ間距離に対して同じ傾向を示すことがわかり、検出感度の点からは、SMR素子と磁気ビーズの距離が非常に重要な要因であることがわかった。

以上の結果から、プロトタイプⅠの設計思想を基本とし、量産機としての「迅速診断システムの開発」を推進した。

Fig. 6. Dependence of signal intensity on the distance between SMR and magnetic beads

4. ラテラルフローキットの作成

検体から被検出物質を抽出し、抽出液を滴下する操作だけで、免疫反応が可能な簡易キット(以下、ラテラルフローキット)の作製を行った。

Fig. 7(a)は、ラテラルフローキットの概観図である。キットは、ポリカーボネート樹脂を射出成形したもので、二つのパーツからなる成形品に、吸収材料、抗体等を組み込み、接着したものである。大きさは、80mm $\times$ 20mm $\times$ 5mmである。サンプル滴下口に、抽出液を滴下すると図に示すように液が流れる構造になっている。Fig. 7(b)に、ラテラルフローキットの内部構造を示す。滴下された抽出液は、磁気ビーズ標識体と反応しながら、反応部に流れていく。ラテラルフローキットでは、非常に細い溝を利用した毛細管現象により、抽出液・磁気ビーズ標識物質を反応部に導く構造となっていることが特徴である。溝は0.2mm $\times$ 0.4mmの開口を持つ。

また、Fig. 7(a)からわかるように、反応部空間は微小空間となるように設計されており、空間厚みは0.15mmとなっている。これは免疫反応効率を向上させるためである。この空間を実現するために、成形体の一部は、0.1mmの厚みとなっており、精密射出成形で実現した。

反応部に到達した被検出物質及び磁気ビーズ標識体は免疫反応により、反応部に吸着され、反応に寄与しなかった磁気ビーズは、毛細管現象により洗い流される。

被検出物質が存在しない場合には、磁気ビーズ標識物質反応部で免疫反応せず、毛細管現象により洗い流される。

Fig. 7. Lateral flow kit for immunoassay

5. 迅速診断システムの試作

〈5・1〉 装置開発 プロトタイプ I に示したように、SMR 素子に対して、磁気ビーズを一方向に水平走査することを設計思想とし、迅速診断装置を開発した。

装置感度向上のために、

- ・ 信号増幅初段にローノイズのプリアンプを使用
 - ・ 1/f ノイズ及びジョンソンノイズ除去のためにバンドパスフィルタを使用。
- カットオフ周波数 15.9Hz, 41.3Hz

(a)

Scanning direction

(b)

Fig. 8. Machine for magnetic beads detection

Fig. 9. Evaluated result of test machine (anti-gen of H.Influenza)

- ・ 装置部品からのノイズ除去のためのセンサの磁気シールド
- ・ A/D コンバーター起因の信号オフセットドリフトを除去するための FFT 処理
- ・ ランダムノイズ除去のための積算処理 (25 回)

の対策を行った。

このようにして完成した装置を Fig. 8 に示す。

Fig. 8(a)は装置外観であり、装置本体の大きさは 260mm×200mm×90mm と小さく、重量も 3kg と軽く、容易に持ち運びも可能である。LED 表示することで、被検出物質の半定量結果が容易にモニターでき、定量結果が必要な場合は、プリンタを接続し数値を表示できる。測定時間はラテラルフローキットにより免疫反応を行った後、約 40 秒と短い。

Fig. 8(b)は、装置内部構造である。免疫反応後のラテラルフローキットを装置に装着し、SMR 素子に対して水平に走査することで信号を検出する。

〈5・2〉 迅速診断システム評価 今回、開発した装置及びラテラルフローキットを用いて、免疫反応を行った結果を Fig. 9 に示す。縦軸の装置出力は、A/D 変換後のデジタル信号出力である。被検出物質としては、H.Influenza 菌を用いた。Fig. 9 からわかるように、検出信号は抗原濃度とともに変化しており、また検出限界が 0.1ng/mL 以下と非常に高感度なシステムであることを実証した。この値は、被検出物が異なるため、一概に比較できるものではないが、CRP (C-reactive Protein) の検出例として、0.25μg/mL という報告⁽⁴⁾、腫瘍マーカー (PSA) の検出例として、0.25ng/mL という報告⁽⁵⁾から見て、十分な感度であると言える。

実際の医療現場での使用を考えると、検体の採取は、患者の咽頭、鼻腔から綿棒 (スワブ) を用いて採取すればよく、患者の負担も、現在よく用いられている、インフルエンザウイルス診断キットと同等である。

我々が今回開発したシステムは、「簡便性」「高汎用性」「定量可能」「システムの小型化」「安価」などの特徴を備えており、感染症診断・環境検査の場に好適である。

謝 辞

本開発にあたり、免疫アッセイの助言、実施をいただいた、東京女子医科大学の杉原茂孝教授、鈴木葉子先生、旭化成グループの渡邊勝哉、藤村真理子、五月女勲、生田茂、望月雅子、遠藤藍の各氏に感謝いたします。(各氏の所属は当時の所属)

(平成 22 年 5 月 21 日受付, 平成 22 年 7 月 30 日再受付)

文 献

- (1) 満田年宏:「小児科臨床 Japanese journal of pediatrics」, Vol.56, p.1282 (2003)
- (2) 大川洋二:「感染症迅速診断キット活用の現況」, 日小医会報, The Journal of the Japan Pediatric Association, Vol.27, pp.11-14 (2004)
- (3) 特許公報: 特許第 4237045 号
- (4) 公開特許公報: 特開 2010-25887
- (5) 特許公報: 特許第 4514233 号

山 本 裕二郎

(非会員) 1953年9月10日生。1981年3月早稲田大学理工学研究科修了。同年、旭ダウ(株)入社。樹脂加工の研究開発を経て、リチウムイオン二次電池の開発、診断システムの開発などを担当後、現在、旭化成イーマテリアルズ(株)にて、ワイヤーグリッドフィルムの開発に従事。

高 佐 健 治

(非会員) 1950年9月29日生。1973年3月大阪大学基礎工学部化学工学科卒業。1975年3月同大学院修士課程化学工学専攻修了。同年旭化成工業(株)入社。現在旭化成(株)研究開発センターにて、ポリマー加工に関する研究に従事。高分子学会、日本材料学会会員。旭化成グループフェロー。博士(工学)。

森 下 朋 浩

(非会員) 1974年8月13日生。1997年3月東京大学工学部応用化学科卒業。1999年3月同大学院修士課程応用化学専攻修了。同年旭化成工業(株)入社。現在旭化成エレクトロニクス(株)研究開発センターにて、半導体薄膜を用いた光センサの開発に従事。

柴 崎 一 郎

(正員) 1971年3月東京教育大学大学院修了。東京教育大学理学部物理教室勤務を経て、1974年旭化成工業(株)入社、技術総合研究所技術研究所室長、旭化成グループフェロー兼柴崎研究室長等を経て、現在は、(財)野口研究所顧問の他、東京工業大学大学院生命理工学研究科特任教授、豊橋技術科学大学特命教授を務める。2003年紫綬褒章受章。博士(理学)。

松 山 健 二

(非会員) 1960年10月16日生。1983年3月東京大学農学部農芸化学科卒業、同年旭化成工業(株)入社、現在旭化成(株)研究開発センターにて抗体蛋白を利用した病因診断技術の研究開発に従事。