

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業  
事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）高通水性高分子基材を用いた疾患マーカー迅速スクリーニングデバイスに関する研究開発

（プログラム名）（英語）Development of devices for rapid disease-marker screening using a macroporous polymer substance

実施期間：令和2年9月3日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）久保 拓也  
（英語）Kubo, Takuya

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）京都大学・大学院工学研究科・准教授  
（英語）Kyoto University・Graduate School of Engineering・Associate Professor

## II 補助事業の概要

現在、疾患診断に主として用いられる簡易手法としては、上述の通り ELISA が最も汎用である。2019 年における世界市場は約 200 億円であり、2026 年には 250 億円に到達すると予想されている (360 Research Reports, <https://www.360researchreports.com/>)。本研究では、下記の研究体制の下、ELISA に替わる新たな診断ツールの創出を目的として、申請研究期間における中間目標 (1 年目終了時)、最終目標 (2 年目終了時) を以下の通りに設定した。

中間目標：SPM の最適化と複数成分の濃縮を可能にする基材を完成させる

最終目標：対象物質の拡大と集積化を完成させる。

この目標を達成するために、研究期間内に当該開発サポートの支援を受けて、以下の項目についての評価を行った。最終年度における評価項目と進め方は次のとおりである。

### 1) 疾患マーカーの調査と検出対象抗体の決定

自己抗体疾患のうち、膠原病に属する疾患マーカーについての既存の検出法や抗原/抗体反応の機構を調査し、本研究におけるターゲット抗体を絞り込む。また、最終的なコンセプト立証のための対象疾患を決定する。

### 2) ターゲット抗体濃縮 SPM 基材の開発

1) のターゲット抗体の選択的な捕捉の予備検討として、一般的なイムノグロブリンシリーズの抗原を固定化した SPM を作製し、その機能を評価する。さらに、複数のターゲット抗体のための SPM を作製し、吸着/脱着条件を決定する。

### 3) SPM 集積デバイスを用いた検出法の開発

初年度に作製した SPM 並列化デバイスを改良し、濃縮、洗浄、回収が自在に制御できる新たなデバイスを作製する。また、汎用の HPLC システムと接続可能な多機能バルブを作製することで、濃縮デバイス/HPLC システムを構築する。最終的に、(2) で作製した複数の SPM 基材を含むデバイスを完成させ、擬似試料を用いて、本提案のコンセプトを立証する。

## 研究開発成果

### 疾患マーカーの調査と検出対象抗体の決定

開発サポートの支援によって、膠原病の専門医に対するヒアリングの機会を複数設けた。また、自身においても種々の疾患のマーケティング情報収集を行い、問題点を精査した。その結果、ターゲット抗体及び対象疾患を以下の通りに設定した。

対象の抗体：Jo1 抗体, NXP2 抗体, MDA5

対象の疾患：筋炎

### ターゲット抗体濃縮 SPM 基材の開発

Protein A 固定化 SPM (ProA-SPM) が IgG に対してのみアフィニティーを示すことが確認されていることから、濃度の異なる試料に対するピーク面積の定量性を評価した。その結果、試料濃度に対するピーク面積のプロットにおいて、決定係数が 1 となり、ピーク面積が試料濃度に対して高い定量性を示すことが確認された。同様に、IgA を捕捉する Jacalin を固定化した SPM においても、同様の結果が得られた。最後に、筋炎関連抗原である NXP2 を固定化した SPM カラムを作製し、種々の評価を実施した。結果から、NXP2-SPM において、IgG が吸着せずに溶出したことから、NXP2 の固定化が確認された。

## SPM 集積デバイスを用いた検出法の開発

本研究で目標とする分析システムの配管図を下図に示す。このシステムは二台の HPLC から構成される二次元 HPLC システムである。一次元目の HPLC では、夾雑系から標的成分を分離および濃縮する前処理を行い、二次元目の HPLC では、一次元目で濃縮された標的成分の定量を行う。また、一次元目の HPLC では、複数のアフィニティーカラムを並列化した濃縮デバイスとバルブスイッチングシステムを組み合わせ、複数の標的成分の前処理を並列化することで、分析効率の向上を目指した。

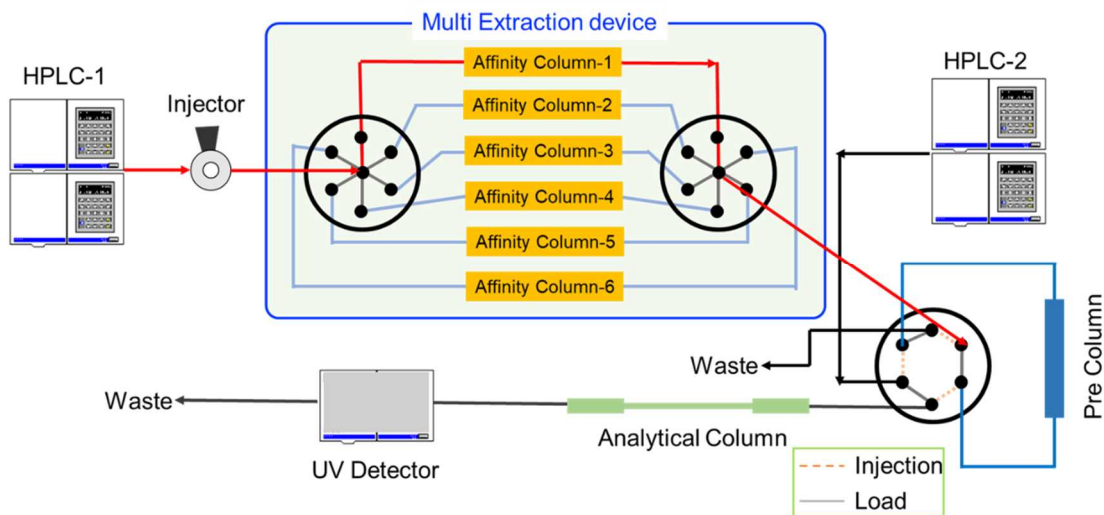


図. 新規分析システムの配管図.

上記の HPLC 連結システムにおける二次元目の逆相分離の条件検討を行った。ここでは、抗体医薬品の分析に関する論文に基づき、コアシェル型の C8 カラムを用いた。また、タンパク質は分子量が大きいため、拡散速度が遅くピークがブロードになる傾向がある。そこで、拡散速度を大きくするために、高温条件で分析を行った。結果、今回標的とした三成分（トランスフェリン, Trf 含む）の明確な分離が確認された。次に、同時定量のコンセプトを実証するために、装置概念を下図(a)ように改良した。IgG, IgA をモデルとして、濃縮実験を行った。その結果、下図(b)に示すような完全分離が実現した。以上のことから、本法のコンセプトが成立した。

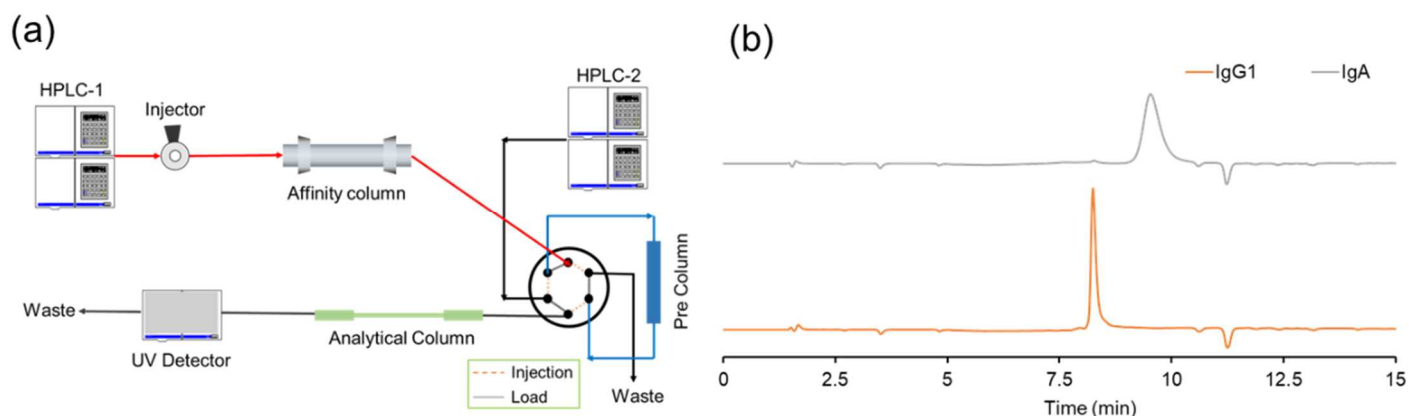


図. 改良システムとクロマトグラム.

以上の最終年度の研究課題から、最終目標に掲げた

- ・ ニーズ調査及び SPM 機能評価によるマーカー抗体の決定
- ・ マーカー抗体の組み合わせによる診断疾患の決定
- ・ イムノグロブリンファミリーの SPM 作製と評価
- ・ 新規 SPM によるターゲット抗体の選択的濃縮
- ・ 送液制御可能な SPM デバイスの作製

については、研究期間内に達成された

- ・ 新規 SPM によるターゲット抗体の選択的濃縮

本件については、引き続き筋炎のマーカー抗体に対する SPM の吸着・脱着条件を検討しながら、複数の抗体に対する SPM を完成させる。

- ・ 複数のターゲット抗体の同時濃縮と HPLC による定量

本件については、同時濃縮のコンセプトは立証できたが、全体の小型化や実試料における評価が残されている。今後、臨床医との共同研究によって、ニーズに基づくシステムの最適化を進める。

## Summary

In this study, we propose an inexpensive diagnostic device composed of multiple spongy monoliths (SPMs) as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is mainly used for existing disease diagnosis. Currently, ELISA is the most general-purpose method mainly used for disease diagnosis. The global market in 2019 is about 20 billion yen and is expected to reach 25 billion yen in 2026 (360 Research Reports, <https://www.360researchreports.com/>). The purpose of this study is to create a new diagnostic tool to replace ELISA. Although ELISA has high selectivity for a specific component and enables rapid detection, multi-component detection is impossible in principle, and it is susceptible to interference by the sample matrix. The SPM device of the present proposal can simultaneously concentrate and detect multiple components, and can selectively concentrate / detect each target substance, so it is excellent in quantification even for trace components. It can also be used as a pre-analysis device such as a mass spectrometer (MS) as a high-sensitivity analysis method, achieving high throughput in terms of analysis time and cost. There is no device development example with the above advantages, and the range of applications when it is realized is very wide.

For the objectives above, we investigate the following subjects.

### 1) Investigation of disease markers and determination of antibodies to be detected

Among autoantibody diseases, we investigate existing detection methods for disease markers belonging to collagen disease and the mechanism of antigen / antibody reaction, and narrow down the target antibodies in this study. Also, we determine the target disease for the final proof of concept.

### 2) Development of target antibody-enriched SPM substrates

As a preliminary study for the selective capture of the target antibody in 1), we prepare an SPM in which a general immunoglobulin series antigen is immobilized and evaluate its function. In addition, SPMs for multiple target antibodies are prepared and adsorption / desorption conditions are determined.

### 3) Development of detection method using SPM integrated devices

We improve the SPM parallelization device manufactured in the first year and create a new device that can freely control concentration, cleaning, and recovery. In addition, a concentration device / HPLC system is constructed by manufacturing a multifunctional valve that can be connected to a general-purpose HPLC system. Finally, we will complete the device containing multiple SPM substrates prepared in (2) and prove the concept of this proposal using simulated samples.

From the above research themes of the final year, we have set them as the final goals.

Determination of marker antibody by needs survey and SPM function evaluation, determination of diagnostic disease by combination of marker antibodies, SPM production and evaluation of the immunoglobulin family, selective enrichment of target antibody by novel SPM, fabrication of SPM device with controllable liquid feed, were achieved within the research period.

But, selective enrichment of target antibody by novel SPM, regarding this matter, we will complete SPM for multiple antibodies while continuing to examine the conditions for adsorption and desorption of SPM for myositis marker antibodies. Also, simultaneous concentration of multiple target antibodies and quantification by HPLC, regarding this case, the concept of simultaneous concentration was proved, but the overall miniaturization and evaluation of the actual sample remain. In the future, we will promote the optimization of the system based on needs through joint research with clinicians.