

GOD-POD-UnaG法を用いた 血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発

森岡一朗¹⁾, 長野伸彦¹⁾, 桃木恵美子¹⁾, 岡橋 彩¹⁾

Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method

Ichiro MORIOKA¹⁾, Nobuhiko NAGANO¹⁾, Emiko MOMOKI¹⁾, Aya OKAHASHI¹⁾

要旨

我々は新しくグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み合わせることにより、微量血中のアンバウンドビリルビン (UB) を測定することができる画期的な方法を確立した (GOD-POD-UnaG法)。本研究では、このGOD-POD-UnaG法を用いた自動測定機器の開発を行っている。今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器の実現可能性が見えてきた。

1. はじめに

新生児のビリルビンによる脳障害 (核黄疸) は脳性麻痺や心身障害の主要因の一つで、少子化時代の我が国において克服すべき疾患である。我々は、血中のアルブミンと結合していない非抱合型ビリルビン (アンバウンドビリルビン, UB) を測定すれば、この脳障害の発症を高率に予測できることを明らかにしてきた。現在のUB測定機器は、1980年代に開発された吸光度測定を用いたグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法 (UBアナライザー, アローズ社, 大阪) である。しかし、このGOD-POD法を用いた血中UB測定は、抱合型 (直接) ビリルビンやヘモグロビン (溶血) の血液では誤値が生じるという臨床で大きな問題であり普及には至っていない。我々は新しくGOD-POD法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み合わせることにより、抱合型ビリルビンやヘモグロビンの影響を受けずに微量血中のUBを測定することができる画期的な方法を確立

した (GOD-POD-UnaG法: PCT/JP2016/060327, 特願2017-510081)。本研究では、このGOD-POD-UnaG法を用いた自動測定機器を開発し、実用化を行う。

2. 方法

我々の発案したGOD-POD-UnaG法を用いて、研究室でUBを測定することに成功している。本法を社会実装するために、取り組んだ。

研究室での具体的な測定方法 (図1)

- 1) 30℃の温度管理下で、グルコース含有緩衝液 1000 μ Lおよび血清 20 μ Lを混和させたものをペアで作る。
- 2) 一方には緩衝液、他方にはGOD-PODの酵素液をそれぞれ25 μ L加え、いずれも20秒後にアスコルビン酸555 μ Lを混和させる (総容量1600 μ L)。
- 3) 作成された2検体を、UnaGを用いて蛍光を測定する。
- 4) ビリルビン標準液を用いたビリルビン濃度と蛍光強度の検量線から、血清中のビリルビン濃度

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
森岡一朗: morioka.ichiro@nihon-u.ac.jp

を算出する。

- 5) 2検体におけるビリルビン濃度の差から血清UB値が求められる。

また、GOD-POD-UnaG法では直接ビリルビンに影響を与えない予備実験データをすでに得ている(図2)。

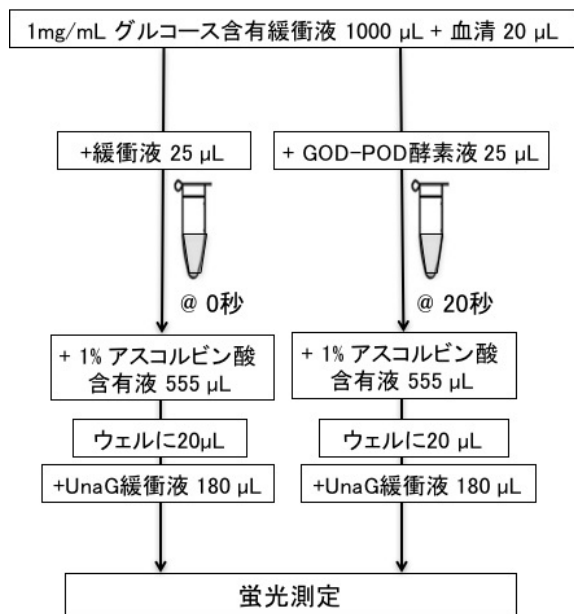


図1 GOD-POD-UnaG法

3. 結果

3-1 実現可能性試験

a. 米国のベンチャー企業であるBaebies社の保有するDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器を開発できるとの着想に至り、企業と開発を進め、実現可能性を確認した(図3, 4)。

b. 実現可能性試験で用いた方法で血中UB (DMF UB) 値の定量性の確認のため、既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB (Arrows UB) 値と

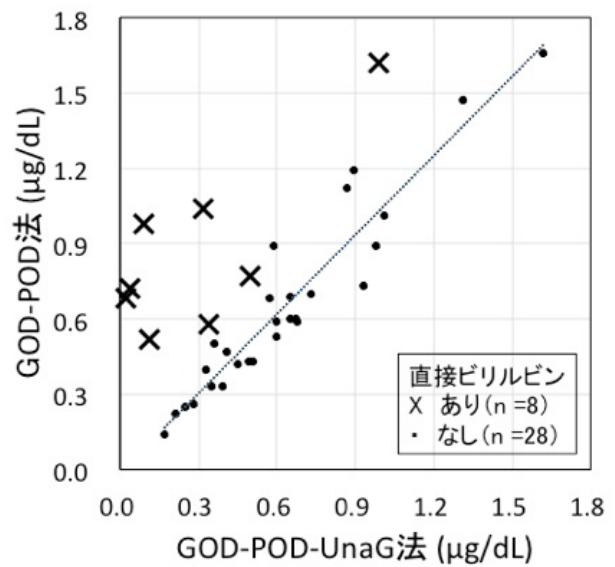


図2 GOD-POD法とGOD-POD-UnaG法で測定されたUB値の比較

直接ビリルビンの混在する血清では、GOD-POD法では偽高値を示し、GOD-POD-Una法では予測されるごおりの結果が得られる。

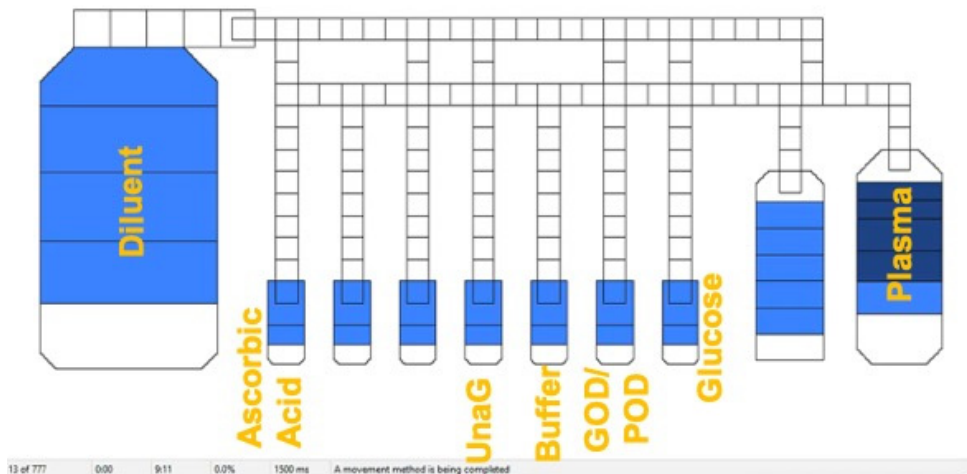


図3 GOD-POD-UnaG法とDigital Microfluidics技術を組み合わせ

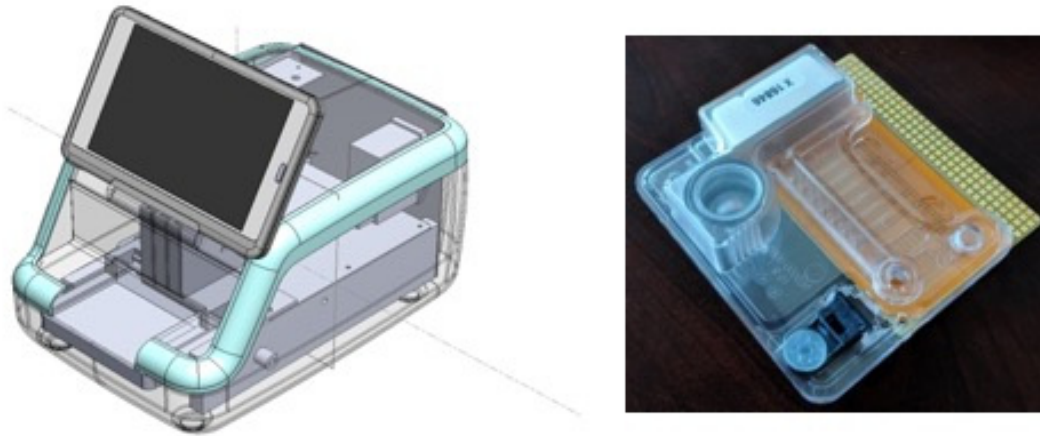


図4 完成図案 (左：機器, 右：カートリッジ)

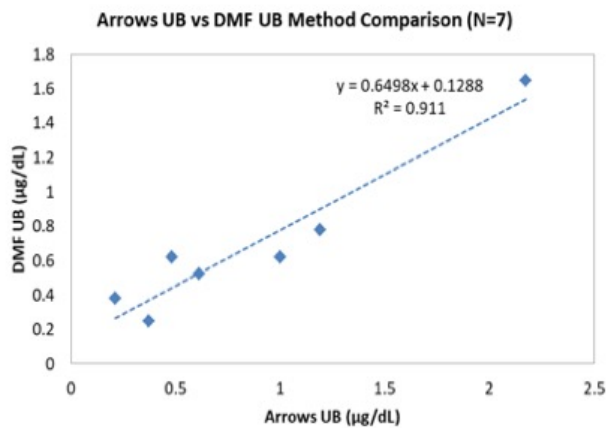


図5 既存のUB値とdisposable digital microfluidics (DMF)で測定したUB値の相関

比較した。図5に示すように、人工ビリルビン溶液のUB値との相関は、 $R^2=0.911$ で強い相関を確認した ($n=7$)。

4. 今後の計画

今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器の実現可能性を示せた。次年度の計画を示す。

- 1) 2019年度に引き続き、新血中UB測定機器の完成に取り組む (Baebies社)。実装化を目指し、シノテスト社と共同開発しているUnaGの大量生産法を確立させる。
- 2) 医学部臨床研究審査委員会への申請・承認後、通常診療で測定され血中UB濃度がわかっている実際の新生児の血清を用いた定量性の確認を

行う。そのために、2020年3月20日に日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会へ申請書を提出した。2020年6月19日付で承認を得た (RK-200414-2)。日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子総合医療センターに入院した黄疸発症新生児の通常診療で採取された血清の残余を得る。その際、通常の保険診療で測定された血中UB濃度 (既存のUBアナライザー、GOD-POD法 [アローズ社, 大阪]) で測定したデータも収集し、比較検討する。

- 3) 2)の結果をもとに、薬事承認の申請に必要な研究計画を立て、特定臨床研究法に則り、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得る。
- 4) 新血中UB自動測定機器で測定した血中UB濃度の精度を検証する。変動係数 (CV) は5%未満となることを確認する。
- 5) 日内変動分析および日間変動分析：同一検体を用いた繰り返し測定 (6回以上) を行い、CVを求める。
測定者によるばらつきの検討：医師、研修医、看護師、検査技師が繰り返し測定 (6回以上) を行い、CVを求める。
- 6) 抱合型 (直接) ビリルビンやヘモグロビン (溶血) 含まない血清検体を用いて、既存のUBアナライザーと新血中UB自動測定機器での血中UB濃度で相関関係を相関係数と相関式を求める。評価は相関係数が0.9以上、相関式は $y=1.0x + 0$ に近い結果となることで行う。

- 7) 既存のUBアナライザーの欠点である抱合型(直接)ビリルビンやヘモグロビン(溶血)含有の血清検体を新血中UB自動測定機器で測定し、測定値に影響がないことを確証させる。評価は、そのほかのパラメータである総ビリルビン/アルブミン比と比較することで確認できる。
- 8) 以上の成果に基づいて、アトムメディカル社とともに薬事承認申請を行う。体外診断医薬品・

医療機器として承認されれば、保険診療点数の確保のための申請を行う。

5. 結 語

今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた新血中UB自動測定機器の実現可能性が見えてきた。