

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ーペルオキシダーゼ (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)。2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた。2020年度は、実際の新生児血を用いて、本自動測定系の精度検証を行った。既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較では、 $y=0.99x+0.01$, $R^2=0.9514$ で強い相関を確認した ($n=9$)。しかし、変動係数 (CV) が10~15%であり、精度に課題が残った。2021年度は精度の上昇をはかり、CVが10%を下回るところまでできた。今後、CVが5%程度になるようさらに改修を行い、国内の薬事承認に向けたプロセスを行っていく。

1. はじめに

新生児のビリルビンによる脳障害 (ビリルビン脳症) 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¹⁾。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ーペルオキシダーゼ (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上大きな問題があり普及には至っていない^{2), 3)}。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

合わせることで、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: 特許第6716108号, 2020年6月12日)^{2), 3)}。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。

本装置がPoint-of-careの体外臨床検査診断として実用化されれば、現在では見逃してしまうビリルビン脳症発症のハイリスク新生児が検出できるようになる。そして、世界中でビリルビン脳症という脳性麻痺や心身障害の発症抑制に大きく貢献できる。脳性麻痺や心身障害児は生涯に渡って療育や福祉支援が必要であり巨大な医療費や福祉費用がかかっている。その費用を減少させることができ、医療経済上、大きな効果となる。

2019年度は、アトムメディカル社および米国のノースカロライナ州にあるBaebies社を連携組織と

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

して進め、その結果、Baebies社の保有するDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた機器の実現性ができた (Finder UB値)⁴⁾。2020年度には、実際の新生児血を用いて、精度の検証を行った。既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値 (Atom UB値) と比較では、 $y=0.99x+0.01$, $R^2=0.9514$ で強い相関を確認した (n=9)。しかし、変動係数 (CV) が10~15%であり、精度に課題が残った⁵⁾。

2. 方法

我々は、2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた⁴⁾。この自動測定機器は、UB (Finder UB値) 以外に、アルブミンおよび総ビリルビンと合わせて、すべてを50 μ Lの全血で測定できる。すべての測定は、使い捨てのDMFカートリッジで自動的に実行される (図1)。米国で開発研究が行われている。

測定系を調整し、その検証として、n数を増やし、

①血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関、②

血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) で、同一検体を用いた繰り返し測定 (12回) を行い、CVを求めた。

③さらに精度の向上のため、以下の表に示す人工ビリルビン溶液 (bilirubin/albuminモル比として、0から1.0) を作成し、最も適切な反応 (Reaction, RxN) 時間を検討した。

3. 結果

①血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関

図2に左図示すように、n=20でほぼ $y=1.0x+0$ の直線に近づいているのがわかる。しかしながら、まだばらつきが存在している。

②血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) のCV (n=12)

自動測定機器で測定した血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) のCVは、各々9.7%と8.5%であった。

③最適な反応時間の検討

精度の向上のため、反応時間を再度検証し直し、最適な反応時間を23.5秒と決定した。



図1 UB測定のための自動測定プロトタイプ機器 (Finder UB値が測定できる)

表1 人工ビリルビン溶液

	Sol A	Sol B	Sol C	Sol D	Sol E	Sol F
B/A ratio	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
0.4 mM/0.4 mM B/A Stock Solution	0	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL
0.4 mM Albumin Solution	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	0.0 mL
bilirubin, mg/dL	0	4.7	9.4	14.0	18.7	23.4
Albumin, g/dL	0	2.76	2.76	2.76	2.76	2.76

B/A, bilirubin/albuminモル比

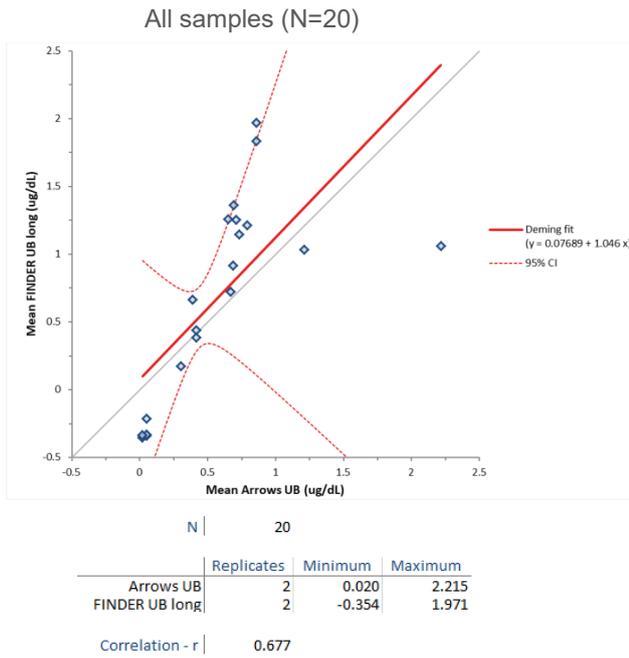


図2 血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関

表2 血中UBの高値と低値時のCV値

0.54 μg/dL	Mean	Repeatability SD	Repeatability CV
UB	0.57 (μg/dL)	0.055	9.7%

0.93 μg/dL	Mean	Repeatability SD	Repeatability CV
UB	0.93 (μg/dL)	0.079	8.5%

4. 今後の計画

国際共同産学連携社会実装開発研究のため、2020年度はCVが10～15%であったが、2021年度にカートリッジを種々の調整を重ね、CVが10%を下回るまでできた。相関は、 $y = 1.0x + 0$ の直線に近づいているが、まだばらつきが存在しているため、精度はCVが5%程度になるように検証や改修も含め、もう一息の工夫をおこなっている。さらに国内での社会実装のためには、まだ、薬事承認に向けたプロセスを行うことが残っている。

1) 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規定を順守し(2020年6月19日付承認, RK-200414-2), 日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子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100検体確保している(抱合型(直接)ビリルビンやヘモグロビン(溶血)含有検体は除く)。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。その一致率および相関関係を示す解析結果が、体外診断用医薬品の承認基準となることを確認している(厚生労働省医薬食品局長, 平成27年1月20日通知 薬食発0120第1号)。相関関係は、相関係数と相関式を求め、評

Tested the following reaction times

- 1.1s
- 5.8s
- 10.5s
- 23.5s
- 31.5s
- 65.8s

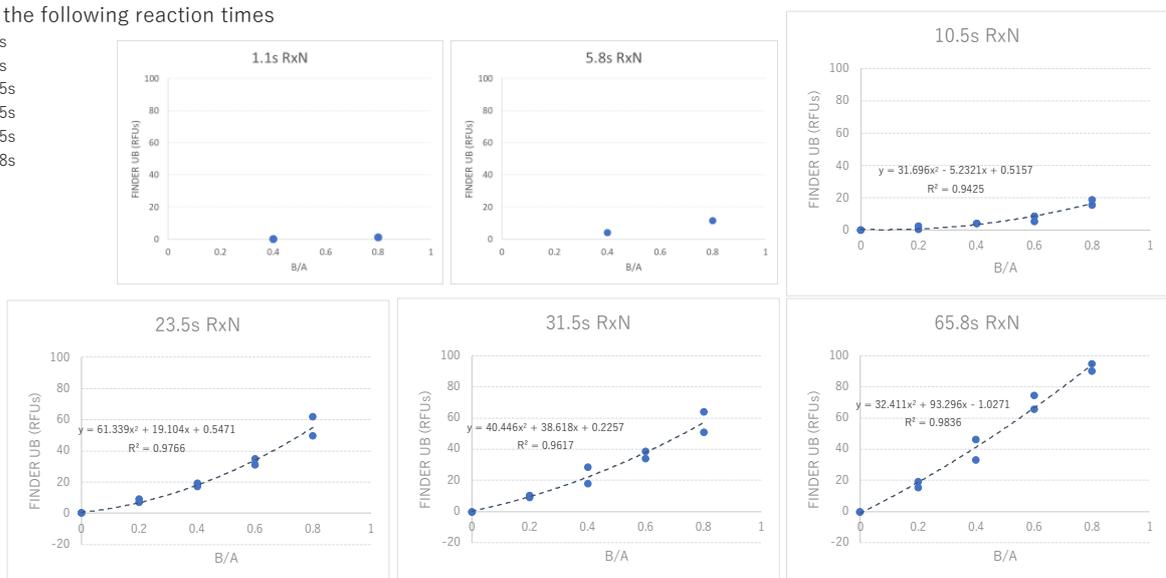


図3 最適な反応時間の検討

値は相関係数が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。

- 2) その他の解析として,
 - A) 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。CVは5%未満となることを目指す。
 - B) 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。
 - C) 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認させる。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。
- 3) 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

米国でDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた新血中UB自動測定機器で、人工ビリルビン溶液や実際の新生児血を用いて精度の検証を続けている。今後、CVが5%程度になるよう改修を行う。その後、日本での検証を行い、体外診断医薬品・医療機器としての社会実装を目指す。

文 献

- 1) Morioka I, Nakamura H, Koda T, et al. Serum unbound bilirubin as a predictor for clinical kernicterus in extremely low birth weight infants at a late age in the neonatal intensive care unit. *Brain Dev.* 2015; 37: 753-757.
- 2) Iwatani S, Nakamura H, Kurokawa D, et al. Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Sci Rep.* 2016; 6: 28489.
- 3) Iwatani S, Yamana K, Nakamura H, et al. A novel method for measuring serum unbound bilirubin levels using glucose oxidase-peroxidase and bilirubin-inducible fluorescent protein, UnaG: No influence of direct bilirubin. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 6778.
- 4) 森岡一朗, 長野伸彦, 桃木恵美子ら. 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. *日本大学医学部総合医学研究所紀要.* 2020; 8: 27-30.
- 5) 森岡一朗, 長野伸彦, 桃木恵美子ら. 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. *日本大学医学部総合医学研究所紀要.* 2021; 9: 10-12.