

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05225

研究課題名(和文) 細孔電気抵抗法と機能性ナノバイオ界面による新奇生体微粒子解析技術の創出

研究課題名(英文) A development of analytical system for biological nanoparticles using resistive pulse sensing with functional nano-biointerface

研究代表者

堀口 諭吉 (Horiguchi, Yukichi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：50609758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細孔電気抵抗法(Resistive Pulse Sensing, RPS、ポア計測)は、通過する微粒子を1つ1つ計測することが可能な技術であり、微量分析技術へと応用が期待できる。そのため、ウイルスや細菌といった病原性微粒子の早期検出や、がん由来の微粒子測定による早期診断などへの利用が期待できる。一方で、ポア計測は生物学的情報を得ることはできないため、本研究では機能性ナノバイオ界面を創製し、これを生体微粒子解析技術へ応用することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では機能性界面により、汚れが付着しにくい表面の作製や、ウイルスを捕捉する表面を作製することができた。この機能性界面を用いることでポア計測の際に孔が詰まるのを防ぐことができたほか、ウイルスがポア表面に捉えられる様子を計測することに成功した。また、がん由来の生体分子検出に有効な機能性界面の創製も実現した。これらの成果は、新しいウイルスの迅速診断やがんの早期検出に結びつく有望な技術となりうる。

研究成果の概要(英文)：Resistive pulse sensing (RPS) is an analytical technique to measure particles individually. Therefore, it can assume to be used for early diagnosis such as infection of pathogenic virus and bacteria, and tumor derived particles from a small amount of samples. On the other hand, RPS cannot measure a biological information to detect the measured particles. In this study, preparation of a functional nano-bio interface for an application to detect biological particle analysis was investigated.

研究分野：ナノ材料化学 ナノマイクロシステム

キーワード：バイオセンサー ウイルス 微量分析 界面 シアル酸 表面修飾 人工知能 迅速検査

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

我々の生活を取り巻く環境には様々な生体微粒子が存在しており、これを解析することは、ウイルス・細菌が引き起こす感染症、がんを始めとする重篤な疾患のメカニズム解明に繋がる大変重要な課題である。例えば、外因性の微粒子であるウイルスが生体に感染する際には、宿主となる生体の細胞と選択的に結合し細胞内へ侵入、増殖を引き起こすが、こうした一連の流れはウイルスや細胞表面に存在する分子同士の緻密な相互作用によって成り立っている。また、内因性の微粒子であるエクソソームは細胞間のコミュニケーションを行うのに重要な役割を果たしているとされる。これはがん化した細胞組織の拡大・転移などにも関与している可能性が示唆されているが、詳しいメカニズムについては未解明である。以上のように、生体微粒子を精細に計測することでできれば、微粒子が引き起こす生命現象を明らかにすることができる。生体応答を定量的に評価することが可能となるため、薬剤応答性など疾患の新しい治療法開発が期待できるほか、重篤な疾患の早期診断に大きなイノベーションを起こす新技術となりうる。

こうした中、近年微粒子を高感度に計測する技術が台頭し、バイオセンシングへの応用が期待されている。細孔電気抵抗法 (Resistive Pulse Sensing, RPS、ポア計測) は細孔が空いた膜で繋がった電解液の両端に電圧をかけることで生じるイオン電流を計測することで、微粒子の通過をモニタリング、カウントすることができる。そのため、ウイルス粒子の計測や<sup>1, 2</sup>、細胞由来の小胞の計測などが報告されており<sup>3</sup>、ポア計測による生体微粒子解析は世界的にも注目され、研究が進められている。一方で、ポア計測による分析で得られる粒子の情報は粒子のもつ物理的な特性のみに制約される点が本研究において問題点となっており、検出された生体微粒子が何であるかを判別できるようにすることが解決すべき課題である。

## 2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で記述したとおり、ポア計測は大変有望な微量分析技術であるが、生体由来の情報を得ることができない。また、生体微粒子は一般的にばらつきが大きいと、粒子の形状情報だけをそのまま検出技術へと応用することは非常に困難であると考えられる (図2)。一般的なバイオセンサーは、抗原抗体反応等を利用した生体間の特異的な相互作用 (分子認識) を検出することで検体を識別するため、この機構をポア計測にも組み込む必要がある。そのため、ポア計測により生体微粒子検出の際には分子認識を活用することが非常に重要である。ポア計測と分子認識機構を組み合わせた超微量分析技術は世界的にも注目度が高く<sup>4, 5</sup>、今後も発展が期待される研究領域である。一方で、リガンドの固定化方法等を含めた分子認識機構の設計など、実現に至るまでの系統立てられた基盤技術は本研究提案時点で乏しく、提案者はこれまでに培ってきたコロイド・ナノ界面技術を独自にポア計測に展開することでこれを解決していくことが本研究の目的である。

本研究の当初の予定では、ナノ材料をプローブとした生体相互作用検出を想定していたが、ポア表面側を分子修飾することで直接生体相互作用を検出する手法が研究過程で有効であることを見出したため、これを主体とする取り組みを実施した。また、疾患検出に有効なバイオセンサー界面の創製に係る研究開発も実施した。具体的には「(1) 簡便かつ安価なポア表面機能化技術探索」、「(2) がん検出に有効なバイオセンサー界面の創製」、「(3) ポア計測におけるバイオセンシング技術開発」の3つの研究を実施した。それぞれの研究について、「3. 研究の方法」および「4. 研究成果」に示す。それぞれが各番号に対応している。

## 3. 研究の方法

(1) ポア計測の一つの課題として、詰まりの問題点が挙げられる。これは生物学的微粒子を計測する際に発生するケースが多く、計測対象とする微粒子がポア表面に付着して取れなくなってしまうほか、含まれている生体由来の夾雑物が付着するケースもある。一度このような状態に陥ってしまうと、微粒子は細孔を通過できなくなり、計測継続不能となってしまう。ポア計測における弱点はこの部分が非常に大きく、改善すべきポイントである。そこで、非特異的な吸着を抑制する分子として双性イオン (スルホベタイン) を有するチオール末端分子、Sulfobetaine3-undecanethiol (SB-SH) を修飾した。双性イオン層は近接する水分子のネットワーク構造への影響が小さく、疎水性相互作用による分子の非特異吸着を抑制する効果があることが知られている。SB-SHの固定化については過去に報告を行ったポリドーパミンをポリウレタン表面上に中間層として設け、その上にチオール基末端分子であるSB-SHをマイケル付加反応により化学的に修飾した。

ポアの詰まり抑制効果を評価する手法として、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。スルホベタインを修飾後に5 mg/mLのBSAが溶解した50 mMリン酸緩衝液 (PBS) 中に暴露し、ポアを通過するイオン電流値の経時変化を測定することでポアの詰まりについて評価した。

(2) ポア計測を高機能な生体微粒子解析技術とするためには、生体微粒子を捕捉する分子を創

製していく必要がある。とりわけターゲットとする生体微粒子は検出する価値の高いものが望ましい。そこで提案者はがん検出に着目した。がんは通常の組織と比べ、異なる性質を持っていることが知られている。例えば、死亡の原因となる転移を起こすがん細胞は、表面にシアル酸と呼ばれる糖鎖を過剰に発現していることが知られている。これはがん細胞そのものだけでなく、がん細胞から遊離した細胞外微粒子やタンパクなどに於いても同様に過剰発現しているために、これを捕捉するリガンドを創製することで、将来的にはポア計測などを用いた高機能ながん検出システムとすることが期待できる。

シアル酸を特異的に認識するリガンドとしてボロン酸が報告されており、数ある糖鎖の中でもシアル酸のみ酸性条件下で特異的に結合する。一方で結合力の弱さが課題であり、高感度化が難しい。近年、ボロン酸化合物の中でピリジン骨格をもつ「ピリジルボロン酸」が従来よりも20倍程度強い結合力を示すことが報告された。提案者はこれに着目し、金表面に密生可能なピリジルボロン酸誘導体を合成し、金表面センサー上に展開。シアル酸の吸着能について評価した。

### (3)

ポア計測におけるバイオセンシングを実現するため、ポア表面にヒトインフルエンザウイルスを認識するリガンドを固定化し、ポア計測によるヒトインフルエンザウイルス A (H1N1, PR8株) の認識実験を実施した。リガンドを固定化するにあたっては、(1) の成果により確立された分子修飾法を用いた。ポア表面上にリガンドを支持する中間層としてポリドーパミンを修飾した。糖鎖リガンドを固定化するためのリンカーとして機能するアミノオキシ基を有するチオール末端分子 (AOUT) をマイケル付加反応にてポリドーパミン層に修飾した。ヒトインフルエンザウイルスを認識する糖鎖、6'シアルルクトースをグリコプロテティングにより AOUT と化学的に結合した。リガンドが固定化されたポアを用いて、ヒトインフルエンザウイルス A のポア計測を実施した。参照実験として、鳥インフルエンザウイルスを認識する糖鎖、3'シアルルクトースを同様にポア表面上に結合し、ヒトインフルエンザウイルス A のポア計測を実施した。

## 4. 研究成果

### (1)

図1にBSA中でのポア間を流れるイオン電流値変化を示す。修飾を行っていないポリウレタン表面の場合、BSA中に暴露されると、即座に電流値が低下していることがわかる。これは、ポアの表面上にBSAが付着することで孔が塞がり、流れるイオン電流の量が減少していることに由来する。すなわち電流値の減少をポアの詰まりとして判断することができる。これに対し、ポリウレタン表面上にスルホベタインを修飾した表面の場合、BSA中に30分間晒された場合でも、電流値が減少することはなかった。これはBSAが表面に吸着することを防ぎ、ポアの詰まりが発生しなかったことを意味する。スルホベタインとは異なる原理で非特異吸着を抑制するポリエチレングリコールを修飾した場合でも、この効果は同様に現れた。以上の結果から、ポア表面を機能化することで、微粒子の計測パフォーマンスを向上させられる可能性が示された。本成果はApplied Physics Expressに掲載された<sup>6</sup>。

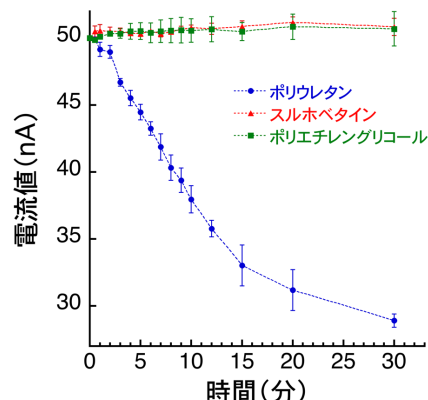


図1 5 mg/mL BSA 中でのイオン電流値変化 (n = 3)

### (2)

シアル酸を特異的に認識する評価法として SPR (表面プラズモン共鳴) センサーを用いた。図2はシアル酸タンパクとして知られるフェチュインを用いた吸着試験の結果である。フェチュインはシアル酸含有量が8wt%と非常に高く、表層はほぼシアル酸で覆われているため、シアル酸吸着試験のモデルとして適している。300 nM のフェチュインをピリジルボロン酸が固定化された表面にフローしたところ、酸性条件下 (pH5) にてフェチュインの吸着に由来する共鳴角シフトが観測された。一方でこれを中性条件下 (pH7) で実施したところ、吸着は見られなかった。このことから、この吸着がボロン酸-シアル酸に由来する結合であることが確認された。ピリジルボロン酸とシアル酸の結合定数は $10^3$ 程度と高くは無いが、高密度なシアル酸と高密度なシアル酸同士が多点で結合した結果、ナノモルオーダー

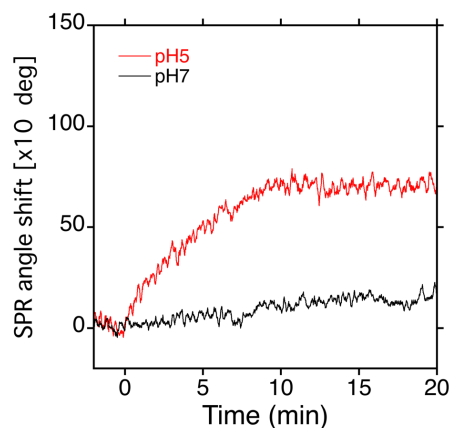


図2 SPR センサー表面上でのフェチュイン認識評価

の非常に希薄なフェチュインを捕捉することに成功したと考えられる。従来のシアル酸タンパク吸着はマイクロモルオーダーであったため、そのパフォーマンスは大幅に改善された。本成果は *Chemistry Letters* に掲載された<sup>7</sup>。

(3)

6'シアルルラクトース修飾を行ったポアを用いて計測を行った場合、ヒトインフルエンザウイルス A がポアを通過する時間は、修飾を行わない場合と比較して大幅に延長された。これはウイルスがポア表面上に存在する6'シアルルラクトースと特異的に相互作用したため、その通過時間に大きく影響したためと考えられる。対照実験として実施した3'シアルルラクトースを用いた実験と比較しても、通過時間が長いことがわかった。このことから、特異的な相互作用に由来するものであることは明らかである。さらに、ウイルス1つ1つの通過シグナルを精査したところ、ポア表面上で停止し、再び動き出す様子が電流値パターンから確認された。このことからウイルスが明確に6'シアルルラクトースと相互作用していることを確認した。一方で、これは確率的な要素を含んでいるため、相互作用の度合いはまちまちであり、長く停止するものもあれば、非常に短時間で相互作用が終わってしまうケースもある。そのため、通過時間のヒストグラムをとってみると、3'シアルルラクトースのヒストグラムと被っている領域が大きく、単純なパラメータとしてこれらを区別することは困難であった。そこで、本研究ではAIを活用し、これを識別する評価を行った。その結果、AIは6'シアルルラクトースと3'シアルルラクトースのどちらの表面で測定したウイルスのデータであるかを高い精度で識別することに成功した。こうした技術は、通過した微粒子を特定する技術として有用であり、将来的にはウイルス検出としての応用も期待できる。本研究成果はアメリカ化学会の *ACS Applied Materials & Interfaces* に掲載された<sup>8</sup>。また、東京医科歯科大学のプレスリリース記事にも当該成果が掲載された<sup>9</sup>。

<参考文献>

- ① R. Vogel, G. Willmott, D. Kozak, G. S. Roberts, W. Anderson, L. Groenewegen, B. Glossop, A. Barnett, A. Turner, M. Trau, "Quantitative Sizing of Nano/Microparticles with a Tunable Elastomeric Pore Sensor" *Analytical Chemistry*, Vol. 83, Issue 9, 2011, 3499-3506
- ② H. Wu, Y. Chen, Q. Zhou, R. Wang, B. Xia, D. Ma, K. Luo, Q. Liu, "Translocation of Rigid Rod-Shaped Virus through Various Solid-State Nanopores" *Analytical Chemistry*, Vol. 88, Issue 4, 2016, 2502-2510
- ③ A. Németh, N. Orgovan, B. W. Sódar, X. Osteikoetxea, K. Pálóczi, K. É. Szabó-Taylor, K. V. Vukman, Á. Kittel, L. Turiák, Z. Wiener, S. Tóth, L. Drahos, K. Vékey, R. Horvath, E. I. Buzás, "Antibiotic-induced Release of Small Extracellular Vesicles (Exosomes) with Surface-associated DNA" *Scientific Reports*, Vol. 7, Issue 1, 8202
- ④ R. E. Gyurcsányi, "Chemically-modified Nanopores for Sensing" *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, Issue 7, 2008, 627-639
- ⑤ R. Ren, Y. Zhang, B. P. Nadappuram, B. Akpınar, D. Klenerman, A. P. Ivanov, J. B. Edel, Y. Korchev, "Nanopore Extended Field-effect Transistor for Selective Single-molecule Biosensing" *Nature Communications*, Vol. 8, Issue 1, 2017, 586
- ⑥ Y. Horiguchi, Y. Miyahara, "Surface Modification to Suppress Small Pore Clogging in Resistive Pulse Sensing" *Applied Physics Express*, Vol. 13, Issue 11, 2020, 115002
- ⑦ Y. Horiguchi, K. Barthelmes, Y. Miyahara and A. Matsumoto, "pH-responsive Adsorption and Dissociation of Sialic Acid Expressed Protein on Boronic Acid Immobilized Surface" *Chemistry Letters*, Vol. 50, Issue 8, 2021, 1467-1469
- ⑧ Y. Horiguchi, N. Naono, O. Sakamoto, H. Takeuchi, S. Yamaoka and Y. Miyahara, "Methodology to Detect Biological Particles Using a Biosensing Surface Integrated in Resistive Pulse Sensing" *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 14, Issue 17, 2022, 20168-20178
- ⑨ 東京医科歯科大学プレスリリース「ウイルスをバイオセンサーで捉え、AI で読みとく」【堀口諭吉 非常勤講師】 <https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220510-1/>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horiguchi Yukichi、Miyahara Yuji	4. 巻 13
2. 論文標題 Surface modification to suppress small pore clogging in resistive pulse sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 115002 ~ 115002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1882-0786/abdb4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Yukichi、Barthelmes Kevin、Miyahara Yuji、Matsumoto Akira	4. 巻 50
2. 論文標題 pH-responsive Adsorption and Dissociation of Sialic Acid Expressed Protein on Boronic Acid Immobilized Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.210229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Yukichi、Naono Norihiko、Sakamoto Osamu、Takeuchi Hiroaki、Yamaoka Shoji、Miyahara Yuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Methodology to Detect Biological Particles Using a Biosensing Surface Integrated in Resistive Pulse Sensing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 20168 ~ 20178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmi.1c25006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堀口諭吉、宮原裕二
2. 発表標題 微粒子計測技術向上を目的とした機能性ポリマー界面形成
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口 諭吉、宮原 裕二
2. 発表標題 細孔を用いた電気抵抗法による微粒子計測技術への分子修飾手法開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口 諭吉
2. 発表標題 機能性界面付与による微粒子計測技術のパフォーマンス制御
3. 学会等名 第27回次世代医工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukichi Horiguchi, Norihiko Naono, Osamu Sakamoto, Hiroaki Takeuchi, Shoji Yamaoka, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Molecular Recognition Gives the Biological Information to Particle Analysis
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukichi Horiguchi, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Hiroaki Takeuchi, Shoji Yamaoka, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Specific Detection of Human Influenza Virus Using Resistive Pulse Sensing with Nanoparticle-based Molecular Recognition
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics & BioElectronics (MBE10) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 諭吉、直野 典彦、坂本 修、武内 寛明、山岡 昇司、谷口 正輝、鷺尾 隆、宮原 裕二
2. 発表標題 高分子層に展開した分子認識界面とAIによるウイルス検出技術の開拓
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 諭吉、直野 典彦、坂本 修、武内 寛明、山岡 昇司、谷口 正輝、鷺尾 隆、宮原 裕二
2. 発表標題 分子認識界面とAIテクノロジーを応用したウイルス粒子計測技術の創出
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukichi Horiguchi, Kevin Barthelmes, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto
2. 発表標題 Simple Functionalization Technique for Extremely Small Pore via Polydopamine Layer
3. 学会等名 Material Research Meeting 2021 (MRM2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------