

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22860046

研究課題名（和文） バイオマーカー分析に用いる脂質膜センサの開発

研究課題名（英文） Development of sensor based on lipid/polymer membrane for biomarker detection

研究代表者

田原 祐助 (TAHARA YUSUKE)

九州大学・システム情報科学研究院・学術研究員

研究者番号：80585927

研究成果の概要（和文）：ストレス疾患の指標である唾液バイオマーカーのコルチゾール、DHEA等のステロイドホルモンを分析可能な脂質高分子膜センサの開発を行った。脂質高分子膜の組成や抗原抗体反応を利用する事で、コルチゾールの検出を実現した。また、センサチップの小型化に成功し、サンプル量の低減、短時間分析の実現可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Salivary biomarker such as cortisol and dehydroepiandrosterone are increasingly used as an index of the body's neuroendocrine response to stressors. We developed and evaluated a sensor for biomarker detection using a lipid/polymer membrane or antigen-antibody reactions. A miniaturized sensor chip including lipid/polymer membrane was fabricated. It was indicated that the sensor chip can provide sensing performance with low sample volume and short-term analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2011年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：計測工学

キーワード：バイオマーカー，脂質高分子膜，センサ

1. 研究開始当初の背景

我が国における自殺者は、1998年に3万人を突破し、現在もその水準で推移していることが厚生労働省から報告されている。現代社会はストレス社会であり、長期的なストレスや疲労の蓄積によって、うつ病や慢性疲労症候群などを発症するといった深刻な社会問題がある。こうした社会問題は、日本だけに

とどまらず、世界中で問題視されており、医療、福祉の領域において解決すべき重大課題となっている。脳科学、遺伝学といった研究分野において、精神疾患の分子メカニズムが解明されつつあり、将来的な治療法等の開発が期待されている。現在、唾液バイオマーカーとストレス性疾患との関連性が医学系・疫学系研究者を中心として報告されており、特にステロイドホルモンであるコルチゾール

や DHEA がストレス性疾患の指標として注目されている。

ステロイドホルモンであるコルチゾールや DHEA の測定方法は、様々な研究機関で実施されており、エレクトロノフォレシス、マイクロ電気泳動、ELISA 等のイムノセンサがある。しかし、誰にでも使用可能で即時性を可能とする定量技術は確立されていない。それは、唾液中コルチゾールや DHEA の分子量が小さく(約 360)、分子を高感度に認識する抗体を用いても、直接的な分子の捕捉が困難であることがその要因となっている。そのため、目的物質を蛍光タンパクや酵素等で標識したコンジュゲート(標識化抗原)と被測定物質を競合的に抗体と反応させることで(競合法)、間接的に分析を行っている。さらに、試料の前処理や、複雑な測定手順、高度で大型の分析装置が必要なことから、専門家でない扱うことができない。

2. 研究の目的

ストレス性疾患の研究として、視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA) の異常によるステロイドホルモンの分泌異常が確認されており、疾患の指標として注目されている。本研究の目的は、ストレス疾患の指標である唾液バイオマーカーのコルチゾール、DHEA 等の脂溶性ステロイドホルモンを 10 分以内で分析可能な、誰にでも簡便に使用できる脂質高分子膜センサを開発することである。

3. 研究の方法

①脂質高分子膜組成

脂質高分子膜は有機溶剤を用いて、脂質、可塑剤、支持剤(高分子)を溶解し、乾燥することでシート状に成型した。脂質高分子膜センサは、孔を設けた塩化ビニル製ハウジングに、銀/塩化銀電極、3.3M KCl 飽和塩化銀溶液を封入し、作製した脂質高分子膜を孔部分(溶液接触面)に貼付することで作製した。バイオマーカーを含む溶液中に脂質高分子膜センサと参照電極を浸し、電気化学アナライザで膜電位測定を行った(図 1)。対象物質としてコルチゾールを選定し、物理・化学的相互作用による膜電位変化を引き起こす脂質高分子膜組成を検討した。

②抗原抗体反応を利用した検出方法の検討

脂質高分子膜の将来的な感度や選択性の向上を見据え、抗原抗体反応を利用したコルチゾール検出の検討を行った。評価方法として表面プラズモン共鳴 (SPR) センサを用いた(図 2)。金薄膜表面にコルチゾールに類似した物質を自己組織化単分子膜 (SAM) を介して

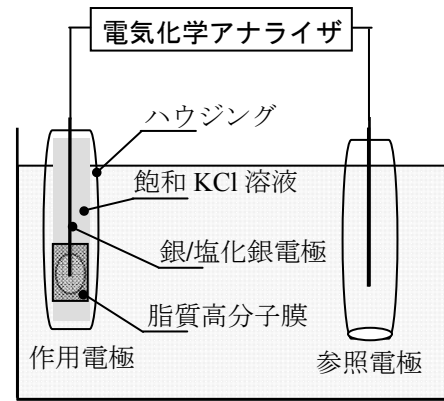


図 1 膜電位測定システム

固定化した。次に抗コルチゾール抗体の溶液を流路に流し抗体の結合量(共鳴角変化) $\Delta\theta_0$ を測定する。続いてコルチゾールと抗体を混合し反応させた溶液を流路に流し、抗体の結合量(共鳴角変化) $\Delta\theta_1$ を測定する。抗体はコルチゾールか類似物質の一方と結合、コルチゾールと類似物質は結合しないため、コルチゾールと抗体が結合すると類似物質に結合する抗体の数は減少し、抗体の結合量 $\Delta\theta_1$ は $\Delta\theta_0$ に比べて低くなる。この 2 種類の結合量の比を抗体結合率 $\Delta\theta_1/\Delta\theta_0$ として測定を行った。

③センサチップの試作

脂質高分子膜センサのマルチチャンネル化を実現するために、プラスチック基板電極上(25 mm×40 mm)に直径 4.5 mm の脂質高分子膜チャンネルを 5 個設置した。プラスチック基板電極はプラスチック板に Ti/Ag をスパッタで堆積し、フォトリソグラフィーでパターンニングを行った。チャンネル部は、銀塩化銀、固体電解質、脂質高分子膜の順に積層させた構造とした(図 3)。

4. 研究成果

①脂質高分子膜組成

脂質高分子膜の作製において、負の電荷を持つ phosphoric acid di-n-decyl ester (PADE)、正の電荷を持つ trioctylmethylammonium

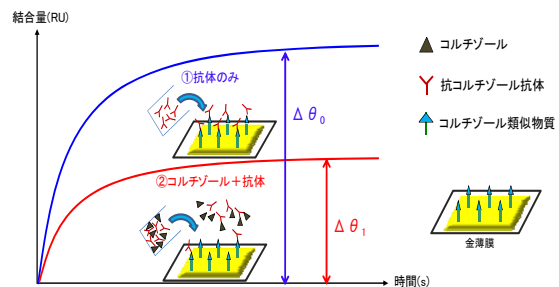


図 2 SPR センサ (間接競合法) を用いたコルチゾール検出

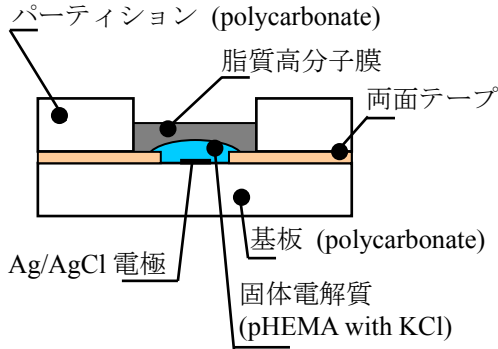


図3 脂質高分子膜チャンネルの構造

chloride (TDAC), 正の電荷を持ち, かつ TDAC と比較して疎水性が高い tetradodecylammonium bromide (TDAB) の計 3 種類を脂質として用いた. 10 ml テトラヒドロフラン (THF) に 1 mM の各脂質, 可塑剤として 1 ml dioctyl phenylphosphonate (DOPP), 高分子として 800 mg PVC を混合して溶解し, シャーレで完全に乾燥したものを脂質高分子膜として用いた. ポリ塩化ビニル製の中空棒に, 作製した脂質高分子膜を貼付し, 銀/塩化銀電極と内部液 3.3 M KCl 飽和 AgCl 溶液を封入したものをセンサ電極として使用した. また, 参照電極としてガラス製の銀塩化銀電極を用い, サンプル溶液の電位を計測した. 測定サンプルとして 0.01 - 1.0 mg/ml コルチゾールを用いた. 結果を図 4 に示す. 3 種類すべての脂質においてコルチゾールの濃度が高いほど応答電位が高く, TDAB, TDAC, PADE の各センサの順に高い応答電位が得られた. 従って, コルチゾールに対し, TDAB および TDAC が疎水性相互作用を起こすと考えられた. 従って, コルチゾール検出には, 正の電荷を持ち, かつ高い疎水性を持つ TDAB を混合した脂質高分子膜が適することが明らかとなった. さらに, TDAB の濃度による応答電位の違いを確認するために脂質に 0.02 - 5.0 mM TDAB, 可塑剤に 1 ml DOPP, 高分子として 800 mg PVC を用いて脂質高分子膜を作製し, コルチゾールに対する応答電位を計測した. TDAB の濃度とセンサの応答電位の関係を図 5 に示した. TDAB の濃度に依存して応答電位の値が高くなっていくことが分かった. また, 応答電位は, TDAB が 3 mM 以上で飽和した.

②抗原抗体反応を利用した検出方法の検討

アミンカップリング法により, コハク酸ヒドロコルチゾン (コルチゾール類似物質) の固定化を行った. 次に, コルチゾールを含まない抗体溶液 (15 $\mu\text{g/ml}$) および 1, 10, 100, 1000 ng/ml に希釈したコルチゾールと 15 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した抗コルチゾール抗体を 1 : 1 で混合し 15 分間反応させた後, 流路に流し

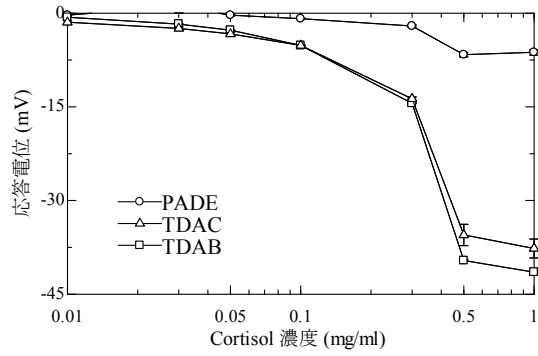


図4 脂質高分子膜と応答電位

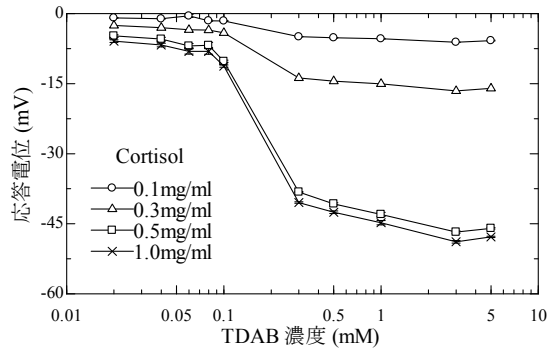


図5 脂質濃度と応答電位の関係

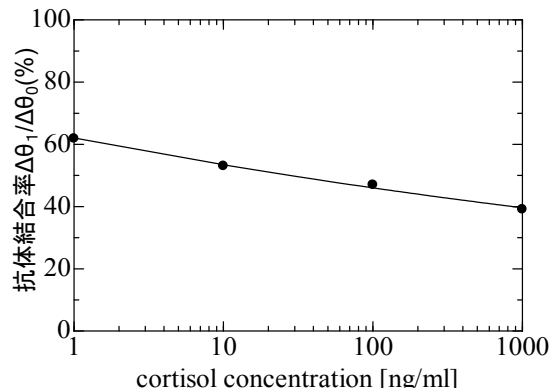


図6 コルチゾールの抗体結合率

測定を行った. 結果を図 6 に示す. 直接法で, 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 間接競合法で 1.0 ng/ml のコルチゾールの検出が可能であり, 間接競合法による測定が直接法より高感度である事が確認出来た.

③センサチップの試作

脂質高分子膜センサのマルチチャンネル化を実現するために試作したセンサチップは, 安定した膜電位応答を示し, 目標とするセンサ性能を満たした. 電位測定は, 1 サンプル当たり前処理含め 10 分程度で計測可能であった. また, 脂質高分子膜の直径 (受容部)

は 4.5 mm 程度であり，測定に必要なサンプル量の低減 (数百 μl 程度)が十分に期待される結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 田原 祐助：感性ナノバイオセンサに関する研究，心身ストレスに関する学術研究集会 2011，2011 年 9 月 10 日，ホテル安比グランド本館
- (2) 切通 哲郎，田原 祐助，都甲 潔：平成 23 年度電気関係学会九州支部連合大会，2011 年 9 月 26 日，佐賀大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 祐助 (TAHARA YUSUKE)
九州大学・システム情報科学研究院・学術研究員
研究者番号：80585927