

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 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710125

研究課題名（和文） 人工ナノレセプター粒子を用いたアルツハイマー病早期診断
非標識検知チップの開発研究課題名（英文） Development of label-free biochip for early diagnosis of Alzheimer's
disease using artificial nano-receptor particles

研究代表者

瀧脇 雄介（FUCHIWAKI YUSUKE）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：80468884

研究成果の概要（和文）：分子インプリンティング法による人工ナノレセプターを用いて、アルツハイマー病疾患マーカーのタウ蛋白を非標識で簡便に検知できるバイオチップの開発を行った。レセプター表面への非特異的吸着を抑制するため、アミノ基とホスファチジルコリン類似基由来のポリマーを新規に合成し、S/N比を増強させる事に成功した。分子認識界面を高精度に作製するため、インクジェット技術を新たに導入し検討を行ったところ、従来より約3倍バラつきを低減させる事ができるようになった。

研究成果の概要（英文）：We studied to develop a novel label-free biochip device for early diagnosis of Alzheimer's disease using molecularly imprinted-based artificial receptors. In order to improve the nonspecific adsorption on surface of nano-artificial receptors, the newly functional polymer, which includes both phosphorylcholine and amino groups, was synthesized and accomplished to increase signal to noise ratio. Ink-jet printing technology has been included for the accurate preparation of bio-recognition interface, and got in about three times lower variations from calibration curves as compared to previous studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：バイオチップ

1. 研究開始当初の背景

（1）テーラーメイド医療や再生医療の実現を目指し、容易に薬効予測や治療後の経過観察を行う、ポイント・オブ・ケア（POC）検査用のバイオチップを開発する研究は日進月歩で行われているが、早期に診断を可能とするセンサ型のバイオチップは、結果のバラつきや効果判定の不確実性、使い勝手の悪さ

など、様々な技術課題を解決する事が求められている。しかし、天然の生体分子認識素子は至適な pH や温度等、リガンドと特異的に結合する環境を準備・維持する必要があるため、POC 検査に資する実用的なバイオチップを開発する上で困難である。これに対し、生体反応特有の「かたち」をナノスケールで人為的に模倣する、分子インプリンティング法(MIP

法)と呼ばれる技術を駆使すれば、生体分子に必要とされる環境を準備せずとも、リガンドを特異的に結合・認識できるため、本技術を用いた応用研究が注目されている。

2. 研究の目的

(1) 高機能バイオメテック材料を合成し、標識剤等を使用せず、化学的安定に POC 検査を行う事ができる、新しいバイオチップを開発する事を目的とする。抗体等の生体分子素子に比べ、MIP はポリマーの網目構造内の単位容積あたりに対する、リガンドの特異的結合部位数が多いため、濃縮効果による高感度化と、非特異的吸着を抑制する親水性ポリマーをシームレスに MIP レセプターへ導入する事により、高感度で高精度なバイオチップの作製を目指す。

(2) 厚生労働省は国内のアルツハイマー (AD) 病患者数が、2050 年には 500 万人に達すると試算しており、臨床医療等の分野で POC 検査を用いてこれらを早期に診断できる技術の成熟化が、強く要望されている。本研究では、AD 病のサロゲートバイオマーカーであるタウ蛋白を、MIP レセプターで迅速・高精度に検知する事を目的に検討を行う。

3. 研究の方法

(1) MIP 法は、リガンド分子に対する鑄型を作るモノマー等を共に混在させ、自己凝集化によって材料合成を行う鑄型合成技術であり、簡便で安価に調製できる事を特徴とする。しかし、タンパク質のような巨大分子で表面に電荷を持つ官能基が多く存在する場合、タンパク質通しが凝集する事による非特異的な相互作用の影響を受けたり、又は、架橋反応後に鑄型構造を保持しつつ、テンプレート分子を可逆的に取り除く事が困難になる。そこで、タンパク質の形状追随性をナノスケールで維持するため、MIP レセプターの調製条件を局在型プラズモン共鳴法 (LSPR) を利用して評価・検討を行った。LSPR は、ナノメートル貴金属構造体より観察される光学現象であり、標識に伴う煩雑な操作が不要、リアルタイムな高感度測定が可能、小型かつ安価等の優位点を有する。

(2) LSPR 応答を多角的に検出するため、複数の MIP チップを合成し、チップ毎に結合パターンを多変量解析する事で評価法を検討する。MIP の合成は、アクリルアミド系の水溶性モノマーを用いて合成を行ったが、MIP 膜への非特異的な吸着を抑制するため、MIP 膜へ簡便に導入する事が可能な官能基を有する、ホスファチジルコリン類似基由来のポリマーを新規に合成する事を検討した。

4. 研究成果

(1) 金キャップナノ構造チップを作製するために、金基板表面へ粒径 100 nm のシリカ微粒子を展開し EDC を用いて共有結合させ、LSPR 応答により粒子密度の制御を検討した。その結果、展開させるナノ粒子が増加するにつれ、粒子の密度制御が困難になったため、安定なナノ構造体をスルーポットに作製できない事が判明した。

そこで改善策として、ナノインプリンティング法を用いて金キャップナノ構造体を作製したところ、最高で 50 nm の解像度を有するチップの作製に成功した。これにより、チップのセンシング面積を広くし、かつ高いスルーポット量産性が可能なバイオチップ基板を得た (図 1)。実際に作製された金キャップナノ構造体チップで LSPR 応答を観察したところ、良好な検出応答を得られる事が分かった。

次に、タウ蛋白に対する MIP ポリマーを合成し、LSPR 応答による吸着評価を検討した。その結果、残存する非特異的吸着の程度により LSPR の光学現象が大きく干渉され、検出応答がバラつく事が分かった。

そこで非特異的吸着の抑制が期待できるホスファチジルコリン類似基とアミノ等の官能基を有するポリマーを新規に合成し、S/N 比の増強が可能であるかを検討した。その結果、新規に合成したポリマーは非特異的吸着を抑制できるだけでなく、高分子電解質的性質により、タンパク等の大きな分子を選択的に認識する上で、静電的に吸着をコントロールする事ができる事が分かった。

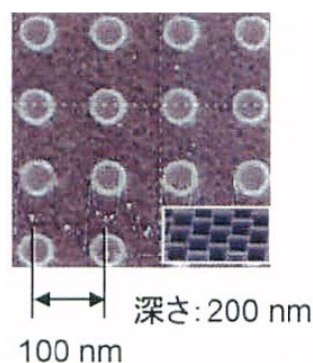


図 1: 金キャップナノ構造体に基づいた MIP バイオチップデバイス

(2) 金キャップナノ構造体チップの上に、抗体分子と MIP 薄膜を各々調製し表面状態を比較した。抗体固定界面は、数百ナノメートルの表面凹凸構造が認められたが、MIP 界面はそれら凹凸構造が殆ど認められなかった。そこで、MIP の調製工程に必要な重合時間を 0.1-5.0 分の間で検討を行ったところ、2 分以下の時にターゲット分子の吸着に伴う僅

かな LSPR 応答が認められはじめた。

抗体固定チップでは自己組織化単分子膜 (SAM) を介し共有結合的に素子を固定化させるが、MIPR チップは金キャップナノ構造体表面でランダムにテンプレート分子を配置・重合させる事により薄膜を調製し固定化させるため、ターゲット分子を捕捉する結合サイトの分布や、その密度を抗体固定界面のよう化学的に配置・制御する事が困難である。よって、LSPR 応答によるバックグラウンドと S/N 比がチップ毎に大きくバラつくため、多角的なプロファイリング解析を正確に行う事が困難である事が分かった。

そこで、この問題を解決するため、化学結合によりテンプレート分子を予め SAM 表面に共有結合的に固定化し、MIP がナノオーダーの薄膜になるよう、重合時間と作製工程の条件を変える事で結合サイトの分布と密度を化学的に制御し、バラつきの低減が可能であるかを検討した。又、テンプレート分子を固定化する際に、ピコリットルオーダーで素子を正確に配置できるインクジェットプリント技術を新たに活用し MIP チップを作製した。

その結果、重合時間が 0.5 分の時に、バックグラウンドのバラつきが従来より約 3-4 倍低減させる事が可能である事が分かった。同時に、シグナル値の低下も観察されたが、全体として S/N 値は増加したため、プロファイリング化による高精度な検知のための良好な結果を得るに至った。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yusuke Fuchiwaki, Mikito Yasuzawa
Immunosensor Accuracy is Improved by Coating Beads with Poly-2-[3-(Methacryloylamino)Propylammonio]Ethyl 3-Aminopropyl Phosphate, Anal. Lett., 査読有、45 巻、2012、pp. 262-271、
DOI:10.1080/00032719.2011.633180
- ② Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota, Yusuke Fuchiwaki, Yuko Nakane, Characteristics of Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Thin Layer for Bisphenol A and Response of the MIP-Modified Sensor, ISRN Materials Science, 査読有、Vol.2012 (2012), 6 pages
DOI: 10.5402/2012/861643
- ③ Yusuke Fuchiwaki, Yuichi Yabe, Yoshinori Adachi, Masato Tanaka, Kaori Abe, Tomonori Nakahara, Yuji Yamachoshi, Masatoshi Kataoka, Toshihiko Ooie, Fabrication of the printed microchip

toward point-of-care testing, Chemical Sensors, 査読無、28 Supplement A 巻、2012、pp. 58-60、

URL:<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2012/2012a-abt.htm>

- ④ Yusuke Fuchiwaki, Mikito Yasuzawa, Norimichi Futagami, Kotaro Rikitake, Improvement of accuracy in flow immunosensor system by introduction of poly-2-[3-(methacryloylamino)propylammonio]ethyl 3-aminopropyl phosphate, Journal of Sensors, 査読有、V01.2011 (2011) 10 頁
DOI: 10.1155/2011/507047
 - ⑤ Yusuke Fuchiwaki, Mikito Yasuzawa, Flow immunosensing system utilizing antibodies immobilized on beads coated with poly-2-[3-(methacryloylamino)propylammonio]ethyl 3-aminopropyl phosphate, Sensors and Actuators A, 査読有、170 巻、2011、pp.100-105、
DOI: 10.1016/j.sna.2011.05.025
 - ⑥ 安澤幹人、二神規道、瀧脇雄介、藪谷智樹、本仲純子、Selectivity and Regeneratability Evaluation of Antigen Analogous-Modified Surface Film for Polychlorinated Dibenzodioxin Immunosensor Using Surface Plasmon Resonance Measurement, Bunseki Kagaku, 査読有、60 巻、2011、pp.81-86、
DOI: 10.2116/bunsekikagaku.60.81
 - ⑦ Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota, Yuko Nakane, Tomoyuki Kanematsu, Yusuke Fuchiwaki, bisphenol A インプリントポリマー薄膜の特性とセンサ応答, Chemical Sensors, 27 Supplement A 巻、査読有、2011、pp.19-21、
URL:<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2011/2011a-abt.htm>
 - ⑧ Izumi Kubo, Nobuyuki Yokota, Yuko Nakane, Yusuke Fuchiwaki, The establishment of bisphenol A (BPA) sensing system utilizing molecularly imprinted polymer receptor and electrochemical determination, International Journal of Electrochemistry, 査読有、Volume 2011 (2011), 4 pages
DOI: 10.4061/2011/534936
- [学会発表] (計 2 件)
- ① 瀧脇雄介、矢部雄一、安達良紀、田中正人、阿部佳織、中原伴徳、山瓶子勇次、片岡正俊、大家利彦、Point of Care (POC) 診断用プリントドマイクロチップの構築、第 53 回化学センサ研究発表会、2012 年 3 月 29 日、静岡県

②田中正人、出島秀一、中原伴徳、舘脇雄介、
大家利彦、パルスインジェクター、
BioJapan 2011、2011年10月5日、神奈
川県

[図書] (計1件)

① 舘脇雄介、久保いづみ、INTECH、
Biomimetics, Learning from nature、2010、
pp. 365-378

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘脇 雄介 (FUCHIWAKI YUSUKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・研究員

研究者番号：80468884