

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20476

研究課題名（和文）複数のシグナル増幅機構で駆動する迅速・高感度な膜透過型マルチイムノアッセイ

研究課題名（英文）Rapid and sensitive membrane-based immunoassay driven by multiple signal amplification mechanisms

研究代表者

奥山 浩人 (Okuyama, Hiroto)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：80961101

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高感度かつ実践的な医療検査を指向し、多孔質膜を基盤として用い、光学シグナルと圧力シグナルの両方で分子検出が可能なバイオセンサーの設計を行った。本研究で開発されたバイオセンサーは、光学シグナル、圧力シグナルをアウトプットに用いた場合、それぞれpg/ml及びng/mlの感度で分子検出が可能であり、その有用性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発したイムノセンサーは、圧力変化及び色変化をシグナルとして利用することができ、さらに両者の検出レンジは1000倍近く異なる。本センサーを応用することで、検出レンジの異なる複数の標的分子を、同時かつ異なるシグナルアウトプットで検出することが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, biosensors with high sensitivity and practical rapidity were designed, using porous membranes as the substrate. This sensor enabled the detection of target biomolecules by both optical and pressure signals. The biosensor developed in this study was able to detect molecules with a sensitivity of pg/ml and ng/ml when optical and pressure signals were used as outputs, respectively.

研究分野：膜工学

キーワード：バイオセンサー 多孔質膜 抗原抗体反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症の広がりや少子高齢化社会の到来により、患者の身の回りで簡便かつ高感度に検査を行うことが可能な、先進的なバイオセンサーが求められている。現在、バイオセンサーのほとんどは光学シグナルもしくは電気化学シグナルを用いて分子検出を行っている。しかし既往手法は、単一シグナルをアウトプットに用いるため、複数の標的分子を多様な検出レンジで検査するマルチアッセイへの展開が困難であるという課題があった。この問題を解決するためには、異なる標的分子を複数のシグナルと検出レンジで検出する新しい手法が必要である。

2. 研究の目的

先進的な医療診断に向けて、複数のシグナルアウトプットの適用が可能なバイオセンサーを開発する。センサー基盤には多孔質トラックエッチング膜を用い、微細孔中に抗体が集密化された反応場へ検体を積極的に透過させて迅速性と高感度を両立する。さらに、細孔内酵素反応に基づく光学シグナルによる分子検出に加え、細孔内でのポリマー結合と細孔閉塞に基づく圧力シグナルの利用が可能な分子検出システムの構築を目指す(図1)。

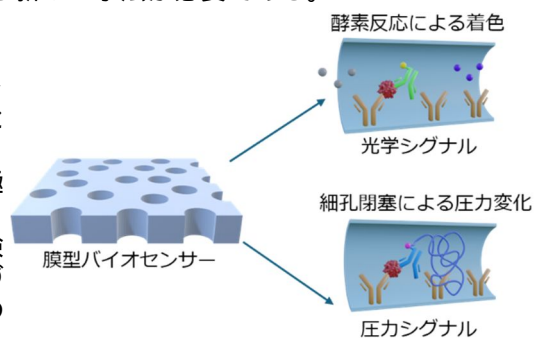


図1. 本研究のコンセプト図

3. 研究の方法

(1) 光学シグナルを用いたバイオセンシング

膜型バイオセンサーを作製するために、プラズマグラフト重合法を用いて膜細孔内に poly(glycidylmethacrylate) (GMA) ポリマーを導入した。さらにエポキシ基の開環反応により、ポリマー側鎖にアジドを導入した。レセプターである捕捉抗体には、環状アルキン構造を導入し、さらに Cu-free click 反応により、細孔内へ高密度に抗体を固定し、センサーを作製した。分子検出試験では、Interleukin-6(IL-6)をモデル標的分子として、抗原溶液、二次抗体溶液、基質溶液をシリンジポンプによって順次膜へ透過した(合計試験時間 45 分)。透過された基質溶液を紫外可視(UV/vis)分光装置により分析し、光学シグナルの強度を確認した。

(2) 圧力シグナルを用いたバイオセンシング

まず、細孔閉塞を駆動する機能性ポリマーとして、末端に標的分子との反応部位を有する poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAM)を原子移動ラジカル重合法によって合成した。また、膜細孔内には、上記と同様に、標的分子に対するレセプターをプラズマグラフト重合によって導入した。

分子検出試験の実証試験では、モデル標的分子として streptavidin を、モデルレセプターとして biotin を使用した。作製した膜型センサーに対し、標的分子溶液、ポリマー溶液を順次透過した(合計試験時間: 最大 60 分)。透過中の入り口側水圧を、圧力センサーを用いて経時的にモニタリングし、圧力シグナルの強度を確認した。試験装置は図2の通りである。

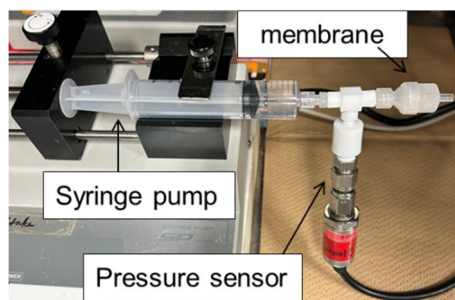


図2. 膜型センサーの分子検出試験装置

4. 研究成果

(1) 光学シグナルを用いたバイオセンシング

プラズマグラフト重合では、溶液透過性を維持するために、細孔体積に対して約5%のポリマーを導入した。GMA ポリマーの導入およびアジド基導入反応の進行は、フーリエ変換赤外分光法を用いて確認した。抗体導入ステップでは、蛍光標識抗体を固定後、膜断面を蛍光顕微鏡で確認することで、高密度な抗体固定を確認した(図3)。

分子検出試験では、最終的に得られた基質溶液を UV/vis 分光法で分析したところ、透過させた IL-6 の濃度に応じて 650 nm 付近の吸光度が増大し、青色の光学シグナルが生じた。結果的に、本システムでは 5pg/ml 程度の高感度を実現することが可能だった。一方で、人口唾液などの複雑なサンプルを使用した場合、生体分子の膜への吸着によるノイズが生じ、感度が大幅に低下する現象が見られた。そこで、グラフトポリマー中に、超親水性の防汚ポリマーとして知られる 2-

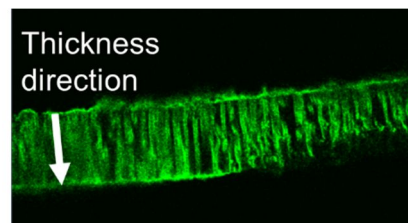


図3. 膜断面の蛍光像

Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)ポリマーを共重合することで、吸着を抑制することに成功し、感度の向上を実現することにも成功した。

(2) 圧力シグナルを用いたバイオセンシング

シグナル増幅に用いる PNIPAM として、分子量 6000–19000 のポリマーを合成した。それぞれのポリマーに対し、HABA 法を用いてアビジンへの結合性を確認したところ、分子量による結合数の変化は見られなかった。したがって、分子検出試験では細孔閉塞が最も起こりやすい $M_n=19000$ のポリマーを用いることとした。

分子検出試験における圧力シグナル測定結果を図 4 に示す。標的分子を透過した際には、標的自身の体積効果により、わずかな圧力増加がみられた。それに対し、続いて増幅素子である PNIPAM を透過したところ、PNIPAM が細孔内の標的分子に結合することでさらに圧力増加が起こり、結果的に初期の 3.3 倍の圧力増加が生じた。さらに、温度変化を与えたところ、圧力値が初期値付近まで低下したことから、圧力シグナルが PNIPAM によってもたらされていることが実証された。

さらに、streptavidin の濃度を変化させて、連続的に圧力測定試験を行ったところ、図 5 に示す検量線を作成することができた。この結果から、このシステムを用いた場合、ng/ml 領域の標的分子を測定できることが明らかとなった。

以上より、膜型バイオセンサーを用いて光学シグナルおよび圧力シグナルを用いた分子検出を初めて実証した。さらに、それぞれの増幅法では、検出範囲が pg/ml および ng/ml であったことから、将来的には異なる濃度領域を有する複数の標的分子を検出するシステムが期待される。

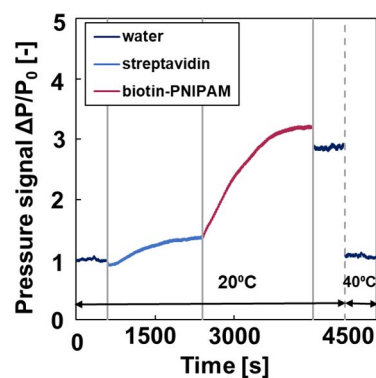


図 4. 圧力シグナル測定結果

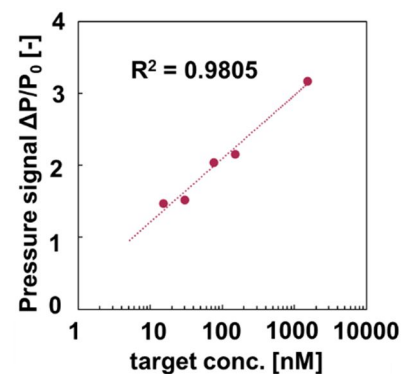


図 5. 圧力シグナル法における検量線作成結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Hiroto Okuyama, Yuhei Oshiba, Takeo Yamaguchi
2. 発表標題 Membrane-based Biosensor Towards Highly Sensitive and Rapid Medical Diagnosis
3. 学会等名 International Congress on Membranes & Membrane Processes 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuya Takemura, Hiroto Okuyama, Takeo Yamaguchi
2. 発表標題 Systematic design of membrane-based biosensor with high signal output
3. 学会等名 International Congress on Membranes & Membrane Processes 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Yamashita, Hiroto Okuyama, Takeo Yamaguchi
2. 発表標題 Immunosensor using porous membrane with enhanced antifouling properties for diagnostic
3. 学会等名 International Congress on Membranes & Membrane Processes 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田佳那, 奥山浩人, 山口猛央
2. 発表標題 細孔内におけるシグナル増幅を用いた新規膜型バイオセンサの開発
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田畑絵梨佳, 奥山浩人, 山口猛央
2. 発表標題 多孔質膜細孔を反応場とする電気化学アプタセンサーの開発
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥山浩人, 山口猛央
2. 発表標題 高速かつ高感度な分子検出が可能な膜型バイオセンサーの開発
3. 学会等名 日本膜学会第45年会・膜シンポジウム2023合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下浩輝, 奥山浩人, 山口猛央
2. 発表標題 優れたアンチファウリング性と分子認識能を持つ膜型イムノセンシング
3. 学会等名 化学工学会第89回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田畑絵梨佳, 奥山浩人, 山口猛央
2. 発表標題 多孔質膜細孔を分子認識場とする新規電気化学アプタセンサーの開発
3. 学会等名 化学工学会第89回年会
4. 発表年 2024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
---------	---------