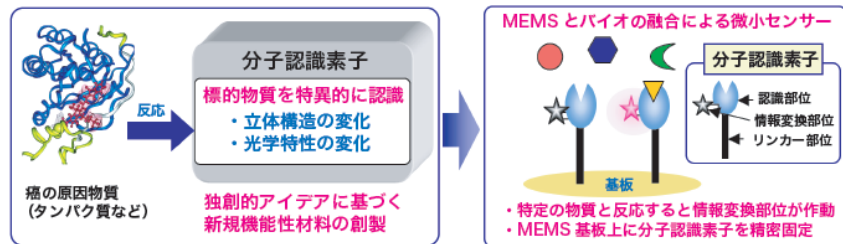


(2) バイオ材料(タンパク質など)の選択的修飾技術(独立行政法人産業技術総合研究所)

1. 研究の概要

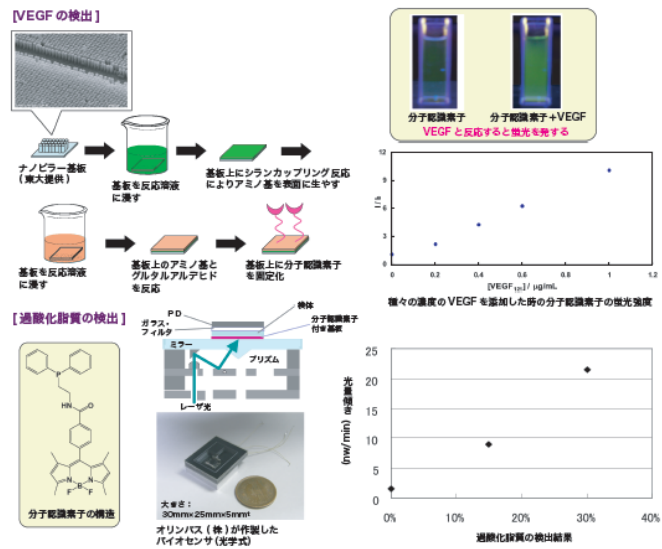
特徴

本研究では、①MEMS 基板上において、癌細胞の増殖・転移さらには種々の生活習慣病と密接に関係する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの疾病関連マーカータンパク質、ヒドロキシシノール酸(HODE)などの酸化傷害バイオマーカーなどの生体分子を特異的に認識し、光学特性の変化といった物理的シグナルを用いて検出するための分子認識素子の構築、②MEMS 基板などの担体上への分子認識素子の固定化法の開発および③微細加工プロセスと融合し、MEMS の技術を利用したバイオセンサーへの適応の可能性を示した。



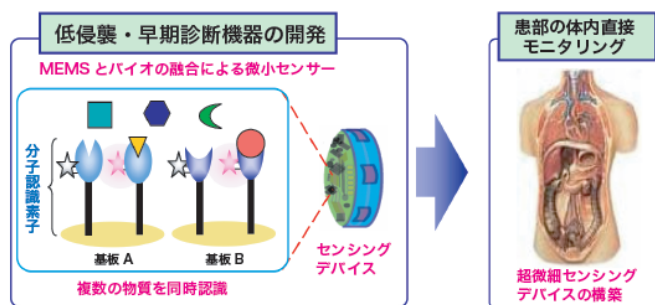
技術内容・特性

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を検出するための分子認識素子の開発については、VEGF を認識した時のみ蛍光を示す新規分子認識素子の開発に成功した。開発した素子を金基板および東京大学下山研究室が作製したナノピラー基板に固定化し、表面プラズモン共鳴法と蛍光法を用いて、VEGF との反応によるシグナルを確認した。過酸化脂質を検出するための分子認識素子の開発については、トリフェニルフォスフィンと BODIPY から構成される新規分子認識素子の開発に成功した。また、オリンパス(株)が作製した蛍光検出用センサモジュール内に分子認識素子を固定化し、エバネッセント励起法による過酸化脂質の検出を確認した。



用途・目的

癌をはじめとした疾患は複数の原因物質が共同的に作用している。そこでこれらの原因物質を特異的に認識する複数種の分子認識素子を固定化した基板をアレイ状に配置し、MEMS の技術を用いてデバイスのダウンサイジング化を図る。この技術を用いて作製した超微細センシングデバイスを、体内での患部の直接モニタリングに適用すれば、癌の早期診断、早期治療に大きく貢献することが期待される。



## 2. 成果の詳細

### 2-1 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 検出用センサーの開発

#### 2-1-1 研究の目的

この研究項目では、1) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を検出するための分子認識素子の開発、2) 分子認識素子の基板上への固定化技術の開発、3) MEMS への適応の可能性について報告する。血管新生は癌の増殖と転移に密接に関わっていることから、近年、その分子生物学的研究が盛んに行われている。血管新生に関与する因子として、エフリン、アンジオポエチン、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などが知られている。このうち VEGF はその中心に位置し、癌の増殖・転移、増殖性糖尿病性網膜症、慢性リウマチなどに深く関わっている。このため、その成果を医療や健康管理の現場で役立てるためには、VEGF を、簡便、迅速かつ長時間にわたりモニタリングする技術を確立しておくことが重要となる。

#### 2-1-2 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を検出するための分子認識素子の開発

##### 2-1-2-1 分子認識素子の設計・合成

VEGF を検出するための分子認識素子の開発にあたり、以下の点に着目した。

- 1) VEGF を特異的に認識するために、VEGF 受容体の VEGF 結合部位に着目した。  
VEGF 結合部位は 14 個のアミノ酸が特定の配列で並んだペプチドから構成されており、これを認識部位として採用した。
- 2) 分子認識素子が VEGF に結合した場合、分子認識素子は、生体分子間の相互作用に伴う分子認識素子の高次構造変化を物理的信号に変換するトランスデューサとして機能する必要がある。そこで、VEGF を光学的に検出することを目的として、簡便かつ高感度な分析手法の一つである蛍光光度法を採用する。このため、VEGF 結合部位にリンカー分子を介して蛍光発色団を導入した。
- 3) 分子認識素子を異種材料である MEMS 基板あるいはそれを模倣した担体上に固定化するため、分子認識素子の末端にアミノ基を側鎖に持つアミノ酸であるリジンを、リンカー分子を介して導入した。

以上、3つのコンセプトを基に設計・開発した分子認識素子の模式図を図1に示す。

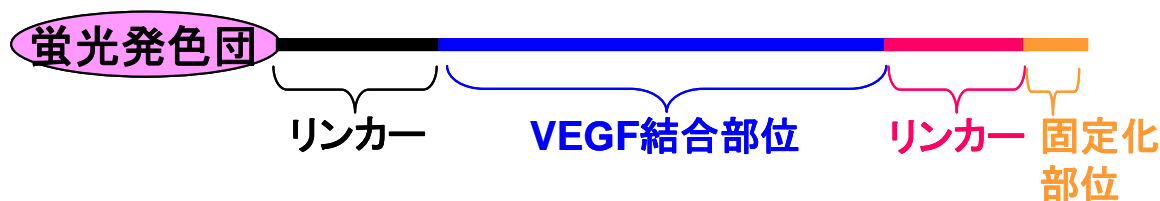


図1 分子認識素子の概念図

上記設計概念を基に、3種類の分子認識素子の合成を行った。このうち、開発に成功した蛍光発色団としてフルオレセインを持つ分子認識素子の純度と構造の同定の結果であるHPLCのクロマトグラムと質量分析測定の結果を図2および図3に示す。HPLCのクロマトグラムにおいては、目的物以外のピークは観察されていない。また、質量分析測定の結果においても、目的化合物由来の分子イオンピークのみが明瞭に観察された。

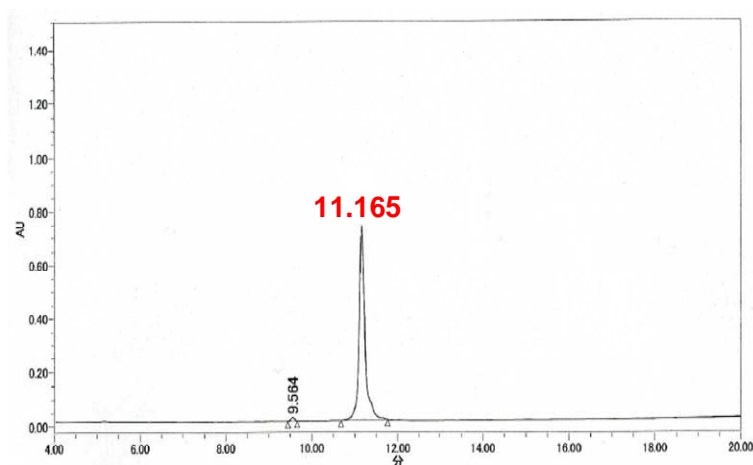


図2 HPLCの分析データ

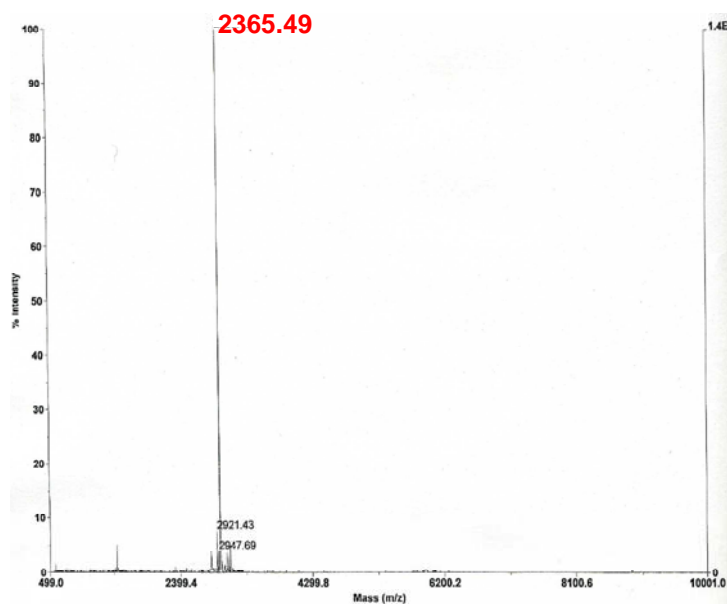


図3 精製後の分子認識素子のマスペクトル

#### 2-1-2-2 分子認識素子の性能評価

蛍光スペクトル測定を用いた分子認識素子と VEGF の相互作用を以下の条件で測定した。

分子認識素子濃度：10.0 $\mu$ M

溶媒: PBS(10 mM, pH7.4)

励起波長: 470nm.

蛍光光度計: 分光蛍光光度計 FP-6500 (日本分光製)

スリット幅 (励起側): 3nm

スリット幅 (蛍光側): 1nm

VEGF: ヒトでは通常アミノ酸数が 121 個 (VEGF<sub>121</sub>)、165 個 (VEGF<sub>165</sub>)、189 個 (VEGF<sub>189</sub>)、206 個 (VEGF<sub>206</sub>) の 4 種類が存在する。今回の測定では、アミノ酸数が 121 個の VEGF<sub>121</sub> を使用した。VEGF<sub>121</sub> のアミノ酸配列をはじめとした化学情報は以下の通りである。

VEGF<sub>121</sub> のアミノ酸配列: APMAEGGGQN HHEVVKFMDV YQRSYCHPIE TLVDIFQEYP  
DEIEYIFKPS CVPLMRCGGC CNDEGLECVP TEESNITMQI  
MRIKPHQQQH IGEMSFLQHN KCECRPKKDR ARQENC DKPR  
R

分子量: 28.4 kDa (ジスルフィド結合により二量体を形成)

等電点: 6.22

なお、今回使用した VEGF は組換え体を使用したため、糖鎖はない

上記実験条件に基づき、開発した 3 種類の分子認識素子について、蛍光スペクトル測定を用いた VEGF との相互作用解析を行った。

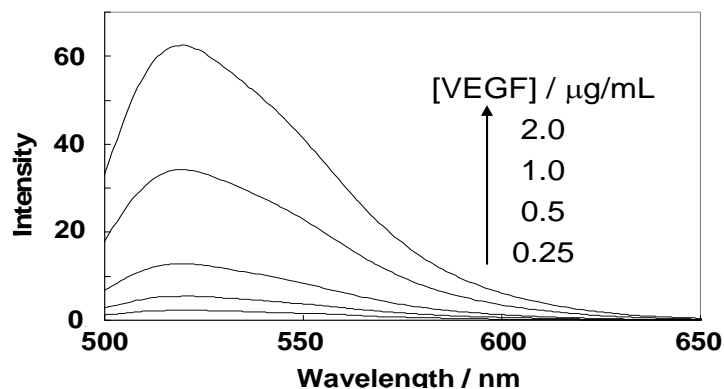


図 4 蛍光発色団としてフルオレセインを導入した分子認識素子に種々の濃度の VEGF を添加した時の蛍光スペクトル変化

相互作用の解析にあたり、①VEGF と特異的に反応すると蛍光強度に変化が生じる、②可視領域の光で蛍光発色団を励起することが出来る、③VEGF との反応の際、妨害物質の影響を受けない、以上の 3 項目の観点から分子認識素子と VEGF との相互作用を、溶液中で評価を行ったところ、蛍光発色団としてフルオレセインを導入した分子認識素子が上記



これまでの研究で、VEGFと分子認識素子が複合体を形成することによって、蛍光の発光が観察されることが明らかとなった。しかし、生体内においてVEGFを検出刷る場合、様々な無機塩などの測定に影響を及ぼすと考えられる物質が含まれている。そこで、①妨害物質が共存していても、VEGFと分子認識素子が複合体を形成すること、②これらの物質がどれくらいの濃度で反応系中に存在した場合、分子認識素子とVEGFとの反応を阻害するか、ということを確認するため、分子認識素子とVEGFが複合体を形成している状態で、反応系中の妨害物質の濃度を変えながら、蛍光物質から発せられる蛍光の強度をモニターした。反応系中の蛍光検出用ペプチドとVEGFが複合体を形成している状態で、反応系中の塩化ナトリウムおよびBSAの濃度を変えていき、蛍光強度が10%変化したときの阻害物質の濃度を測定した。ここで、蛍光強度の変化を10%に設定した理由として、蛍光ペプチドを用いてVEGFを定量的に検出する場合、蛍光ペプチドから発せられる蛍光強度をVEGFの濃度に換算する方法をとる。このため、阻害剤の添加による蛍光強度の変化率が、VEGFの濃度算出に影響を及ぼさないラインが10%であるために、本数値を設定した。

表 1 分子認識素子と VEGF との反応に影響を及ぼす妨害物質と濃度

| 物質                 | 濃度    |
|--------------------|-------|
| Glycine            | 10mM  |
| NaCl               | 0.5M  |
| Ammonium Sulfate   | 0.2M  |
| Asparagine         | 5mM   |
| NaHCO <sub>3</sub> | 50mM  |
| Zinc Chloride      | 0.5mM |
| Sodium Acetate     | 90mM  |
| Sodium Phosphate   | 0.5M  |
| Guanidine · HCl    | 0.35M |
| Imidazole          | 4mM   |
| Calcium Chloride   | 10mM  |
| Triethanol Amine   | 20mM  |
| Sodium Citrate     | 50mM  |
| Urea               | 0.5M  |
| Sucrose            | 5%    |

表 1 に使用した妨害物質の種類と、[分子認識素子] = 10  $\mu$ M, [VEGF] = 0.2  $\mu$ g/mL の条件化において、妨害物質を添加したとき、520nm の蛍光強度が 10%以上低下したときの妨害物質の濃度を示す。この結果から、過剰量の妨害物質が共存していても、分子認識素子と VEGF との反応は影響がないことが明らかとなった。

### 2-1-3 リンカー分子の開発

MEMS基板上への固定化部位とVEGF結合部位、さらに分子認識素子内の蛍光発色団とVEGF結合部位を繋ぐリンカーペプチドの鎖長およびアミノ酸配列について検討を行った。その結果、特定のアミノ酸配列を導入した分子認識素子のみがVEGFと反応し、シグナルを検出することが出来た。

### 2-1-4 固定化方法の開発

分子認識素子を異種材料であるMEMS基板を模倣した担体上に固定化する際の化学反応時間、濃度等についての最適化について検討を行った。実験に使用した基板は、ガラス基板上に金薄膜を蒸着したものを使用した。固定化の方法としては、図7に示すように、金薄膜基板をチオール基を有する2種類の試薬を含んだエタノール溶液に浸すことによって、薄膜上に自己組織化膜を形成した。次に、分子認識素子を共有結合を介して固定化するため

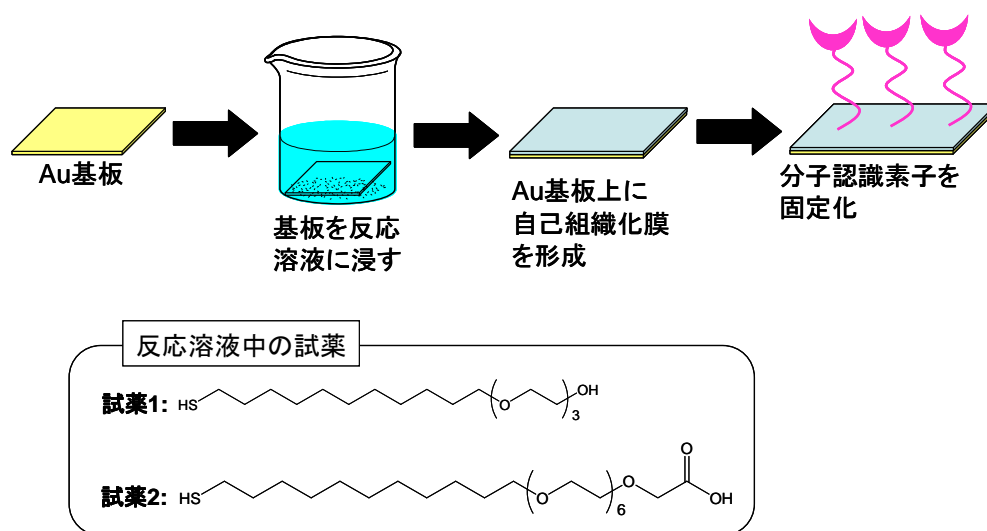


図7 分子認識素子を基板上に固定化するための操作手順

に基板上に存在する自己組織化膜中のカルボキシル基を、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)とN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を用いて反応活性化状態とした。次に、時間を変化させながら分子認識素子を添加すると、分子認識素子中

の固定化部位と活性化したカルボキシル基が反応して、分子認識素子は基板上に固定化された。最後に、未反応のカルボキシル基をブロッキングするために、エタノールアミンを添加した。

以下に実験操作について詳述する。

#### 2-1-4-1 Au基板上への自己組織化単分子膜の形成

##### 使用した試薬

20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoic acid (DOJINDO)

11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol ether (DOJINDO)

エタノール (和光純薬)

##### 試薬濃度

[20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoic acid] = 0.1 mM

[11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol ether] = 1.9 mM

##### 溶媒

エタノール

##### 使用した金基板

GE Healthcare社製 SIA Kit Au付属の金基板

##### 操作

- 1) 付着している有機物等を取り除き、金表面を清浄化するため、金基板をPiranha溶液(硫酸：30%過酸化水素水=3：1 v/v)に15分間浸した後、純水で洗浄した。
- 2) 洗浄した金基板を20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoic acidと11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol etherが溶解したエタノール溶液に1時間浸す。
- 3) エタノール、純水の順に基板を洗浄した後、乾燥した。

#### 2-1-4-2 自己組織化単分子膜表面上への分子認識素子の固定化

##### 使用した試薬

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩(EDC) (GE Healthcare)

N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) (GE Healthcare)

酢酸緩衝液 (GE Healthcare)

PBS緩衝液 (GE Healthcare)



エタノールアミン (GE Healthcare)

試薬濃度

[EDC] = 0.35 M

[NHS] = 0.35 M

[酢酸緩衝液] = 10mM (pH 4.5)

[エタノールアミン] = 1.0 M (pH8.5)

[分子認識素子] = 100 $\mu$ g/mL in 酢酸緩衝液

固定化に使用した装置

Biacore T100 (GE Healthcare)

流速

5.0 $\mu$ L/min

固定化操作

- 1) EDC、NHS、分子認識素子、エタノールアミンのそれぞれの溶液が入ったサンプル管をBiacore T100に装着する。
- 2) 測定開始ボタンを押すと、まずEDCとNHSが装置内で混合され、SAM膜で覆われた基板上に導入され、SAM膜表面のカルボキシル基が活性化される。
- 3) 分子認識素子が基板表面に導入され、SAM膜表面のカルボキシル基と分子認識素子中のリジン残基がカップリング反応する。
- 4) 未反応の活性化されたカルボキシル基をブロッキングするため、エタノールアミンを導入する

### 2-1-4-3 測定結果

上記、一連の操作を表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いてモニタリングし、担体上に固定化された分子認識素子の固定化量を算出し、分子認識素子の固定化の最適化を行った。

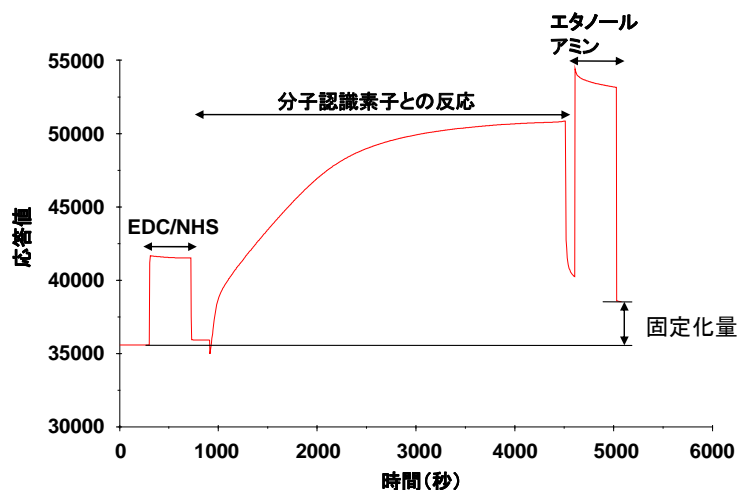


図8 分子認識素子を基板上に固定化した時の SPR 応答曲線

算出された固定化量は、3.1ng/mmであった。

### 2-1-5 検出方法の開発

分子認識素子が測定対象物質に結合した場合、生体分子間の相互作用とそれに伴う分子認識素子のわずかな構造変化を物理的信号に変換するトランスデューサとして機能する必要がある。そこで、光学的な検出法のうち、汎用性が高く、かつ高感度分析を可能とする表面プラズモン共鳴 (SPR) 法と蛍光検出法に焦点を絞り、基板上に固定化された分子認識素子と VEGF との相互作用を観察した。

#### 2-1-5-1 実験条件および操作(SPR法)

##### 使用した試薬

VEGF<sub>121</sub> (PEPROTECH)

PBS (GE Healthcare)

NaOH

##### 試薬濃度

[VEGF<sub>121</sub>] = 0 ~ 1.5 μg/mL in PBS

[NaOH] = 50mM

### 使用したSPR装置

Biacore T100 (GE Healthcare)

### 流速

5.0 $\mu$ L/min

### 操作方法

種々の濃度に調製したVEGF溶液および再生溶液である水酸化ナトリウム水溶液をBiacore T100に装着し、操作を開始する。

## 2-1-5-2 実験条件および操作(蛍光法)

### 使用した試薬

VEGF<sub>121</sub> (PEPROTECH)

PBS (GE Healthcare)

NaOH

### 試薬濃度

[VEGF<sub>121</sub>] = 0 ~ 1.5  $\mu$ g/mL in PBS

[NaOH] = 50mM

### 使用した蛍光光度計

FP6500 (日本分光)

### 操作方法

分子認識素子が固定化された基板表面にVEGF溶液200 $\mu$ Lを滴下する。5分間静置した後、蛍光光度計を用いて蛍光スペクトルを測定する。測定終了後、再生溶液である水酸化ナトリウム水溶液を滴下した後、純水で洗浄し、次の測定に使用した。

## 2-1-5-3 測定結果

図9に種々の濃度のVEGFを添加した時のSPR応答曲線を示す。VEGFの濃度の増加に伴い、シグナルの強度が増加したことから、基板上に固定化された分子認識素子はVEGFに対して応答したことが確認された。

図10に種々の濃度のVEGFを添加した時の分子認識素子の蛍光スペクトルを示す。分子認識素子は、溶液状態と同様、基板上に固定化された状態でもVEGFと反応し、蛍光を

示すことが確認された。

以上の結果から、分子認識素子が VEGF を認識したシグナルを検出することができ、分子認識素子が標的物質を認識した際の構造変化を検出できることが示唆された。

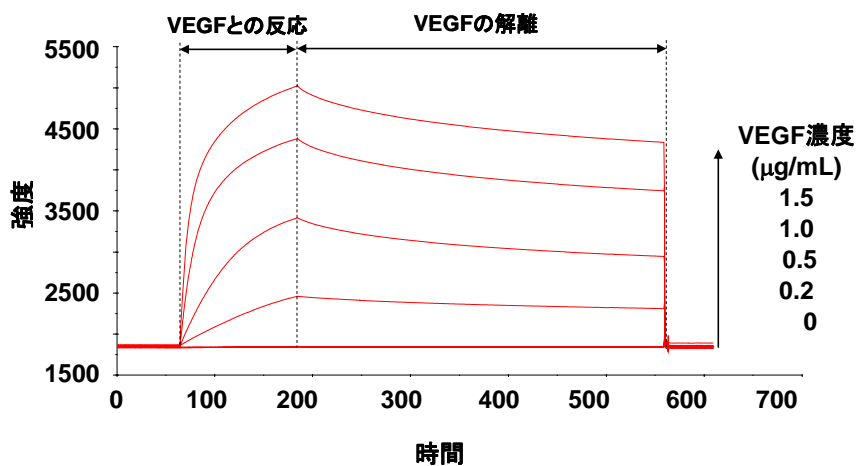


図 9 基板上に固定化された分子認識素子と VEGF との反応による SPR 応答曲線

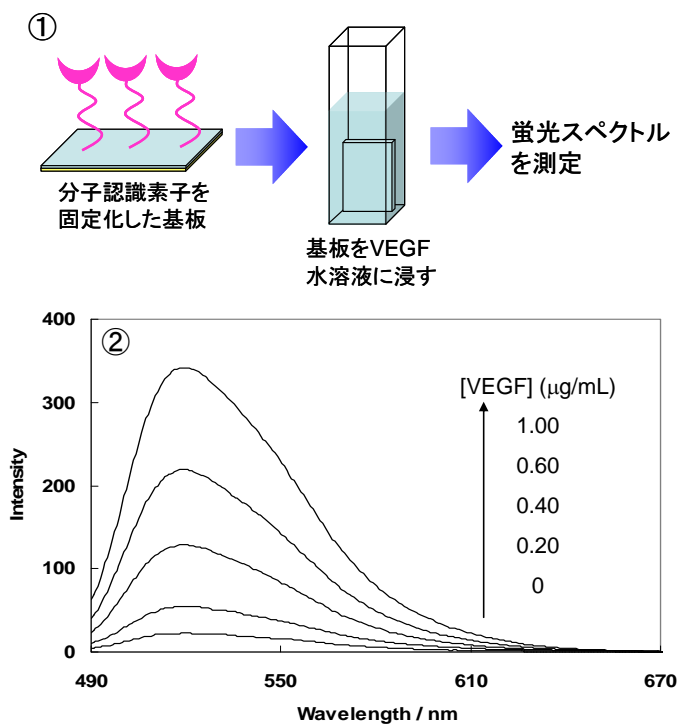


図 10 基板上に固定化された分子認識素子と VEGF との反応による蛍光強度変化

## 2-1-6 MEMS 基板の作製および評価

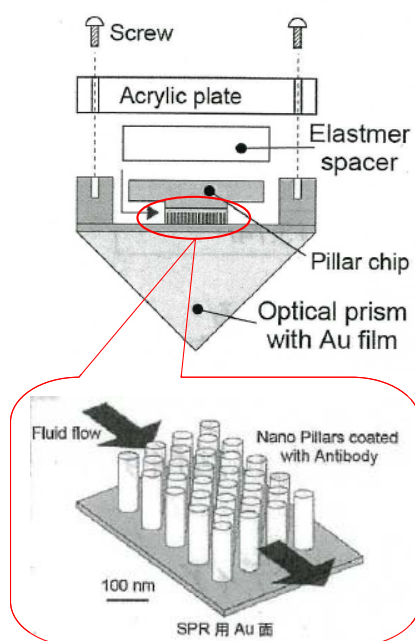


図 11 ナノピラー-SPR の概念図

SPR の電場は、金膜から 100nm 程離れたところまで到達することが知られている。この部分まで分子が満たされる機構を構成すれば、検出感度が増すのではないかとこのコンセプトを基に、東京大学下山研究室は、図 11 に示した MEMS 構造体から形成されたナノピラー-SPR を提案している。そこで、ナノピラー-SPR に VEGF 検出用分子認識素子が適応出来ることの可能性を示すための実験を行った。

ナノピラー-SPR は、SPR を誘起し、かつ分子認識素子を固定化するための金薄膜部分と、分子認識素子の固定化量を増加させるための  $\text{SiO}_2$  から成るピラー部分から構成されている。そこで、それぞれのパーツごとに分子認識素子の固定化条件、VEGF に対する応答特性について評価した。

### 2-1-6-1 金基板の基本特性

金薄膜部分については、下山研究室より提供された図 8 に示す基板を使用した。基板はガラス基板上に Cr を介して金薄膜を蒸着している。基板表面に分子認識素子を固定化し VEGF との相互作用を観察する場合、当方が所有する SPR 装置 (Biacore T100) を使用する。そこで、提供された基板が Biacore T100 における測定に適応可能であることを示すため、屈折率が異なる水と PBS を交互に流し、SPR 応答が得られるかどうか検討した。

#### 2-1-6-1-1 実験条件

##### 使用した試薬

PBS (GE Healthcare)

## 使用した金基板

図 12 に示した東京大学下山研究室より提供された基盤

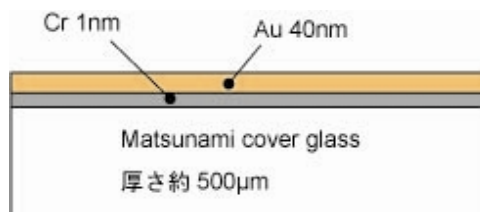


図 12 測定に使用した金基板の模式図

## 測定装置

BiacoreT100

## 流速

10.0μL/min

## 操作方法

- ① 下山研究室より提供された金基板を BiacoreT100 に装着する。
- ② 水と PBS を 2 分間隔で交互に流し、SPR 測定を行う。

## 2-1-6-1-2 測定結果

図 13 に示したように、水と PBS の屈折率の違いに対応した SPR 応答が確認された。以上の結果から、下山研究室から提供された金基板は SPR 測定に対応可能であることが実証された。

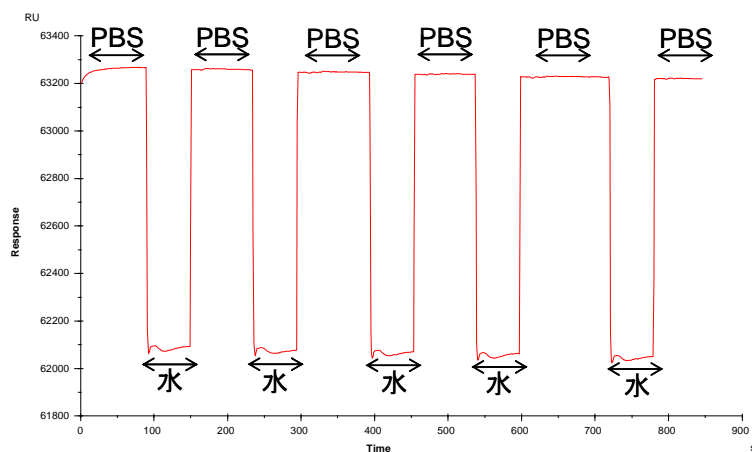


図 13 水と PBS を交互に流した時の SPR 応答曲線

## 2-1-6-2 Au基板上への自己組織化単分子膜の形成

下山研究室より提供された基板上に、これまでと同様に分子認識素子を固定化するために、まず基板表面に自己集積化単分子膜の構築を行った。

### 2-1-6-2-1 実験条件

#### 使用した試薬

20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosanoic acid (DOJINDO)

11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol ether (DOJINDO)

エタノール (和光純薬)

#### 試薬濃度

[20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosanoic acid] = 0.1 mM

[11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol ether] = 1.9 mM

#### 溶媒

エタノール

#### 使用した金基板

東京大学下山研究室より提供された金基板

#### 操作

- 1) 付着している有機物等を取り除き、金表面を清浄化するため、金基板をPiranha溶液(硫酸 : 30%過酸化水素水 = 3 : 1 v/v)に15分間浸した後、純水で洗浄した。
- 2) 洗浄した金基板を20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosanoic acidと11-Mercaptoundecanol hexaethyleneglycol etherが溶解したエタノール溶液に1時間浸す。
- 3) エタノール、純水の順に基板を洗浄した後、乾燥した。

## 2-1-6-3 自己組織化単分子膜表面上への分子認識素子の固定化

SAM膜で覆われた基板上に分子認識素子の固定化実験を行った。

### 2-1-6-3-1 実験条件

#### 使用した試薬

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩(EDC) (GE Healthcare)

N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) (GE Healthcare)

酢酸緩衝液 (GE Healthcare)

PBS緩衝液 (GE Healthcare)

エタノールアミン (GE Healthcare)

#### 試薬濃度

[EDC] = 0.35 M

[NHS] = 0.35 M

[酢酸緩衝液] = 10mM (pH 4.5)

[エタノールアミン] = 1.0 M (pH8.5)

[分子認識素子] = 100 $\mu$ g/mL in 酢酸緩衝液

#### 固定化に使用した装置

Biacore T100 (GE Healthcare)

#### 流速

5.0 $\mu$ L/min

#### 固定化操作

- 1) EDC、NHS、分子認識素子、エタノールアミンのそれぞれの溶液が入ったサンプル管をBiacore T100に装着する。
- 2) 測定開始ボタンを押すと、まずEDCとNHSが装置内で混合され、SAM膜で覆われた基板上に導入され、SAM膜表面のカルボキシル基が活性化される。
- 3) 分子認識素子が基板表面に導入され、SAM膜表面のカルボキシル基と分子認識素子中のリジン残基がカップリング反応する。
- 4) 未反応の活性化されたカルボキシル基をブロッキングするため、エタノールアミンを導入する

#### 2-1-6-3-2 測定結果

基板表面に分子認識素子の固定化を行った。1)塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと N-ヒドロキシコハク酸イミドの添加による基板表面の反応活性化、2)分子認識素子と基板表面との反応、3)エタノールアミンの添加による未反応の反応活性部位をブロッキング、といった一連の反応過程を SPR によってモニタリングした。図 14 に示した応答曲線から、固定化量 (4.8ng/mm<sup>2</sup>) を算出した。



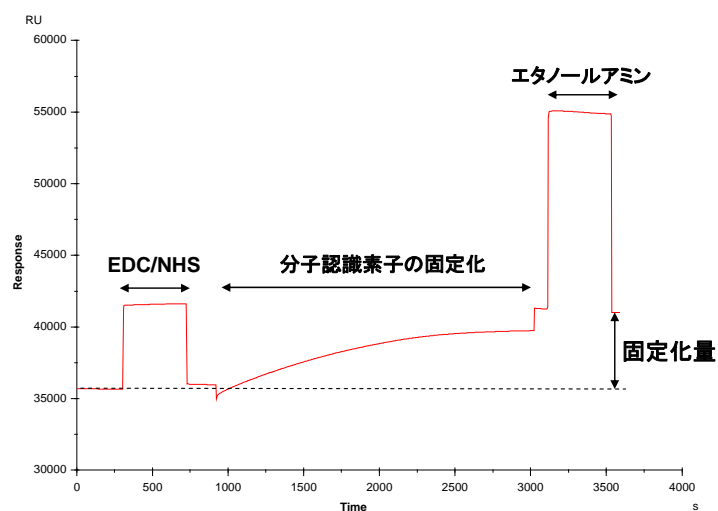


図 14 分子認識素子を基板上に固定化した時の SPR 応答曲線

#### 2-1-6-4 金基板上に固定化された分子認識素子と VEGF との反応

基板の上に固定化された分子認識素子と VEGF との反応を SPR 法でモニタリングした。

##### 2-1-6-4-1 実験条件

###### 使用した試薬

VEGF<sub>121</sub> (PEPROTECH)

PBS (GE Healthcare)

NaOH

###### 試薬濃度

[VEGF<sub>121</sub>] = 0 ~ 1.5 μg/mL in PBS

[NaOH] = 50mM

###### 使用した SPR 装置

Biacore T100 (GE Healthcare)

###### 流速

5.0 μL/min

###### 操作方法

種々の濃度に調製した VEGF 溶液および再生溶液である水酸化ナトリウム水溶液を Biacore T100 に装着し、操作を開始する。

#### 2-1-6-4-2 測定結果

分子認識素子が基板上に固定化された状態で、VEGF との反応を観察したところ、図 15 に示したように、VEGF の濃度の増加に伴い、SPR 強度の増加が観察された。以上の結果から、下山研究室から提供された基板を用いても、これまでの測定結果と同様、

- 1) 分子認識素子は基板上に固定化されたこと、
- 2) 基板上に固定化された状態で、VEGF と反応することが示唆された。

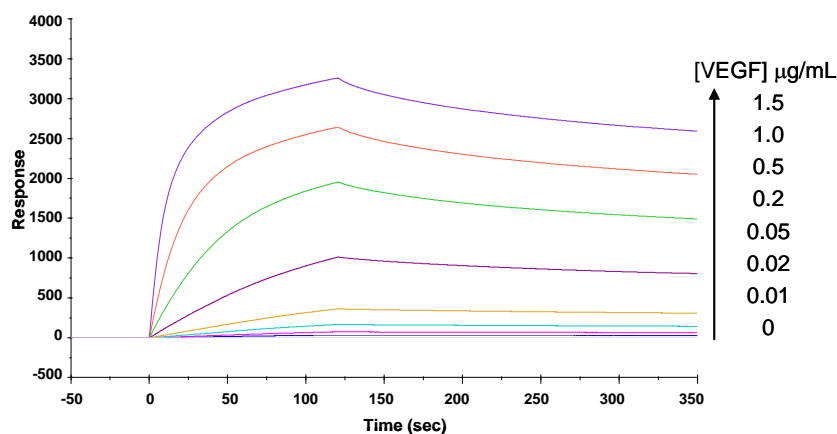


図 15 種々の濃度の VEGF を添加した時の表面プラズモン共鳴(SPR)測定の結果

#### 2-1-6-5 ナノピラー基板上への分子認識素子の固定化

ナノピラー部分については、下山研究室より提供された図 16 に示す基板を使用した。使用した基板は、シリコンナノ加工をベースに作製されており、直描→DRIE→熱酸化の過程を経て、表面が熱酸化ガラスで覆われている。

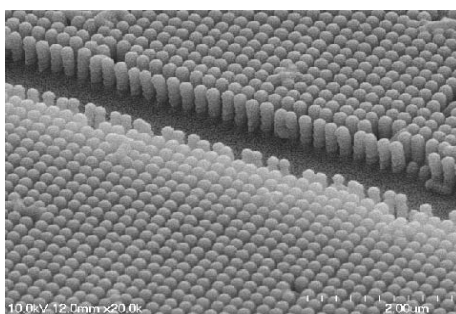


図 16 ナノピラー基板の表面状態

ナノピラー基板表面上への分子認識素子の固定化は、図 17 に示した手順に従って行った。まず、基板をシランカップリング剤溶液に浸し、シランカップリング反応によって基板表

面にアミノ基を生やす。次に、基板をグルタルアルデヒド溶液に浸し、さらに分子認識素子溶液に基板を浸すことによって、固定化を行った。

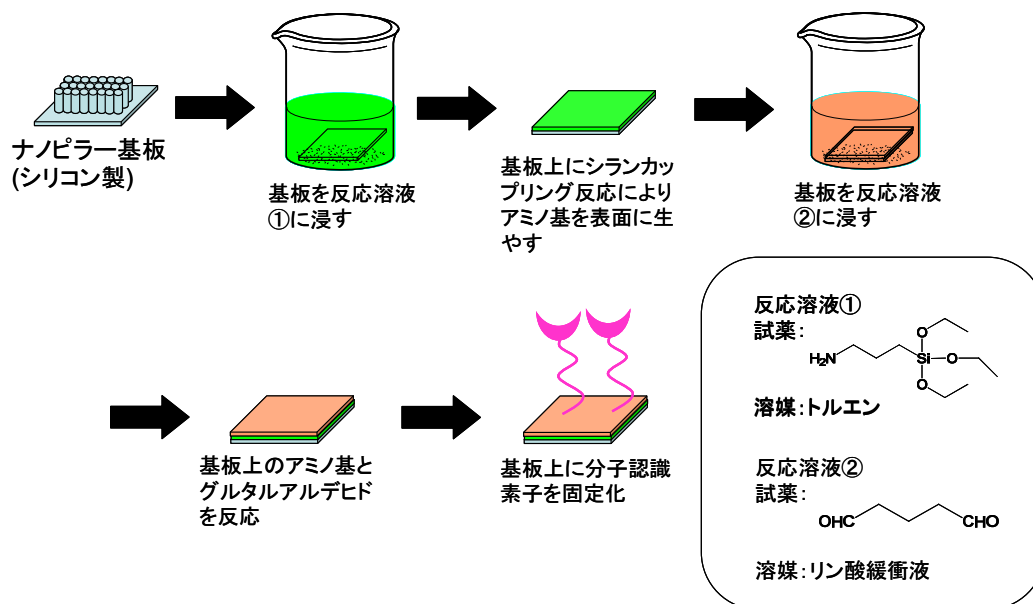


図 17 ナノピラー基板表面上への分子認識素子の固定化操作

以下に固定化方法について詳述する。

#### 使用した試薬

3-アミノプロピルトリメトキシシラン(東京化成)

トルエン(和光純薬)

グルタルアルデヒド(東京化成)

リン酸緩衝液(関東化学)

#### 試薬濃度

[3-アミノプロピルトリメトキシシラン] = 5% in トルエン

[グルタルアルデヒド] = 5%

#### 操作方法

- 1) 洗浄したナノピラー基板を 3-アミノプロピルトリメトキシシランのトルエン溶液に 5 分間浸漬する。アミノシラン膜が形成された基板をエタノールで 5 回、純水で 3 回洗浄する
- 2) アミノシラン膜が形成された基板をグルタルアルデヒド溶液に 1 時間浸す。

3) グルタルアルデヒドが結合した基板を、分子認識素子が溶解した溶液に2時間浸す

#### 2-1-6-6 ナノピラー基板上に固定化された分子認識素子と VEGF との反応

基板上に固定化された分子認識素子が VEGF に対して応答するかどうかの確認を行った。ナノピラー基板単独では、SPR 法を用いて観察することが出来ない。そこで、分子認識素子と VEGF との相互作用が蛍光法を用いて観察出来ることに着目し、基板上に種々の濃度の VEGF 溶液を滴下したときの蛍光強度を測定した。

#### 2-1-6-6-1 実験条件

##### 使用した試薬

VEGF<sub>121</sub> (PEPROTECH)

PBS (GE Healthcare)

NaOH

##### 試薬濃度

[VEGF<sub>121</sub>] = 0 ~ 1.5 µg/mL in PBS

[NaOH] = 50mM

##### 使用した蛍光光度計

FP6500 (日本分光)

##### 操作方法

分子認識素子が固定化された基板表面に VEGF 溶液 200µL を滴下する。5分間静置した後、蛍光光度計を用いて蛍光スペクトルを測定する。測定終了後、再生溶液である水酸化ナトリウム水溶液を滴下した後、純水で洗浄し、次の測定に使用した。

#### 2-1-6-6-2 測定結果

種々の濃度の VEGF を添加した時の分子認識素子の蛍光強度変化を図 18 に示す。VEGF 濃度の増加に伴い、蛍光強度の増加が観察された。以上の結果から、分子認識素子はナノピラー基板表面上に固定化されていること、および固定化された状態で VEGF と相互作用することが明らかとなった。

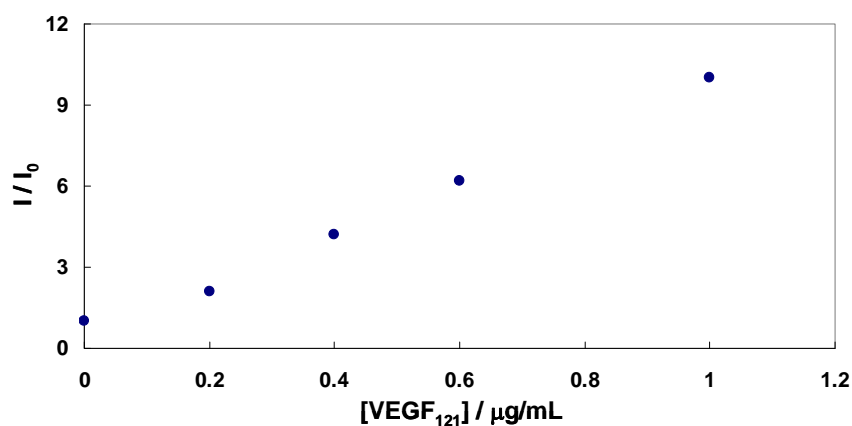


図 18 種々の濃度の VEGF を添加した時の分子認識素子の蛍光強度  
 溶媒 : PBS、励起波長 : 488nm、検出波長 : 535nm

さらに、ナノピラー構造が VEGF 検出に有効であることを確認するために、ナノピラー基板と同じ材質で構成された平坦基板の上に、分子認識素子を固定化した後、VEGF を添加した際の蛍光強度の測定を行った。その結果、平坦基板 1mm<sup>2</sup>あたりの蛍光強度は 1.5 であった。一方、ナノピラー基板の 1mm<sup>2</sup>あたりの蛍光強度は 3.2 であった。以上の結果から、ナノピラー構造をとることによって、分子認識素子の固定化量が増加し、VEGF の検出に有効であることが分かった。

## 2-2 過酸化脂質検出用センサーの開発

### 2-2-1 研究の目的

近年、過酸化脂質と疾病との関係が注目されている。過酸化脂質との関係がある、若しくは関係があると考えられている疾病には、癌、動脈硬化、虚血性疾患や肝機能障害等が挙げられる。

過酸化脂質と疾患の関連性を調べるために、生体内での過酸化脂質量・分布等を明らかにする必要があるが、これまでも過酸化脂質の分析方法の開発や分析試薬の開発等が報告されてきた。中でも、Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP)は、バッチでは数nmolレベル、HPLCポストカラムシステムではpmolレベルでの過酸化脂質の測定が可能である測定試薬で、細胞内の過酸化脂質のイメージングにも応用されている。

この測定試薬と過酸化脂質との反応は、図19の様にDPPPが過酸化脂質と当モルで反応し、DPPPの酸化体が生成する。また、この酸化体は蛍光を生じるため、その蛍光強度を測定することにより、過酸化脂質量の測定が可能である。

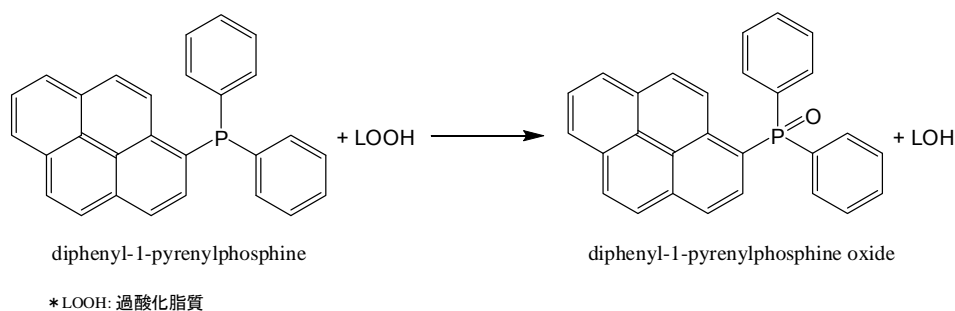


図19 DPPPと過酸化脂質の反応

以上の特性から、DPPPはデバイスの開発に有効であると考えられるが、検出波長が紫外領域( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=352\text{ nm}/380\text{ nm}$ )にあるため、生体試料由来の自己蛍光、生体試料へのダメージや装置の小型化が困難であった。そのため、DPPPの検出波長を長波長側にシフトさせた過酸化脂質測定試薬を開発し、基盤に固定化する事により疾病検出のためのデバイスの開発を行った。

### 2-2-2 過酸化脂質を検出するための分子認識素子の開発

#### 2-2-2-1 分子認識素子の合成

上述にあるDPPPは、過酸化脂質との反応部位としてジフェニルフォスフィンを持つため、本研究において開発する分子認識素子にもジフェニルフォスフィンを採用した。また、蛍光発色団に求める条件として、

- ① 可視光による励起が可能であること

② 蛍光発色団の耐久性がよく、フォトブリーチングを引き起こさないこと

が挙げられる。種々の蛍光発色団について検討を行った結果、近年、生化学における蛍光分析に汎用されているboron dipyrrometheneを採用した。Boron dipyrrometheneは、励起波長が500nm近傍にあるため、可視光による励起が可能である。また、試薬の耐久性がよいことが知られているため、本研究に最適な化合物である。これら2種類の反応部位と蛍光発色団を併せ持つ新規化合物として、

*N*[2-(diphenylphosphino)ethyl]-4-(1,3,5,7-tetramethyl-

4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)benzamide(DPPEA-BODIPY)を設計した。

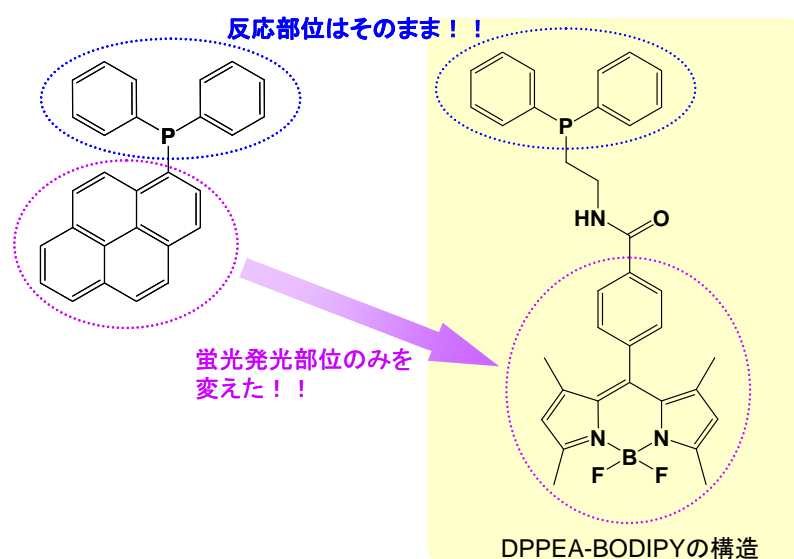


図20 DPPEA-BODIPYの分子設計の概念

DPPEA-BODIPYは2,4-dimethylpyrroleを出発原料とし、図21に示したように、5工程、収率4.0%で合成した。以下に、DPPEA-BODIPYの合成方法について、詳述する。

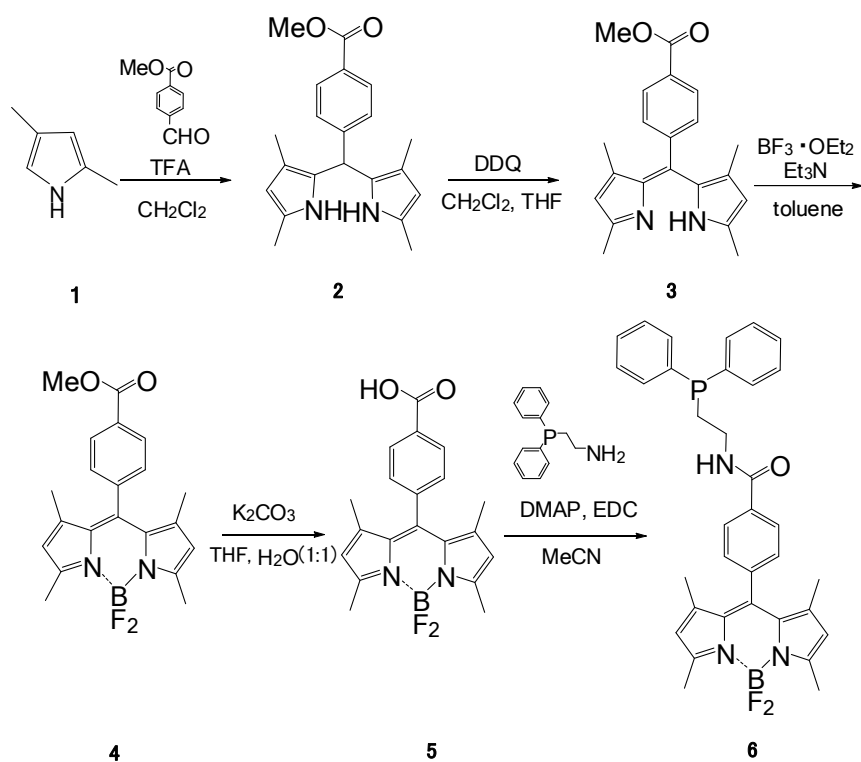


図 21 DPPEA-BODIPY の合成スキーム

### 化合物 3 の合成

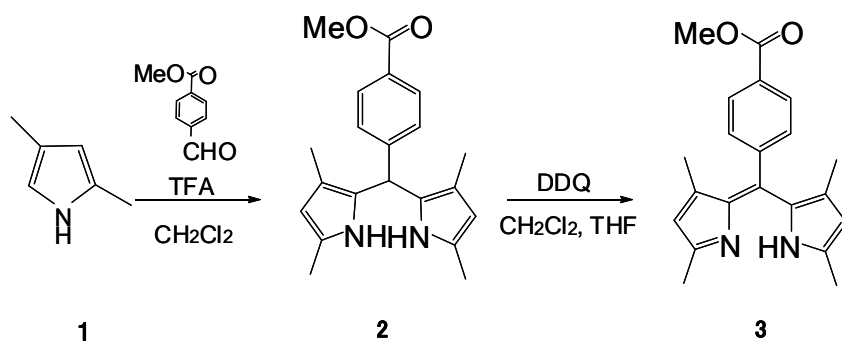


図 22 化合物 3 の合成スキーム

テレフタルアルデヒド酸メチル 4.31 g (26.28 mmol) と 2,4-ジメチルピロール 5g (52.55 mmol) をジクロロメタン(脱水)100 ml に溶解し、窒素雰囲気下 30 分間、室温で攪拌後、トリフルオロ酢酸を数滴添加し、さらに窒素雰囲気下 15 時間、室温で攪拌した。

テトラヒドロフラン 25 ml(脱水)とジクロロメタン 25 ml(脱水)の混合溶液に 2,3-ジクロロ



-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノンを 5.97 g(26.26 mmol)溶解し、15 分間で滴下する。薄層クロマトグラフィーにより、反応が終了したことを確認後(反応時間 4 時間)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出を行い、更に飽和塩化ナトリウム水溶液で、ジクロロメタン相を抽出し、減圧濃縮した。

アミノプロピル化処理したシリカゲルカラム (溶媒 ; ヘキサン/酢酸エチル=15/1) にて精製を行った。

MS と NMR により生成物の確認を行った。

収量 1.71 g (収率 19.5 %)

$^1\text{H-NMR}$  測定

測定条件 : 400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$

測定結果 : 1.27(s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2.34(s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3.96(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 5.88(s, 2H, CH), 7.40-7.42(d, 2H, benzene), 8.11-8.13(d, 2H, benzene)

質量分析測定の結果

$[\text{M}+\text{H}]^+ = 335.20$

化合物 4 の合成

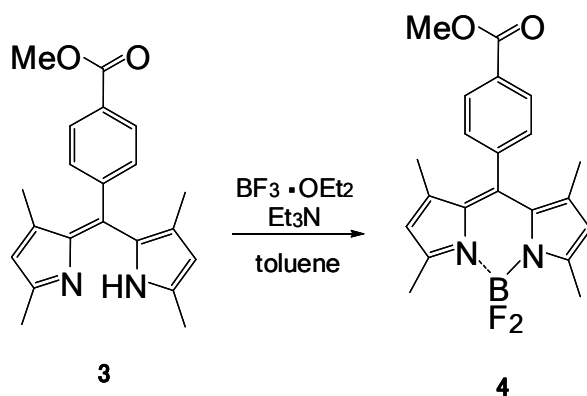


図 23 化合物 4 の合成スキーム

化合物 3 を 1.6 g(4.81 mmol)とボロントリフルオリド - エチルエーテル コンプレックス 9.2 ml、 トリエチルアミン 9.2 ml をトルエン (脱水) 65 ml に溶解し、室温で 3 時間攪拌し、薄層クロマトグラフィーにより化合物 3 が無くなり反応が終了したことを確認後 (反応時間 3 時間)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出を行い、更に飽和塩化ナトリウム水溶液でジクロロメタン相を抽出し、減圧濃縮した。

アミノプロピル化処理したシリカゲルカラム（溶媒；ヘキサン/酢酸エチル=7/1）にて精製を行った。

MS と NMR により生成物の確認を行った。

収量 1.76 g （収率 95.8 %）

$^1\text{H-NMR}$  測定

測定条件：400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$

測定結果：1.36(s,6H, $\text{CH}_3$ ), 2.56(s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3.97(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 5.99(s, 2H, CH), 7.40-7.42 (d, 2H,benzene), 8.17-8.19(d, 2H, benzene)

質量分析測定の結果

$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 405.21$

化合物 5 の合成

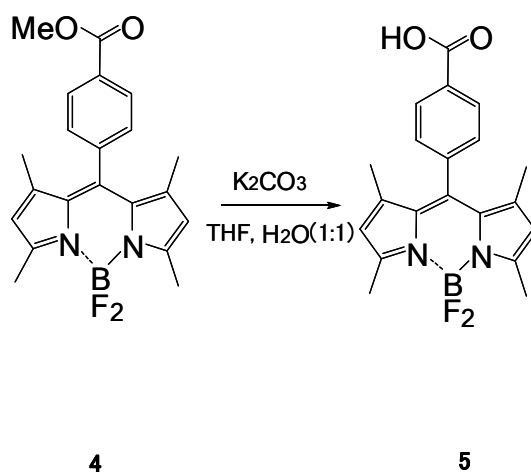


図 24 化合物 5 の合成スキーム

化合物 4 を 0.5 g(1.31 mmol)と炭酸カリウム 300 mg(2.17 mmol)をテトラヒドロフラン 60 ml と純水 60 ml の混合溶液に溶解し、50°Cで 10 時間、室温 14 時間攪拌し、ジエチルエーテルを加え水相を抽出し、その後ジクロロメタンで抽出し、減圧濃縮した。

MS により生成物の確認を行った。

粗収量 0.48 g

質量分析測定の結果

[M-H]<sup>-</sup> = 367.23

### 化合物 6 の合成

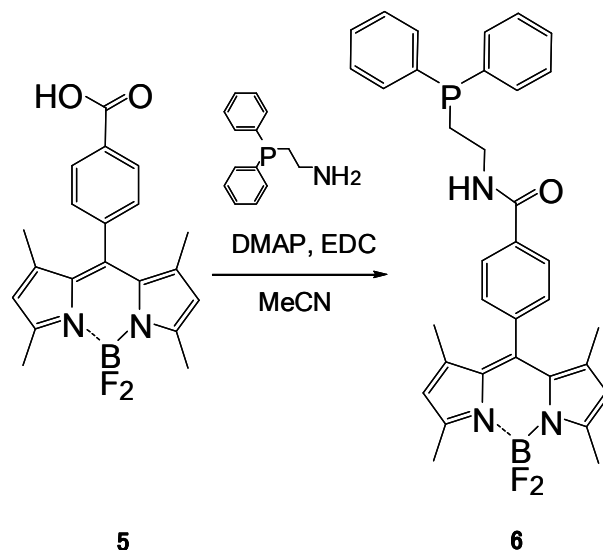


図 25 化合物 6(DPPEA-BODIPY)の合成スキーム

化合物 5 を 0.48 g と 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド,ヒドロクロライド 0.89 g (4.64 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン 0.31g (2.54 mmol) と 2-(ジフェニルホスフィノ)エチルアミン 1g (4.36 mmol) をアセトニトリル(脱水)75 ml 中、窒素雰囲気下、0℃で 30 分間攪拌後、室温で 4 日間攪拌した。その後、純水を加えジクロロメタンで抽出し、減圧濃縮した。シリカゲルカラム (溶媒 ; クロロホルム) にて精製し、ジエチルエーテルから再結晶した。

収量 160.26 g (収率 21.1 %) (化合物 4 からの収率)

#### <sup>1</sup>H-NMR 測定

測定条件 : 400 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>

測定結果 : 1.34(s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.46-2.50(t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.56(s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.67-3.75(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.98(s, 2H, CH), 6.30(s, 1H, NH), 7.32-7.38(m, 8H, benzene), 7.47-7.52(m, 4H, benzene), 7.70-7.72(d, 2H, benzene)

質量分析測定の結果

$[M+Na]^+ = 602.04$

## 2-2-2-2 分子認識素子の性能評価

DPPEA-BODIPY の光学特性の評価にあたり、DPPEA-BODIPY をクロロホルムに溶解した後、励起及び蛍光スペクトルを測定した。その結果、図 26 に示したように、DPPEA-BODIPY の極大励起波長及び極大蛍光波長が可視光領域にあることが分かった ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=502\text{ nm}/515\text{ nm}$ )。

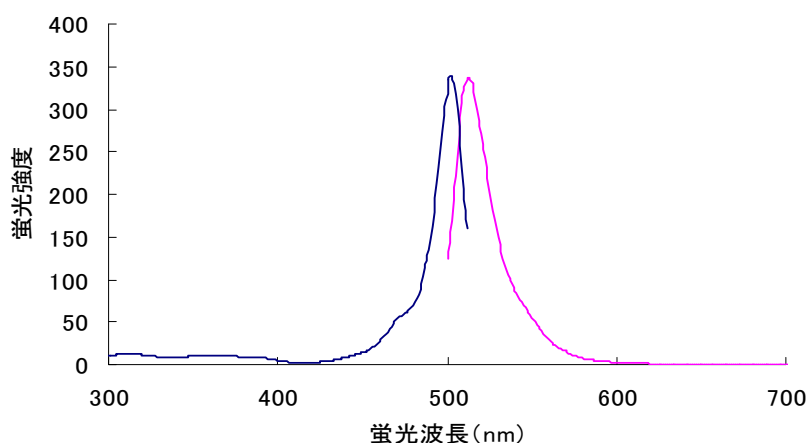


図 26 DPPEA-BODIPY の励起スペクトルと蛍光スペクトル  
(— : 励起スペクトル、— ; 蛍光スペクトル)

次に、DPPEA-BODIPY とリノール酸メチルの過酸化脂質の測定を行った。測定の操作法として、抗酸化剤 2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾールを含むクロロホルム(3 mg BHT/10 ml  $CHCl_3$ )に DPPEA-BODIPY を溶解した。酸化したリノール酸メチルを DPPEA-BODIPY と同様に、抗酸化剤を溶解したクロロホルム溶液に溶解し過酸化脂質の試料として用い測定した。反応溶液中の DPPEA-BODIPY の濃度は  $55.23\ \mu\text{M}$  とした。DPPEA-BODIPY 溶液  $50\ \mu\text{l}$  に過酸化脂質溶液を濃度が 0 から  $61.76\ \mu\text{M}$  となるように、順次  $100\ \mu\text{l}$  加えた。密栓容器中で、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間、反応させた。反応終了後は、氷浴につけ反応を停止した。

反応停止溶液を蛍光光度計測定用セルにとり、蛍光測定を行った。蛍光測定条件として、

励起波長 :  $502\text{ nm}$

検出波長 :  $515\text{ nm}$

スリット幅 (励起側) :  $3\text{ nm}$

スリット幅 (蛍光側) :  $1\text{ nm}$

とした。

その結果、過酸化脂質と DPPEA-BODIPY の反応により蛍光強度が増加し、蛍光強度と過酸化脂質量 (0- $2.76 \times 10^{-9}$  mol の範囲) の間には直線関係が成りたった (図 27)。

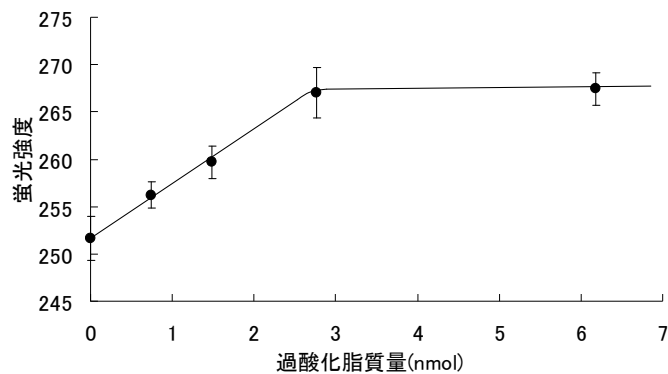


図 27 DPPEA-BODIPY による過酸化脂質の測定

次に、DPPEA-BODIPY 溶液を過酸化脂質溶液と同様に反応させて、反応溶液中の DPPEA-BODIPY 及びその酸化体 (DPPEA-BODIPY=O) の質量分析を行った。

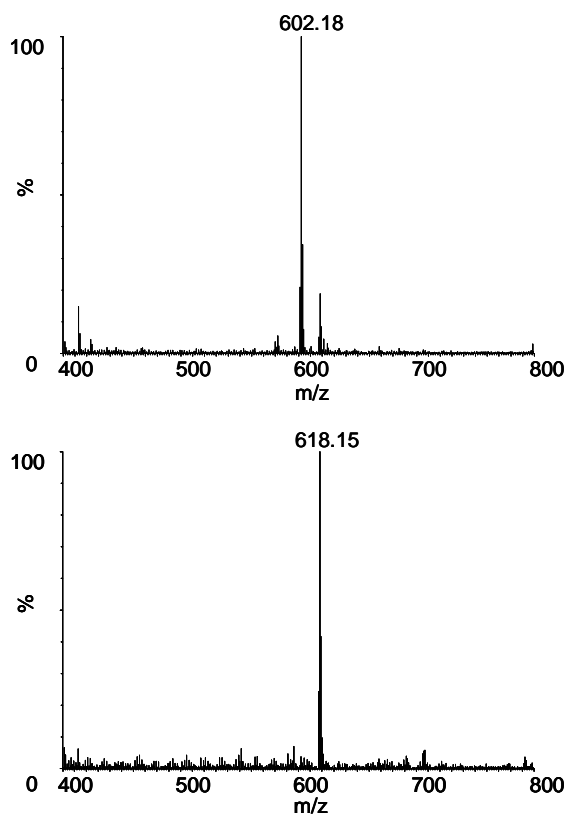


図 28 過酸化脂質と DPPEA-BODIPY の反応溶液の質量分析

質量分析測定は以下の通りに行った。まず、DPPEA-BODIPY (2.65nmol)と過酸化脂質 (2.76nmol)を 37 °C、1 時間反応させた後、質量分析測定を行った。質量分析計には、Waters 社製 micromass ZQ システムを使用した。

図 28 の上図には DPPEA-BODIPY 単独のマスペクトル、下図には DPPEA-BODIPY と過酸化脂質が反応した後のマスペクトルを示す。反応前は、DPPEA-BODIPY 由来の分子イオンピークのみが観察された。一方、過酸化脂質と反応すると、DPPEA-BODIPY 単独の分子イオンピークは消失し、新たに過酸化脂質と反応後の生成物に由来する分子イオンピークのみが観察された。以上の結果から、DPPEA-BODIPY は過酸化脂質と定量的に反応し、酸化体に由来する構造を与え、かつ、DPPEA-BODIPY の蛍光強度の増加は、過酸化脂質との反応に由来することが裏付けられた。

以上の結果から、DPPEA-BODIPY を用いることにより、可視光領域での過酸化脂質の測定が可能となった。

### 2-2-3 固定化方法の開発

分子認識素子を異種材料である MEMS 基板を模倣した担体上に固定化する際の時間、濃度等についての最適化について検討を行った。

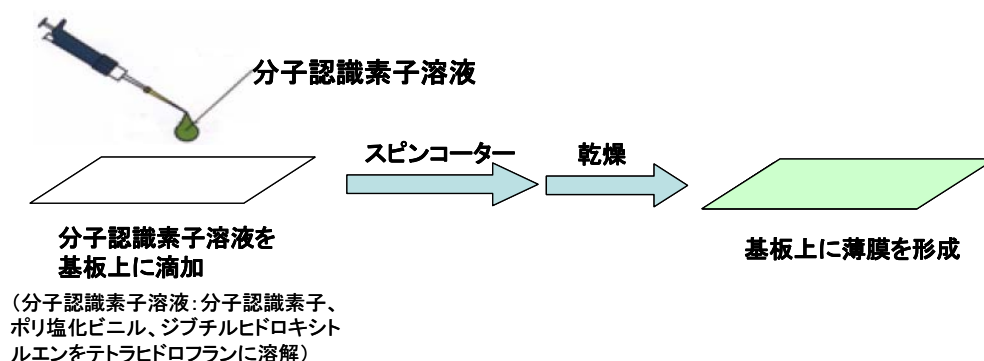


図 29 過酸化脂質検出用分子認識素子の固定化操作

固定化の方法としては、図 29 に示したように、分子認識素子とポリ塩化ビニルまたは PMMA などの高分子が溶解したテトラヒドロフラン(THF)溶液を、基板上に滴下し、スピコーターにより薄膜を作製し、遮光したデシケーター内で減圧乾燥を行った。以下に、PMMA を高分子薄膜とし、分子認識素子として DPPP を使用した時の操作方法について具体的に述べる。

#### 2-2-3-1 実験方法

##### 器具・試薬

Poly(methyl methacrylate)(PMMA) (SIGMA-ALDRICH Japan K.K.) Diphenyl-1-pyrenylphosphine

(同仁化学)

2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol(BHT) (東京化成)、

過酸化水素(和光純薬)

クロロホルム(和光純薬)

ミカサスピコーター MS-A100 (MIKASA Co., Ltd., Japan)

分光蛍光光度計 FP-6500 (固体試料セルホルダー付き) (日本分光)

#### 試薬溶液

DPPP 溶解用 BHT 溶液:15 mg BHT/50 ml クロロホルム

センサー用 BHT 溶液:4.58 g BHT/50 ml クロロホルム

センサー用 PMMA 液 ; 20.854 g (7.2 ml)クロロホルムに 1.2 g PMMA を溶解。

DPPP 溶液 : 10.5 mg DPPP/10ml(BHT-CHCl<sub>3</sub>)

#### 固定化方法

DPPP 溶液とセンサー用 PMMA 液、センサー用 BHT 液を混合し (1/3/1, v/v/v)、PET フィルムに滴下し、スピコーターにより薄膜を作製し、遮光したデシケーター内で減圧乾燥を行った。

同様の方法を用いて、DPPEA-BODIPY についても高分子薄膜に包括することによって基板上に固定化した。

#### 2-2-4 検出方法の開発

分子認識素子が測定対象物質に結合した場合、生体分子間の相互作用とそれに伴う分子認識素子のわずかな構造変化を物理的信号に変換するトランスデューサとして機能する必要がある。そこで、光学的な検出法のうち、汎用性が高く、かつ高感度分析を可能とする蛍光検出法に焦点を絞り、基板上に固定化された分子認識素子と過酸化脂質との相互作用を観察した。

まず、DPPPをPMMAによって固定化した高分子薄膜を用いて、過酸化水素を検出出来るかどうかの検討を行った。

##### 2-2-4-1 実験方法

実験操作としては、0-9.88 M の過酸化水素溶液を調整し、固定化膜に滴下した。5 分後、膜上の過酸化水素を除去し、分光蛍光光度計で測定を行った。

##### 2-2-4-2 測定結果

図 30 は、過酸化水素溶液と反応後の固定化膜を、分光蛍光光度計により測定し（励起波長 352 nm）、得られた蛍光スペクトルからバックグラウンド（反応前の固定化膜のスペクトル）を差し引いたスペクトルである。また、過酸化水素溶液の各濃度における再現性測定を行った結果を図 31 にしめす（蛍光波長 380 nm）。

図 30 及び図 31 が示す様に、過酸化水素濃度増加に伴い固定化膜の蛍光強度が増加した。以上の結果から、分子認識素子を高分子薄膜に包括した状態でも、過酸化物に対する応答を示すことが確認された。

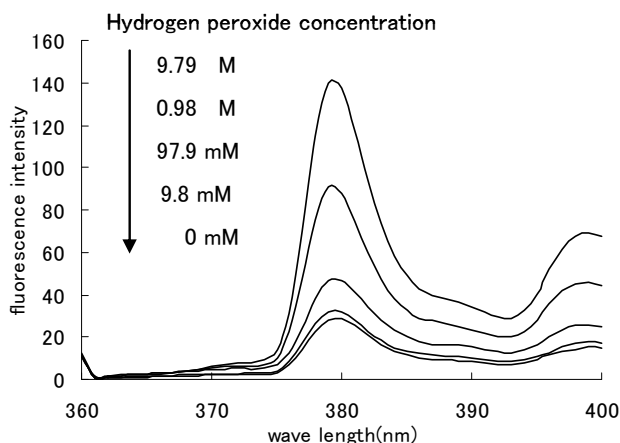


図30 DPPPを包括したPMMA膜に種々の濃度の過酸化水素を添加したときの蛍光スペクトル変化

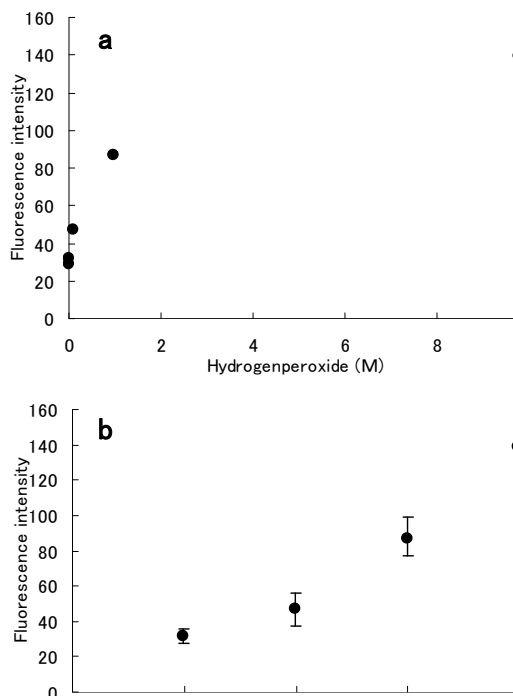


図 31 DPPP を包括した PMMA 膜による過酸化水素溶液の測定の検量線  
b は a を対数グラフで示した。



次に、同様の方法を用いて、DPPEA-BODIPYをPVC膜中に包括した固定化膜を作製し、過酸化水素に対する応答特性について評価した。

実験操作として、固定化膜表面に試料溶液である純水または9.8 M 過酸化水素溶液を、遮光して滴下し、5分後に分光蛍光光度計で測定を行った。

図32に、過酸化水素溶液及び純水と反応後の、DPPEA-BODIPY/PVC膜を分光蛍光光度計により測定し、得られた蛍光スペクトル(励起波長502 nm)を示す。純水により蛍光強度は殆ど増加しなかったが、過酸化水素溶液により蛍光強度は増加した。

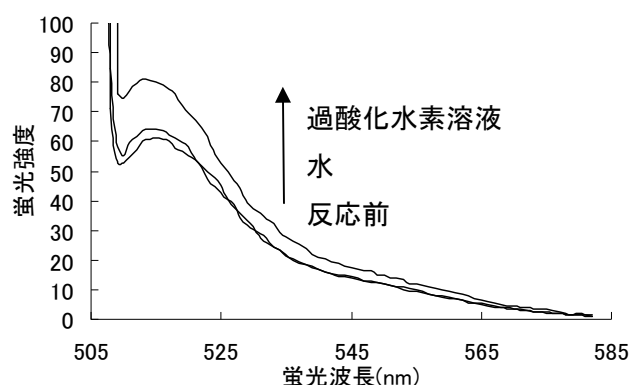


図 32 DPPEA-BODIPY-PVC 膜の過酸化水素によるスペクトルの蛍光強度変化

(励起波長: 502 nm、過酸化水素溶液: 9.8 M 過酸化水素溶液滴下 5 分後の蛍光強度、水: 純水滴下 5 分後の蛍光強度)

以上の結果から、DPPEA-BODIPY を PVC 薄膜によって固定化したセンサーは、過酸化脂質センサーとしての可能性が示された。

#### 2-2-5 MEMS 基板の作製および評価

MEMS の技術を利用したバイオセンサへの適応の可能性を示すため、オリンパス(株)と連携し、過酸化脂質検出用分子認識素子および固定化技術を用いて、バイオセンシングデバイスの構築を行った。

分子認識素子と過酸化脂質との相互作用によるシグナル検出には、カバーガラスなどの全反射面の裏側にトンネル効果によりしみだすエバネッセント光を励起光源とし、蛍光を観察する方法を採用した。この方法を採用した理由として、

- 1) 生じたエバネッセント場光は、試料側の厚さ数百ナノメートルの領域のみを光励起し蛍光を発生させる。このため、背景に光ノイズの少ない非常に暗い状態で、物質を励起することができる、
- 2) オリンパス(株)が作製した SPR センサモジュールとほぼ同じ光学系で測定が可能である、  
ことが挙げられる。

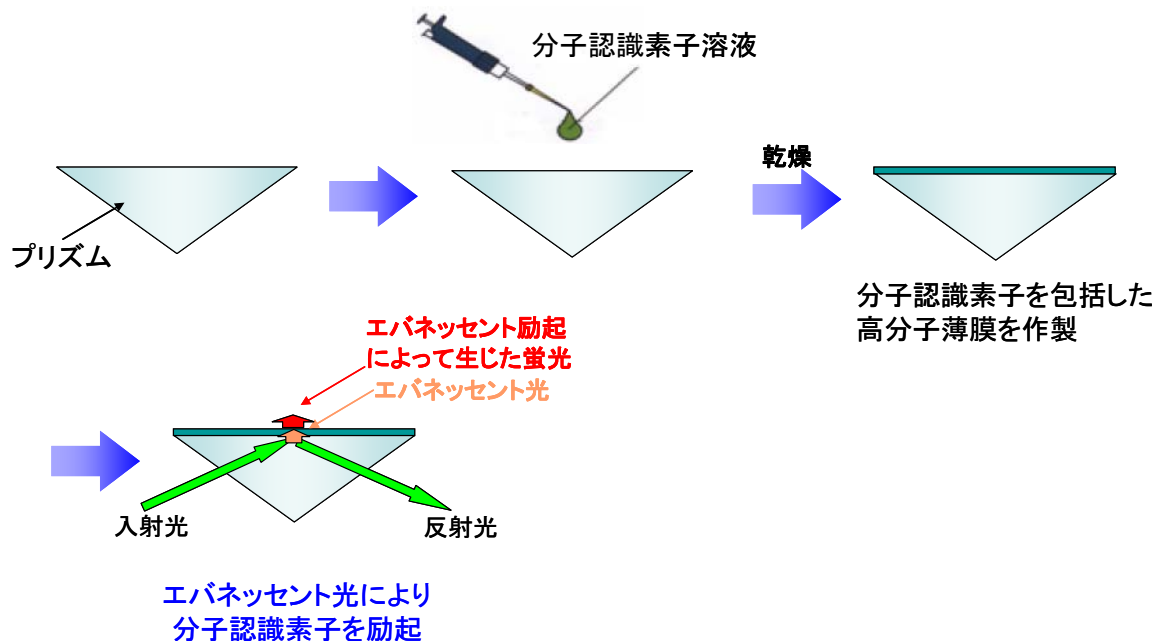


図 33 エバネッセント励起法による過酸化脂質検出の概念図

エバネッセント励起法による過酸化脂質の蛍光検出測定では、図 33 に示したように、まずプリズム上に分子認識素子を包括した高分子溶液を滴下することによって、基板上に高分子薄膜を作製する。この状態で、全反射するように光を照射し、生じたエバネッセント光によって分子認識素子を励起し、生じた蛍光をモニターする。

本実験では、オリンパス（株）と共同で実施した。オリンパス（株）が提供した基板の上に、図 33 に示した操作と同様の方法を用いて、我々が開発した分子認識素子を固定化した。

以下に、固定化条件について記載する。

#### 2-2-5-1 実験方法

分子認識素子：DPPEA-BODIPY

高分子材料：PMMA, PVC

抗酸化剤：2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT)

基板：ガラス基板 (BK7)

スピコーター：ミカサスピコーター MS-A100 (MIKASA Co., Ltd., Japan)

固定化法：DPPEA-BODIPY 溶液、高分子材料溶液、抗酸化剤溶液を最適な条件下で混合した溶液を、ガラス基板上に滴下し、スピコーターにより薄膜を作製した。その後、遮光したデシケーター内で減圧乾燥を行った。

固定化が終了した基板は、オリンパス(株)に送付し、同社の測定装置を用いてシグナル検出測定を実施した。

#### 2-2-5-2 測定結果

オリンパス(株)にて実施した測定装置の光学系を図 30 に示す。分子認識素子を固定化したガラス基板は、マッチングオイルを介してプリズムに装着されている。過酸化水素を基板表面に導入し、固定化された分子認識素子と反応させる。この状態で、488nm のレーザーを全反射させるように照射させることによって、エバネッセント光を誘起し、分子認識素子を励起状態にする。生じた蛍光を、光センサによって検出することによって、定性分析、定量分析を行うことが出来る。

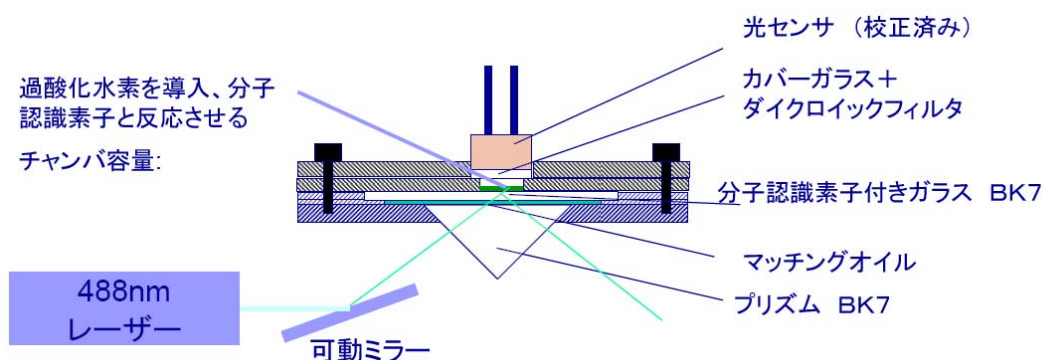


図 34 エバネッセント光による過酸化脂質検出用分子認識素子の蛍光検出の模式図

まず、PMMA 薄膜中に固定化された分子認識素子と過酸化水素との反応を試みたが、シグナルは検出されなかった。これは、PMMA 膜の脂溶性が高いため、エバネッセント光が生じる領域まで過酸化水素が薄膜中に十分に染み込まず、分子認識素子と過酸化水素との反応が起きなかったためであると考えられる。

一方、PVC 薄膜中に分子認識素子を固定化した薄膜を用いて、種々の濃度の過酸化脂質を基板上に滴下後、蛍光強度を測定した。その結果、図 35 に示したように、過酸化脂質濃度に対して、蛍光強度は直線的に増加した。以上の結果から、エバネッセント光によって分子認識素子を励起状態にできたこと、蛍光強度をモニターすることによって過酸化脂質を定量的に検出できることが分かった。

さらに、オリンパス（株）は、上記技術を蛍光センサモジュールに採用することによって、過酸化脂質の検出を実証出来た。

以上の結果より、過酸化脂質検出用分子認識素子を用いたバイオ材料の MEMS への適応の可能性を示すことが出来た。

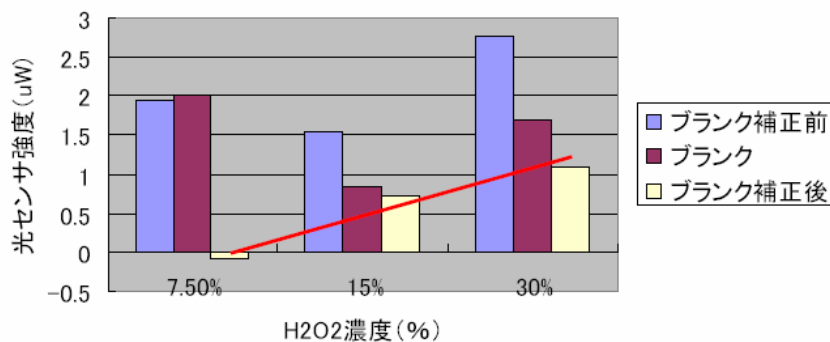


図 35 種々の濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した時の分子認識素子の蛍光強度

## 2-4. 開発成果のまとめ

### (1) 目標の達成度

|         | 研究項目           | 目標  | 成果  | 達成度 |
|---------|----------------|---|---|-----|
| 基本計画の目標 | 分子認識素子の構築      | 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)および過酸化脂質を検出するための分子認識素子の開発 | 標的物質と特異的に反応し、蛍光を発する分子認識素子の開発に成功<br><br>分子認識素子                     | ○   |
|         | 固定化方法の開発       | ・分子認識素子を基板上に精密に固定化<br>・シグナルの検出を確認         | Au基板、ナノピラー基板、ガラス基板上に有機薄膜を介して分子認識素子の固定化に成功。シグナルの検出を確認  | ○   |
|         | MEMS基板の作製および評価 | ・MEMS構造体中の基板上に分子認識素子を固定化<br>・シグナルの検出を確認   | 東京大学及びオリンパスが作製したMEMS基板上に分子認識素子を固定化→シグナルの検出を確認<br><br>オリンパス製バイオセンサ | ○   |
| 自主目標    | 検出方法           | 2種類以上の光学的検出方法に対応した素子の構築                   | SPR法、蛍光検出法、エバネッセント励起法に対応した素子を開発し、その特性を評価した。   | ○   |

達成度 ×：目標未達成、△：条件付で目標達成、○：目標達成、◎：目標を大幅に上回る成果

疾患関連物質を特異的に検出するための分子認識素子の開発に始まり、分子認識素子を基板上に精密に固定化する方法の開発を経て、最終的に東京大学、オリンパス（株）との連携によって、当初の目標通りに、バイオMEMSセンサーへの適応の可能性を実証出来た。

### (2) 成果の意義

疾病関連マーカータンパク質などを特異的に認識するためのバイオ材料とMEMSの微細加工技術を融合することによって、微小のバイオセンサーを構築する上での有用な知見となった。

### (3) 知的財産等の取得

| 特許の名称  | 特徴・強み・新規性                                    |
|--|--|
| タンパク質分析用試薬<br>(特願 2008-027552)   | VEGF を検出するための新規分子認識素子の物質特許と固定化法についての用途に関する特許 |
| ポロジピロロメタン誘導体及びその過酸化脂質を検出するための新規分子認識素子の物質特許<br>を用いた過酸化脂質測定試薬<br>(特願 2008-153991 ) | 特許   |

(4) 成果の普及

学会発表

| 名称                 | 発表題目 (発表者)  | 発表日        |
|--------------------|---|------------|
| 日本化学会第88春季年会       | 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を検出するための機能性ペプチドの創製 (鈴木 祥夫)  | 2008年3月28日 |
| 日本分析化学会第57年会       | 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を検出するための機能性ペプチドの創製 (鈴木 祥夫)  | 2008年9月12日 |
| 日本分析化学会第57年会       | BODIPYを蛍光団として用いた新規過酸化脂質測定試薬の設計・合成 (井上 直子)   | 2008年9月10日 |
| 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム | 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を検出するための蛍光ペプチドの創製 (鈴木 祥夫)   | 2008年9月18日 |
| 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム | ボロンジピロメタンを蛍光団として用いた新規過酸化脂質測定試薬の開発 (井上 直子)   | 2008年9月18日 |
| Pittcon 2009       | Novel Fluorescent Peptides for Detection of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (鈴木 祥夫) | 2009年3月9日  |

論文発表

| 論文誌   | 題目  | 著者                  |
|---|---|---------------------|
| BIOSCIENCE<br>BIOTECHNOLOGY AND<br>BIOCHEMISTRY | Novel fluorescent probe for analysis of hydroperoxides based on boron dipyrromethane fluorophore    | 井上直子、鈴木祥夫、横山憲二、軽部征夫 |
| ChemBioChem                                     | Development of a Fluorescent Peptide for the Detection of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) | 鈴木祥夫、横山憲二           |

展示会などへの出展

| 開催時期    | 展示会名称                |
|---------|----------------------|
| 2007年7月 | 第18回マイクロマシン MEMS 展示会 |
| 2008年2月 | nano tech 2008       |
| 2008年7月 | 第19回マイクロマシン MEMS 展示会 |
| 2009年7月 | 第20回マイクロマシン MEMS 展示会 |

プレス発表

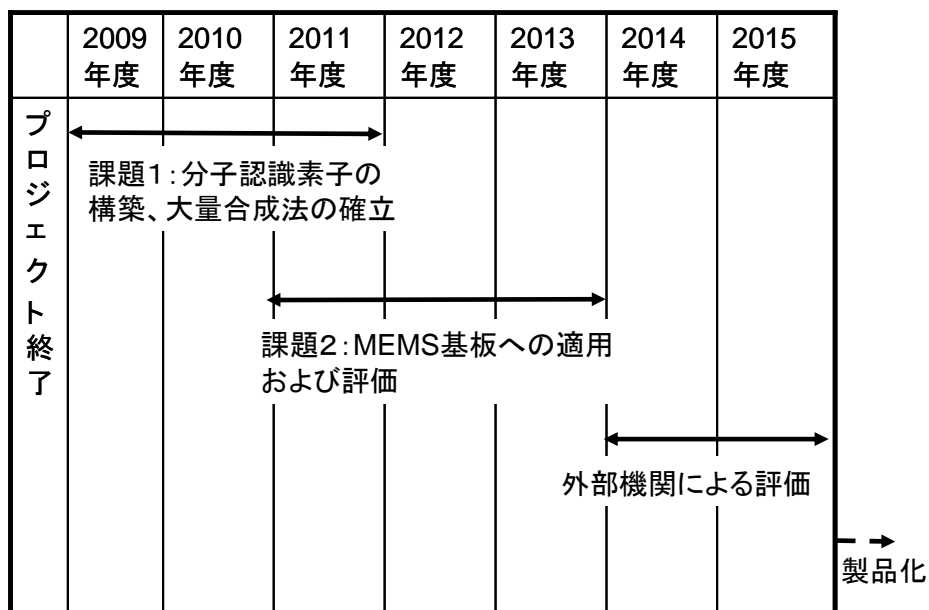
| 発表時期 | 要旨 |
|------|----|
|------|----|

|           |  |
|-----------|--|
| 2008年8月8日 | 血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を検出するための材料の開発<br>（日本経済新聞に掲載） |
| 2008年9月2日 | 血管内皮細胞増殖因子を検出するための機能性材料の開発<br>（化学工業日報に掲載）    |

研究成果を普及させるために、特許：2件、口頭発表：6件、論文：2件、プレス発表：2件、展示会：4回を実施した。

3. 実用化・事業化の見通し

(1) 成果の実用化可能性



本事業の成果は医療機器に応用されると考えられる。医療機器は非常に高い安全性・信頼性が求められるため、本研究開発事業期間の後、

①分子認識素子の構築、大量合成法の確立

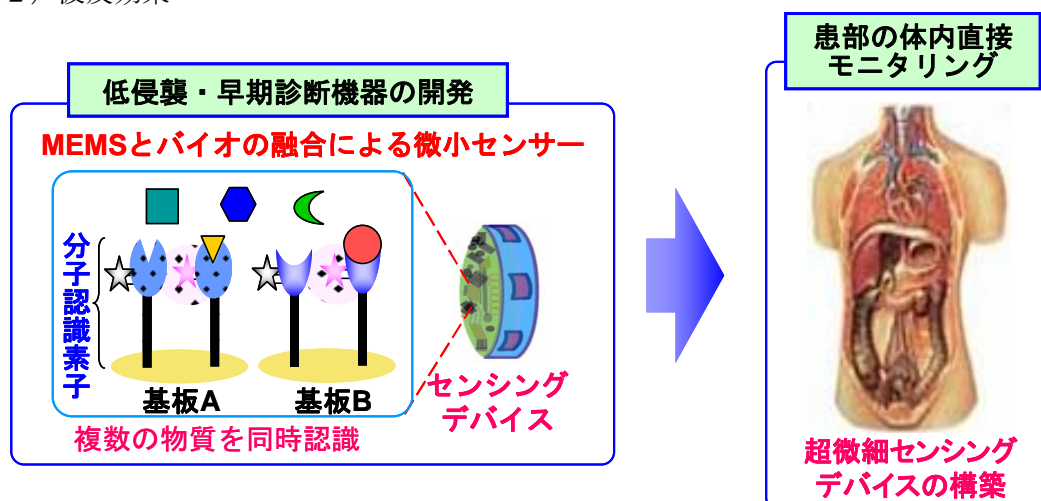
②MEMS 基板への適用および評価

が必要となる。

その後、外部機関による安全性確認実験を経て製品化を行う予定である。



(2) 波及効果



癌をはじめとした疾患は複数の原因物質が共同的に作用している。そこでこれらの原因物質を特異的に認識する複数種の分子認識素子を固定化した基板をアレイ状に配置し、MEMSの技術を用いてデバイスのダウンサイジング化を図る。この技術を用いて作製した超微細センシングデバイスを、体内での患部の直接モニタリングに適用すれば、癌の早期診断、早期治療に大きく貢献することが期待される。