

別紙2 (補足資料)

<p>サブテーマ名：DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価 テーマ名： 抗体電極チップ及び検出装置の開発</p>
<p>サブテーマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）今井 一英 研究従事者（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター 研究員 今井 雄一郎、(H17-H18)</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 蛋白質間の相互作用の検出方法としてはウエスタンブロット法、ELISA法、マイクロアレイ法等が知られている。とりわけ近年の注目のマイクロアレイ法は少量の試料よりハイスループットに検出できることが優れている。しかし、通常マイクロアレイ法は試料を蛍光標識し蛍光スキャナーで検出するために実験コストがかかり、また検出装置も高額になりやすい。そこで、これらのデメリットを解消するため電気化学的な検出を試みた。電気化学的な検出は、蛍光検出とは異なり試料を蛍光標識する必要がないためその分のコストダウンが期待される。また、光学系の設備を使用せず電流・電圧系を制御するために装置自体の小型化や作製費用の抑制が期待される。</p> <p>②研究の独自性・新規性 半導体製造技術を応用して多試料測定可能な電極チップを作製した。次いで作製した電極チップの直線性や検出限界等の特性を評価した。検出装置に関しては別途検討し小型化を目指し、制御ソフトに関しても取り扱いが易しいインターフェースになるように調整した。検出原理は電子供与性の酵素と多試料測定可能な小型電極チップを組み合わせることで連続的に目的の電極を測定する方式であり、このような検出装置は例がない。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） フェーズⅡ（H17-H18）： 電極チップの作製と評価、検出装置の作製と評価。 フェーズⅢ（H18. 11. 25事業完了日以降）： 適用分野の調査や連携先の模索。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>はじめに、電極チップを作製し直線性や感度当の特性を評価した。電極チップは17mm×17mmの基板上に36個の作用電極、2個の対電極、2個の銀/塩化銀参照電極を持つデザインを採用した。チップ最表面には絶縁膜としてポリイミドをコーティングした。検出系としてはチップに蛋白質等の生体物質を固定化しておき、目的の試料をふりかける。次いで2次抗体やグルコースオキシダーゼ(GOD)標識3次抗体を反応させる。最終的にはグルコースをふりかけることでGODと反応し過酸化水素が生成する。その状態で+0.7V vs 銀/塩化銀の電位を印加することで過酸化水素が電気化学的に酸化され電子が発生する。発生した電子の量により生体反応の有無や程度を検出することを想定した。作製した電極チップを評価したところ過酸化水素を50 μM～1mM程度の範囲で直線的な電流値の増加が観察されまた、電極チップ上に蛋白質を固定化し測定したところ特異的にシグナル電流値の増加が見られたことから、電極チップとして機能することが示唆された。</p> <p>一方、検出装置は測定方法を当初、多試料同時測定を目指していたが電流値の異常が見られ連続測定方式へと切り替えた。測定方式の切り替えにより測定時間は長くなったものの、1電極あたりの電流変動レベルが市販の測定装置に比べ非常に低く、安定した装置であることが確認された。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <ul style="list-style-type: none"> 36箇所センシング部位を持つ多電極チップを作製した。 同時検出方式と連続測定方式の測定装置を作製した。 <p>特許件数：0 論文数：0 口頭発表件数：1 ポスター発表件数：2</p>
<p>研究成果に関する評価</p> <p>1 国内外における水準との対比</p> <p>国内で見た場合、アレイ化技術と電気化学的な方式を組み合わせた生体物質の検出は東芝、TUM Gene等が報告している。これらはいずれも検出対象は遺伝子DNAであり抗体等の蛋白質ではない。一方、国外の場合、米Affymetrix社が蛍光によるDNA検出でシェアを伸ばしている。電気化学的な方式では米Nanogen社が電極をアレイ上に配列させDNA検出を行っているものの、数十ものアレイ化した蛋白質を電気化学的に検出する方法は未だ確立されてはならず商品化に至った例もほとんどない。</p>

2 実用化に向けた波及効果

今後、電極チップの有用性や測定工程の自動化を目指した検討が行われると思われる。最終的には対象検査項目を絞った診断や食品検査等への応用への展開が期待される。

残された課題と対応方針について

課題としては、検出に用いる酵素や装置構成の見直しがあげられる。活性が高い酵素自体が手に入らないと検出自体が高感度にならない。本研究でも酵素を直接固定化した場合は有意に電流値の増加を観察できるものの、間接的に反応させた場合ではほとんどシグナルが見られなかった。また、現在の装置は検出機としての装置でありチップ上での蛋白質反応や洗浄工程は別途行う必要がある。最終的にはこれら反応～洗浄～検出までを内包した装置が望まれる。さらに、検出対象を何にするかが重要であり弊社だけでは補足できない市場調査や潜在/顕在需要の把握が必要である。以上を踏まえ、電極チップとして本研究をただちに事業化する予定はないが、チップ作製のノウハウや検出装置作製時に得た知見等は様々な分野への展開の可能性もあり弊社独自の検討と提携先の模索を通じて方向性を考えたい。

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備： なし

地域負担による設備： チップ作製・解析用クリーンルームなど