

バイオアッセイ用の簡易型 DNA チップの開発

博士後期課程物質工学専攻
学生番号：09587701-1
遠藤 浩

目次

第 1 章	序論	1
1-1	背景	1
1-2	バイオチップの説明	1
1-3	DNA チップの検出原理	2
1-4	DNA チップ、検査装置のこれまでの流れ	6
1-5	DNA チップおよび検査装置の目指す方向	7
	参考文献	9
第 2 章	チップと装置の開発	10
2-1	背景	10
2-2	3 電極系の測定	10
2-3	電極モジュールの開発	13
2-3-1	W 電極の作製	13
2-3-2	電極モジュールの作製	17
2-4	電気化学アナライザー (HAN-H100) の開発	19
2-4-1	機能概要	19
2-4-2	装置各部の説明	21
2-4-3	仕様	23
2-4-4	動作準備	24
2-4-5	USB ドライバー及びアプリケーションソフトのインストール	24
2-4-6	電極の準備	25
2-4-7	測定準備	28
2-4-8	測定方法	28
2-4-9	アプリケーションの説明	30
2-4-10	アプリケーションを用いた測定	31
2-5	結言	35
	参考文献	36
第 3 章	シングル型 DNA チップの電気化学的口腔癌診断への応用	37
3-1	緒言	37
3-2	実験	39
3-2-1	サンプルの処理方法	39
3-2-2	TRAP アッセイ	39
3-2-3	電気化学測定	40

3-3	結果と考察	42
3-3-1	臨床検体のテロメラーゼ活性	42
3-3-2	臨床検体のテロメラーゼ活性検出可能領域	43
3-3-3	臨床検体のテロメラーゼ陽性率	44
3-4	結言	47
	参考文献	48
第4章	マルチ電極モジュールと装置の開発	49
4-1	緒言	49
4-2	電極モジュール	49
4-2-1	W 電極の作製	49
4-2-2	電極ホルダーの構想	51
4-2-3	電極モジュールの構成	51
4-2-4	寒天製造治具	54
4-3	マルチ電極用測定装置（EMC-02AN）の開発	55
4-3-1	機能概要	55
4-3-2	装置各部の説明	56
4-3-3	仕様	58
4-3-4	動作準備	59
4-3-5	USB ドライバー及びアプリケーションソフトのインストール	59
4-3-6	測定準備	59
4-3-7	測定方法（本装置による測定の場合）	59
4-3-8	測定方法（外部装置による測定の場合）	60
4-3-9	アプリケーションの説明	61
4-3-10	アプリケーションを用いた測定	61
4-4	チップの評価のためのサンプル 1-オリゴヌクレオチドターゲットによる検討	61
4-4-1	チップの評価のためのサンプル 2-非対称 PCR 産物ターゲットによる検討	61
4-4-2	チップ評価のためのサンプル 3-RNA ターゲットによる検討	62
4-4-3	チップの評価のための電気化学測定	64
4-4-4	チップの評価	65
4-5	結言	69
	参考文献	70
第5章	結論	71
	参考文献	75

第1章 序論

1-1. 背景

ポストゲノム解析が新しい局面を迎える中で、ヒトのゲノム配列よりも機能情報の方が求められるようになってきた。配列決定後の解析としては遺伝子多型の機能解析、刺激や疾患などに伴う発現変化、遺伝子機能の解析などがあり、これらをまとめてポストゲノムと呼ぶ。ポストゲノムの研究に必須なものとしてDNAチップをはじめとするバイオチップがある¹⁾。

小型化を目指したバイオチップの開発においては多種機能の集積化が必要であり、そのためにはミクロン、あるいはナノサイズで分子を配置することができる表面修飾や微細加工技術などのナノテクノロジーが重要となる。最近では、このようなナノテクノロジーをベースに、小型で感度に優れた電流や電位などの電気シグナルを計測する遺伝子解析技術の開発が活発に行われてきた。例えば、金表面に化学吸着するチオール化合物の特性を活かして金電極や金ナノ微粒子表面にDNAを修飾する方法やDNAの分子サイズまでナノ構造制御したデバイスと電気計測を組み合わせるバイオチップへ応用する例が多く報告されており、バイオ計測法の新規機能解析技術として将来性が期待されている²⁾。

世界のバイオチップ市場は、2015年には91億USドルに達し、2009～2015年にかけて20.9%の年平均成長率で推移すると見込こまれている。北米は2015年までにバイオチップ産業において、最高の市場シェアを維持すると見られており、アジア経済国は2009～2015年にかけて23%の年平均成長率を保持すると予測されている³⁾。

1-2. バイオチップの説明

バイオチップとは、生体分子（DNA、たんぱく質、糖鎖など）や細胞をプローブとして基板上に高密度に固定したもので、チップ上のプローブと特異的に相互作用する標的分子や化合物などを、大量かつ同時並行的に検出できるデバイスのことである。そのうちDNAが固定されたものをDNAチップ、またはDNAマイクロアレイと呼ぶ。この他、マイクロ流路を用いた分析システムもバイオチップの一つとして考えられる。

今日のバイオチップ市場を主導しているのはDNAチップで、遺伝子発現（細胞内で活性化している遺伝子を知ることで病気の症状を詳細に解析する技術）やSNP解析（一人一人の遺伝子の違いを見分け、病気のかかりやすさや薬の効き方、副作用などを予測する）など、創薬や新薬開発の有力なツールとして使われている。また、外部から侵入した微生物やウイルスの遺伝子を調べることで、疾病の原因となっている病原体の同定やインフルエンザウイルスなどの型判定にも利用することができる。体外診断用としては2007年に米国食品医薬品局（FDA）ががんの転移再発の判定用キットの販売承認を与えたのを始めとして、国内では子宮頸がんの原因となるヒト・パピローマ・ウイルス（HPV）の型判定用チップが認可されるなど、医療用の市場が広がり始めている。さらに、食品検査の分野でも、食品の遺伝子配列からブランド判定や微生物汚染の検出など新たな市場の広がりが期

待されており、急速な産業規模の拡大が予測されている⁴⁾。

DNA は、直径 2.37 nm、螺旋（らせん）一巻きが 3.4 nm の右巻き螺旋構造をとり、螺旋一巻きに約 10 個の塩基が含まれている。4 種の塩基は必ず決まった相手と結合するというナノメートルスケールでの完全な物質選択性が、DNA の多彩な機能や特性と結びついている。また、わずか一つの DNA の置換えや消失が生体機能に大きな影響を与えることも知られている。DNA チップは、ナノ領域での塩基選択性を利用して、わずか 1 塩基だけの DNA の違いまで容易に検出するデバイスであり、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの接点に位置する新しいデバイスと考えられる⁵⁾。

1-3. DNA チップの検出原理

DNA チップは、DNA を構成する 4 種の塩基が、G-C、A-T という対で結合し、DNA の主構造である 2 本鎖を形成することを利用している。基板上に 1 本鎖 DNA（プローブ）を固定しておき、調べたい DNA（ターゲット）を 1 本鎖状態にした試料を反応させると、プローブと相補的な配列を持ったターゲットが存在すれば 2 本鎖を形成する。2 本鎖 DNA チップの構造を図 1 に示した。この 2 本鎖形成を光学的、電氣的に検出する手法が DNA チップの検出原理である⁵⁾。

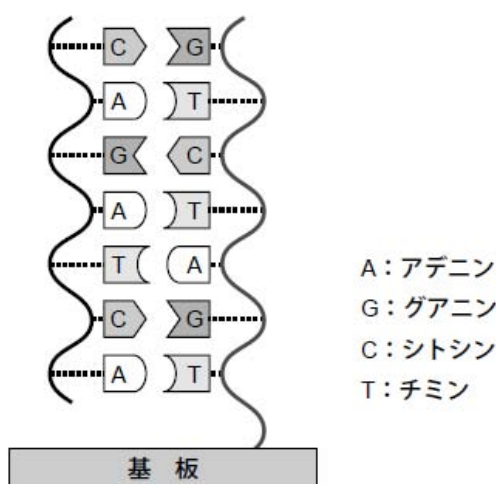


図 1. DNA チップの構造。基板上に固定した 1 本鎖 DNA と完全に相補的な配列を持った一本鎖 DNA だけが 2 本鎖を形成する。この 2 本鎖形成を光学的、電氣的に検出する。

図 2 に電気化学的な DNA 検出技術を示した⁶⁾。検出は以下の工程で行われている。
①プローブ DNA が結合した金電極上で検体 DNA とハイブリダイゼーション反応を行う。目的の遺伝子が検体 DNA 中に含まれると電極上でハイブリッド（2 本鎖）が形成される。

②形成したハイブリッド部位に特異的に結合する挿入剤という分子を添加する。③電圧印加による挿入剤の酸化電流を検出する。

流れる電流値の大小を比較するだけで簡単に DNA の解析が可能であり、蛍光検出方式に比べ装置の小型化が可能となり持ち運びが容易となると期待される。そのため、研究用途だけでなく、臨床検査や食品検査など幅広い分野での利用が期待されている⁶⁾。

現状、電気化学的な DNA チップは、開発メーカーや大学で商品化されている。以下に主な DNA チップおよび検査装置を紹介する。

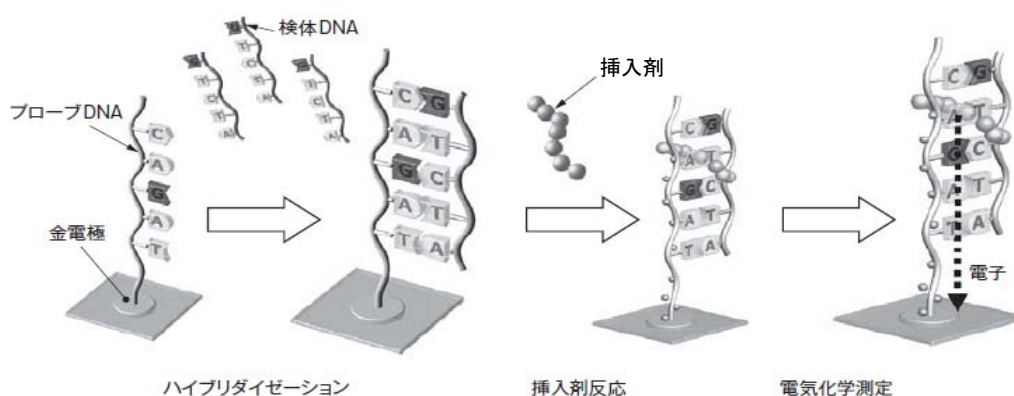


図 2. 電気化学的 DNA 検出技術の原理

2 本鎖 DNA 部位に結合した挿入剤の電気化学的な酸化反応に由来する電流測定で DNA の検出を行う。

東芝は蛍光検出型 DNA チップで必要とされる検体 DNA の色素標識や大型の蛍光検出器が不要な下記図 3 に示した電流検出型の DNA チップ基板とカセットを開発した。

DNA チップ基板は複数の金電極をパターンニングした数 cm 角のガラス基板で、それぞれの電極上には異なるプローブ DNA を固定化することが可能である。

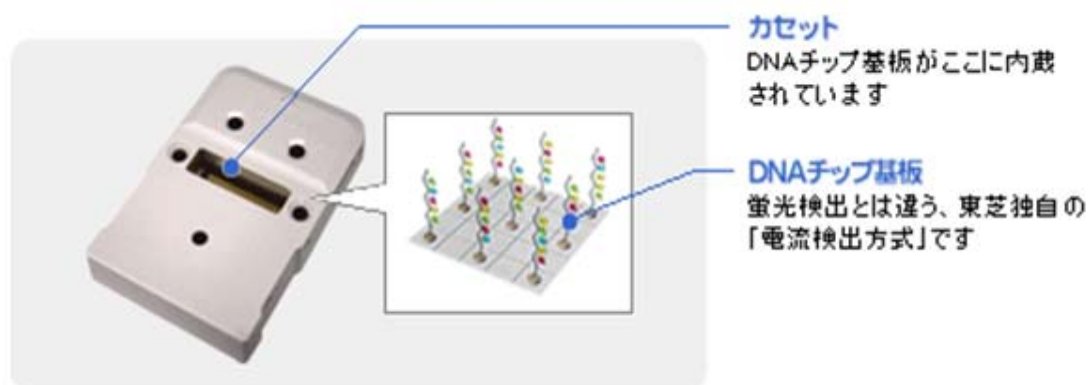


図 3. Genelyzer 専用 DNA チップカセット (電流検出型)

また、DNA チップに合わせて専用の DNA 検査装置 Genelyzer (図 4) も開発している⁶⁾。



図 4. DNA 自動検査装置 Genelyzer

Motorola Clinical Micro Sensors 社の DNA 検出システムには電気化学的サンドイッチ法という方式が用いられている。図 5 にその原理を示した⁷⁾。ターゲット DNA 検出には捕集用プローブ (capture probe) と検出用プローブ (signaling probe) が利用されている。

捕集用プローブは電極表面に固定化されており、検出用プローブは複数のフェロセンを固定化している。フェロセンは安定な酸化還元反応を行えるので、適当な電位をかけることにより電流が流れることになる。

最終的にターゲット DNA のみに 2 つのプローブが結合できるので、電極上にフェロセンが濃縮され電位をかけるとターゲット DNA 量に応じて電流が流れることになる。これによりターゲット遺伝子の検出を可能にしている⁸⁾。

当該メーカーの製品として図 6 に Biochip cartridges eSensorsTM4800 を図 7 に Electronic biochip reader eSensorTM4800 の写真を示した⁹⁾。

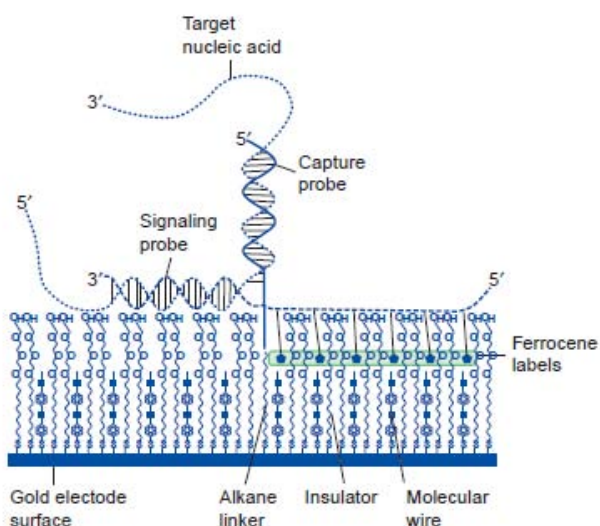


図 5. Motorola Clinical Micro Sensors 社の DNA 検出システム

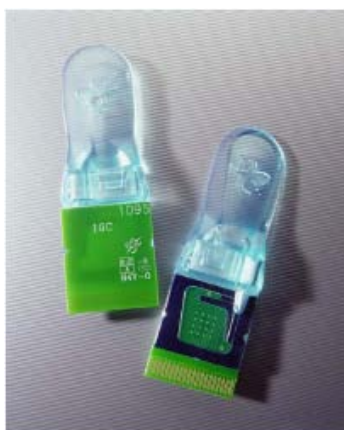


図 6. Biochip cartridges
eSensor™4800

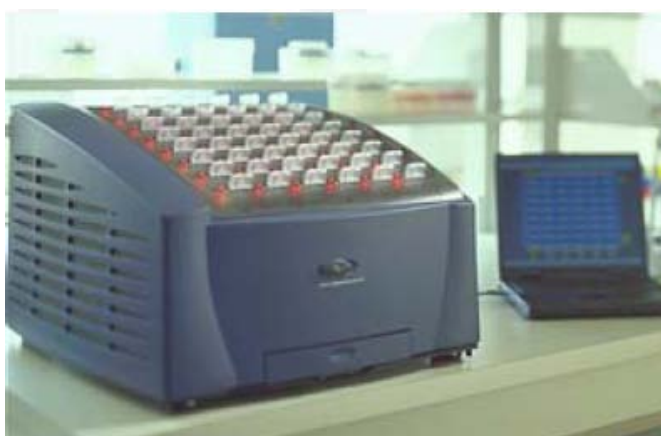


図 7. Electronic biochip reader eSensor™4800

Xanthon 社が開発した Xanthon Xpression Analysis System™ のタイタープレートと検出装置をそれぞれ図 8 および図 9 に示した¹⁰⁾。また、本システムの原理を図 10 に示した⁸⁾。

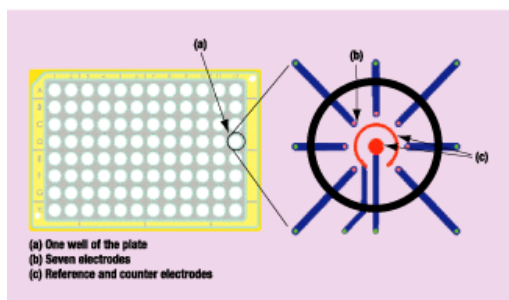


図 8. Xanthon analysis



図 9. Xanthon compact instrument

オリゴヌクレオチドプローブを固定化した電極にターゲット DNA をハイブリダイゼーションすると電極上に濃縮されたターゲット DNA 断片のグアニン部の酸化反応をルテニウム錯体がメディエーターとして仲介することで電流が発生する。この電流値は電極に濃縮されたターゲット DNA の鎖長が長い場合、電流増加はきわめて大きい⁸⁾。

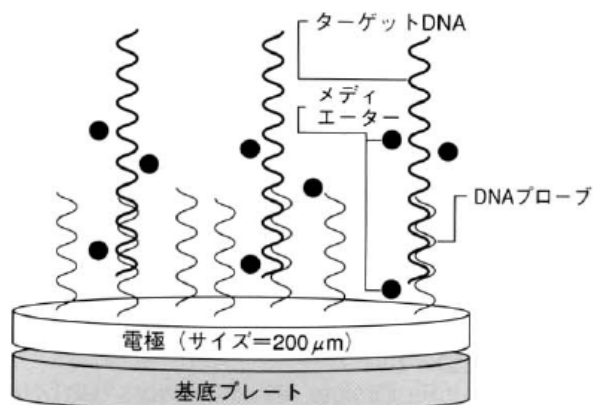


図 10. Xanthon 社の DNA 検出システムの原理

Nanogen 社は DNA の電気泳動により特定の電極上へ DNA プローブを固定化することに成功した (図 11 参照)。電極上にアビジンを固定化したゲルをのせておく。これに DNA プローブであるビオチン化オリゴヌクレオチド共存化特定電極にプラスの電位をかける。ビオチン化オリゴヌクレオチドはプラス電荷を有する電極へ電気泳動により泳動される。この際電極上のゲル内のアビジンにビオチン化オリゴヌクレオチドが捕捉されて固定化される。この手法においても電位をかけた電極のみに DNA プローブのアドレッシングに電気化学的反応や電気泳動を利用したものであるが、検出には蛍光法を利用している¹¹⁾。

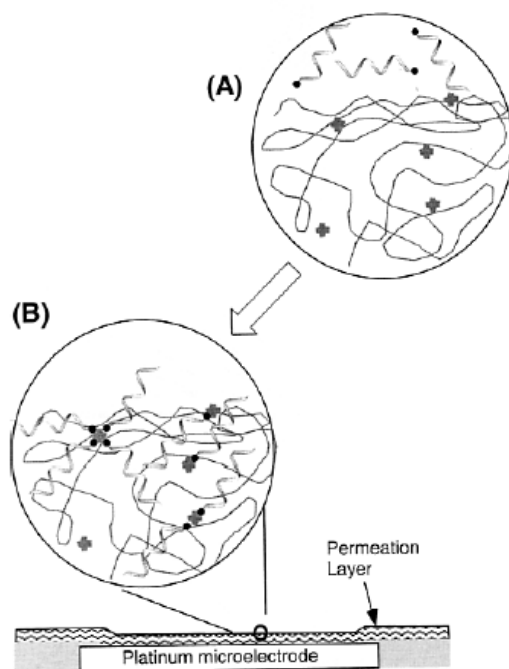


図 11. Nanogen 社の DNA プローブ固定化法。電極上にアビジンを閉じ込めたゲルを固定化してプラスの電位をかける。溶液中のビオチン化 DNA プローブが (A) から (B) のようにゲル中を泳動してアビジンに補足固定化される。

1-4. DNA チップ、検査装置のこれまでの流れ

研究用途で主に用いられているものは蛍光色素を使って DNA を検出する方式である。しかし、蛍光検出方式は、DNA を予め蛍光色素で標識する必要があり操作が煩雑であるだけでなく、蛍光むらが生じやすいなどの問題点が指摘されている。また、標識する蛍光色素が高価であるゆえに、ランニングコストが高く、自動化が困難であり、検出に高感度の光学系を必要とするのでシステムも大型で高額になる。

そこで DNA チップが医療診断などの市場で普及する為には、これらの課題を克服した新しいチップが求められるが、蛍光検出方式に替わる新しい DNA 検出技術として 1990 年代より電気化学的な DNA 検出技術が研究されてきた。この方式は色素標識や光学検出系を必要としない為、チップ及びシステム共に低コスト化が可能である。また、煩雑な色素標識が不要な為に検出が短時間で可能である。更に検出系がコンパクトでシステムの小型化が容易であるなど蛍光方式での問題点が克服可能であると考えられる⁶⁾。

1-5. DNA チップおよび検査装置の目指す方向

電気化学活性種をもつ DNA 固定化電極は DNA に作用する酵素の検出へも応用が可能である。がん化した細胞の特徴の 1 つに、テロメラーゼ活性が見られることが挙げられる。

テロメラーゼとはテロメアと呼ばれる DNA を伸ばす酵素で、正常細胞ではテロメラーゼの活性は検出されないが、がん化した細胞ではテロメラーゼ活性が見られ、これを指標とすればがんの診断ができるものと期待される。図 12 に電気化学的テロメラーゼアッセイ法によるがん診断の原理を示した¹²⁾。

DNA を伸長する酵素であるテロメラーゼの検出は DNA 固定化電極によってすでに達成されており、テロメラーゼの基質となる TS プライマー-DNA を電極へ固定化し、これにテロメラーゼを含む検体を作用させると電極上の TS プライマーがその活性に応じて伸長され 4 本鎖を形成する。そこに竹中らが開発した電気化学的活性種である試薬、フェロセン化ナフタレンジイミド (FND) を結合させる。この伸長度合は FND の濃縮量によって電気化学的シグナルへ変換できる。

従来は、PCR とゲル電気泳動を必要とする手間と時間のかかる手法で診断法としては十分ではなかった¹³⁾。現状では患者のサンプルを検査会社へ委託することにより検査が行われているが、テロメラーゼ酵素の安定性などから病院のベッドサイドで使える診断法が求められている。

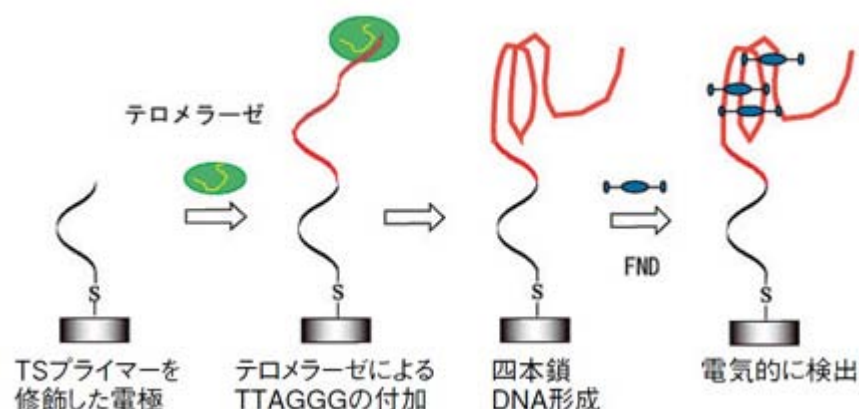


図 12. 電気化学的テロメラーゼアッセイ法によるがん診断の原理

DNA 検出法はバイオセンサーの観点からこれまで多くの研究がなされてきた。特に電気化学的手法によるものは、装置のコンパクト化や低コスト化の可能性から興味もたれている。今後、医療現場等で広く普及させるためには、コスト、操作性、信頼性等の向上が必要である¹⁴⁾。

したがって、本研究の目的は、電気化学的検出法として検出の高精度化、操作の迅速性、装置のコンパクト化および検出の低コスト化を達成するための DNA チップおよび検査装置を開発することとした。

参考文献

- 1) 斎藤晋, (4)バイオチップの動向, 東レリサーチセンター, THE TRC NEWS, No.92 (2005).
- 2) 宮原裕二, 花方信孝, 坂田利弥, マイクロ・ナノ加工技術を用いたバイオエレクトロニクスデバイス, 物質材料研究アウトルック(2006).
- 3) <http://www.spi-information.com/report/03049.html>
- 4) <http://www.jmac.or.jp/ja/biochip.html>
- 5) 源間信弘, 橋本幸二, 石森義雄, 医療診断用 DNA チップ 東芝レビュー, Vol.57 No.1, 29-32 (2002).
- 6) 源間信弘, 橋本幸二, 二階堂勝, テーラーメイド医療を実現する電流検出型 DNA チップ, 東芝レビュー, Vol.63, No.2 (2008).
- 7) T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, Nat.Biotechnol., 21, 1192 (2003).
- 8) 竹中繁織, DNA 診断に最適な次世代 DNA チップ, Bio ベンチャー, Vol.2, No.3 (5・6月号) (2002).
- 9) eSensor™ Products for Clinical Diagnostics MOTOROLA life Science
- 10) N. D. Popovich, Mediated electrochemical detection of nucleic acids for drug discovery and clinical diagnostics, IVD Technology, April 1(2001).
- 11) 竹中繁織, 電気化学的遺伝子センサの現状と未来, オレオサイエンス, 第3巻, 第9号, (2003).
- 12) S.Sato, H.Kondo, T.Nojima, S. Takenaka, Analytical Chemistry, 77, 7304 (2005).
- 13) 竹中繁織, Chap 9 DNA バイオセンサー, 核酸化学のニュートレンド DNA/RNA の新たな可能性を拓く, 日本化学会編, 化学同人, pp.108-115 (2011).
- 14) 源間信弘, 東芝 DNA チップ技術とその可能性, シンポジウム (2004).

第2章 チップと装置の開発

2-1. 背景

化学物質の特性を電氣的に計測する方法を電気化学測定といい、化学物質の成分や濃度、電極上における酸化還元反応の詳細なメカニズムなどについての様々な情報が得られる¹⁾。1990年代後半にトランスクリプトーム解析を推進する技術としてマイクロアレイが登場した。マイクロアレイはDNAチップとも呼ばれており、様々な配列をもつ極微量のDNAをガラスやシリコン製の小基板上に高密度に整列して配置(array)したものである²⁾。DNAチップが医療現場で活躍するためには、チップの性能が向上することのほかにも、チップのコストが下がることが重要となる。従来のDNAチップは1枚数万円以上と現場で使用するにはあまりにも高価すぎた。高性能で低コストなDNAチップを作製するためには、マイクロ流体工学やコンビナトリアル合成、分子レベルでの操作など、幅広い技術が要求される。そのため、様々な分野の企業が自前のノウハウを活用すべくDNAチップ産業に参入している³⁾。

DNAチップの発現パターンを測定するためには、DNA断片に取り付けられた蛍光体をレーザーなどで検出するという方法が一般的であるが、この方法では検出器などがおおがかりで高価になるという欠点がある。そこで蛍光体ではなく、対をつくったDNA鎖だけに導電性の分子を結合させて、電気信号として発現パターンを読み取るという手法も研究されている³⁾。

2-2. 3電極系の測定

電気化学反応においては、2つの電極で酸化反応と還元反応が同時に進むが、どちらか一方の電極で進む反応だけに注目しないとその反応は正しく理解できない。

例えば、“電位差”には陽極と陰極の電位に関する情報が含まれていて両者を完全に分離することはできない。

しかし、どちらか一方の電極の電位が正確にわかれば、そこでどのような反応が起きているのかを推定できる。

またその電極に所定の電位をかけて計画的に反応を起こすこともできる。

このように電気化学反応系で注目する1つの電極をワーキング電極(作用電極)と呼ぶ。ワーキング電極の電位を知るには、リファレンス電極(参照電極)との電位差を測定するとよいが、例えば、ワーキング電極で酸化反応が起きているときにリファレンス電極では還元反応が起きている。

その際、リファレンス電極がSHE(標準水素電極)であれば電極周辺の H^+ の活量が低下して、電位が経時的に変化する為、正確なワーキング電極の電位の測定は困難になる。

そこで、第3の電極としてカウンター電極を用いる。ワーキング電極の電位はリファレンス電極に対して測定・制御するが、電位の正確さを保つ為、リファレンス電極にはほとんど電流を流さないようにする。しかし、ワーキング電極で酸化反応が起こる場合、

ワーキング電極が受け取った電子をどこかに流さなければならない。そのため、カウンター電極で還元反応を起こす必要がある。

このような系を 3 電極系という。

一般的な 3 電極系の概略図を図 1 に示す。電流はワーキング電極とカウンター電極間に流れ、電位はワーキング電極とリファレンス電極間で測定する。

電気化学ではこのような 3 電極式の測定系で測定を行う⁴⁾。

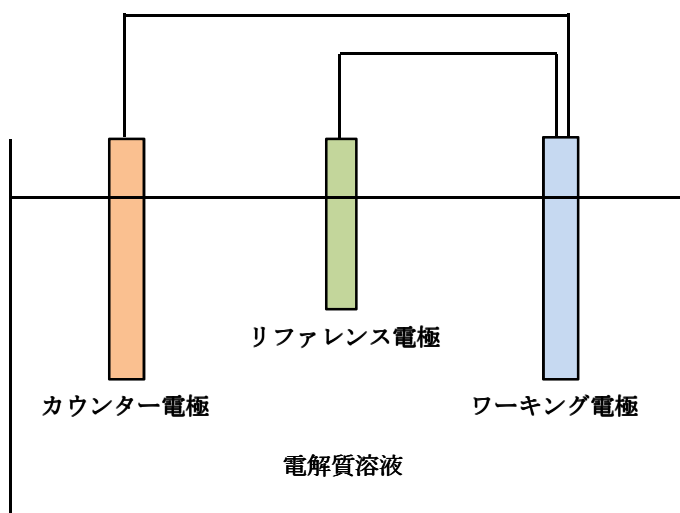


図 1. 3 電極系の概略図

3 電極系の測定に使用する装置をポテンシostatという。ポテンシostatを使えばワーキング電極の電位を測定できるだけでなく、一定の電位もしくは予め決められた波形の電位をかけて反応を起こし、ワーキング電極とカウンター電極に流れる電流を測定することも可能である。

陰極・陽極間の電圧を制御するのではなく、ワーキング電極の電位を制御することでカウンター電極の変化に影響されず、ワーキング電極の電位を制御もしくは測定できる。

ポテンシostatには外部からの信号を入力する端子を装備しており、ファンクションジェネレーター等から必要な波形を入力するとワーキング電極の電位をその波形通りに制御することが可能である。

図 2 にファンクションジェネレーターを接続したポテンシostatによる 3 電極系における測定の概要図を示した。

図より、ポテンシostatとファンクションジェネレーターからなる電気化学測定装置側と 3 電極とセルからなる電極モジュール側の大きく 2 つに分類することができる。

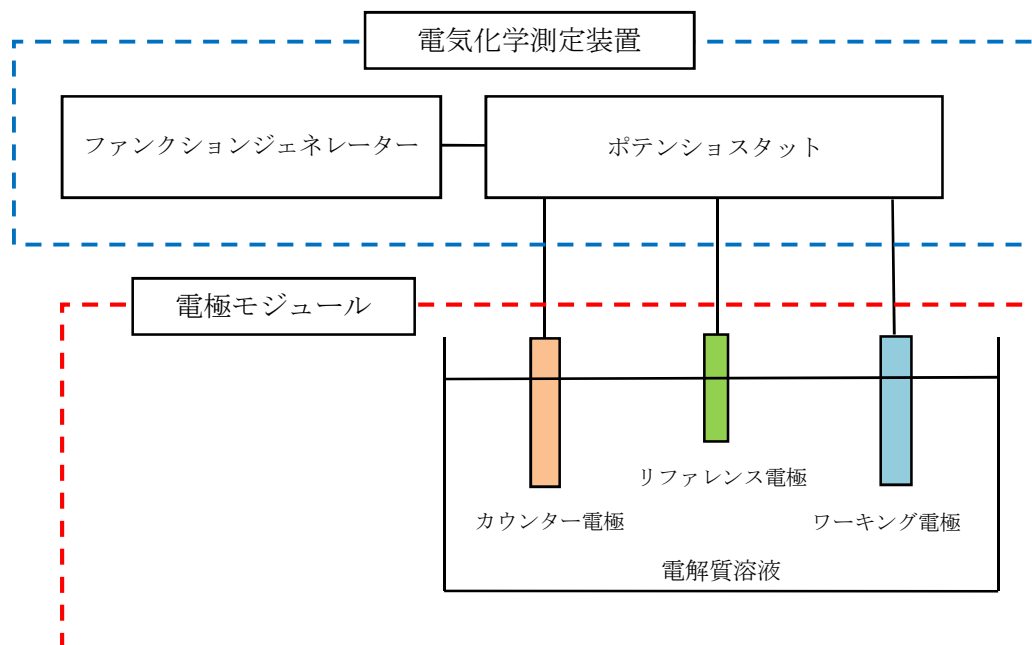


図 2. 3 電極系の測定概要図

本研究では DNA 等のプローブを修飾した電極チップを用いて特定タンパク質や酵素の検出を医療機関、各種研究機関において高精度かつ安価で実現可能にする為に取扱いが容易な専用の電極モジュールとコンパクトで短時間にリアルタイムな測定が可能な簡易型の電気化学測定装置（以下電気化学アナライザーと記す）の開発を行った。

3 電極系の電気化学測定においては、前述したように電極としてワーキング電極（以下 W 電極と記載）、カウンター電極（以下 C 電極と記載）、リファレンス電極（以下 R 電極と記載）が必要である。

各種サンプルの電気化学測定においては、電極表面上での電気化学反応は W 電極上で行われる為、W 電極表面は測定毎に常に測定に必要な条件を満足しておく必要がある。

従って、W 電極表面を毎回測定毎に研磨して洗浄するか、もしくは測定毎に W 電極を新調する必要がある。

本研究では、測定を行う現場でサンプルの短時間で容易な測定を可能にする為に、電極モジュールを測定毎に使い捨てで使用または電極モジュール内の W 電極のみを測定毎に交換して使用できることを前提に電極モジュールの構想を行った。

したがって、装置側に C 電極と R 電極を装備し、電極モジュールを電気化学アナライザーにセットした際に電極モジュールのウェル部に採取したサンプルに 3 電極が完全に浸漬できる状態を可能にする構成を検討した。

その構想図を図 3 に示した。

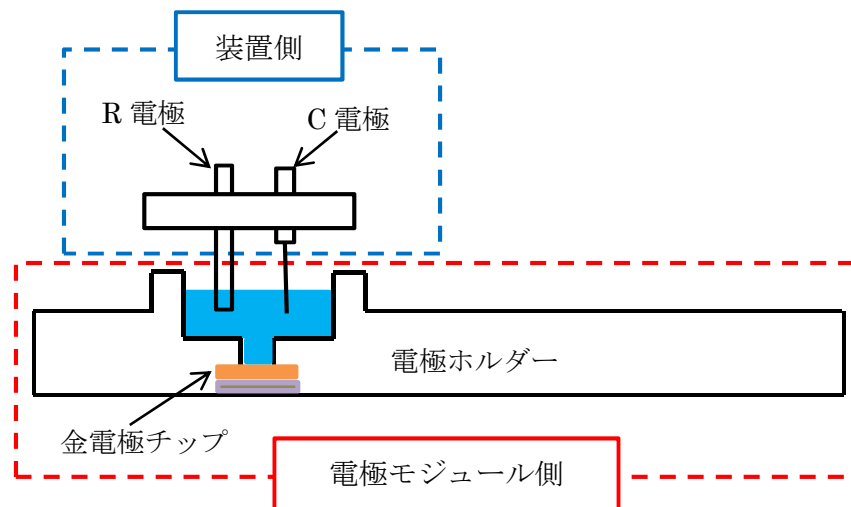


図 3. 3 電極の構想図

2-3. 電極モジュールの開発

2-3-1. W電極の作製

電極モジュールに装備する W 電極としては末端にチオール基を有するプローブ DNA の結合に必要な金電極を選択した。

1. 金コーティング方法の選択

(1)無電解金めっき

社内で製造しているプリント基板に配線を設け、金を無電解めっきして金電極の作製を行った。

プローブを均一に固定化する為に金表面を平滑にする必要がある為、まず金の下地になる銅箔の電解研磨を行い、平滑な銅箔表面に金めっきを行った。

金めっき後の金電極を用いて CV 測定の波形を観察したが、市販の金棒電極で得られるような安定した金の CV 波形は得られなかった。また、個体によって測定波形が異なることを確認した。

このことから、めっき浴中に存在する光沢剤などがめっき中に不純物として金に取り込まれた為に CV 波形に影響を与えたものと考えられる。

また、めっきのパラメーター（めっき液濃度、pH、浴温、攪拌状態など）の経時的変化が、めっき厚や表面形態に影響を与え、金電極個体間でバラツキを発生させたものと考えられる。

(2)金スパッタコーティング

金めっきに代わる金電極の作製方法として金のコーティングに不純物が含有しない金のスパッタコーティングを検討した。この方法は金の析出中の系に不純物が存在せず、まためっきに比べてパラメーターが少ない為、電極個体間で差がない均一な金表面を得ることが期待できる。

金スパッタコーティングには下記の図 4 に示した装置イオンコーターB-2

(エイコーエンジニアリング(株)製)を用いた。

スパッタコーティングのメカニズムを図 5 に示した。金コーティングを行う試料を入れたチャンバ内を真空にし、そこに残った微量のガスを+に帯電させ、これが-に帯電した金ターゲット(純度 99.99%)に衝突し、この衝撃で叩き出された金粒子が試料に析出して金がコーティングされる。

スパッタコーティングの各種パラメーターを表 1 に示した。

金スパッタコーティングの下地材料には金表面にプローブを均一に高密度で固定化することを考慮し、表面が極めて平滑で化学的に安定な材料であるガラス(カバーガラス及びクロムコーティングガラス)、PC(ポリカーボネート)、金属箔(チタン鏡面研磨品及び SUS304 鏡面研磨品)を選択して検討した。

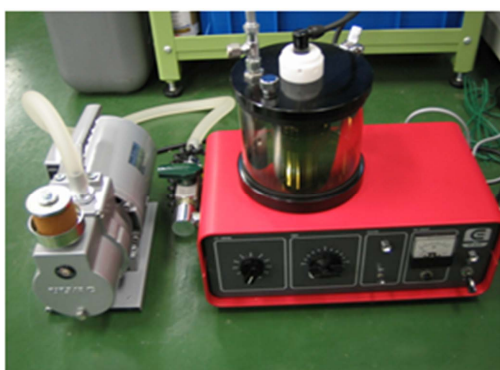


図 4. スパッタコーティング装置

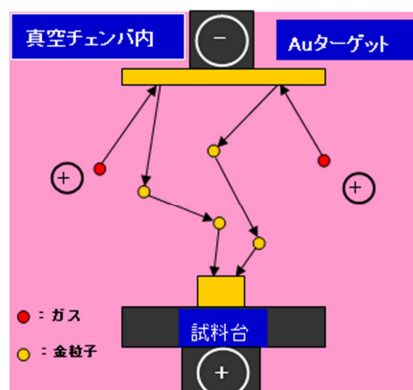


図 5. 金スパッタコーティングの概要図

表 1. 金スパッタコーティングのパラメーター

パラメーター	設定値
電流値	・初期 1 分間 : 10mA 以上 ・残り 14 分間 : 6mA~7mA
スパッタコーティング時間	15 分間
膜厚	700 Å ~ 800 Å (0.07µm ~ 0.08µm)

(3)下地材料の検討及び結果

選択した下地材料に金スパッタコーティングを行った。

金と下地との密着性は、スパッタコーティング後の金表面にテープピーリング（セロハンテープを貼り付けた後、そのテープを素早く引き剥がす）後のテープに金が付着しているかどうかを観察して評価した。（図 6、図 7 参照）

金表面形態の評価は、表面の凹凸の状態を評価した。

総合判定は密着性と金表面形態の結果を総合して決定した。

表 2 に検討結果を○：5 点、△：2 点、×：0 点で示した。

表 2. 金スパッタコーティング材料の検討一覧

下地材料	密着性	金表面形態	コスト	総合点(点)
カバーガラス	×	○	○	10
クロムコーティングガラス	×	○	×	5
PC (ポリカーボネート)	×	×	○	5
チタン箔 (鏡面研磨品)	○	○	△	12
SUS304 箔 (鏡面研磨品)	○	○	○	15

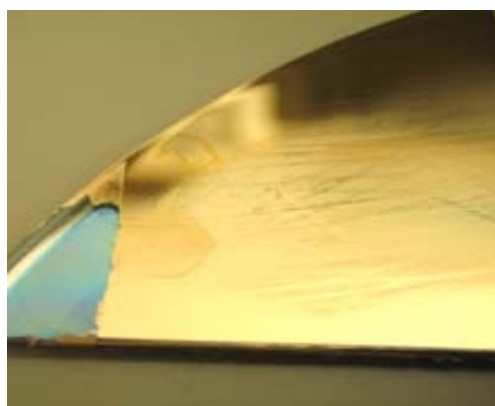


図 6. PC 上の金スパッタコーティングテープピーリングで剥がれた表面

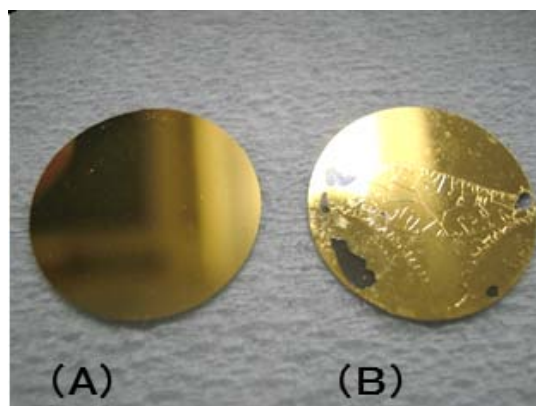


図 7. カバーガラス上の金スパッタコーティング
(A) テープピーリング前の表面
(B) テープピーリング後の表面

表 2 の結果より、ガラスは金属表面よりも金の粒子が突き刺さり難い材料である為、密着性が低いと思われる。PC はスパッタコーティング時の熱により、表面が変形した為、金の密着性と金表面形態は思わしくなかった。金表面形態は PC 以外は全て光沢のある平滑な表面が得られていた。コストを含めて総合的に評価した結果、SUS304 箔鏡面研磨品が金スパッタコーティングの下地材料として適切であると判断した。

2. 金電極の評価

上記、SUS304 箔鏡面研磨品に金をコーティングして作製した金電極と汎用の金棒電極を用いて CV 波形の測定を行い比較した。

(1) 試験条件

各種試験条件を表 3 に示した。

表 3. CV 測定条件

項目	条件
金電極 (W 電極)	・ 金電極 (SUS304 箔鏡面研磨品) ・ 金棒電極 (汎用品)
電気化学測定法	サイクリックボルタンメトリー(CV)法
電位掃引条件	・ 開始電位 : 0V ・ 低電位 : -0.2V ・ 高電位 : 1.5V ・ スキャン速度 : 0.1V/sec positive scan
測定装置	電気化学アナライザー ALS400A (エー・エル・エス社製)
測定溶液	1M H ₂ SO ₄
R 電極	Ag/AgCl
C 電極	Pt

(2) 試験結果

下の図 8 及び図 9 にそれぞれ金棒電極と金電極で得られた CV 波形を示した。

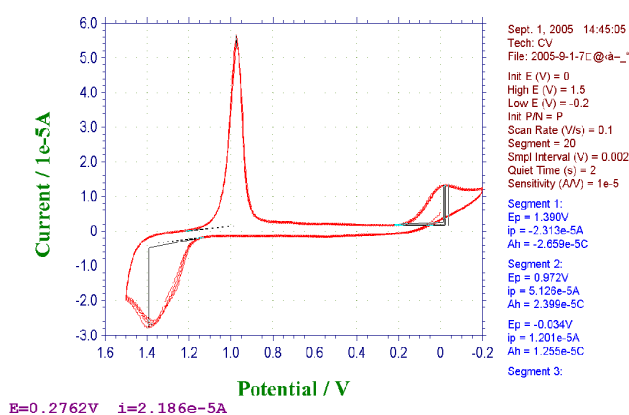


図 8. 金棒電極で得られた CV 波形

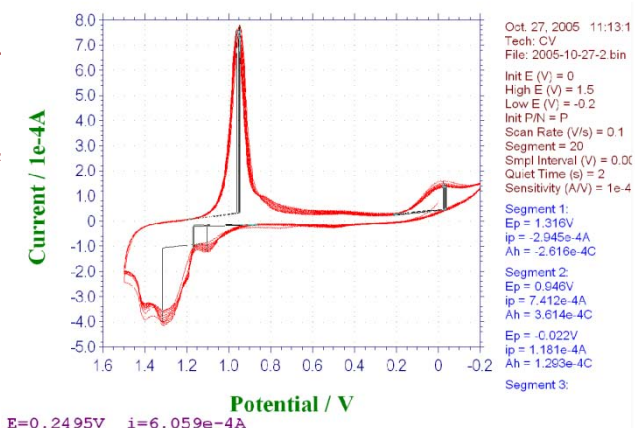


図 9. 金電極で得られた CV 波形

上の図より、金電極で得られた CV 波形は、金棒電極で得られた CV 波形とほぼ同じ波形となることがわかった。

したがって、作製した金電極は、汎用の金棒電極と同様の平滑な金表面が得られていると考えられる。

2-3-2. 電極モジュールの作製

W 電極のみもしくは電極モジュール全体を交換できる仕様とする為に電極モジュールにウェル部を設け、そこに W 電極のみを装着しウェル部と一体化した形状にする必要があった（「電極モジュール」特許申請中）。

そこで W 電極の形状は、サンプル毎に電極交換が容易に行えるように作業性とコストを考慮し、薄膜円盤のチップ形状にした。

1. 金電極チップ

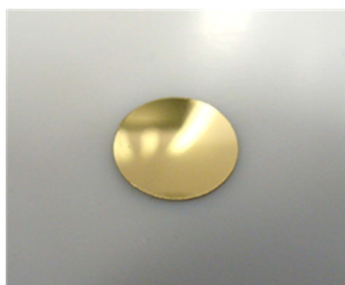


図 10. 金電極チップの写真

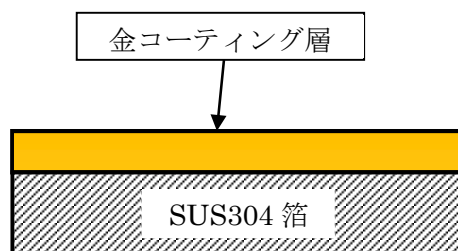


図 11. 金電極チップの断面図

金電極チップは SUS304 箔（板厚：100 μm 、径：7 ϕ ）の片面を鏡面研磨した面にスパッタ装置により金（純度 99.99%以上）を約 700 \AA ～800 \AA の厚さに析出させた電極チップである。その写真を図 10 に、断面図を図 11 に示した。

金電極チップ表面に DNA プローブを固定化させ、高精度の安定した検出を行うためには、チップ表面が鏡面に限りなく近づく必要がある。そこで金をコーティングする片面のみ鏡面研磨加工が施されている。そこに金のスパッタコーティングを直接実施した場合、下地金属の鏡面部分と金との間の密着力が弱く、容易に下地金属からの金の剥離が起こる。従って、金と下地金属間の密着力を強めるアンカー効果を持たせる為、スパッタ時間（15 分間）の冒頭 1 分間のみをイオン電流値の限界値（10mA～12mA）でスパッタを行ってアンカー効果を持たせ、その後、残り 14 分間は電極表面を鏡面に保つ為にイオン電流値を 6mA～7mA に下げてスパッタコーティングを行った。これにより、下地金属との密着力が強く、表面が鏡面で平滑な金電極チップを作製することに成功した。

2. 電極モジュールの構成

電極モジュールは、W 電極をチップ形状にしたことから図 12 に示したように電極ホルダー本体にあるウェル部底に W 電極を押さえて固定できる構造にした。電極モジュールは以下の 6 個の部品で構成されている。電極ホルダー本体のウェル部表面については、サンプル中の有機物の吸着を抑制する為に鏡面に近い平滑な表面が必要である。そこで電極ホルダー作製に使用する金型のウェル部に当たる箇所

の研磨を行った。また、材質は性能とコストを考慮して PP（ポリプロピレン）製とした。

- ① W 電極（金電極チップ）：SUS304 箔に金コーティングしたもの
- ② 電極ホルダー本体：PP 製
- ③ ルーラー：PP 製
- ④ キャップ：PP 製
- ⑤ 導電マット：導電材含有ゴム
- ⑥ 導電板：真鍮製

図 13 に電極モジュールの写真を図 14～図 18 に上記各構成部品の写真を示した。

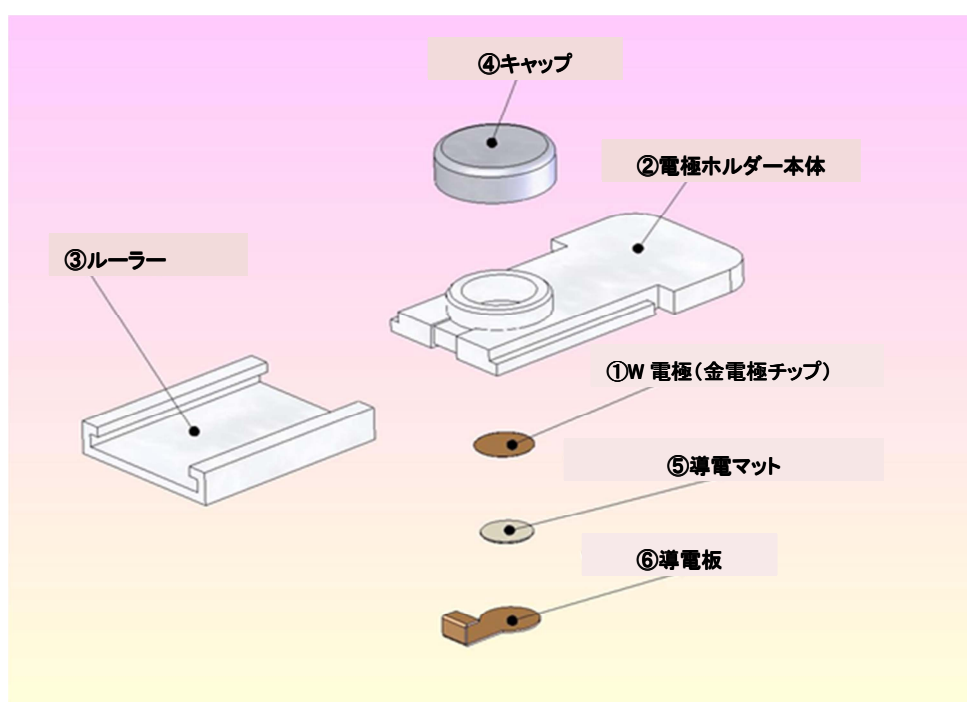


図 12. 電極モジュールの 3D 構成図



図 13. 電極モジュールの写真

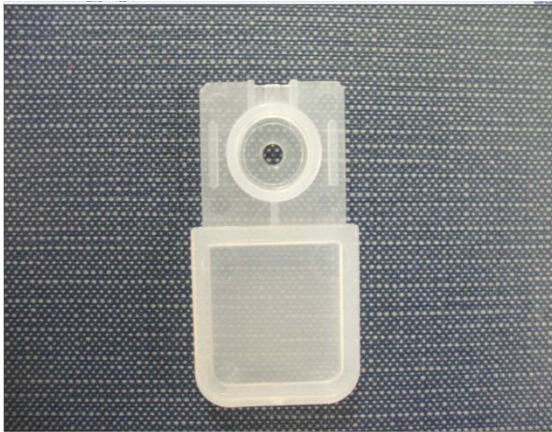


図 14. 電極ホルダー本体

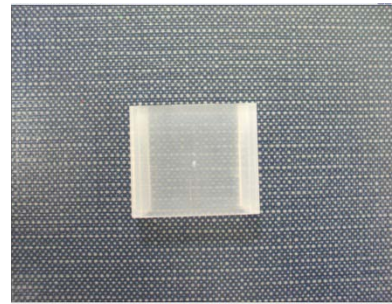


図 15. ルーラー

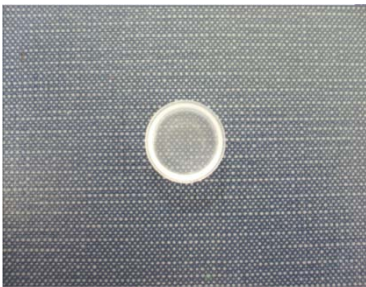


図 16. キャップ

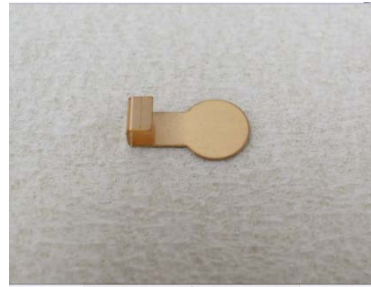


図 17. 導電板



図 18. 導電マット

以上の仕様により、扱いが簡便で低コストな電極モジュールを作製することを可能にした。

2-4. 電気化学アナライザー (HAN-H100) の開発

2-4-1. 機能概要

本装置は、3電極方式の電気化学アナライザーである。

R電極とW電極間の電位をパソコン上で入力した電位に設定する為、W電極とC電極間の電位を制御し、W電極に流れる電流を測定することを目的とした装置である。R電極とC電極は、装置の測定部に装備されている。

電源はUSBバスパワーを使用し、パソコンとUSBで接続することでアプリケーションソフトを立ち上げて簡単にサイクリックボルタンメトリー (CV) やディファレンシャルパルスボルタンメトリー (DPV)、クロノクーロメトリー (CC) の基本測定を実施することを可能にした。

測定データは、CSV形式で保存するようにし、どの計算ソフトを使用しても解析が可能な仕様にした。オプション機能として、外部接続ケーブルを装着すれば外部電極を使用した測定も可能にした。

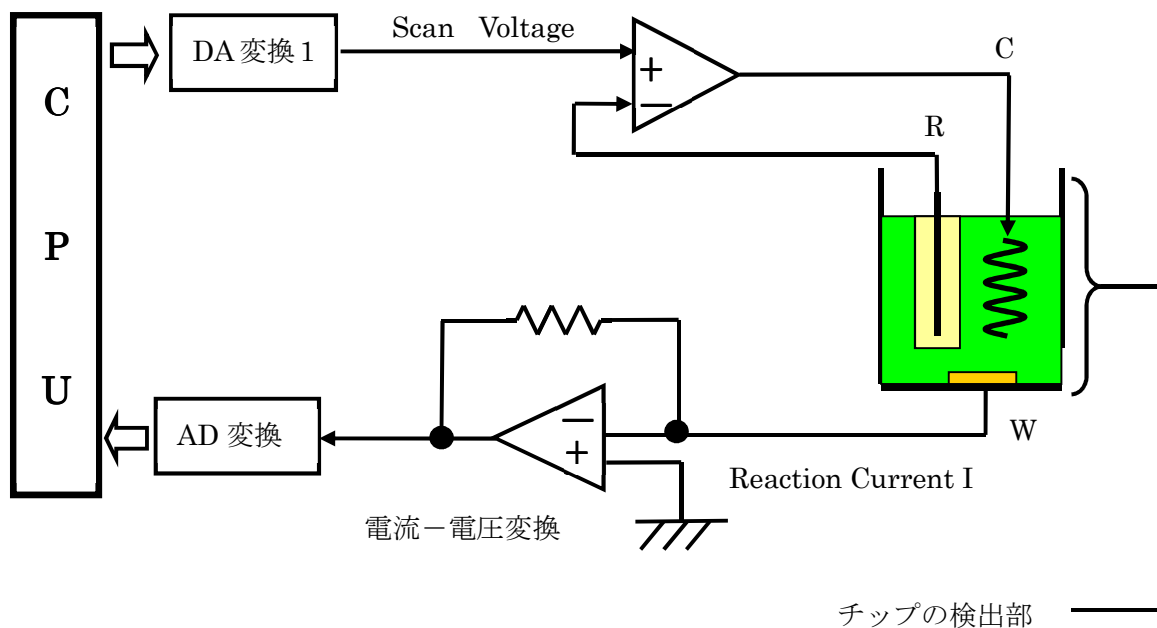


図 19. 装置回路図

図 19 に装置の回路図を示した。

測定装置内の CPU (マイコン) で C 電極の電位 (R 電極電位基準) を走査し、その際、W 電極上で起こる電気化学反応による電流値を検出することができる。

図 20 に電気化学アナライザー本体と図 21 にパソコンに接続した状態の写真を示した。装置は電極側と回路側を完全に分離し、測定時に回路側からの電氣的なノイズの影響を極力抑え、高精度な測定を可能にする設計にした。



図 20. HAN-H100 電気化学アナライザー

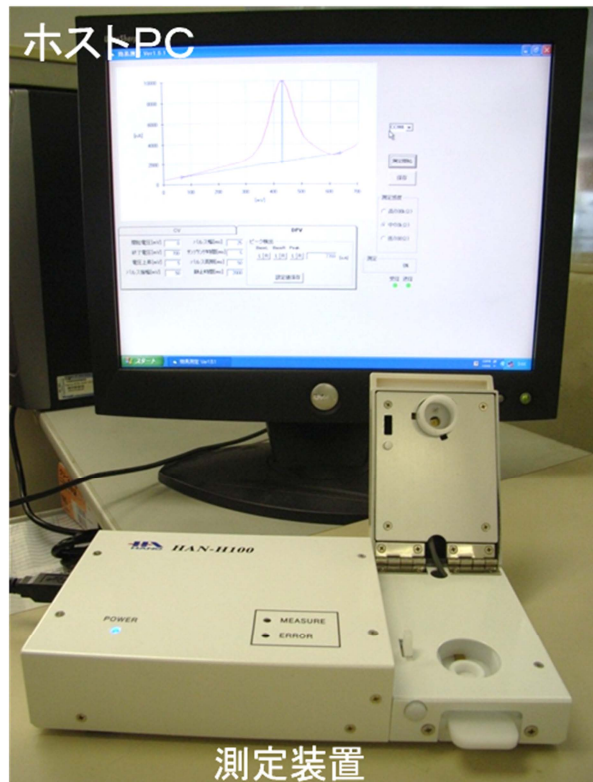


図 21. PC 接続した HAN-H100 電気化学アナライザー

2-4-2. 装置各部の説明

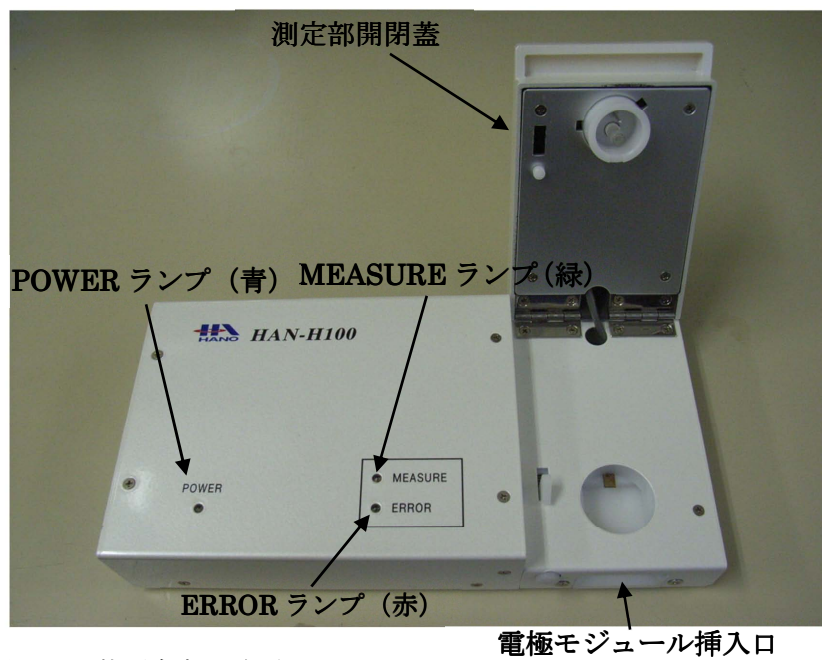


図 22. 装置各部の名称

図 22 に装置正面の写真を示した。装置右側に測定部開閉蓋を設け、開くと電極モジュール挿入口より電極モジュールを装置に挿入してセットすることができる。蓋の内側には C 電極と R 電極を装備した RC 電極ホルダーを設け、測定時に蓋を閉めると C 電極と R 電極が電極モジュールウェル部のサンプル溶液に浸漬する設計である。装置正面の LED 表示は電源の入切を表示する POWER ランプ（青）、測定中の状態を知らせる MEASURE ランプ（緑）、エラー発生時に点灯する ERROR ランプ（赤）である。

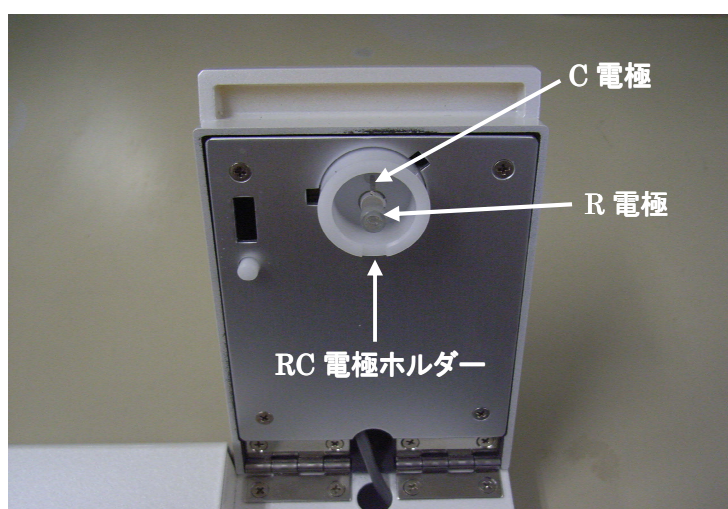


図 23. 測定部開閉蓋

図 23 に測定部開閉蓋の拡大写真を示した。C 電極及び R 電極を装備した RC 電極ホルダーは、C 電極と R 電極の交換及び保守点検が容易にできるように蓋から着脱可能な設計とした。

図 24 に示した装置側面には、USB ケーブル端子を設け、PC と接続することにより PC からの電源供給及び情報、データのやり取りが行えるようにした。

また、外部セルにおける電気化学的測定も可能にする為に装置背面部に専用端子を設けた。



図 24. 装置側面部

2-4-3. 仕様

装置の主な仕様を以下に示した。

1. 本体の寸法及び重量

- 寸法 : 100mm×200mm×35mm
- 重量 : 650g

2. 電源

パソコン USB パワー

3. 制御部

- ADC : 16bit
- DAC : 14bit
- 印加電圧 最大 : +2V
最小 : -2V
分解能 : 500 μ V
- 測定電流 最大 : +20mA
最小 : -20mA
分解能 : 125pA

4. 制御ソフト

- ・サイクリックボルタンメトリー (CV)
- ・ディファレンシャルパルスボルタンメトリー (DPV)
- ・クロノクーロメトリー (CC)

5. 外部電極コネクタ

外部電極のコネクタピン各信号名を表 4 に示した。

表 4.コネクタピンと信号名

ピン番号	信号名
1	SEN
2	C 電極
3	GND
4	R 電極
5	GND
6	W 電極

SEN : 外部接続ケーブル検出信号

2-4-4. 動作準備

1. 操作 PC との接続

USB ケーブルで PC の USB コネクタと接続し、電源を PC の USB から得られる仕様にした。

2-4-5. USB ドライバ及びアプリケーションソフトのインストール

1. USB ドライバのインストール

ソフトインストール用 CD ROM に入っている PDF ファイル「USB ドライバのインストール」を開いて画面の指示に従って操作することでインストールできるようにした。

2. アプリケーションソフトのインストール

PDF ファイル「簡易電気化学測定装置のインストール」を開いて画面の指示に従って操作するとインストールできるようにした。

2-4-6. 電極の準備

装置に装備している R 電極および C 電極の仕様及び作製方法を以下に示した。

1. R 電極の作製

(1)材料

- ①Ag 線 (0.5φ)
- ②RC 電極キャップ (樹脂部品)

(2)作製方法

- ①0.5φ の Ag 線をニッパーで 10mm の長さにカットした。
- ②カット後、RC 電極キャップの穴に Ag 線を通し、キャップ下から Ag 線が 3mm~4mm 出るように Ag 線の位置を決めた。(図 25 参照)
- ③キャップ上部から突き出た Ag 線を直角に曲げ、キャップに Ag 線を固定した。(図 25 参照)
- ④キャップ下の Ag 線の先端から長さ 2mm の部分に BAS 社製の「参照電極用銀塩化銀インク」(銀塩化銀ペースト)を均一に塗り、容器内で 12 時間以上静置して乾燥させた。(図 26 参照)
- ⑤シリコンチューブ (2.5×4) を 15mm の長さにカットし、バイコールガラス (2.85φ×5mm or 4mm) を片側より差し込んだ。差し込み易いように予めチューブとガラスを純水で濡らしておくことが必要である。
- ⑥バイコールガラスを片側に差し込んだシリコンチューブにマイクロピペット (100μl 用) で 3M KCl 溶液を一杯に注入した。
- ⑦上記④の銀塩化銀ペーストを固定化した RC 電極ホルダーをシリコンチューブに空気が入らないように注意して差し込んだ。(図 27 参照)
- ⑧チューブ内に空気が入った場合、RC 電極キャップを取り、3M KCl 溶液をチューブ内に注入して空気を除去し、再度、RC 電極キャップをシリコンチューブに差し込む必要がある。チューブ内に空気が残らないようになるまで繰り返し行うことが重要である。

R 電極完成品の写真を図 28 に示した。

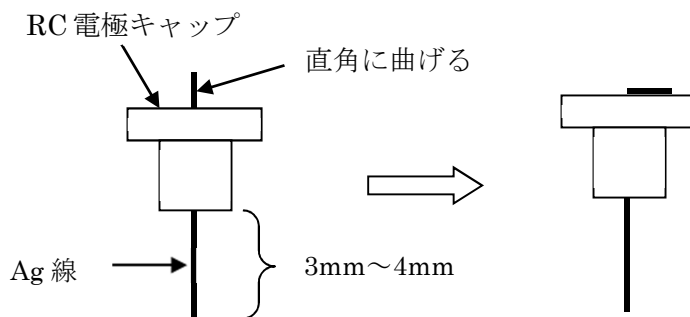


図 25. Ag 線の固定

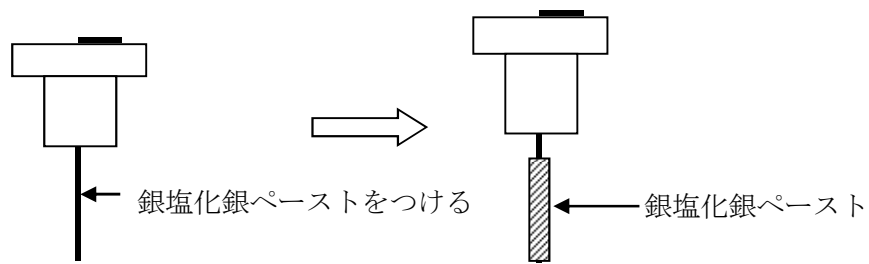


図 26.塩化銀ペーストの塗布

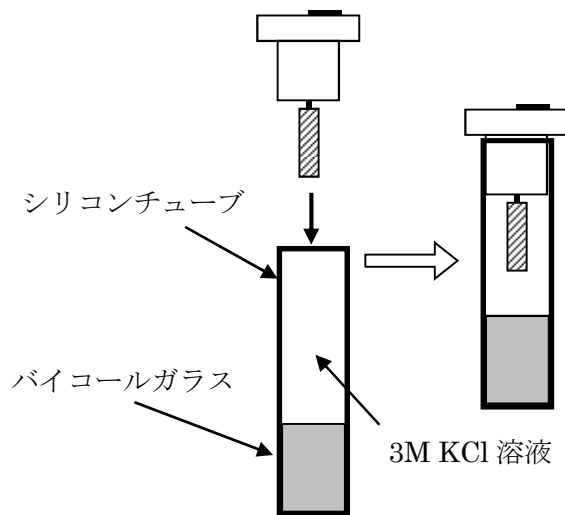


図 27. R 電極組立



図 28. R 電極完成品

(3)保管方法

①図 29 に示したようにチューブ(0.5ml)に 3M KCl 溶液をマイクロピペットを使って 0.2ml 程度注入し、その後 R 電極を収めてチューブのキャップを完全に閉めるようにした。

その写真を図 30 に示した。

②R 電極が入ったチューブ(0.5ml)はチューブホルダーに立てて保管した。

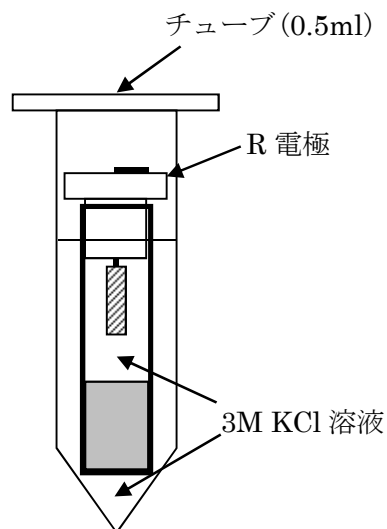


図 29. チューブに収めた R 電極



図 30. 保管状態の R 電極

2. C 電極の作製

(1)材料

- ①白金線
- ②RC 電極キャップ (樹脂部品)

(2)作製方法

- ①0.5φ の Pt 線をニッパーで 19mm の長さにカットした。
- ②図 31 に示したようにカットした Pt 線を RC 電極キャップの穴に通し、キャップの下から Pt 線の長さが 12mm になるように位置を決めた。
- ③RC 電極キャップ上部に突き出た Pt 線をピンセットで直角に曲げ、キャップに固定した。C 電極完成品の写真を図 32 に示した。

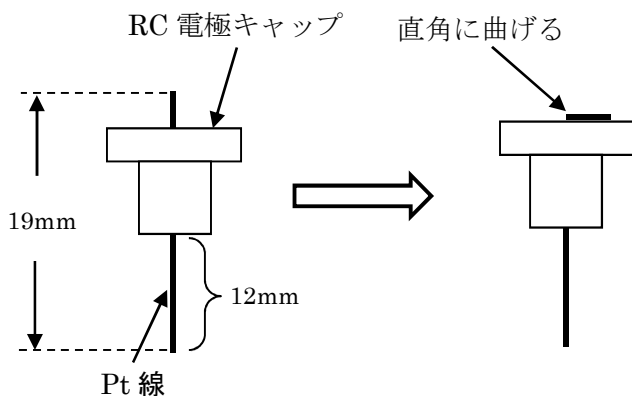


図 31. Pt 線の固定



図 32. C 電極完成品

2-4-7. 測定準備

1. R 電極及び C 電極の準備

- ①チューブの中の R 電極をピンセットで取り出し、純水で洗浄した後、RC 電極ホルダーの大きい方の穴へ電極のバイコールガラス側より挿入する。次に C 電極を小さい方の穴へ差し込み固定する。（図 33～図 35 参照）



図 33. RC 電極ホルダー



図 34. R 電極の装着

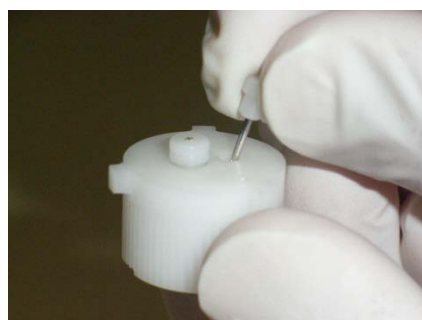


図 35. C 電極の装着

2. RC 電極ホルダーの取付け

図 36 に示したように C 電極を上にして RC 電極ホルダーを掴み測定部開閉蓋の RC 電極ホルダー固定穴に固定する。この際、RC 電極ホルダーの突起と固定穴の溝を合わせて差し込み、右（時計周り）に RC 電極ホルダーを回転させて固定する構造とした。

測定終了後は RC 電極ホルダーを取外し、R 電極の先端部および C 電極を純水で洗浄する。R 電極は 3M KCl 溶液が入ったチューブに入れて保管する。



図 36. RC 電極ホルダーの取付

2-4-8. 測定方法

1. 電源の投入

- ①測定用のソフトがインストールされた PC の電源を入れる。
- ②USB ケーブルを上記 PC と装置側面の端子に接続する。
- ③測定用ソフトを立ち上げる。（「2-4-10 1.ソフトの起動」参照）

2. 電極モジュールの設置

- ① 図 37 に示したように電極モジュールのウェル部にマイクロピペットを用いて電解液を注入する。
注入量は約 300 μ l である。
- ② 電解液を注入した電極モジュールを装置の電極モジュール挿入口より挿入しセットする。(図 38 参照)
この際、装置内の W 電極端子と電極モジュールの導電板が確実に接触するまで差し込む。
- ③ 電極モジュールを装置にセットした後、測定部開閉蓋を閉じる。



図 37. ウェル部への電解液注入



図 38. 電極モジュールのセット

3. 測定の手順

- ① アプリケーションの起動
簡易測定アイコンをダブルクリックして起動させる。
簡易測定アプリケーションが開き、測定画面にソフトのバージョンが表示される。PC と装置が接続されて測定可能な状態になると測定画面右下の受信・送信の LED (緑色) が点灯する。
- ② 条件設定
アプリケーションより CV 測定法または DPV 測定法のどちらかを選択し、さらに各測定条件の入力を行う。
- ③ 測定
 - ・ PC 画面上の測定開始ボタンをクリックすると測定を開始する。
 - ・ 測定終了後、画面に測定波形とデータ保存用の画面が表示される。

4. 測定の終了

測定終了後、測定解除ボタンを押すと測定部開閉蓋を開放状態にすることで電極モジュールを装置より取出すことができる。(図 39 参照)

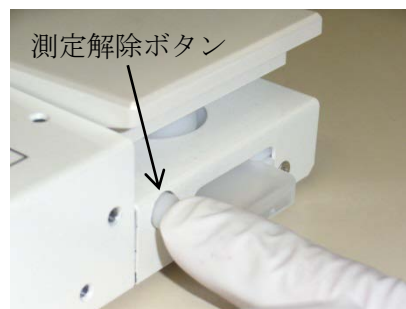


図 39. 電極モジュールの取出し

2-4-9. アプリケーションの説明

PC モニターの測定画面に表示される操作内容を図 40 に示した。

1. タイトルバー及び各種ボタン・表示の説明

- (1) [タイトル] : 測定ソフトのバージョン表示を表示している。
- (2) [最大化] ボタン : ボタンをクリックすると、簡易測定 Ver○○○アプリケーションウィンドウをデスクトップ全面に表示する。
- (3) [最小化] ボタン : ボタンをクリックすると、簡易測定 Ver○○○アプリケーションウィンドウをアイコン化してタスクバーに表示する。
- (4) [閉じる] ボタン : ボタンをクリックすると、簡易測定 Ver○○○アプリケーションウィンドウを閉じ、プログラムを終了する。

2. 測定方法の選択

CV (サイクリックボルタンメトリー) と DPV (ディフェレンシャルパルスボルタンメトリー) 及び CC (クロノクーロメトリー) の 3 種類の測定方法を可能にした。

- (1) [CV] ボタン : ボタンをクリックすると CV 測定用の画面に切替わる。
各種条件の設定項目に測定に適した数値を入れる。
- (2) [DPV] ボタン : ボタンをクリックすると DPV 測定用の画面に切替わる。
各種条件の設定項目に測定に適した数値を入れる。
- (3) [CC] ボタン : ボタンをクリックすると CC 測定用の画面に切替わる。
各種条件の設定項目に測定に適した数値を入れる。

測定結果の波形のピーク部位の電流値と電位値が表示され、マニュアル修正ボタンでピーク部位のズレを修正することができるようにした。

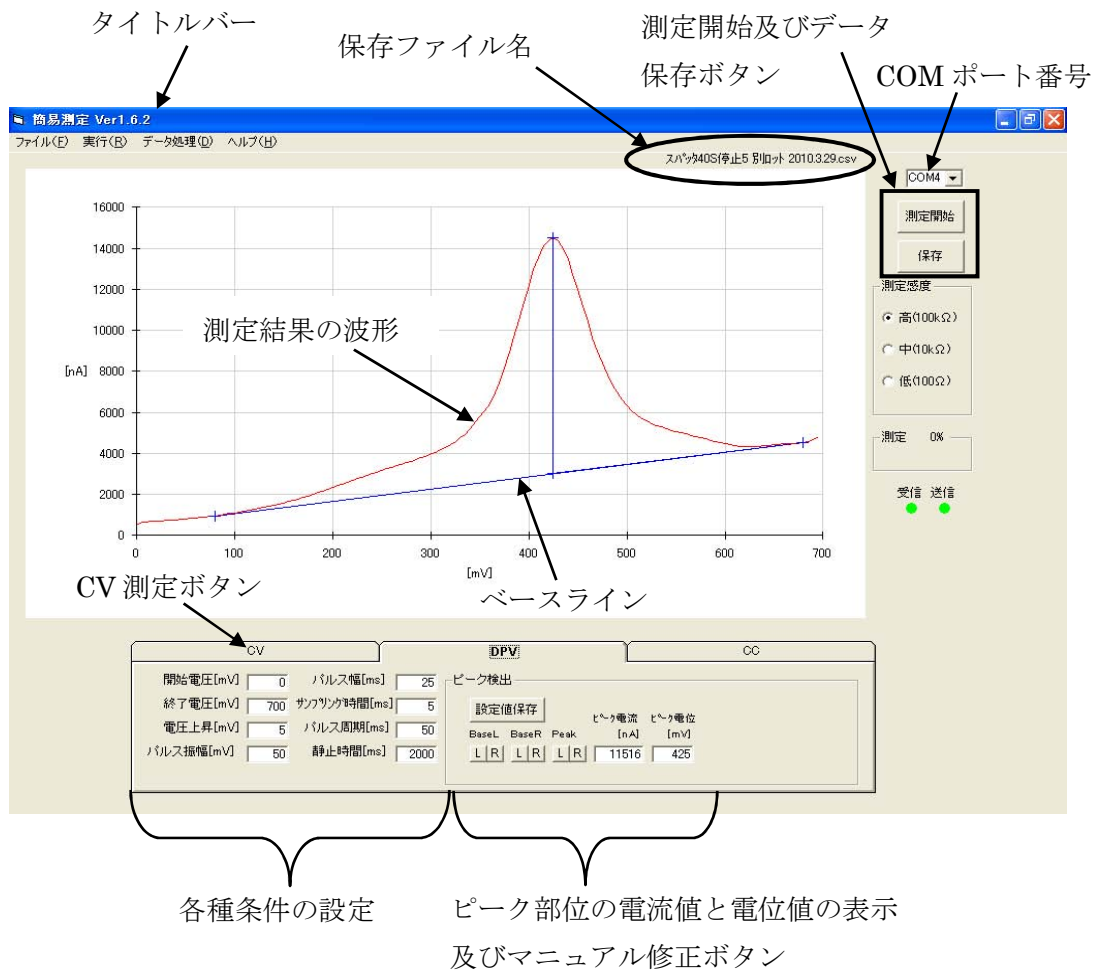


図 40. 測定画面の表示内容

2-4-10. アプリケーションを用いた測定

1. ソフトの起動

簡易電気化学測定装置のアイコンをダブルクリックし、ソフトを起動する。
PDF ファイル「USB ドライバーのインストール」で割り当てられた COM
ポート番号を確認し、COM ポート番号を選択する。

2. 測定

(1) ソフト起動時の表示画面は図 41 に示した CV 測定画面になっており、各種測定項目に測定に適した数値を入れる。

DPV 測定及び CC 測定の場合は各々 [DPV] ボタン、[CC] ボタンをクリックするとそれぞれ DPV 測定用、CC 測定用の画面に切替わるようにした。

(2) [測定開始] ボタンをクリックすると測定を開始する。

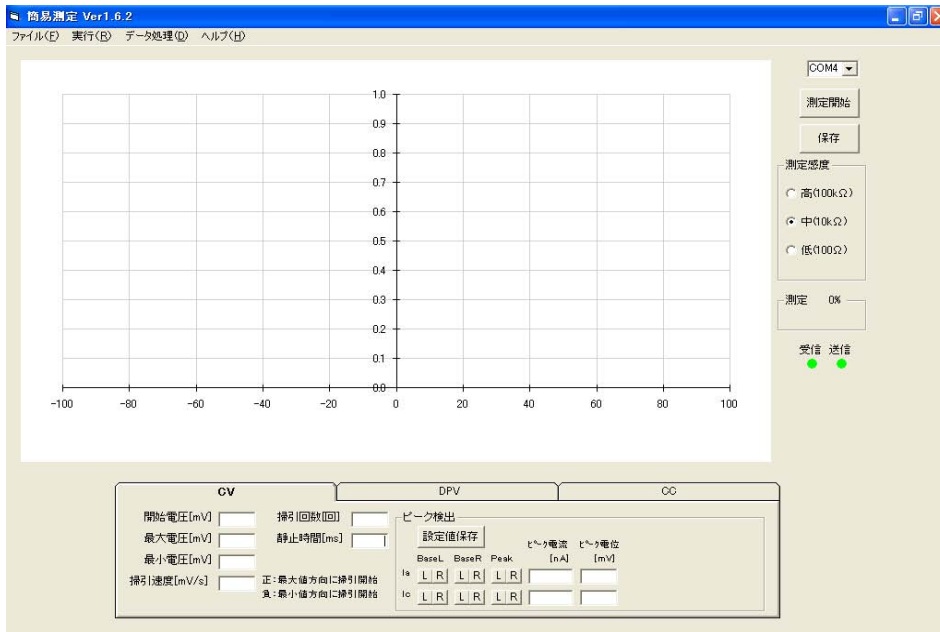


図 41. ソフト起動時の表示画面

3. 各種測定法

下記各種測定法の波形に記載した各パラメータに測定に最適な数値を選択して測定画面の該当欄に設定することで、測定することができる。

(1) CV 測定

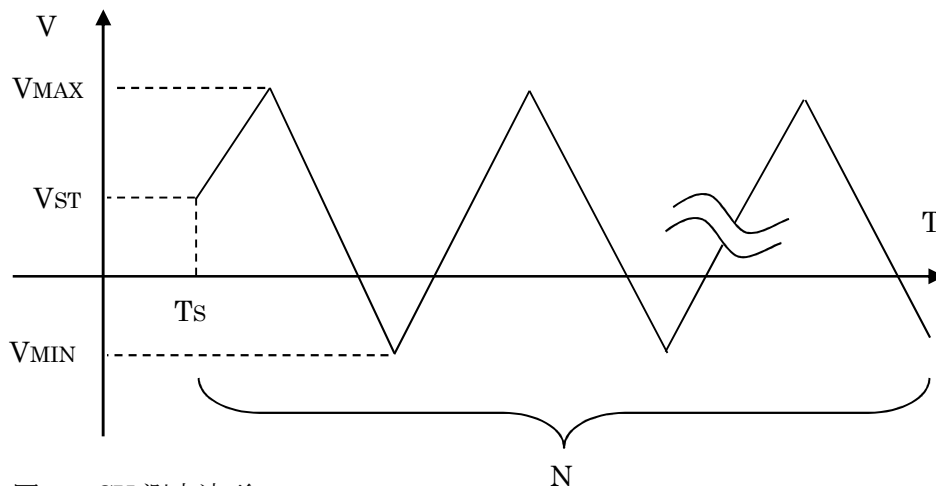


図 42. CV 測定波形

<パラメーターの説明>

- ・VMAX : 最大電圧
- ・VST : 開始電圧
- ・VMIN : 最小電圧
- ・Ts : 静止時間
- ・N : 掃引回数

(2) DPV 測定

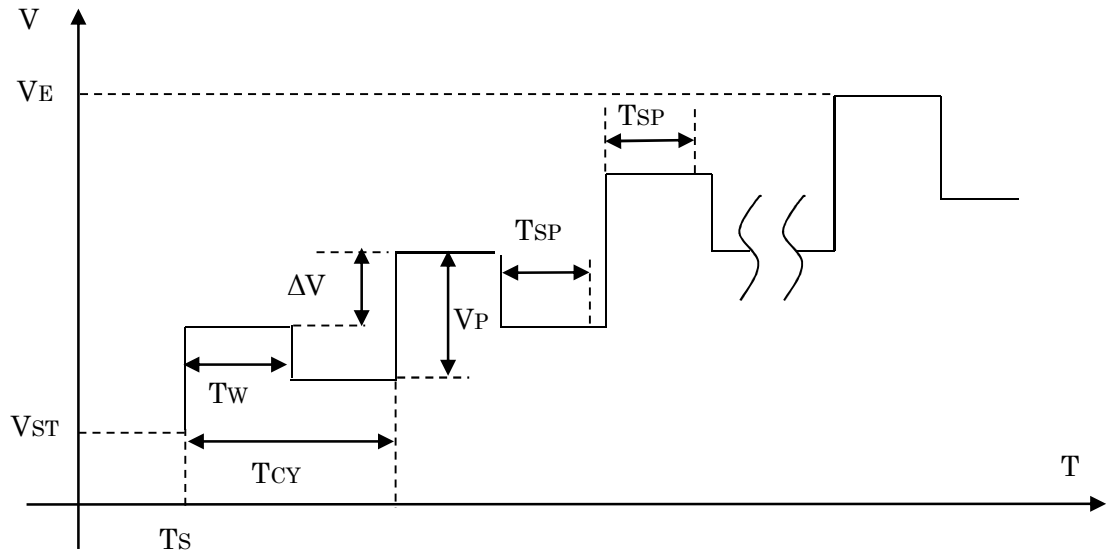


図 43. DPV 測定波形

<パラメーターの説明>

- ・VST : 開始電圧
- ・VE : 終了電圧
- ・ΔV : 電圧上昇
- ・VP : パルス振幅
- ・Ts : 静止時間
- ・TW : パルス幅
- ・TSP : サンプルング時間
- ・Tcy : パルス周期

(3) CC 測定

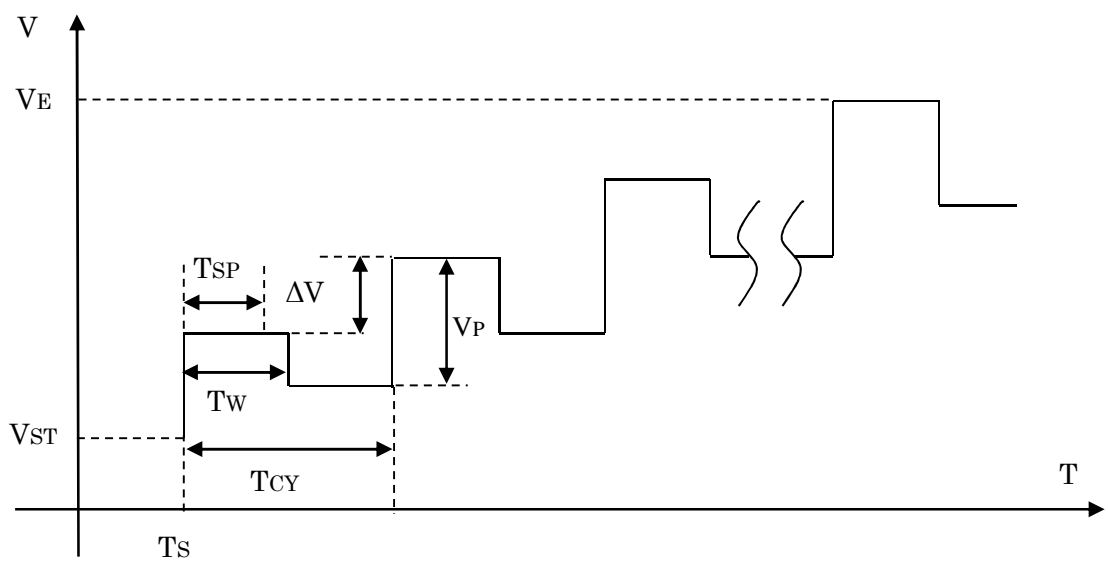


図 44. CC 測定波形

＜パラメーターの説明＞

- ・VST：開始電圧
- ・VE：終了電圧
- ・N：ステップ数
- ・TW：パルス幅
- ・TSP：サンプリング時間
- ・Ts：静止時間

4. 測定データの保存

測定終了後、図 45 に示したようにデータ保存の必要性を PC モニターに表示するようにした。データ保存が必要な場合はデータの保存先を決め、ファイル名を付けて〔保存〕ボタンをクリックし、保存が不要な場合は〔キャンセル〕ボタンをクリックすることで対応した。(図 46 参照)

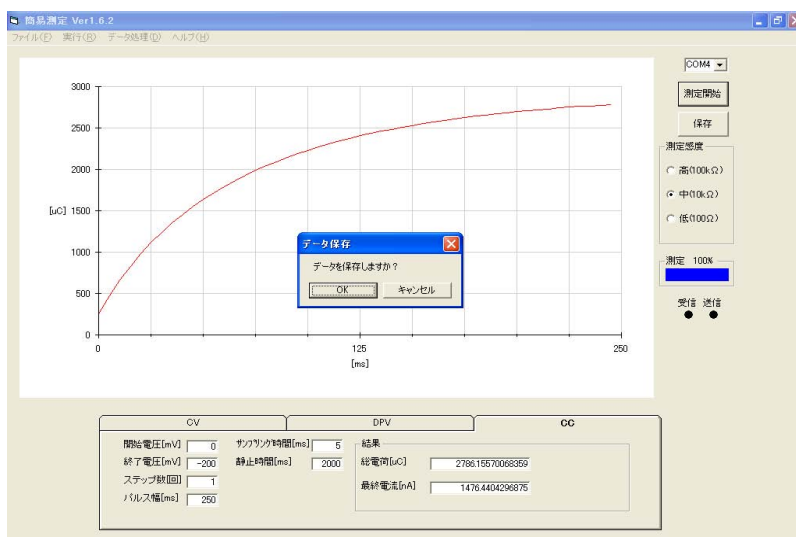


図 45. データ保存画面 1

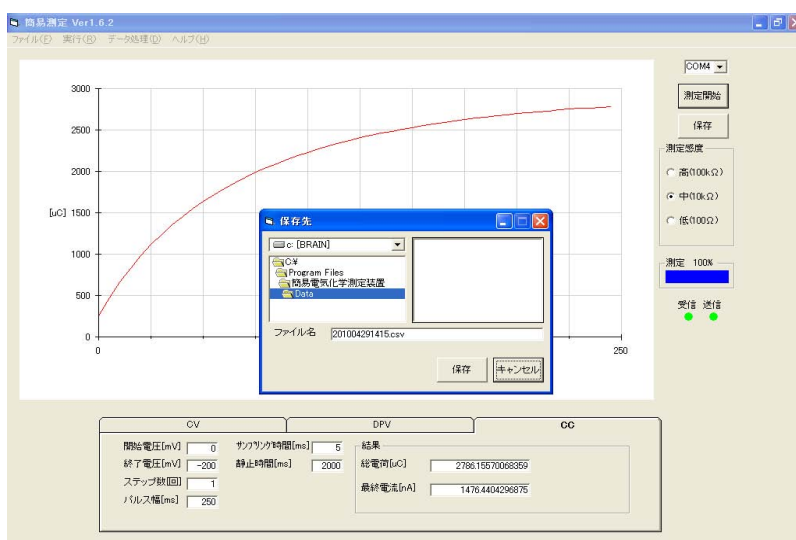


図 46. データ保存画面 2

5. 測定データの再表示

データを再度、表示したい場合、左上のメニューバーのファイル、ファイル名を指定して開くことで再表示できるようにした。手順を下記に示す。

(1)アプリケーションソフトを立ち上げ、PCのモニターに測定画面を表示する。

画面左上のファイルを開くを選択する。

(2)表示したいファイルを、選択して開く。(図 47 参照)

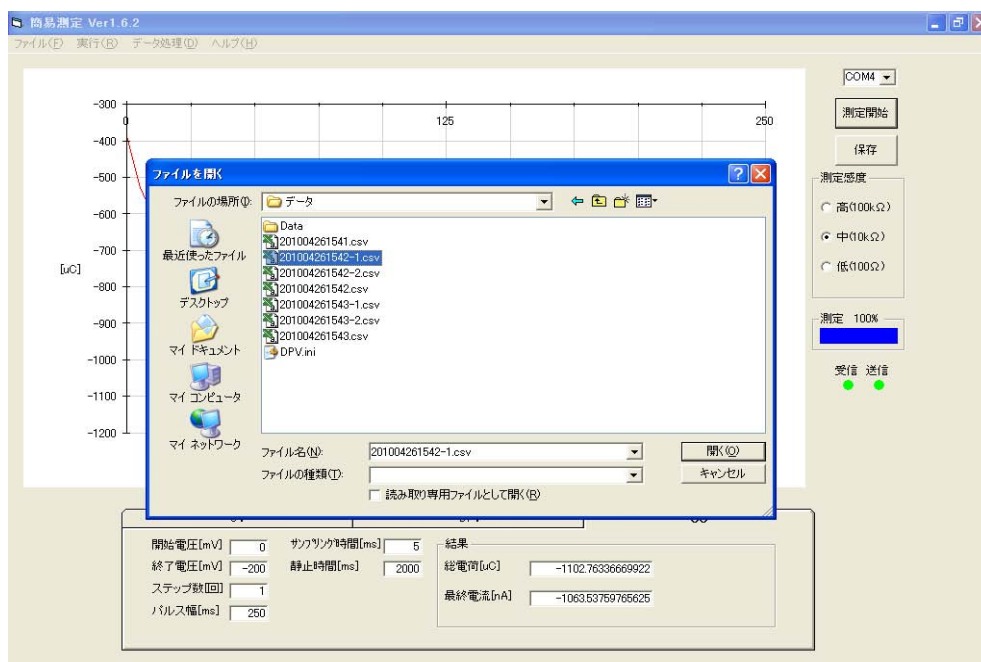


図 47. 測定データ再表示画面

2-5. 結言

電極モジュールにおいては、その構造に特徴を持たせ、そこに使用する金電極チップ及びホルダーなどの各種部品の作製方法と材料を検討することにより、低コストで扱いやすい電極モジュールを作製することができた。医療機関や検査機関で使用する場合は、電極モジュールを使い捨てで使用し、大学や企業の研究機関では電極モジュール内の金電極チップのみを交換して使用することもできる。

一方、電気化学アナライザーは、回路側と電極側を完全に分離することで、測定時の電氣的ノイズを抑えた高精度測定を可能にし、軽量・コンパクト化も実現した。特に電極側においては測定部の蓋の開閉のみで検体を測定できるようにし、またアプリケーションを独自に作成することで低コストで操作が非常に簡便で、短時間に電気化学測定を行うことができるキットを完成させることができた。

参考文献

- 1) A.J. Bard, L. R. Faulkner, 2nd Ed Electrochemical Methods Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York (2001).
- 2) M. Schena, Micoarray Analysis, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2003).
- 3) G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Matthis, A. Roget, L. M. Torres-Rodriguez, E. Vieil, Applied Biochemistry and Biotechnology, Volume 89, Numbers 2-3, 183(2000).
- 4) 電気化学測定マニュアル (基礎編) 電気化学会編 丸善出版

第3章 シングル型 DNA チップの電気化学的口腔癌診断への応用

3-1. 緒言

テロメラーゼは染色体の末端に存在するテロメア配列（ヒトを含む脊椎動物の場合 TTAGGG の繰り返し配列）を認識し伸長する酵素である。テロメラーゼは、成人体細胞ではほとんど発現していないが、腫瘍細胞中ではその活性が亢進することから、近年新たなガンマーカーとして期待されている¹⁾。

これまでにテロメラーゼの活性測定方法として TRAP 法が知られている²⁾。TRAP 法の手法を以下に述べる。テロメラーゼが認識する DNA プローブ (TS プライマー) とテロメラーゼを混合し、伸長反応を行う。続いて伸長産物を PCR で増幅し、ゲル電気泳動でバンドのパターン (6 bp 毎のラダーが得られる) からテロメラーゼの活性の有無を判定する。この手法は、PCR とゲル電気泳動 (非変性 PAGE) が必要であり、検出に煩雑な操作と多くの時間が必要となる。また臨床検体などに含まれる夾雑物には PCR 自体を阻害するものが多い。このため判定が偽陰性となる可能性がある。この問題を解決し、一層簡素化できれば、テロメラーゼをマーカーとした癌診断が容易になると期待される。

実際、さまざまな新規なテロメラーゼ活性検出法が最近報告されている。Willner らは伸長産物に相互作用する機能的 DNA ビーコン³⁾や DNAzyme⁴⁾を利用して PCR と PAGE を必要としないテロメラーゼ活性検出を試みている。またより簡便な手法として、TS プライマー固定化基板を調整し、その上でテロメラーゼ伸張反応を行い、伸長された DNA を検出するものがいくつか報告されている⁵⁻⁷⁾。これらはいずれも PCR も PAGE も必要ないテロメラーゼ活性検出法である。Zheng らはナノワイヤ上に TS プライマーを固定し、伸長された DNA を電界効果トランジスタ (FET) で検出している⁵⁾。Eskiocak らはグラファイト電極上に固定した TS プライマーカーから伸長した DNA 中のグアニンの酸化電流 (ca. 1.0 V vs. Ag/AgCl) により、テロメラーゼ活性を検出している⁶⁾。これらの手法で、いずれも特殊な基板 (電極) が利用されている。

これらに対して、Sato らは PCR も PAGE も必要とせず、通常のコールド電極に TS プライマーを固定したプローブ電極を作用電極としてテロメラーゼ活性を検出する電気化学的手法を考案した (図 1)⁷⁾。これは電気化学的 2 本鎖 DNA 検出試薬であるフェロセン化ナフタレンジイミド (FND) (図 1(A)1) を応用したものである⁸⁾。図 1(A)1 が強く 4 本鎖 DNA に結合すること ($K \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$)⁷⁾、テロメラーゼにより伸長されたテロメア配列はカリウムイオンやナトリウムイオン存在下では、図 2 に示すように種々の四本鎖 DNA 構造を形成することに基いている⁹⁾。まずテロメラーゼの基質となる TS プライマー固定化電極を調整し、電極上においてテロメラーゼ反応を行う。テロメラーゼの活性があるとき、電極上の TS プライマーが認識され、付加伸長反応が起こる。伸長された DNA は、カリウムイオンを含む電気化学測定溶液中では、4 本鎖 DNA 構造を形成していると想定されるので、図 1(A)1 を含む電気化学測定溶液で測定したとき、図 1(A)1 は電極上の 4 本鎖 DNA 上に濃縮される。これよりテロメラーゼに活性が認められるときは、テロメラーゼ反応前と比べて反応後では電流が

増大する。

これまでに図 1(A)1 により HeLa 細胞 50 cells の細胞抽出液によるテロメラーゼ活性検出の電気化学的検出を達成している。

Sato らがこれまでに合成した 7 種類の FND 誘導体について¹⁰⁾、テロメラーゼ活性試薬としての性能評価を行った結果、図 1(A)2 が最も強く 4 本鎖 DNA に結合することが分かった¹¹⁾。そこで本論文では舌癌患者の口腔内全体の細胞(全剥離細胞)、癌箇所(局所剥離細胞)、癌組織切片(組織)の細胞抽出液 (Lysate) のテロメラーゼ活性を、図 1(A)2 を利用した電気化学的手法により前章で開発した電極モジュールを用いて評価した。

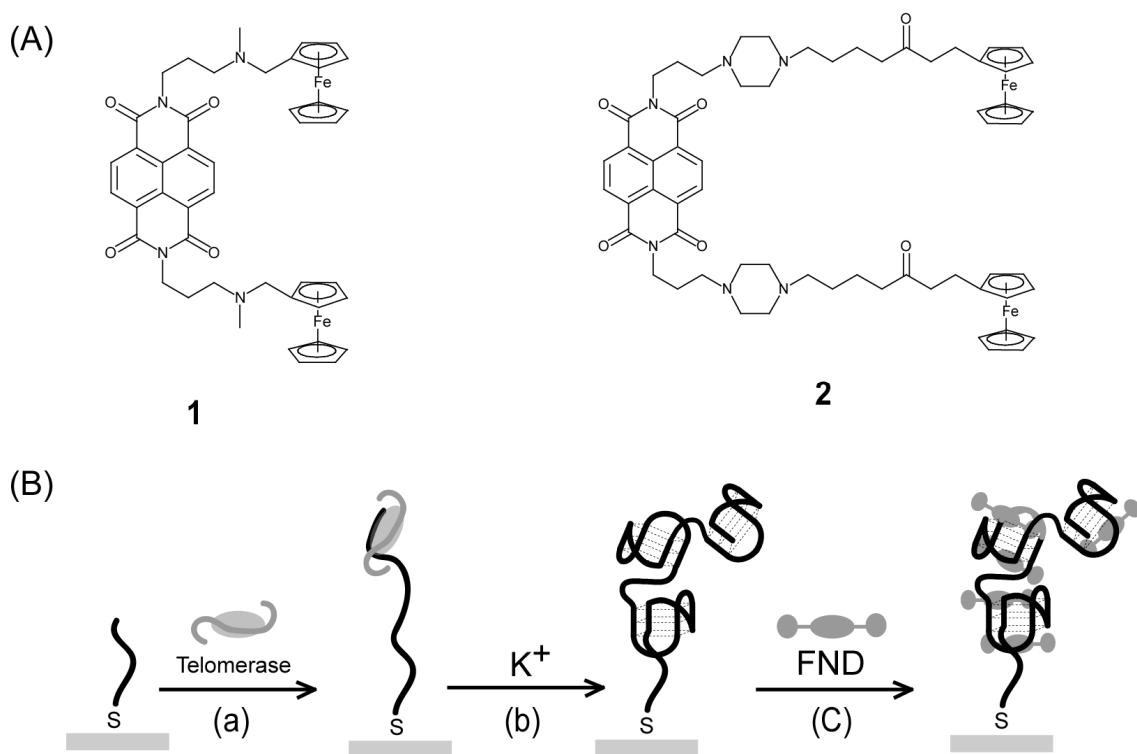


図 1. テロメラーゼ活性を検出する電気化学的手法の説明図

(A) 1 : 電気化学的 2 本鎖 DNA 検出試薬であるフェロセン化ナフタレンジイミド (FND)

2 : 最も強く 4 本鎖 DNA に結合する FND

(B) FND の 4 本鎖 DNA への結合モデル

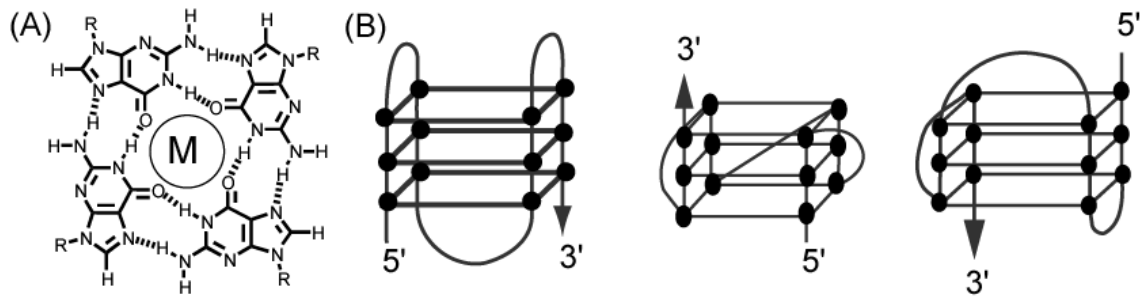


図 2. テロメラーゼにより伸長された DNA はナトリウムイオン、カリウムイオンの存在により、4 本鎖 DNA 構造を形成する。

3-2.実験

3-2-1.サンプルの処理方法

九州歯科大学の患者（8 名）の検体として、口腔内全剥離細胞（B）、局所剥離細胞（L）、組織切片（T）の提供を受けた。下記の手順で処理を行った。

- (1) 口腔内剥離細胞は、2 cm×2 cm のスポンジのついたブラシで口腔内全体をぬぐい、生理食塩水に浸して細胞を回収した。
- (2) 局所剥離細胞は、癌部位をブラシでこすり、生理食塩水に浸して細胞を回収した。
- (3) 遠心分離後、得られた細胞ペレットを Lysis buffer 500 μ L に懸濁させ、遠心分離（10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 分）後、上清をサンプルとした。
- (4) 組織切片については、手術により切除されたサンプルについて 1 mm×1 mm 切片を Lysis buffer に加え、遠心分離（10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 分）後、上清をサンプルとした。
- (5) 得られたサンプル（細胞抽出液）の含有蛋白質量を Proteostain（Protein Quantification Kit-Wide Range、同仁堂）により測定した。

3-2-2.TRAP アッセイ

TRAPeZe キット（Millipore）を利用して、TRAP アッセイを行った。

- (1) TRAP アッセイの溶液は、各サンプルにつき 25 μ L の溶液を調整した。溶液組成は、以下のとおりである：20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.05% Tween 20, 1 mM EGTA, 各 50 μ M dNTP mixture, 1 \times TS Primer, 1 \times Primer Mix, 2 Units Taq polymerase（Promega）, 2 μ g 細胞抽出液。
- (2) 伸長反応および PCR は以下の条件で行った：30 $^{\circ}$ C で 60 分、（95 $^{\circ}$ C 30 秒、59 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 30 秒）を 33 回、72 $^{\circ}$ C で 20 分、4 $^{\circ}$ C で保温。その後、12.5% アクリルアミド、1.25 \times TBE に PCR 産物 10 μ L を注入して 200 V で 1 時間ゲル電気泳動した（1 \times TBE：89 mM Tris 塩基、89 mM ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.0）。
- (3) 泳動後、TAKARA バイオの 1 \times Gelstar（in 1 \times TBE）溶液で 30 分間染色し、写真撮影した。用いた DNA マーカーは、20 bp step ラダー（タカラバイオ）で、下から 40, 60, 80,

100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500 bp の DNA を示す。

3-2-3.電気化学測定

プローブ DNA として SS-T8TS1 (HO-(CH₂)₆-SS-(CH₂)₆-5' TTT TTT TTA ATC CGT CGA GCA GAG TTA GGG) を用いた。前章で開発した電極モジュール(金電極チップ装備)を W 電極として用いた(金電極部分は直径 3 mm の円、本体はポリプロピレン製) (図 3 参照)¹²⁾。R 電極 には銀塩化銀電極、C 電極 には白金電極を用いた。測定はディスプレイサブルチップ専用アダプタを電気化学アナライザー ALS650C に接続して、Osteryoung square wave voltammetry (SWV) 測定およびクロノクーロメトリー(CC) 測定を行った。

以下に測定手順を示した。

- (1) チップの前処理のために、30 秒間プラズマ処理を行った。
- (2) 終了後、直ちに 5 nM SS-T8TS1、100 mM NaCl、1 mM 6-メルカプトヘキサノール混合溶液 300 μ L を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。終了後、アスピレータで溶液を除去し、Milli-Q で洗浄して、プローブ DNA 固定化電極を得た。
- (3) 続いて 0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液、20 μ M FND2、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液 300 μ L でそれぞれ洗浄した後、20 μ M FND2、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液 300 μ L を加え、SWV 測定を行った(i_0 測定)。
- (4) 伸長反応溶液(10 ng μ L⁻¹抽出液、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.0 mM MgCl₂、50 mM KCl、0.10 mM 2-メルカプトエタノール、0.10 M スペルミジン、20 μ M dNTP mixture) を 20 μ L 添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。
- (5) 終了後、1×PBS を 300 μ L 加え、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液、20 μ M FND2、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液 300 μ L でそれぞれ洗浄した後、20 μ M FND2、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl 溶液 300 μ L を加え、SWV 測定を行った(i 測定)。
- (6) 得られた結果を、電流増加率 $\Delta i\% = (i/i_0 - 1)$ によって評価した。
SWV 測定条件: 初期電位、0 V ; 最終電位、0.5 V ; 電位増加分、0.01 V ; 振幅、0.05 V ; 周波数、70 Hz ; 静止時間、2 秒 ; 感度、 1×10^{-5} A V⁻¹。
- (7) CC 測定時の電極上の DNA 量を、以下のようにして算出した¹³⁾¹⁴⁾。10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4)、次いで 50 μ M Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4)でプローブ DNA 固定化電極のクロノクーロメトリー (CC) 測定を行った。
- (8) 終了後、電極を Milli-Q 水 300 μ L で 2 回洗浄し、RNase Inhibitor (TOYOBO) 40 units mL⁻¹を加えた RNase Free Water (Ambion)を 100 μ L で洗浄した。調整した伸長反応溶液 20 μ L を金電極表面に添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。
- (9) 終了後、Milli-Q 水 300 μ L で 2 回ウェルを洗浄し、50 μ M Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl 溶液(pH 7.4)で再度 CC 測定を行った。得られたデータから、以下の式によりテロメア DNA 伸長度を算出した。

$$\Gamma_0 = \frac{(Q_{\text{before}} - Q_{\text{dl}})}{n \cdot F \cdot A} \quad (1)$$

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \Gamma_0 \left(\frac{z}{30} \right) N_A \quad (2)$$

$$\Delta\Gamma = \frac{(Q_{\text{after}} - Q_{\text{before}})}{n \cdot F \cdot A} \quad (3)$$

$$N_{\text{telomere}} = \frac{\Delta\Gamma \cdot (z/6) \cdot N_A}{\Gamma_{\text{DNA}}} \quad (4)$$

n: 反応に関与する電子数

F: Faraday 定数 (C equiv⁻¹)

A: 電極表面積 (cm²)

Q_{dl}: capacitive charge (C)

Γ₀: Ru(NH₃)₆Cl₃ の濃縮密度 (mol cm⁻²)

Γ_{DNA}: プローブ DNA 固定化密度 (molecules cm⁻²)

ΔΓ: テロメラゼ伸長産物量 (molecules cm⁻²)

Z=3: Ru(NH₃)₆Cl₃ の電荷量

N_A: アボガドロ数 (molecules mol⁻¹)

Q_{before}: 伸長反応前の電荷

Q_{after}: 伸長反応後の電荷

N_{telomere}: テロメア DNA 伸長量

CC 測定条件: Init E (V) = 0.1, Final E (V) = -0.4, Step = 1, Pulse Width (s) = 0.25, Sample Interval (s) = 0.005, Quiet Time (s) = 2, Sensitivity (A V⁻¹) = 10⁻⁵.

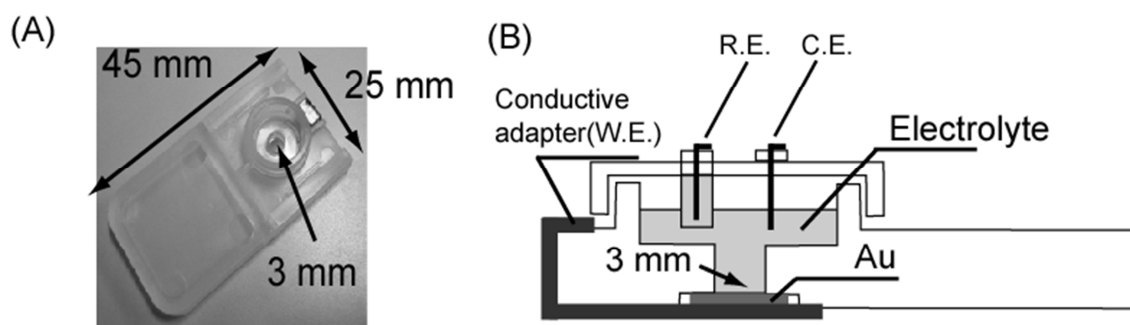


Fig.3 (A)電極モジュール (金電極チップ装備)、(B)電極モジュールの断面図

3-3.結果と考察

図1のFND 1と2の半波電位 $E^{1/2}$ は、それぞれ0.41と0.21 V vs. Ag/AgClに現れる¹⁰⁾。2の酸化還元はより低電位側で起こることから、1に比べてバックグラウンド電流の影響を受けにくいと期待される。なお、電極としてはディスポーザブルタイプの金電極チップを用いた。

3-3-1.臨床検体のテロメラーゼ活性

癌組織から採取した細胞抽出液に対して、TRAPアッセイと電気化学測定を行った。まず、2.0 μg の蛋白質を含む抽出液について、TRAPアッセイを行った。図4(A)に示すとおり、コントロールである癌組織を含まない抽出液 (bufferのみ)、もしくは抽出液を95 °Cで1時間処理したLysate ($\Delta+$) については、ラダーは観察されなかったが、加熱処理を行わなかったLysate (Δ^-) については伸長産物50 bpのところから6 bp毎のラダーが(TTAGGG)₁₁まで観察された。この結果は、抽出液Lysate ($\Delta+$) 中にテロメラーゼ活性が存在し、加熱によってそれが失われたことを示す。

次に、同じ組織由来のLysate (Δ^-) およびLysate ($\Delta+$) のテロメラーゼ活性を電気化学測定で評価した結果を図4(B)、図4(C)に示した。20 μM FND2、0.10 M AcOH-AcOK、0.10 M KCl溶液を用いて、プローブ固定化電極に対して0.20 μg の蛋白質を含むLysate (Δ^-) およびLysate ($\Delta+$) 処理前後におけるSWV測定を行った。その結果、Lysate (Δ^-) では0.21 Vにおいて66%、Lysate ($\Delta+$) では4%の電流増加を観察した。この電流増加の原因を探るために、50 μM Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl溶液におけるDNA固定化電極のクロノクーロメトリー測定によって電極上のDNA量を定量した¹³⁾¹⁴⁾。4.0 \times 10¹⁰ molecules/cm²のプローブ固定化電極をLysate (Δ^-) およびLysate ($\Delta+$) で処理したところ、Lysate (Δ^-) で処理した時、電極表面上の電荷量の増加を観察した。これより、電極上で伸長されたDNA量は、およそ160 merであり、(TTAGGG)₂₇までの伸長が観察された。Lysate ($\Delta+$)処理前後では電極上の電荷量に変化が見られなかったことより、電流増加は確かにテロメラーゼ活性に由来するものであると考えられる。

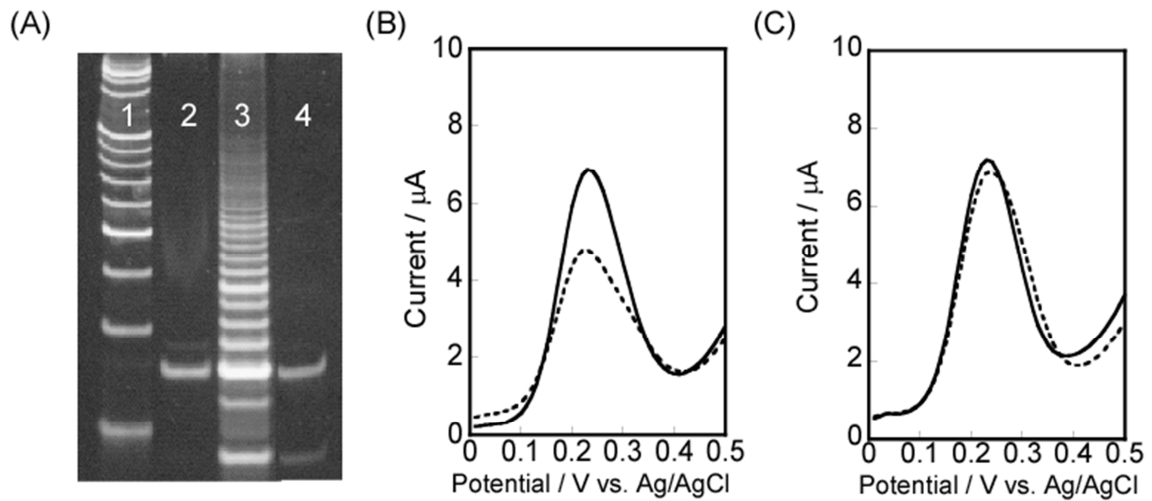


図 4. (A)癌組織から採取した細胞抽出液に対する TRAP アッセイの結果
 (B)癌組織から採取した Lysate(Δ^-)のテロメラーゼ活性を電気化学測定で評価した結果
 (C)癌細胞から採取した Lysate(Δ^+)のテロメラーゼ活性を電気化学測定で評価した結果

3-3-2.臨床検体のテロメラーゼ活性検出可能領域

臨床サンプルの検出可能濃度領域について癌組織由来の細胞抽出液に対して TRAP アッセイと SWV 測定を行った。その結果、TRAP アッセイでは 20 ng 以上の蛋白質を含む抽出液でテロメラーゼの活性が認められた (図 5)。電気化学測定では、2 - 200 ng の蛋白質質量で Δi の増加が見られたが、2000 ng では Δi は低くなった。これは、抽出液中に含まれる夾雑物の影響によるためであると思われる。

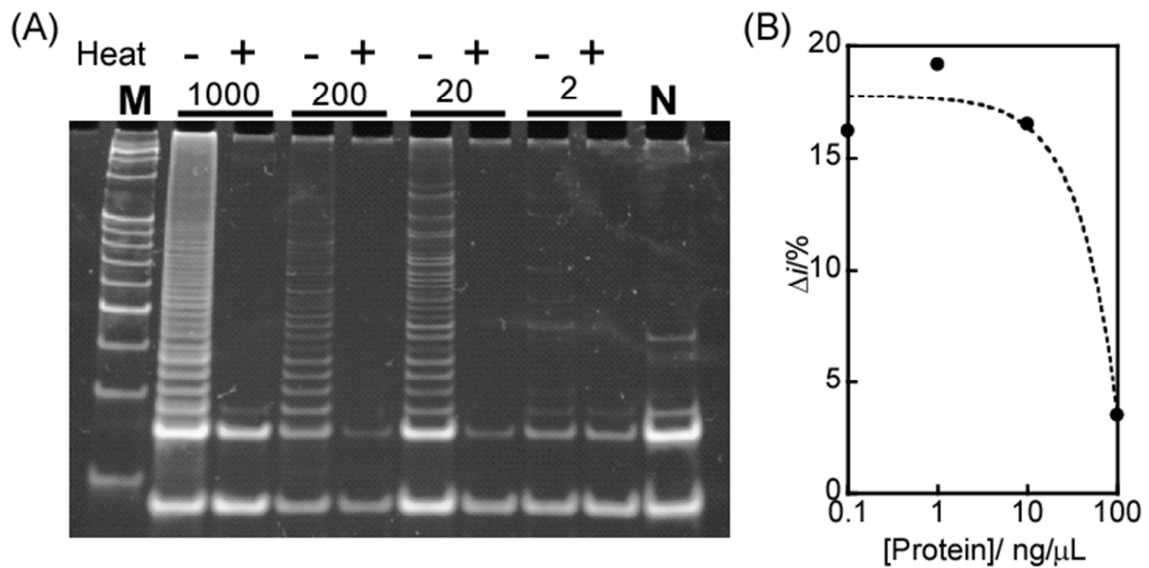


図 5. (A)癌組織由来の細胞抽出液に対する TRAP アッセイ結果
 (B)同 SWV 測定結果

3-3-3.臨床検体のテロメラーゼ陽性率

癌由来の局所剥離細胞と健常者から採取された局所剥離細胞由来の抽出液 (200 ng の蛋白質を含む)で処理した結果を図 6 に示す。局所剥離細胞においても、組織由来の抽出液と同様に電流増加が認められ、加熱するとその電流増加は消失した。また、健常者においても電流増加は観察されなかった。癌患者から採取された全剥離細胞、局所剥離細胞、組織について各 8 検体ずつ TRAP アッセイと電気化学測定を行った。図 7 に示すように、TRAP アッセイでは TTAGGG 単位のラダーが TS プライマーを含む 50 mer のプライマー-DNA の付加産物として観察されないときは“-“、TS プライマーからの付加産物(TTAGGG) n の繰り返し回数 n が、1-4 のとき“±”、4 以上のとき“+”と表記した。表 1 に示すとおり、TRAP アッセイでは判定の難しいもの(±)がいくつか観察された。しかし、± 判定を陽性で見なすと、全剥離細胞、局所剥離細胞、組織切片の順で陽性率は 13、24、100%と増加した。TRAP アッセイにおいて、頭頸部扁平上皮癌の陽性率は 82%程度であると報告されている¹⁾。

また、口腔癌患者の唾液サンプルについて、Zhong らによる TRAP 法評価では、健常者のサンプルでは 7%でテロメラーゼ陽性、癌患者では 75%で陽性となっている¹⁵⁾。

今回得られた TRAP アッセイの結果では、組織由来のサンプルでのみ Hiyama、Zhong らの報告と同程度の陽性率が得られた。一方、電気化学測定では、ほとんどの検体で電流増加が観察された。ネガティブコントロールとして、加熱した組織サンプルで得られた Δi は 4%、健常者の全剥離細胞、局所剥離細胞における Δi はそれぞれ 16%、9.2%であることから、 $\Delta i < 16\%$ は“-“、 Δi が 16-20% は“±”、 $\Delta i > 20\%$ は“+”とした。その結果、電気化学的測定では高いテロメラーゼ陽性率(全剥離細胞 88%、局所剥離細胞 88%、組織切片 100%)が得られた。

これは、Hiyama ら¹⁾や Zhong ら¹⁵⁾の報告と比べると、若干高い陽性率であった。臨床検体内に含まれる夾雑物は PCR 自体を阻害する可能性が高いため、従来の TRAP 法では PCR が阻害された例もあったものと推測される。電気化学法において、剥離細胞サンプルであっても高い陽性率を示したのは、本手法が PCR を含まないためと推察される。

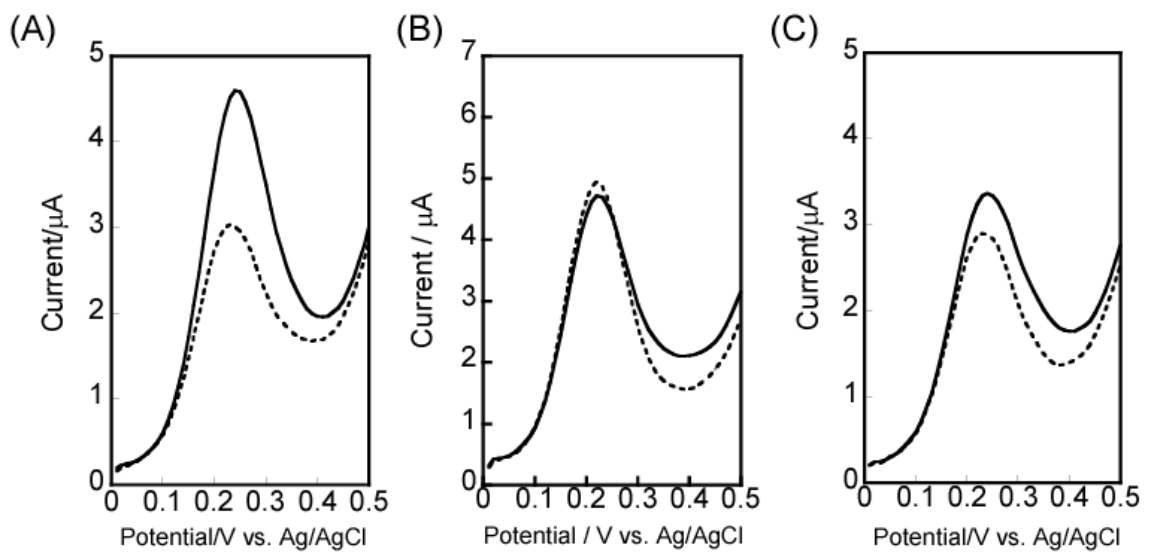


図 6. 癌由来の局所剥離細胞と健常者から採取した局所剥離細胞由来の抽出液の電気化学測定結果

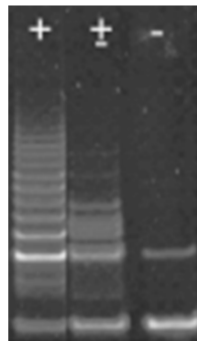


図 7. 癌由来の局所剥離細胞と健常者から採取した局所剥離細胞由来の抽出液の TRAP アッセイ結果

表1. Results of telomerase assay by TRAP and electrochemical method.

Patient type ^a	Sample type ^b	TRAP		Electrochemical method
N	B	-		16
	L	-		9.2
	B	+	+	23
	B	±	+	32
	B	±	+	28
	B	±	+	42
	B	-	-	2.9
	B	-	±	16
	B	±	+	59
	B	-	+	59
	L	+	+	54
	L	+	±	18
	L	±	+	20
	L	-	+	26
T	L	±	+	93
	L	±	+	88
	L	-	-	7.1
	L	-	+	68
	T	±	+	75
	T	+	±	18
	T	+	+	28
	T	+	±	18
	T	+	+	28
	T	+	+	44
T	±	+	36	
T	+	+	36	

^aN, healthy people; T, cancer patient.

^bB, exfoliated buccal cells; L, local exfoliated cells; T: cancer tissue.

3-4. 結言

本研究で開発した電極モジュールを使用し、電気化学的テロメラーゼ活性検出法により、舌癌由来のサンプル 3 種に対するテロメラーゼ活性を測定した。その結果、高いテロメラーゼ陽性率が得られた。特に口腔内の細胞サンプルであっても陽性率は高く、本電極モジュールを使った電気化学的手法により高感度な癌診断法が可能であることが分かった。Zhong らは舌癌の進行度が増すとテロメラーゼの陽性率も上昇すること (Stage I+II 69%、III+IV 81%)、リンパ節への転移の有無 (リンパ節転移有りで 80%、転移無しで 73%) によってもテロメラーゼ活性の陽性率が異なること (リンパ節転移している患者の方が陽性率は高い) を報告している¹⁵⁾。今後検出方法をさらに最適化し、検出精度を高めることによって癌の進行度を電流増加率で評価することができれば、癌の診断や治療の予後評価等に利用できる可能性があると考えられる。また口腔癌以外の癌診断への適用も期待される。

参考文献

- 1) E. Hiyama, K. Hiyama: *Cancer Lett.*, **194**, 221 (2003).
- 2) N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay: *Science*, **266**, 2011 (1994).
- 3) Y. Xiao, V. Pavlov, T. Niazov, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7430 (2004).
- 4) V. Pavlov, Y. Xiao, G. Ron, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner: *Anal. Chem.*, **76**, 2152 (2004).
- 5) G. Xheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, C. M. Lieber: *Nat. Biotech.*, **23**, 1294 (2005).
- 6) U. Eskiocak, D. Ozkan-Arksoysal, M. Ozsoz, H. A. Öktem: *Anal. Chem.*, **79**, 8807 (2007).
- 7) S. Sato, H. Kondo, T. Nojima, S. Takenaka: *Anal. Chem.*, **77**, 7304 (2005).
- 8) S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka: *Molecules*, **10**, 693 (2005).
- 9) J. Dai, M. Carver, D. Yang: *Biochimie*, **90**, 1172 (2008).
- 10) S. Sato, S. Takenaka: *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177 (2008)
- 11) S. Sato, S. Takenaka: to be submitted.
- 12) K. Ohtsuka, H. Endo, K. Morimoto, B. N. Vuong, H. Ogawa, K. Imai, S. Takenaka: *Anal. Sci.*, **24**, 1619 (2008).
- 13) A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov: *Anal. Chem.*, **70**, 4670 (1998).
- 14) S. Sato, S. Takenaka: submitted to Analytical Chemistry.
- 15) L.-P. Zhong, G.-F. Chen, Z.-F. Xu, X. Zhang, F.-Y. Ping, S.-F. Zhao: *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **34**, 566 (2005).

第4章 マルチ電極モジュールと装置の開発

4-1. 緒言

すでにモノ仕様の電極モジュールとその検査装置（第2章に記載）を開発したが、電極モジュールをマルチ化し、多種類の異なったリガンドを電極チップ上に集積化することによって、サンプル中の多種類のターゲットを同時に分析できるようになる。そこで、分析の効率化を図る為にマルチ化した電極モジュールと検査装置の開発を行った。このような電極モジュールと検査装置は高感度、コンパクト化することで研究用途だけでなく、各種臨床検査や食品検査など幅広い分野での利用が期待される。

4-2. 電極モジュール

4-2-1. W 電極の作製

マルチ電極チップのウェル面積は、モノ電極チップに比べて面積が大きい。測定対象のサンプル溶液をマルチ電極チップのウェルに満たす場合、溶液が微量でも測定を可能にするにはウェルの深さを浅くする必要がある。第2章に記載したモノ電極仕様の電気化学アナライザーHAN-H100のように測定部開閉蓋にR電極とC電極を装備し、電極モジュールのウェルに満たしたサンプル溶液の上からR電極及びC電極を浸漬させる方式では、電極が浸漬できるだけの深さを確保する必要がある。

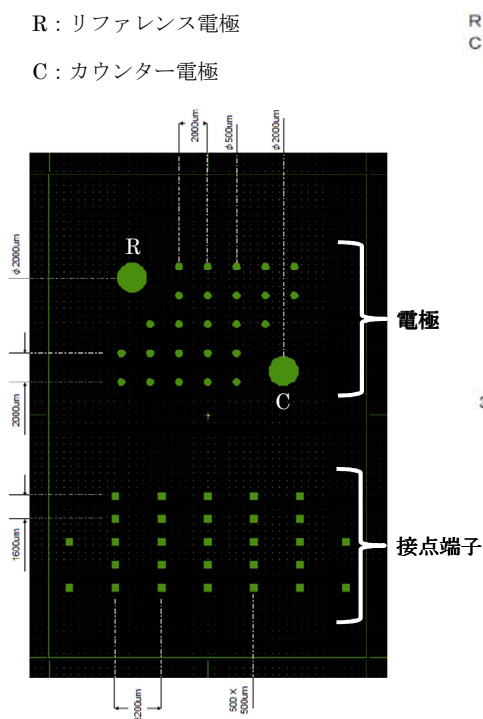


図1. 25pin 電極チップ図面

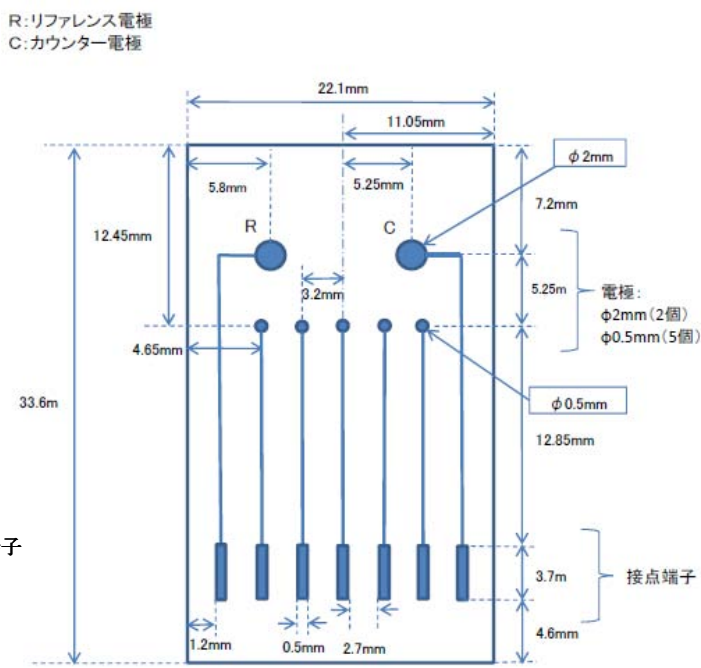


図2. 5pin 電極チップ図面

従って、マルチ電極チップにおいて、微量のサンプル溶液の測定を可能にする為には、R 電極及び C 電極を電気化学アナライザー側に装備する方式は困難と考えられることから、電極チップ側に R 電極と C 電極を設ける仕様を検討した。

マルチ化する W 電極の基板材料には、表面が極めて平滑で安定な材料であるシリコンと PET（ポリエチレンテレフタレート）を選択した。

W 電極の電極数を 5pin 電極チップと 25pin 電極チップとし、その電極の図面をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。

25pin 電極チップは、W 電極 25 個と R 電極、C 電極各 1 個で構成されている。図面設計と作製は Vintasys Corporation に依頼した。

一方、5pin 電極チップは、W 電極 5 個と R 電極、C 電極各 1 個の構成で設計し、作製は田中貴金属工業(株)に依頼した。

上記 25pin 電極チップと 5pin 電極チップの仕様を下記の表 1 に示した。

表 1. マルチ電極チップの仕様

項目	25pin 電極チップ	5pin 電極チップ
基板材質	シリコン	PET
基板厚	0.7mm	0.5mm
金膜厚	0.5 μ m	左に同じ
W 電極数、電極径	25 個 0.5 ϕ	5 個 0.5 ϕ
R 電極径	2 ϕ	左に同じ
C 電極径	2 ϕ	左に同じ

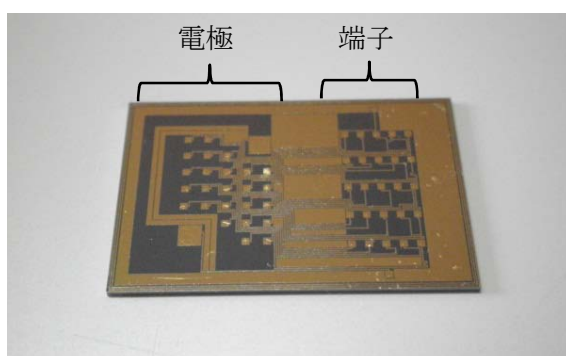


図 3. 25pin 電極チップ

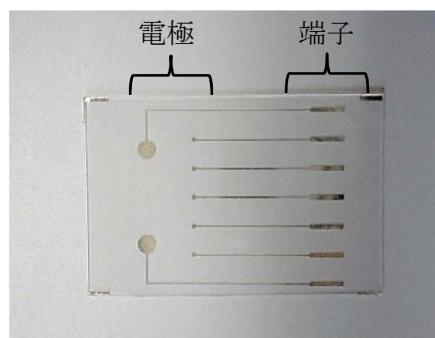


図 4. 5pin 電極チップ

25pin 電極チップ及び 5pin 電極チップの完成品の写真を図 3 及び図 4 に示した。

4-2-2.電極ホルダーの構想

図 5 に電極ホルダーの構想図を示した。

プローブピン 27 本を固定した装置側のプローブピンホルダーを上下に可動させる構造にすることで、マルチ電極チップ上に設けた W 電極 (25 個)、R 電極、C 電極端子部の計 27 個の電極端子部とコンタクトすることを可能にした。測定時には装置側のプローブピンホルダーを下げて、装置にセットした電極モジュールの電極端子をプローブピンに接触させ導通状態にする。一方、測定を終了する際は、プローブピンホルダーを上げて電極モジュールの電極端子からプローブピンを離す構造とした。

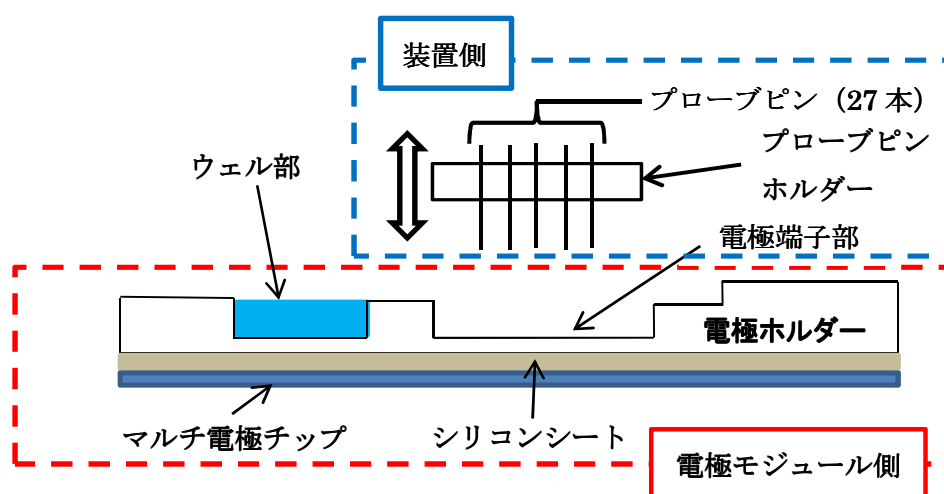


図 5. 電極ホルダーの構想図

4-2-3.電極モジュールの構成

1. 25pin 電極モジュールの組立

以下の図 4～図 7 に電極モジュールの構成パーツを示した。

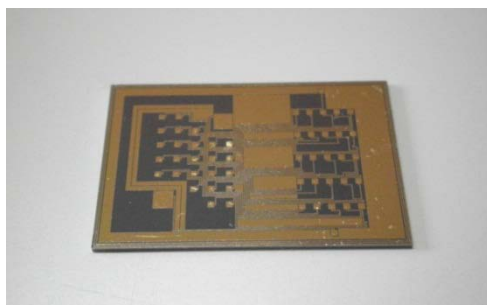


図 6. 電極チップ



図 7. 電極ホルダー



図 8. シリコンシート

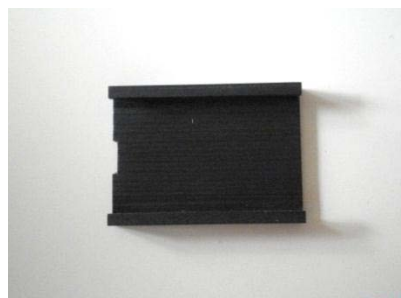


図 9. ルーラー



図 10. 電極ホルダーへのシリコンシートの装着



図 11. 電極チップの装着 (表側)



図 12. 電極チップの装着 (裏側)

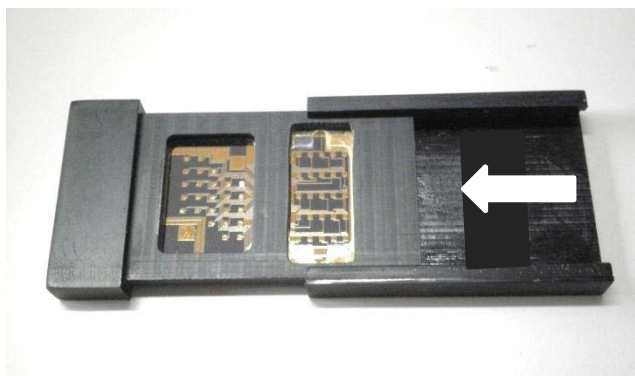


図 13. ルーラーの装着



図 14. 25pin 電極モジュール完成品

また、電極モジュールの組立手順を以下に示す。

- (1) 電極ホルダー（材質：ABS）の裏側（段差が存在する側）にシリコンシート（液漏れ防止用）を装着する。（図 10 参照）
- (2) シリコンシートの上に電極チップの表側（回路側）を載せて装着する。（図 11、図 12 参照）
- (3) 最後にルーラー（材質：ABS）を図 13 のように装着して電極ホルダーと電極チップを挟み込んで固定する。
- (4) 25pin 電極モジュール完成品を図 14 に示した。

2. 5pin 電極モジュールの組立

下の図 15～図 19 に電極モジュールの構成パーツを示した。

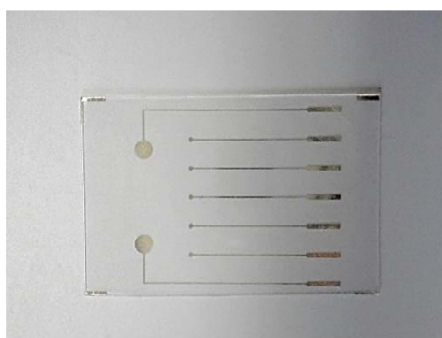


図 15. 5pin 電極チップ



図 16. シリコンシート



図 17. スペーサー



図 18. 電極ホルダー

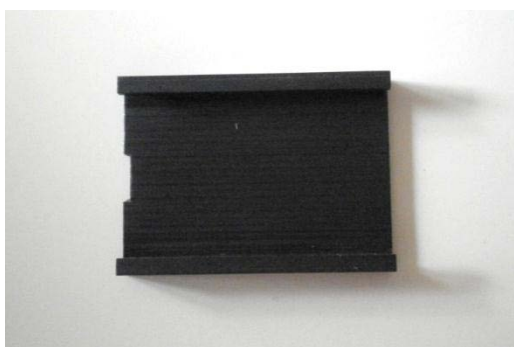


図 19. ルーラー

電極モジュールの組立手順を以下に示す。

- (1)電極チップにマスキングシールを貼り付ける。
- (2)電極ホルダーの裏側（段差が存在する側）にシリコンシート（液漏れ防止用）を装着する。
- (3)電極チップのマスキングシールを貼り付けた面をシリコンシートの上に貼り付ける。
- (4)その上からスペーサー（材質：POM）を装着する。（図 20 参照）
- (5)ルーラーを図 21 のように装着して電極ホルダーと電極チップを挟み込んで固定する。
- (6)ホルダーの電極部の溝にキャップを取り付けて 5pin 電極モジュールを完成させた（図 22 参照）。

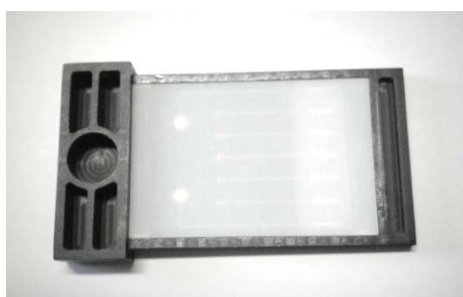


図 20. スペーサーの装着



図 21. ルーラーの装着

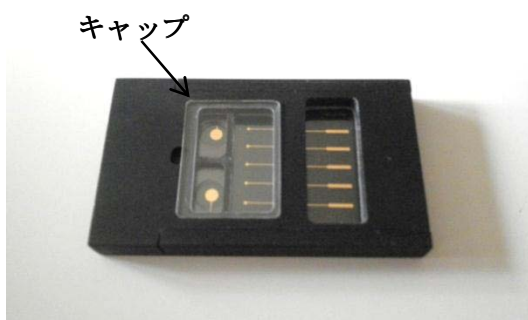


図 22. 5pin 電極モジュール完成品

4-2-4. 寒天製造治具

電極モジュールの R 電極上にサンプル溶液中の含有成分（タンパク質等の有機物）が付着するのを防止する目的で、電気化学測定を実施する際には R 電極上に寒天を載せて測定することとした。

その寒天を作る為の治具を作製した（図 23 参照）。本治具を使用することで R 電極に載せる寒天のブロックを一度に 20 個作製することができる。

寒天の作製手順を以下に示す。

- (1)KCl 30g をイオン交換水 100ml に加熱しながら溶解させる。
- (2)マイクロピペットで溶解した寒天溶液を採取し、寒天製造治具のマスに流し込む。

(3)本治具を冷蔵庫に入れて寒天を固める。

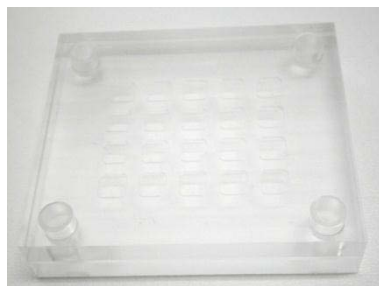


図 23. 寒天製造治具

4-3. マルチ電極用測定装置 (EMC-02AN) の開発

4-3-1. 機能概要

本装置は、マルチ電極対応の 3 電極方式の電気化学アナライザーである。

4-2-3 に記載した 25pin 及び 5pin 電極モジュール専用の測定装置である。

図 24 に装置の回路図を示した。

R 電極と W 電極間の電位をパソコン上で設定された電位に合うように C 電極の電位を制御し、個々の W 電極で起こる電気化学反応によって流れる電流を測定する仕様とした。25 個の W 電極の中から任意の電極を選択し、測定する手動モードとパソコンからの測定実行の度に選択される電極が 1~25 まで順次切り替わる自動モードを備えている。また、電源は USB バスパワーを使用し、パソコンと USB で接続することでアプリケーションソフトを立ち上げることができる。

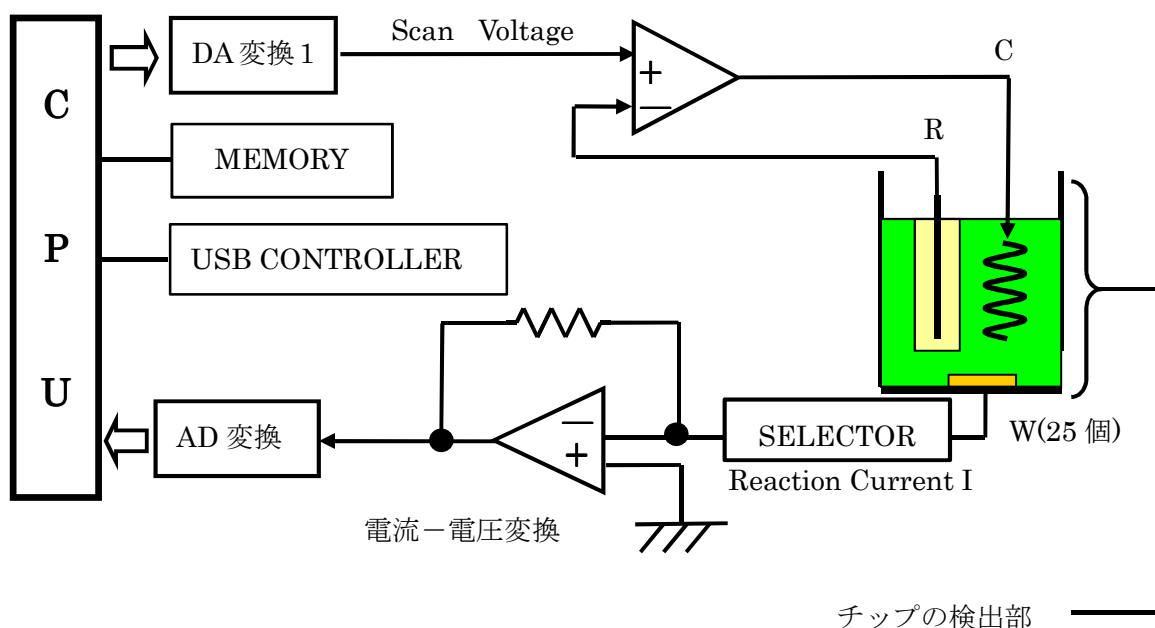


図 24. 装置回路図

本装置は、第2章で記載した電気化学アナライザーHAN-H100用のパソコンアプリケーションソフトに対応しており、CV、DPV、CC の測定を可能とした。
また他の装置でも測定を可能にする為に外部端子を設け、マルチ電極のアダプターとしても使用できるように設計した。
測定データは、CSV形式で保存するようにし、どの計算ソフトを使用しても解析が可能な仕様にした。

4-3-2. 装置各部の説明

図25に装置正面の写真を示した。

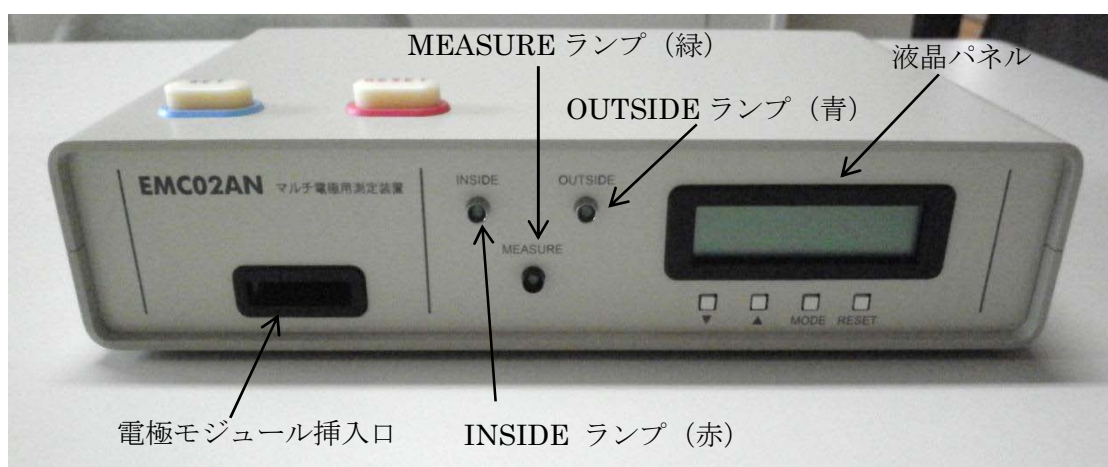


図25. 装置正面

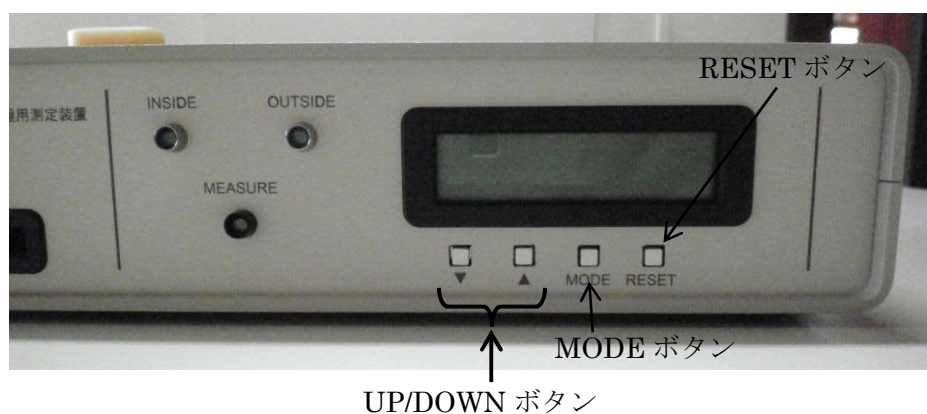


図26. ボタン類



図 27. 装置天面部

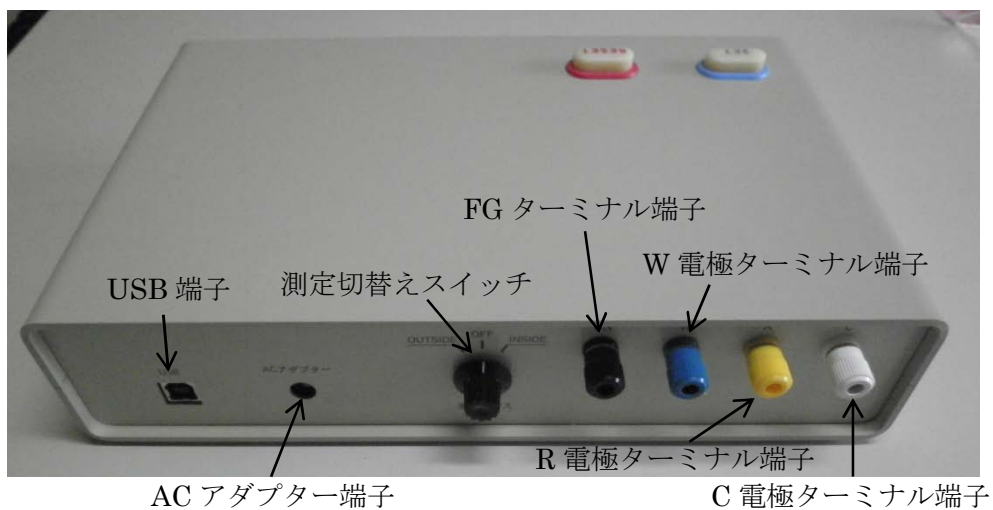


図 28. 装置背面部

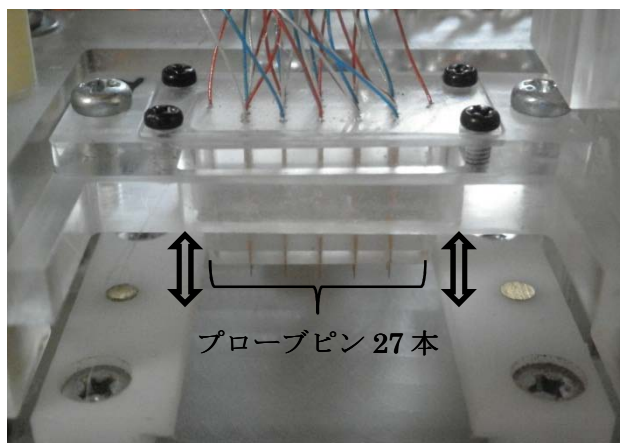


図 29. プローブピンホルダー部

4-3-3. 仕様

1. 本体の寸法

180mm×280mm×60mm

2. 電源

USB パワー及び AC アダプター

3. プローブピンホルダー部

図 29 に示したように、プローブピン 27 本（W 電極用：25 本、R 電極用：1 本、C 電極用：1 本）をプローブピンホルダーに固定し、SET/RESET ボタンで上下に可動させることで電極モジュールの電極端子にプローブピンが接触できるようにした。

4. 制御部

- ・ADC：16bit
- ・DAC：14bit
- ・印加電圧 最大：+2V
最小：-2V
分解能：500 μ V
- ・測定電流 最大：+20mA
最小：-20mA
分解能：125pA

4. 制御ソフト

HAN-H100 用アプリソフト

- ・サイクリックボルタンメトリー (CV)
- ・ディファレンシャルパルスボルタンメトリー (DPV)
- ・クロノクーロメトリー (CC)

5. マルチ電極のアダプター機能

マルチ電極による測定を外部の測定装置で行う場合の各ターミナルの信号名を表 2 に示した。

表 2.コネクタピンと信号名

ターミナルの色	信号名
黒	FG(frame ground)
白	W 電極
黄	R 電極
赤	C 電極

4-3-4.動作準備

1. 操作用 PC との接続

USB ケーブルで PC の USB コネクターと接続し、電源を PC の USB から得られるようにした。

4-3-5. USB ドライバー及びアプリケーションソフトのインストール

1. USB ドライバーのインストール

第 2 章に記載の電気化学アナライザーHAN-H100 用のソフトインストール用 CD ROM を用いて PDF ファイル「USB ドライバーのインストール」を開き、画面の指示に従って操作することでインストールできるようにした。

2. アプリケーションソフトのインストール

PDF ファイル「簡易電気化学測定装置のインストール」を開いて画面の指示に従い操作するとインストールできるようにした。

4-3-6. 測定準備

1. 電極モジュール組立

「4-2-3.電極モジュールの構成」に記載。

2. 寒天 (KCl 含有) の装着

電極モジュールの R 電極上にサンプル溶液中の含有成分が吸着しないように寒天を装着する。

3. サンプル溶液の滴下

測定対象のサンプル溶液をマイクロピペットで採取し、電極モジュールのウェルに滴下する。

4-3-7. 測定方法 (本装置による測定の場合)

1. 装置の設定

①測定用のソフトをインストールした PC の電源を入れる。

②USB ケーブルを上記 PC と装置側面の端子に接続する。

③本装置背面の測定切替えスイッチを INSIDE にする。

④測定用ソフトを立ち上げる。

(「第 2 章 チップと装置の開発 2-4-10. アプリケーションを用いた測定」参照)

2. 電極モジュールのセット

サンプル溶液を滴下した電極モジュールを電極モジュール挿入口より装置の中に入れセットする。

この際、装置の SET ボタンが解除されていることを確認する。

3. 測定の手順

①アプリケーションの起動

簡易測定アイコンをダブルクリックして起動させる。

簡易測定アプリケーションが開き、測定画面にソフトのバージョンが表示される。PC と装置が接続されて測定可能な状態になると測定画面右下の受信・送信の緑色の LED が点灯する。

②条件設定

- ・MODE ボタン (図 26 参照) により、自動モードまたは手動モードを選択する。
- ・アプリケーションにより、CV 測定法、DPV 測定法、CC 測定法の中から測定法を選択し、さらに各測定条件の入力を行う。

③測定 (自動モード)

- ・PC 画面上の測定開始ボタンをクリックすると W 電極の W1 から測定を開始する。
- ・測定終了後、画面に W1 の測定波形とデータ保存用の画面が表示される。
- ・ファイル名を付けてデータを保存する。
- ・再度、PC 画面上の測定開始ボタンをクリックすると W2 の測定を開始する。
- ・以下、測定が必要な W 電極数まで測定を繰り返す。

④測定 (手動モード)

- ・UP/DOWN ボタン (図 26 参照) にて測定する電極を選択することができる。
- ・PC 画面上の測定開始ボタンをクリックすると選択した W 電極の測定を開始する。
- ・測定終了後、画面に選択した W 電極の測定波形とデータ保存用の画面が表示される。
- ・ファイル名を付けてデータを保存する。

4. 測定の終了

測定終了時は、装置の RESET ボタンを押し、プローブピンホルダーを上に戻すことで電極モジュールをプローブピンのコンタクトから解放することができる。RESET 完了後、電極モジュールを装置より取り出すことができる。

4-3-8. 測定方法 (外部装置による測定の場合)

1. 装置の設定

- ①装置に AC アダプターを接続する。
- ②本装置背面の測定切替えスイッチを OUTSIDE にする。
- ③外部測定装置の W 電極、C 電極、R 電極の各ケーブルを本装置背面 (図 28 参照) の各々のターミナル端子に接続する。

2. 電極モジュールのセット

「4-3-7 2.電極モジュールのセット」参照

3. 測定の手順

- ① MODE ボタン (図 26 参照) により、手動モードを選択する。
- ② UP/DOWN ボタン (図 26 参照) にて測定する電極を選択する。
- ③ 外部測定装置の操作手順通りに測定を行う。

4-3-9. アプリケーションの説明

本装置に用いたアプリケーションは第 2 章に記述した電気化学アナライザー HAN-H100 と同じものである。

「第 2 章 チップと装置の開発 2-4-9. アプリケーションの説明」参照

4-3-10. アプリケーションを用いた測定

「第 2 章 チップと装置の開発 2-4-10. アプリケーションを用いた測定」参照

4-4. チップの評価のためのサンプル 1-オリゴヌクレオチドターゲットによる検討

実験に用いた DNA を表 3 に示す。合成オリゴヌクレオチドは、カスタム合成を行った (ジーンネット)。arpbP0-probe と arpbP0-target は下線部が相補的な配列を有する。

表 3. プローブ DNA およびサンプル DNA

	Sequence
arpbP0-probe	5'-CCC CCC CCC CCC <u>TGT ATG ACA ATG GCA GCG TCT ACA</u> -3'
arpbP0-target	5'-GACCTCAGGGCT <u>GTAGACGCTGCCATTGTCATACA</u> -3'
Agrcb-target	5'-TTCGCTAATCATTTCCGGAAAGTTCACACGGGTCT-3'

arpbP0-target および Agrcb-target は以下の手順でフェロセンラベル化を行った。1 mM arpbP0-target および Agrcb-target 含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μ l に 1 mM FCDI を 5 μ l 溶かした 50% DMSO を含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μ l を加えて、25°C で 1 時間振とうした。振とう後、NAP-5 (GE ヘルスケア) を用いて精製を行い、フェロセンラベル化ターゲットを得た。

4-4-1. チップの評価のためのサンプル 2-非対称 PCR 産物ターゲットによる検討

サンプルは、HeLa 細胞から以下の手順で準備した。

まず HeLa 細胞ペレット (1 \times 10⁶ cells)から Triple prep kit (GE ヘルスケア)を用いて RNA を抽出した。その後、Forward, Reverse プライマーとして 5'-CGG AAG AGT GTC TGG

AGC AA-3', 5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3'を用いて、非対称 PCR を行った。非対称 PCR 条件は、以下に示すとおりである。溶液は、0.04 μ M Forward プライマー, 4 μ M Reverse プライマー, 100 fg RNA 産物, 1 \times HotStarTaq Master Mix (Qiagen)を調製した。温度プログラムは、95°C \times 5min, (95°C \times 1 min, 62°C \times 1 min, 72°C \times 1 min) \times 33 で行った。

得られた非対称 PCR 産物(マイナス鎖)は、FCDI によってフェロセンラベル化を行った。非対称 PCR 産物 (最終濃度 2.5 ng/ μ L)を含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μ l に 1 mM FCDI を 5 μ l 溶かした 50% DMSO を含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μ l を加えて、25°C で 1 時間振とうした。振とう後、QIA quick PCR purification kit (Qiagen GmbH)を用い精製を行い、フェロセンラベル化 DNA を得た。

実験に用いたプローブ DNA を表 4 に示す。合成オリゴヌクレオチドは、カスタム合成を行った(ジーンネット)。

表 4. プローブ DNA

	Sequence
hTERT(+)	5'-TGTCGGAAGCAGAGGTCAGGCAGCATCCCCCCCCCCCCC-3'
hTERT(-)	5'-GATGCTGCCTGACCTCTGCTTCCGACACCCCCCCCCCCC-3'

4-4-2. チップの評価のためのサンプル 3-RNA ターゲットによる検討

ハイブリダイゼーション評価に用いる DNA プローブおよびターゲット部位の配列は表 5 に示す通りである。

表 5. プローブ DNA の配列

	Sequence	由来
arpbP0	CCC CCC CCC CCC TGT	Oryzias latipes cDNA clone similar to acidic ribosomal protein P0 (AJ457241)*
	ATG ACA ATG GCA GCG TCT ACA	
hsp70	CCC CCC CCC CCC GAG	Oryzias latipes mRNA for heat shock protein 70 cognate, complete cds (D13669.1)*
	GTG ACA TTT GAT ATT GAC GCA AAT GG	

*) Gene bank ID

サンプル RNA は、以下の通り処理した。メダカの肝臓を採取し、肝臓 10 mg に対して 180 μ L 以上の RNAlater RNA stabilization Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を添加し

た。この組織サンプルを RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH)によって処理し、total RNA を採取した。

メダカ肝臓由来の total RNA(最終濃度 2.5 ng/μL)を含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μl に 1 mM FCDI を 5 μl 溶かした 50% DMSO を含む 50 mM ホウ酸/NaOH 緩衝溶液 (pH 9.0)50 μl を加えて、25°C で 1 時間振とうした。振とう後、QIA quick PCR purification kit (Qiagen GmbH)を用い精製を行い、フェロセンラベル化 total RNA を得た。

4-4-3. チップの評価のための電気化学測定

DNAプローブとして表3~5に示す配列を用いた。本章で開発した電極をW電極として用いた(金電極部分は直径1mmの円、本体はPET製)。R電極には銀塩化銀電極、C電極には白金電極を用いた。測定は専用アダプタを電気化学アナライザーALS650Cに接続して、Osteryoung square wave voltammetry (SWV) 測定を行った。

以下に測定手順を示した。

- (1) 5 pin 電極チップは、電極部以外はポリイミドテープでカバーした。
- (2) この電極をプラズマ照射 (Cute 1MP/R, フェムトサイエンス)した。照射条件は、 5.0×10^{-2} Torr, Air 30 SCCM, 30 s とした。
- (3) 1 mM ジチオプロピオン酸 2 μ L を添加し、25°C で 3 h 静置した。
- (4) 電極は、Milli-Q 水で洗浄し、水分をエアブローで除いた後、50 mg/mL 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、50 mg/mL N-ヒドロキシコハク酸イミド 混合溶液を 2 μ L 添加し、25°C で 20 min 静置した。
- (5) 溶液をエアブローで除いた後、2 μ L の 0.5 μ M DNA プローブ, 0.5 M NaCl 溶液を添加し、25°C で 2 h 静置した。
- (6) Milli-Q 水で電極を洗浄した後、2 μ L の 20 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl 溶液を添加し、4°C で 1 h 静置した。
- (7) ハイブリダイゼーションは、各ターゲットによって以下の通り変更した。
 - (7)-1 電極を 2 \times SSC で洗浄し、0.5 ng/ μ L フェロセンラベル化オリゴヌクレオチド, 2 \times SSC 溶液を 2 μ L 添加し 25°C で 2 h 静置した。
 - (7)-2 電極を 2 \times SSC で洗浄し、0.5 ng/ μ L フェロセンラベル化非対称 PCR 産物, 2 \times SSC 溶液を 2 μ L 添加し 25°C で 2 h 静置した。
 - (7)-3 電極を 5 \times SSC で洗浄し、0.5 ng/ μ L フェロセンラベル化 total RNA, 5 \times SSC, 50% ホルムアミド、0.125% SDS 溶液を 2 μ L 添加し 25°C で一晩 (15 h) 静置した。
- (8) 電極を 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0, 0.1 M NaClO₄ で洗浄し、同じ溶液にて SWV 測定を行った。
SWV 測定条件: 初期電位、0 V ; 最終電位、0.5 V ; 電位増加分、0.01 V ; 振幅、0.05 V ; 周波数、70 Hz ; 静止時間、2 秒 ; 感度、 1×10^{-5} A V⁻¹。

4-4-4. チップの評価

チップは、プラズマ照射を行っても、劣化等は観察されなかった。

まず、5 pin 電極に対して、オリゴヌクレオチドをターゲットとしたときの検討を行った。オリゴヌクレオチドターゲットには、ランダムに FCDI が 1~4 分子ラベル化されている¹⁾。二種類のターゲット DNA、5 ng/ μ L の arpbP0-target および Agrcb-target を arpbP0-probe 固定化電極に作用させたときの電気化学応答を図 30 及び図 31 に示す。電位は、安定して 0.27 V で得られた。1-5 ng/ μ L の範囲でターゲット DNA の濃度変化を観察した結果、フルマッチである arpbP0-target/arpbP0-probe の場合の方が、arpbP0-target よりも電流は高く、濃度依存的に電流は増加した(図 32)。識別能が若干低いのは、ターゲットオリゴヌクレオチドの配列が 35 mer であり、FCDI がラベル化されることによって、ハイブリ効率が低下しているためであると思われる²⁾。

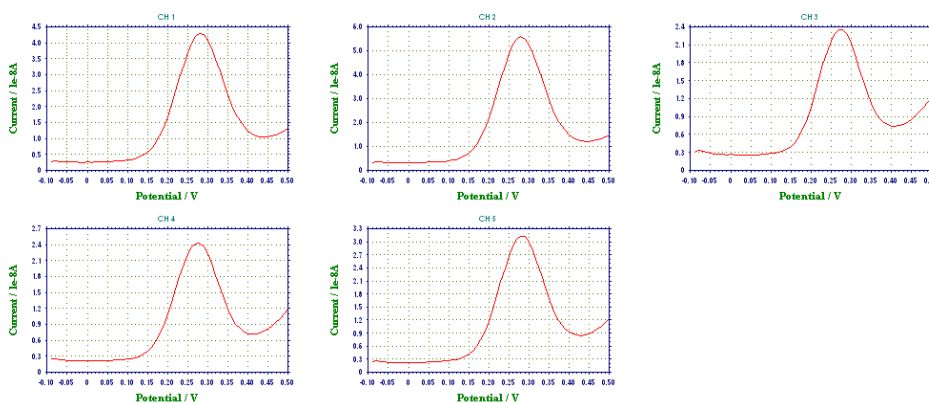


図 30. arpbP0-probe 固定化電極に対して、5 ng/ μ L の arpbP0-target を作用させたときの SWV 結果。

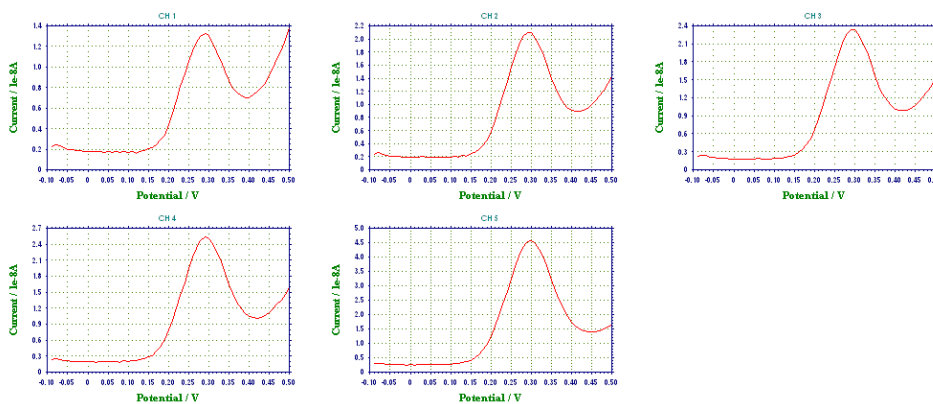


図 31. arpbP0-probe 固定化電極に対して、5 ng/ μ L の Agrcb-target を作用させたときの SWV 結果。

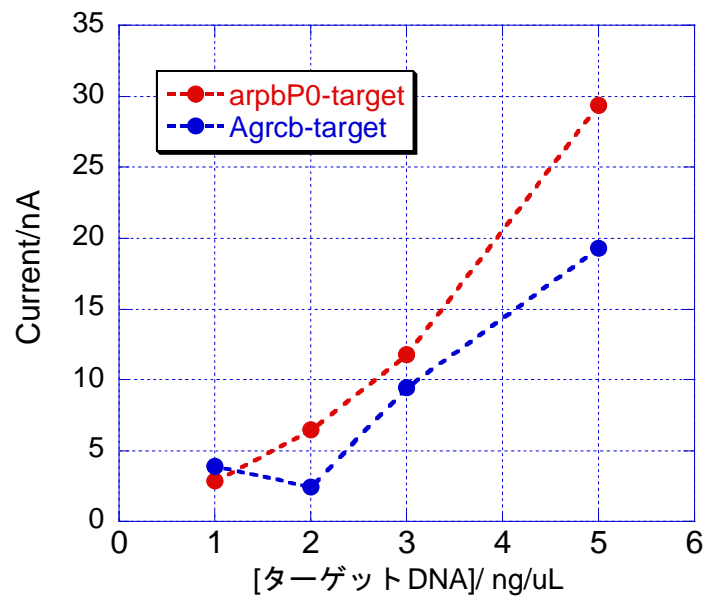


図 32. arpbP0-probe 固定化電極に対して、異なる濃度の arpbP0-target および Agrcb-target を作用させたときの応答電流値.

次に、より実用的なターゲットとして非対称 PCR 産物に対して、検討を行った。非対称 PCR として、hTERT のマイナス鎖を非対称 PCR によって増幅した。非対称 PCR 産物の長さは、145 bp である。このサンプルに対して、FCDI をラベル化した。固定化プローブは、hTERT のプラス鎖とマイナス鎖である hTERT(+)と hTERT(-)を用いた。

この結果もオリゴヌクレオチドターゲットの場合と同様に電流が観察された。図 33 には、ターゲット DNA 濃度を 2-10 ng/μL まで変化させたときの電流変化を示す。とくに興味深いことに、ターゲット DNA 濃度として 5 ng/μL を超えたとき、大きく識別能が向上した。35 mer のオリゴヌクレオチドに対して、145 mer の非対称 PCR の場合、FCDI のラベル化位置がターゲット部位に重なる確率は大きく低下する。そのため、ターゲット DNA をより効率的に検出可能になったと思われる。

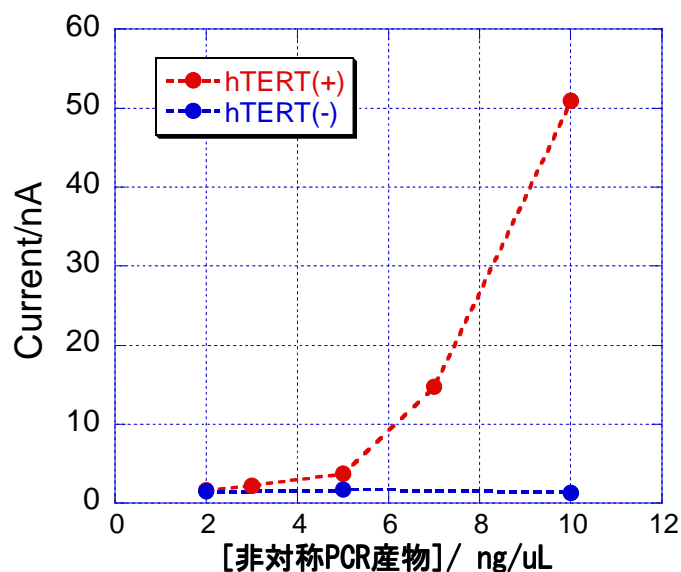


図 33. hTERT(+)-probe および hTERT(-)-probe 固定化電極に対して、異なる濃度の非対称 PCR 産物を作用させたときの応答電流値.

メダカの肝臓由来の Total RNA をサンプルとして、開発した基板を利用した遺伝子検出を試みた。RNA は、1 ng を検体とし、調べる遺伝子は arpbP0 と hsp70 である。RT-RCR における発現解析では、これらの発現量は arpbP0/hsp70=4.8 であった。電気化学測定では、C12 を固定化部位として有するプローブ arpbP0, hsp70 を利用して、arpbP0 および hsp70 固定化電極を調製した。arpbP0 の結果を図 34、hsp70 の結果を図 35 に示す。また、得られた電流値を表 6 にまとめた。

観察された電位は、すべての電極で 0.13 V vs. Ag/AgCl であり、安定した電流を示した。また、得られた電流値を比較すると、arpbP0, hsp70 プローブ固定化電極ではそれぞれ $7.21 \pm 2.05 \times 10^{-9}$ A, $4.09 \pm 2.43 \times 10^{-9}$ A となった。ばらつきが多少大きいですが、この要因はチップの性能によるものではないとおもわれる。実際に未修飾チップについて、100 μ M フェロセンカルボン酸, 10 mM リン酸緩衝液で測定を行うと、 $5.93 \pm 0.5 \times 10^{-7}$ A であり、変動係数が 8.6% であることから、チップとしての精度は高いと思われる。そのため、RNA 検出におけるばらつきは、ターゲットが total RNA であること、さらに RNA であるため RNA であるため分解酵素によるコンタミネーションによる分解を受けやすいためであると考えられ、これは測定条件の最適化によりさらなる安定化を図ることが可能であると思われる。

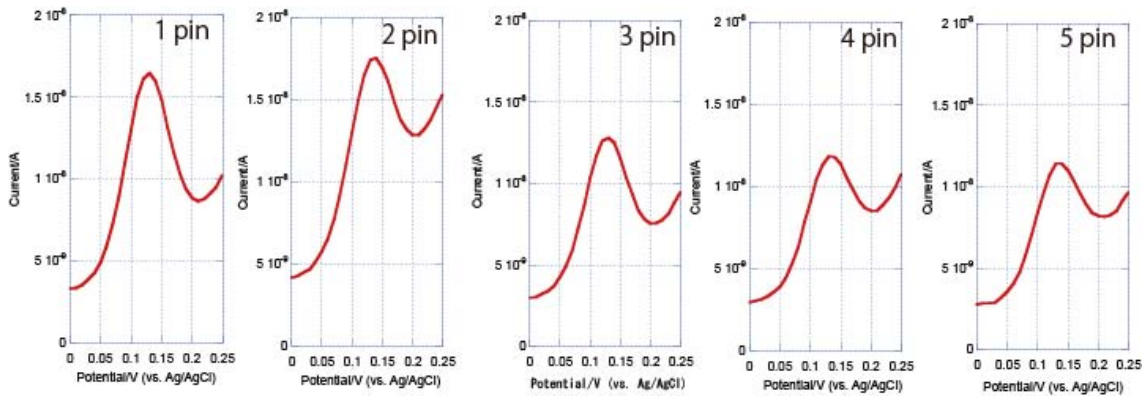


図 34. arpbPO 固定化プローブにおける SWV 測定結果.

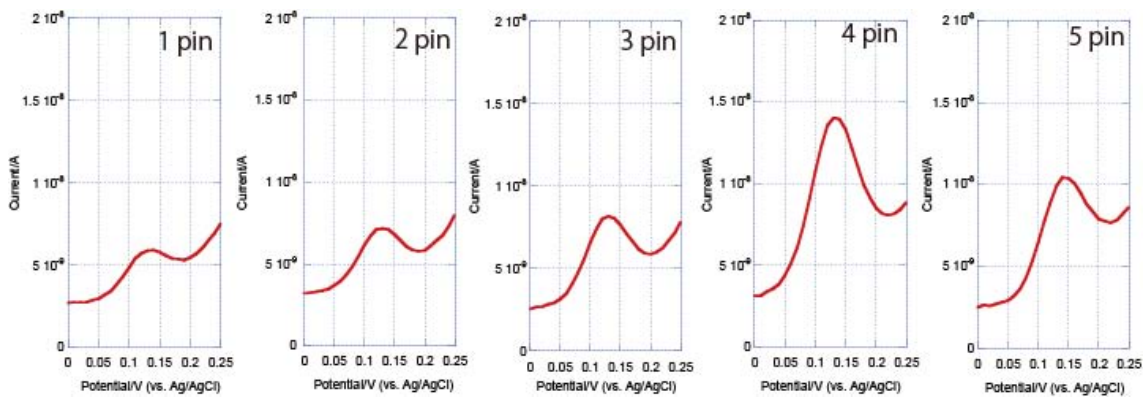


図 35. hsp70 固定化プローブにおける SWV 測定結果.

表 6. 電流値の比較

電極 No.	i_h/A	i_a/A
1	1.04E-08	1.52E-09
2	8.17E-09	2.26E-09
3	7.45E-09	3.33E-09
4	4.44E-09	8.35E-09
5	5.64E-09	4.97E-09
平均	7.21E-09	4.09E-09
標準偏差	2.05E-09	2.43E-09

i_a : arpbPO 固定化プローブ

i_h : sp70 固定化プローブ

4-5. 結言

W 電極をマルチ化（5pin 電極、25pin 電極仕様）することで測定の効率化とコストの削減が期待できる電極モジュールを作製できた。一方、測定装置はコンパクト設計で、外部測定装置接続用のアダプター機能も設け、本装置のみでも、また外部測定装置に接続しても電気化学測定を可能にした。電極モジュールの電極端子部とのコンタクトには電極毎に対応した 27 本のプローブピンを用いたが、このピンは非常に細く衝撃に弱い構造である為、取扱いには注意を要する。従って将来的には、電極モジュールの電極端子部とのコンタクトには面接触できる面積の広い接点端子を用い、電極モジュールにマイコン化したセレクター機能を持たせ、マルチ電極チップの電極の選択を可能にする仕様が考えられる。

これにより、セレクター機能のある電極モジュールを高付加価値のパーツとして繰り返し使用でき、マルチ電極チップのみを測定毎に交換して使用できる為、低コスト化が図れる。また、マルチ電極用測定装置においては、数の多いプローブピンを電極モジュールとの接点端子に使用する必要が無くなり、これによりプローブピンホルダーを可動させる機構を装置内に設ける必要が無い為、さらにコンパクトで安価な装置を作製することが可能になると考えられる。

参考文献

- 1) K. Mukumoto, T. Nojima, S. Takenaka, *Tetrahedron*, **61**, 11705-11715 (2005).
- 2) Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Michinori Waki, Shigeori Takenaka, *Analytical Sciences*, **23**, 115-119 (2007).

第5章 結論

DNA チップは癌や疾患臓器における遺伝子発現やゲノムの多型をみることにより、的確で詳細な病態判断とそれに基づく治療方法の選択などテーラーメイド医療を可能とする臨床診断への応用が期待される。DNA チップの実用化を考えた場合、電気化学的手法は有効な方法である。従来、電気化学的手法を利用した DNA チップに関する研究成果が数多く報告されてきた。本研究は、その中の1つの可能性としてその活性が癌と関連している DNA 伸長酵素の1つであるテロメラーゼに着目し、その活性検出を電気化学的手法で行う電極モジュールとその検出装置である電気化学アナライザーの開発内容及びそれを用いて口腔癌の検出を検討した研究内容をまとめたものである。

第1章では、バイオチップの原理とその歴史及び実用性について述べた。また今後の将来性についてもバイオチップ市場を主導していくと思われる DNA チップの検出原理と装置の小型化と低コスト化が期待できる電気化学的検出法について説明した。さらに、すでに実用化されている代表的なメーカーの DNA チップと検査装置をいくつか紹介した。

電気化学活性種をもつ DNA 固定化電極は酵素の検出も可能で、癌化した細胞の特徴の1つであるテロメラーゼ活性の検出にも応用でき、これを指標にすると癌の診断が可能になることを述べた。

第2章では、実際に開発を行い製品化した電極モジュールとその検査を行う電気化学アナライザーの開発過程についての詳細を述べた。電極モジュールにおいては、低コストで使い捨てで検査できることを基本にし、さらにランニングコストを抑える為には、中にセットした電極チップのみを交換しても対応できる構造にした点について説明した。一方、電気化学アナライザーでは、回路側と電極側を完全に分離し、一体化することで、コンパクトで電氣的ノイズの影響を受け難い高感度測定を可能にした点について説明した。

第3章では、実際に九州歯科大学から提供頂いた患者のサンプルを用いて、本研究で開発した電極モジュールを用いた電気化学的手法と従来からの TRAP 法でテロメラーゼ陽性率の比較検討を行った。その結果、TRAP 法に対して電気化学的手法では高い陽性率を示すことが判明した内容について述べた。

第4章では、第2章で開発したモノ仕様の電極モジュールと電気化学アナライザーをベースに、測定の効率化を図る為のマルチ電極モジュールと電気化学アナライザーの開発内容とその仕様について記載した。また、本章ではマルチ電極モジュールとして 5pin 及び 25pin 電極チップを使用したモジュールの内容を述べているが、将来的には電極のピン数を増やし電極モジュールに装備したマイコン形式のセレクターで電極の選択が可能になる点について述べた。本章では、作製チップの性能を評価するために合成オリゴヌクレオチド、非対称 PCR 産物、メダカから抽出した mRNA を検体としてこれらを FCDI によってフェロセン修飾を行い、チップへハイブリダイゼーションさせた。これによって目的遺伝子の電気化学的検出を作製チップで実現できた。

特に、本研究では開発した電極モジュールを用いた電気化学的テロメラーゼ活性検出法が TRAP 法に比べて高いテロメラーゼ陽性率の検出を可能にしたことを明らかにした¹⁾。

ところで、日本の国民病の一つに歯周病がある²⁾。現在、国内成人の 80%以上が歯周病であると考えられている。オーラルヘルスケアの向上を考える際に避けて通れない課題が歯周病の克服である。歯周病は成人の殆どが罹患しているという国民病であり、抜歯の要因としてう蝕(虫歯)を上回る最大の要因でもある。現在の主要な歯周病診断法は、目視、プラーク付着検査、動揺度検査(ピンセットで歯のぐらつきを確認)、歯周病ポケットの深さ測定(測深プローブ(針)をポケットに挿入)であり、何れも歯科医師の手技に頼った主観的判断であり、再現性のない測定を通院ごとに行っている。そのため、1)疾患の進行度に応じた治療法が施されていない(例えば、難治性歯周炎や若年性歯周炎では、歯を残すより抜歯して他の治療法を考えなければならない症例)。2)現行検査法に対する患者の信頼性が低く、患者自身のケア意識が低い、という課題がある。現在、歯周病の原因菌特有の酵素活性を調べるキットが市販されているが、感度が低く定量的評価はできない。リアルタイム PCR を用いて歯周病原因菌叢(菌種の分布)を調べる手法もあるが、高コストかつ操作が煩雑であるなど多くの制限があり、臨床現場では普及していない。更に、近年、歯周病が全身疾患(動脈硬化・心臓病、骨粗鬆症、肺炎(誤嚥性肺炎)、糖尿病、肥満・高脂血症、早期低体重児出産など)の原因となっていることが明らかになっている。

歯周病菌が産生する歯周組織破壊酵素は細胞毒性を有しており、血流によって伝搬することで全身のどの臓器に対しても破壊的に作用し、様々な全身疾患の病原因子となっている。その中で、高齢者は誤嚥性肺炎予防、成人は心筋梗塞や糖尿病予防、妊婦は早期低体重児出産予防の観点から、歯周病対策は医学、医療にも貢献するという認識が医師の間でも広がっており、歯科と医科の協力関係も構築されつつある。

しかしながら、慢性全身疾患の要因は多岐にわたるため、歯周病との関連メカニズムを解明し、的確な予防的診断を行うためには、多種類の生体分子の測定が必要となり、現在の技術では時間とコストが障壁となり、実現できていない。

そこで、1)的確かつ科学的根拠に基づいた 2)歯科の臨床現場(チェアサイド)で使用可能な 3)装置・ランニングともに低コストでコンパクト、簡便で、多種類の生体分子を迅速に検出する「定量的歯周病総合診断システムの開発」が求められている。

近年、歯周医学(Periodontal medicine)の観点から、歯周病と全身疾患(糖尿病、細菌性心内膜炎、アテローム性動脈硬化など)の研究が進展し、多くの事実が明らかにされてきた。そこで、近い将来、医科領域と連携するためには、歯周病と全身状態を一体的に評価することが今後強く求められてくるが、現在用いられている評価方法はそれぞれ異なった背景・技術に基づくため、検査で得られた情報を統合することが難しくなっている。また、ELISA や PCR など現行の方法は検査機関に委託するため時間がかかることから、チェアサイドでリアルタイムに生体因子を評価することはできず、医科で開発が進められているポイントオブケアの視点にたったものは皆無である。さらに、一般臨床で汎用

するにはコスト面での制約も大きい。このような状況を考えると、歯周病患者からの同一検体を用いて、より多くの生体因子を同時かつリアルタイムに評価できる電気化学的技術の開発・汎用化は、臨床において、また医科との連携を確立するためにも急務である。従って、歯周病判定項目である歯周組織破壊酵素、歯周病原因菌叢、炎症性メディエータを低コストかつ簡便に測定できる電気化学的バイオチップと専用読み取りデバイスを開発することが将来的に期待されている。

(1) 歯周組織破壊酵素検出

歯周病原因菌の一つである *P. gingivalis* は、歯周組織破壊酵素の一つであるプロテアーゼ、ジンジパインを分泌する。

図 1 に竹中研究室が開発した電気化学的プロテアーゼアッセイ法³⁾を示す。

電極チップ上には、プロテアーゼが認識する基質ペプチドが固定化されており、ジンジパインの有無で異なる電気化学シグナルを示す。

現在、シングルチップで、約 4.5×10^5 個の *gingivalis* 菌の検出を達成しており、歯周病検査キットとして販売されているペリオチェック等に比べて数十倍の感度の向上が見られた、などの成果をあげている⁴⁾。

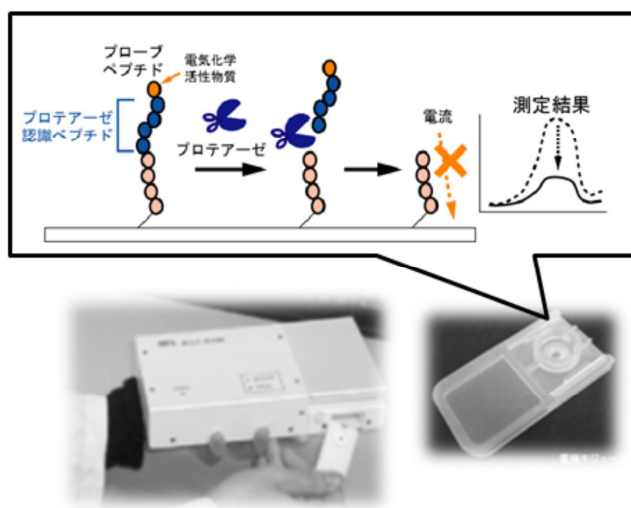


図 1. プロテアーゼの電気化学的検出の概念と電気化学バイオチップ専用読み取りデバイス予想図

(2) 歯周病原因菌叢検出

前述したプロテアーゼを分泌する菌は *P. gingivalis* だけではなく、歯周病に関連する菌は複数あるため、菌そのものを検出しなければならない。そこで、図 2 に示す通り電気化学的に菌由来のリボソーム RNA(rRNA)を検出した電気化学的 TRC 法の特許申請中

である。TRC 法は、検体の RNA から酵素的に cDNA を調整し、これを更に酵素的に cRNA として増幅し、DNA チップ上でのハイブリダイゼーション後、電気化学的に検出するものである。電気化学的検出のためには竹中研究室で開発された電気化学的 DNA リガンドであるフェロセン化ナフタレンジミド(FND)を用いる⁵⁾。これによって感度の向上と測定時間の短縮が実現できる。本技術では、数千コピーの mRNA の検出に成功している。

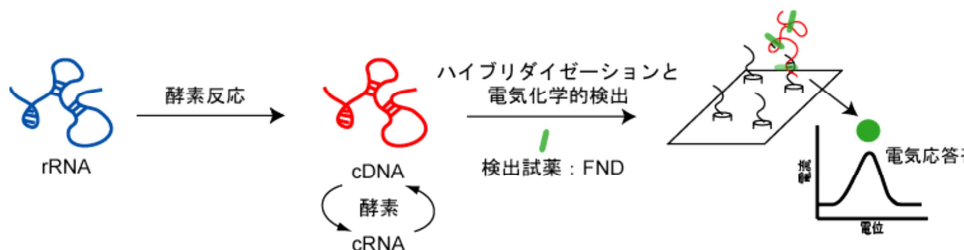


図 2. TRC 法による RNA の増幅と電気化学活性 DNA リガンド FND と DNA プローブ固定化マルチ電極を利用した検出原理

(3) 炎症性メディエータの検出

炎症性メディエータ検出には、これらの抗体をターゲットとして電気化学的エライザ検出システムを適用する。竹中研究室では、これまでにトリインフルエンザの検出のために簡易電気チップを利用した電気化学的エライザ法を考案している(図 3)⁶⁾。

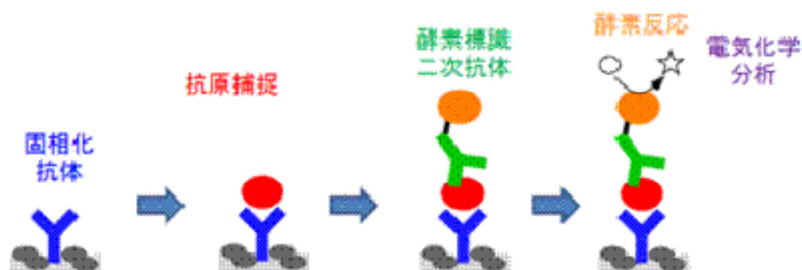


図 3. 電気化学的エライザ法による検出原理

本手法では、二次抗体に酵素を導入し、その酵素反応で産生した電気化学的活性物質 (p-aminophenol (pAP))を検出するものである。これを電気化学エライザ検出システムに展開することで、歯周病原菌叢の直接検査が可能になる。

従来歯周病診断は歯科医師の手技による主観的判断に頼っていたが、歯周組織破壊酵素検出、歯周病原菌叢検出、炎症性メディエータ検出が可能なる 3 種類の電気化学的バイオチップと、これら 3 種の検査全てに対応可能な読み取り装置からなる「歯周病総合診断用装置」を開発することで、従来不可能であった定量的歯周病総合診断の実現が期待できる。

参考文献

- 1) 佐藤しのぶ, 森久美子, 遠藤浩, 児玉正明, 土生学, 西原達次, 富永和宏, 竹中繁織, 分析化学, 印刷中.
- 2) 野口和行, 石川烈, 歯周病の発病と生体防御はどのようにかわるか, 新しい健康科学への架け橋, 歯周病と全身の健康を考える, ライオン歯科衛生研究所 編, pp. 55-61, 医歯薬出版 (2004).
- 3) Keiichi Ohtsuka, Iwao Maekawa, Michinori Waki, Shigeori Takenaka, *Analytical Biochemistry*, **385**,293(2009).
- 4) S.Takenaka et al., unpublished date.
- 5) S. Sato, S. Takenaka, Electrochemical approaches to the study of DNA-drug interactions, *Methods for Studying Nucleic Acid Drug Interactions*, M. Wanunu, Y. Tor Eds., CRC Press(2001).
- 6) K. Ohtsuka, H. Endo, K. Morimoto, B. N. Vuong, H. Ogawa, K. Imai, S. Takenaka, *Analytical Sciences*, 24,1619(2008).

謝辞

本研究の実施の機会を与えて戴き、またその遂行にあたり終始ご指導を賜りました九州工業大学大学院 工学研究院 教授 竹中繁織先生に心より感謝申し上げます。

本論文の作成において、数多くのご助言と激励を賜りました九州工業大学大学院 工学研究院 教授 柘植顕彦先生、九州工業大学大学院 工学研究院 教授 横野照尚先生、九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授 尾川博昭先生に心より感謝申し上げます。

本研究で開発したチップ及び装置を使用して実際に貴重な実験データを測定して戴き、適切にご指導を賜りました九州工業大学大学院工学研究院 助教 佐藤しのぶ先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に必要な臨床サンプルを提供して戴きました九州歯科大学 教授 冨永和弘先生、博士課程 森 久美子先生に心より感謝申し上げます。

歯科治療の現状に関する資料を提供して戴きました日野歯科医院（福山市）院長 日野泰志先生に心より感謝申し上げます。

実験データの測定及び機器の使用においてご協力を戴きました竹中研究室の皆様、心より感謝申し上げます。

以上、お世話になりました方々に深く感謝と御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。

最後に亡き義父 松本好生、3年間励まし続けてくれた義母 松本喜美子、父 遠藤健治、母 千恵子、妹 洋子、快く博士課程への挑戦を承諾し、家庭を支えてくれた妻 ようこ、娘 千紘に感謝します。ありがとうございました。