

新規原理、チップ基板、検出デバイスによる、マーカー物質に依存しないマイクロレイシステムを用いた新規バイオ検出技術の開発

(ハイペップ研究所¹、日本軽金属グループ技術センター²)

(1) 過去20年のバイオチップ開発の背景

検査診断では疾患特異的マーカー分子を標的とし、1 : 1の対応である抗原-抗体反応や酵素反応を用いるアッセイが主流である。既知の標的だけでは検査診断ができない例が多く存在する。プロテインチップはほとんど実用化されていない。演者らは、国のミレニアムプロジェクト(2000-2002)を契機に独自の発案を基にペプチドマイクロレイの研究開発を開始、ハイペップ研究所を設立し実用化への道を拓いた。実際に多くのプロテインチップ開発は、**固定化捕捉分子による検出感度・再現性・安定性の問題から、1:1検出の溶液アッセイが主流となり、固定化は殆どのグループが撤退した。**バイオサンプルには多くの物質が含まれるが、統計学的手法をデータ解析に駆使し、多変量解析を行う事で、特定の疾患原因物質が解明されていない病気の診断でも応用が可能であることが示された。

(2) 新規な生体計測法の基本原理

捕捉分子【構造を有する蛍光標識ペプチド】と検体中の非認識物質との相互作用で、認識前後で蛍光強度が異なる。**この蛍光強度変化は用量依存で**カラーバーコード様の表記が可能：“Protein Fingerprint”と命名【日米欧特許】捕捉ペプチドが検体により、蛍光強度変化し特徴的なパターンを与え同定が行える。確立された診断法が無い場合でも客観的な指標を与える。データ解析では、統計学的手法を駆使し、主成分解析など、多変量解析を行う事で、特定の疾患原因物質、疾患陽性マーカーが解明されていない病気の診断への応用も可能とした。本手法では、大型・高額な装置、あるいは習熟、専門的技術は不要である。PepTenChip®は患関連物質や、いわゆるサロゲートマーカーなどの探索も可能である。

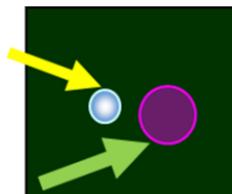
診断への応用例の一つ、胃がんに関する未病判定に関してを口頭講演する。

(3) 新原理 次世代診断PepTenChip® の4要素技術が完成

- 1. 捕捉分子：**多種の構造標識ペプチド群数千種=保存輸送に有利、捕捉分子を標識=検体標識不要、検体添加後の洗浄不要
- 2. 新規基板素材と表面化学：**捕捉分子搭載のための**素材アモルファスカーボン**、と固定化の表面化学、研磨 & 表面誘導体化に成功 アミド結合は安定
- 3. アレイ化技術 (クリーンルーム)：**基板の上に極微量ペプチド群 (数百pico L/spot) を定量的にアレイヤーで添加 (Spot直径: 100~ 200 μm; Delivery volume: ca. 500 pico L; Density: 1,254 spots/cm²) ; 手動アレイ化法も確立
- 4. 蛍光検出器・解析ソフトウェア・データベース** (オンサイトで仕様の検出器の設計・製作) 小型、簡便操作、メンテナンスフリー、バイオセーフティレベルの室内での使用やフィールド使用(機内持込) が可能な**PepTenCam**、**多変量解析**

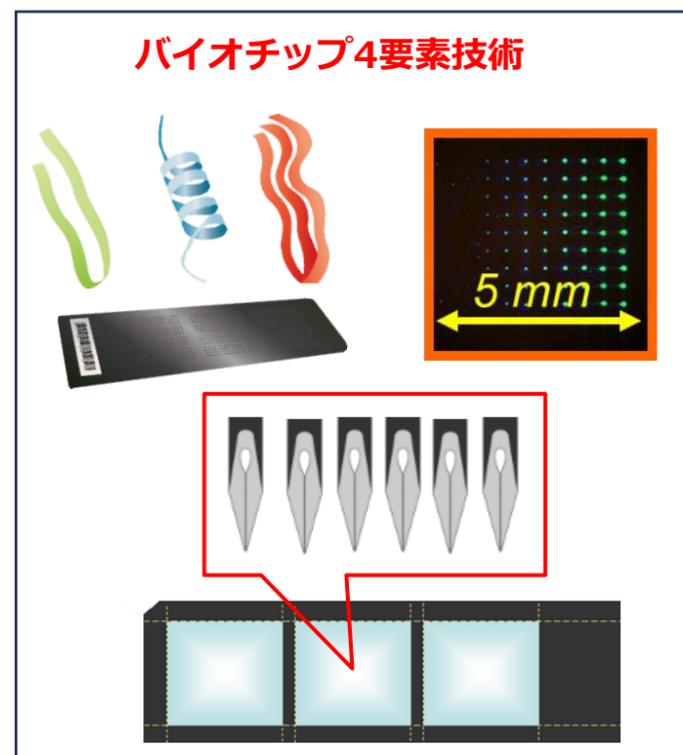
(4) 基板素材：Amorphous Carbonの特長・利点

1. 低自家蛍光・低非特異吸着
2. 均一な表面官能基
3. 多様な表面誘導体化：アミノ基、カルボキシル基が基本
4. 高平滑<1 nm; 高平坦度<10μm
5. 導電性：MALDI-TOF-MSのターゲットとして使用可能
6. 再生・再利用可能



捕捉分子溶液添加
固定化領域が限定
@ 1 mm id.

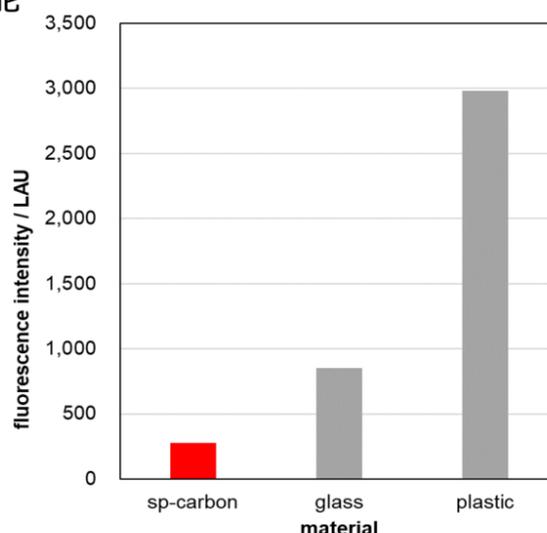
捕捉ペプチドは修飾部分だけに固定化され、それ以外は反応しない



基板のDimension: 25.0 x 75.0 x T: 1.00 mm

表面のアミノ基量：

PepTenChip® : ca 4-5 nmol/cm²
市販のガラススライド: ca 0.26 nmol/cm²
表面官能基の定量法 (特許)



プロテオーム研究 Chip&MS
Dual detection
基板をMALDI-TOF-MSのサンプル・ターゲットとして使用 = 捕捉された物質の同定
→ データベース検索

基板の応用 ★ラボオンチップ★マイクロ流路
★細胞チップ (nano well) ★ Chip & MS

関連動画と
製品案内

バイオチップ
全動画



新規原理
に基づくバ
イオ検出



新規
カーボン
基板



手動アレイ化法、
再生・再使用の
ためのプロトコル



(5) 誘導体化パターン

全面誘導体化

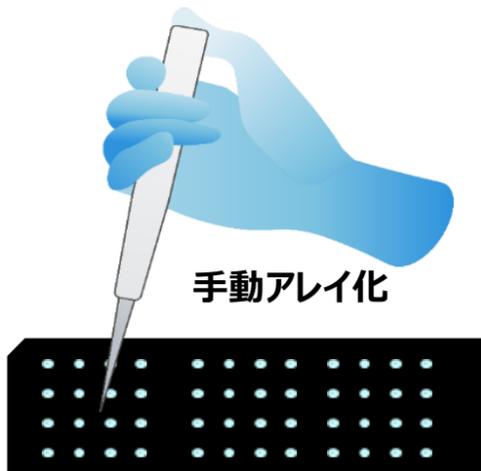
検体1滴を
カバーグラ
スで全面に

3ブロック誘導体化

16X3 = 48 spots

(6) アレイ化技術: アレイヤー vs. 手動

過去に注目された微量精密吐出/分注法は実サンプルでは、いずれも再現性、操作性に問題があり、実用性に劣った。我々は過去数年間にわたるアレイ化技術の検討で多くのノウハウを蓄積し、ステルスピンを用いるマイクロアレイ化法を確立した。



手動アレイ化



IC24-01

手動アレイ化用インキュベーションカセット、より微量の検体に対応



PepTenCam

(7) 自分の捕捉分子を搭載するテーラーメイドマイクロアレイの自作

3つの特長: ① 固定化量が従来のガラス基板と比べ格段に多い。したがって固定化し易く、高感度測定が可能で検体の量もより微量で済む。(特許取得済) ② 基板の電気伝導性が高いため。チップ基板をそのままMALDI-TOF-MSのサンプルターゲットとして使える。③ 共有結合による固定化は搭載されている捕捉分子が安定で基板は再使用できる。使い捨てではない: 動画プロトコル

新製品

研究者独自の捕捉分子の固定化が可能なマイクロアレイ作製用機材 (マニュアルスポット法)

- 基板P/N PTC-MAS48-3
- 蛍光検出器PTC-FD15
- インキュベーションカセット

アレイヤーを所有しない研究者も独自のアレイを自作

(8) 新開発検出器 PepTenCam PTC-FD15

簡便操作、メンテナンスフリー、据付調整不要、試薬不要 小型 6Kg・機内持込サイズ

1. 現場採材検体を直接オンサイト計測
2. 読取ソフトウェア付属
3. ラップトップPC接続
4. 遠隔地・フィールドでの使用、在宅医療にも有用
5. 感染危険の検体: BSL3, 4の空間でも有用

PepTenChip®は繰り返し使用できる

- ◆ 本システムは長波長側検出で蛍光色素の劣化が無い
- ◆ アミド結合で固定化されたペプチドは構造的に安定
- ◆ 検体搭載後洗浄を繰り返し拭き取っても脱離しない
- ◆ 当該チップは使い捨てではなく再使用が可能:



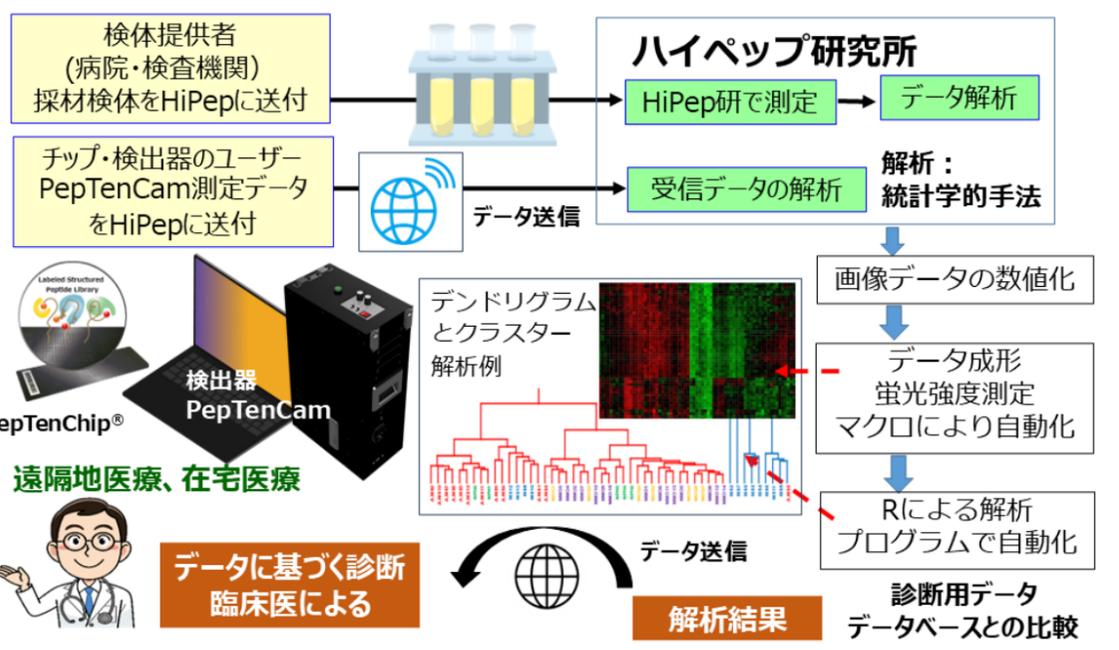
(9) 診断への応用 検体: 体液、組織ホモジネート 現在適当な診断法や客観的診断基準が無い疾患

★ 口腔衛生: 特定原因物質が未知の歯周病の早期発見 (Bioorg & Med. Chem, 26, 3210, 2018)

臨床応用例 → 口頭講演参照

- ★ 未病検査【胃がんの例】 がん化の早期発見
- ★ 原因不明で確定診断法の無い神経難病、多発性硬化症の判別: 【不適切な治療が患者のQOLを悪化】

(10) 運用 データのネットワーク化



(11) まとめ

1. 次世代検査診断、PepTenChip® Systemを開発
2. 従来多くは陽性疾患マーカーの計測であるが、マーカーに依存しない診断法を開発
3. 客観的指標の提供は、医師のスキルによる違いを解消 (遠隔地診断、在宅診断)
4. 有効な診断法が無い疾患に焦点をあて、新原理を確立
5. データ解析: 多変量解析 Protein Fingerprints法
6. リアルタイム・オンサイト → 遠隔地医療、在宅医療、高齢者医療、非侵襲

(12) 共同研究先=臨床検体

南京医科大・江蘇省第一人民医院 魏教授・武医師
関西医科大 近藤教授、藤井准教授
京都府立医大 芦田医師

(13) 最新の関連技術論文 ◆化学工学第88巻2号, 61-64, 2024.

◆Analytical Methods (Royal Society of Chemistry) 17, 4590-4598, 2025. DOI:10.1039/D5AY00426H