

厚生労働科学研究費補助金(長寿研究事業)

分担 研究報告書

LOH症候群における遺伝子多型とARTの治療感受性遺伝子同定に関する研究

分担研究者 小中弘之 金沢大学大学院医学系研究科集学的治療学 講師

【研究要旨】

近年の分子生物学ならびに遺伝子工学の劇的進歩と相俟って、ヒトゲノムの大まかなデザインが明らかになり、次はヒトの遺伝子の多型と疾病との関連性を明らかにすることが医学界の急務となっている。薬剤の効果や副作用が個々において異なる理由の1つとして遺伝子多型の存在が重視されるため、遺伝子多型(特に一塩基多型)を解析することは個別化医療の実現に寄与する可能性を大いに秘めている。そこで、今回我々は LOH 症候群の易罹患性遺伝子と ART の治療感受性遺伝子を選択し、その遺伝子の一塩基多型(SNP)を解析することによって、LOH 症候群の発症予想のみならず ART の効果や副作用の予測に応用可能か検討した。今年度は 3 年間の最終年度を迎え、集積されたゲノム DNA 数は既に 130 サンプルで、候補遺伝子の SNP を中心に順次解析を始めた。本研究によって LOH 症候群に対する ART における診断から治療までを包括したテーラーメイド医療の可能性を示唆するような成果が期待できると考えられた。

【研究目的】

平均寿命の延長に伴う急激な高齢化という社会的背景のもと、高齢者の健康増進や予防医学への積極的な取り組みが国策の一つとなり、健康寿命の延伸を目指した長寿科学研究が待望される時代となった。近年、アンチエイジング医学の登場とともに、その治療法として、サプリメント摂取、抗酸化療法、ホルモン補充療法の必要性が過度にクローズアップされている。特にホルモン補

充療法については、更年期女性に対してはエストロゲン補充療法が広く普及してきた一方で、中高年男性に対するそれは未だ発展途上にある。中高年男性のアンドロゲン低下は、本邦ではこれまでも“加齢に伴う一現象”とみなされる程度で、医療の対象として軽視されていた経緯があったが、アンドロゲンは男性における重要な生理的機能を有するため、その低下はED、認知症、筋力低下、骨粗鬆症、貧血、内臓脂肪増加(あるいはメタボリックシンドロームへの進展)等の各種合

併症を引き起こし、高齢男性のADL, QOLに多大な影響を及ぼす。そこで、LOH症候群に伴うこれらの症候の改善を目指した、アンドロゲンの補充による骨、筋肉、血管、脂質代謝等に対する臨床効果に関する強力なエビデンスを創出する必要がある。その際、あらかじめLOH症候群に対するARTの有用性を予測・予見できれば、テーラーメイド医療の実現が可能となり、医療費削減につながることを期待される。そこで、ARTの有効性に関わる遺伝的背景の存在を大前提とし、治療の感受性と副作用を規定しうる遺伝子を選別した。次にその遺伝子多型のなかでも、特に一塩基多型(SNP)を中心に解析を加え、個人化治療への応用を検討した。

#### 【研究方法】

LOH症候群と診断されARTが施行された対象症例より、血液7 ml 採取し、血清を使用してDNA を抽出する。ゲノムDNA増幅キットを用いて抽出したDNAを増幅し、後々の追加解析のためにストックサンプルを作成しておく。ARTにおける治療感受性遺伝子に照準を絞って、主としてSNPを検索し、ART有効群を予測する。ターゲット遺伝子の同定に際し、以下の2つのアプローチを用いた。

1) 候補遺伝子アプローチ:先駆的な知識をベースに遺伝子を狙い打ちする方法で、遺伝子の選択方法は多種多様にわたる。今回我々はARTの有効例に絞って遺伝子多型を検索するため、テストステロン代謝に関わ

ることが予想される以下の遺伝子を解析した。すなわち、チトクローム p450 酵素系である CYP17 や CYP3A4, 細胞増殖因子とその受容体である insulin-like growth factor-1 (IGF-1) と IGF binding protein-3 (IGFBP-3), 前立腺組織内でテストステロンを dihydrotestosterone (DHT)に変換する酵素である steroid 5 $\alpha$ -reductase type II enzyme (SRD5A2), における遺伝子多型を候補とした。(図1) さらに、アンドロゲン受容体(AR)におけるCAG repeat 数が前立腺癌の発ガンリスクや予後因子に相関すると報告されているため、SNPsのみならず同反復多型も解析対象とした。今年度はさらに、サイトカイン関連遺伝子のカテゴリーよりIL-6とTNF $\alpha$ を選択し、それぞれに対するSNP解析も追加した。

2) ゲノムワイドアプローチ:SNP をゲノム全域に渡って絨毯爆撃的に解析する方法で、症例対照群においてゲノム上のSNPをマーカーと考えて網羅的に調べていき、その近傍にあるSNPがマーカーとして検出されることによって疾患との関連性を見出す。さらに、DNAチップなどの遺伝子研究の革新的技術とコンピューターの情報処理能を駆使して、網羅的なSNPの解析を展開する予定である。なお、標的遺伝子の既知SNPの検出には、目的遺伝子をPCR法により増幅し、PCR増幅産物から直接サイクルシーケンスにて塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法、PCR後、制限酵素による切断の有無を電気泳動で解析することにより制限酵素断

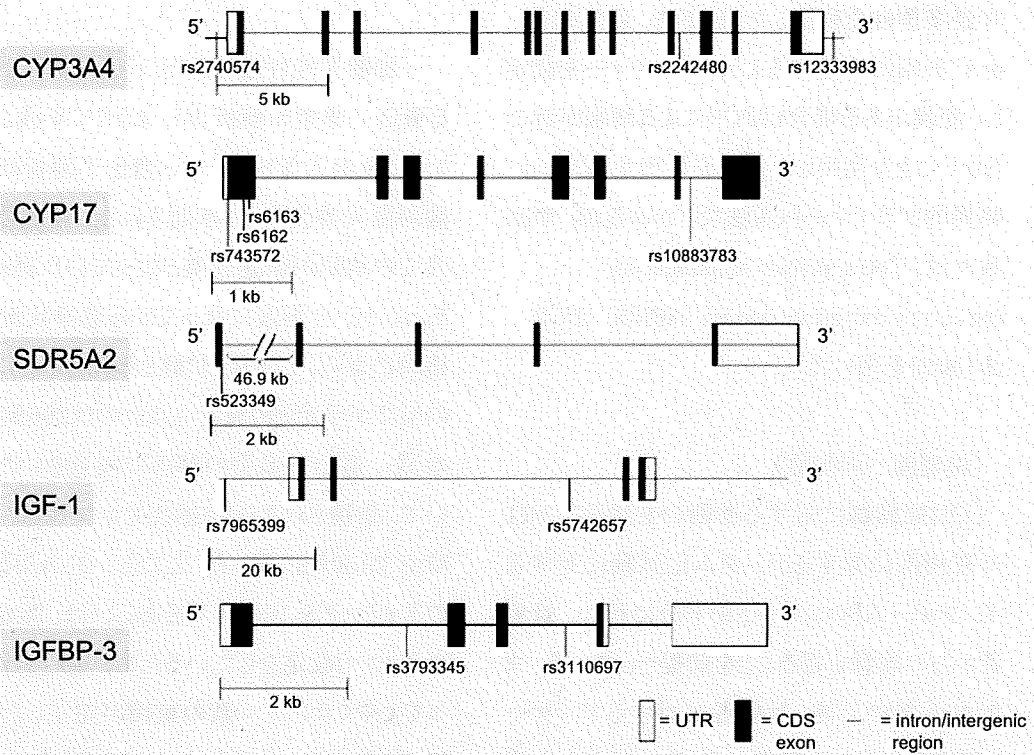
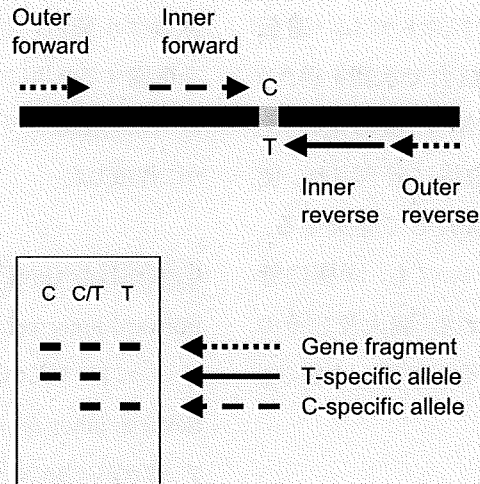


図1 候補遺伝子



Four primers are used: the two outer primers amplify a fragment of the gene that contains an SNP (white box). The inner primers are designed to amplify the two allelic states (e.g., in a C→T transition, one primer will amplify the C allele and the other the T allele).

図2 Tetra-primer amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR

片長多型性を利用したRELF法、変異部位を3'末端に位置するようにプライマーを設定し、変異がある場合はPCRによる増幅が起こらないことを利用した変異を検出するアレルト異的プライマーPCR法などがあるが、今回我々は、Tetra-primer amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR法(図2)を用いた。

#### (倫理面への配慮)

LOH症候群に対する診断の必要性和ARTの有用性に対するランダム化試験に対するインフォームドコンセントを十分に行い、対象者からの同意を得ることを前提としている。また本研究終了後、対象者に対するアンケート調査を施行し、研究対象者の視点から倫理的の問題の有無についても吟味し、今後の臨床研究にフィードバックさせていく予定である。さらに、患者及び健常人から提供された検体を用いたバイオ診断チップの開発および遺伝子多型の解析に関する研究においては、各施設におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認を得たうえで、研究に使用する検体は、匿名化のうえ個人情報管理者により厳格に管理され、使用済み試料は産業廃棄物として廃棄する。得られた結果データについても、同様に管理され、倫理的に懸念される「個人及びその家族等の関係者に対する不利益」は全く生じないように配慮される。

#### 【研究結果】

「加齢男性性腺機能低下症候群における遺伝子多型の解析」が、ようやく平成20年6月に金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認された。倫理委員会での承認が律速段階となっていた経緯があったが、今年度になってから進捗状況は格段に進み、LOH症候群と診断され、12回のARTが予定通り施行されたのは266例。そのうち、遺伝子多型の解析に同意をいただいで、集積されたDNA抽出サンプルは、現時点で130例に達した。ただし、DNA用採血のタイミングをART終了後あるいは、開始後半年という設定をしているため、現時点になってようやくサンプル数の集積が完了した状況である。従って現在SNPの解析を始めたばかりのため、今回の報告では残念ながら、ART奏功群と非奏功群間におけるSNPの詳細な解析結果について言及することはできない。しかしながら、SNP解析のために、各種試薬、各種キットは既に購入済で、電気泳動ゲル装置、全自動核酸抽出・精製装置を準備すると共に、Tetra-primer ARMS-PCRに必要なプライマーの一部は以下のよう

#### IL-6 (-174 G→C)

Forward inner primer (G allele):

5'-GCACTTTTCCCCTAGTTGTGTCTTCCG-3'

Reverse inner primer (C allele):

5'-ATTGTGCAATGTGACGTCCTTTAGCTTG-3'

Forward outer primer:

5'-GACTTCAGCTTTACTCTTTGTCAAGACA-3'

Reverse outer primer:

5'-GAATGAGCCTCAGACATCTCCAGTCCTA-3'

TNF $\alpha$  (-308 G→A)

Forward inner primer (A allele):

5'-TGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCAGGA-3'

Reverse inner primer (G allele):

5'-TAGGACCCTGGAGGCTGAACCCCGTACC-3'

Forward outer primer:

5'-ACCCAAACACAGGCCTCAGGACTCAACA-3'

Reverse outer primer:

5'-AGTTGGGGACACGCAAGCATGAAGGATA-3'

### 【考察】

各個人間におけるゲノムの塩基配列の差異は遺伝子多型と呼ばれ、各個人に生来備わっている個性の多くは、この遺伝子多型によって説明されると考えられている。遺伝子多型は、1) 一塩基多型 (SNP)、2) 挿入・欠失多型 (insertion/deletion polymorphism)、3) 反復多型 (repeat polymorphism) の3種類に大別される。

なかでも、SNPはある集団内で1%以上の頻度で認められるゲノム上の一塩基多型と定義され、その大多数が2種類の対立遺伝子 (アレル) からなり、ゲノム上に平均100～1,000塩基につき1個の割合で均等に存在するため、薬物応答性の個人差を規定する因子として今後の新薬開発に大きな影響を与えるとされ、医療ビジネスの分野においても非常に高い注目を受け、急速に解析が進んでいる。

SNPの生物学的な意義は、ゲノム上における存在部位によって異なり、大まかに4種類に分類される。すなわち、1) プロモーターなどの調節領域にあるもの (regulatory SNP: rSNP)、2) エクソン内の翻訳領域にあるもの (coding SNP: cSNP)、3) イントロンに存在するもの (intronic SNP: iSNP)、4) その他の領域にあるもの (genomic SNP: gSNP) である。さらに、cSNPはアミノ酸置換を引き起こすもの (non-synonymous cSNP) とそれを伴わないもの (synonymous cSNP) に分類される。そのほかにも、イントロン内に存在しスプライシングに関与する多型や変異によって本来と異なる部位に終止コドンが形成される多型 (missense SNP) などが知られている。また、このような1～数十塩基の多型以外にも、数千～数万塩基以上の大きな欠失や挿入、さらには遺伝子単位での重複 (遺伝子のコピーの数的差異) が健常人においても認められることが明らかにされている。

さて、遺伝的な観点からみると、ヒト疾患は、単一遺伝子疾患、多因子疾患、および遺伝子が全く関与しない疾患に大別できる。現在の疾患ゲノム研究における最大のテーマは、多因子疾患であるcommon disease に関連する遺伝子を同定し、その機能を探ることにある。多因子疾患の発症には、遺伝要因、環境要因、そしてそれらの相互作用が関与しているが、疾患遺伝子の同定が成因解明に直結し、さらにはテーラーメイド医療とよばれる個人差に応じた医療の実現に向けた基盤となりうることが期待されている。疾患関連SNPの同定研究における初期目標は、強

い有意差で関連し、かつ高いオッズ比を有するSNPを見つけ出すことにある。SNPが与える影響は、既述したように遺伝子発現量の変化、スプライシングの違い等が考えられ、実際にイントロンや翻訳領域にある synonymous SNPで遺伝子発現変化を伴うものの報告が散見される。

今回我々は、ステロイド合成・代謝に関わるCYP17, CYP3A4, SRD5A2を候補遺伝子とするとともに、細胞増殖因子ならびに受容体の遺伝子多型であるIGF-1とIGFBP-3も標的とした。特にCYP17はアンドロゲン合成に関わる酵素であるP450c17aをエンコードしている。転写開始部位から34bp上流にT/C多型が存在し、変異アレルであるA2は転写活性を亢進すると推測されている。

また、SRD5A2は前立腺組織内でテストステロンをdihydrotestosterone (DHT)に変換させ、アンドロゲン受容体との結合を可能ならしめる。SRD5A2の3'-UTRにはTA反復多型が、そしてcodon 49と89にはSNP(A49TとV89L)が存在し、いずれもSRD5A2の酵素活性に影響を及ぼすことが推測されている。

IGF-1は細胞の増殖や分化そしてアポトーシスに関与している増殖因子の一つであり、前立腺ガンではアンドロゲン非存在下での癌細胞の増殖を促す。プロモーター領域にはCA反復多型が存在し IGF-1の発現を調節していることが示唆されている。一方IGFBP-3はIGF-1と結合することによりIGF-1受容体への結合を阻害することから、IGF-1に対して抑制的に作用していると考えられる。セリンプロテアーゼであるPSAはIGFBP-3を

消化するため、PSAレベルが高い環境下ではIGFBP-3濃度は減少し、相対的にIGF-1濃度が増加することが予想される。

ARに関しては、ARのエクソン1に存在するCAGとGGNの反復多型において、長い反復数を持つARはトランス活性能とアンドロゲン結合性が弱いため、前立腺ガンの発祥に対して抑制効果をもつものと推測されている。しかし、メタアナリシスではいずれの多型においても反復回数の少ないアレルは前立腺ガン発症のリスクを高める傾向が認められるものの、正常コントロールとの差は極めて小さいと報告されている。

従って、LOH症候群におけるSNPを遺伝マーカーとした患者・対照関連解析(アソシエーション・スタディ)は、遺伝要因に対するアプローチ法の1つとなりうると考えられた。また、ARTの治療感受性遺伝子に照準を絞ったSNP検索することによって、ART有効群の予測が可能となることが示唆された。

## 【結論】

本研究は、SNP解析を中心としたLOH 症候群における疾患関連遺伝子の同定とARTに対する治療感受性遺伝子の同定によって、個人の発病リスクや予後推察、ART の治療効果や副作用予測、新しい診断法、治療法や予防法の開発を目指したものである。したがって本研究より得られる成果は大変意義深く、テーラーメイド医療の確立に大いに寄与する可能性が示唆された。今後、さらなる

症例の蓄積によって、LOH症候群とARTに関するSNPのさらなる知見を集積していく必要があると考えられた。

**【健康危険情報】**

該当なし

**【研究発表】**

1. 論文発表  
    該当なし
2. 学会発表  
    該当なし

**【知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)】**

1. 特許取得  
    該当なし
2. 実用新案登録  
    該当なし
3. その他  
    該当なし

ナノテクノロジーを利用した、LOH 症候群の早期発見、早期治療を目指した唾液でわかるバイオ診断チップの開発に関する研究

分担研究者 民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学 教授

**研究要旨** 本分担研究は、LOH 症候群の早期発見を目指して、LOH 症候群のマーカーと考えられる遊離型テストステロン濃度及び心身ストレスと関連しているとされるコルチゾール及び老化度との関連が指摘されているデヒドロエピアンドロステロンサルフェートについて、簡便に測定できるバイオ診断チップの開発を目的に実施した。本年度はコルチゾール及びテストステロンについて非侵襲的に測定するため唾液を対象としたイムノクロマト法による検出について検討した。いずれもステロイドホルモンであるため、競合法によるイムノクロマトストリップを構築した。その結果、モデル系で数 ng/mL～数十 ng/mL の感度での検出は可能であったが、唾液中の各ホルモンの濃度はコルチゾールが数 ng/mL、遊離テストステロンが数十 pg/mL～数百 pg/mL であると報告されているため、実サンプルでは更に検討する必要の有ることが示された。今後高感度化を検討すると共に、唾液の前処理による濃縮についても検討する予定である。

#### A. 研究目的

高齢男性の性ホルモン低下に起因する LOH 症候群の治療は高齢男性の QOL 改善や ADL の高い維持可能に繋がり、男性の健康寿命延伸及び長寿社会の医療費削減に有効であると考えられる。そのためには、LOH 症候群の早期発見、早期治療が重要である。そこで、“非侵襲、簡便、迅速、自宅でセルフチェックが可能”を指向したバイオ診断チップとして唾液中のコルチゾール、テストステロンなどのマーカーを検出するイムノクロマトストリップの開発を目的とした。

#### B. 研究方法

今回ターゲットとしたマーカーであるコルチゾールとテストステロンは、いずれも低分子のステロイドホルモンであるため、競合法を用いてイムノクロマトストリップを構築した（図 1 参照）。コルチゾール抗体又は抗原であるテストステロンをニトロセルロース膜のテストライン上に固定化し、適用する金コロイド標識抗原若しくは標識抗体濃度を最適化し、検出感度を検討した。また、流速の異なるニトロセルロース膜や、金コロイドのサイズについても検

討し、検出感度の向上を試みた。測定はハーフストリップで行った。

今回は、モデル系での検討を行ったため、ヒト実検体を用いることはなく、特に倫理面に関する配慮の必要は無かった。

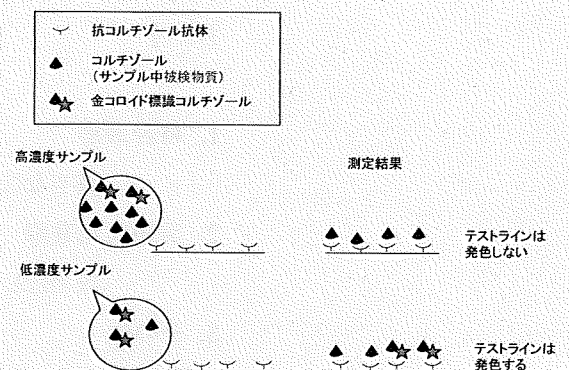


図 1 競合法の原理（例：コルチゾールを抗原とした場合）

#### C. 研究結果

##### 1) コルチゾールの検出について

図 1 に示したように、コルチゾール抗体をニトロセルロース膜上に固定化し、金コロイド標識したコルチゾールを一定量混合したサンプ



ルを適用し、発色強度を検討した。サンプル中に存在するコルチゾール濃度が高いとテストライン上に結合する標識コルチゾールの量が少なくなるため、テストラインの発色が弱くなる。競合法では測定に使用する金コロイドの量を厳密に一定にする必要があるが、使用する金コロイド濃度が高すぎると、低濃度の物質を検出することが出来ない。そこで OD520 を 6 に調整した金コロイド標識コルチゾールを 10 倍、20 倍、50 倍に希釈して、コルチゾール濃度 0, 8, 40, 200 ng/mL のサンプル液に適用し、測定した結果を図 2 に示した。10 倍及び 20 倍希釈で 200 ng/mL 以上の濃度を目視で検出することが出来た。50 倍希釈の場合、発色強度が非常に弱いため、目視ではいずれのラインもほとんど発色が確認出来なかったが、イムノクロマトリーダーを使用することで 8 ng/mL の濃度を検出することは可能であった。

今後、高感度化を図るために、より親和性の高い抗体の探索や BAS 化抗原などを用いる方法、標識金コロイドのサイズなどについて検討する予定である。

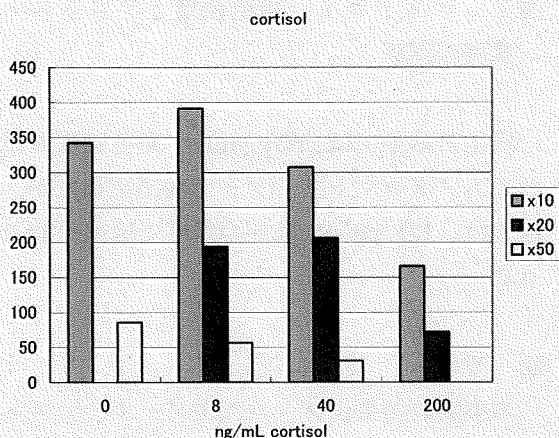


図 2 コルチゾールの競合法テストストリップによる検出（希釈度の異なる試料の発色度を測定）

## 2) テストステロンの検出について

当初、テストステロンをニトロセルロース膜上に固定化し、各種標識抗体による検出を試みたが、テストラインが全く発色しないことから、

テストステロンがニトロセルロース膜上に結合していないことが推測された。そこで、抗体を結合することも試みたが、テストステロンへの金コロイド標識も十分出来なかったためか、検出することが出来なかった。そこで、BAS 化したテストステロンを入手し、固定化したところ金コロイド標識した XM209 抗体で検出出来ることが予備的試験により示された。

そこで、1 分間に 90 mm および 135 mm の流速であるニトロセルロース膜 (HF90, HF135) それぞれに BAS 化テストステロンを固定化したテストストリップを作成し、40 nm の金コロイドで標識した抗体 1  $\mu$ L または 2  $\mu$ L を添加して測定した。テストラインとコントロールラインの発色強度をそれぞれイムノクロマトリーダーにより測定した。

図 3 にサンプル中のテストステロン濃度とテストライン発色強度の関係を、図 4 にテストライン強度とコントロールライン強度の合計に対するテストライン強度の割合を指標としてテストライン濃度との関係をグラフ化したものを示す。

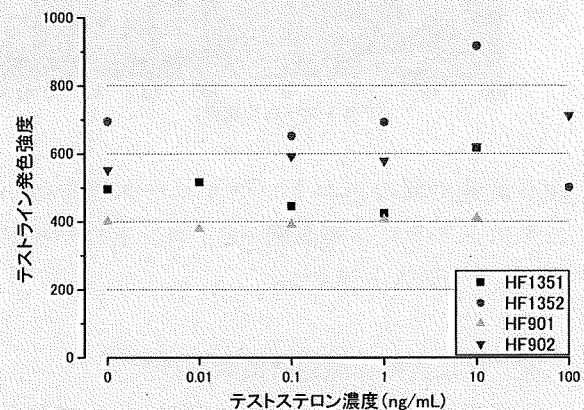


図 3 テストステロン濃度とテストラインの発色強度の関係

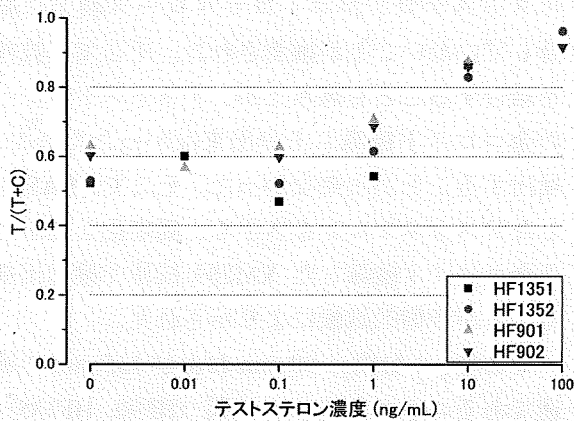


図4 規格化したテストライン強度とテストステロン濃度との関係 (T: テストライン発色強度、C: コントロールライン発色強度)

これらの結果から、HF135 ではいずれの適用量でも 0.1 ng/mL で、HF90 では 1  $\mu$ L 適用時に 0.01 ng/mL で発色強度の低下が認められた。

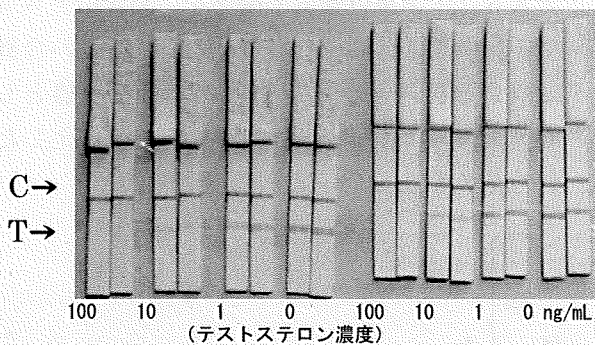


図5 流速の異なるニトロセルロース膜を用いたテストステロン実測例 (C: コントロールライン、T: テストライン)

図5には実際の測定結果例を示す。

目視では 0 ng/mL と比較して 1 ng/mL で若干発色の程度が薄くなっていることが認められたが、それ以下の濃度のテストステロンによる変化はクロマトリーダーによる数値化を行うことでのみ検出可能であった。1 ng/mL での発色強度低下は HF90 の方が大きい傾向が認められた。

ついで、金コロイド粒子のサイズを 60 nm に高め、HF90 のストリップを用いて検出感度に関して検討した。

図6に実際の測定結果例を、図7にイムノクロマトリーダーを用いて測定した発色強度とテストステロン濃度の関係を示す。

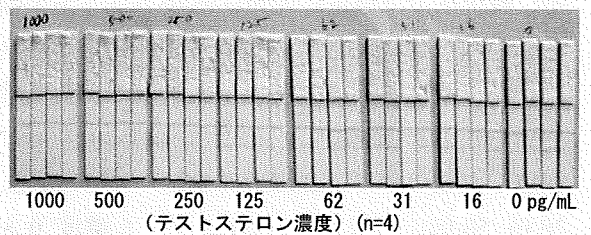


図6 HF90、60 nm 金コロイド標識抗体によるテストステロンの検出

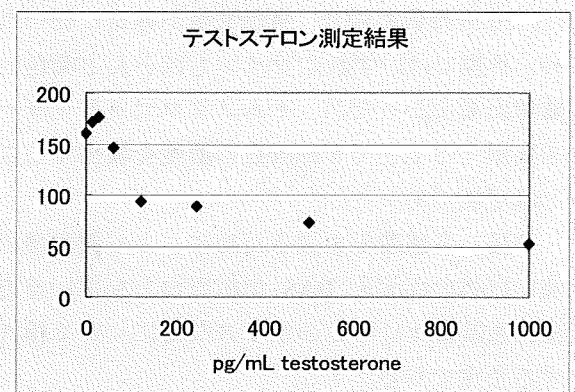


図7 テストライン発色強度とテストステロン濃度の関係

以上の結果では、62 pg/mL で発色強度の添加がイムノクロマトリーダーで検出出来たが、目視では、125 pg/mL 以上の濃度で検出可能であった。

#### D. 考察

本実験の結果より、コルチゾール、テストステロンとも、イムノクロマト法による検出が可能であることが示された。しかし、健常人で唾液中のコルチゾール濃度は数 ng/mL、遊離テストステロン濃度は数十から数百 pg/mL と報告されており、また、唾液実サンプル中には目的物質以外に様々な混在物が存在しているため今回のモデル系よりテストストリップの感度が低下することを考慮すると、今回作成されたテストストリップの感度はいずれの場合も十分

とは言えない。また、低濃度の目的物質を検出するには、発色強度のわずかな低下を検出する必要が有るため、イムノクロマトリーダーを用いる必要が有る。低コスト手軽な測定を目指すには、出来るだけ目視での判定が可能であることが望ましい。そのためにもさらなる高感度を図るために、金コロイドのサイズや濃度について検討すると共に、より親和性の高い検出用抗体の検索を行う。また、唾液実サンプルは粘性が高くそのままではイムノクロマトストリップを流れないため、前処理による粘性低下、濃縮などについて今後検討する予定である。

#### E. 結論

今回、イムノクロマト競合法により、コルチゾール及びテストステロン濃度を検出出来るテストストリップを構築できた。目視ではいずれの場合も数 ng/mL の感度であったが、イムノクロマトリーダーを用いることで定量的な測定が可能となり、感度はコルチゾールで 8 ng/mL, テストステロン 62 pg/mL であった。今後、唾液実サンプルに適用するためには、唾液の前処理及びさらなる高感度化について検討する必要が有る。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

ナノテクノロジーを利用した、LOH 症候群の早期発見、早期治療を目指した唾液でわかるバイオ診断チップの開発に関する研究

分担研究者 民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 教授

研究要旨 本分担研究は、LOH 症候群の早期発見を目指して、LOH 症候群のマーカーと考えられる遊離型テストステロン濃度及び心身ストレスと関連しているとされるコルチゾール及び老化度との関連が指摘されているデヒドロエピアンドロステロンサルフェートについて、簡便に測定できるバイオ診断チップの開発を目的に実施した。本年度はコルチゾールを測定対象に酵素や蛍光分子などを標識剤を用いずに簡便に行える方法について検討した。すなわち、金ナノ構造を用いた局在プラズモンチップにコルチゾールの抗体を固定化し、これに測定試料であるコルチゾールを用いて検出を検討した。

#### A. 研究目的

高齢男性の性ホルモン低下に起因する LOH 症候群の治療は高齢男性の QOL 改善や ADL の高い維持可能に繋がり、男性の健康寿命延伸及び長寿社会の医療費削減に有効であると考えられる。そのためには、LOH 症候群の早期発見、早期治療が重要である。そこで、簡便、迅速、自宅でセルフチェックが可能を指向したバイオ診断チップとしてコルチゾール、テストステロンなどのマーカーを検出するセンシングシステム開発を目的とした。

#### B. 研究方法

分子間相互作用の解析において表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いたバイオセンサがある。これは抗原抗体反応をラベルフリーで観測できるセンサとして有用である。しかし、SPR を発生させるためにはプリズム及びそれらの光学系を必要とするため、高価で大型なシステムにならざるを得ない。これらに対し、低価格で簡易的なセンサ、さらには多項目かつ高感度な測定ができるラベルフリーバイオセンシングである。今回、ポーラスアルミナに金 (Au) を蒸着させ、その干渉性と局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) の性質を有するナノ光学チップを作製し、その光学特性を調べた。さらに、このチップを用いてラベルフリーバイオセンシングへのコルチゾール測定への

応用を検討した。

まず、多数の微細孔構造を持つポーラスアルミナに Au を蒸着させることによってナノ光学チップを作製した。アルミニウム (Al) 基板を 2 段階陽極酸化処理して、これに Au を蒸着した。作製したチップの光学特性を評価するために、ポーラスアルミナの膜厚を変化させ、吸収スペクトルを測定した。またラベルフリーバイオセンシングへの応用として、抗原抗体反応によって生じる吸収スペクトルの波長ピークシフトを評価した。抗原抗体反応では、作製したチップの Au 表面に 4, 4'-Dithiodibutyric acid (DDA) の自己組織化単分子膜 (SAM) を形成し、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) を介して抗体を固定化した。これに抗原を作用させて、スペクトル測定を行った。

#### C. 研究結果

得られた局在プラズモンチップの表面構造を SEM を用いて確認できた (図 1)。ポーラスアルミナの膜厚の増加に従い、可視領域から近赤外領域での吸収スペクトルの強度は高くなり、そのピーク数も増加することを確認した。また抗体及び抗原の固定化に伴い、ピーク波長シフトも確認した (図 2)。これらの結果から、ポーラスアルミナ及び金の膜厚を変化させ、最も感度の良いチップを選択することで、生

体分子相互作用による波長ピークシフトの高感度化が期待された。コルチゾール抗体を用いて測定した結果を図3に示す。

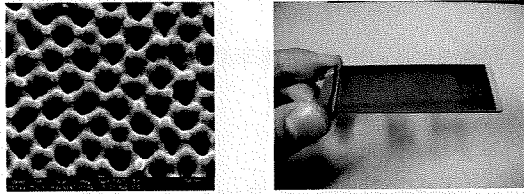


図1 LSPRチップの表面構造と全体写真

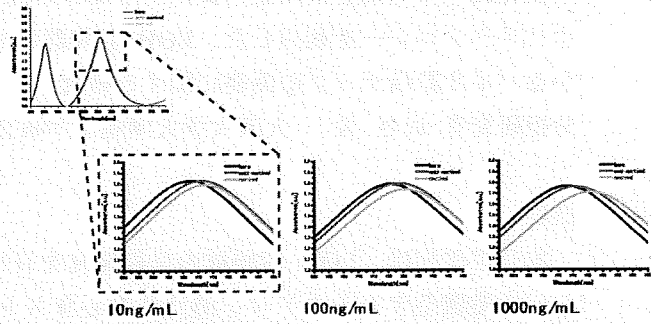


図2 LSPR吸収スペクトル変化とコルチゾール濃度との関係

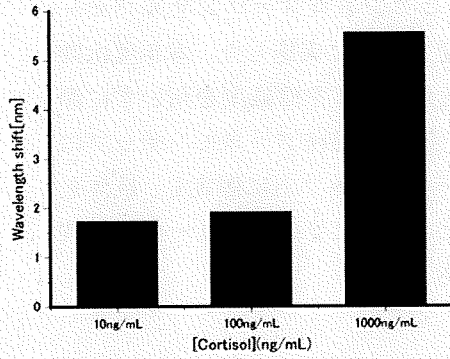


図3 波長シフトとのコルチゾール濃度との相関

研究発表：

応用物理学会年会(2009年3月30日)

特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）分担研究報告書

ナノテクノロジーを利用した、LOH 症候群の早期発見、早期治療を目指した唾液でわかるバイオ診断チップの開発に関する研究

分担研究者 民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 教授

## 概要

本分担研究は、LOH 症候群の早期発見を目指して、LOH 症候群のマーカーと考えられる遊離型テストステロン濃度及び心身ストレスと関連しているとされるコルチゾール及び老化度との関連が指摘されているデヒドロエピアンドロステロンサルフェートについて、簡便に測定できるバイオ診断チップの開発を目的に実施した。本年度は昨年度に引き続き、コルチゾールを測定対象に酵素や蛍光分子などを標識剤を用いずに簡便に行える方法について検討した。コルチゾールの分子量から局在プラズモンチップにコルチゾールの抗体を固定する方法よりも、コルチゾールをチップ上に固定し、抗体を添加する方法を採用したところ、感度上昇を確認できた。さらにラベルフリーの2次抗体を使った場合にも、同様に感度上昇の傾向を確認できた。

## A. 研究目的

加齢男性性腺機能低下症候群（LOH 症候群）と呼ばれる高齢男性の性ホルモン低下に起因するとされている症例に関して、男性における更年期障害の症例として注目を集めている。LOH症候群の治療は高齢男性の生活の質的向上改善（QOL 改善）や日常生活活動（ADL）の高レベルでの維持可能に繋がり、男性の健康寿命延伸はもちろんのこと、早晚迎えることになる長寿社会において、健康保険医療費の削減に効果的であると考えられる。LOH 症候群の早期発見、早期治療は症例に対する情報獲得、LOH 症候群の重篤化の軽減、治療期間の短縮化が見込まれ、非常に重要となっている。本研究分担ではLOH 症候群の検査の簡便・迅速化や自宅などでのセルフチェックを指向したバイオ診断チップとして診断マーカーであるコルチゾールを検出するセンシングシステム開発を目的とし、研究を行った。

## B. 研究方法

コルチゾールの検出に関しては、プラズモン効果を利用した分子間相互作用の解析を採用した。一般的なプラズモン効果を利用した検出方法としては、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いたバイオセンサが知られている。この測定方法の長所として抗原抗体反応を酵素・蛍光物質などの標識の必要のないラベルフリー計測が可能である。しかし、SPRを発生させるためにはプリズム及びそれらの光学系を必要とするため、高価で大型なシステムにならざるを得ない。これに対し局在表面プラズモン共鳴（LSPR）を用いた計測は、ファイバースコープと小型分光器などを用いた比較的低価格な光学系で構成が可

能である。そのため、セルフチェックや簡易的なバイオ診断チップを使ったシステム構築といった目標に対して、ナノバイオセンサチップと光学測定系とのシステム構築と多項目かつ高感度な測定ができるラベルフリーバイオセンシングシステムという目的により現実的なアプローチが可能な方法と考えている。

これまでにポーラスアルミナに金(Au)を蒸着させ、その干渉性と局在表面プラズモン共鳴(LSPR)の性質を有するナノ光学チップを作製し、その光学特性を調べた。さらに、このチップを用いてラベルフリーバイオセンシングへのコルチゾール測定への応用を検討した。この結果を踏まえ、これまでに使用したアルミナポーラスチップと検出方法の改良を行うことで、検出限界の向上を目的にして、引き続きコルチゾールの検出を試みた。

### C. 研究結果

ナノ光学チップの測定表面を均一化することで測定再現性の向上や抗体・抗原の固定量などの安定化を検討した。

アルミアポーラスの作製手順は、①アルミニウム基板の陽極酸化処理、②作製した酸化アルミナをエッチングによって一旦除去、③再度陽極酸化処理、の3段階で行った。これによりナノ微細孔構造を有するアルミナポーラス構造が形成される。このアルミナポーラス表面にAu薄層を堆積させ、ナノ光学チップとした。ここで、従来は熱抵抗型真空蒸着法を用いて金属を堆積させていたが、表面の平滑性向上が期待できるスパッタ法を新たに検討した。その結果、図1に示すように、蒸着法では粒子状の表面が観察されていたのに対し、スパッタ法により形成された基板表面において、より平滑な金表面を形成していることが観察された。

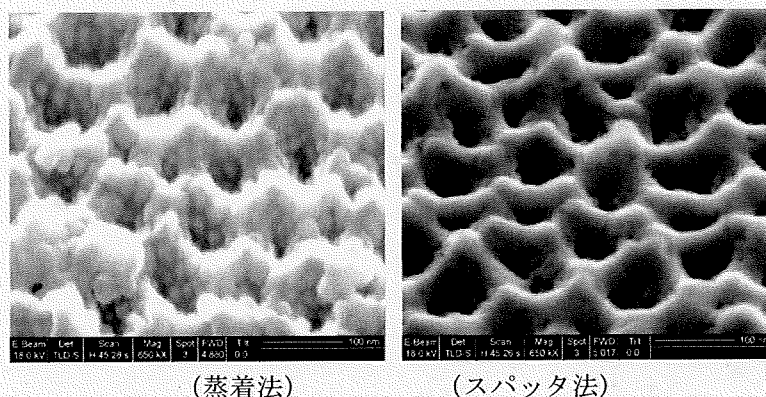


図1. 改良前後のナノ光学チップのSEM画像

作製したチップ上に抗体あるいは抗原を化学的に固定化させるにあたり、カルボキシル基などの官能基を有するチオール化合物を用いて自己組織化単分子膜(SAM膜)を形

成させる必要がある。従来は、4, 4'-Dithiodibutyric acid (DDA)を用いてSAM膜層を形成させてきた。しかし、DDAではナノ光学チップ上に固定される抗体量が十分でないと考えられたため、より高密度且つ安定なSAM膜形成のために試薬検討を行った。その結果、アルキル鎖の長い15-carboxy-1-pentadecanethiolを用いることで安定なSAM膜層を形成させることができた。

また、測定方法として、従来はナノ光学チップ上に抗体を固定し、さらに抗原を結合させ、その反応に伴う吸収波長変化を測定していた。しかしながら、コルチゾールは比較的 low molecular weight であることから、コルチゾールの捕捉に伴う吸収波長変化を安定的に計測することが容易でなかった。そこで、コルチゾールをナノ工学チップ上に固定し、これに抗コルチゾール抗体を反応させる方法での計測を検討した。

ナノ光学チップ表面にBSAコンジュゲートされたコルチゾールを固定化後、光学測定を行った。その結果、10 ng/mLのコルチゾールに対する吸収波長変化を検出することができ(図2)、従来の抗体固定されたナノ光学チップに抗原を添加する測定方法よりも良い結果が得られた。また、さらなる検出感度を上げるために、2次抗体を反応させたところ、図3に示すとおり、より大きな波長変化を計測することができた。加えて、2次抗体の反応時間も10分程度で十分であったため、2次抗体を用いた増感法も有用と考えられた。以上の結果により、今後は競合法やサンドイッチ法などへの応用展開も可能と考えられる。

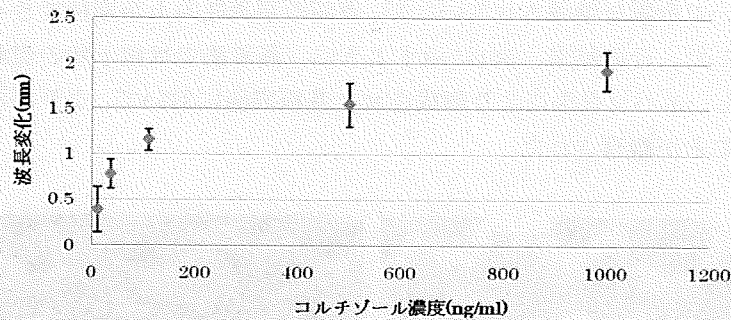


図2. コルチゾール測定

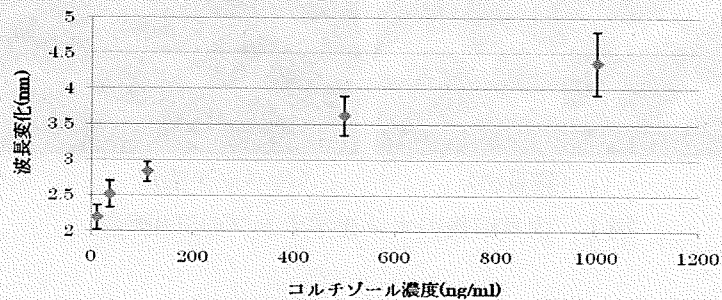


図3. ラベルフリーの2次抗体を使用したコルチゾール測定



研究業績：

著書

1. 局在表面プラズモンチップを用いたバイオセンサ、吉川裕之、斎藤真人、近藤兼司、民谷栄一、OPTRONICS, 341(5), 90-94, 2010

招待講演

(海外)

1. Eiichi Tamiya, "Localized Surface Plasmon Resonance-based Label-free High-throughput Biochip for Multiple Analysis of Biomolecular Interactions" PITTCON2010 (Orland, Florida, U.S.A) 2010/3/3-7
2. Eiichi Tamiya "Nanotechnology based biosensors and biochips" WACBE, World Congress on Bioengineering 2009, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2009/7/26-29
3. Eiichi Tamiya "Nanotechnology and Biosensor" KAIST Seminar, KAIST, Daejeon, Korea 2009/8/28

(国内)

1. 民谷、「ナノ構造制御デバイスとバイオセンサ」第75回化学センサ研究会、新コスモス電機(株)、大阪、2010/1/21
2. 民谷、「バイオセンサー開発の現状と展望」第4回産研テクノサロン「バイオセンシングの最前線」(大阪大学中之島センター) 2010/1/29
3. 民谷、「ナノバイオテクノロジーの応用展開」第45回化学工学コロキウム(岡山理科大学25号館、岡山市) 2009/12/10

国内学会

1. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、東京工業大学、2008年9月18日-20日
2. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第56回応用物理学関連連合後援会、筑波大学、2009年3月30日-4月2日
3. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第24回生体関連化学シンポジウム、九州大学、2009年9月13日-15日

特許

なし

臨床試験実施計画書

中高年男性における前立腺特異抗原(PSA)と  
遊離型テストステロン(Free-T)との相関および  
運動習慣の有無に関する臨床試験

実施に当たっては GCP, ヘルシンキ宣言,

臨床研究に関する倫理指針に準拠する

金沢大学附属病院泌尿器科 小中弘之  
作成年月日 2007年 8月14日 第1版

目次

1.背景及び試験実施の意義・必要性

2.試験の目的

3.試験の評価項目

- ◇ 3-1 主要評価項目(プライマリーエンドポイント)
- ◇ 3-2 副次的評価項目(セカンダリーエンドポイント)

4.試験計画・試験デザイン

- ◇ 4-1 対象患者(適格基準)
  - 4-1-1 選択基準
  - 4-1-2 除外基準
- ◇ 4-2 試験のアウトライン
- ◇ 4-3 試験薬の概要
- ◇ 4-4 試験方法

5.重篤な有害事象への対応

- ◇ 5-1 重篤な有害事象及び予測できない新たな事象が発現した場合
- ◇ 5-2 救済処置(必要に応じて規定する)

6.試験スケジュール(観察・検査・調査項目・実施期間)

7.インフォームド・コンセントの手順

8.試験の中止基準

9.被験者の登録方法・割付方法

10.試験実施期間

11.目標症例数

- 12.有効性及び安全性の評価方法
- 13.解析方法
- 14.審査委員会への報告義務
- 15.症例報告書(CRF)の取り扱い
- 16.記録の保存
- 17.健康被害に対する補償・賠償
- 18.予測される医療費(被験者の負担)
- 19.患者(被験者)に対する金銭の支払, 医療費の補助(ある場合)
- 20.研究資金
- 21.試験実施者及び連絡方法
- 22.参考資料, 文献リスト