

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「複合化樹脂薄膜多層成形技術を用いた迅速・高効率なバイオマーカー構造解析を実現する低ノイズ・高吸着性チップの開発」

研究開発成果等報告書

平成25年4月

委託者 近畿経済産業局

委託先 特定非営利活動法人 近畿バイオインダストリー  
振興会議

## 目次

第1章	研究開発の概要	2
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2	研究体制	7
1-3	成果概要	11
1-4	当該研究開発の連絡窓口	13
第2章	本論	
2-1	薄膜多層生計技術の最適化による新チップ試作と性能評価	14
2-2	成形樹脂膜厚の最適化検討	14
2-3	試験製造	15
2-4	規格・試験法の設定	15
2-5	保存安定性試験	16
2-6	新チップと製造法の総合評価	16
2-7	チップ物性評価	17
最終章	全体総括	18

## 第1章 研究開発の概要

アルミチップ基板に PVDF とエネルギー吸収剤 (EAM) を混合成形した Type1-1 (複合樹脂: PVDF+EAM) が、エネルギー吸収剤由来ノイズの低減化と質量分析による性能評価 (MS 測定および MS/MS 測定) において良好な成績を示したので、最終年度には本チップの製造法を決定し試験製造を行い、規格・試験法の設定および保存安定性試験を実施した。さらにアルミチップ基板に PVDF と4種類の樹脂 (cation, anion, chelate, mix bed) を混合成形した4タイプ (Type1-2~Type1-5) のチップを試作し質量分析による性能評価の結果、Type1-3 (複合樹脂: PVDF+X10) の酸性ペプチドに対する吸着量が増大したため、酸性ペプチドの構造解析に有用であると判断し、次世代新チップとして開発研究を実施した。これら5種類の新チップ候補の構造を図1に示した。

新チップ Type1-1 は、新チップ製造用に設計・製作した新製造機の適正化を図り、薄膜多層成形技術を完成させ最終製品の新チップ製造体制を確立した。1ロット200本、10ロットの試験製造を実施し、性状・性能評価に合格した全10ロットの実データを基準に新チップの試験法と規格値を設定した。

新チップによる構造解析の結果、現行チップでは血清検体から診断バイオマーカーを直接チップ上で構造解析することが出来なかったが、新チップでは妊娠高血圧症候群11種類の

うち4種類の構造解析が可能になり、加えてチップ上で3種類の精密質量測定に成功し、それらのペプチドが2価イオンからなることが判明した。このようにして、11種類の構造解析リストから、3種類が削除され、残る8種類の診断バイオマーカーの50%に当たる4種類の構造解析に成功し、数値目標の $\geq 50\%$ が達成できた。

さらにType1-3が酸性ペプチドの構造解析に威力を発揮することが示唆され、生理的に重要な糖鎖ペプチドやリン酸化ペプチドの特殊用途の次世代新チップとして、今後とも開発を継続する。

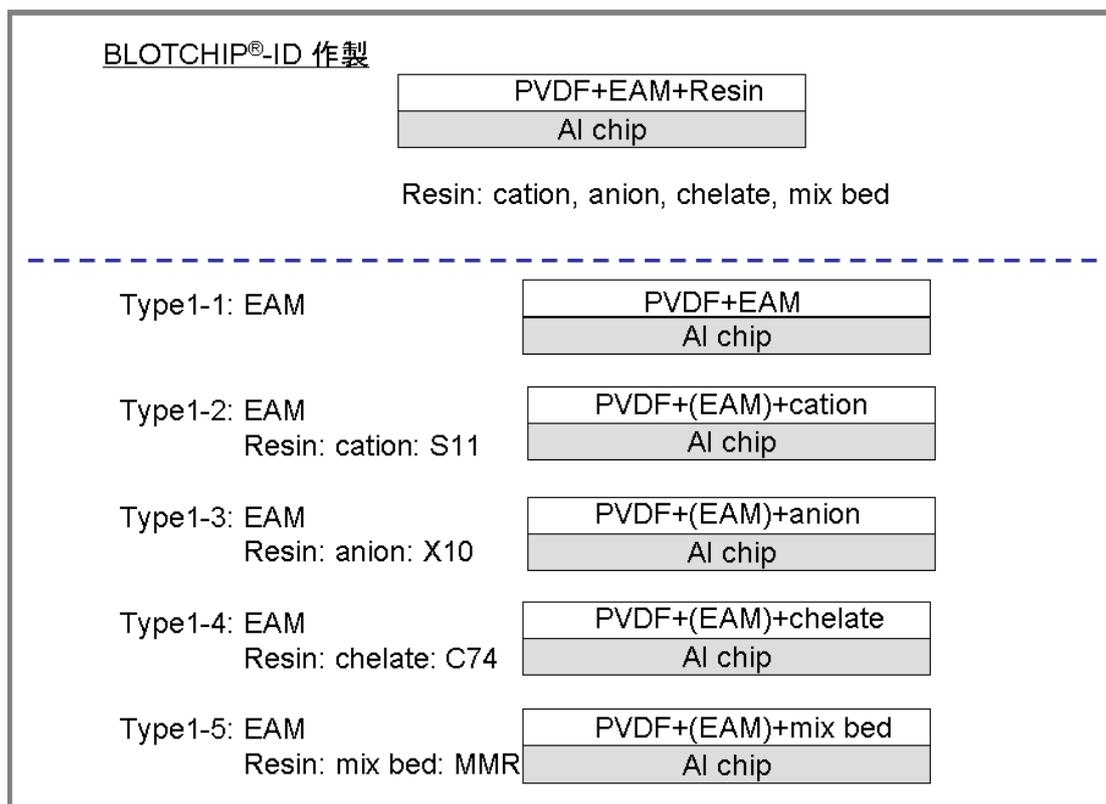


図1 試作した5種類の新チップ候補

### 1-1 研究開発の背景・研究目的および目標

#### 〔研究背景〕

患者の遺伝子やタンパク質などのバイオマーカーによって、薬がよく効き、副作用が出ない患者かどうか予め判定し、こうして選ばれた患者に医薬品を投与する個別化医療が世界的な潮流となった。加えて海外で開発された医薬品が、国内販売に切り替わった途端に重篤な副作用が出現するという昨今の事例は、あらためて薬の効く患者（レスポンドー；図2）あるいは、副作用が予測される患者を予知できる技術の登場が、患者、医師、医薬品業界、行政からの喫緊の課題であることを示した。しかしこの新戦略が成功を収めるには、病気ごとに異なるバイオマーカーをあらゆる病気で発見し、その分子の特徴と構造（正体）を突き止めなければならず、個別化医療への道は今まさに端緒に付いたばかりである。

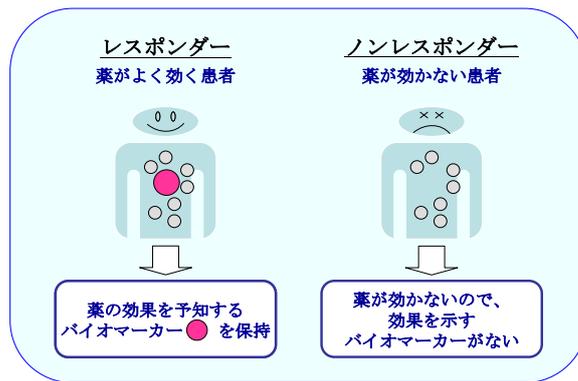


図2 バイオマーカーによるレスポnderとノンレスポnderの識別

株式会社プロトセラは、生体材料に親和性の高い Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 樹脂を金属板表面に薄膜多層成形加工したチップ (BLOTCHIP®) を開発し、このチップ表面にペプチドを保持して測定する新しい質量分析法を確立した。その結果、電気泳動から質量分析に至る煩雑な中間工程を省略でき、定量性とスピード向上の革新をもたらした。さらに図3に示すように、タンパク質に結合したバイオマーカーを界面活性剤(図中の SDS) で有効に分離した後に質量分析計で測定することで、既存のプロテオーム解析法が血液中の主だったタンパク質の除去を必須とし、そのためタンパク質に結合したバイオマーカーを検出できなかった問題が一挙に解決できた。こうして今後予想される個別化医療や早期診断等の広範囲なバイオマーカーの研究開発に、本技術が期待される(【論文】; Proteomics 11 (13), 2727-2737 (2011), BBRC, 379 (1), 110 - 114, 2009、他一報、【特許】; 日本第 4447458 号、欧州 4 カ国登録済、日本第 4166572 号、欧州 4 カ国登録済、その他審査中)

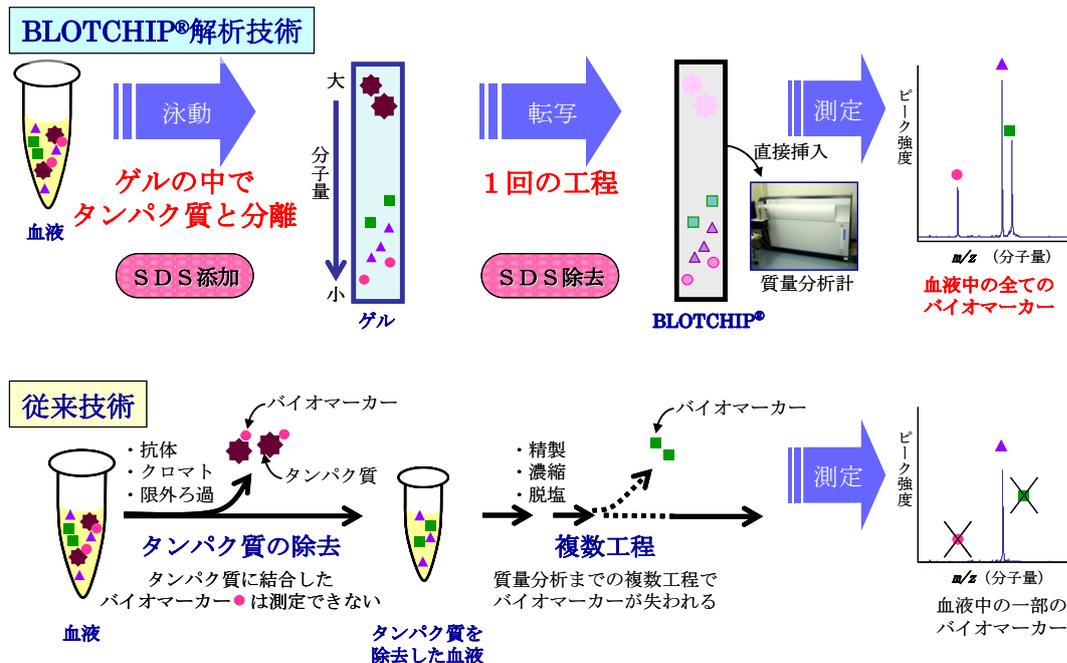


図3 タンパク質結合バイオマーカーの新解析技術 (BLOTCHIP®解析技術)

このように病気のバイオマーカーを発見する技術は確立された。しかし、この成果を個別化医療・診断につなぐためには、なおバイオマーカーの正体を突き止める構造解析の技術革新が必要となる。現在、バイオマーカーの構造解析が困難な理由は、第一に、バイオマーカーの精製に数ヶ月を要し、かつ解析に必要な十分量が得られない問題、第二に、MALDI-MS/MS 法による構造解析では、エネルギー吸収剤 (EAM; Energy - Absorbing Molecules) 由来のノイズがバイオマーカーの構造決定を妨害するという問題、最後に現行の疎水性の PVDF 単体からなる BLOTCHIP®では、酸性・塩基性バイオマーカーに対するチップ保持能が弱いという問題が想定され、これらの解決策が求められる。

### 〔研究目的及び目標〕

株式会社プロトセラでのこれまでの現行 BLOTCHIP® (疎水性の PVDF 単体が薄膜多層成形されたチップ) を使用したバイオマーカー構造解析の研究結果から、解決法は EAM 由来ノイズ・イオンの削減化 (問題点第二の解決策) と、酸性・塩基性バイオマーカー吸着量の増大 (問題点第三の解決策) にあると結論された。問題点の第一はプロトセラでは現行 BLOTCHIP®解析技術により既に解決済の課題であった (他の既存技術では今後とも未解決課題)。従って、EAM 由来ノイズ・イオンを削減する樹脂と極性バイオマーカーの吸着を増加する樹脂を金属表面に薄膜多層成形し、これら樹脂の特長を活かした複合化樹脂の薄膜多層成形された新チップを開発する。この複合化樹脂薄膜多層成形高度化技術により、構造解析用新チップを完成させ、全ての患者一人ひとりに最善の個別化医薬品の開発と、癌、脳卒中、心臓病等現代病の早期発見・早期治療に必要なバイオマーカーの迅速・高効率な構造解析を達成する革新技術の確立を目的とする (図4)。

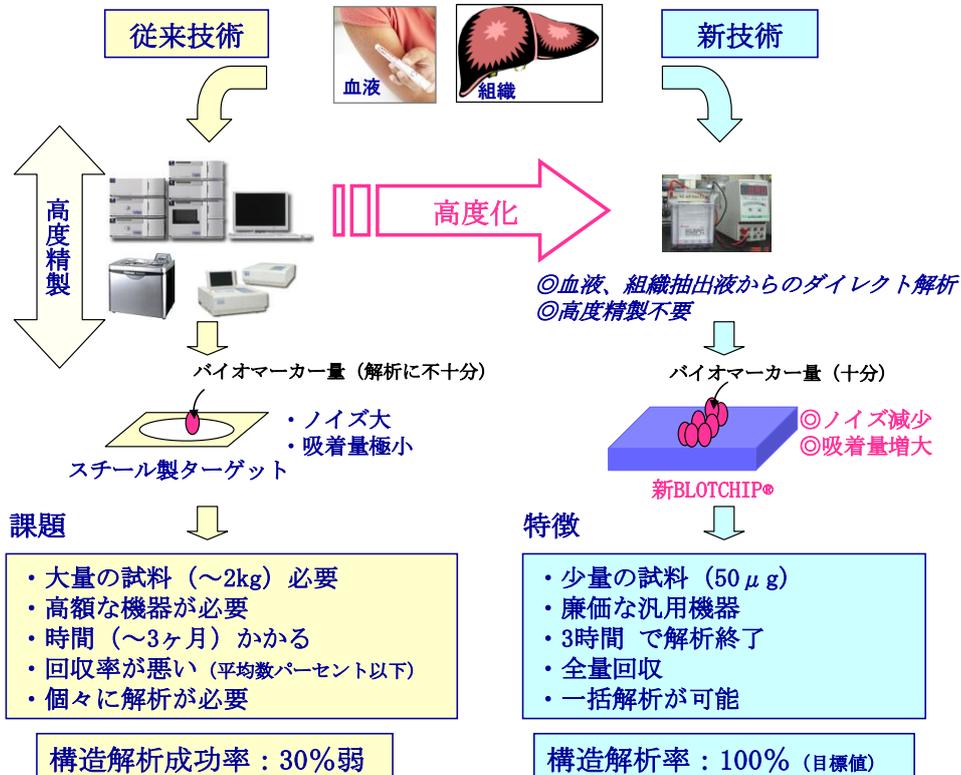


図4 従来技術と新技術によるバイオマーカー構造解析の比較

株式会社プロトセラは BLOTCHIP®解析技術を使って妊娠高血圧症候群の早期診断用バイオマーカー候補 11 個を発見し、従来の『高度精製+MALDI-MS/MS』法でそれらの構造解析を行った結果、11 個の中の 3 個のバイオマーカーのアミノ酸配列を解明した（特願 2009-230995）。このバイオマーカーを用いた診断結果から、妊娠高血圧症候群患者の診断精度（感度）は 100%と判定された。このように有用な早期診断用バイオマーカー候補 11 個を発見したが、従来の『高度精製+MALDI-MS/MS』法では、3 個の構造解析に成功したが、残る 8 個は数段階の精製工程で、総回収率が 1%以下に低下し、解析に必要な最小レベルの重量を確保できず、現状ではこれら候補の今後の構造解析には全く為す術（すべ）が無い。従って表 1 に示した、バイオマーカーの高度精製を必要とせず、極短時間で、100%のバイオマーカーの構造決定が可能な、複合化樹脂薄膜多層成形技術の高度化による構造解析用新チップ製造技術の完成を目標とする。

表 1 複合化樹脂薄膜多層成形技術の高度化目標

構造解析技術	新技術	従来技術
高度精製	不要	必要
所要時間	3 時間	50 日
マーカーの損失	極小	大
(妊娠高血圧症候群) バイオマーカー構造決定数	11/11 (100%)	3/11 (27%)

【研究概要】

こうした研究背景と研究目的ならびに研究目標の下に、委託研究として実施する研究の概要を図 5 に示した。

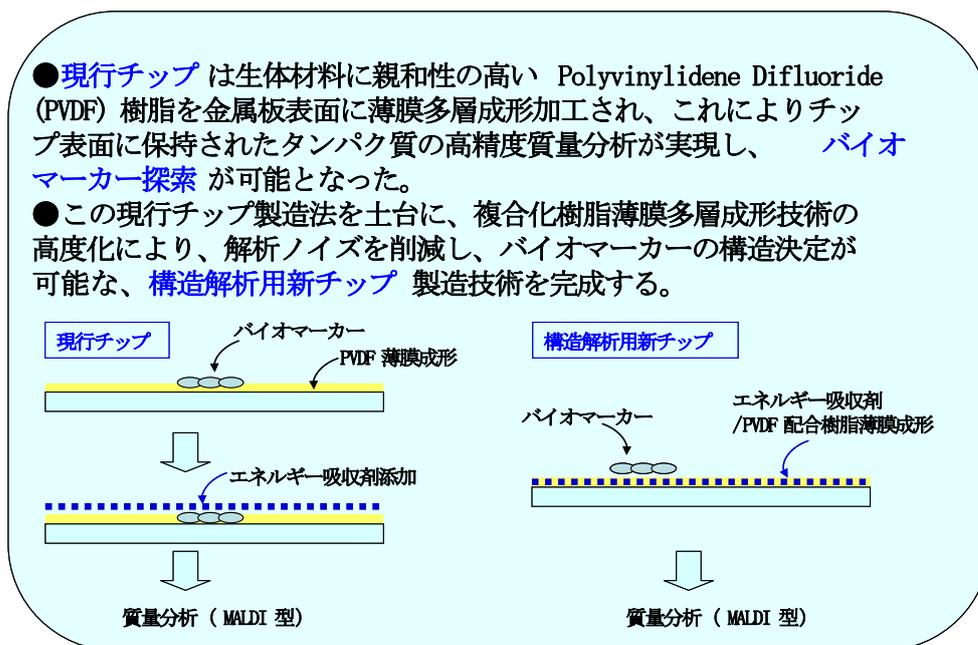
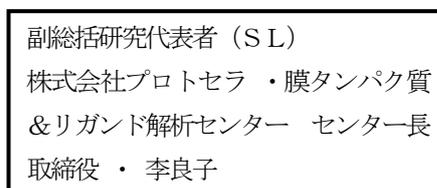
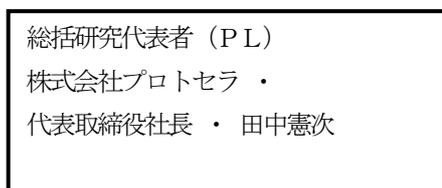
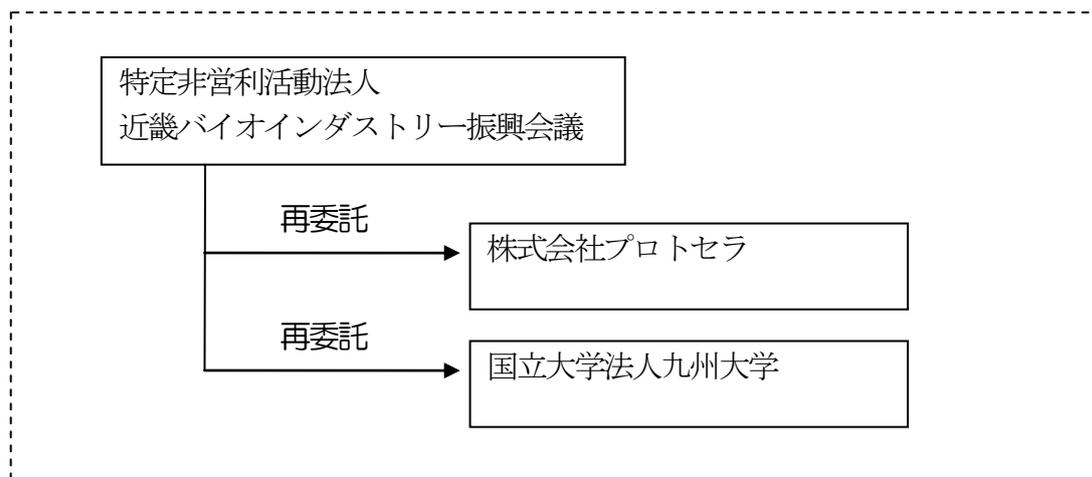


図 5 委託研究概要

## 1-2 研究体制

### 1-2-1 研究組織及び管理体制

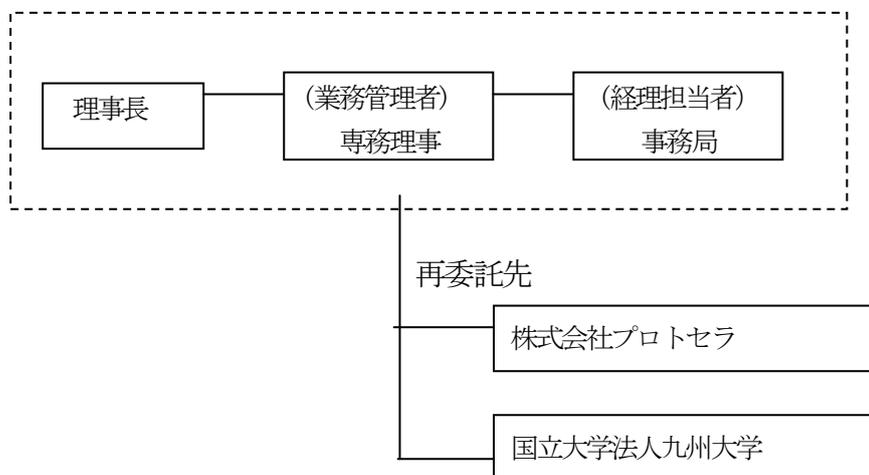
#### (1) 研究組織（全体）



#### (2) 管理体制

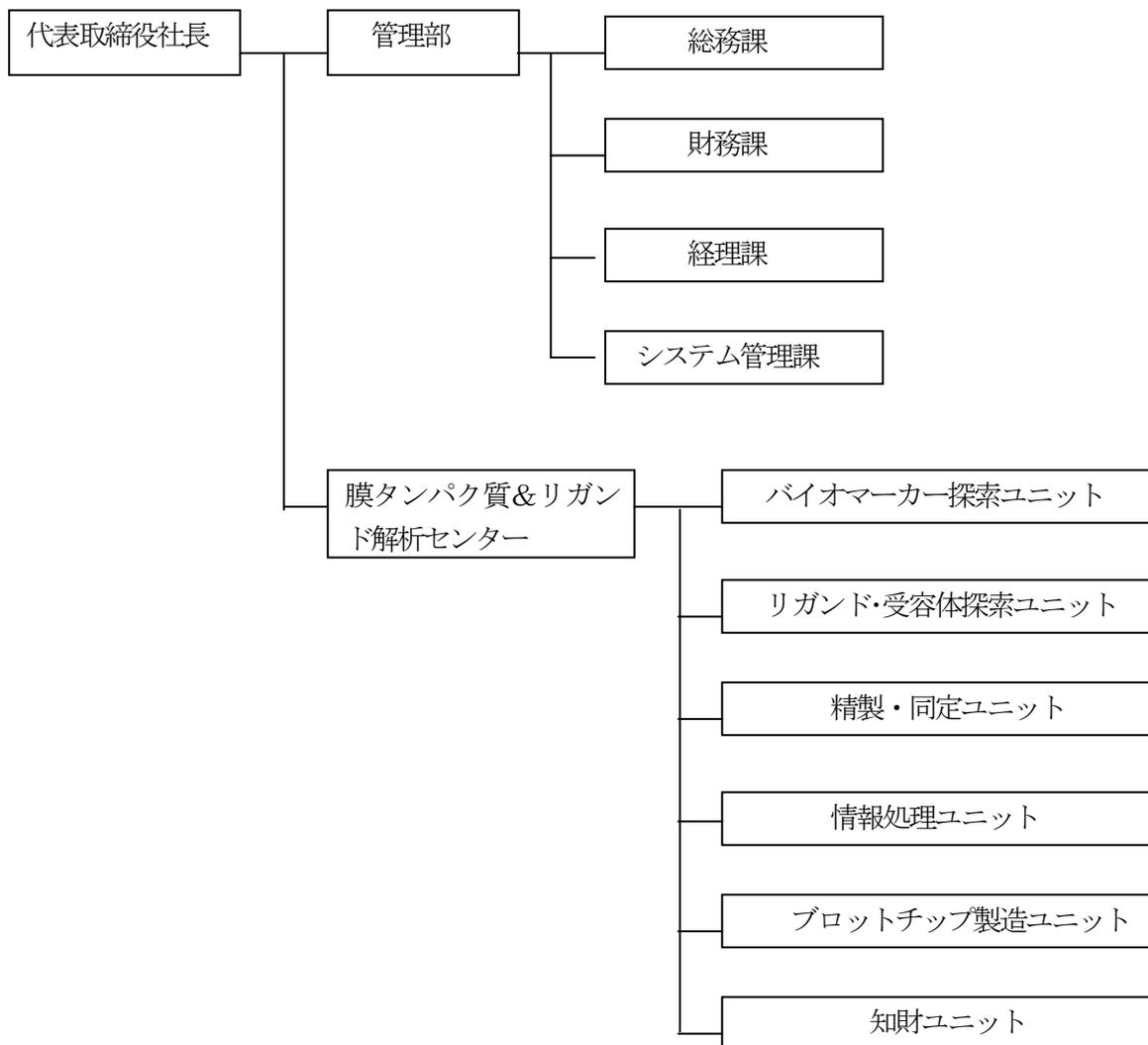
##### ①事業管理機関

[特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議]

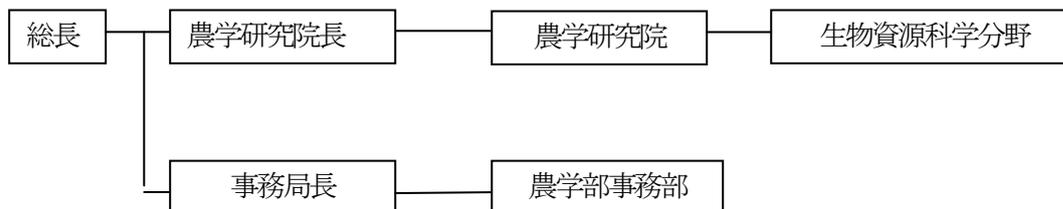


②（再委託先）

[株式会社プロトセラ]



[国立大学法人九州大学]



1-2-2 研究者氏名及びプロジェクト管理員

(1) 事業管理機関

特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
遠山 伸次	専務理事	⑩
井上 了	理事・事務局長	⑩
塚谷 有希	事務局員	⑩

(2) 再委託先

株式会社プロトセラ

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
田中 憲次	代表取締役社長	①、②、③、④、⑤、⑥
李 良子	膜タンパク質&リガンド解析センター センター長 取締役	①、②、③、④、⑤、⑥
野中 大輔	膜タンパク質&リガンド解析センター 副センター長	①、②、④、⑤、⑥
金 永鈺	管理部長 兼 膜タンパク質&リガンド解析センター 研究員	①、②、③、④、⑥
麻田 恭一	膜タンパク質&リガンド解析センター 研究員	①、②、③、④、⑤

国立大学法人 九州大学

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
北岡 卓也	農学研究院 環境農学部門 准教授	⑦

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理機関)

特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

(経理担当) 事務局員

塚谷有希

(業務管理) 専務理事

遠山伸次

(再委託先)

株式会社プロトセラ

(経理担当) 管理部 経理課員

芝野 透

(業務管理) 取締役 兼 膜タンパク質&リガンド  
解析センター長

李 良子

国立大学法人九州大学

(経理担当) 農学部経理係 係長

山本泰庸

(業務管理) 農学研究院 准教授

北岡卓也

(4) その他

アドバイザー

名前：寺澤道夫

所属：日本たばこ産業株式会社

役職：顧問 新チップ試作研究アドバイス

### 1-3 成果概要

アルミチップ基板に PVDF、エネルギー吸収剤 (EAM) または 4 種類の樹脂 (cation, anion, chelate, mix bed) を混合成形した 5 タイプ (Type1-1~Type1-5) のチップを試作、性能評価後、新チップとしてエネルギー吸収剤由来のノイズを低減化した Type1-1 (複合樹脂: PVDF+EAM)、次世代新チップとして酸性ペプチドの吸着量を増大化した Type1-3 (複合樹脂: PVDF+(EAM)+X10) の 2 種を開発することに決定した(図6)。

新チップ Type1-1 は新製造機を使用した薄膜多層成形技術を完成し最終製品の新チップ製造体制を確立した。1 ロット 100 本、10 ロットの予備試験製造を完了後、10 ロットの実データを基準として新チップの規格値を設定、その後に実施した予備保存安定性試験に適応した。その後、1 ロット 200 本、10 ロットの本格試験製造を完了、新チップ評価を実施した結果、新チップの全ロットで性状・性能共に規格値に合格した。

新チップによる構造解析の結果、現行チップでは血清検体から診断バイオマーカーを直接チップ上で構造解析することが出来なかったが、新チップでは妊娠高血圧症候群 11 種類のうち 4 種類の構造解析が可能になり、加えてチップ上で 3 種類の精密質量測定に成功し、それらのペプチドが 2 価イオンからなることが判明した。このようにして、11 種類の構造解析リストから、3 種類が削除され、残る 8 種類の診断バイオマーカーの 50% に当たる 4 種類の構造解析に成功し、数値目標の  $\geq 50\%$  が達成できた。

また、次世代新チップ Type1-3 は酸性ペプチドの構造解析に威力を発揮することが期待されるため、新製造機での薄膜多層成形法の各種条件の至適化検討を継続する。

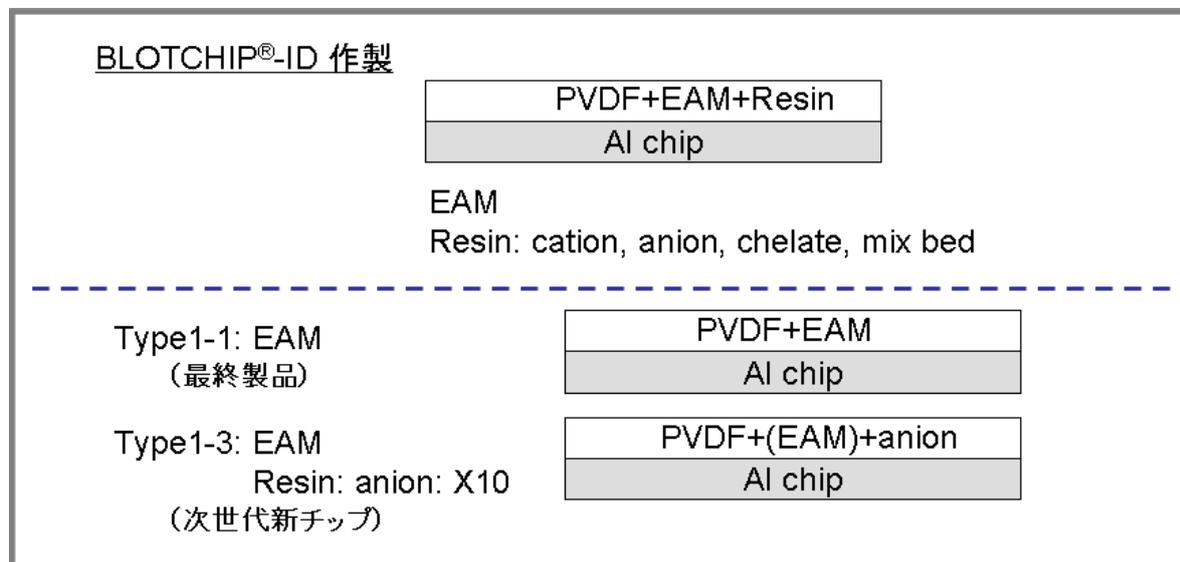


図6 新チップ候補と選択された新チップ 2 タイプ

### ① 薄膜多層成形技術の最適化による新チップ試作と性能評価

新チップとして5タイプの新チップを試作した。Type1-1(複合樹脂：PVDF+EAM)は、新製造機において主に塗布量、塗布回数等について薄膜多層成形技術の最適化を行い、1ロット200本製造体制を固めた。試作した新チップ10ロットは全てMS評価における5種の標準ペプチド質量ピーク強度値が達成され、かつ標準ペプチドの構造解析(同定)に成功したため、本チップを新チップとして本格開発することに決定した。Type1-2(複合樹脂：PVDF+cation), Type1-3(複合樹脂：PVDF+anion), Type1-4(複合樹脂：PVDF+chelate), Type1-5(複合樹脂：PVDF+mix bed)として4つの樹脂S11、X10、C74、NMRをスクリーニングアップし薄膜多層成形技術の最適化を検討した結果、最終的にType1-3(複合樹脂：PVDF+X10)の新チップが酸性ペプチドに対して高い吸脱着能が示されたことより、次世代新チップとして今後も開発を継続することに決定した。

### ② 成形樹脂膜厚の最適化検討

新チップ基板上に薄膜成形された成形樹脂膜厚は、蛍光X線測定装置により炭素原子膜を標準とする相対値として定量化することが可能となった。新製造機により試作された新チップ10ロットの成形樹脂膜厚測定を行った結果、ロット間の膜厚CV値は2.19%であった。これに対して手動方式で試作した新チップのロット間、膜厚CV値は5.75%であった。

成形方法を手動から機械化したことによりロット間のCV値が大きく減少し目標とする5%以内となった。本10ロットの値を基準として規格設定を行った。

### ③ 試験製造

最終形態の新チップType1-1(複合樹脂：PVDF+EAM)を1ロット200本、計10ロットの新製造機による試験製造を行った。試験製造された10ロットの新チップ評価を実施した結果、全ロットの新チップは性状(色、均一性、接着性、膜厚)および性能(MS評価、MS/MS評価)共に規格値に合格した。

### ④ 規格・試験法の設定

規格・試験法を設定した。新チップ性状は肉眼判定による外観検査(色、均一性、接着性)と蛍光X線分析装置による膜厚測定値を設定した。色は淡黄色、均一性はスポット(不均一な点)が無いこと、接着性は電気転写後にチップ表面に剥離が無いことを規格とした。

新チップの性能試験は、質量分析測定によるノイズ、MS評価、MS/MS評価の3項目を選定し、各項目毎に規格値を設定した。アルミ基板上の成形膜厚値も規定した。

### ⑤ 保存安定性試験

新チップで20℃、脱酸素剤・乾燥剤存在下での3ヶ月、6ヶ月の予備安定性を検討した。本格試験製造の新チップでは4条件⑦4℃、脱酸素剤・乾燥剤 ①20℃、脱酸素剤・乾燥剤 ②4℃、窒素充填 ③20℃、窒素充填で検討した。評価は規格・試験法に準拠して実施した。

### ⑥ 新チップと製造法の総合評価

新チップとして開発するType1-1(複合樹脂：PVDF+EAM)チップを新製造機(新型ノズル

BP201 型設置) で塗布量、塗布回数、その他の詳細な条件等の最適化を行い薄膜多層成形技術を完成した。この完成した薄膜多層成形技術により新チップ1ロット100本の10ロット試作、さらに試験製造として1ロット200本を10ロット製造した。試作チップは最適化目標としていたMS評価における5種の標準ペプチドの質量ピーク強度値が達成され、かつ標準ペプチドの構造解析(同定)に成功した。また、試験製造した新チップは性状(色、均一性、接着性、膜厚)および性能(MS評価、MS/MS評価)等全て設定した規格値に合格し、新製造機による薄膜多層成形技術の完成が確認された。

新チップによる構造解析の結果、現行チップでは血清検体から診断バイオマーカーを直接チップ上で構造解析することが出来なかったが、新チップでは妊娠高血圧症候群11種類のうち4種類の構造解析が可能になり、加えてチップ上で3種類の精密質量測定に成功し、それらのペプチドが2価イオンからなることが判明した。このようにして、11種類の構造解析リストから、3種類が削除され、残る8種類の診断バイオマーカーの50%に当たる4種類(PIHA、PIHE、PIHH、PIHJ)の構造解析に成功し、数値目標の $\geq 50\%$ が達成できた。

#### ⑦ チップ物性評価

新製造機により1cm角のアルミ基板とガラス基板上に新チップの塗布物質を成形し物性評価用チップを作製し、表層薄膜の物性評価を原子間力顕微鏡(表層の凹凸構造)、接触角計(表層の親水性・疎水性)、エスカ表面解析(表面元素組成、最表層に出ている官能基)により物性評価を実施した。その結果、手動成形新チップと比較すると新製造機により成形した新チップではチップ表層に500 nm以上のナノ凹凸は観察されず、50-200 nmに収まった。また、非常に明瞭に元素分析ができており、特にC1sスペクトルから構造同定できるレベルの組成解析が可能であった。

#### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

※ 対外的な問い合わせの担当者(所属・氏名・電話・

FAX・E-mail)を記載

特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

事務局員 塚谷 有希

電話 06-6459-6795

FAX 06-6447-7011

E-mail [tsukatani@kinkibio.com](mailto:tsukatani@kinkibio.com)

## 第2章 本論

### 2-1 薄膜多層成形技術の最適化による新チップ試作と性能評価

新チップ Type1-1: PVDF+EAM の試作を開始した。チップ製造の規模は本来は 200 本規模であるが、スプレーノズルを新型に変更したため、100 本規模での予備的試験製造との位置付けで試作を行った。この予備的試験製造 (100 本 x 10 ロットの試作) はトラブル無く順調に推移し 10 ロット試作を完了した。成形されたチップ外観は 10 ロット共に同様な淡黄色であり、外観上は良好な結果が得られた。また、電気転写後の接着性、質量分析評価としてノイズ、MS 評価、MS/MS 評価を行った結果、10 ロット共に評価基準をクリアした。また、電気転写後の剥離もなく接着性についても問題なく、MS測定の際のノイズピークのTICについても低値を示し、1ロット 100 本 x 10 ロット試作 (予備的試験製造) は全ロットで評価基準をクリア出来た。

新チップ候補として Type1-2(複合樹脂: PVDF+cation), Type1-3(複合樹脂: PVDF+anion), Type1-4(複合樹脂: PVDF+chelate), Type1-5(複合樹脂: PVDF+mix bed)についても手動方式により薄膜多層成形技術の最適化を検討した結果、Type1-3 チップでアニオン交換樹脂 X10 (粉状) の成形チップが酸性ペプチドに対して高い吸脱着能が示された。本チップは次世代新チップとして今後も開発を継続する方針である。

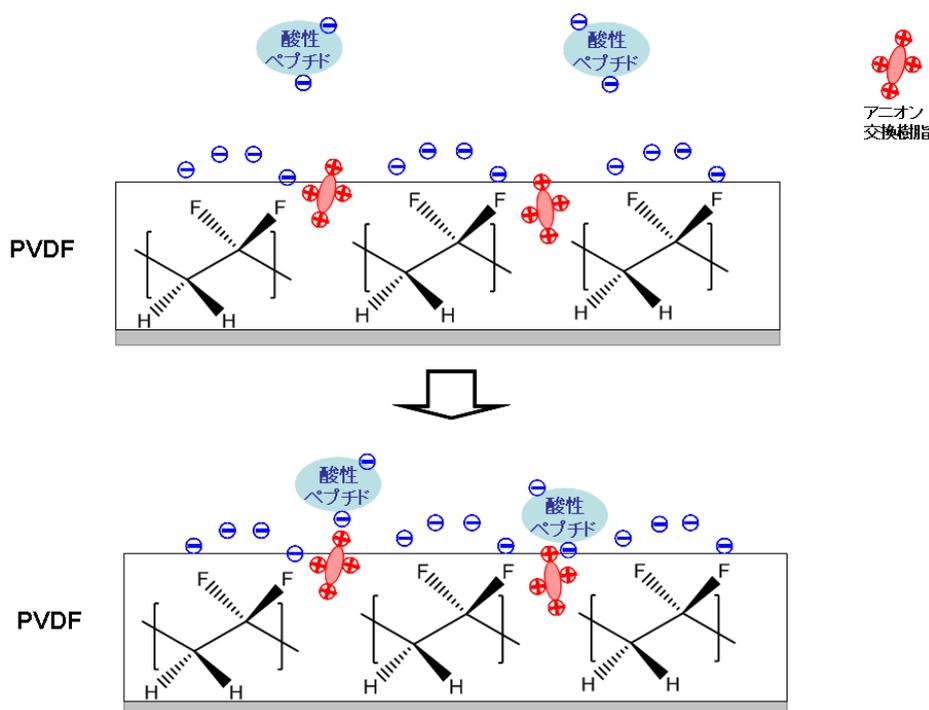


図7 アニオン交換樹脂混合成形の効果

### 2-2 成形樹脂膜厚の最適化検討

新チップ基板上に薄膜成形された成形樹脂膜厚は、蛍光 X 線測定装置により測定可能であることが示された(図8)。しかしながら、新規チップの配合溶液を成分とする「標準膜」

とも言うべき膜厚原器は存在しないため、標準炭素膜換算として相対膜厚で代替し算出することとした。

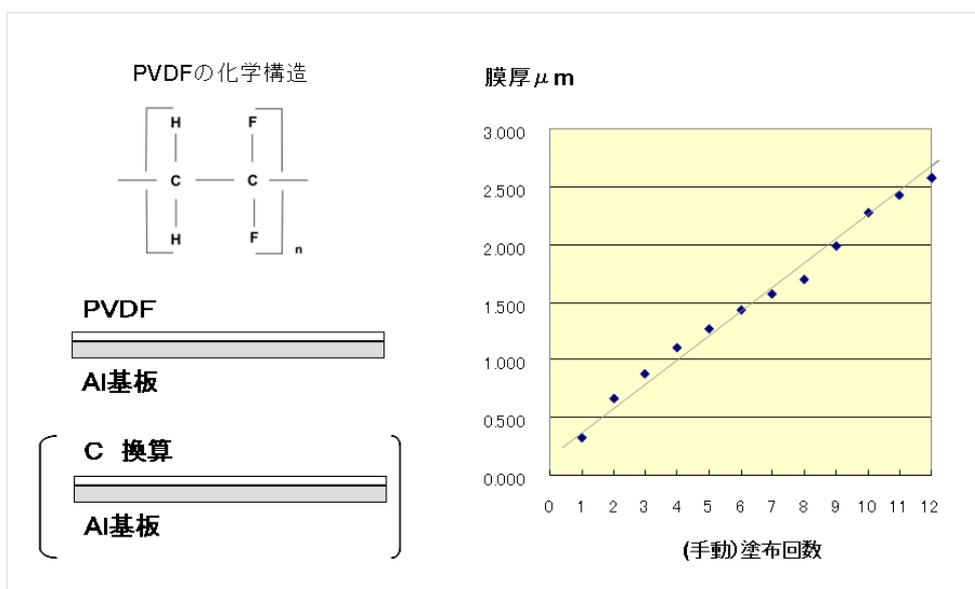


図8 蛍光X線測定によるチップ膜厚測定

エネルギー分散型蛍光X線分析装置（蛍光X線測定）、SII NT社製 SEA1200VX 使用

予備試験製造の位置付けで1ロット100本x10ロット新チップを試作した。これら10ロットの成形樹脂膜厚測定を行った結果、ロット間の膜厚CV値は2.19%であった。これに対して昨年度に手動スプレーで試作した新チップのロット間、膜厚CV値は5.75%であったため、成形方法を手動スプレーから新製造機によりプログラム化したことによりロット間のCV値が大きく減少し目標とする5%以内となった。

### 2-3 試験製造

試験製造は前工程（サイクル数3）、後工程（サイクル数5）で実施した。新チップ試験製造は1ロット200本製造規模であり、9月26日に1ロット目の製造を開始、その後の製造も特記すべきトラブルは無く順調に推移し10月22日には10ロット目の試験製造を終了した。試験製造した新チップ10ロットについて、性状（外観、膜厚）および性能（ノイズ、MS評価、MS/MS評価）共にすべてのロットで規格値をクリアする結果が得られた。

### 2-4 規格・試験法の設定

新チップ Type1-1 の規格・試験法を設定した。新チップ性状の規格としては肉眼判定による外観検査（色、均一性、接着性）とエネルギー分散型蛍光X線分析装置（SII NT社製 SEA1200VX）によるチップ表面の成形膜厚について標準炭素膜を基準として相対膜厚値を設定した。新チップの色は淡黄色、アルミチップ上に成形された表面が均一でありスポット（不均一な点）が無いこと、接着性は質量分析評価の過程で行う電気泳動ゲルとチップを接触させて通電する電気転写の終了後、電気泳動ゲルをチップ表面から除去した後に

チップ表面の成形膜に剥離が無いことを判断基準に設定した。また、新チップ性能は MALDI 型質量分析測定よりノイズ、MS 評価、MS/MS 評価の 3 項目を設定した。

## 2-5 保存安定性試験

本年 4 月より新ノズル交換後、新チップ Type1-1 を 100 本 x10 ロット試作し、外観検査と質量分析評価、膜厚測定等を行った結果、外観、接着性、ノイズ、MS 評価、MS/MS 評価いずれも良好であった。これら 10 ロットは製造後、20℃にて乾燥剤および脱酸素剤を添加し密閉容器で遮光保存した。新チップ (Type1-1) の 3 ロット No. M120423, M120424, M120427 が 7 月で 3 ヶ月経過したため、7 月下旬に 3 ヶ月の保存安定性予備試験として MS 評価 (標準 5 ペプチドの MS ピーク強度測定) を実施した。

試験製造 (200 本 x10 ロット) された新チップは 4 条件 ㊶ 4℃、脱酸素剤・乾燥剤 ㊷ 20℃、脱酸素剤・乾燥剤 ㊸ 4℃、窒素充填 ㊹ 20℃、窒素充填 での保存安定性試験を実施した。期間は 1 ヶ月から最長 12 ヶ月まで行う予定である。現時点では 1 ヶ月と 3 ヶ月の保存安定性試験が終了した。

## 2-6 新チップと製造法の総合評価

株式会社プロトセラは BLOTCHIP® 解析技術を用いて妊娠高血圧症候群 (PIH) の早期診断用バイオマーカー候補 11 個を発見した。これら 11 個のバイオマーカー候補を構造解析 (同定) するため、血清サンプルの前処理を行い逆層クロマトグラフィー等にかける高度精製し MALDI-MS/MS の質量分析にかける構造解析を行った結果、11 個中の 3 個のバイオマーカーのアミノ酸配列を解明した (特許出願 2009-230995)。しかしながら、残る 8 個のバイオマーカーは精製工程において総回収率が 1%以下に低下し、質量分析に必要な最小レベルの重量を確保出来ず、8 個のバイオマーカー候補の構造解析には全く為すすべが無い状態であった。そこで、これまでの現行チップ (商標 BLOTCHIP®) を使用したバイオマーカー構造解析検討の結果からエネルギー吸収剤由来ノイズの削減化とバイオマーカー吸着量の増大化を薄膜多層成形技術により実現化し新チップを開発することがバイオマーカーの迅速・高効率な構造解析を達成出来ると考えられた。

平成 22 年度より本プロジェクトを開始し、1 ロット 200 本製造が可能であり複合化樹脂の成形条件をコンピュータ制御可能な新チップ製造機を設計、スプレーノズルの選定等を行い新製造機を導入した。平成 23 年度には複合化樹脂の薄膜多層成形の各種条件を検討後、新チップ候補を試作し、基本性能を確認した。平成 24 年度にはチップ表面均一性の高度化のため新ノズルを導入した。新チップとして開発する Type1-1 (複合化樹脂: PVDF+EAM) チップを新製造機 (新型ノズル BP201 型設置) で塗布量、塗布回数等の最適化を行い薄膜多層成形技術を完成した。この完成した薄膜多層成形技術により新チップ 1 ロット 100 本の 10 ロット試作、さらに試験製造として 1 ロット 200 本を 10 ロット製造した。試作新チップ全 10 ロットおよび試験製造した新チップ全 10 ロット共に性能試験に合格したことより新製造機による薄膜多層成形技術の完成が裏付けられた結果となった。これらの新チップを用い最終評価として現行チップでは不可能であった妊娠高血圧症候群 11 種類の診断バイオマーカーの構造解析を実施した。

平成 23 年度の試作チップを使った妊娠高血圧症候群 11 種類の診断バイオマーカーの構

造解析では、11個のバイオマーカー候補のうち2個 PIHE, PIHH の構造解析に成功した。平成24年度は試験製造で作製した最終製品の形態を有する新チップにより妊娠高血圧症候群11種類の診断バイオマーカーの構造解析を行った。その結果、11個のうち4個 PIHA, PIHE, PIHH, PIHJ の構造解析に成功した。また、PIHD はレフレクトロンモードでの精密質量を測定する過程で同位体イオンピーク間の差が 0.5Da であったことより、PIHD は2価イオンであることが判明したため、この時点でバイオマーカーリストから除外した。PIHG と PIHI についても PIHD と同様なスペクトルが観察されたため、2価イオンとしてバイオマーカーリストから除外した。従って、妊娠高血圧症候群の診断バイオマーカーは11種類としていたが、3マーカーが2価イオンのため脱落したため、診断バイオマーカーは8種類となった。最終製品の新チップで4バイオマーカーの構造解析に成功したことより、成功率は50%となり、今年度の目標(≧50%)を達成するに至った。

## 2-7 チップ物性評価

新製造機により1cm角のアルミ基板とガラス基板上に新チップの塗布物質を成形し物性評価用チップを作製し、表層薄膜の物性評価を原子間力顕微鏡、接触角計、エスカ表面解析により物性評価を実施した。原子間力顕微鏡による表層凹凸構造の評価において光学顕微鏡ではこれまでと同様に非常に大きな凹凸が観察されたが、手動塗布と比べると500nm以上のナノ凹凸は観察されず、50-200nmに収まった。今後、基板との接着性の改善により、さらなる平滑化が可能と推測された。接触角計による表層の親水性・疎水性の評価においては疎水性のPVDFと親水性のEAMを複合塗布しているため、結果的に基材表面の親・疎水状態に大きな変化はなかった。

表2 PIHバイオマーカー11個の構造解析(同定)

バイオマーカー		理論分子量 [M+H] <sup>+</sup>	元のタンパク質	バイオマーカーのアミノ酸配列	同定成否	
番号	記号				H23年度	H24年度
1	PIHA	2,080.97	Kininogen-1	HNLGHGKHERDQGHGHQ	否	成功
2	PIHB	2,091.91	Fibrinogen-a	DEAGSEADHEGTHSTKRGA	否	否
3	PIHC	2,127.01	Kininogen-1	GHQLGHGHEQQHGLGHGKHF	否	否
4	PIHD	2,148.30	(2価の可能性高い)			
5	PIHE	2,209.06	Kininogen-1	KHNLGHGKHERDQGHGHQ	成功	成功
6	PIHF	2,378.21	Compliment C4-A / B	DDPDAPLQPVTPQLQFEGRRN	否	否
7	PIHG	2,678.42	(2価の可能性高い)			
8	PIHH	2,858.53	Alpha2-HS-glycoprotein	TVVQPSVGAAGPVVPPC(+cys)PGRIRHFV	成功	成功
9	PIHI	2,962.20	(2価の可能性高い)			
10	PIHJ	3,156.63	Inter-a-trypsin inhibitor heavy chain H4	NVHSGSTFFKYLLQGAKIPKPEASFSPR	否	成功
11	PIHK				否	否

PIHA, PIHB, PIHC, PIHE, PIHF, PIHH, PIHJ:従来の大量試料から液クロによる高度精製後に同定されたもの

## 最終章 全体総括

### 〔複数年の研究開発成果〕

#### (1) 新チップ製造機的设计、製作と性能評価

複合化樹脂の薄膜多層成形を自動化するため、新チップ製造機を設計、製作した。製造機の心臓部に相当するノズル選定とターンテーブル型チップ移動装置についての各種調査と立会い実地試験を重ねた後、設計図を完成した。本設計図に基づき新製造機を製作、各種基本動作の確認と性能評価を行った後、現行チップ(商標 BLOTCHIP®)製造法を新製造機用に最適化し、現行チップ3ロットの試作を実施した。試作した現行チップについて規格試験を行った結果、3ロット共に現行チップ規格に合格したため、本製造機が新チップ開発に必要な複合化樹脂薄膜多層成形が実施可能と判断し、今後の新チップ開発を本製造機により行うことに決定した。

#### (2) エネルギー吸収剤 (EAM) の選定

複合化樹脂薄膜多層成形高度化技術による構造解析用新チップを開発するため、まず、エネルギー吸収剤選定のために各種特許および文献情報を調査し候補化合物を10種類選定した。5タイプのEAM候補化合物5種類(モノマー、MAモノマー、ホモオリゴマー、ホモポリマー、ヘテロポリマー)と金ナノパーチクル(AuNPs)の修飾体化合物5種類について各々PVDF溶液に添加し溶解性・相溶性・固化性状の評価、さらに手動でのスポッティング法とスプレー塗布法により複合化樹脂薄膜多層成形を行い新チップ試作を検討した。その結果、最終評価として試作チップの構造解析能(MS/MS測定)の結果より、全10種の化合物のうちEAMモノマーを選定した。

#### (3) 新チップ Type1-1 (複合樹脂：PVDF+EAM) 試作

アルミ基板に対するPVDFとEAMの複合化樹脂薄膜多層成形条件の各種検討を行い最適化しType1-1チップを試作した。さらに、新ノズルを設置した新製造機による複合化樹脂薄膜多層成形技術を完成し、Type1-1新チップを10ロット(1ロット100本)試作した。本試作チップにより各標準ペプチドのMS評価おとMS/MS評価を実施した結果、数値目標を10ロット共に達成した。

#### (4) ペプチド吸着効果の検討

バイオマーカーの新規チップへの吸着量の増大を図るために、チップ基板にPVDFと4種類の樹脂(cation, anion, chelate, mix bed)を薄膜多層成形された4タイプのチップを試作、性能評価を比較検討後、次世代新チップとして酸性ペプチドの吸着量を増大化したType1-3(複合樹脂：PVDF+(EAM)+anion)を開発することに決定した。

#### (5) Type1-1 (複合樹脂：PVDF+EAM) 試験製造

新チップType1-1試作と性能評価の結果、決定した最終形態の新チップType1-1(複合樹脂：PVDF+EAM)を1ロット200本、計10ロット、試験製造を行った。試験製造された10ロットの新チップ評価を実施した結果、全ロットの新チップは性状(色、均一性、接着性、膜厚)および性能(MS評価、MS/MS評価)共に規格値に合格した。

#### (6) 規格・試験法の設定

規格・試験法を設定した。新チップ性状は肉眼判定による外観検査(色、均一性、接着性)と蛍光X線分析装置による膜厚測定値を設定した。色は淡黄色、均一性はスポット(不均一な点)が無いことを確認、接着性は電気転写後にチップ表面に剥離が無いことを確認す

ることを設定した。

新チップ性能は質量分析測定よりノイズ、MS評価、MS/MS評価の3項目を設定した。新チップの(PVDF+EAM)成形膜厚についても規格値を設定した。

#### (7) 保存安定性試験

試作した新チップで20℃、脱酸素剤・乾燥剤存在下での3ヶ月、6ヶ月の予備安定性を検討した。試験製造した新チップでは4条件⑦4℃、脱酸素剤・乾燥剤 ④20℃、脱酸素剤・乾燥剤 ⑤4℃、窒素充填 ⑥20℃、窒素充填での保存安定性を1ヶ月、3ヶ月で検討した。保存安定性試験は設定した規格・試験法に準拠して実施した。安定性試験は最長1年まで継続することとした。

#### (8) 新チップと製造法の総合評価

新チップとして開発する Type1-1 チップを新製造機で塗布量、塗布回数、塗布温湿度等の最適化を行い薄膜多層成形技術を完成した。完成された新チップを使用し、最終評価として現行チップでは不可能であった妊娠高血圧症候群(PIH)の診断バイオマーカーの構造解析を新チップで行いその成功率を算出した。当初PIHのバイオマーカーは11種類を想定していたが、その内3個は2価イオンであることが判明したため、標的バイオマーカーは8個となり、新チップで同定出来たものは4個、成功率は50%であり、最終目標 $\geq 50\%$ を達成した。

#### (9) チップ物性評価

新製造機により1cm角のアルミ基板とガラス基板上に新チップの塗布物質を成形し物性評価用チップを作製し、表層薄膜の物性評価を原子間力顕微鏡(表層の凹凸構造)、接触角計(表層の親水性・疎水性)、エスカ表面解析(表面元素組成、最表層に出ている官能基)により物性評価を実施した。その結果、手動成形新チップと比較すると新製造機により成形した新チップではチップ表層に500 nm以上のナノ凹凸は観察されず、50-200 nmに収まった。また、非常に明瞭に元素分析ができており、特にC1sスペクトルから構造同定できるレベルの組成解析が可能であった。

### 課題① 新チップ Type1-1 (複合樹脂：PVDF+CHCA) 保存安定性 (6ヶ月以上)

新チップ Type1-1 (複合樹脂：PVDF+EAM) の保存安定性について1ヶ月後は設定した各種規格試験に合格し既に証明済である。今後、新チップを販売戦略に乗せるには、流通時間、購入者の使用頻度を考慮すると最低6ヶ月以上の保存安定性は必要と判断されるため、今後も引き続いて保存安定性の試験を最長1年まで実施する。

### 課題② 次世代新チップ Type1-2 (複合樹脂：PVDF+X10) 試作

次世代新チップ Type1-2 (複合樹脂：PVDF+X10) は酸性ペプチドに対する保持用量が増大することにより酸性ペプチドの構造解析能力が数段向上する点で新チップ Type1-1 の構造解析能を補完するチップとして今後も開発を検討する。当面の検討としては、まず製造機の各種ラインに目詰まりを生じない程度まで X10 樹脂を粉砕化し沈殿しない複合樹脂溶液を調製する。この複合樹脂溶液をアルミ基板上に新製造機により薄膜多層成形を行い、複合樹脂溶液濃度、塗布回数等の各種検討後、Type1-2 試作を行い、質量分析による酸性ペプチド A-marker の構造解析能力を評価する。

### 【研究開発後の事業化展開】

#### ① 子宮内膜症・大腸がんの診断キット開発

新チップType1-1（複合樹脂：PVDF+EAM）を使用し、現行チップで見出したバイオマーカーの構造解析を行う。現在まで子宮内膜症、大腸がんにおいて感度・特異度は高値を示すが構造解析に成功しなかったため、その後のビジネス展開が停滞しているバイオマーカーが20個前後存在する。新チップType1-1を用いてこれらのバイオマーカーの構造解析を行い、特許出願後、抗体を作製し診断キット開発へ展開する。

#### ② 新チップType1-1（複合樹脂：PVDF+EAM）販売

現行チップ（商標BLOTCHIP®）と新チップ（商標BLOTCHIP®-ID）の販売を展開する。その販売実績を見ながら、実績が当社の製造能力を超える時点を予測して、国内企業（質量分析装置製造会社、新事業企画企業、臨床検査企業その他）数社に限り通常実施権付きのライセンス製造 and/or 販売をスピンオフする。

#### ③ 新チップType1-1（複合樹脂：PVDF+EAM）の国内研究施設への無料配布

MALDI型質量分析装置を所有する国内研究施設（国立研究機関、大学を含む）を対象に無料で新チップType1-1を出荷し、新チップのユーザーとしての性能評価と論文発表等にご協力頂く。その後、3年目から国内販売を実施する。配布した新チップで成功した構造解析の結果が特許出願、論文等に掲載されることにより、新チップの有用性が証明され、引き続いて展開する新チップの有償販売にシームレスに移行出来、販売本数も加速度的に増大するものと予測される。