

現場利用を指向したバイオセンサシステム



研究ノート

齋藤 真人*

Development of the POCT-oriented biosensing system and applications

Key Words : Biosensor, Microfluidics, Centrifugal thermal convection

はじめに

生体由来の優れた分子認識能を持つ分子（抗体や酵素など）を利用して対象物質を捕捉し、変換素子を介して電気信号に変換することで計測する。つまりバイオセンサーであるが [1,2]、これには認識分子や変換素子、検出手法が種々提案されており、例えば光学計測を利用したバイオセンサー、電気化学測定を利用したバイオセンサー、トランジスタを利用したバイオセンサーなど多岐にわたるデバイスが開発されている。近年ではさらに、マイクロスケールの反応場を導入し微量化することにより、迅速・高感度な検出デバイス構築への取り組みがなされている。バイオセンサの用途は、医療現場における迅速診断、日常的なモニタリングによる健康管理や生活習慣病予防、食品関連分野・設備における食中毒菌などの衛生検査、農業現場における家畜疫病など多岐にわたるが、とくに各種現場にて特定項目を検査するポイントオブケアテスト（POCT）が可能で、つまり簡易・迅速・高感度な検出を可能とするチップデバイスの開発が求められている。

著者も長らくナノ・マイクロ構造を利用したバイオセンシングチップデバイスに関する研究に精力的に取り組んできた。そのなかでもとくに現場利用を指向したマイクロ流体チップの開発やバイオアッセイ応用に取り組んだ例を紹介する。

遠心促進熱対流型 PCR デバイスの開発

核酸増幅技術である Polymerase chain reaction (PCR) 法は、分子生物学や検査においてよく使われているが、Manzらによってマイクロ流体を利用した迅速核酸増幅の可能性 [3] が示されたことで、その後多くのオンチップ PCR デバイスの研究が盛んになった。反応場を微小空間におくことで迅速な熱交換や分子拡散の防止など効果がある。筆者も、Polydimethylsiloxane (PDMS) 製の往復蛇行型マイクロ流路 PCR チップを開発し、わずか 9.5 分で新型インフルエンザウィルス遺伝子の増幅を示すなど、遺伝子増幅の高速化に取り組んできた [4,5]。しかしながら、実用性の観点からは、操作性や量産性を得られるものでなければならない。従来、送液制御にはシリンジポンプなどを使用するが、これに対し、マイクロ流路内に生じるキャピラリ力を利用した溶液自走、つまり外部溶液駆動源の不要な溶液自走型の往復流路型 PCR チップも開発し、流体制御の簡易化も行った [6,7]。しかしながら、迅速性とチップセットアップの簡易化だけでは不十分で、PCR 特有の試料調製の煩雑さの解消も実用展開に向けた大きな課題と考える。そのため、これら課題を包括的に解決できる技術の創出に取り組むこととした。

まず、溶液を自走させるために熱対流に注目した。ベナール対流を表す基礎方程式を見ると、重力に依存するパラメータがあるが、ここで重力の大きさを変化させられれば対流速度を制御できるものと考えられる。現実には難しいので、遠心場に置き換えて相対重力加速度で考えることで熱対流速度を制御することが期待できる。つまり温調と同時に回転制御することで、熱対流の生成と流速制御させることができる (図 1a)。これを実証するため、COP 製のリング状マイクロ流路 (直径 5 mm、流路幅 500 μm) と、温調 (95 $^{\circ}\text{C}$ と 60 $^{\circ}\text{C}$) と回転同時制御可能な装置を試作した。温調回転下の流路内の溶液 (食紅着色)



* Masato SAITO

1976年4月生まれ
北陸先端科学技術大学院大学 材料科学
研究科機能科学専攻 博士後期課程
(2004年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科 精密
科学応用物理学専攻 助教、産総研・
阪大 先端フォトバイオ 客員研究員、
博士(材料科学)
TEL : 06-6879-7837
E-mail : saito.masato@ap.eng.osaka-u.ac.jp
Website : <http://dolphin.ap.eng.osaka-u.ac.jp/realize/>

をハイスピードカメラにて観察したところ、熱対流の生成と流速制御が可能であることを確認した(図1b)。5Gの負荷の場合、流路内1週の対流時間は12秒程度であった。モデルとしてヒトβ-ACT DNA(120 pg)を指標に評価したところ、わずか10分と迅速なDNA増幅が可能であった(図1c) [8]。

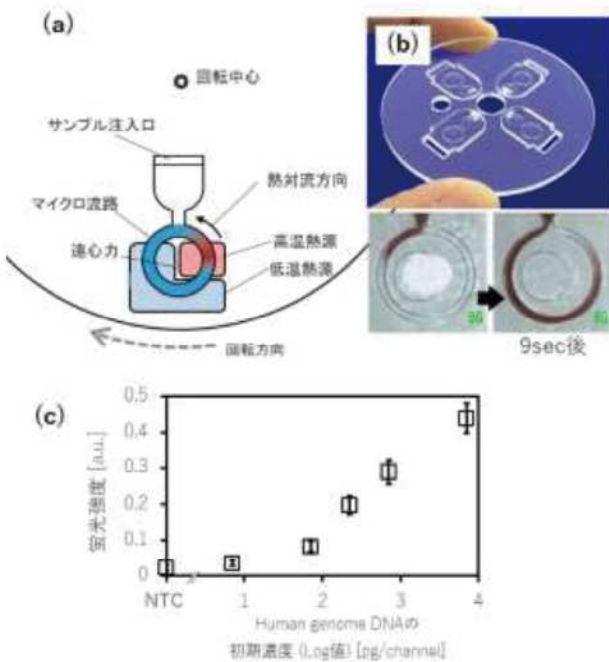


図1. 遠心促進熱対流型PCRチップの開発。(a) 遠心促進熱対流の概略、(b) 試作チップと温調回転下での熱対流の様子、(c) ヒトゲノムDNAを指標にした検量特性

また、PCR調製の煩雑さ克服のため、マイクロ流路の毛細管現象と遠心移送を利用して、PCRに必要な溶液量を分取する機能を付与したチップも開発した。これは、任意量を滴下するだけで、つまり精緻なピペティングの熟練度を要せずにPCR実行を可能とするものである。近年、世界的な共通課題として薬剤耐性細菌が懸念されている。阪大医学部感染制御部の朝野先生らと共同で、本デバイスを用いたヒト糞便検体中の薬剤耐性遺伝子(IMP-6)の検出を試みたところ、検体液のボイルと希釈のみで特段の前処理をせず、簡易迅速にIMP-6のDNA検出が可能であった[9]。現在、感染制御の一助になるよう引き続き開発を進めているところである。

自動捕集検知システム開発の取り組み

大気中に浮遊する有害物質、例えばインフルエンザウィルスなどの感染症の原因となる微生物、アレルギーの原因となる種々のアレルゲン、環境化学物

質など、これらを迅速かつ簡便な操作で検知できることは、人々の健康維持や社会の安全にとって有用である。これら性質の異なる複数の対象物質を、複数のバイオセンシング技術を統合することで検知を実現する試みに取り組んでいる。開発を行っている自動捕集検知システムの例を紹介する。

現場にて自動検知するために、環境から対象物質を吸引捕集する機能を備えることが求められる。このとき、バイオセンシングの性質上、つまり酵素や抗体類を使用するため、対象物質を水溶液中に取り込むことが必要である。市販の大気捕集機器はいくつかあるが、バイオセンサーデバイスとの直接的な接続が難しい。そのため、自動検知装置に組み込める新たな大気捕集ユニットを自作した。図2aに示すような内部にシリンダー状の空間(4つ)があり、その内壁円周に沿う入口と中央の筒状出口をもつ容器を設計した。W80×D80×H82mmのサイズとなる。図2bに試作したミスト発生器と捕集容器を示す。容器上部付近でミストを噴霧して、大気中試料と混合させる。このとき容器出口に吸引モーターを接続することで、入り口から容器内に大気が引き込まれる。その様子を図2cに示す。このとき容器内部でサイクロンを発生させ、気液分離させる。水中に溶け込んだ標的物質は水とともに容器内にのこり、不要なガスは容器外に放出される仕組みである。大気吸引量 338L/min、捕集液量 726μLの動作能力

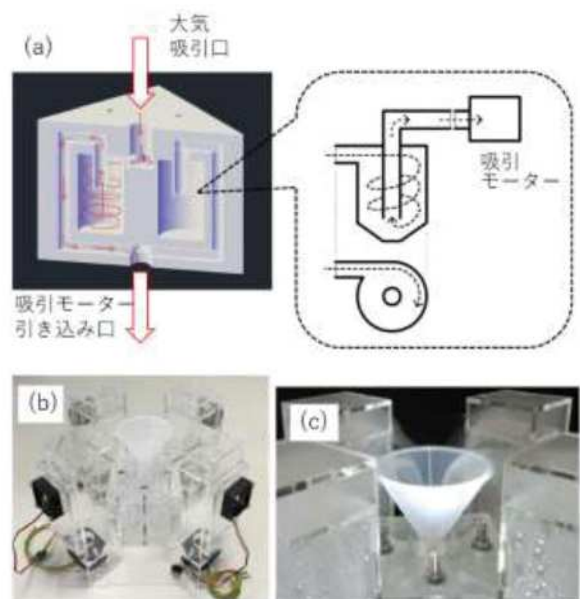


図2. 試作した大気捕集容器。(a) 捕集容器の設計、(b) 試作した捕集ユニット、(c) ミスト発生と大気吸引の様子

であった。

有害物質モデルとして、化合物、タンパク毒素、バクテリアの3とおりを試みた。化合物として、有機リン系農薬であるダイアジノンオキソン、神経毒であるサリンを用いた。検出には酵素活性阻害（アセチルコリンエステラーゼ）を利用した電気化学測定法による検知を行った。タンパク毒素にはボツリヌス毒素、検出には糖鎖固定化局在プラズモン（LSPR）チップを利用した分光測定法による検知を行った。バクテリアモデルには枯草菌、検出にはマイクロ流体PCRチップを利用した測定を行った。

各モデル物質をネブライザで噴霧し、捕集から検出まで連続動作による試験を行ったところ、10 ng サリン、10ng ボツリヌス毒素 (A) (BTX/A/Hc)、8cellの枯草菌の捕集・検知に成功した。捕集開始から検出までの所要時間も、化合物で4分程度、タンパク毒素で15分、バクテリアで15分と迅速性も満たすことができた[10]。なお、これら計測については科学警察研究所、産業技術総合研究所と共同で行った。

さらに上述の検知チップ要素技術および捕集ユニットを統合した小型自動検知装置（24Vバッテリー駆動、30cm×30cm×30cm、12.8kg）を試作し（図3）、引き続き開発を進めているところである。



図3. 試作した小型自動捕集検知装置

今後はさらなる発展形として、小型化とネットワーク接続することで、種々のシチュエーションで常時モニタリングを行うことも考えたい。トラブル発生時の初動を早くする、トラブル拡大の防止など役立つものと期待される。また、これらのバイオセンシング技術は、酵素や糖鎖、抗体などの認識分子、DNAプライマーなどを適宜選択すれば、種々の感染症拡散の抑制制御、パンデミック防止、環境汚染と健康被害抑制、家畜・養殖の感染症監視、農産物

輸出入の水際管理・品質管理（特定外来種害虫、カビ毒、未承認遺伝子組換え作物など）、可能性を挙げればきりが無いが、幅広く社会の安全にも寄与できるものと期待できる。

おわりに

遠心を利用したマイクロ流体核酸増幅技術などに関する取り組みについて紹介した。今後の課題としては、各チップの精度向上や高感度化、実試料への大規模展開が課題と考えている。

また、現在の新たな取り組みとして、ナノ・マイクロチップ技術をベースに、免疫に関する1細胞アッセイ技術の創出に取り組んでいる。多数の細胞を扱ったバルクな計測・解析では平均値としての結果が示されるわけで、従来技術ではさらに踏み込んだ細胞機能解析を行うことは難しく、計測手法の破綻を迎えていると考えられている[11]。免疫機能のより深い理解に資するため、同種の細胞のヘテロジェネイティの解明に向け、1細胞機能を直接とらえる新規計測デバイス技術の創出に取り組んでいる。

以上、新たな計測デバイスの創出による、医療や生化学研究、社会実装への貢献が果たせるよう邁進していきたいと考えている。

参考文献

- 1) バイオセンサー、鈴木周一編、講談社、1984.
- 2) バイオエレクトロニクス、軽部征夫、民谷栄一、朝倉書店、1994.
- 3) M.U. Kopp, A.J. de Mello, A. Manz, *Science*, 280, 1046-1048.
- 4) K. Yamanaka, M. Saito, et al, *Analyst*, 2011, 136, 2064-2068.
- 5) T. Nakayama, M. Saito, et al, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 396, 457-464.
- 6) H. Tachibana, M. Saito, et al, *Sensors and Actuators B: Chemical* 206, 303-310 (2015).
- 7) H. Tachibana, M. Saito, et al, *Biosensors and Bioelectronics* 74 (2015) 725-730.
- 8) M.Saito, et al, *Anal.Chem.*, 89 (23), 12797-12804 (2017).
- 9) M. Saito, et al, μ TAS2017, 1244-1245.
- 10) M. Saito, et al, *Microsystems & Nanoengineering*, 4, Article number: 17083 (2018).
- 11) P.K. Chattopadhyay, T.M. Gierahn, M. Roederer, J.C. Love, *Nature Immunology* 15, 128-135, 2014.