

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05544

研究課題名(和文) コンパクトディスク型マイクロチップを用いる感染症検査システムの開発

研究課題名(英文) Development of inspection system for diagnosis of infectious diseases using a compact disk-type microfluidic device

研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA, Hizuru)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小型で全自動かつ迅速診断が可能な感染症検査システムを開発することを目的として、リアルタイム測定が可能な新規コンパクトディスク(CD)型蛍光検出システムを開発した。本蛍光検出システムは、光源(LED)と光検出器(フォトダイオード)をCD型マイクロチップと一緒に回転させることにより、試料導入から分離・検出に至る一連の分析操作を、CD型マイクロチップの回転を停止させることなく、全自動で行うことが可能である。さらに、ポイント・オブ・ケアテスト(POCT)のための、バッテリー駆動が可能な小型でポータブルな携帯型蛍光検出システムを開発し、これを用いてウイルス抗体検査が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：A novel compact disk (CD)-type fluorescence detection system capable of real-time measurement was developed for rapid diagnosis of infectious diseases. This fluorescence detection system can automatically perform analytical operations including sample introduction, separation and detection on a CD-type microfluidic device by rotating a light source (LED) and a photodetector (photodiode) with the CD-type microfluidic device. A portable fluorescence detection system that could run on a battery was also developed for point of care testing (POCT). This portable fluorescence detection system was successfully used in an antibody test on infectious diseases.

研究分野：分析化学

キーワード：CD型マイクロチップ マイクロ化学分析システム 蛍光 酵素免疫測定法 オンサイト測定 POCT 感染症

1. 研究開始当初の背景

近年 SARS や鳥インフルエンザなどの新興感染症や結核などの再興感染症の世界的な流行が社会問題となっている。このような感染症の流行を防止するためには、感染症を迅速に診断するための新しい検査手法の開発が必要である。感染症の迅速検査法として、空港等でサーモグラフィーを用いて旅行者の体温と心拍数を測定し、得られた体温と心拍数から感染症に感染している患者を迅速にスクリーニングする方法が報告されている。しかし、この方法は感染していても発症していない患者に対しては適用できない。一方、感染症の確定診断法として、ウイルス分離法、RT-PCR 法、血清抗体価測定法などが実用化されているが、これらの手法で用いられる従来の分析装置は高価であるものが多く、測定に時間を要し、また、オンサイトやベッドサイドで測定できるようなポータブルな分析システムではない。このため、現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定できる小型の新しい検査システムの開発が求められている。

2. 研究の目的

上記要求に応える検査システムとして、マイクロ化学分析システム(μ TAS)が注目されている。 μ TAS は分析時間の短縮、試薬量の削減、コストの低減、装置の小型化など多くの優れた特徴を有しており、国内外の数多くのグループにより精力的に研究が行われている。しかし、試薬や試料の送液に用いるポンプやバルブ、検出に用いるレーザーや顕微鏡などの周辺機器が大型かつ高価であるため、これをオンサイトやベッドサイドでの感染症検査に適用することは不可能である。一方、著者らはこのような μ TAS の送液系に関する問題を解決するために、コンパクトディスク(CD)型マイクロチップを用いる分析システムを開発している。これは、CD 型マイクロチップのリザーバー内に入れた試薬や試料をチップの回転により生じる遠心力を利用して送液し、目的物質を分離・検出するもので、ポンプやバルブが不要なため、分析システム全体の小型化に有用である。また、 μ TAS の検出系に関する問題を解決するために、LED や有機 EL を光源とし、無機フォトダイオードや有機フォトダイオードを光検出器とする小型でポータブルな蛍光検出システムを開発している。さらに、これらを組み合わせた CD 型マイクロチップを用いる蛍光検出システムを開発している。これにより、周辺機器も含めて真にポータブルな μ TAS を実現することができた。しかし、この分析システムは、光源と検出器が固定され、CD 型マイクロチップのみが回転する構造であるため、試料導入と分離の操作を行った後、チップを停止させてから検出を行わなければならない。

そこで本研究では、小型で全自動かつ迅速

診断が可能な感染症検査システムを開発することを目的として、リアルタイム測定が可能な新規 CD 型蛍光検出システムを開発した。本システムは光源と光検出器を CD 型マイクロチップと一緒に回転させるにより、リアルタイム測定を可能にしている。さらに、バッテリー駆動が可能な携帯型蛍光検出システムを開発し、これを用いたウイルス抗体検査を検討した。

3. 研究の方法

(1) ターンテーブルの開発

CD 型マイクロチップを回転させるためのターンテーブル(図 1)を作製した。本ターンテーブルはモーターに印加する電圧を変えることにより、回転速度を 7895rpm まで変化させることが可能である。

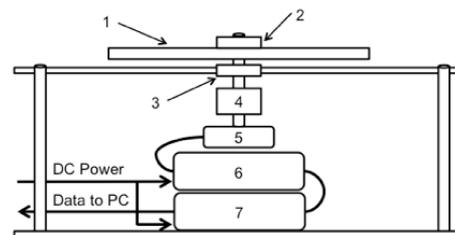


図1 ターンテーブル

1: CD型マイクロチップ、2: 固定治具、3: シャフトベアリング、4: カプラー、5: プラシレス直流モーター、6: PWMモーターコントローラー、7: D/Aコンバーター

(2) CD 型マイクロチップの作製

シリコン基板上にネガ型フォトレジスト(SU-8)を滴下し、500 rpm で 20 秒間回転させた後、さらに 2000 rpm で 20 秒間回転させた。この基板を 95 で 10 分間ベークした後、目的流路を描写したフォトマスクを重ね、紫外線を露光した。次に、95 で 3 分間ベークした後、専用現像液で現像し、さらに 200 で 3 分間ベークして、マイクロチップの鋳型となる凸型テンプレートを作製した。このテンプレートを用いてポリジメチルシロキサン(PDMS)製のマイクロチップを作製した。すなわち、テンプレート上に触媒を添加した PDMS プレポリマーを流し込み、60 で 1 時間ベークして硬化させた。これをテンプレートから剥離し、試料リザーバー用の穴を開けた後、ポリカーボネートディスクと張り合わせ、CD 型マイクロチップ(図 2)を作製した。

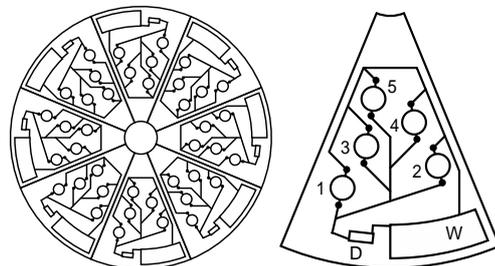


図2 CD型マイクロチップのデザイン

マイクロチップ: 直径 120 mm、マイクロチャネル: 幅 500 μ m、深さ 50 μ m、1-5: 試薬及び試料リザーバー(直径 5 mm、深さ 2.5 mm)、D: 検出チャンバー(2 x 5 mm、深さ 50 μ m)、W: 廃液リザーバー(6 x 20 mm、深さ 2.5 mm)

(3)リアルタイム測定が可能な CD 型蛍光検出システムの開発

光硬化性 3D プリンターを用いて作製したホルダーに LED を取り付けた。また、フライス加工機を用いて加工したアクリル板に、フォトダイオード、バッテリー、I/V 変換アンプ、データロガーなどを取り付けた。これらを CD 型マイクロチップに重ね合わせ、光源と検出器および CD 型マイクロチップが一体となって回転する蛍光検出システム(図 3)を開発した。これを用いて、グルコースの測定を検討した。グルコースの測定に用いた CD 型マイクロチップのデザインを図 4 に示す。

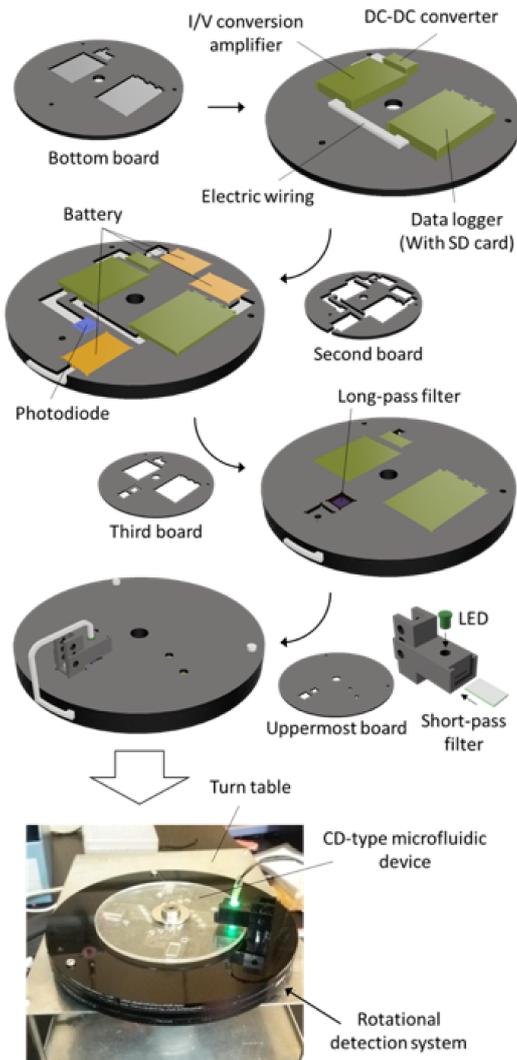


図3リアルタイム測定が可能な CD型蛍光検出システム

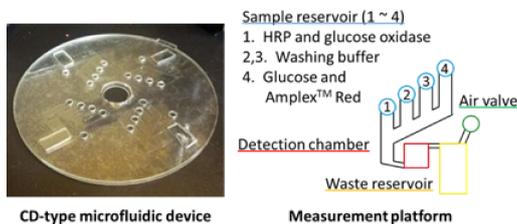


図4 グルコースの測定に用いたCD型マイクロチップのデザイン

(4) 携帯型蛍光検出システムの開発

LED とフォトダイオードを用いて手のひらサイズの携帯型 9ch 蛍光検出システム(図 5)を開発した。本蛍光検出システムはバッテリー駆動が可能で、パソコンやタブレット端末を用いて Bluetooth 通信によりワイヤレス測定が可能である。この検出システムと、PDMS および活性炭を用いて作製した専用の 9 穴マイクロタイタープレートを用いて、ヒト血清中に含まれる麻疹 IgG の測定を検討した。

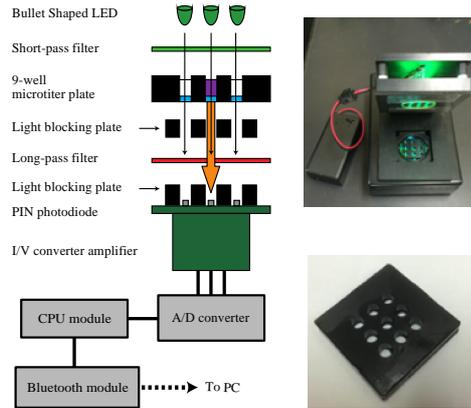


図5 携帯型蛍光検出システムと 9穴マイクロタイタープレート

4. 研究成果

(1) 遠心力を利用した送液の検討

CD 型マイクロチップのリザーバー内の溶液が流れ出す回転速度は、チップの中心からリザーバーまでの距離(回転半径)、リザーバー出口(マイクロチャネル入口)の断面積、溶液の密度、リザーバー内の溶液の遠心方向の深さおよび表面張力に依存する。したがって、回転半径が異なれば溶液が流れ出す回転速度も異なるので、CD 型マイクロチップの回転速度を段階的に上げていくことにより、中心から最も遠いリザーバーから順に溶液を検出チャンバーに送液することができる。このことをシミュレーションと実験(図 6)の両面から明らかにすることができた。

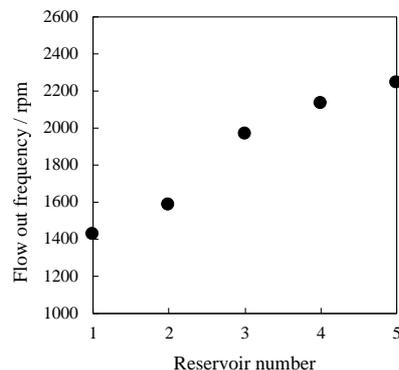


図6 リザーバーの位置と溶液が流れ出す回転速度の関係
回転半径: 1. 45 mm; 2. 40 mm; 3. 35 mm; 4. 30 mm; 5. 25 mm

(2) CD 型マイクロチップを用いる蛍光検出システムによる唾液中 IgA の定量

CD 型マイクロチップを用いる蛍光検出システムを用いて ELISA によるストレスマーカー

ーの一種である唾液中 IgA の定量を検討した。IgA に対する検量線(図 7)は 225 ng/mL 以下の濃度範囲において良好な直線性 ($r^2=0.999$) を示し、検出限界(3 σ)は 71.4 ng/mL と見積もられた。また、本システムにより得られた唾液中に含まれる IgA の定量値は、96 穴マイクロタイタープレートを用いる従来法により得られた定量値とよく一致した。IgA はヒトの唾液中に 110~220 $\mu\text{g/mL}$ 程度含まれ、ストレスによりその濃度が変化することが報告されているので、本法を用いて客観的にヒトのストレスを評価できる可能性がある。

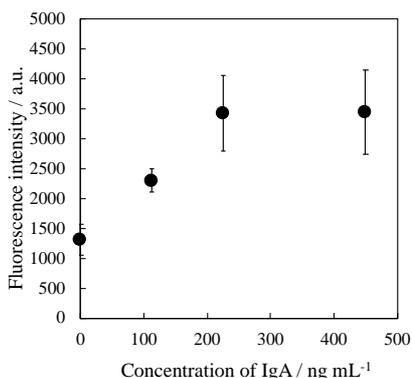


図7 IgAに対する検量線

(3) リアルタイム測定が可能な CD 型蛍光検出システムによるグルコースの定量

3-(3)で開発した CD 型蛍光検出システムを用いて、グルコースのリアルタイム測定を検討した。リザーバー1内の HRP とグルコースオキシダーゼを含む溶液を遠心力により送液して、検出チャンバー内壁に HRP とグルコースオキシダーゼを固定化した。検出チャンバー内の遊離の HRP とグルコースオキシダーゼを緩衝液で 2 回洗浄した後、リザーバー4内の種々の濃度のグルコースと AmplexTM Red を含む試料溶液を検出チャンバーに送液した。このときの蛍光強度の変化を CD 型マイクロチップを回転させたままリアルタイムに測定した。100 μM のグルコースを含む試料溶液を導入したときの蛍光強度の変化を図 8 に示す。試料溶液に含まれるグルコースは検出チャンバー内壁に固定化されたグルコースオキシダーゼにより酸化され、グルコノラクトンと過酸化水素を生成する。一方、試料溶液中の AmplexTM Red は生成した過酸化水素と検出チャンバー内壁に固定化された HRP と反応して蛍光性のレゾルフィンを生成する。したがって、反応時間が増加するにしたがって蛍光強度も増加する。図 8 から明らかのように、本システムを用いてこの蛍光強度の増加をリアルタイムに測定することに成功した。グルコースに対する検量線は、50 μM 以下の濃度範囲において良好な直線性 ($r^2=0.992$) を示し、検出限界(3 σ)は 22 pmol と見積もられた。これらの結果は、本研究で開発した CD 型蛍光検出システムを用いて、試料溶液に含まれる目的成分の蛍光をリアルタイムに測定できることを示している。

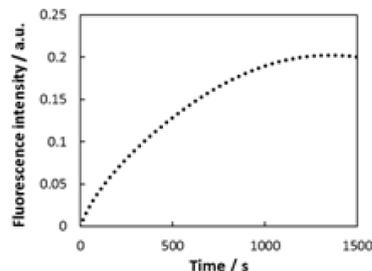


図8 グルコースを含む試料溶液を遠心力により検出チャンバーに送液したときの蛍光強度の変化

(4) 携帯型蛍光検出システムによるウイルス抗体検査

開発した携帯型蛍光検出システムを感染検査に適用できるかどうか検証するために、ヒト血清中に含まれる麻疹 IgG の測定を検討した。本実験では、ヒト血清試料 10 検体に加え、比較対照として陽性コントロール(pc)と陰性コントロール(nc)を測定し、血清試料の蛍光強度が pc の蛍光強度よりも大きい場合を陽性、小さい場合を陰性とした。測定結果を図 9 に示す。本法と従来法のいずれにおいても、血清試料 1~5 は麻疹 IgG に対して陽性を示し、血清試料 6~10 は陰性を示した。これらの結果は、本研究で開発した携帯型蛍光検出システムをウイルス抗体検査に適用できることを示している。

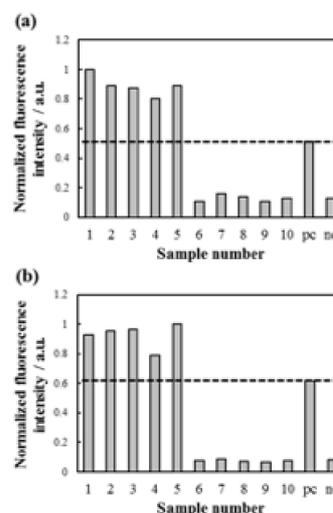


図9 麻疹 IgG の測定結果

(a) 携帯型蛍光検出システム, (b) 96 穴マイクロタイタープレートとプレートリーダーを用いる従来法

(5) 結論

本研究では、リアルタイム測定が可能な CD 型蛍光検出システムを開発した。また、バッテリー駆動が可能な携帯型蛍光検出システムを開発し、これを用いたウイルス抗体検査に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Yong Zhang, Sifeng Mao, Yuma Suzuki, Yumi Tanaka, Masato Kawaguchi, Weifei Zhang, Hulie Zeng, Hizuru Nakajima, Ming Yang, Katsumi Uchiyama, Elaborately programmed nanowires

fabricated using a tapered push-pull nozzle system, *Chem. Comm.*, **54**, 719-722 (2018), 10.1039/C7CC07873K, 査読有.

Hulie Zeng, Sifeng Mao, Yong Zhang, Hizuru Nakajima, Katsumi Uchiyama, Reversibly electro-controllable polymer brush for electro-switchable friction, *J. Mater. Chem. C*, **5**, 5877-5881 (2017), 10.1039/C7TC01624G, 査読有.

Hulie Zeng, Yong Zhang, Hizuru Nakajima, Katsumi Uchiyama, Stably electro-switchable poly-allyloxy hydroxypropyl sulfonate branched brush towards reversible capture and release of proteins and cells, *Sensor. Actuat. B*, **251**, 334-338 (2017), <http://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.032>, 査読有.

Jianmin Yang, Daisuke Katagiri, Sifeng Mao, Hulie Zeng, Hizuru Nakajima, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Inkjet printing based assembly of thermoresponsive core-shell polymer microcapsules for controlled drug release, *J. Mater. Chem. B*, **4**, 4156-4163 (2016), 10.1039/C6TB00424E, 査読有.

Jie Zhan, Koji Furui, Hizuru Nakajima, Noriaki Kaneki, Ryoichi, Ishimatsu, Koji Nakano, Toshihiko Imato, Akihide Hemmi, Development of a portable surface plasmon resonance sensor with multi-sensing points based on the linear CCD sensor, *Anal. Sci.*, **32**, 673-679 (2016), 10.2116/analsci.32.673, 査読有.

Hulie Zeng, Daisuke Katagiri, Taisuke Ogino, Hizuru Nakajima, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Droplet enhanced fluorescence for ultrasensitive detection using inkjet, *Anal. Chem.*, **88**, 6135-6139 (2016), 10.1021/acs.analchem.6b01566, 査読有.

Sifeng Mao, Chiho Sato, Yuma Suzuki, Jianmin Yang, Hulie Zeng, Hizuru Nakajima, Ming Yang, Jin-Ming Lin, Katsumi Uchiyama, Microchemical pen: an open microreactor for region-selective surface modification, *Chem. Phys. Chem.*, **17**, 3155-3159 (2016), 10.1002/cphc.201600857, 査読有.

Weifei Zhang, Sifeng Mao, Jianmin Yang, Hulie Zeng, Hizuru Nakajima, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, The use of an inkjet injection technique in immunoassays by quantitative on-line electrophoretically mediated microanalysis, *J. Chromatogr. A*, **1477**, 127-131 (2016), 10.1016/j.chroma.2016.11.041, 査読有.

Kazuhiro Morioka, Hizuru Nakajima,

Akihide Hemmi, Shinpei Iida, Fumi Kitamura, Hulie Zeng, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Investigation of simultaneous immunoassay by a two-dimensional surface plasmon resonance sensor using multiplied beam splitting optics, *Bunsekikagaku*, **65**, 79-85 (2016), <https://www.jsac.jp/node/47>, 査読有.

Hulie Zeng, Jianmin Yang, Daisuke Katagiri, Ying Rang, Shuhua Xue, Hizuru Nakajima, Katsumi Uchiyama, Investigation of monodisperse droplet generation in liquids by inkjet, *Sensor. Actuat. B*, **220**, 958-961 (2015), 10.1016/j.snb.2015.06.027, 査読有.

Ying Rang, Hulie Zeng, Hizuru Nakajima, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Quantitative on-line concentration for capillary electrophoresis with inkjet sample introduction technique, *J. Sep. Sci.*, **38**, 2722-2728 (2015), 10.1002/jssc.201500201, 査読有.

[学会発表](計 33 件)

Miyu Nakajima, Atsushi Shoji, Kenji Morita, Kazuhiro Morioka, Akiyo Yanagida, Akihide Hemmi, Hulie Zeng, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima, Development of surface plasmon resonance sensor using an optical fiber prepared by electroless displacement gold plating method, *PITTCON 2018*, Orlando, USA (2018).

Kazuhiro Morioka, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Hulie Zeng, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Development of portable fluorescence detection system using an organic photodiode array detector, *PITTCON 2017*, Chicago, USA (2017).

Kazuhiro Morioka, Harpal Singh, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Masayuki Shimojima, Le Van An, Sazaly AbuBakar, Hulie Zeng, Shungo Kato, Masami Sugamata, Ming Yang, Katsumi Uchiyama, Development of Portable ELISA System for Infectious Disease Diagnosis, *PITTCON 2016*, Atlanta, USA (2016).

[その他]

ホームページ等

<https://www.tmu.ac.jp/stafflist/data/na/653.html>

6. 研究組織

研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA, Hizuru)

首都大学東京・大学院都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858