

令和元年6月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05833

研究課題名(和文) 超高感度・簡便・迅速な診断を目指した紙・フィルム・テープで作る分析チップ

研究課題名(英文) Simple and high-performance diagnostics chip using paper, film and tape

研究代表者

瀧脇 雄介 (Fuchiwaki, Yusuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80468884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：紙・フィルム・テープを貼り合わせて作製したマイクロ流路で、試薬を滴下してスマホで酵素反応に伴う発色を測ることにより、実験室で行うMicroplate ELISA法と同等以上の感度を15分で実現できる分析チップを開発した。またイムノクロマト法で汎用されているセルロース膜上の抗原抗体反応よりも、100倍以上高感度に測定した。さらに試薬を順次滴下できるPress-Through-Package方式のカートリッジを独自に開発し、これらの技術を組み合わせることで、検体の滴下から測定までを全自動で行う小型のプロトタイプ機とそれらのキット化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、安価な紙・フィルム・テープから構成される新しい分析チップを開発し、液の滴下だけの操作で、発色と酵素免疫測定法による高感度検知に成功した。また、臨床分野の簡易検査におけるゴールドスタンダードのイムノクロマト法に比べて、100倍以上高感度に測定できることを実証した。途上国や緊急時の医療検査では、費用、耐久性、使い易さが大きな障害となっていたが、液の滴下だけの操作であれば専門知識のない人でも手軽に使えることから本法は実用化に向けて卓越したメリットがある。また多くの市販のキット組み合わせることにより高い選択性と幅広い検査への展開も可能であるため、多様な学術分野への水平展開が強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Although paper-based microfluidic chip devices are an ideal platform for point-of-care diagnostics, it is difficult to achieve microfluidic control required for sensitive analyses such as ELISA on a paper substrate. In this study, we developed a novel lateral-flow test chip that can perform operations like a pump, such as flowing, stopping, and replacing a solution, just by adding the solution onto an inlet. For sensitive and accurate detection, the transparency and flatness of the substrate is crucial for precise analysis of weak light generated by a specific reaction. The signal intensity of the novel chip was higher than that of a chip made of nitrocellulose membrane, and the variation was smaller. The limit of detection of the chip was 0.1 ng/ml, whereas that of the nitrocellulose membrane was 100 ng/ml. In addition, we succeeded in developing a compact prototype equipment by combining these technologies.

研究分野：分析化学

キーワード：チップ キット イムノクロマト 紙

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

途上国や緊急時の医療診断では、費用、耐久性、使い易さが医療技術の大きな障害となっている。これに対して、簡易な臨床検査法として利用されているイムノクロマトグラフィー（IC）法は、液を点着させるだけで手軽に扱うことができることから妊娠検査薬やインフルエンザなどの感染症の現場で活躍している。しかし、IC法のデメリットとして、セルロースなどの膜上で色の変化を検知することから「色むら・にじみ」の影響や、膜上で「微量の検体をはかることが難しい」等といったことがあった。更に多項目のバイオマーカーを測るためには、滴下する試薬量や、膜内での液の流速或は膜への非特異吸着の発生により、高感度に測ることができないという課題があった。

一方で学術的には、米国を中心として紙をベースにした分析チップが盛んに研究開発されており、サンドイッチ免疫測定法を紙上で連続的に実施される方法や、複数の反応液を予め浸み込ませた紙を順次折り畳むことで逐次的に反応を進行させる方法等が主に報告されてきた。しかし、微量の検体を正確にはかるには、「紙」自体の色むら・にじみの発生の低減や、正確な流体制御を実現する必要があった。

そこで本研究では「紙」のメリットである素材の安価さや、ポンプを使わずに液が自ら流動していくといった手軽さは堅持しつつ、多項目を高感度に測ることができる、新しい分析チップの開発に取り組んだ。予備検討として、フィルムとテープを用いて貼り合わせることでマイクロ流路の作製を行った。マイクロ流路の側面にはテープを用いて上面と下面からフィルムで貼り合わせることで、微量の液が自ら流動していくマイクロ流路を作製した。液を滴下するだけで、「流す」「止める」「液を入れ替える」といったポンプのような操作を、繰り返し行うことができる。また、反応に伴う発色や発光・蛍光などを測る部分は、透明なフィルムを用いるため微量な色の変化も明瞭検知できると考えられる。そこで本研究では、新しい本マイクロ流路による分析チップを利用して、従来のセルロース膜上での反応より高感度にバイオマーカーを検知することを目的に検討を行った。

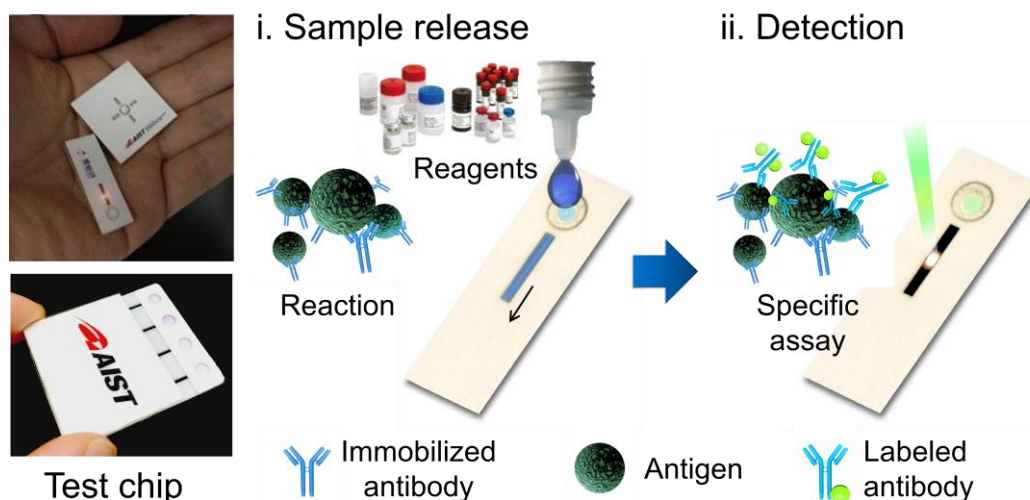


図1 フィルムとテープを貼り合わせたマイクロ流路の分析チップ

2. 研究の目的

一般的にラボで行われている 96well プレートを用いた酵素免疫測定（ELISA）法などは、洗浄液や複数の試薬を用いて選択的な反応を逐次的に進める。多項目測定は項目間の交差反応を回避するため、1項目に1 well を設けて、反応場とプロトコルを設定することが望ましい。

そこで本研究では、試薬や洗浄液を滴下すれば数十～数百 μm のマイクロ空間でそれらが自動的に計量されて入れ替わり・反応するマイクロ流路を開発することを目指した。予めフィルムとテープから構成されるマイクロ流路上に抗体などの分子を固相化しておけば、滴下量を気にする必要がなく、選択的な反応を逐次的に進めていくことができる（図2）。また1項目に1流路を設けて多項目の測定を行うため、特別なスキルは必要としない。

本分析チップはイムノクロマト法と異なり、サンドイッチ免疫アッセイに基づく測定をセルロース膜上ではなく、透明なフィルム上で実現することができる。更に、液を滴下させるだけで自動的に微量な液をマイクロ流路内で入れ替えることができるため、洗浄操作によって非特異吸着を除去できることや、反応しなかった抗原や抗体を洗浄除去することもできる。そのため安価かつ簡便さは維持しつつ、IC法やセルロース膜上での反応よりも、高感度に測定できることを目的とした。具体的にはインフルエンザのリコビナントタンパクと炎症性サイトカインの C-reactive protein (CRP) を高感度に定量すること目的とした。

更に、液の滴下から測定までを自動化することを目指してプロトタイプの構築についても検討を行った。これにより本法の操作法における優位性も構築することを目指した。

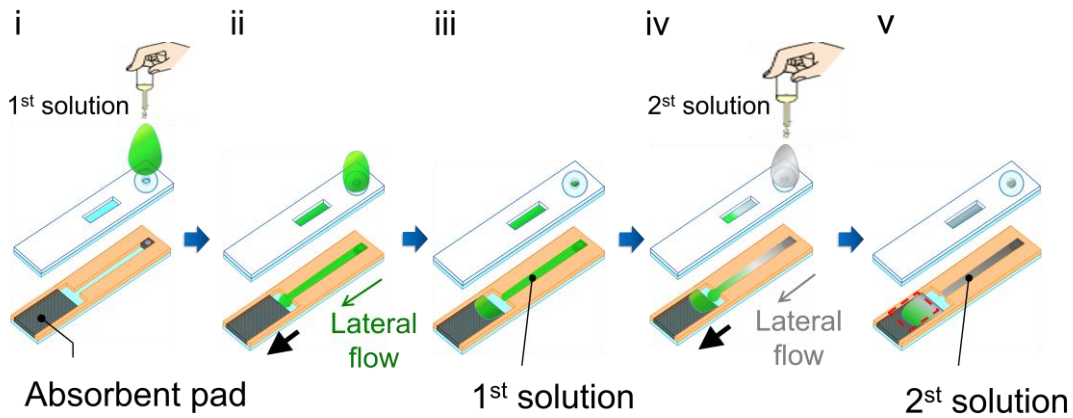


図2 液を滴下するとマイクロ流路内で液が自動的に入れ替わるイメージ図

3. 研究の方法

流路の構造は、市販のフィルムと両面テープで構成されており、フィルムの表面には帯電性を付与した。フィルムは柔らかい素材であるため流路の一部を塞ぐことがあるが、水溶性の溶液は静電気を帯びたフィルムの表面に強く引き寄せられるため、液はフィルムで塞がれた流路の間隙を自ら押し広げて流動していく。また柔らかいフィルムを適用することで、液が流動していく駆動力は毛管力ではなく、液自身の質量によってマイクロ流路内を流動していく。これにより別の液を流路の入口に滴下すると、滴下された液の質量によって予め流路内にあった液は下流部の吸収紙側に押し出されて、その結果として滴下された液に自動的に入れ替わることの最適条件を検討した。

実際に検出性能を評価するため、市販の ELISA 用の試薬と洗浄液を用いてインフルエンザのリコビナントタンパクと CRP をモデル抗原として測定を行った。また液の滴下から検出までを自動化するため、液を簡便に滴下するための使い捨て型のカートリッジの開発にも着手した。Press-through-package (PTP) により試薬を予め真空成型により作製した PTP 包装容器内に閉じ込めて、操作時に順番に PTP の包装容器を押し出すことによって包装容器内にある試薬が順番に外にリリースされて自動的に滴下される方法を考案した。検出法には、発色、化学発光、蛍光法の何れの検出方法でも測れることを実証するため、各検出法について検討を行った。

4. 研究成果

マイクロ流路内の溶液交換を調べるため、0.1M のリン酸緩衝液 (PBS) と FITC 蛍光試薬をマイクロ流路の入口に交互に滴下して、光ファイバー型蛍光検出器の蛍光プローブの先端をマイクロ流路の上面に設置することで蛍光強度の評価を行った。その結果、FITC 蛍光試薬を滴下したときはマイクロ流路内の蛍光強度が増加して、一定の高さで蛍光値が維持された。次に PBS を滴下すると、マイクロ流路内の蛍光値は FITC 蛍光試薬を滴下する前のバックグラウンドの値まで戻った。この操作を繰り返し行ったところ、同じように蛍光値が上下するデータが得られたことから、入口に液を滴下するとマイクロ流路内で液が完全に入れ替わることが確認された。

そこで実際に検出性能を評価するため、市販の ELISA 用の試薬と洗浄液を用いてモデル抗原の CRP とインフルエンザに対する検討を行った。CRP に対する化学発光 ELISA による測定を行ったところ、本マイクロ流路は CRP の基準値以下である 1-100 ng/ml の範囲において良好な直線性の相関を得ることができた。一方で、比較対照として、セルロース膜に対する CRP の化学発光 ELISA では、セルロース膜への非特異吸着によるバックグラウンドが大きかったため、1-100 ng/ml の範囲で CRP を検知することが困難であることがわかった。このことから、本マイクロ流路はセルロース膜に比べて CRP を約 1,000 倍明瞭に検知できることが示唆された (図3)。

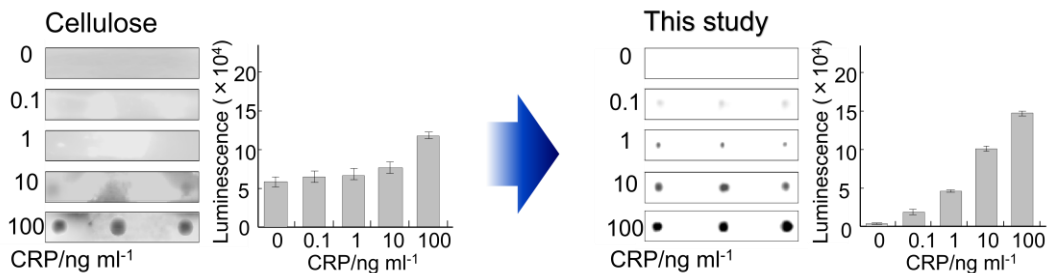


図3 セルロース膜と本分析チップでの化学発光シグナルの比較

一方で化学発光法は高価な検出装置を要することから簡便・低コストの測定法には向かない。そこで次に、酵素反応に伴う発色法を検討した。市販のインフルエンザ抗原に対する発色 ELISA 法のキットを用いて、サンドイッチ免疫アッセイ法により測定を行ったところ、抗原液の添加から検出まで 30 分で検知できることがわかった。また感度においては、96well マイクロプレートと同程度の感度で検知した。この発色法による測定は、酵素反応が進行するにつれて、目視で確認できる程の色の変化をマイクロ流路上で確認できたが、目視による色の判定は操作者の主観が入るため数値化することが望ましい。そこで色の濃淡を数値化できるスマートフォンのアプリを新たに開発した (図 4)。その結果、スマホアプリを用いて酵素反応に伴う発色を数値化して半定量できることがわかった。



図 4 色の濃淡を数値化できるアプリ

本法の実用化に向けた検討を更に進めるために、試薬を予め封入した PTP 包装によるカートリッジを順次押し出すことができるプレスローラーと、続けて抗原抗体反応に伴うシグナルを自動的に検知できる蛍光検出プローブを備えたプロトタイプを試作した (図 5)。蛍光検出を行う蛍光プローブは直線方向に 1 軸で動いて、分析チップの蛍光シグナルを検出することができる。検出された蛍光シグナルはタッチパネル式のディスプレイにリアルタイムに表示される。実際に FITC 標識抗体を用いて CRP に対する免疫アッセイを本プロトタイプで行ったところ、10-1,000 ng/ml の CRP に対して相関性のある検知を行うことができた。これにより、本分析チップとカートリッジを用いることで、検体の滴下から検出までを自動化できることがわかった。

今後は、これらの定量精度として、固相化抗体の濃度や標識抗体の濃度、最適な抗原抗体反応の時間、マイクロ流路側面粘着剤への成分の吸着等を改善することによって製品としての蓋然性が上がるため、これらの検討を推し進めたい。

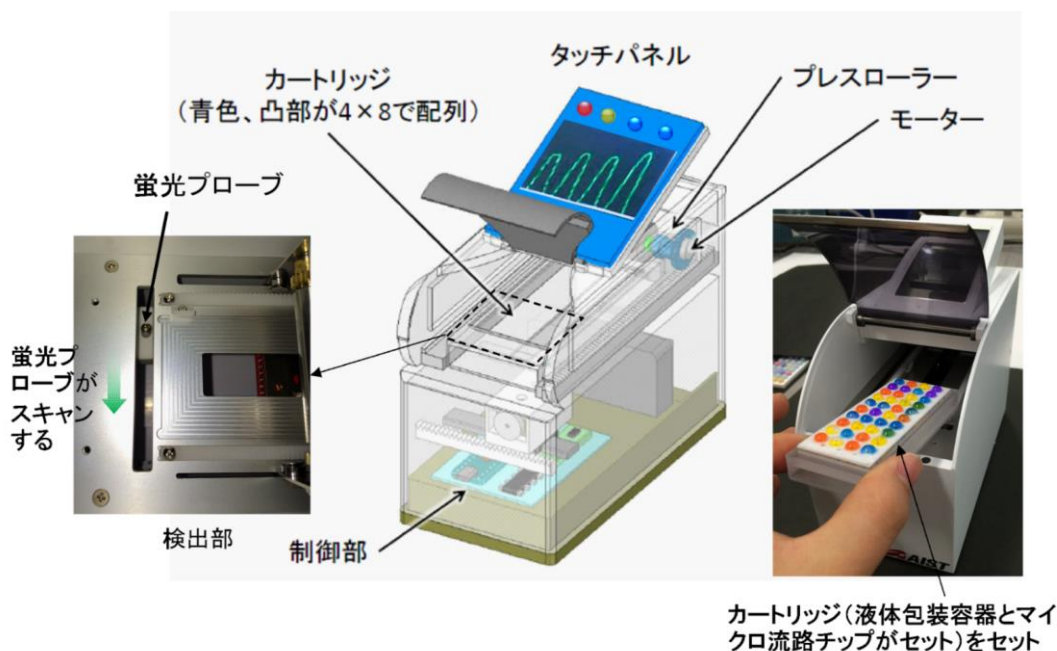


図 5 試薬の滴下から蛍光法による検出までを自動化したプロトタイプ検出装置

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Y. Fuchiwaki, K. Goya, M. Tanaka, "Practical high-performance lateral flow assay based on autonomous microfluidic replacement on a film" Anal. Sci., 34-1, pp. 57-63,

2018 査読有り

- ② K. Goya, Y. Fuchiwaki, “Paper-Like Surface Microstructure Fabricated on a Polymer Surface by Femtosecond Laser Machining” Anal. Sci., 34-1, pp.33-38, 2018 査読有り
- ③ Y. Fuchiwaki, M. Tanaka, T. Fujiwara, M. Kaneda, S. Yamamura, “Simple and High-Performance Diagnostics Test Chip & Kit Using Paper, Film and Tape” Chemical Sensors, 34(Suppl. B) pp.25-27, 2018 査読無し
- ④ Y. Fuchiwaki, K. Goya, M. Tanaka, H. Takaoka, “Flow production of practical and quantitative capillary driven-flow immune sensing chip using a circumferentially-grooved island micro-surface” Int. Journal of Engineering Research & Science, 3-3, pp.41-49, 2017 査読有り
- ⑤ K. Goya, Y. Yamachoshi, Y. Fuchiwaki, M. Tanaka, T. Ooie, M. Kataoka, K. Abe, “Femtosecond laser direct fabrication of micro-grooved textures on a capillary flow immunoassay microchip for spatially-selected antibody immobilization” Sens. Act. B, 269, pp.1275-1281, 2016 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① 涸脇 雄介、田中 正人、藤原 貴久、兼田 麦穂、山村 昌平、Simple and High-Performance Diagnostics Test Chip & Kit Using Paper, Film and Tape、2018 年電気化学秋季大会、2018
- ② 涸脇 雄介、田中 正人、藤原 貴久、兼田 麦穂、山村 昌平、スマートフォンと紙・フィルム・テープチップではかる、簡単・迅速な ELISA 代替キット、日本分析化学会第 67 年会、2018
- ③ 涸脇 雄介、紙・フィルム・テープでつくる低コストな医療診断用チップ/検査キット、P-MEC Japan 2018、2018
- ④ 涸脇 雄介、「どこでも」「だれでも」「簡単に」医療診断 - 低コスト医療診断を実現する、紙・フィルム・テープチップ-、サステイナブル技術連携促進シンポジウム「ヘルスケア」産業技術総合研究所 2018
- ⑤ 涸脇 雄介、田中 正人、合谷賢治、紙・フィルム・テープでつくる多項目検査キットの開発、日本化学会 第 98 春季年会、2018
- ⑥ 涸脇 雄介、合谷 賢治、田中 正人、紙とフィルムでつくる高感度な携帯型多項目生化学検査キットの試作、日本臨床検査自動化学会第 49 回大会、2017
- ⑦ 涸脇 雄介、手軽・低コスト医療診断を実現する、紙・フィルム・テープチップと検査キット、第 5 回次世代医療システム産業化フォーラム 2017、2017
- ⑧ 涸脇 雄介、合谷 賢治、田中 正人、紙とフィルムでつくる多項目分析チップと体外診断キットへの応用、日本分析化学会第 66 年会、2017
- ⑨ 合谷 賢治、涸脇 雄介、田中 正人、大家 利彦、Femtosecond laser surface modification of an immunoassay microchip for spatially-localized antibody immobilization, International Symposium on Laser Precision Microfabrication, 2017

[図書] (計 4 件)

- ① 涸脇 雄介、紙・フィルム・テープでつくる診断用チップ/検査キット、紙パルプ技術タイムス (Japanese Journal of Paper Technology)、2018、8
- ② 涸脇 雄介、「紙」を利用したその場簡易検査デバイス - Paper-Based Test Strip for Point-Of-Care Diagnostics -, BIO INDUSTRY、2018、35-4
- ③ 涸脇 雄介、紙製の化学分析用マイクロデバイス-Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μPADs)-、ぶんせき、2017、12
- ④ 涸脇 雄介、紙とフィルムでつくる多項目分析チップと体外診断キットへの応用、展望とトピックス (日本分析化学会 第 66 年会)、2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：液体包装容器及び液体吐出装置

発明者：涸脇雄介、合谷賢治、田中正人

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特許、PCT/JP2018/032770 (W I P O)

出願年：2018 年

国内外の別：国外

名称：アッセイプログラム及びアッセイ装置

発明者：涸脇雄介、田中正人

権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2018-137719
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：アッセイ装置
発明者：瀧脇雄介、田中正人
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2018-028995
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：アッセイ装置
発明者：瀧脇雄介、田中正人
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-254472
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：アッセイ装置
発明者：瀧脇雄介、田中正人
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-254473
出願年：2017 年
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：多孔質媒体を利用したアッセイ装置
発明者：瀧脇雄介、田中正人、大家利彦
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特 6281945
取得年：2018 年
国内外の別：国内

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。