

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01803

研究課題名(和文)外力支援近接場照明バイオセンサを用いた革新的疾病マーカー検査技術の開発

研究課題名(英文) Development of innovative disease marker testing technology using external force-assisted nearfield illumination biosensor

研究代表者

安浦 雅人 (Yasuura, Masato)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：20760408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：外力支援近接場照明バイオセンサ(EFA-NIバイオセンサ)を用いたウイルス検出系をベースに、超高感度タンパク質検出系を構築した。他手法との感度比較のため、市販の感染性を無くしたインフルエンザウイルス粒子をサンプルに用いて、PCR法によるウイルス核酸検出とEFA-NIバイオセンサによるウイルス核タンパク質(ウイルス1粒子に1000個程度含まれる)の検出を並行して行った。その結果、EFA-NIバイオセンサによるタンパク質検出は、PCRの核酸検出感度と同様aMレベルの検出感度を実現した。また、蛍光標識を用いたマルチ検出の実現に向け、近接場照明系の改良を行い、増強度向上と複数波長増強に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

夾雑物耐性が高いという生体由来の測定サンプルに有利な特徴を持つEFA-NIバイオセンサを改良し、測定対象をウイルスからタンパク質に拡張した。定量性の向上に関するアプローチも成果を上げており、ウイルスが「いる」「いない」という検出だけでなく、様々な病気の診断に利用できる極低濃度のタンパク質の定量を可能にする基礎を固めた。また、近接場照明系の改良により、安価なチップでも増強効率を高く保つ手法や複数波長の励起光を増強する手法を実現した。これらは、低コスト化や多項目検査の実現に繋がる成果である。

研究成果の概要(英文)：An ultrasensitive protein detection system was constructed based on a virus detection system using an external force-assisted nearfield illumination biosensor (EFA-NI biosensor). To compare the sensitivity with other methods, virus nucleic acid detection by PCR method and virus nucleoprotein detection by EFA-NI biosensor (about 1000 molecules are contained in a virus particle) were performed using commercially available non-infectious influenza virus particles as samples. As a result, protein detection by the EFA-NI biosensor achieved aM-level detection sensitivity similar to that of nucleic acid detection by PCR. In addition, we improved the near-field lighting system to realize multi-detection using fluorescent labels and succeeded in improving the intensity and enhancing multiple wavelengths.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：イムノアッセイ 超高感度 磁性粒子 導波モード

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

深刻な疾病の早期発見を目的として、様々な測定手法の開発が行われている。なかでも、低侵襲・非侵襲の測定技術開発は、患者に掛かるストレスが少ない測定手法として大きな注目を集めている。

診断において、疾病マーカーを含有する体液、とりわけ血液が用いられるが、血漿分離など採取後の前処理が必要な点、採血という侵襲性の手法が必要な点が問題となる。非侵襲性の手法として、尿や唾液などを用いる手法などが提案されているが、血液以外の体液は疾病マーカーの含有量などの点でデメリットがあり、SN比の飛躍的向上等の課題が山積、難航している。また、疾病の早期発見には患者自身が日々自主的に検査を行えることが望ましく、煩雑な前処理や洗浄等の工程が不要な手法が必要である。そのような状況下で、前処理・洗浄不要の体液中疾病マーカー高感度検出手法の開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、極微量の体液(血液・唾液・尿など)から疾病マーカーを短時間に測定可能なセンサを実現することである。

血漿分離や洗浄などの煩雑な手順を省き、希釈と混合の簡便な手順のみで15分以内に測定が可能なセンシング技術を開発し、個人が家庭で日々測定するための装置に即応可能な技術を確立する。前立腺特異抗原などの主要な疾病マーカー数種を指標として、体液中のマーカー測定を実証する。センサの基本技術には、申請者らが開発した高感度センサである外力支援接場照明バイオセンサ(EFA-NIバイオセンサ)を用いる。現状のEFA-NIバイオセンサは夾雑物が多量に含まれる環境中での高感度検出に優れ、aMレベルの検出を実現するが、定量性の改善が課題である。本開発では、EFA-NIの検出機構を装置・プロトコル両面から更に発展させて定量性を確保し、従来の常識を打ち破る全血からの微量疾病マーカー定量の実現を目指した。

### 3. 研究の方法

申請者らの保有技術であるEFA-NIバイオセンサを高度化し、定量性の実現と更なる夾雑物耐性の向上を図った。具体的には磁場印加プロトコルの改良や蛍光標識の導入によるアプローチを行った。EFA-NIバイオセンサの検出対象としてウイルス検出の実績があったことを利用し、aMレベルの検出を実現している他手法としてPCR測定系を導入し、開発するEFA-NIバイオセンサ改良検出系の性能評価に用いた。また、迅速化と高感度性の両立を図るべく、試薬濃度と粒径が与える影響をシミュレーションで評価し、最適条件の探索を理論面からも行った。

### 4. 研究成果

・EFA-NIバイオセンサによるタンパク質測定系の確立と他手法との比較評価  
リアルタイムPCR装置を導入し、同一のサンプルに対してqPCRによるウイルス検出とEFA-NIバイオセンサによるウイルスタンパク質(核たんぱく質を採用)検出を行い、その検出能力を比較した。市販の不活化済みインフルエンザウイルス抗原をサンプルとしたところ、ウイルス核酸をターゲットとするqPCRでは1pg/mLから、1ウイルス粒子当たり1000個程度含まれるとされる核たんぱく質をターゲットとしたEFA-NIバイオセンサでは1fg/mLから検出に成功した(図1)。

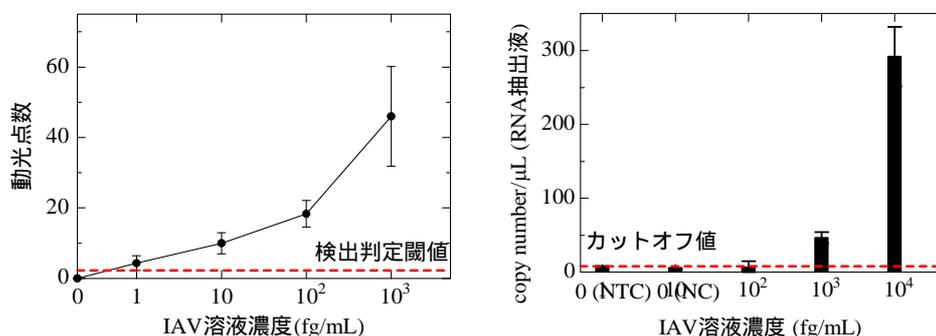


図1. インフルエンザウイルス (IAV) 同一サンプル検出結果 (左: EFA-NI バイオセンサによる核たんぱく質検出、右: qPCRによるウイルス核酸検出)

この成果は、「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウムにて報告した。

・EFA-NI バイオセンサの定量性向上

高感度検出において実績のあるノロウイルスのカプシドタンパク質をターゲットとして、EFA-NI バイオセンサの定量性を向上させるためのアプローチを模索した。従来の EFA-NI バイオセンサでは、磁性粒子とマーカーの間に 20 倍程度の粒径比があり、立体障害や修飾抗体のアフィニティの違いも影響して磁性粒子のみ或いはマーカーのみが結合してしまう状態が生じやすく、定量性が乏しい原因になっていると予想された。そこで、磁性粒子とマーカーの粒径比を 2~3 倍程度まで抑えることで、磁性粒子・マーカーともに複数個が同時にターゲットに対して結合できる状態を作りだし、磁性粒子のみ或いはマーカーのみが結合してしまう状態を起こりにくくしたところ、図 2 に示すように磁性粒子・マーカー濃度を超えない範囲で濃度に依存してシグナル数が顕著に増大する検出系の確立に成功した。

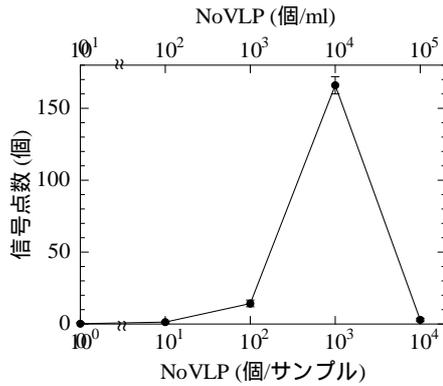


図 2 . 環境夾雑サンプル中添加 NoVLP の検出

この成果は、JJAP にて論文発表した。

・蛍光 EFA-NI に向けた近接場照明系の開発

蛍光標識を用いた検出においては、検出対象が小さく高々1個ずつの磁気微粒子及び標識しか結合できないタンパク質検出のために、従来の EFA-NI で用いた散乱タイプの光学標識に比して信号強度を高める必要が生じた。蛍光標識のサイズを最低数百 nm サイズ程度確保し、その全体に励起光が照射される必要がある。また、他項目検出のためには、同時に複数波長の蛍光励起が可能な光学系とする必要があった。そこで、EFA-NI バイオセンサの特徴である平板導波路チップを用いた近接場照明系を改良し、チップ上の同一位置で複数波長の導波モード励起を実現する光学系の実証実験を行い、多重染色した細胞の蛍光像の取得によりこれを実証した（図 3 左）。さらに、粒径の大きな蛍光標識にも、全体に励起光が照射されるように、励起光の増幅効率が高い安価な 3 層構造導波路チップの設計を導出した（図 3 右）。

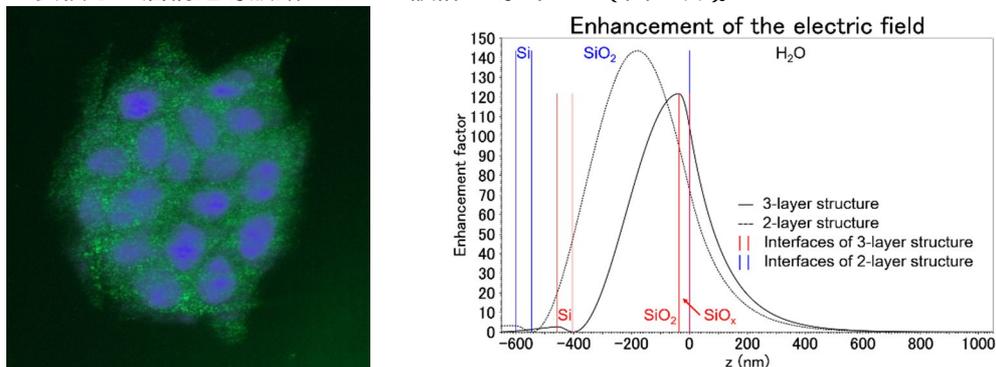


図 3 . 開発した近接場照明系用導波路チップを用いて照明・撮像した細胞多重染色蛍光像（左）と従来の 2 層構造導波路チップに比してチップ表面近傍での電場増強度が高い 3 層構造導波路チップ設計（右）

これらの成果は、それぞれ Sensors and Materials 誌にて論文発表した。

・EFA-NI バイオセンサの感度・反応速度に試薬濃度と粒径が与える影響に関するシミュレーション

EFA-NI バイオセンサにおいてより早く、より高効率にターゲット、磁気微粒子、及び標識の結合体を形成させるための反応条件を明らかにするため、反応速度論に基づく計算モデルを構築し、シミュレーションを行った。ブラウン運動によって衝突する粒子系を想定し、ターゲット粒子に対して微粒子が1つ、および2つ結合する場合につき、抗原抗体反応の解離反応も考慮に入れて計算した。微粒子が1つ結合する場合、ターゲットと微粒子の粒径比が大きいほど反応が早く進むことが分かった。また、磁気微粒子の初期濃度を高くすることが反応の高速化に有効であった。一方、微粒子が2つ結合する場合は、微粒子が1つ結合する場合と異なり、ターゲットと微粒子の粒径比が大き過ぎるとかえって反応速度が低下し、適切な粒径比が存在することが示された。

この成果は、電気学会 光応用・視覚/計測合同研究会にて学会発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuura Masato, Shirato Haruko, Higo-Moriguchi Kyoko, Fujimaki Makoto	4. 巻 58
2. 論文標題 Detection of norovirus-like particles with an external force-assisted near-field illumination biosensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 071005 ~ 071005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/1347-4065/ab29e2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuura Masato, Ueno Koji, Ashiba Hiroki, Nakaya Yuki, Fujimaki Makoto	4. 巻 32
2. 論文標題 Waveguide-mode Sensor Chip with Si/SiO <sub>2</sub> /SiO <sub>x</sub> Structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1567 ~ 1567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM.2020.2732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuura Masato, Fujimaki Makoto	4. 巻 31
2. 論文標題 Waveguide-mode Illumination for Enhanced Fluorescent Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 63 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM.2019.2044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Masato Yasuura, Makoto Fujimaki
2. 発表標題 Comparison of surface-modification types for sensor chips of the external force-assisted near-field illumination biosensor.
3. 学会等名 International Conference on Bio-Sensing Technology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashiba Hiroki, Fujimaki Makoto
2. 発表標題 External Force-Assisted Near-Field Illumination Biosensor for Blood Testing
3. 学会等名 International Conference on Materials for Advanced Technologies 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦葉 裕樹、藤巻 真
2. 発表標題 外力支援近接場照明バイオセンサによる血漿中タンパク質の高感度検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashiba Hiroki, Fujimaki Makoto
2. 発表標題 Ultrasensitive detection of hepatitis B virus antigen using an external force-assisted biosensor
3. 学会等名 Biosensors 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安浦雅人
2. 発表標題 外力支援型バイオアッセイ技術の開発と展開
3. 学会等名 新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会材料分科会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安浦雅人、藤巻真
2. 発表標題 外力支援蛍光バイオセンサによるインフルエンザウイルス検出
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦葉裕樹、仲屋友喜、佐藤洋隆、岩崎信太郎、間陽子、藤巻真
2. 発表標題 外力支援バイオセンサによる無細胞合成タンパク質検出
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安浦雅人、仲屋友喜、藤巻真
2. 発表標題 外力支援近接場照明(EFA-NI)バイオセンサによるインフルエンザウイルスの検出
3. 学会等名 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ashiba Hiroki, Nakaya Yuki, Sato Hirotaka, Aida Yoko, Fujimaki Makoto
2. 発表標題 Detection of proteins expressed by in vitro translation using external force-assisted biosensor
3. 学会等名 European Biosensor Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuura Masato, Fujimaki Makoto
2. 発表標題 Comparison of surface-modification types for sensor chips of the external force-assisted near-field illumination biosensor
3. 学会等名 6th International Conference on Bio-Sensing Technology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashiba Hiroki, Fujimaki Makoto
2. 発表標題 External Force-Assisted Near-Field Illumination Biosensor for Blood Testing
3. 学会等名 International Conference on Materials for Advanced Technologies 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安浦雅人、芦葉裕樹、藤巻真
2. 発表標題 導波モード照明のための3層構造平面導波路検討
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安浦雅人、芦葉裕樹、藤巻真
2. 発表標題 導波モード照明に適した平面導波路設計
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 會田紗瑛華、芦葉裕樹、安浦雅人、藤巻真、大木義路
2. 発表標題 ナノ粒子を用いたウイルス検出法における粒子結合挙動の理論解析
3. 学会等名 電気学会光応用・視覚/計測合同研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 標的物質検出装置	発明者 安浦 雅人、藤巻 真	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-145110	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	芦葉 裕樹  (Ashiba Hiroki)  (90712216)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員    (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------