

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02592

研究課題名(和文) タンパク・核酸の1分子デジタル計測が可能な印刷型センサーの開発

研究課題名(英文) Development of printable sensors enabling molecular digital measurement for proteins and nucleic acids

研究代表者

高村 禪 (Takamura, Yuzuru)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：20290877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は印刷技術で作成可能な試験片・チップを用いて、ローコストで簡便なデジタルELISA技術の開発を目指した。(1) Open Circuit Potential (OCP)とFETアレイを用いた分子計数技術開発では、OCP変化を増大させる条件を見出し、1分子に由来していると思われる信号の検出に成功した。(2) 酸化物FETによる核酸センサの開発では、様々な不安定要因を解決しLeishmania由来の核酸を検出できるセンサを開発した。(3) 紙ベースデジタルELISA計測法の開発では、1分子の感度は得られなかったが、副次的にアフラトキシン(B1)を高感度に測定できる紙ベースデバイスを開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子の高感度計測は、生命の研究の基礎から、癌の超早期発見、パンデミックの抑制などにおいても、大変重要である。デジタルELISA/PCR技術の登場で、分子を1個1個数えられる高感な測定が可能となりつつあるが、従来の装置は大型・高価で、また測定に時間がかかる欠点があった。本研究により、ローコスト・簡便なデジタル計測のための、幾つかのアプローチの基礎が確立できたと考えられ、その意味での学術的意義は大きい。また本研究は、将来的に集団検診や医療現場、その場検査にデジタル計測を導入するための技術開発に、大いに役立つと考えられ、その社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a low-cost and simple digital ELISA using test strips or chips that can be created by printing technology. (1) In the development of Digital ELISA using Open Circuit Potential (OCP) and field-effect transistor (FET) arrays, we found many factors to improve OCP changes, and successfully detected signals on the FET array that are considered to originate from a single molecule. (2) In the study of a high-sensitive nucleic acid sensor by a solid electrolyte gate thin film transistor (TFT), we solved various instability factors. Then by combination with an isothermal amplification of Recombinase Polymerase Amplification (RPA), finally we developed a sensor that can detect Leishmania-derived nucleic acids. (3) In the development of paper-based digital ELISA, single molecule sensitivity could not be obtained. But, subsequently we successfully developed a paper-based device that can measure aflatoxin (B1) with high sensitivity.

研究分野：バイオセンサー、微小流体デバイス、BioMEMS、マイクロプラズマ

キーワード：1分子計測 バイオセンサ デジタル計測 タンパク質 核酸 FETセンサ 酸化物TFT オープンサーキットポテンシャル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子の高感度計測は、バイオ医療研究の基礎から、癌の超早期発見、パンデミックの抑制まで、非常に重要である。当時、タンパク質等の濃度・量の計測は、従来のアナログ的な方法に加え、1個1個の分子をカウントする、デジタル ELISA、デジタル PCR (以下デジタル計測) 技術が、実用面でも台頭してきた。Digital 計測は、非常に低い検出限界、非常に広いダイナミックレンジを併せ持ち、原理的には検量線を引かずに絶対計量(分子数を数える)が可能で、既に製品化されている。しかしながら、装置は大型・高価で、測定(特に酵素による信号増幅)に時間がかかり、集団検診やルーチンワーク、その場検査で利用できる様なものではない。従来のデジタル計測では、磁気ビーズに固定した抗体等を使い、これと試料とを混濁しターゲット分子を3次元空間で捕捉する。それを液滴やウエルアレイに再配置しかつ細分画化(小さな区画に閉じ込める)をする。各分画内で酵素により信号増幅(1個の酵素が複数の色素を作る)をし、1分子の有無を、検出可能な蛍光強度等に置き換えて2次元撮像素子やフローサイトメトリで計数する。この3次元空間での捕捉、再配置、細分画化、酵素による増幅の各ステップには、それなりの機器もしくは手間、注意と時間(10時間近く)が必要であった。

2. 研究の目的

デジタル ELISA/PCR 技術は測定対象分子の数を直接カウント(分子計数)し、従来より3~6桁低い検出限界を実現しているが、コスト・測定時間・簡便性においてまだ改善の余地がある。また、申請者らは印刷形成可能な高性能酸化物 TFT 群を開発し、その1系統は1細胞レベルの量の mRNA を増幅なしで直接検出可能なほど高性能な核酸センサになることを発見した。これらを組み合わせると、試験紙のような形状、使い勝手、コストで、分子計数が可能な生体分子計測方法を確立できる可能性がある。本申請では、新規分子計数法として(1) Open Circuit Potential (OCP) と FET array を用いた分子計数技術開発、(2) 固体電解質ゲート TFT による高性能核酸センサ、(3) 紙ベースデジタル ELISA/PCR 計測法の課題に取り組む。

3. 研究の方法

上記3つの課題において次の様に研究を行った。

(1) Open Circuit Potential と Oxide TFT array を用いた分子計数技術開発

Pt ナノ粒子を標識した抗体を用い、抗原抗体反応を用いて、標的分子に1対1対応して金属ナノ粒子を電極上に固定化させる。その後、酸化剤あるいは還元剤を導入すると、金属の触媒効果で、ナノ粒子が固定化された電極に電荷が移動し、その電極電位 (Open circuit Potential : OCP) は電荷の蓄積により時間と共に増加する。これをアレイ化し、それぞれの電極電位を、酸化物 TFT アクティブマトリックスを使って読み出すことでデジタル計測が可能となると考えた。初年度は、まずより大きな OCP 信号を発生させるナノ粒子の条件、還元剤の条件、電極寸法依存性、電極材料依存性を調べた。その結果、還元剤の消費が思ったより多いことも分かった。令和3年度は、測定条件や測定系を見直して、還元剤消費の影響をなるべく受けない実験方法を探った。令和4年度はそれらの結果を踏まえて、より大きな OCP 信号を発生させる条件を検討した。さらに、抗原抗体反応を至適に行えるよう、PH を調整した還元剤の開発にも着手した。これら最適な条件を使って FET 電位センサーアレイ上での測定を行い、OCP によるデジタル計測の実証を試みた。

(2) 固体電解質ゲート TFT による高性能核酸センサ開発

我々が開発した酸化物 TFT のある系統を用いると、非常に高感度に DNA や RNA を検出することができるが、その理由が分かっていなかった。我々は、本トランジスタにおいて、有機無機ハイブリッド材からなるゲート絶縁体が良好なイオン伝導体となっており、それが効率よくセンサ信号をチャンネルに集めるからと考えている(アンテナ効果)。令和2年度はこれを検証するために、様々な面積のゲート絶縁体(アンテナ)を作成し、それが感度に及ぼす影響を系統的に調べた。これにより高感度化の原理を明らかにするとともに、核酸検出をより高感度化し、デジタル計測につなげていく。まず特性を不安定化させる要因を再度調査し、特性との関連性を調べる。これにより、よりハイレベルな部分で、デバイスを安定化させる。そのうえで、構造や、測定に関連する各パラメータの依存性を調べ、高感度化とメカニズムの解明につなげていく。令和4年度は、これら不安定化要因の対策を行い、安定かつ高感度なデバイスを開発する。また、実サンプルの測定も行い、優位性を実証した。

(3) 紙ベースデジタル ELISA/PCR 計測法の開発

抗原抗体反応を迅速に検出できるイムノクロマトグラフィーをベースに、紙やニトロセルロース膜の網目に固定化された抗体を用いて、まず効率よく抗原を捕獲させる。捕獲した抗原1分子を核として選択的に色素塊を、肉眼でも見える大きさまで成長させることで、簡易に1分子計測が可能な、究極に安価、利便性の高いデバイスの開発を試みる。より効率の良い増幅方法の検討を行うために、(i) ALP BCIP/NBT を用いた系、(ii) 銀ナノ粒子で標識し、銀イオンによる増感を行う系 (iii) Bridge Amplification を用いた系を試みる。並行して、これらに必要な溶

液操作を自動化する Lab on Paper の開発も行う。

4. 研究成果

3つの課題について、成果を次にまとめる。

(1) Open Circuit Potential と Oxide TFT array を用いた分子計数技術開発

電極に1次抗体を固定化し、抗原導入後、Pt ナノ粒子を標識した抗体を結合させた。その後還元剤としてヒドラジンを導入すると、電極電位 OCP は電荷の蓄積により時間と共に減少した。ナノ粒子の条件、還元剤の条件、電極寸法依存性、電極材料を変化させ、より大きな OCP 変化を起こす条件を調べた。

また、表面の白金粒子密度、電気2重層容量をより正確に測定し、それらの結果を理論的モデルと合わせて検証し、ナノ粒子1個当たりの還元電流の大きさを見積もった。

その結果、触媒の電流と電極当たりの容量が、当初考えていたものよりかなり大きいということが分かった。これはより大きな信号が得られる良い面がある一方で、材料(還元剤)の消費を考慮する必要があることを意味する。

また、従来より用いていた還元剤は PH が 9 付近であり、ELISA のための抗原抗体反応にはあまり良い条件ではなかった。より高感度化のため、PH を 7 付近で調整可能な還元剤を調整した。

最後に、得られた最適な条件を用いて、FET 電位センサーアレイ上でヒト絨毛ゴナトロピン(hCG)をモデル材料として、OCP によるデジタル計測の実証を試みた。その結果1分子に対応していると思われる信号を得ることに成功した。さらに、hCG 濃度、 1×10^{-6} 、 3×10^{-6} IU/mL において、濃度と検出ピクセル数がほぼ比例するデータが得られた。これらにより、OCP を用いたデジタル ELISA がほぼ実証できたと考える。

(2) 固体電解質ゲート TFT による高性能核酸センサ開発

令和2年度は、本 TFT の高感度の主因として、ゲート材料が効率よくセンサ信号をチャンネルに集めるアンテナ効果を仮定し、その検証を主に行った。その結果、アンテナ効果はほぼ確認されたが、一方で、TFT 構造やプロセス条件、測定条件など様々な要素が、特性に影響を及ぼすことが分かった。また、本 TFT は非常に高感度なため、これまであまり問題にならなかったような不安定さが、全体の大きな不安定化につながっていることも改めて確認できた。

令和3年度は、TFT 構造やプロセス条件、測定条件など、特性を不安定化させる要因を徹底的に精査した。その結果、参照電極に起因する不安定化要因や、表面処理に起因する不安定化要因が新たにクローズアップされた。令和4年度は、これら不安定化要因の対策を行い、安定に核酸を検出できるデバイスを開発した。

さらに、これと等温増幅法である Recombinase polymerase amplification (RPA)法を組み合わせて、Leishmania 症原虫由来の核酸を検出できるセンサを開発し論文発表した[1]。

(3) 紙ベースデジタル ELISA/PCR 計測法の開発

(i) ALP BCIP/NBT を用いた系についてまず説明する。モデル材料として hCG を用い、ニトロセルロース膜に hCG 1 次抗体を固定化し、これに hCG 抗原、次にアルカリフォスファターゼ(ALP)で標識した hCG 2 次抗体を捕獲させる。最後に ALP の基質として 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt, nitro-blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) を加え、ALP の周りに不溶化した色素塊を成長させた。成長させたスポット塊を顕微鏡下で数え、濃度との関係を調べた。様々な試行錯誤の結果、反応スポットの数が濃度に比例する結果が得られたが、分子の数に比べ反応スポットの数は数桁ほど小さかった。これはニトロセルロース膜に厚みがあり、膜内部に成長したスポットは表面から数えられないことに起因すると考えられる。デジタルで計測可能ではあるが、感度はあまり良くない結果となった。

また、(ii)銀ナノ粒子で標識し、銀イオンによる増感の系、(iii)Bridge Amplification を用いた系についても試みたが、余り良い結果は得られなかった。

最後に、(i)の系を自動化するための Lab on a Paper の開発を行った。スクロースの様かい時間を利用した遅延弁を用いて、必要な溶液操作を自動化することができた。またこの自動化法を応用し、アフラトキシン(B1)を高感度に測定できる手法を確立し論文発表した[2]。

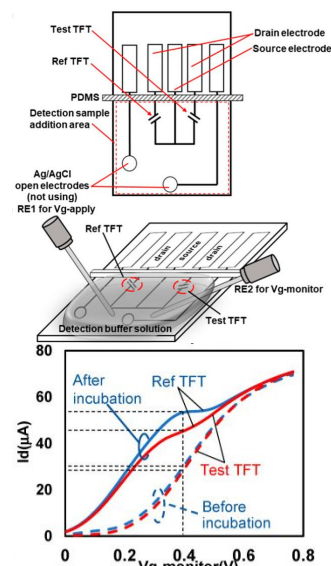


図1. RPA 法と酸化物 TFT による Leishmania の高感度検出[1]

さらに、hCG 濃度、 1×10^{-6} 、 3×10^{-6} IU/mL において、濃度と検出ピクセル数がほぼ比例するデータが得られた。これらにより、OCP を用いたデジタル ELISA がほぼ実証できたと考える。

令和2年度は、本 TFT の高感度の主因として、ゲート材料が効率よくセンサ信号をチャンネルに集めるアンテナ効果を仮定し、その検証を主に行った。その結果、アンテナ効果はほぼ確認されたが、一方で、TFT 構造やプロセス条件、測定条件など様々な要素が、特性に影響を及ぼすことが分かった。また、本 TFT は非常に高感度なため、これまであまり問題にならなかったような不安定さが、全体の大きな不安定化につながっていることも改めて確認できた。

令和3年度は、TFT 構造やプロセス条件、測定条件など、特性を不安定化させる要因を徹底的に精査した。その結果、参照電極に起因する不安定化要因や、表面処理に起因する不安定化要因が新たにクローズアップされた。令和4年度は、これら不安定化要因の対策を行い、安定に核酸を検出できるデバイスを開発した。

さらに、これと等温増幅法である Recombinase polymerase amplification (RPA)法を組み合わせて、Leishmania 症原虫由来の核酸を検出できるセンサを開発し論文発表した[1]。

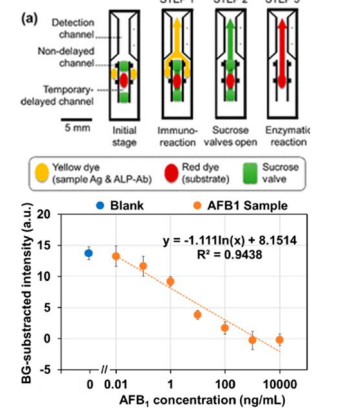


図2. 紙ベースデバイスによるアフラトキシンの高感度検出[2]

参考文献

[1] W. Wu et al, *Biosensors (Basel)* 2023,1,765. doi: 10.3390/bios13080765.
[2] S. Charernchai et al, *Anal. Chem.* 2022,94,5099. Doi: 10.1021/acs.analchem.1c05401

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sumamal Charernchai, Miyuki Chikae, Tue Trong Phan, Wanida Wonsawat, Daisuke Hirose, and Yuzuru Takamura	4. 巻 94
2. 論文標題 Automated Paper-Based Femtogram Sensing Device for Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Aflatoxin B1 Using Submicroliter Samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anal. Chem. 2022	6. 最初と最後の頁 5099-5105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.1c05401	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 該当する

1. 著者名 Radhika Biyani, Kirti Sharma, Kenji Kojima, Madhu Biyani, Vishnu Sharma, Tarun Kumawat, Kevin Maafu Juma, Itaru Yanagihara, Shinsuke Fujiwara, Eiichi Kodama, Yuzuru Takamura, Masahiro Takagi, Kiyoshi Yasukawa & Manish Biyani	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of robust isothermal RNA amplification assay for lab-free testing of RNA viruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports 2021	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95411-x	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 該当する

1. 著者名 Takaaki Abe, Shunya Okamoto, and Yoshiaki Ukita	4. 巻 33
2. 論文標題 High-Thick Thermal Reflow Process Using Vacuum-Assisted Micromolding for Submillimeter Microvalves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 4441-4453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95411-x	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 該当する

1. 著者名 Takaaki Abe, Shinsuke Oh-hara, and Yoshiaki Ukita	4. 巻 15
2. 論文標題 Adoption of reinforcement learning for the intelligent control of a microfluidic peristaltic pump, Biomechanics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomechanics	6. 最初と最後の頁 1-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0032377	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Shinichi, Shirasaki Takayoshi, Yamashita Taro, Iwabuchi Sadahiro, Suzuki Yutaka, Takamura Yuzuru, Ukita Yoshiaki, Deshimaru Shungo, Okayama Toshitugu, Ikeo Kazuho, Kuroki Kazuyuki, Kawaguchi Kazunori, Mizukoshi Eishiro, Matsushima Kouji, Honda Masao, Kaneko Shuichi	4. 巻 16
2. 論文標題 DOCK11 and DENND2A play pivotal roles in the maintenance of hepatitis B virus in host cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246313	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16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 高村 禅
2. 発表標題 プリントドマイクロチップ技術によるヘルスケアのためのバイオセンシング
3. 学会等名 「現場使用可能な新型コロナウイルス変異株RNA検出システムの開発 と 開発途上国・新興国での性能評価」のキックオフフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Biyani Manish, 高村 禅
2. 発表標題 コロナウィルスセンサ
3. 学会等名 サイレントボイスセンシング国際シンポジウム2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mohit, Daisuke Hirose, Eisuke Tokumitsu and Yuzuru Takamura
2. 発表標題 DNA biosensing using Indium Oxide thin film transistor with HfO2 as gate insulator prepared by solution process.
3. 学会等名 European Materials Research Society, Spring Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Etsu So, Yuzuru Takamura, Daisuke Hirose
2. 発表標題 Development of Immunosensor using metal nano particle and open-circuit potential
3. 学会等名 2022年 第69回 応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 SUMAMAL CHARERNCHAI, Miyuki Chikae, Wanida Wonsawat, Daisuke Hirose, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Development of automated paper-based femtogram sensing device for competitive ELISA of Aflatoxin B1 using sub-microliter samples
3. 学会等名 2022年 第69回 応用物理学会 春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 WU Weidong, Daisuke Hirose, Biyani Manish, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 High transconductance oxide transistor biosensor for nucleic acids detection
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sumamal Charernchai, Daisuke Hirose, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 A low-volume sample and highly sensitive paper-based device for automating competitive ELISA of aflatoxin B1
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Genki Takahashi, Daisuke Hirose, Biyani Manish, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Implementation of biosensor chips using 3D printer for virus detection
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 SU Yue, Daisuke Hirose, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Open circuit potential sensor research for single biomolecule detection
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Biosensing and Analysis using Microchip Technology
3. 学会等名 International Symposium on Silent Voice Sensing (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yueh-Han Huang, Daisuke Hirose, Meng-Jiy Wang, and Yuzuru Takamura
2. 発表標題 FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF AXIAL VIEW LIQUID ELECTRODE PLASMA
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本保, 高村禪
2. 発表標題 ガス不要・設置工事不要なプラズマ発光分光方式の元素分析装置の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第42回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 WU Weidong, Daisuke Hirose, Biyani Manish, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Research on a bacterial detection with a high transconductance oxide transistor
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumamal Charernchai, Daisuke Hirose, Biyani Manish, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Development of paper based analytical devices for highly sensitive immunoassay
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Ujike, Daisuke Hirose, Biyani Manish, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Development of a virus detection chip using high transconductance oxide transistors
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 SU Yue, Daisuke Hirose, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Biomolecule measurement research using OCP of gold electrode
3. 学会等名 Excellent Core Student Symposium in 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アレイ化バイオセンサー	発明者 高村禪、下田達也、 ファントウエチョ ン、廣瀬大亮、栗谷	権利者 国立大学法人北 陸先端科学技術 大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 43091	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

高村禪研究室 https://www.jaist.ac.jp/ms/labs/takamura/ JAIST Takamura Lab 高村(禪)研究室 2021 https://www.youtube.com/watch?v=2K3jjcb1084
--

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	廣瀬 大亮 (Hirose Daisuke) (20854673)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (13302)	
研究分担者	浮田 芳昭 (Ukita Yoshiaki) (40578100)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

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
---------	---------