

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04854

研究課題名（和文）超高感度ユビキタス検査技術による未病とバイオマーカーの相関解明

研究課題名（英文）Study on the correlation between pre-symptomatic state and biomarkers using ultra-sensitive and ubiquitous testing technology

研究代表者

笠間 敏博（Kasama, Toshihiro）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特任准教授

研究者番号：00564717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、感染初期のウイルス性呼吸器感染症患者の唾液に含まれるウイルス由来タンパク質の量や、超早期がん患者の血液に含まれるがん細胞由来マイクロRNAの量など、自覚症状がない未病患者の臨床検体に極めて希薄な濃度で含まれる疾病関連生体分子（バイオマーカー）に関する情報を明らかにするデバイスの開発である。

本研究期間においては、まず2021年度に、半導体製造技術を応用し、微細な構造から成るデバイスの作製法を確立した。2022年度には分析自動化システムの開発を実施するとともに、バイオマーカーの検出感度の評価を行った。2023年度には模擬臨床検体を使ってデバイスの評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、微細な構造を持つデバイスを半導体製造技術を応用して開発することに成功し、バイオマーカーの超高感度検出技術の確立に寄与。自動分析システムの開発により、分析の再現性が向上。未病段階における疾病関連生体分子の検出と解析により、未病のメカニズム理解が進み、予防医学の発展に貢献、などがある。

社会的意義として、未病段階でのバイオマーカー検出技術により、疾病の早期診断と予防が可能となり、患者のQOL（生活の質）向上に寄与。早期発見と予防によって、進行した病気の治療にかかるコストを削減し、医療経済に貢献。疾病の早期発見が公衆衛生の向上につながり、社会全体の健康状態が改善、などがある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to develop a device capable of identifying information related to disease-associated biomolecules (biomarkers) that are present in extremely low concentrations in clinical samples from patients without apparent symptoms (pre-symptomatic patients). These include viral-derived proteins in the saliva of patients with early-stage viral respiratory infections and cancer cell-derived microRNA in the blood of early-stage cancer patients. During the study period, in fiscal year 2021, we established a method for creating devices composed of micro-structures by applying semiconductor manufacturing techniques. In fiscal year 2022, we developed an analysis automation system and evaluated the detection sensitivity of biomarkers. In fiscal year 2023, we evaluated the device using simulated clinical samples.

研究分野：ナノ・マイクロデバイス

キーワード：バイオマーカー 未病 低侵襲検査 ユビキタス検査 イムノアッセイ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックにより、未病段階での診断の必要性がこれまで以上に高まっている。未病段階での診断には、頻繁に行うことができるユビキタス検査技術やバイオマーカーの超高感度検出技術が重要である。従来のイムノクロマト法などのユビキタス検査手法は操作が容易であるが、その感度が十分でなく、未病段階での診断には適さない。一方、数 aM 程度のバイオマーカーを検出する技術も既に存在するが、これらは分析が煩雑であり、ユビキタス検査の実現には至っていない。このように、未病段階の診断技術はまだ発展途上にある。未病段階での診断が特に重要な疾病として感染症が挙げられる。例えば、COVID-19 を例にとると、未病段階の患者を見つけて隔離することができれば、感染症の拡大防止に非常に有効である。特に COVID-19 に関しては、患者の体内で産生される中和抗体が短期間で減少することが報告されており、ワクチンに変わるパンデミック抑制手段として、未病段階のユビキタス検査技術は緊急に取り組むべき開発課題である。他にも結核や肝炎など、我が国でもまだ収束の見通しが立っていない感染症が多いが、これらも未病段階での診断が感染拡大防止や早期治療開始に繋がり、有効である。また、がんの早期診断も重要な課題である。超早期がん患者の血液中にはがん細胞由来のマイクロ RNA が極めて低濃度で存在するが、これを検出する技術は限られている。このように、未病段階におけるバイオマーカーの検出技術はまだ発展途上であり、未病とバイオマーカーの相関を明らかにするための新しい技術の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未病段階の患者から得られる臨床検体に含まれる極低濃度のバイオマーカーを高感度に検出するデバイスの開発である。具体的には、研究代表者が発見した感光性ポリビニルアルコール (PVA) の蛍光色素濃縮作用を利用し、臨床検体のような夾雑物を多く含む検体から生体分子を超高感度 (100 aM 程度、1 mL 中に約 60000 個) に検出する技術を開発する。これにより、従来の技術では困難であった未病段階での診断が可能となり、早期治療や感染拡大防止に寄与することが期待される。

本研究は、以下の3つを開発目標として設定している。

- 臨床検体のように細胞片などの夾雑物を含むサンプルを前処理なしで分析可能とすること。
- 分析デバイスとともに自動で分析を行う安価で簡易な自動分析装置も開発し、分析結果の再現性を向上させるとともに、あらゆる場所で分析できるようにすること。
- 数 aM 程度の生体分子を定量可能とすること。

夾雑物除去のために煩雑な前処理が必要であったり、複雑な液体操作が必要な場合、分析自動化のための機器が大型・高価になりやすく、ユビキタス検査を達成することが困難になるため、これらの目標を同時に達成することが重要である。これまで、ユビキタス検査とバイオマーカー超高感度検出の両立を目指した研究はほとんどなかった。しかし、研究代表者がこれまでの研究で用いてきた感光性 PVA は、硬化すると細胞片などの侵入を許さないため洗浄で簡単に除去できることがわかっており、臨床検体の分析実績がある。また、酵素基質反応によって生じた蛍光色素を内部に濃縮させることがわかっており、微量の抗原を高感度に検出できる。これらの性質を利用することで上記の3つの目標が達成できると考えた。

3. 研究の方法

本研究は以下の計画で進められた。

- 超高感度分析デバイスの開発 (2021 年度)

本研究では、比較的頑健で扱いやすい生体分子であるタンパク質を分析対象のバイオマーカーとし、抗原抗体反応によって検出した。本研究で用いる診断デバイス作製に用いる感光性 PVA を図 1 に示す。紫外線照射により、感光基 (アジ基) が他の PVA 鎖と化学結合して硬化する。タンパク質がアジ基の近くに存在していた場合には、タンパク質と化学結合する。本研究ではこの樹脂とアビジンの混合液をマイクロ流路に導入し、フォトマスクを通して紫外線照射することで、マイクロ流路内にアビジンが結合された PVA 樹脂構造物を作製した。その後、ビオチン標識抗体をマイクロ流路に導入し、ビオチン-アビジン結合によって抗体をその構造物に固定化した。これまでは比較的大きな構造物を反応場にしていたが、反応場の蛍光強度を短時間で上昇させるために、反応場を微細化・アレイ化した。これにより、バイオマーカーの超高感度検出を可能にした。

- 緩衝液中のタンパク質の検出 (2021 年度後半 ~ 2022 年度)

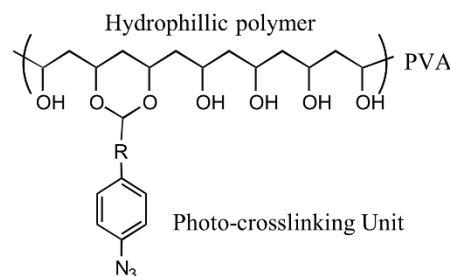


図 1 感光性 PVA の分子構造

ポンプによって検体や試薬を順に反応場へ送液する装置を開発するとともに、それを用いてサンドイッチイムノアッセイによって緩衝液中の抗原分子を定量分析した。抗原を含む1 mLの緩衝液を反応場に流し、抗原分子を反応場で捕捉および濃縮した。その後、酵素標識2次抗体と基質を順に反応場へ流した。抗原が捕捉されている反応場では、1次抗体-抗原-酵素標識2次抗体の複合体ができており、酵素基質反応によって生じた蛍光色素が反応場に蓄積して、反応場が明るい蛍光を発した。一方で複合体ができていない反応場は暗いままであった。蛍光を発する反応場の数 N は検体の濃度と相関があり、 N と抗原濃度の関係から検量線を得ることができた。バックグラウンドのシグナル強度とノイズから統計学的に検出限界を見積もり、デバイスの性能を評価した。

- 模擬臨床検体中のタンパク質の検出（2023年度）

臨床検体の代用として、低侵襲で採取できる唾液の市販品を購入し、それに抗原分子を溶解して、診断デバイスの分析性能を評価した。検出限界や分析誤差の面において、臨床検体に含まれる細胞片などの夾雑物が分析に及ぼす影響を重点的に調査した。

4. 研究成果

目標としていた超微細構造体アレイからなる抗原抗体反応場の開発に成功した。紫外線露光の方法を改良することで、これまでより微細な構造の抗原抗体反応場を作ることができた。また、構造の微細化と高密度化により、微小な空間に反応場を集積化できるようになり、マイクロ流路デバイスの特徴である分析試薬量の低減も同時に達成した。

ポンプと、それを制御するマイコンから成る送液装置を開発した。Python を使った制御ソフトウェアも開発し、任意の量の検体や洗浄液、分析試薬を任意の速度でマイクロ流路内の反応場に順に送液することに成功した。これにより、操作者のスキルに関係なく高い再現性をもった定量分析が可能となった。

開発した超微細構造体アレイを有する分析デバイスと送液装置を用いて、緩衝液や市販の唾液試薬にスパイクした 2019-nCoV のスパイクタンパク質を定量分析した。緩衝液中の検出限界濃度は約 100 fM、唾液検体中では約 1 pM であった。当初の目標よりも高くなったが、検出限界濃度は抗体の結合定数や 1 次抗体と 2 次抗体の組み合わせに大きく依存するため、他のクローンの抗体でも今後分析する必要があると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 J. Shin, T. Kasama, R. Miyake	4. 巻
2. 論文標題 MACHINE LEARNING-BASED QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD USING IMMUNO-WALL DEVICE	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2022)	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 X. Zhou, T. Kasama, R. Miyake	4. 巻
2. 論文標題 Sensitivity-improved immunoassay for SARS-CoV-2 spike protein in saliva without pretreatment by using immuno-wall microfluidic device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2022)	6. 最初と最後の頁 1197 ~ 1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Shin Jungchan, Kasama Toshihiro, Miyake Ryo	4. 巻 414
2. 論文標題 Development of cellulosic material-based microchannel device capable of fluorescence immunoassay of microsamples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3419 ~ 3428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-022-03963-2	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 Xiang Zhou, Toshihiro Kasama, Ryo Miyake	4. 巻
2. 論文標題 High-throughput and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein in saliva without pretreatment by using immuno-wall microdevices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceeding of microTAS 2021	6. 最初と最後の頁 839 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Shin Jungchan, Kasama Toshihiro, Miyake Ryo	4. 巻
2. 論文標題 DEVELOPMENT OF MICROCHANNEL IMMUNOASSAY DEVICE APPLYING THE TRANSPARENCY OF CELLULOSE-DERIVED MATERIALS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceeding of microTAS 2021	6. 最初と最後の頁 1413 ~ 1414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 J. Shin, T. Kasama, R. Miyake
2. 発表標題 MACHINE LEARNING-BASED QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD USING IMMUNO-WALL DEVICE
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 X. Zhou, T. Kasama, R. Miyake
2. 発表標題 Sensitivity-improved immunoassay for SARS-CoV-2 spike protein in saliva without pretreatment by using immuno-wall microfluidic device
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiang Zhou, Toshihiro Kasama, Ryo Miyake
2. 発表標題 High-throughput and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein in saliva without pretreatment by using immuno-wall microdevices
3. 学会等名 microTAS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin Jungchan, Kasama Toshihiro, Miyake Ryo
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF MICROCHANNEL IMMUNOASSAY DEVICE APPLYING THE TRANSPARENCY OF CELLULOSE-DERIVED MATERIALS
3. 学会等名 microTAS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 馬場嘉信、柳田 剛、加地範匡	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 244
3. 書名 AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 検体分析装置、検体分析方法	発明者 笠間敏博、三宅亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-189506	出願年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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