

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760295

研究課題名（和文） 環境中における粒子状アレルゲンのリアルタイム計測マイクロ流体デバイスの開発

研究課題名（英文） Microfluidic devise for real-time analysis of particulate allergen in an environment

研究代表者

荒川 貴博（ARAKAWA TAKAHIRO）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：50409637

研究成果の概要（和文）：

環境中に存在するアレルゲンに含まれるタンパク質のリアルタイム計測を目指した三次元マイクロ流体システムの構築を行った。空間中から粒子状物質をマイクロ流体デバイス中に取り込み、流体デバイス上に集積化された高感度、高選択性バイオセンサを利用して数 ng/mL オーダーにて計測可能なセンシングシステムを構築した。高度な計測技術を実現するため、要素技術を確立し、新しい環境モニタリングマイクロ流体システムを実現した。

研究成果の概要（英文）：

A microfluidic device for measuring of allergenic substances was fabricated and demonstrated. From the environmental points of view, a continuous measurement method of allergenic substances with high sensitivity and selectivity is strongly requested. Measurement range of ng/ml-level was established in this system. This microfluidic system allows us to evaluate various substances for an environmental monitoring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2400000	720000	3120000
2011年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：マイクロ流体デバイス、マイクロ流体システム、マイクロ流路、三次元構造体、PDMS、MEMS 技術、アレルゲン、環境計測

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患の有病率は年々増加傾向にあり、国民の30%以上が罹患しているといわれている。アレルギー性疾患は遺伝的要因と環境的要因の双方により発症するため、

環境中のアレルゲンを回避し除去することは発症予防や症状改善の対策として有効である。特に、チリダニ由来のアレルゲンは強いアレルゲン性を有しており、その環境中濃度の基準がWHOや文部科学省により設けら

れている。ダニアレルゲンの測定には免疫計測法が広く用いられているが、特別な設備や施設が必要であり、煩雑な操作を要する場合や結果を得るまでに時間を要するといった問題があるため、生活環境におけるアレルゲンの簡便な評価技術が求められている。

アレルゲンとなるものはダニ、真菌などそのものではなくアレルゲン中に含まれるタンパク質や糖タンパク質であるため、人体を構成しているタンパク質に対し異種タンパク質であるため、抗体が生成されることにより過剰な免疫反応としてアレルギー症状を発症してしまうと考えられている。現状では、タンパク質の同定法として **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**法が広く普及している。しかし抗原抗体反応で用いる反応試薬を大量に消費し、一度に種類のアレルゲンの測定に制限されており、また従来用いられている測定装置は検出感度が低く、精度の良い測定結果を得るには、長時間の分析を要するという問題点がある。現状の **ELISA**法では環境中に存在する多種のアレルゲンに対して十分な機能を有していない。また、放射性同位元素を使用するラジオイムノアッセイ法は非常に高感度な計測が行えるが、計測に危険性が伴い、特殊な施設を必要としており、家庭や規模の小さい病院では導入が困難である。近年、蛍光色素を用いた蛍光免疫測定法は、簡便に計測を行うことができるため、環境測定を目的とした新しい計測手段となり得るものと期待されており、研究が盛んに行われている。

2. 研究の目的

現在、酵素や抗体など生体分子の物質認識機能を活用した各種のバイオセンサの開発を進めている。生体の物質認識機能を利用することで、高い選択性で対象物質の濃度を計測することが可能である。そこで、隔膜等を用いることで気体中の成分を湿潤させた感応部に取り込むことにより、生体物質の活性を維持しながら匂いに含まれるガス成分を選択的に計測することを可能としたガスセンサを開発した。一般に、これらの物質認識機能はタンパク質の立体構造によるものであるため、温度や pH、圧力などの環境に大きく依存し、気相（乾燥）環境では著しく活性が失われるといった問題点があった。

そこで、使用環境の影響に依存するバイオセンサをマイクロ流体デバイスと融合させた新しいバイオセンシングシステムの構築を目指している。センサをマイクロ流体デバイス上に作製することにより、計測環境からの温度、湿度などの影響を抑えることが可能となり、バイオセンサを用いた長時間環境モニタリングを実現することができる。更に、MEMS 技術により様々な成分の蛍光免疫計

測を一括で実現できるアレルゲン分析デバイスへと展開することを考えている。

3. 研究の方法

本研究計画は3つの要素技術確立と要素技術を集積化したシステム構築を目指して研究を進めていく。確立を目指す要素技術として、①MEMS 技術を利用したマイクロ開口を有するマイクロ流路への粒子状物質の回収技術、②気相・液相の混相流を用いた粒子状物質の抽出技術、③光ファイバ式・アレイ方式の蛍光免疫計測システムを利用した高感度計測技術の確立である。確立した要素技術をマイクロ流体デバイス上に集積化して、様々な大気中に存在する物質のリアルタイム計測・評価を行う。マルチアレイ化による多成分同時計測へ展開する。高度なシステムへの発展や商品化を見据えた研究へ移行したいと考えている。

4. 研究成果

①マイクロ開口を有する粒子状物質の捕捉のためのマイクロ流体デバイスの作製

環境中に存在するダニアレルゲンおよび含有するタンパク異質などの微小粒子状物質を取り込むための、新規のマイクロ流体デバイスの作製を行った。3次元構造を有する流体デバイスを作製するため、加工性に優れるポリジメチルシロキサン (PDMS) をデバイス材料として用いる。マイクロ流路の上面に大気中に浮遊する気相成分や微小粒子を通過させるためのサイズ選択性を持たせた PDMS 薄膜を貼り合わせた構造とした。このマイクロ開口を通してマイクロ流路中の溶液に溶解させるデバイスの作製を行った。大気中に存在する粒子状アレルゲンの回収のため、サイズに応じた 3 μm 角~30 μm 角の開口部を作製することで、選択的に目的の粒子状物質をマイクロ流路内に取り込むことを行った。実際に開口部を有する三次元デバイスを作製し、設計通りのデバイスの作製に成功した。さらに、マイクロ開口部への疎水表面修飾についても検討をおこなったところ、フッ素樹脂を含むスプレー処理にて表面を疎水性に長時間維持することを実現し、マイクロ開口部からの液体の漏れを抑えることを実現した。これにより、オープンフロー型のマイクロ流体デバイスの作製が可能となった。

②気相・液相の混相流を用いたタンパク質抽出のためのマイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体デバイス上でアレルゲン含有のタンパク質を溶解させる溶媒を導入し、タンパク質をマイクロ液滴中に回収するデバイスを作製した。マイクロ流路の合流部においては層流を形成せず、カプセルのような形状のマイクロ液滴を生成に成功した。マイ

クロ液滴とその間の気体の体積は、それぞれ導入する流体の流量に依存しているため最適化を行った。マイクロ液滴と気体との界面がマイクロ流路壁に接する形状の場合、タンパク質を抽出したマイクロ液滴は、他のマイクロ液滴と接することなくマイクロ流路中を移動していくため、希釈されずに微量なカプセルとして取り扱うことが可能であると確認された。

③光ファイバ式蛍光免疫計測システムでのアレルギー等の含有するタンパク質計測方法の検討

光ファイバ型プローブの側面に捕捉抗体を固定化し、検出対象抗原、蛍光標識抗体の順にプローブを浸漬することで免疫複合体を形成する手法を確立した。モデル成分として、チリダニ科コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) 由来のタンパク質Derf 1を測定対象として評価を行った。マイクロ流体デバイスに組み込む前段階として、光ファイバプローブとキュベットでの評価を行い、従来法との比較を行った。さらに、複数種の抗原抗体反応を一括で計測するため、光ファイバプローブをガラス基板上に作製した貫通穴に光ファイバを複数接続し、マルチアレイ化した計測デバイスを作製した。

④マイクロ流体デバイスを用いた気相成分計測システムへの集積化の検討

マイクロ開口を有する粒子状物質の捕捉のためのマイクロ流体デバイス、気相・液相の混相流を用いたタンパク質抽出のためのマイクロ流体デバイスの確立した要素技術を集積化した流体デバイスを作製し、環境中に存在するモデル成分であるアレルギーなどの微小粒子状物質の成分計測への応用が可能なマイクロ流体システムの構築を行った。

今後、環境医学に貢献できる新しい環境モニタリングマイクロ流体システムとして応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Arakawa T, Koshida T, Gessei T, Takahashi D, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K., Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode, *Microchimica Acta*, 173(1-2), 199-205, 2011.

② Arakawa T, Noguchi M, Sumitomo K, Yamaguchi Y, Shoji S., High-throughput

single-cell manipulation system for a large number of target cells, *Biomicrofluidics*, 5, 014114, 2011.

③ Miyajima K, Itabashi G, Koshida T, Tamari K, Takahashi D, Arakawa T, Kudo H, Saito H, Yano K, Shiba K, Mitsubayashi K., Fluorescence immunoassay using an optical fiber for determination of *Dermatophagoides farinae* (Der f 1), *Environmental Monitoring and Assessment*, 182(1-4), 233-241, 2011.

④ Arakawa T, Wang X, Ando E, Endo H, Takahashi D, Kudo H, Saito H, Mitsubayashi K., Real-time chemiluminescence visualization system of spatially-distributed exhausted ethanol breath on enzyme immobilized mesh substrate, *Luminescence*, 25, 185-187, 2010.

⑤ Koshida T, Arakawa T, Gessei T, Takahashi D, Kudo H, Saito H, Yano K, Mitsubayashi K., Fluorescence biosensing system with a UV-LED excitation for l-leucine detection, *Sensors & Actuators B Chemical*, 146(1), 177-182, 2010

[学会発表] (計7件)

① Arakawa T, Kato R, Munkhjargal M, Takahashi D, Kudo H, Mitsubayashi K. A drug-injection system with chemo-mechanical energy conversion for active feedback control of glucose concentration in a blood, The 16th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Beijing, China, Jun 2011.

② Munkhjargal M, Kato R, Miyajima K, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K. Bio-inspired self-regulation system of glucose level with chemo-mechanical energy conversion bio-membrane, International Bionic Engineering Conference 2011, Boston, USA, Sep 2011.

③ 荒川貴博, 北和昂, 王昕, 宮島久美子, 高橋大志, 工藤寛之, 三林浩二. 機能性タンパク質を利用したモニタリングシステムに関する研究, 第28回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 東京, 2011年9月.

- ④ Arakawa T, Kato R, Hatayama K, Munkhjargal M, Kudo H, Mitsubayashi K. Active feedback drug-injection system consisting of decompression unit and drug release unit with chemo-mechanical energy conversion, 2nd International Conference on Bio-Sensing Technology 2011, Amsterdam, The Netherlands, Oct 2011.
- ⑤ 荒川貴博, 王シン, 高橋大志, 工藤寛之, 三林浩二, 生体触媒を利用した呼気中エタノールガスの二次元可視化計測システムに関する研究, 第 20 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 東京, 2011 年 1 月.
- ⑥ 荒川貴博, 王シン, 安藤恵理, 北和昂, 高橋大志, 工藤寛之, 齊藤浩一, 三林浩二. 生体触媒を利用した呼気中エタノールガス計測のための可視化システムに関する研究, 2010 年・秋季〈第 71 回〉応用物理学会学術講演会, 長崎, 2010 年 9 月.
- ⑦ Wang X, Arakawa T, Ando E, Endo H, Takahashi D, Saito H, Kudo H, Mitsubayashi K. A chemiluminescent visualization system for breath ethanol monitoring using enzyme-immobilized substrate, the 13th international meeting of chemical sensors (IMCS-13), Perth, Western Australia, Jul. 2010.

[その他]

- ① センサ EXPO2010、東京ビックサイト、2010 年 11 月
- ② センサ EXPO2011、東京ビックサイト、2011 年 11 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 貴博 (Arakawa Takahiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教
研究者番号：50409637