

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成30年3月23日現在

デジタルバイオ分子デバイスの創成と展開

Development of Digital Bio-Molecular Device and Biomedical Applications

課題番号：15H05769

民谷 栄一 (TAMIYA EIICHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

本申請課題の“デジタルバイオ分子デバイス”では、「極微量流体デバイス」、「センシングデバイス」、「分子認識増幅素子」の研究要素の統合により分子計測を基礎としたバイオ分子のデジタル解析を可能とするデバイスの設計指針を明らかにし、応用評価を図るが、遠心駆動デジタルドロップレットPCR、光ピックアップ式マイクロELISA、電気化学発光システムを用いたバイオデバイスなどを開発した。

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー、ナノバイオデバイス、BioMEMS

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサー研究では、生体の有する分子認識増幅機能を活用し、マイクロ流体制御、ナノセンシング機構と連携させることにより、優れたバイオセンシング機能の向上が進められている。究極のバイオ計測法として分子数レベルでの測定を基礎としたデジタルバイオセンシングへの可能性も示唆されている。

2. 研究の目的

生体の有する優れた分子認識や分子信号増幅機能に着目し、1分子レベルの解析を実現し、これを基礎としたデジタル情報としてバイオ分子計測を行うシステムの創成とその応用を推進する。具体的に1分子を配置できる極微小流体デバイス、特定の1分子情報を認識、増幅する分子認識増幅素子、高感度及びラベルフリー計測できる電気化学発光や局在プラズモン共鳴デバイスなどのセンシングデバイスの要素から構成される。これらを基礎としたバイオ分子のデジタル解析を可能とするデバイスの設計指針を

とともに医療診断分野などへの応用展開も推進する。(図1)

3. 研究の方法

本申請課題の“デジタルバイオ分子デバイス”では、「極微量流体デバイス」、「センシングデバイス」、「分子認識増幅素子」の研究要素の統合により分子計測を基礎としたバイオ分子のデジタル解析を可能とするデバイスの設計指針を明らかにし、応用評価を図るが、そのため以下に示す研究項目を遂行する。

- 1) 極微量流体バイオデバイスの設計創成
- 2) バイオセンシングデバイスの設計創成
- 3) デジタルバイオデバイスの応用評価

4. これまでの成果

1) 極微量流体バイオデバイスの設計創成  
遠心駆動デジタルドロップレットPCRの開発  
マイクロ流路を用いてオイルに囲まれた液滴＝ドロップレットを微小区画としてPCRを行うデジタルドロップレットPCR (ddPCR) に着目し、ドロップレット内に1分子DNAを封じ込め、そこからDNA増幅反応を行うもので、各液滴内の増幅された遺伝子の有無をエンドポイントでカウントすることで、初めに存在したDNA分子の統計的により確からしい絶対定量を行う。そのためには、迅速な伝熱や熱交換を実現するための熱空間制御が必須である。そこで、ジグザグ状微小流路反応場の一部を加熱しながら同時に遠心させることで液滴に浮力を発生させ、液滴を自発的に移動させて迅速なddPCRを行う、遠心浮力促進型ddPCR法を開発した。微差加工技

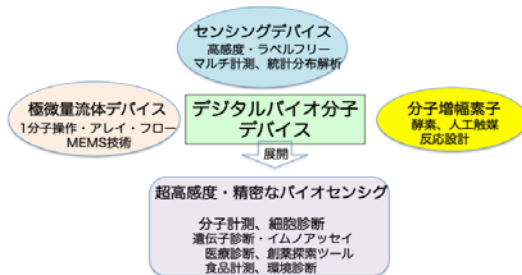


図1 デジタルバイオ分子デバイス研究の要素技術と応用展開  
明らかにし、関連する学術分野の体系化を図る

術に基づき PDMS/ガラス製チップを設計作製した。ステージ回転数を変化させてジグザグ PCR 流路内の液滴挙動の観察を行ったところ、液滴移動速度はPCR サイクルに換算すると 440, 1000, 1320rpm においてそれぞれ 83.6, 14.5, 11.4sec/Cycle となり、液滴挙動の遠心制御によって PCR 蛇行流路内を従来の時間領域 ddPCR と比較して早い PCR サイクル時間で挙動させることに成功した。また、溶液回収しゲル電気泳動アッセイにて特異的増幅が確認され、遠心促進浮力駆動ドロップレット PCR および迅速反応が可能であることを実証できた。

## 2) バイオセンシングデバイスの設計創成 光ピックアップ式マイクロ ELISA

基板表面に集光したレーザービームの反射光強度変化から酵素反応を検出する我々独自の光ピックアップ型バイオセンシング技術を高度化し、疾患や健康状態の指標となるタンパク質バイオマーカーを極微量サンプルから検出する迅速高感度な光ピックアップ式マイクロ ELISA 法の開発に取り組んだ。放射状に延びるチャンネル構造を持つディスク型チップをデザインし、CO<sub>2</sub> レーザー加工機を用いてアクリル板を加工してチップを作製した。ディスクを回転させることにより遠心力でチャンネル内に洗浄液を流し、半自動的な未反応抗体の洗浄を可能とした。またチャンネル内に C 反応性タンパク (CRP) 捕捉抗体を固相化し、ブロッキング処理を行い、CRP 測定用の ELISA チップとした。チップ内の流路の幅、高さ、長さ測定感度の関係について検討し、流路幅が約 2 mm 以上、流路高さは 100 μm 程度以下が構造として適していることを示した。作製したチップを用いて、0.4~50ng/ml の範囲内で CRP の定量測定に成功した。

## 3) デジタルバイオデバイスの応用評価

電気化学発光システムを用いたバイオデバイス  
ルミノールを用いた電気化学発光に着目し、電極電位により発光基質の生成を制御できることを明らかにした。すなわち、負電位では酸素活性種が、正電位ではルミノール活性種の生成を制御でき、両方の電位を走査することにより、発光反応を制御できることが示された。また、空間的に発光制御するために電極上にマイクロチャンバーを多数形成させ、発光イメージング解析を検討した。その結果、マルチチャンバー構造を用いることで、生成された活性酸素種のマイクロチャンバー内における局在化と濃縮効果をイメージング解析により明らかにした。次に、構築した発光イメージング系を用いて活性酸素の一種である過酸化水素を分解する酵素カタラーゼの計測を行った。カタラーゼが電気化学的に生成した活性酸素種を基質として反応し、これによりルミノール発光が消光する変化量を計測解析した。遊離状態のカタラーゼでは 190nM の検出が可能だったが、磁性粒子に固定化することで 90fM の検出が可能で、100 万倍以

上の高感度化を実現した。以上、電気化学発光に着目し、発光基質の生成を時空間的に制御することにより、酵素反応や抗酸化分子と連動したバイオ分析を行うプラットフォームを提案し、カタラーゼ活性、糖化アルブミンなどの高感度化などを実現した。特に、マイクロ流体制御チップ技術と電気化学発光系を連携させ、デジタルバイオ分子分析を行う新たな測定システムを示した。

## 5. 今後の計画

30-31 年度の 2 年間に限らず、今までに構築したシステムの性能の向上を計るための取り組みと実用に向けた連携研究者とのさらなる連携を進める。すでに阪大医学部病院、阪大歯学部病院との連携は進めており、標準試料を用いた検討は開始している。最終的には、実試料(血液試料など)を用いた診断などへの道筋を示していく予定である。特に、デジタルバイオ分析のために、遠心駆動デジタルドロップレットシステムや電気化学発光マイクロチャンバーアレイ電極システムなどを創成しており、これらの成果の世界的な情報発信を進める。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Masato Saito, Kazuya Takahashi, Yuichiro Kiriya, Wilfred Villariza Espulgar, Hiroshi Aso, Tadanobu Sekiya, Yoshikazu Tanaka, Tsuneo Sawazumi, Satoshi Furui, Eiichi Tamiya, Centrifugation controlled thermal convection and its application to rapid microfluidic PCR devices, , *Anal. Chem.*, **89** (23) 12797-12804 (2017)

Yuki Inoue, Mikako Inoue, Masato Saito, Hiroyuki Yoshikawa and Eiichi Tamiya, Sensitive Detection of Glycated Albumin in Human Serum Albumin Using Electrochemiluminescence”, *Anal.Chem.* **89** (11) 5909-5915 (2017)

Yuki Inoue, Masato Saito, Hiroyuki Yoshikawa, Eiichi Tamiya, Quenched Electrochemiluminescence Imaging using Electro-Generated Substrate for Sensitive Detection of Catalase as Potential Enzyme Reporter System , *Electrochimica Acta*, , **240**, 447-455 (2017)

Hiroyuki Yoshikawa, Asami Hironou, ZhengJun Shen, and Eiichi Tamiya ,Versatile Micropatterning of Plasmonic Nanostructures by Visible Light Induced Electroless Silver Plating on Gold Nanoseeds, , *ACS Applied Materials and Interfaces* **8** (36) 23932-23940 (2016)

中谷賞 (大賞) 受賞  
中谷医工計測技術振興財団 (2016 年度)

ホームページ等  
<http://dolphin.ap.eng.osaka-u.ac.jp/nanobio/>