

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350035

研究課題名(和文)集積化3次元マイクロ免疫反応ディスクを用いた全自動疾病マーカー検査システムの研究

研究課題名(英文)Research on Full-protocol Disease Marker Screening System using Integrated Lab-on-a-CD for Immunoassay

研究代表者

内海 裕一(Utsumi, Yuichi)

兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・教授

研究者番号：80326298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：1 μ l以下の微量血液から疾病マーカーを迅速かつ高感度に網羅検出するための全自動検査システムのプロトタイプを実現した。試料滴量 血清抽出 免疫反応 光学検出の4CDを積層した10検体用のLab-on-a-CDの設計・試作・評価を行った。同一回転数で異なる送液が可能な手法を考案し、CDの試作にはX線加工を用いて回転制御のみで酵素免疫法に必要な全単位化学操作を再現性良く達成した。マウスIgGの酵素免疫測定系に適用した結果、検量線が1回の操作で得られ検出限度は1ng/mL以下、CV変動は5%以下と高い感度と再現性が得られた。以上疾病マーカーの網羅的迅速検出のための大きな見通しを得た。

研究成果の概要(英文)：This paper reports a new type of lab-on-a-CD device with three-dimensional microchannel networks and vertical capillary bundle structure. The device consist of the multiple lab-on-a-CD chips with conventional planer microchannels and vertical microchannels which constructed on the disks made of poly-dimethylsiloxane (PDMS) and poly-methylmethacrilate (PMMA). The PMMA layer with vertical channel were fabricated by deep X-ray lithography using synchrotron radiation. We designed and fabricated the chips for aim of taking enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Three-dimensional liquid transportation through Lab-on-a-CD structure is suggested by computational fluid dynamics and it is successfully demonstrated chips. Detection of immunoglobulin G(IgG) from mouse is successfully demonstrated in the three-dimensional devices and it is notable that the result suggests quite high-sensitive implying detection limit down to 1ng/mL by primitive result.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学 チップ分析

キーワード：チップ分析 生体分析 免疫反応 バイオリアクター ELISA マイクロ化学システム Lab-on-a-chip

1. 研究開始当初の背景

ペプチドや蛋白質を精度良く定量検出する手法としては酵素免疫測定法 (ELISA) が最も実績がある。しかし従来の ELISA による血液分析は、タイタープレートや試験管を用いており、洗浄や反応に複数の機器の繰り返し操作が必要で、分析時間に数時間～数日を要する問題があった。

これに対し、ワンチップ基板上に形成したマイクロ流路によって高速・高効率に化学操作を行う μ TAS (Micro Total Analysis Systems) は、マイクロ流路を用いることにより反応分子の拡散時間を大きく短縮したフロー化学操作が行え、反応の飛躍的な高速・高効率化や試料・試薬の少量化が期待できる。しかし攪拌や反応には一定の流路長が必要なことから集積化に限界があり、複雑な化学操作では連続フロー化が難しいなどの欠点があった。申請者は、従来の μ TAS の問題解決のために平面流路に垂直流路を結合した 3 次元 μ TAS による “3 次元マイクロ免疫反応回転ディスク” を世界で始めて実現し、血液中の免疫グロブリンなどの高感度な ELISA 測定に成功した (Ukita et al. μ TAS2010, pp345)。このシステムは、前処理 (血清抽出)、免疫反応、光学検出からなる 3 つの基本機能の樹脂ディスクを縦に積層した、3 次元マイクロ免疫反応システムであり、これを用いて回転動作による遠心力制御のみで ELISA に必要な全化学操作を逐次的に行うことが可能である。“回転ディスク型 μ TAS” の開発自体は、これまで UCIrvine 大 (米)、フライブルク大 (独)、千葉大 (日)、サムスン先端研 (韓国) 等の例があり、連続化学操作を一括に行う有力ツールと目されている。しかし全てが 1 枚の単一機能ディスクであるために、盛り込める測定プロトコルに限られ、全プロトコルを実現することができない。また、免疫反応を成功させた例は数例しかなかった。

2. 研究の目的

健康寿命の延伸や生活の質の向上が叫ばれている昨今、早期医療診断・治療を行う上で疾病マーカーとなる蛋白質やペプチドを高感度かつ迅速に検出することが極めて重要となっている。しかし血液中の様々な標的マーカーを迅速かつ高感度に一括測定するセンシングシステムは確立されてない。本研究は疾病マーカーとなるペプチドや蛋白質を少量の血液から迅速かつ高感度に一括検出する為に、3 次元放射光加工技術を駆使して免疫測定法の全プロトコルを回転式 μ TAS ディスク上に集積した、世界初の全自動疾病マーカー検査システムを実現することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では全自動疾病マーカー検査システムを実現するために、以下の課題に取り組む。(1)フルプロトコル 3 次元マイクロ免疫反応

システムの実現と化学操作性能評価

全ての ELISA 測定のプロトコルに対応した、3 次元流路の構成法と流体制御法を確立する。次に 3 次元放射光加工技術を用いて、免疫反応、光学検出の 2 機能を積層したより集積度の高い、高信頼性のディスクを作製する。さらに遠心力によって全血から血清分離と抽出が可能な前処理ディスクを作製し、先のディスク上に積層することによって、血液試料導入から、前処理 (血液分離、血清抽出) 免疫反応 洗浄 蛍光標識抗体の導入 洗浄 光学計測 に至る全自動操作が可能なフルプロトコルの 3 次元マイクロ免疫反応システムを実現し、その化学操作性能を評価する。

(2)免疫反応系の最適化による高感度化・高精度化の実現

免疫反応系の高感度化、高精度化 (データの高い再現性) は、信頼性の高い “全自動疾病マーカー検査システム” を実現する必須条件である。このため、<1>共有結合を用いたキャピラリー側壁への安定した抗体固定化方法の確立と、<2>少量のバッファー液による効率的な洗浄手法の確立に重点を置き、免疫反応条件の最適化を行う。

4. 研究成果

(1) セミフルプロトコルの免疫反応ディスクの設計・試作と送液特性評価
試料導入ディスク、免疫反応ディスク、光学検出ディスクを積層した、血清検査用のセミフルプロトコルの免疫反応ディスク (径 3 インチ) を設計、試作した。さらに、作製したディスクが、回転速度の制御によって、ELISA プロトコルに対応した逐次送液が再現性良く実行可能か検証した。この結果、ユニット間の輸送回転数のばらつきを設計値の 5% 以下に抑えることが出来た。

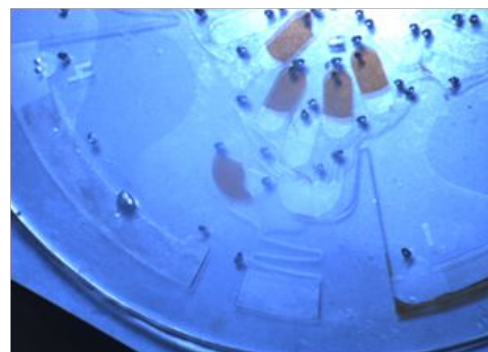


図1 セミフルプロトコルディスク

前処理 (血清抽出) ディスクの設計と試作フルプロトコルのディスクを実現するための全血からの血清抽出が行える前処理ディスクの設計及び試作を行った。血清成分の抽出には、流路の親水化方法等を検討した。この結果キャピラリーバルブと血清成分分離のための遠心力のみにより、全血から 99.8% 以上の精製率で血清分離に成功した。

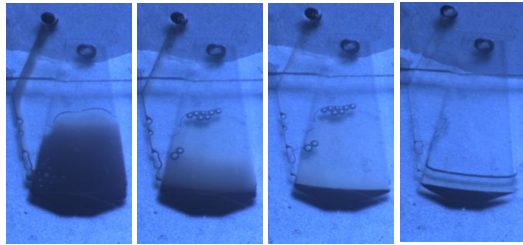


図2 血清抽出ディスク

フルプロトコルの免疫反応ディスクの設計と試作の検討

PMMAによる免疫反応ディスクとPDMSから成るセミフルプロトコル免疫反応ディスク上に、開発中の前処理（血清抽出）ディスクを積層し、フルプロトコルの免疫反応が可能な4層構造のディスクの設計と作製を行った。特に前処理（血清抽出）ディスクから免疫反応ディスクへの血清の輸送が再現性良く行えるための流路設計を行った。設計には遠心送液のみならず毛管力や空気流入の制御などを用いて同一回転数において異なる送液が可能な方法を取り込んだ、より柔軟性の高い手法を考案した。さらにPMMAとPDMSから成る免疫反応ディスクと新規に試作した血清抽出用の前処理ディスクを積層し、マーカー検査に必要なフルプロトコルの単位化学操作がすべて可能な4層構造のディスクを実現した。特に血清抽出後に、前処理ディスクの下層に位置する免疫反応ディスクに血清を再現性良く輸送するために、回転数を下げて動作する毛管力ポンプの最適設計を行いその試作を行った。同時に毛管力ポンプの内壁表面処理方法の検討を行い輸送動作の再現性向上を図った。免疫反応ディスクの設計も新規に見直し、リザーバーへの空気流入を制御することで回転数に依存せず送液タイミングを設定できる手法を考案した。さらに該手法に基づく新規の免疫反応ディスクを放射光とUVリソグラフィーを用いて試作し、回転数に依存せずに送液タイミングを制御できることを検証した。

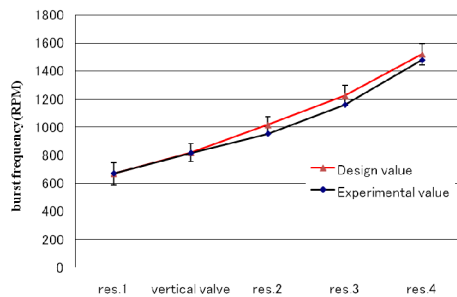


図3 送液タイミングの制御

以上の知見に基づき、血清抽出用の前処理ディスクと新規設計の免疫反応ディスクを積層したフルプロトコルの免疫反応ディスク

を試作した。さらに単位化学操作に必要な全ての液体輸送の動作の検証を行い、再現性良く実現できることを実証した。図3に各回転数におけるキャピラリー破断バルブの計算結果（赤線）と実測結果（黒線）を示すが、50rpm以下の送液タイミング精度が得られた。

(2) 免疫反応系の最適化による高感度化・高精度化の実現

物理吸着を用いたキャピラリー側壁への安定した抗体固定化方法と洗浄について条件の最適化を行った。得た知見を元に抗マウスIgG抗体をキャピラリーに側壁に固定化したELISA（酵素免疫測定）反応により、実際のマウスIgGの検量線を得た（図4）。この結果、数10ng/mlの検出感度を得た。さらに、ELISAの各洗浄工程はCDチップ内で行う場合（白丸）と、チップ外で行う場合（黒丸）で有意な差が得られ、CDチップで全ての工程を行うことの優位性を示す結果が得られた。

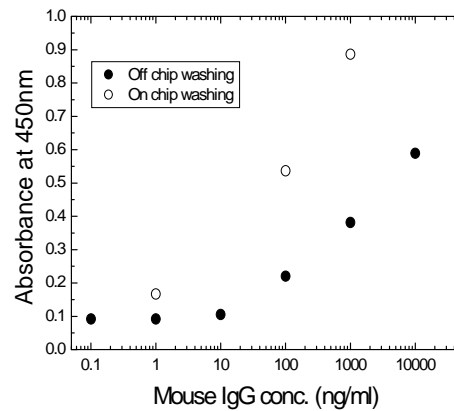
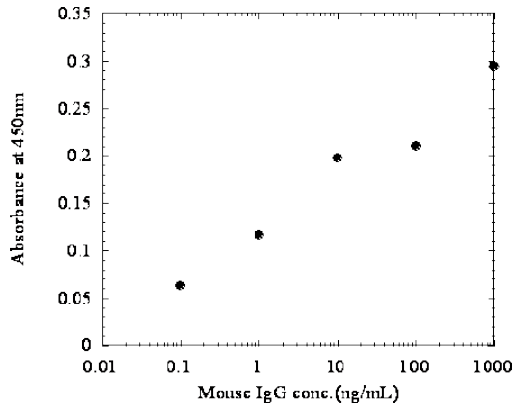


図4 マウスIgGの検量線

キャピラリー側壁への共有結合を利用による安定した抗体固定化方法の検討

従来の μ TASやLab-on-a-chipでは、抗体の固定化方法としてファンデルワールス力や疎水性相互作用などの物理吸着を主に用いて来たが、溶液の輸送時や洗浄時に抗体が剥離する、抗体の種類によっては固相表面に固定化がなされないなど安定した固定化がなされない場合が多い。図4で示したELISA実験も、抗体を物理吸着によって固定化している。更なる感度向上、そして再現性のある検量線作成には、抗体の安定な固定化が重要となってくる。本研究では共有結合を用いて抗体を強固に固定化させる手法の確立を試みた。

抗体を安定かつ強固に固相表面に固定化することを意図して、アビジンピオチンシステムを採用した。アビジンとピオチンは特異的に非常に強く結合するうえ、配勾を持たせた固定化が可能のため、安定性、再現性の高い抗体の固定化が可能であると考えられる。本研究では反応場の固相表面に第一級アミノ基を導入した。具体的には反応場であるキャ



ピラリー側壁に第一級アミノ基を多量に導入し、抗体を共有結合させるために、塩素基結合型の PMMA 樹脂を新たに開発した。反応場を含む垂直流路材料となる PMMA に直接アミノ基を導入するのは難しいため、MMA と少量の塩素を側鎖結合したモノマーのクロロ

図5 マウス IgG の検量線

エチルメタクリレート (CEMA) をランダムに共重合することで PMMA(MMA/CEMA) を合成した。MMA と CEMA の共重合した PMMA(MMA/CEMA) は表面に少量のクロロ基が露出しているため、第一級アミノ基を大量に含むポリエチレンイミン (PEI) と反応させることで、PEI のアミノ基とクロロ基が置換反応を起こし、P(MMA/CEMA) 表面に PEI を結合した。

本デバイスによる免疫測定法の可能性検討と特性を見積もるために、マウス由来のイムノグロブリン G (IgG) の検出を試みた。図5に作成した検量線を示す。検出限度は 1ng/mL 以下と推定される。この結果物理的抗体固定化法に比べ 1 桁以上の感度向上となっており、共有結合による抗体の固定化の効果が大きく表れた。

以上、共有結合を用いたキャピラリー側壁への安定した抗体固定化方法について検討を行った。この結果、塩素基結合型の PMMA 樹脂を新たに提案し、その開発を行い、従来の物理吸着法と比較して数十倍の感度を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Ryo Takahashi, Takao Fukuoka, Yuichi Utsumi, Akinobu Yamaguchi, Optofluidic Devices with Surface-Enhanced Raman Scattering Active Three-Dimensional Gold Nanostructure, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 52, 6, 2013, pp.06GK12, 1-5

Hideki Kido, Tomoyuki Kuroki, Masaaki Okubo, Yuichi Utsumi, Application of photo-etching of polytetrafluoroethylene induced by high energy synchrotron radiation to LIGA, Microsystem

Technologies, 査読有, 19, 3, 2013, pp.301-307

Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Tsukasa Azeta, Masaki Ishizawa, Chiwa Kataoka, Masahiro Takeo, Yuichi Utsumi, Stacked centrifugal microfluidic device with three-dimensional microchannel networks and multifunctional capillary bundle structures for immunoassay, Sensors and Actuators B: Chemical, 査読有, 166-167, 2012, pp.898-906

Tsukasa Azeta, Yuichi Utsumi, Proposal of High-Integrated Three-Dimensional Microfluidic by Using Centrifugal Force for Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Journal of Japan Institute of Electronics packaging, 査読有, 15, 1, 2012, pp.38-41

Saki Kondo, Yoshiaki Ukita, Kuniyo Fujiwara, Yuichi Utsumi, A Novel Micromixer with Three-Dimensionally Cross-Linked Capillary Array Structure Fabricated by Deep X-ray Lithography, Electrical Engineering in Japan, 査読有, 177, 1, 2011, pp.26-31

〔学会発表〕(計42件)

Masaki Ishizawa, Yasuto Arisue, Ikuo Okada, Akinobu Yamaguchi, Yuichi Utsumi, Novel Pressure-Controlling Valve of Centrifugal Microfluidics, PITTCON2014, March 2-6 (2014), Chicago, USA

Hiroki Nose, Masaki Ishizawa, Takeshi Kunisada, Kazuhisa Kuroda, Akinobu Yamaguchi, Yuichi Utsumi, Blood separation lab-on-a-CD with controlled surface, 7th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE7), March 17-19 (2013), 福岡国際会議場, Fukuoka, Japan

Masaki Ishizawa, Yuichi Utsumi, Contamination-Free Internally-Triggered Automatic Flow Sequencing for Microfluidics, 38th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2012), September 16-20 (2012), Toulouse, France

Yoshiaki Ukita, Takayuki Oguro, Masaki Ishizawa, Hiroki Nose, Yuichi Utsumi, Yuzuru Takamura, Visualization of Biological Fluid Behaviour on Spinning Centrifugal Microfluidics using Coaxial Micro-Stroboscope, 38th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2012), September 16-20 (2012), Toulouse, France

Masaki Ishizawa, Tsukasa Azeta, Hiroki Nose, Yoshiaki Ukita, Yuichi Utsumi, Three-Dimensional Lab-on-a-CD with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Nano/Micro Engineered and Molecular

Systems (IEEE-NEMS 2012), March 5-8 (2012),
京都大学, Kyoto, Japan

Masaki Ishizawa, Tsukasa Azeta, Hiroki
Nose, Yoshiaki Ukita, Masahiro Takeo,
Kyuya Nakagawa, Shinichi Yusa, Yuichi
Utsumi, Multi Stacked Centrifugal
Microfluidics for Enzyme-linked
Immunosorbent Assay, 37th International
Confedence on Micro and Nano Engineering
(MNE2011), September 19-23 (2011), Berlin,
Germany

Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Yuichi
Utsumi, Proposal of Three-dimensional
Microfluidics Device For Immunoassay
Using Centrifugal Force, 9th
International Workshop on High Aspect
Ratio Micro Structure Technology
(HARMST2011), June 12-18 (2011), Hsin Chu,
Taiwan

Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Masahiro
Takeo, Kyuya. Nakagawa, Shinichi Yusa,
Yuichi Utsumi, Three-Dimensional
Lab-on-a-CD with Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay, 9th International
Workshop on High Aspect Ratio Micro
Structure Technology (HARMST2011), June
12-18 (2011), Hsin Chu, Taiwan

Yoshiaki Ukita, Tsukasa Azeta, Saki
Kondo, Chiwa Kataoka, Shinichi Yusa,
Masahiro Takeo, Yuichi Utsumi,
Environmental Analysis using Stacked
Centrifugal Microfluidicsy, 9th
International Workshop on High Aspect
Ratio Micro Structure Technology
(HARMST2011), June 12-18 (2011), Hsin Chu,
Taiwan

6. 研究組織

(1)研究代表者

内海 裕一 (UTSUMI, Yuichi)
兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・教授
研究者番号：80326298

(2)研究分担者

武尾 正弘 (TAKEO, Masahiro)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：40236443

遊佐 真一 (YUSA, Shinichi)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：00301432

浮田 芳昭 (UKITA, Yoshiaki)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・助教
研究者番号：40578100

片岡 正俊 (KATAOKA, Masatoshi)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・グループ長

研究者番号：20224438