

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01798

研究課題名(和文) 遠心制御熱対流による分子反応促進と迅速多項目遺伝子測定法の開発

研究課題名(英文) Reaction acceleration and rapid detection by centrifugation-controlled microfluidic thermal convection

研究代表者

斉藤 真人 (Saito, Masato)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：80457001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：遠心熱対流制御とこれを利用した同時多項目遺伝子検出を可能とするため、反応場の微小集積化したマイクロ流体デバイスの構築を目指した。微小環境下の熱流体のシミュレーション解析から伝熱と流体の挙動解析を行い、デバイス設計指針を得た。集積マイクロ流路と温調回転装置を試作し、薬剤耐性遺伝子の迅速多項目PCR検出に成功することができた。また、遠心熱対流を利用した抗原抗体反応の迅速検出も示すことができ、本技術は種々のバイオアッセイへの展開が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流路の集積チップと温調回転装置を試作し、これを用いて薬剤耐性遺伝子の迅速多項目PCR検出の実証に成功した。また、抗原抗体反応への応用も示した。これらの試みを通して遠心熱対流によるバイオアッセイの迅速化と多項目化が可能であることが示された。今後、本技術が、医療・健康に関連するマーカー計測、食品や農業における検査、環境などの衛生モニタリングなど社会の多岐にわたる分野へ応用展開することで、安心安全社会の構築への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To exploit the utility of centrifugation-controlled thermal convection in biosensing applications, we aimed to construct a microfluidic device which has integrated reaction chambers. The device structure, integrated microchannel, and heater shape were designed based on the analyzed simulation result of heat transfer and fluid behavior in the model microenvironment. The prototype of the integrated microchannel chip and the rotating heater stage were fabricated and on-chip PCR was performed. With the developed system, rapid detection of multiple drug resistance genes was successfully demonstrated. In addition, the on-chip centrifugal thermal convection system was also applicable to accelerate antigen-antibody reaction (ELISA). With ease of operation and versatility for a range of targets, it is expected that this technology can be applied in a number of bioassays and enhance their value.

研究分野：バイオセンサー

キーワード：遠心熱対流 PCR ELISA マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

酵素や抗体などの分子認識能を利用して対象物質を捕捉し、信号変換によって計測するバイオセンサーにおいて、近年ではさらに、マイクロスケールの反応場を導入し微量化することにより、迅速・高感度な検出デバイス構築への取り組みがなされている。医療、健康、食品、農業などその応用分野は多岐にわたるが、とくに各種現場にて特定項目を検査するポイントオブケアテスト (POCT) で、且つ迅速高感度検出を可能とするバイオアッセイチップデバイスの開発が求められている。しかし、例えば、近年世界的に懸念されている薬剤耐性菌が知られているが、その種類は IMP 型、VIM 型、NDM 型など、少なくとも 80 種類以上 (荒川宣親、日本臨床微生物学雑誌 13(3), 2003.) に及んでいて、またその薬剤耐性遺伝子の伝搬性からその拡散がより強く懸念されている。そのため、マイクロ流体デバイスを用いたバイオアッセイにおいて、より多項目な計測・検出の実現が強く求められている。

2. 研究の目的

当課題研究者は、熱対流と遠心に着目した新たな反応促進マイクロ流体デバイスを開発してきた。熱対流の方程式であるベナール式に注目してみると重力に依存する項があることがわかるが、このパラメータを遠心場に置き換えて相対重力加速度とみることで、つまり回転数によって熱対流速度を制御できるものである (図 1)。試作した環状マイクロ流路に温度の異なる 2 温を配置し、温調回転によって循環する連続流生成と流速制御を確かめていて、さらに熱対流 PCR への応用を試みて、DNA 増幅反応の迅速化が可能であることを示している (M. Saito, et al, Anal. Chem., 2017, 89, 12797)。

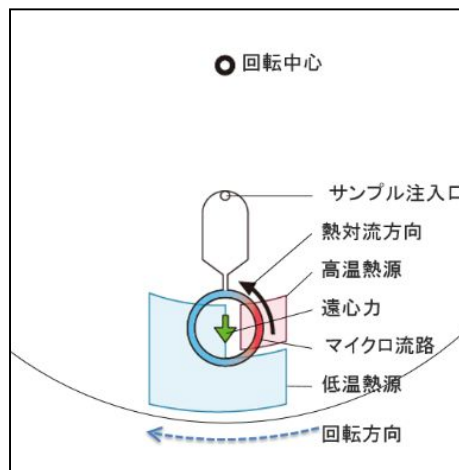


図 1. 遠心下における熱対流生成

しかしながら、冒頭に述べたように、薬剤耐性菌はいまや 80 種以上も存在が明らかとなっていることから、これらをカバーするためには反応槽の微小化と集積化が必要であり、それに伴って微小反応場への加熱・伝熱の精密制御や流体制御の新たな制御方法の構築が求められる。つまり、数 μm ~ 数百 μm の空間に温度差を生成するための熱供給の手法、ならびに微小空間の伝熱と流体の挙動解析、バイオアッセイに必要な精密な流体制御など、流路集積を実現するための最適解を導出する必要がある。そこで本研究では、遠心熱対流手法のバイオアッセイ応用の可能性を探るとともに、さらなる微小化と多項目対応を実現するための取り組みを行う。

3. 研究の方法

3D CAD を使用してマイクロ流路チップの設計を行った。素材には、Polydimethylsiloxane (PDMS)あるいは Cyclo Olefin Polymer (COP)を使用した。PDMS 製チップの作製には、シリコンウェハ上に SU-8 パターンを形成し、PDMS をキャスト、80 °C、2 時間で熱硬化させた。離形後、フタ材とともに接合面を酸素プラズマ活性化し、貼り合わせた。COP 製チップの作製には、金型射出成型によって流路溝成型を行い、2 mm 厚のチップ本体を作製した。フタ材は COP フィルム (188 μm 厚) を用いた。チップ本体とフタ材に酸素プラズマ照射によって表面活性化し、真空温調加圧装置を用いて、133 °C、1120N/chip、30 分間で熱圧着することで接合した。

遠心熱対流生成用温調回転装置は、チップステージ (伝熱ブロック)、熱源ヒーター、モーターによって構成される。本装置は、ヒーターとステージが一体となっており、ステージはモーターと接続されており、回転しながら温度制御が可能である。チップステージは金属製で、熱電対により温度モニタをし、PID 制御にて温調している。

定常状態の遠心熱対流の三次元シミュレーションを、COMSOL マルチフィジックスを用いて行った。水をブシネスク近似したナビエ・ストークスモデルと流体を考慮した伝熱モデルを強連成したモデルを用いた。

4. 研究成果

集積化微小反応場における熱対流制御と遠心力による反応液の自走駆動および熱対流加速を利用した多項目遺伝子検出を可能とするため、反応場の微小化と集積化に加え、伝熱と流体の挙動解析を行うことで、より精密な熱制御の実現を目指した。

まず、遠心熱対流を生成させるための配置としては、各流路に対する高温と低温の熱源の配置が影響する。図 2a に示すように、前提として、各流路で同一の遠心力がかかるためには、同一半径上に配置される必要がある。また、流路数をより密にするためには楕円形にするのがよい。この制約のなかで、遠心場の上面から見て、環状流路の左右に高温と低温の熱源を配置した場合、

高温と低温の熱源が交互に配置されており、流路間の熱干渉よりも熱源からの隣接する流路への熱干渉が避けられないと考えられ、また熱源構造も複雑になる。そこで、環状流路に対して上下方向に低温と高温の熱源を配置することとした(図2b)。このとき、環状流路の左右で熱分布が同一では熱対流が生じないため、非対称形の環状流路(図2c)とした。上記設定において、3Dモデルを作成してシミュレーション解析(COMSOL Multiphysics 使用)による熱分布および対流方向の評価を行った。熱源をPCRと同じ95および60とし、流路位置について回転中心から半径36.5mm、ペナール対流方程式中の重力項について相対重力加速度5Gに設定した。結果、円周上の流路間ピッチ4.6mm、6.4mmで熱対流の生成が得られ、また流路間に熱干渉は生じず、流れ方向も一様となった。しかしながら、図3aに示すように、流路間ピッチを3.2mmとしたとき、熱干渉が生じ、各流路の流れ方向が同一でなくなった。集積度向上させるために、高温側熱源に流路片側に沿って突起形状を付したところ、図3bに示すように、各流路の熱分布と流れ方向を一様にする事ができた。これらの検討結果から熱干渉を回避するための流路集積設計指針が得られた。

これら解析を基にして、セラミックヒーター+アルミブロックを熱源にした接触型ヒーターおよびマイクロ流路チップを試作した(図4)。食紅液を添加した溶液を流路口に積層した後、ハイスピードカメラを用いて温調回転下における熱対流の様子を観察した。図5aに示すように、流路内で溶液の熱対流が生じていることが確認でき、また例えば350rpmでは10.7秒/周と高速に熱対流を生成することができ、遠心に応じた熱対流速度変化も確認できた(図5b)。この結果はシミュレーション解析ともよく一致した結果となった。このことは、PCRの熱サイクル時間を制御できることを意味し、伸長時間の最適化を行うことが可能である。試作した集積チップと温調回転装置を用いて、カルバベナム耐性遺伝子の1つである *bla_{IMP-6}* を指標としてオンチップPCRを行った。PCR試薬として、ニッポンジーン製試薬 GeneAce qPCR Mix ver.3、プライマー及びプローブ、0.1% (w/v) BSA を使用した。アニーリング・伸長反応にかかる供給熱源温度、熱対流速度と回転速度(相対重力加速度)の関係を検証し、チップ流路内の遠心熱対流 DNA 増幅にかかる条件を導出した。回転中の流路に488nmレーザー光を照射し、フォトダイオードにてDNA増幅に伴う蛍光強度変化を検出した。

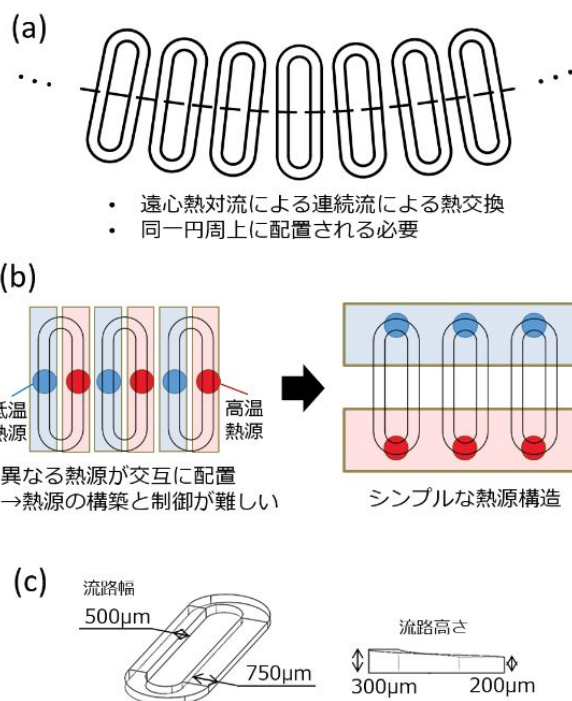


図2. 集積化に向けた流路検討。(a)流路の同一円周配置。(b)流路と熱源の配置関係。(c)流路形状。

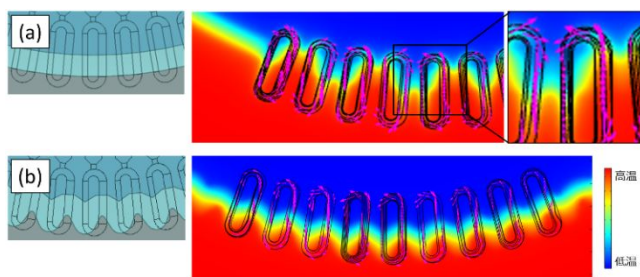


図3. 集積流路間(流路間ピッチ3.2mm)の熱分布と対流生成方向。(a)平滑な熱源形状の場合。(b)突起を付した熱源形状の場合。

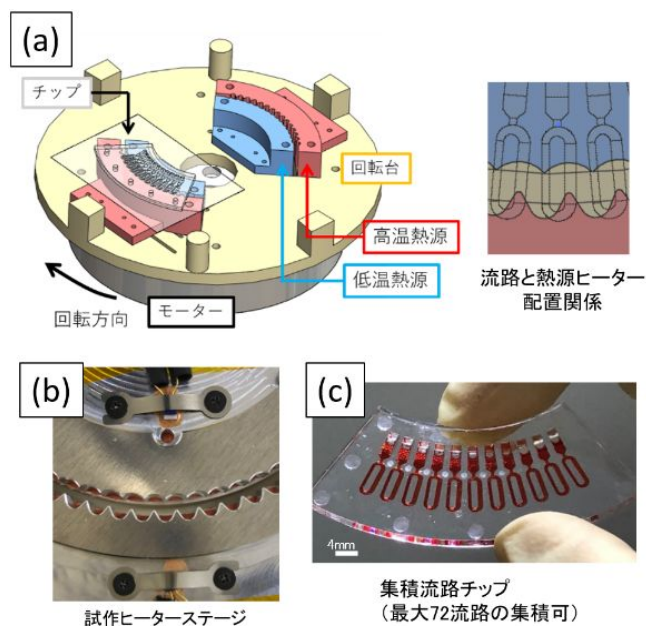


図4. 温調回転装置と集積チップ。(a)熱源ヒーターステージの設計。(b)試作ヒーターステージ。(c)試作した集積流路チップ(COP金型射出成型)。

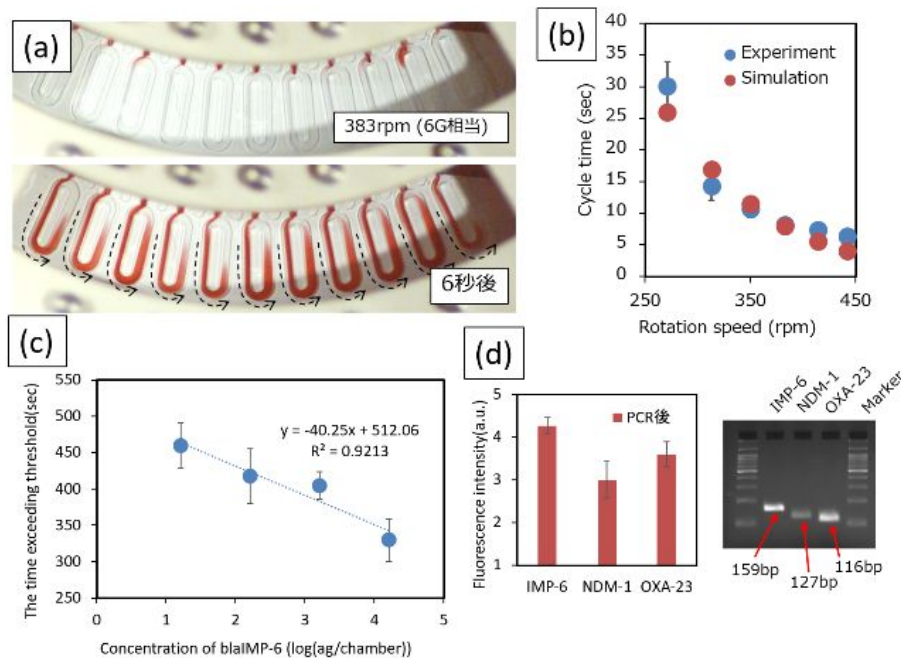


図5. 遠心熱対流生成と PCR 応用 . (a) 温調回転中の熱対流生成の様子 . (b) 遠心速度と熱対流速度の関係 . (c) *bla*_{IMP-6} 薬剤耐性遺伝子検出の検量特性 . (d) 多項目同時検出 .

ヒーター高温 97 、低温 60 、回転速度 383rpm に設定し、*bla*_{IMP-6} 遺伝子配列を含むアンプリコン精製 DNA をテンプレートとして用いて、テンプレート DNA 濃度依存性を見たところ、図 5c に示すように、テンプレート DNA 初期濃度 16fg ~ 16ag/chamber のダイナミックレンジにおいて蛍光検出時間（閾値 0.2）との間に直線的な相関がみられ、またその検出時間も 400 秒前後であったことから、集積 PCR デバイスを用いた迅速かつ定量検出が可能であることが確認できた。さらに、*bla*_{IMP-6} 遺伝子を含有する *E. Coli* 精製 DNA 18.5pg/chamber、*bla*_{NDM-1} 遺伝子を含有する *E. Coli* 精製 DNA 2.13ng/chamber、*bla*_{OXA-23} を含有する *A. baumannii* 精製 DNA を用いて、多項目 PCR (N=3、20 分間反応) を試みたところ、いずれの薬剤耐性遺伝子も増幅が見られ、また電気泳動分析でも特異的バンドを確認することができた (図 5d)。このことから、本研究で作製した集積 PCR デバイスを用いて同時多項目検出が可能であることを示すことができた。なお、各検出プライマー・プローブについて、IMP-6; *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013, 42, 352-356、NDM-1; *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1647-1649 (2011)、Oxa-23; *J. Med. Microbiol.* 61, 1532-1537 (2012) を参照した。

遠心熱対流によって生じる流れについても解析を行った。まず、温度差と遠心力により生じる熱対流に加え、遠心下においては流体に対してコリオリ力が作用して 2 次流が発生する。そのため、遠心熱対流においては、より複雑な流れが生成される。そこで、試作した非対称環状流路について、3 次元的な対称性の影響の検証も含め流体シミュレーションによる解析を行った。一方を狭深 (500 × 300 μm) もう一方を広浅 (750 × 200 μm) となる非対称の楕円形マイクロ流路 (図 2c) とし、これに流路片側に高温熱源の突起の配置 (高温熱源配分を増やす) と遠心方向 (時計回り・反時計回り) とを組み合わせた評価を行った。結果、広浅流路側に熱源突起を配置して時計回りに遠心することで、流速の向上だけでなく剪断方向への渦の発生が大きくなるこ

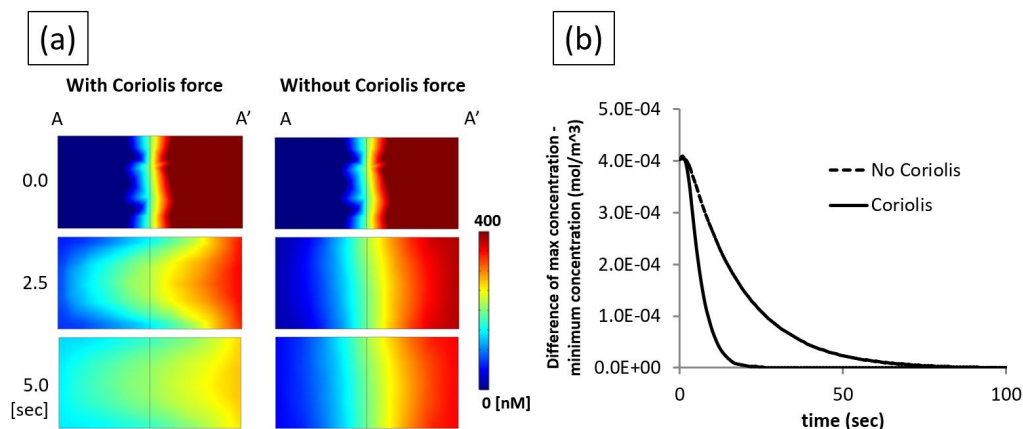


図6. 溶液混合に対する遠心熱対流の効果 (シミュレーション解析). (a) コリオリ力の有無による混合の変化の様子 . (b) 溶液濃度の時間変化 .

とが分かった。このことから、今回設計した熱源と流路配置関係が適していることも分かった。加えて、流路内に濃度差 (400M と 0nM) のある状態を仮定し、コリオリ力の作用の有無による溶液濃度変化についても解析を試みた。その結果、図 6 に示すように、コリオリ力の作用を考慮した場合においては 20 秒後にほぼ均一な溶液状態になったのに対し、拡散のみに依存する場合は 80 秒を要して、4 倍速くなる結果となった。つまり、遠心温調による熱対流は、流路方向と剪断方向の流れをもつこととなり、より複雑な流れを生成して溶液混合を促進する効果があることが示唆された。このことは DNA 増幅反応の促進に寄与するものと推測される。

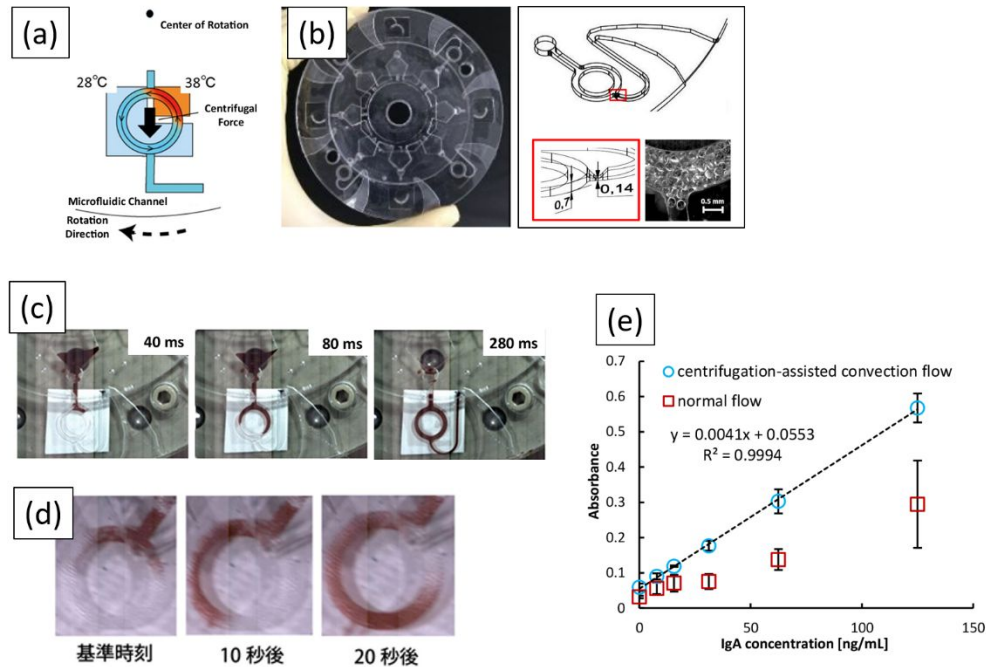


図 7．遠心熱対流生成と ELISA 応用．(a)熱源と流路の配置関係．(b)試作チップ．(c) 溶液の遠心置換の様子．(d) 28 -38 における熱対流生成の様子．(e) 検量特性評価．

バイオアッセイの一つとして、ELISA に代表されるように抗原抗体反応を利用したタンパク質等のバイオマーカーの計測手法があるが、複雑なプロセスや時間を要するなどの課題がある。そこで、遠心熱対流生成を利用した反応促進による迅速化への試みも行った (図 7)。ディスク状基板に、溶液置換用の U 字構造およびその途中に環状流路を設けた構造とした。切削加工にて耐熱性樹脂モールドを試作、PDMS をキャストして熱硬化させた。作製した流路に抗 IgA 抗体を固定化した 250 μm 径ポリスチレンビーズを充填した。24 μL の抗原 (IgA) を注入し、遠心にて環状流路に充填置換される。このとき流路内に 28 -38 の温度差を作り、遠心下 (300G) において熱対流生成 (50 μL/min) させた。結果、抗原反応時間 10 分、酵素標識抗体反応時間 5 分、基質反応時間 5 分、計 20 分で迅速に抗原抗体反応の検出が可能で、また検量特性を得ることに成功した。検出下限は 6.16 ng/mL であった。

以上、微小環境下の熱流体のシミュレーション解析から設計指針を得て、集積マイクロ流路と温調回転装置を試作し、これを用いて薬剤耐性遺伝子の迅速多項目 PCR 検出の実証に成功した。また、抗原抗体反応のような低温条件下でも熱対流生成が可能で、検出迅速化もできた。これらの試みを通して、遠心熱対流によって酵素反応や抗原抗体反応の反応促進と迅速化、さらには多項目化が可能となることで、今後はより広範なバイオアッセイへ展開が可能で、医療や健康、環境等のモニタリングなど安心安全社会への寄与を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Wilfred Espulgar, Tatsuro Tadokoro, Eiichi Tamiya, Masato Saito | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Utility of Centrifugation-Controlled Convective (C3) Flow for Rapid On-chip ELISA | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 20150 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56772-6 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sakiko Ushiro, Masato Saito, Wilfred V. Espulgar, Eiichi Tamiya | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Developing integrated centrifugal convective PCR device for detection of drug-resistant gene | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 μ TAS2019 (proceedings) | 6. 最初と最後の頁 1232-1233 |
| 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 Wilfred Villariza Espulgar, Masato Saito*, Kazuya Takahashi, Sakiko Ushiro, Norihisa Yamamoto, Yukihiro Akeda, Shigeto Hamaguchi, Kazunori Tomono, Eiichi Tamiya | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Deskilled and Rapid Drug-Resistant Gene Detection by Centrifugal Force-Assisted Thermal Convection PCR Device | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Sensors | 6. 最初と最後の頁 1225 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s21041225 | 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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 後 早希子・齋藤 真人・Wilfred V. Espulgar・民谷 栄一 |
| 2. 発表標題 遠心熱対流による核酸分子増幅反応促進と微小反応場の集積検討 |
| 3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sakiko Ushiro, Masato Saito, Wilfred V. Espulgar, and Eiichi Tamiya |
| 2. 発表標題 DEVELOPING INTEGRATED CENTRIFUGAL CONVECTIVE PCR DEVICE FOR DETECTION OF DRUG-RESISTANT GENE |
| 3. 学会等名 μTAS2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 後 早希子・齋藤 真人・Wilfred V. Espulgar・民谷 栄一 |
| 2. 発表標題 遠心熱対流場の集積検討と薬剤耐性遺伝子の迅速検出 |
| 3. 学会等名 応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masato Saito |
| 2. 発表標題 Centrifugal microfluidics devices for bioassay |
| 3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会, シンポジウム "Development of Biosensing Technology Targeting Sustainability Development Goals" 「持続可能な開発目標を目指したバイオセンシングの開発と展開」(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 後 早希子、齋藤 真人、Wilfred Villariza Espulgar、民谷 栄一 |
| 2. 発表標題 遠心熱対流PCRの流路集積設計に向けたシミュレーション解析検討 |
| 3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤真人、Wilfred Esplugar、民谷栄一 |
| 2. 発表標題 遠心駆動力を利用したマイクロ流体制御とバイオアッセイへの応用 |
| 3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 後 早希子, 齋藤 真人, 民谷 栄一 |
| 2. 発表標題 遠心熱対流を利用した微小反応場中の遺伝子増幅反応の制御 |
| 3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤真人 |
| 2. 発表標題 現場計測を指向したバイオセンシングシステムの開発 |
| 3. 学会等名 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 研究会「有機分子・バイオエレクトロニクスの未来を観る」 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 真人, 後 早希子, Esplugar Wilfred |
| 2. 発表標題 遠心熱対流のためのマイクロ流路集積と迅速薬剤耐性遺伝子検出 |
| 3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 齋藤真人 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 生産技術振興協会 | 5. 総ページ数 112 |
| 3. 書名 研究ノート「現場利用を指向したバイオセンサシステム」、生産と技術、平成31年夏号(71巻3号) p64 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 齋藤真人 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 シーエムシー出版 | 5. 総ページ数 258 |
| 3. 書名 4-2. 遠心駆動マイクロ流体チップによるバイオアッセイ、バイオイノベーションに向けて～バイオテクノロジーの新技术からの新しい視点～ 監修：植田充美 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 齋藤真人、Wilfred Villariza Espulgar、民谷栄一 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 化学同人 | 5. 総ページ数 200 |
| 3. 書名 1章 マイクロ流体技術による細胞・核酸操作、Part シングルセル解析を支える細胞操作と計測技術 「DOJIN BIOSCIENCE SERIES シングルセル解析で何がわかるか」、竹山春子・細川正人編 | |

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 熱対流生成システム、流路チップ、及び熱対流生成装置 | 発明者 齋藤真人、後早希子 | 権利者 大阪大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-153074 | 出願年 2019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 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 明田 幸宏 (Akeda Yukihiro) | 大阪大学・医学部附属病院・講師 | |

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 |
|---------|---------|
| | |