

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18361

研究課題名(和文) 疾病関連細菌の迅速・簡易カウンティングを行うスマートバイオデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of smart biodevices for quick and simple counting of disease-related bacteria

研究代表者

田畑 美幸 (Tabata, Miyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・テニユアトラック助教

研究者番号：00636839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、疾病関連細菌を電気化学的に迅速に検出する小型診断デバイスを作製し、臨床医療の現場においてその場診断可能な細菌カウンティングシステムを開発することを目的とし、患者の体液サンプルに存在する細菌と同程度の大きさを有するセンサ電極を微細加工技術により集積化後、細菌特異的な抗体をセンサ上に固定化し、細菌を電気化学的に検出するセンサチップを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌検出技術は医療、生命科学、食品、環境など、幅広い分野において必要不可欠な技術である。細菌同定技術は開発から30年以上経過しているPolymerase chain reaction (PCR)に依存しているのが現状で、新たな検出原理の探求が滞っている。本研究では、微細センサの作りこみによる構造最適化と特異検出を実現する機能化センサ表面の構築の両方からアプローチするという新しい方法論により、高速細菌検出を検討することに学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To develop a small-sized diagnostic device for electrochemically detecting disease-related bacteria and to develop a bacterial counting system that enables in-situ diagnosis in clinical medicine, the sensor electrodes having the same size as the bacteria were integrated with the microfabrication technology. The bacteria-specific antibodies were immobilized on the sensor surface, and then the target bacteria was electrochemically detected.

研究分野：電気化学

キーワード：バイオセンサ 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌検出技術は医療、生命科学、食品、環境など、幅広い分野において必要不可欠な技術である。近年、腸内フローラという言葉により腸内で共生関係にある細菌数のバランスが体調に影響を及ぼしていることが広く認知されるようになった。一方で日本人の死因第三位である肺炎の主な原因はウイルスや細菌の感染によるものであり、それらの感染症は時に重篤化し、エボラ出血熱やデング熱などウイルス性感染症は社会的脅威として記憶に新しい。細菌による感染症は高齢者や乳幼児のような抵抗力が弱い人や HIV 感染症など免疫系疾患を患っている人が罹患しやすく、そのような人々は主に病院やグループホームなどの集団生活の場にいる場合が多く、院内感染により一気に感染者数が拡大してしまう。また腸管出血性大腸菌 O-157 による集団食中毒の発生も毎年のようにニュースで取り上げられており、細菌感染症の重症化は身近に起こりうる社会的問題であるといえる。軽度の細菌感染症は一般にかぜに似た症状を引き起こし、初診でレントゲン撮影や血液検査を行い診断の参考とされる。しかしそれらは細菌種の同定ではないのであくまでも参考であり、血液検査に至っては検査結果を得るまで一週間程度を要し迅速な診断ができないという課題がある。そのため、臨床医療の場では医師に迅速な検査結果を提供し診断や治療方針に指針を与えるような細菌検出デバイス開発のニーズがある。

2. 研究の目的

患者の体液サンプル内の細菌を同定する場合にはセルソーターや real-time PCR などの検出装置が利用され、それらは多くの生化学機器と同様に蛍光ラベリングによる光学的検出法を採用しており、高価な試薬や大型で専用の光学系検出機器、煩雑な操作を要するという課題がある。一方で、バイオトランジスタに代表される電気化学計測を利用したバイオセンサは、半導体技術との親和性からセンサ部分を高度に集積化することで高感度検出を実現し、ラベルフリーでリアルタイムな検出が可能であるという利点がある。本研究では、微細加工技術により細菌の大きさに合わせたセンシングエリアを作製し、特定の細菌を高速カウンティングする方法を提案し、実施した。

3. 研究の方法

本提案では細菌をカウンティングするデバイスの作製を目指した。電気化学計測は、非標識でレーザー励起光や光学検出系が不要であるため、小型化に有利であり、微細加工技術によるゲート電極の高密度化・並列化が容易である。その計測原理は電極上で捕捉された標的分子の荷電または誘電率変化を固 - 液界面電位変化として直接検出するものであるため、精密な表面設計が重要である。

細菌が 1-2 μm の大きさを有していることから、金を電極材料として直径 2 μm の大きさを SiO_2 で厳密に規定し集積化したカウンティングチップを作製し、SU-8 を保護膜として電極以外の部分を覆った。細菌に特異的な抗体を固定化し電極表面に細菌を捕捉した後インピーダンス計測を行った。抗体分子の固定化方法、非特異的吸着抑制分子の共固定といった要素の最適化を行った。ターゲットとなる細菌には、扱いが容易である歯周病細菌を用いた。計測結果をチップ作製プロセスにフィードバックし、SU-8 で形成しているウェルの効果を検証した。

4. 研究成果

電気化学的に対象を検出する本方式では、電極表面での分子認識反応を電流値または電圧値変化として記録するため、シングルセル検出が好ましい。センシングエリアを細菌の大きさに合わせ、2、5、10 μm と変化させたセンサをフォトリソグラフィーにより試作した(図 1-2)。インピーダンス計測の結果、2 μm のセンサがシングルセル検出に適していることを見出した。一方で 2 μm の場合 SU-8 保護膜の除去が非常に困難であり、歩留まりに課題が残った。SU-8 は粘性が高くネガレジストであることに起因していることが示唆されており、ポジレジストの利用により歩留まりの問題は解決すると見込まれる。

複数の歯周病菌を同時検出するためにはバイオセンサのアレイ化が必要である。図 1 に示し

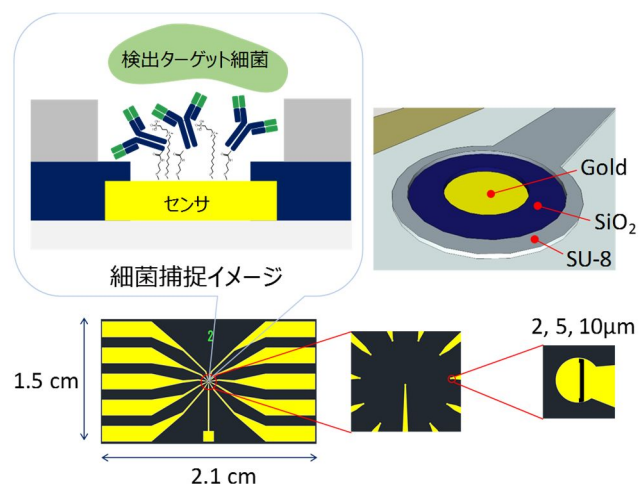


図 1: 最適化したセンサ構造レイアウト

たように、10 チャンネルの同時検出を実現し、細菌の電気化学検出の原理検証実験には有用であった。実際の利用を想定し、更なる高集積化を進めていく。引き続き、2 μm のセンシング領域を持つセンサチップを用いて、修飾前、抗体修飾後、細菌添加後のインピーダンス計測を行った。電極表面と溶液間でメディエーターのやり取りができなくなることに起因し、修飾前 < 修飾後 < 細菌添加後の順でインピーダンス値が大きくなることを確認した。センサ信号を BLE 方式で送信し、タブレット端末で受信・表示するシステムの構築に取り組んだ。センサコネクタ部分に改良が必要であるが、簡単な電位計測結果表示は実現した。

このように、検出原理の確立及びセンサプロトタイプを試作に取り組み、結果の見える化を推進した。並列解析のための電極配置に改善の余地があるため、今後も継続して実際サンプルを使用した測定を行い、検出感度・検出レンジ・検出限界を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Chindanai Ratanaporncharoen, Miyuki Tabata, Natthapol Watanagool, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Mana Sriyudthsak, Yuji Miyahara,	4. 巻 30(5)
2. 論文標題 Characterization and Optimization of Thermally Grown Iridium Oxide and Its Application to pH Sensors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1175 ~ 1175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM.2018.1733	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 Chindanai Ratanaporncharoen, Miyuki Tabata, Yuichi Kitasako, Masaomi Ikeda, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Junji Tagami, Yuji Miyahara	4. 巻 90
2. 論文標題 pH Mapping on Tooth Surfaces for Quantitative Caries Diagnosis Using Micro Ir/IrOx pH Sensor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4925 ~ 4931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b00867	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 Tabata Miyuki, Miyahara Yuji	4. 巻 32
2. 論文標題 Label-free Nucleic Acid Amplification Detection using Electrochemical Sensors for Liquid Biopsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 97 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2494/photopolymer.32.97	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 Tabata Miyuki, Miyahara Yuji	4. 巻 7
2. 論文標題 Liquid biopsy in combination with solid-state electrochemical sensors and nucleic acid amplification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6655 ~ 6669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9TB00718K	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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Chindanai Ratanaporncharoen, Miyuki Tabata, Noboru Ishihara, Kazuya Masu, Mana Sriyudthsak, Yuichi Kitasako, Masaomi Ikeda, Junji Tagami, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Development of the wireless pH sensor for quantitative analysis in dental field
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chindanai Ratanaporncharoen, Miyuki Tabata, Noboru Ishihara, Kazuya Masu, Mana Sriyudthsak, Yuichi Kitasako, Masaomi Ikeda, Junji Tagami, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Application of solid-state electrochemical sensors for quantitative analysis in dental field
3. 学会等名 Frontiers2018" - EPFL/TMDU/UTokyo Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田畑美幸
2. 発表標題 リキッドバイオプシーを指向する等温核酸増幅と組み合わせた小型電気化学センサ
3. 学会等名 シーエムシー出版 早期発見に向けた次世代がん検査技術の開発と今後の展望 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Tabata, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Biosensors detecting cancer biomarkers for liquid biopsy
3. 学会等名 Matrafured2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Tabata, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Electrical/Electrochemical detection of small nucleic acids for liquid biopsy
3. 学会等名 EMN Barcelona Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑美幸, Chindanai Ratanaporncharoen, 北迫勇一, 池田正臣, 合田達郎, 松元亮, 田上順次, 宮原裕二
2. 発表標題 マイクロpHセンサによる定量う蝕診断
3. 学会等名 2019年度砥粒加工学会学術講演会 (ABTEC2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Tabata, Yusuke Yoshioka, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Takahiro Ochiya, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Ir/IrOx chips for electrochemical DNA detection combining with isothermal nucleic acid amplification
3. 学会等名 4th International Symposium on Biomedical Engineering ((国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Tabata, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Electrical/Electrochemical detection of small nucleic acids for simple liquid biopsy platforms
3. 学会等名 Bio4Apps2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑美幸, 吉岡祐亮, 合田達郎, 松元亮, 落谷孝弘, 宮原裕二
2. 発表標題 microRNAを定量検出するpHセンサチップの開発
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑美幸, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二, 吉岡祐亮, 落谷孝宏
2. 発表標題 低分子核酸を定量するpHセンサチップの開発
3. 学会等名 令和元年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田畑美幸、宮原裕二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 13
3. 書名 酵素トランスデューサーと酵素技術展開 第7章 酵素FETセンサ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ http://www.tmd.ac.jp/bsr/index.html
--

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