

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500448

研究課題名（和文） 独自のマイクロチップと増幅法を駆使したPOCTデバイスの開発

研究課題名（英文） Point-of-care testing devices with original microfluidic technology and signal amplification method

研究代表者

細川 和生 (HOSOKAWA KAZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：00373366

研究成果の概要（和文）：本研究では、独自のマイクロチップと増幅法を活用して、血中などに含まれる疾患マーカーを簡便・迅速・高感度に検出する技術の開発を目的としていた。まず抗体の固定化法を検討したところ、デキストランを介して基板に共有結合する方法が、感度の点で優れていることが分かった。次に、複数種類の疾患マーカーを同時に検出する技術の開発に成功した。さらに、抗体の代わりに DNA 断片を使うことで、この方法がマイクロ RNA 検出に応用できることも分かった。

研究成果の概要（英文）：We have developed rapid and sensitive detection methods for disease biomarkers using original microchip and amplification technologies. First, we found that covalent immobilization of antibody to the substrate via dextran matrix is advantageous in terms of sensitivity. Next, we succeeded in detecting three biomarker proteins simultaneously on the microchip. Finally, this method was successfully applied to microRNA detection as well.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：マイクロチップ、免疫アッセイ、ポイント・オブ・ケア、疾患マーカー、臨床検査、抗体

1. 研究開始当初の背景

血液などに含まれる特定のタンパク質は疾患と強い相関があるため、疾患マーカーと呼ばれ、診断の基本データとして日常的に検出・定量が行なわれている。たとえば血中の前立腺特異抗原（PSA）濃度が 10 ng/mL を超えると前立腺がんの強い疑いがあると

される。現在、PSAの定量は高感度免疫アッセイ（免疫学的測定法）を用いて専門の検査センターで行なわれ、結果が出るまで最低2～3日かかる。通院患者は結果の説明を受けるために病院を再度訪れなければならず、さらにサンプルの輸送コストや取り違えリスクなどもある。こうした無駄は「その場

検査」(point-of-care testing, POCT)ができれば避けられる。実際、妊娠検査では簡便なディップスティックが市販されており、素人が1分で検査できる。しかし、PSAのように高感度・定量性を要するものにはディップスティックは適用できない。

POCTの新しいプラットフォームとして、マイクロチップが注目を集めている。ここで言うマイクロチップとは、内径0.1 mm程度の流路を内蔵した数 cm 角の平板であり、半導体加工技術を応用して製作する。こうしたマイクロ流路を用いると免疫アッセイが迅速に行なえることが分かっている。マイクロチップ免疫アッセイは今世紀に入って多数の研究例が報告されており、おおむね10～30分の測定時間をうたっている。この点はPOCTとして合格と言えるものの、その他の点では、それぞれの研究が課題をかかえていた。たとえば周辺装置が大掛かり、操作に熟練を要する、感度不足、信頼性不足などであった。

2. 研究の目的

血液、尿、唾液などに含まれる疾患マーカー（例えば前立腺特異抗原PSAや甲状腺刺激ホルモンTSHなど）を免疫アッセイによって検査する際に、試料を検査センターなどに送るのではなく、その場で簡便、迅速、高感度、定量的に検査することができるマイクロチップデバイスを開発する。そのために、申請者の独自技術である自律駆動マイクロチップとLFDA (laminar flow-assisted dendritic amplification, 層流樹状増幅法) を活用する。

3. 研究の方法

(1) 抗体固定化法の検討

まず、これまで他の抗原(CRP)で実績のあった、物理吸着による方法で抗体を固定化した。精製済みのPSAとヒト女性の血清(PSAを含まない)を購入し、それらを適宜混合して模擬サンプルを作製した。それらのサンプルに対して免疫アッセイを行った。

次に、次に、あらかじめ抗体を共有結合させた基板でマイクロチップを作製した。具体的には、ガラス基板の表面をアミノ化した後、デキストランを介して抗体を共有結合させた。次にPDMS基板上にマイクロ流路を加工し、それを抗体固定化ガラス基板と接合してマイクロチップを作製した。

(2) 複数タンパク質の同時検出

3種類のがんマーカータンパク質 (AFP = α フェトプロテイン, CEA = がん胎児性抗原, PSA) を同時に検出、定量する実験を試みた。

ヒトAFP, CEA, PSAそれぞれに対する抗体をスライドガラス表面に共有結合で固定化した。固定化には幅100 μ m, 間隙100 μ mのPDMS流路を用いて、平行線状の抗体パターンを作製した。そのPDMSをはがし、別のPDMS流路(Y字型, 幅100 μ m, 深さ25 μ m)を抗体パターンに直交するように配置して、マイクロチップを完成した。各抗原をウシ胎児血清に溶解してサンプルとし、自律駆動法およびLFDAを用いて免疫アッセイを行った。サンプル体積は0.5 μ L, 測定時間は20 minとした。

(3) マイクロRNAの検出

新しいがんマーカーとして注目されているマイクロRNAの検出を試みた。マイクロRNAは免疫アッセイと同様の原理で検出することができる。すなわち、ターゲットRNAと相補的な配列を持ったプローブDNAを、抗体の代わりにターゲットと結合させれば良い。この実験ではヒトmiR-21 (22塩基)をターゲットとして、そこに同時に結合できる2種類のプローブDNA (捕捉プローブと検出プローブ, 各11塩基)を設計した。捕捉プローブをガラス基板に固定化し、そこにPDMS流路を接合することにより、マイクロチップを完成した。自律駆動法とLFDAを用い、免疫アッセイと同じ要領で(2次抗体の代わりに検出プローブを注入)検出を行った。サンプル体積は0.5 μ Lとした。

4. 研究成果

(1) 抗体固定化法の検討

物理吸着による方法で抗体を固定化し、PSAの免疫アッセイを行ったところ、血清サンプルでの検出限界は0.52 ng/mLとなった。これは血清の代わりにバッファを用いた場合(0.49 ng/mL)と大差なく、血清中の夾雑物が測定にほとんど影響しないことが分かった。また、LFDAによる増幅を行わない場合の検出限界(140 ng/mL)と比較すると200倍以上高感度であり、LFDAの効果が実証された。

次に共有結合による方法で抗体を固定化し、PSAの免疫アッセイを行った。このマイクロチップでは、免疫アッセイの各試薬に界面活性剤を添加しても、抗体が表面から脱離しないと考えられたので、実際に加えて実験したところ、非特異吸着が大幅に抑制され、PSAの検出限界1 pg/mLという超高感度を達成した。比較のため、抗体を物理吸着させたマイクロチップにおいて同様な実験を行ったところ、抗体が脱離してしまい、測定に適さないことが分かった。以上の結果から、抗体を基板に共有結合して、試薬に界面活性剤を添加することが感度向上に有効である

ことが分かった。

(2) 複数タンパク質の同時検出

まず反応の特異性を確認するために、一つの抗原のみを高濃度 (1 μ g/mL) に含むサンプルで実験を行ったところ、対応する抗体パターンのみで強い蛍光が観察され、その他の抗体パターンにおいて有意な交差反応は観察されなかった。次に各抗原を同時に変化させて、対応する抗体パターンにおける蛍光を測定して検量線を作成した。検出限界は 0.56 ng/mL (AFP), 0.22 ng/mL (CEA), 0.61 ng/mL (PSA) となり、臨床的に意義のある濃度範囲を十分にカバーする測定可能域が得られた。これらの結果から、本手法が複数疾患マーカーの同時 POCT に有望であることが分かった。

(3) マイクロ RNA の検出

LFDA による増幅反応開始から数分で、捕捉プローブを固定した位置において蛍光強度が指数関数的に増加した。この増加が始まる時間はマイクロ RNA 濃度に依存し、高濃度な場合ほど早期に信号増加が開始した。しかしその増加開始時間には若干のばらつきがあり、またブランク (濃度ゼロ) の場合にも信号増加が見られた。そこで常に参照溶液としてブランクを流し、サンプル溶液との比較によってセンサーの応答を定義することにした。その応答をサンプル濃度に対してプロットしたところ、検出限界値として 0.5 pM が得られた。以上から、本研究の方法がマイクロ RNA に対しても有効であることが分かった。

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 7 件)

1. Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Application of microchip phosphate-affinity electrophoresis to measurement of protease activity in complex samples, *Analytical Biochemistry*, 432, 8-10, 2013. (査読有)
2. Naoki Sasaki, Jiansheng Gong, Makoto Sakuragi, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda, Yoshihiro Ito; Hydrodynamic cell pairing and cell fusion through a microslit on a microfluidic device, *Japanese Journal of Applied Physics*, 51, 030206, 2012. (査読有)
3. Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Activity measurement of protein kinase and protein phosphatase by

microchip phosphate-affinity electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 421, 782-784, 2012. (査読有)

4. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Rapid microRNA detection using power-free microfluidic chip: coaxial stacking effect enhances the sandwich hybridization, *Analyst*, 137, 3234-3237, 2012. (査読有)

5. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLOS ONE*, 7, e48329, 2012. (査読有)

6. Hiroki Okada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Power-free microchip immunoassay of PSA in human serum for point-of-care testing, *Analytical Sciences* 27, 237-241, 2011. (査読有)

7. Kazuo Hosokawa, Takahiro Sato, Yasunobu Sato, Mizuo Maeda; DNA detection on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification, *Analytical Sciences* 26, 1053-1057, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. Kazuo Hosokawa; Power-free microfluidic device for point-of-care medical tests, CRC International Symposium, Sapporo, Japan, February 5-6, 2013.
2. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Sub-attomole detection of microRNA in twenty minutes using power-free microfluidic chip: towards point-of-care testing, *μ TAS 2012*, pp. 776-778, Ginowan, Japan, October 28-November 1, 2012.
3. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda; Manipulation of individual live cells by micro-fabricated structure, The 7th Sweden-Japan BioNano Workshop, Stockholm, Sweden, October 15-18, 2012.
4. Ryo Ishihara, Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda;

MicroRNA detection on a power-free microchip toward point-of-care testing, The 7th Sweden-Japan BioNano Workshop, Stockholm, Sweden, October 15-18, 2012.

5. 細川和生; 自律駆動マイクロチップを用いたイムノアッセイ, 生物化学的測定研究会第17回学術集会, 東京, 6月8日, 2012.

6. Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Activity measurements of kinases and phosphatases in cell lysates by microchip phosphate-affinity electrophoresis, *μTAS 2011*, pp. 1929-1931, Seattle, USA, October 3, 2011.

7. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Highly sensitive microRNA detection using gold nanoparticles on power-free microfluidic chip: towards point-of-care early-stage cancer diagnosis, *μTAS 2011*, pp. 491-493, Seattle, USA, October 3, 2011.

8. 小松仁, 新田英之, 韓愛善, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップと金ナノ粒子によるマイクロRNAの検出, 日本分析化学会第60年会, 名古屋, 9月14日, 2011.

9. 臼田雪子, 韓愛善, 佐藤香枝, 細川和生, 前田瑞夫; マイクロチップ・リン酸基アフィニティー電気泳動法によるチロシンキナーゼ c-*Src* の活性測定, 日本分析化学会第60年会, 名古屋, 9月14日, 2011.

10. 細川和生, 岡田浩樹, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロチップによる複数の疾患マーカータンパク質同時イムノアッセイ, 日本分析化学会第60年会, 名古屋, 9月14日, 2011.

11. 韓愛善, 細川和生, 前田瑞夫; マイクロチップにおけるリン酸基特異的なアフィニティー電気泳動によるキナーゼ/フォスファターゼ活性の測定, 日本分析化学会第60年会, 名古屋, 9月14日, 2011.

12. 森崎良, 細川和生, 櫻木誠, 吉田泰彦, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; マイクロ流体チップを用いたマウス胸腺由来細胞 OP9G とマウス胚性幹細胞 EB3 の一対一配置と融合, 日本分析化学会第60年会, 名古屋, 9月14日, 2011.

13. 小松仁, 新田英之, 韓愛善, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップを用いたマイクロRNA高感度検出, 第23回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 千葉, 6月11日, 2011.

14. Naoki Sasaki, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Alternating current cloud point extraction on a microfluidic chip for preconcentration of membrane-associated biomolecules, *PACIFICHEM 2010*, Honolulu, USA, December 16, 2010.

15. Hiroki Okada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Detection of clinical cut-off values of prostate specific antigen in poly(dimethylsiloxane) microchannels for point-of-care testing, *PACIFICHEM 2010*, Honolulu, USA, December 16, 2010.

16. Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Detection of kinase activity by phosphate-affinity electrophoresis on a PDMS microchip, *PACIFICHEM 2010*, Honolulu, USA, December 16, 2010.

17. 岡田浩樹, 細川和生, 前田瑞夫; Power-free マイクロチップを使ったイムノアッセイと医療診断への展開, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 名古屋, 11月18日, 2010.

18. 佐々木直樹, 森崎良, Jiansheng Gong, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; 流れを利用する異種細胞配置・融合用マイクロ流路のレイ化, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 名古屋, 11月18日, 2010.

19. 細川和生; 自律駆動マイクロチップによる簡便・高感度なイムノアッセイ, 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 岐阜, 11月16日, 2010.

20. Naoki Sasaki, Jiansheng Gong, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda, Yoshihiro Ito; Pairing and fusion of heterotypic cells in a microchannel, *μTAS 2010*, pp. 687-689, Groningen, The Netherlands, October 6, 2010.

21. Hiroki Okada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Low-femtomolar detection of biomarker protein by point-of-care immunoassay on a power-free microchip with covalently immobilized antibody, *μTAS 2010*, pp. 560-562, Groningen, The Netherlands, October 5, 2010.

22. 森崎良, 佐々木直樹, 櫻木誠, 細川和生, 吉田泰彦, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; 細胞融合実験用マイクロ流体チップの開発, 日本化学会第4回関東支部大会, つくば, 8月30日, 2010.

23. 佐々木直樹, Jiansheng Gong, 細川和生, 前田瑞夫, 伊藤嘉浩; マイクロ流路内異種細胞配置・融合法の開発, 第21回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 東京, 6月11日, 2010.

24. 岡田浩樹, 細川和生, 前田瑞夫; マイクロチップ免疫アッセイによる前立腺がんマーカーの迅速・簡便・高感度解析, 第21回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 東京, 6月11日, 2010.

[その他]

該当項目なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 和生 (HOSOKAWA KAZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学
研究室・専任研究員

研究者番号：00373366

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし