

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710146

研究課題名(和文) オンサイト遺伝子迅速検知用集積化マイクロチップの開発

研究課題名(英文) On-chip genetic detection microfluidic chip for the rapid field detection of biological agents

研究代表者

淵脇 雄介 (FUCHIWAKI, YUSUKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80468884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、平板型プラスチック基板に連続蛇行流路を切削加工で作製し、この蛇行流路内で発生する温度勾配を、高効率なポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実現するためのアクチュエーターとして活用した。これにより、世界最速水準まで高速化したPCR法が可能なマイクロ流路チップを開発した。さらに、ポンプの吐出駆動だけで、反応・送液・検出のセンシングにおける全工程を、完了できるよう集積化させる事に成功した。滅菌処理済みの炭疽菌の検知では、市販のサーマルサイクラーに対し80%程の増幅効率で、15分以内の短時間に検知することができた。

研究成果の概要(英文)：Novel flow-through PCR microfluidics system using vapor pressure of destabilizing-flow source was developed and achieved ultimately-rapid and small-volume DNA amplification on a chip. The yield of PCR amplification compared to the thermal cyclers was shown about 80% in less than 15 minutes. The chip device was made of pressure-sensitive polyolefin film (PSP) and cyclo-olefin polymer (COP) substrate, which was processed with a micro-Numerical Control machine to produce a microchannel. The enclosed structure of the microchannel was fabricated solely by weighting PSP film on COP, resulting in a practical application that excels when compared with other devices. For automatic-mixing on a single chip, pillar structures were constructed in a reaction chamber. Droplets of reagents were captured among these pillars by surface tension. When the sample solution was loaded into the chamber, the reagents were mixed and then flowed to the opposite side of microchannel.

研究分野：ナノ マイクロ科学

キーワード：PCR 炭疽菌 オンサイト

### 1. 研究開始当初の背景

感染症やバイオテロといった「見えない敵」による被害を防止・最小限にする技術は、これまで国の科学技術基本計画でも強く要望されてきた。これに対し、迅速診断キットとしてよく使われている免疫クロマト法は、一般的に簡便ではあるが感度が低く、偽陽性・偽陰性の率の高さが問題となっていた。また、遺伝子検査でよく行われるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法は感度が高いが、一般的に 95、72、55 のヒーターの昇降操作を 30 cycle 以上繰り返すため、早くても 1 時間以上を必要とし、時間がかかり過ぎるという問題があった。

こうした背景のなかで、PCR 速度を極限まで速くするため、あらかじめ PCR に要する 3 つの温度をセットしたヒーターを同一平面上に設置し、その上に連続蛇行流路が作製されたマイクロ流路チップを密着させた、フロースルーPCR 法という手法が登場し注目をあつめていた (図 1)。この方法は、流路内に連続的に PCR 液を送液するだけで、PCR が迅速に完了するため、本来 PCR に必要なヒーターの昇降制御の操作が不要になり、そのうえ、理論上は PCR が最速になる。

これまで、米国や国内の企業が先行して、本フロースルーPCR 法による遺伝子検査装置の実用化に取り組んできたが、大量の PCR 液を送液し続ける必要があること、又、90 以上の熱変性反応域では、流路内を流れる PCR 液が突沸し乱流を引き起こすため、実用的な仕様の構成にまでは至らなかった。

これに対し本研究では、これらを解決して、より簡便な PCR を実現するため、これまで突沸や乱流を引き起こしていた 90 以上の熱変性反応域の蒸気圧を、逆に、効率的な PCR 送液を実現するための駆動力として活用することに着眼点をおいた。また、実際に現場で手軽に扱えるよう、流体操作のための駆動力は、実装が容易な 1 つのポンプ吐出だけとして、簡便・高速に遺伝子検査を完了できるマイクロ流路チップの開発に取り組んだ。

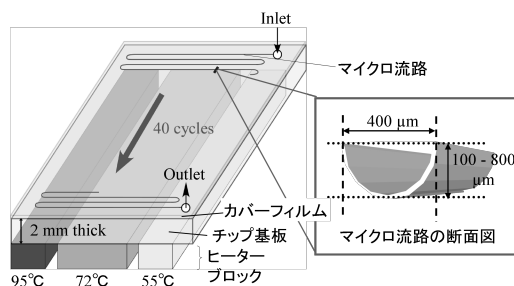


図 1: 蛇行流路がデザインされたフロースルーPCR 法によるマイクロ流路チップ

### 2. 研究の目的

簡便さと高速な PCR 法の実現は、トレードオフの関係にあるが、PCR 効率をあげることで解決できる。そこで、試料プラグ液が流動し

ていくための駆動力である蒸気圧差と、マイクロ流路構造の最適化をはかることで、PCR 効率の向上を試みた。また、流路内壁への吸着を抑制することで、PCR 効率を市販のサーマルサイクラーに対して、これまでの 50% 程度から 80% まで向上させることを目指した。さらにポンプの吐出だけで、安定な遺伝子検知が可能なマイクロチップ上への集積化を目指した。また、バイオテロのような危機的状況下では、センサ情報から得られるデータの信頼性確保が不可欠であるため、擬剤を使用して誤報防止に向けた検知感度の検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実用的なマイクロフロー集積化チップの作製

マイクロチップは、各々温度設定されたマイクロ流路内をプラグ試料液が流動するため、流路壁面への吸着と、試料液の蒸発による収率の低下を低減できるデバイス設計である事が望ましい。そこで、耐熱性・疎水性・密閉性に優れたシクロオレフィンポリマー (COP) と透明で薄い圧着フィルムを用いて、マイクロ流路チップ作製した。本方法は、作製に伴う加熱・酸素プラズマ等の煩雑な操作が一切不要で、更に、クリーンな環境下でコンタミフリーに反応液の封入が可能である。

また、COP 由来のピラー構造をチャンバー内に形成し、反応液をこれらピラーの間隙へ封じ込める事により、マイクロ流路チップへの PCR 反応液充填機能と、送液試料と PCR 反応液の混合機能が、1 シリンジ駆動だけで自動的に行えるチャンバーを実現した (図 2)。

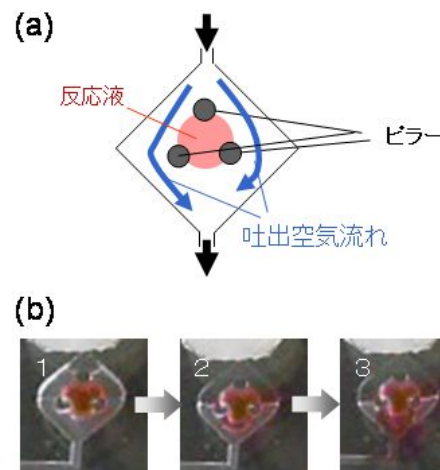


図 2 COP ピラーによる混合チャンバー

#### (2) 蒸気圧と試料プラグ液を活用した簡便・高速な PCR 法

熱変性域で発生する蒸気圧は、プラグ液が昇温方向へ移動する流速を遅くするため、PCR に必要な伸長時間を安定に長く確保できる (図 3)。一方、冷却方向は、逆に熱変性域の蒸気圧が、プラグ液の流速を加速させて瞬

時に移動させるため、迅速な冷却が達成され、副生成物の発生が最小限に抑えられる(図2)。さらに、マイクロ空間で流動するプラグ液は、高速な内部対流により、反応の高速化と、圧力損失の低い高速送液を実現できるため、超高速・高効率なフローPCR法が可能なる事を見出した(図3, 4)。

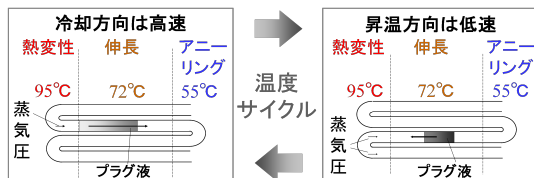


図3: 蒸気圧を利用した試料プラグ液の温度の昇降操作の概略図

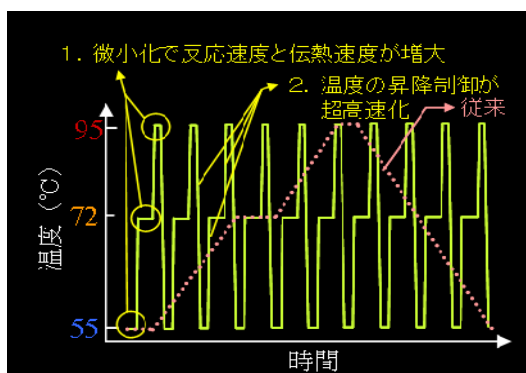


図4: 蒸気圧を利用した世界最速水準でのPCR温度プロファイルのイメージ

(3)バイオテロ事案発生時を想定した現場での測定と性能の検証

迅速な検知は、現場型検査デバイスに要求される性能として最も重要な要素技術の一つである。ウイルスや細菌はエアロゾルとして空气中に散布・飛散しているため、迅速に検知しなければ大気中に致死濃度のエアロゾルが蔓延化し、被害及び感染の拡大を水際で阻止する事が困難になる。そこで実際に、開発した集積化チップと複数の装置を組み合わせ検知感度の性能を現場で検証した(図5)。致死量の炭疽菌が飛散してから1分後にトリガー信号が発生し、続いてマイクロサイ

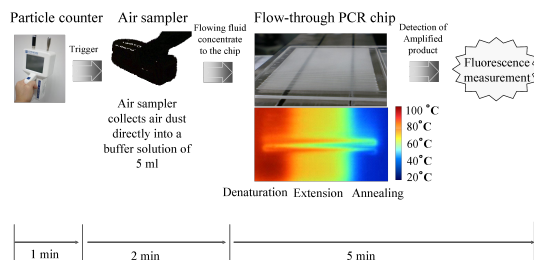


図5: 大気中に強毒性の細菌飛散によるテロを想定した現場測定の検証

クロンでエアロゾル捕集とバブリング濃縮、芽胞破砕を2分間行なった。その後、試料液をチップへ注入して5分後に検知が完了した。この事から、飛散後僅か8分での検知に成功した。また、誤報検知の検証として炭疽菌と同じバチルス属の枯草菌の芽胞を混入、或は非混入した試料を用いて、マイクロ流路チップ上での検証を行ったところ、検知されなかった。

#### 4. 研究成果

研究期間全体をとおして得た成果としては、PCRから検知までをフィールドオンチップに完了するマイクロ流路チップの開発のため、1. 実用的なマイクロフロー集積化、2. 蒸気圧と試料プラグ液を活用した簡便・高速な新規なPCR法、3. バイオテロ事案発生時を想定した現場での簡便な検知ができることを示した。また、多項目を現場でより簡便に検知することを実現するため、タブレット端末と小型の機能電子制御ボードで動作確認することを進めながら検討してきた結果、少なくとも4項目の試料を超高速・同時にPCR増幅できることが確認された。

一般的に、こうした技術を集積化させて遺伝子を迅速、自動検知するためのフィールドオンチップの研究開発は、複雑な外部制御や煩雑な表面処理などを組み合わせで行われている事例が殆どであり、装置が大型で高価なものが多い。これに対して本法は、ポンプの吐出だけでこれらの機構がすべて完了することから、センサシステムの小型化・ネットワーク化・情報通信化を可能にしていくうえで有用な知見を提供した。またこれらの成果は、論文化と特許化をとおして、広く社会・国民に公開するよう一貫してつとめた。

#### 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 15 件)

瀧脇雄介、Batch Quartz Crystal Microbalance Immunosensor using a Protein Immobilized Hydrophilic Polymer, ANALYTICAL LETTERS, 査読有、48巻、2015、1570-1577  
DOI: 10.1080/00032719.2014.994120

安澤幹人、鳥羽威人、日裏健太郎、李江、コインカー パンカジ マドゥカー、植木智之、瀧脇雄介、Preparation of micro-biosensor for continuous glucose monitoring, MODERN PHYSICS LETTERS B, 査読有、29巻、2015、1-5  
DOI: 10.1142/S0217984915400400

安澤幹人、大村優也、日裏健太郎、李江、瀧脇雄介、田中正人、Preparation of enzyme-immobilized electrodes using cellulose solution, Chemical Sensors,

査読無、31 卷 Suppl. A、2015、pp. 94-96  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2014/2014b-abt.html>

淵脇雄介、田中正人、大家利彦、  
Inexpensive and Reliable Monitoring of  
the Microdeposition of Biomolecules,  
ANALYTICAL LETTERS, 査読有、48 卷、2015、  
921 - 928  
DOI: 10.1080/00032719.2014.968929

淵脇雄介、田中 正人、榎田 洋二、大家 利  
彦、New Approach to a Practical Quartz  
Crystal Microbalance Sensor Utilizing  
an Inkjet Printing System, SENSORS, 査  
読有、14 卷 11 号、2014、20468 - 20479  
DOI: 10.3390/s141120468

淵脇雄介、永井秀典、Study of a liquid  
plug-flow thermal cycling technique  
using a temperature gradient-based  
actuator, SENSORS, 査読有、14 卷、2014、  
20235 - 20244  
DOI: 10.3390/s141120235

大家利彦、山瓶子勇次、田中正人、淵脇  
雄介、阿部佳織、片岡正俊、Surface  
Processing by Ultrafast Laser for POCT  
Device, Journal of Japan Laser  
Processing Society, 査読有、21 卷 3 号、  
2014、11-16  
[http://www.jlps.gr.jp/journal/21-3.p  
df](http://www.jlps.gr.jp/journal/21-3.pdf)

安澤幹人、三川純平、李江、日裏健太郎、  
淵脇雄介、PREPARATION OF  
ENZYME-IMMOBILIZED ELECTRODES USING  
CELLULOSE DISPERSION AND THEIR  
APPLICATION TO SENSORS, Chemical  
Sensors, 査読無、30 卷 Suppl. B、2014、  
130-132  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2014/2014b-abt.html>

淵脇雄介、矢部雄一、安達良紀、田中 正  
人、阿部佳織、片岡 正俊、大家 利彦、  
Inkjet monitoring technique with  
quartz crystal microbalance (QCM)  
sensor for highly reproducible  
antibody immobilization, SENSORS AND  
ACTUATORS A-PHYSICAL, 査読有、219 卷、  
2014、1 - 5  
DOI: 10.1016/j.sna.2014.08.010

古谷俊介、鳴石奈穂子、斎藤真人、民谷  
栄一、淵脇雄介、永井秀典、Rapid and  
Highly Sensitive Detection by a  
Real-time Polymerase Chain Reaction  
Using a Chip Coated with Its Reagents,  
ANALYTICAL SCIENCES, 査読有、30(5) 卷、

2014、569-74  
DOI: org/10.2116/analsci.30.569

永井秀典、淵脇雄介、微小流体デバイス  
を用いた可搬型高速遺伝子検査システム、  
電気学会論文誌 C 電子・情報・シス  
テム部門誌、査読有、134 卷 4 号、2014、  
510-514  
DOI:[http://doi.org/10.1541/ieejieiss.  
134.510](http://doi.org/10.1541/ieejieiss.134.510)

日裏健太郎、枝川和明、淵脇雄介、安澤  
幹人、Preparation of biorecognition  
elemented-immobilized electrodes  
using electrodeposition method and  
their application to sensors, Chemical  
Sensors, 査読無、30 卷 Suppl. A、2014、  
pp. 13-15  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2014/2014a-abt.html#5>

枝川和明、淵脇雄介、安澤幹人、In Vivo  
Evaluation of Fine Needle Amperometric  
Glucose Sensors Implanted in Rabbit's  
Blood Vessel, JOURNAL OF THE  
ELECTROCHEMICAL SOCIETY, 査読有、161  
卷 2 号、2014、B3111-B3115  
DOI: 10.1149/2.016402jes

淵脇雄介、田中正人、山瓶子勇次、阿部  
佳織、片岡正俊、大家利彦、DEVELOPMENT  
OF POINT-OF-CARE TESTING DEVICES USING  
LASER PROCESSING AND INK-JET PRINTING,  
Chemical Sensors, 査読無、29 卷 Suppl.  
B, 2013、pp. 43-45  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2013/2013b-abt.htm>

淵脇雄介、片岡正俊、大家利彦、脇田慎  
一、吉田康一、DO-IT-YOURSELF MICRO  
ANALYSIS CHIP AND ITS APPLICATION TO  
ACCURATE DIAGNOSTIC, Chemical Sensors,  
査読無、29 卷 Suppl. B, 2013、pp. 40-42  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2013/2013b-abt.htm>

[学会発表](計 3 件)

淵脇雄介、オンサイト超高速遺伝子検知  
用マイクロ流体デバイス、2013 年日本化  
学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16  
日、東広島市

淵脇雄介 他、メカトロニクス技術を駆  
使した POC チップ、日本分析化学会第 73  
回分析化学討論会、2013 年 05 月 19 日、  
函館市

淵脇雄介、マーカー等解析用マイクロ流  
体デバイスの開発、公益社団法人日本分  
析化学会中国四国支部 徳島地区分析技

術セミナー、2012年12月07日、徳島市

〔図書〕(計 1 件)

瀧脇雄介、化学と工業、超高速に遺伝子を検知するマイクロチップ - 5 分間以内にウイルス等の遺伝子を迅速検知 -、65 巻 11 号、2012、882-883

〔産業財産権〕

出願状況(計 5 件)

名称：核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ

発明者：永井秀典、古谷俊介、萩原義久、瀧脇雄介

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2014-140758

出願年月日：平成 26 年 07 月 08 日

国内外の別：国内

名称：核酸増幅装置及び核酸増幅方法

発明者：瀧脇雄介、田中正人、永井秀典

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2014-012420

出願年月日：平成 26 年 01 月 27 日

国内外の別：国内

名称：マイクロチャンバー及び液体の混合方法

発明者：瀧脇雄介、片岡正俊、大家利彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2013-095009

出願年月日：平成 25 年 04 月 30 日

国内外の別：国内

名称：マイクロ流体装置を活用した核酸増幅方法

発明者：瀧脇雄介、片岡正俊、大家利彦、脇田慎一

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2013-090154

出願年月日：平成 25 年 04 月 23 日

国内外の別：国内

名称：定量用マイクロチャンバー

発明者：瀧脇雄介、永井秀典、片岡正俊、大家利彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2012-131147

出願年月日：平成 24 年 06 月 08 日

国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：核酸増幅方法

発明者：永井秀典、瀧脇雄介

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5717235 号

出願年月日：平成 22 年 3 月 26 日

取得年月日：平成 27 年 3 月 27 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧脇 雄介 (FUCHIWAKI Yusuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80468884