

UV レーザ技術を駆使した医療ニーズ課題解決型 バイオチップ分子認識界面の開発

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 瀧脇雄介

(平成 23 年度奨励研究助成 AF-2011220)

キーワード：バイオチップ，UV，分子認識

1. 研究の目的と背景

1・1 医療機器のニーズ

健康長寿を達成し国民が健康で安心して質の高い生活を実現することは、少子高齢化が進む日本にとっては、税収の減少、年金や医療費の増大など、財務的・社会的な要因からも喫緊の課題である。そこで、病気を発症してから治すのではなく、発症させずに予防したり、日常生活から健康を増進させることで、病気になりにくくするヘルスケアが注目をあつめている。

最近のヘルスケアにかかわる医療機器の分野は、小型化したセンサーをはじめとするエレクトロニクスなど、情報通信技術とセットで実用化することで、ヘルスケアに対するよりきめ細かなサービスが実現しつつある。こうした背景から、よりバイオに特化した半導体エレクトロニクス技術の誕生が求められており、主として、デジタルヘルスという分野での貢献が技術トレンドになっている。つまり、我々を取り巻く医療機器の姿は変わりつつある。

一方、この分野をものづくりによる市場開拓という側面から見ると、日本は世界に類を見ない少子高齢化に突入していることから、デジタルヘルスは国内が先進的な市場になると予想される。もちろん、ニーズだけで新しい市場が生まれる訳ではないが、人体の様々な状態を計測するバイオセンサー（生体センサー）で、血液センサーや DNA チップなど、デジタルヘルスに必要な技術の種類は、日本が世界でも最先端の水準にある。

ヘルスケアの市場を先んじて牽引していくには、技術的にはバイオ材料と半導体材料の効果的な融合により、手のひらサイズのチップ上に新たな機能を創出させた、「バイオチップ」と呼ばれるデバイスの、機能を磨きあげ完成度を高めたものが必要になる。

しかし、現在のヘルスケアにかかわるバイオチップなどの医療機器の市場を見ていくと、それらに扱われている要素技術や部品の多くが日本製であるにもかかわらず、国内の市場は 10%以下という事実から、いわゆる「技術で勝ってビジネスで負ける」という構図があり、克服すべき課題は市場にもある。

ヘルスケアや予防医療に資するツールとして、科学技術が貢献可能性を明示するには、単に現在の技術水準から将来展開を示すだけでなく、どのようなグランドデザインを掲げ、そしてその達成に向けてどのような必要となる技術を抽出し、国民の生活やサービスへ一体化させて進めていくかを示す事が求められる。

基礎研究の段階では、目新しいが、しかし扱いにくいデバイスが多く、日常生活に溶け込んだツールへと昇華させていくには役に立たないものが多い。

実際に実用化が待望されている最近のトレンドでいえば、パソコンやスマートフォンといった高機能な情報端末と繋ぐことによって、単なるデータの計測から個人がデータの意味を読み解くことができる、小型・簡便・高精度なバイオチップの創出が期待されている。従って、バイオチップの分子認識界面で正確・高精度に対象となる試料を捕捉できる界面を調製する必要があり、かつ産業優位な方向へ展開できる技術が望ましい。

1・2 研究の目的

臨床現場におけるバイオチップの研究開発は、データ解析や効果判定の不確実性、さらに測定精度や使い勝手の悪さが実用化を妨げる大きな要因となっている。

先導的に臨床研究を進めている国内の各医療機器メーカーも、基本的には各社の独自技術による製品開発であるため、データの互換性がない点も大きな課題である。従って、製品の客観的評価において大きな市場が想定されるものの、互換性の無さが産業化を阻害している要因でもあり、早期の標準化が待たれるが、この分野の標準化は人の命にもかかわるため実際には殆ど進んでいない。

技術的には、従来は化学的に不安定な生体分子を利用した自己凝集・静置法などの生化学反応によって分子認識界面が作製されるため、多様な産業ニーズに迅速かつ必要十分に対応しきれない問題があった。これに対し、我々は、レーザによる分子認識界面の改質技術と、抗体などのバイオインクをインクジェット印刷で高精度に吐出・固定化させる技術を融合させることで、産業化に優位で幅広い応用が可能な、新しいバイオチップを作製したので報告する（図 1）^{1, 2)}。

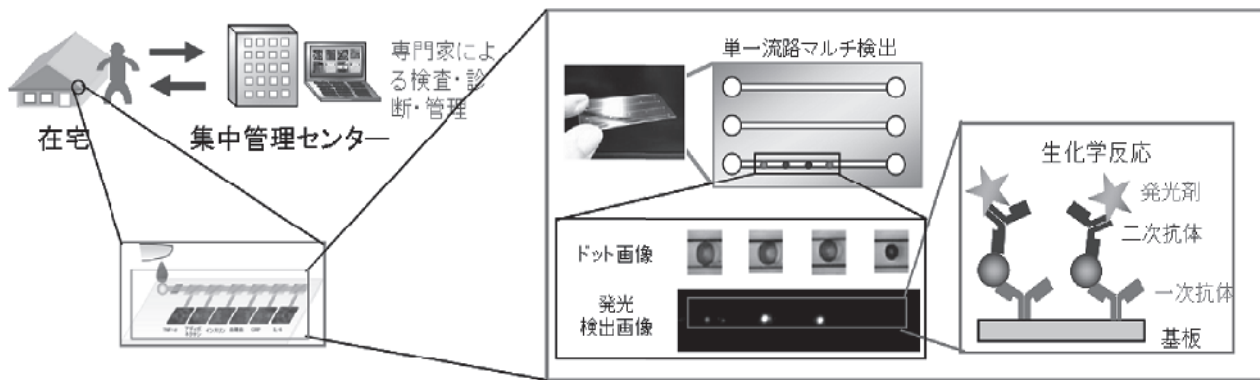


図1 在宅や臨床現場で実際に使うことのできるバイオチップ

2. 実験方法

2.1 基板の加工および表面改質方法

基板は環状ポリオレフィン(COC)射出成型基板に新規に細胞膜由来の親水性生体模倣高分子膜をコーティングしたものと、これと同一形状でコーティングがされていないものを用いた。共に基板の表面には幅 300 μm 、深さ 100 μm 、長さ 60 μm の直線流路が 4 本デザインされており、その両端には直径 1 mm の貫通孔がある (図 2)。

レーザー照射工学系は、ArF のエキシマレーザー (193 nm) を使い発振器からの出力ビームはホモジナイザで強度を均一化した後、マスクで中央部を切り出し、倍率 1/10 の縮小光学系で基板上のマイクロ流路底面に結像させた。レーザーの照射範囲は十分な照射範囲が確保されるよう、マイクロ流路中の抗体固定部位を中心に、幅 350 μm × 長さ 1 mm の領域とした。

2.2 抗体固定化と流路カバー

本実験では I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (P1CP) 用モノクローナル抗体 (タカラバイオ) を使い、緩衝液で 0.1 mg/ml に希釈した後、ピエゾ駆動型インクジェット装置 (クラスターテクノロジー) を用いて、チップ上のマイクロ流路底面に一流路あたり複数点に対して吐出、固定化を行った。吐出・固定化された抗体溶液量は、吐出された液滴の顕微鏡拡大像をストロボ撮影し、画像の直径と液滴数から算出した。今回の実験では、いずれも直径は 56 μm で体積は 92 pL であった。固定化の際には 200 回の吐出を行っており、1 点あたりの抗体溶液量は 18.4 nL である。

流路底面に抗体を吐出固定化したあとは、粘着塗布フィルム (東洋インキ) により、流路をカバーし、マイクロ溝を流路、両端の貫通孔をそれぞれ試料導入用と排出用のポートとする評価用チップを構成した。

2.3 抗原検出による分子認識界面の評価方法

検出用チップのフィルム面を下にして、マイクロプレートでのサンドイッチ ELISA (Enzyme-Linked

ImmunoSorbent Assay) 法に準じた以下の手順で検出・評価を行った。1) 室温で 4 時間放置して自然乾燥、2) 洗浄液を 3 回導入、3) 抗原溶液とペルオキシダーゼ標識 2 次抗体の混合液を導入、4) 15 分間放置して化学発光基質溶液を導入、5) 発行強度を冷却 CCD カメラを用いて測定 (GEヘルスケア, LAS2000)。

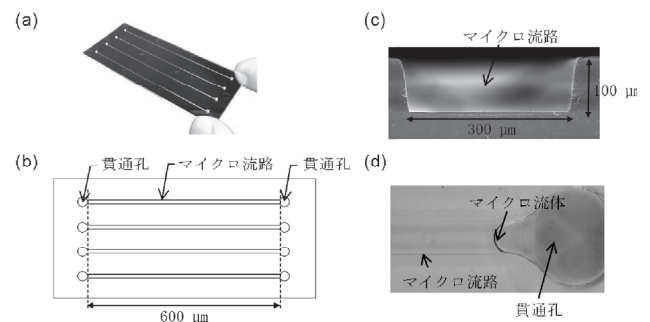


図2 抗原検出用バイオチップの概略: a) バイオチップの写真, b) バイオチップの構造, c) マイクロ流路の顕微鏡断面写真, d) マイクロ流路と貫通孔の顕微鏡平面写真

3. 実験成果

3.1 UV レーザによる非特異吸着抑制コーティング界面の改質

バイオチップによる分子認識は抗原と抗体の間の特異的な反応に基づいてバイオマーカーなどの試料を検出する。しかし、生体中に存在する殆どの試料はマイクロ流路の表面に非特異的に吸着する。そこで、抗原抗体反応に基づいたシグナルを精度よく測定するには、マイクロ流路表面の非特異的な吸着を抑制する必要がある。

一般的には、非特異吸着を抑制した分子認識界面は、複数の薬剤を用いて連続的に化学的処理を行い調製されるが、煩雑な操作を要するため産業化に向けては適さな

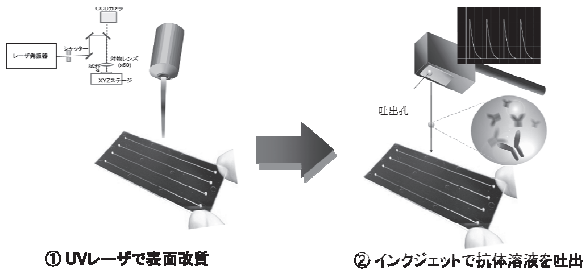


図3 非特異吸着抑制界面をUVレーザーで改質して抗体を固定化する手順

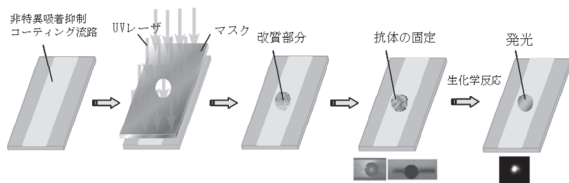


図4 非特異吸着抑制界面を改質・抗体固定化によるELISA法での化学発光の評価手順

表1 フルーエンスに対する分子認識界面改質の接触角による評価

フルーエンス(J/cm ²)	0.44	0.88	1.32	1.76
接触角(°)	70.5±2.3	68.0±2.2	60.5±2.1	50.2±1.6
界面の濡れ性				
表面改質の平面画像				

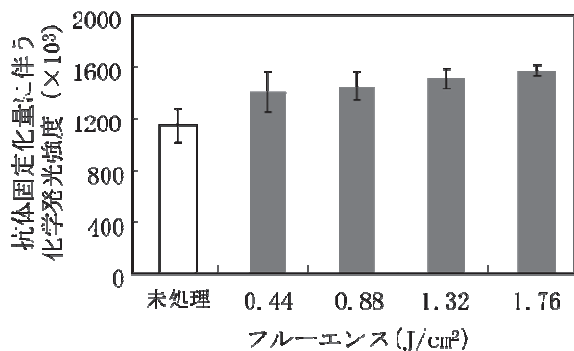


図5 フルーエンスに対する抗体固定化精度のELISA法による評価

い。そこで、UVなどの光照射により、抗体などの素子を安定に固定化できるよう界面の改質を行う事が出来れば、簡便にバイオチップを作製する事ができ産業化に対しても優位である(図3, 4)。

COC基板のマイクロ流路表面に対し、種々のフルーエンスで1パルスのレーザー照射を行った後の分子認識界面

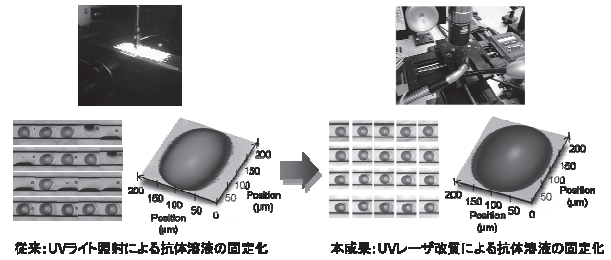


図6 UVレーザー改質による数ミクロンオーダーの解像度を有する分子認識界面の改善

の外観と接触角の数値を表1に示す。0.44J/cm²では外観上の変化は見られないが、0.88 J/cm²で周辺の一部の透明度が低下しはじめ、その後はフルーエンスの上昇に伴い透明度は低下した。顕微鏡観察の結果、透明度の低下領域では界面表面の微細凹凸の形成と微粒子の付着が認められた。これに伴い接触角も低下して表面濡れ性が上昇し、抗体固定液との親和性が上昇していることが確認された。レーザー照射基板については、蒸留水を用いた超音波洗浄を行った後に抗体溶液の固定化を行った。

図5に、表1に示すフルーエンスの増加に伴うELISA法による化学発光強度の増加とバラつきを調べた結果を示す。1.76 J/cm²まではフルーエンスの増大に伴い化学発光強度が増加し、バラつきも減少することが確認された。これは、非特異吸着抑制コーティング剤はUV光に対し変性し素子を固定化する特性があるため、フルーエンスの増大に伴いコーティング剤が変性し、抗体の固定化が促進されたと考えられる。一方で1.76 J/cm²以上になると、バラつきが大きくなった。これは、コーティング剤だけでなくマイクロ流路表面も加工される事により、デブリと呼ばれる加工に伴い発生する微細粒子や、界面表面の不規則な物理的形状、コーティング剤が存在するマイクロ流路表面と界面との極性が極端に異なるため、抗原抗体反応をレーザー照射で制御する事が困難になった事を意味する。

3・2 数ミクロンオーダーの解像度を有する分子認識界面の作製

従来のUVランプで照射された非特異吸着抑制コーティング表面から成る分子認識界面は、おおよそ数十ミクロンオーダーの解像度で表面構造が改質されており、生体分子の吸着量も±15%以上のバラつきが確認されていた^{3,4}。また、この改質方法の場合、ほとんどのケースで吐出中に液滴が壁面と底面のエッジ部に移行してしまう現象が発生し、抗体液の安定した固定化が困難であった(図6)。これに対し、前述で最適化されたレーザー照射による改質では、抗体固定のための液滴の広がり小さくなり、壁面に付着しにくくなったため、安定した抗体液の固定化が可能になった。顕微鏡で界面改質の程度を調べてみると、UVランプ照射時は改質界面は数十ミクロン

オーダーの解像度であったが、本実験によるレーザー照射では数ミクロンオーダーの解像度で作製されていることが顕微鏡画像から確認された。そこで、実際に ELISA 法によりシグナル精度の改善の程度を調べた。

3・3 UV レーザ照射面での酵素免疫測定法による高感度検出

異なる濃度の PICP に対する化学発光強度との相関を調べて界面の評価を行った (図 7)。表面改質に伴うシグナル強度のバラつきの低下と、感度の上昇を検討するため、抗体固定液をインクジェットを使って正確に 20 滴吐出したときと、200 滴を吐出したときを比較した。その結果、PICP に求められる検出濃度範囲において、非常に良好な相関を得る事ができた。また、従来の技術ではシグナルのバラつきが 15% までが限界であったのに対し、本分子認識界面はバラつきを 10% 以下まで低減する事に成功した。

また、抗体液が 20 滴のときは直線性の相関よりやや低下して曲線状になる傾向が見られた。これに対し、200 滴を吐出・固定化した時は、良好な直線性の相関を得るに至った。これは、抗体液が 20 滴では固定化された抗体の絶対量が少なかったために、幅広い濃度の PICP を正確に測定する事が困難な界面であった事を意味する。

マイクロ空間中での反応は反応速度の高速化やサンプル量の低減など、様々な優位性があるが、その一方で、マクロ空間での反応系に比べて固定化される抗体の量やその存在状態などの僅かな違いが、シグナルのバラつきや感度に対してダイレクトに影響する。また、マイクロ流路表面への抗体の固定化は、固定する抗体液の濃度が高くなるにつれ液の粘度が高くなるため、抗体液を安定にインクジェットで吐出する事が困難になる。抗体液の体積を多くした場合においても、壁面への付着や一定の面積を維持する事が困難になる。

これに対し本研究では、1 パルスでレーザー改質を行い、インクジェットで正確かつ迅速に抗体液を吐出・固定化でき、マイクロ空間中でもシグナルの感度とバラつきの低下を達成し、従来法より優位な結果を得た。

3・4 単一流路中での多項目検出

バイオマーカーは複数の項目を検出する事によってはじめて個人のヘルスケアや予防医療に対し、意味のある数値を提供する事ができる。そこで、たった一つの単一流路だけで、多項目のバイオマーカーを同時に検出することができれば、簡便、安価、機能などの点で、バイオチップがツールとして果たす役割は極めて大きくなる。

そこで実際に、有用性が期待される複数のバイオマーカーを単一流路に導入し、同時に複数を検出する事を検討した。予めこれらのバイオマーカーは、各々の抗体間で発生する交差反応による偽陽性・偽陰性の可能性が高い事がわかっていたが、本実験で検討した結果、本分子

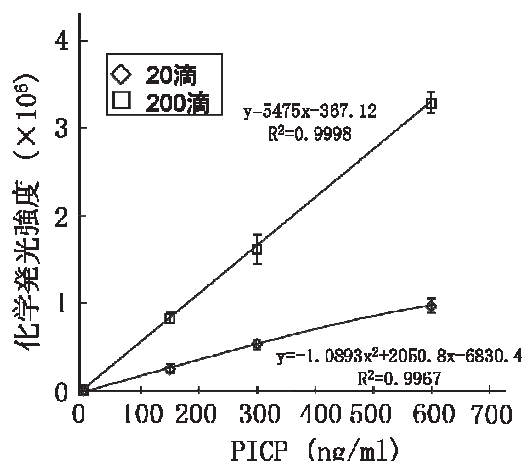


図 7 ELISA 法による化学発光強度との相関

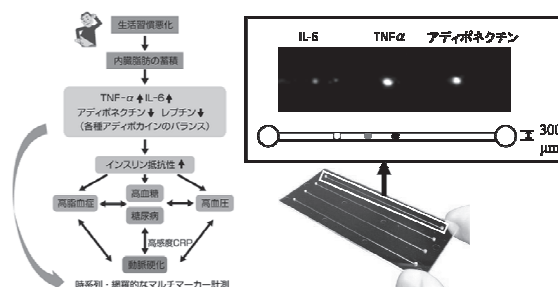


図 8 高精度化に伴う単一流路でのマルチ検出の実現

認識界面を用いれば、同時に多項目を検出できる事が分かった。よって高精度に抗体が固定化され、特異的な反応が優位に作用している界面を、作製できている事が示唆された。

4. 結論

本研究では、レーザー改質技術とピエゾインクジェット印刷技術を駆使することにより、バイオチップを高精度かつ工業優位な方法により作製する事に成功した。

1 パルスで波長 193 nm の UV レーザ照射の条件を検討することにより、PICP 濃度測定用バイオチップの感度と精度は大きく向上した。また、必要なレーザーフルエンスは非常に低く、1 パルスの照射で済むため高スループットな作製にも優位である。さらにドライプロセス下であることから、流路形状による表面処理の偏りも生じにくく、表面張力の影響も少ないなど、新たな優位性も明らかになった。

本助成で得られた知見と要素技術は、まず知的財産化を積極的にはかり、産業化に向けて戦略的に進めていく事を、本助成の研究期間中に行った。今後は、論文化を進めて広く公開し、多項目のバイオマーカーの高感度検出を達成し、実用化に向けて進める事が必要である。

謝辞

本研究を進めるにあたり終始適切な助言を賜りました、産業技術総合研究所の大家利彦研究グループ長、片岡正俊研究グループ長に感謝の意を表します。

また、実験の遂行及び解析にあたり、産業技術総合研究所の田中正人主任研究員、阿部佳織博士、山瓶子勇次氏にはひとかたならぬお世話になりました。ありがとうございました。

そして、試料を提供いただきました徳島大学の疾患ゲノムセンターの皆様心から感謝します。

参考文献

- 1) Yusuke Fuchiwaki et al., : Chemical Sensors, 58-60 (2012), 28.
- 2) 大家利彦, :高温学会誌 138-142 (2011), 37.
- 3) Yusuke Fuchiwaki and Mikito Yasuzawa : Anal. Lett. 262-271 (2012), Vol. 45, 2-3.
- 4) Yusuke Fuchiwaki, Mikito Yasuzawa, Norimichi Futagami, Kotaro Rikitake :J. Sensors, Open Access, 10 pages (2011), Article ID 507047