

[研究助成 (S)]

バイオセンサアレイを用いた血液1滴・軽度認知障害 超早期検出装置の開発とその実証

—— いきいき診断システムの開発 ——

Development and verification of a blood drop early diagnostic system for mild
cognitive impairment using the ion-sensitive biological array sensor

2168001



研究代表者

豊橋技術科学大学大学院
電気・電子情報工学系

教授

澤田和明

共同研究者

国立研究開発法人国立長寿医療研究
センター 治験・臨床研究センター

開発・連携
推進部長

滝川修

[研究の目的]

我が国においては、2010年に超高齢社会へと突入し、なお高齢化率が上昇している。高齢化に伴って、心身が脆弱化することによる疾病等が増加し、特に医療や福祉の分野において多くの問題が指摘されているのが現状である。

全ての人がいきいきとした生活を営むためには、日常的に簡便に利用できる健康支援機器や支援サービスの開発など、大がかりな社会的対策が必要である。我が国では、高齢社会対策基本法のもと、企業、地域社会、家庭及び個人が相互協力する仕組みづくりが進んでいるが、欧米に比べ急激に高齢化が進んでいる我が国の場合、それら対策が追いついていない。特に高齢者においては、加齢に伴う疾病の初期段階とも考えられる軽度認知機能障害やサルコペニア等でフレイル（虚弱状態）になった状況をいち早く感知し、重篤な状況に陥る前に予防・対策することが重要な課題と考えられている。

加齢に伴い増加してくる疾病の中で、認知症患者の60%を占めるアルツハイマー病には根本的な治療法が存在しない。認知症を発症すると介護に多くの人手がかかり家族にまで大きな影響を及ぼすことがある。そのため、認知症の前段階である軽度認知機能障害の発症をとらえ、

重篤な認知症への進展を予防する。例えば、国立長寿医療研究センターが開発した知的活動を伴う運動療法（コグニサイズ）等の治療プログラムを施すことにより、介護負担の軽減など、家族を含めた全ての人がいきいきとする社会を実現することが可能となる。

そのような社会を目指し、軽度認知障害を迅速・簡便に、超早期に診断できる“いきいき診断装置”の開発を研究の目標とした。

[研究の内容, 成果]

1. センサ上における miRNA 検出法の開発

1-1. カップリング反応条件の最適化

センサ表面に cDNA を固定化するためのシランカップリング法の検討を行った。数種のシランカップリング剤を用いて、表層に適量吸着する化合物を選抜した結果、carboxysilane-triol (CEST) を 100 μ M 程度の濃度で塗布し、80°C 熱処理することにより、センサチップ上に5種類以上の蛍光化 cDNA を結合させることが可能となった (図1)。

1-2. 蛍光化 DNA によるハイブリダイゼーションの確認

シリコンウェハ上に固定化された cDNA に対して、蛍光化 DNA をハイブリダイズする条

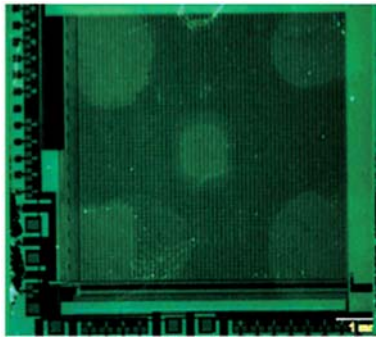


図1 蛍光化 cDNA5 種を固定化したバイオセンサ

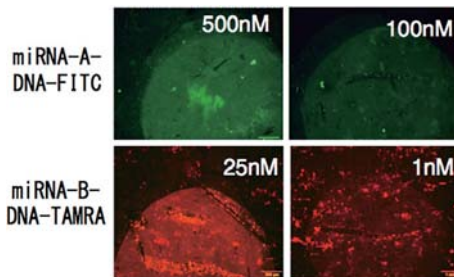


図2 50% 血漿中におけるハイブリダイゼーションの確認
(数値は血漿に添加した蛍光化 DNA 濃度)

件について蛍光顕微鏡により最適化を行った。その結果、1 nM から 1 μ M の範囲で、各 miRNA 特異的に検出できることを確認した。またこの検出法が、50% 血漿中にて有効であることを、ヒト血漿を用いて確認した (図2)。

1-3. センサ上にて miRNA を非標識で検出するための固定化方法の検討

センサ上への cDNA 固定を CEST, amino-propyl-triethoxysilane (APTES), aminopropyl-silanetriol (APST) の 3 種のシランカップリング剤を用いて、それぞれの固定化濃度、時間等を検討した結果、CEST においては 125 μ M~250 mM, APTES においては 1 μ M~100 mM, APST においては 10 μ M~250 mM の範囲でハイブリダイゼーションの際に 5 mV 以上のセンサ電位を検出したことから、シランカップリングの濃度はこの範囲で行うことが推奨される。次に、cDNA との結合に用いる中間試薬の濃度についても検討し、20 μ M から 3 mM の間の濃度が適当であることを見出した。ここまで検討した結果、センサ感応面への cDNA

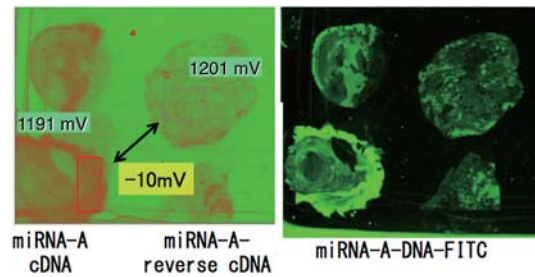


図3 cDNA 固定化磁気ビーズを用いた miRNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果

直接固定化による miRNA 検出法においては、2 μ M の miRNA のハイブリダイゼーションにおいて 10 mV 以上の感度を安定的に検出できないことが判明した。

そのため、固定化方法そのものを見直し、磁気ビーズを用いることでハイブリダイズした miRNA をセンサ感応面に静置することで感度の向上を試みた。磁気ビーズに cDNA を固定化、センサ上に固定化した後、FITC 蛍光化 miRNA-A-DNA を 37 $^{\circ}$ C にてハイブリダイゼーション、続いて DNA インターカレータを添加した結果、マイナス 10 mV の電位差を検出した。

2. センサ検出の自動化システムの開発

2-1. miRNA 検出のための電荷転送バイオデバイスの開発

従来型のガラスエポキシ樹脂基板を用いたセンサにおいては、センサ感応面のプラズマ処理やシランカップリングの際の有機溶媒への耐性が低いことから、樹脂部分をセラミックに置き換えたセラミック基板型センサの開発を行った (図4)。その際にセンサチップ周囲のワイヤの防水に用いる黒色エポキシ樹脂の種類を検討した。その結果、樹脂の成分を変更した対策済み樹脂においては撥水が起らないことを確認した。

2-2. 3 流路システムのモデル開発

本システムの未来の姿を示すため 3D-CAD 及び、3D プリンタを用いてモデルを作製した (図5)。このモデルにおいては、miRNA 検出



図4 従来のガラスエポキシ樹脂基板, 及び新開発のセラミック基板型センサ



図5 ローラー型送液システムと送液用バッグ

の際, 3流路につぎつぎに薬液を注入するためにローラー型の送液システムを備え, これを測定装置と繋いで使用する。洗浄液, 検出液等は薬液送液用バッグ(図5右下)にあらかじめ詰めておき, 一度使用のみで取り替えることを前提としている。

2-3. 3流路システムの稼働

3流路ユニットをアクリル樹脂を削りだして, 3流路システムを作成し実験を行った。別に開発した新型のパッキンをセンサ感応面上に載せ, ユニットの載せることで3流路を独立に検出す

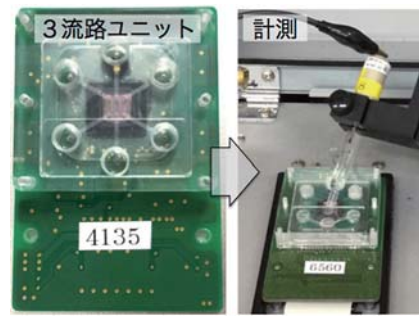


図6 半自動3流路システムとその手動計測法

る半自動のシステムを作成した。このシステムにおいては, 各流路にポンプを用いて送液することで3流路を独立に洗浄, 計測ができるように設計されている(図6)。現時点ではポンプシステムは開発途上であるため, マイクロピペットを用いて薬液の交換, 洗浄等を行った。

2-4. 3流路システムを用いたmiRNAの定量

上記3流路システムを用いて, センサ上にcDNA固定化磁気ビーズを固定化した後, 3流路にそれぞれ別濃度のFITC蛍光化miRNA-A-DNAとインターカレータを送液し, 計測した結果を示した(図7)。100 nMのmiRNAを添加した場合にマイナス2 mV, 1000 nMの場合はマイナス4 mVのセンサ電位を検出したことから, 本システムにおいて, 50 nM程度のmiRNAを検出できると考えられる。

3. 市販血漿中のmiRNA相対存在量の測定

今後, 国立長寿医療研究センターのバイオバンク等を集められた実際の正常人, 及び軽度認知障害の検体サンプルを使用する予定であるが, その前に市販の血漿を用いて本システム

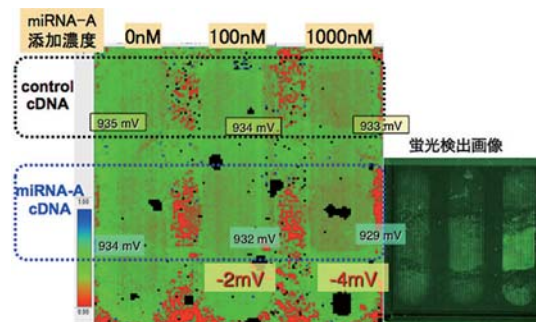


図7 3流路システムによるmiRNA測定例

による miRNA 検出が有効であるかどうかの検討を行う。そのためには miRNA 含有量の分かった血漿サンプルを用意する必要がある。ここでは、市販の血漿 4 種類とそのうちの 1 種に miRNA-B とそのミスマッチ配列である miRNA-B-miss の合成 RNA をそれぞれ 0.2 nM 添加した 5 種類の血漿について、Filgen の TaqMan[®] MicroRNA Assays 受託解析を用いて miRNA の存在量を確認した。全ての血漿について、Kayano ら (Biomarker Research (2016) 4: 22) に発表された健常者のデータと比較した結果、おおむね一致したことから、正常血漿については準備できたことが確認された。(本データは非公開)

[今後の研究の方向, 課題]

本センサを用いた miRNA の検出には、PCR 等による増幅操作や RNA を抽出するといった前処理操作が必要でないため、一滴の血液を用いて簡便かつ迅速に検出が可能である。現時点で、図 7 に示したシステムを用いれば、1 滴の血漿 (50 μ L) 中に含まれる 50 nM 程度の miRNA を 15 分程度で検出できる見通しが

立った。

今後、このプロジェクトの成果を活用し半導体センサ上にて最大 9 種の miRNA を検出可能なシステムを構築する。センサに 1 滴の血液を添加し、ハイブリダイゼーションを行うことで、10 分以内に結果を得られるバイオセンサの開発を目指す。同時に、センサへの微量血液導入のためのマイクロ流路とそれに洗浄・検出機能を備えた一体型装置の開発を進める。これにより、誰でも 1 滴の血液から DNA 診断ができる市販型の装置の開発に繋げたい。

[成果の発表, 論文等]

1. 論文

吉見立也, 奥野海良人, 佐藤大祐, 滝川 修, 服部敏明, 澤田和明, フロー型イオンイメージセンサ装置の開発と応用 (Development of flow-through module for ion image sensor and its application) 分析化学 技術論文, 2019 (投稿中)

2. 学会発表

吉見立也, 奥野海良人, 滝川修, 服部敏明, 澤田和明, フロー系 3 流路イオンイメージセンサによるアミロイド β 検出, 第 55 回フローインジェクション分析講演会, 2018. 11. 16. 東京