

## オンサイト超高度バイオ検査を可能にする マイクロデバイス技術

Nano-reactor array for high sensitive on-site bio-inspection

研究代表者 **野地 博行** Hiroyuki Noji, Prof.  
 東京大学 大学院工学系研究科 教授 The University of Tokyo  
 NOJI LAB <http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>



### 要約 Abstract

「反応空間を局所化する」ことで様々なバイオアッセイを高感度化することができます。本プロジェクトでは、大きさが数ミクロン・体積数フェムトリットル ( $=10^{-15} \text{ l}$ ) の溶液チャンバーデバイスを開発し、その中でバイオアッセイを行うことで様々なバイオ分子を超高感度検出する手法の確立に取り組んでいます。これまでに、前立腺腫瘍マーカーであるPSAを1分子単位で定量計測する1分子デジタルELISA法を確立しました。また、これと平行してCMOSイメージングセンサーを統合化した持ち運び可能な1分子計測システムの開発にも取り組んでいます。これらの成果と、これらの技術が生み出すイノベーションの可能性について紹介します。

Downsizing of reaction volume improves the sensitivity of various bioassays. Aim of this project is to develop a novel biomolecule/virus counting system at single-molecule or particle level, based on our original "femtoliter chamber array" technology. In future, disease marker molecule or virus will be detected in very early stage of illness or pandemics. To demonstrate the potential and feasibility of our approach, we have developed single-molecule digital ELISA to detect a tumor maker protein, PSA (prostate specific antigen) at a single-molecule level. We also aim to develop a microsystem for palm-top device of single-molecule diagnostic assay by integrating CMOS imaging sensor with the femtoliter chamber array device. We will introduce these achievements as well as the perspective of innovation that these novel technologies would bring us in near future.

### はじめに

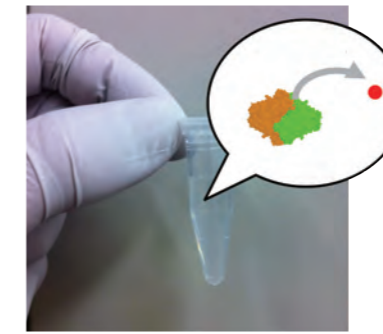
臨床検査をはじめ現在様々なバイオアッセイが社会で広く利用されています。そこでは、新しいバイオマーカーの発見や迅速なスクリーニング技術、そして早期疾病検出などのために、バイオアッセイの高感度化が常に求められています。バイオアッセイに限らず、分析技術の検出感度を決定するのは検出したい分子の「数」ではなく、「密度もしくは濃度」です。したがって、反応体積を極めて微小化することが高感度化の近道となります。しかし、微小な溶液チャンバーが数個しかなければ、極低濃度しか存在しないターゲット分子を検出することはできません。そのため、高感度化には反応体積の小型化と同時に、その小型化チャンバーの超並列化が不可欠となります。私たちは、これまでガラス基板上に作成した親水的なマイクロパターンを疎水ポリマーシート上に作成することで、体積わずか数フェ

ムトリットル ( $10^{-15} \text{ l}$  ; バクテリアサイズ) のチャンバーを1cm四方に100万個並べた検出アレイ技術を開発しました。本発表では、CRESTプロジェクトで開発した通常よりも桁違いに高感度な免疫抗体反応(1分子デジタルエライザ)を中心に発表します。また、このような先進的な分析技術は、システムとしては大型で高価なものが多いのですが、本プロジェクトでは奈良先端科学技術大学院大学の笹川先生のグループと共同で、持ち運び可能な1分子デジタル検出デバイスの開発にも取り組んでいます。この最新の成果についても発表します。

### 1分子デジタルELISA

ELISA法は、検出したいターゲット分子を2種類の抗体で検出します。まず、マイクロビーズ等の担体表面を1つめの抗体で修飾することで、ターゲット分子を担体上に

**In mL tube**  
 600 molecules/min  
 1 zM/min in 1 mL ( $1 \text{ cm}^3$ )



**In fL chambers**  
 1  $\mu\text{M}$ /min in 1 fL ( $1 \mu\text{m}^3$ )

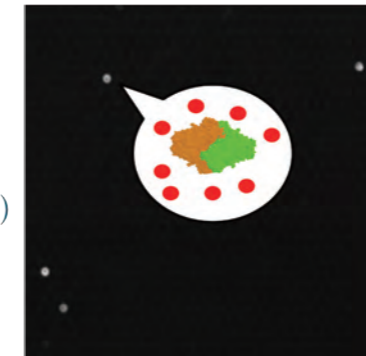


Fig 1. 反応溶液の小型化による超高感度化。ミクロンサイズの超微小溶液チャンバーに閉じ込めるだけで酵素の1分子アッセイが可能となる。Single-molecule detection of enzyme molecule by encapsulation in a micron-sized reaction chamber.

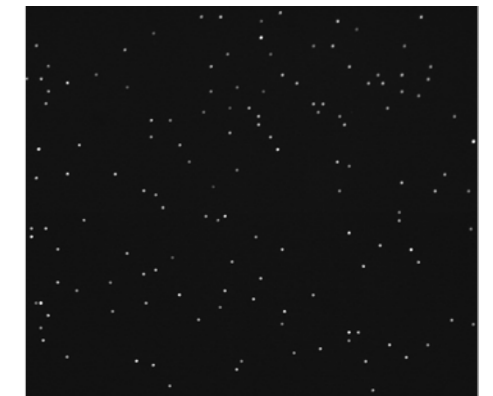
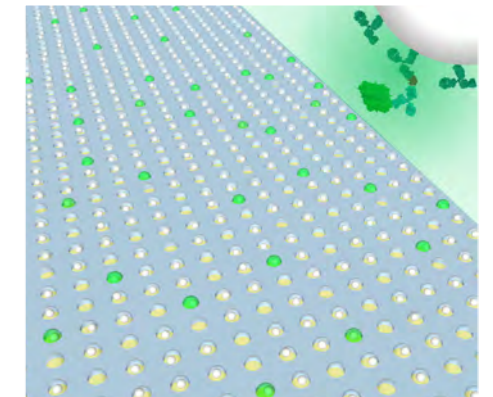


Fig 2. デジタルELISA法の模式図(下)と、実際に得られた蛍光画像。Schematic image of digital ELISA (top) and fluorescent image of digital ELISA for PSA (bottom).

捕捉します。次に、2種類目の抗体が担体上に提示されているターゲット分子に結合しますが、このときこの抗体にはマーカーとなる酵素分子があらかじめ接続されており、この酵素によって生成される反応生成物を比色法もしくは蛍光で検出します。ターゲット分子が多いと、担体に固定化された酵素分子数も多くなるため、これに比例して溶液の色や蛍光強度が強くなります。我々のデジタルELISA法では、このマイクロビーズを1個ずつ1つのチャンバーに捕捉し、各チャンバーの蛍光強度を2値化することで「ターゲット分子がいるかないか」を決定していきます。すなわち、通常のELISAとは異なり、ターゲット分子を1個1個数え上げていく方法であるため、本質的に超高感度の1分子計測となります。さらに、チャンバー数がぎわめて多いため、溶液中にごくまれにしか存在しないターゲット分子も検出することが可能となります。モデル反応として前立腺腫瘍マーカーPSAに対しデジタルELISA法を行ったところ、その感度は2aMとなり、通常のELISA法と比較して100万倍の高感度化が達成されたことが分かりました。ここでは、抗体や溶液に特別なものは一切使用しておらず、反応場を超微小溶液チャンバー

を用いただけであるため、この手法は原理的にさまざまなELISA法に応用可能となります。

### 今後の展開

今回開発したデジタル計数法によって分析化学に新しいイノベーションを起こすには、検出装置を含めた全体のシステムの小型化と低価格化が必須となります。そのために、CMOSイメージングセンサーとデバイスを統合化した小型システムの開発にも取り組んでいます。現在までに1分子の酵素アッセイに成功しており、近い将来実際のELISAの1分子アッセイが達成されると期待されます。また、現在のチャンバーシステムを大幅に改良した新しいシステムの開発も進んでいます。これまでとは全く異なる分析手法や、新しいバイオテクノロジー技術の可能性が見えています。時間の許す限りこれらの話題についても紹介します。

### 参考文献

[1] Kim et al. Lab on a chip, 2012, 12, 4986-4991.