

# バイオ分析のデジタル革命

野地博行

東京大学・応用化学

JST CREST「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創成」

# 分子はつぶつぶ

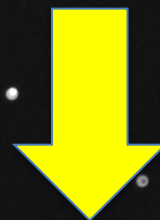
細胞膜上の受容体分子の蛍光イメージ  
(飯野@岡崎統合バイオ)

10  $\mu\text{m}$

# バイオ分析のデジタル化

検出感度が向上すると、1分子がみえてくる

= 信号が0か1の二値化(デジタル化)

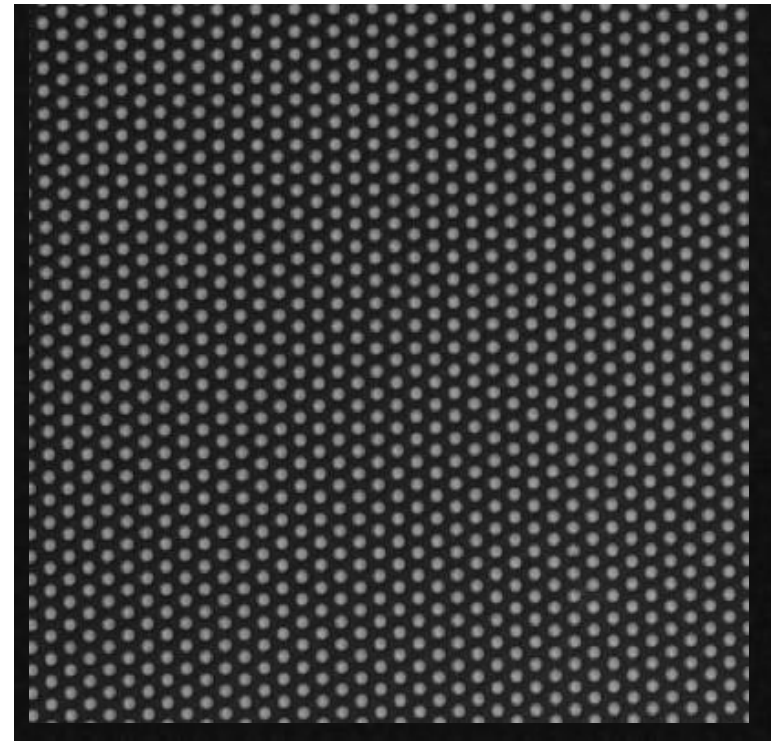
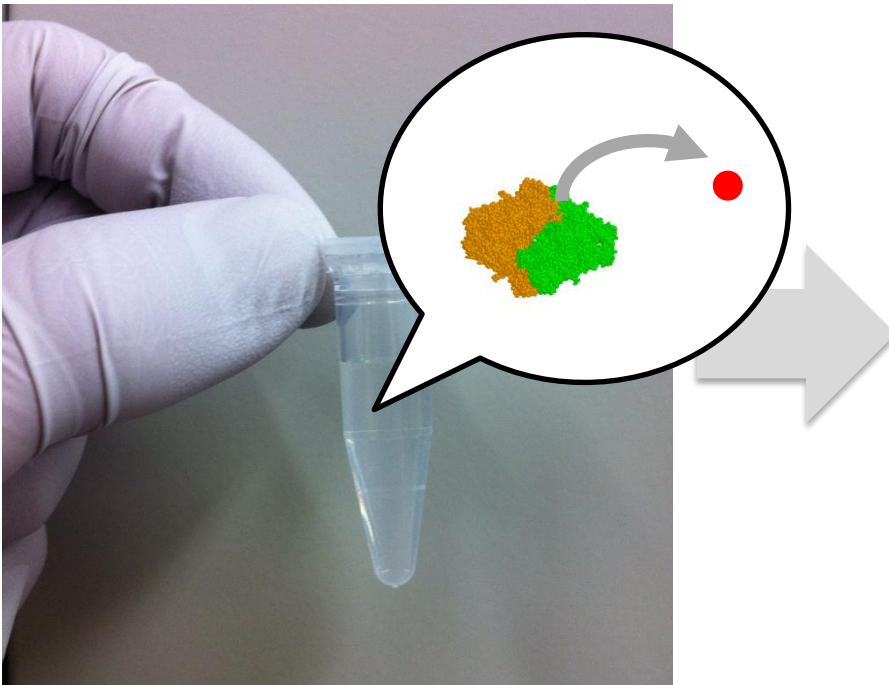


## デジタルバイオアッセイ

# Down-sizing for single molecule enzyme assay

In mL tube

In fL chambers



600 molecules/min  
1 aM/min in 1 mL ( $1 \text{ cm}^3$ )

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

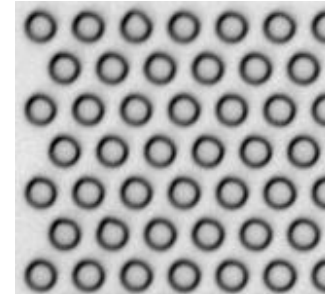


# Partitioning into ultra-small compartments

Milli-liter (10 mm)



Femto-liter (1-10  $\mu\text{m}$ )



VS



Tokyo Dome

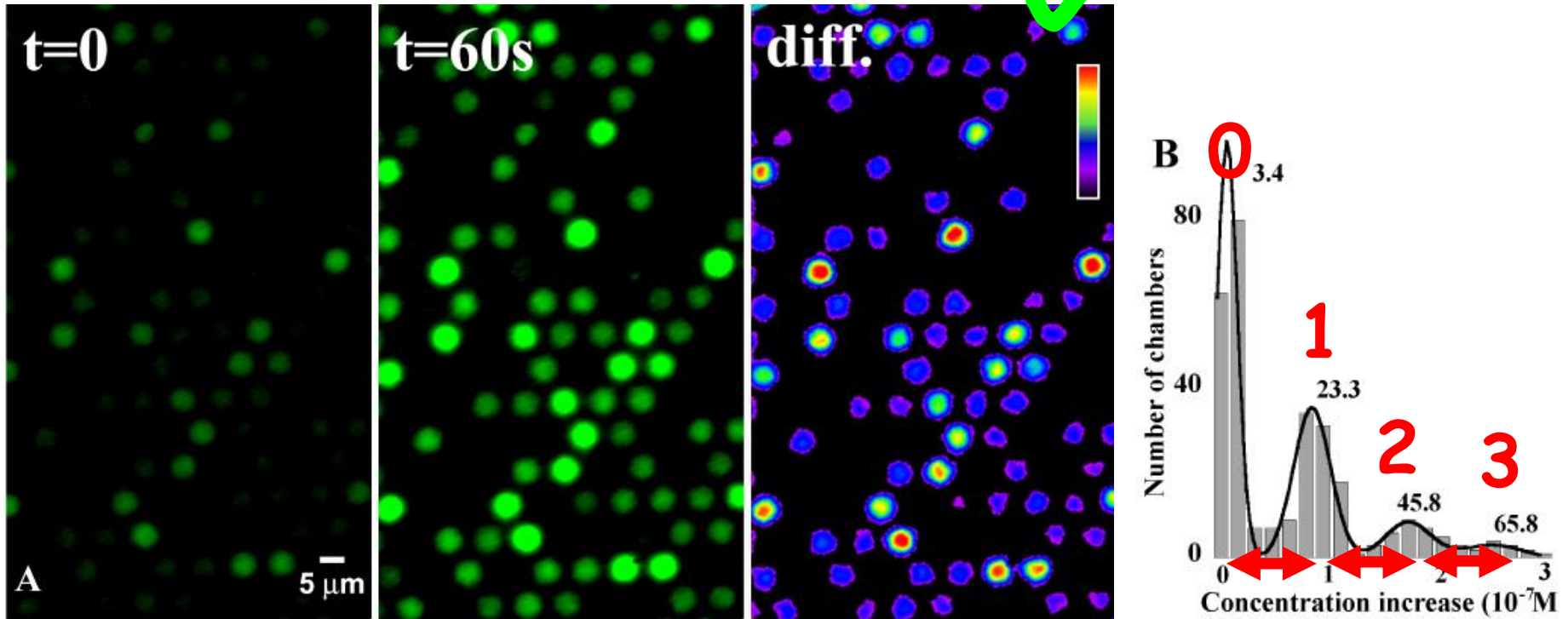
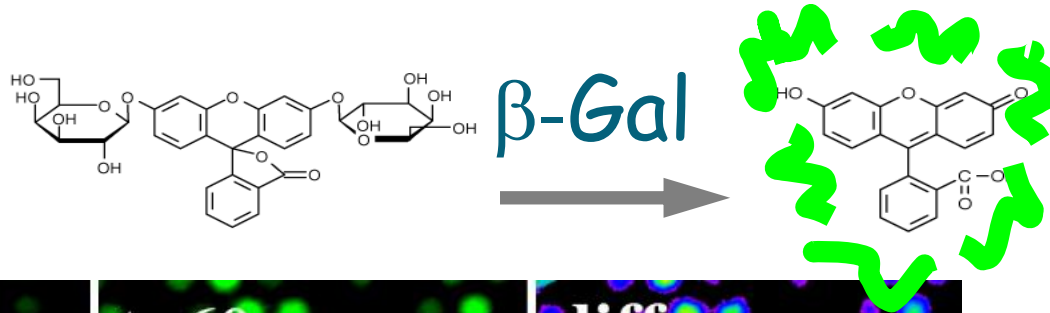


Petbottle



VS

# 2005年に基本アイデアを実証



Nature Biotechnology 2005

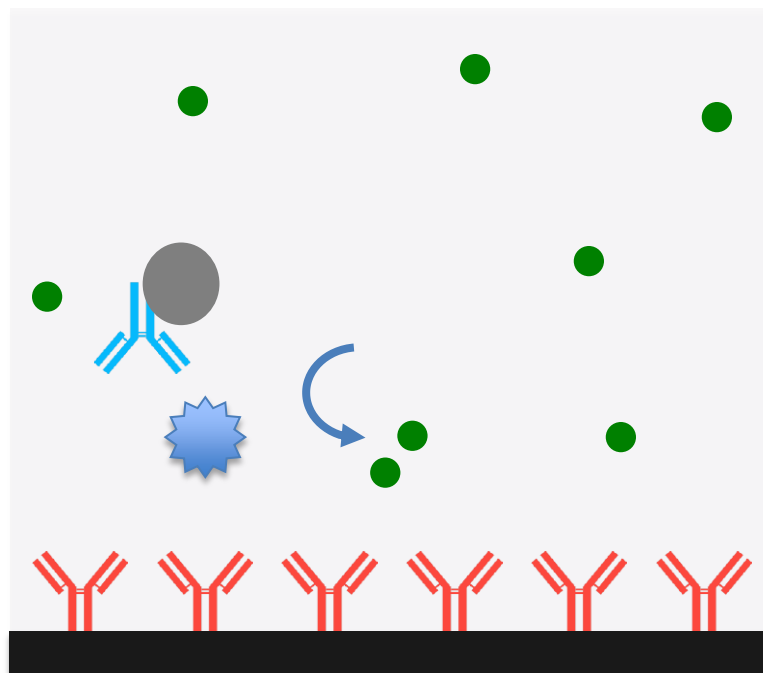
超高感度酵素アッセイの基盤技術 特許第3727026号 (H15年4月10日)

しかし、このときこの技術の応用性をうまく説明できず、大学に継承してもらえず、、、



# 臨床診断アッセイのデジタル化 1分子デジタルELISA

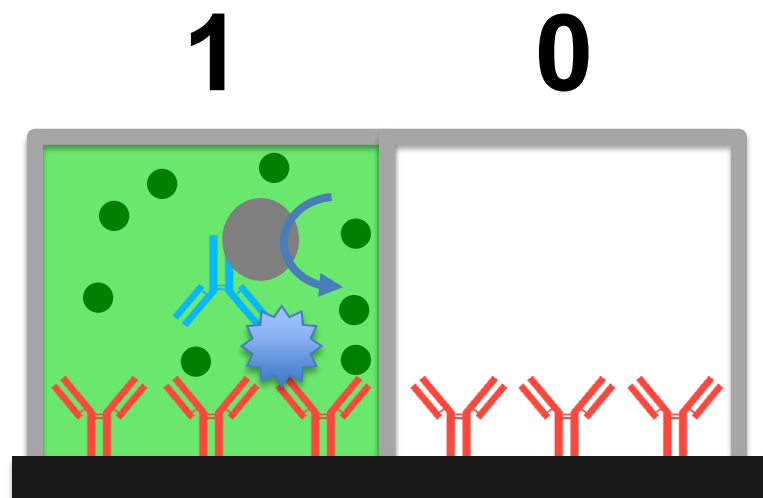
# ELISA法の高感度化 超微小溶液チャンバーに閉じ込める



**Conventional ELISA**  
reaction volume:  $\mu\text{L}$

Limit of detection (LOD)  $\sim \text{pM}$

**VS**

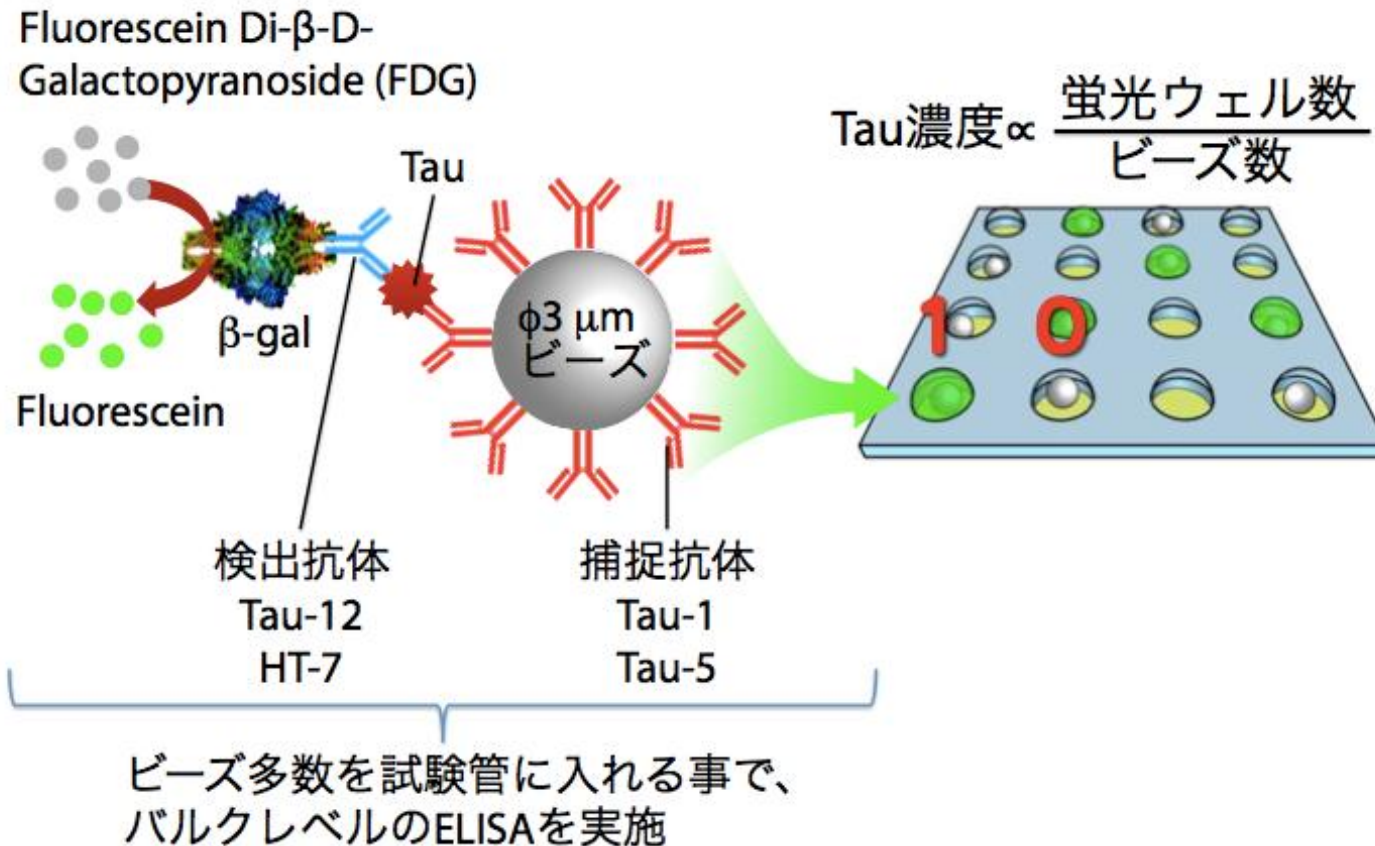


**Digital counting**  
reaction volume:  $\text{fL}$

Limit of detection (LOD)  $\sim \text{aM}$



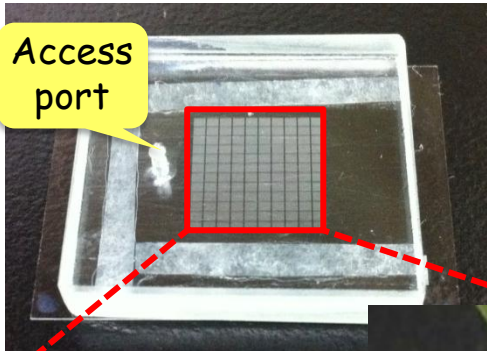
# 実際のデジタル計数法



マイクロビーズにターゲットを捕捉

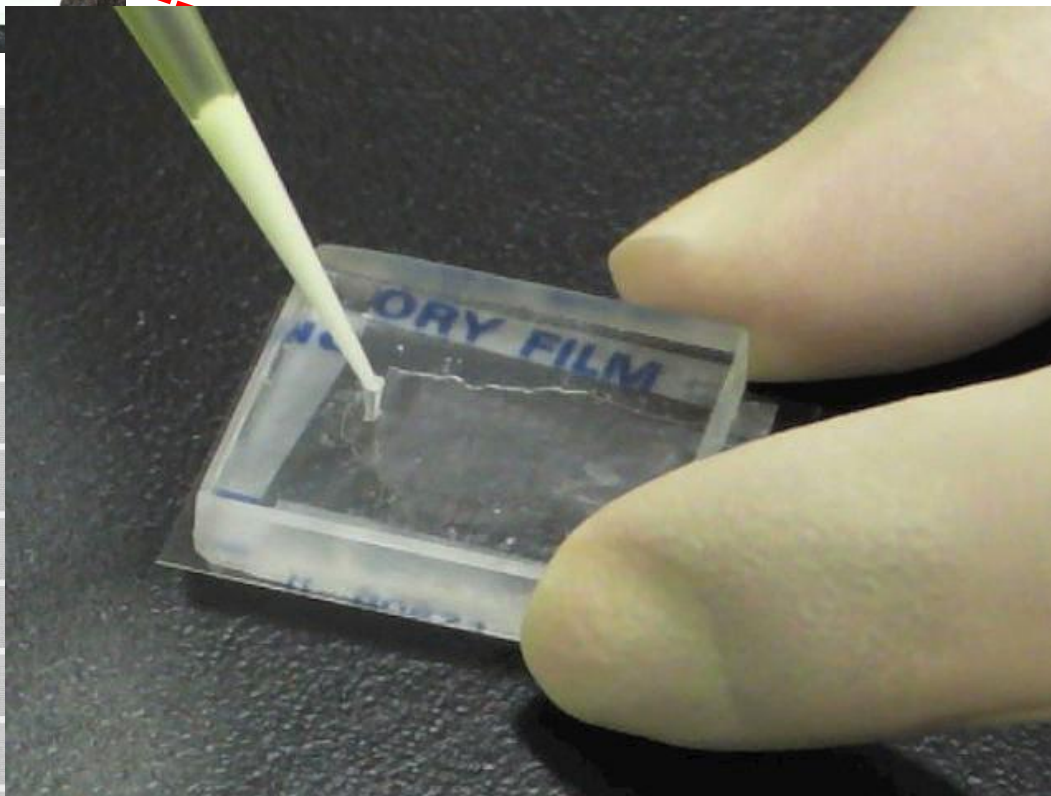
# 親水/疎水マイクロパターン ンデバイス

Access  
port



10 mm

120



120  
wells

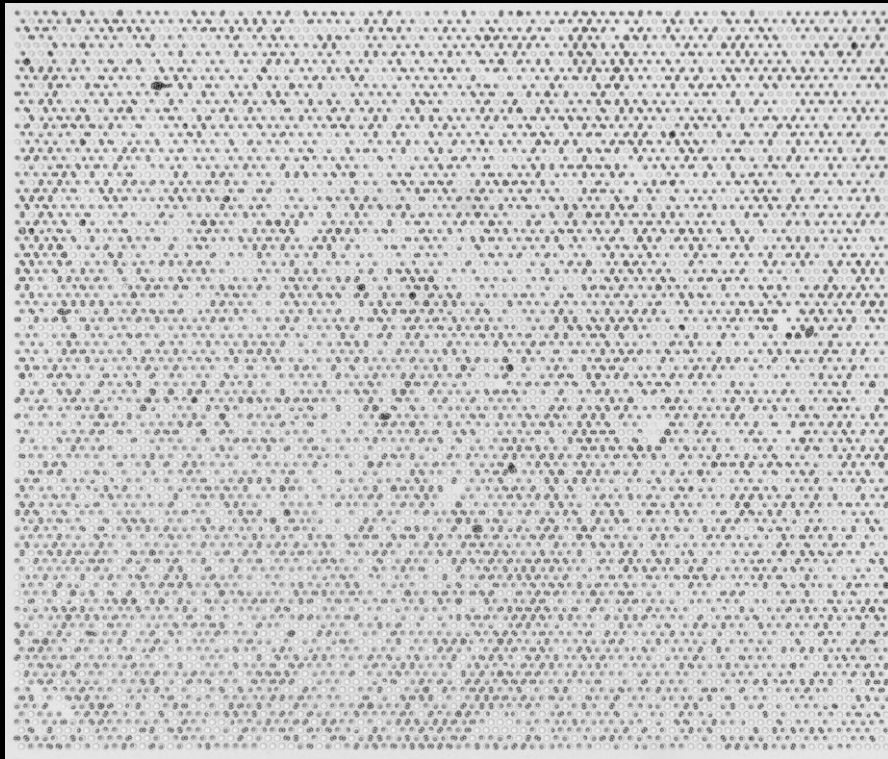
100万個以上のマイクロドロップレット  
ビーズを閉じ込める

100  $\mu$ m



# デジタルELISAで得られる画像

明視野画像



蛍光画像



[PSA] = 200 aM

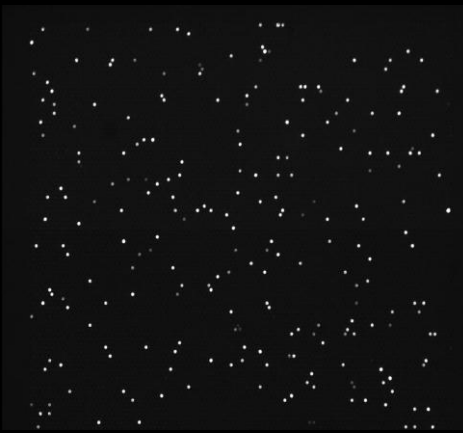
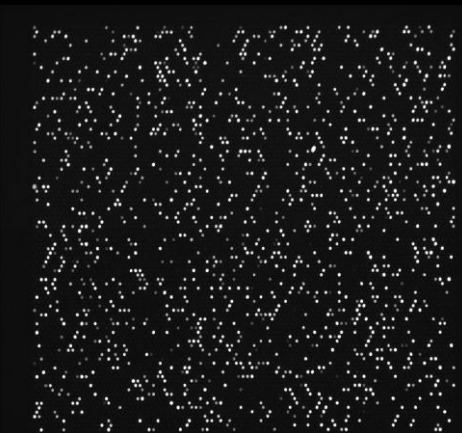
# シグナルのPSA濃度依存性

[PSA] = 2 fM

[PSA] = 200 aM

[PSA] = 20 aM

[PSA] = 0 M

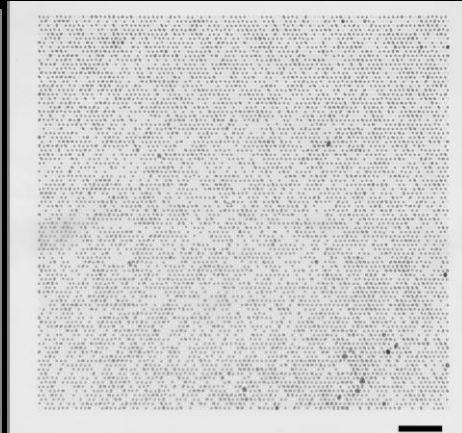
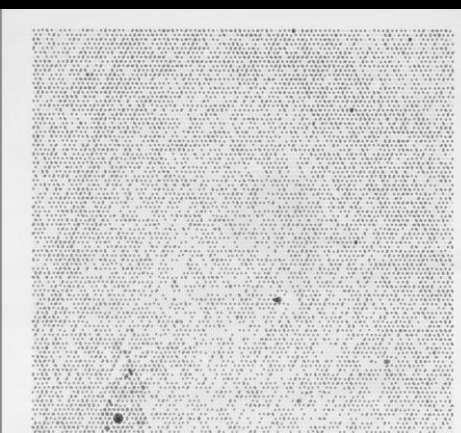


蛍光ドロップレット  
総数: 1399

230

40

17



ビーズ総数: 7553

8462

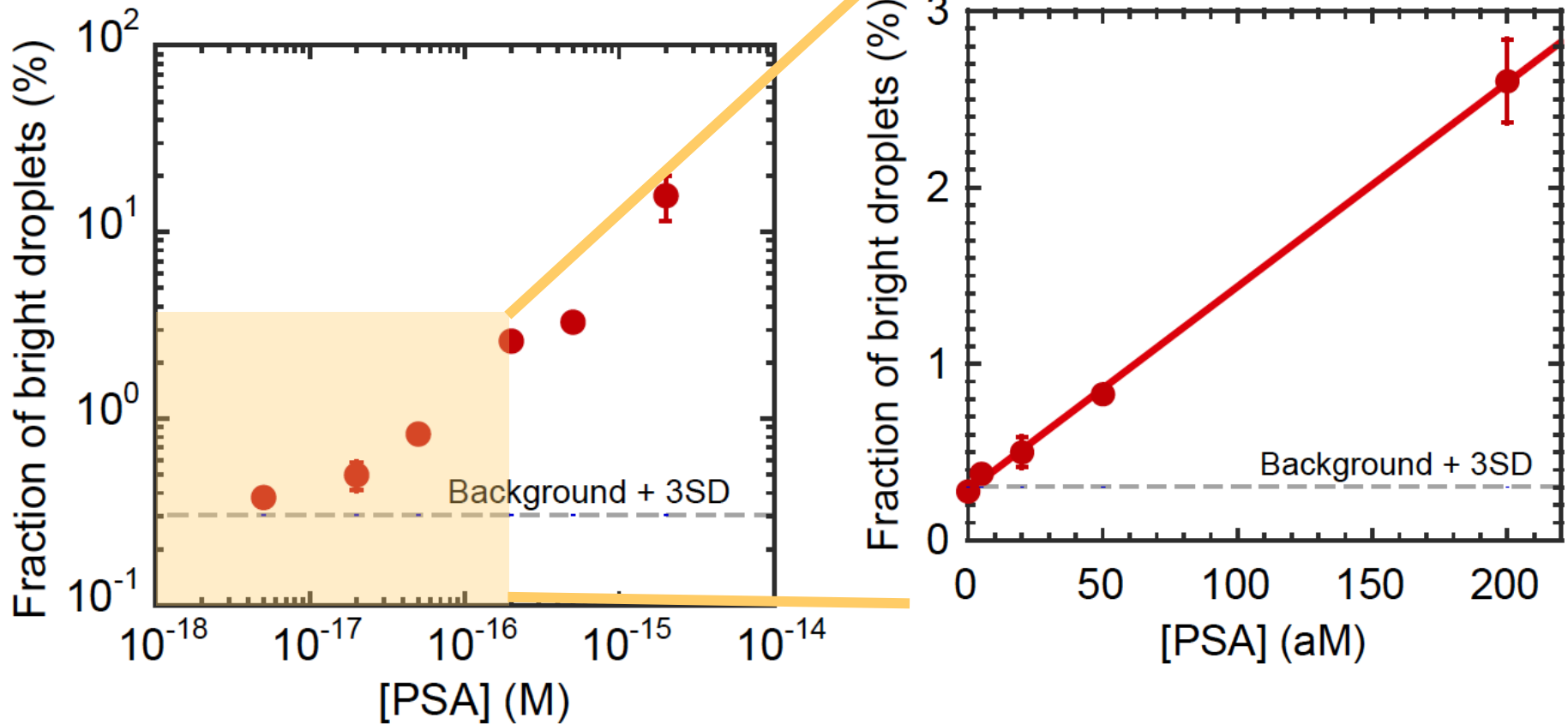
8505

7677

100  $\mu$ m



# LOD of digital ELISA



**L.O.D. = 2 aM**

**$10^6$  times better than conventional ELISA; 14 pM**

# メディア報道と若手研究者の表彰

- 読売新聞 (2012年9月1日第2面)
- 日本経済新聞 (2012年9月4日第14面)
- 日経産業新聞 (2012年9月4日第10面)
- マイナビニュース (2012年9月4日)
- 学新聞 (2012年9月14日第4面)

英国王立化学会(RSC)東京国際カンファレンスBest Poster賞  
(PD. Kim)

**がん検出感度100万倍**

東大チーム  
新技術開発

微細加工技術を使い、がん細胞やインフルエンザウイルスの検出感度を、これまでの100万倍以上まで高める技術を開発した。病気の早期発見につながる成果で、英科学誌に掲載される。

研究チームが着目したのは、血中にあるがん細胞やウイルスが作り出す特異的なたんぱく質(抗原)と、結びつきやすいたんぱく質(抗体)の反応「抗原抗体反応」を利用した検査法。これまでは小型試験管の中で検査するため、感度が悪かった。

チームは、半導体を作る技術を応用し、1ミリ四方のガラスに100万個の小さな穴を開け、そこに抗原抗体反応でできた分子を流し込み、1個ずつとらえられるようにした。前立腺がんの指標「PSA(前立腺特異抗原)」の有無を調べると、従来法より100万倍薄い濃度でも検出できた。野地教授は「現在は高感度カメラ、顕微鏡が必要だが、小型のセンサーで検査でき、持ち運べるキットを開発したい」と話す。

**読売新聞**



# 期待される用途

## 1. ウイルス・病原菌感染の超早期診断

感染初期(血中濃度10粒子/mL)の検出が可能に

## 2. がん摘出後の再発・転移の超早期発見

がん再発によるマーカー上昇を早期に検知

## 3. アルツハイマー病の初期診断

発症初期のアルツハイマー病の検出が可能

## 4. 低摂取負担

尿や唾液で検出可能になると期待

## 5. 新規バイオマーカーの探索

バイオマーカーの発見は、検出感度上昇と相関

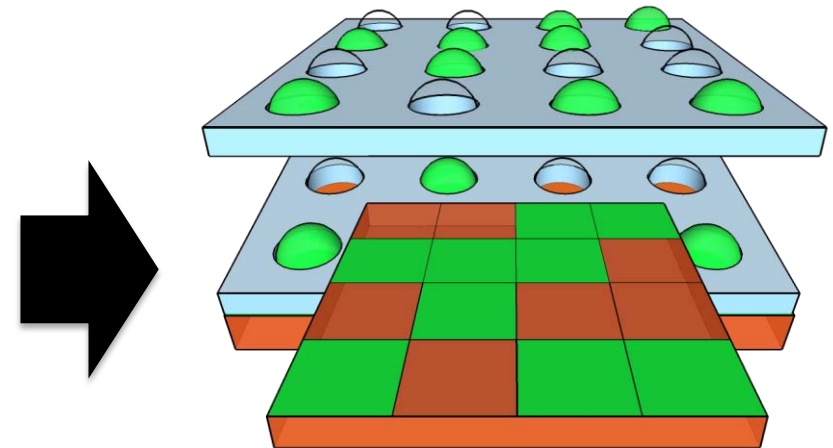
これから ①



# 1分子Digital ELISAは確立した。 次は、手のひらデバイス！



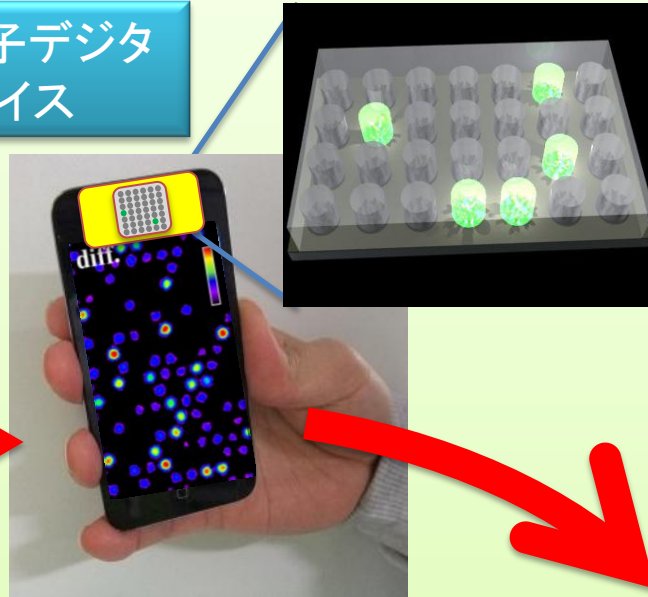
**Microchamber array**



**CMOS image sensor**

# 疾病の超高感度オンサイト検出

携帯型1分子デジタル  
計数デバイス



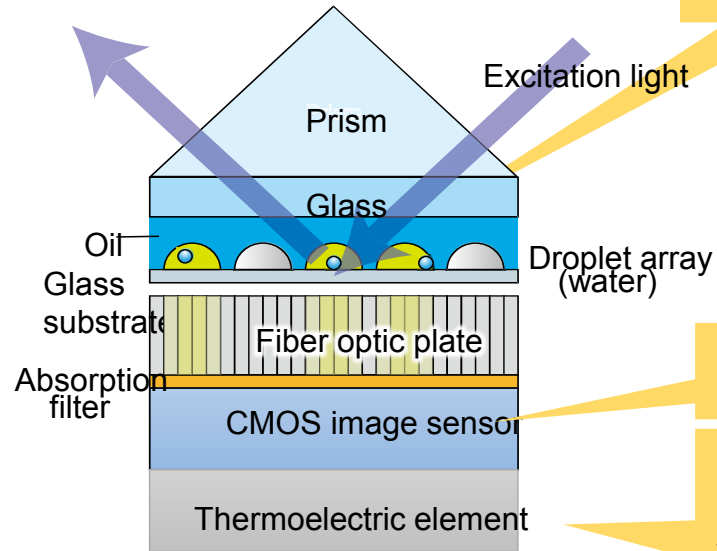
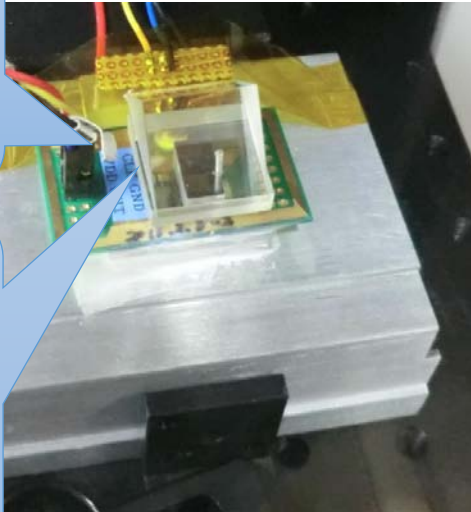
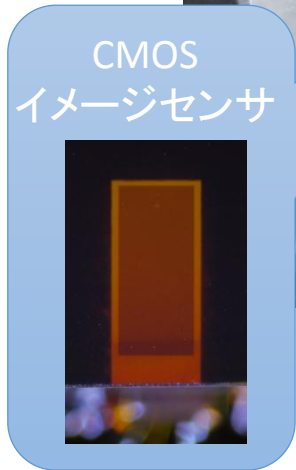
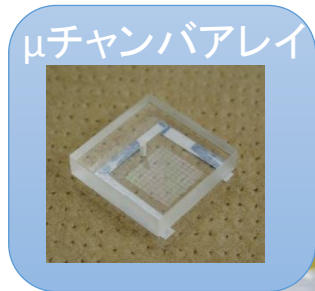
感染初期サンプル採取・調製



判定結果のメール送信による迅速な周知



# レンズ無しの検出装置



全反射による  
励起光除去

回路最適化

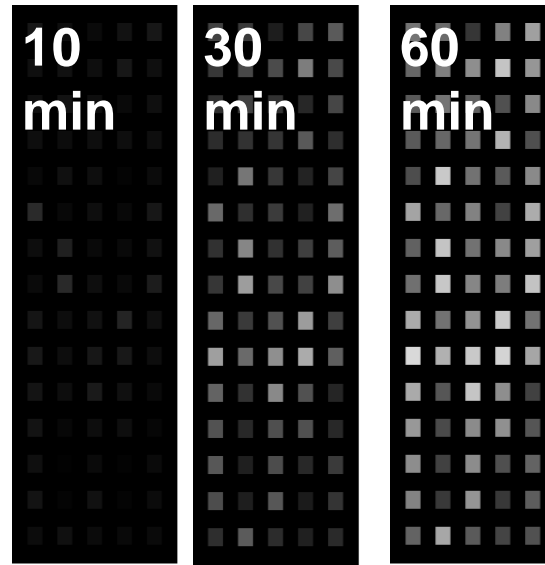
冷却による  
ノイズ低減

10  
min

30  
min

60  
min

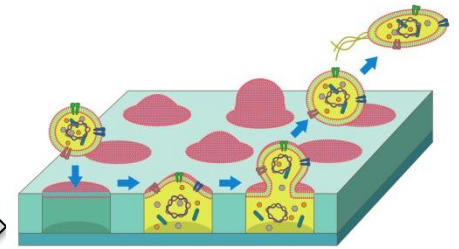
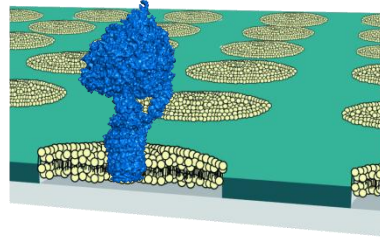
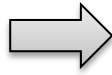
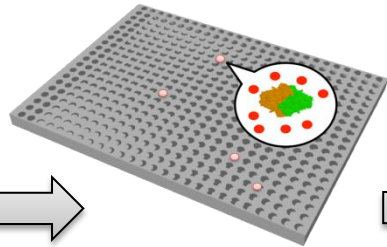
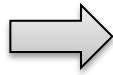
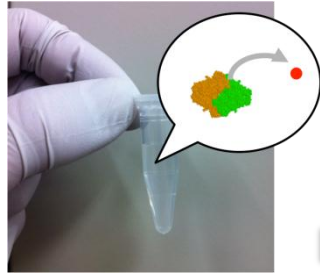
CMOS sensor images



これから ②



# 超微小チャンバーから人工細胞リアクタへ



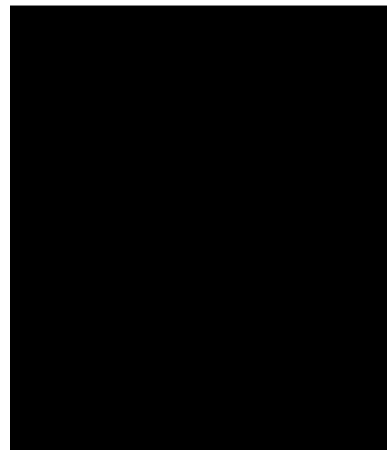
超微小溶液チャンバを用いた1分子酵素アッセイ  
(Nature Biotech. 2005,特許3727026)

脂質二重膜チャンバーアレイ  
(特開2015-040754)

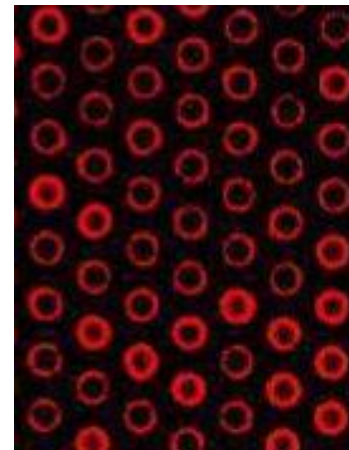
バクテリアサイボーグ  
(バクテリアと膜チャンバの融合)(特  
開2015-80421)



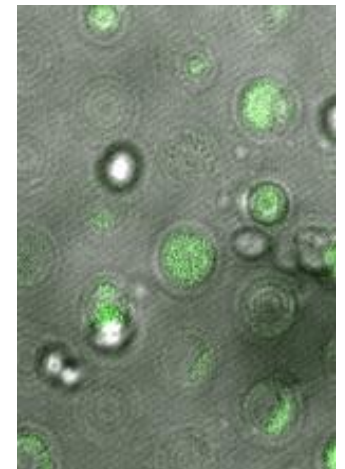
感度100万倍の抗原抗体反応  
(1分子デジタルELISA)  
(Lab on a chip 2012,  
PCT/JP2012/055885)



1分子DNAからの  
無細胞遺伝子発現  
(未発表データ)



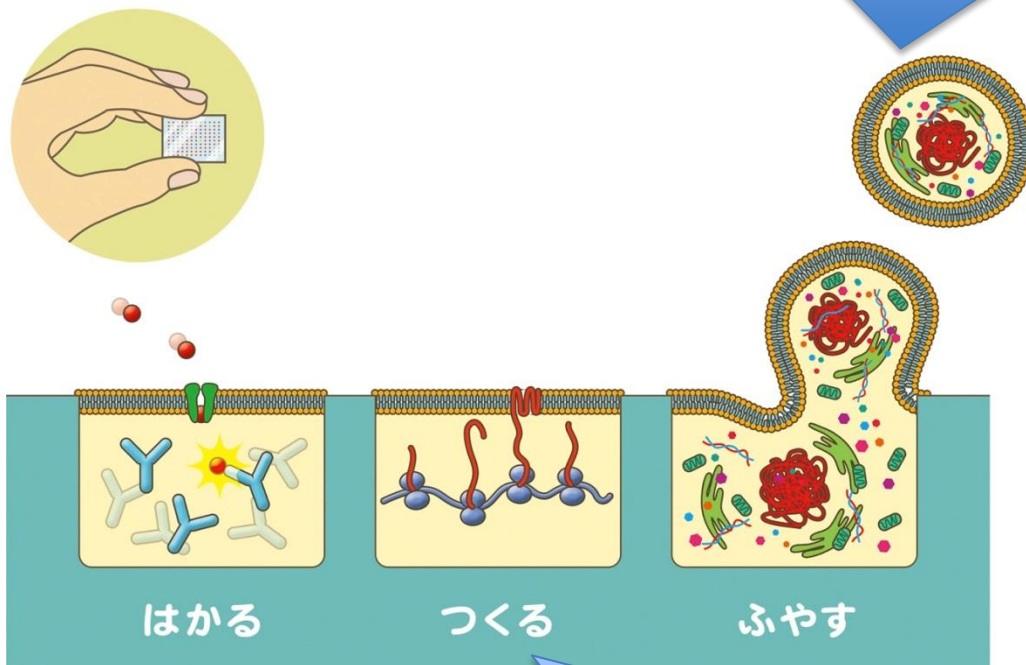
膜タンパク質の再構成と  
輸送活性の1分子計測  
(Nature Comm. 2015)



膜チャンバーと融合したサイ  
ボーグ大腸菌の出芽  
(未発表)

# 微小リアクタを用いた バイオ産業イノベーション

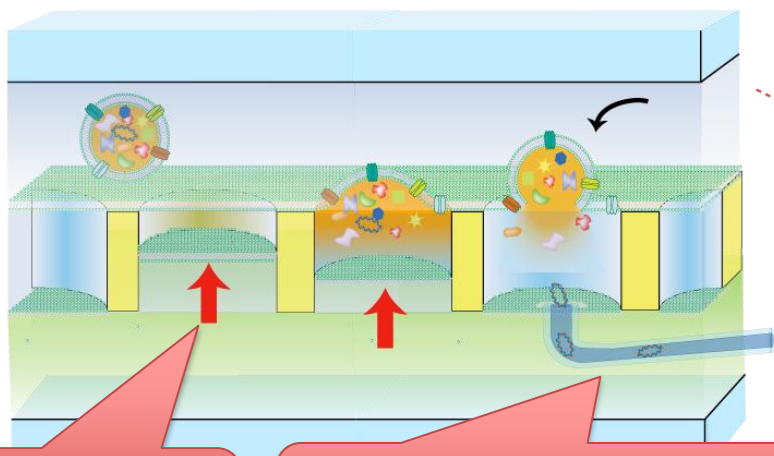
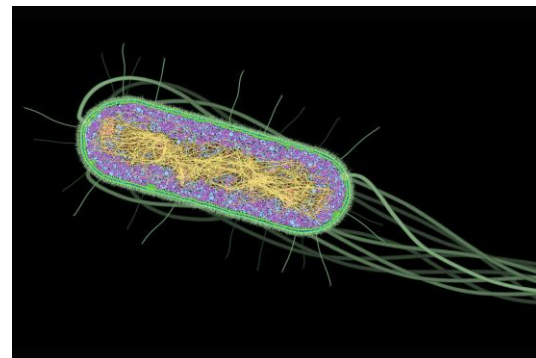
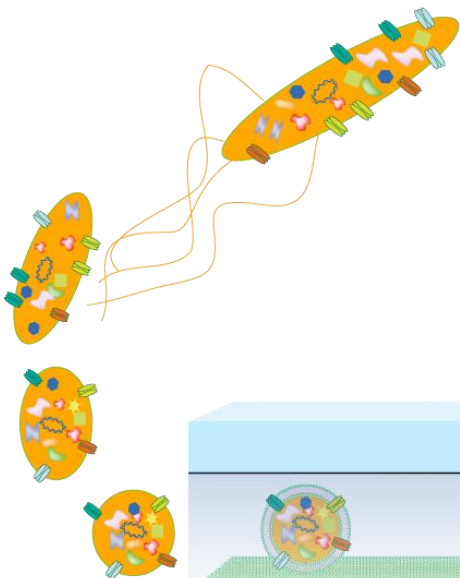
複製可能な人工細胞



「1分子デジタル臨床分析」

機能に基づく超並列型スクリーニング

# 人工染色体で起動する人工細胞創出へ



Microchamber

Upper Channel

Lower Channel

PDMS

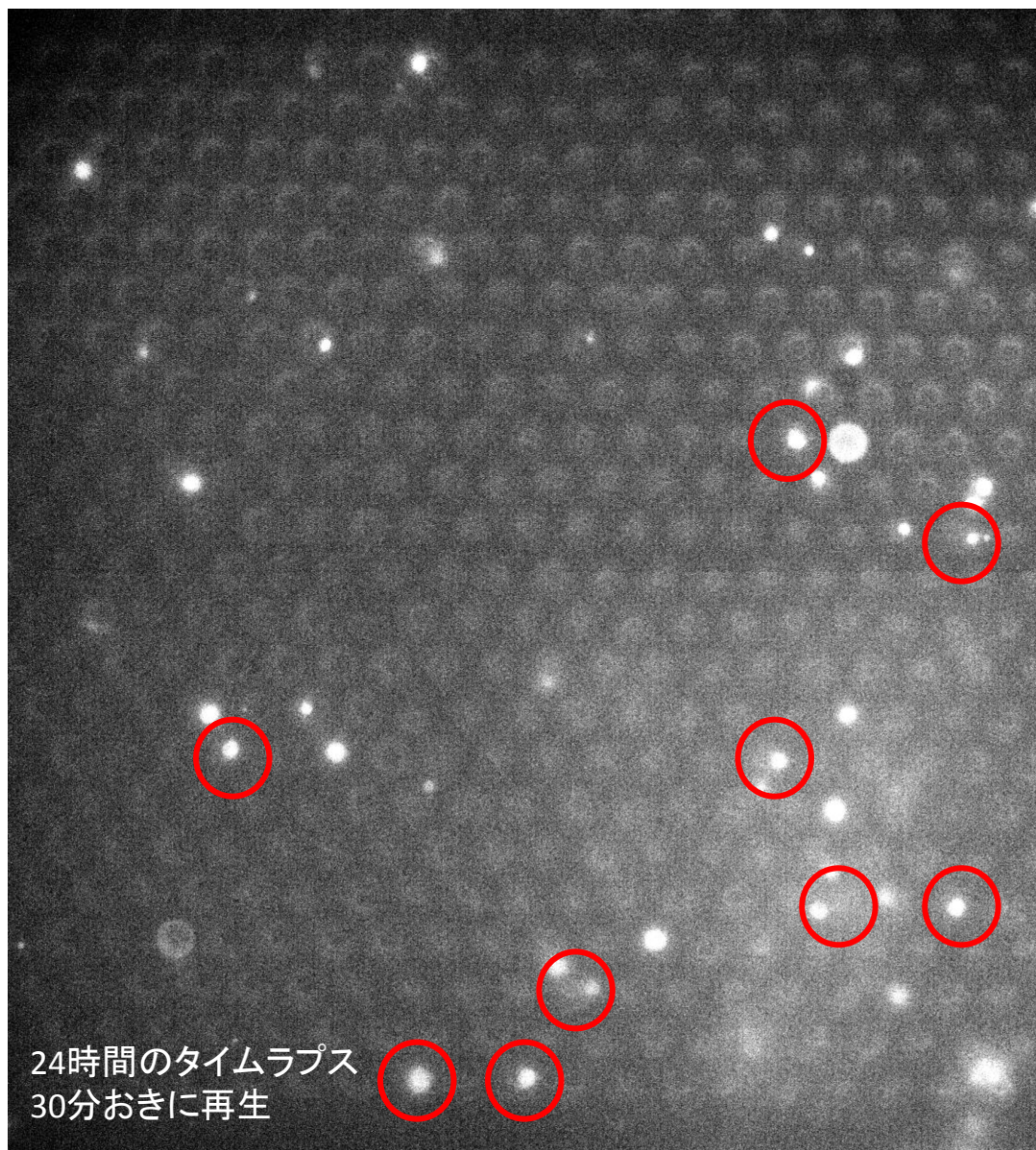
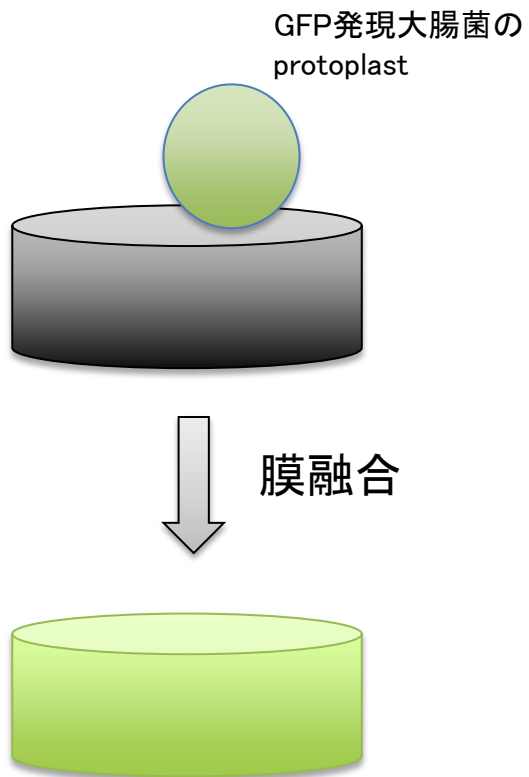
外力による細胞出芽 (OSの起動)

人工染色体 (OS) インストール

Wetwareの導入



# 大腸菌protoplastと膜チャンバーの融合

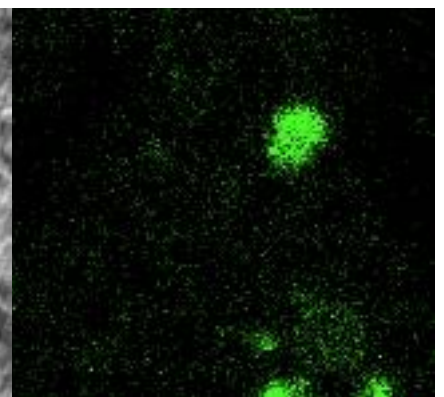
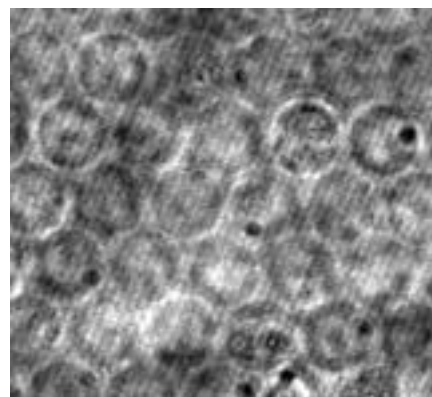
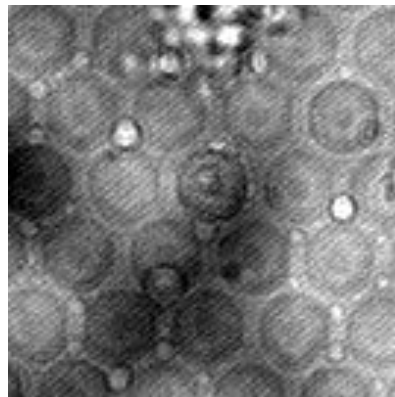
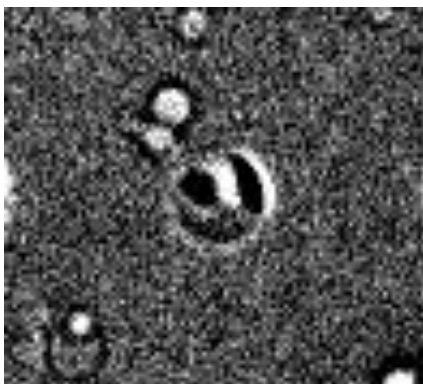
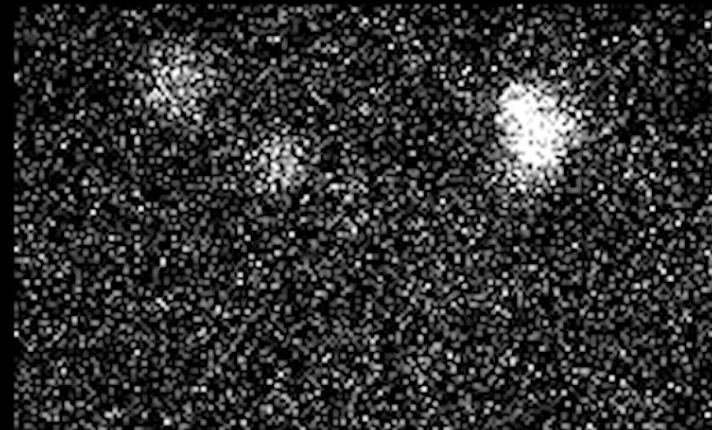
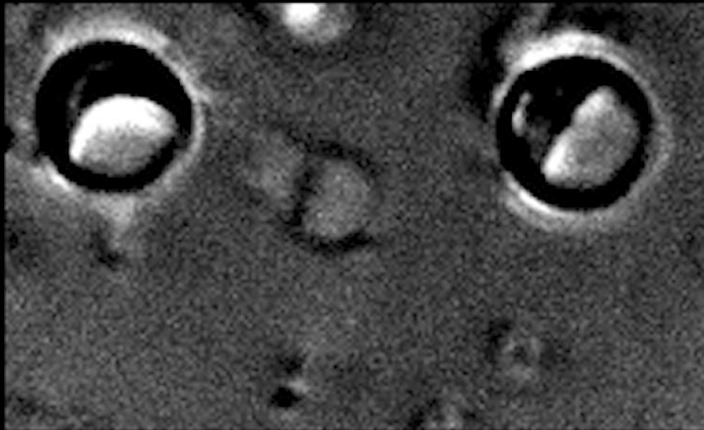




# 融合後の変化

明視野像

GFP蛍光像



# JSTとの関わり

2011-2015 CREST 「生体分子 1 分子デジタル計数デバイスの開発」  
(東大教授)



CREST 「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創成」  
領域代表：曾根 純一

2000-2002 PRESTO 「生体膜で機能するプロトン駆動のナノマシン」  
(さきがけ研究員→東大助教授)



さきがけ 「組織化と機能」  
領域代表：国武豊喜 北九州産業学術推進機構 理事長

1998-2000 CREST 木下プロジェクト「一方向反応のプログラム基盤」  
(博士研究員)



CREST 「生命活動のプログラム」  
領域代表：村松 正實 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 所長

その他：さきがけ研究アドバイザー（川合「界面の構造と制御」プロジェクト、上田「細胞の構成的理解と制御」、浜地「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」、

# 研究メンバー

奈良先端大学  
太田、笹川、徳田



東京大学  
飯野(現: 岡崎統合バイオ)  
田端、小野、Kim、池田、榎

