

可搬型生物剤・化学剤検知用バイオセンサの開発

実施予定期間：平成 23 年度～平成 27 年度

研究代表者：民谷 栄一

(大阪大学大学院工学研究科 教授)

I. 概要

生物剤・化学剤を用いたテロ事案発生時に、ファーストレスポnderが迅速に現場へ駆けつけ適確な判断が出来る様、隊員が携帯できる小型軽量のシステムに、炭疽菌、ボツリヌス毒素、リシン及などの生物剤や、サリン、VX等の化学剤をそれぞれ検知可能なバイオセンサシステムを開発する。超高速なセグメントフローPCRや、熱安定性に優れ抗体に匹敵する特性を有する人工糖鎖を用いた局在表面プラズモン共鳴(LSPR)バイオセンサ、化学剤用酵素センサを搭載し、生物剤については、測定開始から結果表示まで15分以内に大気中致死濃度を、また化学剤については擬剤を用いて5分以内に大気中致死濃度の1/100の検知を実現する。

1. 目標

生物剤・化学剤を用いたテロ事案発生時に、初動対応として非特定物質による汚染が想定される現場において、生物剤と化学剤を同時に検知可能な可搬型のバイオセンサシステムを開発する。特に、警察や消防・自衛隊等のファーストレスポnderが迅速に現場へ駆けつけ、適確な判断が出来る様、隊員が携帯できる小型軽量のシステムに、炭疽菌、ボツリヌス毒素などの生物剤や、サリン、VX等の化学剤をそれぞれ検知可能なバイオセンサを内蔵させる。

目標とする装置は、部品の最適化によってA4サイズ(最長辺30cm)のアタッシュケース程度までダウンサイジングを図るとともに、現場の環境から試料を吸引する大気回収装置等を組み込んだ装置の開発を行う。ボツリヌス毒素検知では、2分間吸引の大気中致死濃度に対して、測定時間15分以内での検出を目指す。サリン及びVXについては、1分間吸引の大気中致死濃度の1/100を目標感度として、測定時間5分以内の検出を目指す。また、重量についても、実証期間までに、大人がひとりで搬送できる20kg以下を実現し、最終的にはロボットへの搭載を想定した15kg以下を目標とする。

2. 技術的内容

a. 炭疽菌検出用バイオセンサの開発

炭疽菌の確定検査には、培養法が利用されるが、検知に早い場合でも8時間を要するため、近年では迅速な検査法

として、PCR法を用いた検出が利用されている。炭疽菌も特異的な遺伝子を増幅ターゲットとしたPCR法により、炭疽菌の確認が可能である。PCR法以外にも、保護抗原に対するELISA等による抗体検査も可能であるが、測定に数時間かかる上、菌表面の抗原を認識するために、ヒトに対して弱毒性で市販されているDavis株との区別が困難であり、擬陽性に関して大きな問題がある。PCR法による炭疽菌検出のプロトコールでは、炭疽菌特異的遺伝子をターゲットに、サーマルサイクルにより増幅後、ゲル電気泳動によりバンドを確認することで行われている。また、最近ではリアルタイムPCR法を用いた蛍光検出によるキットも市販化されており、蛍光強度変化から炭疽菌遺伝子の定量も可能となっている。PCR法におけるサーマルサイクルでは30サイクルに1時間以上費やすため、培養法に比べて迅速ではあるが、現場検知には利用困難であった。そこで、提案者らは、PCR法を微小流体デバイス化したセグメントフローPCR法を開発し、40サイクルのサーマルサイクルを超高速化することで、電気化学検出や蛍光検出と組み合わせ約5分で炭疽菌遺伝子の検出を実現している。また感度についても、滅菌処理済の炭疽菌を用いた場合、PCR試料中に10 cellsから検出可能であることを確認しており、また、炭疽菌芽胞の擬剤であるBacillus subtilisの芽胞溶液についても、破砕処理後で8 cells程度から検出可能であった。使用しているPCR用試薬キットの性能では、チューブ中で3 cellsから検出が確認されていることから、本提案では、流路内壁への吸着抑制などの検討により、遺伝子増幅効率の改善を図ることで感度の向上を図り、感度不足による擬陰性の可能性の低減を目指す。

b. ボツリヌス毒素高感度検出用バイオセンサの開発

これまで提案者らは、リシンやコレラ毒素を高感度に迅速に検知する技術を開発してきた。リシンやコレラ毒素は、細胞表層の特定の糖鎖に結合して、中毒症状を示す。この事実を利用して、提案者らが独自に開発した人工糖鎖を用い、LSPR法と組み合わせ、わずか8分で30 ng/mlのリシン実剤の検知に成功した。リシン以外のアルブミン、ピーナツレクチン(PNA)、小麦レクチン(WGA)など6種類のタンパク質に対しては結合せず、本分析法は高い特異性を有していることを実証した。また、コレラ毒素検出用の糖鎖を用い、20 ng/mlのコレラ毒素実剤の検知にも成功している。本提案では、これまでの実績を活用して、テロへの使用が懸念されているボツリヌス毒素を検知対象に選び、当該毒素を致死量以下の検出感度で迅速に検知する技術を開発する。すなわち、当該毒素と結合する認識素子の開発を行い、測定環境の影響を受け難い局在プラズモ

ン共鳴(LSPR)、または、電気化学検出を検知原理に用いた毒素検知システムを開発する。本研究では、合成化学、ナノテクノロジー、センシング技術等の先端的技術を活用して、当該毒素の高感度・迅速検出について果敢に挑戦する。

c. 化学剤検出用バイオセンサの開発

化学剤(サリン、VXガス)によるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の酵素活性阻害を電気化学的に測定した例はほとんどない。しかしながら、サリン、VXガス同様にAChEの酵素活性阻害を引き起こす、有機リン系の農薬を電気化学的に測定した報告例は多数ある。使用する酵素の種類、数、電気化学による検出の方法は、様々である。我々は、スライドガラス上にPDMS(ポリジメチルシロキサン)で作製した流路中に酵素アセチルコリンエステラーゼ(AChE)を配置して試料溶液を流しこみ、阻害反応を行った後に印刷電極にて測定する手法、すなわち、基質としてアセチルチオコリン(ATCh)を用いて、生成するチオコリンを電気化学的に測定することによって0.01ppm(0.01 μ g/ml)のダイアジノンオキソンを7分間で検出することに成功している。本提案では、5分以内での化学剤の検出を可能とするため酵素、電極、バイオチップの見直しを行い、さらにメディエーター等を用いた他の電気化学検出法と比較し、擬陽性なく化学剤の測定可能なバイオチップの開発を行う。

d. 可搬型生物剤・化学剤検知装置の開発

本課題に先立って、炭疽菌検知用セグメントフロー型PCRと、リシン検知用LSPRのためのシステム制御用ソフトウェアを専用に開発し、タッチパネル型PCにて全てのコントロール可能な、可搬型の小型リアルタイム検知システムを実現している。

これらの成果をもとに、非特定物質による汚染が想定される現場において、初動対応に適した生物剤・化学剤同時検出可能な可搬型全自動検知装置の開発に取り組む。各剤を想定した捕集サンプリングがなされた後、各検知チップへ分配される。化学剤サリン・VXガスは酵素検知チップにより、生物毒ボツリヌス毒素はLSPR検知チップにより検知する。生物剤炭疽菌は、芽胞破碎処理され、セグメントフローPCRにより検知される。これらの性能仕様を満たすため、エアロゾル捕集機能、芽胞試料破碎機構、チップデバイス駆動用制御盤、小型分光器あるいは小型電気化学測定器が組み込まれ、さらに捕集から検知までの操作および装置駆動を全自動化するソフトウェアを開発する。また、部品の最適化によってA4サイズ(最長辺30cm)のアタッシュケース程度まで外寸のダウンサイジングを図る。また、重量についても、大人がひとりで搬送できる20kg以下を実現し、最終的にはロボットへの搭載を想定した15kg以下を目標とする。また大気中ダストなどの影響による作動率を検証し、誤報率低減に向けた仕様とセンサ感度の増強とのバランスの最適化を行う。耐振・耐環境性能について

も検証を行い、堅牢性に優れた実用性の高いシステムの構築を目指す。

3. 技術開発期間終了時の目標

生物剤・化学剤を用いたテロ事案発生時に、初動対応として非特定物質による汚染が想定される現場において、生物剤と化学剤を同時に検出可能な可搬型のバイオセンサシステムを開発する。特に、警察や消防・自衛隊等のファーストレスポnderが迅速に現場へ駆けつけ、適確な判断が出来る様、隊員が携帯できる小型軽量のシステムに、炭疽菌、ボツリヌス毒素、リシンなどの生物剤や、サリン、VX等の化学剤をそれぞれ検出可能なバイオセンサを内蔵させる。

装置本体は、部品の最適化によって最長辺30cm角程度までダウンサイジングを図るとともに、現場の環境から試料を吸引する大気回収装置等を組み込んだ装置の開発を行う。重量についても、大人がひとりで搬送できる20kg以下の実現を目指す。捕集機能については、市販のBioCapture相当(150L/min)の吸引量を想定する。また、各剤検知に対応したディスプレイなバイオセンサチップが内蔵され、以下に示す検知感度を目指す。

検知感度等の性能については、炭疽菌検知の場合、これまでに開発したセグメントフローPCRデバイス技術をもとに、流路内壁への吸着抑制などの検討により、遺伝子増幅効率の改善を図ることで感度の向上を図り、感度不足による擬陰性の可能性を低減する。測定開始から結果表示まで15分以内に大気中致死濃度以下で、10 cells/ μ lの炭疽菌遺伝子の検出を実現する。

ボツリヌス毒素検知においても、これまでに開発した高感度・高選択性のリシン検知用LSPRチップ技術をもとに、リシン同様タンパク質系の生物毒であるボツリヌス毒素への応用を図る。ボツリヌス毒素特異的結合能を有する糖鎖を設計・合成し、高純度化・高密度固定化および非特異的吸着(擬陽性)抑制技術について検討する。大気中致死濃度以下である目標感度100 ng/mlの検出を15分以内で実現することを目標とする。

一方、化学剤においては、コリンエステラーゼ酵素活性阻害法を用いたバイオセンサチップで、擬剤(ダイアジノンオキソン)を使用した場合に、既に0.01 ppm(0.01 μ g/ml)の感度を達成している。この要素技術をもとに、サリン及びVXの1分間吸引の大気中致死濃度が、それぞれ150 mg/ m^3 、0.1 mg/ m^3 であることから、その1/100を目標感度として、測定時間5分以内に擬陰性は0%で1 μ g/ m^3 以下の検出下限を目指す。

4. 実証期間終了時の目標

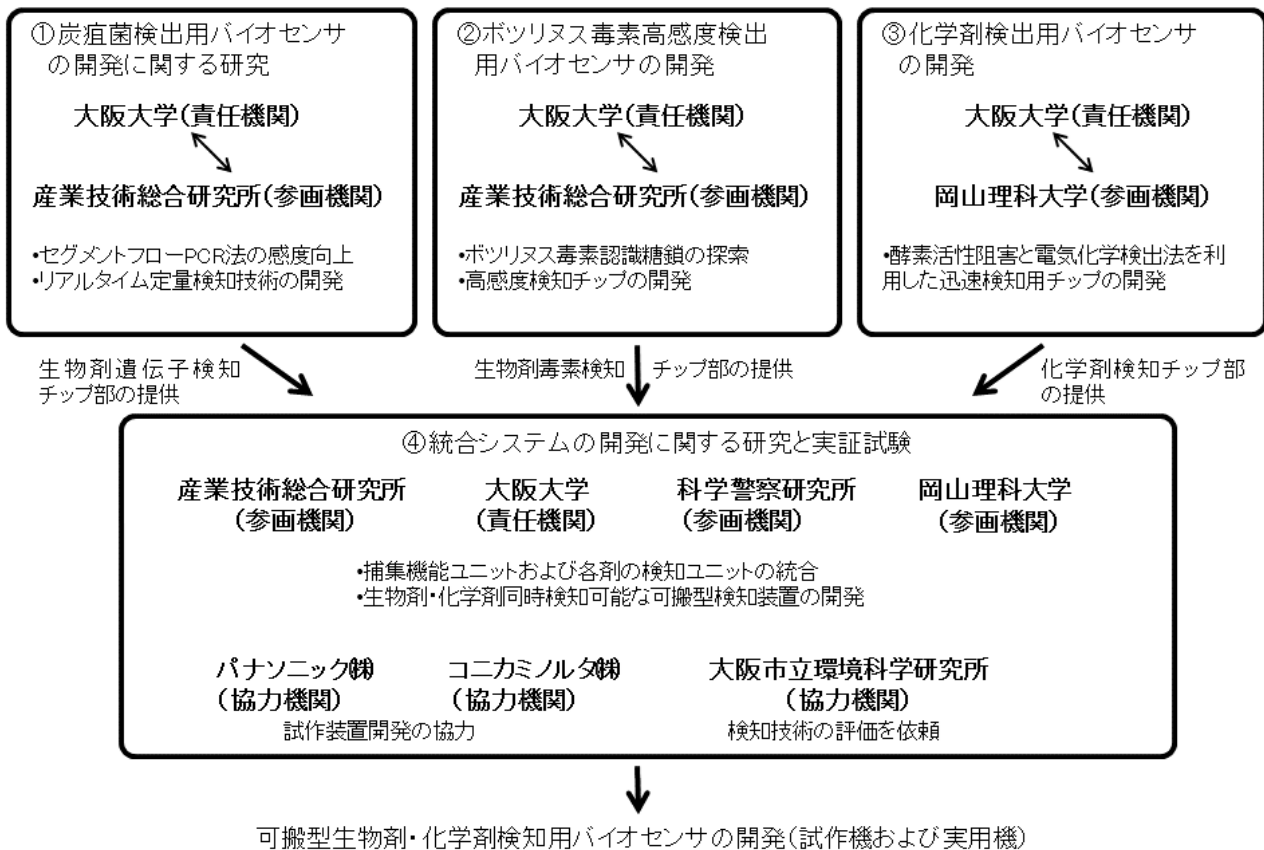
チップデバイスを射出成形により大量生産し、ロット間誤差や試薬の長期保存性の検証など、測定系や開発装置の

バリデーションを実施し、最適化する。また、耐振動性や耐環境性能に関する検証や、開発したプロトタイプ装置についてフィールド試験による擬陽性や擬陰性の検証を実施し、堅牢性に優れた装置に仕上げる。さらなるダウンサイジングも図り、A4 サイズのアタッシュケースまで小型化を目指す。重量も最終的にはロボットへの搭載を想定した 15kg 以下を目標とする。

以上の目標性能は、テーマ設定を満たしており、さらに、既に開発した各バイオセンサは、複雑な光学系などを必要

とせず、装置構成としてはシンプルに実現できるため、ヘリコプターや車載などを想定した際に実用上重要となる耐振・耐環境性能にも優れていると考えられる。また、ボツリヌス毒素等の生物毒素検出用の認識素子には、本技術の特徴の一つとして、可能な限り抗体ではなくより熱安定性に優れた糖鎖を使用するため、長期の室温保存にも対応が可能である。すなわち、消耗品等の優れたライフサイクルコストも期待され、他の追随を許さない極めて実用性の高いシステムを構築できるものと期待される。

5. 実施体制



6. 各年度の計画と実績

a. 平成 23 年度 (技術開発期間 1 年目)

(1) 計画

- (a) セグメントフローPCR 法における炭疽菌遺伝子検出の感度向上、および流路コーティング技術の開発
- (b) ボツリヌス毒素(C)認識糖鎖の設計・合成と高純度化
- (c) AChE 酵素活性阻害剤ダイアジノンオキソン 5 分以内での測定条件の検討
- (d) 大気捕集機能および炭疽菌芽胞破碎機能の検討

(2) 実績

- (a) セグメントフローPCR 法における炭疽菌遺伝子検出の感度向上、および流路コーティング技術の

開発

炭疽菌検出用セグメントフローPCR 法を用いたバイオセンサについて、流路デザインを最適化するとともに、射出成形によるバイオセンサの大量生産を行った。また流路に対するタンパク等を利用したコーティング技術を新たに開発し、遺伝子試料の非特異吸着を抑制し、高い増幅効率を実現した。

- (b) ボツリヌス毒素(C)認識糖鎖の設計・合成と高純度化

ボツリヌス毒素と特異的に結合し、また、センサ基板に固定化できるよう、還元末端側にアンカーを導入した糖鎖を設計した。これをケモエンザイム法により合成し、工程ごとにゲルろ過や逆相カラム等を用いて精製を行うことで目的の糖鎖を高純度に得

ることができた。

(c) AChE 酵素活性阻害剤ダイアジノンオキソン 5 分以内での測定条件の検討

擬剤（ダイアジノンオキソン）を用いて化学剤検出用センサに使用する酵素としてヒト由来のアセチルコリンエステラーゼが最適であると決定した。電気化学測定により、0.02U の酵素量に対して 1.1ng (3.8pmol) のダイアジノンオキソンが検出可能であることを確認し、5分以内の測定条件を算出した。

(d) 大気捕集機能および炭疽菌芽胞破碎機能の検討
捕集機能ユニットの基礎的検討を行い、1分間の作動条件で 948μL の溶液量を回収することが可能であることがわかった。また、モデル菌、モデルガス剤のサンプリングも可能であることを確認した。また開発する各剤検知チップ、捕集機能ユニットとバイオセンサシステムとの統合にかかる仕様の検討を行い、各部間の接続や駆動部材などの仕様を設定した。

b. 平成 24 年度（技術開発期間 2 年目）

(1) 計画

(a) リアルタイム PCR ユニットの開発、および感度及び定量性の検証

(b) 糖鎖高密度固定化（高感度化）およびブロッキング（擬陽性抑制）技術の開発

(c) 化学剤検知チップの設計と作製、および大気バブリング溶液を用いた検知検討とチップ改良

(d) 捕集および芽胞破碎機能ユニットの試作と性能検証、各剤の検知チップユニットの仕様検討、統合プロトタイプ装置の設計

(2) 実績

(a) リアルタイム PCR ユニットの開発、および感度及び定量性の検証

炭疽菌特有の毒性関連遺伝子を迅速に検知する技術として、これまでの流路のエンドポイントにおける蛍光検出から光学系を改良し、リアルタイム PCR が可能な光学ユニットを新たに開発した。これにより、さらなる迅速性と高感度を実現した。

(b) 糖鎖高密度固定化（高感度化）およびブロッキング（擬陽性抑制）技術の開発

マイクロ波を用いた糖鎖の固定化技術を開発し、従来の SAM 法と比べ毒素検出レスポンスが約 4 倍向上した検知チップの開発に成功した。未修飾リボ酸及び TEG-リボ酸を用い、糖鎖固定化チップに対するブロッキングを検討したところ、未修飾リボ酸において顕著なブロッキング効果があることを実証した。

(c) 化学剤検知チップの設計と作製、および大気バブリング溶液を用いた検知検討とチップ改良

ショ糖またはトレハロース溶液に非イオン性界面

性剤を含んだ溶液で化学剤検知チップに用いる酵素を凍結乾燥することで室温にて 3 ヶ月酵素活性が維持できることを実証した。擬剤（ダイアジノンオキソン）雰囲気下の大気を吸引し、大気バブリング溶液での検出を行い、5分以内での検出が可能であった。

(d) 捕集および芽胞破碎機能ユニットの試作と性能検証、各剤の検知チップユニットの仕様検討、統合プロトタイプ装置の設計

4つの捕集容器を備える樹脂性捕集容器を設計・作製し、24V バッテリー駆動にて、大気吸引量 338L/min、捕集液量 726μL の動作能力を達成した。擬剤の捕集と致死濃度相当以下のダイアジノンオキソン、リシン凝集素 RCA120 を測定可能であることを確認した。統合システムの捕集プロセス制御プログラム案を作製・試作し、捕集動作および電気化学測定までを連続的に行えることを確認した。また、芽胞破碎機能ユニットに関して、擬剤である枯草菌芽胞についてインキュベーションによる熱的破碎効果により検出できる可能性を見出した。

c. 平成 25 年度（技術開発期間 3 年目）

(1) 計画

(a) ボツリヌス毒素 (A) 検知チップの開発

(b) 生物剤・化学剤検出用ユニットの統合、および試作ユニットの性能評価

(c) プロトタイプ装置の作製および性能評価

(2) 実績

(a) ボツリヌス毒素 (A) 検知チップの開発

金ナノ粒子を固定化した LSPR チップに、毒素認識素子である糖鎖、抗体を固定化した検知チップを開発した。

(b) 生物剤・化学剤検出用ユニットの統合、および試作ユニットの性能評価

試作した捕集ユニット、および生物毒素剤・化学剤検知用バイオセンサを連動させ、大気噴霧した致死量相当以下の毒素擬剤 (RCA120) を 15 分で検出し、また致死量相当以下の化学剤擬剤（ダイアジノンオキソン）を 5 分以内に検出を達成した。

(c) プロトタイプ装置の作製および性能評価

各ユニットをアタッチケース内に組み込んだ統合プロトタイプを試作した。24V バッテリー駆動の仕様とすることで、可搬性を得ることができた。化学剤擬剤（ダイアジノンオキソン）・生物剤擬剤（RCA120）を用いて検証評価を行い、致死濃度相当以下を目標時間内に検出可能であることを確認した。

d. 平成 26 年度（実証期間 1 年目）

(1) 計画

- (a) PCR 用微小流体デバイスの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良
- (b) リシン検知用糖鎖の合成とチップ作製および試作機を用いた特異性評価
- (c) 化学剤検知チップの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良
- (d) 各剤の量産型検知チップと開発装置のバリデーション

(2)実績

- (a) PCR 用微小流体デバイスの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良
セグメントフローPCR 用微小流体デバイスを射出成形により大量生産し、炭疽菌擬剤に対して 5.3% のロット間誤差や 6 ヶ月以上の試薬の長期保存性について確認された。
- (b) リシン検知用糖鎖の合成とチップ作製および試作機を用いた特異性評価
リシン検知用糖鎖を化学的に合成し検知チップに固定化した。開発したチップを用いてリシン擬剤の検出を行い、又、標的毒素以外の 10 種類の蛋白質について特異性評価を行ったところ、いずれも擬陽性を示さなかった。ボツリヌス毒素検知チップについても特異性評価を行い、9 種類の蛋白質について擬陽性を示さないことを確認した。

- (c) 化学剤検知チップの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良

化学剤検知用印刷電極を改良し、量産化を可能にした。4℃で 12 ヶ月保存した凍結乾燥酵素を用いても致死量相当以下の化学剤擬剤（ダイアジノンオキソン）を 5 分以内に検知可能であり、長期保存性についても確認した。

- (d) 各剤の量産型検知チップと開発装置のバリデーション

9 ヶ月間保存した酵素および改良型電極チップ、4 か月間保存した毒素検知チップを用いてバイオセンサの再現性について評価したところ、所望の性能が得られることを確認した。また装置捕集機能の改良を施した。

e. 平成 27 年度（実証期間 2 年目）

(1)計画

- (a) 試作機を用いた実剤評価と装置調整および改良
- (b) 耐振動性や耐環境性能に関する検証、およびフィールド試験による擬陽性や擬陰性の検証

7. 年次計画

取組内容	1年度目	2年度目	3年度目	4年度目	5年度目
a. 炭疽菌検出用バイオセンサの開発に関する研究	セグメントフローPCR法における炭疽菌遺伝子検出の感度向上 流路コーティング技術の開発 ↔	リアルタイムPCRユニットの開発 感度及び定量性の検証 ↔	生物剤・化学剤検出ユニットの統合 試作ユニットの性能評価 ↔	PCR用微小流体デバイスの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良 ↔	耐振動性や耐環境性能検証 フィールド試験による検証 ↔
b. ボツリヌス毒素高感度検出用バイオセンサの開発に関する研究	ボツリヌス毒素(C)認識糖鎖の設計・合成と高純度化 ↔	糖鎖高密度固定化(高感度化)およびブロッキング(擬陽性抑制)技術の開発 ↔	実剤および試作ユニットを用いた性能評価 ボツリヌス毒素(A)検知チップの開発 ↔	試作機を用いた特異性評価 リシン検知用糖鎖の合成とチップ作製 ↔	試作機を用いた実剤評価と装置調整および改良 ↔
c. 化学剤検出用バイオセンサの開発に関する研究	AChE酵素活性阻害剤ダイアジノンオキソン5分以内での測定条件の検討 ↔	化学剤検知チップの設計と作製 大気バブリング溶液を用いた検知検討とチップ改良 ↔	生物剤・化学剤検出ユニットの統合 試作ユニットを用いた性能評価 ↔	化学剤検知チップの量産化と性能評価、バリデーション実施、改良 ↔	耐振動性や耐環境性能検証 フィールド試験による検証 ↔
d. 統合システムの開発に関する研究と実証試験	大気捕集機能および炭疽菌芽胞破碎機能の検討 ↔	捕集および芽胞破碎機能ユニットの試作と性能検証 各剤の検知チップユニットの仕様検討 統合プロトタイプ装置の設計 ↔	プロトタイプ装置の作製および性能評価 ↔	各剤の量産型検知チップと開発装置のバリデーション ↔	耐振動性や耐環境性能検証 フィールド試験による検証 ↔