

特集：ディスプレイセンサおよびそれを支える技術の新展開

2. プリントブル電極を用いたモバイルバイオセンサー

民谷 栄一

1. はじめに

バイオセンサーは、生体の有する優れた分子識別機能を活用し、これと電極、半導体、光検出素子などのデバイスから構成される計測装置である。特に生体や環境などの状態を分子レベルで精密に理解できるため多くの有益な情報を与える。作製技術としてスクリーン印刷、ナノインプリントなどのプリントブル技術は、量産可能で特性の良いバイオセンサーを開発するうえで、きわめて有用である。著者らは、スクリーン印刷電極とモバイル型の電気化学計測装置を用いたポータブルバイオセンサーを多く開発している。以下にそれらについて紹介する。

2. 量産可能なスクリーン印刷電極とモバイル計測装置

バイオセンサーに用いる電極には、電気化学計測用として通常用いられる作用極、対極、参照極の3極が必要である。たとえば、作用極や対極にはカーボン、金電極が、参照極にはAg/AgCl電極などが用いられる。こうした電極材料をスクリーン印刷するためには、インク状の粘性を有する高分子材料と混合して用いられる。そのため、最終的には導電性を有する加工処理が求められる。印刷基板には、セラミック、プラスチック、紙材料も可能で透明かつフレキシブルな印刷電極も作製できている

(Fig. 1). 筆者らは、バイオデバイステクノロジー社と連携して量産可能な印刷電極を種々開発している。作用極、対極、参照極の3電極を同一基板上に作成した電極から作用極を複数配置したマルチ電極、光計測も同時にできるようにした透明印刷電極、遺伝子増幅のためのPCRチューブにちょうど配置できるPCR電極、電極基板上に試料溶液をドロップできるようにした電極などの作製も実現している (Fig. 2). こうした印刷電極チップはモバイル型バイオセンサーに有効である。すでに筆者らが開発している手のひらサイズの電気化学装置と組み合わせて用いる。この電気化学装置は、65 gと軽量であるが、測定モードとしてCV (Cyclic Voltammetry) LSV (Linear Sweep Voltammetry) CA (Chronoamperometry) DPV (Differential

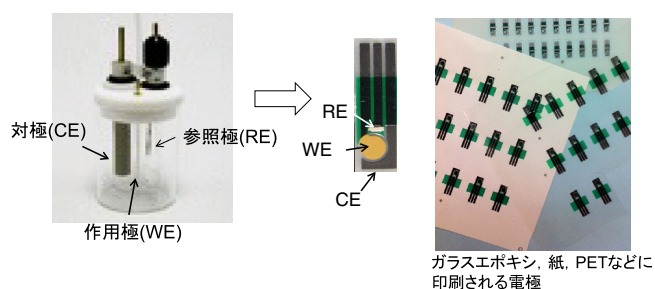


Figure 1. (Color online) 電気化学計測のための3極一体型印刷電極。

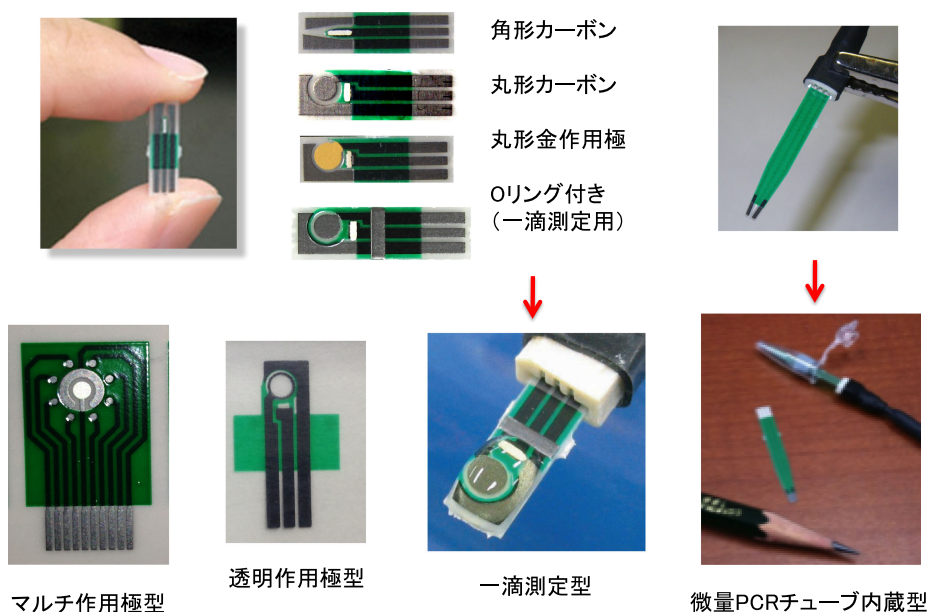


Figure 2. (Color online) バイオセンサー用各種印刷電極。

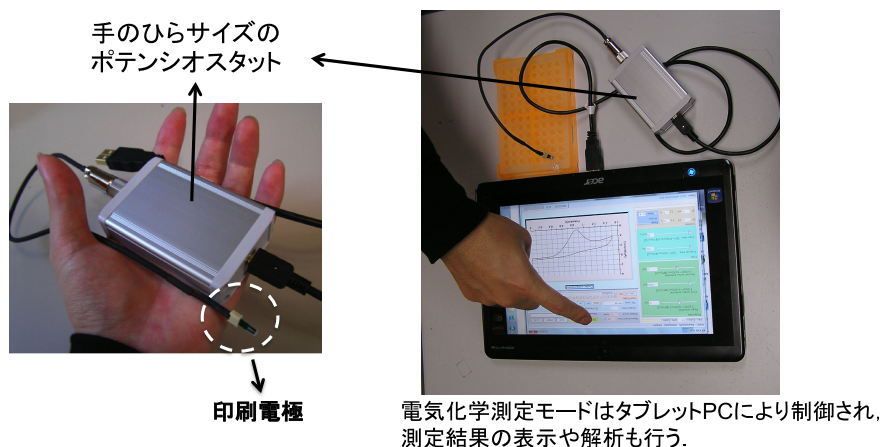


Figure 3. (Color online) 印刷電極とポータブル電気化学装置.

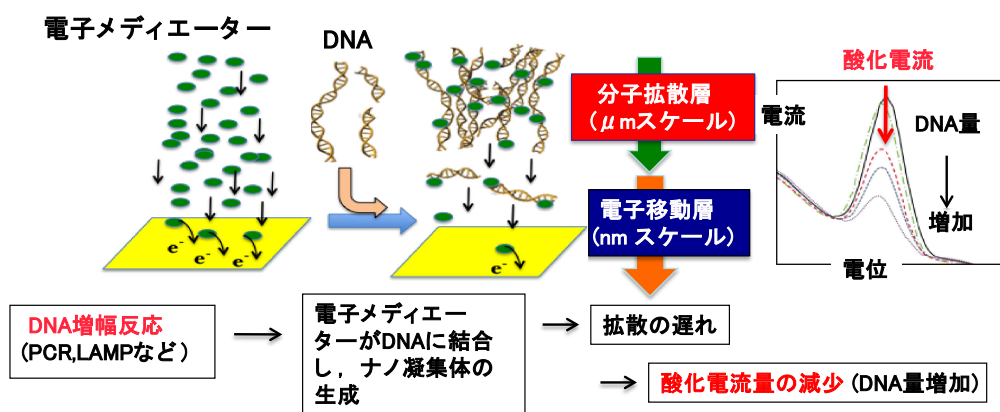


Figure 4. (Color online) 電気化学遺伝子センサーの原理.

Pulse Voltammetry) SWV (Square Wave Voltammetry) を有しており、タブレットやノート型 PC に USB を介して接続され、PC の充電電源で稼働できるため、戸外でのフィールド測定や移動中の測定なども可能である。PC に内蔵したソフトにより各種パラメーター設定と測定データの解析が可能である (Fig. 3).

3. 印刷電極を用いる POCT (ポイントオブケア診断) のための遺伝子センサー¹⁻⁷

筆者らは、電極を用いた方法で遺伝子を検出する原理を明らかにしている。これは、電極に特定の DNA を固定することなく、溶液中进行する特定の DNA と相互作用する電気化学的活性を有するバインダー分子との相互作用を利用して測定するものである (Fig. 4)。特定の遺伝子を PCR などにより増幅し、この増幅された遺伝子に結合した電気化学活性分子は、結合により電極への拡散が阻害され、電極への電子移動が減少する。すなわち電流減少量が増幅された遺伝子量と相関することとなる。この原理をもとに、血液中の B 型肝炎ウイルス、食中毒に関わる病原性微生物であるサルモネラ菌や大腸菌 O-157、炭疽菌、院内感染 MRSA 菌、歯周病菌 (口腔液)、インフルエンザ (鼻腔液)、肝炎ウイルス (血液)、ApoE (アルツハイマーリスク因子)、遺伝子組み換え食品、肉質判定 (ハラル用) などに応用した (Fig. 5)。Flow 型 PCR チップ

による遺伝子の迅速増幅についても検討した。マイクロチャンネル内に反応溶液を送液する Flow 型 PCR チップは、溶液自体が各温度に固定したヒーター上を通過するため、温度の上げ下げの制御に時間がかかる通常のサーマルサイクラー装置よりも迅速化することが可能である。このような Flow 型デバイスでは、遺伝子増幅後の溶液はデバイスの outlet からそのまま送液されてくるため、検出デバイスとの連結性に優れている。PCR チップは、soft lithography 技術によってマイクロ流路を有するチャンネルを一枚のチップに集積させたシリコン鋳型を作製し PDMS に転写したものにガラス基板を貼り合わせて作製した。ヒーター上に設置後、シリンジポンプで PCR 溶液を送液して大腸菌を増幅した結果、12 分 (30 cycles) で PCR が可能であり、その増幅を電気化学で測定することが可能であった。こうしたマイクロ流体遺伝子チップ、ポンプ、電気化学測定装置一式を装備したキャリヤー型のバイオセンサシステムも開発している。また、インフルエンザウイルスといった RNA ウイルスを測定するために RT-PCR フローチップも開発している (Fig. 6)。これにより 15 分程度で測定が可能となった。さらに、PCR のように温度サイクルを必要とせず一定温度で増幅可能な LAMP 法を用いて遺伝子センサーを開発した。遺伝子試薬を導入したチューブ内に電極を挿入し、そのままヒーター上に設置し、リアルタイムに測定を可能とした (Fig. 7)。

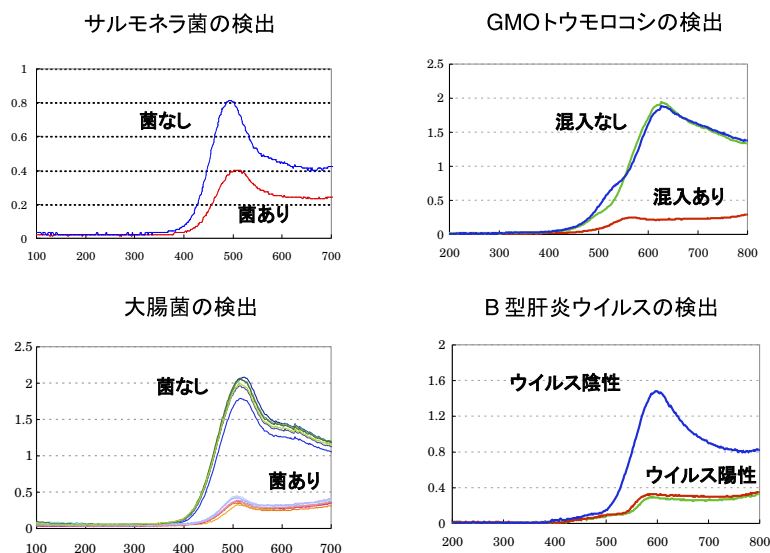


Figure 5. (Color online) 電気化学遺伝子検出装置による各種測定例.

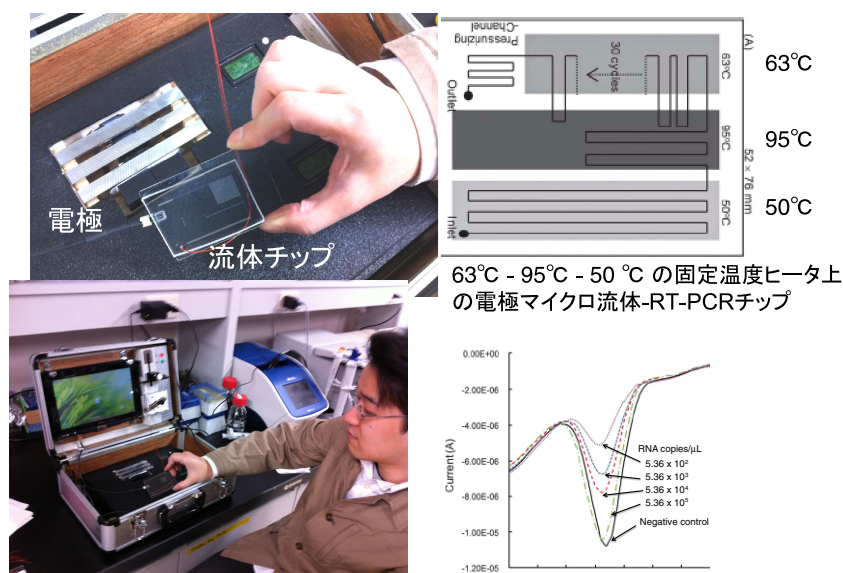


Figure 6. (Color online) 印刷電極を内蔵した遺伝子増幅 RT-PCR 流体チップ.

4. 印刷電極を用いるモバイル型免疫センサー⁸⁻¹¹

医療、食品など様々な分野で特定のタンパク質を定量することによって、健康、食品の安全性などが守られている。通常、特定のタンパク質を定量するには、抗体を用いた ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) と呼ばれる方法が行われている。ELISA は、酵素を抗体に標識して測定対象であるタンパク質と結合させ、酵素反応による発色、発光、蛍光の信号を用いて定量する手法である。測定対象に対する抗体があれば測定可能な方法で、様々なタンパク質を検出するためのキット化された製品が世界中で使用されている。ELISA は、光学的な検出方法であり、測定装置の小型化が困難であるが、著者らは、装置の小型化が可能な電気化学的な測定法として、抗体に酵素ではなく金ナノ粒子を標識することで、ELISA と同感度の印刷電極を用いたタンパク質定量法、GLEIA

(Gold Linked Electrochemical Immuno Assay) を開発している。その手法は、印刷電極の作用電極上に抗体を固定し、金ナノ粒子標識抗体と抗原でサンドイッチを形成させ、抗原の量を金ナノ粒子の数として測定する手法である (Fig. 8)。まず、妊娠診断マーカーであるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hGC) をモデルタンパク質として検討を行ったところ、サンドイッチを形成し、作用電極上に存在する金ナノ粒子は、測定対象である抗原が多くなるほど金ナノ粒子が多く存在することが確認でき、電気化学的な手法で金ナノ粒子を測定すると、抗原が多くなるに従い、電気化学的な信号も大きくなることが確認できた。hGC を 6.2 pg/mL の高感度測定が可能であった (Fig. 9)。さらこのこの手法を用いて、インシュリンを測定し、血糖値センサーと一体化した HOMA 係数を求めるセンサーの作成も実現している (Fig. 9)。その他、アルブミン、ヘモグロビンなどの定量にも成功している。

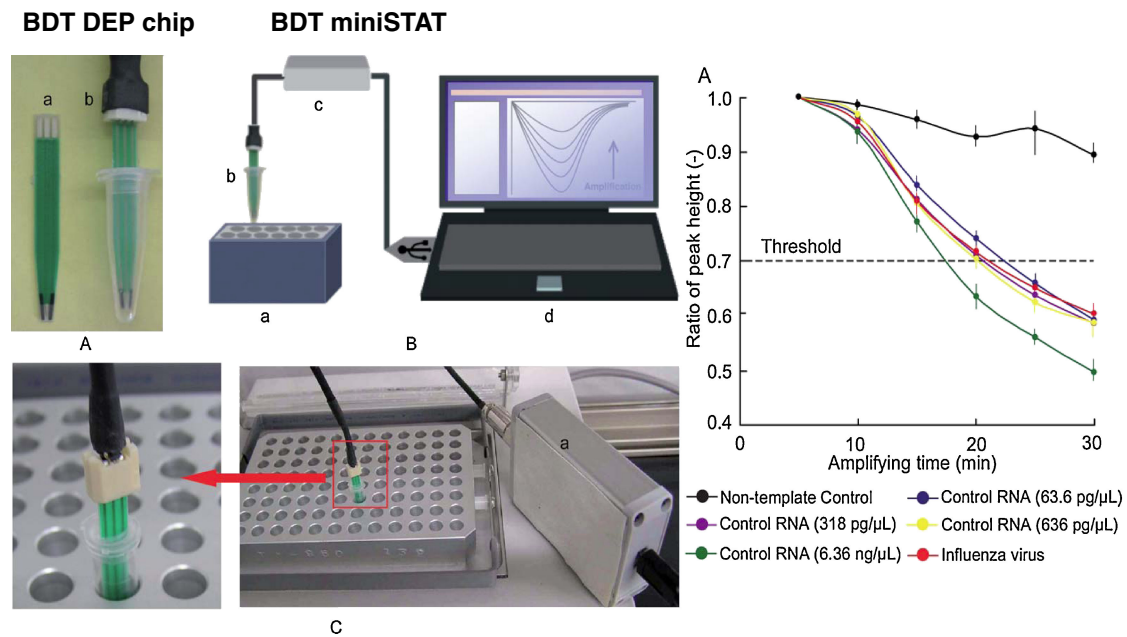


Figure 7. (Color online) 印刷電極内蔵した等温増幅法を用いたリアルタイム遺伝子診断。(インフルエンザウイルス)

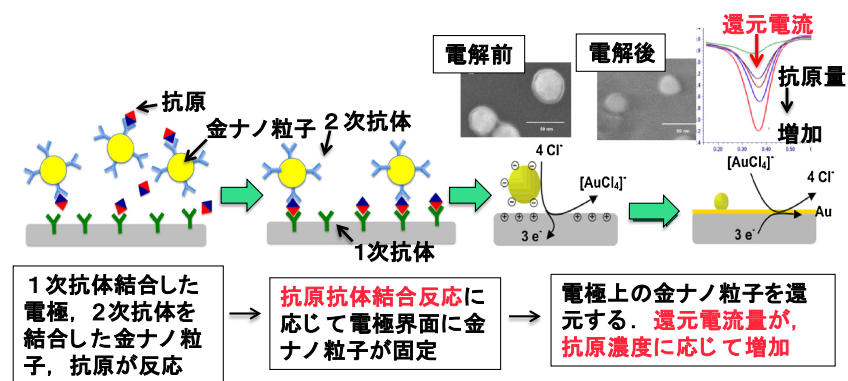
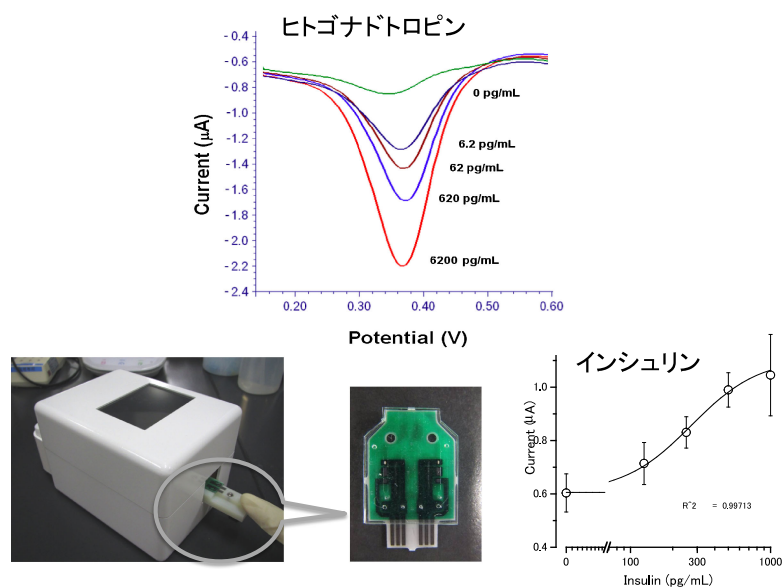


Figure 8. (Color online) Gold linked Electrochemical Immuno Assay (GLEIA) の原理.



$$\text{HOMA係数} = \text{血糖値 (mg/dL)} \times \text{インシュリン}(\mu\text{U/mL}) / 405$$

Figure 9. (Color online) GLEIA センサーを用いた例.

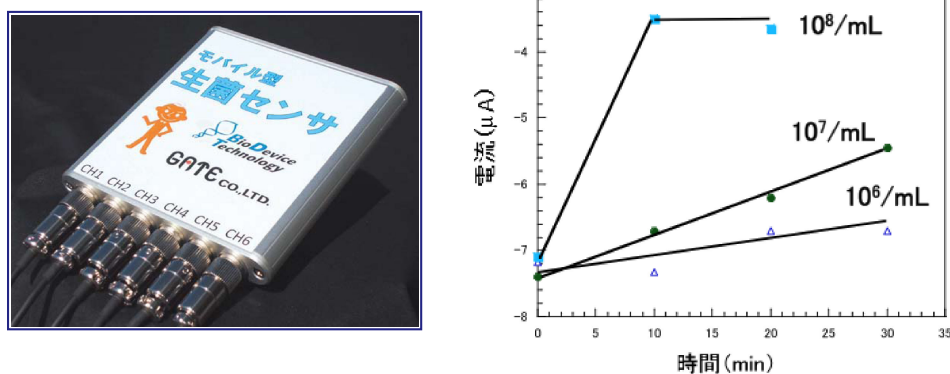


Figure 10. (Color online) 生菌数センサーと測定結果.

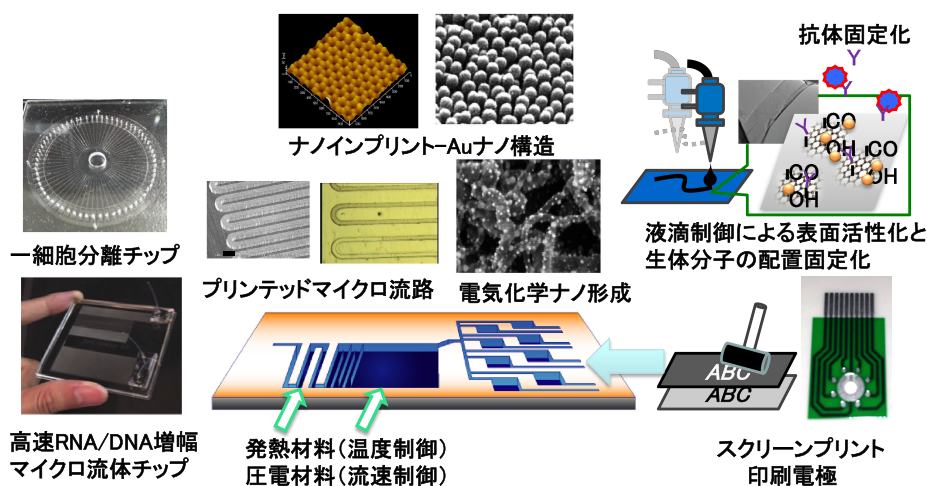


Figure 11. (Color online) ナノ・マイクロ統合型プリントバイオデバイスの実装例.

5. 印刷電極を用いたモバイル型生菌数センサー¹²⁻¹⁵

一般に食品検査等では一般生菌数の検査が行われている。これらの検査は平板培地に菌を塗布し、出現してきたコロニーをカウントする方法で菌数を推定している。しかし、この方法は菌の培養を基本とするため、結果が分かるまでに1–2日を要する。従って、生鮮食品などでは、検査結果が出荷後になるため、実際には検査の役目を果たしていないのが現状である。このようなことから、これらに代わる電気化学手法での一般生菌の検出を検討してきた。そこで筆者らが開発した携帯型の簡易電気化学センサーおよび小型印刷電極を用いて、迅速な生菌数の推定を検討した。生菌数の測定には大腸菌、*Escherichia coli* IFO 3301 (*E. coli* IFO 3301)を用いた。電気化学測定用の培地を用い、*E. coli* の濃度を 10^6 cell/mL 、 10^7 cell/mL 、 10^8 cell/mL に調整した。その後、それぞれの菌体濃度について、酸素（溶存酸素）の電位を測定した。電気化学測定には、携帯型の簡易電気化学センサー (BDTminiSTAT100) およびディスプレイの小型印刷電極（カーボン電極、DEP SP-P）を用いた。測定条件は、CV（電位掃引速度 50 mV/sec ）、電極への滴下サンプル量 $20 \mu\text{L}$ 、10分おきに電極を交換し測定した。まず、大腸菌を含まない溶液を用いてCV測定を行い、溶存酸素にもとづく還元電流を確認した。次に、各濃度の大腸菌溶液（ 10^6 cell/mL 、 10^7 cell/mL 、 10^8 cell/mL ）のCV測定を行ったところ、菌

数濃度に応じて溶存酸素の電流値の時間経過が異なった (Fig. 10)。特に、 10^7 cell/mL 以上では10分後から明らかな減少が見られた。その結果、生菌数に応じて溶存酸素濃度が早く消費されることが示された。今回用いた携帯型の簡易電気化学センサーは、軽量でかつPCに接続して各種現場でも簡便に測定可能であり、食品の安全を確保するための生菌数の迅速定量にも応用できることが示唆された。また、コンポストの微生物活性を測定するセンサーとしても応用可能である。

6. さいごに

以上、スクリーン印刷電極を用いたポータブル電気化学バイオセンサー、特に、遺伝子センサー、免疫センサー、微生物センサーの例を示した。いうまでもなく、プリンタブル技術は、特性の良いセンサーチップを安価に量産できるところに優位であるが、スクリーン印刷技術法により作製される各種センサーに測定試料を導入し、これらに適正な前処理を行なうためのマイクロ流体チップ技術との連携も不可欠である。Figure 11にはナノとマイクロを統合したプリンタブルなバイオセンサーの実装事例を示した。特に今回示したようなモバイルバイオセンサーは、POCT (Point of Care Testing) 用として各種現場や在宅など今までにない新たな製品開発や市場開拓につながるものとして期待している。

文 献

1. N. Nagatani, K. Yamanaka, M. Saito, R. Koketsu, T. Sasaki, K. Ikuta, T. Miyahara, and E. Tamiya, *Analyst*, **136**, 5143 (2011).
2. K. Yamanaka, M. Saito, K. Kondoh, M. M. Hossain, R. Koketsu, T. Sasaki, N. Nagatani, K. Ikuta, and E. Tamiya, *Analyst*, **136**, 2064 (2011).
3. M. Kobayashi, T. Kusakawa, M. Saito, S. Kaji, M. Oomura, S. Iwabuchi, Y. Morita, Q. Hasan, and E. Tamiya, *Electrochem. Commun.*, **6**, 337 (2004).
4. K. Yamanaka, T. Ikeuchi, M. Saito, N. Nagatani, and E. Tamiya, *Electrochim. Acta*, **82**, 132 (2012).
5. M. U. Ahmed, Q. Hasan, M. M. Hossain, M. Saito, and E. Tamiya, *Food Control*, **21**(5), 599 (2010).
6. M. U. Ahmed, M. Saito, M. M. Hossain, S. R. Rao, S. Furui, A. Hino, Y. Takamura, M. Takagi, and E. Tamiya, *Analyst*, **134**, 966 (2009).
7. M. U. Ahmed, K. Idegami, M. Chikae, K. Kerman, P. Chaumplik, S. Yamamura, and E. Tamiya, *Analyst*, **132**, 431 (2007).
8. K. Idegami, M. Chikae, K. Kerman, N. Nagatani, T. Yuhi, T. Endo, and E. Tamiya, *Electroanalysis*, **20**, 14 (2008).
9. M. Chikae, K. Idegami, N. Nagatani, E. Tamiya, and Y. Takamura, *Electrochemistry*, **78**, 748 (2010).
10. T. T. Lien, N. X. Viet, M. Chikae, Y. Ukita, and Y. Takamura, *J. Biosens & Bioelectron.*, **2**, 1000107 (2011).
11. M. Saito, M. Kitsunai, M. U. Ahmed, S. Sugiyama, and E. Tamiya, *Electrochemistry*, **76**, 606 (2008).
12. K. Yamanaka, T. Ikeuchi, M. Saito, N. Nagatani, and E. Tamiya, *Electrochim. Acta*, **82**, 132 (2012).
13. M. Chikae, K. Kerman, N. Nagatani, Y. Takamura, and E. Tamiya, *Anal. Chim. Acta*, **581**, 364 (2007).
14. M. Chikae, R. Ikeda, K. Kerman, Y. Morita, and E. Tamiya, *Bioresour. Technol.*, **97**, 1979 (2006).
15. J. Ishii, M. Chikae, M. Toyoshima, Y. Ukita, Y. Miura, and Y. Takamura, *Electrochem. Commun.*, **13**, 830 (2011).



民谷 栄一（大阪大学大学院工学系研究科精密科学応用物理学専攻・教授）

1985年東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了（工学博士）。東京工業大学資源科学研究所助手，講師を経て1988年より東京大学先端科学技術研究センター助教授。1993年北陸先端科学技術大学院大学教授。2007年より現職。1989年日本化学会進歩賞，2005年市村学術貢献賞，2010年文部科学大臣発明奨励賞など受賞。専門分野：バイオセンサー，ナノバイオテクノロジー，細胞工学など。趣味：映画鑑賞，ドライブなど。