

平成22年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「メタボリックシンドローム予防・管理のための
血糖値・インスリン同時測定デバイスの開発」

研究開発成果等報告書概要版

平成23年 9月

委託者 中部経済産業局
委託先 財団法人石川県産業創出支援機構

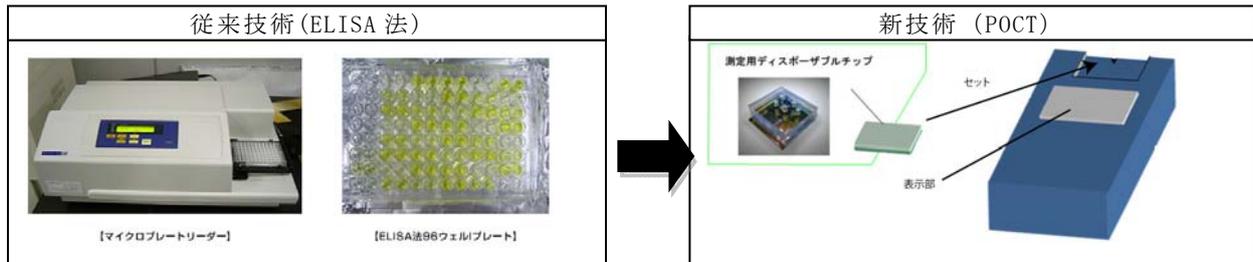
この報告書には、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報(未出願又は未公開の産業財産権等又は未公開論文)、ノウハウ等の秘匿情報が含まれているので、通例の取扱いにおいて非公開とする。ただし、行政機関の保有する情報の公開に関する法律(平成11年法律第42号)に基づく情報開示請求の対象の文書となります。

目次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	3
1-3 成果概要	6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	6
第2章 本論	7
2-1 小型測定装置のハードウェアの設計と製造	7
2-2 小型化を実現するための機構の開発	8
2-3 検査の自動化のためのソフトウェアの作成	11
2-4 適用サンプルとセンサ電極に関する検討	12
2-5 バイオセンサの最適化と保存安定性の検討	14
2-6 センサチップの設計と試作	16
2-7 センサチップの評価	23
2-8 試作機で測定されるデータの臨床的意義の評価	25
最終章 全体総括	25

第1章 研究開発の概要

世界中で増加しているメタボリック症候群の発症には、インスリン抵抗性が大きく関与しており、血中インスリン濃度の頻繁なモニタリングが重要であり、在宅での自己検査が理想的であるが、その血中濃度は非常に低く、これを測定できるPOCT機器(ベッドサイドや在宅で測定可能な小型機器)は現在無いため、検査機関でのみ測定が可能となっている。一方、検査機器市場では、ベッドサイドや在宅で測定可能なPOCT機器の伸長が著しく、今後現場からのニーズが高まる事が予想されるため、低濃度のインスリンマーカーを測定できる小型簡便迅速測定可能なPOCT機器の開発を目指す。



既存技術の現状	研究開発目標
測定には大型で高額な装置が必要。	機器が小型で可搬性が高く、安価。
操作が煩雑で専門知識が必要。	電極を組み込んだ μ TAS技術を使ったセンサチップにより、誰でも測定可能。
測定には数時間かかる。	30分以内に測定完了。
コスト面から、少数の検体には対応が難しく、検査機関向け。	個々の測定向けのためベッドサイドや在宅で使用出来る。
HOMA-R 指数算出に必要な血糖値とインスリンの測定にはそれぞれ装置が必要。	一台の装置で2種類の異なるモードによりほぼ同時に測定し、その結果を演算しHOMA-R 指数を算出できる。
試料の必要量が mL オーダーで必要。	試料の必要量は μ L オーダー。

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

特定ものづくり基盤技術高度化指針のうち、以下の項目に対応。

(三) 電子部品・デバイスの実装に係る技術に関する事項

1. 電子部品・デバイスの実装に係る技術において達成すべき高度化目標

(4) バイオテクノロジー・医療に関する事項

(1) 研究の背景

川下製造業者の抱える課題及び要請(ニーズ)として実装プロセス技術の多様化がある。今回対象としている臨床検査機器の国内市場は血液分析装置だけで約600億円であり、ほぼ頭打ちの状態である。一方、在宅で使用されている血糖値測定機はその消耗品も含めて約700億円と推定されており、POCT 機器市場は更に伸長を続けている。従って川下業者は、新規 POCT 機器の開発を期待している。また、現在世界中で増え続けているメタボリック症候群やその予備群を対象として、その生活習慣を改善し、疾病の進行を防止するための新たなモニタリング機器が医療関係者や健康に対する意識の高いユーザーから求められている。これらのニーズに合致する機器の1つとしてHOMA-R 指数測定機器が挙げられる。その普及のためには、装置の小型化、取扱の簡便化、測定の迅速化、装置及びセンサチップの低コスト化及び高感度化が必要である。

(2) 研究目的及び目標

世界的な健康志向の高まりから、診断機器分野ではPOCT 機器(ベッドサイドや在宅で測定可能な小型機器)の市場が拡大しており、低濃度のマーカー(指標)測定可能な小型で自動化された簡便な装置が必要とされている。今回 POCT 機器として大きな潜在ニーズのあるメタボリックシンドロームの指標である HOMA-R 指数の測定用小型測定装置を開発することを目的に、 μ TAS 技術や各種部品の実装技術を高度化し、微量血液サンプル中のマーカーを簡便迅速に測定する技術を確立する。すなわち、異なる種類のバイオセンサでほぼ同時に測定し、結果を演算して HOMA-R 指数を表示する装置の小型軽量化、低価格化すると共に、これに使用するバイオセンサを組み込んだセンサチップを低コストで生産する技術の開発を目指す。

開発する小型電気化学測定装置の性能目標は、下記の通り。

測定方法 … differential pulse voltammetry および amperometry

演算機能 … 血糖値とインスリン濃度の測定結果を用いて HOMA-R 指数算出

検査精度 … 目標:測定値の精度 CV% 5%以内

検査時間 … 目標:30 分以内(適用から結果算出まで)

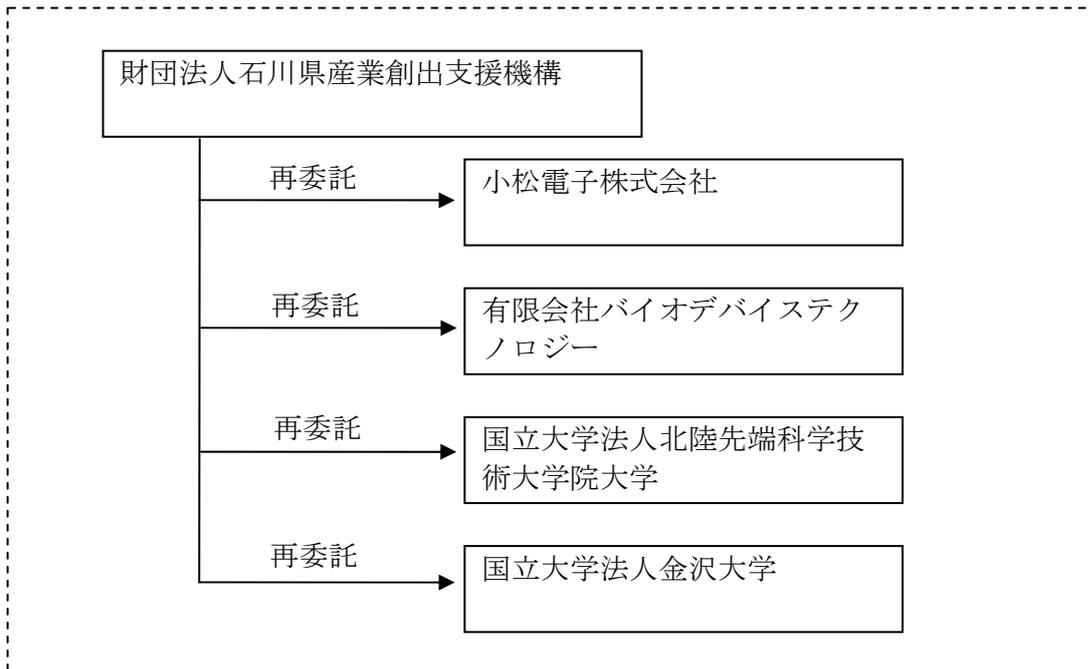
可搬性 … サイズ最大 W150mm × D100mm × H50mm

チップ駆動用マイクロポンプを組み込み、その制御を行う。

また、センサチップの性能目標は、全血 10 μ L をサンプル適用部分に落とすだけで測定出来、その際の抗原抗体反応は 10 分以内に終了する事、および、抗体及び酵素をそれぞれ固定化したバイオセンサ電極を組み込み、冷蔵で半年以上安定に使用出来ることである。

1-2 研究体制

1) 研究組織(全体)



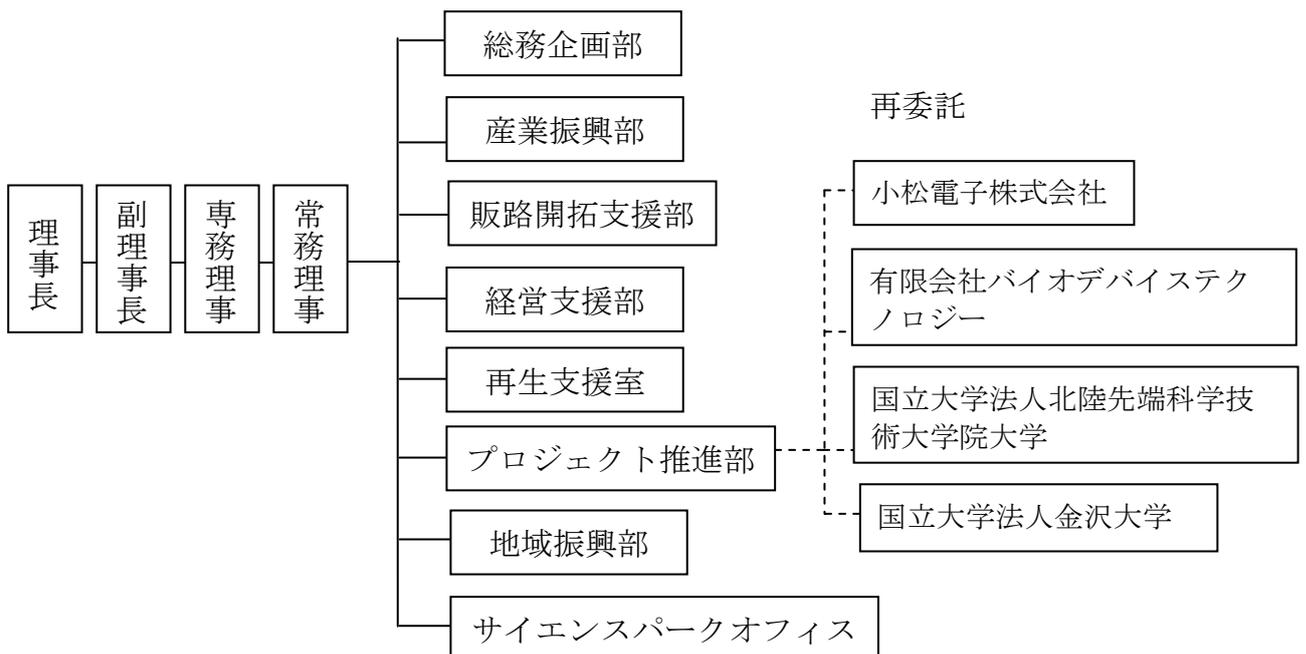
総括研究代表者 (PL)
小松電子株式会社
商品部 メディカルデバイス課
課長 福村 康和

副総括研究代表者 (SL)
国立大学法人北陸先端科学技術
大学院大学
教授 高村 禪

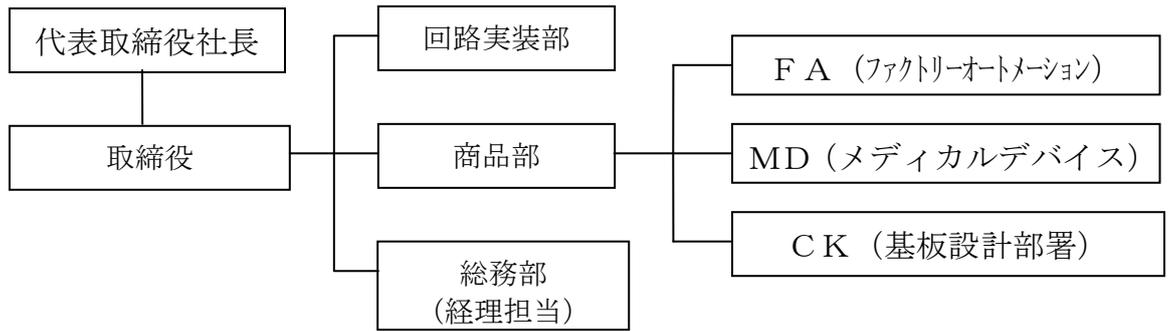
2) 管理体制

① 事業管理者

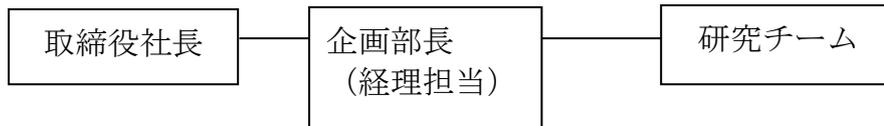
財団法人石川県産業創出支援機構



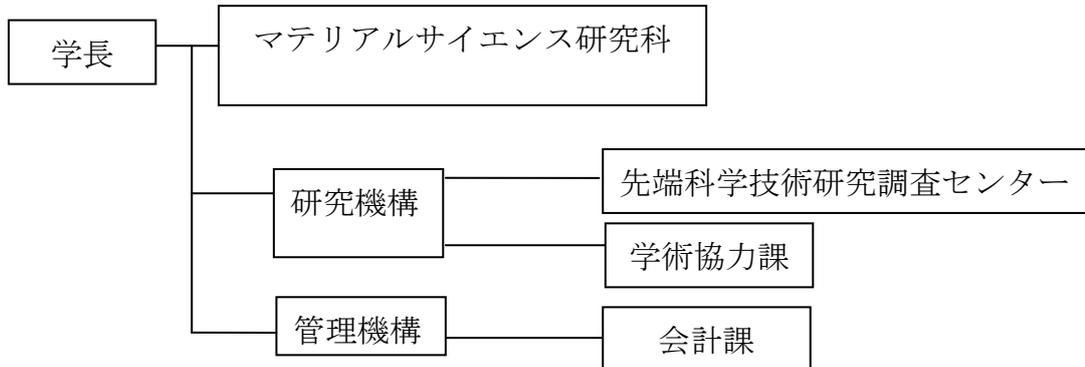
② 再委託先
小松電子株式会社



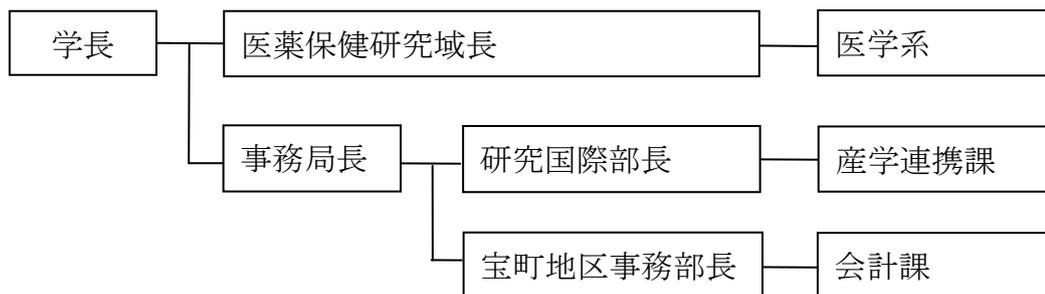
有限会社バイオデバイステクノロジー



国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学



国立大学法人金沢大学



3) 研究員氏名

小松電子株式会社

氏名	所属・役職
吉田 哲郎	常務取締役
福村 康和	商品部 MD 課長
北出 由之	商品部 MD 技師
林 哲	商品部 MD 技師
牧野 哲治	商品部 MD 主任
宮野 康	商品部 MD 班長
春木 祐二	商品部 MD 班長
越中屋 玲	商品部 CK 班長
田中 秀一	商品部 MD 班長
濱高 了	商品部 MD 一般
ヤン ミンルイ	商品部 MD 一般

有限会社バイオデバイステクノロジー

氏名	所属・役職
牛島 ひろみ	企画部長
由比 光子	研究チーム 主任研究員
角谷 悦子	研究チーム 研究補助員
森田 亜有	研究チーム 研究補助員

国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学

氏名	所属・役職
高村 禅	マテリアルサイエンス研究科・教授
浮田 芳昭	マテリアルサイエンス研究科・助教
服部 真周	マテリアルサイエンス研究科・研究員
近江 みゆき	マテリアルサイエンス研究科・研究員

国立大学法人金沢大学

氏名	所属・役職
篁 俊成	医薬保健研究域医学系・准教授
竹下 有美枝	医薬保健研究域医学系・助教

4) アドバイザー

田中貴金属工業株式会社

技術開発部門 メディカル部 渡邊 洋

1-3 成果概要

小型電気化学測定装置としては、それぞれ電気化学測定である、DPV (differential pulse voltammetry : 電気化学的測定法の一つで、電圧の変化に対して流れる電流を測定するボルタンメトリーに属する微分パルスボルタンメトリーという方法。) および CA (amperometry : ボルタンメトリーの一つ。電極に一定電位を印加した状態で、流れる電流を測る方法。) を実現し、全血の測定を実施し、血糖値とインスリン濃度の測定結果を用いてメタボリックシンドロームの指標である HOMA-R 指数を算出出来た。しかし、測定精度に関しては、現在、検量線の作成中であり、定量的評価の課題が残った。

また、検査時間に関しては、血液適用から結果算出まで、約30分の目標に対し、マイクロ流路を用いる事により、約15分程度で完了する事が可能な目処が立った。

さらに、可搬性に関しては、目標サイズ、最大 幅 150mm×奥行き 100mm×高さ 50mm に対し、幅 150mm (容器含まず) mm×奥行き 113mm×高さ 105mm を実現し、目標値は超えたものの手のひらサイズの測定機器を実現した。これらは、チップ内のマイクロ流路の組込により、さらに小型化出来る目処もあり、今後の課題として残った。

また、センサチップにおいては、前処理をしない全血 10 μ L 以下での測定が可能であることを明らかにした。センサ作成に際して、抗体とサンプル、標識抗体量などの適切な量および反応時間や酸化処理時間を決定した。また、糖コーティングや温度、吸湿など保存安定性に影響する要因を明らかにできたが、4 週間を超えた長期的な保存安定性の検討はできなかった。カーボン印刷電極 (DEP-Chip) に加えて HOMA-R 指数測定用チップのための電極 (INS-1) を新たに作成することができ、いずれの電極でもインスリンセンサと血糖値センサを作成できた。いずれもバッファーに溶解した標準物質による検量線が作成でき、インスリンや血糖値のモデル系での測定が可能であることを確認した。しかし、INS-1 では血清に溶解した標準物質による検量線は値が小さすぎて作成できなかった。ただし、これはマイクロ流路技術を活用することで解決できる見通しが立っている。また、INS-1 とマイクロ流路を組み合わせることで HOMA-R 測定装置試作機が動作することを確認できたが、これらを用いた検量線作成及び実サンプルによる十分な検討は今後の課題として残った。

上記のとおり、測定精度に今後の改善の余地があるものの、本事業の当初の目標である、迅速に血糖値とインスリン値の同時測定できるベッドサイドや家庭でも使用できるコンパクトな装置の試作・開発を行うことができた。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

財団法人石川県産業創出支援機構

役職・氏名 プロジェクト推進部長 西村 聡

電話: 076-267-6291 FAX: 076-268-1322

E-mail: s-nisimu@isico.or.jp

第2章 本論

研究開発の実施内容に従う、研究成果の詳細は以下の通りである。

2-1. 小型測定装置のハードウェアの設計と製造 (研究実施番号 ①)

小型化の為の機能の統合の為、内容機能を統合し専用デバイスを開発した。開発したデバイスの概要は、表①-1 に示す。

項目	内容
採用デバイス	Stellarisシリーズ(TI製)のデバイス採用
OS	Stellaris Ware(ミドルウェア部使用)
GUI	カラー液晶タッチパネル、タッチインターフェイス
電気化学測定	・DPV(インスリン測定)、CA(血糖値)の同時測定 ・微小電流の測定回路の開発 ・回路シミュレーションにより設計の効率化 ・測定波形を専用デバイスで自動判別
メモリーカード	SDメモリーカードによるデータ保存、ファームウェアのバージョンアップに対応
USB	・PC接続でのパラメーター設定 ・クラウドへのコネクション
通信機能	・LAN、Bluetooth はコネクター対応 ・機能の実装は今後の課題

表①-1 デバイスの機能統合

また、小型の為のプリント基板では、次ぎの要素を投入し実現した。製作した基板の概要を表①-2 に示し、製作した基板は図①に示す。

項目	内容
高密度実装	0603チップ(0.6mm×0.3mm)のチップ採用
基板サイズ	140mm×105mm×1.6mm
工法	4層基板 両面リフロー基板
パターンサイズ	90 μ m パターン幅
設計手法	CAD によるシミュレーション、開発
デバイスの小型化	さらに小型化を目指した、部品点数削減の為の FPGA の開発は、課題として残った。

表①-2 基板の概要



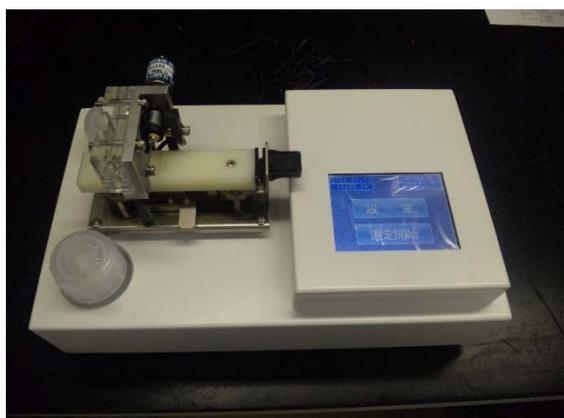
図①-1 今回開発の基板

2-2. 小型化を実現するための機構の開発 (研究実施番号 ②)

2-2-1 センサチップ装着での自動測定の実現

小型化実現の為の新機構を考案し、センサチップ装着から自動測定可能とする。また、筐体部に関しては、物理的評価を行い、ハンディ型を考慮した、重量バランス、耐振動・衝撃かつ屋外使用に耐えうる素材選定を行い小型化を実現する。筐体の目標サイズは幅150mm×奥行き100mm×高さ50mm以下、重さ1 Kg以下である。

本研究期間では、測定器試作器、及び臨床評価用試作器として2回の試作を行った。1次試作としてHOMA-R測定器試作機を図②-1に、2次試作としてHOMA-R臨床評価用試作器を図②-2に示す。



外観サイズ…
幅275mm×奥行き170mm×高さ150mm

重さ…約3 Kg

図②-1 HOMA-R 測定器試作器(1次試作)



図②-2 HOMA-R 臨床評価用試作器(2次試作)

外観サイズ… 幅115mm×奥行き150mm×高さ105mm

また、製品化実現のため、開発した HOMA-R 臨床評価用試作器の信頼性を確認する次の試験を行った。試験結果を表②-1 に示す。

評価項目	判定
1) 製品静電気放電試験	OK
2) 製品絶縁耐力試験	OK
3) 製品漏洩電流試験	OK
4) 耐環境(低・高温連続動作)試験	OK
5) 製品空間輻射試験	OK
6) 製品雑音端子電圧試験	OK
7) 製品ファーストトランジエントバースト試験	OK
8) 製品放射性無線周波数電磁界試験	OK

表②-1 HOMA-R 臨床用評価器 信頼性試験結果

2-2-2 マイクロポンプでの試料の取り込み機構の開発

センサチップからの試薬の取り込みの為、本体機構にマイクロポンプを搭載する。これは、センサチップのマイクロ流路の機構と連動し開発する。

検討を実施した内容の結果は次の通りである。

検討1…毛管力による PDMS 製マイクロ流路内へのサンプル導入の検討

【実験目的】

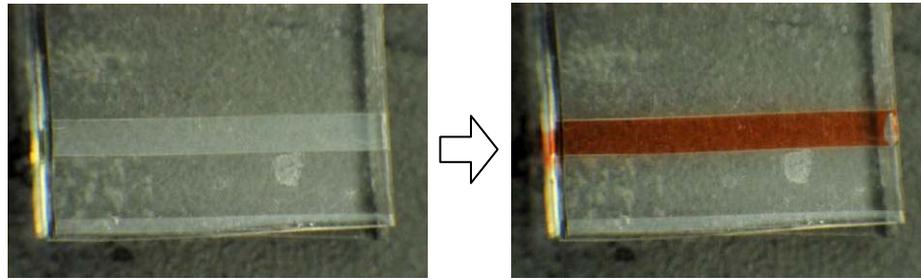
マイクロ流路の材質である PDMS (polydimethylsiloxane) は疎水性であるため、何ら処理をしない状態での毛管力によるサンプルの導入は難しい。今回表面親水化法を新たに確立したため、本法の毛管力導入への有効性を示す。

【実験方法】

マイクロ流路(幅 1 mm、深さ 150 μ m)が形成された PDMS を作製した。この PDMS の流路側の表面を親水化した。これを表面処理されていない PDMS にはりつけ、PDMS の側面から水がはいりようマイクロ流路の端を切断し、PDMS チップを作製した。顕微鏡で PDMS チップの側面に流路の穴が開いているのを確認し、流路の片側から着色水(赤)を接触させ、どのように色水が流路に入っていくのかを確認した。比較のため、親水化していないマイクロ流路でも同様の実験を行った。

【実験結果】

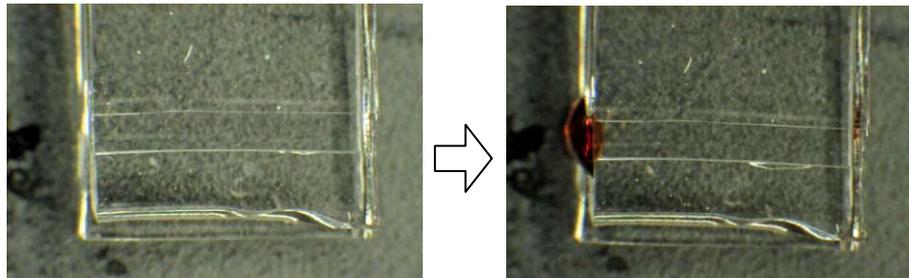
直線のマイクロ流路を親水化し、どのようにサンプルが入っていくのかを確認した。その結果、親水化されたマイクロ流路にサンプル(着色水)を接触させると直ちに導入されることを確認した(図②-3(a))。これに対し、親水化されていないマイクロ流路では、サンプルを接触させ時間が経過すると少量ずつ導入されるものの流路内をサンプルで満たすことはできなかった(図②-3(b))。これらの結果より、マイクロ流路内の親水化が毛管力によるサンプルの導入機構の実現に有効であることが示された。



サンプル導入前

サンプル導入後

図②-3(a) 親水化処理あり



サンプル導入前

サンプル導入後

図②-3 (b) 親水化処理なし

検討2…デバイス動作検討

(毛管力により導入したサンプルのダイヤフラムポンプによる送液及び、洗浄液注入と希塩酸注入操作)

【実験目的】

毛管力によりサンプルを一定量導入する。この状態からのダイヤフラムポンプによるサンプル送液動作が可能であるかを検討した。

【実験方法】

試薬吸引口、ダイヤフラムポンプ、洗浄液を注入流路及び、希塩酸注入流路を接続した流路構造を作製し、検討を行った。SU-8製の鋳型を作製し、鋳型を用いて、PDMS流路の作製を行った。始めにPDMS主剤と架橋剤を10:1の割合で混合し、混合の際に生成された混液の気泡を脱気した。脱気を行ったPDMS混液を、鋳型内に流し込んだ。PDMSが硬化されたことを確認後、鋳型からPDMSをはがし、PDMS流路を完成させた。空気層の流路が形成されたPDMS基板の空気圧制御装置とつなげる部分に注射針で貫通孔を1か所開けた。次に、PDMS製の中間膜の作製を行った。空気層が形成されたPDMS基板と中間膜にプラズマ処理を行い接合し、中間膜と接着したPDMS基板をはがした。そして、流路層の流路入口の上部にくる部分を注射針で貫通孔を4か所開けた。次に、流路層が転写されたPDMS基板に親水化処理を行った。空気層と流路層のPDMS基板どうしを貼り合わせ、PDMSチップを完成させた。PDMSチップの上部をカッターの刃などで切断し、流路の吸い込み口が露出させ、PDMSチップを完成させた。

作製したPDMSチップを用いて、ダイヤフラムポンプの動作テストを行った。ダイヤフラムポンプと直結している流路を空圧制御装置に繋げて、加圧と減圧ができるようセッティングを行った。圧をかけていない状態で、溶液吸い込み口に溶液を充填した。充填後、空圧制御装置を用いて加圧、減圧を繰り返した。

流路の吸い込み口付近に溶液(赤の色水)を接触させ、流路内に充填した。空圧装置に

より、ダイヤフラムポンプを動作させ、溶液を送液した。その後、マイクロシリンジポンプを用いて下の流路側から溶液を送液した。

【実験結果】

溶液充填後ダイヤフラムポンプを動作させることによって溶液の移動を確認することができた。空気抜き孔からの空気の逆流が研念されたがそのような現象は確認されなかった。

さらに、洗浄液注入流路より洗浄液(生理食塩水)を注入した結果、正常に洗浄液が注入されることを確認した。

2-3. 検査の自動化のためのソフトウェアの作成 (研究実施番号 ③)

2-3-1 GUIインターフェースによる簡便な操作の実現

QVGAでの液晶タッチパネルを搭載し、次の機能を実現した。

- ・ 4名分のパラメタを保持
⇒使用者(ユーザー)をメニューで選択
 - ・ “開始”ボタンでスタート
 - ・ カレンダー機能内蔵
 - ・ 操作ガイド
⇒吸収パッドの取付、チップ取付などの手順を画面上に表示
- 作成した操作画面を図③-1に示す

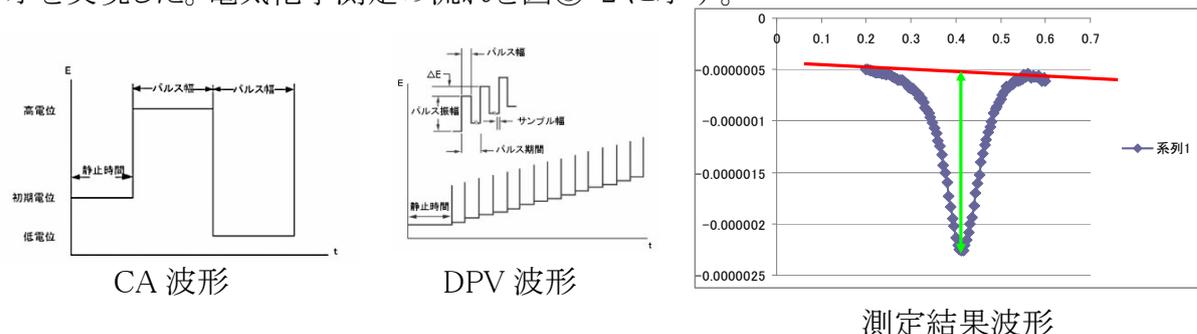


図③-1 操作画面

2-3-2 測定結果の演算を行うためのアルゴリズムの開発を行う。

回路シミュレーションにより設計の効率化を図り、インスリン値測定のためのDPV測定と、血糖値測定のためのCA測定の同時測定を実現した。

取得した波形により、専用デバイス上の組込ソフトウェアで解析し、画面への結果表示を実現した。電気化学測定の流れを図③-2に示す。



図③-2 電気化学測定の流れ

2-4. 適用サンプルとセンサ電極に関する検討（研究実施番号 ④）

2-4-1 センサ電極に関する検討

本開発装置で使用するセンサは血中インスリン濃度と血糖値を測定するためのものである。血糖値センサはバイオセンサ市場で最も多く販売されているもので、すでに確立されているため、その手法を参考にグルコースデヒドロゲナーゼを用いて作成した。

電極表面上にインスリンに対する一次抗体と金コロイド標識抗体を固定化し、サンプルを適用、抗原抗体反応を行ったのち、洗浄し、表面にインスリンを介して結合した金コロイドの量を電気化学的に定量することでインスリン濃度を定量できる。

図④-2
開発チップ

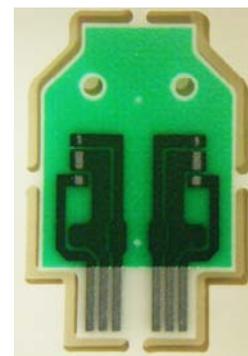
本開発では、センサ電極として、カーボン印刷電極 (DEP-Chip EP-P) と、新たに開発したカーボン印刷電極 (INS-1) を使用し、以降のセンサの最適化や流路評価を行った。

DEP-Chip EP-P は図④-1の通り。



図④-1 DEP-Chip

INS-1 は血糖値センサとインスリンセンサを1枚の上のにせるため2つの電極と、流路と組み合わせて使用した場合に廃液を排出するための穴を配置した。何種類かの検討を経て、最終的に作成された電極は切手大のサイズで、形状は図④-2の通りである。



2-4-2 適用サンプル(全血での測定)

DEP-Chip では、1.4 - 2 μ L のサンプルで測定が可能であった。全血の場合は、その約50%が血球などの固形成分のため、サンプル量としては適用した全血の約半分となる。

DEP-Chip を用いて全血 2 μ L 中のインスリン濃度を予備的に測定したところ、標準品のインスリンをバッファーに溶解して作成した検量線では、血液中の値が低く見積もられることが示されたが、食前は低く、食後に高くなるというパターンは検出され、2 μ L の全血で十分に測定可能であることが示された。

	電流値 (μ A)	換算値 (ng/mL)
食前	0.142	0.031
食後 30 分	0.268	0.308
食後 2 時間	0.278	0.329

表④-1 DEP-Chip でのインスリン測定

INS-1 はインスリン溶液や血清をサンプルとした場合、1 μ L 以下で測定可能であった。

以上の結果から、全血を前処理無しで10 μ L 以下の量で測定することは十分に可能であることが示された。

また、マイクロ流路と DEP-Chip を組み合わせて全血中のインスリンを検出できるか予備的に検討した。

【実験目的】

マイクロ流路を用いた全血の送液及び、測定に関する知見を取得する為に、既存の印刷電

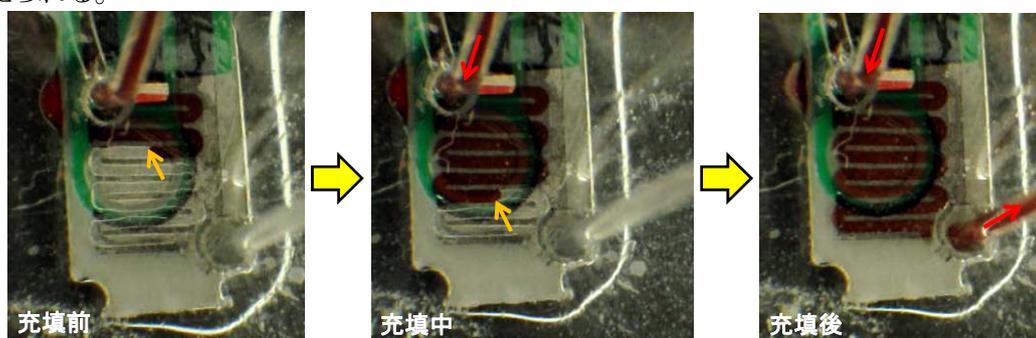
極上にマイクロ流路を実装し、この中に全血サンプルを注入し、抗原抗体反応を行う。最後に DPV 測定により反応の結果を評価する。

【実験方法】

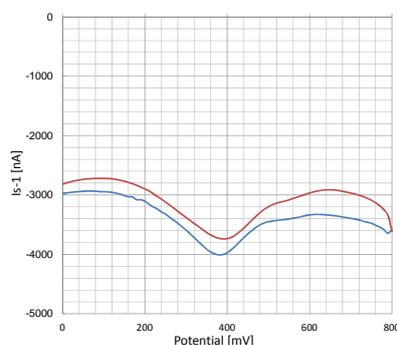
全血をサンプルとし、マイクロ流路を形成した PDMS チップを用いて DEP チップの作用電極上で抗原抗体反応を行い、電気化学測定を行った。マイクロ流路を形成した PDMS チップ (厚さ 3 mm) の作製を行った。マイクロ流路の両末端に注射針で貫通穴をあけ、そこにチューブを差し込んだ。この PDMS チップをアクリル製ホルダーに取り付け、マイクロ流路と印刷電極 (DEP チップ) の作用電極が重なるように位置合わせを行い、ホルダーで固定した。マイクロシリンジ内を PBS で満たし、マイクロ流路の入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。指をランセットによって穿刺し、ピペットで全血を 5 μL 採取し、金コロイド標識 2 次抗体 2 μL と混ぜサンプルを調製した。チューブでサンプル溶液 4 μL を吸引し PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡観察下で 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速さでサンプル溶液を注入した。サンプル溶液が作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 15 分後にポンプを停止した。サンプル注入後、ホルダーおよび PDMS チップをとりはずし、PBS を用いて DEP チップの洗浄を行った。DEP チップの作用電極上に塩酸 1.4 μL を滴下して、電気化学測定 (DPV 法) を行った。

【実験結果】

マイクロ流路を形成した PDMS チップを用いて全血の注入を行った。全血をマイクロ流路内に充填する前と充填中、充填後の写真を図④-3 に示す。充填前に多少マイクロ流路内に全血が入り込んでしまったが、その後マイクロ流路内に円滑に注入することができ、作用電極表面全体を濡らしたことを確認できた。また抗原抗体反応後、電気化学測定を行った結果を図④-4 に示す。値は低いですがピークらしきものを確認できたことから抗原抗体反応ができたのではないかと考えられる。



図④-3 マイクロ流路に全血サンプルを送液する様子



図④-4 全血サンプルの DPV 測定結果

※注釈

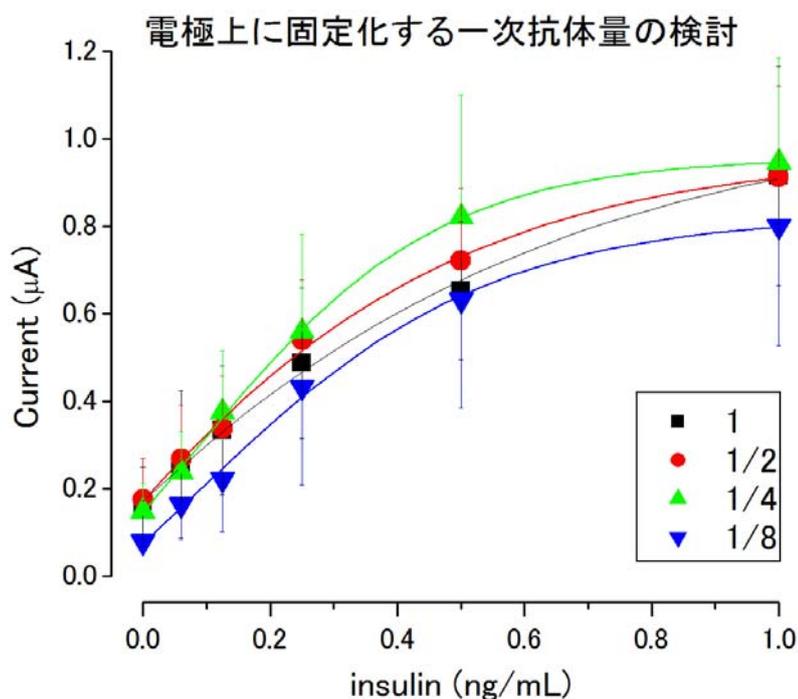
電気化学測定（DPV 法）を行う際、1 度目の測定結果を青線、直後に酸化処理をせず再び測定した結果を赤線に示す。

2-5. バイオセンサの最適化と保存安定性の検討（研究実施番号 ⑤）

2-5-1 バイオセンサの最適化

INS-1 や流路チップの作成までの間に、センサの評価基準を確立するために、DEP-Chip を用いたインスリンセンサ測定条件の最適化を検討した。

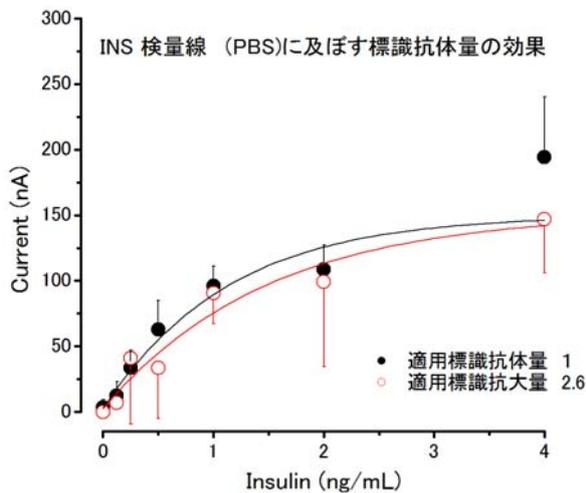
本測定法で最もコストに影響を及ぼすのは抗体の量であるため、どこまで減らすことができるかについて検討した。電極上に固定化する一次抗体量について従来使用してきた量を1として、1/8 量まで順次減らしたところ、1/4 までは結果にほとんど影響せず、1/8 で全体に若干ではあるが測定結果が有意に減少した(図⑤-1)。従って、使用する抗体量は安全を見込み、また保存安定性を維持するために今後 1/2 量とすることにした。



図⑤-1 1 次抗体の検討

その他、抗原抗体反応の条件について各種検討し、決定した。

INS-1 については金コロイド標識抗体のサンプルに対する適用量を検討した。バッファーにインスリンを溶解した標準液による検量線では標識抗体量を増やしてもほとんど影響が認められなかった(図⑤-2)。



図⑤-2 INS 検量線

しかし、コントロール血清(市販品、10人分の血清の混合物)に既知濃度のインスリンを添加し測定した結果、標識抗体量が多い方がより高い値で測定できた。従って、2-4-2で示したように標準液に比べて全血や血清中のインスリン濃度の測定値は低くなるが、標識抗体量を多くすることで改善できると考えられる。

血糖値センサについては、固定化する酵素濃度及び量、メディエーターの量について条件を様々に振って、0 mg/mLと 2 mg/mL のグルコースについて測定し、安定して測定可能な条件を決定した。

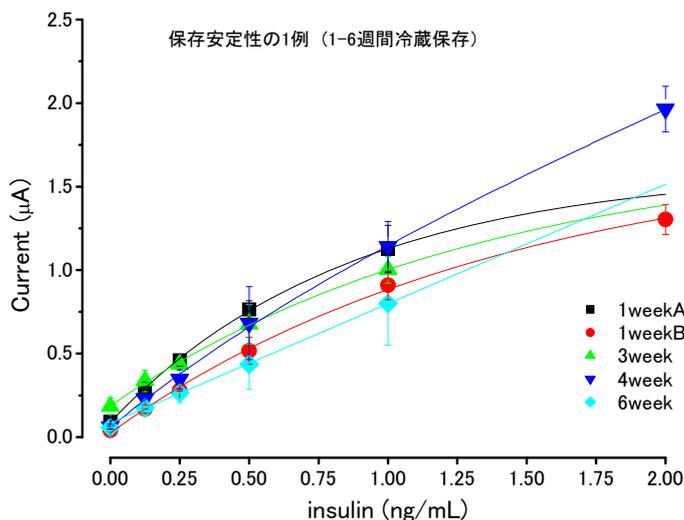
なお、メディエーターについては、当初フェリシアン化カリウムを使用したが、値が安定しないため、文献を調査し、近年頻繁に使用されているフェロセンカルボン酸を試したところ、比較的安定して測定できたため、本開発ではメディエーターはフェロセンカルボン酸を使用することにした。

2-5-2 保存安定性

DEP-Chip で作成した血糖値センサとインスリンセンサについて、保存安定性を検討した。

血糖値センサについては、酵素が数日で失活する現象が認められたが、高分子ゲルを基剤として酵素を電極上に配置することで2週間以上活性が保たれ、安定性が高まることが示された。また、将来的に電極作成と同様の手法で、スクリーン印刷によりグルコースデヒドロゲナーゼ及びメディエーターを含む水溶性高分子ゲル(ペースト)を印刷して酵素固定化電極を作成する可能性について検討し、印刷が可能であることを確認した。しかし、非常に薄い層として印刷されるため、酵素量を十分乗せることが難しく、版について工夫が必要であった。大量生産に対応するためには、さらなる検討を要する。

インスリンセンサについて予備的に実施した保存安定性実験では、冷蔵で6週間は活性が維持されていた(図⑤-3)。室温や冷蔵保存について各種作成条件で検討したところ、室温でも比較的活性が維持されることが分かったものの、冷蔵保存の方がインスリンに対する感度をより長く維持することが示された。



図⑤-3 保存安定性

2-6. センサチップの設計と試作 (研究実施番号 ⑥)

北陸先端科学技術大学院大学が保有するマイクロ流路技術を用いて、センサチップ上にサンプルと洗浄液を供給する機構を作りこみ、センサ電極と一体化することで、センシングに必要な溶液操作を自動化する。また、サンプル溶液をセンサ表面に流しながら接触させることにより、センシングに必要な時間の短縮も図る。プロトタイプに相当するものは既にあり、流路の幅や、流速、サンプル量、洗浄液量を、本測定項目にあわせて最適化する。血液をチップのサンプル適用部分に落とすだけで測定でき、その際センサ部分での抗原抗体反応を10分以内に終了できるようにポンプにより反応液を攪拌できる設計であることが目標。

上記の実証の為に以下の検討を行う。

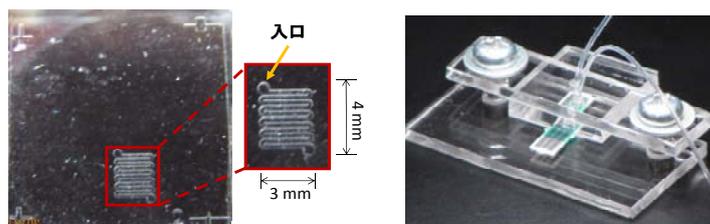
検討1…マイクロ流路を実装した印刷電極内での抗原抗体反応の検討

【実験目的①】

マイクロ流路を既存の印刷電極上に実装し、抗原抗体反応をマイクロ流路内で行う影響を知見として得ることを目的とした。

【実験方法①】

マイクロ流路を形成したPDMSチップ(厚さ3 mm)の作製を行った(図⑥-1左)。マイクロ流路の両末端に注射針で貫通穴をあけ、その穴にチューブを差し込んだ。このPDMSチップをアクリル製ホルダーに取り付け、マイクロ流路と印刷電極(DEPチップ)の作用電極が重なるように位置合わせを行い、ホルダーで固定した(図⑥-1右)。

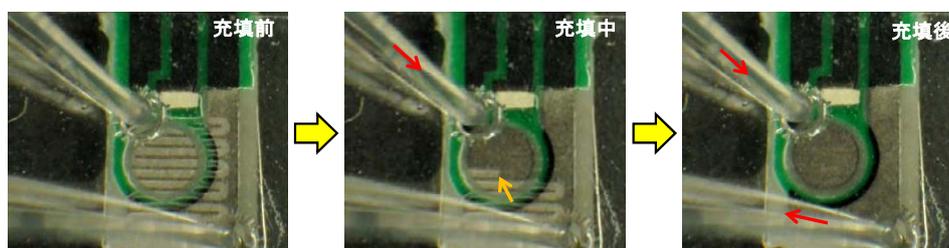


図⑥-1 実験に用いたマイクロ流路(左)
マイクロ流路を取り付けた印刷電極(右)

マイクロシリンジ内を PBS (Phosphate Buffered Saline) で満たし、入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。抗原(インスリン) 5 μL と金コロイド標識 2 次抗体 2 μL を混ぜ、気泡を取り除くためにボルテックスしサンプル溶液を調製した。調製したサンプル溶液は表⑥-1 に示す。ボルテックスの際に金コロイドが沈殿したため、ピペッティングにより攪拌を行った。チューブでサンプル溶液 4 μL を吸引し PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡観察下で 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速さでサンプル溶液を注入した。サンプルが作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 15 分後にポンプを停止した(被検サンプル量は計算上 3 μL)。サンプル溶液でマイクロ流路内を充填する前と充填中、充填後の顕微鏡写真を図⑥-2 に示す。

表⑥-1 検討に使用したサンプルの組成

NO.	サンプル溶液	備考
1	インスリン(8 ng/mL) 5 μL + 金コロイド標識 2 次抗体 2 μL	これを Positive Control とする。
2	インスリン(0 ng/mL) 5 μL + 金コロイド標識 2 次抗体 2 μL	これを Negative Control とする。



図⑥-2 サンプルを注入中の様子

サンプル溶液注入後、ホルダーおよび PDMS チップをとりはずし、PBS を用いて DEP チップの洗浄を行った。DEP チップの作用電極上に塩酸 30 μL を滴下し電気化学測定 (DPV 法) を行った。DPV の条件は、表⑥-2 に示す。以上の作業をサンプル溶液 (Positive Control) とサンプル溶液 (Negative Control) に対して 2 回ずつ行った。その際、使用する PDMS チップは作業ごとに新品の PDMS チップに取り換えた。

表⑥-2 DPV 測定条件

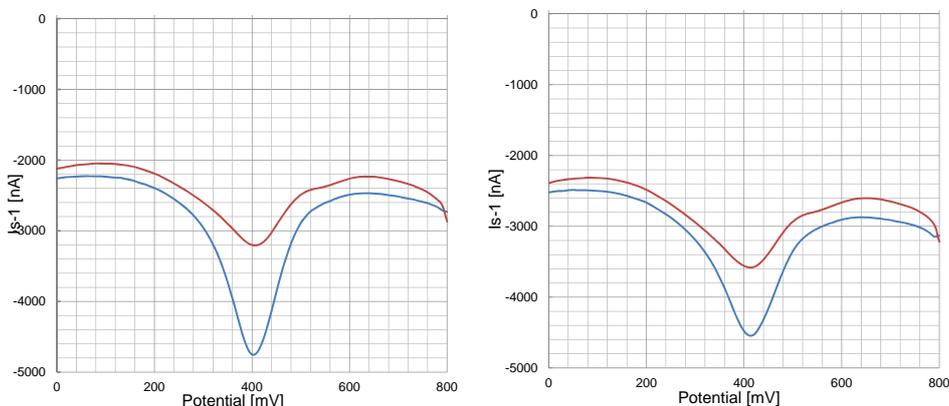
初期電位	800 mV
最終電位	0 mV
振幅	10 mV
パルス振幅	50 mV
パルス周期	100 ms
パルス幅	40 ms
サンプリング幅	2 ms

【実験結果①】

マイクロ流路を形成した PDMS チップを用いて DEP チップの作用電極上で抗原抗体反応を行い、電気化学測定を行った。Positive Control の電気化学測定の結果を図⑥-3 に示し、Negative Control の電気化学測定 1 回目の結果を図⑥-4 に示す。これらの結果は、従来の方法である、DEP チップの作用電極上に滴下したサンプル溶液の液滴内で抗原抗体反応を行い電気化学測定を行った時の結果より 5~10 倍ほどバックグラウンドが出ている。しかし Negative Control に比べ、Positive Control のシグナルが明らかに高いピークがであることからインスリンを検出できたと考えられる。この結果は、マイクロ流路を用いない従来の方法での測定結果に比べ高い値である。また、従来の方法では抗原抗体反応に 60 分間かけていたところを今回マイク

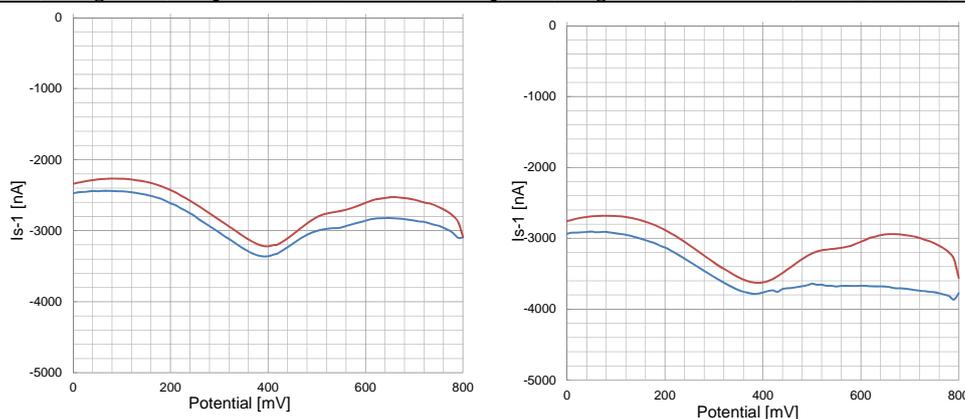
マイクロ流路を用いた方法では 15 分間に短縮し抗原抗体反応を行ったにもかかわらず、顕著なピークを確認することができたため、抗原抗体反応の高効率化にマイクロ流路が寄与したと考えられる。

インスリン(8 ng/mL)5 μ L + 金コロイド 2 μ L (Positive Control)の電気化学測定結果



図⑥-3 DPV の測定結果
左：一回目、右：二回目

インスリン(0 ng/mL)5 μ L + 金コロイド 2 μ L (Negative Control)の電気化学測定結果



図⑥-4 DPV の測定結果
左：一回目、右：二回目

※注釈

電気化学測定(DPV 法)を行う際、1 度目の測定結果を青線、直後に酸化処理をせず再び測定した結果を赤線に示す。

【実験目的②】

前項と同様のマイクロ流路を用いて、印刷電極チップの作用電極上にマイクロ流路を実装し、この中で抗原抗体反応を行った後に、さらに洗浄液をマイクロ流路に流して洗浄を行う。その後、電気化学測定を行いインスリンを含むサンプルとブランクサンプルとの差を確認し、マイクロ流路内で抗原抗体反応および洗いの処理を行った結果を評価する。

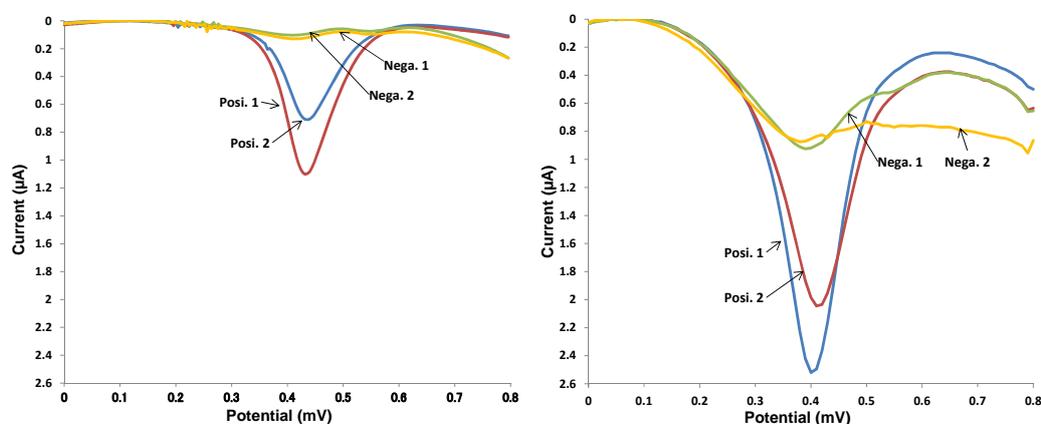
【実験方法②】

前項の共同実験で使用したものと同様の、マイクロ流路を形成した PDMS チップ(厚さ 3 mm)を用意した。流路の幅は 200 μ m 深さはおよそ 60 μ m である。マイクロ流路の両末端に注射針で貫通穴をあけ、その穴にチューブを差し込んだ。この PDMS チップをアクリル製ホルダーに取り付け、マイクロ流路と印刷電極(DEP チップ)の作用電極が重なるように位置を合わせ、ホルダ

ーで固定した。DEP チップには、1 次抗体を作用電極に固定化しブロッキングしたものを使用した。マイクロシリンジ内を超純水で満たし、入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。マイクロ流路の入口側の FEP チューブを取り外し、マイクロシリンジから超純水を送った。インスリン 5 μL と金コロイド標識 2 次抗体 2 μL を混ぜ、サンプル溶液を調製した。調製したサンプルの一覧を表⑥-1 に示す。チューブでサンプル溶液 4 μL を吸引し、PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡 (OLYMPUS S2X7) 観察下で 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速さでサンプル溶液を注入した。サンプルが作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 15 分後にポンプを停止し(被検サンプル量は計算上 3.0 μL)、マイクロシリンジを取り外した。別のマイクロシリンジ内を PBS で満たし、入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。マイクロ流路の入口側のチューブを取り外し、マイクロシリンジから PBS を送った。チューブの先端まで PBS で満たし、PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡観察下で 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速さでサンプル溶液を注入した。サンプルが作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 15 分後にポンプを停止した(洗浄液量は計算上 15 μL)。ホルダーおよび PDMS チップをとりはずし、DEP チップ表面の洗浄液を窒素ガスで軽く吹き飛ばし、DEP チップの作用電極上に塩酸 30 μL を滴下し、電気化学測定 (DPV 法) を行った。DPV の条件は、表⑥-2 に示す。以上の作業をサンプル溶液 (Positive Control) とサンプル溶液 (Negative Control) に対して 2 回ずつ行った。その際、使用する PDMS チップおよび FEP チューブは作業ごとに新品に取り換えた。

【実験結果②】

マイクロ流路を形成した PDMS チップを用いて、DEP チップの作用電極上で抗原抗体反応および洗いの処理をマイクロ流路内で行い、電気化学測定 (DVP 法) を行った。その測定結果及び前項で行った実験 (抗原抗体反応のみを流路内で行ない、洗浄は注射筒を用いて手作業で行った) の結果を図⑥-5 に示す。サンプル溶液 (Positive Control) では 0.4V 付近に明瞭なピークが確認できるが、サンプル溶液 (Negative Control) では明瞭ではなく、抗原の有無に依存する有意差が出ている。また、前項の結果と比較してサンプル溶液 (Positive Control) ピーク値は 1/2 程度に減少が見られるもの、バックグラウンドの値が低くなっておりベースラインも平坦である。この結果より、バックグラウンドの減少をさせるうえでは前回の洗浄法よりも効果的であると考えられる。今回の実験ではサンプル溶液 (Negative control (2 回目)) の実験の際に流路にゴミが詰まってしまい、入口チューブ接続部より洗浄液が漏れ出てしまった。また、いずれの実験でも洗浄液を注入し始めると、流路内に気泡が混入するなどのトラブルがあった。このため、予定していた流量の洗浄液を流すことができていなかった可能性がある。



図⑥-5 本検討の結果 (左)、前項の検討結果 (右)

【実験目的③】

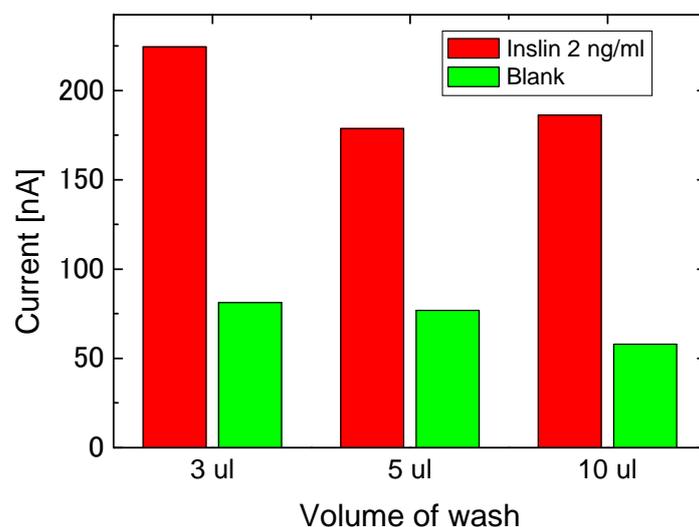
前項と同様のマイクロ流路を用いて、印刷電極チップの作用電極上にマイクロ流路を実装し、この中で抗原抗体反応を行った後に、さらに洗浄液をマイクロ流路に流して洗浄を行う。洗浄時間一定の条件において洗浄液を減少し、DPV 測定の結果から必要な洗浄液量を評価する。

【実験方法③】

前項の共同実験で使用したものと同様の、マイクロ流路を形成した PDMS チップ（厚さ 3 mm）を用意した。流路の幅は 200 μ m 深さはおよそ 60 μ m である。マイクロ流路の両末端に注射針で貫通穴をあけ、その穴にチューブを差し込んだ。この PDMS チップをアクリル製ホルダーに取り付け、マイクロ流路と印刷電極（DEP チップ）の作用電極が重なるように位置を合わせ、ホルダーで固定した。DEP チップには、1 次抗体を作用電極に固定化しブロッキングしたものを使用した。マイクロシリンジ内を超純水で満たし、入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。マイクロ流路の入口側のチューブを取り外し、マイクロシリンジから超純水を送った。インスリン 5 μ L と金コロイド標識 2 次抗体 2 μ L を混ぜ、サンプル溶液を調製した。調製したサンプルの一覧を表⑥-1 に示す。チューブでサンプル溶液 4 μ L を吸引し、PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡（OLYMPUS S2X7）観察下で 0.2 μ L/min の速さでサンプル溶液を注入した。サンプルが作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 10 分後にポンプを停止し（被検サンプル量は計算上 2.0 μ L）、マイクロシリンジを取り外した。別のマイクロシリンジ内を PBS で満たし、入口側のチューブをマイクロシリンジに接続した。マイクロ流路の入口側のチューブを取り外し、マイクロシリンジから PBS を送った。FEP チューブの先端まで PBS で満たし、PDMS チップに取り付けた。マイクロシリンジポンプにシリンジを取り付け、顕微鏡観察下で 3.0, 5.0, 10.0 μ L/min の速さで洗浄液を注入した。サンプルが作用電極表面全体を濡らしたことを確認してから 1 分後にポンプを停止した。ホルダーおよび PDMS チップをとりはずし、DEP チップ表面の洗浄液を窒素ガスで軽く吹き飛ばし、DEP チップの作用電極上に塩酸 30 μ L を滴下し、電気化学測定（DPV 法）を行った。DPV の条件は、表⑥-2 に示す。以上の作業をサンプル溶液（Positive Control）とサンプル溶液（Negative Control）に対して 2 回ずつ行った。その際、使用する PDMS チップおよびチューブは作業ごとに新品に取り換えた。

【実験結果③】

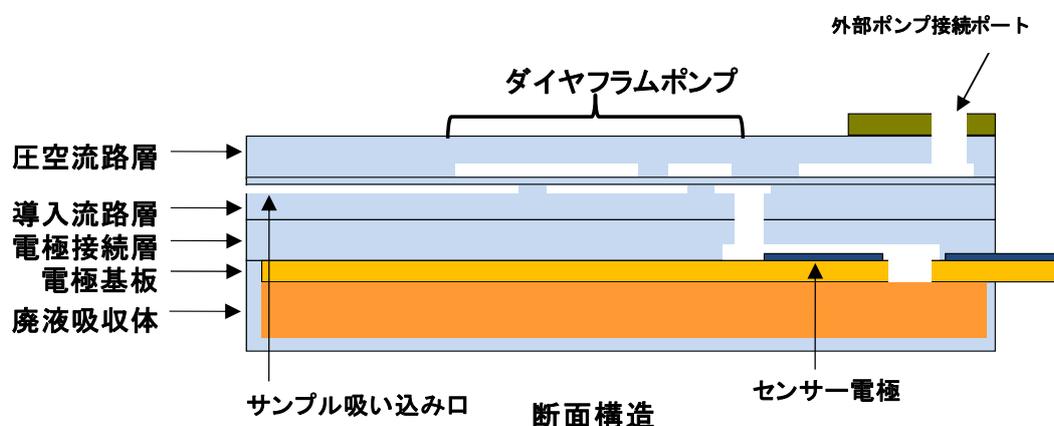
マイクロ流路を形成した PDMS チップを用いて、DEP チップの作用電極上で抗原抗体反応および洗いの処理をマイクロ流路内で行い、電気化学測定（DPV 法）を行った。結果を図⑥-6 に示す。インスリンを 2 ng/ml 含有するサンプル（Positive Control）と含有しないサンプル（Negative Control）で明瞭なシグナルの差が確認できる。抗原の有無に依存する有意差が出ている。また、洗浄液量の減少とともに、若干のシグナル及びバックグラウンドの増大がみられるが、S/N としての変化ほとんどなく、3 μ l という微量な洗浄液でも十分な効果が認められる。



図⑥-6 洗浄液量の影響

検討2…マイクロ流路搭載型センサー電極の概要

本マイクロ流路技術は北陸先端科学技術大学院大学が保有するマイクロポンプ及びバルブ技術を応用するものである。図⑥-7に概略図を示す。サンプル(全血)はマイクロ流路構造側部に開いた隙間より毛管力により吸引され、一定量が導入流路層に導かれる。その先にダイヤフラムポンプを実装されており、これに外部ハードウェアから加圧減圧を周期的に繰り返す圧力空気を送り込むことで、これをポンピング動力としてサンプルを送液する。この際のサンプルの流速はポンプの動作周波数により定量的に制御可能である点が本原理の特徴である。ポンピングを繰り返すことでサンプルはマイクロ流路チップを垂直に貫く流路を通り、次に電極接続層に到達し、センサー電極と物理的接触を行いセンサー表面にあらかじめ固定化されている抗体や酵素などの生理活性物質との反応を開始する。血糖値の測定においては、サンプルが電極表面と接触した状態で測定すれば定量可能である。インスリンの測定においては抗原抗体反応後にセンサー電極表面を一旦洗浄液により洗浄した後、希塩酸を注入し、この後電気化学的に表面に結合したインスリン量を定量する。洗浄液及び希塩酸を外部ポンプに接続し、外部ハードウェアより送液する。



図⑥-7 マイクロ流路チップ搭載型センサー電極の概念図

検討3…マイクロ流路搭載型センサー電極自動溶液動作チェック

【実験目的】

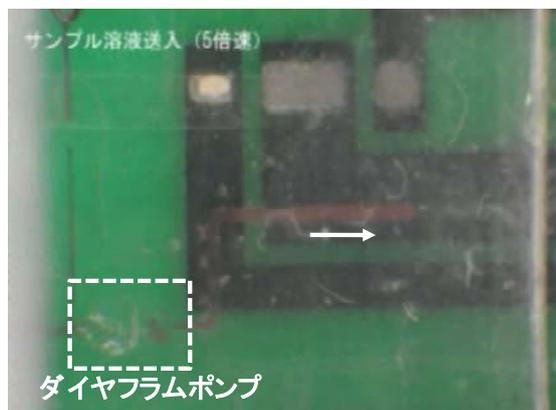
マイクロ流路搭載型センサー電極に血液サンプルを注入し、自動測定装置にセット。自動測定装置によるポンプの動作から洗浄液の注入、希塩酸の注入までの一連の送液動作が自動的に実行可能であることをチェックすることを目的とする。

【実験方法】

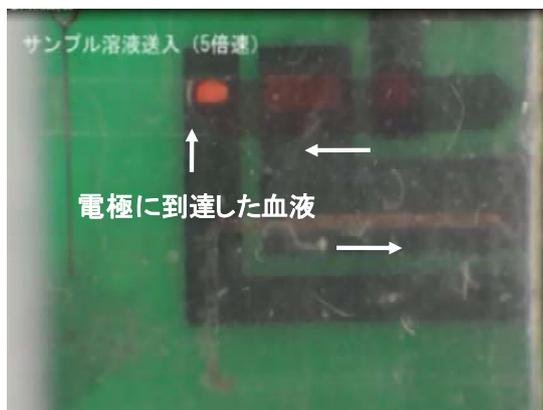
マイクロ流路搭載型センサー電極にサンプルを導入する。これを自動 HOMA-R 測定装置にセットし、ダイヤフラムポンプを動作させるために圧縮空気ポンプを動作させる。次に、ポンプより生理食塩水及び、希塩酸を順次送液し、流路内でのサンプルの挙動を顕微鏡により観察した。

【実験結果】

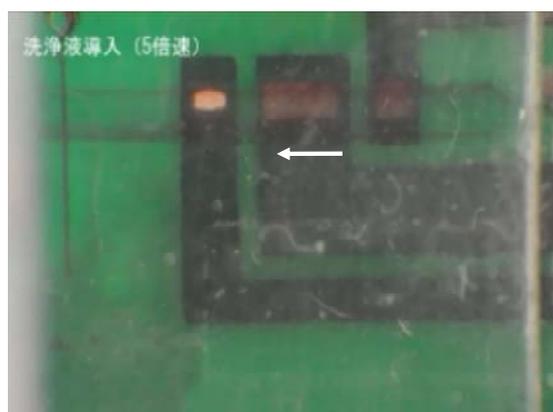
図⑥-8 に自動送液動作中の写真を示す。チップに導入したサンプルを全て送液できなかった。これは、血液の粘性が事前の検討に使用した生理食塩水よりも高かったためであると考えられる。しかしながら、全血サンプルをダイヤフラムポンプにより送液することは可能であり、電極に到達させることができた。次に装置は自動的に血糖値の測定を行った後に、洗浄液を5分間注入する操作に移った。この際、サンプル導入口からの洗浄液や血液サンプルの逆流が無いことを確認した。また、洗浄液が注入されると、血液が洗浄液と置換されて行き、センサー周辺の血液のスメアーが徐々に薄くなる様子が観察でき、目視では目立った洗浄残りは確認されなかった。さらに希塩酸の注入においても、逆流等の目立った問題は見受けられず適切に希塩酸が注入されているように見られた。



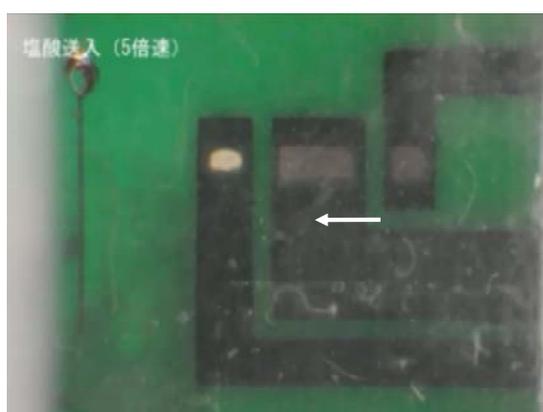
1. ダイヤフラムポンプによるサンプルの送液



2. サンプルの送液後



3. 洗浄液の注入直後



4. 希塩酸の注入直後

図⑥-8 自動 HOMA-R 測定装置により行った自動送液の様子

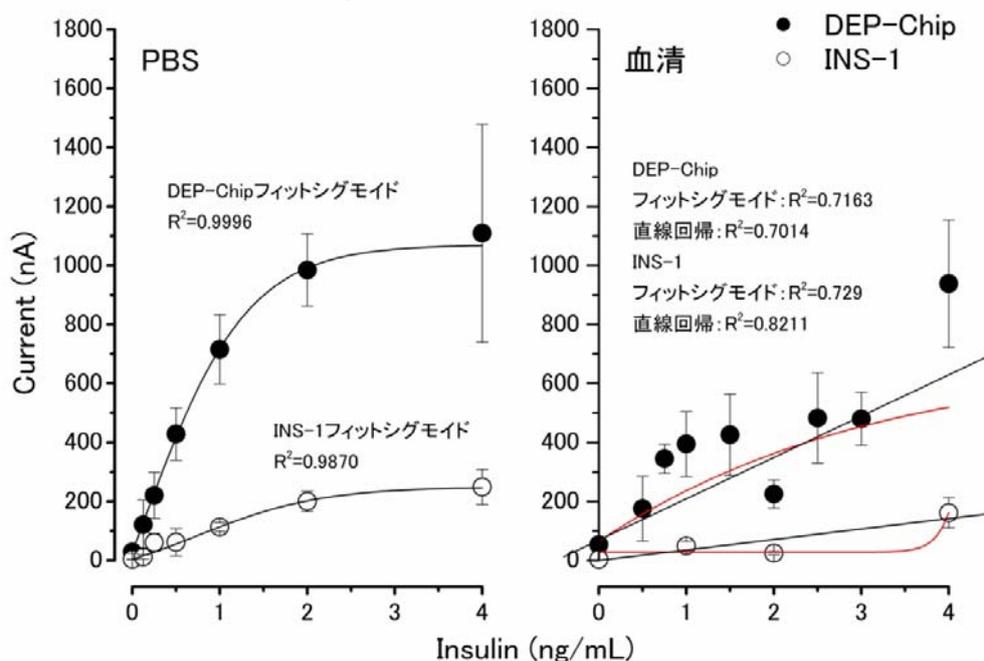
2-7. センサチップの評価 (研究実施番号 ⑦)

DEP-Chip と INS-1 で作成したインスリンセンサ (流路は用いていない) を用いて検量線を作成した。検量線はインスリンをバッファに溶解した場合と、コントロール血清に溶解した場合の 2 種類を作成した。なお、コントロール血清中の既存のインスリン濃度は、インスリンをスパイクして得た値からの換算値ではほぼ 0 と見なすことができた。

バッファに溶解したインスリンで作成した検量線はいずれの電極でも高い決定係数のシグモイド曲線で表すことができた。一方、血清に溶解したインスリンで作成した場合は、値が小さく、バラツキも大きくなった。INS-1 では、低濃度の値がほとんど得られていない。

検量線は最終的には今回開発した試作機を用いて、流路と組み合わせて作成する必要がある。後述するように流路を用いることで、反応時間を短縮することができ、また、サンプルの適用量を増やすことができるため、測定値を大きくすることは可能である。開発期間の制限のため、完成した試作機と流路と組み合わせた測定チップを使用した検討が未だ十分にはできていないが、今後補完研究で実施する予定である。

DEP-ChipとINS-1で作成したインスリン検量線



図⑦-1 インスリンの検量線

インスリンセンサ評価のため、金沢大学篁研究室にてグルコース負荷を行ったヒト血清を、INS及びDEP-Chipで作成したインスリンセンサで評価装置と試作機(第一号機)を使用して測定した。その結果を上記で得られた血清を用いた検量線(回帰直線)から $\mu\text{U/mL}$ 値に換算した。

いずれの場合もELISAの結果に比べ値が低い傾向が認められた。糖負荷によるインスリン濃度変化のパターンはDEP-Chipで作成したセンサでELISAとほぼ同じであったが、INS-1ではややパターンは崩れた。しかし、時間とともに増加するという傾向の検出は可能であった。絶対値が大きく異なる原因の1つは検量線の正確さが不十分であることが挙げられる。また、血清サンプルには測定を阻害する物質が含まれている可能性があり、測定結果に個人間のバラツキが大きいことが分かっている。今回検量線作成に利用したコントロール血清(10名の海外のヒトの血清を混合したもの)と測定した個人の血清の特性がどの程度離れているのかについては今後さらに検討すべき課題であると考えられる。今後、流路チップと試作機を用いて、実サンプルでの測定結果を積み重ねる必要がある。

流路を用いた場合、抗原抗体反応が促進され、反応時間を短縮できる可能性が示唆されている。そこで、DEP-Chipを用いたインスリンセンサで流路を使用した場合としない場合で反応の大きさを比較したところ、反応時間は大幅に短縮可能であった。

本研究では流路の設計から行っており、限られた期間の中では完成した流路を使用している実験を十分行うことができなかつたため、必ずしも満足のいく結果は得られていない。繰り返しのなるが、今後、補完研究で流路を組み合わせたセンサを用いて実験を重ね、より精度の高い検量線を作成し、特に全血についての測定実験を行う必要がある。

8. 試作機で測定されるデータの臨床的意義の評価 (研究実施番号 ⑧)

金沢大学では試作機が測定する HOMA-R の臨床的意義を評価した。

金沢大学病院糖尿病・代謝内科外来に入院中の患者を対象に、インスリン抵抗性指標(空腹時インスリン値、HOMA-R、QUICKI など)と患者の臨床像(代謝異常、内臓脂肪量、骨格筋量、MRS による肝臓および骨格筋細胞内脂肪含量、基礎代謝、呼吸商)、肝臓および脂肪組織由来バイオマーカーとの関連を検討した。実施に当たっては、金沢大学倫理委員会の審査を受け、患者からのインフォームドコンセントを得てサンプルを収集した。これらの指標のうち、エアロモニタ(基礎代謝計)を用いた基礎代謝測定に関する研究期間中の成果は以下のとおりである。

1. 2 型糖尿病患者の基礎代謝を安定的に測定する条件を決定した。
2. 2 型糖尿病患者 17 名の HOMA-R と基礎代謝を測定した。
3. 基礎代謝量は、体重、BMI、CPR(C ペプチド値)、と有意に相関し、IRI(インスリン値)、HOMA-R、QUICKI と相関する傾向が認められた。すなわち、肥満、インスリン抵抗性が高度であるほど、基礎代謝が高いことがわかった。

肥満やインスリン抵抗性状態では交感神経活動が亢進していることが知られており、このことが骨格筋や褐色脂肪組織でのミトコンドリア機能と熱産生を高め、基礎代謝の亢進につながっている可能性を考える。

今回対象とした患者は全て 2 型糖尿病症例である。2 型糖尿病ではインスリン分泌不全と高血糖により HOMA-R が必ずしも正確にインスリン抵抗性を反映していない可能性が知られている。そのために基礎代謝と HOMA-R の間の関係が不明瞭になった可能性も考えられる。本研究がめざす HOMA-R 測定デバイスは、未だ糖尿病に至っていない者やメタボリックシンドロームを有する者を対象としており、そのような対象では HOMA-R がより正確にインスリン抵抗性を反映する可能性がある。

今後、本デバイスの完成により、糖尿病合併しない症例を含めた多数例で検討することにより、HOMA-R の臨床的意義をより明らかにしていく予定である。

最終章 全体総括

今回の研究開発では、小型 POCT 機器として、評価用試作器と臨床用評価器の 2 回の試作と、マイクロ流路を組み込んだ 2 種類の電極を持つバイオセンサの開発・製作を行った。

評価用試作器では、装置の最大課題であった、異なる 2 種の電気化学測定の実現を目指し、DPV(differential pulse voltammetry)および CA(amperometry)の異なる 2 種類の電気化学測定を実現した。

臨床用評価器では、より製品化を意識し、将来的な小型化と、簡便な操作で誰でも使用出来る事に主眼をおいて開発を行った。機能を統合したマイクロプロセッサ(デバイス)の採用し、さらに小型化部品、極小パッケージ部品を採用し、小型化を図った。液送りの為のシリンジ、ポンプ等の機構部品も全て収めた状態で、装置サイズ幅115mm ×奥行き150mm ×高さ105mm を実現した。また、操作面では、液晶タッチ画面での簡便な操作性を実現した。これによって、手のひらサイズの外形で、家庭でも使用可能なサイズの POCT 機器が実現出来た。

また、完成した臨床評価用試作器では、耐ノイズ性や不要輻射の確認も実施し、実用化に

向けた製品の信頼性も確認した。

マイクロ流路部では、洗浄処理を含む抗原抗体反応が検出できるセンサを、市販されている家庭用血液センサ、例えば糖尿病患者用の血糖値センサと、同等の使い勝手、コストで実現できるチップと、その生産方法を開発することが今回の研究開発のポイントであった。

本研究開発においては、そのための課題解決を全て解決できた。その結果、HOMA-R 指数を導出可能な、「切手サイズ」の、使い捨てチップと、コンパクトな測定器が実現された。

一方で、精度、安定度、張り合わせ強度等には、未だ問題や未確認な点があり、今後の研究で詰める必要がある。

また、センサチップについては、印刷電極上にインスリンセンサと血糖値センサを構築し、その最適化と保存安定性について検討した。試験期間の制限により未だ4週間程度の安定性を確認したのみではあるが、安定性に影響を与える要因についていくつか明らかにすることができた。

さらに、HOMA-R 測定用に、1枚の基板上に印刷した2個の電極上にそれぞれインスリンセンサと血糖値センサを構築したセンサチップを作成した。これらのセンサチップを用いてバッファまたはヒトコントロール血清に溶解したインスリン、グルコースを測定し検量線を作成した。

また、全血で測定する際の使用するサンプル量に関しては、当初目的であった全血10 μ L以下でインスリンセンサ、血糖値センサでの測定が可能であることが確認出来た。

インスリンセンサに関しては、マイクロ流路を組み合わせることで、従来のGLEIA法の課題の1つであった抗原抗体反応に要する時間の長さを大きく短縮できることが確認された。従って、今回開発されたセンサチップとマイクロ流路を組み合わせることで、結果を20分以内に得ることは十分可能であることが示された。

今後の課題として、1. マイクロ流路と組み合わせたセンサチップによる測定結果の再現性や精度の向上、2. 全血を用いた測定値を臨床的に確立している血清値、血漿値に換算する手法の確立、3. 量産に至った場合のセンサチップの安定性向上、などを検討する必要がある。

今後実用化に向けては、補完研究として、さらに多くの検体で臨床試験を実施し、データの蓄積、構築を行い、安定性、再現性など、測定結果の信頼性を向上していきたい。また、薬事申請を行い、市場投入を実現したい。

現在の市場では、血液を分析するチップ、センサは様々なものが開発されているが、自己採血可能な血液量で、数ng/ml以下の測定レンジを、家庭にも導入できるコスト、装置サイズ、簡単操作で実現したものはない。今回、チップにポンプを内蔵し、それを駆動する低コストで小型の方法が開発できたことにより、この技術の延長上でヘモグロビンA1c等簡単な前処理が必要な測定も家庭で自動測定できる可能性が拓け、濃度帯ではELISAで測定可能なほぼすべてのものが測定可能になる。従って、本技術は、メタボリックシンドロームのみならず、癌の早期発見や、他の様々なバイオマーカーの測定にも応用可能と期待できる。