特集

POCT用SH-SAWバイオセンサの開発
Development of SH-SAW Biosensor for POCT

谷津田 博 美 Hiromi Yatsuda
小 貝 崇 Takashi Kogai
後 藤 幹 博 Mikihiro Goto
飯 島 修 Osamu Iijima
笠 井 俊 Suguru Kasai

要　旨

今後の医療，ヘルスケアにおいては，その場で簡単に利用できるPOCT（Point of Care Testing）用バイオセンサが望まれている。本論文では，SAWデバイス技術を応用したPOCT用免疫反応形バイオセンサについて述べる。SAWデバイスとしては，温度特性の良好な水晶基板上を伝搬する横波形弾性表面波を利用し，周波数250MHz帯の遅延線形バイオセンサを実現した。実際にチップ上の抗原抗体反応を測定した結果，期待通りのSAW伝搬速度変化が得られ，サンプル内に含まれる抗原量を数値的に検出できることが確認された。また，将来の家庭医療を考慮して，スマートフォン接続形の小形プロトタイプを実現した

Abstract

POCT（Point of Care Testing）which is a diagnostic testing at or near the patients has been required for the near future medical and healthcare systems. In this paper, an immunoassay-based biosensor using shear-horizontal surface acoustic wave（SAW）devices for POCT applications is described. A temperature-stable 250 MHz delay-line type SAW biosensor was fabricated on quartz substrates. SAW velocity changes due to antigen-antibody reactions were observed as we expected and quantitative results were obtained. In addition, a working prototype of SAW biosensors which connects to a smart-phone was demonstrated for future home healthcare applications.

1. まえがき

インフルエンザ等の感染症の流行抑制のために，小形で，その場で簡単に使え，迅速判定可能な検査キットが望まれている。このような検査キットはPoint of Care Testing（POCT）と呼ばれ，誰もが家庭で使うこともでき，生活習慣病の早期発見・治療に有効であり，高齢化社会に向けての医療費削減に絶大な効果を生み出すことが期待されている。さらに，POCT検査キットに通信機能を持たせることにより，無線ネットワークにアクセスし，取得データの一括管理，人間による再入力不要等，医療現場の負担を軽減することも期待されている。

このようなPOCT実現のために，DNA/RNAを利用したLab on a chip，酵素を用いた蛍光検出型診断機，免疫反応を利用した試験紙等があるが，性能，大きさ，使いやすさ，価格等に一長一短があり，ますますの研究開発が望まれている。

一方，現在，弾性表面波（SAW）デバイスは，携帯電話やGPS等の無線機にて幅広く使用されているが，SAWが基板表面にエネルギーを集中して伝搬することから，ガスセンサや溶液センサ[(1)～(4)]としての検討も行われている。SAWを用いたセンサでは，大量生産によりSAWセンサチップの低価格化が期待でき，さらに，その検出回路には光学的な部分が無く，シンプルな電気回路で実現できることから小形化に適すると考えられる。これらのことから，我々はSAWデバイスを用いたPOCT用バイオセンサの検討を行っている[(5)～(7)]。

センサは，目標分子を認識するための分子認識部位と，認識した信号を電気信号に変換する情報変換部位から構成される。情報変換部位であるSAWデバイス及び検出回路の技術はJRCのコア技術であるが，分子認識部位すなわちバイオに関する技術は保有していなかった。このため，英国ニューカッスル大学関連のバイオ企業Orla Protein Technologies Ltd.と2009年から共同研究を開始し，2011年には合弁会社OJ-Bio Ltd.を設立して開発を進めている。

本論文では，当社が進めているPOCT用SAWバイオセンサについて，その概要，基本動作，スマートフォン接続形のデモ機，今後の展開について述べる。

2. SAWセンサチップ

表面に抗体が配置されたSAWバイオセンサチップ上に，全血，血清，尿等のサンプルを滴下することで診断を行う。もし，サンプル内に目的抗原が入っている場合，その抗原はチップ上の抗体と結合し，チップ上を伝搬しているSAWの伝搬速度が変化する。この速度変化を測定することによりサンプル内の抗原濃度を数値的に検出するのが，SAWバイオセンサの動作原理である。SAWバイオセンサチップとしては，SAWを励振する電極構成，溶液を滴下しても電極部分が電気的にショートしない構造，抗体が配置されるバイオ表面の3つが重要である。

2.1　電極構成

SAWを用いた溶液センサとして，様々な基板を利用した横波型弾性表面波（SH-SAW）を用いたデバイスが検討されている[(1)～(4)]。本論文では，実際の使用環境を考慮して，温度特性が良好な36度回転Yカット水晶基板上の垂直X軸伝搬SH-SAWを用いて検討を行った[(5), (6)]。この水晶基板上のSH-SAWの2次温度係数は－0.05ppm/℃^{2}程度であり，頂点温度を室温に合わせることで，±10℃の温度変化に対してもおよそ5ppm程度の音速変化にすることができる。

電極構成としては，入力電極，出力電極，そしてバイオ反応領域を分離することができる遅延線形とし，伝搬路及び電極は金を用いて形成した。図１にSAWバイオセンサチップの概略図を示す。入出力電極の間にバイオ表面エリアがあり，そこに抗体が配置されている。入出力電極ともに電極1周期（λ）20μｍ の1/12λ形の浮き電極形一方向性電極とし，中心周波数はおよそ250MHz，伝搬路長450λ，挿入損失15dB程度の遅延線形フィルタを基本構造として用いた。また，2チャンネルによるバルク波打消し構造とした[(7)]。

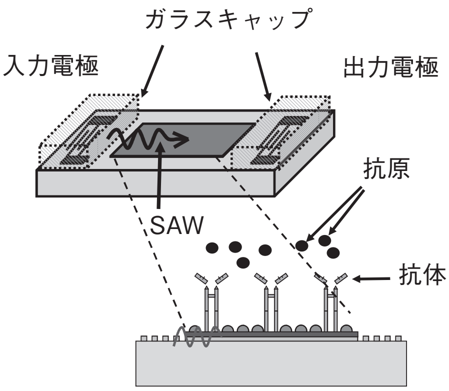


図1　SAWバイオセンサ概略図
Fig.1　Configuration of SAW biosensor chip.

2.2　電極封じ構造

バイオセンサでは，チップ上に，血液や尿等のサンプル溶液を滴下する必要があることから，電極を液体から保護する必要がある。この要求に対しては，大量生産を考慮して，厚膜レジストとガラスキャップを用いた空間封じ構造を開発した[(6)]。図2に，電極上に空間を持ったSAWバイオセンサチップの概略図を示す。シート厚み50μｍのエポキシ系厚膜レジストを用いたフォトリソグラフィーにより，電極の周囲に高さ50μｍで幅40μｍのエポキシ壁を形成する。表面波はこの壁の下を伝搬するときに減衰するため，できるだけ幅の狭い壁を形成する必要がある。測定の結果，レジスト下での伝搬損失は約0.8dB/λであり，チップ全体で約3.2dBの伝搬損失とすることができた。この構造により，チップを液体の中につけることも，液体をチップ上に付加することも容易になり，量産に優れた溶液バイオセンサチップを供給することができる。

2.3　バイオ表面

免疫反応を利用したバイオセンサを目標にしており，通常は図1で示すようにSAW遅延線の伝搬路上に抗体を配置する。この抗体の種類を変えることにより，様々なセンサを実現することができる。SAW遅延線の伝搬領域（金膜表面）に抗体を固定化する方法としては様々なものがあり，固定化する抗体により最適化している。

最終的な使用方法としては，SAWチップの伝搬路上に目的とする抗体を配置した後，ドライ化して梱包（包装）する。利用するときに包装からチップを取り出し，チップを検出回路に接続した後，チップ上にサンプル溶液を滴下する。サンプルの中に目的抗原が含まれていると，目的抗原が抗体と結合し，SAWチップの伝搬路上の粘性及び質量が変化し，伝搬している表面波の音速及び振幅が変化する。検出回路でこれを検出し，サンプル中の抗原濃度を数値的に知ることができる。

センサの感度向上のためには，SAWデバイス側での感度向上とバイオ側での感度向上の2種類が考えられる。SAWデバイスの感度向上の方法としては，基板材料の選択，金の膜厚の最適化，高周波数化，長遅延時間化等がある。一方，バイオ表面での感度向上のためには，抗体そのものの抗原との結合度の向上，抗体の配向性，単位面積あたりの抗体の高密度化等の他，2次抗体あるいは金粒子付き2次抗体を利用する方法がある。図3（a）は，抗体・抗原反応のみの概略図であり，ダイレクトアッセイと呼ばれる。図3（b）は，1次抗体に結合した抗原に，さらに金粒子付の抗体（2次抗体）を結合させるもの（サンドイッチアッセイ）で，より大きなSAWの音速変化を得ることができる。この方法では，特に分子量が小さい抗原の場合に有効な方法である。バイオ表面の開発においては，図3で示す抗体を固定化するためのリンカープロティンの最適化が重要であり，現在，抗体によって異なるリンカープロティンを利用している。

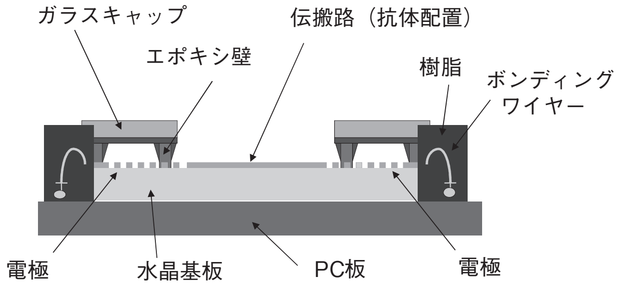
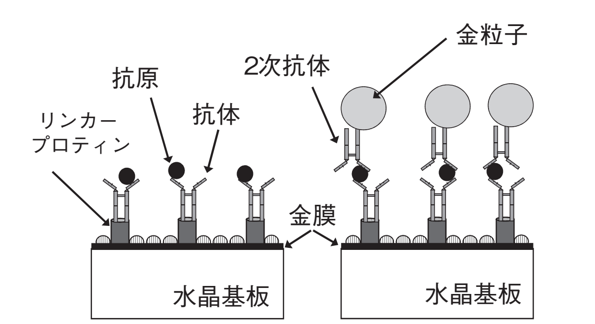


図2　SAWバイオセンサ空間封じ構造
Fig.2　Air-cavity structure of SAW biosensor chip.



（a）ダイレクトアッセイ　（b）サンドイッチアッセイ
図3　バイオ表面構造
Fig.3　Bio-surface structures.

3. 検出回路

SAWバイオセンサでは，SAWバイオセンサチップの他に，抗原抗体反応によるSAWの伝搬速度の変化を測定するための検出回路が必要である。SAWバイオセンサチップに電気信号を入力することにより，SAWがチップ上を伝搬し，設定された遅延時間後に信号が出力される。入力信号と出力信号を解析することにより，チップ上を伝搬したSAWの伝搬速度が得られ，抗原抗体反応による伝搬速度変化がわかる。

入出力間の信号としては，SAW伝搬による主応答の他に，入出力間の電気的結合による直接伝達応答がスプリアスとして存在する。しかし，SAWの伝搬速度は遅いため，遅延線タイプとすることによりμsオーダの遅延時間が得られる。入出力間の直接伝達信号とSAW伝搬信号には時間差があることから，バースト信号を用いることにより容易に分離することができる[7]。

図4に検出回路のブロック図を示す。250MHzの信号発生器，バースト回路，2個のデバイスを測定するためのスイッチ回路，入力信号とSAW遅延線出力信号とを比較して伝搬速度変化を計算するための位相比較回路，さらに振幅比較回路から構成されている。ここでは2個の測定としているが，将来のマルチチャネル対応（1チップで4種類測定）に拡張可能である。検出回路は，140×100×40mm^{3}の金属ケースに収納されている。このような検出回路の基本構成は，無線機の送受信回路と類似していることから，将来はIC化により，20mm角以下の小形化が期待できる。

実験で利用している，検出回路，パソコン，SAW素子が接続された写真を図5に示す。

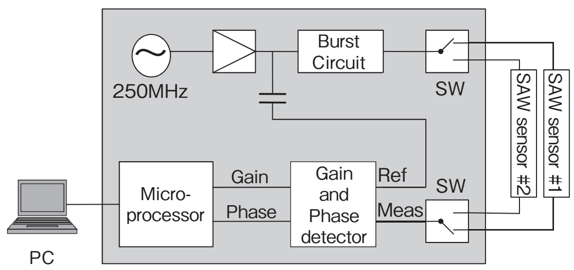


図4　検出回路ブロック図
Fig.4　Block diagram of detection circuit.

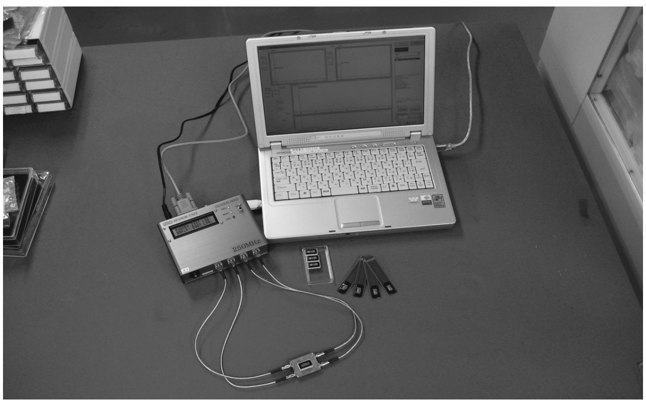


図5　実験構成
Fig.5　Experimental set up.

4. 基本動作

図6に，本SAWバイオセンサの基本動作確認のために行った抗原抗体反応の実験結果を示す。HSA（Human Serum Albumin）を用いたモデルアッセイで，抗体はポリクローナルAnti-HSAを用いた。リンカープロテインが形成された表面に，抗体，抗原，2次抗体を順番に滴下した場合のSAWの音速変化をリアルタイムで測定した。図で示した（Ⅰ）の領域は，表面にリンカープロテインが形成された状態でバッファ溶液を滴下した状態である。横軸2minの時点で抗体を滴下。領域（Ⅱ）の部分は，リンカープロテインが抗体と結合することにより音速が変化している様子を示している。抗体滴下後2min後には音速は一定値を示し，リンカープロテインと抗体との結合が飽和している様子がわかる。滴下溶液をバッファーで置換後，横軸14minの時点で抗原を滴下。領域（Ⅲ）の部分は，抗体が抗原と結合することにより，音速が変化している様子を示している。抗原濃度の低い場合には，抗体と抗原の衝突確率が小さく，ゆっくりと音速が変化している様子が示されている。一方，抗原濃度の高い場合には，音速変化は急激であり，短時間で飽和している。滴下溶液をバッファーで置換後，横軸26minの時点で，2次抗体を滴下。領域（Ⅳ）の部分は，1次抗体に結合していた抗原に対して，2次抗体が結合する様子が示されている。滴下溶液をバッファーと置換後，横軸38minの時点で塩酸を滴下し，リンカープロテインと1次抗体の結合を切り離し，領域（Ⅰ）と同じ表面状態にもどしている。実際の応用では，このような繰り返し利用は行わないが，バイオ表面の反応を観察するために塩酸を滴下した。

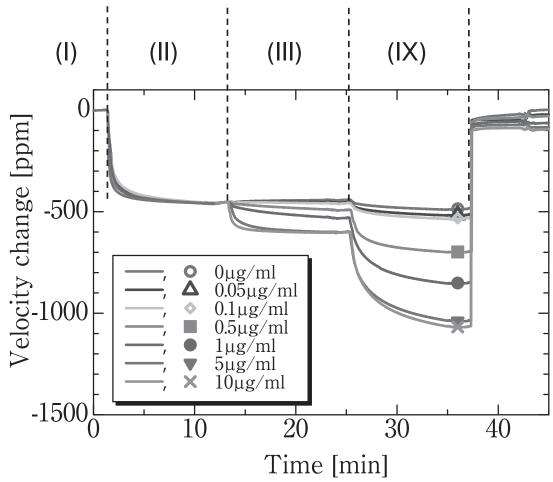


図6　抗原濃度に対する抗原抗体反応時間応答
Fig. 6 Real time response of antigen-antibody reaction with different concentrations of antigen.

図6で示された実験結果により，ダイレクトアッセイ及びサンドイッチアッセイでのSAWの音速変化は期待通りであり，SAWセンサ表面での抗原抗体反応が予定通りに行われていることがわかる。

図7は，図6の結果を抗原濃度に対する音速変化としてまとめた結果を示す。図7の縦軸の音速変化は，点線で示されるダイレクトアッセイでは，抗原滴下5分後の音速変化をプロットし，実線で示されるサンドイッチアッセイでは2次抗体滴下5分後の音速変化をプロットして示した。ダイレクトアッセイに比較して，2次抗体を利用することで音速変化が増幅されている。サンドイッチアッセイは，抗原の分子量によらず大きなSAWの音速変化を得ることができ，汎用性があり有効な方法である。

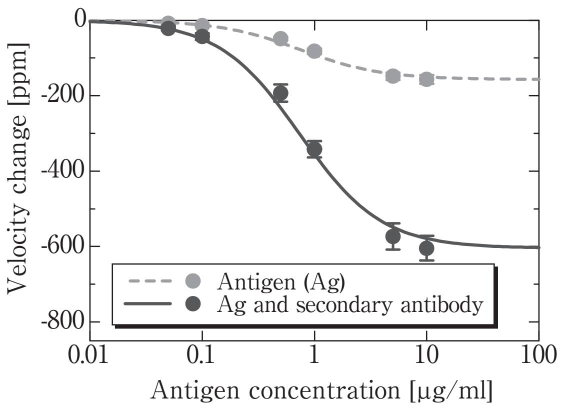


図7　抗原濃度に対するSAWの音速変化
Fig.7　Velocity changes of SAW for antigen concentrations.

基本動作の確認の他，英国OJ-Bio社では実際のサンプルを用いたバイオ実験が行われている。例えば，インフルエンザのクリニカルサンプルを用いて，従来形の診断キットとSAWバイオセンサの比較実験を行った。その結果，サンプル数は少ないながらも，SAWバイオセンサの方が良好な診断結果が得られた。

5. スマートフォン接続形SAWバイオセンサ

実際の応用を考慮して，スマートフォン接続形の検出回路を試作した。図8に試作機の写真を示す。基本的に，図5で示した実験セットアップと同様であるが，パーソナルコンピュータの代わりにスマートフォンとし，アンドロイドベースのアプリを作成した。SAWバイオセンサチップを検出回路に直接配置する構成としたが，今後，SAWバイオセンサチップの接続方法は実際の応用に対して最適化される。スマートフォンを利用することは，スマートフォンの持つ表示機能，通信機能，GPS機能を使うことができるため，検出回路側をシンプルにすることができ有利である。

目標としているのは，いつでも，どこでも，誰にでも簡単に使える簡易診断キットである。現在，様々な用途で広く利用されている紙ベースのテストキットでは目視による判断が必要であるが，本方法では電気的な測定により結果を数値化できるところが大きな特長である。これにより，信頼性の高いデータを記録，送信することができ，現在の様々なニーズに対応できる。

6. あとがき

その場で容易に使用できるPOCT診断キットを実現するために，SAWデバイスを用いた免疫センサを開発している。基本動作が確認され，様々な応用に対してその性能を検証中である。インフルエンザに対しては，英国にてクリニカルサンプルを用いた予備実験が行われ，従来の簡易テストキットと比較して同等以上の性能が確認された。今後とも，インフルエンザ，HIV/AIDS及び歯周病についてのプロジェクトが英国にて並行して進められ，実用化に向けたデータが蓄積される予定である。

現在のところ，検出回路部分はプロトタイプのため250cc程度であるが，IC化することにより20mm角以下のモジュールとすることができ，低価格化も期待できる。一方，SAWバイオセンサチップは大量生産に適し，さらなる小形化やマルチチャネル化等の高機能化も検討中である。

電子回路技術とバイオ技術の融合により，小形で使いやすいバイオセンサを実現し，生活習慣病の早期発見・治療，さらには感染症の拡大抑制等，今後の安心・安全の世界に少しでも貢献できるものと期待している。

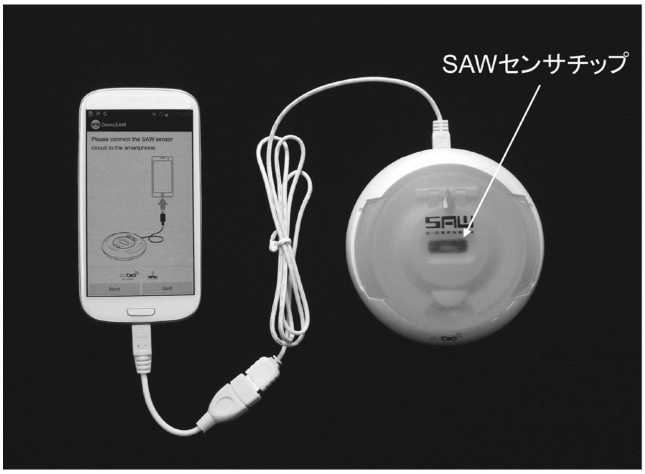


図8　スマートフォン接続形SAWバイオセンサ
Fig.8　Working prototype SAW biosensor connecting with smart-phone.

参考文献

(1) T. Moriizumi, Y. Unno, S. Shiokawa, “NEW SENSOR IN LIQUID USING LEAKY SAW”, Proc. IEEE International Frequency Control Symp., pp.579-582, (1987).

(2) J. Kondoh, Y. Matsui, S. Shiokawa, “SH-SAW BIOSENSOR BASED ON pH CHANGE”, Proc. IEEE Ultrason. Symp. pp337-340, (1993).

(3) E. Berkenpas, S. Bitla, P. Millard, M. Pereira da Cunha, “Pure Shear Horizontal SAW Biosensor on Langasite”, IEEE Trans. on Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr., vol.

51, pp.1404-1411, Nov.（2004）.
（4） T. Kogai, H. Yatsuda, S. Shiokawa, "Dip-type Liquid-Phase Sensor using SH-SAW", Proc. IEEE Ultrason. Symp. pp.2091-2094,（2007）.
（5） T. Kogai, H. Yatsuda, "Liquid Sensor Using SAW and SH-SAW on Quartz", Proc. IEEE Ultrason. Symp. pp.552-555,（2006）.
（6） H. Yatsuda, T. Kogai, N. Yoshimura, T. Mori, "Liquid-Phase SH-SAW Immunoassay Sensor", Fourth International Symposium on Acoustic Wave Devices for Future Mobile Communication Systems, pp.69-72,（2010）.
（7） M. Goto, O. Iijima, T. Kogai, H. Yatsuda, "Point of Care SH-SAW Biosensor", Proc. IEEE Ultrason. Symp. pp.736-739,（2010）.

用　語　一　覧

Anti-HSA: Anti -Human Serum Albumin（ヒト血清アルブミン抗体）
DNA: deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
GPS: Global Positioning System（全地球測位システム）
HSA: Human Serum Albumin（ヒト血清アルブミン）
Lab on a chip:（マイクロチップ解析）
POCT: Poin of Care Testing（臨床現場即時検査）
RNA: ribo nucleic acid（リボ核酸）
SAW: Surface Acoustic Wave（弾性表面波）
SH-SAW: Shear-horizontal SAW（横波形弾性表面波フィルタ）