

モバイル型 生物剤検知システム BioBulwark™

BioBulwark™ Mobile-Type Biological Agent Detection System

岡田 純 廣澤 大二 二階堂 勝

■OKADA Jun ■HIROSAWA Daiji ■NIKAIDO Masaru

安全・安心な社会を実現するためには、犯罪やテロに対するリスク管理体制の構築が極めて重要である。近年、世界的にバイオテロの脅威が高まるなかで、各国は独自に生物剤^(注1)検知技術の開発と配備を進めており、わが国でも早急な対応が求められている。

東芝は、独自に開発した電流検出型DNA (Deoxyribonucleic Acid : デオキシリボ核酸) チップ技術をベースに、今回、モバイル型 生物剤検知システム BioBulwark™ (バイオブルウォーク) を商品化した。このシステムによって、事件発生現場で迅速、安全、高感度、かつ簡便に生物剤を検知でき、事件が発生した際、警察や消防などのファーストレスポンドー (一次対応者) による迅速な対応が可能になると期待されている。

To realize a safe and secure society, a strong need exists for the construction of risk management systems to protect against crimes and terrorism. Demand has therefore been increasing for the rapid development and deployment of biological agent (BA) detection technology as a countermeasure to the growing threat posed by global bioterrorism.

As a solution to this issue, Toshiba has developed the BioBulwark™ mobile-type BA detection system based on our proprietary technologies for electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) chips. BioBulwark™ can rapidly and safely detect BAs at the site of an accident or incident with high sensitivity and simple operation. This system is expected to facilitate prompt responses by police officers, firefighters, and other first responders.

1 まえがき

食の安全の確保や、インフルエンザをはじめとする新興・再興感染症のパンデミック対策、バイオテロ対策など、安全で安心な社会を実現するために、細菌やウイルス、タンパク質などの検出が可能なバイオセンシング技術の開発が期待されている。

バイオテロに関しては、わが国でも1993年に炭疽(たんそ)菌、ボツリヌス菌毒素の散布事件が都内で発生しており、また、米国の炭疽菌郵送事件を模倣した事件も2001年以降多数発生し、これまでに数千件を超えられている。海外では、米国、欧州、韓国などの諸外国が、バイオセンシング技術の開発を積極的に進めているが、その詳細は機密情報として公開しない方針をとっている。したがって、わが国でも、生物剤を検知するための独自技術の開発が求められている。

東芝は、電気化学的な手法に基づく新しい遺伝子検出技術として電流検出型DNAチップ技術⁽¹⁾を開発し、現在、ヒトパピローマウイルスの型判別⁽²⁾及びマウスやラットなど実験動物の微生物モニタリング用⁽³⁾の生物剤検知システムを商品化している⁽⁴⁾。この電流検出型DNAチップ技術をベースに、科学警察研究所及び国立大学法人 帯広畜産大学と共同で生物剤検知技術を開発し、更にその成果をベースにして、事件発生現場で

迅速、安全、高感度、かつ簡便に生物剤を検出できる、モバイル型 生物剤検知システム BioBulwark™ (バイオブルウォーク) を商品化した^{(5), (6)}。ここでは、このシステムの概要と特長について述べる。

2 BioBulwark™の概要

米国の疾病予防管理センター (CDC : Centers for Disease Control and Prevention) では、代表的な数十種類の生物剤を、危険度と社会的影響度に応じてA, B, Cの3種類に分類している (表1)。カテゴリー Aはもっとも危険性が高く、社会

表1. CDCが指定する生物剤の例

BAs classified by Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

カテゴリー	病原体、毒素
A	<ul style="list-style-type: none"> 炭疽菌 ボツリヌス菌毒素 ペスト菌 野兔病菌 天然痘ウイルス 出血熱ウイルス (エボラ、ラッサ、ほか)、など
B	<ul style="list-style-type: none"> ブルセラ菌 鼻疽菌 脳炎ウイルス リシン毒素、など
C	<ul style="list-style-type: none"> 多剤耐性結核菌 ニハウイルス、ハンタウイルス、など

(注1) 生物兵器として用いられる可能性の高い病原体や毒素の総称。

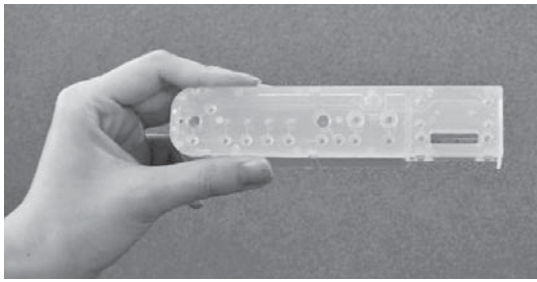


図1. 生物剤検知用DNAチップカセット — 炭疽菌など19種類の生物剤を検知するために用いる使い捨てのカセットである。検査に必要な試薬とDNAチップを内蔵している。

DNA chip cassette for detection of BAs



図2. モバイル型全自動DNA検出装置 — 送液と反応温度をコントロールする機構と、電気化学的な検出系を内蔵している。生物剤検知用DNAチップカセットをセットすれば、自動で生物剤の検出を行う。

Mobile-type automated DNA detection equipment

の影響度も大きい。今回は、A、B、Cの中から、バイオテロで用いられる可能性の高い19種類の生物剤を検出対象に選定した。

BioBulwark™は高感度、小型、全自動をコンセプトに開発され、生物剤検知用DNAチップカセット(図1)とモバイル型全自動DNA検出装置(図2)で構成される。検出系は、国産の遺伝子増幅技術と電流検出型DNAチップ技術を組み合わせることで、高感度化を実現した。また、検出装置は、生物剤による汚染が疑われる事件発生現場へ持ち込んで使用することを考慮し、一般的な分析機器と比べて耐環境性能、耐振動性能、及び耐衝撃性能を高めた構造となっている。

3 生物剤検知用DNAチップカセット

3.1 基本構成

遺伝子の検出には図3に示すような複数の工程が必要で、生物剤検知用DNAチップカセット内では、遺伝子増幅から電流検出までのプロセスを行う。

遺伝子の増幅には等温増幅技術の一種であるLAMP

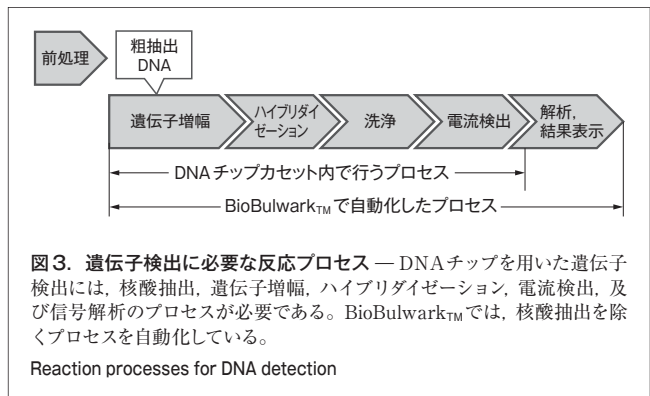


図3. 遺伝子検出に必要な反応プロセス — DNAチップを用いた遺伝子検出には、核酸抽出、遺伝子増幅、ハイブリダイゼーション、電流検出、及び信号解析のプロセスが必要である。BioBulwark™では、核酸抽出を除くプロセスを自動化している。

Reaction processes for DNA detection

(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を採用した。LAMP法は、試料中に含まれるごく微量の対象遺伝子を30 min ~ 1 h程度で1,000万倍以上に増やすことができる。遺伝子増幅法としては温度サイクルで増幅を行うPCR (Polymerase Chain Reaction)法が一般的であるが、LAMP法は等温で増幅ができるので装置化が容易であり、また、PCR法よりも遺伝子増幅産物が1桁以上多いなどのメリットがある。電流検出型DNAチップ技術は当社が独自に開発した技術で、蛍光色素の光学的な信号を検出する従来技術に比べ、検査の短時間化と低コスト化が可能で、装置の小型化や自動化が容易などの特長を備えている。LAMP法と電流検出型DNAチップ技術を組み合わせることで、原理的には数十個程度の生物剤を検知でき、既存の生物剤検知技術の中では、トップクラスの感度と精度を実現した。

また、従来の遺伝子検査には特殊なスキルが必要とされていたが、カセットには遺伝子増幅試薬、ハイブリダイゼーション試薬、洗浄試薬、電流検出試薬など、検査に必要な全ての試薬と電流検出型DNAチップが内蔵されており、操作は簡単な前処理をしたサンプルをDNAチップカセットに注入するだけであり、誰にでも検査が可能である。

更に、遺伝子検査では、反応中に生成される遺伝子増幅産物が拡散することによるコンタミネーションの防止が極めて重要になるが、このDNAチップカセットはサンプル注入後に専用の蓋をすることで完全に密閉され、信頼性の高い検査が可能である。今回開発したDNAチップカセットでは、19種類の生物剤を3種類のカセットで検査することができる。

送液効率、反応時間、及び試薬コストを考慮すると、DNAチップカセットに内蔵する試薬はできるかぎり少ないことが望ましいが、液量が少なくなると取扱いが難しくなる。そこで、微量液体の高精度送液を実現するために、今回、新たにマイクロ送液技術を開発した。マイクロ送液技術は、マイクロ流路、マイクロシリンジ、及びマイクロバルブの三つの要素から構成されている(図4)。

3.2 マイクロ流路

マイクロ流路の幅は、一般的な射出成形で容易に製作でき

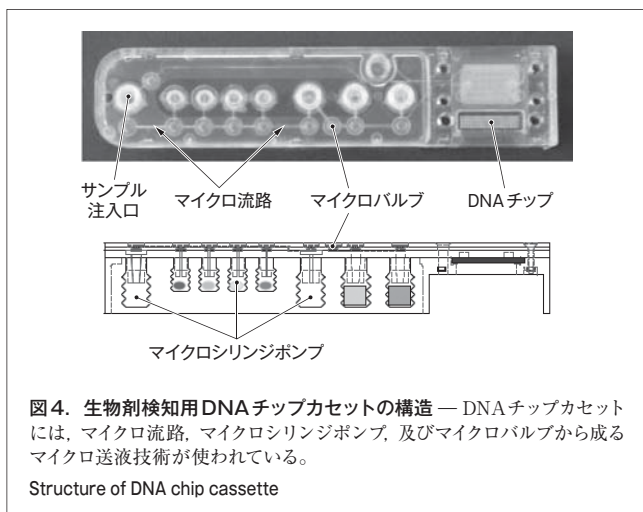


図4. 生物剤検知用DNAチップカセットの構造 — DNAチップカセットには、マイクロ流路、マイクロシリンジポンプ、及びマイクロバルブから成るマイクロ送液技術が使われている。
Structure of DNA chip cassette

る200～400 μm に設定した。これによって、金型の製作を含めてコストパフォーマンスを改善した。また、流路を形成するために複数の部材を接合する必要があるが、接着剤を用いると流路に流れ込んで埋まってしまう可能性が高いことから、新たに樹脂の拡散接合技術を開発し、流路をふさぐことなく高品位の接合を実現できた。

3.3 マイクロシリンジポンプ

マイクロ流路構造のカセット内で送液を行うためには、マイクロポンプが必要になる。マイクロポンプでもっとも実績があるのは、圧電素子を使用した方式である。しかし、この方式では逆止弁と逆止弁の間に配置した圧電素子に通電し、素子を伸縮させることで送液を行うため、流路とマイクロポンプの駆動機構が一体となっている。生物剤検知用DNAチップカセットは検査の性格上使い捨てにする必要があり、コストを考えると圧電素子タイプの採用は難しい。

今回は、マイクロポンプの駆動機構を装置側に備えさせる方式を採用し、蛇腹構造のマイクロシリンジポンプを開発した。このポンプの材質、構造、及びサイズを最適化することで、マイクロ流路内で数十 μm^3 の液体を精度良く送液することが可能になった。

3.4 マイクロバルブ

マイクロ流路構造のカセット内で確実に送液を行うためには、不用意な液の移動や蒸発などを防止するバルブが必要になる。一般に市販されているマイクロバルブは、電磁的な開閉機構を備えた方式がほとんどであり、サイズもあまり小さくなく、高価である。そのため、使い捨てを前提とする生物剤検知用DNAチップカセットに搭載するには不適である。そこで、小型で安価なマイクロバルブを開発した。今回開発したマイクロバルブは、量産が容易な射出成形で製作し、マイクロ流路内に埋め込んで、カセットに形成した駆動用ダイアフラムに外部から圧力を加えることで制御する。バルブのサイズが数mm程度であるため、信頼性の確保が課題であったが、材質や形状を

最適化することで、安価でありながら確実なバルブ動作を実現できた。

4 モバイル型 全自動DNA検出装置

装置内には、送液と反応温度をコントロールする機構と、電気化学的な検出系が内蔵されており、生物剤検知用DNAチップカセットをセットすれば、遺伝子増幅反応、ハイブリダイゼーション反応、洗浄、電流検出を行い、検出結果の解析、及び検査結果の表示まで自動で行う。検出には高速（生物剤の有無だけを判定でき、検出時間40min）と高感度（病原性も判定でき、同70min）の二つのモードを準備している。更に、この装置は二つの生物剤検知用DNAチップカセットを同時に検出でき、2種類の異なるカセットの同時検出、高速モードと高感度モードでの同時検出など、事件発生現場の状況に応じて使分けができるようになっている。

BioBulwark™は、生物剤による汚染が疑われる事件発生現場へ持ち込んでの使用が想定される。そこで、装置を構成する測定ユニット、制御パソコン、タッチパネルなどをカスタ付きの防水ケースに内蔵し、一体構造とした。また、防護服を着用した状態でも作業しやすいユーザーインターフェースを採用した（図5）。更に、屋外での使用や車での移動にも耐えられるように、一般の分析機器にはない高い耐環境性能、耐振動性能、及び耐衝撃性能を備えている。気温が0～40℃、湿度が30～80%RH（相対湿度）という外部環境での動作を保証し、振動や落下に対しても堅ろうであることを確認している。

5 実剤を用いた実用性の検証

生物剤検知の一例として、炭疽菌の検出結果を図6に示す。



図5. モバイル型全自動DNA検出装置の使用イメージ — 防護服を着用した作業者が、モバイル型全自動DNA検出装置を使用するときのようすをイメージしたものである。
Images of BioBulwark™ operation

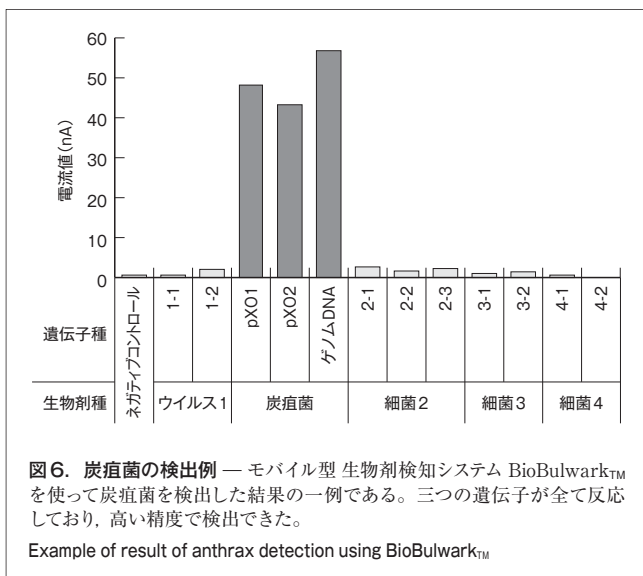


図6. 炭疽菌の検出例 — モバイル型生物剤検知システム BioBulwark™ を使って炭疽菌を検出した結果の一例である。三つの遺伝子が全て反応しており、高い精度で検出できた。

炭疽菌は、毒素を産生する2種類のプラスミドDNA (pXO1, pXO2)^(注2)を菌体内に持っていることから、炭疽菌のゲノムDNA配列と2種類のプラスミドDNA配列の3か所を検出するDNAチップを開発した。生物剤検知は、その検出対象の特殊性から、誤検知(偽陽性)があった場合に社会的な影響が大きい。1生物剤に対し複数個の遺伝子を調べることで、検出の精度を高めることができるだけでなく、炭疽菌の場合は、病原性の強弱に関する情報を得ることも可能になる。図6は強病原性の炭疽菌を検出した例であるが、三つの遺伝子が全て反応しており、高い精度で検出できた。また、ほかの18種類の生物剤に対しても複数の遺伝子を検出する仕様になっており、実剤を用いて、高感度で高精度に検出できることを確認している。

6 あとがき

当社は、事件発生現場レベルで迅速、安全、高感度、かつ簡便に生物剤の同定が可能なモバイル型生物剤検知システム BioBulwark™を開発し、商品化した。BioBulwark™は、海外の類似製品に比べ検出対象が広く、かつ高感度で高精度な測定を実現している。また、生物剤による汚染が疑われる事件発生現場での使用も考慮し、耐環境、耐振動、及び耐衝撃などの性能を高めた構造になっており、事件発生時に、警察や消防などのファーストレスポンスによる迅速な対応が可能になると期待される。現在、幅広いユーザーの要望に応えるため、いっそうの小型・軽量化を進めている。

遺伝子解析にかかわる技術はこれまで海外から導入される

(注2) 細胞内の核に存在するゲノムDNAと異なり、核外に存在する環状のDNA。

ものが多かった。特に生物剤検知に関する製品は、その特殊性からほぼ100%が外国製で、中身がブラックボックスであるケースが多く、また、十分なメンテナンスを受けられないという問題があった。その点、BioBulwark™は全て国産技術で構成されており、ブラックボックスでないだけでなく、メンテナンスも容易である。

また、遺伝子検査にはこれまで高い専門性が必要とされていたが、BioBulwark™では特殊な技術が不要なため、今後は生物剤の検知にとどまらず、食品検査や検疫での新興・再興感染症検査への応用、更にはヒトゲノム情報を調べることで薬の効き目や副作用を予測するテーラーメイド医療など、遺伝子検出が必要とされる様々な分野に展開していく。

文献

- (1) 源間信弘, ほか. テーラーメイド医療を実現する電流検出型DNAチップ. 東芝レビュー. 63, 2, 2008, p.37-40.
- (2) Satoh, T., et al. Development of novel HPV genotyping chip system using electrochemical chip and non-PCR amplification technology. International Journal of Gynecological Cancer. 16, Issue Suppl. 3, 2006, p.739-740.
- (3) Goto, K., et al. Specific and quantitative detection of PCR products from Clostridium piliforme, Helicobacter bilis, H. hepaticus, and mouse hepatitis virus infected mouse samples using a newly developed electrochemical DNA chip. Journal of Microbiological Methods. 69, 2007, p.93-99.
- (4) Hongo, S., et al. Development of an automated DNA detection system using an electrochemical DNA chip technology. Journal of Control, Measurement, and System Integration. 1, 2008, p.265-270.
- (5) 黒崎陽平, ほか. 微生物核酸の迅速簡易抽出法の開発とその応用. 日本法科学技術学会誌. 15, 2, 2010, p.135-142.
- (6) Okada, J., et al. "Development of biological warfare agents detection system using electrochemical DNA chip". Abstracts of the 10th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents. Stockholm, Sweden, 2010-06, The CBW Protection Symposium. 2010, p.99.



岡田 純 OKADA Jun

部品材料事業統括部 新デバイス開発センター DNAチップ開発担当主務。DNAチップ及びDNA検査装置の開発に従事。応用物理学会会員。
New Devices Development Center



廣澤 大二 HIROSAWA Daiji

部品材料事業統括部 新デバイス開発センター DNAチップ開発担当主務。DNAチップ及びDNA検査装置の開発に従事。
New Devices Development Center



二階堂 勝 NIKAIDO Masaru

部品材料事業統括部 新デバイス開発センター長。ディスプレイ及び電子デバイスの開発に従事。
New Devices Development Center