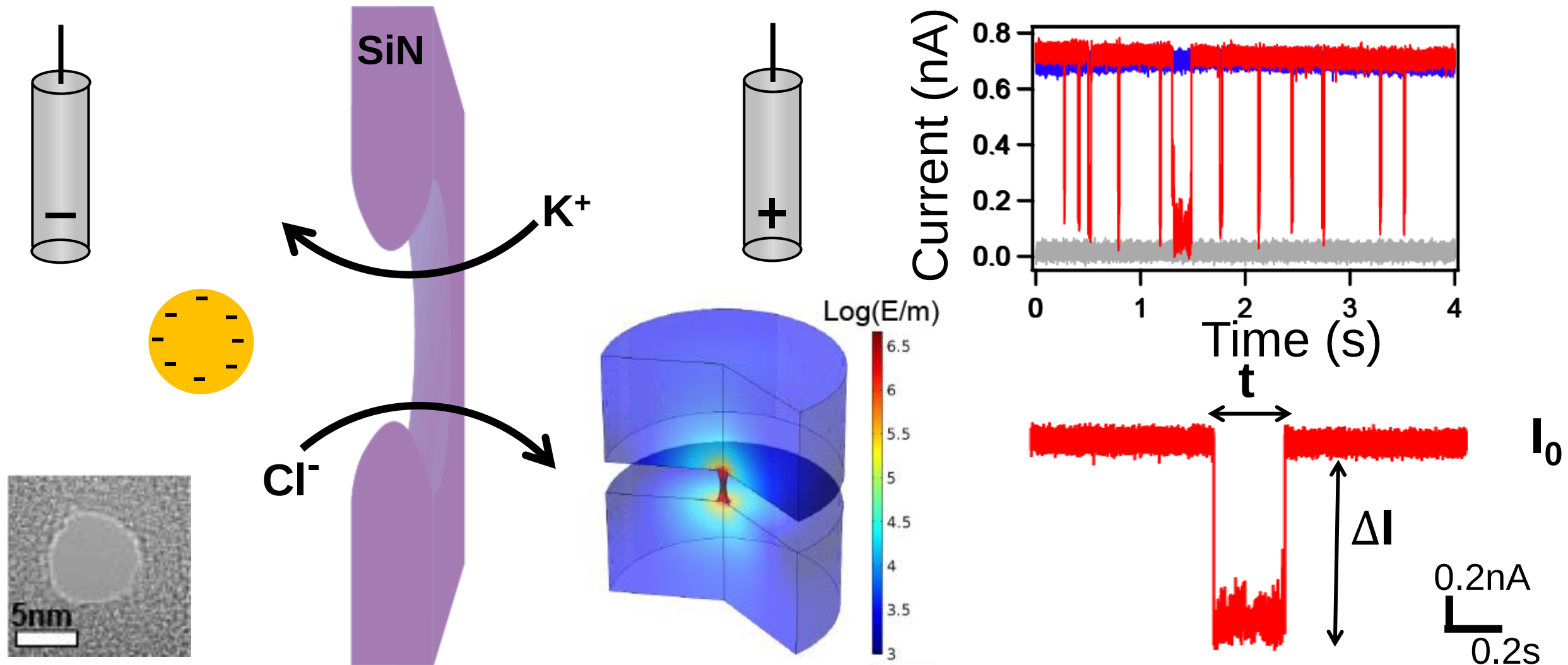


レーザーマニピュレーション法とナノポア 計測による微量生体分子分析技術

長岡技術科学大学 技学研究院機械系
准教授 山崎 洋人

2025年6月26日

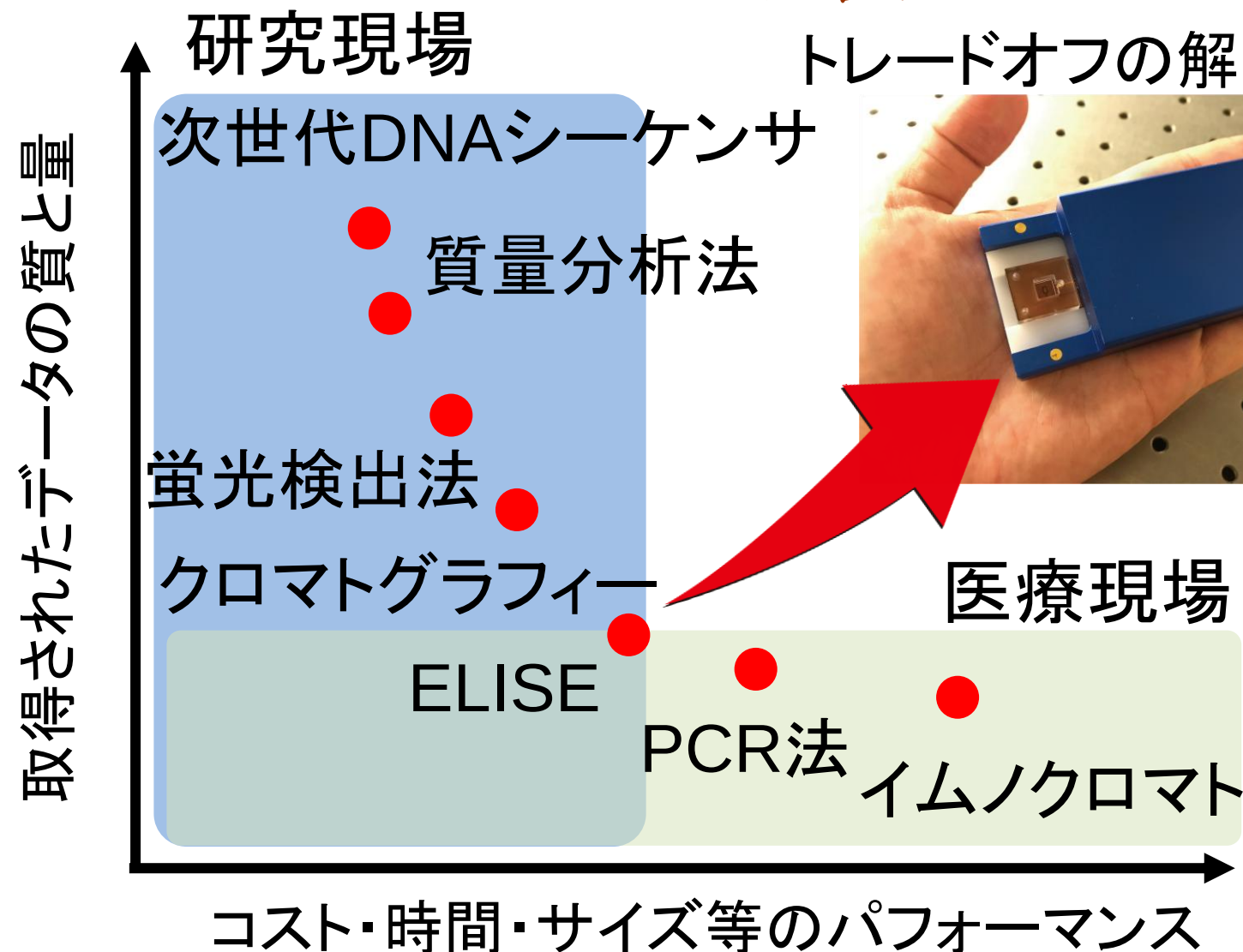
ナノポア計測(Principle of Colter counter)



$t, \Delta I \propto$ 大きさ, 立体構造や表面状態 $\rightarrow$ 生体分子識別
高いスループットかつラベルフリー計測が可能

ポータブル生体分子検出デバイス開発が可能

バイオ分析装置の高感度化かつ小型化



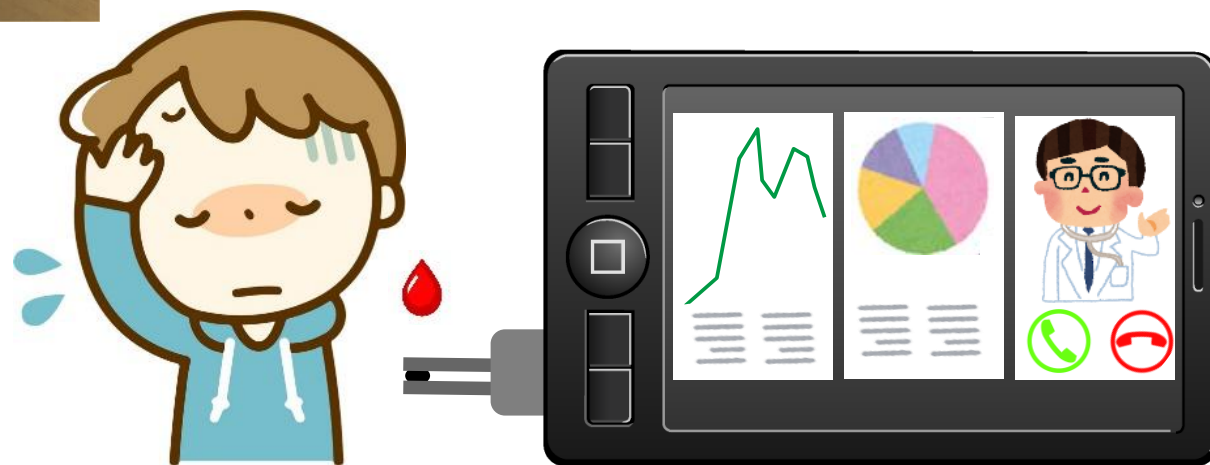
トレードオフの解消！！

応用例

臨床現場即時検査

(Point of Care Testing: POCT)

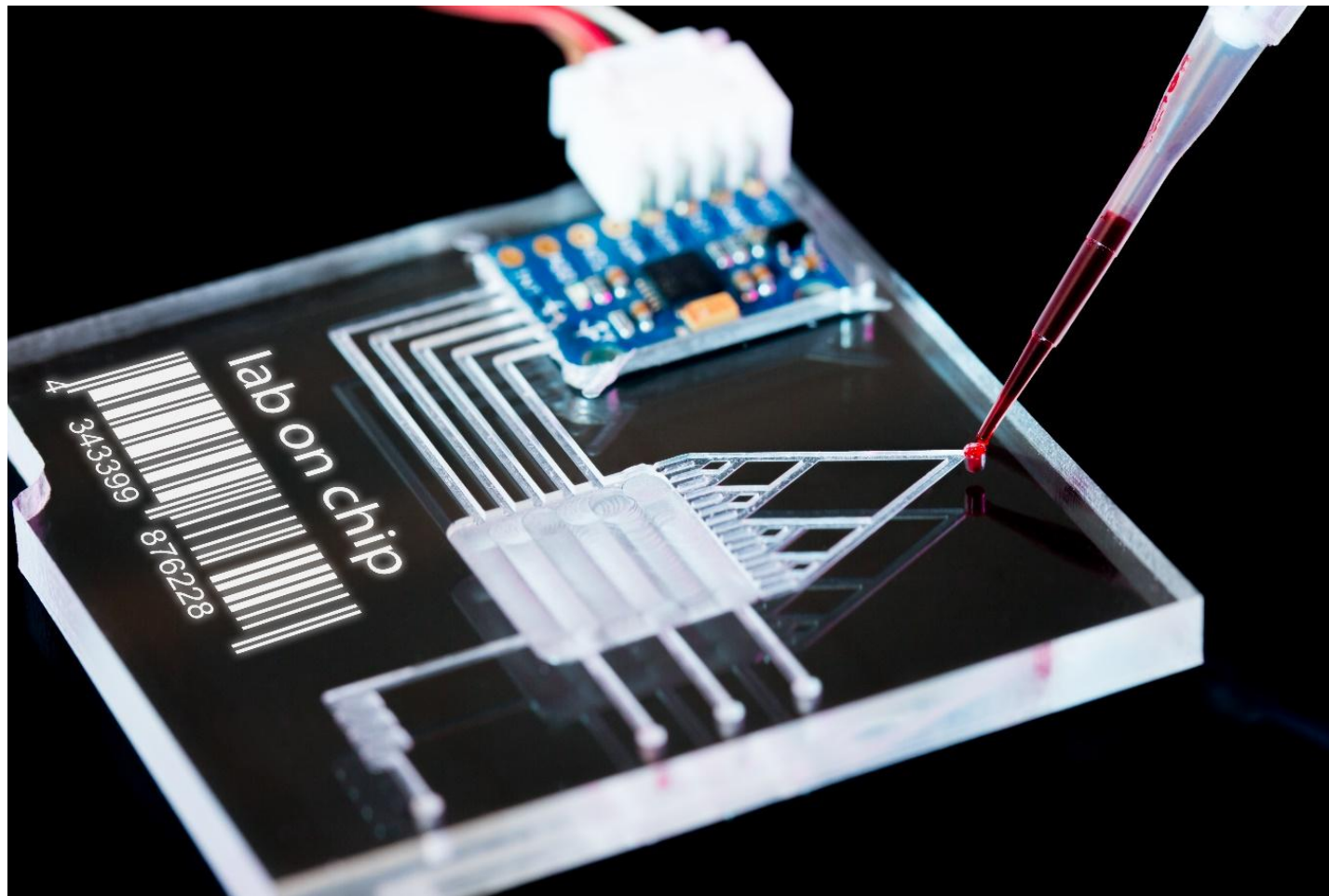
小型分析器や迅速診断キットを用いて
医療現場で行うリアルタイム検査



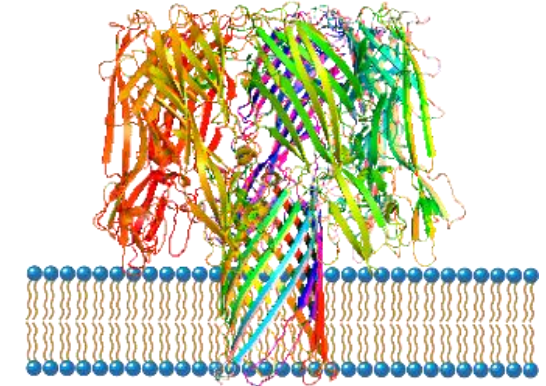
高感度な小型デバイスで遺伝子配列同定やバイオマーカー検出ができれば
従来のトレードオフを解消する革新的な技術となる

ナノポア計測のラボオンチップ化

自動化と高スループット・スクリーニングを実現するために、
Lab-on-chip ミリメートルから数平方センチメートルの単一の集積回路上に1つまたは複数の実験室機能を統合した装置。



タンパク質ナノポア
 α Hemolysin



半導体ナノポア



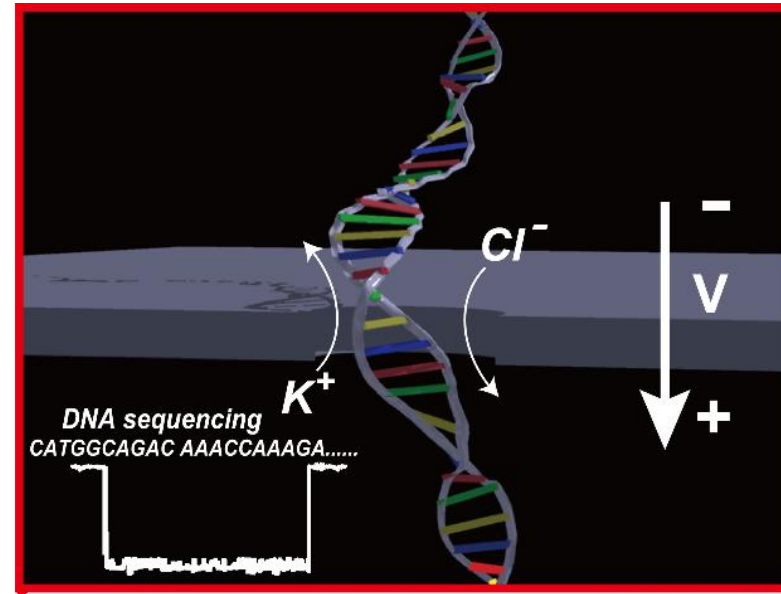
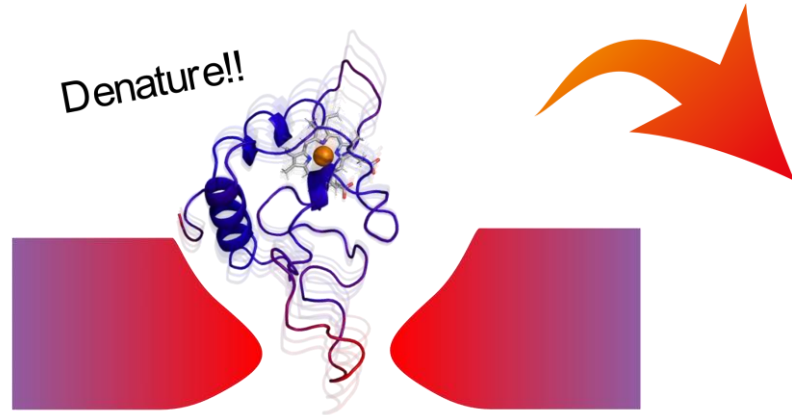
マイクロ流体、電子装置、光学装置を組み合わせた、生体材料(酵素など)に依存しない
“機械駆動型計測システム”の開発ができる。

ナノポア計測技術の研究開発

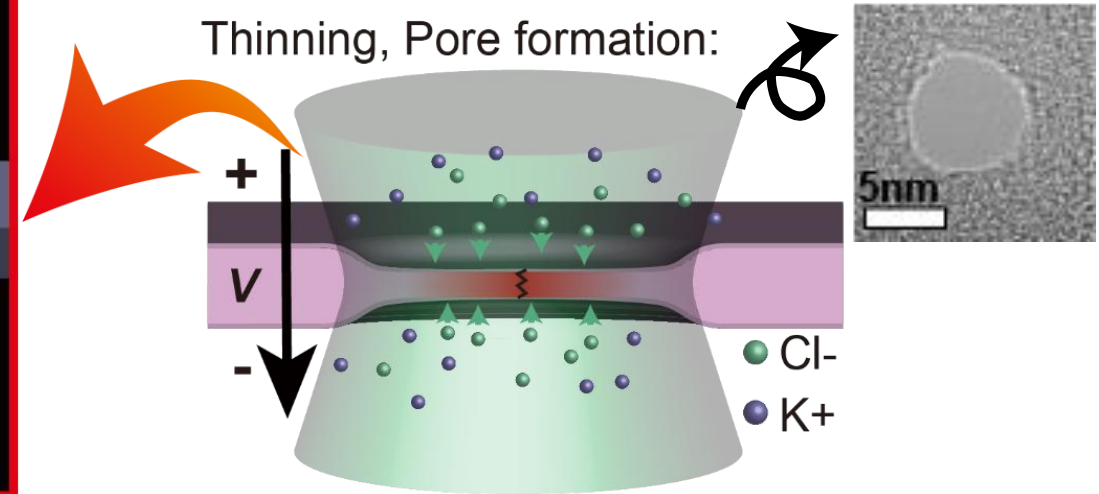
小型デバイス化！！

計測検出能の向上

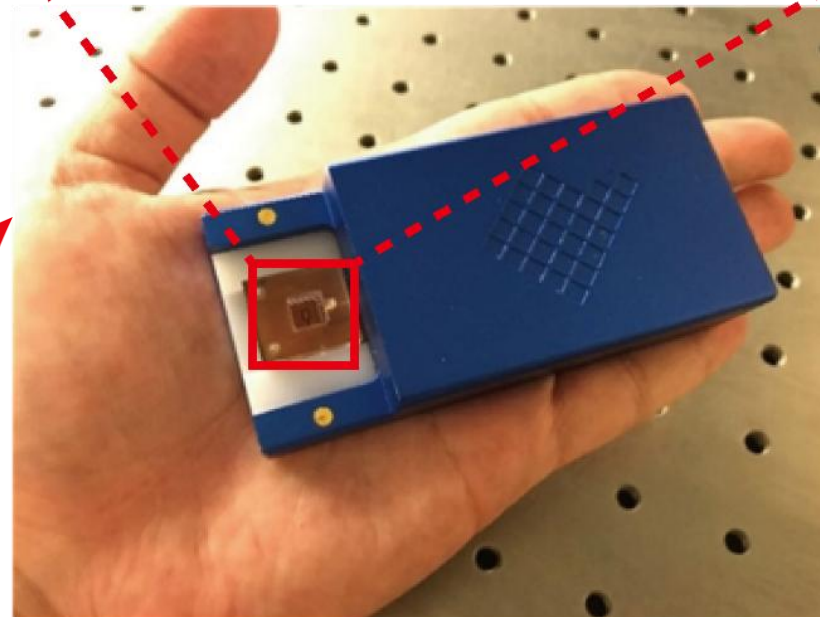
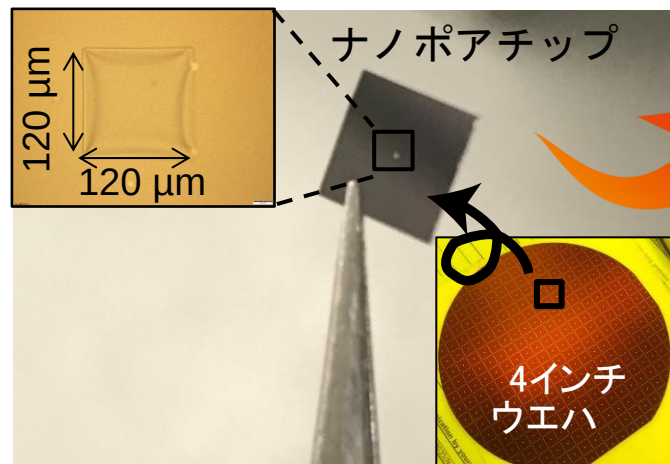
Photothermally heated pore



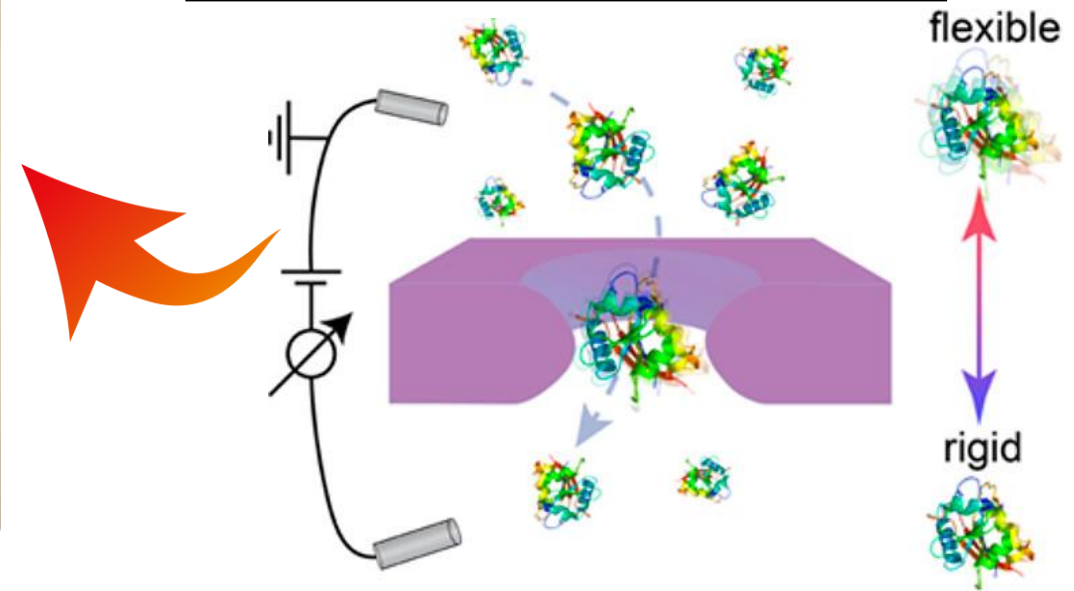
ナノポア加工技術の開発



ナノポアチップ開発



生体分子の特徴を調べる



ナノ半導体膜におけるナノポア加工の課題と独自技術

従来加工方法

例: 透過型電子顕微鏡 (TEM)

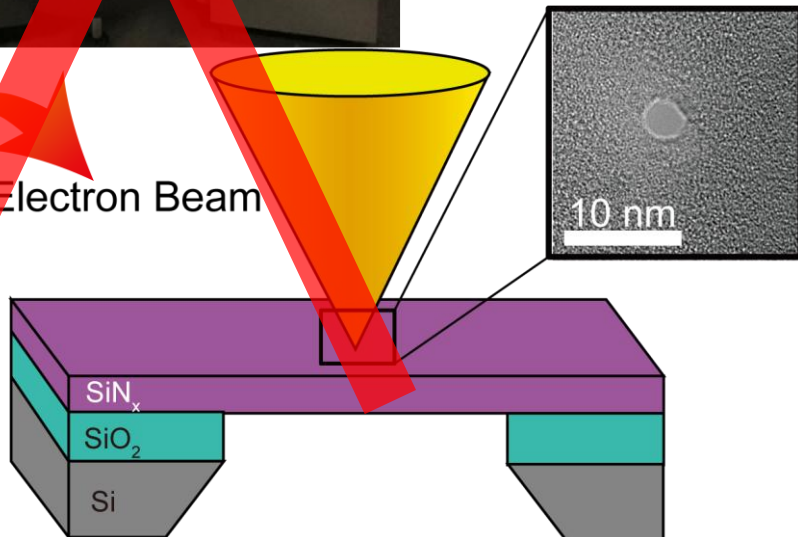


- ① 装置 (TEM) が高価なこと
- ② 作製時間が長いこと

▶ 実用面で大きな課題



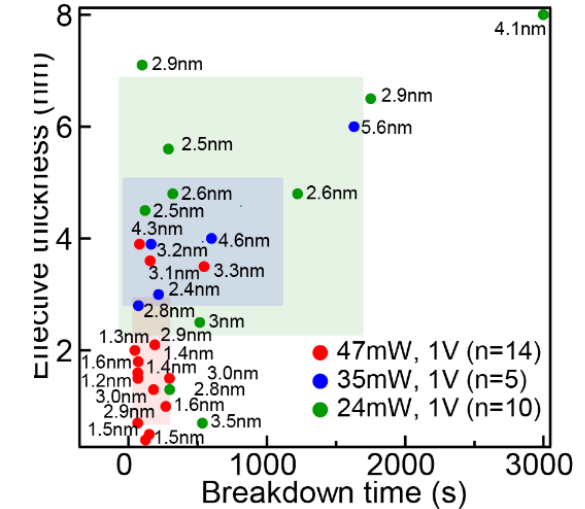
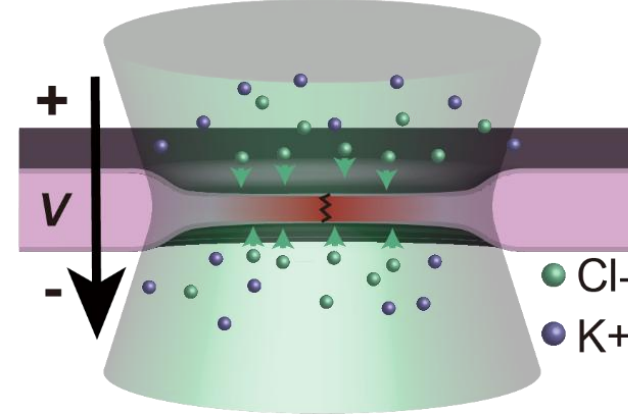
Electron Beam



その場ナノポア加工技術

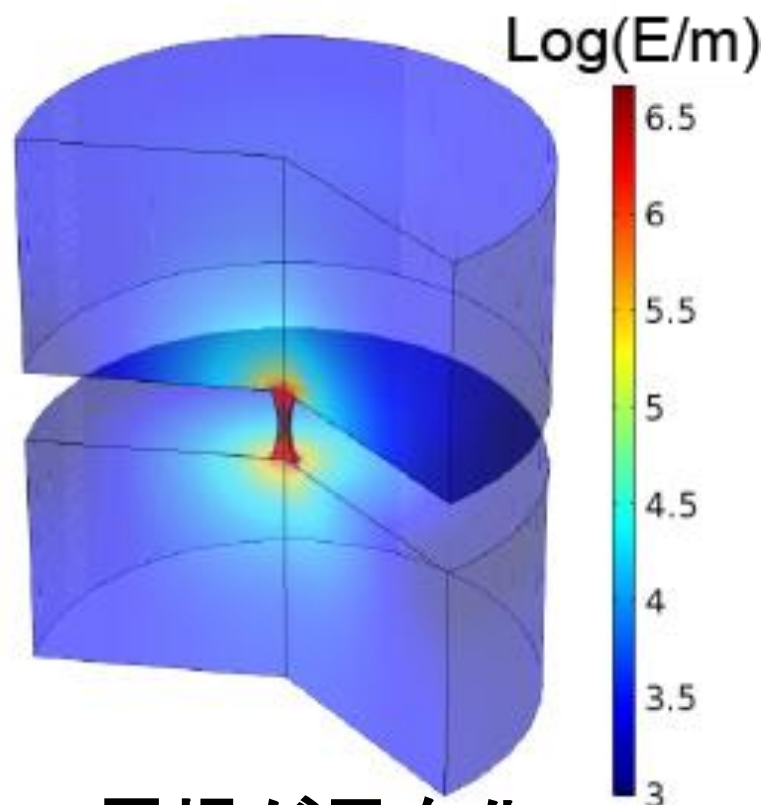
例: レーザエッチング加工 (独自技術)

Thinning, Pore formation:

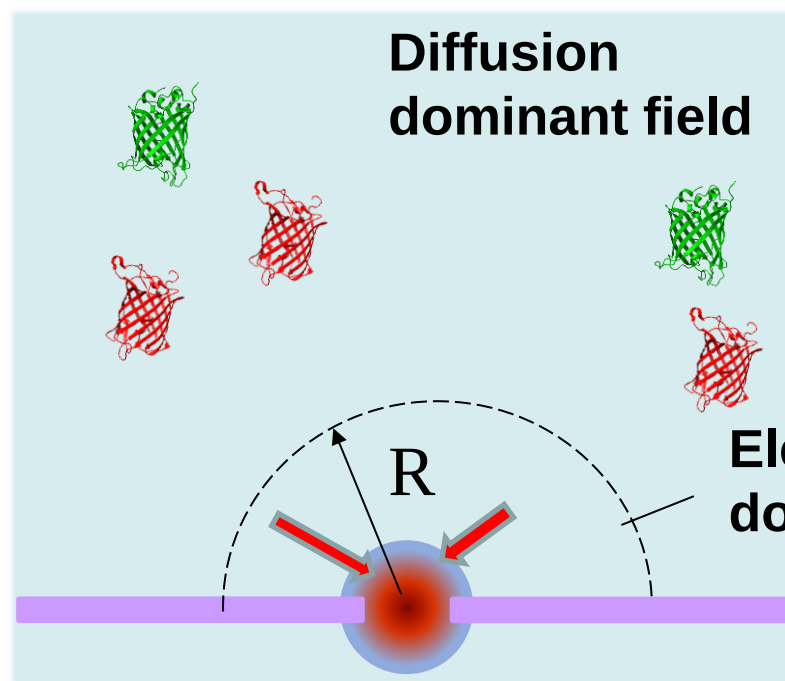


ナノポア計測における課題

ナノポア近傍の 電場分布



電場が局在化

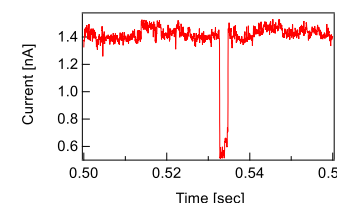


R: 捕捉距離

分子A: 分子B



分子A? or 分子 B?



ナノポア計測の課題

- ・ 捕捉距離が短いことによる検出濃度の限界 (概ねサブナノモラー程度)
- ・ 分子量が近いものが混在する場合に波形からの識別が困難

新技術について

レーザーマニピュレーション



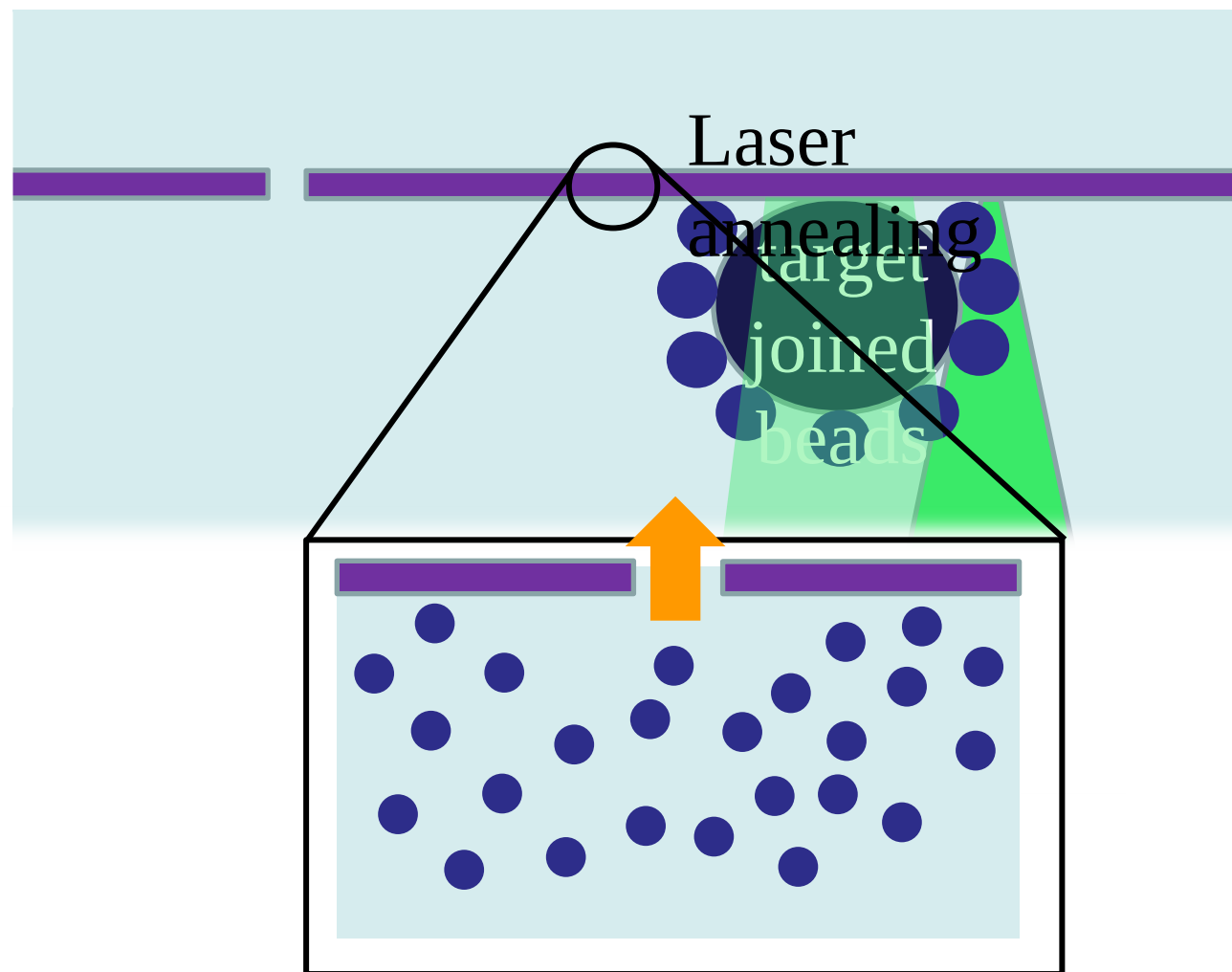
ビーズから溶出



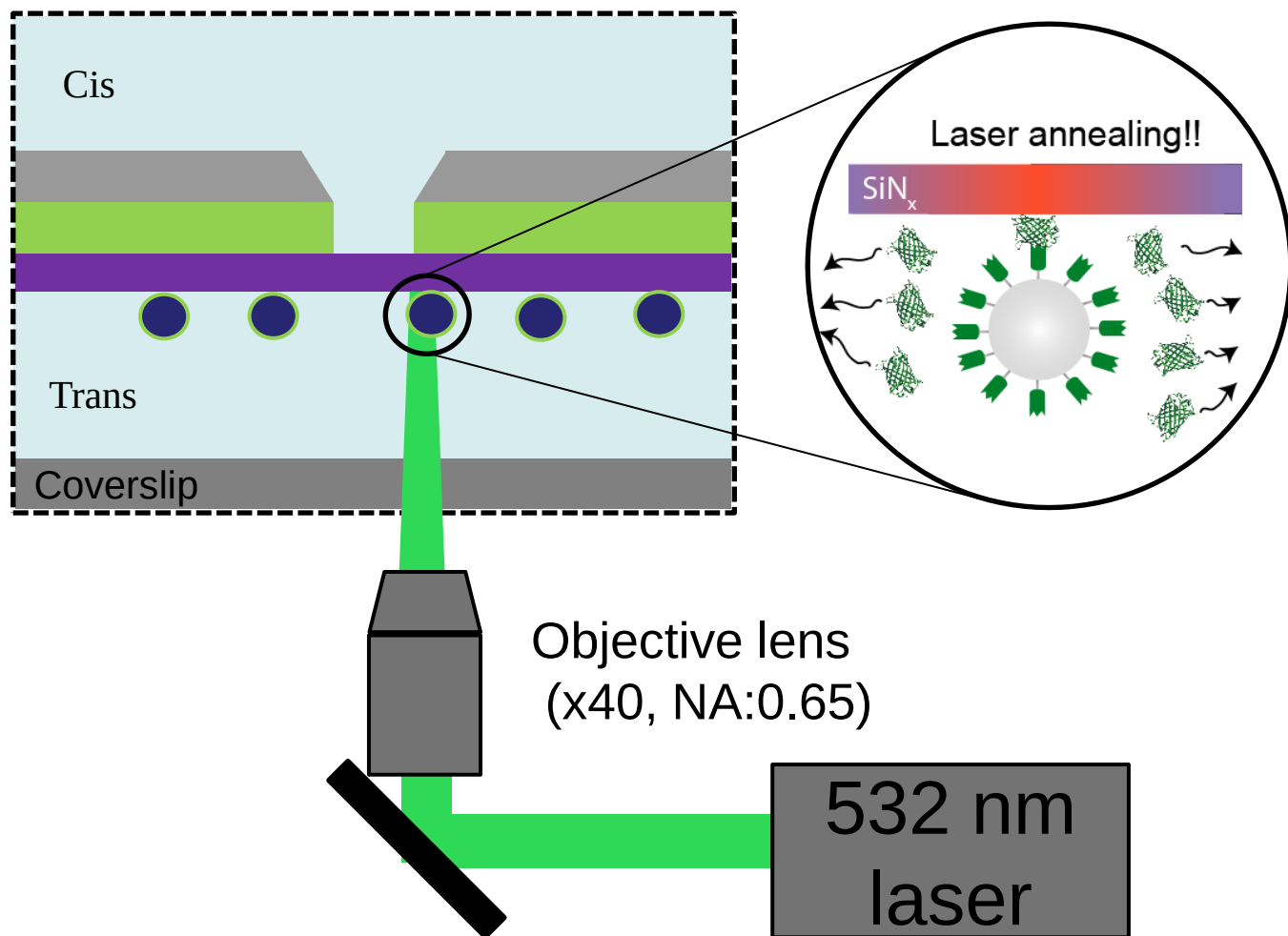
高サンプル濃度場形成



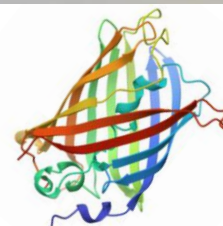
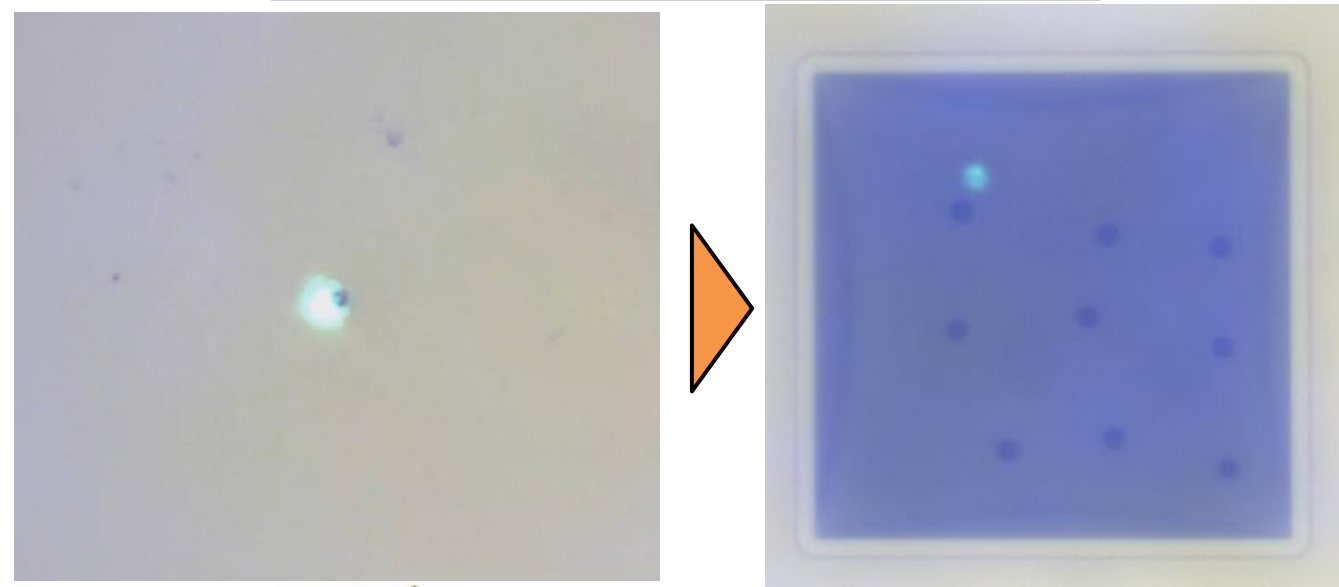
標的分子の検出



レーザーマニピュレーションによる磁気ビーズ の操作と分子溶出



レーザーマニピュレーション

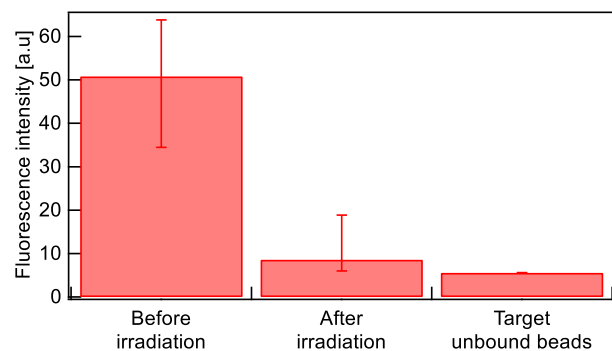


標的分子

Green Fluorescent Protein (GFP)

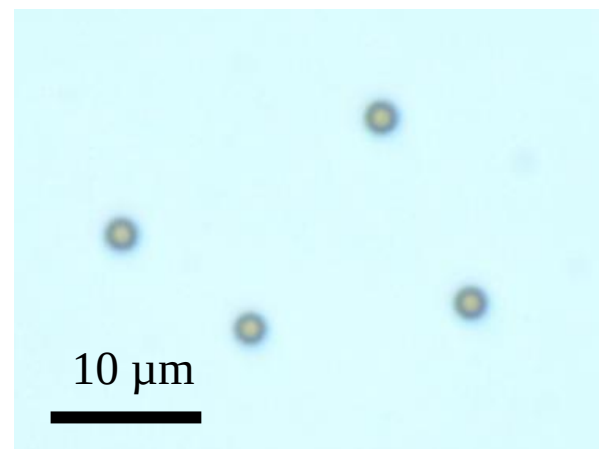
溶出の前後でビーズを撮影し、蛍光強度を解析

レーザーによる標的分子溶出の検証



レーザー
照射前

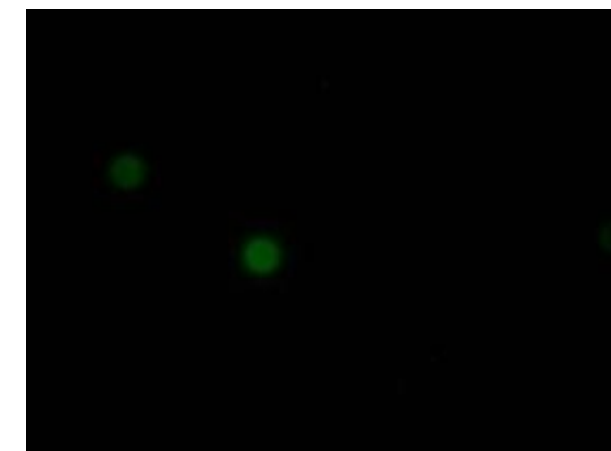
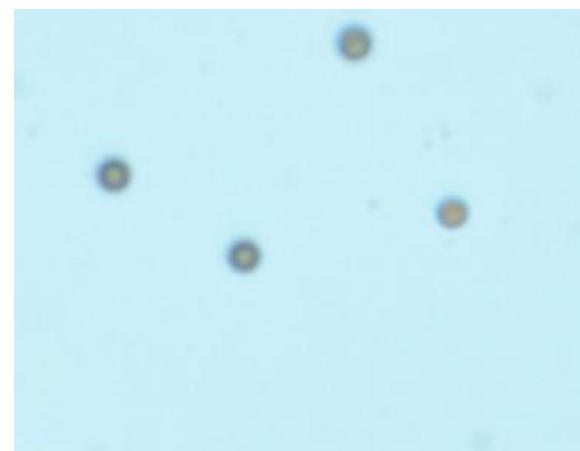
明視野像



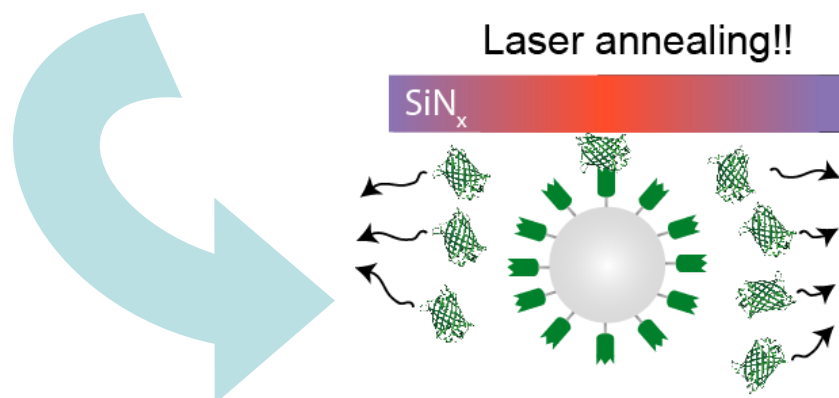
蛍光像



照射後



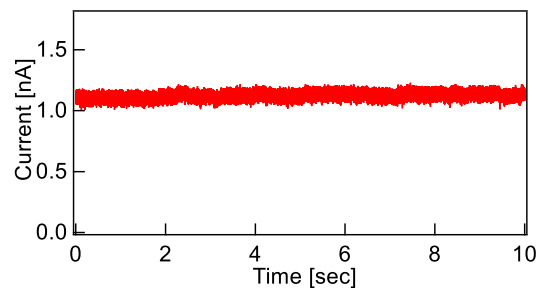
➡ :レーザー照射した磁気ビーズ



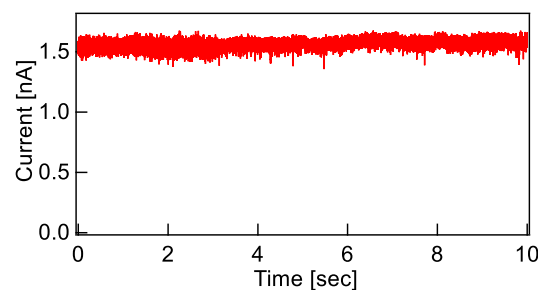
- ・照射後の蛍光強度が約90%減少することから、GFP溶出が確認された。
- ・従来は変性剤を使用して溶出するが、本実験結果より、変性剤を使用しない溶出法を構築できた。

単一磁気ビーズ溶出時のナノポア計測結果

未結合ビーズ

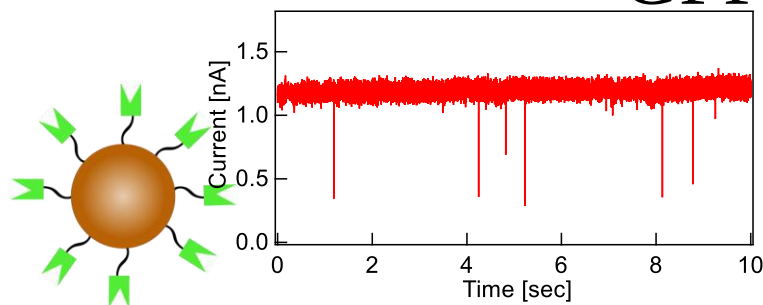


200 mV

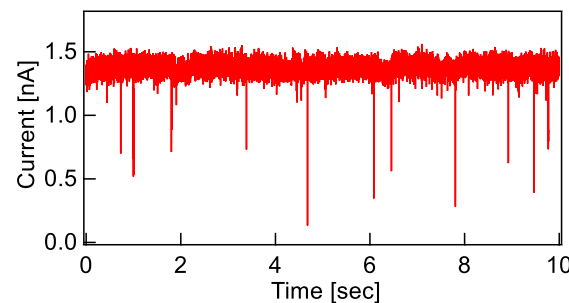


250 mV

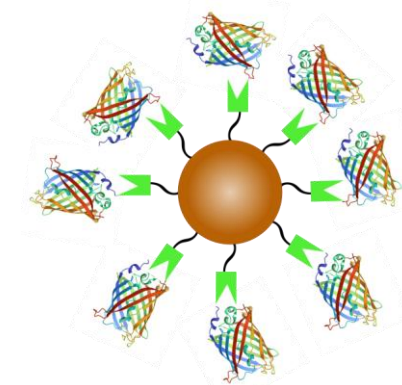
GFP結合ビーズ



200 mV



250 mV



GFP有ビーズの場合、大きな電流遮断が発生

2種のビーズを用いた複数サンプル同時計測

磁気ビーズ A



標識分子 (抗体)

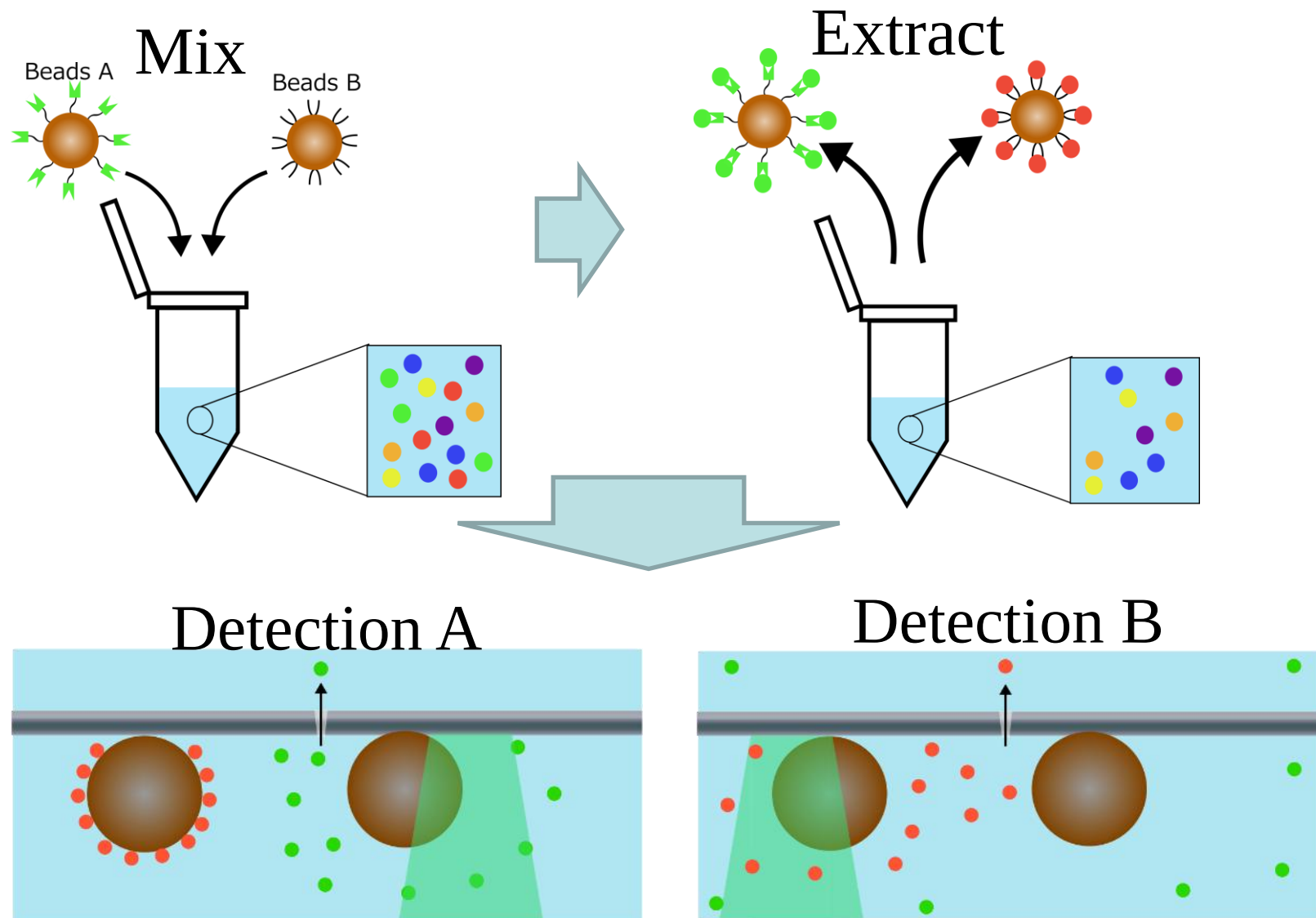
標的分子 A

磁気ビーズ B



標識分子を
変更

標的分子 B

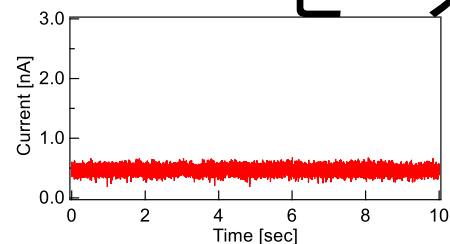


2種のビーズを用いた 複数サンプル同時計測結果

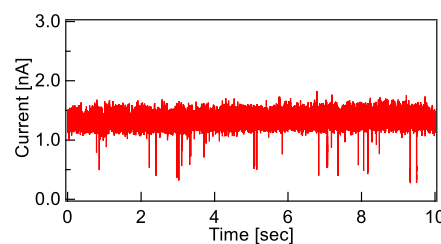
GFP溶出時のナノポアの高さ: 3.4 nm

RNA溶出時のナノポアの高さ: 5.5 nm

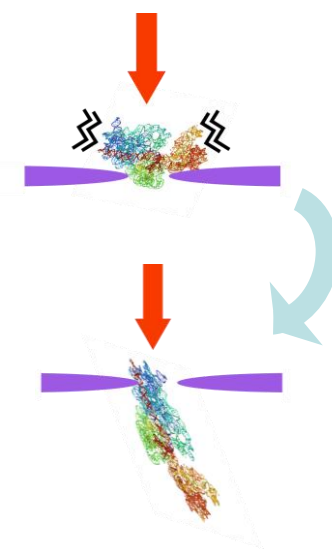
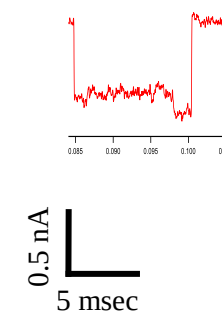
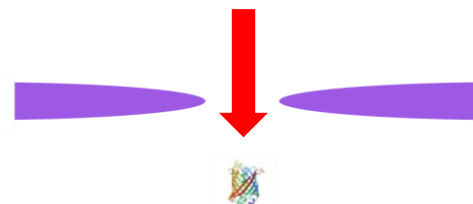
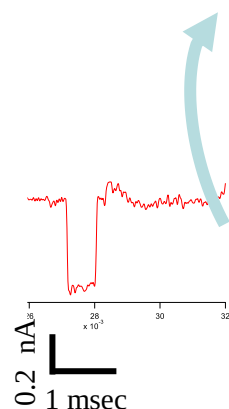
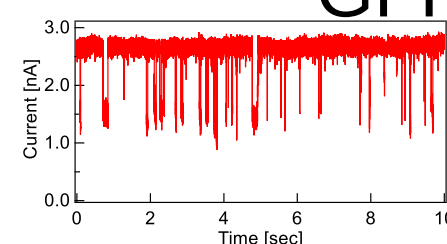
ビーズ導入前



GFP



GFP + RNA



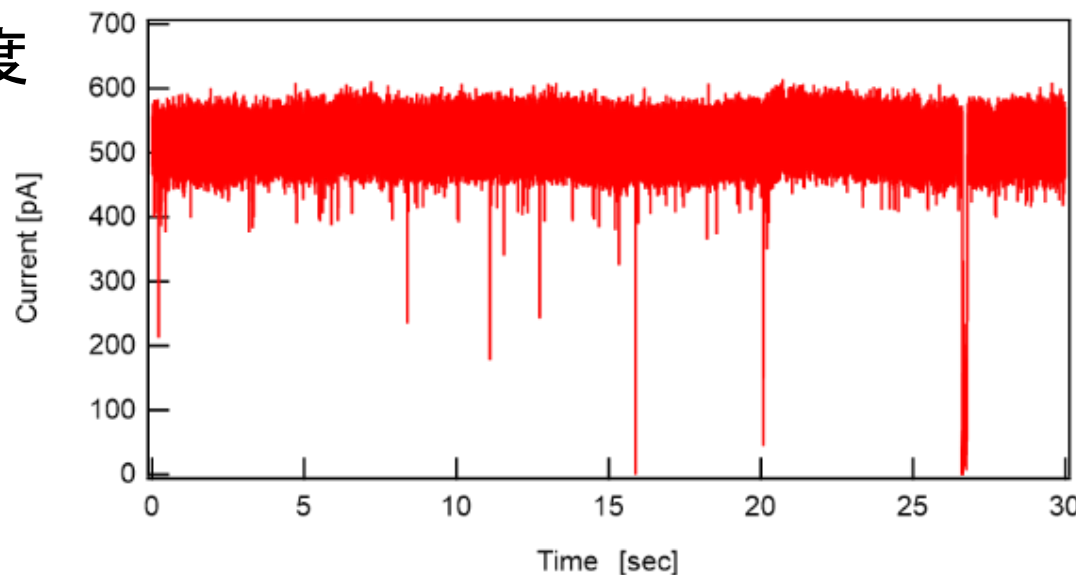
- RNAを溶出した後は頻度が増加
- RNAではGFPのものより長い遮断波形が多い

提案手法の最低検出濃度調査

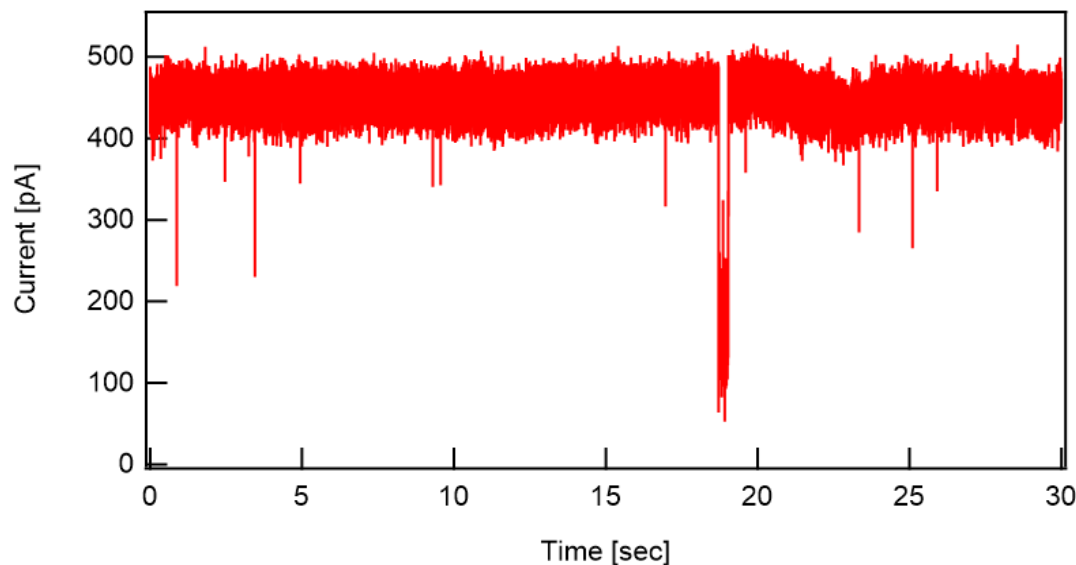
溶出後の電流波形

調整サンプル濃度

18.5 nM

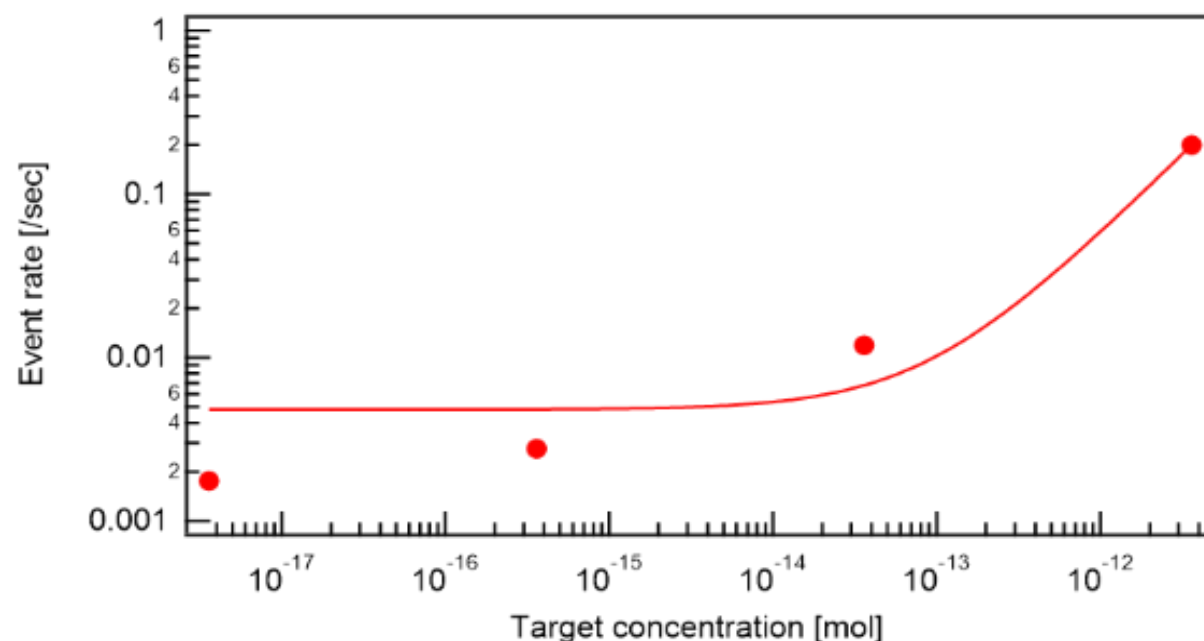


1.85 pM



ナノポアの高さ: 3 nm

標的サンプル: GFP



濃度1.85 pMの標的サンプルからの検出が可能

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術では達成できなかった“高い選択性を有する”かつ“夾雑物サンプルからの検出できる”ナノポア計測方法を開発することに成功した。

開発者	方法	最低検出濃度	選択性	夾雑物
Wanunu et al. ^[1]	電解質濃度に差をつけることによる強い引き込み場の利用	3.8 pM	×	×
Freedman et al. ^[2]	金コートナノピペットを用いた誘電泳動トラッピング	5 fM	×	×
Chuah et al. ^[3]	磁力によるナノポアと磁気ビーズ間の抗原抗体結合の検知	0.4 fM	×	○
本技術	レーザーマニピュレーションと磁気ビーズによる高サンプル濃度場の形成	1.85 pM	○	○

ナノポア計測以外との比較例

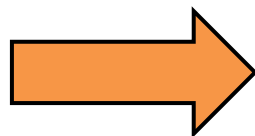
質量分装置（従来のタンパク質解析装置）の必要最低タンパク量

質量分析装置

1.25 ng^[4]

10000倍低減！！

本手法



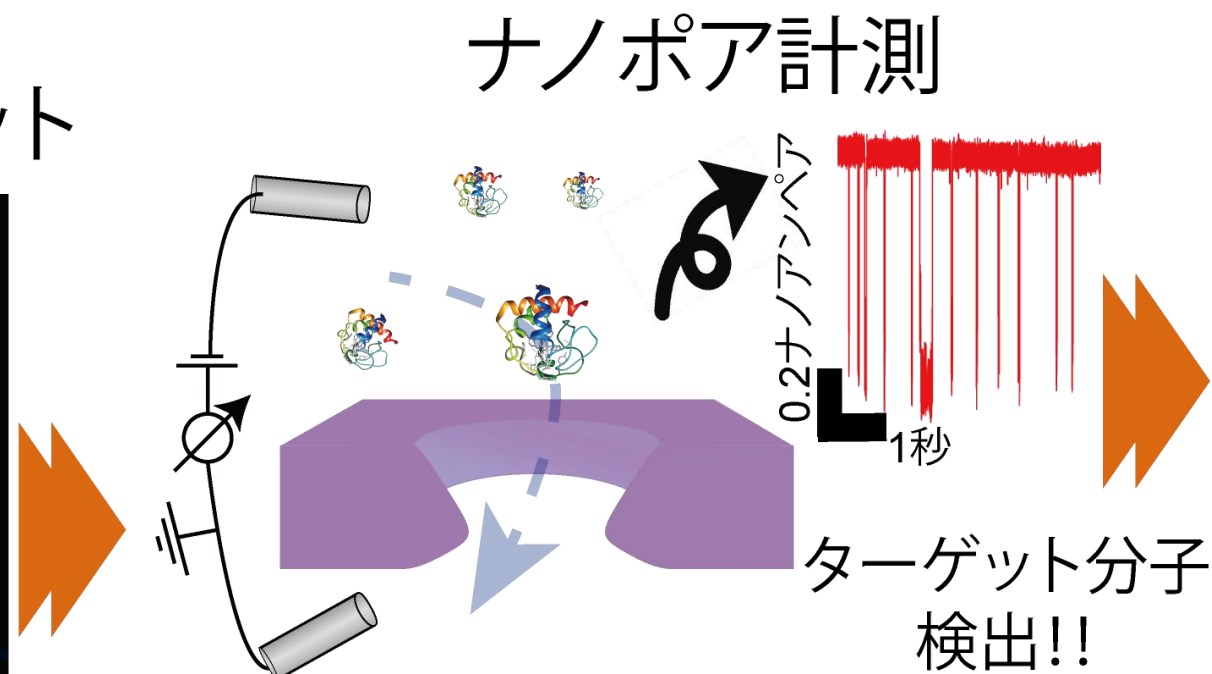
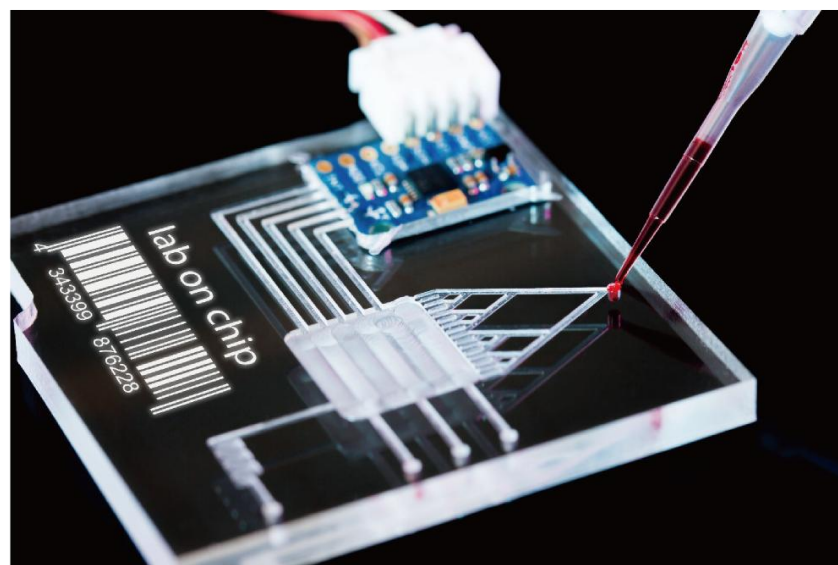
100 fg (1.85pM)

想定される用途

- 医療現場において、遺伝子検査やバイオマーカー検査
- 質量分析法やERAIZA法など、タンパク質の定量解析
- 屋外における環境バイオマーカー検出

医療診断の例

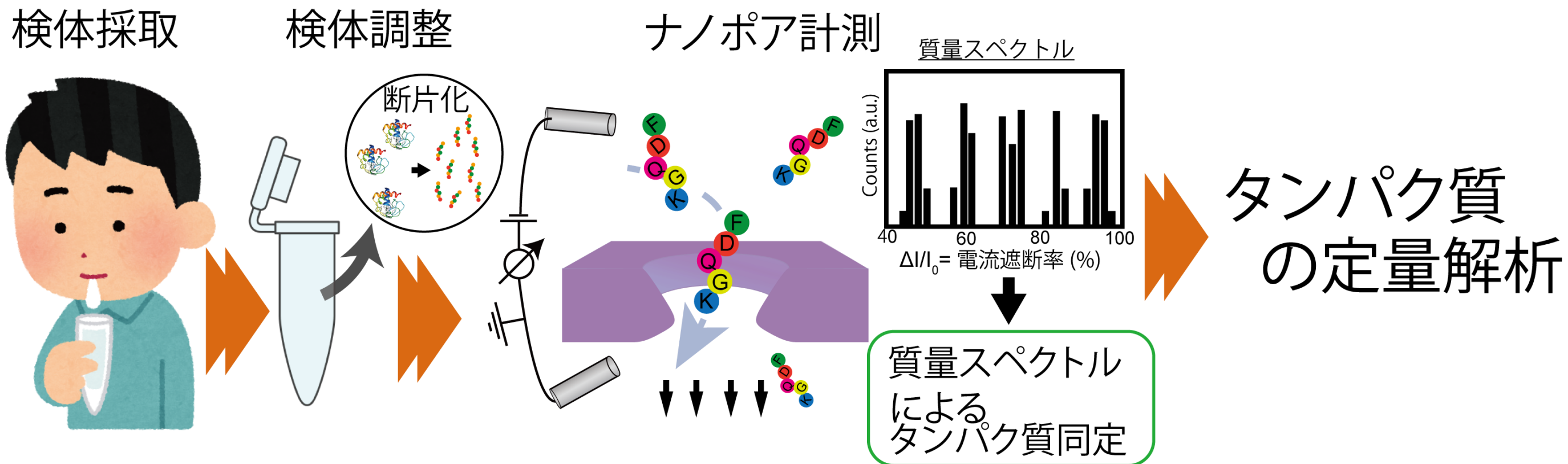
検体採取 検体をナノポアデバイスにセット



医療診断!!

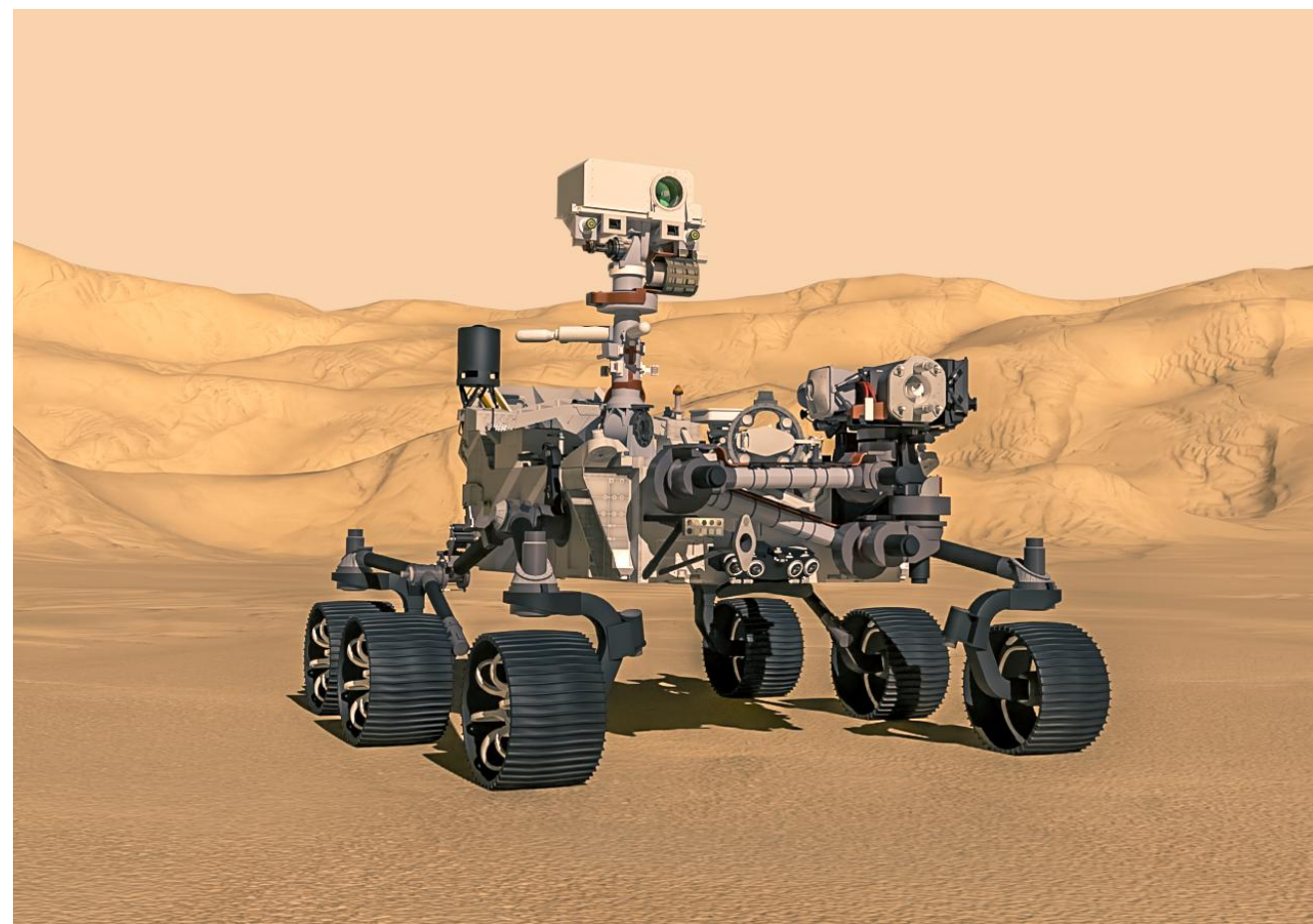
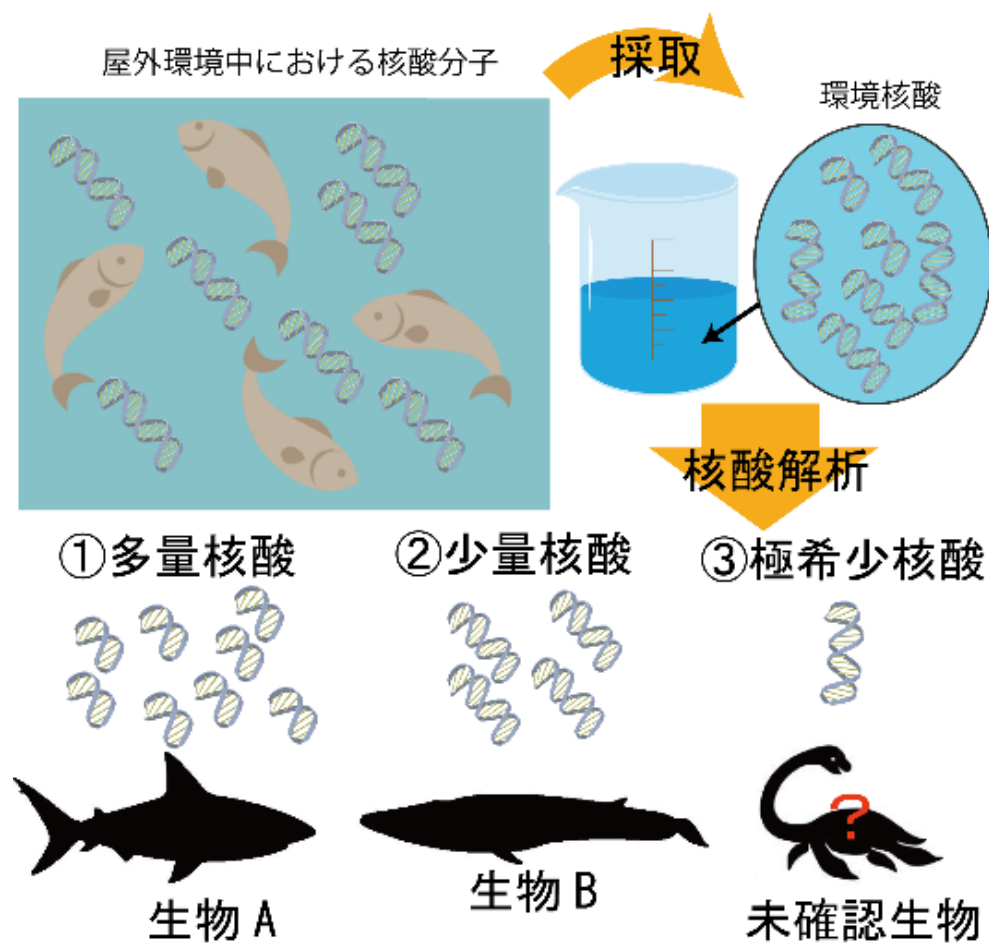
想定される用途

- 医療現場において、遺伝子検査やバイオマーカー検査
- 質量分析法やERAIZA法など、タンパク質の定量解析
- 屋外における環境バイオマーカー検出



想定される用途

- 医療現場において、遺伝子検査やバイオマーカー検査
- 質量分析法やERAIZA法など、タンパク質の定量解析
- 屋外における環境バイオマーカー検出



実用化に向けた課題

- 現在、ナノポアデバイスについて、研究室レベルで分子検出が可能のところまで開発済み。しかし、実用化を見越したポータブルデバイスの開発や利用方法の具体化が未解決である。
- 今後、疾患に関わる生体分子の検出データを取得し、実応用に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、目的の検出対象を高い精度で同定できるような波形解析方法（機械学習を含む）を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の波形解析方法については、機械学習などのAI技術開発との共同研究により技術進展が加速すると考えている。
- 抗体やアプタマーなどの分子認識技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、疾患などに関わる特定のターゲット因子に関する研究や知見が豊富な企業には、本技術の導入が有効と思われる。

新技術のまとめ

我々の新技術は、特異的にサンプル抽出が可能な磁気ビーズを操作するレーザーマニピュレーション法と一分子流体計測技術であるナノポア計測組み合わせることで、タンパク質やDNAを微量で検出することができるため、遺伝子検査やタンパク質の検出を微量(最低量100fg程度)で実施できる。

新技術の特徴

- ・ナノポア計測は、イオン電流計測のため、蛍光色素などの修飾が不要である
- ・磁気ビーズを用いた計測方法であるため、現存のキットとの親和性が高い
- ・分子構造の違いを電流波形として検出するため、分子の物理的特徴を調べることもできる

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 生体分子検出デバイスおよび生体分子測定方法
- 出願番号 : 特願2024-086591
- 出願人 : 長岡技術科学大学
- 発明者 : 山崎洋人、海藤光太

お問い合わせ先

長岡技術科学大学

産学連携・研究推進課 知的財産係

T E L 0258-47-9279

e-mail patent@jcom.nagaokaut.ac.jp

参考文献

- [1] Wanunu, M.; Morrison, W.; Rabin, Y.; Grosberg, A. Y.; Meller, A., Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. Nature Nanotechnology 2010, 5 (2), 160-165.
- [2] Freedman, K. J.; Otto, L. M.; Ivanov, A. P.; Barik, A.; Oh, S.-H.; Edel, J. B., Nanopore sensing at ultra-low concentrations using single-molecule dielectrophoretic trapping. Nature Communications 2016, 7 (1), 10217.
- [3] Chuah, K.; Wu, Y.; Vivekchand, S. R. C.; Gaus, K.; Reece, P. J.; Micolich, A. P.; Gooding, J. J., Nanopore blockade sensors for ultrasensitive detection of proteins in complex biological samples. Nature Communications 2019, 10 (1), 2109.
- [4] コスモバイオ株式会社HP:Genomine社 質量分析受託サービスについて,【11】各質量分析に必要なタンパク質量を教えてください。