

# 金属酸化物を電極材料としたバイオセンシング

---

2022年1月26日

第39回無機材料に関する最近の研究成果発表会@オンライン開催 (Zoom)



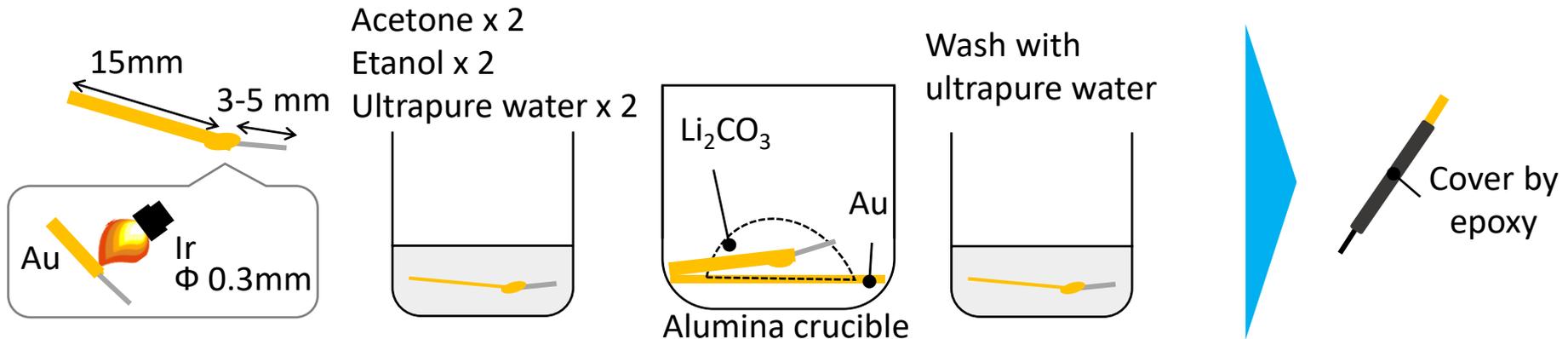
東京医科歯科大学生体材料工学研究所

バイオエレクトロニクス分野

田畑 美幸

# マイクロpHセンサの作製

## 熱酸化法



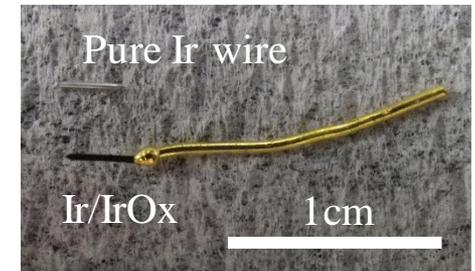
ネルンスト式

$$E = E_0 + \left( \frac{RT}{zF} \right) \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

$E_0$ : the standard electrode potential  
 $R$ : the ideal gas constant  
 $T$ : the temperature in Kelvin  
 $z$ : the number of moles of electrons  
 $F$ : the Faraday constant  
 $a$ : the ion activity.

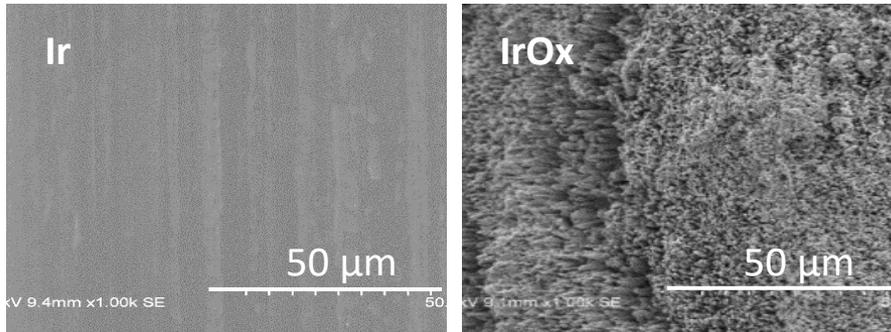
$$E = E_0 - 59.2 \log C$$

(at 25°C)

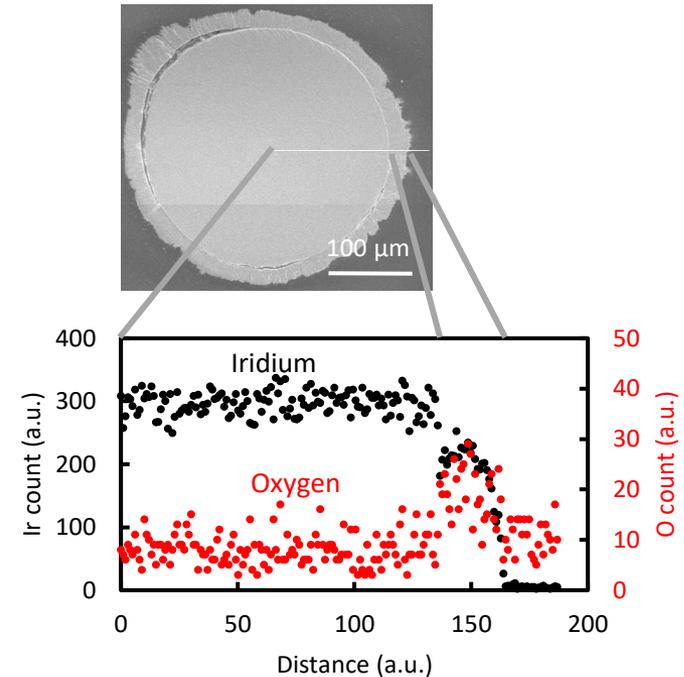


# マイクロpHセンサの特性評価

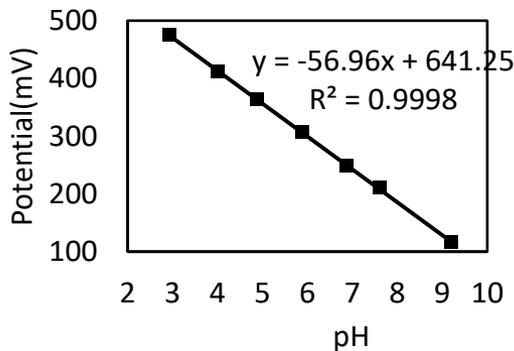
## SEMによる表面観察



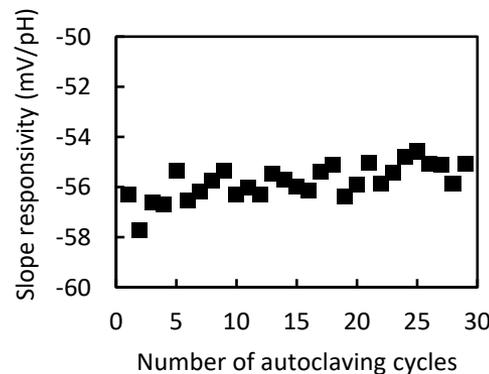
- 熱酸化処理後、Irワイヤの表面粗さが大きく変化していた。
- 外層にて酸素含量の増加が認められた。



## pH感度評価



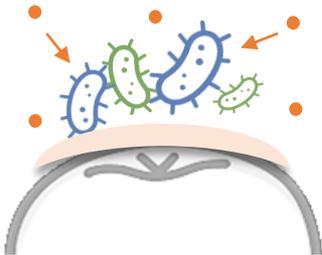
## 再利用評価



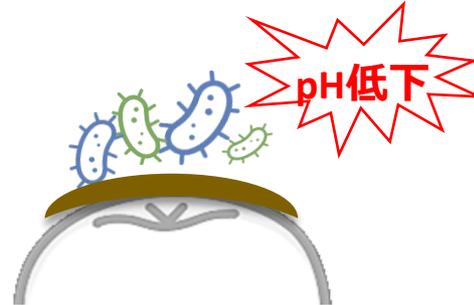
- SEM観察によりIrOx層の形成を確認
- 理論値に近い-57 mV/pHの傾き  
pH感度に優れたセンサ
- 30回オートクレーブしても感度はほとんど変化しない  
繰り返し使用に耐えるセンサ

# う蝕（虫歯）の成り立ちと進行

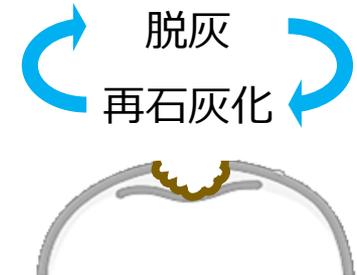
①細菌による糖分取り込み、プラークの形成



②代謝産物の有機酸を産生



③唾液によるリフレッシュ



健康な歯



進行性う蝕



非進行性う蝕



Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry 6th Edition, 2012, Elsevier

# う蝕の診断

## 現状

視診及び歯科用探針による  
触診と画像診断の組み合わせ

## 視診・触診



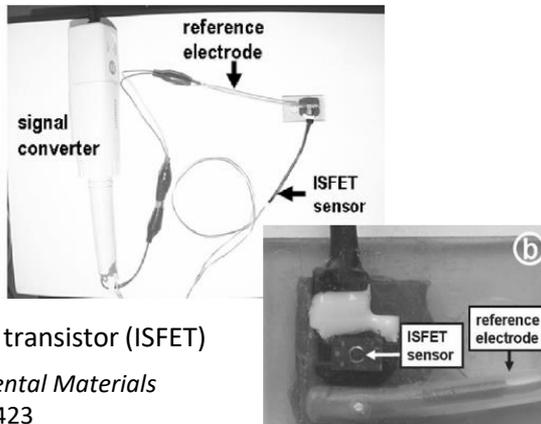
## 画像診断



定量的な診断法がない

- 最も標準的な方法
- 歯科医師の経験や技術に左右される
- 歯間や裏面の撮像が困難
- 初期う蝕の発見が困難

## 新たな定量診断法の開発



Ion-sensitive field effect transistor (ISFET)

K. Murakami et al., *Dental Materials Journal*, 2006, 25(3), 423

## Calcium imaging device



CALCIVis HPより

## Laser imaging device

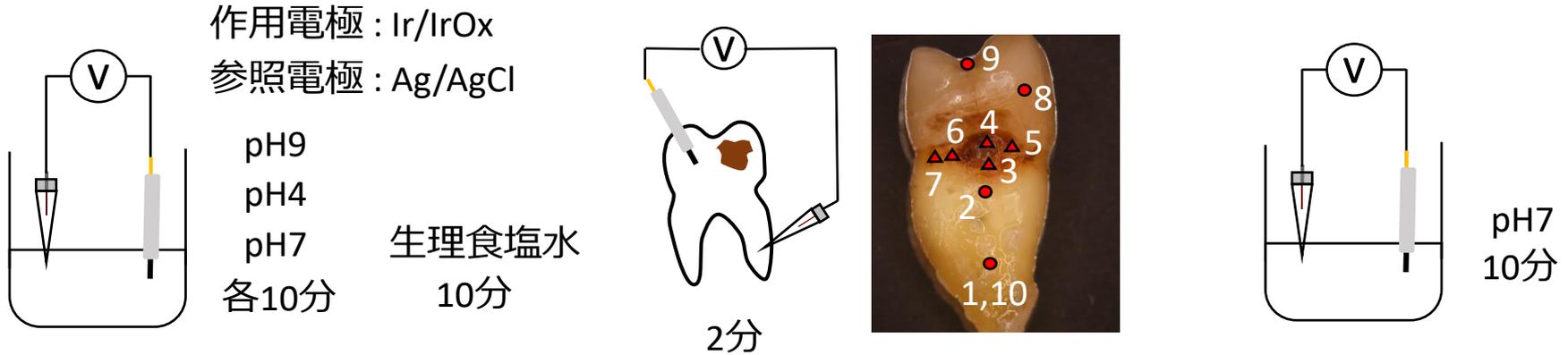


MORITA HPより

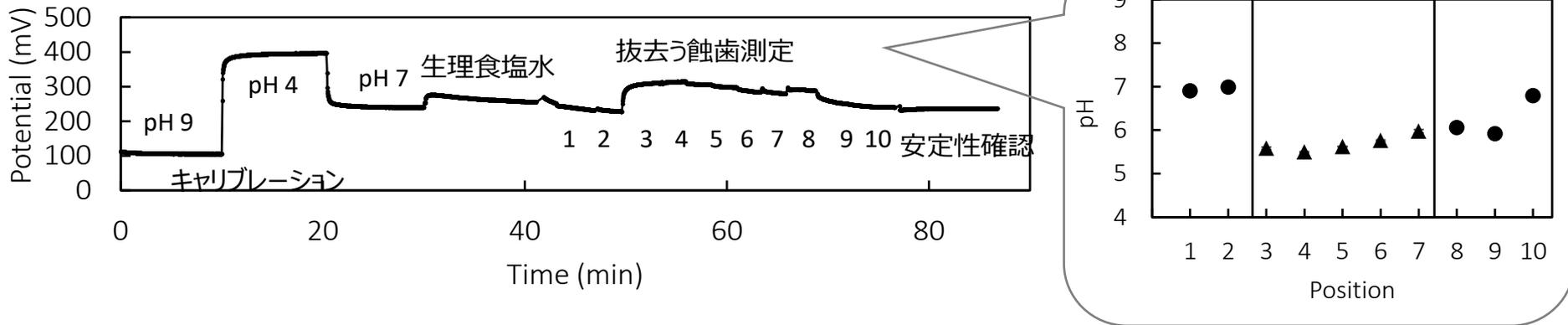
イメージングとAIを組み合わせた診断法も  
開発が進められている。

歯科領域で一般的に用いられている歯科用探針に実装することを目的として、小型化・加工性に優れたIr/IrOxワイヤを用いてう蝕の簡便診断を行うマイクロpHセンサを作製する。

# 抜去う蝕歯のpH測定



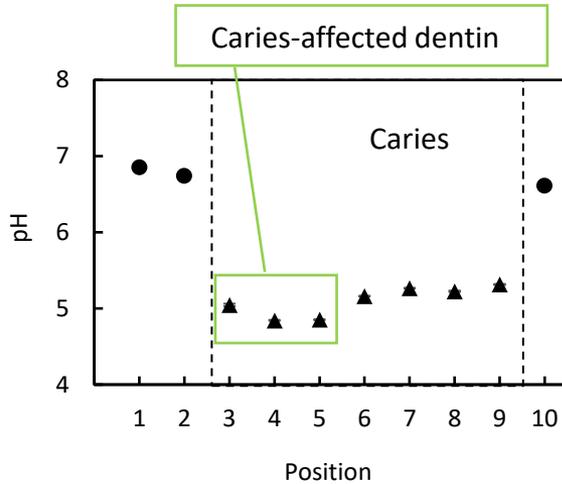
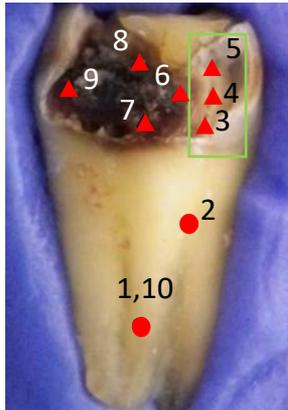
pHマッピングデータ取得のタイムコース



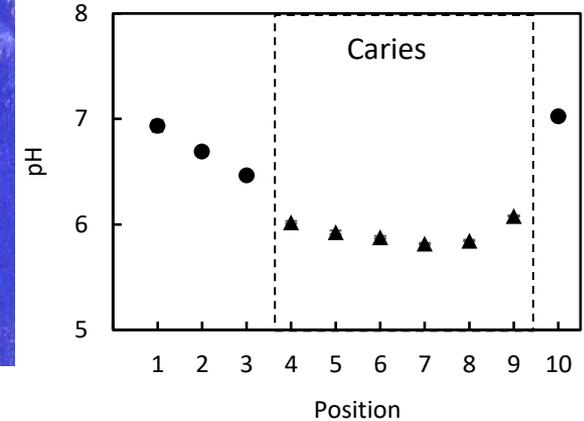
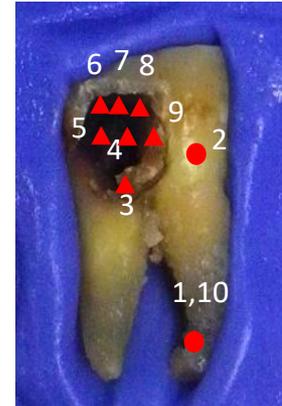
東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会 (承認番号 : 725)

# pHを指標としたう蝕マッピング

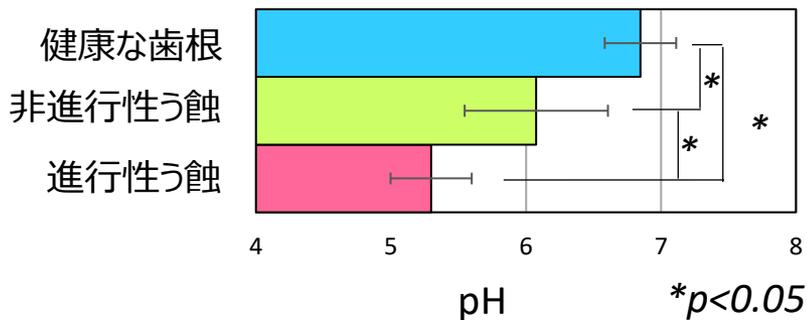
## 進行性う蝕



## 非進行性う蝕



## 抜去う蝕歯18サンプルのpHマッピング解析



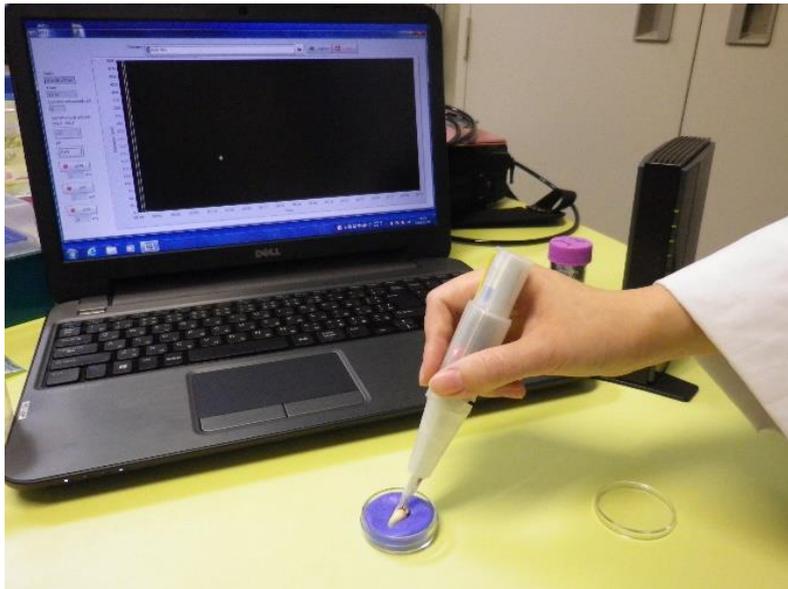
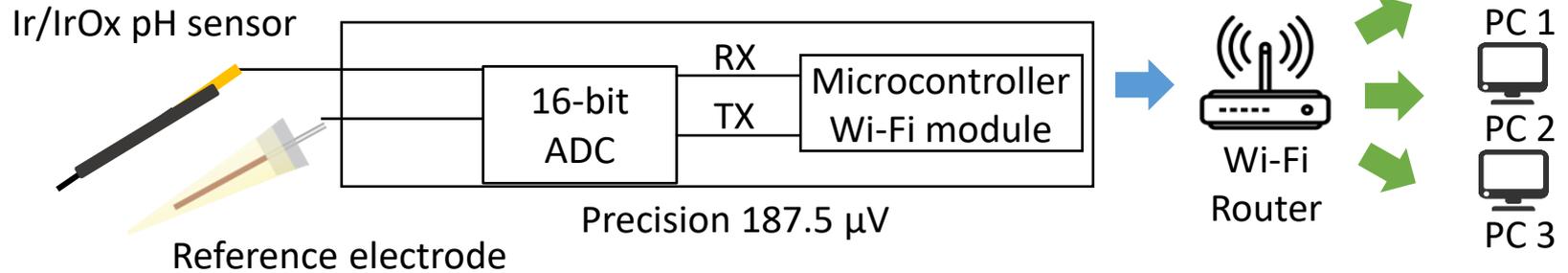
歯科医師の目視によるう蝕分類後、う蝕表層pH計測によるう蝕のpHマッピングを実施した結果、健康な歯根、非進行性う蝕、進行性う蝕はそれぞれ6.85、6.07、5.30のpH値を有していることがわかった。

pH計測に基づくう蝕の定量評価に成功

C. Ratanoporncharoen, *Analytical Chemistry*, 2018, 90(7), 4925

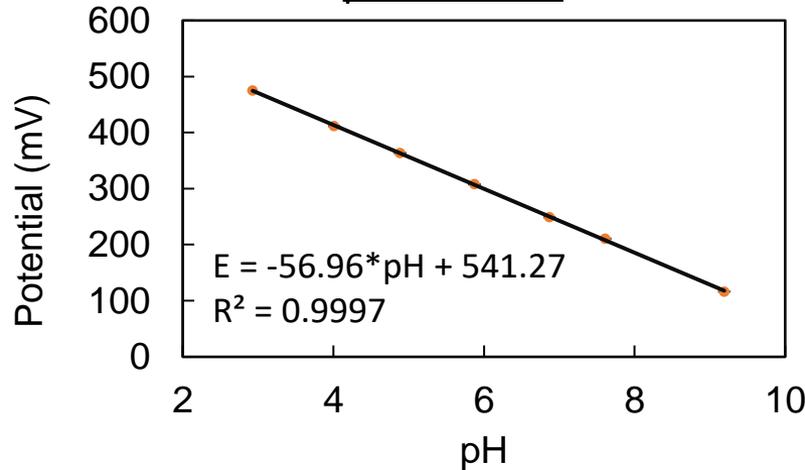
# プロトタイプ製作

## ワイヤレスマイクロpHセンサ



# ワイヤレスpHセンサを用いたう蝕マッピング

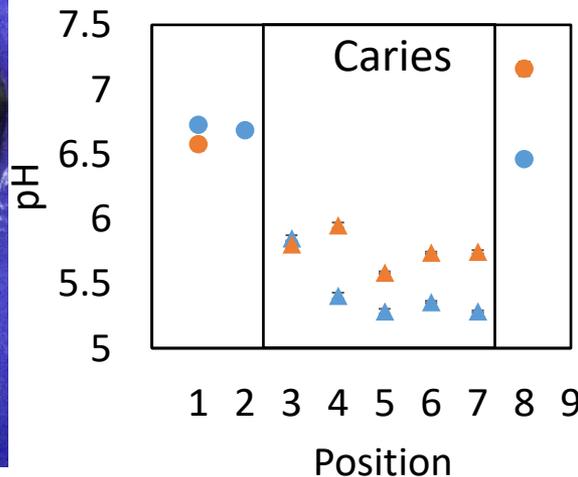
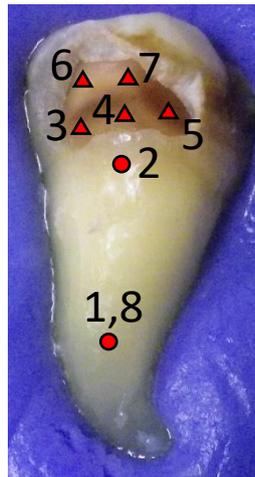
pH感度評価



- 理論値に近い-57 mV/pHの傾き
- エレクトロメータを用いた電極計測系と同程度の感度

- ワイヤレス化しても高感度計測を維持  
pH感度に優れたセンサ
- う蝕マッピングにおいても、ワイヤレスpHセンサで進行性う蝕の識別可能

進行性う蝕のpHマッピング



「削らない治療」へ向けた歯科医師の診断をサポートするプラットフォームへ

- Commercial high resistance meter
- Wireless pH sensor

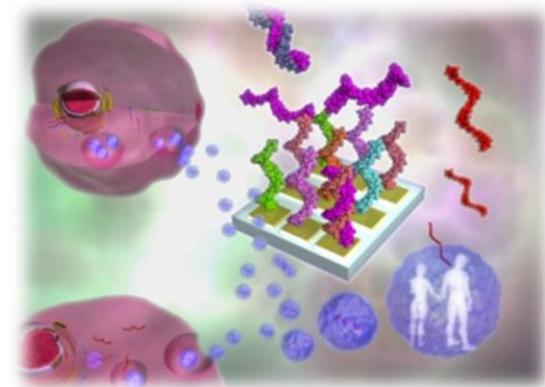
# 電気化学的な核酸検出

## 電気化学的なアプローチの利点

- 装置全体の小型化
- センサの集積化
- 低コスト化

## 代表的な電気化学的核酸検出法

- Differential pulse voltammetry (DPV)
- Square wave voltammetry (SWV)
- Chronocoulometry (CC)



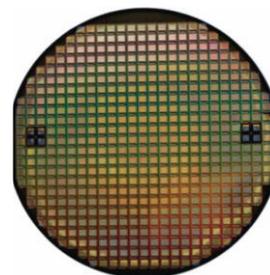
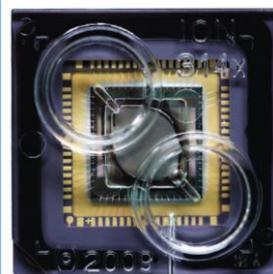
## トランジスタ型DNAシーケンサ



Personal Genome Machine

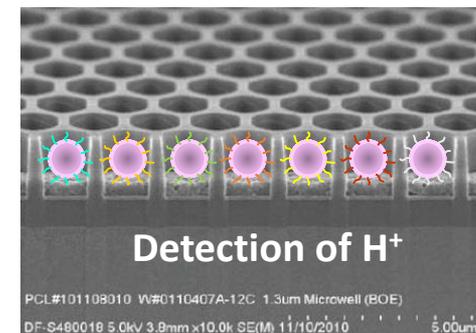
## Ion Torrent/Life Technologies

### Integration of transistors



J.M. Rothberg, et al, Nature, 475, 348-352 (2011)

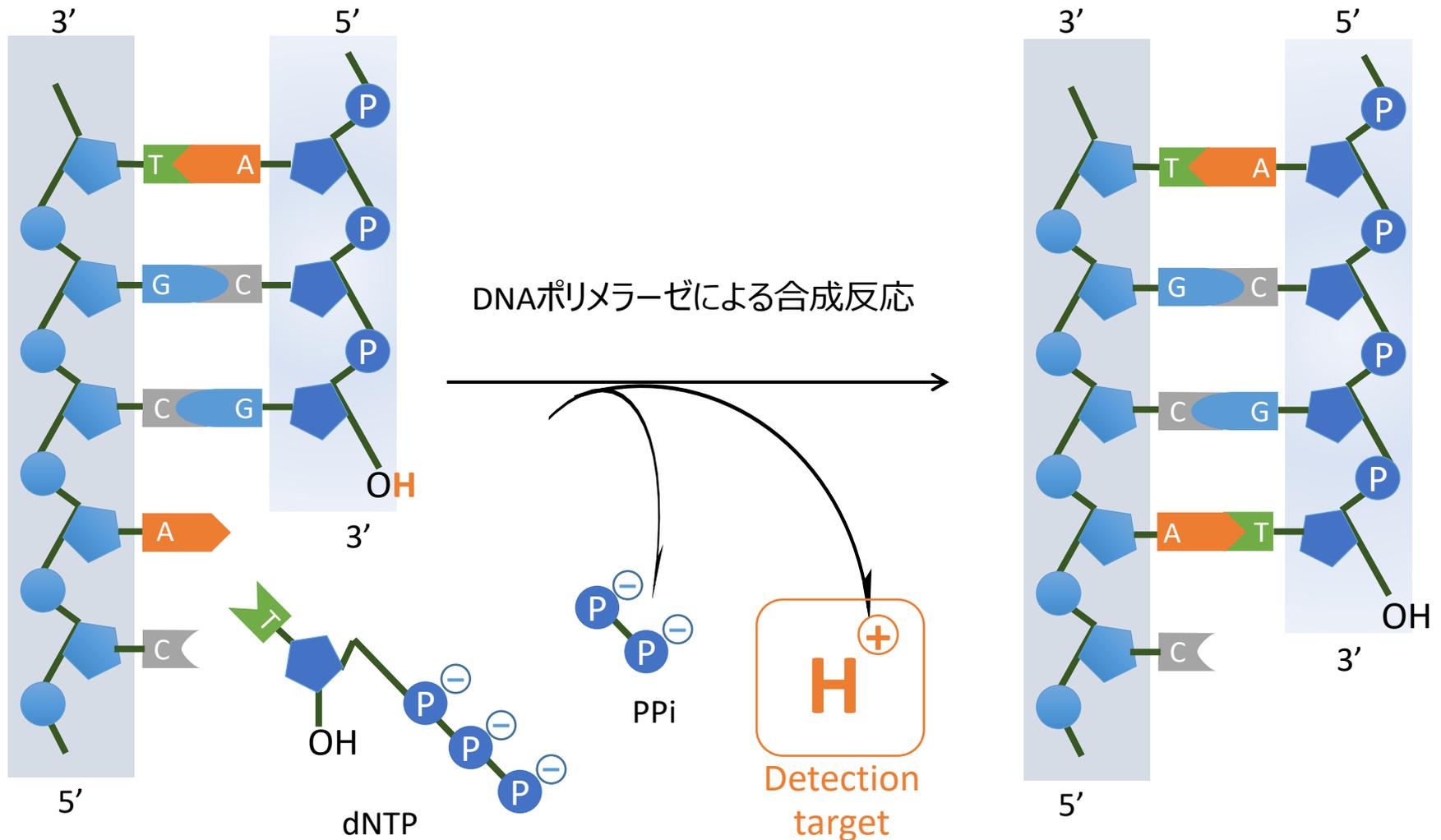
### Beads + DNA probes



# プロトンを指標とした核酸定量検出

テンプレート

合成鎖



# 等温核酸増幅法と電気化学計測

## トランジスタ型DNAシーケンサの課題

- PCR：迅速な温度コントロールが必要
  - 98°C：DNAの熱変性 55°C：アニーリング 72°C：ポリメラーゼによるプライマーの伸長反応
- 熱サイクルによりトランジスタの温度特性が変化 → PCR中のノイズの低減が求められている。

リキッドバイオプシーに有用な増幅と計測を同一チップで行う小型・可搬型バイオセンサの開発

DNA isolation

Amplification

Detection

New  
combination

### 等温核酸増幅法

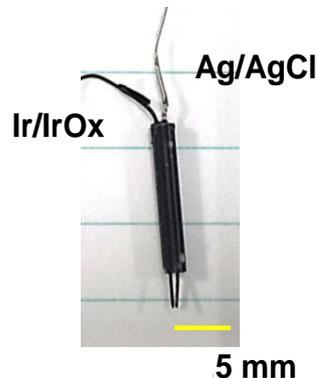
Primer-generation rolling circle  
amplification (PG-RCA)

- 等温反応 (30°C付近)
- 指数関数的にな増幅

### 電気化学計測

電位計測 (pH)

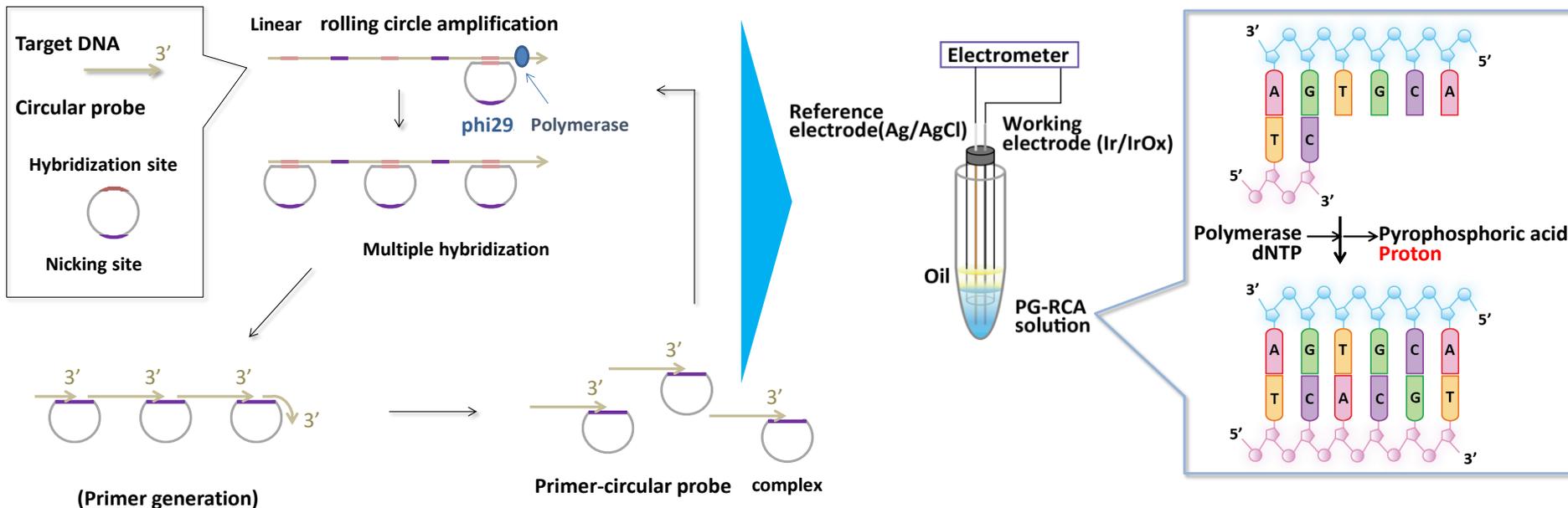
- 簡便な操作
- 正確な計測



ラベルフリーで迅速にターゲット核酸を検出する

# PG-RCA\_pHセンサシステム

## PG-RCA-pH sensorによる DNAの検出



- 核酸増幅反応生成物であるプロトンの検出

- サーマルサイクラー不要：小型化に有利
- 指数関数的増幅

Circular DNA: 5'-  
**GTGGTTG**TCTTCT**CCTCAGCT**CTATCGGATTTGTATCTCT**CCTCAGCCT**  
 ATCGGATTTGTATCTCT**AAGCAGT**-3' (73 nt)

Target DNA : 5'-**CAACCACACTGCTT**-3' (14 nt)

Enzymes and reagents : phi29 DNA polymerase, Exonuclease I, ssDNA ligase, dNTP mixture, Reaction buffer

【Nernstの式】

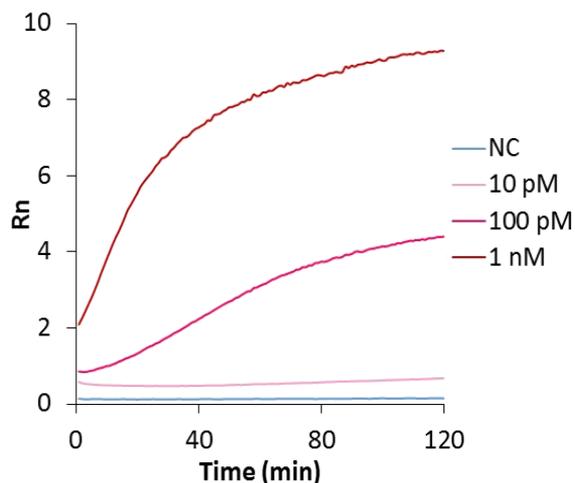
$$E = E_o + \left( \frac{RT}{zF} \right) \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E: 電極電位、E<sub>o</sub>: 標準電極電位、R: 気体定数、  
 T: 温度、z: 移動電子数、F: ファラデー定数、a: 活量

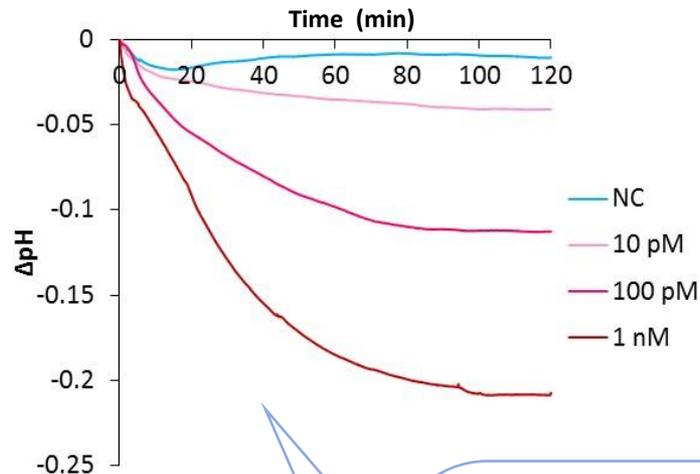
# PG-RCAリアルタイムモニタリング

PG-RCA-pH sensorによる **DNA**の検出

蛍光リアルタイムモニタリング

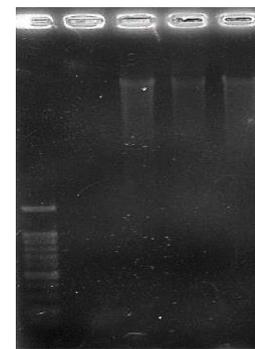


プロトンを指標としたリアルタイムモニタリング



電気泳動結果

NC 10 100 1000 p M



PG-RCA増幅産物確認

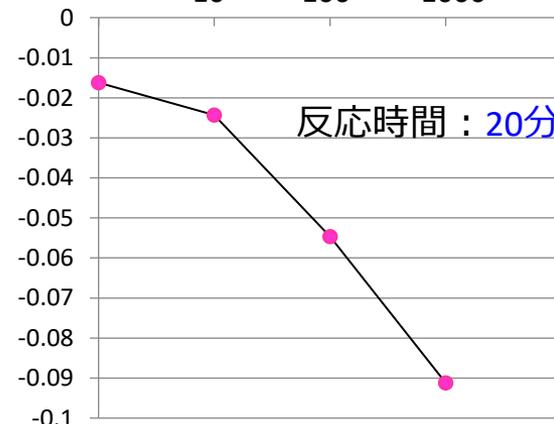
- 電極電位換算pH変化のtargetDNA濃度依存性を実証
- 液相反応、PG-RCA採用により反応効率向上を達成
- Rate assayにより更なる高速化可能

Tabata M, et al. In preparation

微細加工技術と組み合わせた  
高集積化・高感度化

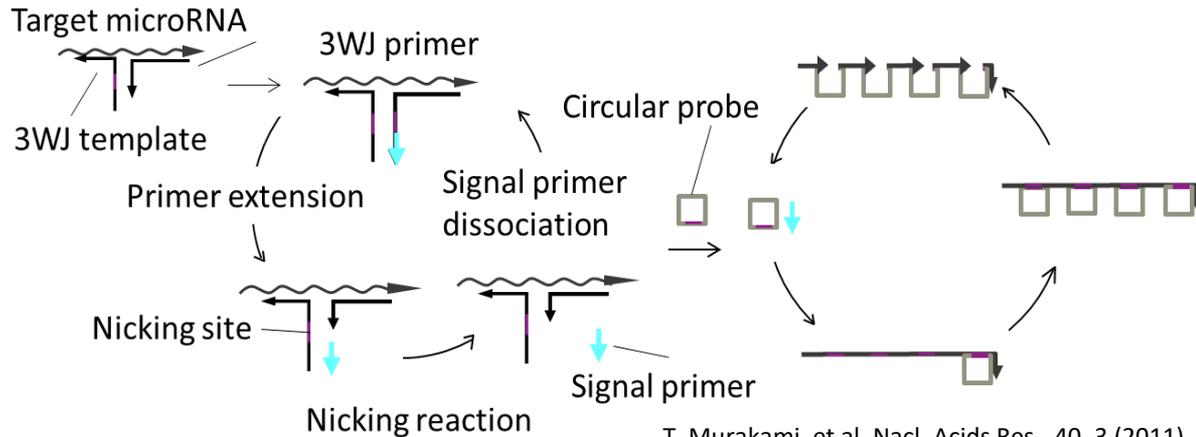
試料DNA濃度 [pM]

10 100 1000

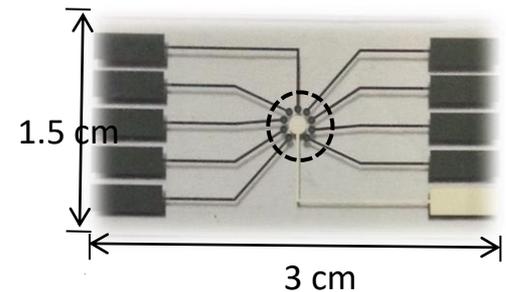


# 3WJ PG-RCA\_pHセンサシステム

## Three way junction PG-RCA-pH sensorによる miRNAの検出



## 酸化イリジウム薄膜マイクロpHセンサ



pH感度 : -58.6 mV/pH  
(理論値 : -59.2 mV/pH)

### 【Nernstの式】

$$E = E_o + \left( \frac{RT}{zF} \right) \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E: 電極電位、E<sub>0</sub>: 標準電極電位、R: 気体定数、  
T: 温度、z: 移動電子数、F: ファラデー定数、a: 活量

Name	Sequence
Circular probe (Tm:93.1)	5'-phosphate- <b>GCTGTGCTCAAGGTGTGTGAATGCTGTGCTCAAGGTGTGTGAATGCTGTG</b> <b>CTCAAGGTGTGTGAAT</b> -3'
hsa-miR-16-5p	<b>UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG</b>
3WJ template (Tm:84.9)	<b>TGCTCAAGGTGTGTGAATGCTTTTTCATAATCGTGGCTGCTGCTATTTT</b>
3WJ primer (Tm:56.2)	<b>CGCCAATATTTATTGATTATG</b>

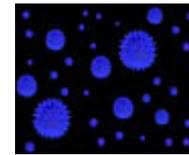
Red: template sequences for signal primer generation  
Green & blue: hybridization sequences among microRNA, template, and primer  
Solid underline: hybridization sequences between three-way junction probes  
Bold character: recognition sequence of Nb.BsmI

# 未来医療へ向けた核酸解析

## Society5.0に対応した未来医療

- IoT
  - AI
  - ロボット
  - 機械学習
  - ビッグデータ解析
- 質の高い情報

集積化・小型化  
センシング（例：ウェアラブルセンサ）



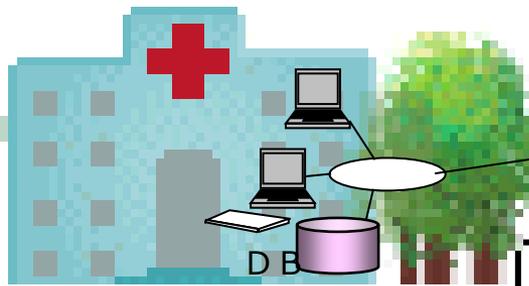
新興感染症  
環境医学

診療形態の階層化・多様化への対応

社会技術として開発

患者のそばで検査・治療

病院



医療情報システム

- ・高度治療
- ・精密検査
- ・難治疾患

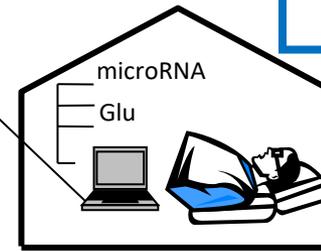
公共回線 / インターネット



中・小病院



患者宅



患者宅

診療所

- ・在宅診療
- ・スクリーニング検査

● 高度な医療をより身近に！

● 健診受診率向上により、病気予防・早期発見！