

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06111

研究課題名(和文) ウイルスの多種類同時検出を可能にする迅速DNA検査法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid DNA detection method for multiplex virus detection

研究代表者

中野 道彦 (Nakano, Michihiko)

九州大学・システム情報科学研究所・准教授

研究者番号：00447856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが開発した微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法について、(1) DNA結合に伴う微粒子誘電泳動の変化について、DNAのどのような特性が影響しているかを調べた。その後、(2) 本DNA検出法が食品検査(豚DNAの検出)に使用できることを示した。次に、(3) 本DNA検出法の定量性をノロウイルス遺伝子の検出についてReal-time PCR法と比較して評価した後、(4) 本DNA検出法がDNA量だけでなく、その長さも定量できることを示した。これは、複数対象を同時に検出するために必要な機能であり、それを実現するために必要な非常に重要な機能を証明した。

研究成果の概要(英文)：Applications of microbeads dielectrophoresis (DEP) based DNA detection method were investigated. (1) DEP change of microbead by DNA attachment is derived from not only electric charges on DNA but also permittivity of DNA, (2) application on food contamination by detecting pig mitochondrial DNA sensitive, (3) quantitative detection of norovirus gene (10 copies/reaction) in comparing with real-time polymerase chain reaction, and (4) determination of DNA length by measuring frequency dependent conductance change of DNA attached microbeads. These results suggest that the DNA detection can be applied to detect multiple virus target genes.

研究分野：静電気生物応用

キーワード：DNA検出 誘電泳動 インピーダンス計測 ウイルス検査

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症の脅威が世界的に広まっている。毎年のようにインフルエンザやノロウイルスが流行しており、最近では、致死率が非常に高いエボラウイルスが世界中の人々の健康を脅かしている。高感度・迅速なウイルス検出法は、ウイルス感染症対策には必要不可欠である。本研究は、研究代表者らが開発した迅速 DNA 検出法を発展させて、一度に多種類のウイルスを電氣的に簡便・迅速・正確に検出することを目的とする。

ウイルス検出には電子顕微鏡による直接観察、免疫法、DNA チップ法などがあるが、PCR (polymerase chain reaction) を代表とするウイルス遺伝子 (DNA/RNA) を連鎖的な DNA 合成反応で増幅する手法 (核酸増幅検査法) が高感度で特異性が高く、最も有効な方法である。本研究は PCR 増幅後の DNA 解析を電氣的に迅速かつ簡便に行い、結果として PCR によるウイルス検出を迅速化する。従来、増幅 DNA はゲル電気泳動によるサイズ分離とその後の蛍光染色によって検出されており、煩雑で長時間の作業が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、迅速なウイルス検出を実現するために、核酸増幅検査における DNA 検出を迅速・簡便化する手法を開発する。特に、複数種類のウイルスを同時に検出する手法について検討する。そのために、新しく考案した DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化を利用した電氣的な DNA 検出法を改良する。この方法は、誘電体微粒子に対象 DNA が結合

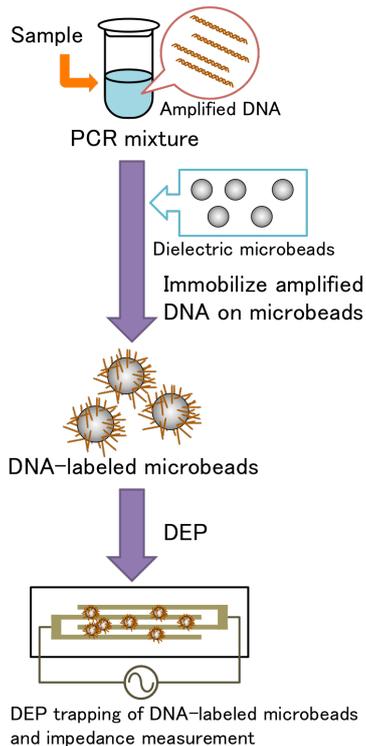


図1 微粒子誘電泳動を利用した DNA 検出の模式図。

することで、その微粒子の誘電泳動特性が変化するという現象を利用したものである。本研究では、結合した DNA のサイズ依存的に生じる微粒子誘電泳動の周波数特性の変化を利用して、複数種類の対象ウイルスから増幅された DNA のそれぞれを検出できるようにする。本法が実現することで、ライフインベーションの進展と安全・安心社会の早期実現に貢献する。

3. 研究の方法

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法は、検出対象 DNA を誘電体微粒子に結合させることで、誘電体微粒子の誘電泳動特性が変化することを利用する (図1)。本研究では、まず (1) DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化について、DNA のどのような特性が影響しているかを調べた。その後、(2) 本 DNA 検出法が豚 DNA の検出に使用できることを示した。次に、(3) 本 DNA 検出法の定量性を評価した後、(4) 本 DNA 検出法が DNA 量だけではなく、その長さも定量できることを示した。これは、複数対象を同時に検出するために必要な機能であり、それを実現するために非常に重要な機能を証明した。

4. 研究成果

4-1. DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化

DNA 結合に伴って誘電体微粒子の誘電泳動が変化する。これは、DNA の電荷に起因する誘電体微粒子の導電率の変化であると考えられる。式(1)は微粒子の導電率とその表面コンダクタンスとの関係を表したものである。

$$\sigma_p = \sigma_{pbulk} + \frac{2K_{Stern}}{r} + \frac{2K_{Diff}}{r} \quad (1)$$

ここで、 $\sigma_{pbulk}$  は粒子材料の導電率で、 $K_{Stern}$  と  $K_{Diff}$  は粒子表面の Stern 層内および拡散層内のコンダクタンスである。式(1)の2項および3項は粒子の半径の逆数に依存しており、粒子の大きさが小さくなると表面コンダクタンスの影響が大きくなることを示している。

図2は、319 bp の DNA を直径 2.8  $\mu\text{m}$  の誘電体微粒子に結合させたときのゼータ電位と誘電泳動のクロスオーバー周波数を DNA 量に対してプロットしたものである。クロスオーバー周波数は、誘電泳動特性を表す指標で、誘電泳動がゼロになる周波数を指す。クロスオーバー周波数の変化に比べて、ゼータ電位の変化が緩やかであった。ゼータ電位は、粒子の表面電荷量に依存して変化すると考えられる一方で、クロスオーバー周波数は粒子の導電率および誘電率の両方に影響される。DNA 量の変化に対するゼータ電位の変化と比べて、クロスオーバー周波数の変化が大きいのは DNA の電荷のみならず DNA の誘電率が粒子全体の誘電率に影響を及ぼしているからではないかと考えられ、これまで、DNA の電荷が微粒子の誘電泳動特性に影響を与えていたと考えていたが、DNA の誘電率も大きく影響していることが示唆された。

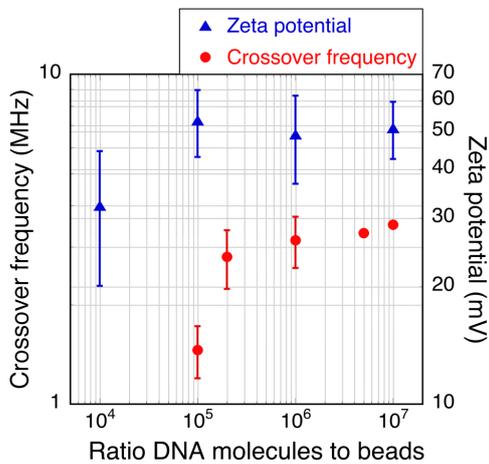


図 2. 微粒子に結合させた DNA 量に対する DNA 結合微粒子のゼータ電位およびクロスオーバー周波数の変化

#### 4-2. 微粒子誘電泳動による DNA 検出法を用いた豚 DNA の検出

ここでは、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の食肉検査への応用を目的として、食肉から抽出した豚 DNA を検出可能か検証した。安全衛生の観点以外にも宗教的な観点からも、原材料表示されているもの以外のものが食品中に含まれてはならない（例：イスラム圏における豚肉の忌避）、このような背景の下、種々の食品検査が行われているわけであるが、特に、生物由来の混入物に関しては、その遺伝子を検出することが、最も感度が高く、信頼できる。ここでは、豚肉の混入を想定し、豚 DNA を PCR 増幅し、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法でその増幅 DNA を検出できるかどうかを検討した。検出対象は豚ミトコンドリア DNA である。

図 3 は、豚生肉と牛生肉を混合したサンプルからミトコンドリア DNA を抽出し、豚ミトコンドリア増幅用プライマーを用いた PCR によって DNA を増幅した後、その増幅 DNA を誘電体微粒子に結合して、微粒子誘電泳動による DNA 検出法で測定した結果である。すべての豚生肉混合サンプルにて陽性を

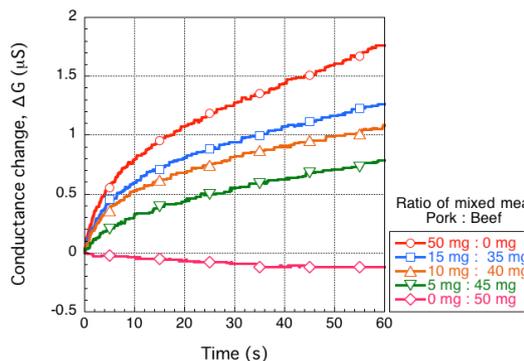


図 3. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法による豚由来 DNA の検出

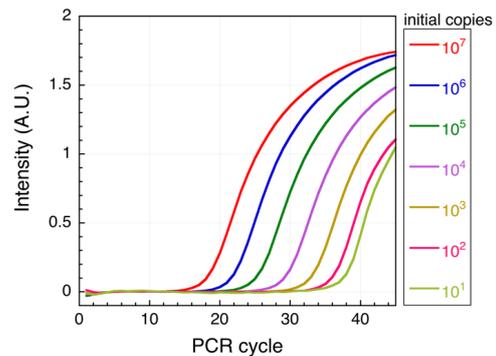
示し、牛生肉のみのサンプルでは陰性であった。また、その検出感度は 5 mg（トータル 50 mg）であった。以上により、本手法を食肉検査に使用できることが示された。

#### 4-3. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の定量性評価

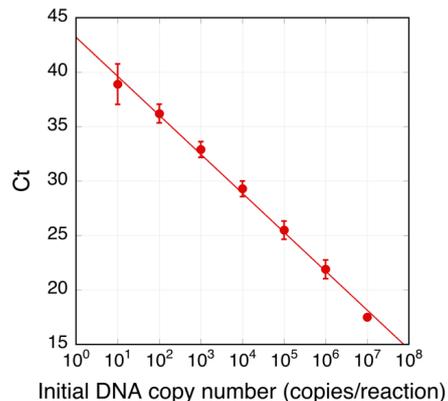
微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の感度および定量性を評価するために、ノロウイルス遺伝子の検出について、Real-time PCR 法と比較した。

図 4 は、Real-time PCR 法 (Taq-man probe) によるノロウイルス遺伝子の検出結果を示す。Real-time PCR では 10 コピー/reaction が検出下限でその定量検出範囲は  $10^7$  コピー/reaction までであった。図 5 に微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出による結果を示す。検出下限は Real-time PCR と同等の 10 コピー/reaction であった。他方、定量検出範囲は  $10^5$  コピー/reaction までであった。これは、微粒子誘電泳動による DNA 検出法が PCR 後に行う手法であるためで、PCR 増幅の飽和によって検出対象が多量に存在する場合は、定量検出ができなくなることを示す。

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法は、Real-time PCR 法に比べて、安価・簡便であり、これが Real-time PCR 法と同等の検出下限で検出できることの意義は大きい。

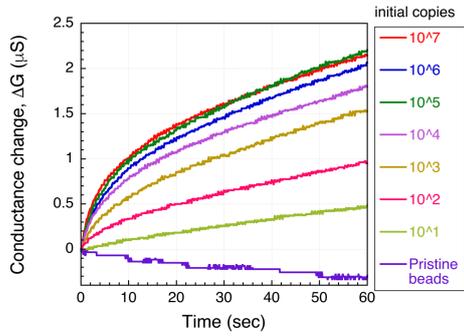


(a)

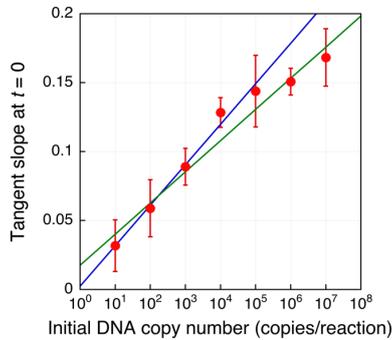


(b)

図 4. Real-time PCR によるノロウイルス遺伝子の検出。(a) 増幅曲線、(b) Ct カーブ。



(a)



(b)

図 5. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法によるノロウイルス遺伝子の検出。(a) コンダクタンスカーブ、(b) コンダクタンスカーブの傾き (Time = 0)。

4-4. 微粒子誘電泳動による DNA 検出法の応用した DNA 長の測定-多検体同時検出に向けて-

微粒子誘電泳動による DNA 検出法を用いて、多検体を同時に検出するために、Multiplex PCR 法を用いて増幅した異なる長さの増幅 DNA を検出することを考えた。異なる長さの増幅 DNA が結合した微粒子を区別して検出するためには、それぞれの誘電泳動特性が異なれば良い。そこで、結合 DNA の長さによる微粒子誘電泳動の特性の変化を調べたところ、そのクロスオーバー周波数が DNA 長に依存することを見出した (図 6)。これによって、異なる長さの DNA を Multiplex PCR 法によって増幅すれば、その増幅 DNA を結合した微粒子を周波数によって個別に検出できることが示唆された。

DNA の長さによって誘電泳動特性が変化するという事は、DNA の長さによって DNA 結合微粒子の電気的特性が変化することを示唆している。そこで、異なる長さの DNA が結合している DNA 結合微粒子の電気的特性 (インピーダンス) を測定することで、微粒子に結合している DNA の長さを測定することができないかを検討した。

図 7 (a) は、DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集した後、その微粒子の印加電圧の周波数に対するコンダクタンス変化をプロットしたものである。このプロットの一次負微分をとったものが図 7(b)である。

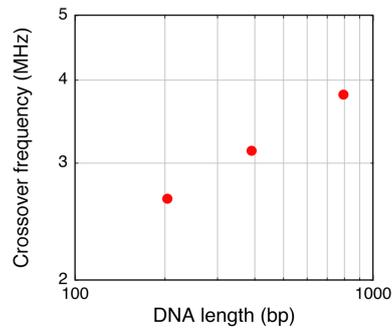
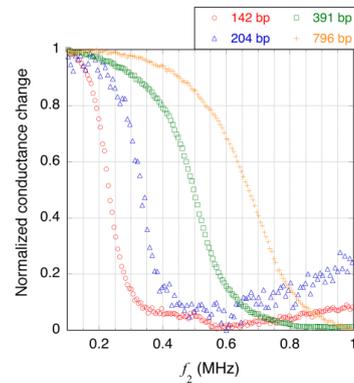
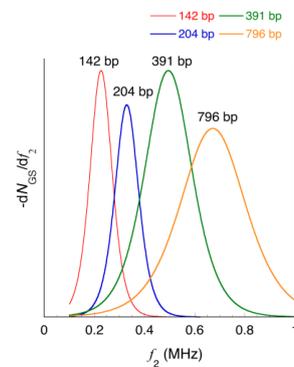


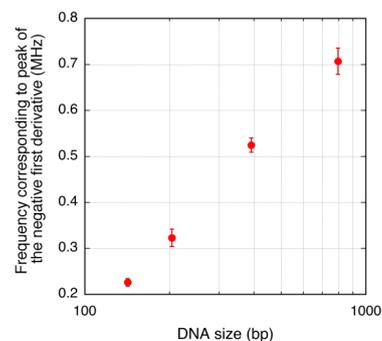
図 6. DNA 長とクロスオーバー周波数の関係



(a)



(b)



(c)

図 7. DNA 結合微粒子のインピーダンス特性による DNA 長の測定。(a) DNA 結合微粒子のコンダクタンスの周波数特性、(b)コンダクタンス特性の負一次微分と周波数の関係、(c)ピーク周波数と DNA 長の関係。

DNA の長さ依存してピークが高周波数側にシフトした。そのピーク周波数を DNA の長さに対してプロットしたものが図 7 (c) である。このように DNA 長さに対して片対数グラフ上で線形の関係があることが示された。以上の結果から、DNA 結合微粒子のインピーダンス特性から DNA 長を計測することが可能であることが示された。これにより、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法によって検出対象の量および長さの両方を測定できることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, Frequency-dependent conductance change of dielectrophoretic-trapped DNA-labeled microbeads and its application in DNA size determinations, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, Vol. 22, 2018, 26, DOI: 10.1007/s10404-018-2051-7
- ② M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, Comparison of Sensitivity and Quantitation between Microbead Dielectrophoresis-Based DNA Detection and Real-Time PCR, *Biosensors*, 査読有, Vol. 7, No. 4, 2017, 44, DOI: 10.3390/bios7040044
- ③ Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro, Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics, *IET Nanobiotechnology*, 査読有, Vol. 11, Issue 5, 2017, pp. 562-567, DOI: 10.1049/iet-nbt.2016.0186
- ④ 山崎 達郎, 丁 震昊, 中野 道彦, 末廣 純也, 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法による豚 DNA の選択的検出, *静電気学会誌*, 査読有, Vol. 41, No. 3, 2017, pp. 153-157, <http://www.iesj.org/content/files/pdf/papers/41/41-3-153.pdf>
- ⑤ M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, Dielectrophoresis and dielectrophoretic impedance detection of adenovirus and rotavirus, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 55, No. 1, 2016, 017001, DOI: 10.7567/JJAP.55.017001
- ⑥ 井上 祐樹, 中野 道彦, 末廣 純也, 負の誘電泳動力による細菌濃縮を利用した誘電泳動インピーダンス計測法の高感度化, *電気学会論文誌 E*, 査読有, Vol. 136, No. 5, 2016, pp. 148-152, DOI: 10.1541/ieejsmas.136.148
- ⑦ 中野 道彦, 笠原弘道, 丁震昊, 末廣 純也, DNA 結合に伴う誘電体微粒子の誘電

泳動特性変化の測定, *静電気学会誌*, 査読有, Vol. 40, No. 1, 2016, pp. 20-25, <http://www.iesj.org/content/files/pdf/papers/40/40-1-20.pdf>

[学会発表] (計 33 件)

- ① 中野 道彦, 誘電泳動を用いた生体物質の操作とインピーダンス計測, 2018 年度第一回静電気学会研究会, 2018.
- ② Z. Ding, K. Ida, K. Matsuda, M. Nakano, J. Suehiro, DNA detection microfluidic device based on negative dielectrophoresis of DNA labeled microbeads, *IEEE SENSORS 2017*, 2017.
- ③ Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro, Quantitative bacterial detection using rapid DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis, *Biosensors 2016*, 2016.
- ④ M. Nakano, H. Kasahara, Z. Ding, J. Suehiro, Effects of DNA length on dielectrophoresis of DNA-labeled microbeads: Crossover frequency and zeta potential, *Biosensors 2016*, 2016.
- ⑤ M. Nakano, T. Yamasaki, Z. Ding, J. Suehiro, Advances in DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis, *Dielectrophoresis 2016*, 2016.
- ⑥ M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara, J. Suehiro, Rapid Size Determination of PCR Amplified DNA by Beads-based Dielectrophoretic Impedance Spectroscopy, *The 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015)*, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hv.ees.kyushu-u.ac.jp/Lab-j/index.html>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003722/research.html>

<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/persons/michihikonakano>

<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/persons/michihikonakano>

<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/persons/michihikonakano>

<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/persons/michihikonakano>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 道彦 (NAKANO, Michihiko)  
九州大学・大学院システム情報科学研究院・  
准教授  
研究者番号：00447856

(2) 連携研究者

末廣 純也 (SUEHIRO, Junya)  
九州大学・大学院システム情報科学研究院・  
准教授  
研究者番号：70206382