

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04171

研究課題名(和文) PDMSマイクロ流体デバイスの特性を活かしたddPCRプラットフォームの構築

研究課題名(英文) Development of ddPCR platform utilizing specific properties of PDMS microfluidic device

研究代表者

橋本 雅彦 (Hashimoto, Masahiko)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：20439251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ポリジメチルシロキサン(PDMS)の高いガス吸収特性を活かし、単分散性の高い油中水滴を再現性よく自律的に高速生成させることを可能とするマイクロ流体デバイスの開発に成功した。さらに、液滴内でPCR増幅を実行したところ、蛍光性液滴の数的割合から算出された各サンプル初期DNA濃度は、ポアソン分布より予測される値と良好な一致を示した。

上記の検討に加え、ピエゾマイクロポンプの利用に基づく小型流体制御システムを新規に開発し、液滴のフロースルー定点スクリーニング実験を行った。本システムは、毎秒120個の液滴をスクリーニング可能であることが明らかとなり、その有用性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドロップレット・デジタルPCR(ddPCR)は、これまで開発された方法では実現成し得なかった遺伝子診断を可能とするため大きな脚光を浴びている。しかし、既存のddPCRプラットフォームは、システム全体が大きい・取り扱いが煩雑・コスト高であるといった問題点が指摘されている。本研究により、少ない初期投資費用で取り扱い易く、小型のddPCRプラットフォームが構築された。本研究によって、ddPCR研究へ新規参入する研究者が増加し、ddPCR研究の開発スピードが加速していくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the principle investigator successfully developed a microfluidic device that allowed to produce monodisperse water-in-oil droplets automatically and reproducibly utilizing the high gas solubility feature of polydimethylsiloxane. Furthermore, with droplet PCR experiments using the droplets obtained by the above device, it was verified that the initial DNA concentration of each sample predicted using the fraction of fluorescence positive droplets on the basis of the Poisson distribution was well concordant with the preset sample concentration.

In addition to the studies described above, the principle investigator exploited a miniaturized fluid control system using a piezoelectric micropump for high-throughput flow-through screening of droplets. It was validated that the current system could screen droplets at a rate of 120 droplets per second. Thus, usability of the developed flow control system for the high-throughput droplet monitoring was demonstrated successfully.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロフルイディクス ドロップレット エマルジョン マイクロ流体デバイス デジタルPCR ポリジメチルシロキサン

1. 研究開始当初の背景

油中に分散したピコリッター (10^{-12} L) オーダーの水コロイド (油中分散水滴) に DNA を一分子ずつ封入し、PCR 増幅を行った後、各々の液滴の蛍光シグナルのオン/オフをデジタルカウントするドロップレット・デジタル PCR (ddPCR) は、サンプル中の DNA 分子のアレル構成を個別に識別することを可能とするため、遺伝子診断法のあり方を一新する先進的技術として、本研究開始当初から現在に至るまで大きな注目を集めている。マイクロ流体デバイスを使用することにより、現在では極めて単分散性の高い微小液滴を調製することが可能となっているが、既存のマイクロ流体液滴調製システムはポンプとマイクロ流体デバイスを接続する付属品が必要であるため、システム全体がかさばって扱いにくいのが現状である。また、システムの構成上、試薬デッドボリュームが大きく、結果的に研究コストも膨らんでしまう。これらの欠点は ddPCR の普及の障害となっており、早急に解決すべき課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、ポリジメチルシロキサン (PDMS) マイクロ流体デバイスの高いガス吸収特性 (引用文献①) を活かし、デバイスを外部ポンプに接続することなく自律駆動的に kHz オーダーの液滴生成と液滴スクリーニングを行える先駆的 ddPCR プラットフォームの構築を目的とした。本研究により、既存の ddPCR プラットフォームのコスト性能・処理性能・操作性・カスタマイズ性を一新し、液滴の利用をベースとした多様なバイオ分析アプリケーションの開発スピードを加速させることに挑戦した。

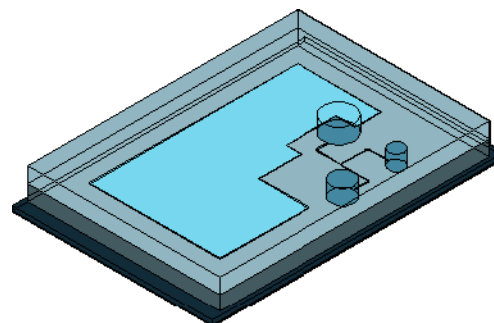


図 1. 液滴調製用マイクロ流体チップと吸引アクチュエーターとのアッセンブリ。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、広い PDMS 比表面積を持った 2 種類の吸引アクチュエーター (アクチュエーター A および B) を作製し、これをマイクロ流体チップの上部に装着することで高い吸引力の長時間持続ならびに油中水滴生成速度の増大を試みた。なお、本研究で用いた PDMS 製マイクロ流体チップには、T 字ジャンクションを有するマイクロ流路、2 つの入りリザーバー、一つの出口リザーバーが備わっている。マイクロ流体チップの出口リザーバー空間ボリュームに対する PDMS 比表面積が 5.0 cm^{-1} であるのに対して、アクチュエーター A のチャンバーは比表面積が約 68 cm^{-1} となるように設計した。また、アクチュエーター B はチャンバー部分に多数の微小な支柱を設けることで比表面積を約 178 cm^{-1} に増大させた。吸引アクチュエーターをデシケーターに入れ、真空ポンプを用いて 90 分間脱気を行った。その後、吸引アクチュエーターをデシケーターから取り出し、あらかじめアクリル板を重ねておいたマイクロ流体チップに素早く貼り合わせた。その際、マイクロ流体チップの出口リザーバーと吸引アクチュエーターのチャンバーが重なる様に配置した (図 1)。最後に入りリザーバーに油相および水相を滴下し油中水滴を作製した。高速度カメラを備えた顕微鏡システムを用いて T 字ジャンクション付近を撮影し (図 2)、液滴の生成速度および粒径の経時変化を測定した。また、作製した液滴を回収し、PCR 反応チューブ内へ導入した。PCR 増幅を行った後に液滴をガラス板に滴下し、落射型蛍光顕微鏡を用いて液滴の蛍光画像を撮影した。最後に、液滴の蛍光強度の分布を示すヒストグラムを作成し、全液滴数に占める蛍光性液滴数の割合を見積ることでサンプル調製時の設定 DNA 濃度とポアソン分布より予測される値とが合致するか検証した。

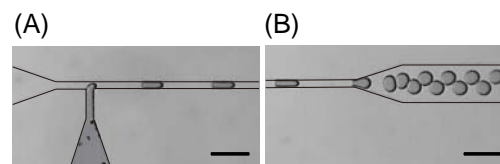


図 2. T 字ジャンクション付近における水相プラグフローの生成 (A) とチャンネル拡張部における液滴生成 (B) の様子を示す顕微鏡画像。スケールバー、 $250 \mu\text{m}$ 。

(2) 上記の検討とは別に、小型ダイヤフラム式ピエゾマイクロポンプを用いたアウトレット減圧式流体制御システムを新規に開発し、ハイスループットなフロースルー液滴スクリーニングを試みた。なお、本システムを構築するに当り、PDMS の高い粘弾性に基づく高密着性能を利用した。また、本実験では、クロスジャンクション流路パターンを有するマイクロ流体チップを用いた。

4. 研究成果

(1) 油相にミネラルオイル、水相にインジゴカルミン溶液を用いて油中水滴の作製を試みた。アクチュエーター A を用いた場合、最大生成速度は 26.6 Hz まで増大した。しかしアクチュエ

ーターB を用いた場合、水相と油相が二相に分離して流れ、油中水滴を作製することはできなかった。これは、アクチュエーターB の比表面積がアクチュエーターA のそれよりも大きいために液滴生成にとって過度の吸引力が出口リザーバに働いたことによると考えられる。

油相をフッ素系オイルである Novec 7500 に変更して同様に油中水滴の調製を試みたところ、アクチュエーターA を用いた場合には最大生成速度は 227 Hz、アクチュエーターB を用いた場合には 470 Hz となり (図 3)、吸引アクチュエーターを適用しなかった場合と比較し生成速度は 2 桁改善された。ミネラルオイルを用いた場合とは異なり、より吸引力が強いアクチュエーターB を適用しても液滴が生成したのは、Novec 7500 を連続相とした場合は液滴の表面張力が大きく安定性が高まるためであると考えられる。また、液滴の粒径は生成開始から終了まで約 69-77 μm でほぼ一定であり、5 回の繰り返し測定各測定時間における標準誤差は平均粒径の 6%以内であった。このように、吸引アクチュエーターを用いた本手法により、単分散性の高い油中水滴を再現性よく自律的に高速生成させることが実証された。

上記に加え、本研究で得られた特筆すべき成果として、本研究のように減圧流体制御を適用する場合、PDMS マイクロ流体チップが PDMS の粘弾性により支持プレートに十分強く貼りつき、PDMS マイクロ流体チップと支持プレートとを永久接着させる必要がないことを新たに見出すことができた。このような非永久接合型のマイクロ流体アセンブリを用いると、マイクロ流路に異物が混入した場合も簡単に取り除くことができるため、チップ一枚当りのコスト性能が大幅に低減されることが利点として挙げられる。このアセンブリを用いて油中水滴を調製し、液滴内 PCR を実行したところ、蛍光性液滴の数的割合から算出された各サンプルの初期 DNA 濃度は、ポアソン分布より予測される値と良好な一致を示した (図 4)。

(2) 前述したピエゾマイクロポンプの利用に基づく流体制御システムを用いて液滴のフロースルー一定スクリーニング実験を行った。クロスジャンクション流路パターンをサイドチャンネルからスペーサーオイルを導入することにより、ジャンクション上流にて密集した液滴をジャンクション下流にて一定間隔を空け一列で輸送させることに成功した (図 5)。ジャンクション下流の定点における明視野輝度を測定したところ、毎秒約 120 個の液滴をスクリーニング可能であることが明らかとなった。このスクリーニングレートは、市販の ddPCR プラットフォームにおけるレート (数分間で 20000 滴; 引用文献②) に匹敵するものであり、安価・簡便・高速である本液滴スクリーニングシステムの有用性が実証された。

<引用文献>

- ① K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, and M. Maeda, 'Power-Free Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices for Gold Nanoparticle-Based DNA Analysis', *Lab on a Chip*, Vol. 4, Issue 3, 181-185 (2004).
- ② L. Miotke, B. T. Lau, R. T. Rumma, and H. P. Ji, 'High Sensitivity Detection and Quantitation of DNA Copy Number and Single Nucleotide Variants with Single Color Droplet Digital PCR', *Analytical Chemistry*, Vol. 86, Issue 5, 2618-2624 (2014).

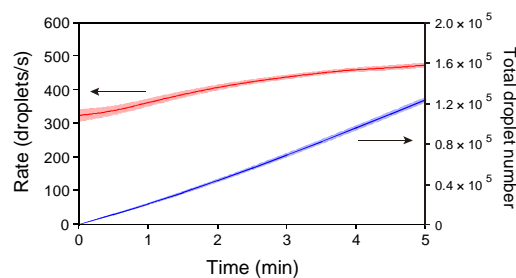


図 3. アクチュエーターB を用いた場合の液滴生成速度と総生成数の経時変化 ($n = 5$). 総生成数は生成数を時間積分して得た。

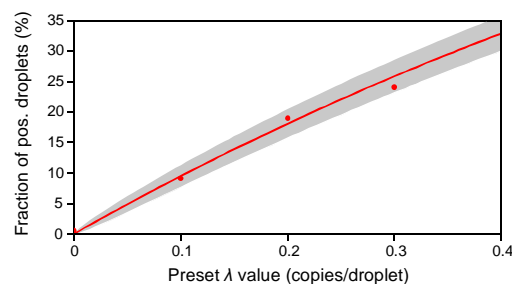


図 4. サンプル調製時に設定された液滴 1 個中の平均テンプレート DNA 分子数 (λ) と全液滴数に対する蛍光性液滴数割合 (p) との関係. 赤い実線はポアソン分布より予測される p と λ との関係を表し、赤色ドットは実験値を表している. グレーの網掛けは、95%信頼区間を示す。

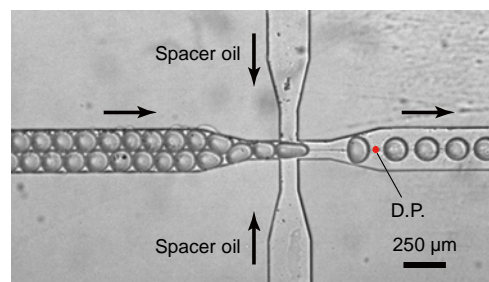


図 5. 液滴間の間隔が一定に保たれ一列に流動する液滴群を捉えた明視野顕微鏡画像. 図中の D. P. は検出ポイントを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

① Yuki Oda, Hirofumi Oshima, Masaya Nakatani, and Masahiko Hashimoto, ‘Vacuum - Driven Fluid Manipulation by a Piezoelectric Diaphragm Micropump for Microfluidic Droplet Generation with a Rapid System Response Time’, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 40, No. 3, 414-418 (2019). [Selected for Front Cover]

DOI: 10.1002/elps.201800357

② Keisuke Fujita and Masahiko Hashimoto, ‘Separation-Free Single-Base Extension Assay with Fluorescence Resonance Energy Transfer for Rapid and Convenient Determination of DNA Methylation Status at Specific Cytosine and Guanine Dinucleotide Sites’, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 40, No. 2, 281-288 (2019). [Selected for Back Cover]

DOI: 10.1002/elps.201800144

③ Yuki Murata, Yuta Nakashoji, Masaki Kondo, Yugo Tanaka, and Masahiko Hashimoto, ‘Rapid Automatic Creation of Monodisperse Emulsion Droplets by Microfluidic Device with Degassed PDMS Slab as a Detachable Suction Actuator’, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 39, No. 3, 504-511 (2018). [Selected for Front Cover]

DOI: 10.1002/elps.201700247

④ Kensuke Sawamura and Masahiko Hashimoto, ‘A Fluorescence Quenching Assay Based on Molecular Beacon Formation through a Ligase Detection Reaction for Facile and Rapid Detection of Point Mutations’, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 33, No. 12, 1457-1460 (2017).

DOI: 10.2116/analsci.33.1457

⑤ Naoaki Okura, Yuta Nakashoji, Toshihiro Koshirogane, Masaki Kondo, Yugo Tanaka, Kohei Inoue, and Masahiko Hashimoto, ‘A Compact and Facile Microfluidic Droplet Creation Device using a Piezoelectric Diaphragm Micropump for Droplet Digital PCR Platforms’, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 38, No. 20, 2666-2672 (2017).

DOI: 10.1002/elps.201700039

⑥ Yuta Nakashoji, Hironari Tanaka, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, ‘A Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Sheet Reversibly Adhered on a Glass Plate for Creation of Emulsion Droplets for Droplet Digital PCR’, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 38, No. 2, 296-304 (2017). [Selected for Front Cover]

DOI: 10.1002/elps.201600309

〔学会発表〕(計 6 件)

① 左良井 尚吾・橋本 雅彦、DNA 一塩基変異検出を指向したオンチップ LDR-CL 検出アッセイの開発、日本分析化学会近畿支部創設 65 周年記念講演会、2018 年 11 月、大阪市立大学杉本キャンパス (大阪府大阪市)。

② 橋本 雅彦、次世代デジタル PCR プラットフォームの創製へ向けて、同志社大学リエゾンフェア・ハリス理化学研究所発表会、2017 年 11 月、ホテルグランヴィア京都 (京都府京都市) 【依頼講演】。

③ 田中 悠悟・村田 悠喜・橋本 雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いたハンズオフエマルジョン調製法における液滴生成レートの高速度化、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月、龍谷大学深草学舎 (京都府京都市)。

④ 近藤 仁貴・中小司 裕太・橋本 雅彦、ドロップレットマイクロフルイディクス研究を支援する自動解析技術の開発、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月、龍谷大学深草学舎 (京都府京都市)。

⑤ 小白金 俊勲・大倉 直朗・橋本 雅彦、ドロップレットデジタル PCR を指向したマイクロフルイディック単分散油中水滴調製法の開発、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月、龍谷大学深草学舎 (京都府京都市)。

⑥ 中小司 裕太・橋本 雅彦、PDMS マイクロ流体チップを利用した単分散油中水滴の自動調製法、化学工学会関西支部第 4 回技術シーズフォーラム、2016 年 10 月、同志社大学今出川キャンパス (京都府京都市)。

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 9 件)

①名称：デジタル PCR 用マイクロ流体デバイス

発明者：橋本 雅彦、中谷 将也、志田 雄星、藤原 紳吾

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2018-167686

出願年：2018 年

国内外の別：国内

②名称：液滴製造用マイクロ流体チップ

発明者：橋本 雅彦、田中 悠悟

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-123166

出願年：2017 年

国内外の別：国内

③名称：マイクロ流路内を流れるエマルションの分散相のサイズを計測するシステム

発明者：橋本 雅彦、中小司 裕太

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-065273

出願年：2017 年

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中小司 裕太、村田 悠喜、田中 悠悟、戸田 美和子

ローマ字氏名：Yuta Nakashoji, Yuki Murata, Yugo Tanaka, Miwako Toda

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。