

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14278

研究課題名(和文) 誘電泳動を利用したPCRフリーDNA診断技術の開発

研究課題名(英文) PCR-free DNA diagnosis using dielectrophoresis

研究代表者

末廣 純也 (Suehiro, Junya)

九州大学・システム情報科学研究院・教授

研究者番号：70206382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：負の誘電泳動力の変化をDNA修飾ビーズの運動軌跡の変化として検出可能とするマイクロ流路デバイスを考案・試作し、DNA修飾ビーズの運動軌跡の変化を観察した。その結果、ビーズ1個あたりのDNA修飾量が1000個以上の場合、DNA修飾ビーズの運動軌跡に明確な変化が現れた。この現象を利用して、粒子個数を蛍光画像観察で定量化する手法を考案し、その有効性を確認した。同手法では、DNA修飾条件100 DNA/particleの検出が可能であることを示した。当初目標としたPCRフリーは実現できなかったものの、従来の微粒子誘電泳動を用いた検出法と比較して約100倍の高感検出を達成した。

研究成果の概要(英文)：A novel micro fluidic device was proposed in order to detect alteration of negative dielectrophoretic force acting on microbeads decorated by DNA molecules. It was demonstrated that the microbead trajectory was apparently changed when the microbead surface was chemically decorated with DNA molecules more than 1000 units. By using fluorescence microbeads and an optical detection system, which could count the number of microbeads, the trajectory change was successfully quantified. This optical detection method realized detection of microbead whose surface was chemically decorated with DNA molecules more than 100 units. The DNA detection sensitivity is 100 times higher than the conventional method, which also utilizes dielectrophoresis of DNA-decorated microbeads.

研究分野：静電気工学

キーワード：計測システム 誘電泳動 DNA診断 MEMS PCR

1. 研究開始当初の背景

近年、エボラ出血熱などのウイルス感染症のパンデミック（地球規模での流行）が大きな脅威となっている。パンデミック感染症の診断・拡大防止には、遺伝子診断（以下、DNA 診断）に基づくウイルス検査が必須であるが、代表的な DNA 診断技術であるリアルタイム PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法は高コストであるため、医療現場の末端にまで普及が進んでいないのが現状である。研究代表者は、電気力学現象の一種である誘電泳動現象を応用した、ナノ～マイクロマテリアルの操作技術開発とセンサ応用に関連した一連の研究を行ってきた。誘電泳動現象とは、不平等電界中で分極した誘電体粒子に力が作用する結果生じる電気力学現象であり、主にバイオテクノロジーの分野において細胞や DNA の操作への応用が検討されている。研究代表者が開発した誘電泳動現象を利用した細菌検出技術である誘電泳動インピーダンス計測法(DEPIM)は、従来法に比べて迅速・低コストという特徴がある。同技術は既に歯科医療分野で実用化されていると同時に、関連論文が英国電気学会(IET)の Premium Award を受賞するなど国際的にも高く評価されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者（末廣）が開発した PCR 法と誘電泳動現象を組み合わせた電氣的 DNA 検出技術の感度を飛躍的に向上させることにより、ウイルスから抽出した DNA を PCR 増幅なしに（PCR フリー）直接検出する技術を開発することである。これにより、より迅速で簡便な DNA 診断に基づくパンデミック感染症の早期封じ込めが可能となり、我が国におけるライフイノ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ことができる。

3. 研究の方法

図1に、本研究で提案した DNA 診断法（以下、新提案法）の原理を示す。同図には、比較のために研究代表者が既に提案し開発中の DNA 診断法（以下、従来法）の原理も示している。両手法共に、マイクロビーズの誘電泳動特性がその表面に結合した DNA によって変化することを利用している点では共通している。従来法では、マイクロビーズ表面に多量の DNA を結合させることで、誘電泳動力の方向が負（高電界部から反発される方向）から正（高電界部に引き寄せられる方向）に逆転する現象を利用している。この結果、DNA で表面修飾されたマイクロビーズは電極間の高電界部に捕集され電極インピーダンスの変化を引き起こす。これまでの研究で、マイクロビーズに作用する誘電泳動力の方向を負から正に逆転させるには、マイクロビーズ1個あたりに約 10^4 個以上の DNA を結合させる必要があることが明らかになっている。

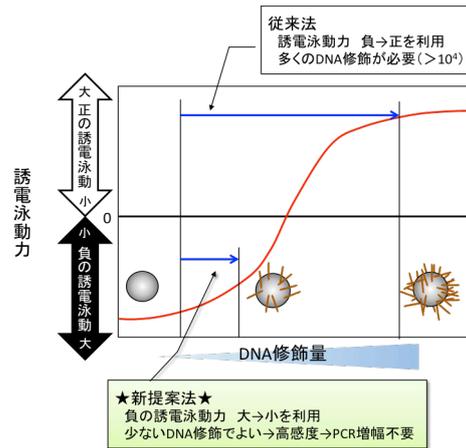


図1 本研究で新たに提案した DNA 診断技術の原理と従来法との比較

このような多量 DNA を得るには PCR によってターゲット DNA を増幅することが不可欠であり、従来法ではこれがトータル検出時間短縮のネックになっている。

このような知見に基づき、新提案法では以下のように発想を転換した。DNA 量が誘電泳動力の方向を負から正に逆転するのに十分でない場合、その方向は変化しないが誘電泳動力の大きさがその量に応じて徐々に低下する領域が存在する。したがって、この誘電泳動力の大きさの変化を何らかの方法で検知できれば、より少ない DNA をマイクロビーズに結合させて検出することが可能になると考えられる。即ち、これは新提案法が従来法よりもより高感度な DNA 診断法となり得ることを意味しており、PCR 増幅を必要としない DNA 診断実現への道を切り開く斬新なアイデアである。

4. 研究成果

(1) DNA 修飾量がマイクロビーズの誘電泳動特性に与える影響の理論的解明

多層誘電体球モデルを用いて DNA 修飾をビーズ表面層の誘電特性変化として表現し、DNA 修飾量によってマイクロビーズに作用する負の誘電泳動力がどのように変化するかを理論的に定量解析した。その結果、ビーズ1個あたりの DNA 修飾量が 1000 個以上であれば、負の誘電泳動力の変化が顕著になることがわかった。

(2) マイクロビーズ運動軌跡に負の誘電泳動力が及ぼす影響の検討

負の誘電泳動力の変化を DNA 修飾ビーズの運動軌跡の変化として観察可能とするマイクロ流路デバイスを考案した（図2）。同デバイスでは、DNA 修飾ビーズに作用する負の誘電泳動力と粘性力のバランスによって同ビーズの運動軌跡が変化する。同デバイスの有効性を検討するため、DNA 修飾ビーズの運

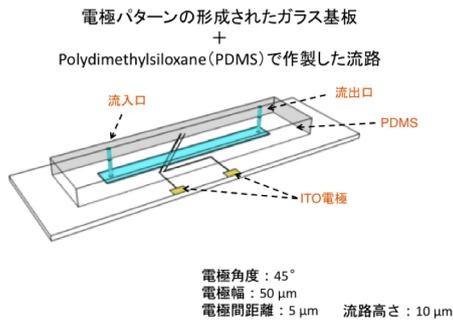


図2 マイクロ流路デバイス

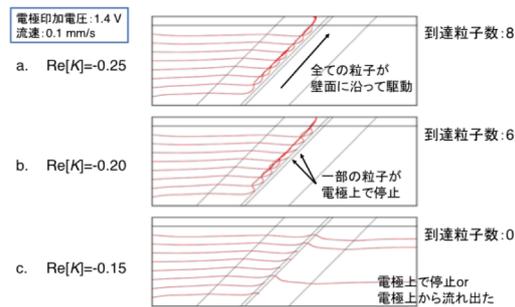
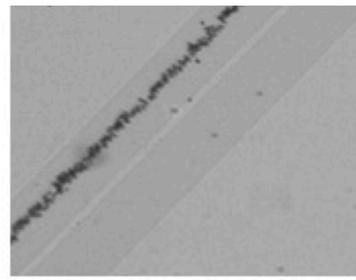


図3 DNA修飾ビーズ運動軌跡の数値シミュレーション結果

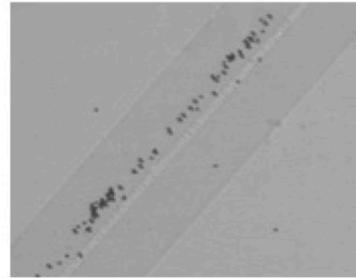
動軌跡を数値シミュレーションにより検討した。その結果、負の誘電泳動力の低下により、DNA修飾ビーズの運動軌跡が変化することが定量的に確認された(図3)。

(3) マイクロビーズの運動軌跡変化を利用した電氣的DNA診断法の提案と実証

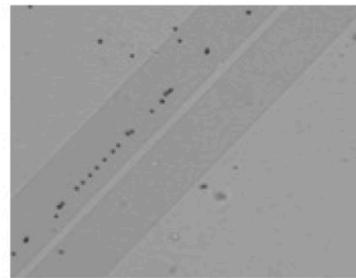
考案したマイクロ流路デバイスを試作し、DNA修飾ビーズの運動軌跡の変化を観察した(図4)。その結果、ビーズ1個あたりのDNA修飾量が1000個以上の場合、DNA修飾ビーズの運動軌跡に明確な変化が現れた。即ち、DNA修飾を施していないビーズには大きな負の誘電泳動力が作用するため、その運動軌跡はマイクロ電極のギャップに沿って大きく変化した。これに対し、DNA修飾ビーズでは負の誘電泳動力の影響が相対的に低下するため運動軌跡の変化が小さくなった。この現象を利用して、粒子個数を蛍光画像観察で定量化する手法を考案し、その有効性を確認した(図5)。同手法では、微粒子を 5.8×10^6 個用いることでDNA修飾条件 10^2 DNA/particleの検出が可能であることを示した(図6)。当初目標としたPCRフリーは実現できなかったものの、従来の正の誘電泳動を用いた検出法と比較して約100倍の高感検出を達成した(図7)。



(a) DNA未修飾



(b) 1×10^2 DNA/particle



(c) 1×10^3 DNA/particle

図4 DNA修飾ビーズのマイクロ流路内における運動軌跡の変化

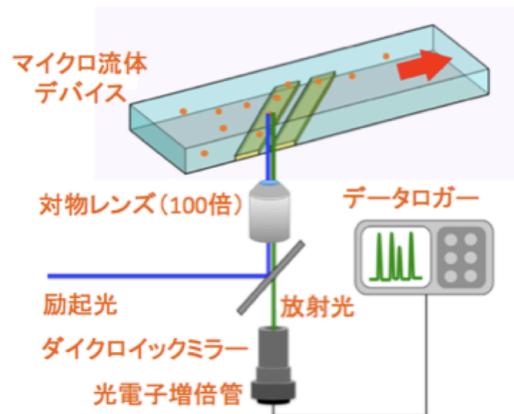


図5 蛍光観測による粒子運動軌跡変化定量化の原理

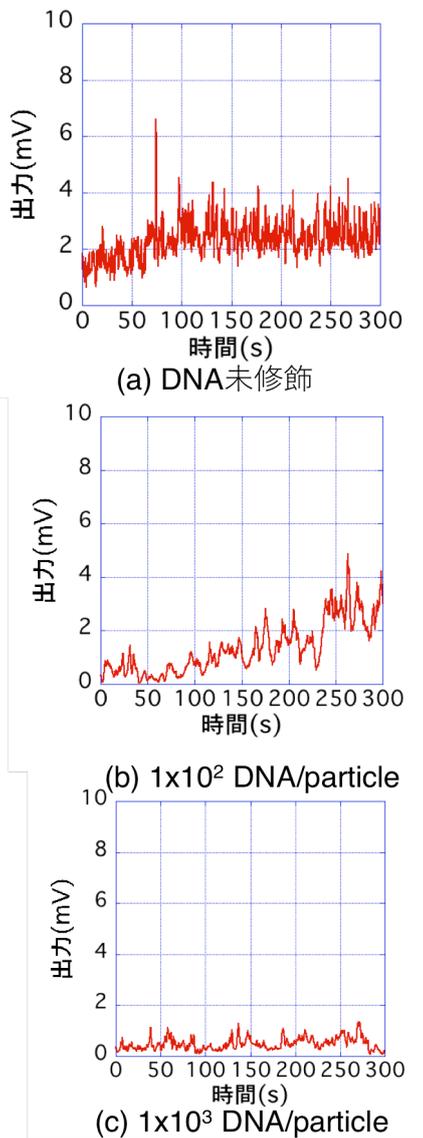


図6 DNA修飾による粒子運動軌跡変化に伴う蛍光信号の変化

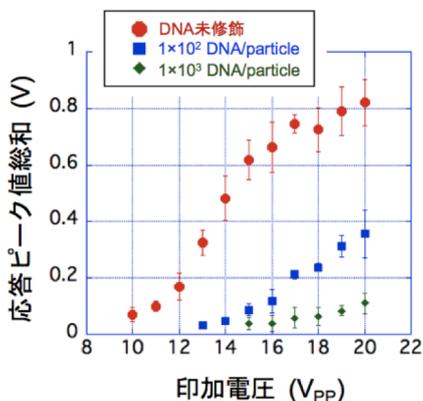


図7 蛍光信号変化によるDNA検出結果

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)

[学会発表] (計8件)

①松田兼弥、井田健一、丁震昊、中野道彦、末廣純也：マイクロ流体デバイスを用いた微粒子誘電泳動によるDNA検出、電気学会全国大会、2018年3月15日、九州大学(福岡県福岡市)

②Z. Ding, K. Ida, K. Matsuda, M. Nakano, J. Suehiro: DNA Detection Microfluidic Device Based on Negative Dielectrophoresis of DNA Labeled microbeads, IEEE Sensors 2017, Nov. 1st 2017, Glasgow, UK

③井田健一、松田兼弥、丁震昊、中野道彦、末廣純也：負の微粒子誘電泳動を用いたDNA検出マイクロ流体デバイス II. 蛍光ビーズを用いた光学的検出の検討、電気・情報関係学会九州支部第70回連合大会、2017年9月27日、琉球大学(沖縄県那覇市)

④松田兼弥、井田健一、丁震昊、中野道彦、末廣純也：負の微粒子誘電泳動を用いたDNA検出マイクロ流体デバイス I. 数値計算に基づく理論的検討、電気・情報関係学会九州支部第70回連合大会、2017年9月27日、琉球大学(沖縄県那覇市)

⑤井田健一、松田兼弥、丁震昊、中野道彦、末廣純也：負の微粒子誘電泳動を用いたDNA検出マイクロ流体デバイス、電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、2017年6月29日、イーグレひめじ(兵庫県姫路市)

⑥井田健一、松田兼弥、中野道彦、末廣純也：微粒子誘電泳動によるDNA検出の高感度化を目的としたマイクロ流体デバイスの開発、電気学会全国大会、2017年3月17日、富山大学(富山県富山市)

⑦井田健一、中野道彦、末廣純也：微粒子誘電泳動によるDNA検出の高感度化を目的としたマイクロ流体デバイスの開発、電気・情報関係学会九州支部第69回連合大会、2016年9月29日、宮崎大学(宮崎県宮崎市)

⑧井田健一、中野道彦、末廣純也：微粒子誘電泳動によるDNA検出の高感度化を目的としたマイクロ流体デバイスの開発、電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、2016年6月29日、金沢市文化ホール(石川県金沢市)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

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

(3) 研究協力者

丁 震昊 (DING, Zhenhao)
九州大学・大学院システム情報科学府・博士
課程学生

(4) 研究協力者

井田 健一 (IDA, Kenichi)
九州大学・大学院システム情報科学府・修士
課程学生

(5) 研究協力者

松田 兼弥 (MATSUDA, Kenya)
九州大学・大学院システム情報科学府・修士
課程学生