

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K14504
研究課題名(和文)コンパクトディスク型マイクロチップを用いるオンサイト遺伝子検査システムの開発

研究課題名(英文)Development of on-site genetic testing system using compact disk-type microfluidic device

研究代表者
森岡 和夫(Morioka, Kazuhiro)
東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70794056
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コンパクトディスク(CD)型マイクロチップ上で遺伝子検査に必要な操作(DNA抽出、遺伝子増幅および検出)を行うための新規技術・システムを開発した。開発したCD型蛍光検出システムを用いて、チップの回転中に蛍光を連続的に測定することに成功した。また、小型のループ介在等温遺伝子増幅(LAMP)システムを用いて、遺伝子増幅に伴う蛍光強度変化のリアルタイム測定を達成した。さらに、酸化インジウムスズ(ITO)ヒーターを備えたシステムにより、チップ上でDNA抽出を行うことに成功した。これらの技術・システムを統合することにより、現場での簡便・迅速・高感度な遺伝子検査が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、遺伝子検査に要する分析操作(DNA抽出・遺伝子増幅・検出)を一枚のCD型マイクロチップ上で実施するための新規技術・システムを開発した。これにより、オンサイトで、誰もが、簡便、迅速かつ高感度な全自動遺伝子検査を実施できるシステムの開発に有用な分析技術・装置構成を見出した。開発した技術やシステムを統合することで、現場での感染症検査や在宅ベッドサイドでの疾病診断などに使用できる、CD型マイクロチップを用いるポータブルな遺伝子検査システムを実現できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Novel methods and systems to carry out genetic testing operations (i.e., DNA extraction, gene amplifier, and detection) with a compact-disk (CD)-type microfluidic device were developed. A CD-type fluorescence system allowed us to continuously measure the fluorescence intensity in the detection chamber on the CD-type microfluidic device during rotation. A small-sized genetic testing system for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was successfully used for real-time measurement of the change in fluorescence intensities with gene amplification. A CD-type DNA extraction system equipped with an indium tin oxide (ITO) heater enabled us to easily perform DNA extraction on a CD-type microfluidic device. A portable and automatic gene testing system with a CD-type microfluidic device would be realized by integrated these downsized systems.

研究分野：分析化学

キーワード：CD型マイクロチップ オンサイト測定 リアルタイム蛍光検出 LAMP DNA抽出 遺伝子検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(リアルタイム PCR)に基づく遺伝子検査は、感染症診断、癌や遺伝性疾患のリスク診断、親子鑑定、食品中に含まれる細菌検査など、幅広い分野で用いられている。この検査をオンサイトで実施することができれば、空港や港などでの迅速な感染症診断や、ベッドサイド・診療所・在宅での疾病診断などが可能となり、人間のより安全・安心な暮らしの実現やクオリティ・オブ・ライフ(QOL)の向上に大きく貢献すると考えられる。しかし、リアルタイム PCR による遺伝子検査は、熟練した技術者や大型かつ高価な専門装置が必要であるとともに、遺伝子増幅に周期的な温度制御を要し、検査に長時間を要するため、実際にオンサイトで遺伝子検査を行うことは難しい。これらの問題を解決できる、“現場で、誰もが、迅速、簡便かつ高感度を実施できる遺伝子検査装置”の開発が求められている。

2. 研究の目的

コンパクトディスク(CD)型マイクロチップは、微細流路がデザインされた円盤状の基板であり、チップを回転させたときに生じる遠心力を利用して試料や試薬を順次送液することで、チップ上で様々な分析操作を行うことが可能である。CD 型マイクロチップは、多段階の分析操作の自動化や、送液にポンプやバルブが不要であるという利点を有するため、現場での遺伝子検査に有用な分析ツールである。しかし、CD 型マイクロチップを用いる遺伝子検査は、温度制御や検出に周辺機器が大型かつ高価な周辺機器を使用するという問題を抱えており、オンサイトでの遺伝子検査を実施することは未だ困難である。ループ介在等温遺伝子増幅法(LAMP 法)は、一定温度で DNA 増幅を行うことができる、周期的な温度制御が不要な遺伝子検査法である。LAMP 法による遺伝子検査は、温度制御システムを小型化できるとともに、増幅効率が高く分析時間の短縮も可能であることから、リアルタイム PCR 法と比較してオンサイトでの遺伝子検査に適していると考えられる。

著者らはこれまでに、LED や無機フォトダイオードを用いて作製した独自の小型蛍光検出システムと、CD 型マイクロチップを一体化して回転するリアルタイム蛍光分析システムの試作に成功している。このシステムを発展させ、等温制御しながら増幅産物をリアルタイムに検出できるシステムを構築できれば、試料溶液からの DNA 抽出、遺伝子増幅、検出に至る一連の遺伝子検査操作を一枚の CD 上で迅速に達成することが可能になると考えられる。本研究では、CD 型マイクロチップを用いる LAMP 法に基づく遺伝子検査を実施するために必要な、DNA 抽出・遺伝子増幅・検出を行う新規技術・システムの開発について検討した。

3. 研究の方法

(1) CD 型マイクロチップと検出システムが一体となって回転する蛍光検出システム

試料導入口および空気弁を形成したポリジメチルシロキサン(PDMS)製ディスク基板と、平滑なポリカーボネートディスク基板とを、流路部をくり貫いた両面粘着シートを用いて貼り合わせることで CD 型マイクロチップを作製した。また、フライス加工機と光造形式 3D プリンターを用いて、光学部品と電子部品を集積するための治具を作製し、これに LED、光学フィルター、フォトダイオード、電流—電圧変換アンプ、データロガー等を固定することで、CD 型蛍光検出システムを構築した。この検出システムと CD 型マイクロチップとを一体化することにより分析システムを構築し(図 1)、グルコースの定量に応用した。西洋わさびペルオキシダーゼ

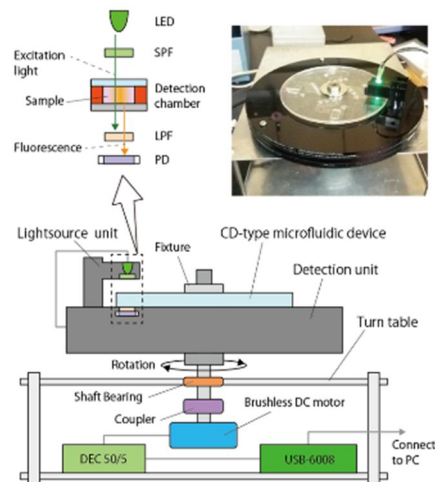


図 1 CD 型マイクロチップと蛍光検出システムが一体化して回転する蛍光検出システム。

(HRP) とグルコースオキシダーゼを予め固定化した CD 型マイクロチップの検出チャンバー内に, Ample Red および種々の濃度のグルコースを含む試料溶液を遠心力により導入し, 酵素反応により生じたレゾルフィンの蛍光強度を測定することにより, グルコースを測定した。

(2) LAMP 法に基づく携帯型遺伝子検査システム

システムは, 超高輝度青色 LED, 光学フィルター, 透明フィルムヒーター, 9 穴マイクロタイタープレートおよび無機フォトダイオード (PD) から構成されている (図 2)。マイクロタイタープレートはヒーター上に設置され, マイクロウェル内の試料溶液は PID 制御により一定温度に加熱される。このとき, 試料溶液には, ショートパスフィルターおよび透明フィルムヒーターを透過した励起光がウェル下部から照射される。発生した蛍光は, ロングパスフィルターを透過してウェル上部に設置された PD により検出される。カルセイン溶液の蛍光測定によりシステムを評価した後に, LAMP 法に基づくコメの品種検査に応用した。

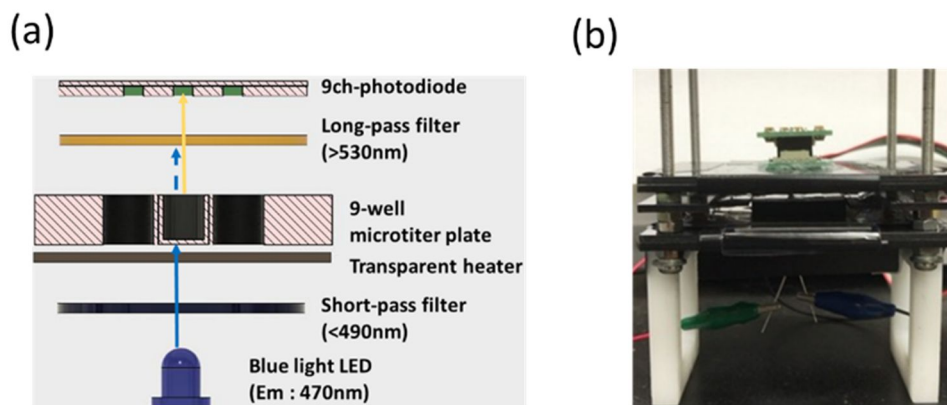


図 2 携帯型遺伝子検査システム。

(3) CD 型マイクロチップを用いる DNA 抽出システム

10 mm 角にカットした ITO ガラス基板の上の両端に銀ペーストを塗布し, 導線を接続することにより ITO ヒーターを作製した。この ITO ヒーターと DC-DC コンバーター, 小型サーモスタットおよびバッテリーを, フライス加工機を用いて切削したディスク型アクリル基板に固定することにより, CD 型マイクロチップを用いる DNA 抽出システムを構築した (図 3)。

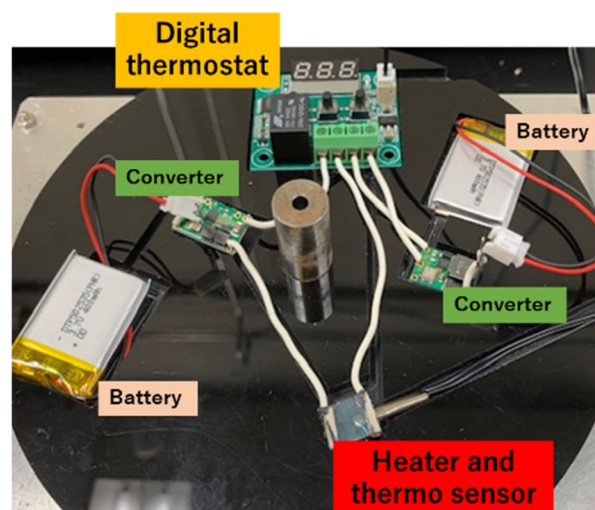


図 3 DNA 抽出システム。

4. 研究成果

(1) CD型マイクロチップと検出システムが一体となって回転する蛍光検出システムの評価
 蛍光物質であるレゾルフィン溶液を使用して回転中の検出システムの性能を評価したところ、静的状態とほぼ同等の感度・安定性で蛍光測定が可能であることがわかった。また、回転数を変化させても蛍光強度はほとんど変化しなかった。次に、このシステムをグルコースの測定に応用し、経時変化する蛍光強度の連続測定について検討した。西洋わさびペルオキシダーゼおよびグルコースオキシダーゼを物理吸着させた検出チャンパーに、Amplex Red とグルコースを含む溶液を導入し、回転状態で蛍光強度を連続して測定した。その結果、反応時間の増加とともに蛍光強度は増加した(図 4a)。作成したグルコースの検量線(図 4b)から、検出限界(3σ)と相対標準偏差($n=4$)は、それぞれ $0.67\ \mu\text{M}$ および 8.5% 以下と見積もられた。これらの結果は、開発したシステムにより、CD型マイクロチップが回転している状態で、検出チャンパー内の溶液の蛍光強度の変化を連続して測定できることを示している。

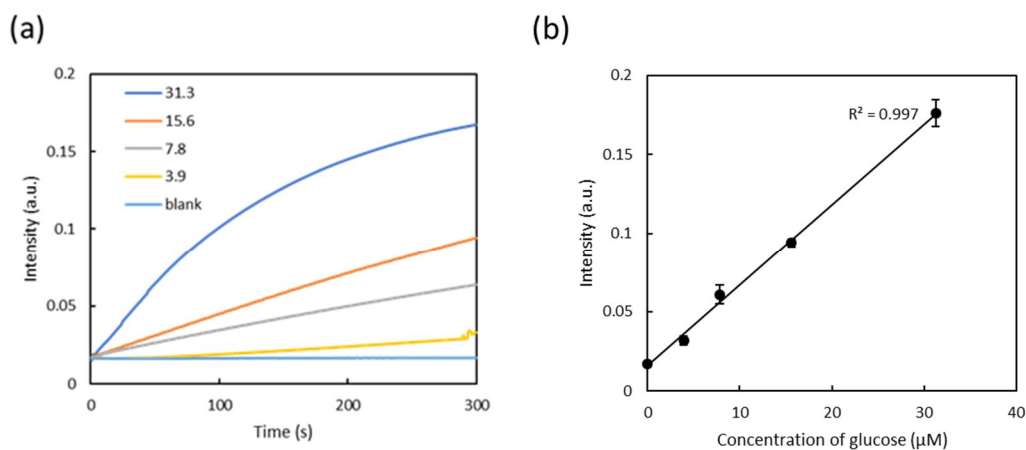


図4 グルコースの測定結果. (a) 異なる濃度のグルコース溶液を導入した後の蛍光強度の時間変化. (b) グルコースの検量線.

(2) LAMP 法に基づく携帯型遺伝子検査システムの評価とコメの品種判別試験への応用

作製したシステムの性能を評価するために、カルセインの蛍光測定を行った。ウェル内に $0 \sim 500\ \mu\text{M}$ カルセイン溶液を $25\ \mu\text{L}$ 入れ、蛍光強度を測定した。その結果、カルセインの濃度増加に伴い蛍光強度は増大し、 $32\ \mu\text{M}$ 以下の濃度範囲において作成した検量線は良好な直線性 ($R^2 = 0.995$) を示した(図 5a)。また、本システムによるカルセインの検出限界(3σ)は、 $0.85\ \mu\text{M}$ と見積もられた。この結果は、本システムによる蛍光測定が可能であることを示している。次に、本システムを、コシヒカリ LAMP 判別キットを用いるコメの品種識別検査に応用した。試料としてコシヒカリを含む 4 品種のコメを使用した。DNA 抽出をそれぞれ実施した後に、DNA 抽出液と検査液を混合した試料溶液をウェル内に封入し、測定を実施した。その結果、他の品種の場合では経時的な蛍光強度の増大が観測された一方で、コシヒカリでは増加が見られなかった(図 5b)。この結果は、本システムを遺伝子検査に応用できることを示唆している。開

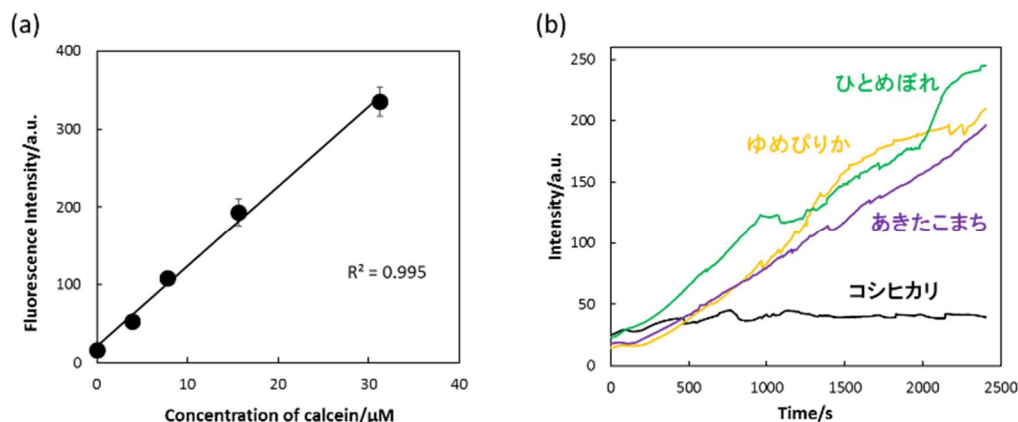


図5 遺伝子検査システムの評価. (a) カルセインの検量線. (b) コメの品種判別検査における 遺伝子増幅過程のモニタリング.

発した蛍光検出システムと透明ヒーターを組み合わせることにより、小型の装置により定温加熱しながらリアルタイム測定が可能であることがわかった。

(3) CD 型マイクロチップを用いる DNA 抽出システムの評価

本システムは、カネカ製簡易 DNA 抽出キット version 2 による DNA 抽出を行う構成であり、試料溶液を 98 °C で 10 分間加熱する操作を含んでいる。そこでまず、サーモスタットの設定温度を 98 °C に設定したときの、自作した ITO ヒーター(図 6a)の表面温度を測定したところ、ITO ヒーターの表面温度は電源投入後約 3 分で設定温度の 98 °C に到達し、10 分以上設定温度を維持できることが確認された(図 6b)。この結果は、試作した CD 型温度制御システムを DNA の抽出に利用できる可能性があることを示している。そこで、本システムおよびマニュアル操作により試料から DNA 抽出を行った後に、サーマルサイクラーによる遺伝子増幅およびアガロースゲル電気泳動を行い、その結果を比較した。その結果、いずれの方法においてもバンドが検出された。この結果から、開発したシステムにより、CD 型マイクロチップ上で DNA 抽出を実施できることが明らかになった。

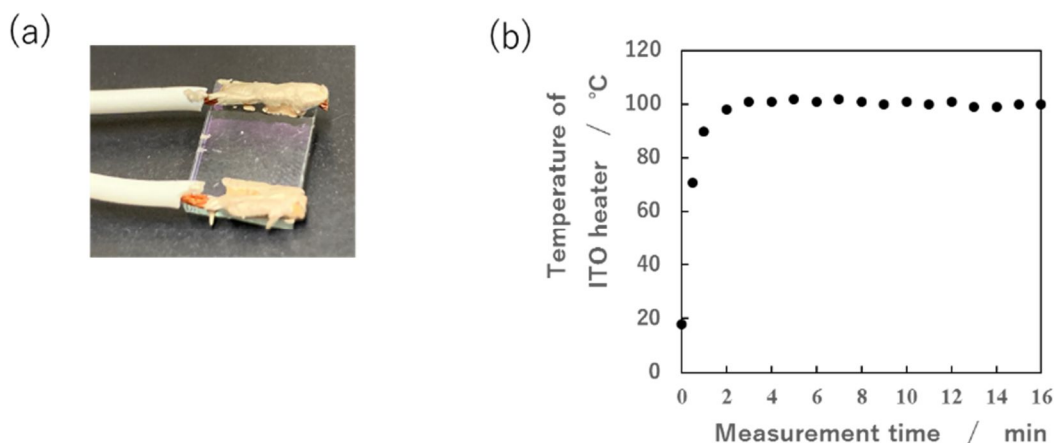


図 6 (a) 自作した ITO ヒーター。(b) 時間に対するヒーターの表面温度。

(4) 結論

本研究では、DNA 抽出・遺伝子増幅・検出を行うシステムを開発した。開発したシステムの要素技術を統合し、CD 型マイクロチップの利点である遠心力を利用した送液法と組み合わせることで、ポータブルな全自動遺伝子検査システムを実現できる。このシステムが実用化されれば、環境計測、感染症検査、疾病診断、食品検査などを、装置を持ち運んで現場で測定することが可能となることから、環境保全や人類の健康福祉に大いに貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森岡 和太, 野条 拓矢, 辺見 彰秀, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 曾 湖烈, 加藤 俊吾, 内山 一美, 中嶋 秀
2. 発表標題 オンサイト測定を指向したコンパクトディスク型蛍光検出システムの開発
3. 学会等名 第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森岡 和太, 水本 拓哉, 辺見 彰秀, 曾 湖烈, 加藤 俊吾, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 内山 一美, 中嶋 秀
2. 発表標題 透明フィルムヒーターを用いるオンサイト遺伝子検査システムの開発
3. 学会等名 第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマ・フォーラム (PPF 2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野条 拓矢, 森岡 和太, 辺見 彰秀, 曾 湖烈, 加藤 俊吾, 内山 一美, 中嶋 秀,
2. 発表標題 リアルタイム測定が可能なコンパクトディスク型蛍光検出システムの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Morioka, Takuya Nojo, Akihide Hemmi, Norio Teshima, Tomonari Umemura, Shungo Kato, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima
2. 発表標題 LAB-ON-A-CD CAPABLE OF CONTINUOUS FLUORESCENCE MEASUREMENT
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----