

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25820174
研究課題名(和文) ウイルスを特異的に検出するためのハイブリッド誘電泳動インピーダンス計測法の開発

研究課題名(英文) Development of hybrid dielectrophoretic impedance measurement for specific detection of virus

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科(研究院・准教授)

研究者番号：00447856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：誘電泳動インピーダンス計測法(DEPIM)を応用して、病原性ウイルスを迅速かつ簡便に測定する手法の開発を目的に研究を行った。アデノウイルスやロタウイルスを用いて、検出できるか試みた。最初に、蛍光染色ウイルスを用いて、それぞれのウイルスの誘電泳動特性を明らかにした。そして、DEPIMを行ったところ、その感度は数十 ng/mlであった。この感度は十分高いものではなかったため、高感度かつ選択的にウイルスを検出するために、核酸増幅法と組み合わせることを考えた。新たに、微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法を考案し、これによってウイルスを高感度かつ選択的に検出できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a method detecting infectious virus rapidly and easily by using dielectrophoretic impedance measurement, DEPIM. Adenovirus and rotavirus were used as testing viruses. At first, dielectric property of the viruses was evaluated by direct observation of the dielectrophoresis of them. Then, DEPIM of the viruses was carried out. It was demonstrated that the sensitivity of the DEPIM was several tens ng/ml. Because the sensitivity was not enough to effective detection of infectious viruses, new method using dielectrophoresis of microbeads was proposed. This method detects DNA amplified from target viruses by polymerase chain reaction. Effectiveness of the method was demonstrated by using amplified DNA from RNA derived from norovirus and human immunodeficiency virus.

研究分野：静電気生物応用

キーワード：誘電泳動 ウイルス検出 PCR インピーダンス計測 簡易検査 ウイルス検査

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルスは様々な病気や食中毒をもたらす。それらを迅速に検出することは現代社会では必要不可欠なものである。その方法には、古典的な培養法を始め、核酸(遺伝子)を検出する核酸増幅法や抗体を用いた免疫法などがある。さらに、近年では微細加工技術を利用して、少量・省スペース・高速な検出法が検討されている。その中で、我々は、誘電泳動現象を利用して液中の細菌を微細電極ギャップに捕集し、その捕集によって生じる微細電極間のインピーダンス変化を測定する誘電泳動インピーダンス計測法(Dielectrophoretic Impedance Measurement, DEPIM)を開発した。誘電泳動による細菌捕集は、国内外を問わず様々な研究者によって行われているが、DEPIMは、インピーダンス計測と組み合わせた点に特徴がある。この手法は、細菌のみならず様々なマイクロ/ナノサイズ物質の検出に利用可能である。様々な改良によって、50 cells/mL(大腸菌)の検出感度を達成している。DEPIMは細菌を迅速かつ高感度・定量的に検出でき、また自動化可能で操作を簡便にできる。研究代表者らは、DEPIMを医療に応用するための研究開発を行い、口腔内細菌の検出法を実現した。

研究代表者は、平成23年~24年に科研費・若手Bの助成を受けて、DEPIMのウイルス検出への応用を研究した。それまでDEPIMによるウイルス検出は全く行われていなかった。感染性腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスを対象とした。まず、蛍光染色ノロウイルスキャプシドを用いてノロウイルスが誘電泳動可能であることを示した。

2. 研究の目的

本研究はDEPIMによるウイルス検出を発展させるもので、ウイルスを特異的(選択的)にDEPIM検出することを目的とする。通常、ウイルス検査に持ち込まれる検体には、様々な物質が含まれている。ノロウイルスの場合は、糞便が主たる検出対象である。そのため、そのような夾雑物の中から検出対象を選択的に検出する必要がある。一方、誘電泳動は誘電体に働く力であり、特に生体由来の物質であればその誘電泳動特性には大きな差がなく、誘電泳動のみを使って対象物質を選別することは非常に困難である。

本研究では、次の2項目の研究を行った。(1)ノロウイルス以外のウイルスのDEPIM検出、(2)ウイルスを特異的に検出するための新しい手法の開発。(1)から、ウイルスを直接的に高感度にDEPIM検出することは難しいとの結果に至ったので、新しい手法(2)を考案した。

3. 研究の方法

(1) ウイルスの DEPIM 検出

アデノウイルスおよびロタウイルスをDEPIM検出できるかどうかを試みた。まず、アデノウイルスおよびロタウイルスの誘電泳動特性を調べた。その後、それぞれのウイルスをDEPIM検出した。

サンプルには、無毒化したウイルスを用いた。誘電泳動特性を調べるために、無毒化ウイルスを蛍光色素で染色した。誘電泳動の様子を顕微鏡で直接観察し、その周波数特性を調べ、それぞれのウイルスの誘電泳動特性を明らかにした。DEPIM検出では、微細電極を含むチャンバーに無毒化ウイルスサンプルを導入して測定した。種々濃度のウイルスサンプルを用意し、それぞれに対してDEPIM応答を取得した。

(2) DNA の高感度検出

後述するように、ウイルスをDEPIMで直接検出するとその感度は数十ng/ml程度であった。この感度は、病原性ウイルスの検出に応用するためには十分に高いとは言えない。そこで、高感度なウイルス検出である核酸増幅法と組み合わせることを考えた。

PCR(polymerase chain reaction)に代表される核酸増幅法は、対象DNAを特異的に増幅する手法である。実際に、ウイルス検出では、最も高感度で特異性の高い手法として利用されている。PCRにおいて、増幅されたDNAは、何らかの方法で検出されなければならない。一般に、アガロースゲル電気泳動による検出が行われているが、煩雑な作業が必要で、また1~2時間要する。そこで、PCR後のDNAを迅速かつ簡便に検出する手法として、DEPIMを応用することを考えた。

DNAをDEPIMで測定するために、その対象DNAを誘電体微粒子に結合して、そのDNA結合微粒子を誘電泳動捕集することにした。ウイルス誘電泳動の研究から、微小物体の誘電泳動がその表面導電率に依存するという知見が得られていた。このことから着想を得て、誘電体微粒子にDNAを結合させることで、その誘電泳動特性が大きく変化するのではないかと考えた。

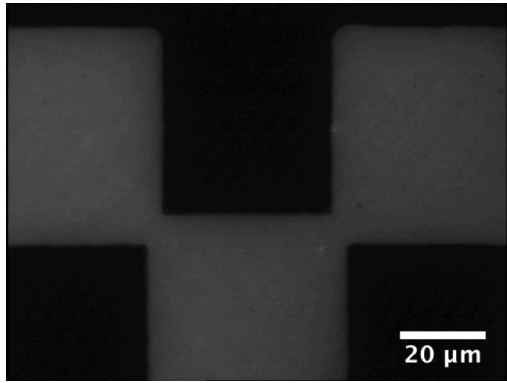
直径数 μm の誘電体微粒子は、負の誘電泳動を示す。一方で、DNAはその構造から溶液中では多数の電荷を有している。このDNAが微粒子に結合することで、その誘電泳動が正の誘電泳動に変化すると考えた。そして、この性質を利用することで、対象DNAが結合した微粒子のみを選択的に検出できると考えた。

ここでは、ノロウイルス由来RNAおよびHIV(human immunodeficiency virus)由来RNAからRT-PCR(reverse transcription - PCR)を行い、その増幅DNAを検出した。

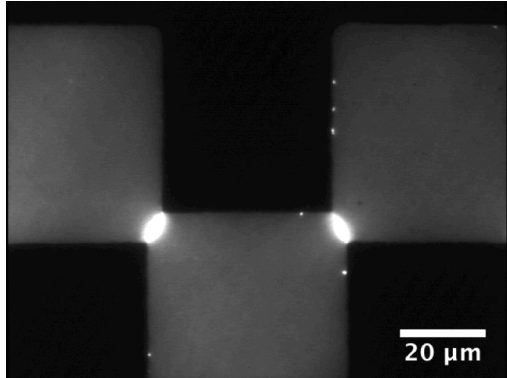
4. 研究成果

(1) ウイルスの DEPIM 検出

図1に顕微鏡観察した蛍光染色ロタウイルスの誘電泳動を示す。電圧印加前は溶液中に分散していたウイルスが、電圧印加後電極(黒い部分)間に捕集された。アデノウイルスおよびロタウイルスの誘電泳動特性を調べるために、懸濁溶液の導電率を変化させ、そのときの誘電泳動の周波数依存性を調べた。図2にそれぞれの誘電泳動特性を示す。これは、懸濁溶液の導電率に対して、誘電泳動のクロスオーバー周波数をプロットしたものである。クロスオーバー周波数は、誘電泳動において、正あるいは負の方向の



(a)



(b)

図 1 蛍光染色ロタウイルスの誘電泳動。
(a) 誘電泳動前, (b) 誘電泳動 (1 MHz, 6×10^{-4} S/m).

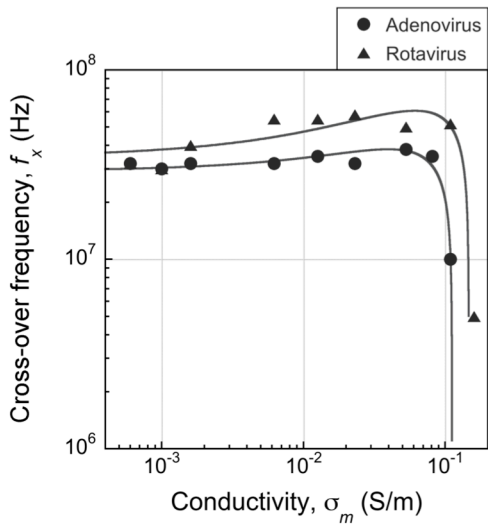
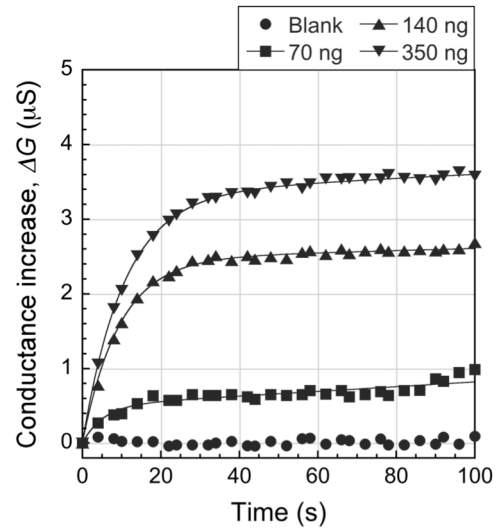


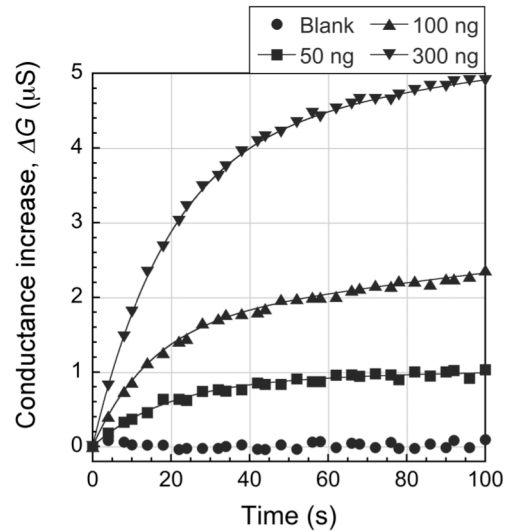
図 2 各ウイルスのクロスオーバー周波数.

表 1 ウイルスの誘電特性.

| 誘電特性 | アデノウイルス | ロタウイルス |
|------------|------------------|------------------|
| 表面導電率 (nS) | 1.74 ± 0.24 | 1.65 ± 0.73 |
| ゼータ電位 (mV) | 58.3 | 83.5 |
| 比誘電率 | 68.15 ± 1.90 | 73.21 ± 3.34 |



(a)



(b)

図 3 ウイルス DEPIM. (a)アデノウイルス, (b)ロタウイルス.

いずれの誘電泳動も示さない, 誘電泳動力がゼロになる周波数のことである. 図 2 中の実線は, 得られたクロスオーバー周波数に対して, 誘電泳動特性をパラメータフィッティングしたものである. この結果から, それぞれのウイルスに対して, 表 1 の誘電特性が明らかになった.

次にそれぞれのウイルスの DEPIM 検出を行った. 図 3 はそれぞれのウイルスの DEPIM 結果を示す. これまでは, 細菌検出に用いられてきた DEPIM がウイルスにも適用できることが示された. その検出時間はおよそ 100 秒以内であった. また, その検出感度は数十 ng/ml であった. これは, 簡易迅速検査法の一つであるイムノクロマト法と同程度であった. 検出時間が短いことは一つの特徴ではあるが, 高感度のウイルス検査法とは言えないということがわかった.

(2) DNA の高感度検出

ウイルスを高感度に検出するために, PCR と

DEPIM を組み合わせた手法について検討した。その手法は図 4 に示すもので、PCR 後の増幅 DNA を誘電体微粒子に結合させて、その DNA 結合微粒子を選択的に検出する。図 5 に DNA 結合前後の微粒子の誘電泳動を示す。DNA 結合前は負の誘電泳動（電極から反発）を示していたが、DNA 結合後には正の誘電泳動（電極に集積）に変化した。これは、DNA が持つ電荷によって、微粒子上の表面導電率が変化したため

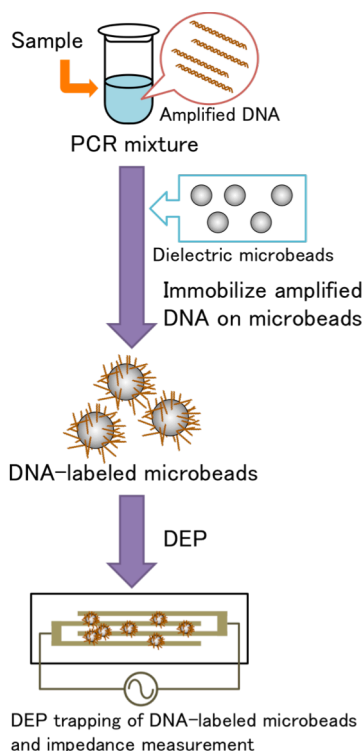


図 4 微粒子誘電泳動を利用した DNA 検出の模式図。

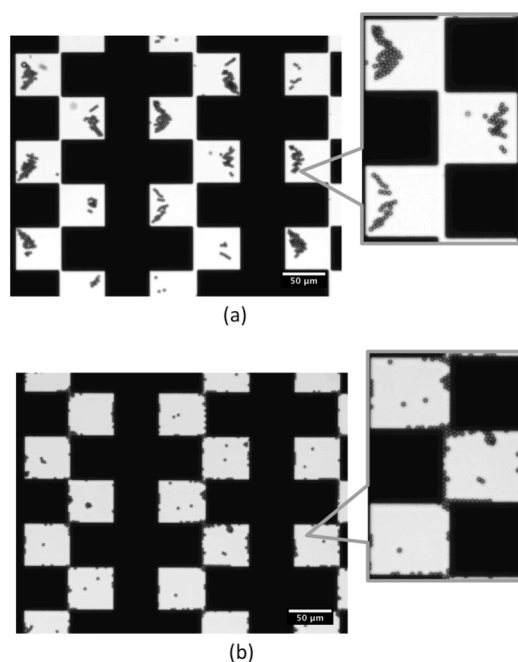


図 5 DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化。(a) 未修飾微粒子, (b) DNA 結合微粒子。

である。この原理を応用して、ノロウイルスおよび HIV 由来 RNA から RT-PCR によって増幅した DNA が検出可能かどうかを試みた。

図 6 は、HIV 由来 DNA を計測した結果である。未結合微粒子は応答を示さないのに対して、DNA 結合微粒子は迅速な応答を示した。ノロウイルスに関しても同様の結果であった。PCR は非常に高感度であるため、その増幅 DNA を迅速に検出することで、これまでの PCR によるウイルス検出を飛躍的に増加できる手法が開発できたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara, J. Suehiro, "Rapid microbead-based DNA detection using dielectrophoresis and impedance measurement," *Europhysics Letters*, 査読有り, vol. 108, 2014, 28003. DOI: 10.1209/0295-5075/108/28003
- ② R. Hamada, H. Takayama, Y. Shonishi, L. Mao, M. Nakano, J. Suehiro, "A rapid bacteria detection technique utilizing impedance measurement combined with positive and negative dielectrophoresis," *Sensors and Actuators B*, 査読有り, vol. 181, 2013, 439-445. DOI: 10.1016/j.snb.2013.02.030

[学会発表] (計 30 件)

- ① H. Kasahara, Z. Ding, M. Nakano, J. Suehiro, "Effect of DNA length on dielectrophoretic characteristics of DNA-labeled microbeads," 2015 IEEE International Conference on Industrial Technology (ICIT 2015), 2015.3.20, Sevilla (Spain).
- ② Y. Inoue, R. Obara, M. Nakano, J. Suehiro, "Concentration of bacteria in high conductive medium using negative dielectrophoresis," 2015 IEEE International Conference on Industrial Technology (ICIT 2015), 2015.3.20,

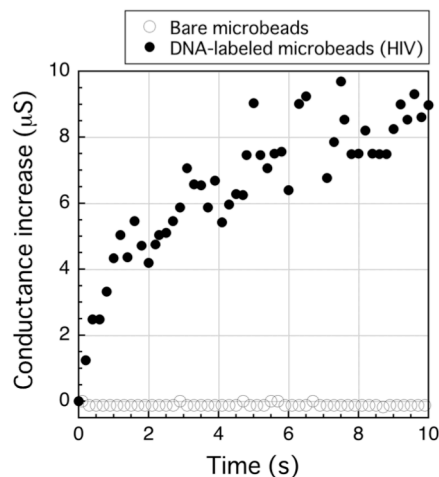


図 6 HIV 由来増幅 DNA の検出結果。

- Sevilla (Spain).
- ③ Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro, “Dielectrophoretic Characteristics of microbeads with DNA of various length,” 8th International Conference on Biomedical Electronics and Devices (Biodevices 2015), 2015.1.13, Lisbon (Portugal).
- ④ M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara, J. Suehiro, “DNA detection using microbeads-based dielectrophoretic impedance measurement,” IEEE Sensors 2014, 2014.11.4, Valencia (Spain).
- ⑤ M. Nakano, H. Kasahara, Z. Ding, J. Suehiro, “Selective detection of DNA with different length using microbeads-based dielectrophoresis and impedance measurement,” The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014.10.29, San Antonio (USA).
- ⑥ M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara, R. Obara, J. Suehiro, “Rapid DNA detection by microbead based dielectrophoretic impedance measurement with modified voltage waveform,” The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), 2014.8.26, Fukuoka (Japan).
- ⑦ Z. Ding, H. Kasahara, R. Obara, Y. Inoue, M. Nakano, J. Suehiro, “Dielectrophoretic characteristics of DNA-labeled microbeads with various ratios of DNA to microbeads,” Dielectrophoresis 2014, 2014.6.14, London (UK).
- ⑧ M. Nakano, Z. Ding, R. Obara, H. Kasahara, J. Suehiro, “Rapid DNA detection based on direction reversing of dielectrophoresis of DNA-attached microbeads,” 24th World Congress on Biosensors (BIOSENSORS 2014), 2014.5.29, Melbourne (Australia).
- ⑨ Z. Ding, H. Kasahara, R. Obara, M. Nakano, J. Suehiro, “Effects of DNA labeling on dielectrophoretic characteristics of microbeads,” Advances in Microfluidics & Nanofluidics 2014, 2014.5.23, Taipei (Taiwan).
- ⑩ M. Nakano, R. Obara, Z. Ding, J. Suehiro, “Detection of norovirus and rotavirus by dielectrophoretic impedance measurement,” 2013 Seventh International Conference on Sensing Technology (ICST 2013), 2013.12.04, Wellington (New Zealand).
- ⑪ R. Obara, Z. Ding, K. Shinzato, M. Nakano, J. Suehiro, “Higher throughput of optical detection of bacteria concentrated by negative dielectrophoresis,” 2013 Seventh International Conference on Sensing Technology (ICST 2013), 2013.12.04, Wellington (New Zealand).
- ⑫ 笠原弘道, Nur Afilla Binti Abd Latif, 丁震昊, 中野道彦, 末廣純也, “DNA 修飾粒子の誘電泳動特性: 粒子径の影響”, 平成 27 年電気学会全国大会, 2015.3.25, 東京都市大学 世田谷キャンパス(東京都).
- ⑬ 井上祐樹, 尾原稜司, 中野道彦, 末廣純也, “誘電泳動インピーダンス計測法の高感度化の為に新電極構造の提案”, 平成 27 年電気学会全国大会, 2015.3.25, 東京都市大学 世田谷キャンパス(東京都).
- ⑭ 井上祐樹, 尾原稜司, 中野道彦, 末廣純也, “誘電体薄膜を用いた負の誘電泳動力による高導電率溶媒中での細菌濃縮の検討”, 第 31 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2014.10.20, くにびきメッセ(島根県).
- ⑮ 笠原弘道, 丁震昊, 中野道彦, 末廣純也, “表面を DNA 修飾した微粒子の誘電泳動特性評価”, 第 31 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2014.10.21, くにびきメッセ(島根県).
- ⑯ 井上祐樹, 尾原稜司, 中野道彦, 末廣純也, “誘電泳動現象による高導電率中での細菌濃縮に適した電極構造の検討: (1) 数値計算”, 平成 26 年度(第 67 回)電気・情報関係学会九州支部連合大会, 2014.9.19, 鹿児島大学 工学部 郡元キャンパス(鹿児島県).
- ⑰ 尾原稜司, 井上祐樹, 中野道彦, 末廣純也, “誘電泳動現象による高導電率中での細菌濃縮に適した電極構造の検討: (2) 実験”, 平成 26 年度(第 67 回)電気・情報関係学会九州支部連合大会, 2014, 2014.9.19, 鹿児島大学 工学部 郡元キャンパス(鹿児島県).
- ⑱ 笠原弘道, 丁震昊, 中野道彦, 末廣純也, “DNA 修飾微粒子の誘電泳動に及ぼす塩基対数の影響”, 平成 26 年度(第 67 回)電気・情報関係学会九州支部連合大会, 2014.9.19, 鹿児島大学 工学部 郡元キャンパス(鹿児島県).
- ⑲ 中野道彦, 丁震昊, 笠原弘道, 末廣純也, “DNA 結合に伴う微粒子の誘電泳動変化を利用した DNA 検出”, 第 38 回静電気学会全国大会, 2014.9.9, 広島国際大学 呉キャンパス(広島県).
- ⑳ 中野道彦, 丁震昊, 笠原弘道, 尾原稜司, 末廣純也, “微粒子誘電泳動を応用した DNA 高速検出法の開発(1)”, 第 61 回 応用物理学会春季学術講演会, 2014.3.19, 青山学院大学 相模原キャンパス(東京都).
- 21 中野道彦, 丁震昊, 笠原弘道, 尾原稜司, 末廣純也, “微粒子誘電泳動を応用した DNA 高速検出法の開発(2)”, 第 61 回 応用物理学会春季学術講演会, 2014.3.19, 青山学院大学 相模原キャンパス(東京都).
- 22 丁震昊, 笠原弘道, 尾原稜司, 中野道彦, 末廣純也, “DNA 結合による微粒子の誘電泳動特性の変化”, 平成 26 年 電気学会全国大会, 2014.3.18, 愛媛大学(愛媛県).
- 23 尾原稜司, 丁震昊, 新里賢太, 中野道彦, 末廣純也, “負の誘電泳動力による細菌濃縮とその蛍光検出”, 平成 26 年 電気学会

- 全国大会, 2014.3.18, 愛媛大学(愛媛県).
- 24 中野道彦, 丁震昊, 笠原弘道, 尾原稜司, 末廣純也, “DNA 結合微粒子の誘電泳動を用いた DNA 高速検出法の開発”, 平成 26 年 電気学会全国大会, 2014.3.18, 愛媛大学(愛媛県).
- 25 中野道彦, 尾原稜司, 丁震昊, 末廣純也, “DNA 結合によるポリスチレン粒子の誘電泳動特性の変化”, 第 30 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2013.11.5, 仙台国際センター(宮城県).
- 26 丁震昊, 尾原稜司, 毛麗娜, 中野道彦, 末廣純也, “免疫凝集と DEPIM を用いた選択的細菌検出法の基礎検討”, 第 30 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2013.11.5, 仙台国際センター(宮城県).
- 27 丁震昊, 尾原稜司, 中野道彦, 末廣純也, “金コロイドを用いた細菌の免疫凝集と DEPIM 法による選択的検出”, 平成 25 年度(第 66 回)電気関係学会九州支部連合大会, 2013.9.24, 熊本大学(熊本県).
- 28 尾原稜司, 丁震昊, 新里賢太, 中野道彦, 末廣純也, “光学的細菌検出への負の誘電泳動による細菌濃縮の応用”, 平成 25 年度(第 66 回)電気関係学会九州支部連合大会, 2013.9.24, 熊本大学(熊本県).
- 29 中野道彦, 尾原稜司, 丁震昊, 末廣純也, “アデノウイルスとロタウイルスの誘電泳動特性の測定”, 第 37 回静電気学会全国大会, 2013.9.11, 千葉大学(千葉県).
- 30 尾原稜司, 丁震昊, 新里賢太, 中野道彦, 末廣純也, “誘電体薄膜を用いた負の誘電泳動現象による細菌濃縮と光学的細菌検出への応用”, 電気学会 センサ・マイクロマシン部門総合研究会, 2013.8.9, 東京工科大学 蒲田キャンパス(東京都).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:核酸検出法

発明者:中野道彦, 末廣純也

権利者:九州大学

種類:特許

番号:徳がん 2014-183933

出願年月日:2014 年 9 月 14 日

国内外の別:国内

○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>

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・
電気システム工学部門・准教授

研究者番号:00447856

(2)研究分担者

(3)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・
電気システム工学部門

研究者番号:70206382