

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289125

研究課題名(和文) 誘電泳動インピーダンス計測法を用いたDNA診断装置の開発

研究課題名(英文) Development of DNA diagnosis device using dielectrophoretic impedance measurement

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科(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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修飾していないマイクロビーズでは、電極間コンダクタンスは時間と共に低下するのに対し、DNA修飾したマイクロビーズでは増加することがわかった。これは、正の誘電泳動によってマイクロビーズが電極間に捕集されたためである。

大腸菌とイースト菌との混合懸濁液から抽出した大腸菌DNAをPCR増幅し、マイクロビーズ表面に結合させ、DEPIMで検出した結果、大腸菌を、24000 CFU/mlの検出感度で選択的に検出できることがわかった。豚肉と牛肉を混合した食肉サンプルから抽出した豚肉DNAを同様に検出した結果より、ターゲットとした豚DNAを提案手法によって選択的に検出できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：DEPIM (dielectrophoretic impedance measurement) revealed that the microelectrode conductance increased with elapsed time as a result of positive DEP trap of DNA-labeled microbeads. On the other hand, intact microbeads were not trapped on the microelectrode decreasing the conductance. This result implies that the presented DNA detection method can basically works as intended. The electrical DNA detection method was further applied to bacterial detection. Bacterial DNA was extracted from E. coli strain K12 bacteria and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The presented method realized quantitative detection of specific bacteria at concentrations above 100000 and 24000 CFU/ml for bacterial solutions with and without other bacterial presence, respectively. It was also showed the method detected 100000 copies of pig meat DNA in the mixture of 10^8 copies of cow meat DNA. As the results, 5 mg of pork in 50 mg of meat mixed with beef was detected.

研究分野：静電気応用工学

キーワード：誘電泳動 DNA 細菌検査 食品検査 Bio MEMS 電気インピーダンス

1. 研究開始当初の背景

近年、新型インフルエンザや口蹄疫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・予防には、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 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、その重要性は国際的にも高く評価されている。また、ナノセンサーに関しては、誘電泳動集積法によるカーボンナノチューブガスセンサの作製技術を世界に先駆けて開発した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が世界に先駆けて開発した誘電泳動現象を利用した上記二つの技術をベースとし、迅速かつ低コストな新しい DNA 診断技術の開発に取り組んだ。これにより、パンデミック感染症の早期予防が可能となり、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を目的とした。

本研究で開発を目指した DNA 診断技術の原理を図 1 に示す。まず、診断対象となる DNA を PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)で増幅する。予備実験として増幅した DNA の DEPIM による直接検出を試みたが、十分な感度が得られないことがわかった。これは細菌 (マイクロサイズ) に比べ DNA (ナノサイズ) が小さすぎるため、誘電泳動で集積しても検出できるほどのインピーダンス変化

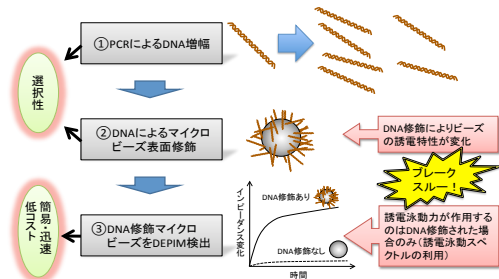


図1 PCR と DEPIM を組み合わせた DNA 診断技術の原理

が得られないためであると考えられる。そこで、次のような検出方法を新たに考案した。まず、PCR 増幅した DNA を表面を化学修飾したマイクロビーズに特異的に結合させる。負に帯電した DNA がマイクロビーズ表面に結合することでその誘電特性が変化し、本来は負の誘電泳動特性を示すマイクロビーズに大きな正の誘電泳動力が作用するようになるため、DNA 修飾されたマイクロビーズだけを DEPIM によって検出することが可能となる。このように、提案手法は、DNA 診断をマイクロビーズの DEPIM 検出によって可能とするものであり、申請者がこれまでに開発してきた DEPIM の特徴 (迅速、簡便、低コスト) を活かした DNA 診断技術を実現できる可能性を有している。

3. 研究の方法

(1) 多層誘電体球モデルを用いた DNA 修飾によるマイクロビーズの誘電特性変化が誘電泳動力に及ぼす影響の理論的検討

図 1 に示した通り、提案する DNA 診断技術の根本原理は、マイクロビーズの誘電特性が DNA 修飾によって変化した結果、大きな正の誘電泳動力が作用するようになることである。本テーマでは、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 修飾によってマイクロビーズに作用する誘電泳動力がどのように変化するかを理論的に検討した。

(2) DNA 修飾したマイクロビーズの誘電泳動特性の調査

本テーマでは、DNA 修飾したマイクロビーズに高周波電界を印加したときの挙動を実験により観察し、DNA 修飾の有無によって誘電泳動現象がどのように変化するかを調査した。誘電泳動は DNA 修飾だけでなく、マイクロビーズの物性値やサイズ、電界周波数、懸濁媒質などにも影響を受けることが理論計算から予測されており、これらのパラメータを変化させて詳細に検討を行った。

(3) DNA 修飾したマイクロビーズの DEPIM 法による電氣的検出法の開発

DNA によって修飾されたマイクロビーズのみが誘電泳動集積される現象を顕微鏡観察や蛍光検出などの光学的手法によって検出することで DNA 診断が可能になる。しかしながら、光学的手法では検出装置が複雑となり高価な蛍光試薬なども必要のため、簡便かつ低コストな DNA 診断技術を実現できない。そこで本テーマでは、研究代表者が開発した電氣的細菌検出技術である DEPIM のマイクロビーズ検出への応用を検討した。

(4) 提案手法の細菌検出と食品検査への応用

提案した DNA 診断技術の応用分野として、細菌検出と食品検査を想定した検討を行っ

た。前者に関しては大腸菌 DNA を検出対象とし、DNA 診断による選択的検出を試みた。後者に関しては、食肉をサンプルとし、牛肉に混入した豚肉 DNA の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 多層誘電体球モデルを用いた DNA 修飾によるマイクロビーズの誘電特性変化が誘電泳動力に及ぼす影響の理論的検討

DNA 修飾によるマイクロビーズの表面コンダクタンスがマイクロビーズに作用する誘電泳動力にどのように影響するかを多層誘電体球モデルを用いて定量的に解析した結果の一例を図 2 に示す。同図より、表面コンダクタンスの増加によって誘電泳動力は負から正に変化すること、その変化はマイクロビーズの大きさにも依存することがわかる。この結果に基づき、誘電泳動力は負から正に変化する周波数（クロスオーバー周波数）のマイクロビーズに結合する DNA 量依存性を調べた結果、約 10^6 個/ビーズではクロスオーバー周波数が飽和することがわかった（図 3）。

(2) DNA 修飾したマイクロビーズの誘電泳動特性の調査

DNA 修飾がマイクロビーズの誘電泳動に及ぼす影響を顕微鏡を用いて観察した結果を図 4 に示す。同図より、DNA で修飾していないマイクロビーズは負の誘電泳動を示し、電極ギャップ間から離れた位置に駆動されていることがわかる（同図 (a)）。これに対し、DNA で修飾したマイクロビーズは正の誘電泳動を示し、電界が集中する電極ギャップ間に捕集される様子が観察された同図 (b)。これは、図 2 に示す理論的解析の妥当性を示すものである。

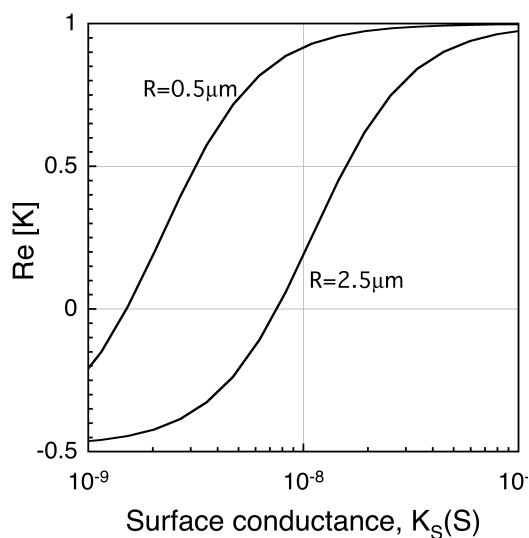


図 2 マイクロビーズの表面コンダクタンスが誘電泳動力に与える影響 (理論値)

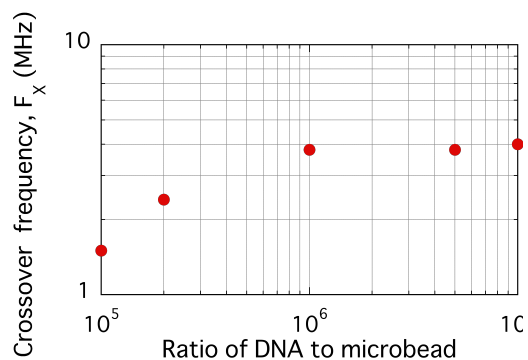
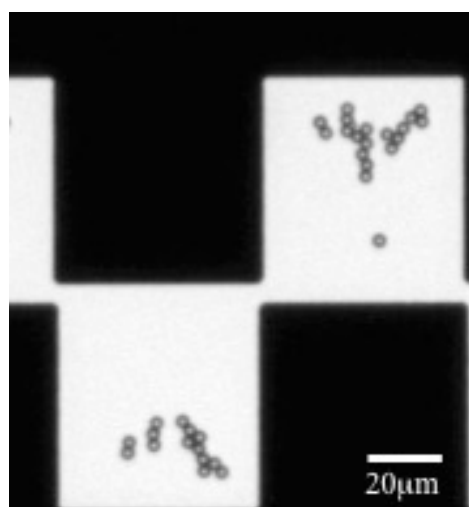
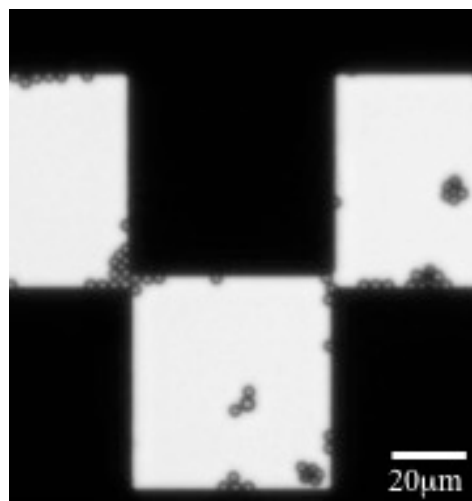


図 3 マイクロビーズ 1 個あたりの DNA 結合数がクロスオーバー周波数に与える影響



(a) DNA 修飾なし



(b) DNA 修飾あり

図 4 マイクロビーズの DNA 修飾が誘電泳動に及ぼす影響

(3) DNA 修飾したマイクロビーズの DEPIM 法による電氣的検出法の開発

DNA 修飾がマイクロビーズの DEPIM 検出に及ぼす影響を図 5 に示す。同図より、DNA で修飾していないマイクロビーズでは、電極間コンダクタンスは時間と共にわずかに低下していることがわかる。これは、図 4 (a) に示した負の誘電泳動によって、マイクロビーズが電極ギャップ間から排除されたためである。これに対し、DNA で修飾したマイクロビーズでは、電極間コンダクタンスは時間と共に急激に増加した。これは、図 4 (b) に示した正の誘電泳動によって、マイクロビーズが電極ギャップ間に捕集されたためである。以上の結果より、提案手法により PCR 増幅した DNA を電氣的に検出可能であることが実証された。

(4) 提案手法の細菌検出と食品検査への応用

大腸菌とイースト菌との混合懸濁液から抽出した DNA から大腸菌 DNA を PCR 増幅し、マイクロビーズ表面に結合させ、DEPIM で検出した結果を図 6 に示す。同図より、ターゲット菌とした大腸菌を、提案手法によって 2.4×10^4 CFU/ml の検出感度で選択的に検出できることがわかる。

豚肉と牛肉を混合した食肉サンプルから抽出した DNA から豚肉 DNA を PCR 増幅し、マイクロビーズ表面に結合させ、DEPIM で検出した結果を図 7 に示す。同図より、ターゲットとした豚 DNA を提案手法によって選択的に検出できることがわかる。

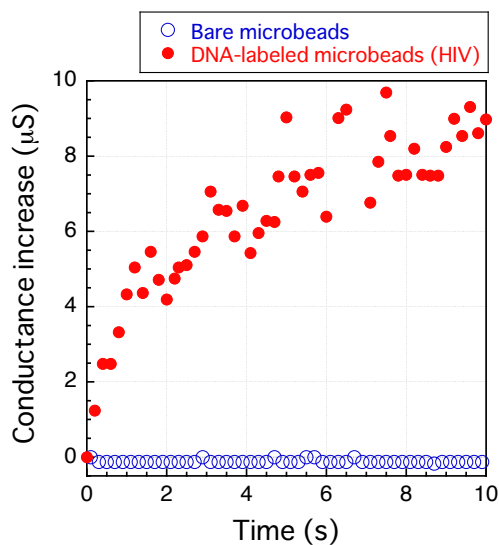


図 5 誘電泳動インピーダンス計測法 (DEPIM) を用いた DNA 修飾マイクロビーズの検出結果

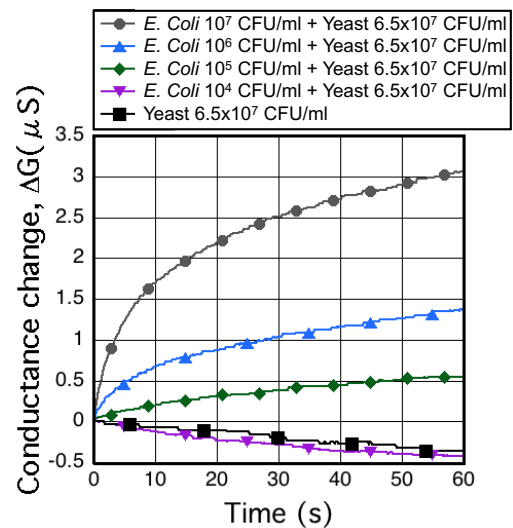


図 6 大腸菌とイースト菌の混合懸濁液から大腸菌 DNA を DEPIM 検出した結果

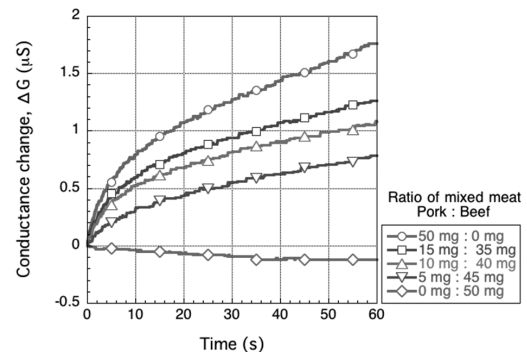


図 7 豚肉と牛肉の混合サンプルから豚肉 DNA を DEPIM 検出した結果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 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、Vol. 41、No. 3、2017、pp. 153-157 (査読有)
- ② Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro: Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics, IET Nanobiotechnology, 2016 (査読有)
DOI: 10.1049/iet-nbt.2016.0186

[学会発表] (計 6 件)

- ① 山崎達郎、丁震昊、堀田博一、中野道彦、末廣純也：耐熱性アビジン修飾微粒子を用いた誘電泳動による DNA 検出、電気学会全国大会、2017 年 3 月 17 日、富山大学 (富

山県富山市)

- ② M. Nakano, T. Yamasaki, Z. Ding, J. Suehiro: Advances in DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis, Dielectrophoresis 2016, July 14th 2016, Cambridge, USA
- ③ Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro: Quantitative bacterial detection using rapid DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis, Biosensors 2016, May 26th 2016, Gothenburg, Sweden
- 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, May 26th 2016, Gothenburg, Sweden
- ⑤ 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混合肉試料からの豚 DNA の選択的検出、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）
- ⑥ 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 検出法による豚由来 DNA の選択的検出、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