

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03277

研究課題名(和文) 進行波誘電泳動を用いたDNA診断装置の開発

研究課題名(英文) Development of DNA diagnostic equipment using traveling wave 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所・教授

研究者番号：70206382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,350,000円

研究成果の概要(和文)：近年、新型コロナウイルスのパンデミックが大きな脅威となっており、迅速・簡易なDNA診断技術の開発が課題となっている。本研究では、進行波電界を利用した新しい原理に基づき、DNA診断技術の高感度化を目指した。まず、DNA修飾した多数のマイクロビーズの進行波電界下の挙動を観察し個々のマイクロビーズの速度を定量化するシステムを開発した。その結果、DNA修飾量の増加に伴いマイクロビーズの運動速度が増大することを明らかにした。開発した手法によるDNA検出感度は、DNA修飾量が100DNA/ビーズであった。これは、研究代表者らのグループが過去に開発したDNA診断法に比べ約1000倍の感度である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新型コロナウイルスのパンデミックが全世界で大きな脅威となっており、迅速・簡易なDNA診断技術の開発が課題となっている。本研究で開発したDNA診断技術は、リアルタイムPCR法などの従来法に比べ低コストであることからより多くの人を対象としたPCR検査を実施することを可能とし、無症状感染者の早期発見に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the pandemic of the new coronavirus has become a major threat, and the development of rapid and simple DNA diagnostic technology has become an issue. In this research, we aimed to improve the sensitivity of DNA diagnostic technology based on a new principle using traveling wave electric field. First, we developed a system for quantifying the velocity of individual microbeads by observing the behavior of many DNA-labeled microbeads under a traveling wave electric field. As a result, it was clarified that the movement speed of microbeads increased with the increase of the amount of the labeling DNA. Regarding the DNA detection sensitivity by the developed method, the amount of labeling DNA was 100 DNA molecules/ bead. This is about 1000 times more sensitive than the DNA diagnostic method developed by the group of investigators in the past.

研究分野：MEMS

キーワード：遺伝子診断 進行波電界 誘電泳動 ウィルス感染症 DNA修飾マイクロビーズ

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、新型コロナウイルス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おり、その拡大を水際で食い止める迅速・簡易な遺伝子診断（以下、DNA 診断）技術の開発が喫緊の課題となっている。

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～マイクロメート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、誘電泳動によってマイクロ電極に細菌を捕集した際のインピーダンス変化から細菌を定量検出する技術で、培養法などの従来法に比べて迅速・低コストという特徴がある⁽¹⁾。同技術は、その後民間企業との共同研究に発展し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 や静電気学会進歩賞を受賞するなど、その重要性は国内外で学術的にも高く評価されている⁽²⁾。また、ナノセンサに関しては、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などの作製技術を世界に先駆けて開発した⁽³⁾。これら誘電泳動応用技術に関する論文はこれまでに合計 1300 回以上引用されている（出典：Scopus）。

研究代表者は、上記二つの独自技術を発展的に融合させた DNA 診断技術を提案し、科研費の基盤 B（平成 26-28 年度）および挑戦的萌芽（平成 28-29 年度）などの支援の元で開発を進めてきた。その特徴は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅した DNA をマイクロビーズ表面に結合させ、その際に生じる誘電泳動特性の変化を応用する点にある⁽⁴⁾。また、同手法による細菌由来 DNA の定量検出にも成功している⁽⁵⁾。

しかしながら、挑戦的萌芽で目標とした PCR フリー化の実現には、現状の感度（マイクロビーズ 1 個あたり約 10^5 個以上の DNA を結合させることが必要）では不十分であり、更なる高感度化が必要であることが判明しつつある。この目標を挑戦的萌芽の期間内だけで達成することは困難であるとの判断から、新しい着想を取り入れた本研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者（末廣）が世界に先駆けて開発に取り組んでいる DNA 修飾マイクロビーズの誘電泳動現象を利用した DNA 診断技術を、進行波電界を利用した新しい検出原理に基づき更に高感度化すると同時に、極微量の生体関連物質を電氣的に簡便・迅速に検出する計測原理の確立を目指す。以上により、パンデミック感染症の早期予防を実現することで、我が国におけるライフイノベーションの進展と安全・安心社会の実現に貢献することを目的とする。

図 1 に本研究で新たに提案した DNA 診断高感度化の原理を示す。提案手法では、定常的な電界下で得られる誘電泳動力に代わり、進行波電界下で得られる誘電泳動力（以下、進行波誘電泳動）を利用することが大きな特徴である。進行波電界は電界カーテンとも称され、交互に並べた櫛歯状マイクロ電極に位相差（同図では 90° ）を有する交流電界を印加することで発生できる。通常の誘電泳動力が、懸濁液中におけるマイクロビーズの分極状態を表す Clausius-Mossotti 係数 CM の実数部 $Re[CM]$ に比例するのに対し、進行波誘電泳動力は CM の虚数部 $Im[CM]$ に比例することが明らかにされている。

従来法ではマイクロビーズの $Re[CM]$ の値が DNA 修飾によって変化することを利用していった。しかしながら、DNA 修飾量が少ない領域ではその変化はごく僅かであるため、マイクロビーズ 1 個あたりに約 10^5 個以上の DNA を結合させる必要がある。一方、 $Im[CM]$ に着目すると、 $Re[CM]$ に比べて DNA 修飾量の増加に対する変化率が大きいことが理論的な検討から明らかとなった。しかも、DNA 修飾なしの場合に $Im[CM] \approx 0$ となる条件下では、これを基準とする相対的な変化率で比較すると、 $Re[CM]$ に比べて 100 倍程度大き

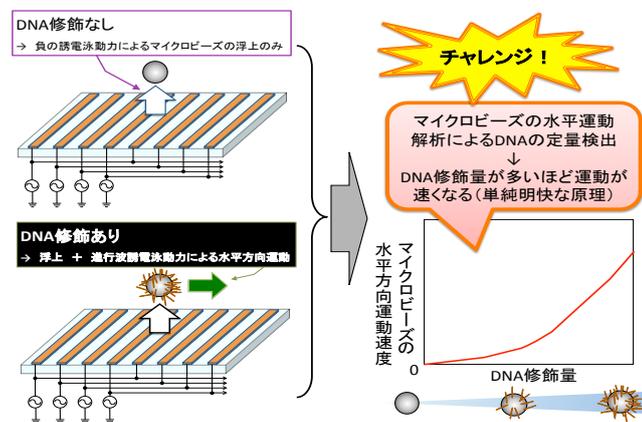


図 1 DNA 修飾マイクロビーズの進行波誘電泳動を応用した DNA 診断法

な変化を得ることができる。以上の結果より、 $\text{Im}[\text{CM}]$ に比例する進行波誘電泳動力によるマイクロビーズの挙動変化を利用することで、従来法よりも更に高感度な DNA 診断が実現できる可能性があるとの着想に至った。

3. 研究の方法

【テーマ 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進行波誘電泳動力に及ぼす影響の理論的検討

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 $\text{Im}[\text{CM}]$ が微量の DNA 修飾によって変化した結果、大きな進行波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進行波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。

【テーマ 2】DNA 修飾したマイクロビーズの進行波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進行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進行波誘電泳動現象がどのように変化するかを調査した。進行波誘電泳動は 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う。また、一度の観察で多数のマイクロビーズの速度を定量化するため、画像処理ソフトウェアを用いたデータ解析法を検討した。

【テーマ 3】DNA 修飾したマイクロビーズの進行波誘電泳動特性に基づく DNA 診断法の検討

本テーマでは、上記 2 テーマの結果に基づき、DNA 修飾量と進行波誘電泳動速度の相関を明らかに、定量的な DNA 診断法への応用を検討した。

4. 研究成果

【テーマ 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進行波誘電泳動力に及ぼす影響の理論的検討

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進行波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結果を図 2 に示す。従来の研究から、DNA 修飾によってマイクロビーズの表面コンダクタンス K_S が増大することが示唆されており、同図でも横軸に K_S をプロットしている。したがって、同図より DNA 修飾によって $\text{Im}[\text{CM}]$ に比例する進行波誘電泳動力の絶対値が急激に増大することが分かる。一方、 $\text{Re}[\text{CM}]$ に比例する負の誘電泳動力は逆に低下し、 $\text{Im}[\text{CM}]$ が最大値となる表面コンダクタンス K_S ではほぼ零にまで低下する。以上の理論的検討の結果、進行波誘電泳動力を利用した提案手法では誘電泳動力を利用する従来手法よりもより少ない DNA 修飾量で DNA 検出が可能となる可能性が示された。

【テーマ 2】DNA 修飾したマイクロビーズの進行波誘電泳動特性の調査

進行波誘電泳動に必要な櫛歯状マイクロ電極をフォトリソグラフィにより作製した (図 3)。後述する顕微鏡を用いたマイクロビーズの挙動観察の妨げにならないように、透明電極を ITO で作製した。同電極に先ず位相差のない交流電圧信号 (周波数 100kHz) を印加し、負の誘電泳動力によってマイクロビーズを電極上に浮上させた (図 4)。次に、電極に 90° の位相差を有する交流電圧信号を 4 本のフ

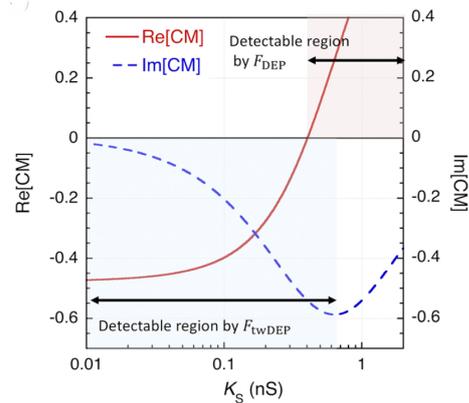


図 2 マイクロビーズの表面コンダクタンスが進行波誘電泳動力に及ぼす影響 (理論値)

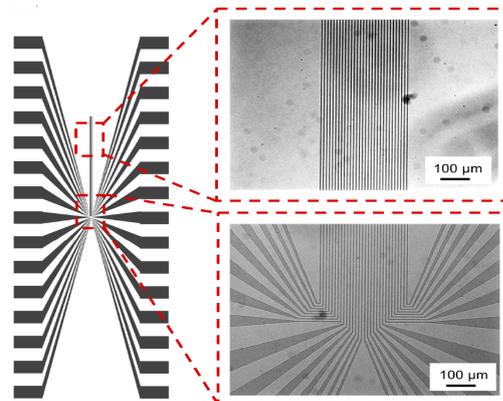


図 3 フォトリソグラフィにより作製した ITO 櫛歯状マイクロ電極

インガー毎に印加し、進行波誘電泳動力を発生させた。図5に画像処理ソフトウェアを用いた多数のマイクロビーズの運動速度解析の実行画面を示す。

【テーマ3】DNA修飾したマイクロビーズの進行波誘電泳動特性に基づくDNA診断法の検討

図6にDNA修飾量を変化させて測定したマイクロビーズの進行波誘電泳動速度分布を示す。速度分布はほぼ正規分布で近似でき、これは個々の粒子のDNA修飾量のばらつきなどに起因するものと考えられる。このことは、最もDNA修飾量が少ない100DNA/ビーズの場合に速度分布に2つのピークが現れていることから推察される。DNA修飾量の増加と共に速度分布は高い値にシフトしており、この結果は図2に示した理論的予測とほぼ一致していることがわかる。図7に示す検量線から、提案手法によるDNA検出下限は100DNA/ビーズであり、運動速度の平均値はDNA修飾量の対数値にほぼ比例して増大することがわかる。

以上の結果より、従来法のDNA検出感度(10⁵ DNA/ビーズ)の約1000倍に相当する極めて高い検出感度が得られたと言える。

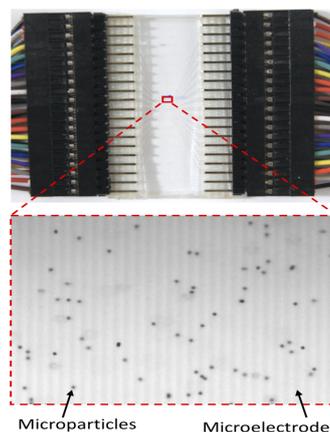


図4 負の誘電泳動力によって櫛歯状マイクロ電極上に浮上したマイクロビーズ

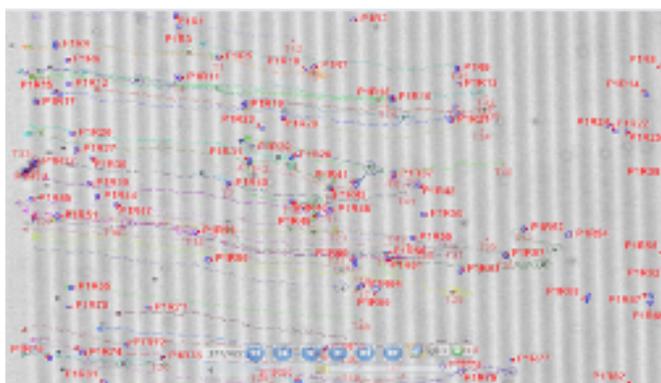


図5 画像処理ソフトウェアを用いた多数のマイクロビーズの運動速度解析の実行画面

<引用文献>

- (1) Suehiro, J., Yatsunami, R., Hamada, R., Hara, M.: Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method (1999) Journal of Physics D: Applied Physics, 32 (21), pp. 2814-2820.
- (2) Hamada, R., Suehiro, J., Nakano, M., Kikutani, T., Konishi, K.: Development of rapid oral bacteria detection apparatus based on dielectrophoretic impedance measurement method (2011) IET Nanobiotechnology, 5 (2), pp. 25-31.
- (3) Suehiro, J.: Fabrication and characterization of nanomaterial-based sensors using dielectrophoresis (2010) Biomicrofluidics, 4 (2), art. no. 004095BMF, .
- (4) Nakano, M., Ding, Z., Kasahara, H., Suehiro, J.: Rapid microbead-based DNA detection using dielectrophoresis and impedance measurement (2014) EPL, 108 (2), art. no. 28003, .
- (5) Ding, Z., Kasahara, H., Nakano, M., Suehiro, J.: Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics (2017) IET Nanobiotechnology, 11 (5), pp. 562-567.

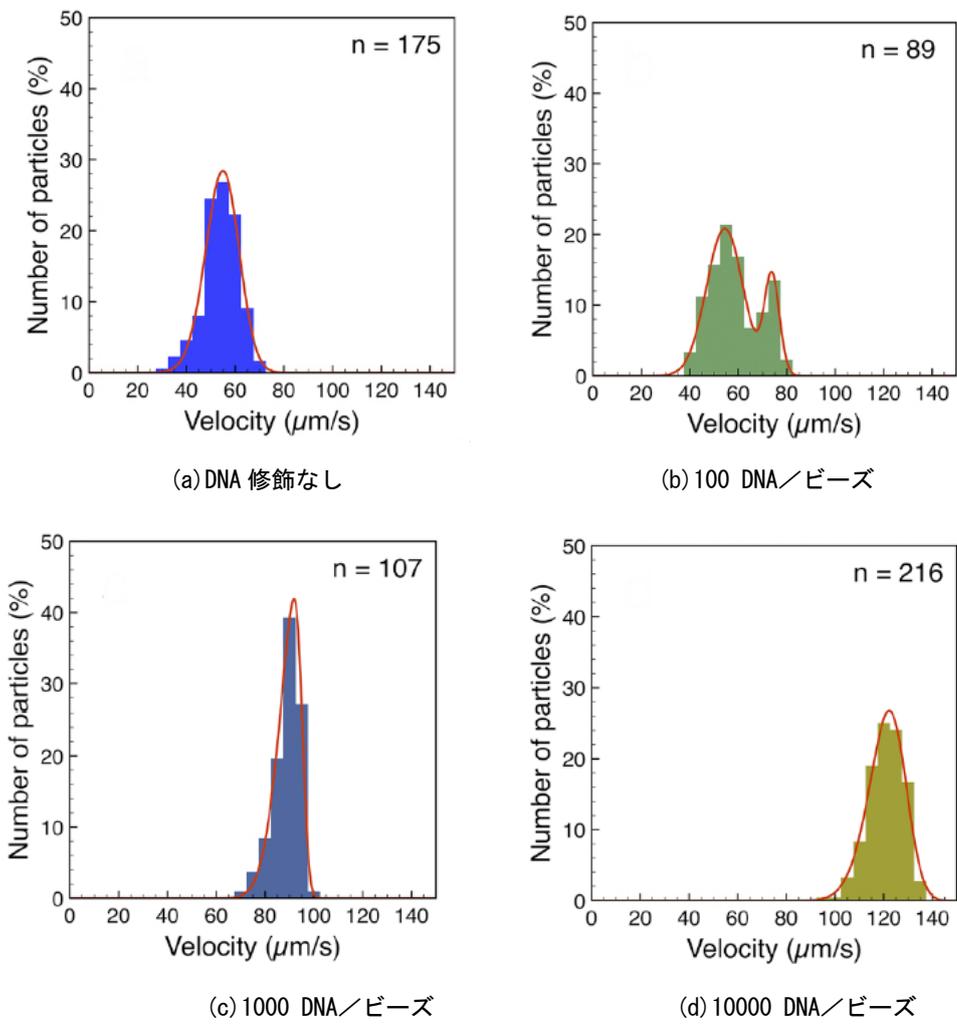


図6 進行波誘電泳動によるマイクロビーズ運動速度分布に DNA 修飾量が及ぼす影響

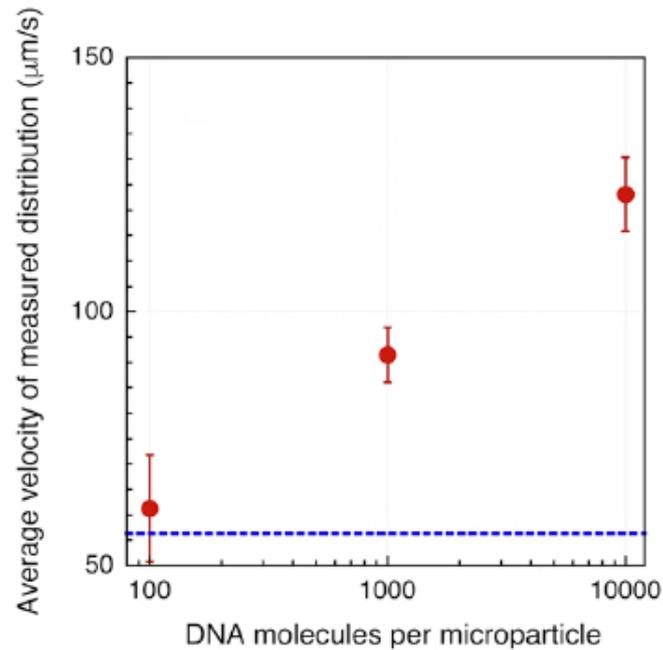


図7 進行波誘電泳動によるマイクロビーズ運動速度の DNA 修飾量依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 IET Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 562-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1049/iet-nbt.2016.0186	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丁 震昊, 中野道彦, 末廣純也
2. 発表標題 DNA Detection Method by Analyzing DNA-labeled Microbead Velocity under Traveling Wave Dielectrophoresis
3. 学会等名 平成30年 電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Z. Ding, K. Ida, K. Matsuda, M. Nakano, J. Suehiro
2. 発表標題 DNA detection microfluidic device based on negative dielectrophoresis of DNA labeled microbeads
3. 学会等名 IEEE SENSORS 2017（国際学会）
4. 発表年 2017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
研究協力者	中野 道彦 (Nakano Michihiko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	稲葉 優文 (Inaba Masafumi)		