

令和 元年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0242

研究課題名（和文）ウイルスの多種類同時検出を可能にする迅速DNA検査法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of fast DNA detection method for multiplex virus detection(Fostering Joint International Research)

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） 10,500,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：核酸増幅検査は、検出対象の遺伝子を選択的に増幅し、検査する手法で、細菌やウイルスなどの感染症の検査や食品検査、遺伝子診断などに用いられている。本研究では、核酸増幅検査を迅速かつ簡便に行うために考案した電氣的にDNAを検出する手法について、定量で高感度な検出が可能であることを示した。また、一定温度で遺伝子増幅が可能手法と組み合わせた新しい手法を考案し、30分以内に数個の遺伝子を検出できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らが考案した電氣的なDNA検出法は、誘電泳動と呼ばれる現象を利用した手法で、これまでの電氣的なDNA検出法とは異なる。本研究はその手法について、原理を詳細に検証し、また有用性についても示した。近年は、核酸増幅検査を感染症診断に留まらず様々な検査に利用したいという要望が高まっている。本研究で示した電氣的なDNA検出法は、迅速（30分以内）で簡便かつ高感度（数個）な核酸増幅検査を可能にし、その利用範囲を広げることに貢献すると考えている。

研究成果の概要（英文）：Nucleic acid amplification test (NAT) is one of the diagnosing methods based on gene detection, which is selectively amplifies target genes. NAT has been widely used such as infectious disease diagnosis, food investigation, and genetic diagnosis. This study demonstrated that our electrical DNA detection method enables sensitive and quantitative detection of DNA by easy and fast operation. It also demonstrated that new method combining with isothermal DNA amplification detects 2 copies/reaction of anti-microbial resistance gene within 30 min.

研究分野：静電気生物応用

キーワード：核酸増幅検査 インピーダンス計測 誘電泳動 微粒子 DNA検出

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

感染症の脅威が世界的に広まっている。毎年のようにインフルエンザやノロウイルスが流行しており、最近では、致死率が非常に高いエボラウイルスが世界中の人々の健康を脅かしている。高感度・迅速な検出方法は、感染症対策には必要不可欠である。本研究は、研究代表者らが開発した迅速 DNA 検出法を発展させて、更に高感度に電氣的に簡便・迅速・正確に検出することを目的とする。感染症診断には様々な手法があるが、PCR (polymerase chain reaction) を代表とする遺伝子 (DNA/RNA) を連鎖的な選択的 DNA 合成反応で増幅する手法 (核酸増幅検査法) が高感度で特異性が高く、最も有効な方法である。本研究は DNA 増幅後の DNA 解析を電氣的に迅速かつ簡便に行う。従来、増幅 DNA はゲル電気泳動によるサイズ分離とその後の蛍光染色によって検出されており、煩雑で長時間の作業が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、核酸増幅検査における DNA 検出を迅速・簡便化する手法を開発する。そのために、研究代表者らが考案した DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化を利用した電氣的な DNA 検出法を改良する。この方法は、誘電体微粒子に対象 DNA が結合することで、その微粒子の誘電泳動特性が変化するという現象を利用したものである。本研究では、新たに DNA 長を電氣的に計測する手法や、DNA 検出法の応用、高感度化について検討する。

3. 研究の方法

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法は、検出対象 DNA を誘電体微粒子に結合させることで、誘電体微粒子の誘電泳動特性が変化することを利用する (図 1)。本研究では、まず (1) DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化について、DNA のどのような特性が影響しているかを調べた。その後、(2) 本 DNA 検出法が豚 DNA の検出に使用できることを示した。次に、(3) 本 DNA 検出法の定量性を評価した後、(4) 本 DNA 検出法が DNA 量だけではなく、その長さも定量できることを示した。さらに (5) 等温 DNA 増幅法と組み合わせて短時間に高感度に耐抗生物質病原菌を検出することも示した。

4. 研究成果

4-1. DNA 結合に伴う微粒子誘電泳動の変化

DNA 結合に伴う誘電体微粒子の誘電泳動の変化は、電荷を持つ DNA が表面に結合することによる誘電体微粒子の導電率の変化に起因すると考えられる。式 (1) は微粒子の導電率とその表面コンダクタンスとの関係を表したものである^[1]。

$$\sigma_p = \sigma_{pbulk} + \frac{2K_{Stern}}{r} + \frac{2K_{Diff}}{r} \quad (1)$$

ここで、 σ_{pbulk} は粒子材料の導電率で、 K_{Stern} と K_{Diff} は粒子表面の Stern 層内および拡散層内のコンダクタンスである。 K_{Stern} は電荷密度に比例するため、負電荷を持つ DNA が結合すると K_{Stern} が大きくなると考えられる。また、式 (1) の 2 項および 3 項は粒子の半径の逆数に依存しており、微粒子においてこの現象が顕著になることを示している。

図 2 は、319 bp の DNA を直径 2.8 μm の誘電体微粒子に結合させたときのゼータ電位と誘電泳動のクロスオーバー周波数を DNA 量に対してプロットしたものである。クロスオーバー周波数は、誘電泳動特性を表す指標で、誘電泳動力がゼロになる周波数を指す。クロスオーバー周波数の変化に比べて、ゼータ電位の変化が緩やかであった。ゼータ電位は、粒子の表面電荷量に依存して変化すると考えられる一方で、クロスオーバー周波数は粒子の導電率および誘電率の両方に影響される。DNA 量の変化に対するゼータ電位の変化と比べて、クロスオーバー周波数の変化が大きいのは DNA の電荷のみならず DNA の誘電率が粒子全体の誘電率に影響を及ぼしているからではないかと考えられ、これまでは、DNA の電荷が微粒子の誘電泳動特性に影響を与えていたと考えていたが、DNA の誘電率も大きく影響していることが示唆された。

4-2. 微粒子誘電泳動による DNA 検出法を用いた豚 DNA の検出

ここでは、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の食

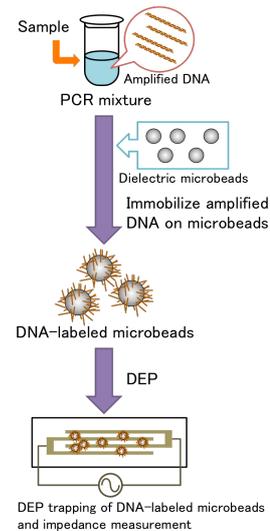


図 1 微粒子誘電泳動を利用した DNA 検出の模式図。

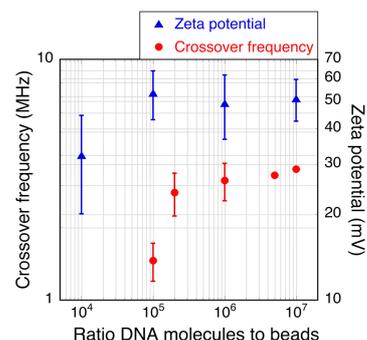


図 2. 微粒子に結合させた DNA 量に対する DNA 結合微粒子のゼータ電位およびクロスオーバー周波数の変化。

肉検査への応用を目的として、食肉から抽出した豚 DNA を検出可能か検証した。安全衛生の観点以外にも宗教的な観点からも、原材料表示されているもの以外のもが食品中に含まれてはならない、このような背景の下、種々の食品検査が行われている。特に、生物由来の混入物に関しては、その遺伝子を検出することが、最も感度が高く、信頼できる。ここでは、豚肉の混入を想定し、豚 DNA を PCR 増幅し、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法でその増幅 DNA を検出できるかどうかを検討した。検出対象は豚ミトコンドリア DNA である。

図 3 は、豚生肉と牛生肉を混合したサンプルからミトコンドリア DNA を抽出し、豚ミトコンドリア増幅用プライマーを用いた PCR によって DNA を増幅した後、その増幅 DNA を誘電体微粒子に結合して、微粒子誘電泳動による DNA 検出法で測定した結果である。すべての豚生肉混合サンプルにて陽性を示し、牛生肉のみのサンプルでは陰性であった。また、その検出感度は 5 mg (トータル 50 mg) であった。以上により、本手法を食肉検査に使用できることが示された。

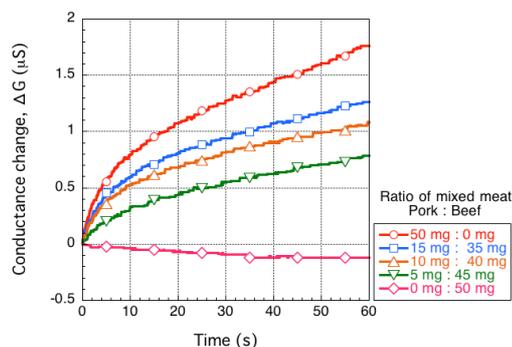


図 3. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法による豚由来 DNA の検出

4-3. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の定量性評価

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法の感度および定量性を評価するために、ノロウイルス遺伝子の検出について、Real-time PCR 法と比較した。

図 4 は、Real-time PCR 法 (Taq-man probe) によるノロウイルス遺伝子の検出結果を示す。Real-time PCR では 10 copies/reaction が検出下限で、その定量検出範囲は 10^7 copies/reaction までであった。図 5 に微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出による結果を示す。検出下限は Real-time PCR と同等の 10 copies/reaction であった。他方、定量検出範囲は 10^5 copies/reaction までであった。これは、微粒子誘電泳動による DNA 検出法が PCR 後に行う手法であるため、PCR 増幅の飽和によって検出対象が多量に存在する場合は、定量検出ができなくなることを示す。

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法は、Real-time PCR 法に比べて、安価・簡便であり、これが Real-time PCR 法と同等の検出下限で検出できることの意義は大きい。

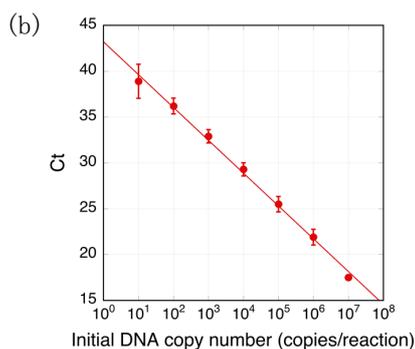
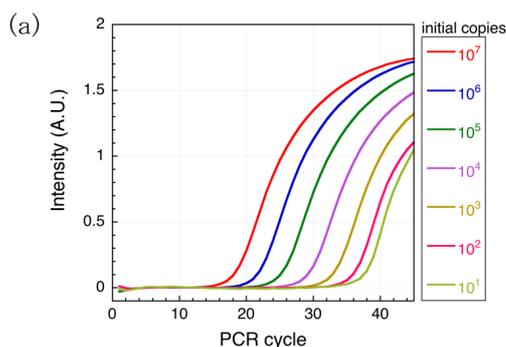


図 4. Real-time PCR によるノロウイルス遺伝子の検出。(a) 増幅曲線、(b) C_t カーブ。

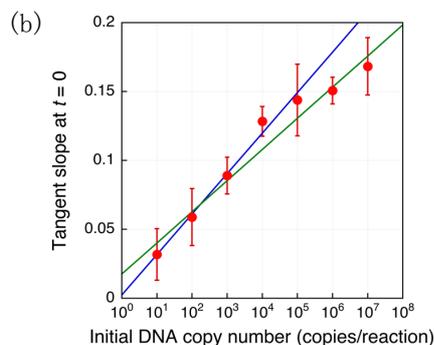
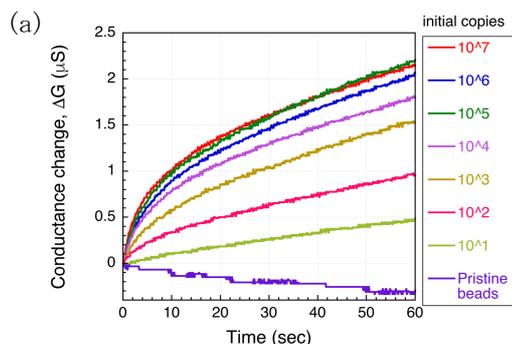


図 5. 微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法によるノロウイルス遺伝子の検出。(a) コンダクタンスカーブ、(b) コンダクタンスカーブの傾き (Time = 0.)。

4-4. 微粒子誘電泳動による DNA 検出法の応用した DNA 長の測定

微粒子誘電泳動による DNA 検出法を用いて、多検体を同時に検出するために、Multiplex PCR 法を用いて増幅した異なる長さの増幅 DNA を検出することを考えた。異なる長さの増幅 DNA が結合した微粒子を区別して検出するためには、それぞれの誘電泳動特性が異なれば良い。そこで、結合 DNA の長さによる微粒子誘電泳動の特性の変化を調べたところ、そのクロスオーバー周波数が DNA 長に依存することを見出した (図 6)。これによって、異なる長さの DNA を Multiplex PCR 法によって増幅すれば、その増幅 DNA を結合した微粒子を周波数によって個別に検出できることが示唆された。

DNA の長さによって誘電泳動特性が変化するという事は、DNA の長さによって DNA 結合微粒子の電気的特性が変化することを示唆している。そこで、異なる長さの DNA が結合している DNA 結合微粒子の電気的特性 (インピーダンス) を測定することで、微粒子に結合している DNA の長さを測定することができないかを検討した。

図 7 (a) は、DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集した後、その微粒子の印加電圧の周波数に対するコンダクタンス変化をプロットしたものである。このプロットの一次負微分をとったものが図 7 (b) である。DNA の長さによってピークが高周波数側にシフトした。そのピーク周波数を DNA の長さに対してプロットしたものが図 7 (c) である。このように DNA 長さに対して片対数グラフ上で線形の関係があることが示された。以上の結果から、DNA 結合微粒子のインピーダンス特性から DNA 長を計測することが可能であることが示された。これにより、微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法によって検出対象の量および長さの両方を測定できることが示された。

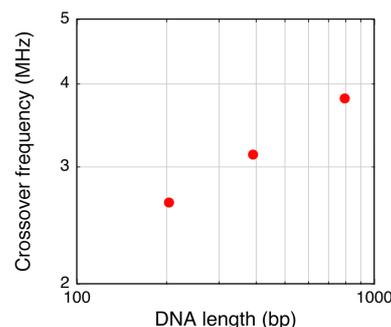


図 6. DNA 長とクロスオーバー周波数の関係

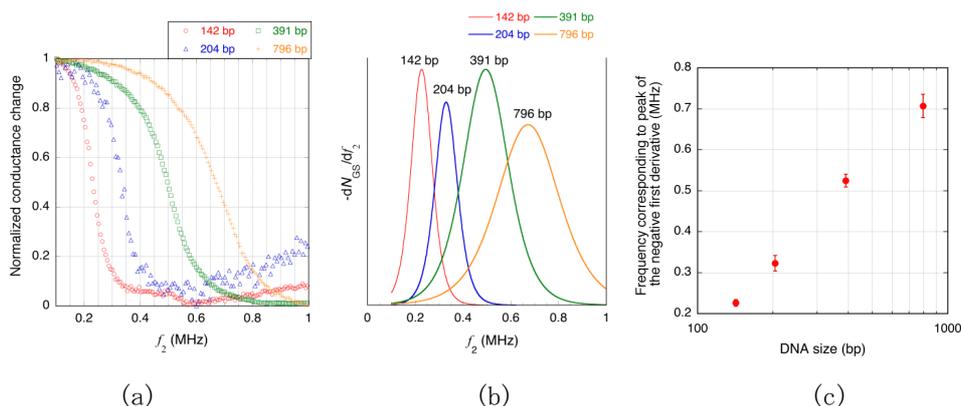


図 7. DNA 結合微粒子のインピーダンス特性による DNA 長の測定。(a) DNA 結合微粒子のコンダクタンスの周波数特性、(b) コンダクタンス特性の負一次微分と周波数の関係、(c) ピーク周波数と DNA 長の関係。

4-5. 等温増幅法と組み合わせた耐抗生物質病原菌の検出

PCR は核酸増幅法のスタンダードな手法である。ただし、PCR は精密に温度変化を制御する必要がある。それに対して、近年では、一定温度で核酸増幅を行う手法が開発されている。ここでは、等温増幅法の一つである RPA (recombinase polymerase amplification) ^[2] を用いて耐抗生物質病原菌遺伝子を検出する手法について述べる。検出対象は、大腸菌に導入した *bla*_{CTX-M-15} 遺伝子で、この遺伝子を持つことでペニシリンなどの抗生物質に対する耐性を得る。

等温増幅法を用いることで、精密な温度制御が不要である。さらに、微粒子に DNA を結合する本 DNA 検出法にとってはもう一つの利点がある。それは、微粒子と DNA との結合を増幅反応中に行えるということである。これまでの、微粒子と DNA との結合には、増幅 DNA 末端に導入したビオチンと微粒子表面に修飾したストレプトアビジンとの結合反応を利用してはいたが、この結合反応は高温条件下では非常に効率が悪い。そのため、微粒子と増幅 DNA との結合は増幅反応後に行っていた (図 1)。RPA 法は 37°C で行うため、微粒子と増幅 DNA の結合を増幅反応中に実施することができる。本研究では、RPA nfo と呼ばれる手法^[2]を用いて、増幅反応と同時に増幅 DNA 結合微粒子を調整する手法を考案した (図 8)。

図 9 に検出結果を示す。PCR は温度サイクルを繰り返すことで、DNA 合成反応を繰り返すが、等温増幅反応の場合は、反応時間が増幅効率を決める。反応時間 20 分と 15 分を比べると、15 分反応では 200 copies/reaction が検出下限であったが、20 分反応では 2 copies/reaction が検出下限であった。増幅反応後は、DNA 結合微粒子の洗浄に 5 分間、検出に 1 分間必要であるた

め、本研究による手法では、26分間で2 copies/reactionの耐抗生物質病原菌遺伝子を検出できることが示された。

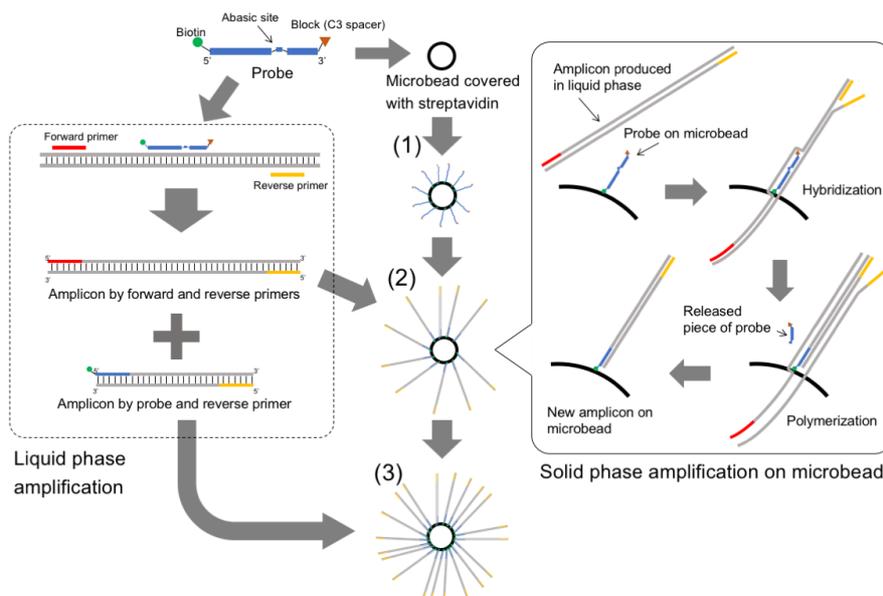


図8. RPAによるDNA増幅と増幅DNAの微粒子への結合の同時反応。(1) nfoプローブの微粒子への結合、(2) 微粒子表面でのDNA合成、(3) 反応液中で合成されたDNAの結合。

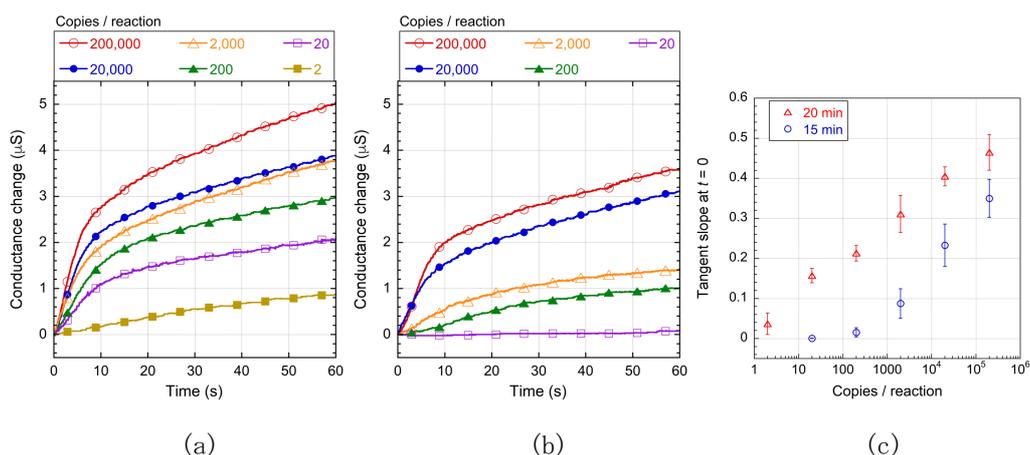


図9. 耐抗生物質病原菌遺伝子の検出結果 (a) 反応時間20分、(b) 反応時間15分、(c) コンダクタンスカーブの傾き (Time = 0.)。

<引用文献>

- [1] I. Ermolina, H. Morgan, “The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 285, 419–428, 2005.
- [2] R. K. Daher, G. Stewart, M. Boissinot, M. G. Bergeron, “Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications,” *Clinical Chemistry*, 62, 947–958, 2016.

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. M. Nakano, S. Kalsi, H. Morgan, “Fast and sensitive isothermal DNA assay using microbead dielectrophoresis for detection of anti-microbial resistance genes,” *Biosensors and Bioelectronics*, 117, 583–589, 2018. 10.1016/j.bios.2018.06.063. (査読有り)
2. M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, “Frequency-dependent conductance change of dielectrophoretic-trapped DNA-labeled microbeads and its application in DNA size determinations,” *Microfluidics and Nanofluidics*, 22, 26, 2018. 10.1007/s10404-018-2051-7. (査読有り)

3. M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, "Comparison of sensitivity and quantitation between microbead dielectrophoresis-based DNA detection and real-time PCR," *Biosensors*, 7, 44, 2017. 10.3390/bios7040044. (査読あり)
4. Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro, "Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics," *IET Nanobiotechnology*, 11, 562-567, 2017. 10.1049/iet-nbt.2016.0186. (査読あり)
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 DNA 検出法による豚 DNA の選択的検出," *静電気学会誌*, 41, 153-157, 2017. (査読あり)
6. 中野道彦, 笠原弘道, 丁 震昊, 末廣純也, "DNA 結合に伴う誘電体微粒子の誘電泳動特性変化の測定," *静電気学会誌*, 40, 20-25, 2016. (査読あり)

[学会発表] (計 27 件)

1. Z. Ding, M. Nakano, J. Suehiro, "DNA detection method based on the microbead velocity under traveling wave dielectrophoresis," 12th International Conference on Biomedical Electronics and Devices (Biodevices 2019), 2019.
2. 中野道彦, "誘電泳動を用いた生体物質の操作とインピーダンス計測," 2018 年度 第一回 静電気学会研究会, 2018.
3. M. Nakano, T. Yamasaki, Z. Ding, J. Suehiro, "Advances in DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis," *Dielectrophoresis 2016*, 2016.
4. Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano, J. Suehiro, "Quantitative bacterial detection using rapid DNA detection method based on microbeads dielectrophoresis," *Biosensors 2016*, 2016.
5. 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*, 2016.
6. M. Nakano, H. Kasahara, Z. Ding, J. Suehiro, "Sensitive and quantitative DNA detection by beads-based dielectrophoretic impedance measurement," *IEEE SENSORS 2015*, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003722/index.html>

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

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名 : Hywel Morgan

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 : University of Southampton

部局名 : Electronics and Computer Science, Institute for Life Sciences

職名 : Professor

[その他の研究協力者]

研究協力者氏名 : 末廣 純也

ローマ字氏名 : Junya Suehiro

※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。