

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01731

研究課題名(和文) DNA結合微粒子の親水・疎水性の解明と無電源目視核酸増幅検査手法の開発

研究課題名(英文) Study of hydrophilicity of DNA-labeled microbeads and development of electric power less visual nucleic acid amplification detection method

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所・准教授

研究者番号：00447856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸増幅検査を簡便かつ迅速に行うための増幅DNAの目視判定法を開発した。その原理を検証するとともに、Multiplex PCR (polymerase chain reaction) に適用可能であることも示した。迅速診断技術の開発という観点から次の応用研究も行った。微粒子誘電泳動DNA検出法を用いた心筋梗塞バイオマーカー DNase I の検出、細胞外小胞の一種であるエクソソームの特性評価、マラリア原虫に感染した赤血球の電気的特性の評価。これらの研究成果は、感染症やがん診断を迅速・簡便化する新しい手法の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA結合微粒子によるDNAの目視判定手法について、その原理の一端を明らかにした。これは、これまでに知られていないDNAの物理的性質であり、さらに詳細に調べることでDNAが持つ新たな性質が明らかになる可能性がある。他方、感染症やがん診断を迅速・簡便化するための基礎的な研究として、本研究の手法を応用した。これらの成果は、医療リソースに乏しい地域での感染症検査や、家畜や農作物に対する感染症検査には、簡便で迅速かつ安価な手法はもちろんのこと、その場で検出できる手法を提供する。感染症の脅威は常に私たちのそばにある。本研究は、我々が感染症と戦うために必要不可欠な新しい武器となると期待している。

研究成果の概要(英文)：It has been developed that direct eye detection of the amplified DNA makes nucleic acid amplification testing rapid and simple. In the project, the principle of the detection method was tried to be revealed. Also, the method was improved to detect multiple samples amplified by multiplex polymerase chain reaction. In the view of the rapid diagnosis techniques, the following subjects have been studied: detection of DNase I, which is a candidate of a myocardial infarction biomarker, using the microbeads dielectrophoresis-based DNA detection method; dielectric characterization of exosomes, which are kinds of extracellular vesicles; dielectric characterization of the malaria-infected erythrocyte. The demonstrated results show the potential of the methods to be rapid and simple diagnosis methods for infectious diseases and cancer.

研究分野：静電気生物応用

キーワード：微粒子 DNA検出 迅速検査 目視判定 診断技術

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症の大流行は、我々に感染症検査の重要性を再認識させた。感染症検査には、Real-time PCR を代表とする核酸増幅検査、免疫クロマト法による抗体・抗原検査、培養法などがある。核酸増幅検査法は、検出対象のゲノムの特定配列から DNA あるいは RNA を増幅して検出する方法で、様々な検査法の中で感度や選択性が最も高い。

PCR (polymerase chain reaction) は、温度サイクルによる DNA ポリメラーゼの連鎖反応で DNA を増幅するもので、Real-time PCR はその温度サイクルごとに増幅 DNA 量を蛍光検出する。PCR は精密 (0.1°C 以内) な温度制御 (95°C→60°C→72°C) を必要とし、Real-time PCR では、そこに高額な光学検出装置を組み込む上、蛍光色素を含む試薬も必要であり、検査のコストが高い。そこで、PCR に代わる核酸増幅法に、等温増幅法が開発されている。例えば、LAMP (loop-mediated isothermal amplification, 60-65°C) や、RPA (recombinase polymerase amplification, 37°C) がある。これらは、精密な温度制御が不要なため安価に実施可能で、特に RPA は、反応温度が 37°C と低く、また必要なプライマーが二つと少ないため、他の手法よりも簡便である。核酸増幅検査のコスト・煩雑さの一因は、核酸増幅法で増幅された DNA あるいは RNA をなんらかの方法で検出しないことにはならないことにある。Real-time PCR は、その検出を反応装置に組み込むことで、検出時間を短縮しているが、一方でコスト高を招いている。安価な手法として、増幅 DNA のゲル電気泳動による確認があるが、これは 1 時間程度の煩雑な作業を必要とする。

2. 研究の目的

本研究では、核酸増幅検査における増幅 DNA を簡便かつ迅速に測定する新たな手法を確立することを目的とした。後述するように、研究代表者は、誘電体微粒子の誘電泳動現象を利用した DNA 検出法 (以下、微粒子誘電泳動 DNA 検出法) を開発した。これは、誘電体微粒子の誘電泳動特性が DNA 結合によって変化することを利用したもので、増幅 DNA を微粒子に結合して、その DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集する。この時、未結合微粒子には DNA 結合微粒子と反対方向の誘電泳動力が働くため、DNA 結合微粒子のみが選択的に捕集される。

微粒子誘電泳動 DNA 検出法の研究過程において、微粒子の親水・疎水性が DNA 結合によって変化することを見出した。親水性基板上で磁性微粒子を外部磁石によって捕集すると、DNA 結合の有無によってその凝集が変化するというものである。未結合微粒子の場合は基板表面に広く付着するのに対して、DNA 結合微粒子では外部磁石近傍に集積した。これは、DNA が微粒子を疎水性にしたために、親水性表面に付着せずに磁石に引き寄せられたためであると考えられるが、その詳細は未解明である。

本研究の目的は、微粒子の親水・疎水性が DNA 結合によって変化するという物理現象を解明し、それを応用した検出法を見いだすこと。さらには、微粒子誘電泳動 DNA 検出法の新しい応用を見いだすこととした。

3. 研究の方法

I. DNA 結合微粒子の親水・疎水性変化に関する実験

ガラス基板上に DNA を結合して、それに伴うガラス基板の接触角の変化を測定した。親水性コーティングスライドガラスにサケ精子 DNA 溶液 (TE, 1 mg/ml) を 10 µl 滴下し、30 分静置した後、脱イオン水で洗浄して乾燥させたものを検証用サンプルとした。その検証用サンプルに脱イオン水あるいは TE バッファーを滴下し、その水滴の接触角を測定した。

II. 目視判定可能な DNA 検出法の応用に関する実験

核酸増幅検査における増幅 DNA の目視判定法を改良して、DNA ハイブリダイゼーションを用いて微粒子と増幅 DNA とを選択的に結合させる方法を試みた。この方法によって、二種類のいちご病原菌をマルチプレックス PCR (polymerase chain reaction) と組み合わせそれぞれを選択的に目視判定することを試みた。

イチゴ硫黄病とイチゴ炭素病の原因菌である *Fusarium oxysporum* fsp. *fragariae* (NBRC 31982) と *Colletotrichum gloeosporioides* (NBRC 104617) を検出対象にした。それぞれを培養した後、ゲノム DNA を抽出し、Multiplex PCR に導入した。それぞれの検出対象に対応したプライマーペアのひとつずつの 5' 末端にタグ配列を付与した。他方、タグ配列と相補的な配列のプローブ DNA を用意し、その 3' 末端にビオチンを修飾してストレプトアビジン修飾微粒子に結合した。Multiplex PCR 後のサンプルと微粒子、プローブ DNA を混合して、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって微粒子に検出対象増幅 DNA を結合させた。その DNA 結合微粒子を目視判定手法によって検出した。

III. その他関連する応用

微粒子誘電泳動 DNA 検出法の応用として、心筋梗塞のバイオマーカー候補である DNase I の検出について検討した。あらかじめ用意した DNA 結合微粒子に対して、DNase I を反応させ、その後、DNase I によって DNA が切断された DNA 結合微粒子を微粒子誘電泳動 DNA 検出法で計測した。

4. 研究成果

I. DNA 結合微粒子の親水・疎水性変化に関する実験

DNA 溶液を滴下して乾燥させたサンプルと DNA を含まない TE を滴下して乾燥させたサンプルを比較した。接触角測定には、脱イオン水と TE バッファーとを用いた。表 1 に接触角の測定結果を、図 1 に接触角測定時の写真を示す。DNA を付着させていない基板と比べて、DNA を付着させた基板では、脱イオン水に対する接触角が TE バッファーに対する接触角に比べて大きく変化した。これは、DNA が低イオン環境において疎水性を示すことを示唆しており、DNA 結合微粒子による増幅 DNA の目視判定手法の原理の一端が示された。

表 1 接触角測定結果

基板上 DNA の有無	接触角 θ		接触角変化率 ($\theta_{TE} - \theta_{DW}$)/ θ_{DW}
	TE バッファー θ_{TE}	脱イオン水 θ_{DW}	
DNA 有り	38.1°	44.2°	16%
DNA 無し	52.8°	55.0°	4%

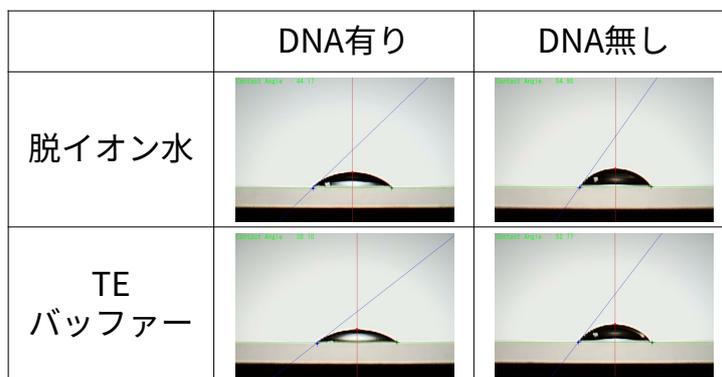


図 1 接触角測定時の写真

II. 目視判定可能な DNA 検出法の応用に関する実験

二種類のイチゴ病原菌を Multiplex PCR と目視判定手法を用いて同時に検出した結果を図 2 に示す。それぞれに特異的なプローブを用いたときにのみ、磁性微粒子の凝集がみられ、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって検出可能であることが示された。Multiple PCR サンプルに対しては同時に検出可能であることも示された。これによって、この目視判定手法が複数検出対象を同時に検出可能な手法であることが示された。

検出対象	<i>F. oxysporum</i> イチゴ萎黄病		<i>C. gloeosporioides</i> イチゴ炭疽病		<i>F. oxysporum</i> & <i>C. gloeosporioides</i>	
	1	2	1	2	1	2
磁石設置前						
磁石設置後						
プローブ1 (<i>F. oxysporum</i>)	×	○	×	○	×	○
プローブ2 (<i>C. gloeosporioides</i>)	○	×	○	×	○	×

— Scale bar: 10mm

図 2 Multiplex PCR と目視判定手法による二種類のイチゴ病原菌の同時検出結果

III. その他関連する応用

微粒子誘電泳動 DNA 検出法を用いて DNase I を検出した結果を図 3 に示す。反応時間は 15 分とし、DNase I の濃度を変化させたときの結果である。微粒子上の DNA が切断されるにつれて、応答が小さくなる。本研究によって、 10^{-6} U から 10^{-2} U までの DNase I が検出可能であることが示された。微粒子誘電泳動 DNA 検出法は短時間の検出が可能で、従来の方法に比べて、非常に簡便である。

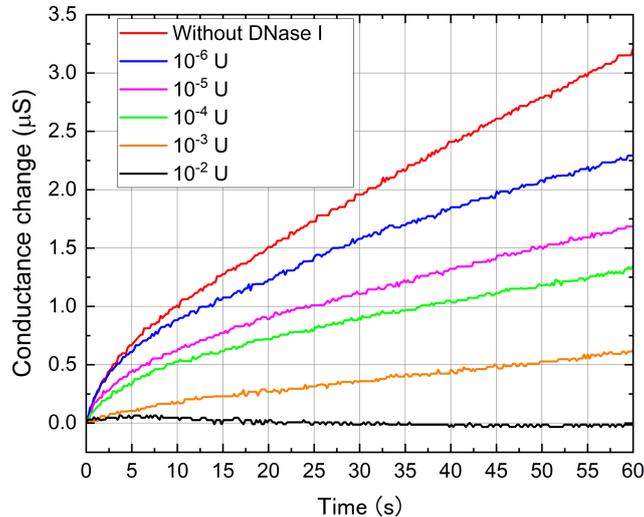


図 3 微粒子誘電泳動 DNA 検出法を用いて DNase I を検出した結果

以上の結果の他に、応用研究として、細胞外小胞の一種であるエクソソームの電気的特性の解明やマラリアに感染した赤血球の電気的特性の解明などを行った。前者の応用研究では、がん細胞由来エクソソームと正常細胞由来エクソソームとの誘電泳動特性を比較して、その両者に違いがあることを明らかにした。また、がん細胞由来エクソソームにおいては、由来がん細胞の種類によっても異なる性質があることが示された。この応用の最終目標は、がん診断の迅速・簡便化である。後者では、マラリア感染症の迅速・簡便診断を最終目標に、マラリア原虫に感染した赤血球と未感染赤血球との間に電気特性の違いがあることを明らかにした。

以上の成果は、医療リソースに乏しい地域での感染症検査や、家畜や農作物に対する感染症検査には、簡便で迅速かつ安価な手法はもちろんのこと、その場で検出できる手法を提供する。今般の新型コロナウイルスによるパンデミックを例に出すまでもなく、感染症の脅威は常に私たちのそばにある。本研究は、我々が感染症と戦うために必要不可欠な新しい武器となるのは間違いない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakabayashi Ryu, Koyama Rie, Inaba Masafumi, Nakano Michihiko, Suehiro Junya	4. 巻 63
2. 論文標題 Quantitative evaluation of dielectrophoretic separation efficiency of cancer exosomes based on fluorescence imaging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 03SP68 ~ 03SP68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ad2657	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakano Michihiko, Inaba Masafumi, Suehiro Junya	4. 巻 18
2. 論文標題 Selective visual detection of multiplex PCR amplicon using magnetic microbeads	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics: X	6. 最初と最後の頁 100461 ~ 100461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biosx.2024.100461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen Hao, Yamakawa Tsubasa, Inaba Masafumi, Nakano Michihiko, Suehiro Junya	4. 巻 22
2. 論文標題 Characterization of Extra-Cellular Vesicle Dielectrophoresis and Estimation of Its Electric Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 3279 ~ 3279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s22093279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中野 道彦, 稲葉 雅文, 末廣 純也	4. 巻 45
2. 論文標題 誘電泳動を用いたウイルスや細菌の静電氣的計測法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 静電気学会誌	6. 最初と最後の頁 52-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakano Michihiko, Inaba Masafumi, Suehiro Junya	4. 巻 141
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 Gene by Microbeads Dielectrophoresis-based DNA Detection Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 233 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.141.233	査読の有無 有
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24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Michihiko Nakano, Masafumi Inaba, Junya Suehiro
2. 発表標題 Selective visualized detection of multiplex PCR amplicons using magnetic microbeads
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryu Nakabayashi, Masafumi Inanaba, Michihiko Nakano, Junya Suehiro
2. 発表標題 Separation of normal and cancer cell-derived exosomes based on their dielectrophoretic properties
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nitipong Panklang, Boonchai Techaumnat, Kesinee Chotivanich, Mati Horprathum, Michihiko Nakano
2. 発表標題 Conductance measurement of malaria-infected cells with impedance spectroscopy
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryu Nakabayashi, Rie Koyama, Masafumi Inaba, Michihiko Nakano, Junya Suehiro
2. 発表標題 Quantitative Evaluation of Dielectrophoretic Captured Fluorescent-Labeled Exosomes
3. 学会等名 IEEE Sensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Michihiko Nakano, Masafumi Inaba, Tomoko Murakami, Maho Sakurai, Junya Suehiro
2. 発表標題 Demonstration of New Microelectrode Design to Enhance Sensitivity of Dielectrophoretic Impedance Measurement
3. 学会等名 IEEE Sensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryu Nakabayashi, Rie Koyama, Masafumi Inaba, Michihiko Nakano, Junya Suehiro
2. 発表標題 Quantitative evaluation of dielectrophoretic separation efficiency of cancer exosomes based on fluorescence imaging
3. 学会等名 MNC (International Microprocesses and Nanotechnology Conference) 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中林 龍, 高山 理衣, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 誘電泳動を利用したヒト乳がん細胞由来エクソソームの分離の実証
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山 理衣, 中林 龍, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 エクソソームの誘電泳動特性に与える蛍光染色の影響
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 旭 航希, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動を用いたDNA分解酵素の検出における反応時間の影響
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中林 龍, 高山 理衣, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 乳がん細胞と大腸がん細胞由来エクソソームの誘電泳動特性の違い
3. 学会等名 令和6年電気学会全国大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Michihiko Nakano, Makoto Shigemoto, Masafumi Inaba, Junya Suehiro
2. 発表標題 Rapid detection of DNase I by dielectrophoresis and impedance measurement of DNA-labeled microbeads
3. 学会等名 microTAS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野 道彦, 稲葉 優文, 末廣 純也
2. 発表標題 植物病原菌のmultiplex PCR検出における目視判定手法の検討
3. 学会等名 2022年 第83回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重本 真, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動を用いたDNA分解酵素の検出における結合DNA長の影響
3. 学会等名 2022年度(第75回)電気・情報関係学会 九州支部連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重本 真, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動DNA 検出法を用いたDNA 分解酵素の定量検出の検討
3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野 道彦, 稲葉 優文, 末廣 純也
2. 発表標題 誘電泳動DNA 検出法によるMultiplex PCRアンプリコンの検出
3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Nakano, T. Okumura, M. Inaba, P. Attri, K. Koga, M. Shiratani and J. Suehiro
2. 発表標題 Novel Biological Indicator using DNA-labeled Microparticles for Non-thermal Plasma Sterilization
3. 学会等名 第32回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田 諭, 中野 道彦
2. 発表標題 誘電泳動による細胞・微生物・DNAの捕集計測
3. 学会等名 令和5年 電気学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Nakano
2. 発表標題 Electrostatic Virus and Bacteria Detection Based on Dielectrophoresis
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of Electrostatics Society of America (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重本 真, 柴垣 有希, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動を用いたDNA分解酵素の検出
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第74回連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 諒, 陳 皓, 重本 真, 黄 怡, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 DNA増幅と微粒子誘電泳動を用いたDNA検出を行うデバイスの検討: 等温DNA増幅法の組み込み
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第74回連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄 怡, 吉田 諒, 田中 凌仁, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 等温DNA増幅法と微粒子誘電泳動を組み合わせた新型コロナウイルス遺伝子の検出
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第74回連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 諒, 末廣 純也, 中野 道彦, 稲葉 雅文, 重本 真, 陳皓, 黄 怡
2. 発表標題 等温DNA増幅法と微粒子誘電泳動による検出を組み合わせた小型デバイスの検討
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重本 真, 柴垣 有希, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動DNA検出法を用いたDNA分解酵素検出の検討
3. 学会等名 令和4年電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄 怡, 吉田 諒, 田中 凌仁, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 等温DNA増幅法と微粒子誘電泳動を組み合わせた核酸増幅検査用試作デバイスの性能評価
3. 学会等名 令和4年電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学ー研究者情報 https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003722/index.html 研究者プロファイリングツール Pure https://kyushu-u.pure.elsevier.com/ja/persons/michihiko-nakano

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	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 (17102)	
研究協力者	稲葉 優文 (Inaba Masafumi)	九州大学・大学院システム情報科学研究所・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	Chulalongkorn University			