

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410153

研究課題名(和文) 微小分散液滴を利用したバイオメディカル分析法の開発

研究課題名(英文) Development of Biomedical Analysis Based on Monodisperse Microdroplet

研究代表者

橋本 雅彦 (Hashimoto, Masahiko)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：20439251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：T字ジャンクション構造のマイクロチャンネル・2つの入りリザーバ・1つの出しリザーバを有するポリジメチルシロキサン(PDMS)製のマイクロ流体チップを減圧下で脱気し、その後大気圧下に戻し、一方の入りリザーバに油相、もう一方の入りリザーバに水相を加えることにより、単分散性の高い油中水滴を自動的に調製する新技術を開発した。生成した油中水滴に単一DNA分子とPCR試薬を内包させPCR増幅を行い、蛍光を示す油中水滴の割合を計数したところ、ポアソン分布から予測される割合と良好な一致を示した。以上のように、PDMSマイクロ流体チップを利用した新たなドロップレットデジタルPCRプラットフォームが確立された。

研究成果の概要(英文)：A fully autonomous method of preparing highly monodispersed water-in-oil droplets with a low sample dead volume was realized using an air-evacuated poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microfluidic chip possessing a simple T-junction channel geometry with two inlet reservoirs for oil and water to be loaded and one outlet reservoir for the collection of generated droplets. Autonomous transport of oil and water phases in the channel was realized by permeation of air confined inside the outlet reservoir into the degassed PDMS. The only operation required for droplet preparation was simple pipetting of oil and aqueous solutions into the inlet reservoirs. It was verified that the resultant droplets could serve as microreactors for digital polymerase chain reactions.

研究分野：分析化学

キーワード：単分散油中水滴の自動調製 単一DNA分子の検出 変異DNAの絶対的定量

1. 研究開始当初の背景

一塩基置換を迅速かつ高感度に検出することは、遺伝子診断において重要な研究課題である。しかし、サンプル中の「変異型/正常型」を選別することなく PCR 増幅を開始する従来の DNA 変異検出法では、圧倒的多数を占める正常型 DNA により必然的に検査結果にあいまいさが内包されてしまう。また、変異型 DNA の存在比率が極端に低い場合では検出不能となる。

このような問題を解決する手法として、油中に分散した水滴を微小反応容器として用いるドロップレットデジタル PCR (ddPCR) が、新規核酸解析法として近年注目を集めている^①。単分散性の高い液滴を高速で調製するために、マイクロ流体液滴ジェネレータが、ddPCR プラットフォームでこれまで用いられてきた。しかしながら、現在までに報告されている液滴ジェネレータは、外部ポンプを使ってマイクロ流体チップへと送液を行うため、大きくて扱いにくく高価であった。また、ポンプとマイクロ流体チップとの接続が必須であるため、サンプルのデッドボリュームが必然的に大きくなるのが問題とされてきた。研究開始当初、これらの問題を解決するための新たな技術開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流体チップの高いガス溶解性を利用した自律的マイクロ流体送液法^②を適用することにより、外部ポンプを必要とせず、デッドボリュームも伴わないハンズフリーな単分散液滴ジェネレータの開発を目的として研究に取り組んだ。また、本ジェネレータの基本性能を評価するとともに、生成した液滴が ddPCR の微小反応容器として機能するか検証した。

3. 研究の方法

本研究では、K-ras 遺伝子のエクソン 1 (c12.2) における DNA 点突然変異の検出をモデルケースとし、Cleave PCR^③を液滴内で行った。変異型 DNA を用いた試料 (Pos. Cntrl.)、正常型 DNA を用いた試料 (Neg. Cntrl.)、およびテンプレート DNA を含まない試料 (Blank Cntrl.) をそれぞれ用意した。なお、この反応に用いるプローブは、蛍光共鳴エネルギー移動応答特性が付与された DNA/RNA キメラプローブであり、標的とする変異アレルに対してのみ蛍光を発するように設計されている。水相としての各反応溶液は、全量 25 μL となるよう調製し、そのうち 20 μL を用いた。また、既報の論文^④を参考にし、油相には界面活性剤 (2.0 v/v% ABIL EM 90, 0.05 v/v% Triton X-100) を溶解させたミネラルオイル 60 μL を用いた。

二つの入りリザーバと出口リザーバ、および T 字ジャンクションを有する PDMS 製のマ

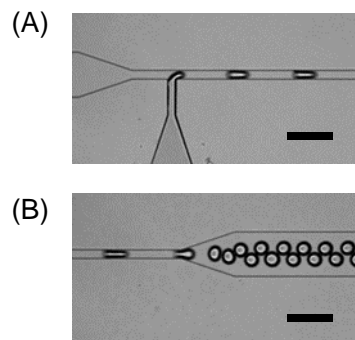


図 1. T 字ジャンクション付近における水相プラグフローの生成 (A) とチャンネル拡張部における液滴生成 (B) の様子を示す顕微鏡画像。スケールバー, 250 μm 。

イクロ流体チップを新規にデザインし使用した。カバーガラスを用いて出口リザーバをシールした状態でデシケータの中に入れ、真空ポンプを用いて 90 分間脱気を行った。その後、マイクロ流体チップをデシケータから取り出し、二つの入りリザーバに上記の油相および水相をそれぞれ加えた。

注入された油相および水相は、自律的に出口リザーバへと輸送され、T 字ジャンクションにおいて油中水滴が生成した (図 1)。高速カメラを備えた顕微鏡システムを用いて T 字ジャンクション付近を撮影し、液滴の生成速度および粒径の経時変化を測定した。同様の実験を複数回行い、本法の再現性を検討した。

生成した液滴を回収し反応チューブ内へ導入した。このチューブを 95°C で 10 秒間保持した後、95°C で 5 秒間、66°C で 10 秒間、さらに 72°C で 20 秒間保持する温度サイクルを 35 回繰り返すことで Cleave PCR を行い、最後に 4°C に冷却し反応を終了させた。反応させた液滴をガラス板に滴下し、落射型蛍光顕微鏡を用いて液滴の蛍光画像を撮影した。最後に、液滴の蛍光強度の分布を示すヒストグラムを作成した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体チップの基本性能

マイクロ流路の T 字ジャンクションで液滴が生成し始めた瞬間を 0 分とし、それ以降 2 分毎に液滴の生成速度を観測し、生成速度の経時変化を示す生成速度曲線を作成した (図 2 (A), 実線)。さらに、この生成速度曲線を時間積分することにより液滴の総生成数を見積った (図 2 (A), 破線)。なお、陰影がかけられた領域は、同様の実験を 7 回繰り返した際の標準誤差を表している。図 2 (A) の実線に示される通り、生成速度は生成開始からおおよそ 40 分後に最大 (ca. 10 Hz) となった後、なだらかに低下していった。しかし、このような生成速度の変化にも関わらず、液

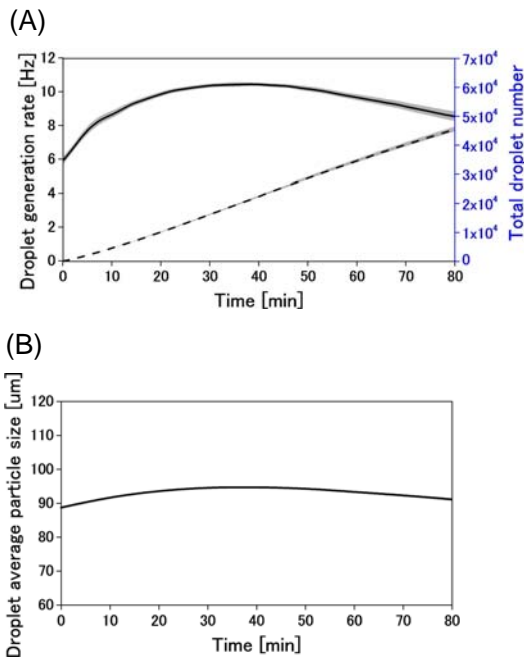


図 2. (A) 液滴生成速度と総生成数の経時変化. 実線は生成速度の平均値を示し、破線は生成速度を時間積分して計算した総生成数の平均値を示す ($n = 7$). 図中の陰影は標準誤差を示す. (B) 平均粒径の経時変化. 図中の陰影は標準誤差を示す ($n = 7$).

滴の粒径は生成開始から終了まで約 $90 \mu\text{m}$ ではほぼ一定であり、標準誤差は各測定時間における平均粒径の 3%以内であった (図 2 (B)). このように、本法によって単分散性の高い油中水滴を再現性よく自律的に生成させることが実証された。

(2) 液滴内における一分子からの PCR 反応

前述の Blank Cntrl.、Neg. Cntrl. および Pos. Cntrl. サンプル溶液をそれぞれ水相に用いて液滴を調製し、PCR 終了後、各々のサンプルに対し 1000 個以上の液滴の蛍光強度を測定しヒストグラムを作成した (図 3 (A)-(C)). テンプレート DNA を含まない場合では、キメラプローブがクリーブされず、蛍光は観察されないと予想されるが、図 3 (A) に示されるとおり、一部の液滴 (1.0%) が蛍光を示していることがわかる。これは、液滴に含まれるプライマー同士の非特異的な増幅物に対してプローブのクリーブが起きたためであると考えられる。非相補的なテンプレート DNA を用いた場合では (図 3 (B))、各液滴内に平均 100 個ものテンプレート DNA 分子が含まれていても関わらず、閾値以上の蛍光強度を示す液滴が全く観察されなかったことから Blank サンプルにおける非特異的な増幅物の生成が裏付けられる。液滴数に対して変異型 DNA 分子の数を 10%とした場合で

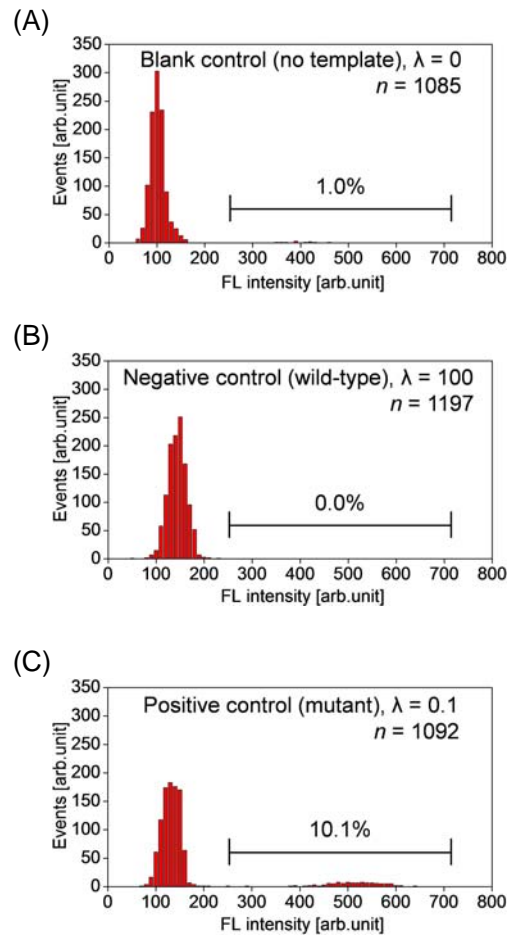


図 3. 無作為に抽出されたおよそ 1000 個の液滴の蛍光強度のヒストグラム. (A) Blank Cntrl. (テンプレート DNA 無し), (B) Neg. Cntrl. (正常型 DNA), (C) Pos. Cntrl. (変異型 DNA). 図中には、液滴 1 個当たりに含まれるテンプレート DNA 分子の平均個数 (λ) と解析された液滴数 (n) が示されている. 蛍光信号オン/オフの閾値は、相対蛍光強度 250 に設定した. また、各図中には解析された液滴群における蛍光信号オンの液滴の割合が百分率で示されている.

は (図 3 (C))、蛍光強度解析した液滴の 10.1%の液滴が閾値以上の蛍光強度を示しており、ポアソン分布から予想される割合 (9.5%) とほぼ一致した。この結果より、液滴内で一分子からの PCR 増幅が成功したと結論付けることができる。

(3) 総括

本研究において、ddPCR における微小反応容器としての単分散性油中水滴の新たな作製法を開発した。具体的には、脱気した PDMS 製マイクロ流体チップの 2 つの入り口リザーバーにそれぞれ油相と水相を添加するだけで、油中水滴を自律的に生成させる手法を確

立した。また、本法により調製された液滴を用い、ddPCR アッセイを実行することに成功した。以上のように、本研究により、油中水滴を利用した一分子からのバイオ分析法が確立された。

<引用文献>

- ① B. J. Hindson et al., 'High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number', *Analytical Chemistry*, Vol. 83, Issue 22, 8604-8610 (2011).
- ② K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, and M. Maeda, 'Power-Free Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices for Gold Nanoparticle-Based DNA Analysis', *Lab on a Chip*, Vol. 4, Issue 3, 181-185 (2004).
- ③ Y. Yatabe, T. Hida, Y. Horio, T. Kosaka, T. Takahashi, and T. Mitsudomi, 'A Rapid, Sensitive Assay to Detect EGFR Mutation in Small Biopsy Specimens from Lung Cancer', *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 8, Issue 3, 335-341 (2006).
- ④ R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik, and A. D. Griffiths, 'Amplification of Complex Gene Libraries by Emulsion PCR', *Nature Methods*, Vol. 3, No. 7, 545-550 (2006).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計19件)

- ① Kenta Hagihara, Kazuhiko Tsukagoshi, Chinami Nakajima, Shinsuke Esaki, and Masahiko Hashimoto, 'Improvement of the Mutation-Discrimination Threshold for Rare Point Mutations by a Separation-Free Ligase Detection Reaction Assay Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer', *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 32, No. 3, 367-370 (2016).
DOI: 10.2116/analsci.32.367
- ② Hironari Tanaka, Shunsuke Yamamoto, Arichika Nakamura, Yuta Nakashoji, Naoaki Okura, Norimitsu Nakamoto, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'Hands-Off Preparation of Monodisperse Emulsion Droplets Using a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip for Droplet Digital PCR', *Analytical Chemistry*, 査読有, Vol. 87, Issue 8, 4134-4143 (2015).
DOI: 10.1021/ac503169h
- ③ Kohei Fujishima, Shunsuke Yamamoto, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'A Microbead-Based Single Base Extension Assay for the Detection of Known Single-Base Changes in Genomic DNA',

Chemistry Letters, 査読有, Vol. 44, No. 5, 595-597 (2015).

DOI: 10.1246/cl.150014

- ④ Mariko Hamada, Koji Shimase, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'Discriminative Detection of Low-Abundance Point Mutations Using a PCR/Ligase Detection Reaction/Capillary Gel Electrophoresis Method and Fluorescence Dual-Channel Monitoring', *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 35, Issue 8, 1204-1210 (2014).

DOI: 10.1002/elps.201300584

- ⑤ Sho Watanabe, Kenta Hagihara, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'Microbead-Based Ligase Detection Reaction Assay Using a Molecular Beacon Probe for the Detection of Low-Abundance Point Mutations', *Analytical Chemistry*, 査読有, Vol. 86, Issue 1, 900-906 (2014).
DOI: 10.1021/ac403531x

- ⑥ Manami Hommatsu, Hisamitsu Okahashi, Keisuke Ohta, Yusuke Tamai, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'Development of a PCR/LDR/Flow-Through Hybridization Assay Using a Capillary Tube, Probe DNA-Immobilized Magnetic Beads and Chemiluminescence Detection (Hot Article Award)', *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 29, No. 7, 689-695 (2013).

DOI: 10.2116/analsci.29.689

- ⑦ Mariko Hamada, Koji Shimase, Keiichi Noda, Kazuhiko Tsukagoshi, and Masahiko Hashimoto, 'Development of a Ligase Detection Reaction/CGE Method Using a LIF Dual-Channel Detection System for Direct Identification of Allelic Composition of Mutated DNA in a Mixed Population of Excess Wild-Type DNA', *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 34, Issue 9-10, 1415-1422 (2013).

DOI: 10.1002/elps.201200671

[学会発表] (計59件)

- ① 中小司裕太・塚越一彦・橋本雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いた単分散油中水滴のセルフプライミング生成法の開発とドロップレットデジタル PCR への応用、日本化学会第96春季年会(2016)、2016年3月24日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)。
- ② 橋本雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いた微小液滴のハンズオフ調製とドロップレットデジタル PCR への応用、第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2015)、2015年11月4日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)。
- ③ 中小司裕太・塚越一彦・橋本雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いた単分散油中水滴のハンズオフ調製とドロップレットデジタル PCR への応用、日本分析化学会第64

年会、2015年9月10日、九州大学伊都キャンパス（福岡県福岡市）。

④ Yuta Nakashoji, Kazuhiko Tsukagoshi, Masahiko Hashimoto, Hands-Free Preparation of Monodisperse Water-in-Oil Droplets Using a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip for Droplet Digital PCR (RSC Best Presentation Award (‘Analyst’ Poster Prize)), RSC Tokyo International Conference 2015, 2015年9月4日、幕張メッセ（千葉県千葉市）。

⑤ 橋本雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いた単分散液滴のハンズフリー調製法、イノベーション・ジャパン2015、2015年8月27-28日、東京ビッグサイト（東京都江東区）。

⑥ 中小司裕太・田中洋成・山本駿介・塚越一彦・橋本雅彦、PDMS マイクロ流体チップを用いた単分散油中水滴のハンズフリー調製とドロプレットデジタルPCRへの応用、日本化学会第95春季年会（2015）、2015年3月27日、日本大学理工学部船橋キャンパス（千葉県船橋市）。

⑦ 橋本雅彦、マイクロ流体チップを利用した単分散油中水滴のハンズフリー製造法、化学工学会関西支部第3回技術シーズフォーラム、2014年10月22日、大阪科学技術センター（大阪府大阪市）。

〔図書〕（計 0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1件）

名称：マイクロ流体チップを用いた微小液滴の製造法および微小液滴製造装置

発明者：橋本雅彦、田中洋成、中村惟愛

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特許願 2014-094531

出願年月日：平成 26 年 5 月 1 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 雅彦 (HASHIMOTO, Masahiko)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：20439251

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし