

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660203

研究課題名(和文) 植物工場における食中毒関連細菌計数用デバイスに関する研究

研究課題名(英文) DNA-BASED RAPID BACTERIAL TESTING DEVICE IN PLANT FACTORY

研究代表者

鳥居 徹 (TORII, Toru)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60172227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微小流路内でPolymerase chain reaction (PCR)を行うデバイス開発である。本研究では、hydrogel molding method (HGM法)により複雑な微小流路を簡単・再現性良く作製するため、分注ロボットを用いて微小流路を作製し、PCRの実施と評価を行った。微小流路の作製では、ゲル鑄型の作製条件(ゲルの加熱・冷却温度、射出圧力、分注ロボットの移動速度、分注の射出位置)を明らかにした。CF-PCR実験では、作製した微小流路内でCF-PCRを行うために必要となる最適な実験条件(試薬流量、ポリメラーゼ濃度、増幅サイクル数)を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research is development of Polymerase chain reaction (PCR) device in the microchannel. The device was fabricated using hydrogel molding method, and the dispenser robot was employed for the fabrication of complex geometry of microchannels. The conditions for the fabrication, such as heating and cooling temperature of gel, pressure of gel, moving speed of robot, dispensing position of the needle, was analyzed. The optimal conditions for the PCR was also analyzed, such as flow rate of reagents, concentration of polymerase, number of amplification, and the performance of the device was evaluated.

研究分野：微小流体工学

キーワード：PCR 遺伝子 微小流路 増幅効率 分注ロボット ハイロドゲルモールディング法

1. 研究開始当初の背景

食品加工における衛生管理において、DNA を利用した分析手法に対して注目が集まっている。食中毒要因となる微生物 DNA を検出することにより、各種微生物を特異的かつ高感度に検出し¹⁾、高精度に危害要因分析が実施できると考えられている。PCR は酵素を含む溶液温度を上下することで DNA を特異的に増幅する技術であるが、微小流路において反応を行うことで、高速化や並列化を図ることが可能である^{2, 3)}。しかし、微小流路作製においては、フォトリソグラフィーを用いたものが多く、微小流路作製に必要な設備や技能が装置普及の障害となっている。

2. 研究の目的

先行研究において、ハイドロゲルを鋳型として用いた微小流路の試作手法 (Hydrogel molding method; HGM 法) が実現された⁴⁾。本研究では、HGM 法により作製した微小流路における CF-PCR の実現を目的とし、装置の設計および微小流路の作製、そして、CF-PCR の実施と評価を行った。装置の設計から試作および実験まで、簡便な手法により CF-PCR デバイスを実現したことを報告する。

3. 研究の方法

(1) ディスペンサーロボットを用いた微小流路鋳型の作製

微小流路の鋳型に用いたハイドロゲルの描画をディスペンサーロボット (Fig. 1) によって行った。40 °C に加熱した液状アガロースゲルを射出描画し、0 °C に冷却された PDMS (polydimethylsiloxane) 表面上でゲル化させ、微小流路の鋳型とした (図 1)。

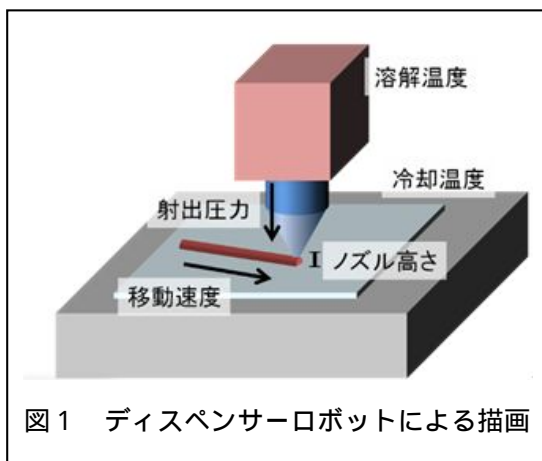


図 1 ディスペンサーロボットによる描画

(2) CF-PCR デバイスの構成と評価

作製した CF-PCR 微小流路は 5 往復に蛇行した流路が 3 つの温度領域を横断する構成となっており、1 回のサンプル導入で 4 cycles の PCR を進行させる (図 2)。PCR ではポリメ

ラーゼの活性による DNA 複製に反応時間を長く必要とするため、CF-PCR デバイス設計においても、72 °C 温度領域が最も広がっている。

流体制御系および温度制御系を微小流路にそれぞれ組み合わせ、実際に CF-PCR デバイスを構築した (Fig. 3)。流体制御について、シリンジポンプを用いてサンプルを微小流路へ一定流量で導入した。温度管理について、熱源を軸に流路と対象となる位置の温度を熱電対により測定し、温度コントローラーを用いて熱源の出力を PID 制御した。また、CF-PCR 後サンプルを希釈し、qPCR (定量 PCR) により DNA 濃度を定量することで、DNA 増幅の確認および、デバイスの増幅効率について評価した。

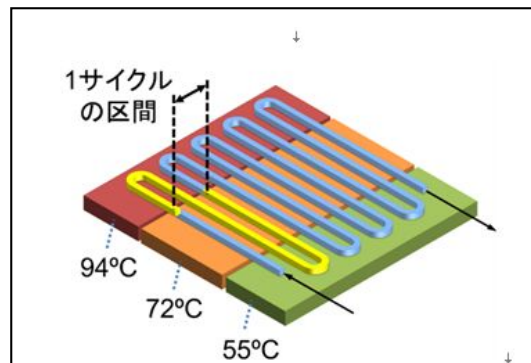


図 2 PCR デバイス概念図

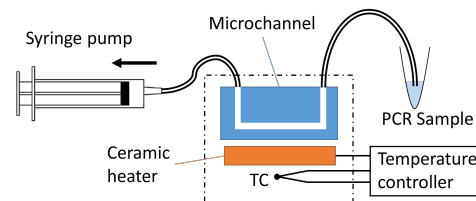


図 3 PCR デバイスの制御系

4. 研究成果

(1) 微小流路鋳型の作製

図 4 はディスペンサーロボットの、移動速度および射出圧力を変化させて描画したゲル鋳型について、微小流路の折り返し部となる一部を撮影したものである。ゲル鋳型の幅は、移動速度低下および射出圧力増加に従って増加し、次第に折り返し部にゲル溜りが生じることを確認した。

図 5 はゲルの各射出圧力における、描画後の微小流路鋳型の幅に対するディスペンサーロボットの移動速度の影響を示している。ゲル鋳型の作製モデルによる描画幅の予測と非常に近い作製結果が得られた (図 8)。これより、ディスペンサーロボットのパラメーターを適切に操作することで、HGM 法における微小流路ゲル鋳型の形状を任意に制御

できることが確認された。また、以降の CF-PCR 実施の際には、(60 kPa, 80 mm/s) の条件のもと作製した微小流路を使用した。

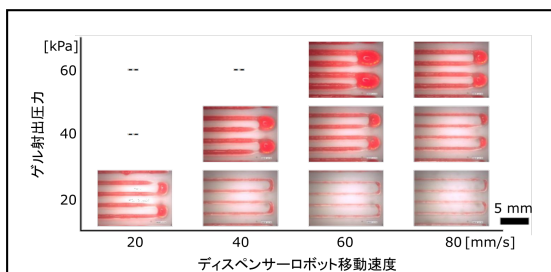


図4 ゲルの描画結果

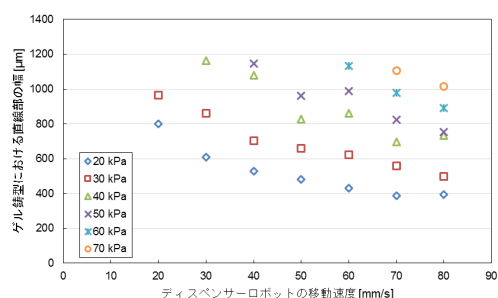


図5 ゲル描画幅の結果

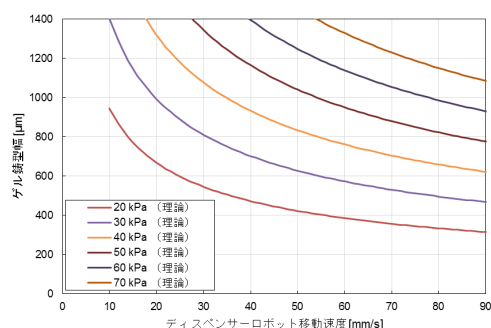


図6 ベル描画幅のシミュレーション結果

(2) 3.2 CF-PCR による DNA 増幅の条件

CF-PCR によって増幅した DNA について、qPCR (定量 PCR) を用いて DNA 濃度を定量した。増幅後の DNA 定量結果より CF-PCR の 1 cycle あたりの増幅効率を求めた。

微小流路の表面処理について、BSA (ウシ血清アルブミン)、あるいは MPC ポリマー⁶⁾ (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) により表面処理を施すことにより、増幅効率が向上した (図 7)。PDMS 表面は疎水性であるため BSA や MPC ポリマーが表面を改質することで、PCR サンプルにおける酵素の流路への吸着を抑制し、CF-PCR の効率が向上したと考えられる。

CF-PCR のサイクル数について、サイクル数の経過に従い、増幅効率が急速に低下していくことが分かった (図 8)。4-8 cycles 時点で

は、増幅効率が 100% を大幅に超過しており、増幅の標的とした DNA だけでなく副産物であるプライマー二量体が多数生成されていると考えられる。その結果 16-20 cycles においては、生成された副産物による PCR の阻害およびプライマーの減少によって増幅効率が大きく低下したのと考えられる。

微小流路へサンプルを導入する流量について、ポリメラーゼ濃度が 250 U/mL の際には、流量の増大に従い増幅効率は低下する一方で、流量を 1 mL/h から 5 倍にしても一定の増幅が確認された (図 9)。これらの結果より、CF-PCR において、高感度な DNA 検出を実施したい場合は流量を小さくしたり、一方で、短時間で DNA 検出を行いたい場合は大きな流量で実験を行ったりといった、目的に応じた実験条件の最適化が実現できる。

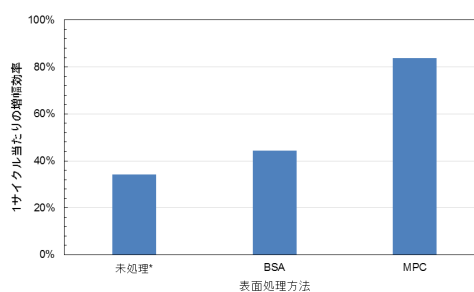


図7 表面処理と増幅効率

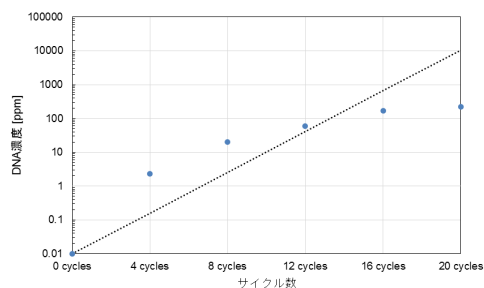


図8 サイクル数と増幅率

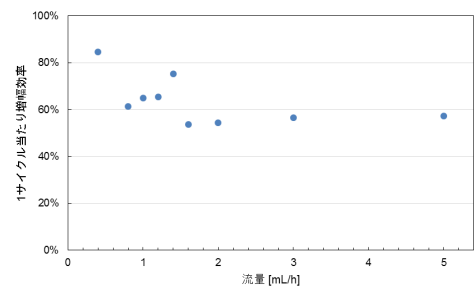


図9 流量と増幅効率

CF-PCR サンプルにおける酵素濃度について、流量 1 mL/h においては、ポリメラーゼ濃度が 50-100 U/mL の際に増幅効率が最大となることが確認された (図 10)。CF-PCR においては、流路への酵素吸着の影響により、通常の

PCR よりも高いポリメラーゼ濃度が必要であり,10 倍濃度が最適であるという結果も報告されている⁷⁾。今回の結果では,通常の 2-4 倍ポリメラーゼ濃度が最適となった。これは MPC ポリマーによる表面処理が,従来の BSA による表面処理よりも吸着抑制に高い効果を発揮したためであると考えられる。

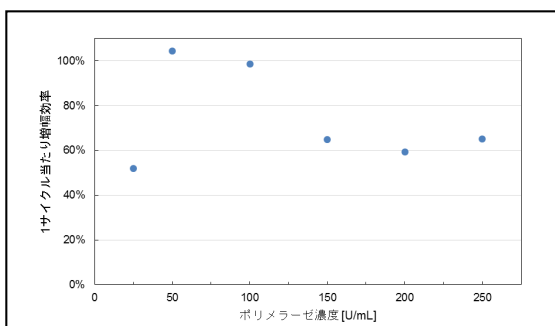


図 10 ポリメラーゼ濃度と PCR 効率

<引用文献>

- 1) M. Lehto, et al., Food Control, 22, 469-475, 2011.
- 2) D. R. Almassian, et al., Chem. Soc. Rev., 42, 8769-8798, 2013.
- 3) E. A. Ottesen, et al., Science, 314, 1464-1467, 2006.
- 4) H. Hirama, et al., Biomed Microdevices, 14(4), 689-697, 2012.
- 5) K. Nii, et al., Microfluid Nanofluid, 14, 951-959, 2013.
- 6) B. Shu, et al., Analytica Chimica Acta, 826, 51-60, 2014.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yusuke Sugiura, Toru Torii:
DNA-BASED RAPID BACTERIAL TESTING DEVICE IN PLANT FACTORY”; the 7th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering, May 21-23, 2014, Yilan(Taiwan), p712-717, 2014

杉浦 悠介, 鳥居 徹:
“ PDMS ハイドロゲルモールドリング法を用いた PCR デバイスの作製 ”; 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会, 平成 25 年 5 月 23 日(木)~24 日(金), 東北大学片平キャンパスさくらホール(宮城県仙台市)、p50, 2013.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥居 徹 (TORII Toru)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 60172227

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし