

プログラム名： 豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを
実現する人工細胞リアクタ
PM名： 野地 博行
プロジェクト名：「はかる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 8 年 度

研究開発課題名：

ユニバーサルなデジタルバイオ分析を実現する核酸検査法の開発

研究開発機関名：

国立大学法人東京工業大学

研究開発責任者：

小宮 健

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本研究開発課題では、研究開発責任者の発明した技術シーズである新規な等温核酸増幅法を、超微小溶液チャンバ技術と融合し、超高感度でハイスループット、かつ廉価な測定装置で行える革新的なデジタル遺伝子診断システムを社会実装することを最終目標に掲げている。当該年度は開発の初年度にあたり、デジタル遺伝子診断システム開発の基礎となる、超微小溶液チャンバを用いた等温核酸増幅検出が実際に実行できることを目標として開発を行った。

超微小溶液チャンバによる等温核酸増幅検出の高速・高感度化に向けて、当該年度はチャンバデバイス上での等温核酸増幅を実施した。ただし、単に増幅反応をチャンバデバイス上で実施するだけでは、増幅が起こらない場合が考えられる。デバイス固有の問題と微小溶液化に起因する問題を切り分けて適切な反応条件を同定するため、微小液滴を作製してその中で増幅を行う実験と、チャンバデバイスを用いて増幅を行う実験を並行して検証を進める計画のもとで、各種の検討を行った。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

チャンバデバイス上での等温核酸増幅を実施して、増幅が起こる条件を同定するための検討を行った。しかし、バルク溶液中での増幅反応と同じ条件では増幅が起こらないことが判明した。そこで、微小液滴を作製してその中で増幅を行う実験を並行して行い、微小溶液化に用いる試薬等が原因ではなく、デバイス固有の問題であることを明らかにした。また、微小液滴内での増幅については、想定していたよりも多様な条件下で実施できることも明らかにした。

チャンバデバイス上で増幅が起こらない問題を解決するため、反応溶液内の各因子の不活化を防ぐブロッキング剤等について検討したところ、各因子とデバイスの間で起こる不要な相互作用を抑制することで、増幅が起こり得ることを示唆する結果が得られた。さらに、反応溶液内の各因子の種類や濃度等について幅広く検討したところ、従来のバルク溶液中とは大きく異なる条件下で増幅が起こることを実証し、当該年度の目標を達成した。

2-2 成果

チャンバデバイス上での等温核酸増幅を実施したが、従来のバルク溶液中での増幅反応と同じ、もしくはその周辺の条件下では増幅が起こらなかった(図1.(a))。そこで、デバイスに固有の問題と微小溶液化に起因する問題を切り分けて適切な反応条件を同定するため、微小液滴を作製してその中で増幅を実施した。その結果、微小液滴内ではバルク溶液中と同様に増幅が起こることを確認した(図1.(b))。また、微小液滴の作製には様々なオイルおよび界面活性剤等の試薬が使用できることを確認するとともに、同組成において増幅が起こらない現象はデバイスに起因する問題であることを明らかにした。

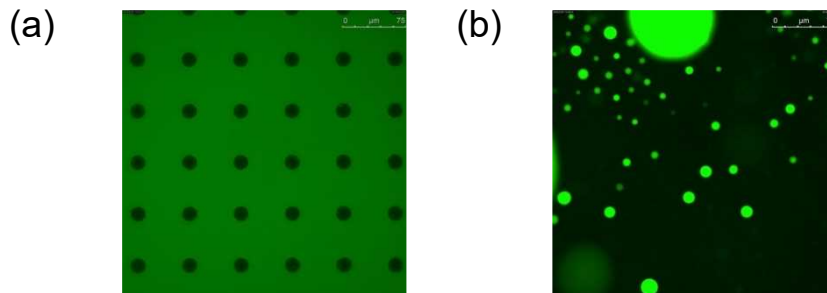


図1. (a) チャンバデバイスを用いた等温核酸増幅の結果. (b)微小液滴内での等温核酸増幅の結果.

次に、反応溶液内の各因子とデバイス間で起こる相互作用について検討したところ、不要な相互作用が起こっており、それを防ぐことで増幅が起こり得ることが示唆された。そこで、反応溶液内の各因子の種類や濃度等について集中的に検討を行い、チャンバデバイス上での等温核酸増幅反応に成功した。当該年度は半年間の研究期間であったが、目標を達成することができた。

2-3 新たな課題など

当該年度の当初の計画では、チャンバデバイス上で等温核酸増幅が起こらない場合に備えて、微小液滴を作製してその中で増幅を行う実験について、自動液滴作製装置も用いて検証を進める予定であった。しかし、従来の自動作製装置が適切に動作する条件と、チャンバデバイスと同程度のサイズの液滴を作成する条件が適合しておらず、本課題の検討には適用できないという課題が発生した。

次年度は、チャンバデバイス上での等温核酸増幅検出の高速・高感度化の開発を実施する上で、反応溶液内の各因子とデバイスとの不要な相互作用の抑制を達成するとともに、微小液滴を用いた条件検討をハイスループットに行う必要がある。本開発では、最終的に全自動デジタルELISA装置に組み込むことを想定しており、チャンバデバイスに最適化された計測システムでの検出を可能にするために、液滴サイズをチャンバデバイスサイズへ合わせる必要があると考えられる。上記の課題を克服するため、チャンバデバイスと同程度のサイズの液滴を自動で作製する手法についても開発を行う。

3. アウトリーチ活動報告

当該年度は該当なし。