

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28年度

研究開発課題名：

デジタル計測技術を用いた遺伝子検査の実用化

研究開発機関名：

凸版印刷株式会社

研究開発責任者：

中山雅人

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

酵素を用いた遺伝子検出反応について、これまで、人工細胞リアクタ(デバイス)内において、人工合成遺伝子の変異を検出するところまでは確認できていたが、血中に極少量でしか存在しない遺伝子を検査するためには、ターゲット分子をリアクタ内の微小な穴に効率よく収容できる必要がある(実用化に向けた大きな課題である)。H28年度は、血中に含まれる低濃度の遺伝子変異を短時間に検出する方法論を確立し、H29年度に計画される臨床検体によるシステム検証に繋げる。

【今期課題】

課題1. 低濃度核酸の検出 Ms1(H28年12月): 2 fMの合成DNAを検出できる。

課題2. 短時間の検出 Ms2(H29年3月): 擬似サンプルから15分以内に遺伝子を検出できる。

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

課題1. 低濃度核酸の検出

低濃度のDNAを効率よくドロプレットに格納し検出するため、マイクロビーズを用いたDNA捕捉(手法①)と、ドロプレット体積の増大(手法②)の2手法を検討した。結果、両手法で、目標値2fMを越える、200 aMの検出を確認した。

課題2. 短時間の検出

反応時間を短縮するため各種条件を詳細に検討し、従来に対し50%以下の反応時間に短縮することができた。また、ヒトゲノムDNAでも同等の反応時間で検出可能であることを確認するため、培養細胞由来の精製DNAを用いて検証を行なった。結果、試薬添加から検出機による画像撮影までを手法①35分程度、手法②18分程度で可能であることを確認した。(手法①は検体からの前処理工程を兼ねているため、検出時間が長いが実使用時の総検査時間は手法②と同等以下になる。)

2-2 成果

◆手法①

マイクロビーズにDNAプローブを標識し、サンプルDNA溶液中で攪拌することでターゲット分子を捕捉する。H28年度はプローブ設計、ハイブリダイズ条件、ビーズの封入方法の検討により、サンプルに含まれるターゲットの検出率が5倍以上向上した。本検討結果を用いて、培養がん細胞DNAに含まれる変異型DNAの割合をddPCR(登録商標、BioRad社)と比較し、高い相関性があることを確認した。本実験で用いたサンプルは、200 aMのヒトゲノムDNAにおいて相対率が0.2%~20%となるように変異型DNAを混合したものであり、非常に高感度な検出が可能であることを認めた。

H28年度に設定した原理検証での感度(MS1 絶対定量:2 fM)を達成しており、今後は臨床で求められる正常遺伝子と変異遺伝子の相対定量0.1%を目標とする。

◆手法②

ドロップレット体積を増加させるため、最適なウェルサイズを検討した。インプリント法で作製したウェル中で酵素反応を行い、蛍光輝度とS/N比の評価および加工のしやすさを考慮し最適な形状を決定した。本デザインのウェルを用いることで従来よりも定量下限が5倍以上向上することが確認できており、今後は反応試薬の最適化および擬似検体の評価を進めていく。

◆反応速度の向上

手法②のウェルサイズの増加に伴い、従来よりも反応性を向上させることが必要となる。H28年度は、試薬条件(反応温度に合わせたプローブの厳密な設計、酵素の至適pHにあわせた最適なBuffer選定、非特異反応抑制と高反応性を両立しうる酵素濃度決定)および温度の最適化により、反応時間を改善前に比べおおよそ半分にすることができた(図左)。また、デジタル計測部材中での検出評価も、反応性が向上し、15分の加温でも、蛍光輝度が増加することが確認できた(図右)。しかし、手法②で最適と判断したウェルデザインにおいて、蛍光輝度が十分であるかは未確認である(今後、画像解析ソフト開発と併せて、必要輝度の閾値を決定する予定)。

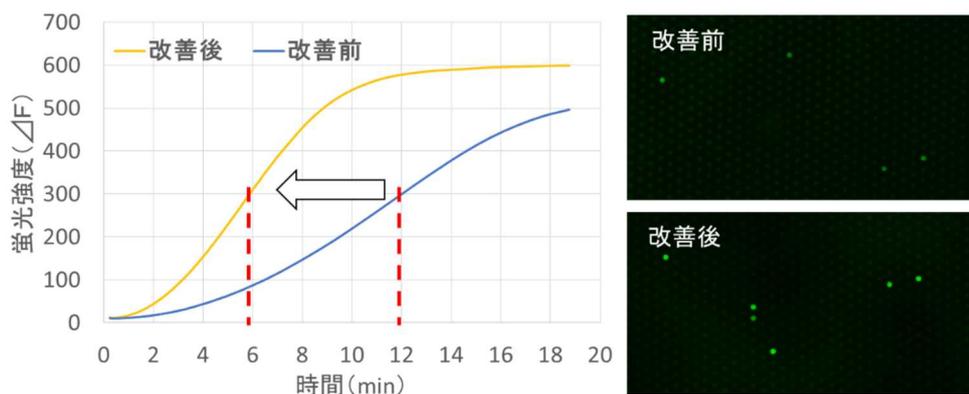


図. 反応速度改善結果(左:リアルタイム蛍光測定装置、右:デジタル計測)

2-3 新たな課題など

◆ヒト検体の正確な測定

H28年度の検証結果では、相対定量計測においてddPCRと比較し最大で40%の計測差異が生じた(手法①)。この原因が測定手法によるものか、サンプルによるものかは不明である。H29年度に予定しているヒト検体を用いた評価では、ddPCR以外の定量手法(クローニングなど)を用いてどちらの手法がよりサンプルを正確に測定可能か評価する必要がある。

◆画像解析処理の速度向上

H28年度は、1解析あたり45枚にもなる画像を顕微鏡付属の解析ソフトを用いて処理を行い、10分程度の時間を要している。今後、測定時間の短縮のために、本手法に適した解析処理を構築する必要がある。

3. アウトリーチ活動報告

特になし。