

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29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

本研究では、デジタル計測を応用した高感度定量且つ圧倒的な迅速性(既存法が検出に4時間を要するのに対し、本システムでは30分以内に検出を完了する)を有する核酸検査システムの実用化を目指しており、H30年度には、プロトタイプキットを作製し、外部機関にて第三者評価を進めていくことを計画している。

H29年度は、プロトタイプキットの性能を裏付けるための検証として、臨床検体を模したサンプルおよび実検体を用いたシステム原理検証を行い、検体由来の夾雑物の影響確認や、ゴールドスタンダードの既存手法と比較した検出精度(定量性)確認等を実施する。

課題1. マイルストーン3擬似検体評価

市販の擬似サンプルを用いた評価で、LOQ(総DNA中の変異型DNAの定量下限)が0.2%以下であることが確認できる。

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

当初、定量精度のみについて、既存法と比較した際の目標値を定めていたが、本システムの特徴となる「感度」においても規定すべきであると考え、「定量性と感度」の両方の技術目標を見極めるために、「定量検出限界値」として目標値を改めることとした。

なお、疑似検体評価において非特異的シグナル(ノイズ)が発生し、その対策が必要になった。課題1.については、上記問題が解決されるまでは、厳密な定量検出限界値を評価することが難しいため、非特異的シグナルを考慮した推定評価に留めることとした。

課題1. Ms3(H30.3) 擬似検体評価

H28年度に達成した0.2 fMのDNA検出感度では、臨床検体評価に際しては不十分であり、少なくともあと6倍以上の感度向上が必要とされた。そこで、検出試薬の至適化および検出デバイス構造の再設計を試みた。結果、検出感度を6.6倍(目標値を越える)に向上させる30 aM(0.2%相当を見込む)を示唆する定量検出感度を得ることができた。これはゴールドスタンダードとなる既存手法(BioRad社 QX200™ Droplet Digital™ PCR システム)と比較して、同等レベルの定量検出限界にあると言えるが、原因特定ができない非特異的シグナルが現れており、これらが解消されない限り、厳密な定量検出限界値を定めることができないという新たな課題が発生している。

2-2 成果

課題1. 擬似検体評価

cDNA(100~250塩基程度)に見立てた擬似サンプルを培養細胞から抽出精製したゲノムDNAより調製した。短鎖化に際しては、超音波破碎により断片化を行った。

まずは、上記短鎖化されたDNAのみを用いて、既存手法(ゴールドスタンダード)との定量精度比較を行い、変異率(総サンプル中の変異型遺伝子の割合)が0%~10%の範囲で高い相関性を認め

ることができた。また、より臨床検体に近い擬似サンプルとして、健常者の血漿に上記調製した短鎖化 DNA を一定の濃度で調合したものを用意し、我々のシステムプロトコルに準拠したかたちで、DNA の精製処理から検出までの一連操作を通した評価を行った。結果、これについても、既存手法と同等の変異率の定量性を認めることができた。

2-3 新たな課題など

H30 年度後半に控える、プロトタイプキットの外部評価に向けては、システムの安定性確保が最重要課題となる。そこで、プロトタイプキットの主要構成品となる、「酵素試薬」と「解析デバイス」の安定作製に重点を置いた技術課題に早期に取り組み、社会実装の加速化を図ることとした。特に、「酵素試薬」については、酵素の大量合成技術、「解析デバイス」については、デバイスの加工技術の構築に注力する。

◆酵素大量合成技術

核酸検出反応の安定性、再現性を保つためには、酵素活性を一定に維持することができる酵素調製技術が不可欠である。酵素は、スモールスケールからラージスケールの調製法に拡張する過程で、コスト性、生産性を考慮したプロセス変更が行われることで、同質のものが得られなくなるという問題が生じることは少なくない。酵素の安定大量生産プロセス技術を確立する。

◆デバイス加工技術

デジタル計測システムの原理から考えて、デバイスの成形・加工（微細樹脂成型、樹脂貼合加工の技術等）の精度は、そのままシステムの検出精度にクリティカルに影響を及ぼすことが容易に示唆される。安定且つ高精度な成形・加工プロセス技術を確立する。

3. アウトリーチ活動報告

印刷学会紙 2017 第 6 号「総説 生体分子のデジタル計測技術開発」中で本研究課題を紹介した。