

信州大学審査学位論文

昇降式 PCR を用いた
遺伝子検査装置の高性能化に関する研究

2016 年 3 月

山口 明美

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	2
1.2 遺伝子検査の市場性	2
1.3 遺伝子検査の現状と課題	7
1.4 本論文の目的と論文構成	8
第2章 遺伝子検査の方法と原理	11
2.1 はじめに	12
2.2 核酸の抽出	12
2.3 核酸の増幅と検出	15
2.3.1 PCR	15
2.3.2 リアルタイム PCR	17
2.3.3 RT	21
2.3.4 RT-PCR	21
2.3.5 PCR を基本とした技術	23
2.4 検出方法	25
2.5 本研究において用いる方法	27
第3章 自動核酸抽出装置の開発	29
3.1 はじめに	30
3.2 装置の構造	30
3.3 カートリッジの構造	34
3.4 実験方法	38
3.4.1 サンプル	38
3.4.2 比較対象とする従来式の核酸抽出方法	38
3.4.3 移動速度と振動周波数の最適化	38
3.4.4 阻害物質	38
3.4.5 検出限界	39
3.4.6 リアルタイム PCR	39

3.5	結果と考察	41
3.5.1	永久磁石の移動速度と振動周波数	41
3.5.2	洗浄効果	44
3.5.3	検出限界	46
3.6	まとめ	47
第4章 昇降式 PCR 装置の開発		49
4.1	はじめに	50
4.2	昇降式 PCR の装置構成と原理	50
4.3	実験方法	54
4.3.1	反応条件	54
4.3.2	従来式 PCR 装置	54
4.3.3	昇降式 PCR 装置	54
4.4	結果と考察	57
4.4.1	標準的な反応条件における性能比較	57
4.4.2	昇降式 PCR 装置における高速条件の性能	62
4.5	まとめ	65
第5章 昇降式 PCR の応用開発		67
5.1	はじめに	68
5.1.1	Nested PCR	68
5.1.2	複数検出	68
5.2	One-step RT-nested PCR	69
5.2.1	実験目的	69
5.2.2	実験方法	69
5.2.3	結果と考察	78
5.2.4	まとめ	84
5.3	Sequential PCR	85
5.3.1	実験目的	85
5.3.2	実験方法	85
5.3.3	結果と考察	91
5.3.4	まとめ	95

5.4	まとめ	96
第 6 章	結論	97
6.1	本論文のまとめ	98
6.1.1	自動核酸抽出装置の開発	98
6.1.2	昇降式 PCR 装置の開発	98
6.1.3	昇降式 PCR の応用開発	99
6.2	将来の展望	99
<参考文献>		101
<本研究に関する発表>		108
<昇降式 PCR に関するその他の論文>		109
<謝辞>		110

表目次

第1章

表 1-1	遺伝子検査の分類 ¹⁾	3
表 1-2	平成 24 年度の遺伝子関連検査の内訳 ⁴⁾	5

第3章

表 3-1	核酸抽出のワークフロー	37
表 3-2	プライマー、プローブの配列 ³⁹⁾	40
表 3-3	試薬組成	40
表 3-4	反応条件	40

第4章

表 4-1	従来式 PCR 装置で用いた試薬組成	55
表 4-2	従来式 PCR 装置における標準反応条件	55
表 4-3	昇降式 PCR 装置で用いた試薬組成	56
表 4-4	昇降式 PCR 装置における標準反応条件	56
表 4-5	昇降式 PCR 装置における高速反応条件	56
表 4-6	従来式 PCR 装置を用いた標準条件での Ct 値と増幅判定	58
表 4-7	昇降式 PCR 装置を用いた標準条件での Ct 値と増幅判定	60
表 4-8	昇降式 PCR 装置を用いた高速条件での Ct 値と増幅判定	63

第5章

表 5-1	プライマー、プローブの配列	72
表 5-2	最適なアニーリング／伸長温度を評価するために用いた試薬組成	73
表 5-3	最適なアニーリング／伸長温度を評価するために用いた高速反応条件	73
表 5-4	従来法の RT nested PCR の試薬組成	74
表 5-5	従来法の RT nested PCR の反応条件	75
表 5-6	従来法の RT nested PCR で TaqMan プローブを入れた場合の Second PCR の試薬組成	76
表 5-7	One-step RT-nested PCR の試薬組成	77

表 5-8	One-step RT-nested PCR の反応条件	77
表 5-9	Sequential PCR に用いたプライマーとプローブの配列	86
表 5-10	昇降式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた試薬組成	87
表 5-11	昇降式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた反応条件	87
表 5-12	従来式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた試薬組成	88
表 5-13	従来式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた反応条件	88
表 5-14	昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の試薬組成	89
表 5-15	昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の反応条件	89
表 5-16	従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の試薬組成	90
表 5-17	従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の反応条件	90

図目次

第2章

図 2-1	磁性シリカビーズを用いた核酸抽出	13
図 2-2	PCR	16
図 2-3	リアルタイム PCR における増幅曲線	18
図 2-4	リアルタイム PCR における検量線	18
図 2-5	TaqMan プローブ法	20
図 2-6	インターカレーター法	20
図 2-7	逆転写反応	22
図 2-8	Nested PCR	24

第3章

図 3-1	自動核酸抽出装置の模式図	32
図 3-2	磁性シリカビーズの揺動	33
図 3-3	カートリッジの模式図	36
図 3-4	永久磁石の移動速度	41
図 3-5	永久磁石の振動周波数	42
図 3-6	夾雑物の洗浄効果	45
図 3-7	検出限界	46

第4章

図 4-1	昇降式 PCR 装置の模式図	51
図 4-2	従来式 PCR 装置の温度移行	53
図 4-3	昇降式 PCR 装置の温度移行	53
図 4-4	従来式 PCR 装置の検量線	59
図 4-5	従来式 PCR 装置の増幅曲線	59
図 4-6	昇降式 PCR 装置の標準条件での検量線	61
図 4-7	昇降式 PCR 装置の標準条件での増幅曲線	61
図 4-8	昇降式 PCR 装置の高速条件での検量線	64
図 4-9	昇降式 PCR 装置の高速条件での増幅曲線	64

第 5 章

図 5-1	各プライマーの最適なアニーリング／伸長温度	79
図 5-2	One-step RT-nested PCR の検出限界	80
図 5-3	従来法の RT nested PCR の検出限界	81
図 5-4	One-step RT-nested PCR の特異度	82
図 5-5	One-step RT-nested PCR の臨床的評価	83
図 5-6	昇降式 PCR 装置を用いた各プライマーの最適なアニーリング／伸長温度	92
図 5-7	従来式 PCR 装置を用いた各プライマーの最適なアニーリング／伸長温度	92
図 5-8	昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR	94
図 5-9	従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR	94

略語一覽

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFU	colony forming unit
Ct	threshold cycle
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
HLA	human leukocyte antigen
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
mRNA	messenger ribonucleic acid
NASBA	nucleic acid sequence-based amplification
PCR	polymerase chain reaction
POCT	point of care testing
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SNPs	single nucleotide polymorphisms
T _m	melting temperature

第 1 章

序論

第1章 序論

1.1 はじめに

遺伝子検査は、感度と特異度の高い検査方法であるために、感染症の診断、癌の治療選択やモニタリング、遺伝性疾患、個人識別などで広く利用されてきた。近年は、癌関連遺伝子の検索やオーダーメイド医療など、適用範囲は多岐に渡り、需要が高まっている。しかし、遺伝子検査は時間がかかる、専門技術や複数の機器が必要となるなどの理由から、大病院や検査会社で実施されており、身近な検査として受け入れられてはいない。高感度な遺伝子検査が迅速、簡単になれば、臨床の現場での正確な診断、適切な薬の処方などに用いることができるため、迅速な遺伝子検査装置の開発が期待されている。

1.2 遺伝子検査の市場性

遺伝子検査は、JCCLS 日本臨床検査標準協議会の「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン (2010)」¹⁾により、3つに分類される。表 1-1 は、そのガイドラインに記載されている遺伝子検査の3つの分類、①病原体遺伝子検査、②ヒト体細胞遺伝子検査、③ヒト遺伝学的検査について、まとめたものである。

①病原体遺伝子検査は、ヒトの体に侵入した感染症の原因となる病原体（ウイルス、細菌等）の特定の遺伝子を検出するため、高感度であり、感染症の診断や薬の選択に有用である。遺伝子検査は感染症の様々な検査の中でも、培養に長い時間を要する細菌の検出、抗菌薬投与後の細菌感染症の診断、培養が困難なウイルスの検出など、培養検査や抗原抗体検査で診断が困難な症例で、威力を発揮している²⁾。

②ヒト体細胞遺伝子検査は、造血器腫瘍や固形腫瘍に関連する特定の遺伝子の後天的な構造変異や発現異常を解析する。これらの確定診断は様々な検査結果に基づいて総合的に行われるが、その中でも遺伝子検査は、病型の診断、治療方針の決定、治療効果のモニタリング、分子標的薬の有無の確認などに使用されている。例えば、造血器腫瘍である慢性骨髄性白血病では、分子標的薬 Imatinib を使用できるか確認するために、*BCR-ABL* mRNA の有無を遺伝子検査で確認する。固形腫瘍である非小細胞肺癌では、分子標的薬 Gefitinib や Erlotinib を使用できるかを確認するために、EGFR 遺伝子変異の有無を遺伝子検査で確認する。

③ヒト遺伝学的検査は、単一遺伝子疾患（遺伝病）の診断、移植に関わるヒト白血球型抗原 (human leukocyte antigen : HLA) の遺伝型の検査、多因子疾患に関わる一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms : SNPs)、疾病罹患リスク（癌、生活習慣病等）、体質（薬物応答性、太りやすさ、アルコール代謝等）、個人識別（親子鑑定等）など、様々な検査が含まれる。この

検査で得られる遺伝情報は、確定診断や治療方針の決定に有用である一方、先天的な個人の遺伝情報を検査するため、その取り扱いによっては社会的、倫理的な問題を招く可能性があり、細心の注意を払う必要がある分野である³⁾。

表 1-1 遺伝子検査の分類¹⁾

①病原体遺伝子検査（病原体核酸検査）	ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体（ウイルス、細菌等微生物）の核酸（DNA あるいは RNA）を検出・解析する検査。
②ヒト体細胞遺伝子検査	癌細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析等、疾患病変部・組織に限局し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査。
③ヒト遺伝学的検査	単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報（生殖細胞系列の遺伝子解析より明らかにされる情報）を明らかにする検査。

日本における遺伝子関連検査の大半は病原体遺伝子検査であることが、日本衛生検査所協会が行っているアンケート調査により示されている。「第7回遺伝子・染色体検査アンケート調査報告書（平成26年）」⁴⁾は平成25年7月に実施され、日本衛生検査所協会に登録されている臨床検査会社が行う遺伝子関連検査（病原体遺伝子検査、ヒト体細胞遺伝子検査、ヒト遺伝学的検査）は、病原体遺伝子検査471万件、ヒト体細胞遺伝子検査32万件、ヒト遺伝学的検査8万件であり、病原体遺伝子検査が92%以上占めていた（表1-2）。ヒト体細胞遺伝子検査やヒト遺伝学的検査の実施数は少ないが、前回（平成23年）の実施数と比較すると大幅に増加傾向にあった。それは、分子標的薬等による造血器腫瘍の治療法が普及し、患者の治療経過のモニタリングにおいて遺伝子検査を反復利用する頻度が増大したことが考えられる。さらに固形腫瘍でも分子標的薬の適用対象者を決めるための遺伝子検査が多用され、検査数が増加している⁴⁾。今後は、分子標的薬の開発・実用化に伴う治療対象者の選定のためのヒト体細胞遺伝子検査や、薬剤応答性や多因子疾患に関わるSNPs検査（遺伝子多型検査）の実用化に伴い、これら遺伝子関連検査が増大することが予想される⁵⁾。

表 1-2 平成 24 年度の遺伝子関連検査の内訳⁴⁾

	件数 (割合)	内訳
①病原体遺伝子検査	4,718,418 件 (92.1%)	感染症診断に関わる遺伝子検査 4,718,418 件
②ヒト体細胞遺伝子検査	319,666 件 (6.2%)	白血病・リンパ腫関係の遺伝子検査 222,883 件 固形腫瘍関係の遺伝子検査 96,783 件
③ヒト遺伝学的検査	83,547 件 (1.6%)	単一遺伝子疾患の診断に関わる遺伝子検査 4,080 件 家族性腫瘍の診断に関わる遺伝子検査 1,106 件 生活習慣病等の疾患感受性診断に関わる遺伝子検査 1,115 件 薬剤応答性診断に関わる遺伝子検査 32,398 件 その他、個人の体質診断に関わる遺伝子検査 322 件 臓器移植に関わる個人識別等の遺伝子検査 44,156 件 親子鑑定に関わる遺伝子検査 370 件
total	5,121,631 件	

遺伝子検査は、感染症の遺伝子検査が大半を占めるが、癌関連遺伝子など、保険収載されたヒト遺伝子の遺伝子検査項目も増えてきていることから、遺伝子検査数は今後も増加し、遺伝子検査装置、試薬の需要は高まっていくと考えられる。1990年に開始された「ヒトゲノムプロジェクト」は、ヒト染色体の遺伝情報やDNA配列を全て解読するプロジェクトであり、13年後の2003年に完了した。その情報は、DNAチップや次世代シーケンサーなどの先進の解析テクノロジーを用いてデータ処理され、99%の配列が99.99%の正確さで解析された。ゲノムの解析は、構造解析と機能解析に分けられるが、ヒトゲノムプロジェクトはヒトのDNA配列約30億塩基対がどのように並んでいるかを明らかにするゲノム構造解析であった。しかし、DNA配列の並び方だけでは、それがどんな「機能」を持っているかわからない。現在は「ポストゲノム時代」と呼ばれ、ゲノム機能解析の段階である。ゲノム機能解析は、遺伝子の特定や、その遺伝子の特徴などの機能を同定する作業であり、バイオインフォマティクスが活用されているが、その作業は始まったばかりである。ポストゲノム時代に入り、単一あるいは複数の遺伝子の異常だけで説明できる疾患（単因子性疾患）は少なく、ほとんどの疾患が多く遺伝子と環境因子の相互作用により発症、または遺伝子が正常でもその発現を調節する後天的な制御の異常によって発症する疾患（多因子性疾患）が圧倒的に多いことがわかってきた。このような背景から、特定の遺伝子の解析だけでなく、ヒトゲノム上に存在する50~100万種のSNPsを用い、DNA配列の個人差、疾病に関わる多因子形質、変異など多方面から疾病に関連する遺伝的要因を解明する研究が進んできており、薬の効きやすさ、疾病のかかりやすさ、体質との関係などを予測し、疾患の早期診断、治療、予防への応用が期待されている。

将来、遺伝子検査が非常に身近な検査となれば、感染症だけでなく、個人個人に最適な医療を提供するためのツールとして使用されるようになると予想される。ヒトゲノム解析によるDNA配列やそのSNPsの情報を利用して、個人に最適な治療方法を計画することを、「オーダーメイド医療」という。具体的には、ある治療薬がその患者に有効であるか事前に検査ができ、投薬量や副作用について見積もる。文部科学省プロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」は平成15年度から開始された。第一期（平成15年度から平成19年度）では、約20万人の患者の協力のもと、47疾患（悪性腫瘍、脳血管障害、てんかん、ぜんそく、心筋梗塞、糖尿病、アトピー性皮膚炎など）約30万症例の血清、DNA、臨床情報がバイオバンクに収集された。第二期（平成20年度から平成24年度）では、第一期で構築した基盤の維持、拡充をするとともに、全ゲノムSNP解析に基づく疾患関連遺伝子及び薬理ゲノム学による薬剤応答関連遺伝子の解明に向けた基礎研究を本格的に実施した⁶⁾。第三期はバイオバンクの拡充、対象47疾患のゲノムワイドSNP解析の完了を目指している。このように、

遺伝子検査結果に基づき、治療がなされる時代が遠くないと考えられ、今後ますます SNP などのヒト遺伝子の遺伝子検査が増えていくと考えられる。

以上より、遺伝子検査は今後様々な分野で増加していくと予測されるが、多くの臨床検体の遺伝子検査を行うためには、①臨床の現場（診察室、地域の診療所）で実行可能であること、②操作が簡便であること、③短時間で結果がわかること、が重要であると考えられる。これらが可能な遺伝子検査装置、遺伝子検査試薬は、まだ市場になく、迅速な開発が望まれている。

1.3 遺伝子検査の現状と課題

遺伝子検査は高感度な検査であるが、他の検査方法と比較するとあまり活用されていない。その理由としては、時間がかかる、作業が煩雑、専門技術が必要、という点が考えられる。遺伝子検査自体は数時間で終了する検査であるが、現状は検査結果を受け取るまでに1~4週間かかっている。その理由は、遺伝子検査は機器や専門技術が必要であり、かつ煩雑な作業を要するためである。臨床の現場（診察室など）で実施することは困難であり、大病院の検査室や検査会社に検体を輸送し、遺伝子検査が行われている。また、精度管理が必要な遺伝子検査は、多数の検体をまとめて検査することにより精度管理のコストを抑えているため、ある一定の検体数が集まるまで待つ時間もかかっている。従って、大病院が院内で検査する場合は1週間に1回の頻度で行われている場合が多く、遺伝子検査が実施できない大半の病院や診療所から大病院や検査会社などに検体を輸送して検査依頼する場合は、輸送の時間などもかかることから、検査結果を受け取るまでに2~4週間かかっている。

感染症の検査は、診断と治療方針の決定に迅速性が求められる。抗原抗体検査は短時間で検査が可能なため、多くの病院や診療所で使用されているが、低感度である。遺伝子検査や培養検査は高感度であるが、結果を得るまでに数日間かかっている。そのため、高感度で迅速な感染症の検査、すなわち迅速な遺伝子検査はまだ臨床現場になく、非常に望まれている。感染症の迅速な遺伝子検査は、医療、農業、畜産業、検疫やセキュリティ、食品など、様々な分野で求められているが、特に医療分野でのニーズが高い。診察室や患者に近い場所で検査する POCT (point of care testing) が、臨床検査の分野で増加している。多くの病院、診療所で使用されているインフルエンザウイルスなどの抗原抗体検査は POCT の一例である。抗体抗原検査は病原体のタンパク質を検出することに対し、遺伝子検査は病原体の遺伝子を検出する。そのため、遺伝子検査は抗原抗体検査と比較して高感度であり、亜型判定など遺伝子のためわかる情報も多い。医療分野で高感度な遺伝子検査が身近な検査となれば、患者は最寄りの病院や診療所で正確な検査を受けることができ、医師は正確な確定診断、適切な薬

の処方が可能となるだろう。さらには、検査の遅れによる治療の長期化や重症化のリスクを低減でき、医療費の削減もできると考えられる。

世界中で多くの研究施設や企業が迅速、簡単な遺伝子検査装置、遺伝子検査試薬の開発に乗り出しており、論文や学会等では POCT を狙った迅速、簡単な遺伝子検査（核酸抽出、核酸増幅・検出）デバイスが非常に多く発表されている。そのため、POCT 用の遺伝子検査の装置と試薬の製品化は「開発段階」であるが、製品化が近いと予測される。例えば核酸抽出では、マイクロ流体デバイスや磁性シリカビーズ等を用いて、数分以内にできるデバイスが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。核酸抽出のための細胞溶解の部分でも、マイクロ流体デバイスやシリカを用いたデバイスが報告されている¹¹⁻¹³⁾。核酸増幅・検出では、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction : PCR）を用いた研究が多く、様々な技術で PCR の温度サイクルを迅速化し、高速 PCR を実行できるデバイスが報告されている¹⁴⁻²³⁾。さらに、核酸抽出と PCR を一体化したデバイスの報告もある²⁴⁻²⁸⁾。迅速、簡単な遺伝子検査装置は開発されつつあるが、現在 10 分以内で核酸抽出から検出まで実行可能な遺伝子検査装置は製品としてなく、迅速な製品化が望まれており、遺伝子検査を臨床の現場で活用できる将来が期待されている。

1.4 本論文の目的と論文構成

迅速、簡単な遺伝子検査を実現する装置開発を目的とした。さらに開発した装置を用いた検査方法の応用開発を行い、高性能化を目指した。遺伝子検査を構成している核酸抽出について自動核酸抽出装置、核酸増幅・検出について昇降式 PCR 装置を開発した。自動核酸抽出装置では、磁性シリカビーズの揺動という特徴的な動きを利用して、3 分という迅速な核酸抽出を目指した。自動化装置のため、煩雑な手作業がなく、専門技術を必要としない構成とした。昇降式 PCR 装置では、2 つのヒートブロックを用いた構造により、ヒートブロックの温度を PCR に必要な 2 つの温度へ昇温・降温する必要がないことから、PCR の所要時間を劇的に短縮した。本研究では、開発した自動核酸抽出装置と昇降式 PCR 装置の性能評価、および昇降式 PCR 装置を用いた新たな遺伝子検査法の応用開発を行い、研究成果をまとめた。

本論文は、以下の構成にて研究内容をまとめた。

第 2 章： 遺伝子検査に用いられている方法、原理についてまとめた。

第 3 章： 開発した自動核酸抽出装置について述べ、移動速度と振動周波数から制御される磁性シリカビーズの「揺動」の最適化の検討を行った。さらに、従来の方法（手作業、自動化装置）と比較して開発した自動核酸抽出装置の性能の実証を

行った。

第4章： 開発した昇降式 PCR 装置について述べ、昇降式 PCR 装置の PCR 装置としての性能を従来式 PCR 装置と比較して実証した。さらに、昇降式 PCR 装置で可能な高速 PCR 条件で高速 PCR が可能かどうかを検証した。

第5章： 昇降式 PCR 装置を用いた応用開発として、2つの新たな遺伝子検査方法、「One-step RT-nested PCR」と「Sequential PCR」を構築した。

(1) One-step RT-nested PCR

遺伝子検査方法の種類の一つとして、3つの反応が必要な RT nested PCR があるが、この方法をもとにして1つの反応液で連続して3つの反応が可能な遺伝子検査方法を構築した。本方法が従来法よりも有用であるか、検出限界、所要時間を比較した。さらに、本方法が臨床の現場で使用可能か検証するために、臨床検体を用いた実証を行った。

(2) Sequential PCR

昇降式 PCR 装置を用いた特徴的なアプリケーションとして、1つの反応液から複数の遺伝子を検出できる遺伝子検査方法を構築した。本方法を用いて、実際に複数の遺伝子を検出することができるか、 β -actin 遺伝子とノロウイルス遺伝子を用いて検証した。

第6章： 本研究で得られた成果をまとめ、結論とした。

第2章

遺伝子検査の方法と原理

第2章 遺伝子検査の方法と原理

2.1 はじめに

遺伝子検査の作業手順は、①核酸の抽出、②核酸の増幅と検出、の2つのステップに分けられる。臨床検体から抽出される核酸は微量のため、多くの遺伝子検査では、核酸を増幅して検出する方法を用いている。本章では、遺伝子検査の方法と原理について述べる。

2.2 核酸の抽出

臨床検体から遺伝子検査をするためには、ヒト、細菌、ウイルスなどの細胞や殻などから核酸（DNA あるいは RNA）を抽出する必要がある、様々な方法が用いられている。核酸抽出の最初のステップは、細胞を溶解することである。その後、様々な夾雑物が混合した細胞溶解液中から、フェノール・クロロホルム、シリカメンブレン、磁性シリカビーズ等を用いて核酸を抽出・精製する²⁹⁻³²。フェノール・クロロホルムを用いた抽出は、フェノールの強力なタンパク質変性作用でタンパク質を変性して不溶性の沈殿とする作用を利用している。しかしながら、多くの手作業が必要となることから、臨床検体を用いた検査における核酸抽出では、あまり多く使用されていない。シリカメンブレン、磁性シリカビーズ等を用いた抽出は、シリカを核酸結合性の固相担体として用いることにより、生体材料から簡便に核酸を抽出できるため、最も利用されている抽出方法である。カオトロピック剤の効果で、核酸の骨格を構成するリン酸基とシリカの間に疎水結合が形成されることを利用しており、タンパク質などの様々な物質の中から核酸だけを選択的にシリカに吸着させることができる。シリカを用いた核酸抽出は、①細胞の溶解、②カオトロピック剤の存在下で、核酸のシリカへの吸着、③夾雑物およびカオトロピック剤の洗浄除去、④シリカから核酸の溶出、⑤核酸溶液の回収、の5つのステップから構成される。図 2-1 に、磁性シリカビーズと磁石を用いた核酸抽出方法を示した。磁性シリカビーズを用いた核酸抽出は、自動化システムへの応用が可能であることから、汎用的な方法として用いられている。

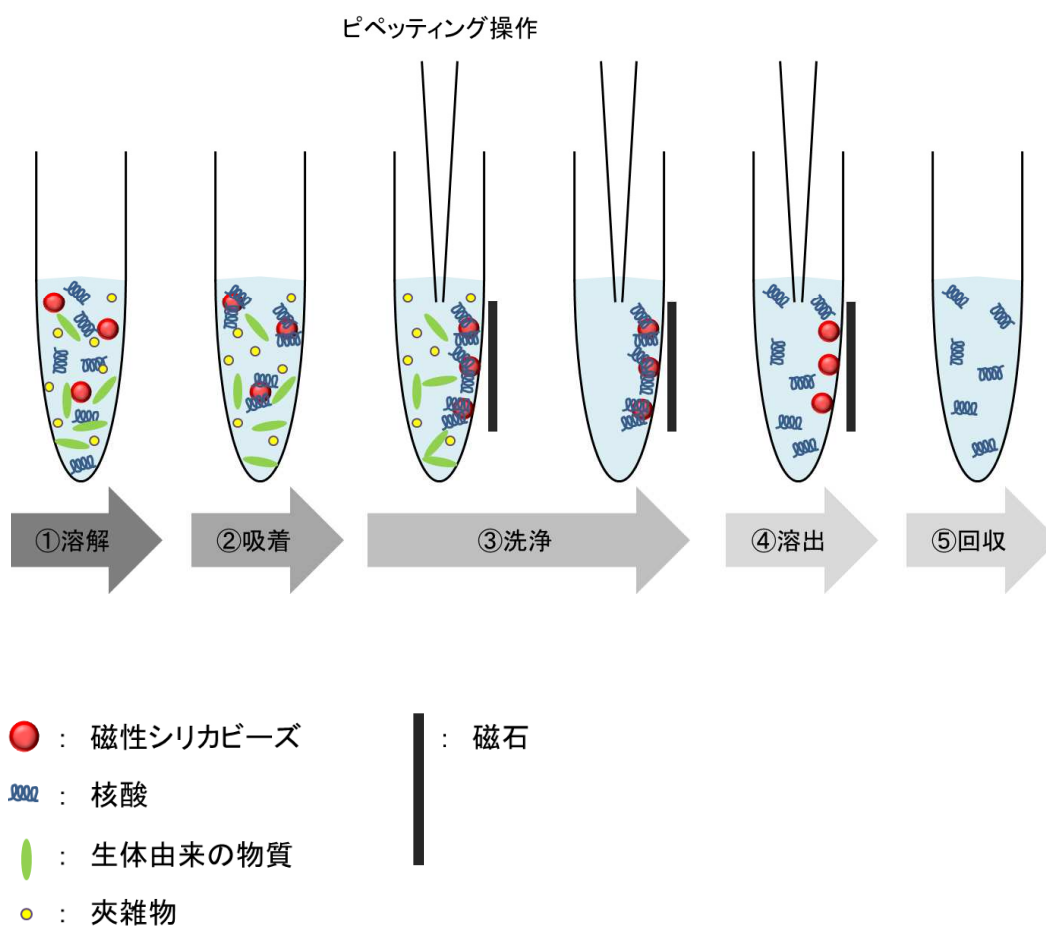


図 2-1 磁性シリカビーズを用いた核酸抽出

洗浄ステップは、PCR 等の核酸増幅に不必要なタンパク質や塩などの夾雑物を取り除くため、核酸抽出の中で特に重要なステップである。多くの研究が核酸抽出の自動化、小型化、迅速化を試みているが、遠心やピペッティング操作をせずに不必要な物質を完全に洗浄することは難しく、それゆえに PCR を阻害する物質が核酸抽出液に残留する可能性がある。検査対象である臨床検体は、粘質物（ムチンや血清など）、ヘモグロビン、リゾチーム、ラクトフェリンなど PCR を阻害する物質を含む^{33,34)}。核酸抽出試薬の成分であるカオトロピック剤も PCR を阻害することで知られている。

核酸抽出の各ステップで必要となる遠心、攪拌、ピペッティング操作を自動化した自動核酸抽出装置が製品化され、使用されている。磁性シリカビーズを用いた自動核酸抽出装置として MagNA Pure LC (Roche Diagnostics)、シリカ膜を用いた自動核酸抽出装置として QIAcube (Qiagen) が市販されているが、大型であり、時間がかかるといった課題がある。そのため、核酸抽出は大病院や検査会社といった検査数が多い場所で行われている。

2.3 核酸の増幅と検出

2.3.1 PCR

PCR は、標的とする遺伝子を指数関数的に増幅させ、増幅の有無でその遺伝子の有無を判別できる核酸の増幅方法である。反応プロセスは、熱変性により二重鎖の DNA を一本鎖に離し、一本鎖の DNA にプライマーを結合させ（アニーリング）、そのプライマーを起点として DNA ポリメラーゼが伸長反応を行う（図 2-2）。3 つのステップを順次繰り返すことにより、特定の DNA 配列を指数関数的に増幅させる技術である。通常、増幅反応の温度は、熱変性 95°C、アニーリング 50~70°C、伸長反応 72°C の 3 つの温度であり、このサイクルを 30~40 回繰り返す。1 回ごとの伸長反応で合成された増幅産物は、次のサイクルでは鋳型として利用されるため、毎回ほぼ 2 倍に増える。20 サイクルの PCR で遺伝子を約 100 万倍に増やすことができるため、検出したい遺伝子が微量であっても検査ができる。また、アニーリングと伸長反応を同時に行うシャトル PCR は、2 つの温度で PCR を実行するため、温度の移行時間を短縮することが可能であり、高速 PCR に適している。

PCR において、プライマーの設計は非常に重要である³⁵⁾。特異的であり、かつ効率良く増幅産物が得られるようにするため、プライマーの長さ、GC 含有率、 T_m (melting temperature) 値などが設計のポイントとなる。 T_m 値は融解温度のことであり、二本鎖の DNA の 50% が一本鎖 DNA に解離する温度である。プライマーが鋳型 DNA と二本鎖を形成するためには、アニーリング温度はプライマーの T_m 値以下でなければならない。アニーリング温度が低すぎると特異性は低下し、高すぎるとアニーリングが不十分になるため、プライマーの T_m 値を考慮した設計は PCR に重要である。また、PCR 条件が決まっている場合、その PCR 条件に適した T_m 値のプライマーを設計することが重要である。

PCR 法以外の核酸増幅法として、LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法、インベーター法、NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) 法などが開発されているが、これらはプライマー設計が複雑であり、反応過程が複雑で迅速化が難しいという課題がある。

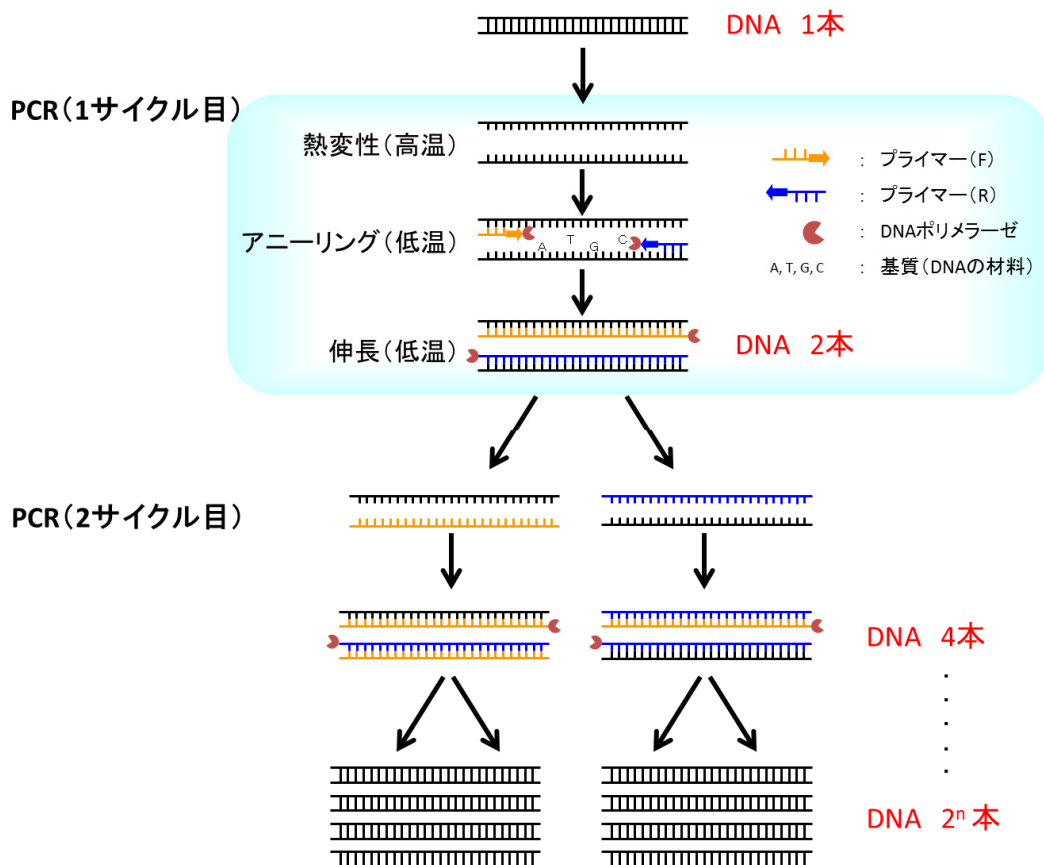


図 2-2 PCR

2.3.2 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、PCR で増幅中の DNA 量を、蛍光物質を用いてリアルタイムでモニターし、検出、解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。PCR の初期は増幅産物である二本鎖 DNA が少ないため、輝度値は装置の検出限界以下となるが、反応が進むにつれて二本鎖 DNA の量が増加し、輝度値が指数関数的に増加する。さらに反応が進むと、dNTP の枯渇や DNA ポリメラーゼ活性の阻害などにより反応速度は遅くなり、やがて一定となる³⁵⁾。反応液に投入した DNA 量が多いほど、増幅産物は早く検出可能な量に達するため早く立ち上がり、少ないほど遅く立ち上がる。従って、反応液に投入した DNA 量が多い順番に並んだ増幅曲線が得られる (図 2-3)。段階希釈した 10^1 から 10^8 コピーの DNA を用いてリアルタイム PCR を行った場合、DNA が多い順に増幅曲線は立ち上がり、さらに等間隔に並んだ曲線が得られる³⁶⁾。この等間隔に並んだ増幅曲線に対して、輝度値がある一定の値 (閾値) となるために必要な PCR サイクル数を Ct 値 (threshold cycle : 閾値と増幅曲線の交点のサイクル数) と呼ぶ。段階希釈した 10^1 から 10^8 コピーの DNA 量と決定した Ct 値をグラフにプロットすると、両者は直線で表される関係となる (図 2-4)。これを検量線として用い、未知のサンプルの Ct 値を調べることで、未知のサンプルに投入された最初の鋳型 DNA の量を求めることができる。閾値は指数関数的増幅域の任意の位置に設定できるが、最も増幅速度の変化率が大きい時点を閾値として解析を行うことが多い。通常、リアルタイム PCR のモニタリングは蛍光物質を用いて行っている。PCR 試薬に蛍光物質を入れた検出方法には、蛍光標識プローブ法とインターカラーター法の 2 種類の方法がある。

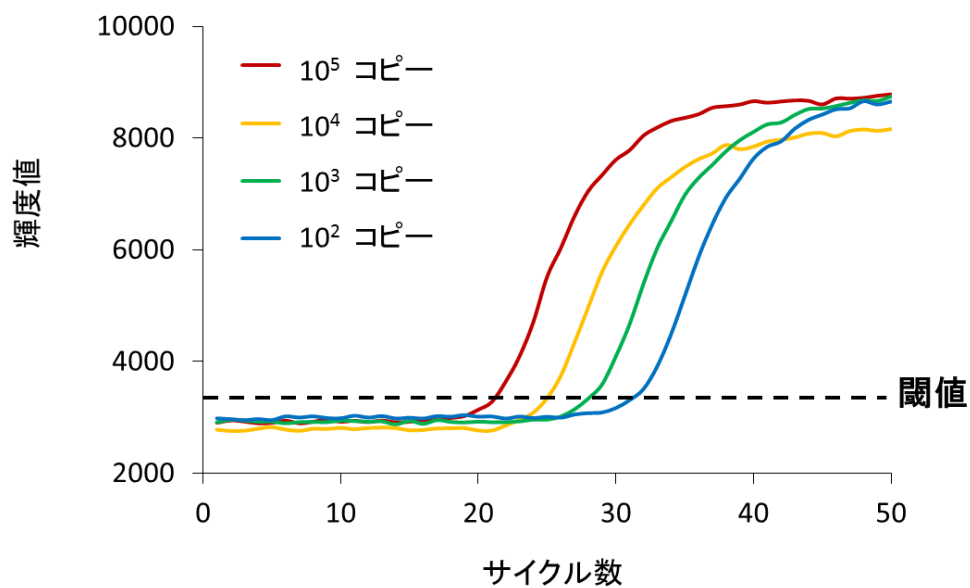


図 2-3 リアルタイム PCR における増幅曲線

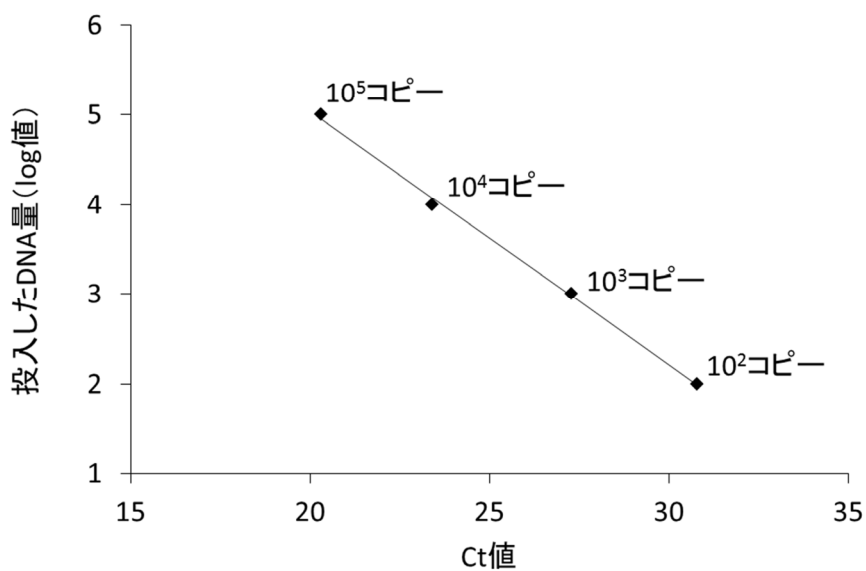


図 2-4 リアルタイム PCR における検量線

蛍光標識プローブ法は、標的とする遺伝子ごとに設計された配列を持つため、特異性が高い。蛍光標識プローブとして TaqMan プローブ、Q プローブ、E プローブ、Scorpion プローブなどが開発されているが、この中でも TaqMan プローブが最も輝度変化量が大きく、プローブ設計が比較的容易である。

蛍光標識プローブの中でも代表的な TaqMan プローブは、TaqMan プローブに結合した蛍光色素のエネルギー遷移を利用している。5' 末端を蛍光物質 (FAM など)、3' 末端をクエンチャー物質 (TAMRA など) で修飾したオリゴヌクレオチド (TaqMan プローブ) を PCR 反応試薬に加え、PCR を行う (図 2-5)。TaqMan プローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的に結合するが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光発生は抑制される。伸長反応ステップ時に、DNA ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型に結合した TaqMan プローブが分解されると、蛍光物質が TaqMan プローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光が発せられる。

インターカレーター法は、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬 (インターカレーター) を PCR 反応液に加える方法である。インターカレーターは、PCR によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発する (図 2-6)。この輝度値を測定することにより、増幅産物の生成量をモニターすることが可能となる。インターカレーター法は全ての二本鎖 DNA を検出するため、標的とする遺伝子ごとに蛍光プローブを用意する必要がないが、標的とした遺伝子以外に増幅された非特異増幅の産物やプライマーダイマーなども検出する。そのため、蛍光標識プローブ法と比較すると特異性は劣る。

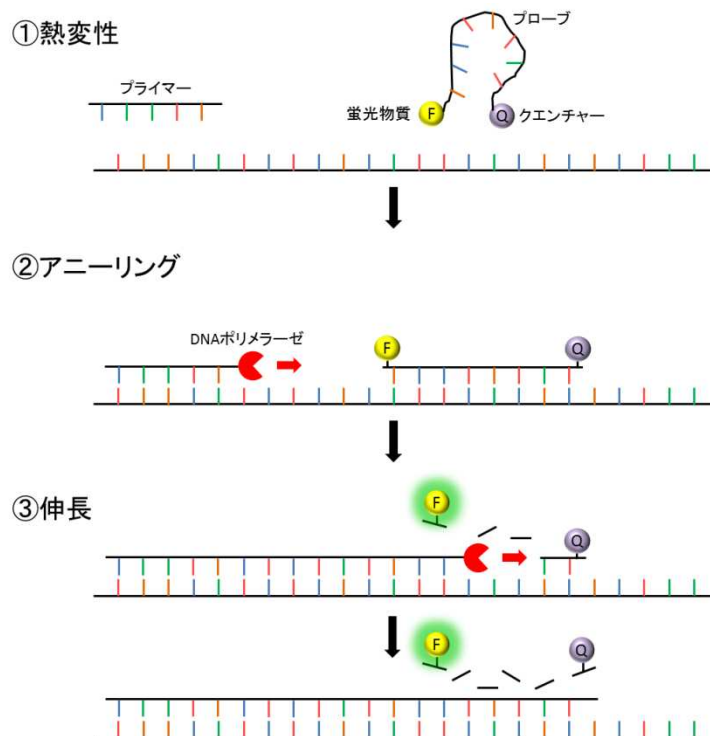


図 2-5 TaqMan プローブ法

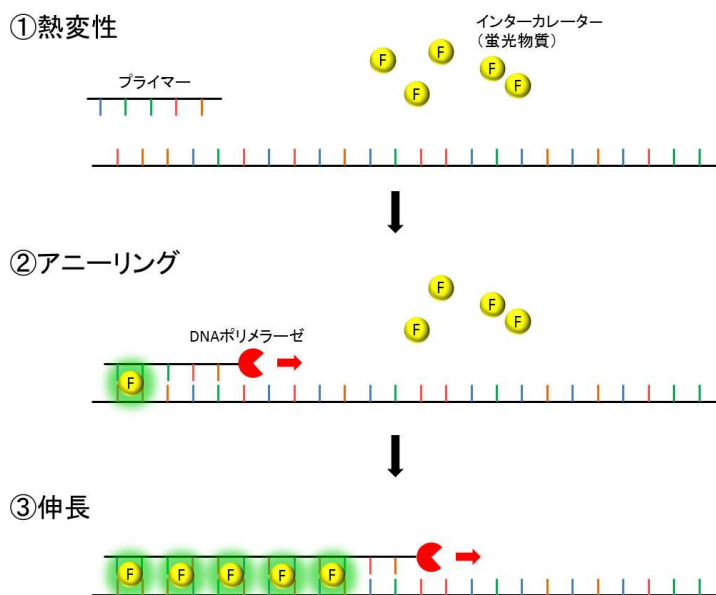


図 2-6 インターカレーター法

2.3.3 RT

標的とする核酸が RNA の場合、RNA は一本鎖であり、RNA を直接 PCR 法に適用することはできないため、RNA から cDNA へ変換する逆転写 (reverse transcription : RT) という反応が必要となる。RT 反応は、逆転写酵素を用い、RNA を鋳型として cDNA (相補的 DNA) を合成する。特異的プライマー (鋳型 RNA の一部分に相補的配列)、オリゴ (dT) プライマー、ランダムプライマーなどの DNA プライマーを RNA に結合させることにより、特異的 RNA、mRNA、total RNA などの逆転写が可能であり、RNA 配列を鋳型として逆転写酵素がプライマーの 3'末端から cDNA の合成を開始する (図 2-7)。mRNA の場合、ほぼ全ての mRNA の 3'末端部に付いている poly (A) にオリゴ (dT) プライマーが結合するため、ほぼ全ての mRNA から cDNA を合成することができる。特異的プライマーを用いる場合は、標的とする RNA の特定部位のみから cDNA を合成するため、特定の遺伝子の検出に有効であるが、cDNA から複数の遺伝子を検出する必要がある遺伝子発現解析等では適さない。ランダムプライマーは、全 RNA を鋳型とするため、RNA の全長に渡り、効率良く逆転写できる。

2.3.4 RT-PCR

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction : RT-PCR) は、RNA を対象とした PCR 法である。RNA から逆転写酵素により cDNA を合成する RT 反応後、cDNA を鋳型として PCR を行う。RNA をゲノムとするレトロウイルス (インフルエンザウイルスなど) やヒト mRNA の検出に用いられる。RT-PCR は、RT と PCR との 2 つの反応を合わせた方法である。今までは、2 つの反応をそれぞれ行っていたが、試薬の開発により、RT から PCR までを連続して行うワンステップの方法が開発され、様々な試薬が市販されるようになった。

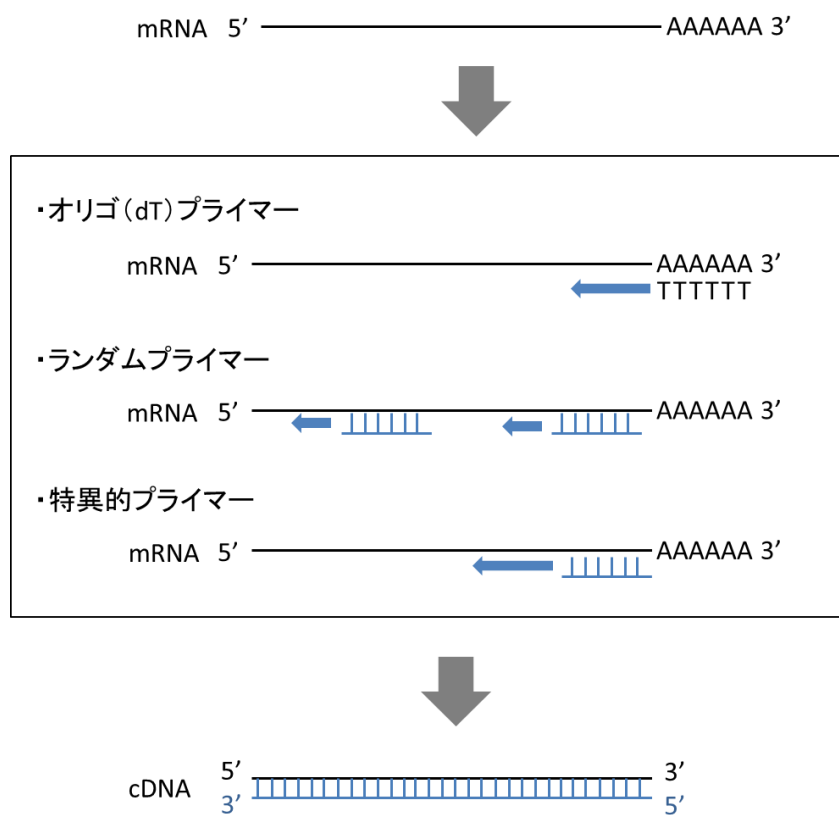


図 2-7 逆転写反応

2.3.5 PCR を基本とした技術

PCR を基本技術として、Multiplex PCR や Nested PCR など、様々な方法が開発されている。Multiplex PCR は、1 回の反応で複数の遺伝子の検出を行う方法である。1 つの臨床検体から、複数の項目を調べる検査に有効である。例えば、呼吸器感染症の複数の病原体を網羅的に検索する試薬キットや、肺癌の EGFR 遺伝子の 29 種類の変異タイプを網羅的に検索する試薬キットが市販されている。Multiplex PCR は、1 つの反応チューブに 2 セット以上のプライマー対を含んでいるため、プライマーのアニーリング温度、プライマーの相溶性、反応液組成の濃度調整など、反応系の構築が複雑になることが欠点であるが、最適化ができれば、非常に有効な検査方法である。

Nested PCR は 1 つの標的遺伝子に対して、外側と内側のプライマーセットを用い、2 段階の PCR を行うことで PCR の感度を向上させる方法である（図 2-8）。1 回目の PCR（First PCR）では外側のプライマーを用いる。2 回目の PCR（Second PCR）では 1 回目の PCR 産物を鋳型とし、内側のプライマーを用いる。白血病の *BCR-ABL* mRNA や *PML-RAR α* mRNA の検出では、ヒトのゲノム DNA が多量に含むサンプルを用いるため、感度を向上させる目的で、Nested PCR が行われている。2 回の PCR の間で、増幅産物が入ったチューブを開封して試薬を調整する必要があるため、他の検査へのコンタミネーションを引き起こすリスクがあり、細心の注意を払って実施されている。

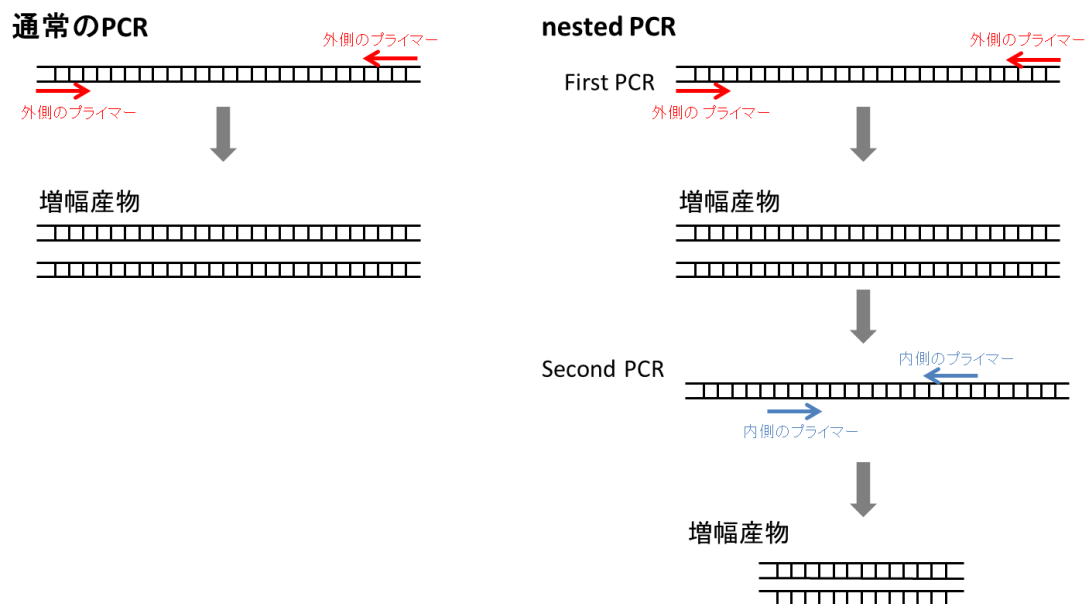


図 2-8 Nested PCR

2.4 検出方法

増幅と同時に検出を行うリアルタイム PCR (TaqMan プローブやインターカレーターを用いる方法) の他に、PCR 後の増幅産物を用いて検出する方法がある。どの方法も PCR を必要とする方法であるため、遺伝子検査の大半は、遺伝子を増幅させる PCR 法が関わっている。TaqMan プローブやインターカレーターを用いた検出方法は、「2.3.2 リアルタイム PCR」で述べているため、その他の検出方法について述べる。

電気泳動法

最も古典的で簡便な方法である電気泳動は、増幅産物の有無と、その DNA の長さを調べることができる。外部から電場をかけると、DNA がアガロースゲルの中を一極から+極に向かって移動することを利用している。長い DNA はアガロースゲルの網目構造の中をゆっくりと移動して短い距離を移動することに対し、短い DNA は速く移動して長い距離を移動する。従って、DNA のサイズに応じた移動距離を示す。電気泳動後のアガロースゲルを蛍光色素 (エチジウムブロマイド) などで染色することで、DNA の長さによる電気泳動パターンを得られ、そのパターンから分子量マーカーを用いて DNA のサイズを求めることが可能である。

融解曲線解析

二本鎖の DNA が一本鎖に解離する温度は、その DNA の配列、長さ、GC 含有率などに依存する。すなわち、融解温度の違いで、ジェノタイピング (遺伝子型判定) や PCR 産物の確認ができる。融解曲線解析は、インターカレーターの蛍光シグナルをモニタリングしながら、温度を徐々に上げていく。最初は PCR 増幅産物が二本鎖の為、蛍光シグナルがあるが、ある一定温度に達すると一本鎖に解離するため、蛍光シグナルは急激に低下する。この時の温度が、融解温度である。通常、PCR 産物は 1 種類のため、融解曲線のピークは 1 つであるが、目的の遺伝子以外の増幅 (非特異的増幅) が起きていた場合、融解曲線のピークは複数現れるため、その PCR の反応系の条件が適切かどうか、特異性を確認することができる。ジェノタイピングでは、正常型の融解曲線のピークと比較して、変異型のピークを解析する。変異型は配列が異なるため、融解温度も異なり、ピークがずれて検出されることを利用する。さらに、変異型がホモ接合体の場合のピークは 1 本であるが、ヘテロ接合体の場合は 2 種類の配列が存在するため、融解曲線のピークも 2 本となり、ホモ接合体かヘテロ接合体かの解析も可能である。

ハイブリダイゼーション法

PCR 後に、蛍光プローブを結合させ、標的とする遺伝子のみを発光させる方法である。Luminex システム (Luminex Inc., Austin, TX, USA) は独自の Multiplexing 技術を用い、多項目同時測定を可能にしている。3 種類の蛍光色素の独自配合により染色した蛍光マイクロビーズを用い、最大 500 種類のビーズを識別可能としている。フローサイトメーターと同様な原理で、液体中を流れるビーズに赤色と緑色のレーザーを照射し、識別する。2 色のレーザーを照射することにより、各ビーズの識別と蛍光標識の蛍光値がわかるため、多種のビーズが混在した状態でも検出することができ、多項目の同時測定が可能になる。HLA 遺伝子の検査などに使用されている。

シーケンス法

PCR 後に、目的の大きさの遺伝子のみを電気泳動後のゲルから抽出し、目的遺伝子の塩基配列を、シーケンサーを用いて読む方法である。遺伝子の塩基配列を解析できるため、遺伝性疾患などの遺伝学的検査に用いられている。また、SNP の検出や、欠失の検出、ホモ接合体やヘテロ接合体の検出などに有効である。

2.5 本研究において用いる方法

本研究では、様々な遺伝子検査の方法がある中で、迅速化の可能性、自動化の可能性を検討し、採用する方法を決定した。核酸抽出法は、自動化システムへの応用が最も容易と考えられる磁性シリカビーズを用いた核酸抽出法を選択した。核酸増幅法は、プライマー設計が容易で、かつ反応過程がシンプルで迅速性のある PCR 法を選択した。検出法は、迅速性と特異性に優れた TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を選択した。TaqMan プローブは蛍光標識プローブの中でも輝度変化量が大きく、プローブ設計が比較的容易であるためである。

第3章

自動核酸抽出装置の開発

第3章 自動核酸抽出装置の開発

3.1 はじめに

核酸抽出は、遺伝子検査を行う上で必須のプロセスである。細胞の中に核酸が存在するため、細胞を溶解あるいは可溶化し、他の生体高分子から核酸を分離、精製する必要がある。従来式の核酸抽出では、複数の手作業を必要とし、専門技術を持った技術者が行っている。また、検査会社や中央検査室などでは、自動核酸抽出装置が導入されているが、大型でおよそ1時間かかっている。それゆえに、核酸抽出は診察室などの臨床の現場では行えず、大病院の検査室や検査会社で行われ、核酸抽出が必要な遺伝子検査も大病院の検査室や検査会社で行われている。

本章では、核酸抽出作業の自動化と迅速化を実現する自動核酸抽出装置の開発を行った。核酸抽出時間は、診察室などで使用することを考慮し、数分、具体的には3分間を目標とした。様々な核酸抽出法の中でも、最も自動化しやすいと考えられた磁性シリカビーズを用いた方法を選択した。しかし、磁性シリカビーズを用いた核酸抽出のプロセスは、ピペッティング操作による複数の溶液の置換が必要であり（図 2-1）、手作業の場合は煩雑な作業、自動装置の場合は装置の大型化や時間がかかる、といった課題があった。そこで、本研究では、複数の核酸抽出試薬をシリコンオイルで分離したカートリッジを開発し、ピペッティング操作を必要としない迅速な自動核酸抽出装置を構築した。本装置が核酸抽出装置として十分な性能を持っているかを実証するために、従来式の自動核酸抽出装置と性能を比較し、PCR を用いて評価した。

3.2 装置の構造

自動核酸抽出装置は、移動機構、磁力印加部、永久磁石（永久磁石 1, 2）から構成される（図 3-1）。カートリッジに入っている磁性シリカビーズは永久磁石に追従するため、全ての核酸抽出ステップを自動で行うことができる。永久磁石の動きは、移動機構による移動速度と磁力印加部による振動周波数により制御されている。すなわち、移動速度は磁性シリカビーズの縦方向の動き、振動周波数は磁性シリカビーズの横方向の動きを制御する。短時間の核酸抽出を実現するために、様々な動きを試した結果、縦方向と横方向の動きを同時に行うことが最も効果的であった。従って、開発した自動核酸抽出装置における磁性シリカビーズの動きは、縦方向と横方向の動きを同時に行う。本研究では、縦方向と横方向に同時に動くジグザグな動きを、「揺動」と呼ぶこととする。磁性シリカビーズの「揺動」による核酸抽出が、本装置の特徴である（図 3-2）。永久磁石はキャピラリーの外側を沿っ

て移動するため、磁性シリカビーズはキャピラリーの内側側面を沿って移動する。磁性シリカビーズの揺動は、キャピラリーが永久磁石1と2から受ける磁力の大小関係の交互反転により行われる。すなわち、永久磁石1をキャピラリー側面に近づけるとともに、永久磁石2をキャピラリー側面から離れさせる動作を交互に繰り返しながら、キャピラリーに付加する永久磁石1と2からの磁力の相対的な大きさを反転させている。その動きにより、磁性シリカビーズは、凝集状態と分散状態とを繰り返し変化している（図3-2）。

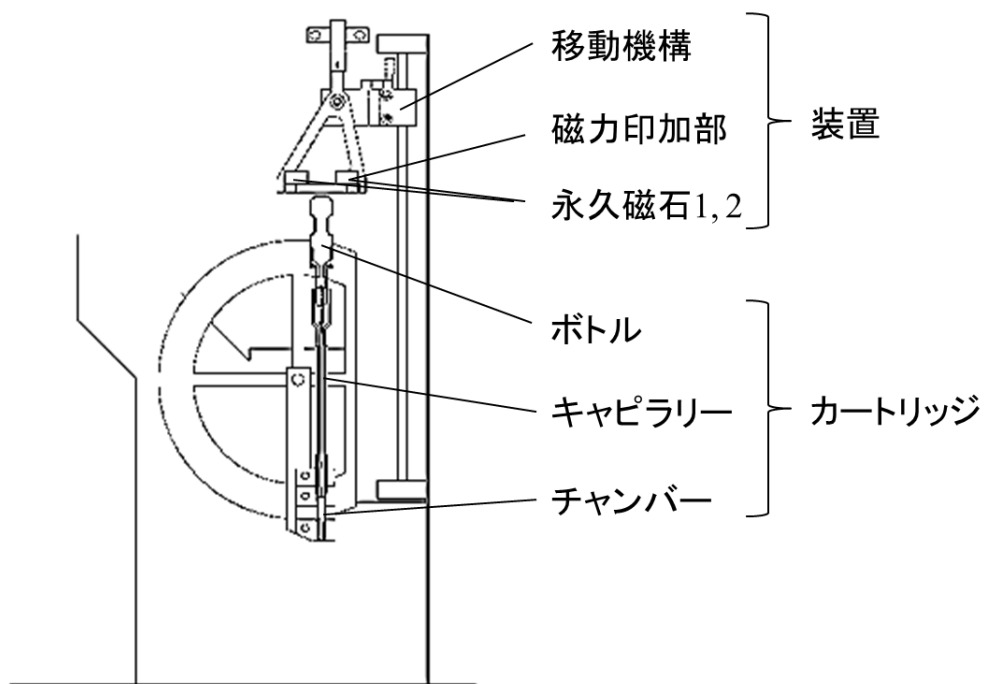


図3-1 自動核酸抽出装置の模式図

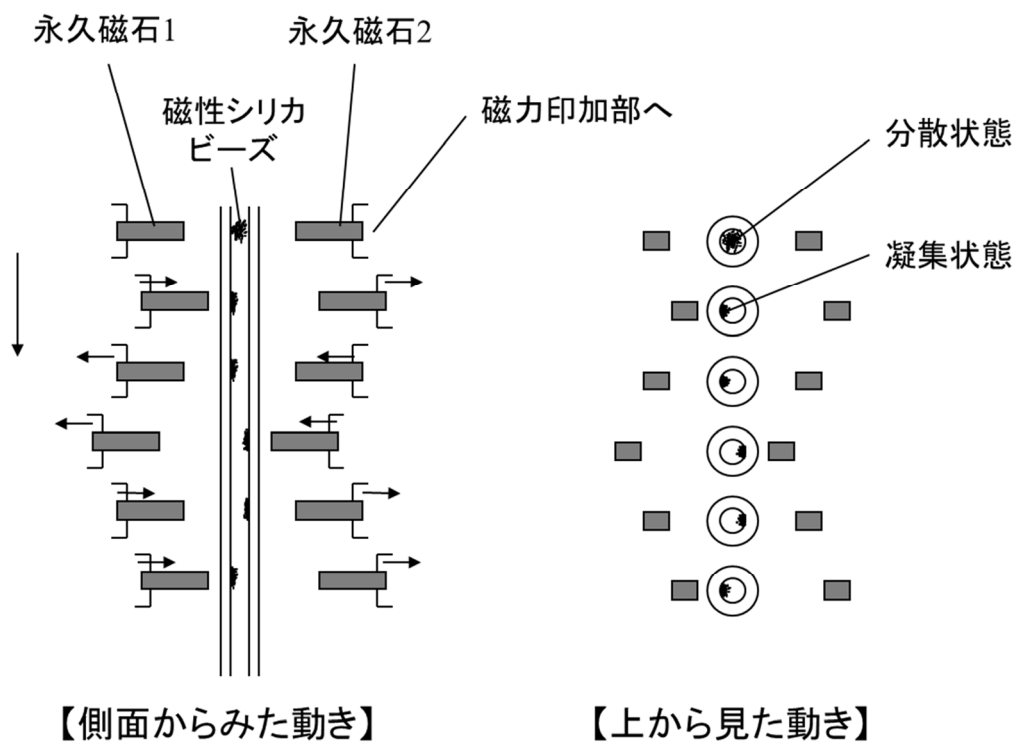


図 3-2 磁性シリカビーズの揺動

3.3 カートリッジの構造

カートリッジは、ボトル、キャピラリー、チャンバーの3つの容器から構成され、材質は、全てポロプロピレンである(図3-3)。キャピラリー本体の内径は1 mm、長さは90 mmである。キャピラリーに充填する核酸抽出試薬はNucleic Acid Purification Kit MagExtractor™ - Genome - (Toyobo Co., Ltd., Japan)を用い、液量の最適化実験を行い、充填量を決定した。磁性シリカビーズの最大濃度は、5 M 液中に50%である。ボトルには、磁性シリカビーズ4 μL、溶解吸着液700 μLがあらかじめ入っており、キャピラリーには、洗浄液280 μL、70%エタノール22 μL、滅菌水4 μLがシリコンオイルで分離されたプラグとして充填されている(図3-3)。チャンバーには、シリコンオイルが充填されている。サンプル100 μLをボトルに投入し、その後、ボトルをキャピラリーに接続する。開発した自動核酸抽出装置を用いた核酸抽出の各手順の動きと目的は、表3-1の通りである。さらに具体的なプロセスを以下に述べる。磁性シリカビーズを用いた核酸抽出の基本原理は、「第2章 2.2 核酸の抽出」に記載している。

【開発した自動核酸抽出装置を用いた具体的なプロセス】

- ①ボトルに100 μLのサンプルを入れる。
- ②ボトルを手で30秒間振ることにより、細胞を溶解し、核酸を磁性シリカビーズに吸着させる。
- ③ボトルをキャピラリーに接続し、装置にセットする。
～ここから自動装置～
- ④核酸が吸着した磁性シリカビーズは、永久磁石の揺動の動きに追従し、キャピラリー内の各試薬を順番に揺動しながら、磁性シリカビーズのみが移動していく。
- ⑤核酸が吸着した磁性シリカビーズが滅菌水に到着すると、核酸は磁性シリカビーズから溶出される。
- ⑥永久磁石がカートリッジの上部に移動し、滅菌水から磁性シリカビーズのみを移動させる。
- ⑦滅菌水中には、核酸のみが存在する。
～ここまで自動装置～
- ⑧カートリッジを装置から取り出す。
- ⑨ボトルを手で押す。
- ⑩キャピラリーから4 μLの核酸溶液をチャンバーに出す。

手で30秒間ボトルを振ることによって溶解吸着ステップを行うことは、予備実験から決定している。核酸抽出試薬の取扱説明書での溶解吸着ステップは、自動チューブミキサーで10分間、激しく混合することである。15秒間、30秒間、1分間、10分間の手で振る水準を設け、抽出核酸を用いたPCRのCt値で評価した。30秒間ボトルを手で振ることが、自動チューブミキサーで10分間混合することと同等のCt値の結果であったため、溶解吸着ステップは、手で30秒間振ることと決定した。

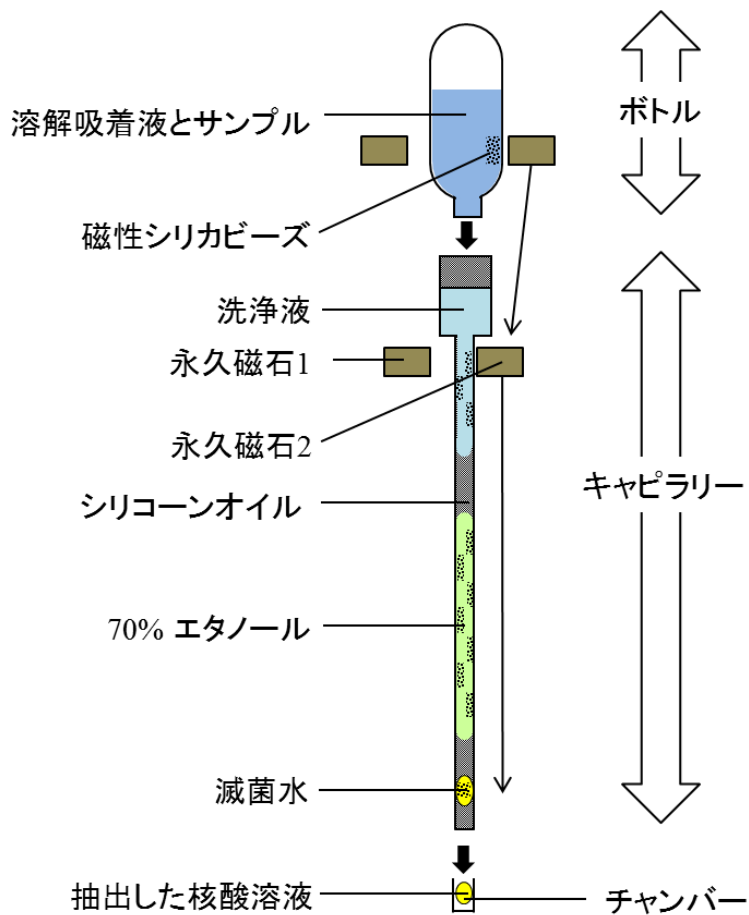


図 3-3 カートリッジの模式図

表 3-1 核酸抽出のワークフロー

ステップ	動き	目的
1. 溶解吸着	ボトルを手で 30 秒間振る	細胞溶解と磁性シリカビーズ表面への核酸吸着
2. 洗浄 1	磁性シリカビーズの揺動 (縦方向の移動と横方向の振動)	磁性シリカビーズの洗浄 (夾雑物の除去とタンパク質変性)
3. 洗浄 2	磁性シリカビーズの揺動 (縦方向への移動と横方向の振動)	磁性シリカビーズの洗浄 (夾雑物の洗浄)
4. 溶出	磁性シリカビーズの横方向の振動	磁性シリカビーズ表面からの核酸溶出
5. 磁性シリカビーズの除去	永久磁石を移動することで磁性シリカビーズのみをキャピラリー上部へ移動させる	磁性シリカビーズを溶液から除去
6. 回収	ボトルを手で押す	キャピラリーから核酸溶液の回収

3.4 実験方法

3.4.1 サンプル

Mycoplasma pneumoniae 株 (ATCC 15531) を American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、mycoplasma agar (Oxoid, Hampshire, UK) と mycoplasma selective supplement - P (Oxoid) を組み合わせて 35°C で 7 日間培養した。その培養液を、コロニーカウントのために、mycoplasma agar (Oxoid) と mycoplasma selective supplement - G (Oxoid) を組み合わせた寒天培地で培養した。寒天培地のコロニーカウントから、培養液の濃度は 1.2×10^7 cfu (colony forming unit)/mL と、決定した。*M. pneumoniae* のゲノム DNA は、培養した *M. pneumoniae* 溶液から、Nucleic Acid Extraction Kit MagExtractor™ - Genome- (Toyobo) を用い、取扱説明書に従って抽出した。

3.4.2 比較対象とする従来式の核酸抽出方法

手作業による従来式の核酸抽出方法は、開発したカートリッジに充填した核酸抽出試薬と同じ試薬である Nucleic Acid Extraction Kit MagExtractor™ - Genome- (Toyobo) を用いた。装置としての比較は、完全に自動化された核酸抽出装置である QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。これらの方法は、全て取扱説明書通りに核酸抽出を行った。

3.4.3 移動速度と振動周波数の最適化

磁性シリカビーズの揺動を最適化するために、1 mm/sec から 5 mm/sec の移動速度と 1 Hz から 5 Hz の振動周波数を評価した。サンプルとして、 10^6 コピーの *M. pneumoniae* 遺伝子と、夾雑物であるリゾチーム 100 µg が入った溶液を用いた。移動速度と振動周波数の最適値は、各評価サンプルについてリアルタイム PCR を行い、その Ct 値により決定した。

統計的分析は、PASW Statistics 21 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いた。データは平均値 ± 標準偏差 (mean ± SD) で示した。Kruskal-Wallis 検定は複数のデータ比較に使用され、対応のない *t* 検定は 2 つのグループ間の比較に使用された。*p* 値が 0.05 以下の場合、統計学的に有意であるとした。

3.4.4 阻害物質

本研究では夾雑物として、リゾチーム (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)、ムチン (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)、ラクトフェリン (Wako)、ヘモグロビン (Sigma-Aldrich Japan) を使用した。夾雑物は、ヒトから採取されるスワブ検体に含まれる

と想定され、PCR を阻害する物質を選定した。使用濃度は、スワブ検体に含まれると想定される最大濃度の 2 倍量を用いた^{37, 38)}。各夾雑物ごとに用意した 10^6 コピーの *M. pneumoniae* 遺伝子が入った溶液に、リゾチーム 100 μg 、ムチン 3 mg、ラクトフェリン 20 μg 、ヘモグロビン 750 μg を入れ、その溶液をサンプルとした。また、洗浄効果のレファレンスとして夾雑物を投入していない 10^6 コピーの *M. pneumoniae* 遺伝子が入ったサンプルと、抽出ステップのレファレンスとして核酸抽出ステップなしの各夾雑物が入ったサンプルも評価した。各夾雑物の影響の評価は、リアルタイム PCR の Ct 値を用いて行った。各夾雑物のサンプルにつき、3 回の繰り返し測定を行った。

3.4.5 検出限界

開発した自動核酸抽出装置の検出限界は、培養した *M. pneumoniae* 溶液を 10^1 cfu から 10^6 cfu の濃度範囲で、100 μL の 10 倍希釈系列を作製し、評価することで決定した。*M. pneumoniae* が入っていない溶液をネガティブコントロールとして用いた。各濃度のサンプルにつき、3 回の繰り返し測定を行った。検出限界は、リアルタイム PCR の Ct 値により評価した。

3.4.6 リアルタイム PCR

開発した自動核酸抽出装置と従来法の核酸抽出との性能を比較するために、抽出した核酸を LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland)、または StepOnePlus™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用いて、リアルタイム PCR を行った。特異的なプライマーとプローブは、*M. pneumoniae* の P1 遺伝子を検出する配列 (表 3-2)³⁹⁾とし、Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Japan)から購入した。PCR 反応液に用いる PCR 酵素は、Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies)を用いた。試薬は表 3-3 通りの組成で 10 μL を調整し、表 3-4 の通りの反応条件で PCR を行った。5 倍濃度の緩衝液は、Tris-HCl (pH 9.0)、塩化カリウム、塩化マグネシウムから構成される溶液を用いた。

表 3-2 プライマー、プローブの配列³⁹⁾

プライマー/ プローブ	配列 5'-3'
Forward プライマー	CCAACCAAACAACAACGTTCA
Reverse プライマー	ACCTTGACTGGAGGCCGTTA
TaqMan プローブ	FAM-AATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTG-BHQ

表 3-3 試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μL
5 倍濃度の緩衝液	2 μL
2.5 mM dNTP	1 μL
20 μM Forward プライマー	0.2 μL
20 μM Reverse プライマー	0.2 μL
10 μM TaqMan プローブ	0.2 μL
滅菌水	4.2 μL
抽出した DNA	2 μL
total	10 μL

表 3-4 反応条件

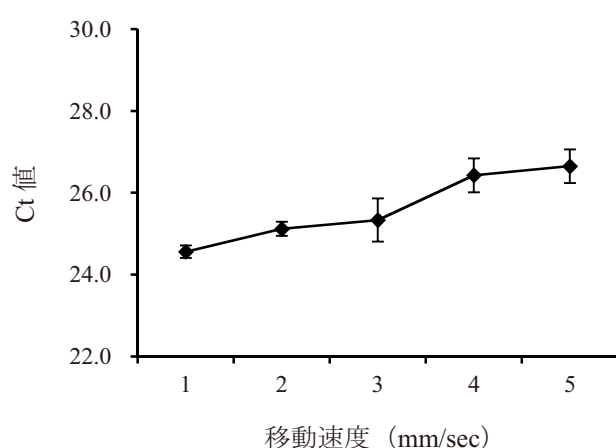
	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	95°C	1 分	1 サイクル
熱変性	95°C	5 秒	50 サイクル
アニーリング/伸長	58°C	20 秒	

3.5 結果と考察

3.5.1 永久磁石の移動速度と振動周波数

永久磁石の移動速度の最適値を決定するために、抽出した核酸を、PCRのCt値により評価した。我々の開発目標は3分以内の核酸抽出であるため、最初に、開発した自動核酸抽出装置において、3分以内で核酸抽出の全てのステップが完了する移動速度を実測した。結果、1 mm/sec以上であれば、3分以内で核酸抽出の全工程を移動することが可能であった（30秒間手で振る溶解吸着時間を含む）。それゆえに、1 mm/sec以上の設定値で核酸抽出の評価を行った。比較対象として、従来法である手作業と自動核酸抽出装置を用いた。投入する検体量はすべて同量とした。結果、1 mm/secが5 mm/secよりもPCRの効率が有意であり、移動速度が遅いほどCt値が良い傾向にあることから、移動速度が遅いほど、より多くの核酸が抽出できていると考えられた（図3-4）。また、目視による観察から、4 mm/sec以上において、永久磁石に追従できなかった磁性シリカビーズがキャピラリー内に残る現象を確認した。それゆえに、1 mm/secを最適な移動速度と決定した。移動速度が速いほど、核酸抽出の時間は短くできるが、磁性シリカビーズの追従性が悪くなった。これは、Ct値が大きくなることから、抽出された核酸の量が少ないと示唆され、磁性シリカビーズのロスにより回収できる核酸量が減少したと考えられる。

A) 永久磁石の移動速度



B) 従来法

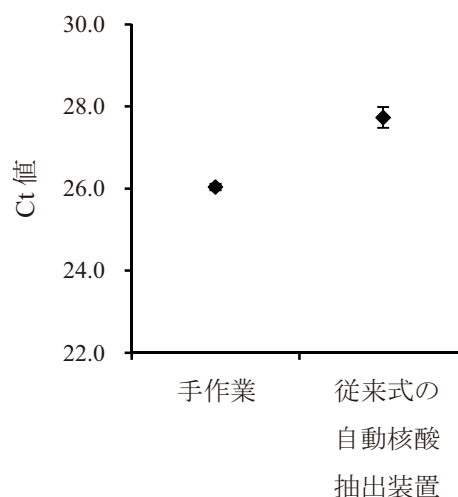


図3-4 永久磁石の移動速度

次に、永久磁石の振動周波数の最適値を決定するために、抽出した核酸を、PCR の Ct 値により評価した。結果、従来法と比較して十分な抽出効率とリゾチームの洗浄効果を確認した（図 3-5）。4 Hz と 5 Hz の間に有意差はなかったことから ($p = 0.231$)、4 Hz 以上で核酸抽出の効率は飽和したと考えられたため、本実験での振動周波数の水準は、5 Hz までとした。振動周波数は、永久磁石の一秒間の往復回数である。振動周波数が高いほど PCR の Ct 値が小さくなったことから、ビーズがより多く動いたほうが、多くの核酸を抽出できると考えられる。本実験結果から、振動周波数が抽出効率に影響していることが示唆され、最適な振動周波数を 5 Hz と決定した。

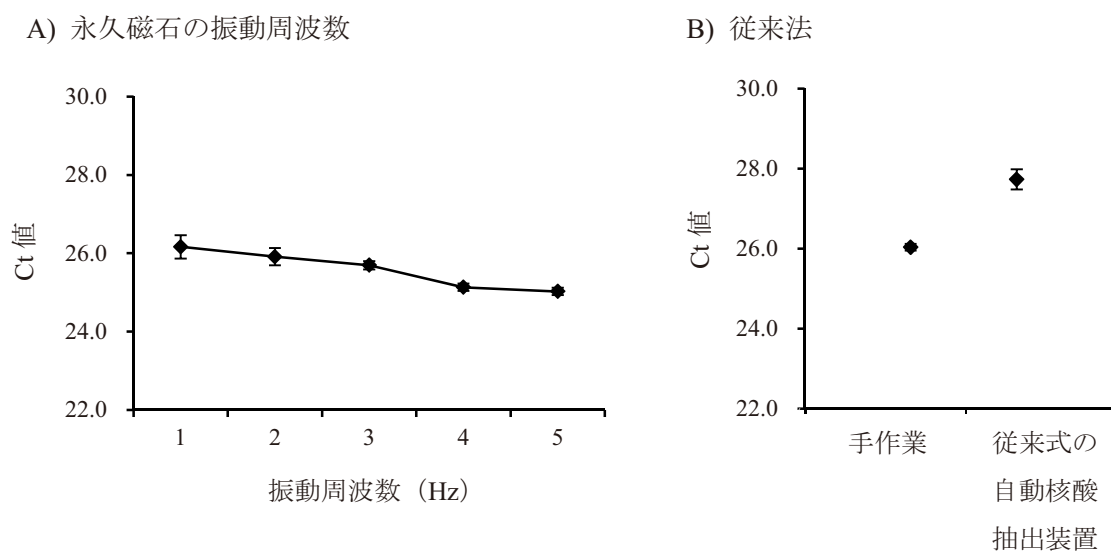


図 3-5 永久磁石の振動周波数

磁性シリカビーズの揺動は、キャピラリー内での縦方向の移動と横方向の移動を同時に行っている。縦方向の移動は、電氣的に制御された移動機構により移動速度として制御されている。横方向の移動は、電氣的に制御された磁力印加部により振動周波数として制御されている。本研究では移動速度を 1 mm/sec、振動周波数を 5 Hz が最も良い最適値として決定した。この「揺動」という本装置の特徴的な動きは、永久磁石とキャピラリーとの距離を変えることで、キャピラリー近傍の磁力の強弱が変わり、キャピラリー内部の磁性シリカビーズの凝集状態と分散状態とを繰り返し変化させている。その結果、磁性シリカビーズが液体中で多くの領域を浮遊し、核酸抽出を実現していると考えられる。移動速度、振動周波数を最適値に設定することで、従来法である手作業の核酸抽出や従来式の自動核酸抽出装置よりも、抽出した核酸による PCR の結果は良好であったことから、本装置は核酸抽出を効果的に実行できると言えるだろう。以上より、この特徴的な揺動は、サンプルから遠心やピペッティング操作を必要としない核酸抽出のために、非常に効果的な動きであると考えられる。

3.5.2 洗浄効果

核酸抽出の重要なステップである洗浄ステップが、開発した自動核酸抽出装置において十分な性能を持っているか、手作業と従来式の自動核酸抽出装置による核酸抽出と比較、評価した。洗浄効果を評価するために、ヒト由来の検体に含まれると考えられ、かつ PCR を阻害する夾雑物を選定し、本実験に用いた。核酸抽出ステップなしの各夾雑物が入った各サンプルで、PCR による増幅がないことを確認している。よって、今回使用した各夾雑物は、核酸抽出ステップの一つである洗浄ステップが不十分で、抽出した核酸溶液に夾雑物が残存していると、PCR による増幅を阻害すると考えられる。

開発した装置による核酸抽出は、従来の核酸抽出の方法と比較して、夾雑物の有無に関わらず、抽出した核酸を用いた PCR の結果が良かった (図 3-6)。また、夾雑物が入ったサンプルから抽出した核酸と、夾雑物が入っていないサンプルから抽出した核酸は、同じ PCR 効率であったことから、開発した自動核酸抽出装置における洗浄ステップは、夾雑物がない状態と同じ程度まで洗浄できる性能であることが分かった。

開発した自動核酸抽出装置による洗浄は、磁性シリカビーズがシリコンオイルによってプラグ状に分離された各抽出試薬を揺動しながら移動していくことで、サンプルに含まれる夾雑物や添加剤などを磁性シリカビーズのまわりから除去している。抽出した核酸を用いた PCR の結果、ピペッティング操作による手作業の核酸抽出と同等以上の PCR 効率であったことから、磁性シリカビーズの揺動による洗浄は、十分な効果があったと考えられる。また、磁性シリカビーズは疎水性層と親水性層を容易に移動できる点も、3分という短時間で核酸の精製が実現したと考えられる。

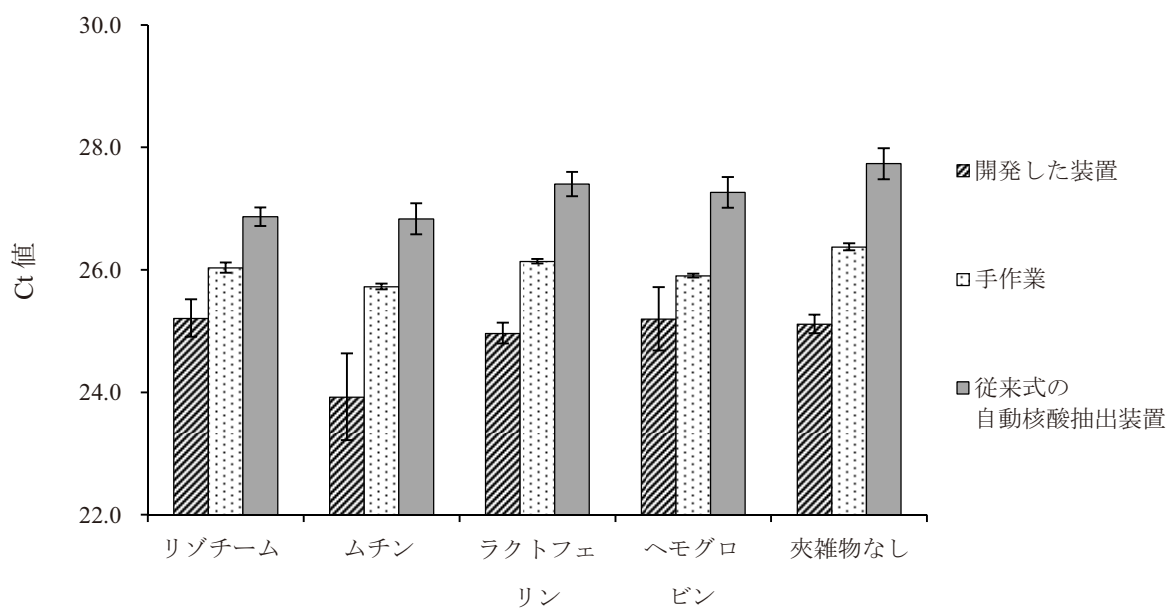


図 3-6 夾雑物の洗浄効果

3.5.3 検出限界

開発した自動核酸抽出装置の検出限界は 10 cfu であり、手作業による核酸抽出法と同じであった (図 3-7)。また、ネガティブコントロールとして使用した *M. pneumoniae* が入っていないサンプル (0 cfu) では、増幅は確認されなかった。本実験から、開発した自動核酸抽出装置は、従来の手作業による核酸抽出と比較して、同じ検出限界であり、核酸抽出方法として十分に受け入れられる性能を持っていることが示された。

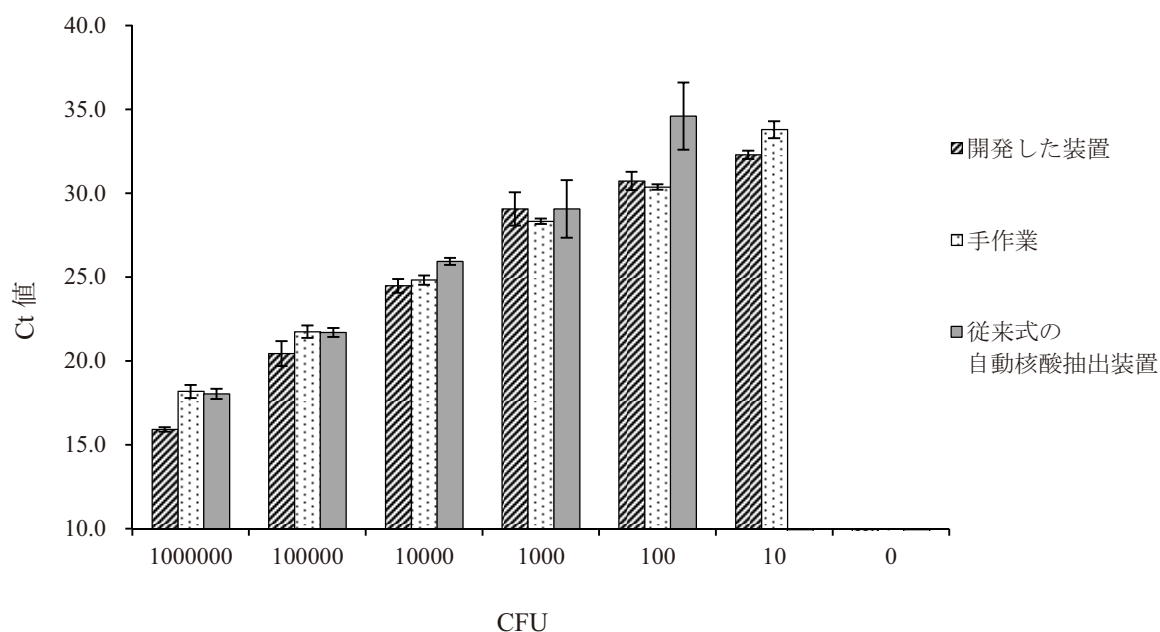


図 3-7 検出限界

3.6 まとめ

本章では、磁性シリカビーズの「揺動」を利用して、3分間でサンプルから核酸抽出が可能な自動核酸抽出装置を開発した。キャピラリー内での磁性シリカビーズの1 mm/secの移動と5 Hzの振動を同時に行う「揺動」は、装置の構成（移動機構、磁力印加部）によって制御されている。本装置の特徴は、磁性シリカビーズの揺動を利用して、手作業の核酸抽出法や従来式の自動核酸抽出装置と同等の洗浄効果、同等以上の検出限界を持ちながら、核酸抽出時間を従来の手作業30分間、自動核酸抽出装置35分間から、3分間へと劇的に短縮した点である。

磁性シリカビーズの揺動は、遠心操作を必要とせずにサンプルから効率良く核酸を抽出できた。本装置で採用した磁性シリカビーズの揺動は、永久磁石とキャピラリーとの距離を変えることで、キャピラリー近傍の磁力の強度を変え、キャピラリー内部の磁性シリカビーズを凝集状態と分散状態へと繰り返し変化させる（図3-2）。その結果、磁性シリカビーズは液体中で多くの領域を浮遊することができ、洗浄溶液と接触するシリカビーズの界面が増加する。そのために、核酸以外のタンパク質等の夾雑物の洗浄効果を高め、溶出ステップでは夾雑物がほぼ存在していない、またはPCRを阻害しない濃度にまで洗浄できていると考えられる。核酸抽出、あるいは核酸精製において、細胞溶解液由来のタンパク質や検体由来の夾雑物は、PCRを阻害し、その結果に大きな影響を与えるため、核酸抽出プロセスにおいて洗浄することが非常に重要である。本装置における洗浄時間は、従来式の装置と比較して非常に短時間であるが、雑多な細胞溶解液からDNAを精製することが可能であった。

多くの研究が、マイクロ流体デバイスやキャピラリーシステムを用いた迅速な核酸抽出を報告しているが^{7-10, 40-45}、本研究で用いている磁性シリカビーズの「揺動」という特徴的な動きを利用した報告はなく、本研究で開発した自動核酸抽出装置の特徴と言えるだろう。マイクロ流体デバイスで連続流を作成し、すでに溶解された細胞液を用いた核酸抽出の報告では、1サンプルあたり2分で核酸抽出を実現している⁷。しかしこの方法は、流れる試薬間をビーズが磁力によって移動するため、ビーズのロスが懸念される。また、細胞の溶解を含めた10分以内での核酸抽出も報告されているが、遠心が必要なものや、マイクロデバイスを使用するためにサンプル投入量が1 μL と微量であるものであった⁸⁻¹⁰。

本研究では、様々な臨床検体から核酸抽出を可能とするために、マイクロデバイスのような形状にするのではなく、サンプル投入量が100 μL となるよう、各核酸抽出試薬の量を最適化し、それら試薬が充填できるカートリッジの形状を選択した。サンプル量を100 μL とした理由は、感染症の検査では特に、スワブを懸濁した溶液がサンプルとして使用され、

その量は 100 μL から 200 μL であるためである。また、核酸抽出の完了後は、使用済みの核酸抽出試薬が入ったカートリッジごと捨てることができるため、サンプルのコンタミネーションのリスクを低減することができる。本実験は *M. pneumoniae* を用いて性能評価を行ったが、今後は、細胞壁が厚いグラム陽性菌などの細菌、ウイルス、ヒトの細胞など、様々な形態から核酸を抽出できる装置を開発していくことが必要である。

開発した自動核酸抽出装置は、専門的な技術を必要とすることなく、サンプルをセットするだけで核酸抽出が可能であり、「自動化」、「短時間化」を実現した。核酸抽出は遺伝子検査にとって必須のプロセスである。遺伝子検査が POCT として普及する近い将来において、迅速な自動核酸抽出装置はなくてはならない装置となると期待される。

第4章

昇降式PCR装置の開発

第4章 昇降式 PCR 装置

4.1 はじめに

PCR は高感度な遺伝子検査法である。しかしながら、市販されている PCR 装置は、反応時間が長いという欠点があるために、遺伝子検査はクリニックなどの診察室では使用されない検査であった。PCR の原理は、熱サイクルを繰り返し行うことで、酵素反応により核酸を増幅することである。この原理を実行するために、従来式 PCR 装置は1つのヒートブロックを用いて熱サイクルを行っていたが、ヒートブロックの温度の上げ下げに時間がかかるため、PCR の時間短縮が困難であった。反応液滴の微小化、マイクロ流体デバイスの活用、反応液滴を迅速に移動させる、などの工夫から、数分間で PCR が可能なデバイスが報告されているが¹⁴⁻²³⁾、製品化するためには、より単純な装置構造にする必要があると考えられる。

本章では、2つのヒートブロックを用い、シリコンオイル中を重力により液滴が2つの温度間を移動することで PCR を行う方法を構築し、本原理に基づく PCR を「昇降式 PCR」と命名した。新たな原理を持つ昇降式 PCR 装置が、PCR 装置として十分な性能を持っているかを実証するために、従来式 PCR 装置を比較対象とした性能の評価実験を行った。

4.2 昇降式 PCR の装置構成と原理

昇降式 PCR 装置は、ヒートブロック、蛍光検出器、制御システムで構成されている。ヒートブロックは、高温と低温に保持されたそれぞれの温度制御ブロック、温度遮断スペーサー、ホルダーから構成される。ホルダーは温度制御ブロックとスペーサーを貫通した構造（10個の穴）になっており、反応チューブが挿入される（図4-1）。

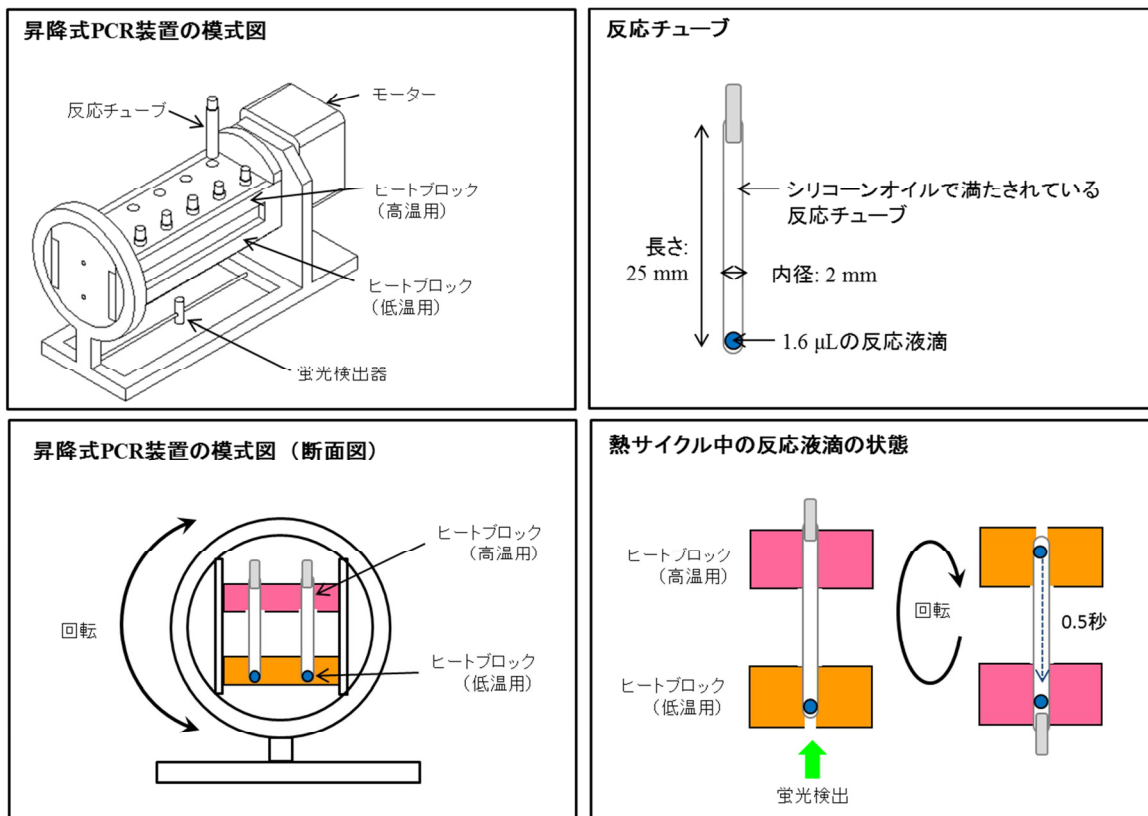


図 4-1 昇降式 PCR 装置の模式図

昇降式 PCR は、シリコンオイルで充填された反応チューブ内で、PCR 反応液が2つの温度領域を繰り返し移動することで PCR に必要な熱サイクルを行う。昇降式 PCR 装置専用の反応チューブは、円柱状であり、内径 2 mm、長さ 25 mm の円筒形のスペースを持っている。迅速な温度移行を行うために、反応チューブはおよそ 130 μL のシリコンオイルで満たされており、装置の機械的な回転の間、反応液がチューブ内を移動しやすくしている。シリコンオイルと反応液は混和せず、反応液は非乳化状態の液滴としてシリコンオイル中に存在する。反応液はシリコンオイルの比重よりも重いいため、反応液は重力により反応チューブの下方方向に沈降する。従って、反応チューブを 180 度回転することで、反応液を反応チューブ底から反応チューブ蓋まで重力により移動させることができる。このような動きから、昇降式 PCR 装置は、微小な液滴である反応液の温度を2つのヒートブロックの温度に順番に素早く変えることができる。また、シリコンオイルの粘度を調整することで、対流の影響を抑え、反応チューブ内の2つの温度領域の温度を一定に保っている。

昇降式 PCR 装置は2つのヒートブロックを持ち、2つのヒートブロックを貫通するような反応チューブが設置されている。反応チューブは、微小な反応液がシリコンオイル中を重力により移動する構造である。特徴的な装置構造と反応チューブ構造により、反応液の温度が PCR の熱変性の温度（高温）からアニールリングと伸長の温度（低温）へ下降する時間、またはその逆の時間が非常に短くなるため、昇降式 PCR 装置は、反応液が熱サイクルの設定温度以外の温度にさらされる時間が非常に短い、という特徴を持っている。多くの従来式 PCR 装置は、ヒートブロックを1つ持ち、ヒートブロックの温度を上げ下げすることで、PCR を行っている。ヒートブロックの温度を上げ下げする時間が必要となるため、その温度移行時間は PCR のトータル時間のロスとなっている（図 4-2）。一方で、昇降式 PCR 装置は、ヒートブロックを2つ持つため、ヒートブロックの温度を変える必要がなく、ロスの時間を省くことができ、その分の時間を短時間化することが可能である（図 4-3）。以上より、昇降式 PCR 装置は、従来式 PCR 装置と比較して、装置の構造から短時間化に有利な構造であると考えられる。

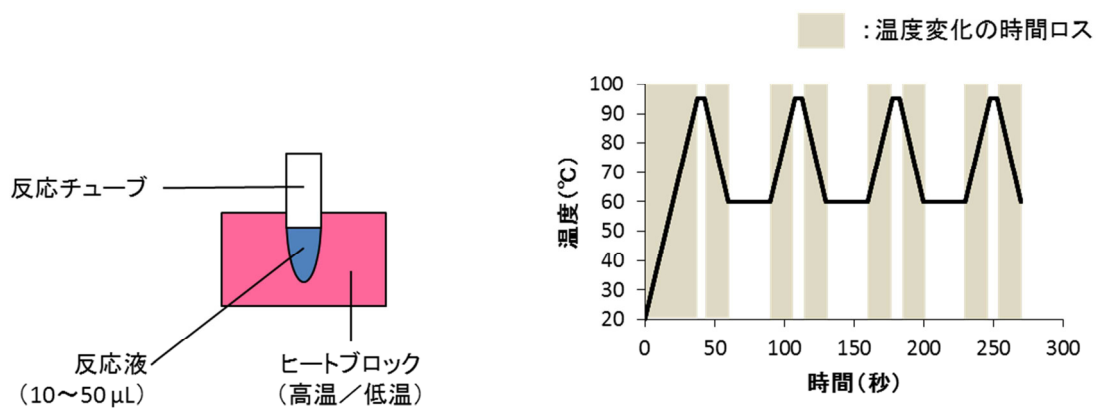


図 4-2 従来式 PCR 装置の温度移行

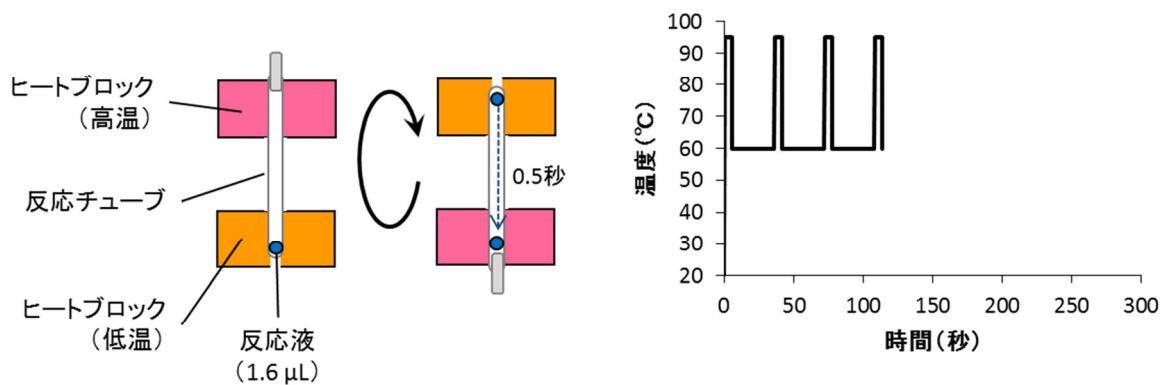


図 4-3 昇降式 PCR 装置の温度移行

4.3 実験方法

昇降式 PCR 装置が、PCR 装置として十分な性能を持っているかを実証するために、従来式 PCR 装置の性能と比較した。

4.3.1 反応条件

標的とする遺伝子は、*M. pneumoniae* の P1 遺伝子とした。特異的なプライマーとプローブは、*M. pneumoniae* の P1 遺伝子を検出するための配列とし（表 3-2）³⁹⁾、Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Japan)から購入した。プラスミドは、表 3-2 のプライマーを用いて作成した。プラスミドのコピー数は、100,000 コピー、10,000 コピー、1,000 コピー、100 コピー、50 コピー、20 コピー、10 コピーを評価対象とした。また、プラスミドが入っていない反応液を NTC (no template control) とした。試薬組成である 5 倍濃度の緩衝液は、Tris-HCl (pH 9.0)、塩化カリウム、塩化マグネシウムから構成される溶液を用いた。

4.3.2 従来式 PCR 装置

開発した昇降式 PCR 装置との比較のため、従来式 PCR 装置として、StepOnePlus (Life Technologies)を使用した。反応液量は 10 μ L であり、その中に各コピー数のプラスミドが入るよう、試薬調整を行った（表 4-1）。反応条件は、標準的な条件とした（表 4-2）。反応液ごと 3 回の繰り返し測定を行い、Ct 値と増幅の評価を行った。増幅の判定は、3 本中 3 本の増幅が認められた場合に、「○」とした。1 本でも増幅が認められない場合は、「×」とした。

4.3.3 昇降式 PCR 装置

反応液量を 1.6 μ L とし、その中に各コピー数のプラスミドが入るように試薬調整を行った（表 4-3）。調整した 10 μ L のうち、1.6 μ L を反応に用い、従来式 PCR 装置の反応条件と同じ条件を、標準反応条件とした（表 4-4）。昇降式 PCR 装置では高速な温度サイクルが可能のため、高速反応条件も評価した（表 4-5）。反応液ごと、3 回の繰り返し測定を行った。昇降式 PCR 装置では、輝度値が 3.0 を超えた時点を Ct 値と判定し、Ct 値と増幅の評価を行った。輝度値が 3.0 に達しないサンプルは、増幅しない、判定とした。増幅の判定は、3 本中 3 本の増幅が認められた場合に、「○」とした。1 本でも増幅が認められない場合は、「×」とした。

表 4-1 従来式 PCR 装置で用いた試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー	0.2 μ L
20 μ M Reverse プライマー	0.2 μ L
10 μ M TaqMan プローブ	0.2 μ L
滅菌水	5.2 μ L
プラスミド	1 μ L
total	10 μ L

表 4-2 従来式 PCR 装置における標準反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	95 °C	20 秒	1 サイクル
熱変性	95 °C	5 秒	50 サイクル
アニーリング／伸長	58 °C	20 秒	

表 4-3 昇降式 PCR 装置で用いた試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー	0.2 μ L
20 μ M Reverse プライマー	0.2 μ L
10 μ M TaqMan プローブ	0.2 μ L
滅菌水	5.575 μ L
プラスミド	0.625 μ L
total	10 μ L

表 4-4 昇降式 PCR 装置における標準反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	98 °C	20 秒	1 サイクル
熱変性	98 °C	5 秒	50 サイクル
アニーリング／伸長	58 °C	20 秒	

表 4-5 昇降式 PCR 装置における高速反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	98 °C	10 秒	1 サイクル
熱変性	98 °C	4 秒	50 サイクル
アニーリング／伸長	58 °C	6 秒	

4.4 結果と考察

4.4.1 標準的な反応条件における性能比較

PCR の熱変性時間を 5 秒間、アニーリング／伸長時間を 20 秒間とし、反応液に含まれるコピー数ごとに、増幅と Ct 値の評価を行った。増幅曲線の図において、同じ水準の 3 本中、1 本を代表として増幅曲線に示した。従来式 PCR 装置を用いた結果、検出限界のコピー数は、10 コピーであった（表 4-6, 図 4-4, 図 4-5）。50 サイクルの反応時間は、48 分間であった。昇降式 PCR 装置を用いた結果、検出限界のコピー数は、10 コピーであった（表 4-7, 図 4-6, 図 4-7）。50 サイクルの反応時間は、22 分間であった。

以上より、昇降式 PCR 装置の性能は、従来式 PCR 装置と同等の検出限界を持ち、PCR 装置として十分な性能を持っていることが実証された。さらに、同じ熱サイクルの反応条件を実行した場合、昇降式 PCR 装置は従来式 PCR 装置と比較して、反応時間は半分以下となり、昇降式 PCR 装置は従来式装置よりも処理時間の短時間化を実現した。

表 4-6 従来式 PCR 装置を用いた標準条件での Ct 値と増幅判定

		Ct 値					増幅判定
		No. 1	No. 2	No. 3	Ave.	SD	
反応液中の プラスミドの コピー数	100,000 コピー	22.4	22.3	22.3	22.3	0.031	○ (3本/3本)
	10,000 コピー	25.6	25.9	25.8	25.7	0.155	○ (3本/3本)
	1,000 コピー	29.6	30.2	30.0	29.9	0.304	○ (3本/3本)
	100 コピー	33.1	32.4	32.8	32.8	0.328	○ (3本/3本)
	50 コピー	36.0	34.8	35.8	35.5	0.638	○ (3本/3本)
	20 コピー	36.0	35.3	37.0	36.1	0.855	○ (3本/3本)
	10 コピー	36.8	37.3	35.4	36.5	0.942	○ (3本/3本)
	NTC	—	—	—			× (0本/3本)

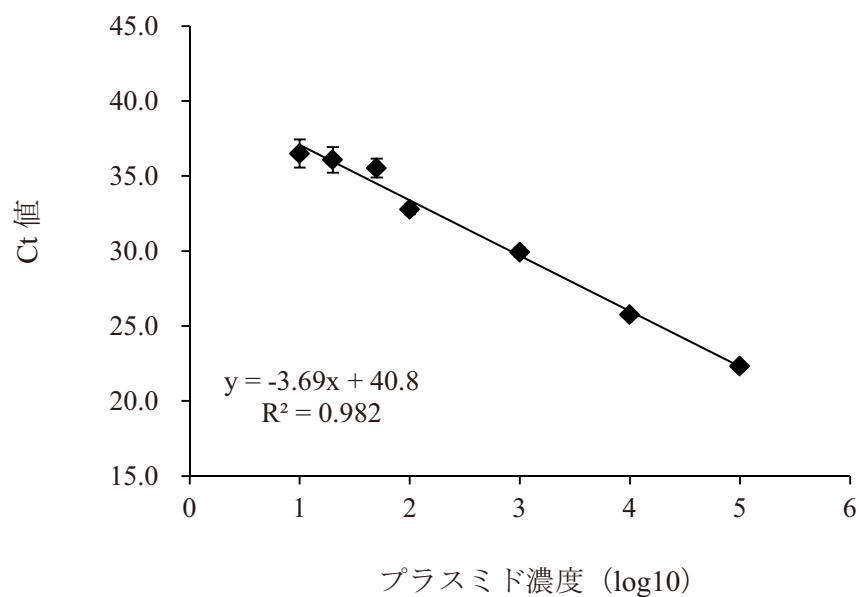


図 4-4 従来式 PCR 装置の検量線

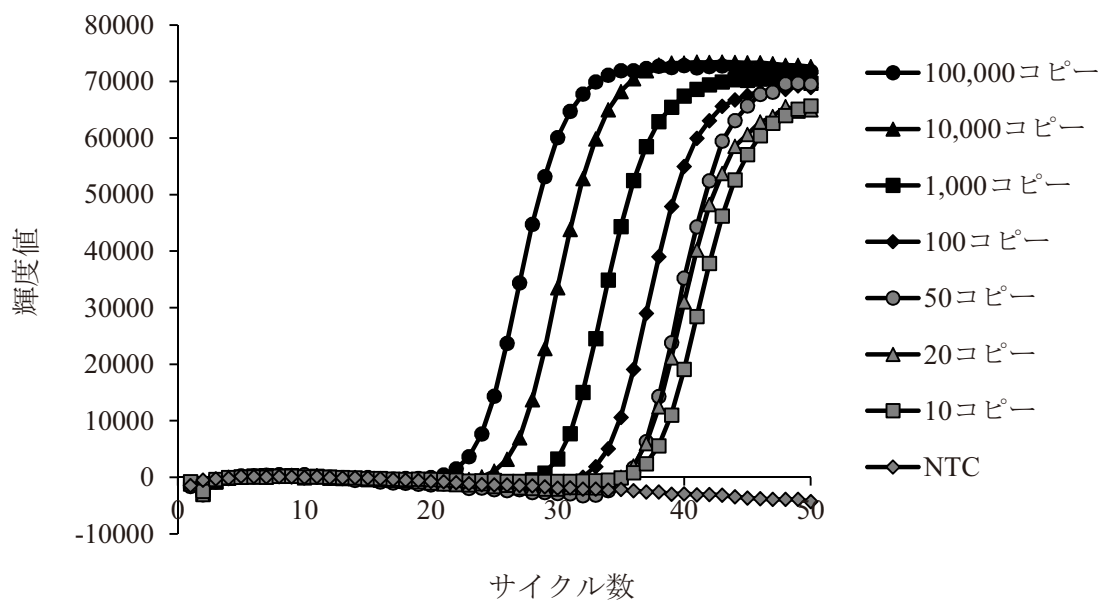


図 4-5 従来式 PCR 装置の増幅曲線

表 4-7 昇降式 PCR 装置を用いた標準条件での Ct 値と増幅判定

		Ct 値					増幅判定
		No. 1	No. 2	No. 3	Ave.	SD	
反応液中の プラスミドの コピー数	100,000 コピー	20.7	20.8	20.7	20.7	0.058	○ (3本/3本)
	10,000 コピー	23.8	24.1	24.2	24.0	0.208	○ (3本/3本)
	1,000 コピー	27.3	27.4	27.3	27.3	0.058	○ (3本/3本)
	100 コピー	31.0	31.1	31.0	31.0	0.058	○ (3本/3本)
	50 コピー	31.5	31.8	31.5	31.6	0.173	○ (3本/3本)
	20 コピー	33.1	32.3	32.3	32.6	0.462	○ (3本/3本)
	10 コピー	34.4	32.7	33.5	33.5	0.850	○ (3本/3本)
	NTC	—	—	—			× (0本/3本)

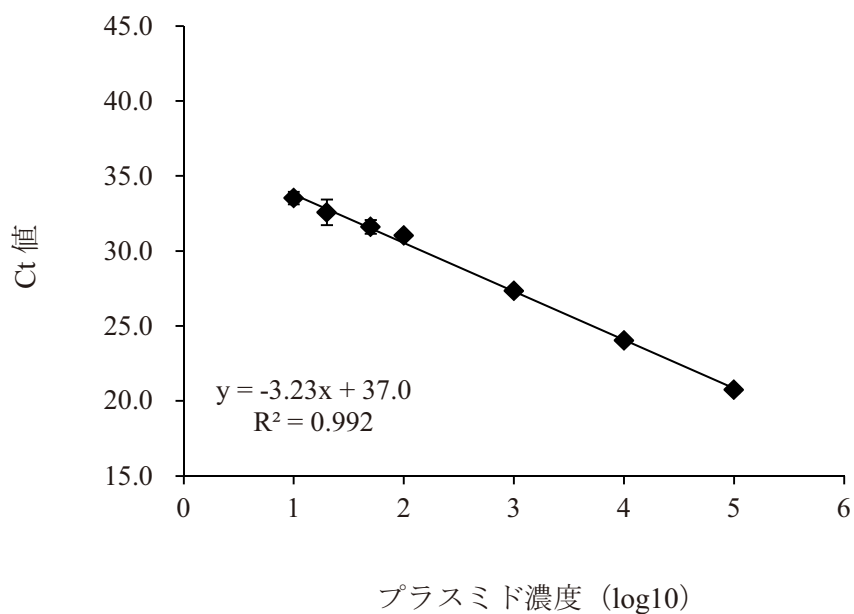


図 4-6 昇降式 PCR 装置の標準条件での検量線

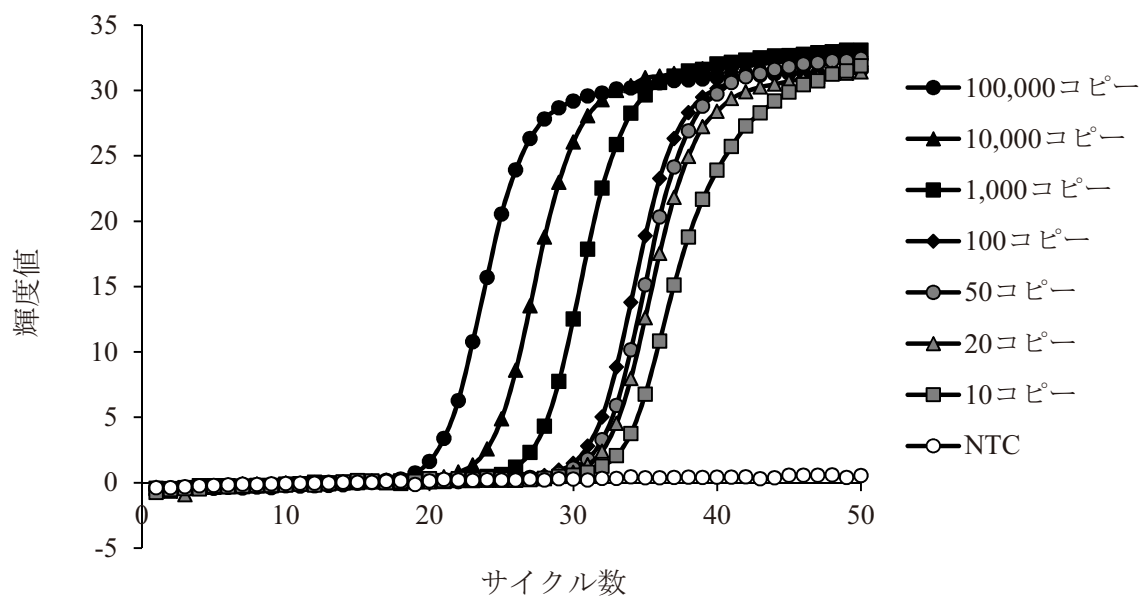


図 4-7 昇降式 PCR 装置の標準条件での増幅曲線

4.4.2 昇降式 PCR 装置における高速条件の性能

昇降式 PCR 装置の高速条件での性能を、実験にて確認した。高速条件は、熱変性時間を 4 秒間、アニーリング／伸長時間を 6 秒間とした。結果、増幅曲線は標準条件と比較してなだらかになる傾向が見られたが、10 コピーまで増幅を確認した（表 4-8, 図 4-9）。しかし、検量線から定量が可能な限界は 20 コピーまでと考えられたため、検量線は 20 コピーから 100,000 コピーの結果で作成した（図 4-8）。高速条件での PCR において、熱変性、アニーリングおよび伸長に十分な時間を確保できなかったために、増幅曲線がなだらかになったと考えられる。しかしながら、10 コピーでの結果は、ハンドリング誤差による影響の可能性もあるため、さらなる検証が必要だと考えられる。

昇降式 PCR 装置を用いた高速条件 50 サイクルの反応時間は、9.4 分間であり、従来式 PCR 装置を用いた標準条件 50 サイクルの反応時間 48 分間と比較して大幅に短縮できた。PCR の増幅判定に十分な 40 サイクルでの反応時間は、7.5 分間であった。従来式 PCR 装置を用いた標準条件の結果（表 4-6）と比較すると、高速条件での昇降式 PCR 装置を用いた各コピー数での Ct 値は同等であった（表 4-8）。

本実験から、昇降式 PCR 装置は高速条件で反応させても、従来式 PCR 装置と同等の性能を持っていることがわかった。昇降式 PCR 装置を用いた 40 サイクルの高速 PCR は、7.5 分間という短時間で十分な結果が得られ、高速 PCR が実証された。

表 4-8 昇降式 PCR 装置を用いた高速条件での Ct 値と増幅判定

		Ct 値					増幅判定
		No. 1	No. 2	No. 3	Ave.	SD	
反応液中の プラスミドの コピー数	100,000 コピー	23.1	22.8	22.8	22.9	0.173	○ (3本/3本)
	10,000 コピー	26.0	25.7	25.8	25.8	0.153	○ (3本/3本)
	1,000 コピー	29.3	29.3	29.2	29.3	0.058	○ (3本/3本)
	100 コピー	33.8	32.8	33.0	33.2	0.529	○ (3本/3本)
	50 コピー	35.4	34.5	34.2	34.7	0.624	○ (3本/3本)
	20 コピー	34.7	35.0	35.4	35.0	0.351	○ (3本/3本)
	10 コピー	35.0	37.6	35.5	36.0	1.380	○ (3本/3本)
	NTC	—	—	—			× (0本/3本)

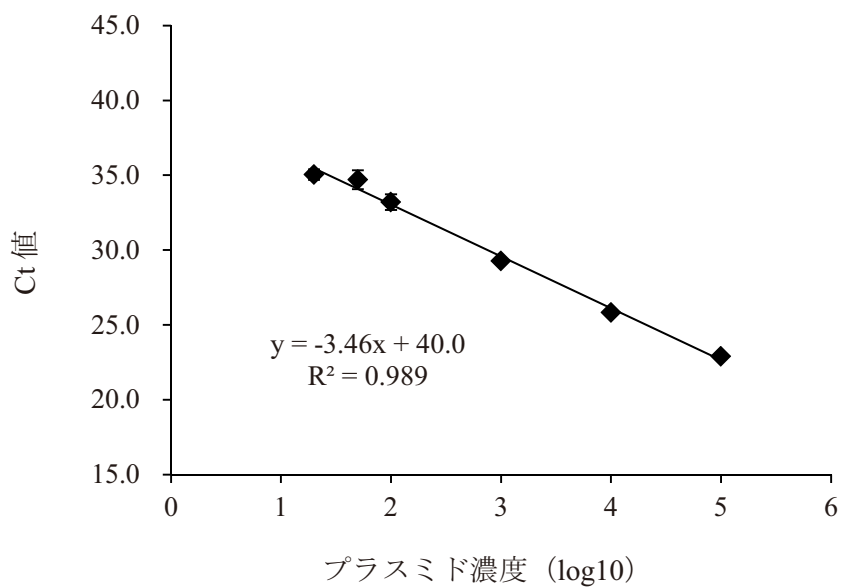


図 4-8 昇降式 PCR 装置の高速条件での検量線

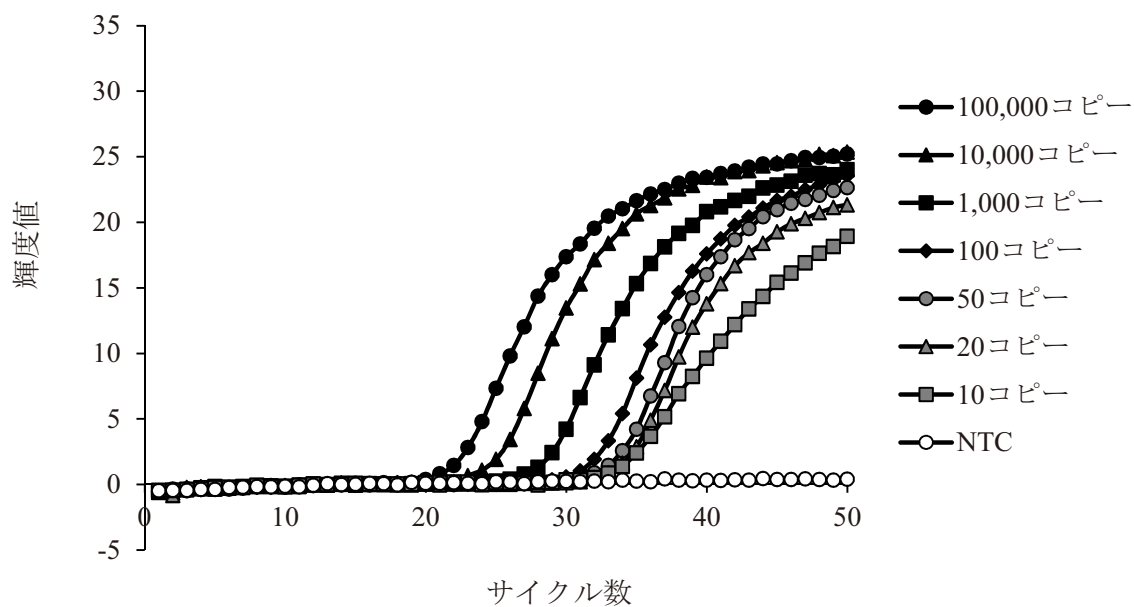


図 4-9 昇降式 PCR 装置の高速条件での増幅曲線

4.5 まとめ

本章では、従来式 PCR 装置の性能と比較することで、開発した昇降式 PCR 装置の性能を実証した。昇降式 PCR 装置は、従来式 PCR 装置と同等の検出限界であった。従来式 PCR 装置では 48 分間かかる 50 サイクルの PCR を、昇降式 PCR 装置を用いることにより 22 分間に短縮でき、高速条件で 9.4 分間に短縮できた。また、40 サイクルでの所要時間は 7.5 分間であった。以上より、昇降式 PCR 装置は PCR を 10 分間以内に実行できるため、PCR を用いた遺伝子検査は「時間がかかる」、という認識であったが、これからは「数分で可能な検査」として受け入れられていく期待される。

昇降式 PCR 装置で高速条件の PCR が実現できた理由として、昇降式 PCR 装置が 2 つのヒートブロックを装備していることが挙げられる。反応チューブが回転する間、反応液である液滴はヒートブロックの設定温度に保温され、回転後は液滴がシリコンオイル中を重力によりもう一方のヒートブロック側へ移動する。液滴はヒートブロックにより温められたシリコンオイルの温度に迅速に温度変化するため、液滴は設定温度以外の温度に曝される時間が短時間となり、特異的な反応を導くことができる。それゆえに、昇降式 PCR 装置は、迅速で特異的な PCR を実行することが可能であったと考えられる。従って、昇降式 PCR 装置は迅速な PCR 条件に有利な装置構造だと考えられる。

第5章

昇降式PCRの応用開発

第5章 昇降式 PCR の応用開発

5.1 はじめに

第4章では、昇降式 PCR 装置を開発し、従来式 PCR 装置と性能を比較することで、PCR 装置として十分な性能を持っていることを実証した。本章では、昇降式 PCR の高性能化の研究として、高感度な検出方法である One-step RT-nested PCR と、複数の遺伝子を連続して検出する Sequential PCR を開発し、その有効性を実験で実証した。

5.1.1 Nested PCR

Nested PCR は第2章で述べた通り、1つの標的遺伝子に対して、1回目の PCR では外側のプライマー、2回目の PCR では内側のプライマーを用い、2回の PCR を行う方法である。1回目の増幅産物を鋳型として2回目の PCR を行うため、標的遺伝子を高感度に検出できる。特に、標的遺伝子以外の遺伝子が多いヒトの臨床検体では、非常に有効な方法として使用されている。本論文では、最初の PCR を First PCR、2回目の PCR を Second PCR と呼ぶこととする。2回の PCR を行う Nested PCR は、First PCR と Second PCR の間に Second PCR の反応液を調整するが、First PCR 後の増幅産物のピペッティング操作により、コンタミネーションを引き起こすリスクがあった。また、標的核酸が RNA の場合は、First PCR の前に RT 反応が必要であり、さらなるコンタミネーションのリスクがあった。それゆえに、作業中の増幅産物によるコンタミネーションを防ぐため、さらには PCR を用いた検査のトータルの時間を短縮するために、反応液を別々に調整することなく単一チューブで Nested PCR の全ての反応ができる試薬、装置が望まれていた。Nested PCR や RT-PCR を単一チューブで行う方法が多く報告されているが⁴⁶⁻⁵³⁾、RT 反応、First PCR、Second PCR を単一チューブ、単一反応液で反応させる One-step RT-nested PCR 法の報告は少ない⁵³⁾。

5.1.2 複数検出

高感度な検査方法である PCR は、病原性微生物による感染症や癌などの領域で使用されている。しかし、標的とする遺伝子の種類は1種類だけでないことが多く、同時に複数遺伝子を検出することが求められている。同時に複数の遺伝子を検出する方法としては、Multiplex PCR が多く報告され、開発されてきている^{26, 54-58)}。

Multiplex PCR は、1つの PCR 反応液で複数の遺伝子を検出する場合、複数の標的遺伝子のプライマーを同時に使用することで、複数の遺伝子領域を増幅している。定量を行わない場合は、反応後の電気泳動により、どの標的遺伝子が存在しているか確認している。定

量を行う場合は、標的遺伝子の数だけ蛍光色素を増やし、その数だけ検出系の数も増やして検出している場合が多いが、蛍光色素や検出系の数は一般的には4波長までと限りがあった。さらに、単一反応液で複数の反応が同時に進むことから、各プライマー間の干渉などで反応が不十分になることがあり、反応条件の構築の煩雑さなどの問題があった。

反応容器の数を増やし、それぞれの容器に異なるプライマーを入れ、蛍光色素と検出系を1つにする方法がある。反応容器ごと標的遺伝子を識別する方法であるこの方法は、検体や試薬量が増え、コストの面で問題があった。また、微量な検体の場合、限られた項目数の遺伝子しか評価できず、微量な検体から複数項目を検出する方法が求められていた。さらに、微量であるが故に、ハンドリングの分注誤差などが大きくなる可能性もあり、単一反応液から複数項目を検出することが求められているが、これまでに1つの反応液、1つの検出系で、複数の遺伝子を検出する方法が報告されていない。

5.2 One-step RT-nested PCR

5.2.1 実験目的

本実験では、昇降式 PCR 装置を用い、RT 反応、First PCR、Second PCR の全ての反応を、単一チューブで蓋を開けずに実行できる One-step RT-nested PCR 法の構築を検討した。本方法の目的は、3つの反応に伴う煩雑な作業の簡便化と、コンタミネーションを防ぐことである。昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR 法を、従来式 PCR 装置を用いた 3 ステップの RT nested PCR 法と比較し、慢性骨髄性白血病のマーカーである *BCR-ABL* mRNA をモデル標的 RNA として用い、検出限界と特異度を評価した。さらに、従来式の方法で *BCR-ABL* mRNA の陽性と陰性の確認をした臨床検体を用いて、実際に臨床検体から検出できるか検証を行った。

5.2.2 実験方法

1) 細胞サンプル

ヒトの *BCR-ABL* mRNA が陽性である K562 細胞を、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、コントロール細胞とした。

2) 臨床検体

本実験における骨髄血の使用は、信州大学の倫理委員会から承認を得ている。骨髄血は、慢性骨髄性白血病陽性 5 人と慢性骨髄性白血病陰性 5 人から得た。陽性、陰性判定は、従来法の RT nested PCR にて確定診断されている。

3) RNA 抽出

Total RNA は、QIAamp RNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用い、骨髓血と K562 細胞から取扱説明書に従って抽出した。Total RNA 濃度は、NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)を用いて測定した。

4) サンプルの準備

昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR と、従来式 PCR 装置を用いた RT nested PCR の検出限界を評価するために、K562 細胞から抽出した total RNA を、滅菌水で 10 倍希釈系列に調整した。

BCR-ABL mRNA を持たないコントロール細胞から得た 100 ng の RNA に K562 から抽出した RNA を 1 ng から 0.1 pg までの 10 倍希釈系列を調整したものをそれぞれ混合し、モデル RNA 混合液とした。モデル RNA 混合液は、昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR の特異度を評価するために使用した。

臨床検体を用いた One-step RT-nested PCR の反応性評価では、10 倍濃度で調整した反応液を、各臨床検体から抽出した total RNA 100 ng 溶液とシリコーンオイル中で 1.6 μ L の液滴となるように混合した。

5) 反応条件

本実験で用いたプライマー、プローブの配列は、表 5-1 の通りである。First PCR で用いる外側のプライマーセット(step2_BCR/step2_ABL)と、Second PCR で用いる内側のプライマーセット(2nd_BCR/2nd_ABL) の最適なアニリング/伸長温度を決定するために、表 5-2 の試薬組成、表 5-3 の高速反応条件で、*BCR-ABL* のプラスミドを用いて最適な温度を検討した。

BCR-ABL mRNA の有無を確認するために、従来法の RT nested PCR を用いた。RT nested PCR を構成する RT 反応、First PCR、Second PCR の反応の試薬組成は表 5-4 の通りであり、表 5-5 の反応条件で、サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。RT 反応は 1 μ g の RNA から Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV, Promega, Madison, WI, USA)を用いて行った。First PCR は、RT 反応から得た 5 μ L の cDNA を用いて、AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)を用いて行った。Second PCR は、1 μ L の First PCR 増幅産物を用いて、AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer)を用いて行った。Second PCR 産物は 3%アガロースゲルで電気

泳動により解析した。アガロースゲルでの核酸のバンドは、エチジウムブロマイドで染色した。RT nested PCR の検出限界を確実に知るために、Second PCR のステージでは、QuantStudio 12k Flex system (Applied Biosystems)を用いて、TaqMan プローブを入れた反応試薬でリアルタイム PCR を行った (表 5-6)。

昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR は、RT 反応、First PCR、Second PCR で構成される。PCR の部分は、アニーリングと伸長ステップを 1 つの温度で行うことのできるシャトル PCR を採用した。酵素は、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) と Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies)を使用した。5 倍濃度の緩衝液は、Tris-HCl (pH 9.0)、塩化カリウム、塩化マグネシウムから構成される溶液を用いた。反応液の各構成成分濃度は、実験により最適化し、試薬組成は表 5-7 の通りに 10 μ L を調整した。その反応液から 1.6 μ L を取り出し、昇降式 PCR 装置で One-step RT-nested PCR を表 5-8 の反応条件の通りに行った。本研究では、増幅の輝度値が 3.0 を超えた時点で陽性と判定し、増幅の有無の評価を行った。

表 5-1 プライマー、プローブの配列

プライマー /プローブ	配列 5'-3'	Localization, 5'-3' Position	Tm 値
step1_BCR	CGGGAGCAGCAGAAGAAGTG	BCR, 3180-3199	66 °C
step1_ABL	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG	ABL, 433-408	65 °C
step2_BCR	GTGAAACTCCAGACTGTCCACAGCA	BCR, 3255-3279	68 °C
step2_ABL	TCCACTGGCCACAAAATCATACAGT	ABL, 375-351	66 °C
2nd_BCR	CACTGGATTTAAGCAGA	BCR, 3356-3372	54 °C
2nd_ABL	TTCACTCAGACCCTGAG	ABL, 279-263	58 °C
ENP541 ⁵⁹⁾	FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-TAMRA	ABL, 277-257	72 °C

表 5-2 最適なアニーリング／伸長温度を評価するために用いた試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー	0.4 μ L
20 μ M Reverse プライマー	0.4 μ L
10 μ M TaqMan プローブ (ENP541)	0.2 μ L
滅菌水	5.175 μ L
BCR-ABL プラスミド (10^4 copies/ μ L)	0.625 μ L
total	10 μ L

表 5-3 最適なアニーリング／伸長温度を評価するために用いた高速反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	98 °C	10 秒	1
熱変性	98 °C	4 秒	50
アニーリング／伸長	40~70 °C	8 秒	

表 5-4 従来法の RT nested PCR の試薬組成

RT 反応	
M-MLV	1 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	4 μ L
2 mM dNTP	2 μ L
ランダムプライマー	1 μ L
0.1 M DDT	0.2 μ L
滅菌水	1.8 μ L
RNA サンプル	10 μ L
total	20 μ L
First PCR	
AmpliTaq DNA polymerase	0.15 μ L
10 倍濃度の 緩衝液	2.5 μ L
2 mM dNTP	2.5 μ L
25 μ M Forward プライマー (step1_BCR)	1 μ L
25 μ M Reverse プライマー (step1_ABL)	1 μ L
滅菌水	12.85 μ L
逆転写反応で得た cDNA	5 μ L
total	25 μ L
Second PCR	
AmpliTaq DNA polymerase	0.15 μ L
10 倍濃度の 緩衝液	2.5 μ L
2 mM dNTP	2.5 μ L
25 μ M Forward プライマー (step2_BCR)	1 μ L
25 μ M Reverse プライマー (step2_ABL)	1 μ L
滅菌水	16.85 μ L
First PCR の増幅産物	1 μ L
total	25 μ L

表 5-5 従来法の RT nested PCR の反応条件

	温度	時間	サイクル数
RT 反応	42 °C	60 分	1
ピペッティング操作			
First PCR	96 °C	1 分	1
	95 °C	20 秒	40
	60 °C	15 秒	
	72 °C	1 分	
	72 °C	2 分	1
ピペッティング操作			
Second PCR	96 °C	1 分	1
	95 °C	20 秒	30
	60 °C	15 秒	
	72 °C	1 分	
	72 °C	2 分	1
ピペッティング操作			
電気泳動	30 分		

所要時間 6 時間

表 5-6 従来法の RT nested PCR で TaqMan プローブを入れた場合の
Second PCR の試薬組成

Second PCR (TaqMan プローブ入り)	
AmpliTaq DNA polymerase	0.15 μ L
10 倍濃度の 緩衝液	2.5 μ L
2 mM dNTP	2.5 μ L
25 μ M Forward プライマー (step2_BCR)	1 μ L
25 μ M Reverse プライマー (step2_ABL)	1 μ L
10 μ M TaqMan プローブ (ENP541)	0.15 μ L
滅菌水	16.7 μ L
First PCR の増幅産物	1 μ L
total	25 μ L

表 5-7 One-step RT-nested PCR の試薬組成

SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.2 μ L
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー (step2_BCR)	0.4 μ L
20 μ M Reverse プライマー (step2_ABL)	0.4 μ L
20 μ M Forward プライマー (2nd_BCR)	0.4 μ L
20 μ M Reverse プライマー (2nd_ABL)	0.4 μ L
10 μ M TaqMan プローブ (ENP541)	0.2 μ L
滅菌水	2.8 μ L
RNA サンプル	2 μ L
total	10 μ L

表 5-8 One-step RT-nested PCR の反応条件

	温度	時間	サイクル数
RT 反応	50 °C	15 分	1
RT 酵素失活と ホットスタート	98 °C	10 秒	1
First PCR	98 °C	5 秒	20
	62.5 °C	20 秒	
Second PCR	98 °C	5 秒	30
	50 °C	20 秒	

所要時間 40 分

5.2.3 結果と考察

1) 各プライマーの最適なアニーリング/伸長温度評価

単一チューブ内で Nested PCR を実現するためには、外側と内側のプライマーのアニーリング温度の最適化が重要である。昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR で用いる外側のプライマーセットは、従来法の RT nested PCR のプライマーセット (step2_BCR/step2_ABL) を用いた。さらに、step2_BCR/step2_ABL のプライマーセットを外側のプライマーセットとして、内側のプライマーセット(2nd_BCR/2nd_ABL)を設計した。配列の設計は、外側と内側のプライマーのアニーリング/伸長の温度差が 10°C 以上となるように、T_m 値を可能なかぎり離れるように行った。

昇降式 PCR 装置の優秀な機能の一つは、各プライマーの最適な温度を正確に反応液に与えられる温度特異性である。アニーリング温度の最適化は、単一チューブ内で Nested PCR や RT とそれに続く Nested PCR を実行するために重要であると考えられたため、高速化条件という厳しい PCR 条件下で最適なアニーリング/伸長温度を調べた。

実験から、外側のプライマーセット (step2_BCR/step2_ABL) は 62.5°C が最も PCR 効率が良く、内側のプライマーセット(2nd_BCR/2nd_ABL) は 50°C が最も PCR 効率が良かったため、最適な温度と決定した (図 5-1)。62.5°C と 50°C は、アニーリング/伸長の温度が 10°C 以上離れており、Nested PCR に適していると判断した。

従来式 PCR 装置はヒートブロックが 1 つのために、温度を変える時間を必要とする。温度を変えている間、反応液は最適ではない温度に曝されることになり、結果として非特異的増幅を起こす可能性があった。しかし、昇降式 PCR 装置では、液滴の温度は 2 つのヒートブロックに制御される 2 つの温度 (熱変性温度、またはアニーリング/伸長温度) にすぐに達することができ、設定温度以外の温度にはほとんど曝されない。以上のことから、昇降式 PCR 装置はプライマーの最適なアニーリング/伸長温度を調べることができ、その温度で PCR を実行可能であり、かつ設定温度以外にはほとんど曝されないという特徴を持っていることがわかった。

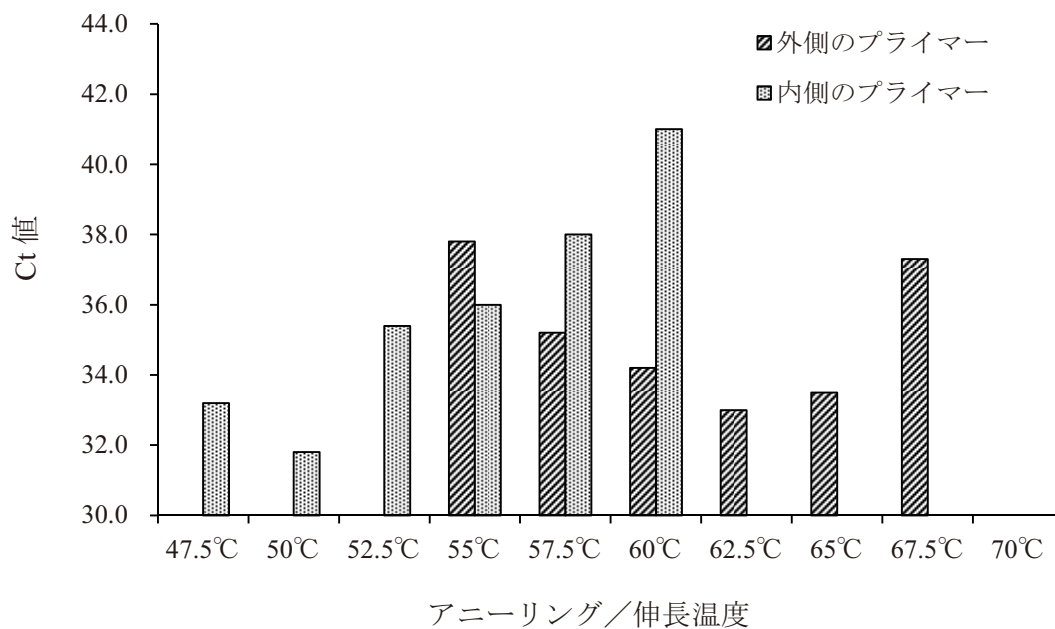


図 5-1 各プライマーの最適なアニーリング/伸長温度

2) 検出限界

K562 細胞から得た total RNA を用いて、昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR と、電気泳動やリアルタイム PCR を用いた従来法の RT nested PCR の検出限界を評価した。各サンプル 3 回測定を行った。結果、One-step RT-nested PCR は、K562 細胞から得た total RNA 1 pg から *BCR-ABL* mRNA を検出できた (図 5-2)。一方、従来法の RT nested PCR は、K562 細胞から得た total RNA 1 ng から *BCR-ABL* mRNA を検出した (図 5-3)。以上より、One-step RT-nested-PCR の検出限界は、RT 反応、First PCR、Second PCR を別々のチューブで行う従来法の RT nested PCR の検出限界よりも 1000 倍高感度であった。1 つのチューブで全ての反応が可能な One-step RT-nested PCR は、最初に持ち込んだ RNA から各試薬調整で量が減ることなく、検出が可能であるが、従来法の RT nested PCR は各反応で各試薬調整が必要となり、最初に持ち込んだ RNA が Second PCR では実質的に減っているため、検出限界の結果に大きく差が出たと考えられる。

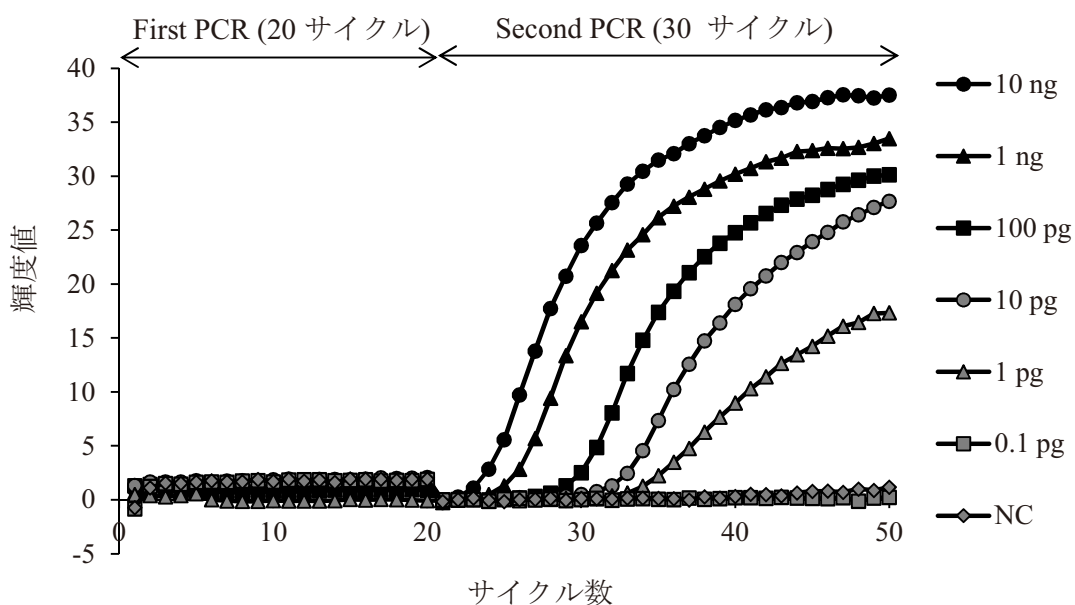
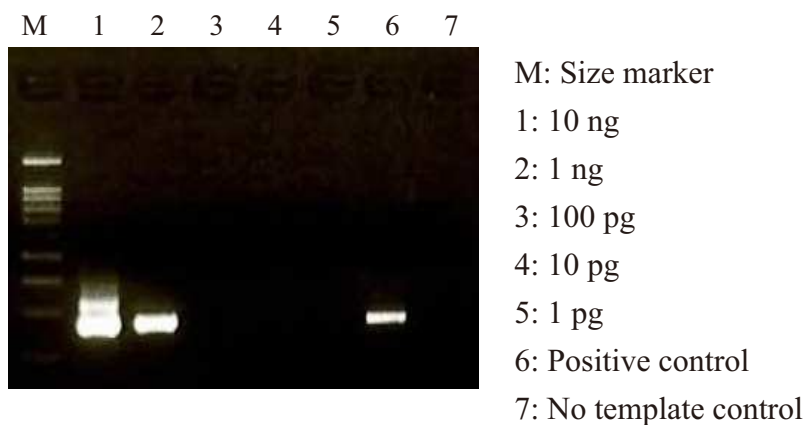


図 5-2 One-step RT-nested PCR の検出限界

A) 電気泳動



B) リアルタイム PCR

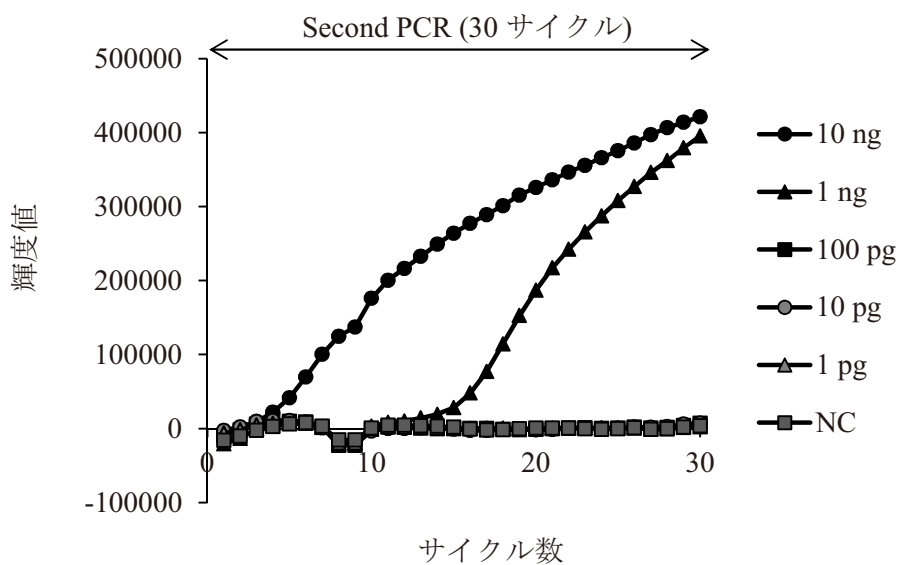


図 5-3 従来法の RT nested PCR の検出限界

3) One-step RT-nested PCR の特異度

モデル RNA 混合液を用いて、One-step RT-nested PCR の特異度を評価した。コントロール細胞由来の 100 ng の RNA に、K562 由来の total RNA を混合した溶液をサンプルとした。標的ではない遺伝子が豊富に存在する状態から、標的とする遺伝子のみを検出できるか評価した。結果、コントロール細胞由来の 100 ng の RNA が入った状態で、K562 細胞由来の *BCR-ABL* mRNA の割合が 0.001%まで検出できた (図 5-4)。これは、One-step RT-nested PCR が白血病患者の臨床検体で、微小残存病変を検出するために十分な特異度を持った方法であると示唆している。また、コントロール細胞から得た RNA のみ (0%) では、*BCR-ABL* mRNA は検出されなかった。

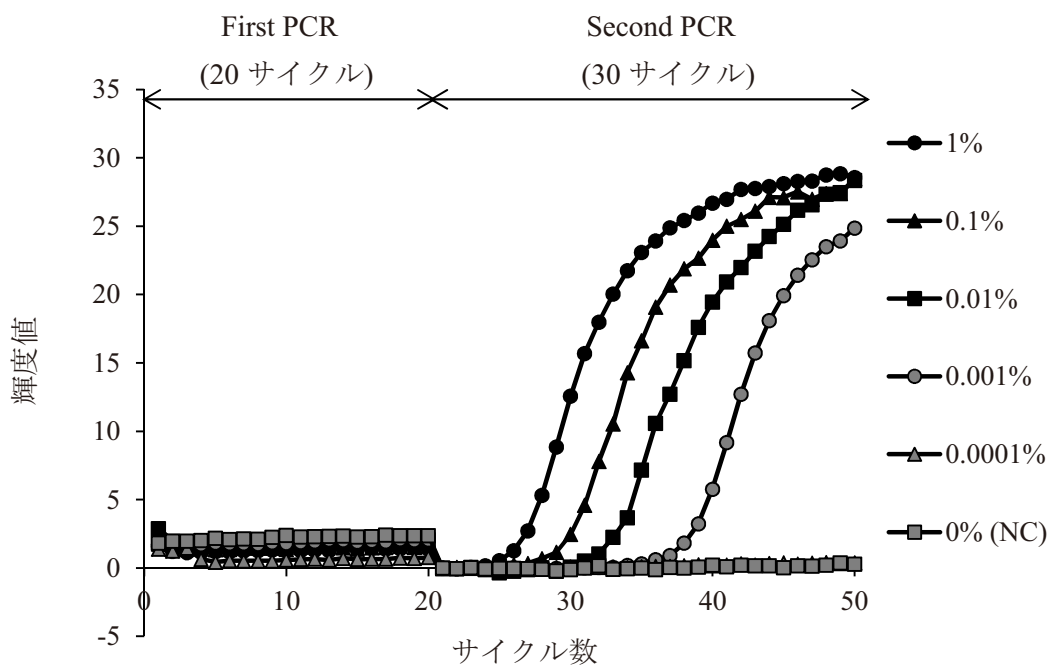


図 5-4 One-step RT-nested PCR の特異度

4) One-step RT-nested PCR の臨床的評価

BCR-ABL mRNA の増幅は、慢性骨髄性白血病患者から得た 5 サンプル (図 5-5 で(+)と表示) 全てから観察され、慢性骨髄性白血病ではない患者から得た 5 サンプル (図 5-5 で(-)と表示) からは増幅が観察されなかった (図 5-5)。従って、従来法の RT nested PCR での結果と、One-step RT-nested PCR と同じ結果であった。また、従来法の RT nested PCR は 6 時間かかったが、One-step RT-nested PCR は 40 分で全ての反応を完了した。

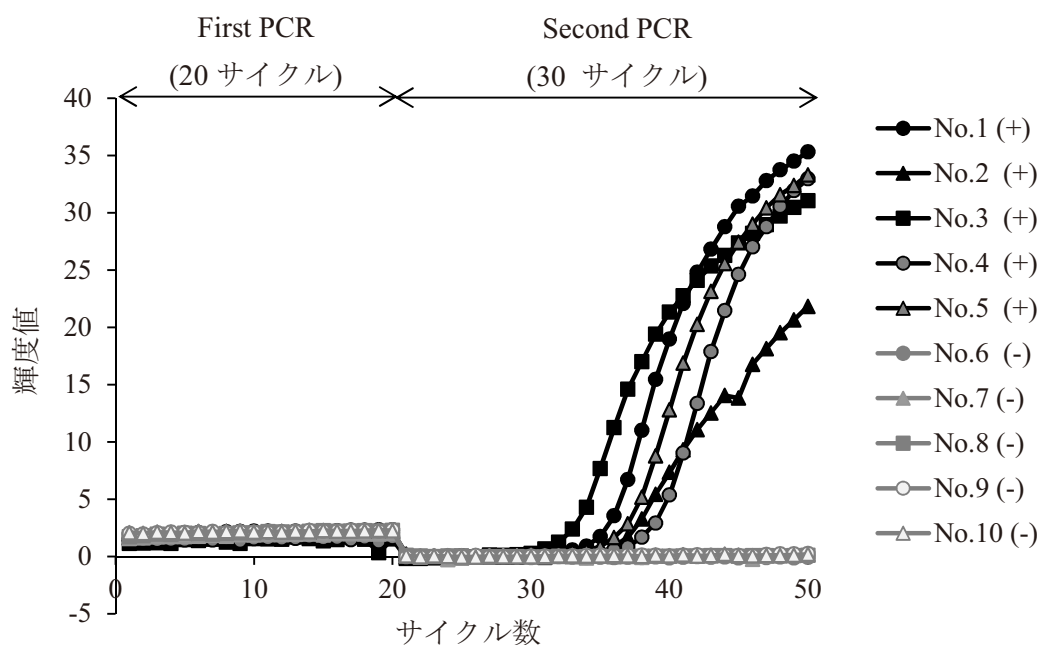


図 5-5 One-step RT-nested PCR の臨床的評価
(No.6~10 のデータは 0 近辺で重なっている)

5.2.4 まとめ

本研究では、昇降式 PCR 装置を用いた One-step RT-nested PCR を構築した。本方法は、複数のチューブでの試薬調整が必要ないため、コンタミネーションを防ぎ、かつ簡便な反応系であった。One-step RT-nested PCR は、単一チューブ内で3ステップの反応を連続して行うことで、全ての反応を40分以内で完了可能な、非常に迅速で、高感度な PCR であった。

厳密なアニーリング／伸長温度の最適化と、反応液が最適な温度以外に曝されることがほとんどない昇降式 PCR 装置の特徴が、RT 反応、First PCR、Second PCR を含む全ての反応を単一チューブ内で可能にしたと考えられる。従来式 PCR 装置は、熱変性の温度からアニーリング／伸長温度が変わる時、ヒートブロックの温度を変える時間が必要であり、その間、反応液は非最適温度に曝され、非特異的増幅のリスクがあった。一方で、昇降式 PCR の反応液は 1.6 μL と微量であり、熱伝導性の良いシリコンオイルに囲まれた環境であるため、2つのヒートブロックの温度に迅速に曝される。最適な温度のみで PCR を実行することができるため、アニーリング／伸長温度が異なる温度の2種類のプライマーセットが入った1つの反応液で、RT 反応と、First PCR と Second PCR の反応を連続して反応させる One-step RT-nested PCR が実現できたと考えられる。

One-step RT-nested PCR の性能は、別々のチューブを用いる従来法の3ステップの RT nested PCR と比較して1,000倍高感度であった。これは、従来法の3ステップの RT nested PCR は反応液を調整する度に標的とする遺伝子も希釈されていたが、One-step RT-nested PCR は反応液を1つにすることで標的とする遺伝子が希釈されることがなく、高感度になったと考えられる。迅速で高感度な PCR は、感染性病原体の検出や、ガンの治療後の微小残存病変のモニタリングに望まれている^{60,61)}。One-step RT-nested PCR は *BCR-ABL* mRNA を0.001%という高い特異度で検出し、微小残存病変の検出に十分な特異度を持った方法であること示唆している。本方法は抗原抗体反応を用いた検査で検出できない濃度の微生物の検出にも適用できると期待される。

以上より、One-step RT-nested PCR は、昇降式 PCR 装置の温度特異性を利用したことで実現でき、さらに1ステップにしたことにより、従来法と比較して高感度を実現した。また、単一チューブで RNA サンプルを用いた One-step RT-nested PCR を実現できたため、この方法はゲノム DNA を用いた One-step nested PCR にも適用可能であると考えられる。One-step RT-nested PCR または One-step nested PCR は、RNA または DNA サンプルを用いた広範囲の遺伝子検査に適用できる方法であると考えられる。

5.3 Sequential PCR

5.3.1 実験目的

本実験では、1つの反応液、1つの検出系で複数の遺伝子を検出する方法の構築を目的とした。昇降式 PCR 装置は、温度特異性があり、高速条件下ほど増幅可能な温度領域が狭まる。遺伝子ごとにアニーリング/伸長温度を変えることにより、異なる PCR を1つの反応液内で連続して実行可能か検討した。本実験では、2つの遺伝子を連続して検出する Sequential PCR の構築を行った。

5.3.2 実験方法

1) 定義と判定方法

複数の遺伝子ごとの PCR を、1つの反応液内で連続して PCR を行うことを Sequential PCR と呼ぶこととする。Sequential PCR は、2種類以上のプライマーと蛍光プローブを含んだ反応液を用い、アニーリング/伸長温度が異なる PCR を連続して2回以上繰り返すことにより、2種類以上の遺伝子の検出を行う。連続した PCR の順番は、プライマーのアニーリング/伸長温度が高い順に PCR を行うこととする。各遺伝子の陰性判定まで行うために、各 PCR は40サイクルまで行う。

昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR では、1回目の PCR を First PCR、2回目の PCR を Second PCR と呼び、First PCR で増幅する遺伝子を gene 1、Second PCR で増幅する遺伝子を gene 2 と呼ぶこととする。First PCR のアニーリング/伸長温度は、gene 1 の最適な温度、gene 2 の増幅不可能な温度を設定し、反応液中に gene 1 が含まれているか判定する。40サイクル後、Second PCR へ移行する。Second PCR は gene 2 の最適な温度、gene 1 の増幅不可能な温度を設定し、反応液中に gene 2 が含まれているか判定する。それぞれの PCR において、1つの遺伝子のみが増幅可能な温度に設定するため、2つの遺伝子の有無を正確に判定することができる。

2) 反応条件

Sequential PCR の構築に用いた標的遺伝子は、内因性コントロールとして使用される β -actin とノロウイルスのプラスミドを用いた。プラスミドのコピー数は、各反応液中に 10^4 コピー入るように試薬調整を行った。Sequential PCR に用いたプライマーとプローブの配列は、表 5-9 の通りである。 β -actin とノロウイルス⁶²⁾のプライマーとプローブは、Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Japan)から購入した。PCR 酵素は、Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies)を用いた。5倍濃度の緩衝液は、Tris-HCl (pH 9.0)、塩化カリ

ウム、塩化マグネシウムから構成される溶液を用いた。従来式 PCR 装置は StepOnePlus™ (Life Technologies)を用いた。反応液ごと、2回の繰り返し測定を行った。昇降式 PCR 装置では、増幅の輝度値が 3.0 を超えた時点で陽性と判定し、増幅の有無の評価を行った。

昇降式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討は、表 5-10 の通りに試薬調整を行った。調整した 10 μL のうち、1.6 μL を反応に用い、表 5-11 の通りに反応を行った。従来式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討は、表 5-12 の通りに試薬調整を行い、10 μL を表 5-13 の通りに反応を行った。各反応液あたり、10⁴ コピー入るように調整した。

昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR は、表 5-14 の通りに試薬調整を行い、表 5-15 の通りに反応を行った。従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR は、表 5-16 の通りに試薬調整を行い、表 5-17 の通りに反応を行った。

表 5-9 Sequential PCR に用いたプライマーとプローブの配列

プライマー/ プローブ	配列 5'-3'	Tm 値
β-actin F	AGCCTCGCCTTTGCCGA	67 °C
β-actin R	CTGGTGCCTGGGGCG	67 °C
β-actin P	FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA	72.6 °C
COG1 F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	66.8 °C
COG1 R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	60 °C
RING1 - TP(b)	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-MGB	69.5°C

表 5-10 昇降式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー	0.4 μ L
20 μ M Reverse プライマー	0.4 μ L
10 μ M TaqMan プローブ	0.2 μ L
滅菌水	5.175 μ L
プラスミド (10^5 copies/ μ L)	0.625 μ L
total	10 μ L

表 5-11 昇降式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	98 °C	1 分	1 サイクル
熱変性	98 °C	5 秒	50 サイクル
アニーリング/伸長	40~70 °C	10 秒	

表 5-12 従来式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に
用いた試薬組成

Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μ L
5 倍濃度の 緩衝液	2 μ L
2.5 mM dNTP	1 μ L
20 μ M Forward プライマー	0.4 μ L
20 μ M Reverse プライマー	0.4 μ L
10 μ M TaqMan プローブ	0.2 μ L
滅菌水	4.8 μ L
プラスミド (10^4 copies/ μ L)	1 μ L
total	10 μ L

表 5-13 従来式 PCR 装置を用いた最適温度領域の検討に用いた反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	95 °C	1 分	1 サイクル
熱変性	95 °C	1 秒	50 サイクル
アニーリング/伸長	40~70 °C	10 秒	

表 5-14 昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の試薬組成

	β-actin/		
	G1-b	β-actin	G1-b
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
5 倍濃度緩衝液	2 μL	2 μL	2 μL
2.5 mM dNTP	1 μL	1 μL	1 μL
20 μM Forward プライマー (β-actin F)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
20 μM Reverse プライマー (β-actin R)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
10 μM TaqMan プローブ (β-actin P)	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
20 μM Forward プライマー (COG1 F)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
20 μM Reverse プライマー (COG1 R)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
10 μM TaqMan プローブ (RING1 - TP(b))	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
β-actin_プラスミド (10 ⁵ copies/μL)	0.625 μL	0.625 μL	
ノロウイルス_プラスミド (10 ⁵ copies/μL)	0.625 μL		0.625 μL
滅菌水	3.55 μL	4.175 μL	4.175 μL
	total	10 μL	10 μL

表 5-15 昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	98 °C	1 分	1
First PCR	98 °C	5 秒	40
	72.5 °C	10 秒	
Second PCR	98 °C	5 秒	40
	55 °C	10 秒	

表 5-16 従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の試薬組成

	β-actin/		
	G1-b	β-actin	G1-b
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
5 倍濃度の 緩衝液	2 μL	2 μL	2 μL
2.5 mM dNTP	1 μL	1 μL	1 μL
20 μM Forward プライマー (β-actin F)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
20 μM Reverse プライマー (β-actin R)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
10 μM TaqMan プローブ (β-actin P)	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
20 μM Forward プライマー (COG1 F)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
20 μM Reverse プライマー (COG1 R)	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
10 μM TaqMan プローブ (RING1 - TP(b))	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL
β-actin_プラスミド (10 ⁴ copies/μL)	1 μL	1 μL	
ノロウイルス_プラスミド (10 ⁴ copies/μL)	1 μL		1 μL
滅菌水	2.8 μL	3.8 μL	3.8 μL
total	10 μL	10 μL	10 μL

表 5-17 従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の反応条件

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート	95 °C	1 分	1
First PCR	95 °C	1 秒	40
	72.5 °C	10 秒	
Second PCR	95 °C	1 秒	40
	55 °C	10 秒	

5.3.3 結果と考察

1) 各装置における各プライマーの最適なアニーリング/伸長温度領域

Sequential PCR を行うために、2つの標的遺伝子として β -actin とノロウイルス G1-b のプラスミドを用意した。最初に、これら2つ遺伝子に対するプライマーの最適なアニーリング/伸長温度を高速条件で評価した。昇降式 PCR 装置を用いた結果、 β -actin は 70°C から 72.5°C で増幅可能であり、72.5°C をアニーリング/伸長の最適温度と決定した (図 5-6)。ノロウイルス G1-b は、50°C から 65°C で増幅可能であり、55°C をアニーリング/伸長の最適温度と決定した。 β -actin の増幅産物は 174 bp と比較的長いために、高速条件下で増幅可能な温度範囲が狭くなったと考えられる。高速条件で PCR を行うためには、増幅産物の長さは短いほど速く反応が進むため、100 bp 前後が良いとされている。ノロウイルス G1-b の増幅産物は 84 bp であり、高速条件下でも十分に反応できる長さであったために、増幅可能な温度範囲が β -actin と比較して広がったと考えられる。

一方、従来式 PCR 装置を用いた 40°C から 70°C までの評価では、 β -actin、ノロウイルス G1-b の両方の遺伝子は全ての温度で増幅が可能であるが、Ct 値が温度に依存しないで一定であり、アニーリング/伸長の最適温度を決定することはできなかった (図 5-7)。従来式 PCR 装置は、1つのヒートブロックを用いているために、熱変性温度とアニーリング/伸長温度の2つの温度の昇降を繰り返して PCR を行っている。温度の昇降の間、反応液は熱変性温度 (95°C) とアニーリング/伸長の設定温度の間の温度に数秒間曝され、その間に増幅可能な温度があれば増幅可能となり、どの設定温度でも増幅できたと考えられる。昇降式 PCR 装置は熱変性とアニーリング/伸長の温度移行が迅速であるため、設定温度以外で増幅が進むことは困難であり、温度特異性が顕著に現われたと考えられる。

昇降式 PCR 装置を用いることでプライマーの温度特異性が現われたことは、昇降式 PCR 装置の特徴である。ヒートブロックが1つの従来式 PCR 装置では現れないこの特徴は、設定温度のみに反応液が曝されることにより、反応液に伝わる温度は設定温度のみとなるため、設定温度以外による反応は起こりづらく、アニーリング/伸長温度範囲がプライマーごとに現れたと考えられる。昇降式 PCR 装置を使用すること、高速条件で反応させることの2点により、プライマーのアニーリング/伸長温度の正確な評価が可能となった。

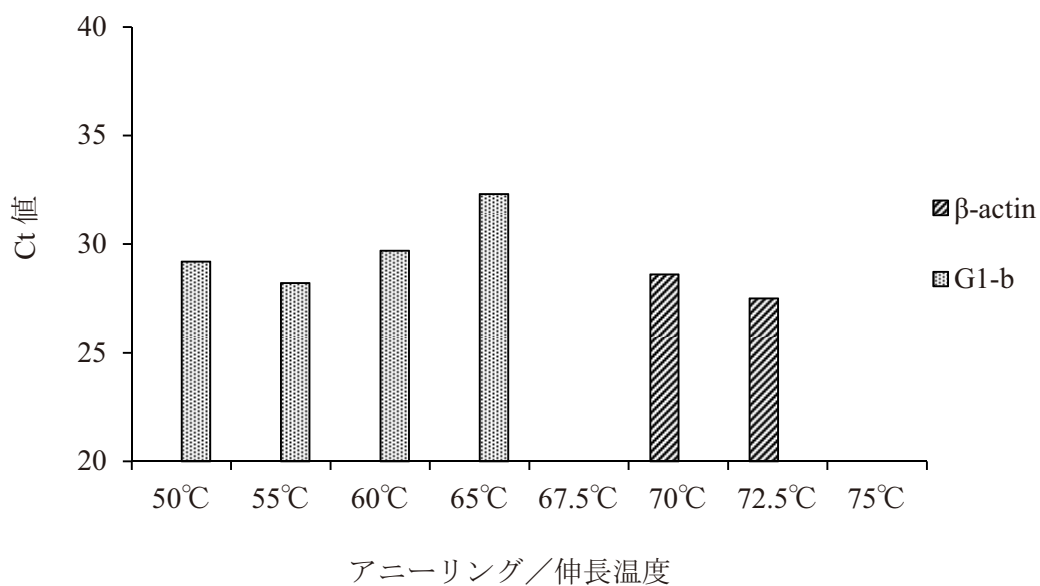


図 5-6 昇降式 PCR 装置を用いた各プライマーの最適なアニーリング/伸長温度

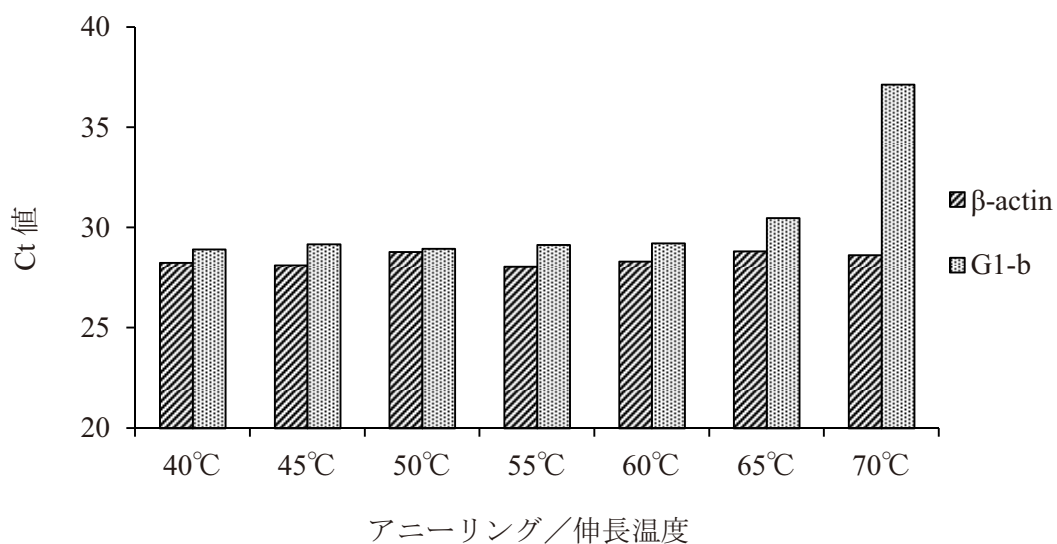


図 5-7 従来式 PCR 装置を用いた各プライマーの最適なアニーリング/伸長温度

2) Sequential PCR

β -actin とノロウイルス G1-b を標的遺伝子として、昇降式 PCR 装置と従来式 PCR 装置で Sequential PCR を行った。アニーリング/伸長温度は、実験結果から、 β -actin が 72.5°C、ノロウイルス G1-b が 55°C とした。First PCR をアニーリング/伸長温度 72.5°C で 40 サイクル行った後、Second PCR をアニーリング/伸長温度 55°C で 40 サイクル行った。標的遺伝子である各プラスミド以外の反応試薬の組成は全て同じであり、 β -actin プラスミドのみが入った試薬、ノロウイルス G1-b プラスミドのみが入った試薬、 β -actin プラスミドとノロウイルス G1-b プラスミドの両方が入った試薬を用意した。

結果、昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR では、2 つの遺伝子の有無を個々に判別可能であった (図 5-8)。 β -actin プラスミドのみが入った試薬では、 β -actin の反応に最適なアニーリング/伸長温度 72.5°C である First PCR でのみ増幅が認められた。反応温度範囲外である Second PCR では増幅がなく、増幅曲線は水平のままであり、増幅していないと考えられる。G1-b プラスミドのみが入った試薬では、アニーリング/伸長温度範囲外である First PCR では増幅がなく増幅曲線は水平のままであった。G1-b の反応に最適なアニーリング/伸長温度 55°C である Second PCR になってから立ち上がり、増幅が認められた。また、 β -actin と G1-b の両方のプラスミドが入った試薬では、First PCR、Second PCR の両方で個々に立ち上がりを示し、2 つの遺伝子が個々に増幅していると考えられる。First PCR の 72.5°C から Second PCR への降温時間を含め、Sequential PCR の時間にかかった 29 分間であった。

一方、従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR では、2 つの遺伝子の有無を、個々に判別することができなかった。図 5-9 の通り、両方の遺伝子が同時に増幅していると考えられる増幅曲線であった。従来式 PCR 装置では、最も高速な条件で反応させた場合でも、1 つのヒートブロックを用いているために温度の昇降が緩慢となり、その間に 2 つの遺伝子の増幅が進み、2 つの遺伝子の有無を正確に検出することはできなかったと考えられる。

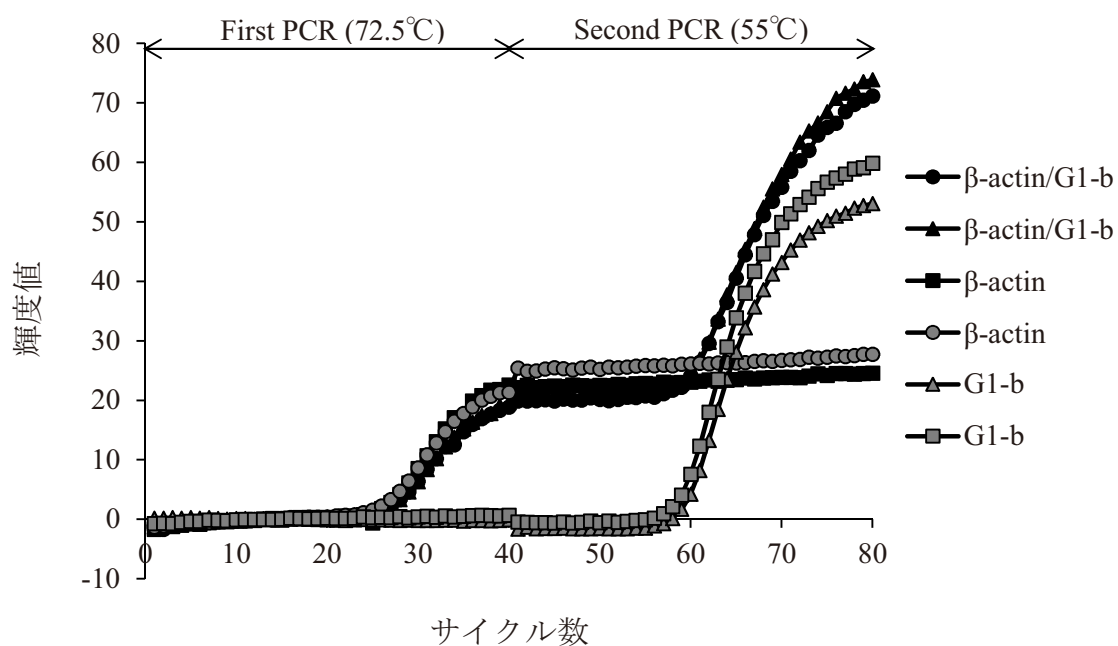


図 5-8 昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR

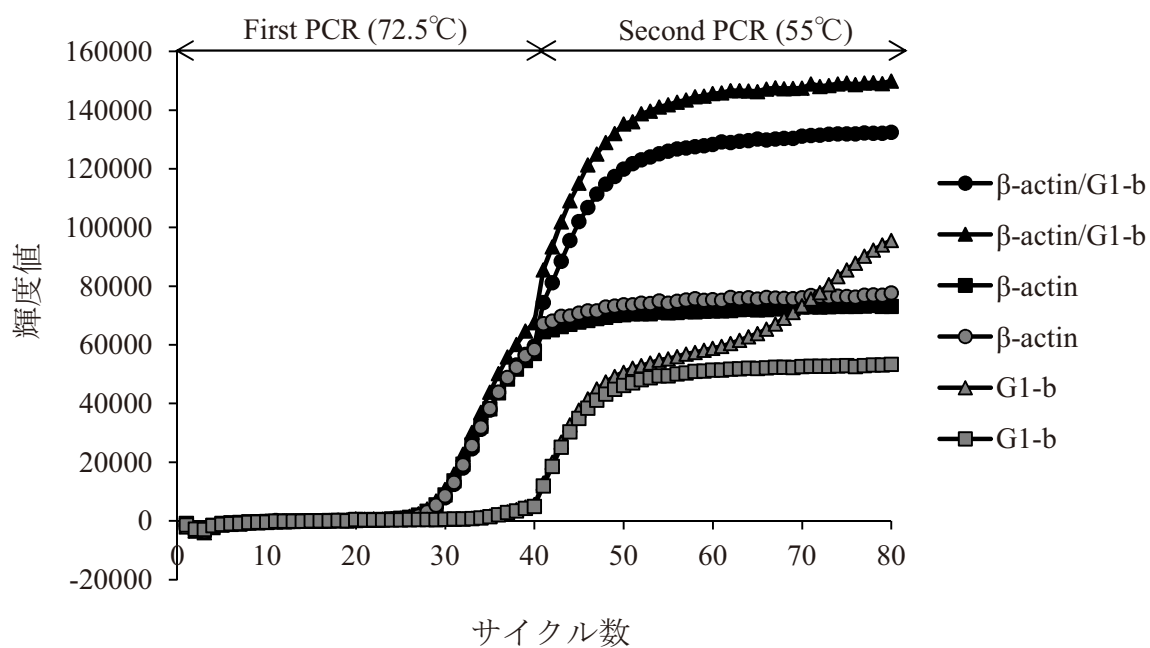


図 5-9 従来式 PCR 装置を用いた Sequential PCR

5.3.4 まとめ

本研究では、高速な熱サイクルが可能な昇降式 PCR 装置の特徴を活かした遺伝子検査方法である Sequential PCR を構築することができた。昇降式 PCR 装置を用いた高速条件での PCR において、各遺伝子の増幅可能な温度領域が狭まる特徴を利用した Sequential PCR は、反応温度が異なる PCR を連続して行うことで、1つの反応液から複数の遺伝子を検出可能にした。遺伝子検査には、標的とする遺伝子以外に、PCR の反応系の確認や、抽出した核酸が PCR に十分量投入されたか確認するために、コントロールが必要となる。ヒトの検体の場合、ヒトの細胞に含まれている β -actin 遺伝子などの内因性コントロール遺伝子を用いている。従って、遺伝子検査は2つ以上の遺伝子を検出することが多く、迅速な熱サイクルが可能な昇降式 PCR 装置で連続して複数回の PCR を行ったとしても、許容できる時間内に検査を終了することができる。本実験の場合、温度の昇降温時間を含めて29分間であった。反応条件や増幅領域を短くするなどの最適化により、さらなる高速化が可能だと考えられる。

昇降式 PCR 装置を用いた Sequential PCR の検出系は1つでよいため、検出系の構築としての装置側のコストを下げることも期待される。従来式 PCR 装置を用いた Multiplex PCR で使用される多検出系のように、各検出系の感度を揃える必要もない。以上より、装置の構成やシステムが単純構成となり、装置設計、装置価格を抑えられると考えられる。

本実験では、ヒートブロックが1つの従来式 PCR 装置では不可能な Sequential PCR を2つの遺伝子で構築したが、増幅可能な温度領域が重ならないようにプライマーとプローブの設計をすることで、3つ以上の遺伝子でも原理的に可能である。今後は、プライマーやプローブの配列の長さや T_m 値を考慮しながら、3つ以上の遺伝子を検出できる反応系の構築を検討し、検出系が構築できれば Sequential PCR の機能をより向上させることができるだろう。

5.4 まとめ

本章では、第4章で開発した昇降式 PCR 装置を用い、温度特異的な昇降式 PCR の特徴を活かして One-step RT-nested PCR と Sequential PCR へ応用実験を行い、その有用性を実証した。One-step RT-nested PCR と Sequential PCR は迅速な熱サイクルと温度特異的な反応が必要であり、昇降式 PCR 装置だからこそ実現した方法であった。従来式の方法、装置では実現できなかった遺伝子検査方法を構築できたことは、昇降式 PCR 装置が遺伝子検査装置として非常に特徴的な装置であることを示している。

昇降式 PCR を用いた応用開発は、信州大学医学部附属病院臨床検査部において進めており、その研究成果として、一塩基変異の検出法の構築や^{63, 64)}、様々な標的遺伝子の検出法の構築挙げられる⁶⁵⁻⁶⁸⁾。これらの研究において、昇降式 PCR は従来式の PCR と比較され、非常に短時間で検査が可能であることを実証している。

迅速化が進む遺伝子検査領域において、迅速な PCR を実行できる昇降式 PCR 装置は、非常に有用であり、様々な分野で必要とされる装置となると期待される。

第 6 章

結論

第6章 結論

6.1 本論文のまとめ

本論文は、昇降式 PCR を用いた遺伝子検査装置の高性能化に関する研究として、迅速、簡単な遺伝子検査装置の開発を目的とした。遺伝子検査を構成している核酸抽出については自動核酸抽出装置、核酸増幅・検出については昇降式 PCR 装置を開発し、各装置の性能評価を行った。応用開発では、昇降式 PCR 装置を用いた新たな遺伝子検査法を構築した。本論文では、装置開発と応用開発を合わせて遺伝子検査装置の高性能化を実現し、以下に研究成果を示す。

6.1.1 自動核酸抽出装置の開発

複数のステップから構成される核酸抽出作業を自動化、迅速化するために、磁性シリカビーズが「揺動」という特徴的な動きをする自動核酸抽出装置を開発した。「揺動」の最適化により、磁性シリカビーズの移動速度を 1 mm/sec、振動周波数を 5 Hz に実験から決定した。磁性シリカビーズの「揺動」を用いた自動核酸抽出装置による核酸抽出は、手作業の核酸抽出法や従来式の自動核酸抽出装置と同等の洗浄効果、検出限界であった。さらに、開発した自動核酸抽出装置を用いた核酸抽出の所要時間は 3 分間であり、手作業による核酸抽出のおよそ 30 分間、従来式の自動核酸抽出装置による核酸抽出のおよそ 1 時間と比較して、劇的に所要時間を短縮した。

6.1.2 昇降式 PCR 装置の開発

高速 PCR を実現する昇降式 PCR 装置を開発した。2つのヒートブロックを用いた構造により、ヒートブロックの温度を PCR に必要な2つの温度へ昇温・降温する必要がないことから、PCR の所要時間を劇的に短縮した。昇降式 PCR 装置は、従来式 PCR 装置と同等の検出限界であった。従来式 PCR 装置では 48 分間かかる 50 サイクルの PCR を、昇降式 PCR 装置を用いることにより 22 分間に短縮でき、高速条件で 9.4 分間に短縮できた。また、40 サイクルでの所要時間は 7.5 分間であった。このような短時間での PCR の実行は、従来式 PCR 装置では実現不可能なことであり、開発した昇降式 PCR 装置は、従来式 PCR 装置の性能を遥かに凌ぐものであることを実証した。

6.1.3 昇降式 PCR の応用開発

(1) One-step RT-nested PCR の構築

昇降式 PCR 装置を用いた応用開発として、高感度な遺伝子検査法 One-step RT-nested PCR を構築した。RT nested PCR は、3つの反応が必要な遺伝子検査法であるが、複数回の試薬調整や、試薬調整に伴うコンタミネーションの課題があった。そこで、3ステップの反応を1つの反応液で実行できる試薬、反応系を構築した。昇降式 PCR 装置にセットされた反応液は、温度間の移動に時間がかからないため、ほぼ設定温度に曝される。反応液をアニーリング／伸長温度に厳密に曝することができる特徴を利用して、連続した3つの反応を1つの反応液で実現した。従来の3ステップの RT nested PCR は、電気泳動を含め6時間かかっていたが、本方法を利用することで、40分間まで短縮ができた。さらに、1ステップにすることで、標的遺伝子を全て反応に持ち込めるため、従来法と比較して1,000倍高感度であった。

(2) Sequential PCR の構築

昇降式 PCR 装置を用いた応用開発として、1つの反応液から複数の遺伝子を連続して検出できる遺伝子検査方法 Sequential PCR を構築した。昇降式 PCR 装置を用いた高速条件での PCR では、反応液が設定温度以外に曝される時間が非常に短時間のため、各遺伝子の増幅可能なアニーリング／伸長温度領域は狭まる。この特徴を利用し、アニーリング／伸長温度領域が重ならないプライマーを用いた PCR を連続して行うことで、1つの反応液から複数の遺伝子を連続して検出することを実証した。本方法は、従来式 PCR 装置においては実現できず、温度特異性の高い昇降式 PCR 装置を用いたことにより、実現できた。今まで複数の遺伝子を検査するためには、貴重で量が限られた臨床検体の分割使用や、臨床検体を複数回採取することで対応していたが、1つの反応液から複数の遺伝子を検査できれば、患者の負荷軽減、正確な検査結果などメリットが大きい。また、蛍光検出系は1つで十分であるため、複数の検出系を必要とする既存の Multiplex PCR と比較して、装置のコストも低減できると考えられる。

6.2 将来の展望

昇降式 PCR 装置を用いた研究は、信州大学医学部附属病院臨床検査部との共同研究として進められている。信州大学医学部附属病院臨床検査部では、既に昇降式 PCR 装置を用いて、インフルエンザウイルス、マイコプラズマ菌、PML-RARA、SNP など、様々な標的遺伝子を迅速に検出ができることを実証している⁶³⁻⁶⁸。本論文の研究においては、昇降式 PCR 装置の

基礎評価と新しい応用展開（One-step RT-nested PCR、Sequential PCR）が試みられた。昇降式 PCR が従来式の PCR と同等の検出限界を持ち、かつ迅速な反応時間で PCR が可能なことが、様々な実験データから実証した。

本研究では、迅速で簡単な自動核酸抽出装置と、高速 PCR を実現する昇降式 PCR 装置を開発し、評価した。従来の方法と同等の性能を保ちながら、核酸抽出は 3 分間、PCR は 7.5 分間で、実行できることを実証した。現在は別々の装置であるが、将来はこの 2 つの装置を一体化させる予定であり、自動核酸抽出装置で用いたカートリッジの溶出液が入るチャンバーは、昇降式 PCR 装置にセットできる形状に設計した。一体化装置が開発できれば、現状の確認できている性能のみで、11 分で遺伝子検査結果がわかる装置となるだろう。

将来は、装置の様々な動き、試薬の組成等をより最適化や改良し、トータルで 10 分以内の遺伝子検査装置の開発を目指す。サンプルをカートリッジにセットし、装置の「スタートボタン」を押すだけで遺伝子検査結果が 10 分以内にわかる装置が開発、製品化できれば、遺伝子検査は専門技術者がいない場所でも可能な検査となる。例えば医療の領域では、診察室で患者を目の前にしながら、診察中に遺伝子検査が可能となり、より正確な診断が可能となる。感染症の場合、起因病原体を正確に特定することにより、検査の感度や時間が理由で処方されてきた不必要な薬の処方を防ぎ、適切な薬のみを処方することができる。SNPs 検査により薬の効きやすさ、体質などもわかれば、個人に最適な治療方法「オーダーメイド医療」も実現するだろう。また、癌の領域においては分子標的薬の開発が進んでおり、複数の分子標的薬が使用できるようになってきた。診察中、手術中に分子標的薬の使用が可能かすぐにわかれば、治療方針もより適切な内容となり、予後にも影響を与えるだろう。さらに、医療以外の領域でも使用されることが予想され、空港での迅速感染症検査、家畜の伝染病検査、食品工場での管理検査、犯罪捜査など、迅速な遺伝子検査は幅広い分野で活用されていくと期待される。

参考文献

- [1] JCCLS 日本臨床検査標準協議会, “遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン”, 2010.
- [2] 大楠清文, 江崎孝行, “感染症診断における遺伝子解析技術の適応”, 日本臨床微生物学雑誌, vol.18, 2008.
- [3] 日本医学会, “医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン”, 2011.
- [4] 日本衛生検査所協会, “第7回遺伝子・染色体検査アンケート調査報告書”, 2014.
- [5] 渡邊淳, “ファーマコゲノミクス (PGx) とオーダーメイド医療”, 日本医科大学医学会雑誌, vol.8, pp.9-17, 2012.
- [6] オーダーメイド医療の実現プログラムの在り方検討会, “オーダーメイド医療の実現プログラムの在り方に関する検討会報告書”, 2012.
- [7] M. Karle, J. Miwa, G. Czilwik, V. Auwärter, G. Roth, R. Zengerle and F. von Stetten, “Continuous microfluidic DNA extraction using phase-transfer magnetophoresis”, Lab on a Chip, vol.10, pp.3284-3290, 2010.
- [8] S. M. Berry, E. T. Alarid and D. J. Beebe, “One-step purification of nucleic acid for gene expression analysis via Immiscible Filtration Assisted by Surface Tension (IFAST)”, Lab on a Chip, vol.11, pp.1747-1753, 2011.
- [9] J. Siegrist, R. Gorkin, M. Bastien, G. Stewart, R. Peytavi, H. Kido, M. Bergeron and M. Madou, “Validation of a centrifugal microfluidic sample lysis and homogenization platform for nucleic acid extraction with clinical samples”, Lab on a Chip, vol.10, pp.363-371, 2010.
- [10] W. Gan, B. Zhuang, P. Zhang, J. Han, C. Li and P. Liu, “A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated DNA extraction and amplification from diverse sample types”, Lab on a Chip, vol.14, pp. 3719-3728, 2014.
- [11] L. Van Heirstraeten, P. Spang, C. Schwind, K. S. Drese, M. Ritzi-Lehnert, B. Nieto, M. Camps, B. Landgraf, F. Guasch, A. Homs Corbera, J. Samitier, H. Goossens, S. Malhotra-Kumar and T. Roeser, “Integrated DNA and RNA extraction and purification on an automated microfluidic cassette from bacterial and viral pathogens causing community-acquired lower respiratory tract infections”, Lab on a Chip, vol.14, pp.1519-1526, 2014.
- [12] M. C. Breadmore, K. A. Wolfe, I. G. Arcibal, W. K. Leung, D. Dickson, B. C. Giordano, M. E. Power, J. P. Ferrance, S. H. Feldman, P. M. Norris and J. P. Landers, “Microchip-based

- purification of DNA from biological samples”, *Analytical Chemistry*, vol.75, pp.1880-1886, 2003.
- [13] M. Mahalanabis, H. Al-Muayad, M. D. Kulinski, D. Altman and C. M. Klapperich, “Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram-negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip”, *Lab on a Chip*, vol.9, pp.2811-2817, 2009.
- [14] J. S. Farrar and C. T. Wittwer, “Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15–60 seconds”, *Clinical Chemistry*, vol.61, pp.145-153, 2015.
- [15] J. H. Son, B. Cho, S. Hong, S. H. Lee, O. Hoxha, A. J. Haack and L. P. Lee, “Ultrafast photonic PCR”, *Light: Science & Applications*, vol.4, pp.e280, 2015.
- [16] T. Sakamoto, M. Kodani, M. Takata, H. Chikumi, M. Nakamoto, S. Nishii-Ito, Y. Ueda, H. Izumi, H. Makino, H. Touge, K. Takeda, A. Yamasaki, M. Yanai, N. Tanaka, T. Igishi and E. Shimizu, “A novel point-of-care system for high-speed real-time polymerase chain reaction testing for epidermal growth factor receptor mutations in bronchial lavage fluids after transbronchial biopsy in patients with non-small cell lung cancer”, *International Journal of Oncology*, vol.46, pp.1473-1480, 2015.
- [17] P. Neuzil, C. Zhang, J. Pipper, S. Oh and L. Zhuo, “Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes”, *Nucleic Acids Research*, vol.34, pp.e77, 2006.
- [18] T. Ohashi, H. Kuyama, N. Hanafusa and Y. Yogawa, “A simple device using magnetic transportation for droplet-based PCR”, *Biomedical Microdevices*, vol.9, pp.695-702, 2007.
- [19] C. Zhang and D. Xing, “Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends”, *Nucleic Acids Research*, vol.35, pp.4223-37, 2007.
- [20] M. G. Roper, C. J. Easley and J. P. Landers, “Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips”, *Analytical Chemistry*, vol.77, pp.3887-3894, 2005.
- [21] E. K. Wheeler, C. A. Hara, J. Frank, J. Deotte, S. B. Hall, W. Benett, C. Spadaccini and N. R. Beer, “Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification”, *Analyst*, vol.136, pp.3707-3712, 2011.
- [22] Y. Fuchiwaki, H. Nagai, M. Saito and E. Tamiya, “Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol.27, pp.88-94, 2011.
- [23] M. Hashimoto, P. C. Chen, M. W. Mitchell, D. E. Nikitopoulos, S. A. Soper and M. C. Murphy, “Rapid PCR in a continuous flow device”, *Lab on a Chip*, vol.4, pp.638-645, 2004.
- [24] Y. Zhang, S. Park, S. Yang and T. H. Wang, “An all-in-one microfluidic device for parallel DNA

- extraction and gene analysis”, *Biomedical Microdevices*, vol.12, pp.1043-1049, 2010.
- [25] C. J. Easley, J. M. Karlinsey, J. M. Bienvenue, L. A. Legendre, M. G. Roper, S. H. Feldman, M. A. Hughes, E. L. Hewlett, T. J. Merkel, J. P. Ferrance and J. P. Landers, “A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in–answer-out capability”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.103, pp.19272-19277, 2006.
- [26] M. A. Poritz, A. J. Blaschke, C. L. Byington, L. Meyers, K. Nilsson, D. E. Jones, S. A. Thatcher, T. Robbins, B. Lingenfelter, E. Amiott, A. Herbener, J. Daly, S. F. Dobrowolski, D. H. F. Teng and K. M. Ririe, “FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection”, *PloS One*, vol.6, pp.e26047, 2011.
- [27] J. Pipper, Y. Zhang, P. Neuzil and T. M. Hsieh, “Clockwork PCR including sample preparation”, *Angewandte Chemie International Edition*, vol.47, pp.3900-3904, 2008.
- [28] G. R. M. Duarte, C. W. Price, B. H. Augustine, E. Carrilho and J. P. Landers, “Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip”, *Analytical Chemistry*, vol.83, pp.5182-5189, 2011.
- [29] P. Chomczynski and N. Sacchi, “The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on”, *Nature Protocols*, vol.1, pp.581-585, 2006.
- [30] R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa, “Rapid and simple method for purification of nucleic acids”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.28, pp.495-503, 1990.
- [31] H. N. Endres, J. A. C. Johncon, C. A. Ross, J. K. Welp and M. R. Etzel, “Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol.37, pp.259-266, 2003.
- [32] R. P. Alderton, L. M. Eccleston, R. P. Howe, C. A. Read, M. A. Reeve and S. Beck, “Magnetic bead purification of M13 DNA sequencing templates”, *Analytical Biochemistry*, vol.201, pp.166-169, 1992.
- [33] C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne, “PCR inhibitors-occurrence, properties and removal”, *Journal of Applied Microbiology*, vol.113, pp.1014-1026, 2012.
- [34] W. A. Al-Soud and P. Rådström, “Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.39, pp.485-493, 2001.
- [35] 養王田正文, “もっと知りたい！PCR 実験”, 講談社, 2010.

- [36] 北條浩彦, “原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド”, 羊土社, 2008.
- [37] 日野原正, “臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科全書 第6巻B 鼻・副鼻腔2”, 金原出版, 1989.
- [38] 奥田稔, “鼻とアレルギー 基礎と臨床”, 医薬ジャーナル社, 1999.
- [39] M. Welti, K. Jatton, M. Altwegg, R. Sahli, A. Wenger and J. Bille, “Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol.45, pp.85-95, 2003.
- [40] C. R. Reedy, C. W. Price, J. Sniegowski, J. P. Ferrance, M. Begley and J. P. Landers, “Solid phase extraction of DNA from biological samples in a post-based, high surface area poly (methyl methacrylate) (PMMA) microdevice”, *Lab on a Chip*, vol.11, pp.1603-1611, 2011.
- [41] J. J. Benítez, J. Topolancik, H. C. Tian, C. B. Wallin, D. R. Latulippe, K. Szeto, P. J. Murphy, B. R. Cipriany, S. L. Levy, P. D. Soloway and H. G. Craighead, “Microfluidic extraction, stretching and analysis of human chromosomal DNA from single cells”, *Lab on a Chip*, vol.12, pp.4848-4854, 2012.
- [42] P. C. Thomas, L. N. Strotman, A. B. Theberge, E. Berthier, R. O’Connell, J. M. Loeb, S. M. Berry and D. J. Beebe, “Nucleic acid sample preparation using spontaneous biphasic plug flow”, *Analytical Chemistry*, vol.85, pp.8641-8646, 2013.
- [43] L. A. Marshall, C. M. Han and J. G. Santiago, “Extraction of DNA from malaria-infected erythrocytes using isotachopheresis”, *Analytical Chemistry*, vol.83, pp.9715-9718, 2011.
- [44] L. Kashkary, C. Kemp, K. J. Shaw, G. M. Greenway and S. J. Haswell, “Improved DNA extraction efficiency from low level cell numbers using a silica monolith based micro fluidic device”, *Analytica Chimica Acta*, vol.750, pp.127-131, 2012.
- [45] X. Chen, D. Cui, C. Liu, H. Li and J. Chen, “Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification”, *Analytica Chimica Acta*, vol.584, pp.237-243, 2007.
- [46] J. Costa, I. Mafra, T. Kuchta and M. B. P. P. Oliveira, “Single-tube nested real-time PCR as a new highly sensitive approach to trace hazelnut”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.60, pp.8103-8110, 2012.
- [47] C. Atkinson, V. C. Emery and P. D. Griffiths, “Development of a novel single tube nested PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots”, *Journal of Virological Methods*, vol.196, pp.40-44, 2014.
- [48] L. N. Sellner, R. J. Coelen and J. S. Mackenzie, “A one-tube, one manipulation RT-PCR

- reaction for detection of Ross River virus”, *Journal of Virological Methods*, vol.40, pp.255-263, 1992.
- [49] C. Van Eeden, D. Zaayman and M. Venter, “A sensitive nested real-time RT-PCR for the detection of Shuni virus”, *Journal of Virological Methods*, vol.195, pp.100-105, 2014.
- [50] L. N. Sellner, R. J. Coelen and J. S. Mackenzie, “Sensitive detection of Ross River virus — a one-tube nested RT-PCR”, *Journal of Virological Methods*, vol.49, pp.47-58, 1994.
- [51] A. Olmos, M. Cambra, O. Esteban, M. T. Gorrís and E. Terrada, “New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube”, *Nucleic Acids Research*, vol.27, pp.1564-1565, 1999.
- [52] E. Bertolini, A. Olmos, M. M. López and M. Cambra, “Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees”, *Phytopathology*, vol.93, pp.286-292, 2003.
- [53] N. T. Jou, R. B. Yoshimori, G. R. Mason, J. S. Louie and M. R. Liebling, “Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.35, pp.1161-1165, 1997.
- [54] J. S. Chamberlain, R. A. Gibbs, J. E. Ranier, P. N. Nguyen and C. T. Caskey, “Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification” *Nucleic Acids Research*, vol.16, pp.11141-11156, 1988.
- [55] J. Mahony, S. Chong, F. Merante, S. Yaghoubian, T. Sinha, C. Lisle and R. Janeczko, “Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.45, pp.2965-2970, 2007.
- [56] S. Bellau-Pujol, A. Vabret, L. Legrand, J. Dina, S. Gouarin, J. Petitjean-Lecherbonnier, B. Pozzetto, C. Ginevra and F. Freymuth, “Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses”, *Journal of Virological Methods*, vol.126, pp.53-63, 2005.
- [57] J. Alvarez, M. Sota, A.B. Vivanco, I. Perales, R. Cisterna, A. Rementeria and J. Garaizar, “Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.42, pp.1734-1738, 2004.
- [58] F. Merante, S. Yaghoubian and R. Janeczko, “Principles of the xTAG™ respiratory viral panel

- assay (RVP assay)", *Journal of Clinical Virology*, vol.40, pp.S31-S35, 2007.
- [59] J. Gabert, E. Beillard, V. H. J. van der Velden, W. Bi, D Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cavé, F. Pane, J. L. E. Aerts, D. De Micheli, X. Thirion, V Pradel, M. González, S. Viehmann, M. Malec, G. Saglio and J. J. M. van Dongen, "Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program", *Leukemia*, vol.17, pp.2318-2357, 2003.
- [60] C. Dierkes, B. Ehrenstein, S. Siebig, H. J. Linde, U. Reischl and B. Salzberger, "Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis", *BMC Infectious Diseases*, vol.9, pp.126, 2009.
- [61] E. Beillard, N. Pallisgaard, V. H. J. van der Velden, W. Bi, R. Dee, E. van der Schoot, E. Delabesse, E. Macintyre, E. Gottardi, G. Saglio, F. Watzinger, T. Lion, J. J. M. van Dongen, P. Hokland and J. Gabert, "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program", *Leukemia*, vol.17, pp.2474-2486, 2003.
- [62] T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda and K. Katayama, "Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR", *Journal of Clinical Microbiology*, vol.41, pp.1548-1557, 2003.
- [63] C. Taira, K. Matsuda, A. Yamaguchi, A. Sueki, H. Koeda, F. Takagi, Y. Kobayashi, M. Sugano and T. Honda, "Novel high-speed droplet-allele specific-polymerase chain reaction: Application in the rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms", *Clinica Chimica Acta*, vol.424, pp.39-46, 2013.
- [64] C. Taira, K. Matsuda, A. Yamaguchi, M. Uehara, M. Sugano, N. Okumura and T. Honda, "Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR", *Clinica Chimica Acta*, vol.445, pp.101-106, 2015.
- [65] K. Matsuda, A. Yamaguchi, C. Taira, A. Sueki, H. Koeda, F. Takagi, M. Sugano and T. Honda, "A novel high-speed droplet-polymerase chain reaction can detect human influenza virus in less than 30min", *Clinica Chimica Acta*, vol.413, pp.1742-1745, 2012.
- [66] A. Sueki, K. Matsuda, C. Taira, A. Yamaguchi, H. Koeda, F. Takagi, Y. Kobayashi, M. Sugano

- and T. Honda, "Rapid detection of *PML-RARA* fusion gene by novel high-speed droplet-reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Possibility for molecular diagnosis without lagging behind the morphological analyses", *Clinica Chimica Acta*, vol.415, pp.276-278, 2013.
- [67] S. Shigeto, K. Matsuda, A. Yamaguchi, A. Sueki, M. Uehara, M. Sugano, T. Uehara and T. Honda, "Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia with the *PML-RARA* fusion gene using a combination of droplet-reverse transcription-polymerase chain reaction and instant-quality fluorescence in situ hybridization", *Clinica Chimica Acta*, vol.453, pp.38-41, 2016.
- [68] A. Sueki, K. Matsuda, A. Yamaguchi, M. Uehara, M. Sugano, T. Uehara and T. Honda, "Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays", *Clinica Chimica Acta*, vol.453, pp.71-74, 2016.

本研究に関する発表

論文発表

- A. Yamaguchi, K. Matsuda, A. Sueki, C. Taira, M. Uehara, Y. Saito and T. Honda, “Development of a rapid and sensitive one-step reverse transcription-nested polymerase chain reaction in a single tube using the droplet-polymerase chain reaction machine”, *Clinica Chimica Acta*, vol.448, pp.150-154, 2015.
- A. Yamaguchi, K. Matsuda, M. Uehara, T. Honda and Y. Saito, “A novel automated device for rapid nucleic acid extraction utilizing a zigzag motion of magnetic silica beads”, *Analytica Chimica Acta*, vol.906, pp.1-6, 2016.

国際会議プロシーディング

- A. Yamaguchi, F. Takagi, K. Kobayashi, T. Honda and Y. Saito, “Simple gene testing method using an automated nucleic acid purification device and a micro chamber array”, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, pp.738-741, 2013.

昇降式 PCR に関するその他の論文

論文発表

- K. Matsuda, A. Yamaguchi, C. Taira, A. Sueki, H. Koeda, F. Takagi, M. Sugano and T. Honda, “A novel high-speed droplet-polymerase chain reaction can detect human influenza virus in less than 30min”, *Clinica Chimica Acta*, vol.413, pp.1742-1745, 2012.
- A. Sueki, K. Matsuda, C. Taira, A. Yamaguchi, H. Koeda, F. Takagi, Y. Kobayashi, M. Sugano and T. Honda, “Rapid detection of PML-RARA fusion gene by novel high-speed droplet-reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Possibility for molecular diagnosis without lagging behind the morphological analyses”, *Clinica Chimica Acta*, vol.415, pp.276-278, 2013.
- C. Taira, K. Matsuda, A. Yamaguchi, A. Sueki, H. Koeda, F. Takagi, Y. Kobayashi, M. Sugano and T. Honda, “Novel high-speed droplet-allele specific-polymerase chain reaction: Application in the rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms”, *Clinica Chimica Acta*, vol.424, pp.39-46, 2013.
- C. Taira, K. Matsuda, A. Yamaguchi, M. Uehara, M. Sugano, N. Okumura and T. Honda, “Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR”, *Clinica Chimica Acta*, vol.445, pp.101-106, 2015.
- S. Shigeto, K. Matsuda, A. Yamaguchi, A. Sueki, M. Uehara, M. Sugano, T. Uehara and T. Honda, “Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia with the PML-RARA fusion gene using a combination of droplet-reverse transcription-polymerase chain reaction and instant-quality fluorescence in situ hybridization”, *Clinica Chimica Acta*, vol.453, pp.38-41, 2016.
- A. Sueki, K. Matsuda, A. Yamaguchi, M. Uehara, M. Sugano, T. Uehara and T. Honda, “Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays”, *Clinica Chimica Acta*, vol.453, pp.71-74, 2016.

謝辞

本研究の遂行および学位論文をまとめるにあたり、多くの方々からご支援とご指導を賜りました。心から御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、ご指導ならびにご教示を賜りました信州大学学術研究院（工学系） 齊藤保典教授に深く感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本論文を審査いただきました信州大学学術研究院（医学系） 本田孝行教授、信州大学学術研究院（工学系） 天野良彦教授、信州大学学術研究院（工学系） 佐藤敏郎教授、信州大学学術研究院（繊維学系） 石澤広明教授には貴重な御助言ならびに御指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行し投稿論文をまとめるにあたり、信州大学医学部附属病院臨床検査部 松田和之副技師長には、研究に対する考え方、進め方、そして論文のまとめ方について多大な御指導、御助言ならびに御支援を賜りました。ここに、深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、信州大学医学部附属病院 臨床検査部の皆様には、専門的な御助言ならびに御協力をいただきました。その中でも平千明氏、末木茜氏には博士課程の学生として互いに激励し合い、公私にわたり多くの御支援をいただきました。皆様の研究に取り組む姿勢に刺激を受け、私は最後までやり遂げることができました。心より感謝致します。

社会人博士課程への進学のお機会を与えていただき終始御支援をいただきましたセイコーエプソン株式会社 技術開発本部 元新領域開発センター部長 中澤尊史様、元コア技術開発センター部長 宮坂仁様、現コア技術開発センター部長 横山孝一郎様に深く感謝申し上げます。

社会人博士課程で研究を遂行するにあたりセイコーエプソン株式会社 技術開発本部 コア技術開発センター課長 高城富美男様をはじめ課の皆様、ならびに関係する皆様には、在学中様々な御配慮ならびに御協力をいただきました。皆様に深く感謝致します。

最後に、これまで支え続けてくれた家族に心より感謝致します。

平成 28 年 3 月

山口 明美