

一塩基多型センシングチップ — その場遺伝子情報解析の実現 —

Realizing Rapid On-site SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Diagnosis

山下 一郎 平岡 牧 田中 浩之
Ichiro Yamashita Maki Hiraoka Hiroyuki Tanaka

要 旨

薬の効き方や副作用などについて、患者から採取した1 μL程度の血液から短時間でその場で判断することを可能とする、遺伝子検査用マイクロ流体チップを開発している。チップの鍵となる要素は、ポリマーアクチュエータによるメガパスカル級の高発生力ポンプと、長さが異なるDNA (Deoxyribonucleic acid) 断片を数秒で分別可能なSiナノピラー DNAフィルター、温度制御が最適化されたDNA増幅 (PCR: Polymerase Chain Reaction) 部、および一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) センサである。これらの構成部品は設計により小型化が可能でワンチップに統合搭載することができる。

Abstract

A microfluidic chip for genetic diagnosis using a microliter of blood is proposed. It enables rapid and on-site diagnosis concerning the effectiveness and/or side effects of a medicine for a patient. The key components of the chip are micro-pumps based on conductive polymer actuation, generating MPa-order high pressure, a DNA separation filter consisting of an ordered array of Si micro-pillars enabling separation of DNA segments with different lengths in few seconds, a micro Polymerase Chain Reaction (PCR) that multiplies DNA segments by optimized heating/cooling control, and a sensor for detecting a Single Nucleotide Polymorphism (SNP). These microfluidic components can be miniaturized with integrated design and mounted to a small chip.

1. はじめに

医療の高度化に伴い、高度の医学的、分子生物学的、生化学的等の知見を総合的に利用した薬効の高い薬が開発され、これまで治療困難であった多くの疾病が治療可能となってきた。しかし、臨床によるあらかじめの検査知見にもかかわらず、副作用による患者への不利益が生じているのも事実である。そのため薬の開発、投薬において薬効だけでなくその副作用をあらかじめ推測し逃れることが、医療より求められている。

これまでの研究から薬の利き方や副作用の個人差の多くが遺伝子レベルでの差異で引き起こされることが分かってきた。遺伝子の実体は、4種類の塩基、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) が、糖、リン酸と結合して作る4種類のヌクレオチドが、一本の鎖のようにリン酸部でつながったものが、さらに塩基結合により2本らせん状により合わさった2重らせん構造体である。結合する2本鎖の核酸は、AはTとCはGとだけ結合する相補的結合と呼ばれる特徴的な塩基対を作り、遺伝子情報が保存されている。ヒトの遺伝子ではこの塩基対が約30億個連なり、高度な機能情報が記録されている。

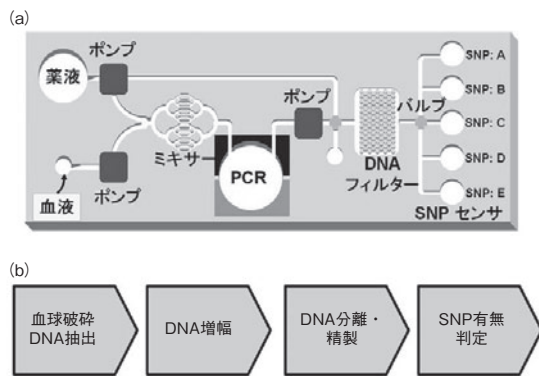
21世紀初頭のヒトゲノム計画により明らかになったヒトの遺伝子像の大きな特徴は、ヒトの遺伝子が全く同一で、一塩基に決まっているのではなく、個人の遺伝子は

多くのバリエーション (多型) をもっていることである。個人は遺伝子レベルで個性をもち、個人の体質はこの遺伝子の多型により決定され、種々の差異をもつようになっていく。

この遺伝子塩基配列の多型の頻度は比較的高く、1000塩基に1つ程度は個人により異なっていることが明らかになっている。この塩基が1つだけ異なったものを一塩基多型、英語名ではSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) と呼ぶ。一塩基多型は一見極めて小さな変化に思えるが、その場所によっては、この遺伝子に基づいて合成される最終的なタンパク質の性質を劇的に変化させ、その遺伝子をもつ個人の体質も大きく変化するなど、個人に決定的な影響を及ぼす。そして現在このSNPと薬効や副作用との関係が次第に明らかになってきている。[1]そのため、あらかじめ個人の体質をSNPにより確認し、その個人にあった薬の投与、治療が必要と認識され始めている。このような個人に合わせた医療はテーラーメイド医療といわれ、その実現が強く求められている。

2. 一塩基多型センシングチップの構成

一塩基多型を検出 (センシング) することは、現在の技術でも可能である。採取した患者の血液から、個人の遺伝子・DNAを抽出し、精製したDNAを解析してSNPを検出する。この検査は大型で高価なSNP解析装置を必



第1図 一塩基多型センシングチップの (a) 模式図, (b) 検出フローチャート

Fig. 1 (a) Schematic drawing of SNP detection chip and (b) functional blocks of SNP detection system

要とし、訓練を受けた人員が必要なため、検査機関が受託して行っているのが通常である。そのためSNP検査は患者より血液を採取してから数日の時間が必要で、医師による迅速な投薬判断の障害となっている。

そこで筆者らは血液からSNP判別まで、その場で数時間で行うことができるワンチップセンサの開発を、高度な半導体加工技術を有するimec（ベルギー）と進めている。これまでにimecとの共同研究成果はIEDM2010にても発表している[2]。第1図はそのワンチップ一塩基多型センシングチップのセンシングの流れを示す (a) 簡単なチップ模式図と、(b) フローチャートである。

まず約1 μL の血液と薬液とをポンプを用いてミキサーにより混合し、白血球を破碎して内部よりDNAを取り出す。その後このDNAから目的のSNPを含む領域のDNAを、PCR (Polymerase Chain Reaction) により遺伝子増幅する。このときDNAの長さを、それぞれ目的のSNPを含む領域ごとに異なるようにPCRを行う。次にこれらの長さの異なるDNA混合液から、高性能DNAフィルターを用いてDNAを長さごとに高精度に分離・精製し、それぞれ1つのSNPを含むDNAを1つのセンサ室に分取する。その後各センサ部分でSNPの有無を判別する。これにより1 μL の血液より目的のSNPの有無が判別できる。以下におおのこの構成部分について解説する。

3. 構成部品

この一塩基多型センシングチップは主要な構成部品として、ポンプ、PCR、DNAフィルター、SNPセンサ、マイクロチャンネル、ミキサー、などがあげられるが、以下にその中でも重要な主要部品について詳しく解説する。

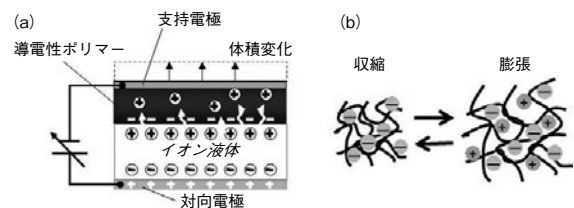
3.1 ポリマーアクチュエータポンプ

マイクロチャンネルを利用する分析システムでは、一般に成分抽出フィルターや、クロマトグラフィーなどの圧力抵抗が高い要素部品に試験液を流通させるために、1 MPa (10気圧) 程度の高い圧力で送液する能力が必要である。また、1時間以内で分析を完了するために、1 μL / 分以上の送液速度であることが望ましい。

筆者らは、独自開発の積層型ポリマーアクチュエータを動力源とする、チップへ搭載可能な小型の高性能マイクロ流体ポンプの開発を行った。このポンプは3 V以下の低電圧で動作し、電池による駆動が容易で、30気圧で2 μL / 分の流速を実現し、また、最大200 ~ 300気圧の非常に高圧発生が可能なのが特徴である。[3]

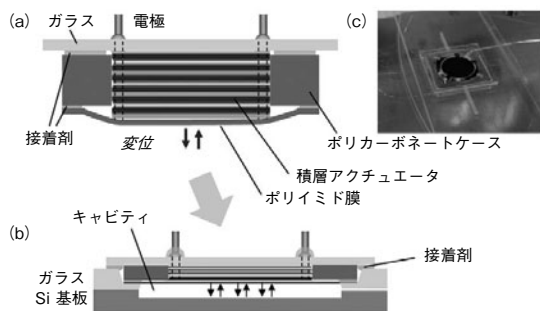
第2図にポリマーアクチュエータの構造と動作の仕組みを示す。平板状の導電性ポリマーが、一方の面に支持電極をもち、他方の面に電解質を挟んで対向電極と向き合った配置で構成されている。電圧印加により、電極表面に電解質イオンが引き寄せられて電気二重層が形成される。これにより導電性ポリマー側で電気化学反応が生じ、電圧の極性によって、イオンが吸収もしくは放出され、厚さ方向に体積変化が生じて動作する。第2図 (b) は、正イオンの入出により導電性ポリマーが伸縮する模式図で、イオンが高分子鎖間に静電相互作用で引き付けられ、その体積変化から強い力を発生する様子を示す。

このアクチュエータは、低電圧動作、高発生力、不揮発のイオン性液体を電解質に利用し小型化容易なこと、矩形電圧により安定した反復動作が可能の特徴をもち、ロボティクスの人工筋肉への応用も報告されている。[4] 今回チップへの実装に適した小面積で高発生力な小型高性能ポンプを実現するため、面内変位ができない様に無機金属の支持電極をポリマー上に形成する構成とし、体積変化をすべて面垂直方向の変位として取り出せるようにした。これにより、極めて高い発生力と大きな変異量が得られている。



第2図 導電性ポリマーアクチュエータの動作原理

(a) デバイス構造, (b) 収縮 / 伸張時の導電性ポリマー内の様子
Fig. 2 Operating principle of CP actuator, (a) device structure and electrical circuit for operation, (b) microscopic representation of shrinking/expanding cycle



第3図 ポンプの構造

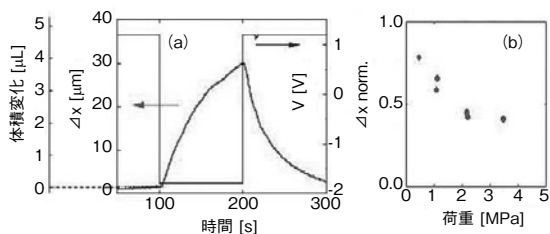
(a) 積層アクチュエータユニット, および (b) ポンプの断面図, (c) ポンプの写真

Fig. 3 Pump structure and picture, (a) schematic drawing of stacked CP actuator layers, (b) cross section of pump, (c) photograph of pump

第3図に開発した単層アクチュエータを8層積層したマイクロポンプを示す。導電性ポリマーとして膜厚70 μmのpoly(pyrrole) (PPy) - bis (trifluoromethylsulfonyl) imide (TFSI), =PPy-TFSIを使用し、電解質層にイオン液体1-ethyl-3-methyl -imidazolium (EMI) -TFSIを含浸させたキャパシタ紙、対向電極にはEMI-TFSI に対し体積変化を示さないPPy- dodecylbenzene-sulfonateを用いた。

積層アクチュエータ構造は、ケースのポリイミド膜の張力を利用したバネ構造により、上下より密着している。アクチュエータ部の直径は8 mm, ケース外寸13×13 mm, 厚さ1.3 mmである。第3図 (b) では、基板の溝にユニットを接着したポンプ全体の断面図を示している。これによる基板の総厚みの増加は0.5 mmであり、既存の外部接続式ポンプと比べて設置体積が極めて小さい。

このアクチュエータユニットの動作を変位計で測定した結果を第4図に示す。第4図 (a) では電圧印加によりPPy-TFSIの厚さの5%に相当する変位を示し、動作初期



第4図 8層積層アクチュエータユニットの動作

(a) 矩形電圧に対する変位量および体積変化の時間依存性
(b) 初期変位速度から見積もった初期体積変化率の荷重依存性

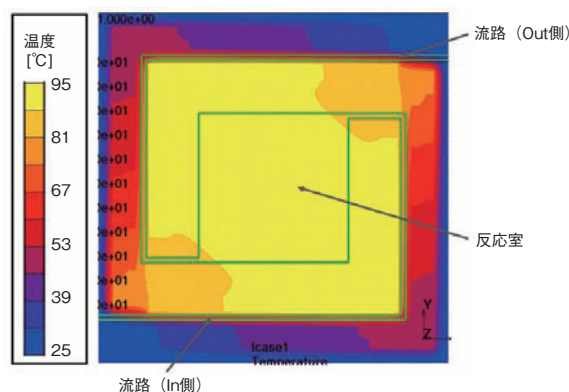
Fig. 4 Performance of pump with 8 stacked CP actuator layers, (a) displacement and cavity volume change against square wave voltage input, (b) initial cavity volume change dependence on load

の流速は4.6 μL /分, 100秒間で4 μL相当の体積変化を示した。また、第4図 (b) に荷重下での初期変位の体積変化率を示す。3 MPaにおいて2 μL /分程度であり、マイクロチャンネルセンサへの送液に十分である。このユニットをマイクロチャンネルチップ上に接着し、直径180 μmのキャピラリーへ接続した結果、平均2.6 μL /分の送液を確認した。以上のようなポンプのオンチップ化により、外付けした場合に問題となる、チップへの接続法や洗浄法、試験液のロス回避でき、分析システム装置全体を小型化でき、ユーザビリティが向上する。

3.2 マイクロPCR

PCR法は、DNAの増幅したい領域の両端に相補的な塩基配列を20塩基対ほどつプライマーと、このプライマーに挟まれた区間の塩基鎖を複製する耐熱性DNAポリメラーゼを用いて、3つの温度域を行き来するサイクル反応：二本鎖の解離 (95 °C) →プライマーのDNA鎖への定着 (55 °C) →DNAポリメラーゼによる複製鎖の伸長反応 (62 °C) を行うことで、所定のDNA領域を増幅する方法である。理想的には、このサイクル反応を1回繰り返すごとにDNAは2倍ずつ乗算される。通常は、数mLの試料に対し、このサイクル反応を1サイクル5分×30回程度、2～3時間かけて行うことでDNAを増幅する。

本センサではSNP検出をできる限り短時間で行うことが求められる。そのため30分以下の高速PCR技術の開発が必要とされた。本開発では、有限要素法を用いた熱シミュレーションによるPCRの構造最適化によって反応室内の温度均一性と、ほかのチップ構成要素との優れた熱



第5図 PCRの構造と熱分布のシミュレーション結果

熱分離のため、らせん状流路部以外の反応室周囲はエッチングされて空隙となっている。

Fig. 5 Plane view of PCR and thermal simulation result.

Central part is reaction chamber. Except spiraled inlet and outlet channels, Si wafer is etched completely from backside of wafer and reaction chamber is thermally isolated.

分離性を確保した形状を設計した。また、熱源・冷却源にはペルチェ素子を用い、熱等価回路モデルによる高速の昇温・冷却サイクル最適化を行った。第5図に、最適設計された3 μL 容量の μPCR チャンバの構造と有限要素法による熱分布シミュレーションの例を示す。反応室内の温度分布は数 $^{\circ}\text{C}$ 以下の一様な分布を示し、かつ反応室外側の温度はほとんど上昇しない。さらに、熱等価回路モデルにより、ペルチェ素子の制御タイミングを最適化した結果、このPCRが1サイクル30秒、30サイクルが15分間で動作できることが確認できた。

3.3 DNAフィルター

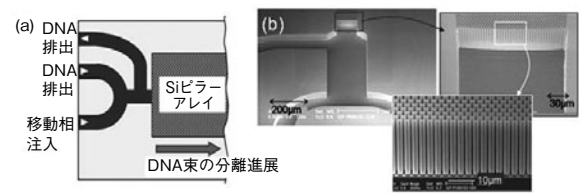
DNAフィルターは、Siの微細加工技術によって作製された、高さ数10 μm 、直径1 μm 、間隔1 μm 程度で規則的に整列したピラーアレイを用いる。長さの異なるDNA断片がピラーアレイを通過するための所要時間が、DNA断片の長さによって異なることを利用してDNAを分離する、液体クロマトグラフィーの手法が主な原理である。

ピラーフィルターの利点として、マイクロビーズをランダムにパッキングしただけの市販フィルターと比べて、マイクロチャンネル中での作製に適し、また、パッキングのランダムネスに起因した分子パスの乱れがなく、高分解能であることが知られている。[5]

これまで、SNP検出に用いるような100塩基対程度の短い断片長のDNAに対しては、ピラー間隔を狭くして物理的にふるいの目を細かくするだけではDNAごとの長さの差異に対する分離能が不十分で、実用的な性能を得ることが難しかった。本開発では、イオンペア逆相液体クロマトグラフィー(IP-RP LC)法をピラーフィルターに応用してこの問題を解決している。ピラー表面を疎水性の単分子修飾剤で化学修飾し、かつ溶媒を調整してDNAの液中での静電状態を最適化することによってピラーとDNAとの相関時間を化学的に増大させ、これにより50塩基対差のDNAの高速分離が可能で、高い分離能を持つDNAフィルターを実現した。[6]

Siピラーの加工には、Deep UV (Ultraviolet Rays) リソグラフィー法による微細加工と、ステッパーの露光可能領域よりも長い試験用フィルターを形成するために、パターン同士の極めて正確なステッチングを行う必要がある。このエッチングプロセスでは、ピラー部についてアスペクト比30以上の加工が可能に加え、低アスペクト比のチャンネル部分と接続したマイクロチャンネルチップへの作り込みも可能とする、統合されたプロセス技術を開発した。(第6図)

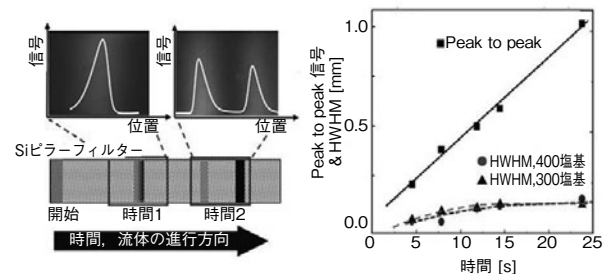
DNA分離の実験例を第7図に示す。300塩基対および



第6図 DNAフィルターの (a) 構造図、および (b) 電子顕微鏡写真。ピラーは高さ25 μm 、幅2 μm 、間隔1 μm

Fig. 6 Details of DNA filter, (a) over-all structure, (b) SEM images of parts. Pillars are 25 μm high and 2 μm wide, with inter-pillar distance of 1 μm .

400塩基対のDNA断片が、5秒以内の極めて短時間で分離された。図のDNAは蛍光修飾されているが、未修飾のDNAについてフィルター出口で吸光測定し、ほぼ全成分が分離されていることを確認した。この分離に要するピラー部分の長さは、わずかに3 mm程度である。また、長さが50塩基対ずつ異なる100 ~ 300塩基対の5種類のDNAについて、室温での分離が可能なよう主溶媒の構成を調整した、アセトニトリルを10%添加した水溶液による分離にも成功した。



第7図 (a) CCD (Charge Coupled Device) 像による300塩基対および400塩基対のDNA 2成分の分離試験の様子、(b) 2成分のピーク間隔と、おのおのの半値半幅の時間依存性

Fig. 7 Results of DNA filter characterization by after injection of mixture of 2 DNA segments (300 and 400 base pairs long), (a) camera images and schematic drawings of DNA separation, (b) separation time dependence of peak to peak distance and half width at half maximum

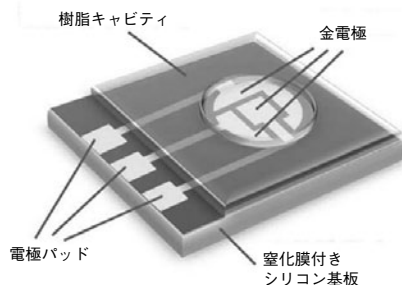
3.4 電気化学SNPセンサ

本開発では、独自開発の電気化学的にSNPを識別する技術[7]を、半導体プロセスによる微細化技術により小型化し、従来の1/20以下の量 (1 μL 以下) の検体のセンシングを可能とする μSNP センサを実現した。この技術は、高価な人工DNA固定電極を使用したSNP検出方式に比べて安価である特徴をもつ。

第8図にセンサの構成を示す。作用極、対極、参照極

の3電極をリソグラフィー技術により微細パターンニングし、さらに、樹脂モールドイングによって小型の樹脂キャビティをセンサ電極のパターンに対してずれることなく基板に転写形成した。作製したセンサの最小容量は0.5 μL （作用極の面積290 μm^2 ）である。

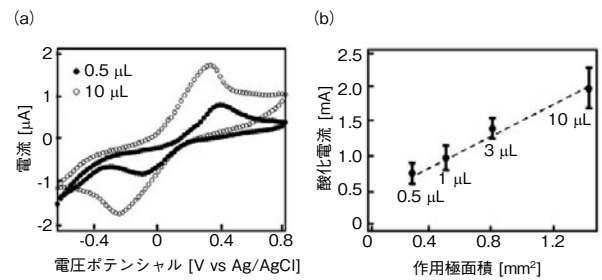
SNP検出は、フィルターで分離されたDNA断片それぞれに対して行われる。まず、DNA断片に含まれる特定のSNPの有無に対応して、DNA複製反応の開始/無反応が特異的に決定するようデザインされたアレル特異性プライマーをDNAに作用させる。[8]次に、この複製のある/なしを判定することによりSNPの判定を行う。これには、DNA複製時の副生成物である、リン酸基由来の2量体化合物であるピロリン酸(PPi)を利用する。キャビティ中に、このPPiを出発物質とし、3種類の酵素を介して発生する電子によってフェリシアン化カリウムが還元される反応系を用意する。これにより、1分子のPPiに対して、4分子のフェロシアン化カリウムが溶液中に生じる。この分子を電気化学的に作用極上で酸化反応させ、その電流値から分子数を定量することによって、DNA複製によるPPi生成の有無が判定され、最終的にSNPを知ることができる。



第8図 超小型電気化学SNPセンサの模式図

Fig. 8 Schematic drawing of newly-developed ultra tiny SNP sensor

第9図に、試作したセンサによる検出感度限界の実験結果を示す。測定には、SNP判定時に実際に生じる濃度に相当する、0.4 mMフェリシアン化カリウム KNO_3 水溶液を用いた。その結果、第9図 (a) に示すように0.5 μL の検体でも10 μL の場合と同様の明瞭（めいりょう）な酸化還元ピークを確認した。0.5 μL 検出時の電流値は、10 μL と比較して小さいが、これは第9図 (b) に示すように、電流値が小型化したセンサの作用極の面積に比例するためである。同時に、同一電極面積では、0.5 μL までは検体量によらず電流値は一定であることも確かめている。すなわち、試作したセンサが0.5 μL の少量検体までスケラブルに検出できることを確認した。さらに現



第9図 (a) 酸化還元反応を示す電流-電圧特性, (b) 酸化電流の作用極面積依存性

Fig. 9 (a) Electrochemical measurement performance with different chamber volume, (b) Oxidation current dependence on surface area of sensor electrodes

在ではセンサに用いる薬液に、全血からDNAを抽出する試薬も加えて、全血からのSNP検出が可能なることも確認できている。[9]

4. まとめ

以上述べてきたように、imecと共同開発したポンプとDNAフィルター、PCR、SNPセンサなどをワンチップにまとめた一塩基多型センシングチップは、1 μL の血液から短時間でSNPを判定することが可能である。このチップを用いることで、一般病院などで医師が患者の薬の効き目や病気の発症リスクを、臨床現場において短時間で判断可能になる手段を提供できると考えている。このチップにより個人（患者）の体質に合わせた医薬品処方などの治療法を選ぶ「テーラーメイド医療」の普及に大きく寄与でき得るものと期待する。

参考文献

- [1] Z. Wang et al., "SNPs, protein structure, and disease," *Human Mutation*, vol.17, pp. 263-270, 2001.
- [2] M. Op de Beeck et al., "Design and fabrication of a biomedical Lab-on-Chip system for SNP detection in DNA,". 2010 International Electron Devices Meeting (IEDM2010), San Francisco, 8 December, 2010.
- [3] M. Hiraoka et al. "Miniature conductive polymer actuators for high pressure generation in lab-on-chip systems," *Sensors and Actuators: A Physical* (2011), doi:10.1016/j.sna.2011.08.024.
- [4] 生嶋君弥 他, "人工筋肉に向けた積層型ポリマーアクチュエータ," *パナソニック技報*, vol.56, no.3, pp.154-158, 2010.
- [5] W. De Malsche et al. "Pressure-driven reverse- phase liquid chromatography separations in ordered nonporous pillar array columns,". *Anal. Chem.* vol.7, pp. 5915-5926, 2007.
- [6] W. De Malsche et al. "Ion-pair reversed phase liquid chromatography of DNA in deep-UV patterned silicon pillar arrays," *MicroTAS 2010*, pp.1736-1738, 2010.
- [7] 夜久英信 他, "電気化学的SNP判別技術の開発," *パナソニック技報*, vol.54, no.2, pp.110-115, 2008.
- [8] H. Yaku et al. "Design of allele-specific primers and detection of the human ABO genotyping to avoid the pseudopositive problem," *Electrophoresis* vol.29, no.10, pp.4130-4140, 2008.
- [9] H. Tanaka et al. "Sub-micro-litter electrochemical SNP detector for Lab-On-a-Chip system," Extended abstract of Solid State Device and Materials (To be published).

著者紹介



山下一郎 Ichiro Yamashita
先端技術研究所
Advanced Technology Research Labs.
博士 (理学)



平岡 牧 Maki Hiraoka
先端技術研究所
Advanced Technology Research Labs.
博士 (理学)



田中浩之 Hiroyuki Tanaka
先端技術研究所
Advanced Technology Research Labs.