

自動SNPs解析装置の開発

Development of Automated SNPs Analyzer

月井 健*
Ken Tsukii

村上彰啓*
Akihiro Murakami

高橋 亨*
Toru Takahashi

徐 傑*
Xu Jie

概要 ポストゲノム時代を迎える今日、テーラーメイド医療の実現に最も大きな貢献が期待されているSNPs（一塩基多型）の解析技術が重要視されており、そのSNPs解析を全自動で行う解析装置の完成が切望されている。

我々は、(株)エフアイ・テクノ殿及び、プレジジョン・システム・サイエンス(株)殿と、全自動DNA解析装置の共同開発を行い、主にDNA検出システムに関する幾つかの重要な技術成果を確立している。今回、微小蛍光標識ビーズによる遺伝子情報の伝達システム及びファイバオプティクス技術を生かし独自の高速かつ高感度なSNPs等のDNA情報を解析する装置を開発した。さらに臨床診断用途に適したSNPsを全自動で解析できる装置を製作中である。

1. はじめに

現在、光ファイバを用いた情報通信機器及び光学部品は、小型精密化され異分野への応用が盛んに図られており、特にファイバオプティクスとして光計測・信号伝達に広く用いられている。一方、バイオ分野はポストゲノム時代に入り、テーラーメイド医療の最も重要な手段として、DNAの個人差を判別するSNPs（一塩基多型）解析が注目されている。また、そのSNPs解析装置としては、高速で高感度な測定が重要であることから、蛍光を用いた計測が主流となっていて、代表的なものとしてはDNAチップやビーズアレイなどが用いられている。しかし、DNAチップは、平面反応の測定系であるために、反応性が低く、高密度化に比例して光情報の測定感度が低下することや、操作が複雑で測定時間が長い等の欠点がある。さらに、測定に供する試料の前処理が必要であるが、そのための自動化技術の開発も課題になっており、現時点では、前処理から測定までの全自動装置は実用化されていない。特に臨床用途としては、全自動で解析可能な装置が切望されており、加えて、高信頼性・簡便性・経済性も求められている。

我々は、(株)エフアイ・テクノ殿及び、プレジジョン・システム・サイエンス(株)殿（以下PSSと略す）と全自動DNA解析装置の共同開発を行っている。今回、自動処理に有利とされるマイクロビーズにDNA情報を携帯させ、マイクロ流路におけるビーズ上のDNA情報を蛍光として高速かつ高感度に計測できる、SNPs等のDNA情報を解析する装置を開発したので報告する。

2. 検出システム開発

2.1 SNPs解析原理

マイクロビーズアレイ法は、水溶液の懸濁状態で用いられることから、反応の自由度と反応速度が高く、アレイの製造コストもDNAチップに比較して極めて安価に抑えることができる。また、マイクロビーズアレイでは、PSS殿が開発した磁性ビーズを用いたマグトレーション法を採用することで、試料の前処理とその測定に同一の自動化処理装置を構成することが可能であるため、臨床診断の用途としては最も適している解析手法と言える。

そこで、本装置では、複数種の蛍光色素を様々な比率で2.8 μm の磁気ビーズに結合させることでビーズを標識し、それぞれの標識に対応したプローブをビーズに付け、標識化に使用していない蛍光色素でラベルされた検体を反応させ、検体がどの標識のビーズに結合したかを判別することによって、検体のSNPs情報を解析する原理を用いている。図1に蛍光標識ビーズを用いたSNPs解析の原理を示す。

2.2 蛍光標識ビーズ測定原理

同解析手法を実現するためには、自動化処理に適したビーズの光情報検出装置を開発する必要がある。更に、複数SNPsの高速で解析を行うためには、微小ビーズの持つ複数種類の蛍光情報をビーズ単位で測定する必要がある。

蛍光を測定する機器としては、分光光度計があるが、ビーズを個別に測定することができず、また、微小粒子の蛍光情報を測定する装置として、細胞研究用途で使われているフローサイトメータがあるが、高価かつ小型化が極めて困難であり、自動化に向かないという問題点がある。

本装置では、液中の微小ビーズを一粒単位で測定するために、送液しているマイクロ流路内に微小ビーズが一粒ずつ安定に流

* 設備部 生産技術開発センター

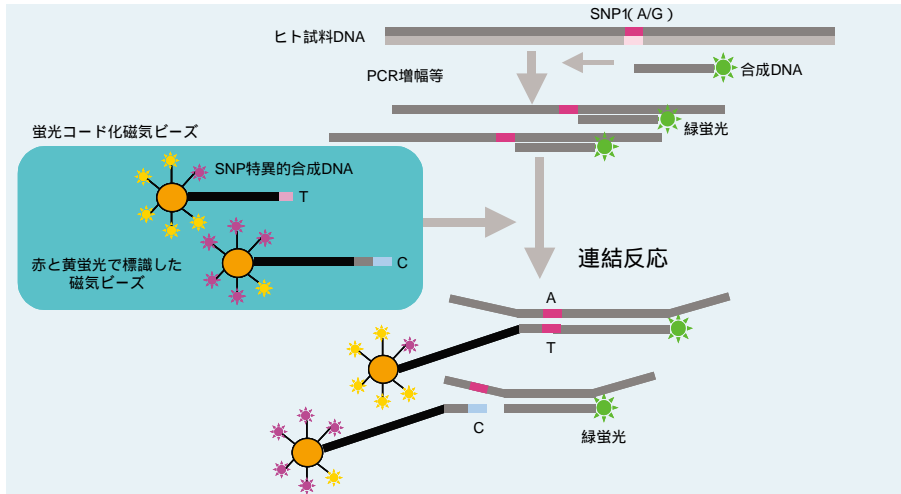


図1 蛍光標識ビーズを用いたSNPs解析
Principle of SNP analysis by measurement of fluorescence-marked beads

れるようにマイクロ流路制御システムを開発し、更に、蛍光検出部とマイクロ流路の一体化、及びファイバアレイによるマルチチャンネル測定等、以下に示す技術を開発することで、臨床用途に適した高感度な蛍光標識ビーズの測定を実現している。

図2に、蛍光標識ビーズの測定及び識別原理を示す。

2.2.1 蛍光検出部とマイクロ流路の一体化

多数の蛍光色素を更に多階調（濃度）の組み合わせにより多色標識されたビーズの微弱蛍光検出には、流動する微小ビーズ個々に正確に特定励起光を照射し、ビーズからの光情報を高感度に測定することが必要である。特に測定対象ビーズは 2.8 μm と微小であることから、流路は、可能な限りの細径化が望まれる。更に、通常、ガラス流路外周部に光学系を構成するが、流路への光軸調整の必要性、表面反射による光学ノイズの発生等の問題も考慮しなければならない。

そこで、一辺数百 μm 程度の精密マイクロ流路の壁面に複数の光ファイバを 1 μm 以下の位置精度で配置し構成した。これは、流路壁面を光ファイバ端面で形成することで、光ファイバによるビーズへの励起光の直接照射、受光が可能となり、光

学ノイズを限りなく低減し、かつ、測定ポイントを微小領域に限定することで、高精度な測定を可能としている。光ファイバの精密固定と整列は光コネクタ製造技術を生かすことによって実現されている。

この流路と光路の一体化は、高効率な光エネルギー伝送による高感度化だけでなく、ビーズ軌道に対する光軸の位置を厳密に決めることができ、ビーズ検出率の向上と光軸調整の省略を実現している。

2.2.2 光ファイバアレイによるマルチチャンネル化

光ファイバを流体の流れ方向に多数並べることで、各光ファイバ毎に異なる標識についての測定を個別に行う事が可能である。各ファイバでの測定は、励起光を光ファイバに入射し、光ファイバより、ビーズへ照射する。ここで励起された蛍光を同一ファイバで受光し、光学フィルタにより波長選択を行い、ビーズの持つ蛍光情報を測定する。測定値は、数レベルのコンパレートによるデジタル化を行い、各測定点の測定情報を流速と時間情報から関連付けることによって、ビーズの持つ複数の光情報を認識する。各々の測定点を異なる位置とすることで、複

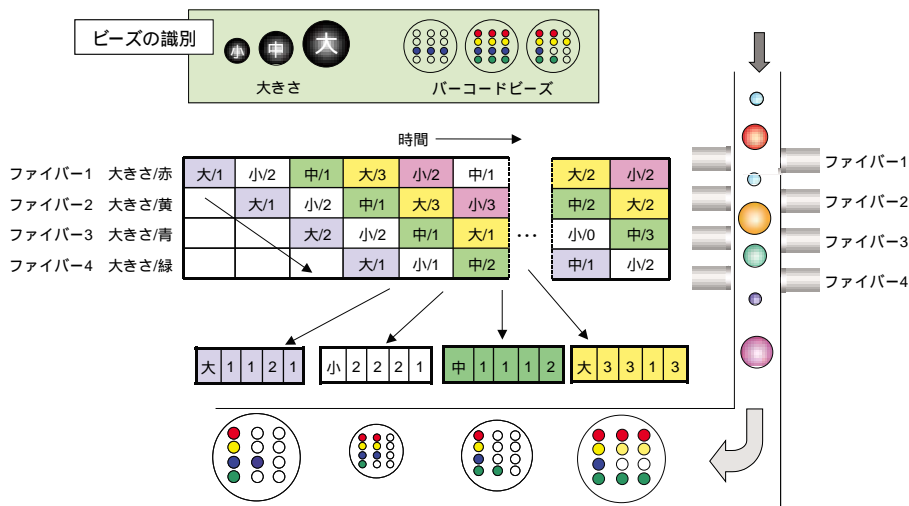


図2 蛍光標識ビーズの測定、識別原理
Mechanism of measurement and identification using fluorescence-marked beads

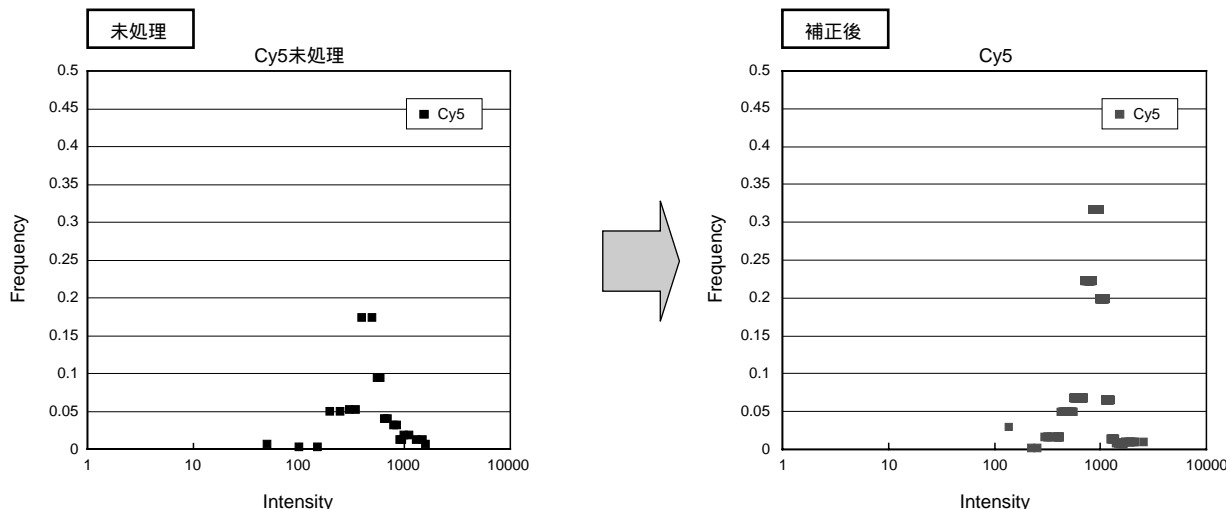


図3 流路内軌道による補正
Effect of normalization using data on bead tracks in the microchannel

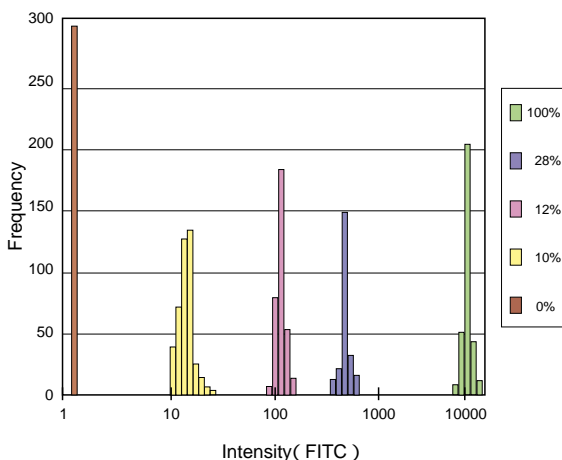


図4 蛍光ビーズの測定結果
Result of measurement of fluorescence-marked beads by flow site meter for purposes of calibration

数種類の蛍光の分光を高感度で測定可能としている。更に、透過光を各々の測定点で同時測定することで、ビーズの通過を確実に捕捉できている。加えて、透過光測定値により、ビーズ径情報の測定を行い、かつ、ビーズの流路内軌道を把握している。蛍光測定値は、未処理ではばらつきが大きいですが、この蛍光測定値に同時測定した透過光測定値を用いて補正することで、図3に示す様に蛍光測定値のS/Nの大幅な改善を実現している。

図4に、代表的なフローサイトメータの校正用蛍光ビーズを測定したデータを示す。このデータから、5段階の強度の蛍光ビーズが識別できている事が確認できる。

また、光ファイバの高密度実装により、検出部の小型化を可能にすると同時に、柔軟で微細な光ファイバで励起光、ビーズから受光した蛍光を伝送するので、レーザ、受光素子、光学部品を別の場所に配置でき、かつコンパクトに装置内に組み込むことが可能である。特に、通常、多色の場合は構成光学系が、検出部に物理的にコンパクトに構成できない問題が発生するが、開発した検出部はファイバアレイのみなので、測定蛍光数

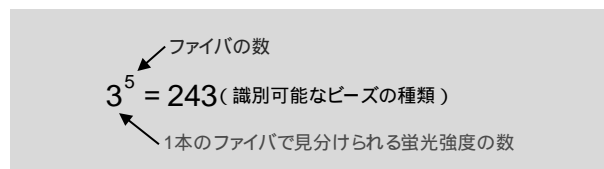


図5 ビーズ識別能力
Bead identifying capability

を容易に増やすことが可能であり、図5の概念図で示す様に、ビーズ識別能力において非常に拡張性が高いといえる。

2.2.3 ビーズ流路内軌道の制御

流路は測定ビーズサイズに対して、大きすぎるとは測定ばらつきにつながり、小さすぎるとはビーズ詰まりを発生し、安定した流れを妨げる。そこで、シースフローを用いた流体制御技術を導入することでマイクロ流路内のビーズ軌道ばらつきを制御して、ビーズ捕捉（検出）率の向上、滞留の抑制を図った。

シースフローとは、ビーズを含んだサンプル流と、サンプル流を包むシース流を、各々異なる圧力で流路内に流し込むことで、サンプル流の流れ抵抗を激減させ、流速勾配を極力小さくすることによって、サンプル流を流路径に対して細く絞る技術である。シース流とサンプル流の設定圧力差によって、サンプル流の径を調整し、ビーズ軌道を任意の位置に集中させることで、ビーズへの測定ばらつきを低減している。図6の実験結果で示す様に、測定ばらつきを低減が確認できた。

また、物理的な流路径を大きくすることでビーズ詰まり等の問題も有効的に防止している。

2.2.4 実験機によるSNPs判定

遺伝子情報を解明するためには、DNAを構成するアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)という四種類の塩基を判別し、それらの塩基が、どのような順番で並んでいるかを調べることになる。また、前記四種類の塩基の並び方を解明することによって、病気等との関連性を示す個人別の遺伝子情報を把握することが、SNPs（一塩基多型）解析の目的である。

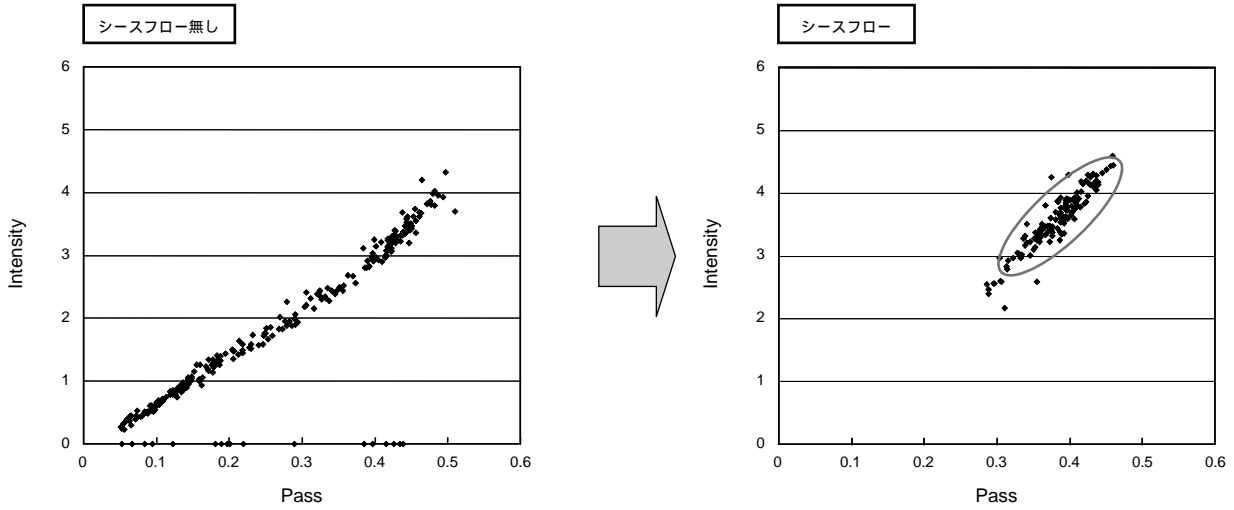


図6 シースフローによる測定ばらつきの低減
Decrease in measurement dispersion due to sheath flow

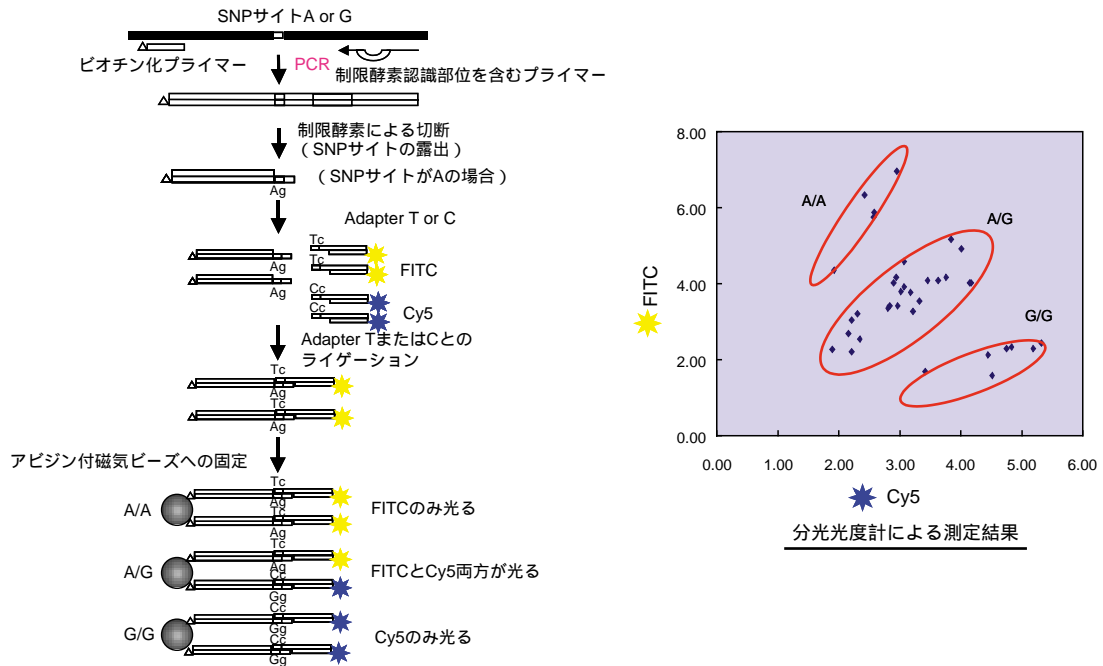


図7 SNP解析実験
Protocol for SNP analysis by measurement of fluorescence, and results obtained

図7に、本装置の性能評価のために実験したSNPs解析原理を示す。この実験では、2種類の蛍光色素を用いた1SNP解析を行っていて、前述の原理とは、標識手法が異なるが、蛍光標識によりSNPs測定を行う原理は同一である。蛍光測定には、分光光度計を用いて、ピーズの測定結果が、蛍光色素FITCであった場合は検体のSNPsサイトはA/Aであり、蛍光色素FITCとCy5であった場合は検体のSNPsサイトはA/Gであり、蛍光色素Cy5であった場合は検体のSNPsサイトはG/Gと同等する。

本装置にて、1SNP判定を行った結果を図8に示す。蛍光色素はCy3とCy5を使用してピーズの標識を行った。この結果により、各々の蛍光強度の組み合わせにより、SNPs判定が可能であることを確認できた。

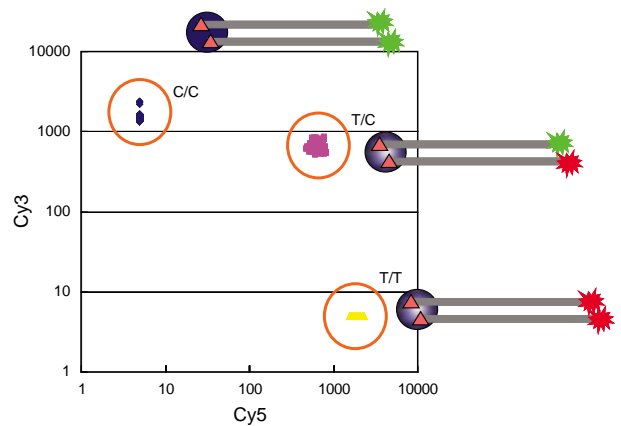


図8 実験機によるSNP解析実験結果
Result of analysis of one SNP using prototype system

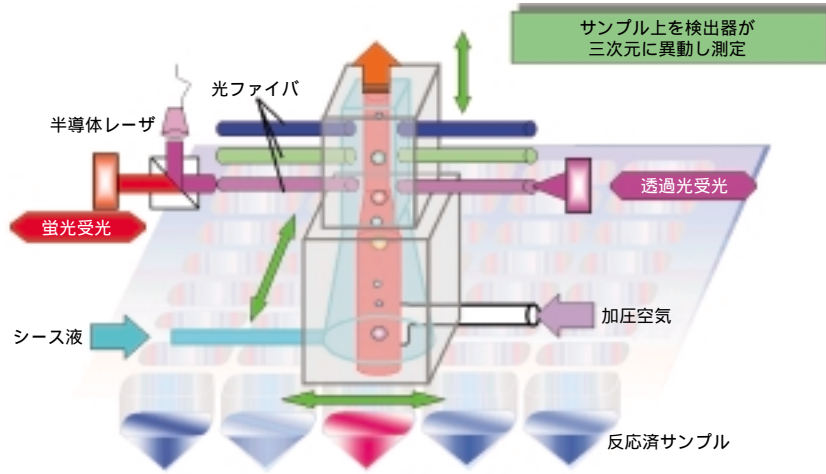


図9 検出部概略構成図
Simplified schematic of detection head

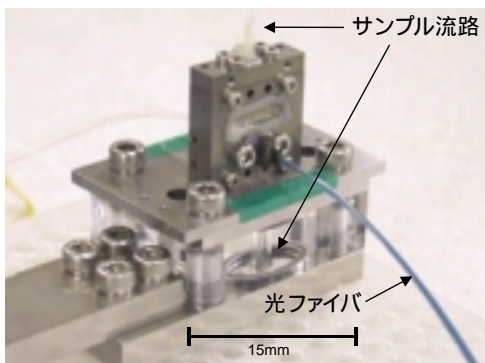


図10 検出部写真
Photo of detection head



図11 装置写真
Photo of SNP analyzer

2.2.5 測定マルチプレックス化

前項では、2種類の蛍光色素の有無で、1SNP解析を行っているが、複数のSNPs解析を同溶液中で反応させて、測定マルチプレックス化を行うことで、高速大量解析が可能となる。そのためには、2.1項で記述した原理で、複数種類の標識ビーズを高速識別する必要がある。本原理では、標識ビーズを個々に測定可能であることから、多種類の標識ビーズの懸濁液を1工程で測定することで、マルチプレックス化を実現できる。現在、1種類の蛍光色素で5段階の強度識別が確認できていることから、2種類の蛍光色素で標識して、もう1種類の蛍光色素で検体ラベルした場合、12SNPsの同時解析が可能である。

更に、微量サンプルにて複数SNPs解析が可能になることから、従来にない低コスト解析が実現できる。

2.2.6 測定時間の短縮

測定時間の短縮、及び多量サンプルへの対応として、サンプル溶液は、市販マイクロプレート仕様として、吸引ノズルと検出部を一体化して、流路長を短縮した。前記の構成により、ノズル吸引直後には測定が完了するため、測定時間が1ウェルのサンプル溶液の測定で10秒程度と大幅な高速化を実現した。検出部は、図9の概略構成図と図10の写真に示されたように、非常にコンパクトな構成となっている。

3. おわりに

光ファイバ、光コネクタ等の精密マイクロオプティクス技術を応用して、高感度、高速、低コスト化を図り、臨床診断用途を目指したマイクロビーズアレイ解析法に最適な検出システムを開発した。さらに、この検出システムを搭載し、DNAの抽出から測定までを全自動で行う初のSNPs解析装置(図11参照)を製作中である。

図11に示す全自動解析装置は、SNPs解析の研究用途向けのものだが、この技術により、テーラーメイド医療等の遺伝子診断がより現実のものになると考えている。今後、この装置を足掛りに、市場ニーズ等を反映し、臨床診断用途向けの解析装置を実用化していきたい。

参考文献

- 1) 澤上-美他：マルチチャンネルファイバセンサーを用いたビーズ検出システムの開発、第25回日本分子生物学会
- 2) PSS Co.,Ltd., PRODUCTS & APPLICATIONS, Rev.003