

# テーラーメイド医療を実現する染色体ファイバ FISH 解析のための マイクロチップの開発

Development of a High-Throughput Fiber-FISH Microchip for Tailor-Made Medicine

2001008



研究代表者

香川大学 工学部  
知能機械システム工学科

准教授

鈴木 孝 明

## [研究の目的]

遺伝子検査は、ウイルス、細菌検査などの感染症を中心に急速に広まり、ヒト遺伝子検査についても白血病を代表とする血液疾患を中心に利用されている。遺伝子検査法においては、従来の核染色法 (nucISH: Nuclear In Situ Hybridization) から核酸増幅や増感法への移行と平行して、サンプルの微量化・検査の高感度化のニーズが高まっている。

本研究では、従来の nucISH による遺伝子検査の時間短縮と検査精度の向上、サンプルの少量化を主な目的として、1) 伸張染色体の区画化・少量化、2) プローブ DNA 拡散の効率化、3) FISH 効率の向上などの技術的課題を解決することによって、従来の nucISH より短い検査時間、高い分解能、多数サンプルの同時観察に対する有効性を検証した。

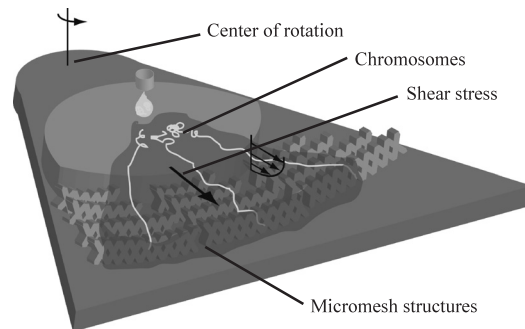
## [研究の内容, 成果]

### 1. 染色体伸張固定の原理

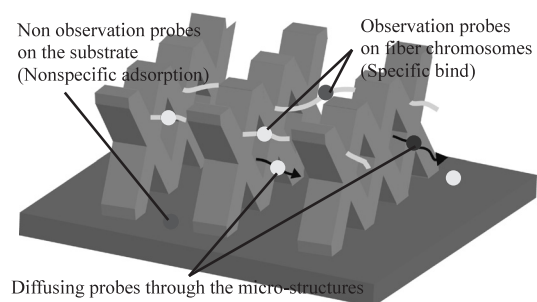
染色体の伸張固定原理の概念図を図1に示す。染色体の伸張にはデバイス回転時の遠心力によって生じる流れ場中のせん断力を利用し、染色体の固定には基板への物理吸着を利用する。図は、デバイスの円形部分を分割した概念図で、実際のデバイスは円形である。円形デバイスの中心が回転中心となり、回転中心に隣接する部

位に滴下台が複数個並び、さらにその周りにマイクロメッシュ構造が同心円状に配置されている。滴下台上に染色体懸濁液を滴下した後に懸濁液が一部自然乾燥することで染色体の一部が基板に吸着、固定される。次に基板を回転させることで遠心力が発生する。遠心力によって基板の表面と気液の界面の間に流れ場が発生し、流れ場中のせん断力により染色体はランダムに伸張される。

染色体が伸張される際、染色体は遠心回転時



(a) Chromosomes stretched by the centrifugal force



(b) Fiber suspension of chromosomes on micro-bridges

図1 高速 FISH マイクロデバイスの概念図

のせん断力により伸張されるため、デバイスの形状を円形とすることで染色体は回転中心から放射状に効率よく均等に伸張される。また、伸張された染色体は、構造が何もない平滑基板上では、網目状にランダムに重なり合うように伸張されてしまい観察対象である染色体が他の染色体によって隠れてしまうため観察が困難である。一方で、本デバイスは、同心円状に配置されたマイクロメッシュ構造上面の谷部分に伸張染色体の束が固定されるため、規則的・均等に配置できる。本研究では、これを区画化と呼び、その区画化特性を評価した。

また、染色体の特定部位の観察については、蛍光 DNA プロブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH 法) が一般的である。本研究では、FISH 解析の時間短縮を目的として、ハイブリダイゼーション時間に対するプロブ結合能を評価した。

## 2. 同心円マイクロメッシュ構造の作製

本研究で用いる固定マスク付き回転傾斜露光法は、図2に示すように、微細なパターンを設けた回転マスク上にレジストを直接塗布し裏面から回転傾斜露光する際に、同じ傾斜角で固定された固定マスクを用いて回転マスクに入射する光の方向を一部に制限し、複雑な構造を作製する方法である。

固定マスク付き回転傾斜露光法によって作製したデバイスを図3に示す。デバイスの直径は15 mm であり中心付近には滴下台が4つある。

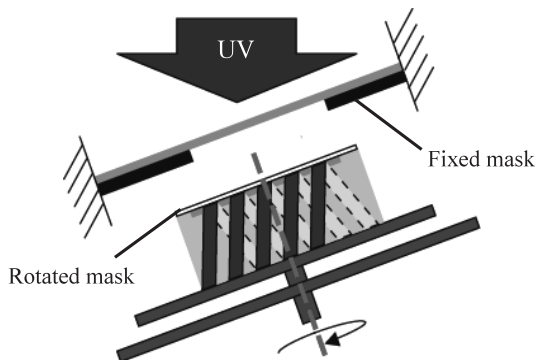


図2 固定マスク付き回転傾斜露光の原理

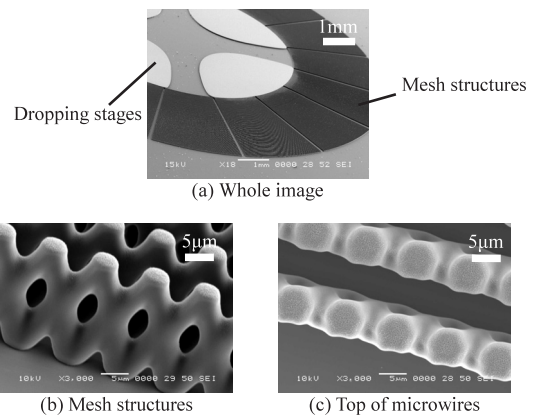


図3 作製したマイクロデバイスのSEM像

滴下台を複数設けることで一度に複数種のサンプルを同時に伸張することが可能となる。滴下台の周りには同心円状にメッシュ構造があり、このメッシュ構造に基板の回転により伸張された染色体が懸架・固定される。

## 3. ヒト染色体伸張実験

デバイス構造の有用性を検証するため、flat, wall, mesh (提案デバイス) の3種類の構造を用意し、染色体の伸張形状の比較検討を行った。flat デバイスの表面はマイクロ構造が無い平滑なガラスであるためほぼ平面である。wall デバイスは、幅  $5\mu\text{m}$ 、高さ  $25\mu\text{m}$  の同心円状の壁面構造を有しており、壁の間隔は  $10\mu\text{m}$  である。mesh デバイスは、幅  $5\mu\text{m}$ 、高さ  $25\mu\text{m}$  の網目状構造の壁面が同心円状を有しており、壁面の間隔は  $10\mu\text{m}$  である。

実験は、まずはじめに、デバイスを UV オゾンクリーナーで20分間  $\text{O}_2$  アッシングし、デバイス表面の洗浄を行う。次に、flat デバイスではデバイス中心、他の2種のデバイスでは滴下台に HeLa 細胞の細胞核を懸濁したサンプルを  $0.5\mu\text{l}$  滴下し、自然乾燥により染色体の一部をデバイス表面に吸着させ、溶解液によりタンパク質を溶解させた後にスピコートによりデバイスを回転数  $5000\text{rpm}$  で回転させる。その後、染色体全長を観察する場合には、染色が容易な YOPRO-1 による染色処理を行った後に蛍光顕微鏡によって基板上的染色体を観察する。

また、染色体の FISH 染色効率の評価については、DNA プローブに MYC/CEN-8 FISH プローブミックス (DAKO) を使用し、染色体全長の染色液として DNA プローブとの蛍光スペクトルの重複を避けるために DAPI を使用した。

撮影した染色体の形状評価としては、伸張染色体が規則的・均等に配置されたことを示す区画化の指標として、染色体の束であるバンド同士の間隔、バンドの傾き、蛍光強度 (染色体の束の大きさ) の変化について評価した。これらの指標のばらつきが少ないほど、その後の特定部位の観察が容易であることを示す。

染色体の伸張の様子を図 4 に示す。図より基板中心から 2 mm ほど離れた滴下台に白色の塊を確認でき、染色体は滴下台に適度な自然乾燥により部分的に吸着固定されていることが分かる。また滴下台からデバイスの円周方向に向かって緑色の帯が確認できる。このことより染色体がデバイスの外周方向に向かって伸張されていることが分かる。特に、本デバイスは 4 つの滴下台を設けているが、各滴下台から別々のサンプルが互いに重なることなく、同時に伸張可能であり、単一デバイスを用いたマルチクリーニングが可能であることが分かる。

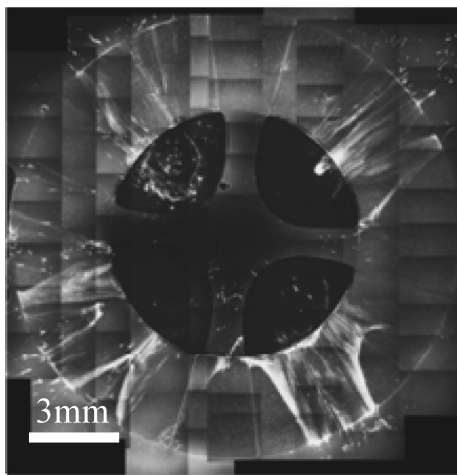


図 4 伸張された染色体像

次に、撮影した局所画像からデバイスの形状に対する染色体バンドの間隔を求め、そのばら

つきである分散度を求めた結果を図 5 に示す。グラフの縦軸が伸張染色体バンドの間隔の分散で、横軸がデバイスの表面形状である。図より、mesh の時に最も分散の値が小さいことが分かり、mesh デバイスは平滑な flat デバイスと比べ、ばらつきを 97.7% 減少させることができた。染色体バンドが等間隔に伸張されている理由としては、mesh 構造上部の V 字の谷部分が等間隔に並んでいるためであると考えられる。

次に mesh デバイスについて、伸張染色体バンドに含まれる染色体数と滴下時の染色体懸濁液の初期染色体濃度 (サンプル濃度) の関係性を評価するために、サンプル濃度による伸張染色体バンドの蛍光強度変化を測定した。測定条件として、サンプル濃度を 2.5%~10% の 4 段階に分けて、各濃度につきメッシュ構造のデバイス 3 枚ずつ、デバイス 1 枚につき 5 箇所観察した。結果を図 6 に示す。図の縦軸は伸張染色体の蛍光強度を表し、横軸は滴下時のサンプル濃度である。図より、濃度が 5% のときに蛍光

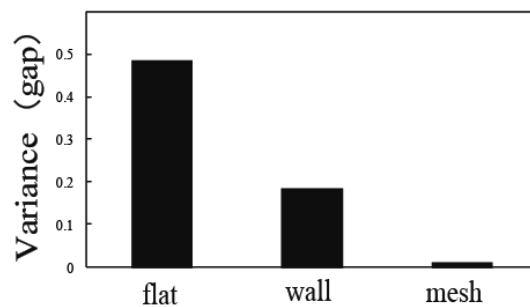


図 5 染色体バンドの間隔の分散

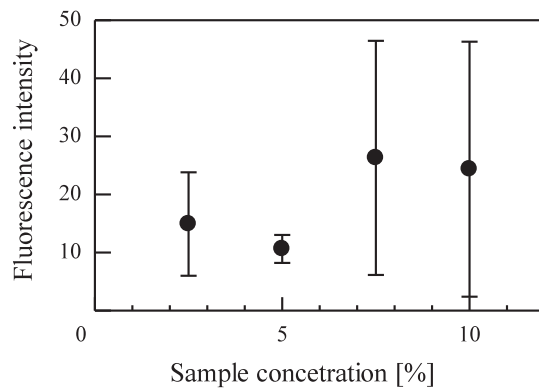


図 6 DNA バンドの蛍光強度

強度のばらつきが最も低く、かつ、各谷構造上に懸架された染色体数が均等であることが分かる。サンプル濃度と平均蛍光強度には、強い相関は見られないが、濃度の上昇と共に、平均蛍光強度も上がる傾向にある。

以上の実験結果から、mesh デバイスは、flat や wall デバイスよりも、染色体バンドが一定の間隔・角度で、かつほぼ同量の染色体数で伸張されており、伸張染色体の区画化が向上し、伸張固定後の染色、および、観察が容易になることが分かった。

次に、mesh デバイス上で伸張染色体を FISH 解析し、蛍光顕微鏡で取得した複数の蛍光像をマージした画像を図 7 に示す。図中の白色の蛍光がプローブである。プローブが直線状に連なっていることから伸張染色体の特定の部位にプローブが結合していることが分かる。ここで、3 種類のデバイスの DNA プローブと伸張染色体との結合にかかる時間を評価した。結合評価においては、ハイブリダイゼーション後のプローブを観察する前に、特異的結合をしなかった余分なプローブミックス液を洗浄する必要があるため、リアルタイムで観察しながら最短結合時間を評価することは困難である。そこで、ハイブリダイゼーション時間を 1, 3, 5 時間と変化させ、それぞれのデバイスについて、染色体が伸張固定されている部位を顕微鏡を走査し計数した。顕微鏡でプローブを観察する際に、デバイス全体にわたって観察することは、領域が広いため非常に困難であることから、プローブの特異的結合点を最大 5 カ所確認した時点で計数を終了することとした。

デバイス形状別のハイブリダイゼーション時間に対する結合箇所数の関係を図 8 に示す。縦軸がプローブ結合箇所数で、横軸が結合のためのハイブリダイゼーション時間である。3 種類のデバイスとも反応時間が長くなるほど多くの箇所が結合している。一方で、反応時間が短くなった場合には mesh, wall, flat の順で結合箇所数が少なくなってくる。このことから、

mesh デバイスが短時間で多くの箇所にプローブが結合していることが分かり、計測した範囲内では、mesh デバイスはハイブリダイゼーション時間が 1 時間で結合箇所を確認できたことから、flat デバイスの 5 倍程度の早さで特異的結合を観察できるといえる。flat デバイスは、伸張染色体がデバイス表面に密着し、かつ染色体が複雑に重なり合って伸張されるのに対して、mesh デバイスや wall デバイスでは、染色体がつり橋状に液中に懸架されるため、染色体の構造自由度が高く、プローブとの結合が容易になったと考えられる。また、wall と mesh デバイスの比較では、wall デバイスでは mesh デバイスに比べて伸張染色体バンドにばらつきが大きいことから、プローブ結合部位が多数の非結合部位の染色体で覆われたり、プローブの拡散

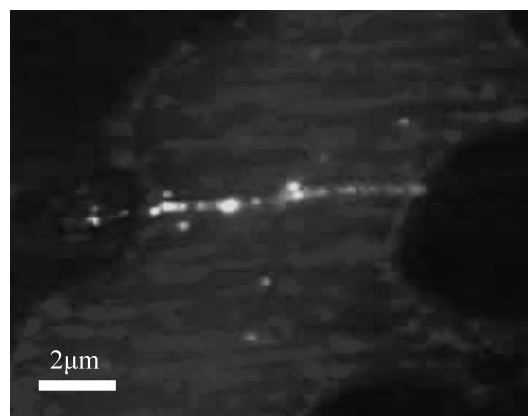


図 7 伸張染色体の FISH 像

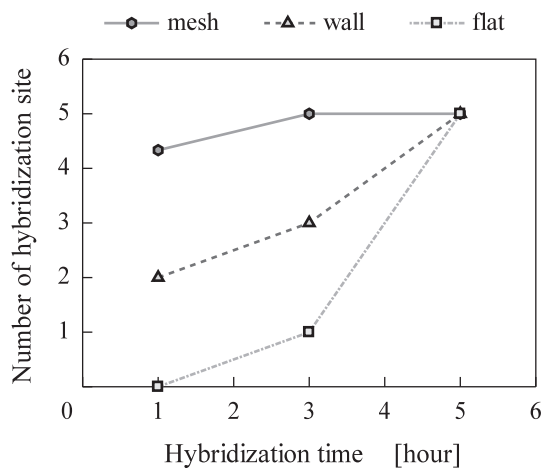


図 8 染色体の FISH 染色効率



を壁構造が妨げたりするために、プローブ結合時間が長くなると考えられる。以上より、提案したデバイスが、特定部位の観察に用いられる FISH 解析において、観察を定量的かつ高速にできることが分かった。

#### [今後の研究の方向, 課題]

本研究では、遺伝子検査において用いられる染色体特定部位の高速解析を目的として、染色体の伸張制御性、複数サンプル同時操作を簡便に行うデバイスを提案した。研究の結果より、作製したデバイスは、臨床診断を初めとする遺伝子検査において、特定項目の高速遺伝子解析に有効であることが分かった。今後は、ターゲットとなる特定遺伝子を選定し、デバイスの有効性を個別に検証すると共に、検査のさらなるシステム化、高速化を目的として、細胞の固定から、染色体の抽出、伸張、懸架、解析までをワンチップ上で実現する方法の検討を行う。

#### [成果の発表, 論文等]

##### 論文

- (1) 平丸大介, 鈴木博之, 神野伊策, 小寺秀俊, 鈴木孝明: 多重マスク回転傾斜露光法による 3 次元複雑マイクロ構造の作製, 日本 AEM 学会誌, Vol. 18, No. 4, pp. 377-382. (2010)
- (2) 鈴木孝明: 単一マスク回転傾斜露光技術の応用展開, (解説論文), 電子材料 (工業調査会), 「特集 - 応用分野を拡大するマイクロマシン/MEMS 技術」, pp. 28-33, 2010 年 7 月号. (2010)
- (3) 鈴木孝明: アセンブリフリー回転傾斜露光法を用いた細胞アレイの作製とその応用, (解説論文), エ

レクトロニクス実装学会誌, Vol. 13, No. 3, pp. 194-199. (2010)

##### 国際会議

- (1) H. Suzuki, D. Hiramaru, K. Terao, H. Takao, F. Oohira, H. Kotera, and T. Suzuki: A High-Throughput FISH Microchip for Clinical Genetics, Proceedings of The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences [MicroTAS2010], pp. 702-704, Groningen, Netherlands. (2010. 10. 3-7)

##### 国内学会

- (1) 鈴木博之, 平丸大介, 寺尾京平, 高尾英邦, 大平文和, 小寺秀俊, 鈴木孝明: 同心円マイクロメッシュ構造を用いた高速染色体解析デバイスの開発, 第 27 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp. 522-527, くにびきメッセ (鳥根県松江市). (2010. 10. 14-15)
- (2) 高崎翔一, 寺尾京平, 高尾英邦, 下川房男, 大平文和, 鈴木孝明: 単一細胞操作デバイスにおける流路幅の影響に関する研究, 日本機械学会 情報・知能・精密機器部門講演会 [IIP2011], pp. 181-183, 東京電機大学 (東京都). (2011. 3. 22-23)

##### 招待講演

- (1) 鈴木孝明: マイクロデバイスを用いた細胞・染色体解析技術, 若手医工連携研究者のネットワーク形成と独創的生体医工学研究テーマの設定のための講演会, 徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部 (徳島大学工学部). (2011. 1. 14)
- (2) 鈴木孝明: マイクロ・ナノ加工技術とその応用, 将来加工技術第 136 委員会 第 11 回研究会 (合同), 日本学術振興会 将来加工技術第 136 委員会 (学士会館: 東京都千代田区). (2010. 11. 19)
- (3) 鈴木孝明: 同心円マイクロメッシュ構造を用いた高速染色体解析デバイス, 第 1 回先端ナノバイオフォーラム, 兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所 (姫路キャスパホール, 兵庫県姫路市). (2010. 11. 15)