

テーラーメイド医療を実現する電流検出型DNAチップ

Electrochemical DNA Chip for Personalized Medicine

源間 信弘 橋本 幸二 二階堂 勝

■ GEMMA Nobuhiro

■ HASHIMOTO Koji

■ NIKAIIDO Masaru

東芝は、蛍光検出型DNA（デオキシリボ核酸）チップで必要とされる検体DNAの色素標識や大型の蛍光検出器が不要な、電流検出型DNAチップを開発した。DNAの電流検出方式は、簡便で低コストのDNA検査が実現可能であるため、現在研究用途では主流の蛍光検出方式に替わって、医療診断でのプラットフォームになることが期待されている。

テーラーメイド医療への応用として、C型肝炎薬剤効果判定や、薬物代謝酵素 遺伝子多型（SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms）解析で高精度に判定できることを実証した。更に次世代技術として、全自動検査装置の開発や高感度CMOS（相補型金属酸化物半導体）型DNAチップの開発を進めている。

Toshiba has developed an electrochemical DNA chip that makes simple and low-cost DNA testing possible due to the realization of a compact detection system and elimination of the need for dye labeling. The electrochemical DNA chip is expected to become a platform in the medical diagnostic field in place of the conventional fluorescent DNA chip.

For personalized medical care, we have established a highly accurate system using electrochemical DNA chips to predict response to interferon in patients with the hepatitis C virus (HCV) and to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in drug metabolizing enzyme genes. We have also been developing future technologies such as a fully automated DNA detection system and a complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) type DNA chip.

1 まえがき

DNAチップは、複数の遺伝子配列を同時に検出できるデバイスとして1990年代初頭から開発が始まり、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーが融合した新しいデバイスとして熱い期待が寄せられている。現在は主に遺伝子発現解析や遺伝子多型（SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms）解析などの研究分野で幅広く用いられており、一部では医療診断への応用も始まりつつある。

研究用途で主に用いられているものは蛍光色素を使ってDNAを検出する方式であり、その代表例としてはAffymetrix社製のGeneChipTMが挙げられる。しかし、蛍光検出方式は、DNAをあらかじめ蛍光色素で標識する必要があり操作が煩雑であるだけでなく、蛍光むらが生じやすいなどの問題点が指摘されている。また、標識する蛍光色素が高価であるうえに、検出に高感度の光学系を必要とするのでシステムも大型で高額になる。今後DNAチップが医療診断などの市場で普及するためには、これらの課題を克服した新しいチップ技術が求められている。

ここでは、東芝が独自に開発した電流検出型DNAチップの検出原理及び技術の特徴を紹介するとともに、実用化に向けた取組みと将来技術について述べる。

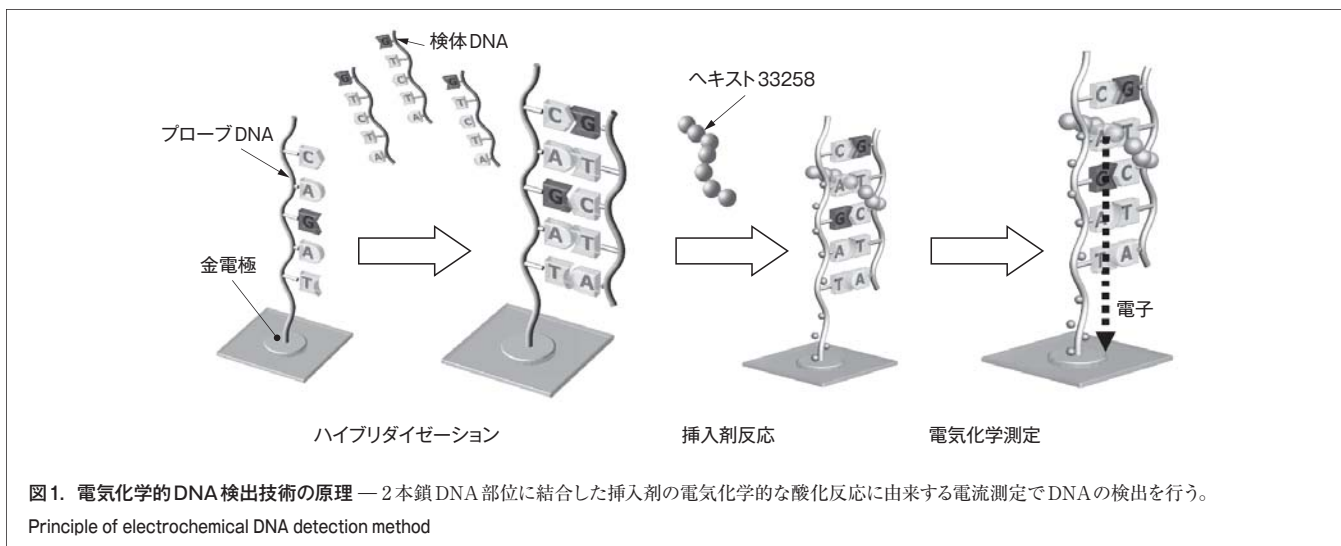
2 電気化学的DNA検出技術の原理と特徴

蛍光検出方式に替わる新しいDNA検出技術として、当社は1990年代前半から電気化学的なDNA検出技術の研究に着手した^{(1), (2)}。この方式は、色素標識や光学検出系を必要としないため、チップ及びシステム共に低コスト化が可能である。また、煩雑な色素標識が不要なため検査時間が短くて済む。更に、検出系がコンパクトでシステムの小型化が容易であるなど、蛍光方式での問題点が克服可能と考えられている。すなわち、信頼性と実用性のより高いシステムを構築できる可能性がある。

電気化学的なDNA検出技術の原理を図1に示す。まず、①プローブDNAが結合した金電極上で検体DNAとハイブリダイゼーション反応を行い、②形成したハイブリッド（2本鎖）部位に特異的に結合する挿入剤（ヘキスト33258）という分子を添加し、③電圧印加による挿入剤の酸化電流を検出する。流れる電流値の大小を測定するだけで、簡単にDNAの解析が可能である。そのため、研究用途だけでなく、臨床検査や食品検査など幅広い分野での利用が期待されている。

3 DNAチップと検査装置

当社は、前述した原理に基づく電流検出型DNAチップを開発した。電流検出型DNAチップは、複数の金電極をパターンニ



ングした数cm角のガラス基板から成り、それぞれの電極上には異なるプローブDNAを固定化することが可能である。そのため、1チップで複数の遺伝子を同時に検出することができる。



実際の検査では、専用の樹脂製カセットに入れて使用する(図2)。また、DNAチップに合わせて専用のDNA検査装置 Genelyzer™を開発した(図3)。

従来の蛍光検出型DNAチップは、高価で大型のハイブリダイゼーション装置と蛍光検出・解析装置が必要で、取扱いにも高い専門性が要求された。そこで一般病院にも導入できるように、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までを自動で行えるシステムを開発した。このシステムを使うと、DNAチップカセットにサンプルを注入し、あとは装置にセットするだけで自動的に検査結果が出力される。電流検出方式の簡便性、短時間検出などの長所を生かすことで、検査項目によっては15分程度での測定が可能になり、DNA抽出、DNA増幅などの前処理を含めても、数時間で検査が完了する。また、入力にはタッチパネルを使用するとともに、電流測定系や送液系のほか、制御系が組み込まれている。図3に示した装置は、2カセットを並列処理できる仕様になっている。

4 実用化

ゲノム解析が世界中で精力的に進められ、最近では、個々人のDNAの情報(体質)を基に最適な医薬品や治療法を選ぶテーラーメイド医療を中心としたDNA検査が現実のものになりつつある。当社は電流検出型DNAチップの医療分野での実用化を目指し、現在外部機関と連携しながら実証試験を進めている。ここでは、その代表例をいくつか述べる。

4.1 C型肝炎テーラーメイド医療用DNAチップ

現在、日本におけるC型肝炎ウイルス(HCV)の感染者は約200万人と言われており、数年以上にわたる持続感染の結果、肝臓がんを発症するおそれもある。もっとも効果的な治療薬はインターフェロン(IFN)であるが、日本人の場合50%以下の患者に対してしか効果がなく、また重篤な副作用も現

れる。最近の研究で、IFNの薬剤効果判定に有用なSNPsがMxA, MBLという2種類の遺伝子に見いだされた。SNPs箇所の塩基を調べれば、投与前にIFNが効くかどうか予測できるわけである。

そこで、この2遺伝子の多型検出用DNAチップを開発し、同意の得られた150以上のDNAサンプルを用いて、このチップと対照法(PCR(Polimerase Chain Reaction)-シーケンス法あるいはPCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法)による判定結果を比較した結果、100%の精度で遺伝子型を判定できることが明らかとなった⁽³⁾。

4.2 薬物代謝酵素遺伝子解析チップ

薬物代謝酵素のNAT2(N-AcetylTransferase2)は、結核菌治療薬のイソニアジドなどを代謝する酵素で、その遺伝子に多型が存在することは古くから知られていた。NAT2変異遺伝子を持つ人(代謝が遅い)はイソニアジドの過剰投与により肝障害などの副作用を発症しやすいため、事前にNAT2の遺伝子多型を調べることができれば、個人の体質にあった投与方法を選択することが可能になる。そこで、日本人に頻度の高い3か所の遺伝子多型を同時検出するチップを開発した。これまでに50例以上の実検体を使った試験を終了しており、対照法の結果と100%一致することが確認された⁽⁴⁾。

4.3 リウマチ薬剤副作用判定チップ

リウマチは、日本における患者数が約70万人で、大変重篤な疾患として知られている。最近では効果的な治療薬も開発されているが、効果や副作用の有無に個人差があり、重い合併症も存在する。また、初期段階の治療が病気の進行抑制に非常に重要なため、薬効予測につながる遺伝子解析への期待は大きい。最近の研究で、メトトレキサート及びスルファサラジンという二つの代表的リウマチ治療薬の副作用と、重い合併症であるアミロイドーシス発症の関連する遺伝子多型が見いだされた。

そこで、これら薬剤の副作用の有無と合併症の発症しやすさを予測するDNAチップを開発し、約300検体の実検体を用いたテストでは、高い精度で型判定ができることを実証した⁽⁵⁾。

4.4 ヒトパピローマウイルス検査用チップ

ヒトパピローマウイルス(HPV)には100以上もの種類が知られており、そのうちの13種類が子宮けいがんとの関連性が高いと報告されている。そこで、これら悪性13種類のHPVを検出するためのDNAチップを開発した。医療機関と共同で行った試験では、対照法との間で高い一致率が得られた⁽⁶⁾。

5 次世代技術の開発

当社は、電流検出型DNAチップ及び検査システムの魅力を更に高めるために、システムの自動化とチップの高機能化について開発を進めている。

5.1 全自動DNA検査装置

DNAチップを用いた遺伝子検査では、DNAの抽出、増幅、反応、検出、及び解析という複数の工程が必要となる。個々の工程は煩雑な作業を必要とするので、専用機器で自動化が進められていたが、それぞれの工程間では手作業が依然として発生するため、専門性を持つオペレーターが必要であった。また、各工程間の操作をロボット化することも可能であるが、装置が大型化し高額化するなどの問題があった。将来的にDNA検査が幅広く受け入れられるためには、高い専門性がなくても検査ができるように、全工程の自動化が必要と考えられる。

電流検出型DNAチップの利点の一つに、検出の機構がシンプルな構成のため、システムを自動化しやすいという点がある。前述したGenelyzer™はハイブリダイゼーション反応以降を自動化したものであるが、将来的には、DNAの抽出や増幅などの前処理から検出までを全自動化したシステムが期待される。そこで、電流検出型DNAチップをベースにした全自動DNAチップ検査装置のプロトタイプ機及びDNAチップカセットを開発した(図4)。

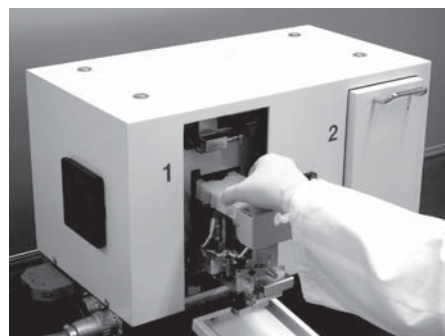


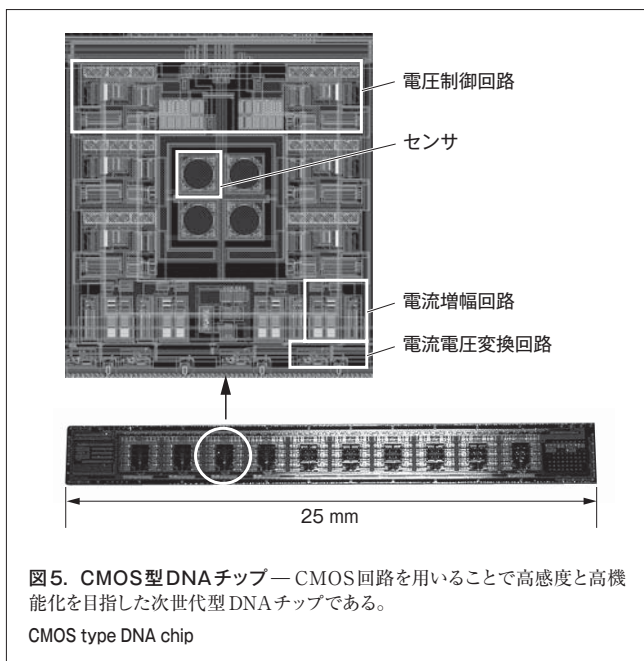
図4. 全自動DNA検査装置 — 密閉型カセットに血液を注入後、装置にセットするだけでDNAの検出が可能である。これは、2004～2006年度厚生労働科学研究費事業の研究成果である。

Fully automated DNA detection system

開発でもっとも重要視したのは、コンタミネーション(サンプル間の汚染)対策で、その実現のために完全密閉型のカセットを基本コンセプトにした。検査に必要な試薬類及びDNAチップはカセットに封入されており、検体としての血液を注入した後はカセット内ですべての反応が行われる。カセット内には廃液だめもあるため、廃棄に際しても増幅産物が外気と接することがない。開発したプロトタイプ機を使って血液からの全自動解析を行い、SNPs検出が可能であることを検証した。

5.2 CMOS型DNAチップ

電流検出型のもう一つの利点は、半導体技術との融合性が高いことである。そこで、半導体デバイスで広く使われているCMOS(相補型金属酸化物半導体)集積回路技術を利用する



ことにより、DNAチップの高機能化と高感度化を目指した開発にも取り組んでいる⁷⁾。現在のDNAチップは、DNAのセンシング機能は備えているが、信号増幅やAD (Analog to Digital) 変換など、電気的な信号処理はすべて検出装置内の回路で行われる。CMOS回路技術を利用すると、電流検出や増幅など種々の機能をチップ内部に取り込むことができ、DNAチップの高機能化が可能になる。

今回開発したCMOS型DNAチップの試作品を図5に示す。個々のセンサ部には、電極の電位を制御する回路、電流増幅回路、電流電圧変換回路、外部回路に信号を伝搬させるマルチプレクサなどの回路が接続されている。これにより、①検出回路をDNAチップ内部に集積することで装置の小型・軽量化が可能になる、②マルチプレクサにより複数のセンサ出力を一つの出力端子で処理できるので、電極数を増やすことが容易になる、③センサ部と電流測定回路とを近接させることで外部ノイズを低減でき、測定可能な電流値の下限が数けた低下する(検出感度向上が見込める)、などのメリットが生まれる。

前述したSNPsの解析は、増幅したDNAを解析の対象としているのでそれほど高感度化は必要ないが、遺伝子の発現解析では、微量mRNA (messenger RiboNucleic Acid) の定量的な解析が必要とされる。最近の研究により、がん発症の初期診断や治療の予後を遺伝子発現のパターンで予測することができるようになってきた。CMOS型DNAチップによる定量的で簡便、かつ高感度な遺伝子発現解析が実現すれば、健康人に対する疾患のモニタリングなど、新しい分野への応用が期待できる。

6 あとがき

現在研究用途で主流の蛍光検出型DNAチップに替わる、新しい方式の電流検出型DNAチップについて述べた。疾患や薬剤応答に関連する遺伝子が明らかになるにつれ、医療診断の現場で利用できるようなDNAチップの必要性は非常に高くなると考えられる。原理的に簡便、短時間、かつ高精度で、しかも低コストで、個々人の遺伝子型を判定できる電流検出型DNAチップへの期待は大きい。全自動化や、半導体技術を取り込んでの高感度化、小型化、低コスト化を実現し、電流検出方式のDNAチップが遺伝子検査のプラットフォームになることを目指して今後も開発を進めていく。

文献

- (1) Hashimoto, K., et al. DNA sensor: A novel electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol. Chem.* **2**, 1993, p.265-270.
- (2) Hashimoto, K., et al. Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA. *Sens.Actuators B.* **46**, 1998, p.220-225.
- (3) Takahashi, M., et al. Electrochemical DNA array for simultaneous genotyping of single-nucleotide polymorphism associated with the therapeutic effect of interferon. *Clin. Chem.* **50**, 3, 2004, p.658-661.
- (4) Nakamura, N., Determination of single nucleotide polymorphisms in N-acetyltransferase2 gene using an electrochemical DNA chip and an automated DNA detection system. *臨床病理.* **55**, 3, 2007, p.216-223.
- (5) 中村奈緒子, ほか. “電流検出型DNAチップを用いた関節リウマチに関連する一塩基多型の検出”. 日本人類遺伝学会第52回大会抄録集. 東京, 2007-09, 日本人類遺伝学会. 2007, p.96.
- (6) Satoh, T., Development of novel HPV genotyping chip system using electrochemical chip and non-PCR amplification technology. *International Journal of Gynecological Cancer.* **16** (Suppl. 3), 2006, p.739-740.
- (7) Gemma, N., et al. CMOS integrated DNA chip for qualitative DNA analysis. *ISSCC Dig. Tech. Papers.* 2006, p.560-561.



源間 信弘 GEMMA Nobuhiro, D.Sc.

研究開発センター 事業開発室技監, 理博。
DNAチップの開発に従事。応用物理学会, 日本物理学会会員。
Business Development Office



橋本 幸二 HASHIMOTO Koji, D.Eng.

研究開発センター 事業開発室グループ長, 工博。
DNAチップの開発に従事。日本化学会会員。
Business Development Office



二階堂 勝 NIKAIIDO Masaru

ディスプレイ・部品材料統括 新デバイス開発センター長。
ディスプレイ及び電子デバイスの開発に従事。
New Display & Devices Development Center