

遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32の開発

森弘惇一*¹・津田稔也*¹・山野博文*²

Development of Genetic Analyzer “BIOSHOT HT-32”

Junichi MORIHIRO, Toshiya TSUDA, Hirofumi YAMANO

Synopsis : In recent genetic testing markets, it is common that patient specimens collected at hospitals, clinics and the like are gathered at a clinical laboratory which specializes in genetic screening and carry out inspections and analyses. Particularly in major inspection centers, there is a demand for an inspection system capable of carrying out a large number of tests with simple operations. On the other hand, the DNA chip "GENE SILICON" developed by our company has excellent detection sensitivity and simultaneous detection of multiple genes is possible, but the inspection process involves a lot of manual work and it is unsuitable for mass inspection.

In this report, we report the development of automatic genetic analyzer “BIOSHOT HT-32” to solve these problems.

Keywords : GENE SILICON ; DNA chip ; genetic analyzer ; automation

1. 緒言

近年の遺伝子検査市場では、病院やクリニック等で採取された検体を、検査を専門に行っている臨床検査センターが預かり、検査・分析を代行することが一般的となっている。特に、大手の検査センターでは全国の病院や診療所から集められた検体を検査する必要があるため、迅速簡便な操作で多検体を同時に検査できること、検査時や工程間の取り違いを極力少なくする検体情報の管理、そして医療現場に通用する安全性と信頼性が強く求められている。

当社の開発したジーンシリコンDNAチップキット¹⁾は優れた検出感度を持ち、複数の遺伝子を同時に検査できるといった優位性を持つ一方で、検査工程は手作業が中心で多検体の検査に向いていないという課題があった。本報では、その課題を解消するために検査工程を自動化した、遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32（以下、本装置）の開発について紹介する。

2. ジーンシリコン検査工程の現状と課題

ジーンシリコンを用いた検査工程は、Fig.1に示すように遺伝子増幅、ハイブリダイズ反応、洗浄、検出がある。それぞれの詳細と操作方法について次に示す。

① 遺伝子増幅工程

検体から抽出されたDNAと遺伝子増幅試薬を混和し、PCR (Polymerase Chain Reaction) 装置にて解析対象の遺伝子領域を増幅すると同時に、増幅された遺伝子を蛍光色素で標識する。

② ハイブリダイズ工程

ハイブリダイズ反応試薬と増幅産物を混和したハイブリダイズ試料（以下、試料）をハイブリカバーに滴下し、それをジーンシリコンに被せる。あらかじめ予備加熱しておいた恒温槽（オープン）中の湿潤箱にジーンシリコンを入れ、60分間加温することでジーンシリコン上に固定化したプローブと試料を反応させる（ハイブリダイゼーション）。

③ 洗浄工程

ジーンシリコンをオープンから取り出し、ハイブリカバーを外して、直ちに洗浄液に浸漬し、未反応物を除去する。指定回数上下に振とうし、指定時間浸漬したのち、リンス液に移す。

④ 検出工程

*1 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ 医療検査チーム

*2 技術研究所 研究部 研究部長 兼 ライフサイエンス技術グループ グループリーダー

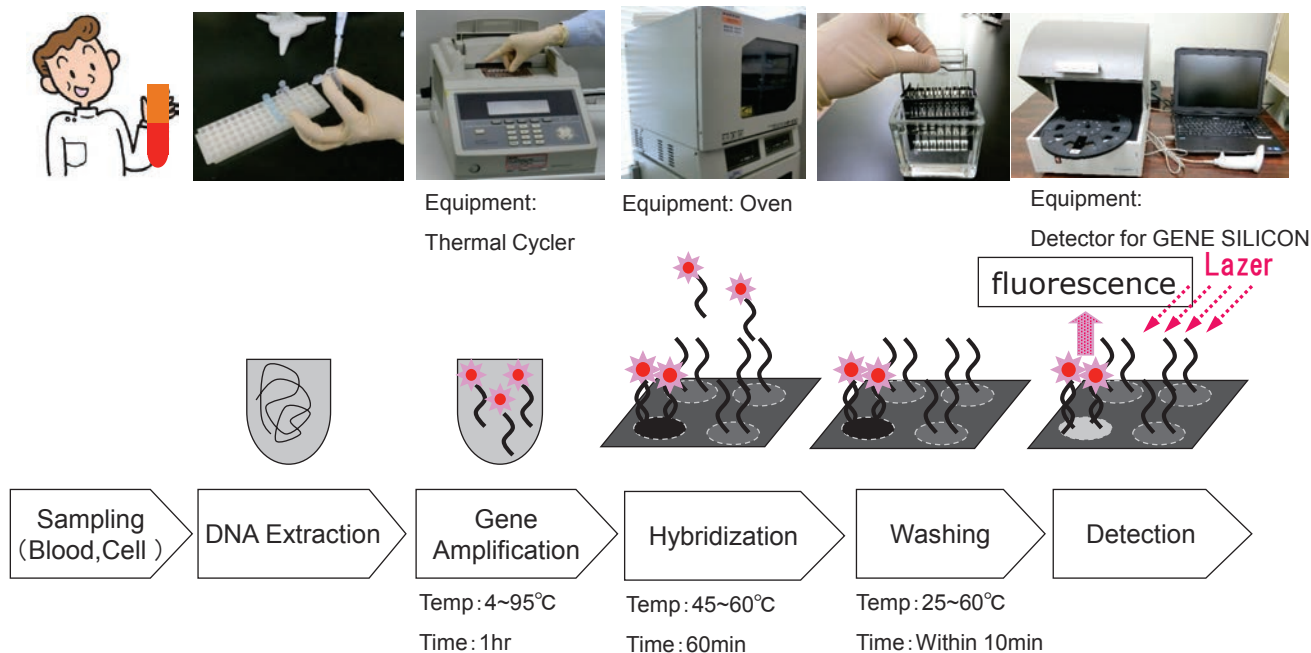


Fig.1 Genetic inspection process for GENE SILICON.

ジーンシリコンをリンス液から取り出し、カバーフィルムを貼り付ける。検出器のターンテーブルにセットし、蛍光測定を実施する。

2.1 各工程における操作性の課題

- ① 遺伝子増幅工程
 - ・PCR装置を用いた遺伝子増幅が必要であり、試薬の調製、分注、混和操作の作業負担が大きい。
- ② ハイブリダイズ工程
 - ・オーブンを使用した雰囲気加熱によりDNAチップと試料の反応を行っているが、使用前にオーブンと湿潤箱の余熱が必要である。
 - ・ハイブリカバーに試料を滴下し、ジーンシリコンに被せる作業が一枚一枚必要である。
- ③ 洗浄工程
 - ・オーブンからジーンシリコンを取り出し洗浄液に浸漬するまでの時間、洗浄ストローク、洗浄スピードを安定させるには一定の技術の習得が必要であり、結果の作業者間差が発生しやすい。
- ④ 検査工程
 - ・カバーフィルムを貼り付ける作業が煩雑である。
 - ・検出器は最大10検査であり、大量検査時にボトルネックとなる。

2.2 検体情報管理の課題

- ・検体情報の登録と、それに対する検査結果の出力機能は現状の検出器に既に備わっているが、検査中取り違え等のチェック機能は無く、不十分である。

3. 課題に対応する装置設計

検査に要する時間を、作業者が手作業で行っている操作時間と機械が動作している反応時間に分けて考えた。この時、操作時間と反応時間のそれぞれを短縮すること、さらにそれぞれの時間が交互に入り交ざるのではなく、それぞれ一括してまとまった時間にする事で煩雑さを抑えることとした。また反応時間については、機械性能を高めることおよびDNAの化学反応性を活用した時間短縮を検討するため、反応部の温調器を温度応答性に優れたペルチェ素子とすることを特徴とした。

3.1 各工程における操作性の課題への対応

- ① 遺伝子増幅工程

PCR法は、DNAの特定領域を大量に増幅することができる方法であるため、わずかな異物の混入（コンタミネーション）が誤った判定に繋がる可能性がある。ジーンシリコンの検査は開放系であり、本装置内で実施する場合、コンタミネーションのリスクを完全に排除することは難しい。また、試薬の送液、分注等は大きな設備も必要になるため、本装置には遺伝子増幅工程を組み込まず、ハイブリダイズ反応以降の工程を自動化の対象とした(Fig.2)。
- ② ハイブリダイズ工程

自動化にあたり、ジーンシリコンと試料の反応方法について再検討した。従来法で用いていたプレートとハイブリカバーでは複雑な動作となり、機械化に不向きであると判断し、PCRチューブ内にジーンシリコンを浸漬して反応させる方式を考案した。PCRチューブを使用することで

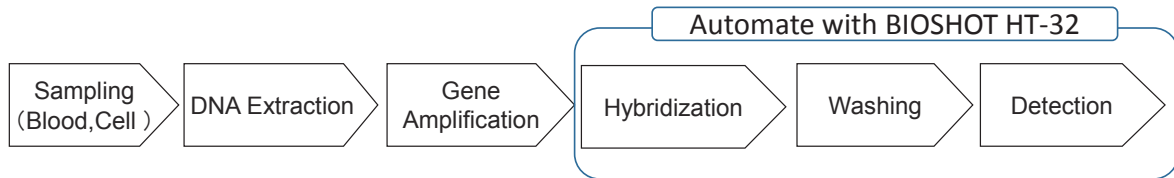


Fig.2 Process to automate with BIOSHOT HT-32.

DNA増幅の終了後、ハイブリダイズ反応試薬を添加しそのままハイブリダイズ工程に移行できるという利点があり、操作性の向上に寄与することが期待される。このため、ジーンシリコンは後述のDNAチップニードルに移載し、PCRチューブに挿入する形の反応を検討した。

i) DNAチップニードル

機械による搬送、扱いやすさを考え、専用のチップ移載治具DNAチップニードル（以下ニードル）を設計した（Fig.3）。操作性を考慮し4連タイプとし、各先端にジーンシリコンを貼付した。試料の液量を最小限に抑えるため、挿入部形状は指定のPCRチューブに最適化されており、1検査あたり45 μ Lの液量で検査することを可能とした。また、ハイブリダイズ反応中の試料の蒸発を防ぐため、PCR

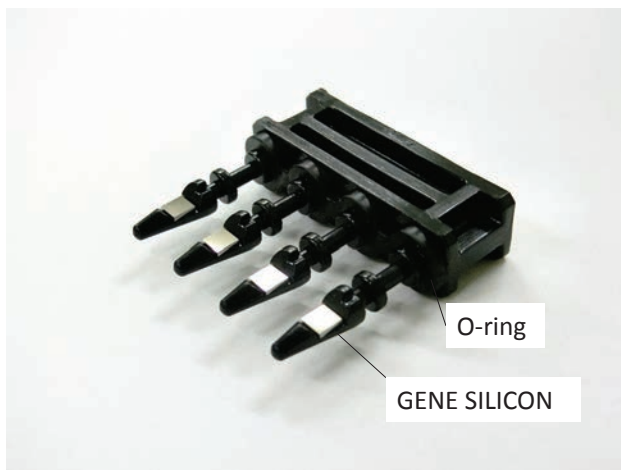


Fig.3 DNA chip needle of BIOSHOT HT-32 for mounting GENE SILICON.

チューブを密閉するOリングを設置した。

ii) ヒートブロック

温調器はヒーターよりも温度応答性の良いペルチェ素子を用いたヒートブロックを採用した（Fig.4 A）。多検体処理に対応できるように、8連PCRチューブを4つ（合計32サンプル）セットできるようにした。試料の温度安定性と高い温度応答性を実現するため、ブロック形状は指定のPCRチューブに整合する形状にし、チューブとブロックの密着性を高めた。また、PCRチューブはセット後に上からPCRチューブホルダーを装着させ、PCRチューブの確実なセットとニードル引き上げ時の持ち上がりを防止した。

iii) ヒートリッド

PCRチューブに挿入されたニードルを上部から押さえる、稼働式のヒートリッドを設置した（Fig.4 B）。

理由の一つはニードルとPCRチューブの気密性を確保するためである。ニードルとPCRチューブでリークする箇所があれば、加温による蒸発で試料の液量が減少し、ハイブリダイズ反応に影響する恐れがある。そこで、試料が入ったPCRチューブにニードルを挿入して反応させる際、ニードルに荷重を与えることでOリングとチューブを密着させ、蒸発を防止した。

もう一つの理由はニードルとチューブ上部を加熱するためである。ヒートブロックによりPCRチューブ内の試料が温められると水蒸気が発生し、それが加温されていないチューブ上部、ニードルに接触して冷却されると水滴として付着し、上述と同様に濃度変化を起こしてしまう。ヒートリッドは内部に棒状ヒーターを備え、反応中に80 $^{\circ}$ Cに加

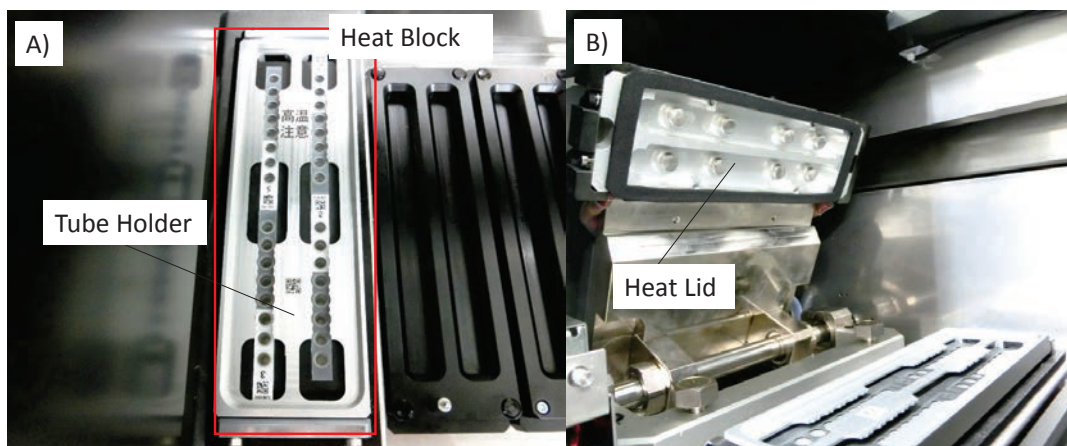


Fig.4 Hybridization stage of BIOSHOT HT-32 for hybridization A)heat block B)heat lid.

熱することでチューブ上部への水滴の付着を抑えた。

③ 洗浄工程

洗浄ステージ (Fig.5) をヒートブロックの横に配置し、ハイブリダイズ反応後、速やかに洗浄に移行できるようにした。ハイブリダイズ終了から洗浄液浸漬までの時間は、手作業時と同等の約4秒間である。セット時の操作性を考え、洗浄液を注ぐ専用のパックを設計し、ステージに据える方式とした。また、様々な洗浄条件に対応するため、洗浄1ステージにはヒーターを内蔵し、加温できるようにした。

④ 検出工程

検出工程は、煩雑なフィルム貼り付け方式から、透明な検査容器にリンス液を満たし、そこにニードルを浸漬して容器面越しにチップを撮影する方式とした (Fig.6)。リンス液を分注した検査容器とニードルホルダーを装置にセットし、洗浄が終わったニードルを機械的に搬送することで検出可能となるため、チップにカバーフィルムを一枚一枚貼り付ける必要がなく機構的にもシンプルかつ操作性

も高くなる。

本工程は検出感度に直結する重要な工程であり、励起光源であるレーザー光がジーンシリコン表面に当たり、ハイブリダイズした蛍光物質から発光した蛍光を受光検出器であるCCDカメラで検出する。この時、ジーンシリコン表面および装置内において、正反射および拡散反射した光がCCDカメラで受光されると、検出感度が著しく低下する。このため、3種類の容器（アクリル射出成型品、アクリル板材貼り合わせ品、ガラス溶着品）を比較検討し、透過性、透明性に優れたガラス溶着品を検査容器として採用した。また、ジーンシリコン表面とガラス面の距離を考慮し、レーザー反射をチップと重ならない位置に発生させ、かつレーザービームを四角形に矯正するスリットを装着した。さらに、ガラス面、ジーンシリコン面で反射したレーザー光が装置内で散乱しないよう、レーザー吸収ホーンを設置した。これらの対策により、チップ撮影時に検出されるバックグラウンドノイズを従来手法と同等に抑えることに成功した。

3.2 検体情報管理の対応

情報管理の方法は、測定に使用するPCRチューブにナンバリングを行い、チューブの識別コードと分注する検体情報を制御ソフトに登録することで測定終了後に検査結果と照合することとした。PCRチューブを個別に識別するため、指定のPCRチューブ専用の二次元コードタグと貼り付け治具を製作した (Fig.7)。これにより、簡便に指定PCRチューブに識別コードを貼りつけることが可能である。また、提供するキット、ニードル、反応試薬、装置に使用する各ホルダー、洗浄パック、検査容器（以下、ワーク (Fig.8)）についても出荷時に二次元コードを付与することとした。これを、ワークをセットした後に、装置に内蔵した二次元コードリーダーで読み取ることで、登録した情報とセットしたワークの内容、位置のマッチングを確認し、検査中取り違えのチェック機能とした。



Fig.5 Washing stage of BIOSHOT HT-32 for washing GENE SILICON after hybridization.



Fig.6 Detecting stage of BIOSHOT HT-32 for detect fluorescence.

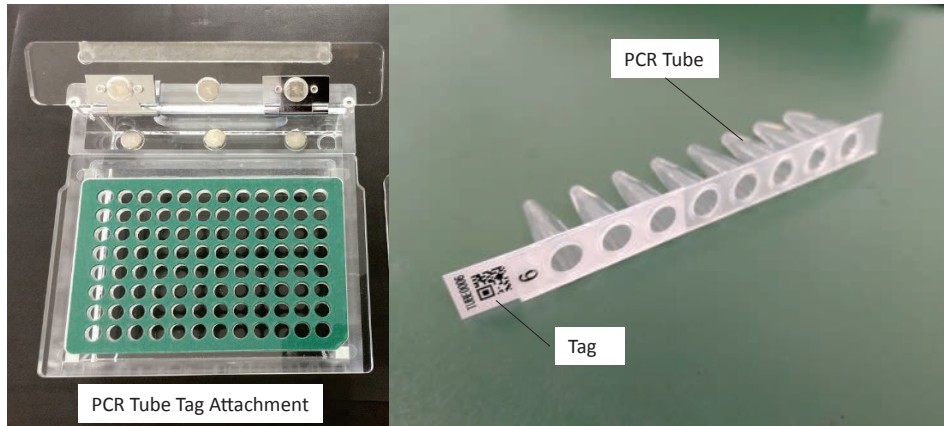


Fig.7 PCR tube tag and tag attachment for BIOSHOT HT-32.

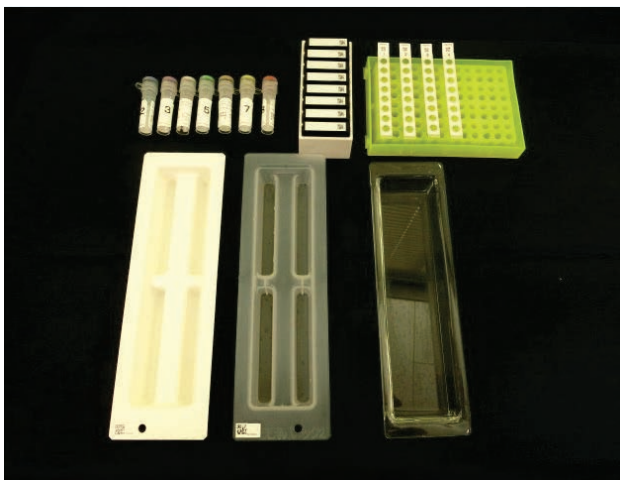


Fig.8 Works used in BIOSHOT HT-32.

3.3 装置の安全性と信頼性の確保への対応

本装置は、病院や検査医療機関への導入、また体外診断用医薬品の測定を想定していることから、医療機器登録することが前提である。よって、医療機器に求められる要求事項（品質、有効性、安全性）に対応する必要がある。開発においてはそれらを考慮した設計を行った。開発の各段階でリスクマネジメントを実施し、受容できないリスクに関しては設計変更や安全情報の提供（文書による喚起）等を実施し、リスクレベルの低減を図った。また、当社内での適合評価が難しい安全規格に関しては、第三者認証機関に試験を依頼した。

電気安全性試験は、体外診断用医療機器に対する安全規

格（JIS C1010-1, JIS C1010-2-101, JIS C6802）を適用した。これは、機器が感電や火傷などの危険の低減を配慮した設計であるか、また故障しても二次的に被害が拡大しないかを規格に基づき確認する試験である。

また、ノイズ耐性・妨害については、体外診断用医療機器に対する電磁両立性規格（JIS C1806-1, JIS C1806-2-6）を適用した。これは機器が発する電磁波が他の機器に影響を与えないか、あるいは周辺からの電磁波によって自らも誤動作しない耐性を有しているかを評価する試験である。

4. 実機への展開

本装置は「遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32」と命名した。BIOSHOTとは当社の登録商標であり、これまでジェンシリコンの卓上検出器の名称として用いてきた。今回はそれに加え、大量処理を意味するhigh throughputの頭文字である「HT」と最大検査数である「32」を加え、本装置の名称とした。

4.1 装置構成

装置の設計にあたっては、スペース効率、操作の分かりやすさを考慮し、各工程をステージとして並列に配置し、各ステージにニードルを移動させる方式とした（Fig.9）。ニードルの移動には、ローダー（Fig.10）を用い、搭載されたチャックでニードルを掴み移動させる。また、ローダー

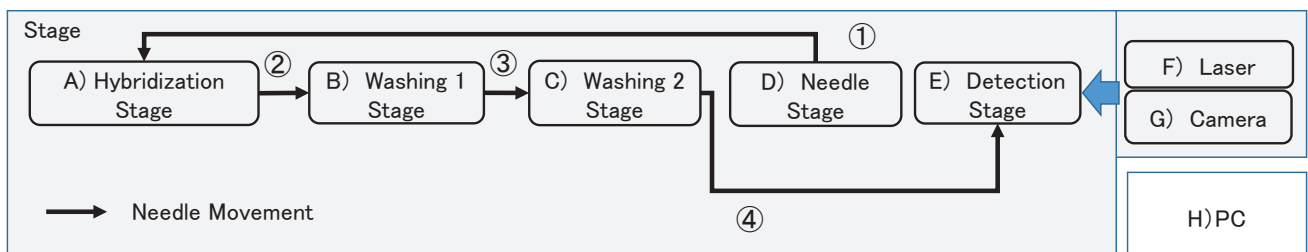


Fig.9 Process flow chart of BIOSHOT HT-32.

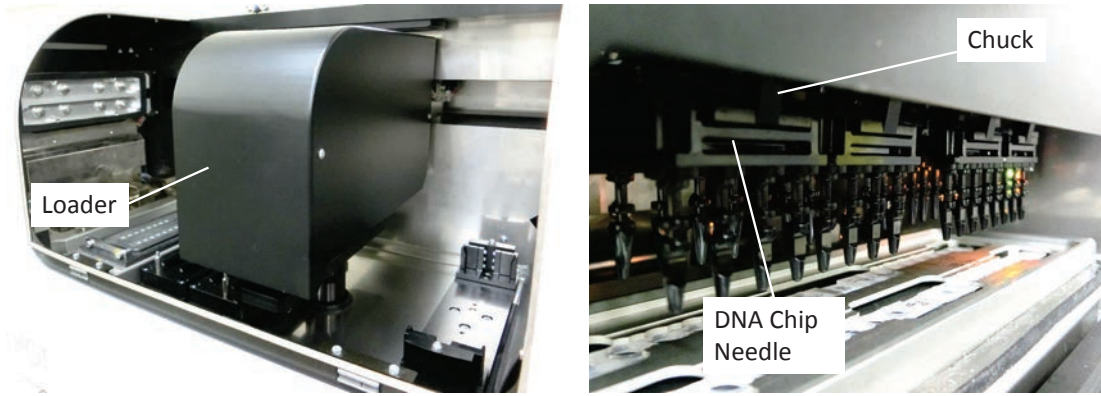


Fig.10 Loader of BIOSHOT HT-32 for carrying DNA chip needles.

にはセットしたワークのID情報を読み取る二次元コードリーダーを内蔵した。主な検査の流れは次の通りである。ニードルステージ (D) に配置されたニードルが、ハイブリダイズステージ (A) にて増幅産物と反応し、洗浄1ステージ (B)、洗浄2ステージ (C) にて洗浄され、検査ステージ (E) にてレーザー (F)、カメラ (G) によって蛍光検出される。操作は専用のPC (H) から行い、測定が終了すると判定結果が記載されたレポートが出力できる。

Table 1 Main specifications of BIOSHOT HT-32.

Item	Content
Processing Time	Hybridization : 30min~60min
	Washing : about 1min (30sec x 2 stage)
	Detection : about 10min (20sec / chip)
Maximum Inspection Capability	32 samples (8 needles)
Size	820 (W) x 517 (D) x 434 (H) mm
Weight	76kg
Normal Rated Power	300VA 50/60Hz

4.2 装置の外観

本装置の外観をFig.11, 検査フローの説明をFig.12, 主要諸元をTable 1にそれぞれ示す。

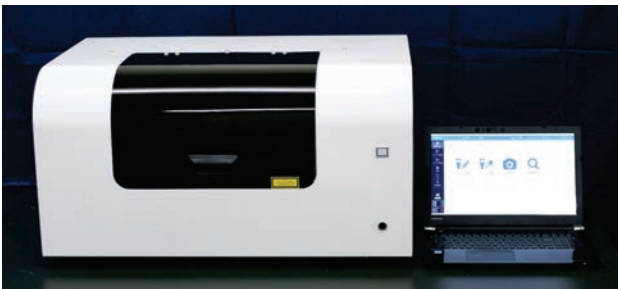


Fig.11 Outside of BIOSHOT HT-32.

5. 性能評価

5.1 検査時間の短縮

5.1.1 操作時間の短縮

ハイブリダイズ反応工程から検出工程までの操作時間について、本装置での最大処理数である32検査を実施する想定で、既存手法との比較を行った。Fig.13に示すとおり、本装置の導入によって、作業者が操作する時間は約50分間短縮された。

ハイブリダイズ工程では、従来のチップ一枚一枚に対して試料を滴下していた工程からニードルタイプのチップをPCRチューブに挿入する工程へと置き換わったことが大き






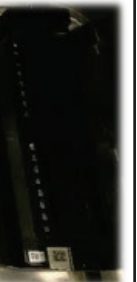

Process	Sample preparation	Hybridization	Washing	Detection
Time	35 min	30~60min	1 min	10 min
Content	<ul style="list-style-type: none"> Mixing the PCR products and buffer Work set  <p>DNA Chip Needle</p>	<ul style="list-style-type: none"> Hybridization reaction of PCR products and DNA chip  <p>Hybridization Stage</p>	<ul style="list-style-type: none"> Washing the chip after hybridization  <p>Washing 1 Stage</p>  <p>Washing 2 Stage</p>  <p>Needle Stage</p>	<ul style="list-style-type: none"> Detect fluorescence of DNA chip with red light laser  <p>Detection Stage</p>  <p>DNA Chip Image</p>

Fig.12 Inspection procedure for BIOSHOT HT-32.

な操作時間削減効果を生んだ。

また、検出工程では従来はチップ一枚一枚にカバーフィルムを貼り付ける作業が必要であったが、本装置では手作

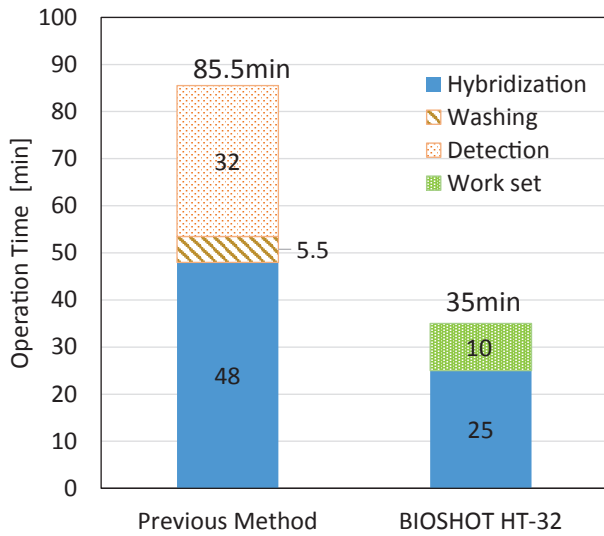


Fig.13 Operation time comparison between previous method and BIOSHOT HT-32.

業無しの検査容器内での一括測定に置き換わったことにより大幅な削減となった。

さらに、工程間の移行作業が装置使用前のワークセット操作に集約されたことで、作業者はハイブリダイズ反応開始から後は検査から離れることが可能となり、操作性を大幅に向上させた。

5.1.2 ハイブリダイズ反応時間の検討

加温特性調査の結果をFig.14に示す。従来方式のオーブンでは、目標温度(51~52°C)付近到達までに約30分間を要しているが、ペルチェ素子を用いた本装置では昇温速度が高速であるため、反応溶液の温度は約1分間で目標温度に到達し安定することが分かった。よって目標温度到達までの時間差である約30分間の反応時間短縮が可能であると推察された。

そこで、実際にジーンシリコンを用いてハイブリダイズ時間に関する検証を行った。Fig.15に本装置でのハイブリダイズ時間の検討結果を示す。検証に使用するジーンシリ

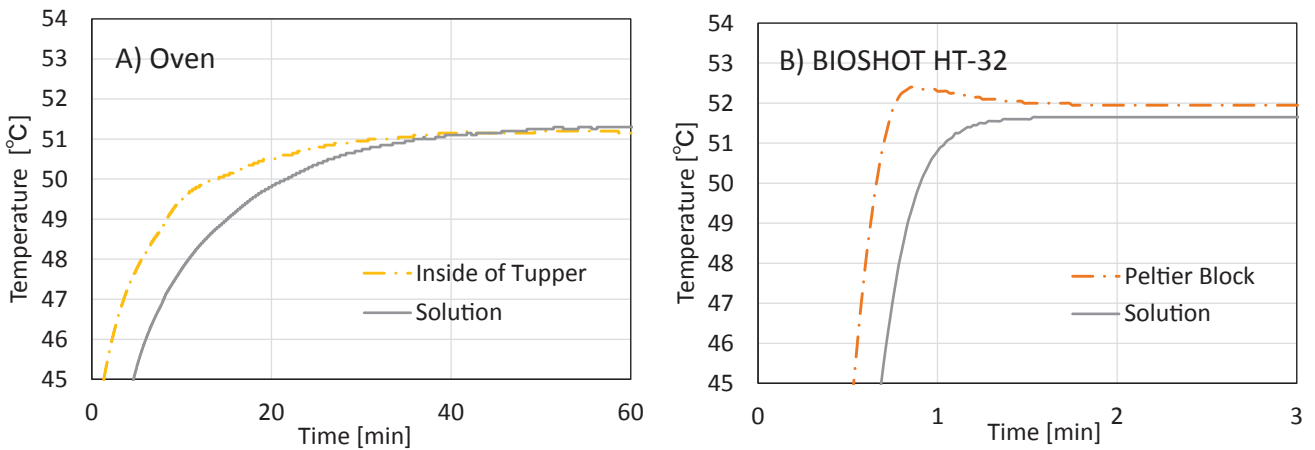


Fig.14 Heating time comparison between A) oven and B) BIOSHOT HT-32.

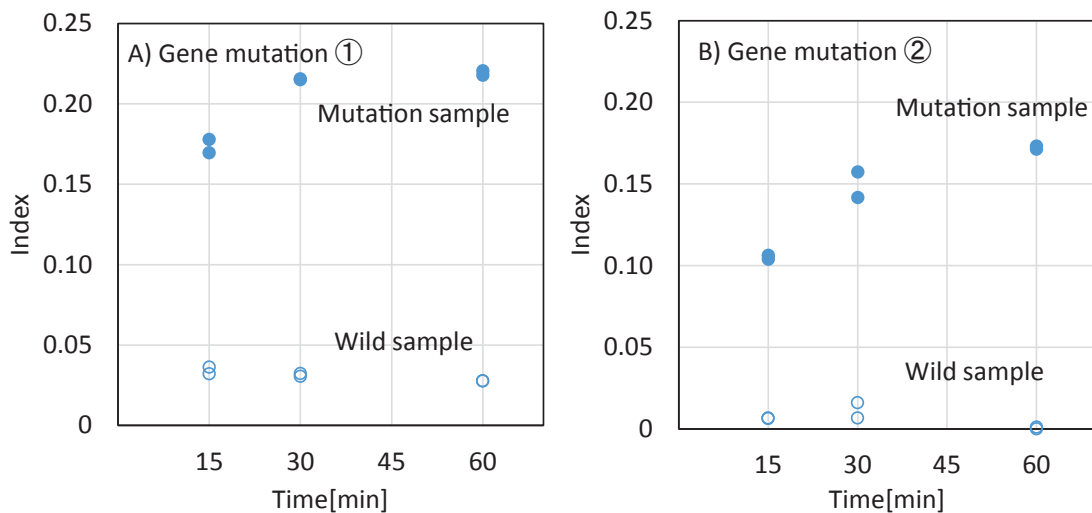


Fig.15 Relationship between hybridization time and index using BIOSHOT HT-32.

コンが検出対象とする遺伝子の中から、判定値の分離が比較的悪かった2種類の遺伝子（検出対象遺伝子①、②）に関して、ハイブリダイズ時間15, 30, 60分間と下記（1）式より求めた判定値（Index）の関係を調べたところ、どちらの検出対象遺伝子も15分間では変異型サンプルの判定値が低下し、野生型サンプルとの分離が悪化したが、30分間では従来の60分間とほぼ同等の値が得られた。つまり、温調器にペルチェ素子を用いたことにより、昇温速度が高速となり、最短30分間の反応時間で十分な判定が可能であることが示唆された。

$$\text{判定値} = \frac{2 \times \text{変異型プローブの蛍光強度}}{\text{野生型プローブの蛍光強度} + \text{変異型プローブの蛍光強度}} \dots (1)$$

5.1.3 ハイブリダイズ反応時間の短縮

一般に、溶液中に2本鎖で存在しているDNAは、高温（約95℃）下では1本鎖に解離する。この熱変性を利用し、チップとのハイブリダイズ反応前に試料をあらかじめ加熱し、1本鎖に解離しておくことで反応平衡に達するまでの時間を短縮できないかと考えた。そこで、ペルチェ素子の温度応答性の速さを生かし、ハイブリダイズ反応前に試料の予備加熱を実施することによる反応効率の向上についての検討を行った。①オープンを用いて、60分間反応させる条件（既存法）、②BIOSHOT HT-32を用いて10分間に短縮して反応させる条件、③BIOSHOT HT-32を用いて、反応前に95℃で2分間予備加熱した後に10分間反応させる条件を実施（各条件n=4）し、蛍光強度（Fig.16）と判定値（Fig.17）の比較を行った。

既存法①に対し、時間短縮した条件②では、蛍光強度が減少し、また判定値も分離が悪化していることが確認できる。一方、予備加熱を用いた条件③では、蛍光強度が増加し、判定値の分離も①と同程度となった。これにより、予

備加熱は試料中の1本鎖DNA割合を増加させ、プローブとのハイブリダイズ反応を促進させる効果が示唆された。ハイブリダイズ反応時間を短縮する手段の一つとして、今後も検討を続ける予定である。

5.2 検体情報の管理

検体情報は二次元コードで登録した後、装置の自動チェック機能により正しく検体を管理できていることを確認した。検査結果は、検体情報、測定日、使用したキット情報等と共にPCのデータベースに保存され、結果検索画面（Fig.18）より、測定日、測定対象、キーワード等で絞り込み検索することが可能である。また、結果は閲覧だけでなく、レポートとしてドキュメント形式での出力が可能である（Fig.19）。

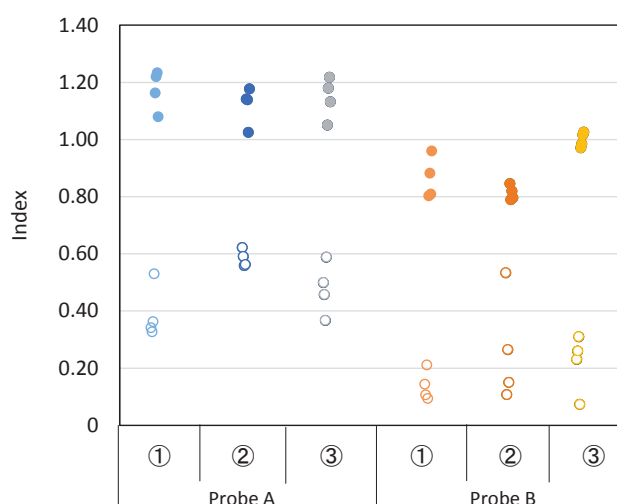


Fig.17 Reaction conditions and index.
 ① Hybridize for 60 minutes using an oven
 ② Hybridize for 10 minutes using BIOSHOT HT-32
 ③ Preheating for 2 minutes and hybridize for 10 minutes using BIOSHOT HT-32

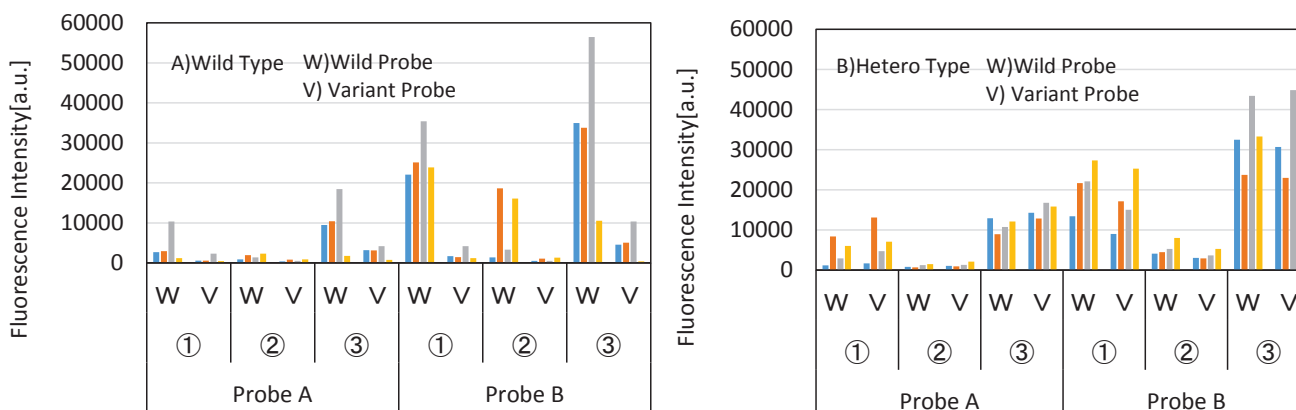


Fig.16 Comparison of fluorescence intensity values.
 ① Hybridize for 60 minutes using an oven
 ② Hybridize for 10 minutes using BIOSHOT HT-32
 ③ Preheating for 2 minutes and hybridize for 10 minutes using BIOSHOT HT-32



Fig.18 Results search window of BIOSHOT HT-32.

BIOSHOT
判定結果

サンプルID	sample1
コメント	
登録日	2018/11/27 16:09
登録ユーザー	tk
登録権限	IVD
測定日	2018/11/27 17:16
測定ユーザー	tk
測定権限	IVD
キット名	TEST chip kit

レポート 正常終了

TEST 結果

BGシグナル: 正常
スポットシグナル: 正常
検査結果: 合格

1 / 5

Fig.19 Output report of genetic inspection from BIOSHOT HT-32.

5.3 装置の安全性と信頼性の確保

装置の安全性、信頼性についてはリスクマネジメントにより評価し、すべてのリスクについて受容可能なレベルまで低減を図った。また、第三者認証機関に依頼した安全規格試験（電気安全性、電磁両立性）についても合格し、規格への適合を証明するレポートが発行された。

6. 結言

遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32の完成により、迅速簡便な多数検査、より確実な検体情報管理、医療機器としての安全性と信頼性を備えた遺伝子検査システムを実現することができた。検体情報の管理によりミスを防止する、操作者の技量差による検査結果のばらつきを抑えるなど、自動化によるメリットは大きいと考える。また、速い温度応答スピードによるハイブリダイズ時間短縮などの優位性を生かした新たな展開も期待される。なお、本装置は一般社団法人KEC関西電子工業振興センター、テュフラインランドジャパンの第三者認証を得て、2018年10月に医療機器登録が完了した。（登録番号：13B3X10232HT3201）

最後に、本装置の開発、設計、製造においては、旭興産株式会社、株式会社ダイナコムの皆様にご協力を頂いた。また、開発支援、サポート頂いた山口県、山口県産業技術センターおよび関係者の皆様へ深く感謝するとともに、御礼申し上げる。

引用文献

- 1) 岡村浩, 山野博文, 平山幸一, 市原輝久: 東洋銅鋳, 34 (2004), 41.