

解禁時間 (テレビ、ラジオ、WEB) : 平成 28 年 7 月 13 日 (水) 午前 1 時 (日本時間)  
(新聞) : 平成 28 年 7 月 13 日 (水) 付朝刊



農研機構



興研株式会社

平成 28 年 7 月 12 日

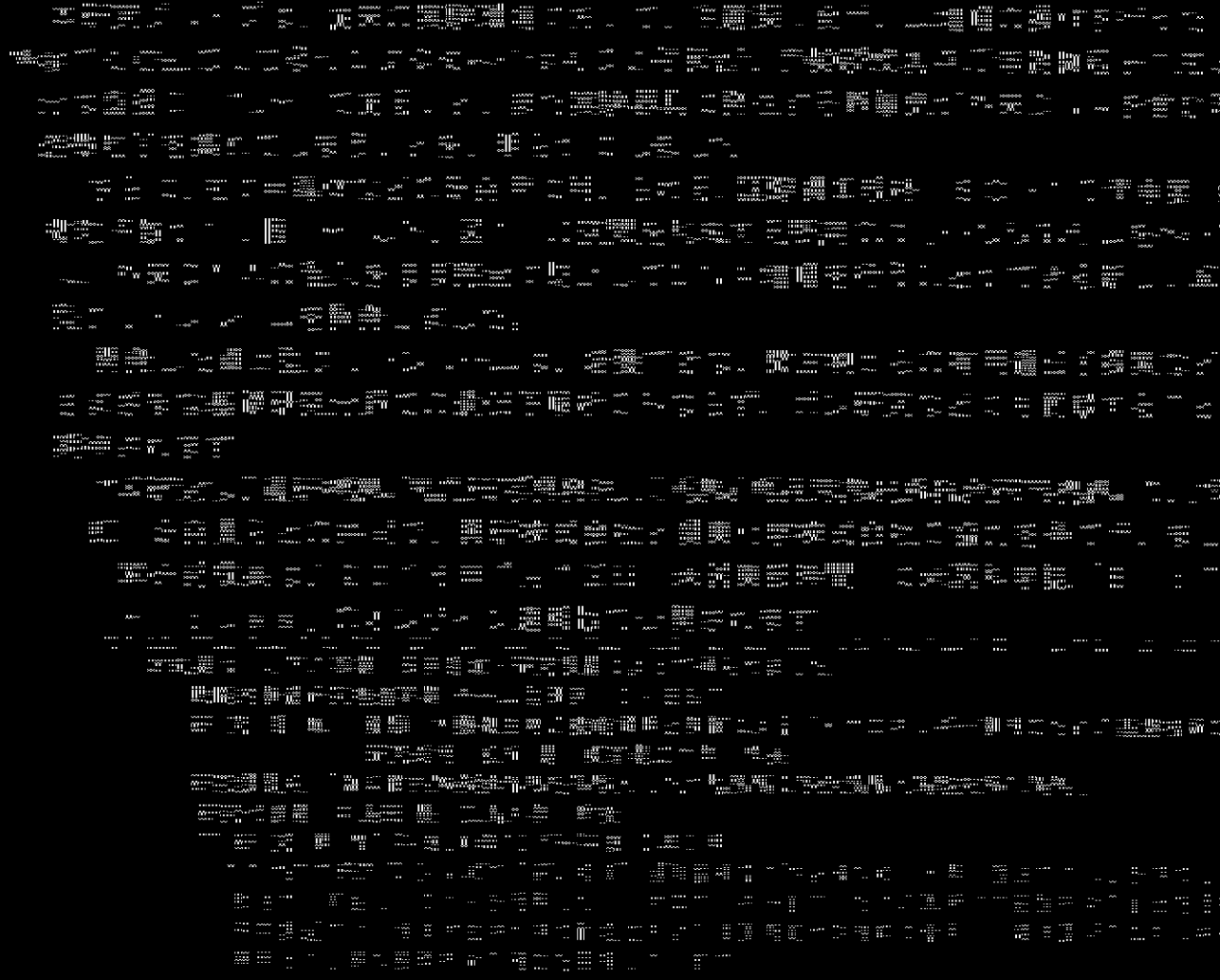
科学技術振興機構 (JST)  
広島大学  
農研機構  
興研株式会社

## 外来DNAの混入を防ぎ、信頼性の高いDNA解析を可能にする 卓上型クリーンルームを開発

### ポイント

- すべてのDNA解析方法において、外来DNAの混入は重大で防ぎづらい問題だった
- 空気中を浮遊する微粒子が主な汚染源であり、実験器具の静電気も重大な要因であることを明らかにした。
- DNAの混入をほぼ完全に防止できるDNA増幅用のクリーンルームを開発した。

DNA解析は、遺伝子検査や医療診断などに不可欠な技術であり、近年では、微量のDNA、特に土壌中のDNAを増幅<sup>注1)</sup>する場合には大きな問題となっていました。



## <研究の背景と経緯>

DNAの増幅と解析は、すでに基礎研究のみならず犯罪捜査に至るまでさまざまな分野で利用されてきています。しかし、目的試料への外来DNAの混入（コンタミネーション）は、DNA解析において重大かつ防ぎづらい問題として認識されながらも、原因の特定が困難で解決が難しい問題でした。微量のDNAを増幅するPCR法は高精度・高感度であるにも関わらず、臨床診断ではコンタミネーションによる誤診を防ぐために、結果を判断する際に他の検査方法と併せる必要があります。また、次世代シーケンサー<sup>注2)</sup>による核酸配列の大規模解析でも、試料とは無関係なDNA配列の混入が起きていることが報告されており、データの信頼性の問題が指摘をされています。

これまで、作業者の経験・技量不足や、遺伝子組換えで作製された酵素へのDNAの混入<sup>注3)</sup>がコンタミネーションの主原因であると考えられていました。一方で、増幅試薬の調製段階における環境、特に空気中に浮遊している微粒子が汚染原因になり得ることもあることも報告されています。そのため無菌操作に使用するクリーンベンチ（国際標準規格ではISO-5、図1）が、一般的にはDNA増幅用の試薬調製に利用されています。しかし、微生物やヒトの1細胞から全ゲノム増幅を行う場合、クリーンベンチを使用してもコンタミネーションは防止できず、DNAを加えなかった試料からもDNA増幅が生じてしまうため、結果の再現性および信頼性が著しく低下してしまいます。

本研究チームでは、培養できない微生物<sup>注4)</sup>の有用遺伝子の利用を想定しており、このような1細胞レベルのDNA増幅が必要になる先端的研究を行う場合には、コンタミネーションの問題を解決し、信頼性の高いデータを得ることが必要です。

そこで、DNAコンタミネーションを抑制するための対策として、試料の採取・調製・増幅の各工程において、

また、作動中でも、落下してくるカビ孢子や花粉などの粒径 $30\mu\text{m}$ 以上の重量のある飛来物は排除できない恐れもあったため、システム内の清浄エリアを覆うフードを設置しました（図3）。フードの設置自体も作業者の腕の動きも清浄度には影響せず、ISO-1環境を維持可能なことが確認できました。そこで、このフードを設置した卓上型クリーンルームシステム（ISO-1環境）で試薬調製した場合と、一般的なクリーンベンチ（ISO-5環境）で調製した場合で、同一の試薬を用いた全ゲノム増幅へのコンタミネーションを比べたところ、ISO-1でのみコンタミネーションが確認され（図4）、粒子径 $0.5\mu\text{m}$ 未満の浮遊微粒子中にDNAが含まれていることが明らかとなりました。

一方で、卓上型クリーンルームを用いて全ゲノム増幅実験を繰り返すうちに実験箇所が増加したにも、クリーンルーム内はISO-1を維持しているにもかかわらず、コンタミネーションの頻度が上昇してきました。汚染源についてさまざまな検討を行ったところ、実験中の気流との摩擦によってプラスチック製実験器具の表面に静電気が発生し、実験が終了してシステムを停止したときに流入してくる空気に含まれる微粒子が、その静電気によって付着することが確認されました（図5）。さらに、一度付着した微粒子は除電されてもプラスチック表面に付着したままとなることも確認されました。そこで、装着したフード内面の天井に除電器を設置し（図3）、実験中に発生する静電気を速やかに除去したところ、コンタミネーションをほぼ完全に抑制することが成功しました（図6）。実験器具・器具が発生した静電気が、微量の試薬や試料を飛び跳ねさせるなどの問題は報告がありましたが、DNAコンタミネーションへの影響については、世界で初めての報告です。

## <今後の展開>

今回開発した卓上型クリーンルームシステムは、興研株式会社から国内向けに販売が開始されています。本クリーンルームにより、1細胞由来培養量の少ない細胞を高倍率培養を再現できる全ゲノム増幅が可能になるため、これまで困難であった培養できない微生物の有用遺伝子探索研究のさらなる促進が期待できます。また、全ゲノム増幅法はヒトの1細胞からでも可能なため、末梢血中の遊離ガン細胞（Circulating tumor cell、CTC）や血中遊離DNA（cell-free

<参考図>

国際規格	1 m <sup>3</sup> 中の最大許容粒子					GMP (作業時)
ISO 14644-1	0.1 μm	0.3 μm	0.5 μm	1.0 μm	5.0 μm	
ISO-1	10					
ISO-2	10 <sup>2</sup>	10				
ISO-3	10 <sup>3</sup>	102	35			
ISO-4	10 <sup>4</sup>	1,020	352	83		
ISO-5	10 <sup>5</sup>	10,200	3,520	832		グレードA
ISO-6	10 <sup>6</sup>	102,000	35,200	8,320	202	





図3 DNA増幅用ISO-1クリーンルーム

2つのプッシュフード（PH1、2）に挟まれ、飛来物防止フードに囲まれた空間の清浄度はISO-1（0.1 $\mu$ m以上の微粒子が10個/m<sup>3</sup>以下）のクリーンエアになる。使用時は除電器で除電しつつパーティクルカウンターで微粒子数を計測しながら、DNA増幅用反応液の調製を行う。実験器具などは、汚染を避けるためにクリーンエア内で保管する。

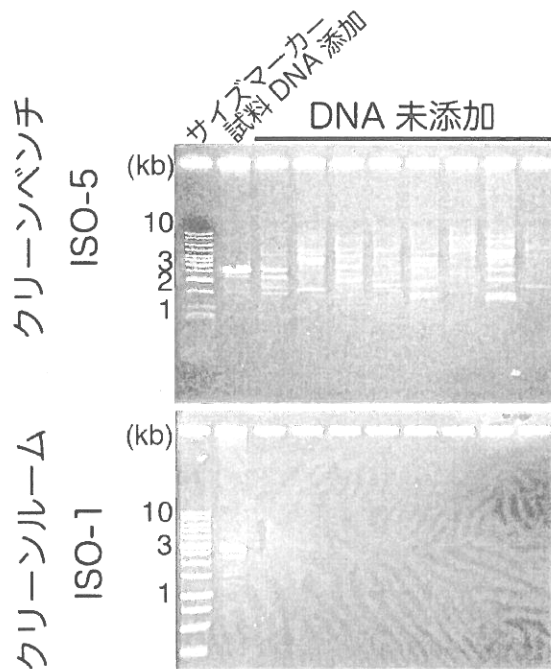


図4 クリーンルーム使用による浮遊微粒子汚染の防止

同一の試薬を用いたDNA増幅の結果。白い線はDNAを示す。クリーンベンチ（ISO-5）で行った実験（上図）では試料DNA未添加の場合でも、増幅DNA由来の縞模様が現れており、コンタミネーションを起こしてしまふおちとどがかかる。キヨウエー製最先端卓型クリーンルーム（ISO-1）を使用した場合（下図）は、増幅DNA由来の縞模様が現れておらず、混入が防止できている。



図5 静電気の発生

システムが稼働中は、気流との摩擦によって、プラスチック製品の表面上に静電気が発生（摩擦帯電）する。システムが停止すると外部から流入した微粒子が排出されないため、帯電したプラスチック製品には電気集塵作用により微粒子が付着してしまう。この付着微粒子が、以降の実験へのDNA汚染源となり得る。この結果を踏まえて、清浄空間内部に、除電器（図2、黄矢印）を設置し、システム稼働中に起きる、プラスチック製品の帯電を防止した。

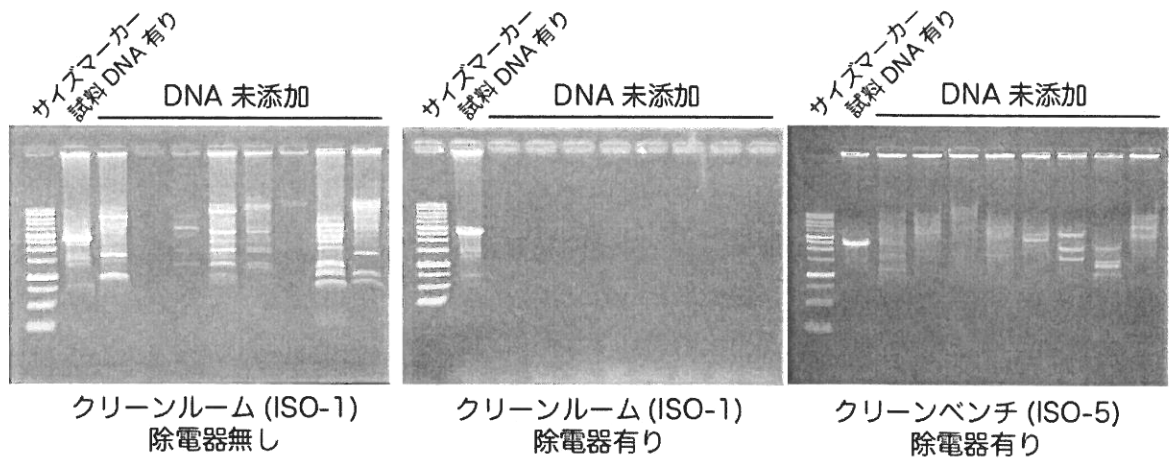


図6 除電器による除電の効果

同一の試薬を用いて、除電器の有し無しで得られたDNA増幅実験を行

## <用語解説>

### 注1) 全ゲノム増幅法

特殊なDNA合成酵素を用いてゲノムDNAを大量に増幅する方法で、微生物やヒトの細胞がらでも、全ゲノム配列の解析が可能になると期待されている。しかし、非特異的にDNAを増やすため、特異的に増やすよりもよき悪人もDNAが増幅されることが分かっています。

### 注2) 次世代シーケンサー

これまで使用されていたDNA配列決定装置(シーケンサー)と比較して、安価に高速で大量の配列解析が可能になるのが特徴。ヒトゲノムでも15月以内で解析が可能のため、現在医療現場での活用が進められており、精密医療(患者の腫瘍に発生した正確な突然変異の特定など)の分野で期待が高い。

### 注3) 酵素にDNAが混入

一般的に分子生物学で使われる酵素は、細菌や大腸菌で作成される。そのためDNAに親和性が高い酵素、例えばPCRに使用する耐熱性ポリメラーゼには大腸菌ゲノムが混入している。本研究でもこれまでに開発したDNAの混入を極限まで減らした特別なDNA-free酵素(関東化学から販売中)を使用している。

### 注4) 培養できない微生物

地球上の全微生物の99%以上は培養困難であると言われている。この難培養微生物の遺伝子を直

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

岡村 好子 (オカムラ ヨシコ)

広島大学 大学院先端物質科学研究科 准教授

〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

Tel : 082-424-4583 Fax : 082-424-4583

E-mail : okamuray@hiroshima-u.ac.jp

<JSTの事業に関すること>

川口 哲 (カワグチ テツ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K' & 五番町

Tel : 03-3512-3524 Fax : 03-3222-2064

E-mail : crest@jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

広島大学 社会産学連携室 広報部 広報グループ

〒739-8511 広島県東広島市鏡山1-3-2

Tel : 082-424-6781 Fax : 082-424-6040

E-mail : koho@office.hiroshima-u.ac.jp

農研機構 食品研究部門 企画管理部 交流チーム

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Tel : 029-838-7980 Fax : 029-838-8005

E-mail : nfri-info@naro.affrc.go.jp

興研株式会社 環境 エンジニアリングディビジョン

〒102-8459 東京都千代田区四番町7番地

Tel : 03-5276-1931 Fax : 03-3265-1976