

指定コピー数のターゲットDNAを含む標準物質の作成への新規バイオプリンティング技術の応用

A Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA

季 雨農*	和泉 賢**	川島 優大*	旗田 茂雄*	加藤 幾雄*
Unoh KI	Satoshi IZUMI	Yudai KAWASHIMA	Shigeo HATADA	Ikuo KATOH
中澤 聡*	松本 貴彦*	米川 侑希*	橋本 みちえ*	林 和花*
Satoshi NAKAZAWA	Takahiko MATSUMOTO	Yuuki YONEKAWA	Michie HASHIMOTO	Waka LIN
前田 礼男*	海野 洋敬*	瀬尾 学*	Riztyan***	大西 真理***
Reo MAEDA	Hirofuka Unno	Manabu SEO		Mari ONISHI
布藤 聡***	岸根 雅宏****	高畠 令王奈****	橘田 和美****	
Satoshi FUTO	Masahiro KISHINE	Reona TAKABATAKE	Kazumi KITA	

要 旨

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの核酸増幅法は様々な分野でターゲットDNAの検出に用いられている。近年では分析化学の発展とともに、1分子レベルのDNAを正確に定量する方法への需要が高まっている。しかし、適切な標準物質がないため、低コピー数のターゲットDNAの検出精度が十分に管理されていないことが多い。そこで、我々は指定コピー数のターゲットDNAを含む標準物質を作製するための新しい方式を開発した。1コピーのみのターゲットDNAを有する細胞の懸濁液をインクジェットヘッドで吐出し、高感度カメラで各液滴中の細胞数をカウントする形でコピー数を制御した。更に我々は本標準物質と希釈法で作製したDNA溶液を使用し、検出限界（LOD）の評価を用いて定性PCRの性能を比較した。結果として、本DNA標準物質を利用することで、より正確な評価結果を得られた。

ABSTRACT

Nucleic acid amplification methods such as polymerase chain reaction (PCR) are extensively used in many fields to detect target DNA. Recent advances in analytical sciences require a method to accurately quantify DNA at the single molecule level. However, analytical quality control when detecting low copy number target DNA is often missing due to a lack of appropriate reference materials. Herein, we have developed a novel method to produce reference material containing a defined copy number of target DNA. In this method, the suspension of cells carrying a single target DNA sequence is ejected by an inkjet head and the number of cells in each droplet is counted using highly sensitive cameras in order to control the copy number. We compared the use of this reference material with that of diluted solutions of DNA to evaluate the performance of qualitative real-time PCR in terms of the limit of detection (LOD). Our results demonstrate that by using this DNA reference material, more accurate information regarding performance quality can be provided.

* HC事業本部 バイオメディカル事業センター
Biomedical Business Center, Healthcare Business Group

** イノベーション本部 戦略統括センター
Strategy Management Center, Innovation/R&D Division

*** 株式会社ファスマック
Fasmac Co., Ltd.

**** 農業・食品産業技術総合研究機構 食品分析研究領域
Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

This paper is a translation of "Seo, M. et al., Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA. *Anal. Chem.* 2019, 91(20), 12733-12740" by the original authors under a CC-BY 4.0 license.

1. はじめに

ここ数十年において、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は分子診断または分子検出分野で至適基準技術として広く使用されてきた。PCR法は反応温度を調整するサーマルサイクルを繰り返し、サーマルサイクルごとにDNA分子濃度を約2倍に増幅することで元の検体のDNA分子濃度を測定する方法である。増幅で発生する蛍光強度がDNA分子濃度に比例するため、理論上蛍光強度が閾値に到達したサイクル数から検体の濃度を計算することが可能である。PCR技術の高特異性と高精度の特徴故、多くのPCR法が開発され、様々なアプリケーションで使用されてきた。特に食料や飼料の中の遺伝子組換え生物（GMOs）の検査¹⁻⁵、感染症の診断⁶、法医学DNAプロファイリング⁷などの分野での需要が高まり、近年では定性PCR試験（ターゲットDNAの有無を測定）及びリアルタイム定量PCR試験（ターゲットDNAのコピー数を測定）がますます普及してきた。しかしながら、PCR検査における陽性（ポジティブ）／陰性（ネガティブ）の判定閾値は、装置性能、試薬性能、PCR測定条件に左右されるため、各種ばらつきを考慮した検出限界や最低保証感度が存在する。実際に、PCRは理論上DNAを1コピーから検出可能であるが⁸、その性能を保証する手段がなかった。その環境の中で、一部の定量及び定性PCR向けのガイドラインではパラメーターのテスト、及びその受入条件が提案された^{9,10}。定性PCR法の感度指標の一つとして検出限界（LOD）がある。Clinical and Laboratory Standards InstituteはLODをサンプル中の検体の確率が記載された検出可能な最小量であり、ただし定量可能である必要はないと定義している¹¹。このアプローチには既知濃度の検体を含む標準物質が必要である。現状において、定性PCRのLODを決定するため、一般的には濃度が既知のDNA溶液を希釈して用意する標準溶液シリーズを標準物質として用いる。元となるDNA溶液の濃度は紫外線（UV）での吸光分析法¹²、蛍光分析法^{13,14}、または質量分析法で測定可能である¹⁵⁻¹⁷。しかし、吸光分析法も

蛍光分析法もpHや塩濃度などのサンプルの状態に極めて影響されやすい。更に、これらの方法でのDNA定量の正確さは未だ不明である¹⁸。質量分析法はDNAを正確に定量可能であるが、メンテナンスの必要性、複雑さ、及びコストの高さはこのアプローチの重大な欠点である。加えて、希釈プロセスの結果は確率分布の1種であるポアソン分布¹⁹に従うため、希釈によって得られるDNAコピー数は常に一定ではない。ポアソン分布によって発生するレプリケート（反復実験）間の相対的変動は低コピー数の場合においてより大きくなる。そのため、作業者がどれほど正確かつ精密に希釈プロセスを実行しても、1分子レベルのターゲットDNAのコピー数を制御するのは不可能である。

以前我々はDNA溶液の平均濃度を0.4 molecules/wellに希釈することによる1分子DNAの標準物質の開発を報告した²⁰。しかしこの方式では1分子DNAの標準物質は用意可能であるが、大量生産には不向きである。

近年では、ティッシュエンジニアリングや再生医療での潜在的な応用が期待され、バイオプリンティング技術への関心が高まっている²¹⁻²³。その中でもインクジェットプリンティング技術は高分解能、高精度、高速、ローコスト、高柔軟性などの利点を有している。そこで、我々はインクジェットプリンティング技術を利用し、圧電効果によるメンブレンのノズル振動で細胞を含む液滴を吐出するインクジェットに基づくバイオプリンティングシステムを開発した²³⁻²⁵。本稿では、このバイオプリンティング方式での指定コピー数のターゲットDNAを含む細胞数ベースDNA標準物質（以降、細胞標準物質）の作製、及びその用途について説明する。

2. 実験材料と方法

2-1 標準配列を有する遺伝子組換え酵母株の生成

我々は一倍体出芽酵母株 YIL015W BY4741, a型 [1408] (ATCC) を原株として利用した. この株の中の *BAR1* 遺伝子 (GenBank登録番号 NM_001179365.1) のオープンリーディングフレームは, 削除カセットモジュールによって相同組換えした (*Saccharomyces* Genome Deletion Project²⁶⁾を参照). *BAR1* が削除された酵母は, 野生株よりも α ファクターに敏感であり, G1 期に維持させることが可能である²⁷⁾. 我々は標準配列及び *URA3* 遺伝子 (ピリミジン合成酵素, オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをエンコードする) を選択可能なマーカーとし, 親株の *BAR1* 領域に導入した. 導入した標準配列はトウモロコシ高移動度群 A 遺伝子²⁸⁾ (*hmgA*, GenBank登録番号 AJ131373.1, nt 604-871), 及び大豆レクチン遺伝子⁴⁾ (*Lel1*, GenBank登録番号 K00821.1, nt 1141-1541) の2種類の遺伝子の部分フラグメントによって組成された *hmg-Lel1* を使用した. 今後の研究のためにこの2つの遺伝子フラグメントをゲノムDNAに組み込んだが, 本研究では *Lel1* のみをターゲット配列として使用した. 酵母のコンピテントセルの準備と組換えは Fast Yeast Transformation kit (Geno Technology 社製) のマニュアルに従って実施した.

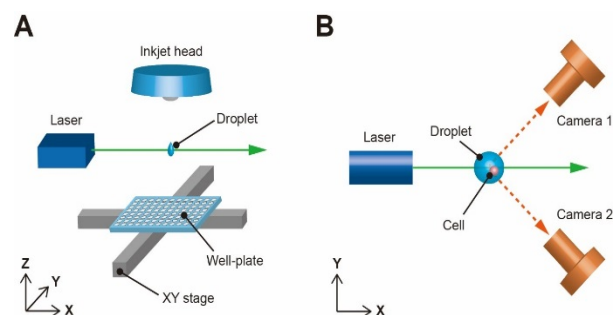


Fig. 1 Schematic diagram of inkjet and cell counting system used in the production of copy number defined reference material.

(A) shows the side view, where droplets containing zero, one, or more yeast cells are ejected into each well of a well plate. The positioning of the well plate is controlled by planar XY stages. (B) shows the top view, where excitation laser light is shown in green and fluorescent light emitted from cells in the droplet is shown in orange. The fluorescent images of cells in each droplet are captured simultaneously by two highly sensitive cameras positioned perpendicular to each other.

組み換えた酵母の懸濁液はウラシルのない選択培地プレートの中で30°Cで培養した. インキュベーション後にプレートに現れたコロニーを別々で液体培地の中で培養し, グリセロールストックの中で保存した. 組み換えた酵母のターゲット遺伝子の発現はPCRとサザンブロットングで検査した. 具体的には, サザンブロットングで検査するため, 我々は5 µgの酵母ゲノムDNAをHindIIIもしくはKpnIで切断し, 0.8%のアガロースゲル電気泳動で単離した後, 単離したDNAをナイロンメンブレンHybond N+ (GE Healthcare社製) 上にブロットした. 続いて AlkPhos Direct Labeling and Detection Systems (GE Healthcare社製) で用意したアルカリホスファターゼ標識プローブを酵母ゲノムDNAとハイブリダイゼーションさせ, 化学発光イメージャーAmersham Imager 600 (GE Healthcare社製) で測定した.

2-2 インクジェット分注と光学カウント

我々は細胞を含む液滴を吐出するインクジェットヘッドと、液滴中の細胞数を測定する光学システムを組み合わせた新規システムを開発した (Fig. 1A). 本インクジェットヘッドは細胞懸濁液を保持する開放型の液室、液室の底部に固定されたディスク状のメンブレン、メンブレンの中心に位置するノズル開口、及びメンブレンの外側に固定された環状ピエゾアクチュエータによって構成した²³⁻²⁵⁾. このヘッドはメンブレンの振動によって直径80 μm のノズル開口から約380 pLの液滴 (直径約90 μm) をオンデマンドで吐出することが可能である. 更に各液滴中の細胞数を測定するため、液滴中の染色した細胞から発した蛍光をお互い直交になるように配置された2台の高感度カメラで撮影した (Fig. 1B). 各液滴中の細胞の画像を撮影するため、短パルスNd:YAGレーザー (Explorer One 532-2Y, Spectra-Physics社製, 励起波長: 532 nm) を蛍光励起光として用い、液滴の吐出に同期して照射した. Evans Blue (ピーク射出波長: 680 nm) で染色した酵母から発した蛍光は2台の高感度カメラ (ORCA-FLASH4.0 V3, 浜松ホトニクス社製) で測定し、取得した2枚の画像セットから細胞数を推定した. 加えて細胞カウント用の画像処理はImageJ²⁹⁾で実行した. このインクジェットシステムを使用し、我々は酵母細胞懸濁液をウェルプレートに分注して標準物質を作製した. プレートは2軸自動ステージ (T5L06-100,350, ヤマハ社製) に設置した.

2-3 細胞標準物質の作製

培養とハンドリングが簡単であるため、我々は一倍体酵母を標準DNAのカプセルとして使用した. 標準配列を内包した遺伝子組換え酵母は0.077% (w/v) のUra DOサプリメント (タカラバイオ社製) を含んだ2.67% (w/v) の最少SD培地 (タカラバイオ社製) で一晚培養した. 一晚培養後のカルチャーを新鮮な培地で1:20の比率で希釈し、OD600が0.5-0.6になるまで繁殖させた. その後、 α ファクター (α 1-Mating Factor acetate salt, Sigma-Aldrich社製) を添

加して最終的な濃度が0.00075% (w/v) の溶液を得てから、更に28°Cで2.5時間培養し、G1期で停止させた. 培地に添加した α ファクターは一倍体遺伝子組換え酵母をG1期に停止させるための接合フェロモンである. 細胞周期は細胞をSYTOX green核酸染色剤 (Thermo Fisher Scientific社製) で染色後、フローサイトメトリー (SH800Z, ソニー社製) で確認した. 周期制御した酵母を70%のエタノールで固定した後、超音波ホモジナイザー (ヤマト科学社製) で1 mMのEDTAを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS, Thermo Fisher Scientific社製) に分散させた. 固定後、酵母を0.01% (w/v) のEvans Blue染色剤 (富士フイルム和光純薬社製) に5分間浸けて染色した. 以上のプロセスでエタノール固定の酵母が細胞インクとして出来上がった.

インクジェットヘッドで吐出した酵母懸濁液の液滴中の細胞数はポアソン分布に従い、以下の確率分布を持つ.

$$P(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \quad (1)$$

ただし、 k は液滴中の細胞数、 λ は液滴中の平均細胞数を表す. $\lambda = 0.06$ cells/dropletの場合、液滴中に2個以上の細胞が存在する確率は理論上0.17%とかなり低くなる. 従って、液滴中に2個以上の細胞が存在する確率を下げるため、我々は酵母懸濁液の濃度を1液滴当たり0.06細胞、約 1.57×10^5 cells/mL相当に調整した. また調整前の酵母濃度はCountess Cell Counting Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific社製) で測定した. 調整後の酵母懸濁液はインクジェットシステムによって96ウェルプレート (MicroAmp Fast Optical 96 Well Reaction Plate, 0.1 mL, Thermo Fisher Scientific社製) の各ウェルに指定の細胞数になるまで分注された. 分注した酵母からDNAを溶出させるため、遺伝子組換え酵母を38°Cで35分間0.1% (w/v) の細胞壁溶解酵素Zymolyase (ナカライテスク社製) の中に仕込んだ. その後、溶解酵素を失活させるため、95°Cで2分間加熱した. それとは別に、インクジェットシステム評価用に0コピーのサンプルを用意するため、濃度が $\lambda = 0.06$

cells/dropletの酵母懸濁液をインクジェットシステムで各ウェルに液滴を1滴のみ分注し、光学計測で細胞が存在しないウェルを選定した。結果として、細胞が存在しない液滴を1滴保持するウェルを257ウェル作製した。

2-4 細胞標準物質と希釈DNA溶液の比較

我々はリアルタイムPCR法のLOD測定の結果を以って、本研究で開発した細胞標準物質と希釈プラスミドDNA溶液を比較した。本研究で使用した*Le1*標準配列検出用のプライマーとTaqManプローブの配列はそれぞれ以下である。

5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3',

5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3',

5'-6-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3'

増幅サイズは118 bpに設計した。リアルタイムPCRはQuantStudio 12K Flex System (Thermo Fisher Scientific社製) で実施した。各ウェルに500 nMのフォワードプライマー、500 nMのリバースプライマー、200 nMのTaqManプローブ、10 µLのTaqMan Universal PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific社製)、及び4 µLの鋳型DNA溶液を添加し、反応ボリューム20 µLに調製した。サーマルサイクリング条件は50°Cで2分間、95°Cで10分間反応させた後、更に95°Cで30秒間と59°Cで1分間を50サイクル繰り返すように設定した。データは蛍光強度が閾値を超えたサイクル数を表すCq値で分析した。また閾値はベースラインの蛍光強度の標準偏差の10倍と設定した。最後まで蛍光強度が閾値を超えなかった反応はネガティブである。評価のため、我々はそれぞれ1, 2, 4, 8, 16, 32コピーのターゲットDNAを保持した数の酵母を各ウェルに分注した細胞標準物質プレートを3枚準備した。またコントロールターゲットDNA溶液として、遺伝子組換え大豆プラスミド (Soy-ColE1/TE-1.5k, ニッポンジーン社製) をそれぞれ理論的に1, 2, 4, 8, 16, 32コピーになるように段階希釈したプレートを3枚準備した。最終的に、インクジェットプロセスと希釈プロセスにて、各

ターゲットDNAコピー数をそれぞれ48レプリケート用意してリアルタイムPCR分析を行った。結果の指標の一つとして、48レプリケート中のポジティブサンプル数のパーセンテージを検出率として計算した。

3. 結果と考察

3-1 細胞インクとプリンティングシステムの開発

我々は標準配列*hmg-Le1*を携帯するPCRフラグメントを相同組換えで酵母ゲノムDNAの*BAR1*遺伝子の領域に組み込んだ。サザンブロット分析の結果、遺伝子組換え酵母のゲノムDNAに1コピーの標準配列が存在することが示された (Fig. 2)。この一倍体遺伝子組換え酵母はG1期に止められた後、エタノールで固定され、細胞インクとして使用された。

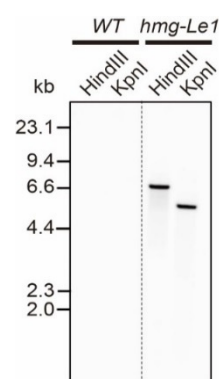


Fig. 2 Genomic Southern blot analysis. Genomic DNA was extracted from wild type yeast (*WT*) and recombinant yeast (*hmg-Le1*). The Genomic DNA (5 µg/lane) was digested with HindIII or KpnI and then fractionated on a 0.8% agarose gel, transferred to a membrane, and probed with the target sequence (358 bp fragment).

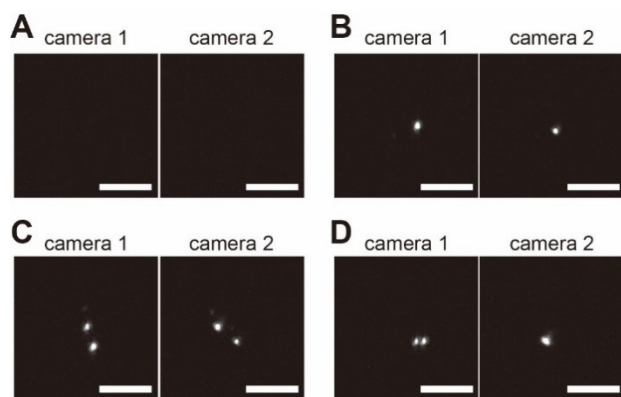


Fig. 3 Pairs of fluorescent images for estimating cell numbers in a droplet. The number of cells was estimated as zero (A), one (B), and two (C) from the number of bright spots in the pair of images. When the number of bright spots was inconsistent between two images, the larger value was adopted. The number of cells in (D) was taken to be two. Scale bars: 100 μm .

また我々は撮影した液滴中の酵母蛍光画像を比較し、2台のカメラで構成された光学システムによって液滴中の酵母の重なりによる誤カウントの確率を最小限に抑えられたことを示した。Fig. 3A-Dはサンプル画像を示している。Fig. 3A, B, Cはそれぞれ液滴中に0細胞、1細胞、2細胞が存在している時の画像を示している。2枚の画像中の細胞数が不一致の時は大きい方の値を該当液滴中の細胞数の測定値として取った。一例として、Fig. 3Dは液滴中に2細胞の存在を示している。

3-2 細胞標準物質のばらつきの試算

細胞標準物質の品質はデータ分析や装置の評価において非常に重要である。標準物質のばらつきを評価することは、Cq値などのリアルタイムPCRの測定結果のばらつきが標準物質の公差によるものなのか、または他の要素によるものなのかを理解するのに非常に有用である。ここでは、我々は細胞標準物質のばらつきが以下の要素に由来すると仮定した。

- (1) 細胞周期起因の細胞内コピー数ばらつき、
- (2) 細胞の誤カウント、
- (3) インクジェットのウェル内の液滴分注位置エラー、
- (4) 環境によるDNA分子の

コンタミネーション。ただし、以下の計算はPCR反応によるばらつきを除外した。

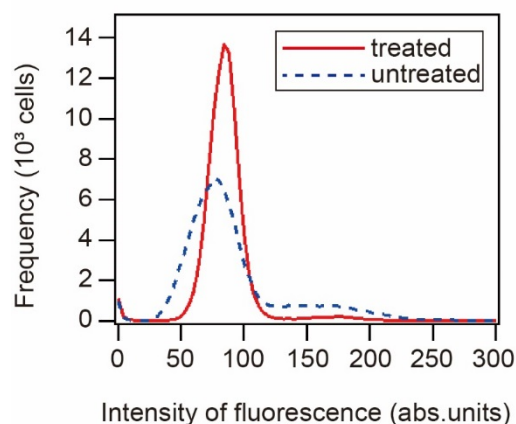


Fig. 4 Flow cytometric analysis for cell cycle distribution of yeast cells. Red line: cells with α -factor. Blue line: cells with no treatment. Fluorescence intensities of around 80 and 160 (arbitrary units) correspond to the haploid and diploid DNA contents per cell, respectively. The ratio of diploid cells in the α -factor-treated sample was estimated as 3%.

1番目の要素に関して、細胞周期起因の細胞内コピー数ばらつきを評価するため、蛍光ラベリングしたDNAの蛍光強度で1細胞当たりのDNA量（DNA倍数性）を定量した（Fig. 4）。蛍光強度のヒストグラムは各細胞内のそれぞれ1コピーまたは2コピーの染色体組の存在に対応すると思われる2つのピークを示している。この結果は3%の細胞がG1期に停止しなかったことを示唆する。細胞内のDNAコピー数真値の期待値 E_{copy} と標準偏差 σ_{copy} はそれぞれ以下の式に従う。

$$E_{copy} = 1 \cdot (1 - p_{copy}) + 2 \cdot p_{copy} \quad (2)$$

$$\sigma_{copy} = \sqrt{(1 - E_{copy})^2 \cdot (1 - p_{copy}) + (2 - E_{copy})^2 \cdot p_{copy}} \quad (3)$$

ただし、 p_{copy} は細胞内に2コピーが存在する確率である。 p_{copy} が0.03であるため、 E_{copy} と σ_{copy} はそれぞれ1.03と0.17である。

2番目の要素に関して、細胞の誤カウントを定量するため、我々はインクジェットシステムによる各液滴中の細胞数の測定値と、液滴がスライドガラス

に着弾した後に顕微鏡で測定した細胞数の真値が一致するのかを評価した。十分なデータ数を取得するため、我々は細胞濃度の期待値が $\lambda = 0.4$ cells/dropletと比較的に濃度の高い酵母懸濁液を使用してインクジェットシステムの誤カウントの評価実験を行った。Table 1は2つのデータセットの頻度分布を示している。本研究では、細胞数真値が特定の値の時に、インクジェットシステムの測定値が真値と一致する割合を一致率と定義した。結果として、真値が1細胞の液滴の場合の一致率が98%を超えたが、液滴中の細胞数増加に伴い、画像上の細胞数と実際の細胞数が合わないケースが発生し、検出率が低下した。次に、我々はTable 1の結果に基づき、 $\lambda = 0.06$ cells/dropletの酵母懸濁液を使用した場合のインクジェットシステムによる細胞数カウントのばらつきを式(4)～(10)で試算した。インクジェットシステムと顕微鏡の測定値ペアが出現する確率 p_{mn} は以下の式に従う。

$$p_{mn} = P(n) \cdot \frac{a_{mn}}{\sum_{m=0}^4 a_{mn}} \quad (4)$$

ただし、 m はインクジェットシステムの測定値、 n は顕微鏡の測定値、 a_{mn} はTable 1が示している各測定値ペアの時のサンプル数、 $P(n)$ は式(1)が示した $\lambda = 0.06$ cells/dropletの時のポアソン分布の確率を表す。続いて、インクジェットシステムの測定値が m の場合、液滴中の細胞数真値の期待値と分散はそれぞれ以下の式に従う。

$$p_n(m) = \frac{p_{mn}}{\sum_{n=0}^4 p_{mn}} = \frac{p_{mn}}{p_m} \quad (5)$$

$$E_m = \sum_{n=0}^4 n \cdot p_n(m) = \frac{\sum_{n=0}^4 n \cdot p_{mn}}{p_m} \quad (6)$$

$$V_m = \sum_{n=0}^4 (n - E_m)^2 \cdot p_n(m) = \frac{\sum_{n=0}^4 (n - E_m)^2 \cdot p_{mn}}{p_m} \quad (7)$$

ただし、 $p_n(m)$ は顕微鏡の測定値が n の場合のインクジェットシステムの測定値が m である確率、 p_m はインクジェットシステムの測定値が m である確率、 E_m と V_m はそれぞれインクジェットシステムの測定値が m の場合の細胞数真値の期待値と分散を表す。加えて、我々はインクジェットの測定値が2細胞以上

の液滴が分注されたウェルを表記し、使用しないことが可能であるため、測定値が1細胞以下の全液滴の中で、1細胞液滴の割合 p'_1 が以下の式に従う。

$$p'_1 = 1 - p_0 \quad (8)$$

インクジェットシステムの測定で1細胞がウェル内に分注された場合、1細胞液滴がウェルに入るまで分注された0細胞液滴の可能な数は0滴から ∞ 滴までである。ウェル内の全液滴に含まれる細胞数の期待値とばらつきを計算するため、液滴数の全可能性を考慮する必要がある。加えて、各液滴の測定結果はお互いに独立しているため、全液滴中の細胞数真値の期待値と標準偏差は以下の式に従う。

$$E_{count} = \sum_{i=1}^{\infty} [E_0 \cdot (i-1) + E_1] \cdot p_0^{i-1} \cdot p'_1 \quad (9)$$

$$\sigma_{count} = \sqrt{\sum_{i=1}^{\infty} [V_0 \cdot (i-1) + V_1] \cdot p_0^{i-1} \cdot p'_1} \quad (10)$$

ただし、 i はインクジェットシステムの測定で1細胞液滴が分注されるまで分注した液滴の可能な総数を表す。実際は i が1000以上の場合、 $p_0^{i-1} \cdot p'_1$ の値が 10^{-10} よりも小さいであり、計算にほぼ影響がないため、我々は $i = 1000$ までの総和を計算した。最終的な結果は E_{count} と σ_{count} がそれぞれ1.004と0.06である。

3番目の要素に関して、液滴分注位置精度を評価するため、我々は液滴の着弾位置を測定した。液滴の着弾位置はヘッドのノズルとウェルの相対位置、及び液滴の飛翔軌道によって決定される。本実験では、プレートはウェル底が切り取られた後、スライドガラスの上に設置された (Fig. 5A)。スライドガラス上に着弾した液滴の位置はガラスの下に設置した蛍光顕微鏡で測定した。Fig. 5B, 5Cはそれぞれ各液滴の着弾位置の散布図、及びウェル中心からの距離のヒストグラムを示している。ウェル底の直径が2.6 mmであるため、結果として全532滴の液滴がウェル底の範囲内に着弾した。そのため、液滴分注位置エラーはばらつきの計算において無視可能であるほど小さいと判断した。

Table 1. Numbers of droplets with a specific number of cells.

		The actual number of cells (per droplet)				
		0 cell	1 cell	2 cells	3 cells	4 cells
The estimated number of cells by inkjet system (per droplet)	0 cell	1074	2	0	0	0
	1 cell	0	686	8	0	0
	2 cells	0	10	218	4	1
	3 cells	0	0	0	44	6
	4 cells	0	0	0	1	1
Concordance rate (%)		100	98.3	96.5	89.8	12.5

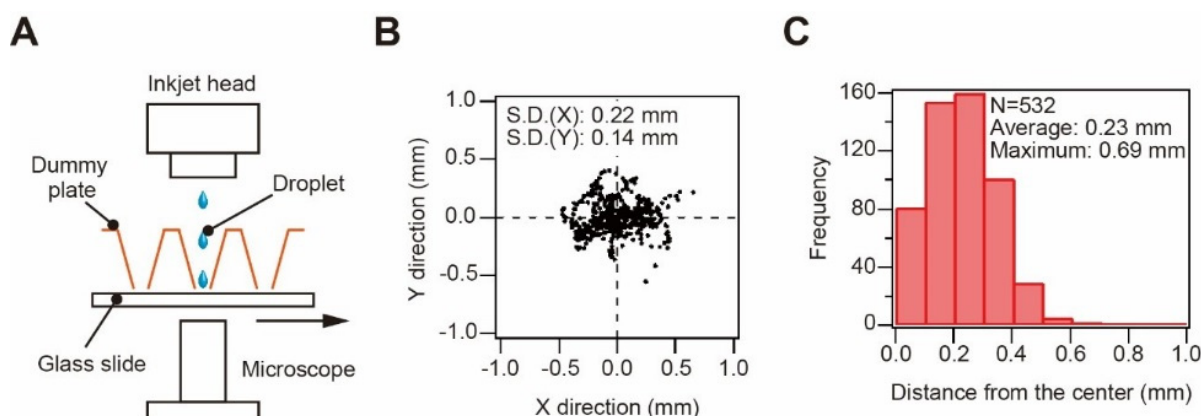


Fig. 5 Quantification of droplet landing positions. (A) Schematic diagram of the experimental setup. To simulate the actual process, a 96-well plate without a bottom was positioned on the glass slide. The landing position of the droplets was measured using a microscope. (B) Spatial distribution of droplet landing locations relative to the center. (C) Histogram of the distance between droplet landing location and the center.

4番目の要素として、我々はコンタミネーションの影響を評価した。ターゲットDNA分子のコンタミネーションは標準物質の準備において非常に重大な問題である。このようなコンタミネーションは環境及び破碎酵母の両方から発生し得る。本実験では、我々のプロセスによって発生するコンタミネーションの確率を評価した。まず、濃度の高い酵母懸濁液 (1.00×10^7 cells/mL) を遠心分離とフィルタリングで処理した後上澄み液を抽出し、各ウェルにそれぞれピペットで4 μ L分注した。続いて、リアルタイムPCRでターゲットDNAの存在を評価した。結果、48ウェル中3ウェルにてターゲット分子が検出された。3つのポジティブウェルのCq値はそれぞれブ

レート2が40.3、プレート3が39.2と41.1である (Table 2)。本実験で各ウェルに分注した液量はインクジェットシステムが分注した液滴1滴の液量の約 1.05×10^4 倍であったのと、分注した酵母懸濁液の濃度は標準物質作製の標準濃度である $\lambda = 0.06$ cells/droplet (1.57×10^5 cells/mL) の約63.7倍であったため、標準プロセスで作製した場合の1滴当たりのコンタミネーションが存在する確率 $p_{contami}$ と1滴当たりのコンタミネーションのコピー数の期待値はそれぞれ $9.34 \times 10^{-6}\%$ と 9.34×10^{-8} コピーと試算された。1滴当たりのコンタミネーションの分散は以下の式に従う。

$$V_{contami} = (0 - E_{contami})^2 \cdot (1 - p_{contami}) + (1 - E_{contami})^2 \cdot p_{contami} \quad (11)$$

インクジェットシステムによって1細胞が分注された場合のコンタミネーションの標準偏差は以下の式に従う。

$$\sigma_{contami} = \sqrt{\sum_{i=1}^{\infty} V_{contami} \cdot i \cdot p_0^{i-1} \cdot p'_1} \quad (12)$$

ただし、 p_m はインクジェットシステムの測定値が m 細胞の確率（前述）、 i はインクジェットシステムの測定で1細胞液滴が分注されるまで分注した液滴の可能な総数を表す。前述と同様、実際は $i = 1000$ までの総和を計算した。最終的な結果は0.001である。

Table 2 Contamination of target DNA.

	Positive/All (well)	Expected rate of contamination (%)
Plate 1	0/16	0
Plate 2	1/16	9.34×10^{-6}
Plate 3	2/16	1.87×10^{-5}

最後は全要素のばらつきで細胞標準物質のばらつきを試算する。前提として、全要素を考慮した最終的なDNAコピー数は以下の式に従う。

$$n_{all} = f(n_{copy}, n_{cell}, n_{contami}) = n_{copy} \cdot n_{cell} + n_{contami} \quad (13)$$

ただし、 n_{all} はウェル内の最終的なコピー数、 n_{copy} は1細胞内のDNAコピー数、 n_{cell} は細胞数、 $n_{contami}$ はコンタミネーションのコピー数を表す。これに従って、3つの要素から合成した標準偏差は以下の式で算出可能である。

$$\begin{aligned} \sigma_{all} &\approx \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial n_{copy}} \cdot \sigma_{copy}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial n_{count}} \cdot \sigma_{count}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial n_{contami}} \cdot \sigma_{contami}\right)^2} \\ &= \sqrt{(E_{count} \cdot \sigma_{copy})^2 + (E_{copy} \cdot \sigma_{count})^2 + \sigma_{contami}^2} \end{aligned} \quad (14)$$

ただし、細胞数真値の期待値 E_{count} と細胞内DNAコピー数真値の期待値 E_{copy} はそれぞれ n_{copy} と n_{cell} の感度係数である。

最終的な結果として、インクジェットシステムで1コピーのDNA分子を分注した場合、DNAコピー数の標準偏差は0.18コピーである。ポアソン分布に従う従来の希釈法で1コピーのDNAの標準物質を作製した場合の標準偏差は理論上1コピーであるため、

インクジェットプロセスで作製した場合は従来の1/5以下のばらつきを持つ標準物質が得られる。

3-3 細胞標準物質による定性PCRアッセイの実験評価

新規開発した細胞標準物質の適用性を評価するため、我々は定性PCRのLODを評価する形でピペットで用意したターゲットプラスミドDNA溶液の段階希釈液との比較実験を行った。本実験で作製と使用した段階希釈標準物質のコピー数は理論値で推定した。またインクジェットプロセスにおいて、 λ を標準手順に従い0.06 cells/dropletに調整し、設定した1, 2, 3, 4, 8, 16, 32のDNAコピー数に到達するまで液滴を連続的に96ウェルプレートの各ウェルに分注した。 λ が非常に小さいため、2細胞以上が存在する液滴は非常に稀であった。設定通りのコピー数のDNAを持つ細胞がウェルに分注された後、吐出停止、次のウェルに移動、分注再開、が繰り返された。Fig. 6はリアルタイムPCRの結果Cq値を示し、Table 3は統計分析結果を示している。また測定値が0細胞のサンプルの偽陽性を評価するため、我々はインクジェットで用意した0細胞の257サンプルをリアルタイムPCRで増幅させた。結果として、全0細胞サンプルにて増幅が認められなかった。加えて、プレートなしのコントロール（分注していないネガティブコントロール）からも増幅は認められなかった（詳細データは割愛）。

また低濃度DNAの領域のリアルタイムPCR結果として、希釈法で作製したサンプルはポアソン分布に従うため、検出率の大幅な低下が見られた。対してインクジェットプロセスで作製したサンプルは1コピーでも92%の検出率を有し、2コピー以上は100%の検出率を有することを示した。加えて、我々はCq値のばらつきを標準偏差（SD）で評価した。Table 3が示すように、検出率が100%の結果同士を比較すると、インクジェットプロセスで作製した標準物質のSDは一律希釈法で作製したものより低いことが見られる。希釈法で作製した標準物質の結果で描いた検量線の決定係数（ R^2 ）と傾きはそれ

ぞれ0.9433と-2.54（増幅効率148%）であり、インクジェットプロセスで作製したサンプルはそれぞれ0.9940と-3.43（増幅効率95.7%）である（Fig. 6）。これは希釈法よりもインクジェットプロセスで作製した標準物質からより正確な検量線が得られることを意味する。

続いて、95%以上の検出率を有する最小濃度がLODとする定義に従い^{30,31)}、2種類の標準物質のLODを評価した。Table 3の検出率の結果から、それぞれのLODは細胞標準物質での評価結果が2コピーであり、DNA段階希釈液での評価結果が8コピーで

あった。つまりDNA段階希釈液を使用するよりも、細胞標準物質を使用することでより低いLODが得られることを示した。

最後に、本実験ではインクジェットプロセスで作製した1コピーと2コピーの標準物質において、一部外れ値が発生した（Fig. 6及びTable 3）。これらの外れ値の発生原因は特定されていないが、一因として、インクジェットプロセスでは酵母細胞から抽出したゲノムDNAでPCR分析を行ったのに対し、希釈法ではターゲット配列を持つプラスミドDNAを使用したことによる、サンプル状態の差異が考えられる。

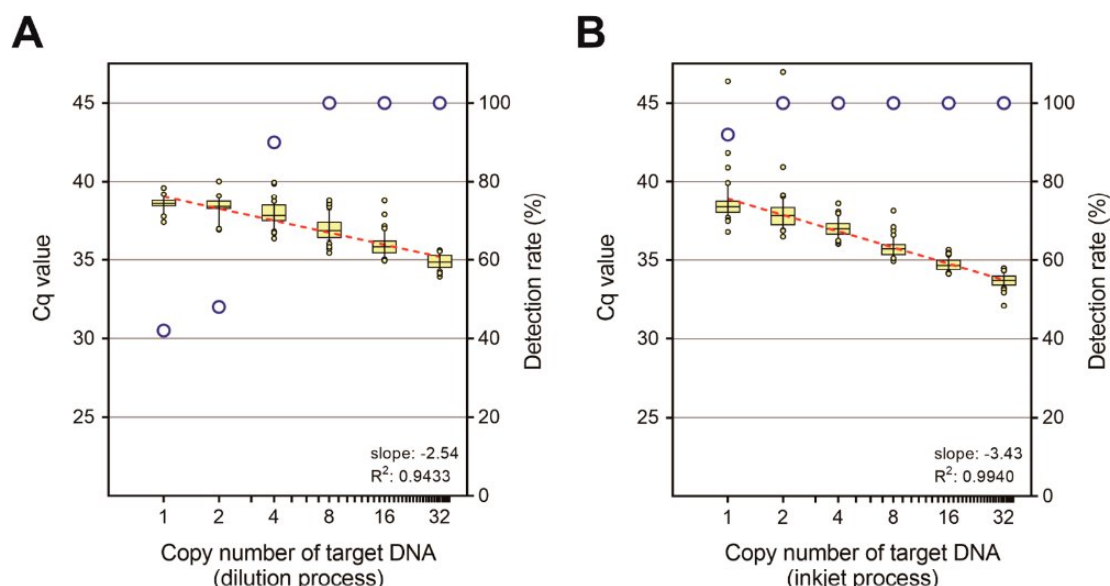


Fig. 6 Boxplot of real-time PCR data and constructed standard curves of (A) the dilution series and (B) the developed reference materials.

The whiskers are drawn to the 10th percentile and up to 90th percentile. Data that lie outside the 10th and 90th percentile are drawn as individual points. Larger circles show the detection rate (right Y-axis). The linearities (R^2) were 0.9433 and 0.9940, respectively. The slopes were -2.54 and -3.43, respectively.

Table 3 Summary of real-time PCR results.

	Dilution process					
	1 copy	2 copies	4 copies	8 copies	16 copies	32 copies
Average Cq	38.55	38.36	37.95	36.96	35.93	34.85
Max Cq	39.59	40.01	39.94	38.77	38.77	35.61
Min Cq	37.40	36.92	36.35	35.43	34.94	33.92
SD Cq	0.4862	0.6965	0.7815	0.7667	0.7560	0.4351
Detection rate	42%	48%	90%	100%	100%	100%
(Positive/Total)	(20/48)	(23/48)	(43/48)	(48/48)	(48/48)	(48/48)
	Inkjet process					
	1 copy	2 copies	4 copies	8 copies	16 copies	32 copies
Average Cq	38.66	38.04	36.98	35.76	34.72	33.68
Max Cq	46.39	46.97	38.59	38.13	35.65	34.49
Min Cq	36.78	36.48	36.02	34.92	34.12	32.10
SD Cq	1.4703	1.5458	0.5390	0.5862	0.3889	0.4281
Detection rate	92%	100%	100%	100%	100%	100%
(Positive/Total)	(44/48)	(48/48)	(48/48)	(48/48)	(48/48)	(48/48)

4. まとめ

本研究で、我々は細胞標準物質の作製方法を示した。またこの標準物質をリアルタイムPCRで測定した結果を示した。インクジェットシステムにおいて、ターゲットDNA配列を含む酵母細胞はインクパーティクルとして使用可能である。またターゲットDNAのコピー数は細胞数の測定によって間接的に推定することが可能である。加えて、本研究で開発した細胞標準物質はあらゆる配列にカスタマイズすることが可能である。更に本標準物質の標準作製手順は溶菌酵素Zymolyaseでの処置も含むため、作成した標準物質はDNA単離などの追加手順なしにPCRテンプレートとして使用可能である。そのため、今後我々の簡便な標準物質は検量線の取得、より高精度なLODの評価、及び装置間または実験手順間の差異の評価などにおいて理想的なコントロールまたは標準になるであろう。

上記を踏まえ、我々は本研究の方法で製造した細胞標準物質は装置性能、試薬、作業スキルなどの要因のクオリティの評価とモニタリングにおいて非

常に有用であると考え、そのため、本標準物質を使用するリアルタイムPCRテストは、食品安全や臨床診断などの幅広い分野でより再現性と信頼性のあるデータを提供可能であろう。

謝辞

本研究を進めるに当たり、本稿に関するトピックの紹介を賜った中江裕樹博士（特定非営利活動法人バイオ計測技術コンソーシアム、JMAC）に感謝を申し上げる。またGang-hua Lang博士の素晴らしいテクニカルサポートに感謝を申し上げる。

参考文献

- 1) A. Holst-Jensen et al.: PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs), *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 375, No. 8, pp. 985–993 (2003).
- 2) ISO 21570:2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative Nucleic Acid Based Methods.

- 3) ISO 21571:2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic Acid Extraction.
- 4) H. Kuribara et al.: Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean, *J. AOAC Int.*, Vol. 85, pp. 1077–1089 (2002).
- 5) Notification No. 201; Consumer Affairs Agency, Government of Japan: Tokyo, Japan (2012).
- 6) S. Yang, R.E. Rothman: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings, *Lancet Infect. Dis.*, Vol. 4, No. 6, pp. 337–348 (2004).
- 7) N. Morling: PCR in forensic genetics, *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 37, No. 2, pp. 438–440 (2009).
- 8) R. Saiki et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science (80-.)*, Vol. 239, No. 4839, pp. 487–491 (1988).
- 9) S. Broeders et al.: Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends Food Sci. Technol.*, Vol. 37, No. 2, pp. 115–126 (2014).
- 10) S.A. Bustin et al.: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clin. Chem.*, Vol. 55, No. 4, pp. 611–622 (2009).
- 11) Clinical Laboratory Standards Institute: Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved Guideline.
- 12) M.J. Cavaluzzi: Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 32, No. 1, p. e13 (2004).
- 13) K. Rengarajan et al.: Quantifying DNA concentrations using fluorometry: A comparison of fluorophores, *Mol. Vis.*, Vol. 8, pp. 416–421 (2002).
- 14) V.L. Singer et al.: Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation, *Anal. Biochem.*, Vol. 249, No. 2, pp. 228–238 (1997).
- 15) S. Fujii et al.: Quantification of phosphorus in DNA using capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1217, No. 50, pp. 7921–7925 (2010).
- 16) S. Fujii et al.: Determination of phosphorus using capillary electrophoresis and micro-high-performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantification of nucleotides, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1216, No. 44, pp. 7488–7492 (2009).
- 17) S. Shibayama et al.: Formic acid hydrolysis/liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry: An accurate method for large DNA quantification, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1468, pp. 109–115 (2016).
- 18) W.W. Wilfinger, K. Mackey, P. Chomczynski: Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity, *Biotechniques*, Vol. 22, No. 3, pp. 474–481 (1997).
- 19) F. Haight: A Handbook of the Poisson Distribution (1967).
- 20) J. Mano et al.: Development of a Reference Material of a Single DNA Molecule for the Quality Control of PCR Testing, *Anal. Chem.*, Vol. 86, No. 17, pp. 8621–8627 (2014).
- 21) S. V Murphy, A. Atala: 3D bioprinting of tissues and organs, *Nat. Biotechnol.*, Vol. 32, No. 8, pp. 773–785 (2014).
- 22) A. Arslan-Yildiz et al.: Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting, *Biofabrication*, Vol. 8, No. 1, p. 014103 (2016).
- 23) D. Takagi et al.: High-precision 3D inkjet technology for live cell bioprinting, *Int. J. Bioprinting*, Vol. 5, No. 2, p. 27 (2019).
- 24) M. Seo et al.: Droplet forming apparatus, U.S. Patent 10029251B2 (2018).
- 25) Y. Kuramochi et al.: Liquid droplet forming apparatus, U.S. Patent 9517622B2 (2016).

- 26) Saccharomyces Genome Deletion Project: Project Overview, Saccharomyces Genome Deletion Project, http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/ (accessed 2019-05-10).
- 27) D.C. Amberg, D.J. Burke, J.N. Strathern: Inducing Yeast Cell Synchrony: α -Factor Arrest Using *bar1* Mutants, *Cold Spring Harb. Protoc.*, Vol. 2006, No. 1, p. pdb.prot4173 (2006).
- 28) Jasbeer, M. Ghazali, Y.K. Cheah: Real-time PCR evaluation of seven DNA extraction methods for the purpose of GMO analysis, *Int. Food Res. J.*, Vol. 16, pp. 329–341 (2009).
- 29) C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, Vol. 9, No. 7, pp. 671–675 (2012).
- 30) M. Burns, H. Valdivia: Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR, *Eur. Food Res. Technol.*, Vol. 226, No. 6, pp. 1513–1524 (2008).
- 31) A. Forootan et al.: Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR), *Biomol. Detect. Quantif.*, Vol. 12, pp. 1–6 (2017).