POCT に向けた遠心促進熱対流型 RT-PCR 法の開発

Development of the POCT RT-PCR device using centrifugal thermal convection

大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻
○高橋和也，桐山雄一朗，斎藤真人，民谷栄一
Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University
○Kazuya Takahashi, Yuichiro Kiriyama, Masato Saito, Eiici Tamiya
E-mail: saitomasato@ap.eng.osaka-u.ac.jp

【はじめに】

遺伝子検査を POCT(Point-of-Care Testing)に応用出来れば，医療・食品など，様々な検査対象で遺伝子レベルの迅速診断を行うことが可能となる．特に医療分野では、感染症の初動対応を迅速かつ適切に行うことが重要で，これには POCT デバイスによる迅速かつ簡便な感染症診断技術の開発が求められる．近年，イムノクロマト法が POCT デバイスとして感染症診断に利用されているが，感染初期では偽陰性となる問題がある．一方，遺伝子検査に用いられる PCR 法はサーマルサイクラーを利用したチューブ PCR や，溶液が送液され温度領域を通過するフローPCR，ベナール対流を利用した熱対流型 PCR（*SCIENCE* 298, 793, 2002）など多様な方法が開発されているが，試薬調整の煩雑さや装置が大型である等の課題があり， POCT デバイスとして実用化に至っていない．そこで，我々はベナール対流を表す基礎方程式中の重力に依存するパラメータに着目した．重力依存パラメータを遠心力に置き換える事で回転数によって対流速度を制御し， 熱交換速度を向上させることで PCR 法を迅速に行うことが出来る．一方，感染症の原因となる RNA を持つウイルス，例えばノロウイルスやデングウイルスなどを検知するためには RT-PCR 法が有効である．そこで本研究では， RNA の迅速・簡便かつ高感度な検出を目的として，遠心促進熱対流型 RT-PCR 法の検討を行った。

【実験方法】

回転温調装置を試作した．リング状ヒーターを有するステージをモーターによって回転させ，印加電圧によって回転数の制御を行っている．ヒーターは高温・低温部に分かれており，それぞれ温調制御可能である．流路幅 500μm， 深さ 250μm， 直径 6mm のリング状の流路を有する，シクロオレフィン樹脂(COP)製のチップを作製した．human total RNA および Beta-2-Microglobulin(B2M)プライマーを含む RT-PCR 溶液を調整し，チップに充填した．チップをヒーター上に設置し，逆転写反応を行った．連続して，ヒーターを回転させ熱対流を発生させ，PCR を行った．エンドポイントでの Taqman プローブによる蛍光値を測定し，増幅の検出を行った．

【結果・考察】

サーモシールを用いて，ヒーターによってチップ流路上の温調が PCR に必要な温度領域(95℃，60℃)に制御出来る事を確かめた．B2M 領域の cDNA を用いて，B2M のオンチップ PCR での相対重力加速度を検討した結果，5G で最大の蛍光値を得る事が出来た．これらの値を元に，オンチップ RT-PCR 法を試みた．結果，human total RNA 量 9.4ng/チップ，反応時間 15 分で増幅に伴う蛍光増加を確認出来た．human toal RNA 初期濃度に対する B2M の検量特性及びノロウイルスやデングウイルスの検出への応用をあわせて報告する予定である．

© 2015年 応用物理学会