遠心促進熱対流型 PCR 法を利用した食品害虫検出システムの開発

Microfluidic centrifugal PCR system for food insect pest

阪大院工，°桐山 雄一朗，齋藤 真人，民谷 栄一

Osaka Univ., °Yuichiro Kiriyama, Masato Saito, Eiici Tamiya

E-mail: saitomasato@ap.eng.osaka-u.ac.jp

【はじめに】穀物類の輸出入に関して、食の安心・安全や植物防疫上、水際での食品害虫の検出が重要である。従来の昆虫同定には、熟練の専門家による目視鑑定が行われているが、これに対し、遺伝子検査によく用いられる PCR 法による DNA 分析が現場で行えれば、目視鑑定のように高度な専門知識や経験が不要で、また鑑定には好ましくない状態の試料でも検査の可能性を広げることができ、輸出入農産物に対する防疫・信頼性・コスト性向上に寄与する。これまでにサーマルサイクラーとサンプリングチューブを利用した従来のチューブ PCR、マイクロ流路を利用したフローPCR、熱対流による温度交換を利用した熱対流型 PCR(*SCIENCE* 298, 793, 2002)など多様な手法が開発されているが、実際に現場で使用する際に試料調製が煩雑である、装置が大型である等の課題がある。そこで我々は、ベナール対流を表す基礎方程式の重力に依存するパラメータに着目し、このパラメータを遠心場に置き換える事で対流速度の制御を行い、PCR における熱交換の迅速性の向上による増幅反応の迅速化を達成した。また同時に、遠心力と熱対流を利用することで溶液充填と混合を自動的に行うことも可能とし、検体液を注入するだけで PCR が行えるよう PCR 操作の簡便化にも成功してきた。現在、食品害虫に適用するべく PCR 検査システムの開発を進めている。今回、PCR の迅速化、簡易化および低コスト化を目的として、射出成型マイクロ流体チップを作製し、これを用いた遠心促進熱対流 PCR への応用検討結果を報告する。

【実験】内径 5mm、外径 6mm、幅 500μm、深さ 300μm のリング形状となるよう流路設計し、射出成型によりマイクロ流路チップを作製した。材質はシクロオレフィン樹脂（COP）を用いた。リング状ヒーター・ステージを有する回転温調装置も試作した。作製したチップに水と食紅液(NewCoccine)を充填し、装置ヒーター上に設置した後、ステージを回転させ、ハイスピードカメラを用いて対流の様子を観察した。作製したチップに PCR 溶液を充填し、装置ヒーター上に設置した後、ステージを回転させ、オンチップ PCR を行い、ヒトゲノム DNA から β-Actin 領域の DNA 増幅を行った。

【結果・考察】ハイスピードカメラによって得られた画像より、相対重力加速度と対流速度の関係が得られた。オンチップPCR後、チップ流路の蛍光値を測定したところ、相対重力加速度5G において最も増幅が行われたことが確認された。ヒトゲノムDNAに対するPCR反応時間と遺伝子増幅量の関係を見たところ、初期濃度705 pg DNAに対して、15分で増幅に伴う蛍光値が最大となることがわかった。ヒトゲノムDNA 初期濃度に対する検量特性を見たところ、検出下限は70.5pgであった。これらの結果より、本システムを用いて遠心制御による目的DNAの高感度迅速増幅を行うことが可能であることを示すことができた。

© 2015年 応用物理学会