

遠心熱対流 PCR の流体解析と薬剤耐性菌遺伝子の迅速検出

Simulation and rapid detection of drug resistant gene in centrifugal thermal convection PCR

○高橋 和也¹, 齋藤 真人¹, 山本 倫久², 明田 幸宏², 朝野 和典³, 民谷 栄一¹

(¹大阪大院工、²大阪大微研、³大阪大院医)

○Kazuya Takahashi¹, Masato Saito¹, Norihisa Yamamoto², Yukihiro Akeda², Kazunori Tomono³, Eiichi Tamiya¹

1. Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University

2. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

3. Division of Infection Control and Prevention, Graduate School of Medicine, Osaka University

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

【はじめに】 薬剤耐性遺伝子 (*e. g.* NDM-1, OXA-23, IMP-6) を持つ細菌による院内感染は、迅速拡散や患者重篤化の原因となるため、早期検出・迅速対応が求められている。また、遺伝子検査を POCT (Point-of-Care Testing) に展開出来れば、遺伝子レベルの迅速診断を行うことが可能となるため、感染症の初動対応を迅速かつ適切に行うことが期待出来る。一方これまでに、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、マイクロ流路を利用したフロー PCR、ベナール対流を利用した熱対流 PCR (*SCIENCE* 298, 793, 2002) など多様な方法が開発されているが、反応時間の長さ、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 展開には至っていない。そこで、我々はベナール対流を表す基礎方程式中の重力項に着目し、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、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、PCR 操作の簡便化に向けて、検体液を注入するだけで PCR が行えるよう、遠心力と熱対流を利用することで自動的な溶液充填と混合にも成功してきた。そこで今回、遠心熱対流における流体制御の理解を深めるため、遠心熱対流による溶液混合の解析として、二次流を考慮した遠心熱対流シミュレーション及び実験を行った。加えて、遠心熱対流 PCR を用いた薬剤耐性菌遺伝子検出の応用検討結果を合わせて報告する。

【実験方法】 リング状ヒーター・ステージを有する回転温調装置及び、流路幅 500 μ m、深さ 250 μ m、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。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。COMSOL MultiPhysics (Non-Isothermal Flow module) を用いて、遠心熱対流装置の 3D モデルを作製し、ヒーター温度を PCR 条件 (95 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C) に設定し、ベナール対流方程式中の重力項を変化させ (1~10G) 遠心熱対流シミュレーションを行った。次に、流体がリング状流路を流れる際に生じる遠心力及びコリオリ力を慣性力とし、二次流を考慮した遠心熱対流シミュレーションを行った。また、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、NDM-1 産生細菌 Total DNA・OXA-23 産生細菌 Total DNA・IMP-6 産生細菌 Total DNA に対する各薬剤耐性遺伝子の検量特性を得た。

【結果・考察】 ハイスピードカメラより得た画像及び熱対流シミュレーションより、相対重力加速度と対流速度の関係が得られ、実験・シミュレーションの両者に良好な一致が見られた。また、実験から対流先端位置のステージ回転方向依存性が観察された。慣性力を考慮したシミュレーションの結果、コリオリ力によって二次流が発生しており、対流のステージ回転方向依存性の原因となっていることが分かった。これらの結果より、遠心熱対流において、コリオリ力による二次流で液体が混合されることが示唆された。また、NDM-1 産生細菌 Total DNA を用いて、NDM-1 に対するオンチップ PCR の相対重力加速度・反応時間を検討した結果、7G・15 分で最大の蛍光値を得る事が出来た。この条件下で、検量特性を調べた結果、NDM-1 産生細菌 Total DNA 初期濃度 2.51pg/chip、OXA-23 産生細菌 Total DNA 初期濃度 69fg/chip、IMP-6 産生細菌 Total DNA 初期濃度 2.17pg/chip における蛍光増加を確認出来た。