遠心熱対流のためのマイクロ流路集積と迅速薬剤耐性遺伝子検出

Integration of microchannel for centrifugal thermal convection and multiple drug resistance gene detection

阪大院工 [1]、産総研・フォトバイオ [2]　○齋藤 真人 [1,2], 後 早希子 [1], Wilfred Espulgar [1]

Graduate School of Engineering, Osaka Univ. [1], AIST PhotoBIO-OIL [2]

○Masato Saito[1,2], Sakiko Ushiro[1], Wilfred Espulgar[1]

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

世界的な課題として薬剤耐性細菌への対応が推進されており、特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の早期検出と迅速対応が求められている。とくにプラスミド上にある薬剤耐性遺伝子（IMP-6, NDM-1, OXA-23 など）の有無を検知することが重要で、つまり POCT に対応した DNA 検知デバイスの実現が求められている。一方、PCR に代表されるような遺伝子検査技術は、所要時間が長い、機器が大型、試薬調製が煩雑など現場利用への展開に課題がある。また、薬剤耐性を有する遺伝子は 80 種類以上存在しており、DNA 検出デバイス開発をより困難なものにしている。そのような中、演者らは、遠心による熱対流生成とその流速制御によって PCR を迅速化した遠心促進熱対流チップ PCR 法を開発してきた[1][2]。本研究ではさらに多項目の薬剤耐性遺伝子検知へ対応するため、遠心促進熱対流 PCR における微小熱対流反応場集積と迅速 DNA 増幅検知を検討した。

PCR にはその原理上、95℃と 60℃の熱供給が必要であるが、マイクロ流路を集積するに伴い、流路間に熱干渉が生じる懸念がある。熱源形状について、内側を 60℃、外側を 95℃とした環状ヒーターとし、流路構造は同一円周上に多く集積するため縦長形状（長円形 6.25×2.25mm）とした。COMSOL MultiPhysics を用いた遠心熱対流シミュレーション解析により、流路間距離約 3.2mm において、各流路に熱干渉なく同一方向の流れを生成できることが確かめられた。流路チップは、射出成型にて成型した COP（Cyclo Olefin Polymer）流路と 188μm 厚 COP フィルムの接合面に酸素プラズマ処理した後、熱圧着（-90KPa、133℃、加圧 1120N/chip、30 分間）を行い接合した。また、シリコンラバーヒーター上に環状アルミブロックを配置した回転温調装置を作製した。試作デバイスを用いて、ヒーター温度、回転数（相対重力加速度）等の諸条件を最適化した後、アンプリコン DNA（IMP-6 部分配列）を指標に、チップ PCR（15 分間）を行った。その結果、16.09fg/chamber~16.09 ag/chamber の範囲で増幅検出可能であった。電気泳動にて増幅産物の確認を行ったところ、159bp の特異増幅を確認することができた。これらの結果から、試作した集積チップを用いた迅速 DNA 増幅が可能であることが確かめられた。加えて、IMP-6 陽性 E.coli total DNA 18.5pg/chamber、NDM-1 陽性 E.coli total DNA 2.13ng/chamber、OXA-23 陽性 A.baumannii total DNA を用いて、同時検出を試みた。その結果、それぞれ 159bp、127bp、116bp の特異増幅を確認することができ、開発した集積 PCR デバイスを用いた多項目同時検出も可能であることが確かめられた。

参考文献：[1] M. Saito, et al., Anal. Chem., 2017, 89(23), 12797-12804, [2] M. Saito et al, μTAS 2017, 1244-1245