

遠心熱対流 PCR 法による新型コロナウイルス遺伝子迅速検知の検討

Rapid SARS-CoV-2 gene detection by centrifugal thermal convection PCR method

阪大工¹, AIST PhotoBIO-OIL², 阪大医³, ニッポンジーン⁴ ○齋藤 真人^{1,2}, 明田 幸宏³, 國谷 亮太⁴, 峯岸 恭孝⁴, 朝野 和典³

Grad. Sch. Eng. Osaka Univ.¹, AIST PhotoBIO-OIL², Grad. Sch. Med. Osaka Univ.³, NipponGene⁴,
○Masato Saito^{1,2}, Yukihiro Akeda³, Ryota Kokutani⁴, Yasutaka Minegishi⁴, Kazunori Tomono³

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

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の流行に対し、感染有無の判定において PCR 検査が重要な役割を果たしている。しかしながら、従来の PCR 法は専門的な手技や機器などを要し、感染対策実施における律速課題ととらえることもでき、ゆえに検査現場において実用可能な簡易迅速診断機器の開発が喫緊の課題となっている。感染初期のウイルス検出には、イムノクロマト法 (抗原検査)、PCR 法があるが、イムノクロマト法はその簡易操作性や迅速性に優れるが、PCR に比較して感度に課題があることはよく知られている(1)。一方、PCR 法においては、近年では小型自動化された市販システム、等温増幅法、マイクロ流体技術を利用したチップ PCR などがあるが、それぞれ一長一短でいずれのシステムにおいても現場医療・検査ニーズを完全に満たせるには至っていないのが実情である。これに対し我々は、独自のマイクロ流体力学と遠心力を利用した遠心促進熱対流型チップ PCR 法を開発してきた(2)。これは、マイクロ流路内に対して温調と回転を同時に行うことで、流路内に生じる熱対流に伴う熱交換を高速化し、遺伝子増幅反応を迅速化するユニークな手法である。さらに任意の量を滴下するだけで必要量の溶液取り込みと迅速遺伝子増幅反応を行うユーザー熟練度に依存しない遺伝子検知を可能にし、糞便検体から熱抽出とチップへの検体・試薬の滴下のみで簡易迅速に薬剤耐性菌の薬剤耐性遺伝子 (IMP-6) を検出することに成功している(3)。そこで今回、社会課題となっている新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) への応用を試みた。

PCR に必要な 2 温 (95°C、60°C) にリング状マイクロ流路を配置し、流路内に熱対流に必要な温度差を与え、さらに遠心することで熱対流を生成させる。回転温調装置および環状流路 (幅 500 μm 、深さ 300 μm 、直径 6 mm) 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。高速 PCR 対応可能なニッポンジーン製増幅試薬、SARS-CoV-2 遺伝子配列を含むコントロール RNA を用いて、また検出プローブには国立感染研マニュアルの示す N2 プライマーセットを用いた。逆転写反応後、試作チップに充填して回転温調装置にてオンチップ PCR を行った。設定温度や回転速度 (相対重力加速度) など遠心 PCR 条件の最適化を行い、相対重力加速度 5G、反応時間 15 分で増幅に伴う蛍光増加を得ることができた。さらに実検体に応用した結果も併せて報告する予定である。

参考文献: [1] 川上ら, 感染症学雑誌, 75(9), 792-799, 2001. [2] M. Saito, et al., Anal. Chem., 2017, 89(23), 12797-12804, [3] M. Saito et al, μTAS 2017, 1244-1245