

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630379

研究課題名(和文)遠心促進熱対流型迅速遺伝子増幅チップシステムの開発

研究課題名(英文)Development of the PCR device driven by centrifugation assisted thermal convection

研究代表者

斉藤 真人(Saito, Masato)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80457001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：各種現場において迅速かつ高感度に病原性細菌などを検出する遺伝子検知システムの開発が望まれている。そこで熱対流による反応溶液の自走駆動と遠心力による熱対流加速を利用したオンチップPCR法を提案した。熱対流が可能なポリジメチルシロキサン(PDMS)/ガラス製マイクロ流路を設計・試作し、熱対流制御条件、溶液気泡発生抑制、流路表面吸着防止処理などオンチップDNA増幅反応の諸条件を検討した。結果、わずか15分での迅速高感度なDNA増幅に成功した(検量特性：DNA初期濃度12pg～12ng/chip、検出感度120pg/chip)。これにより遠心促進熱対流型PCR法の開発に成功し、その基礎条件を確立した。

研究成果の概要(英文)：PCR-based genetic testing has found its applications in many fields such as detection of infectious diseases, food poisoning, etc. Especially, on-site rapid DNA detection is required. In this study, the centrifugation assisted thermal convection PCR was proposed. The PCR solution could be driven by thermal convection and continuously exchange high/low temperatures in a ring structured micro-channel without the use of typical syringe pump. After optimization of other conditions (chip coating, bubble prevention, temperature, flow rate, etc.), the on-chip DNA amplification was successfully achieved from 120 pg of initial DNA within only 15 min. From this result, the methods and conditions for the centrifugation assisted thermal convection PCR could be established. I hope this result will be step toward the practical use of the easy and rapid PCR device for all users.

研究分野：バイオチップ、バイオセンサー

キーワード：PCR バイオチップ

### 1. 研究開始当初の背景

食の安全・健康維持・環境保全など安心・安全な社会を実現するための基盤として、食品加工工場、飲食店、在宅などの各現場において、簡易な操作で迅速かつ高感度に病原性細菌などを検出する遺伝子検知システムの開発が望まれている。

これまでに研究代表者はマイクロ流路を利用した迅速な遺伝子増幅チップを開発し、新型インフルエンザ (K. Yamana, M. Saito, et al., Analyst, 136, 2064-2068, 2011) や、炭疽菌 (Y. Fuchiwaki, H. Nagai, M. Saito, et al., Biosensors and Bioelectronics, 27, 88-94, 2011) の迅速検知を行ってきた。しかし、開発したフロー型チップによる増幅は、外部送液ポンプを必要としており、システムの簡易小型化が難しい課題があった。一方、M. Krishnan らによって、熱対流 PCR が提案されている (SCIENCE, 298, 793, 2002)。これは内径 1.6 mm × 高さ 15.0 mm の円柱状のガラス管内で、底面から熱を供給し、熱対流を発生させ、熱交換し、PCR を行うものである。熱対流は、一定の閉じた反応場において、対流による溶液駆動が可能であり、つまり外部ポンプを必要とせずに PCR 溶液の送液と熱交換が可能である。しかしながら、シリンダー状空間では反応温度・時間ともに制御が難しく、汎用的な発展性が望めない。また、いずれの手法においても、従来の PCR のようにユーザーがマイクロピペッター等を用いて試料調製を行うため、熟練度を要するなど操作性、簡便性に課題がある。このように、ユーザーレベルを問わず、誰でも場所を選ばず利用できるような遺伝子検知システムはいまだ開発されておらず、早急に課題を解決する必要がある。

### 2. 研究の目的

上述の課題の解決を目指すことを目的とし、熱対流による反応溶液の自走駆動と遠心力による熱対流加速を利用したオンチップ PCR 法を提案する。微細加工技術を用いて、ディスク状基板に、リング状の微小反応流路場を作製する。リング状流路内で熱対流させ、温度と時間を制御しつつ、且つ、遠心させることで熱対流を促進させ、熱対流 PCR を迅速に行う、遠心促進熱対流型 PCR 手法を提案、開発する。これは外部ポンプ不要であることから、装置の小型化が可能であり、また閉じた反応場となることから増幅効率を高めることも可能と考えられる。

本研究においては、遠心促進熱対流 PCR の実証と、リング状流路サイズ、遠心速度、熱対流速度、DNA 増幅との関係性を調査し、最適化する。さらには、あらかじめ反応試薬を充填したチップを準備し、検体液をチップ入口に滴下するだけで、遠心中に溶液混合、増幅反応を行える簡易・迅速な遺伝子検出デバイスへと発展させることを目指す。これにより、真に簡易・迅速なオンサイト型遺伝子

診断装置の基礎を築くことで、様々な感染症や微生物による環境汚染、バイオテロなどの危険に迅速に対処が可能となり、社会の安心・安全に寄与することができる。

### 3. 研究の方法

流体の温度傾度が閾値を越えると、熱拡散だけでは温度傾度を解消できなくなり、対流を生じる (ベナール対流)。このベナール対流を表す基礎方程式があり、第 1 式の右辺に、重力加速度を含む項がある。ここで、重力を大きくすることができれば、熱拡散を促進することができると考えられる。さらにこのとき重力場を遠心場に置き換えて考えることで、回転速度の制御によって熱対流速度を制御することが可能になると考えられる。

リング状マイクロ流路について、基本設計として、直径 6 mm リング径、500 μm 流路幅、300 μm 深さの流路サイズとした。素材にはポリジメチルシロキサン (PDMS) とガラスを使用した。Si 基板上にフォトリソ (SU-8 等) を塗布し、フォトマスクパターンを通して露光と現像を行った。形成させたレジストパターンに、PDMS を流し込み硬化させ、転写成型させた PDMS をガラス板に接合し、流路チップとした。リング状流路と熱対流を発生させるための熱源ヒーターについて、図 1 左のように対流の駆動源となる高温 (95 °C) 熱源をリング流路右側に位置するようにした。また、DNA の伸長反応が 60 °C 前後となるため、そのほかの流路部分に低温 (60 °C) 熱源が接触する配置とした。加温遠心機の機構について、図 1 右に示すような 2 種のアルミ製ブロックヒーターを設計し、これを固定するステージ盤、さらにその上に流路チップが位置する。これらを、シャフトに固定し、モーターに接続することで、遠心駆動を行った。

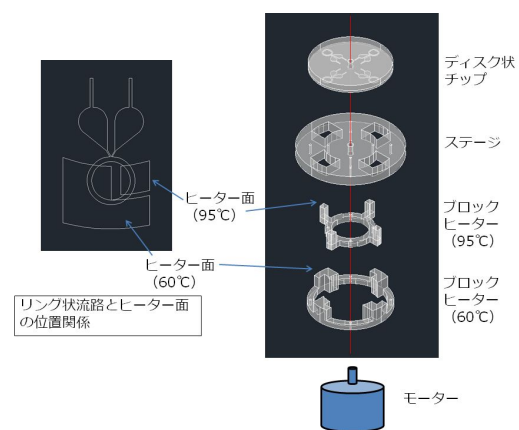


図 1 . チップと装置の配置

試作したチップ・遠心システムを用いて、遠心速度と熱対流速度などの関係性を評価し、遠心促進熱対流条件の最適化を行った。ヒトゲノム DNA と内在性コントロールの ACT 遺伝子領域を用いて遠心促進熱対流型 PCR を行い、DNA 初期濃度検量特性や検出感度、吸着

防止(ブロッキング)などを検証・評価した。検出は蛍光 PCR を利用し、反応前後の流路内の蛍光強度を測定した。

また、操作を簡便化も検討した。図 2 のように、あらかじめ反応試薬を充填したチップを準備し、DNA 検体液をチップ口に注入し、遠心によりリング状流路への移送と熱対流による溶液混合および増幅反応を行った。

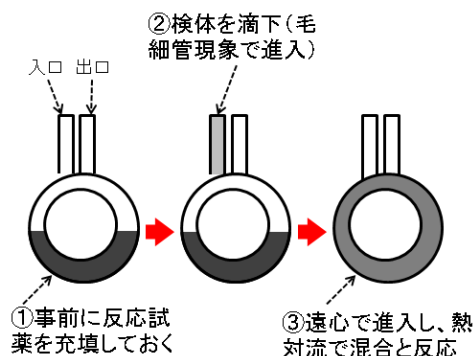


図 2 . 簡易操作化検討

#### 4 . 研究成果

試作した PDMS マイクロ流路(図 3)を、リング状反応流路内で熱対流を発生させるため、95 と 60 の熱源ヒーターブロックに作製した流路チップを設置し、加熱しながら回転させた。作製したチップに水と食紅液を充填し、熱対流の様子を観察したところ(図 4) 相対重力加速度と対流速度的関係が得られた(図 5)。

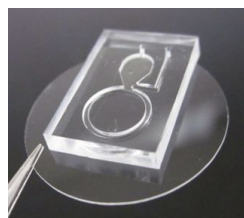


図 3 . 作製した PDMS チップ

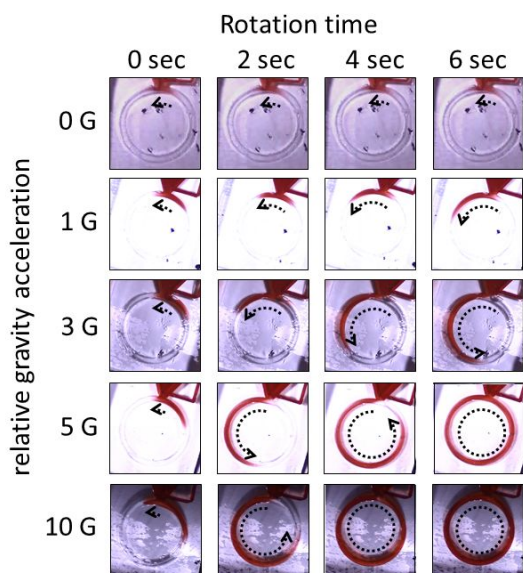


図 4 . 相対重力加速度変化に伴う対流速度変化の様子

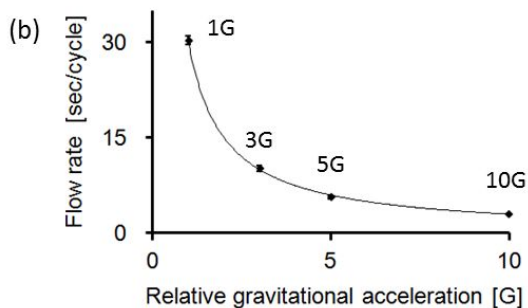


図 5 . 相対重力加速度と対流速度変化の関係

PDMS はそのガス透過性の高さから、高温(95 )にするとマイクロ流路中の反応溶液の気泡発生あるいは蒸発による液量減少によって PCR が妨げられる現象が見られた。これに対し、ミネラルオイルを PDMS 内に浸透(100 、20 分間)させることで、流路中の反応液蒸発および気泡発生を防止できることを見出し、また試料等の吸着防止のため、PCR 反応液に BSA および PVP を加えることとし、これらを流路表面のブロッキングとすることとした。

本デバイスおよびヒトゲノム DNA をテンプレートに用いて -Actin 領域の DNA 増幅を行った。熱対流速度と DNA 増幅の関係を見たところ、相対重力加速度 5G において最も増幅が見られた(図 6)。チップ流路の反応前後の蛍光強度測定を行った。

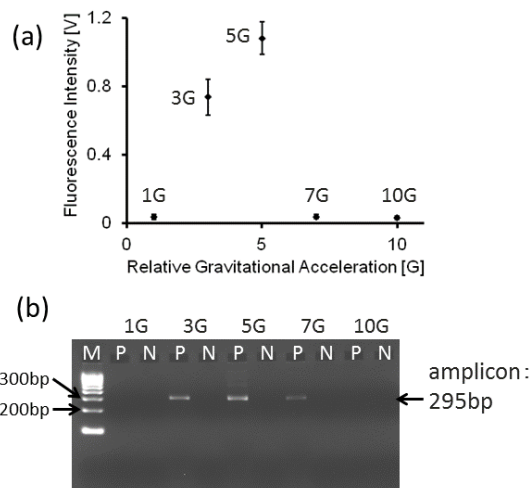


図 6 . 相対重力加速度と DNA 増幅の関係

さらにヒトゲノム初期濃度(12pg ~ 12ng/chip)に対する検量特性を得ることができた。電気泳動分析により目的とする DNA 増幅産物(DNA 長:289bp)も確認した(図 7)。結果、検出感度は 120pg/chip と高感度であった。

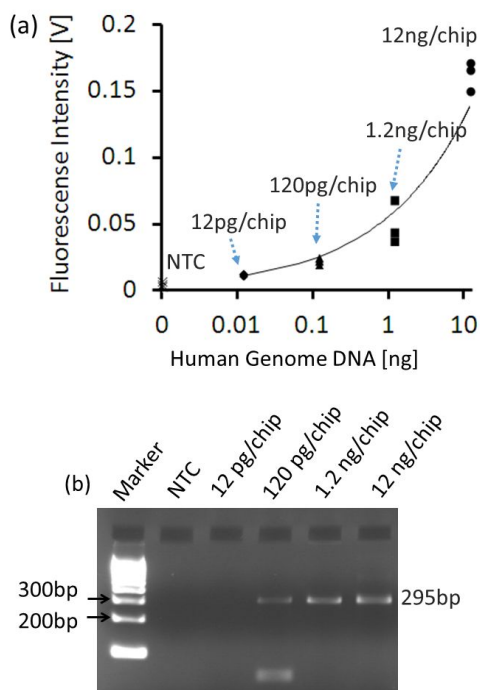


図 7. DNA 初期濃度に対する検量特性評価

一方、簡易操作化の検討も行った。PCR 溶液 3.88  $\mu$ L (鋳型 DNA なし) を充填した流路チップを準備した。これにヒトゲノム DNA 溶液または口腔粘膜サンプル液 0.12  $\mu$ L を遠心充填し、熱対流によって PCR 溶液とサンプル液を混合させ、さらに遠心促進熱対流 PCR による DNA 増幅に成功した。これにより、サンプル液を注入するだけで、簡易迅速に PCR 増幅が行えることを示すことができた。

以上、遠心促進熱対流型 PCR 法の開発に成功するとともに、その基礎条件を確立することができた。従来の PCR による遺伝子検査は、微量な試薬調製や熟練した技術を要していたが、この成果によって、検体を注入するだけで迅速な PCR 検査が可能になるものと期待できる。今後、簡易・迅速なオンサイト型遺伝子診断装置への実用展開を図ることで、種々の感染症や微生物による環境汚染、医療健康診断、バイオテロの危険などに迅速に対処が可能となり、医療、食品、防衛と広範な分野の社会の安心・安全に寄与することが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. 一細胞分離分析デバイスの開発、齋藤真人、山口佳則、民谷栄一、生体医工学、51、211-216、2013、査読無
2. Development of the POCT-oriented PCR device driven by centrifugation assisted thermal convection, Masato Saito, Yuichiro Kiriya, Keiichiro

Yamanaka and Eiichi Tamiya, in Proc. Micro Total Analysis System 2013, 1305-1307, ISBN: 978-0-9798064-6-9、査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 遠心促進型熱対流オンチップ PCR の開発と応用、齋藤真人、桐山雄一朗、民谷栄一、化学とマイクロ・ナノシステム学会 27th 研究会、東北大学、仙台、2013 年 05 月 23 ~ 24 日
2. Development of the poct-oriented pcr device driven by centrifugation
3. assisted thermal convection, Masato Saito, Yuichiro Kiriya, Keiichiro Yamanaka and Eiichi Tamiya, Micro TAS 2013, Messe Freiburg, GERMANY, 2013 年 10 月 27 日 ~ 2013 年 10 月 31 日
4. 遠心促進熱対流型 PCR の開発と応用検討、桐山雄一朗、齋藤真人、民谷栄一、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013 年 09 月 27 ~ 29 日
5. マイクロ・ナノ加工技術を利用したバイオセンシングデバイス開発と実用化に向けて、齋藤真人、第 4 回光科学異分野横断萌芽研究会(招待講演) 下呂温泉旅館組合会議室(岐阜) 2014 年 08 月 5 ~ 7 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 真人 (Masato Saito)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 80457001