【奨励賞研究】

微小流体制御理論に基づく
マルチプレックス遺伝子診断デバイス開発

夏原 大悟

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 機械工学専攻

1. 緒言

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的流行 (パンデミック) によって、人々の心身の健康と生活が脅かされている。本研究では、ウイルス感染症の早期診断を目的とし、1 回の検査で複数種類のウイルスを遺伝子レベルで簡便かつ迅速に同定するためのマイクロ流体デバイスの開発を行っている。本報では、複数の反応容器へ液体を自律的に分注するための理論を構築し、デバイスの設計指針を明らかにした。さらに、COVID-19 および A 型インフルエンザを対象とした病原ウイルスの遺伝子増幅実験を行い、多項目迅速診断の可能性を検討した。

2. 遺伝子診断デバイスの概要

Fig.1 にシリコン樹脂 (PDMS) 製の診断デバイスを示す。患者から採取した遺伝子サンプルと遺伝子増幅試薬をマイクロ流路内に導入し、混合部でサンプルと試薬を高効率に混合する。その後、複数の反応容器へ均等かつ自律的に分注し、遺伝子増幅反応 (LAMP 法) を行う。本デバイスの特徴は、反応容器に 2 個 1 組の受動バルブ (S_1 と S_3) が設けられていることである (図(b))。流路幅 (ギャップ長) を部分的に狭くすることで、表面張力によって液体を一時的に停止させている。具体的には、バルブ S_1 (決壊圧力 P_1) によって一旦停止した溶液が流れの方向を変えて反応容器へと流入される。その後、反応容器が充満してバルブ S_3 (決壊圧力 P_3) へ達すると、バルブ S_1 が決壊して溶液は 2 番目の反応容器へと向かう仕組みとなっている (決壊圧力 $P_3 > P_1$ と設計)。この動作を繰り返すことで自律的な分注を実現している (図(a))。

Fig.1 Microfluidic device for multiplex genetic diagnosis.

3. 実験結果および考察

3.1 反応容器への分注理論モデルの構築

デバイスデザインの最適化を行うためには、分注が可能な反応容器の個数や設定可能な最大導入流量を定量的に理解する必要がある。そこで、分注動作の理論モデルを導出し、デバイスの設計指針を構築した。受動バルブの決壊圧力 (P_1 , P_3) は、ヤン

グ・ラプラスの式に基づき、次式の通り導出することができる。

$$P(g) = -\gamma \left(\frac{\cos \theta_{m'} + \cos \theta_m}{g} + \frac{\cos \theta_m + \cos \theta_f}{H} \right) \quad (1)$$

$$[\theta_{m'} = \min(\theta_m + 90^\circ, 180^\circ)]$$

ここで、 γ は水の表面張力、 θ_m は流路の壁面と天井面の接触角 (PDMS)、 θ_f は流路底面の接触角 (封止用の両面テープ)、 g はギャップ長、 H は流路高さである (図 1(b) 参照)。なお、右辺の第 1 項の接触角 $\theta_{m'}$ は流路内に形成した凸構造角部での水接触角を表現している。式(1)から、バルブ S_1 , S_3 の決壊圧力は、 $P_1 = 3.23$ kPa ($g_1 = 36.5 \mu\text{m}$)、 $P_3 = 5.95$ kPa ($g_3 = 17.9 \mu\text{m}$) と計算できる。

次に、本デバイスの構造上、バルブ S_3 が決壊すると、その後は分注が行えなくなる。結論として、バルブ S_3 に必要な決壊圧力 P_3 は次式を満たす必要があることがわかった。

$$P_3 > P_1 + (m-1)\Delta P_1(L_1) + \Delta P_2(L_2) + \Delta P_3(L_3) \quad (2)$$

ここで、 P_1 は反応容器 1 個目のバルブ S_1 の決壊圧力、 $\Delta P_1 \sim \Delta P_3$ は流路長 $L_1 \sim L_3$ での流路抵抗による圧力損失である (図 1(a))。分注される反応容器の個数 (m) が増えることで、右辺第 2 項の圧力損失 ΔP_1 のみが圧力増分として加算されることを明らかにした。

3.2 LAMP 法による遺伝子増幅実験

Fig.2 に遺伝子増幅実験の結果を示す。ここで、左から 2 番目の反応容器内には、COVID-19 の RNA ウイルスを増幅するためのプライマー (短鎖 DNA) を予め乾燥・固定化している。同様に、左から 4 番目には A 型インフルエンザウイルス用のプライマーを固定化した。図(a)は、COVID-19 遺伝子サンプルを導入し、湯中 58°C で 30min 加温したときの結果である。反応容器 2 番目のみが紫色から水色に変化しており、COVID-19 が検出 (遺伝子増幅反応) できていることがわかる。図(b)は、A 型インフルエンザウイルスの診断結果である。4 番目の反応容器のみが水色に変化しており、正しく陽性反応を示した。以上の結果から、1 つのデバイス上で異なる 2 項目のウイルス診断が行えることが実証できた。

Fig.2 LAMP assays of (a) COVID-19 virus and (b) influenza A.

4. 結言

本研究では、マイクロ流路デザインの最適化を行うために、複数の反応容器に自律的に液体を分注するための理論モデルを構築し、デバイスの設計指針を明らかにした。さらに、本デバイスによって、ウイルス感染症 (COVID-19 および A 型インフルエンザ) の多項目の迅速診断が可能であることを示した。