技術報文(1)

高精度定量ＰＣＲ装置の開発（第１報）

小池　明，山口泰典[*1]，中濱久雄，古本浩章，田尾博幸

Development of High Performance Quantitative PCR System I

KOIKE Akira, YAMAGUCHI Yasunori[*1], NAKAHAMA Hisao, FURUMOTO Hiroaki and TAO Hiroyuki

The thermal cycling parameters are critical to a successful polymerase chain reaction (PCR) experiment. This paper proposes a liquid-mediated rotary PCR thermal cycler. A circular tank is partitioned into three thermal liquid chambers: denaturation at 94°C, annealing at 55°C and extension at 72°C. PCR tubes swim around the tank filled with water, so that they may be cycled between three temperatures. A desired PCR product and no byproduct was detected after PCR experiment in an extremely short total time of 30 minutes for 30 cycles and electrophoresis.

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う装置として，回転型液槽式サーマルサイクラー（反応装置）を設計試作した。液体を満たした３つの液槽（94℃熱変性，55℃アニーリング，72℃伸長）を隔壁で区切り，その中で検体を移動させる機構とした。試作機を用いて PCR 実験および電気泳動を行ったところ，30 サイクルで 30 分という短時間処理にもかかわらず，サブバンドが全く認められず，DNA の増幅効果が強く現れた。

キーワード：PCR，ポリメラーゼ連鎖反応，リアルタイム PCR，定量 PCR，サーマルサイクラー

１．緒　　言

各種感染症の検査や治療においては，リアルタイム定量 PCR 法が威力を発揮する。厚生労働省食品安全部監視安全課長通知により，ノロウイルスの検出方法として，「リアルタイム PCR 法」が新たに記載された（平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号）。

微生物の検出や定量には，従来から培養法や抗原抗体反応法が用いられてきた。培養法は確定診断としては有効だが，一週間程度の時間がかかるため，急速に伝染する病気に対応できず，患者の治療にも間に合わないことが多い。抗原抗体反応法は菌の特定には有効だが，定量性が悪く菌の増減がわからないため治療の効果を判断しにくい。

これに対し，定量 PCR 法は数時間で結果を出すことができ，定量性もよい。したがって，感染症患者の診断が迅速にでき，治療効果も判断しやすく投薬量の過不足も防げる。

しかし，従来の定量 PCR システムは，測定誤差が大きく，操作性が悪いなどの問題がある。その原因は後述のとおり，温度サイクルや測定原理にあると考えられる。そこで，本研究ではその方法を根本的に見直すことで，問題を解決することを試みた。

2005.6.30 受理　情報技術部

*1　福山大学生命工学部

２．従来のペルティエ式 PCR 装置

従来の定量 PCR 装置の性能を評価するため，大腸菌数 20,000［個／ml］であることがわかっている検体を，業界最大手である米国Ａ社の定量 PCR 装置を用いて同一条件で６回実測した。その結果を**図１**に示す。実測値には最大４倍もの開きがあり，統計的に解析するまでもなく，真の値を推定するのは極めて困難であることがわかる。これでは，感染症の検査や治療に用いるのは不十分と言わざるを得ない。このように誤差が大きい原因は，その測定原理そのものにあると考えられる。

同社の定量 PCR 装置の測定原理[1)]を**図２**に示す。これは，樹脂製円筒状の検体容器を，アルミニウム製のサーマルブロックに収容し，ペルティエ素子で加熱冷却する

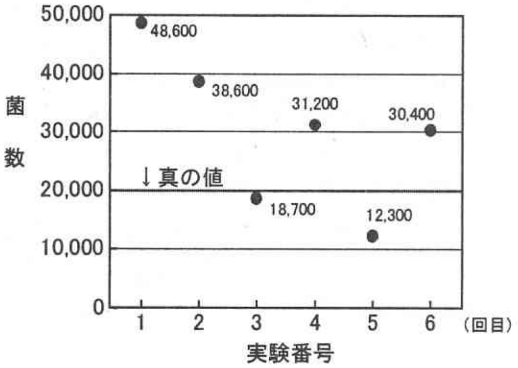


図１　従来の定量 PCR 装置による実測データ

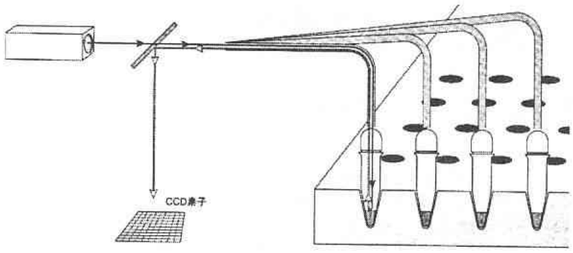


図２　従来のペルティエ式 PCR 装置の測定原理

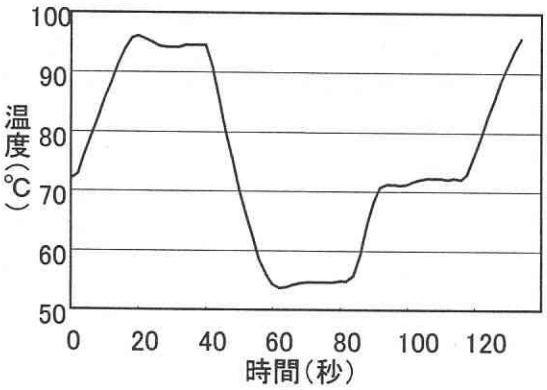


図３　従来のペルティエ式 PCR 装置の温度変化

もの（ペルティエ式）である。このような方式の PCR 装置の温度変化を，シース熱電対（K型，ϕ0.1mm，時定数 0.001 秒）にて実測した結果を**図３**に示す。PCR において，94℃熱変性→55℃アニーリング→72℃伸長→・・・という温度変化 [1]は，急峻であることが望ましいとされるが，ペルティエ式では温度変化が緩やかであることがわかる。この方式では PCR に時間がかかるばかりでなく，所定外の温度に検体が長時間晒されることになるため，副反応（増幅させたい部位ではない DNA の断片が生成されること）を生じやすいと考えられる。副反応が生じると余分な DNA まで測定されてしまうため好ましくない。ペルティエ式では，大きな熱容量を持つサーマルブロックを加熱・冷却するため，急峻な温度変化は困難である。

また，この方式は多検体同時パラレル処理である。これは，効率が良いように思えるが，１検体のみ処理する場合でも多検体処理する場合でも同じ手間と時間（**図２**の装置では 90 分）がかかる。また，多検体をすべて均一の温度にすることは困難であり，これが測定値のバラツキの原因になっているとも考えられている。

既存の定量 PCR 装置には，ペルティエ式のほか，ガラス製キャピラリーを空冷する方式のものもあるが，検体容器を加熱・冷却することに変わりはなく，上述の問題を解決できるものではない。

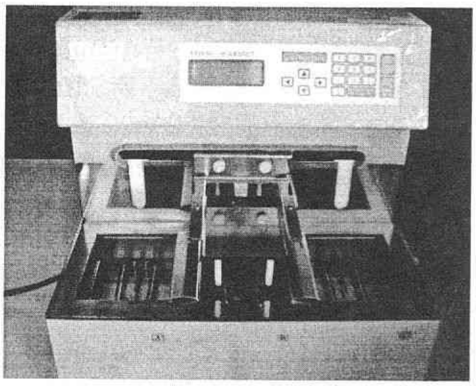
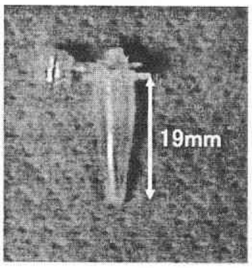


写真１　従来の液槽式 PCR 装置



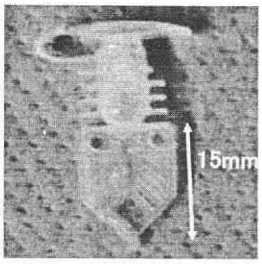


写真２　円筒容器　　**写真３　平板容器**

３．従来の液槽式 PCR 装置

急峻な温度変化を実現させるには，検体を液槽に浸す方法が考えられる。**写真１**に従来からあった液槽式 PCR 装置を示す。これは，液体を満たした３つの温度槽（液槽）に，検体容器を順次浸けていくものであり，各温度槽に浸ける時間を任意に設定できる。急峻な温度変化が可能になる。しかし，液槽の温度変化に検体容器内の温度変化が追従するかどうかは，容器の形状や肉厚によって異なる。そこで**写真２**（円筒状 20$\mu\ell$，肉厚 0.2～0.3mm）及び**写真３**（平板状 25$\mu\ell$，肉厚 0.05mm 以下）など数種類の検体容器について，その温度特性を前述のシース熱電対で測定した。その中で最も温度追従性

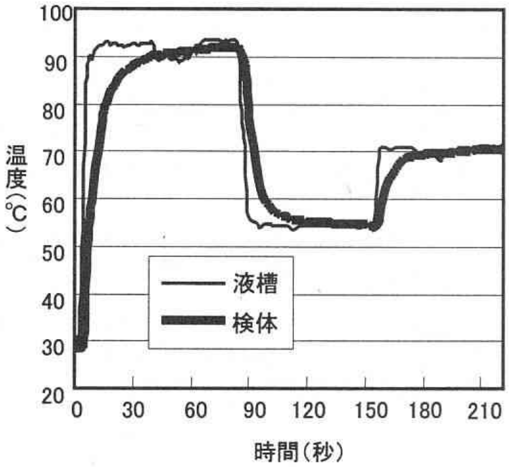


図４　液槽と平板状検体容器の温度変化

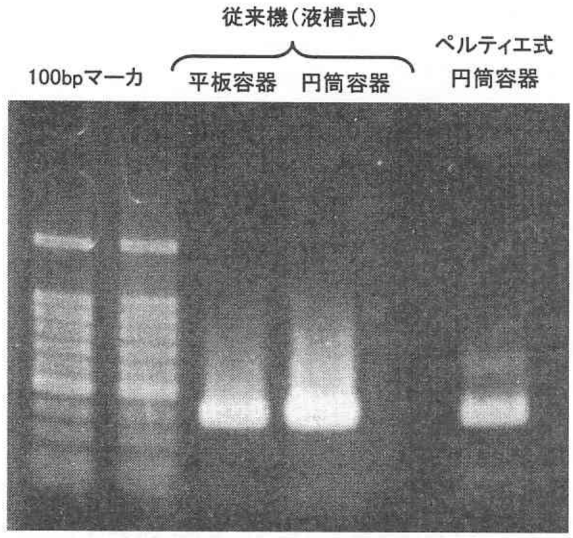


図５　液槽式装置とペルティエ式装置の PCR 実験結果

が良かったのが**写真３**に示す容器である。これは平板状で肉薄であるためだと考えられる。液槽にポリエチレングリコールを満たし，平板容器を浸けた時の温度変化を**図４**に示す。

また，検体容器や PCR 装置等の条件を変えて PCR 実験及び電気泳動を行った結果を**図５**に示す。テンプレートとして用いた DNA はすべて同一（400bp）で，処理時間は 94℃30 秒→55℃30 秒→72℃30 秒である。**図５**の左端に DNA の長さを 100bp ごとに示すマーカーを示した。ペルティエ式装置で円筒容器を用いた場合には 700bp 付近にサブバンド（不要な副産物）が認められる。これに対し，平板容器は 400bp 以外にはバンドが認められず，副反応が出にくく，円筒容器よりも優位であることがわかる。

液槽式 PCR 装置では処理時間を短縮できると考えられる。そこで 94℃30 秒→55℃30 秒→72℃30 秒及び 94℃15 秒→55℃15 秒→72℃30 秒で実験した結果を**図６**に示す。94℃15 秒→55℃15 秒→72℃30 秒では，PCR 産物が全く検出されなかった。これは，液槽を満たしたポリエ

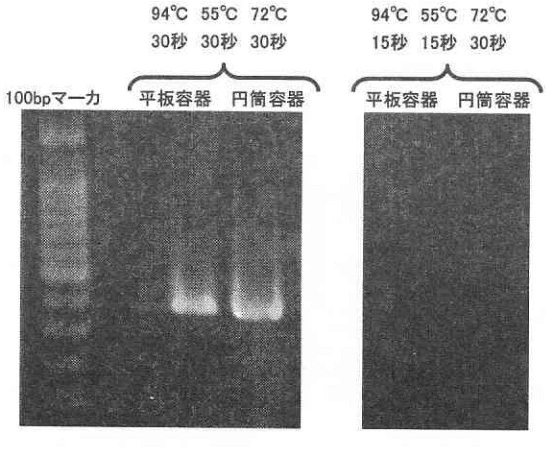


図６　異なる処理時間での液槽式装置の PCR 実験結果

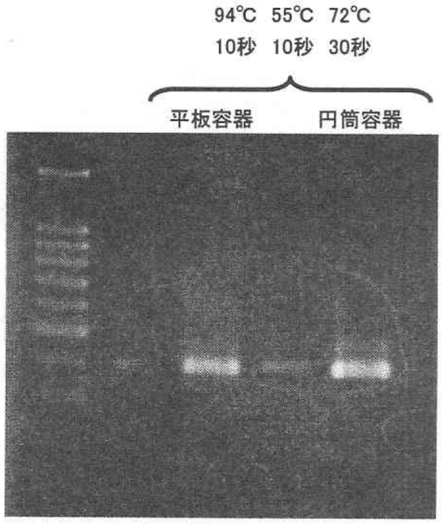


図７　熱媒体を水に換えた液槽式装置の PCR 実験結果

チレングリコールの比熱が小さい（約 0.5cal/K･g）ためであると考えられる。そこで熱媒体を水（比熱 1cal/K･g）に換えて同様の実験を行った。

その結果を図７に示す。水を用いると，94℃10 秒→55℃10 秒→72℃30 秒という短時間でも PCR 産物が検出できた。

以上のことから，短時間処理を実現するためには，水を熱媒体とした液槽式装置が適していると考えられる。ただし，水は比熱が大きいため設定温度に達するまでの時間が長い，蒸発しやすいため実験途中でも補水する必要がある，実験が終了した後に排水・乾燥させる必要がある等の欠点もある。

また，**図４**のような方式では検体容器が絶えず移動しているので，**図２**のような光学計測系を取り付けることが困難であるため，定量 PCR を実現するためには新たな液槽式反応装置が必要となる。

４．回転型液槽式 PCR 装置の設計試作

図８に示す回転型液槽式 PCR 装置の概念設計を行った。液体を満たした３つの液槽（94℃熱変性，55℃アニーリング，72℃伸長）を隔壁で区切り，その中で平板状の検体を回転移動させる。これによって PCR を理想的

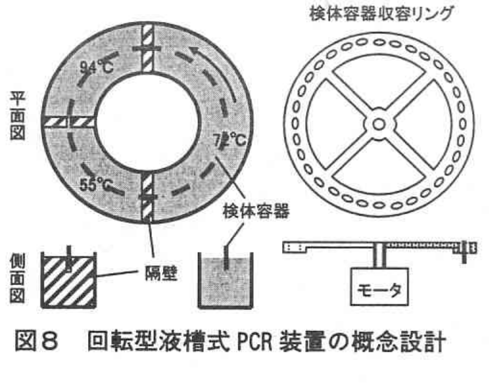


図８　回転型液槽式 PCR 装置の概念設計

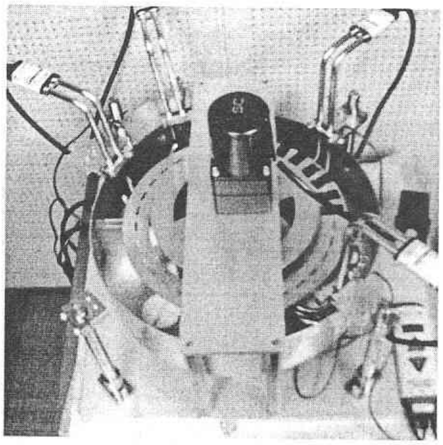


写真４　試作した回転型液槽式 PCR 装置

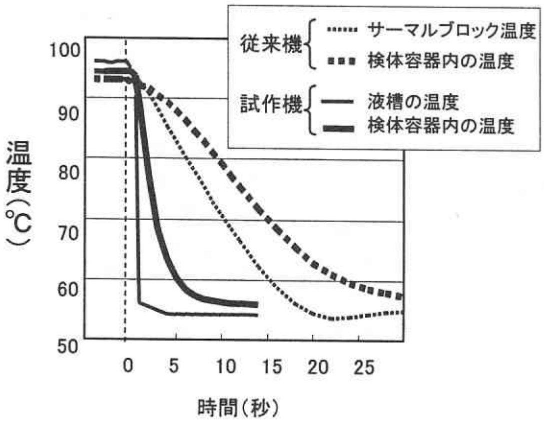


図９ 試作機および従来機（ペルティエ式）の温度変化

な温度サイクルで実現できると考えられる。隔壁の位置が固定されているので，各液槽の時間比（1：1：2）を変えることはできないが，回転数を変えることで１サイクルあたりの時間を任意に設定できる。

概念設計に基づき，**写真４**に示す装置を試作した。各液槽はヒーター，温度コントローラ，スターラー（攪拌子）によって一定かつ均一の温度に保たれる。平板状の検体容器を収容したリングが一定速度で回転することで温度サイクルが実現される。

液槽に水を満たして装置を動作させ，PCR の過程で最も重要とされる 94℃→55℃における検体容器内外の温度変化を実測した結果を**図９**に示す。試作機の温度変化が急峻で，検体容器内の温度追従性が良いことがわかる。

試作機および従来機（ペルティエ式）による PCR 実験後の電気泳動結果を**図 10** に示す。従来機では 30 回（サイクル）の PCR を行うのに 45 分かかったが，サブバンドが現れた。これに対し，試作機では 30 回で 30 分という短時間処理にもかかわらず，サブバンドが全く認められず，DNA が順調に増幅していることが確認された。このように，従来機を凌駕する実験結果が得られたことは

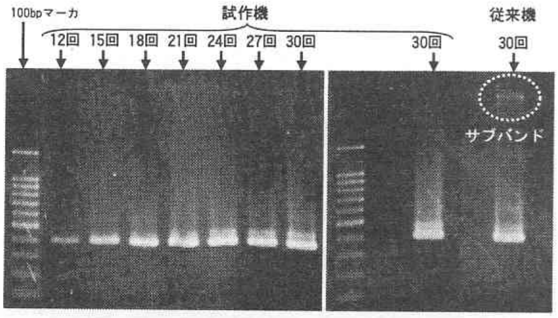


図 10　試作機および従来機（ペルティエ式）の PCR 実験結果

特筆に価する。

また試作機は，従来機とは異なり，実験途中でも検体の追加投入または排出が可能で，各検体に異なるサイクル数の PCR を実行できる。待ち時間なしでいつでもすぐに PCR 実験を始められるため，感染症の検査や治療には特に有効であると考えられる。

5．結　　言

DNA 増幅を行う上で，平板容器と回転型液槽式 PCR 装置が従来方式よりも優位であることが確認された。これを定量 PCR に発展させるためには，各サイクルで DNA 量を光学計測する必要がある。光学計測においても，平板容器は従来の円筒容器よりも扱いやすいと考えられる。

今後，光学系その他の制御系を回転型液槽式 PCR 装置に組み込むことで，定量 PCR が実現できる見込みである。

謝　　辞

本研究の遂行にあたり，ご協力頂いた福山大学工学部香川直己助教授，木曽精機(株)，(株)扶桑理化，(株)栄工社，(財)ひろしま産業振興機構福山支所に深く感謝いたします。

文　　献

1) 中山広樹：バイオ実験イラストレイテッド③本当にふえる PCR，秀潤社, 2003, p.169.