

SARS-CoV-2 遺伝子の迅速検出系の確立 ～15 分以内の迅速判定～

医療・福祉・介護

SATテクノロジー・ショーケース2021

■ はじめに

現在、世界中で新型コロナウイルスが猛威を奮っている。被害の拡大を防ぐためには、可能な限り早く感染を確認することが重要とされている。しかし新型コロナウイルス検出法の代表例であるリアルタイムPCR法では、測定に90分以上の時間を要する。一方、我々と杏林製薬株式会社で共同開発した高速リアルタイムPCR装置GeneSoCは（図1）、マイクロ流路を用いたサーマルサイクル法により15分以内で測定が可能である（図2）。そこで我々は迅速な新型コロナウイルス検出系の確立を目指した。

■ 方法

1. 検出系の確立

検出のための標的遺伝子は2020年1月末時点で最も詳細なプロトコルを公表していたCharité（ベルリン医科大学）が選定していたE遺伝子とRdRp遺伝子とした。検出系を確立するにあたり、いくつかのqRT-PCR試薬およびPCR試薬を用いて、どのような組み合わせがGeneSoCでの測定に適しているか検討した。さらに反応時間・温度条件を検討し、最も検出感度が良い条件を求めた。目標検出時間は15分以内とした。各条件における評価はTurkey-KramerまたはStudent's *t*-testにより行った。

2. 検体由来の精製RNAを用いた検出

検体から精製されたRNAを用いて我々が確立した系で、新型コロナウイルスが検出できるか検討した。RNAの最低濃度は、国立感染症研究所（感染研）のホームページ上で検出下限として求められていた50 copies/reactionとした。

■ 結果

1. 検出系の確立

まず精製RNAから逆転写を行い、cDNAの合成および精製を行った。精製したcDNAを用いてPCR条件の検討を行った。その結果、Hot start: 96°C, 10sec, PCR: (96°C, 4sec → 58°C, 8sec) x 50サイクルの条件が定まった。次に逆転写反応条件の検討を行った。精製RNAを用いて逆転写反応時間を検討したところ、60秒以上は検出感度に差が認められなかった。以上のことから、測定条件は逆転写: 42°C, 60sec, Hot start: 96°C, 10sec, PCR: (96°C, 4sec → 58°C, 8sec) x 50サイクルとなった。

2. 検体由来の精製RNAを用いた検出

精製RNAを用いて測定した結果、測定時間: 約14分30秒、検出限界: 50 copies/reactionであった。以上のことから15分以内で感染研が求める検出感度を達成した（図3）。

■ まとめ

本研究により15分以内で新型コロナウイルスの遺伝子検出が可能となった。このことで検体採取から1時間以内（前処理30分＋検査15分）で検査が可能となり、本検査法は保険適用対象となった。さらに日本において代表的な標的遺伝子とされているN遺伝子についても15分以内の測定系を確立した。今後は様々な感染症を未然に防ぐため、そしてGeneSoCを用いたPOCT実現のために迅速検出系の確立を行っていく。

■ 関連情報等（特許関係、施設）

・「核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ」
特許第 6226284 号、第 6460362 号、第 6519888 号、第 6530548 号、第 6765659 号

・試薬組成に関する特許は出願中



図1. GeneSoCの外観

右側の4つの機器が蛍光検出器であり、蛍光強度の増減を左側の画面に表示する。15分以内でリアルタイムPCRが完了する。

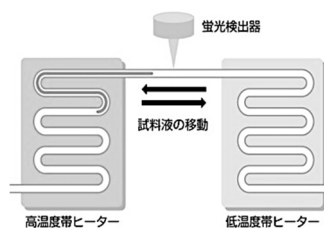


図2. マイクロ流路を用いたPCR
流路内にリアルタイムPCR反応液を入れ、各温度に設定されているヒーター上に反応液を移動させる。通常のサーマルサイクラーのようにヒーターの温度をサイクルごとに変化させる必要がない。

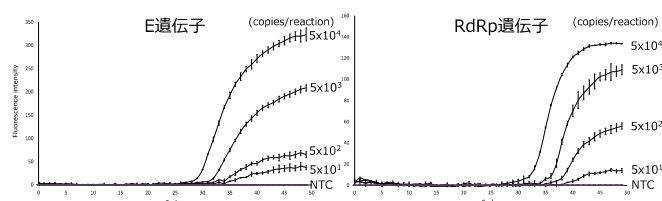


図3. GeneSoCを用いてターゲット遺伝子を測定した結果

精製RNAを用いて測定した結果、EおよびRdRp遺伝子とも50 copies/reactionまで検出することが可能だった。測定時間は約14分30秒であった。感染研が求める検出時間に応じた検出感度を達成した（1時間以上: 50 copies/reaction, 15分～1時間: 100 copies/reaction, 15分以内: 200 copies/reaction）。

代表発表者
所属

竹内 亮太(たけうち りょうた)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所
先端フォトニクス・バイオセンシング
オープンイノベーションラボ
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 (P3)
大阪大学フォトニクスセンター
TEL: 072-751-9527
r-takeuchi@aist.go.jp

問合せ先

■キーワード: (1)リアルタイムPCR
(2)遺伝子診断
(3)マイクロ流路

■共同研究者: (1)永井 秀典グループ長 産業技術総合研究所
(2)古谷 俊介主任研究員 産業技術総合研究所

■研究協力者: (1)前田 卓哉教授 埼玉医科大学医学部