

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15335

研究課題名(和文)世界最速qRT-PCR機器の開発と汎用遺伝子診断への応用

研究課題名(英文)Development of rapid qRT-PCR for applying to the gene diagnosis

研究代表者

大保木 啓介(OBOKI, Keisuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：80415108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高速PCR条件の検討を進め、プライマーについて至適濃度の決定が必要であり、これを決定することが出来た。スピードの点では、「40サイクル8分」を達成した。また、感度としても、1000コピーから50-100コピー程度にまで改善が出来た。最後に残る装置ヒーター部分の温度斑が生じる問題に対応し、おおよそ解決策を見出した。しかし、共同研究先企業による市場予測が芳しくないとの説明により、共同研究が終了し、機器の使用が不可能となった。新しい共同研究パートナーを探す必要が生じ、研究課題はペンディングとなった。高速PCRの試薬組成条件を最適化できたことは収穫であったので、今後の展開を模索中である。

研究成果の概要(英文)：It was necessary to determine the optimal concentration of the primers for efficient running the high-speed PCR, and it was possible to determine this. In terms of speed, "40 cycles 8 minutes" was achieved. Furthermore, the sensitivity was improved from ~1000 copies to ~100 copies. Finally, we found a solution for the problem of temperature unevenness in the heater of the equipment. However, due to the company collaborator's explanation that they cannot predict the market size of gene diagnosis in the future, this collaborative research ended, making it impossible to use the equipment. We needed to find a new collaborative research partner, the research subject became pending. It was valuable that we could optimize reagent conditions for the high-speed PCR. Thus, we are looking for the next tactics for the future development.

研究分野：腫瘍学

キーワード：PCR

1. 研究開始当初の背景

定量リアルタイム PCR を用いた「PCR 遺伝子診断」は、遺伝子を直接検出することから、イムノクロマト法よりも高感度・特異的で、病原体の亜型・薬剤耐性判別も容易であり、新興感染症の検出法として極めて有効である。水際対策としての PCR 遺伝子診断には潜在的ニーズがあると考えられるが、操作性や所要時間の長さから、現場では採用されていない。現場での使用のためには「高速」、「小型」、「簡便」が重要であると考え、これらの克服のため、代表者らは複数の企業と共同で、2007 年より「超高速リアルタイム PCR 装置」の開発を行ってきた。第 1 世代(円盤型)では、「40 サイクルの PCR 反応を 10 分」で行う事に成功した(J Virol Methods. 2011; 178: 75)。第 2 世代(ブロック型)では、高透明、低吸着のシクロオレフィンポリマーを利用したチップを用いることによって、反応時間はそのまま(40 サイクル 10 分)に、操作性の向上を達成した(Sensors and Materials. 2015; 27: 403)。現在、小型化した第 3 世代で検証中である。

2. 研究の目的

グローバルな人の移動の増加に伴って、高病原性鳥インフルエンザ、エボラ出血熱などの新興感染症対策が重要である。空港やクリニックでは、迅速診断が重要と考えられるが、PCR 装置は大きく、専門操作を要し、結果を得るまでに通常 2 時間以上を費やすなどの理由から、「現場」での診断機器としては普及していない。本研究では、実際の細菌やウイルス性感染症の臨床検体での検証を行いながら、世界最速・最小の超高速リアルタイム PCR (qRT-PCR) 装置および試薬の共同開発を行い、実際に現場で使える「超高速遺伝子診断プラットフォーム」の実証を目指す。第 3 世代リアルタイム PCR 装置はペルティエ素子で温度管理をし、大幅な小型化(20 cm x 20 cm x 20 cm)を図り、新設計の小型ポリマーチップ使用を特徴とする。すでに「40 サイクル 10 分」のリアルタイム PCR を実現しており、反応系とプログラム最適化を進めることで、最終的には「40 サイクル 8 分」を目指す。具体的には、研究方法で示した項目に取り組む。

3. 研究の方法

本研究は 2 年計画で行われ、下記の 7 項目(高速 PCR 反応系最適化や臨床研究を含む)についての研究と実証を行う。一方、さまざまなタイプの臨床試料からの迅速な核酸抽出は、現在も大きな課題であるため、これについては軽視せず、超高速リアルタイム PCR 診断実用化のための大きな挑戦の 1 つとして捉えている。本研究では、超高速リアルタイム PCR プラットフォーム実現のための研究を中心に実施し、核酸抽出に関する項目は我々の事前検討技術を基に企業との共同研究と

して進める。

平成 28 年度

(1) PCR 反応系の最適化

通常の PCR では、dNTP、プライマー、ポリメラーゼ等の至適濃度は確立され、条件設定を行う事は稀である。しかし、高速 PCR 条件、即ち、変性 - 会合 - 伸長反応が短時間で繰り返される条件下では、特にプライマーと鋳型 DNA の会合が不十分であることが予想される。我々は先入観を排除し、高速 PCR サイクル条件下では、会合イベントの不足を補う固有の至適濃度が存在すると仮定し、至適条件の探索を行う。

(2) 至適プログラムの確立

我々はこれまでの経験に基づいたプログラムで高速リアルタイム PCR を成功させている。しかし、さらなる反応時間の短縮化については未検討であるため、時間設定を見直し、第 3 世代機での「40 サイクル 8 分」の実現を目指して検討を進める。

(3) 装置性能の実証

1、2 で定めた条件で検出可能コピー数とダイナミックレンジを測定により求める。

(4) 臨床検体での検証(テストケースとしての尿道炎起因菌、歯周病菌の検出)

ATCC の病原体 DNA (尿道炎: クラミジアと淋菌、歯周病菌: ポルフィロモナス・ジンジバリス) を鋳型として、プライマー設定とその最適化を行う。PCR 産物はベクターにサブクローニングしてシーケンス確認を行う。臨床検体については、尿道炎は、東京、大阪の泌尿器科クリニックとの共同研究(所属施設倫理承認済み)により臨床尿検体の収集を実施中、歯周病については、ボランティア検体を用いた収集を計画中である。収集検体から、抽出キットを用いて病原体 DNA の抽出までを行う。

(5) RNA 検出(逆転写+超高速 PCR)の実証(ヒト由来インフルエンザウイルスの検出)

超高速リアルタイム PCR 用専用チップ(5 μ L)内での逆転写と PCR の連続反応を行うプログラムの実証をヒト RNA を用いて行う。これまでに我々のインフルエンザ PCR 診断研究(J Virol Methods. 2011: 178; 75)で実績のある試薬(RNA-direct(TM) Realtime PCR Master Mix: 東洋紡 等)を使用し、高速 PCR プログラム冒頭に 3~5 分間の逆転写時間を挿入したプログラムを実施する。

ヒト由来試料中のインフルエンザウイルス検出は、我々のイムノクロマト法研究で過去に実施実績があり(J Virol Methods. 2014; 209: 62; PLoS One. 2015; 10: e0116715)、倫理承認が取れ次第、同様のスキームで検体収集を実施する。

(6) 融解曲線(変異・多型、PCR 産物均一性)解析の実証

次年度に実施

(7) 遠心機を使わない前処理法の開発

予備的検討として、我々は、核酸吸着レジ

ン方式の市販核酸抽出キットを使って、遠心機の代わりに、シリンジによってレジンを強制通過させる方式を考案し、遠心機方式に近い性能を出せることを確認している。この方法に基づき、前処理方法の共同開発を開始する。

平成 29 年度

- (1) PCR 反応系の最適化
- (2) 至適プログラムの確立
- (3) 装置性能の実証
1~3 は実施予備期間とする。
- (4) 臨床検体での検証(テストケースとしての尿道炎起因菌、歯周病菌の検出) ATCC の病原体 DNA (クラミジア、淋菌、ポルフィロモナス・ジンジバリス) に、ヒトゲノム DNA を段階希釈で加えたものを鋳型とし、ヒトゲノムとの交叉性について検証する。交叉性に問題が無い条件を定めたあと、病原体陽性の臨床検体から抽出した DNA を鋳型に、1、2 で定めた高速 PCR を実施し、既存検査との一致率を評価する。病原体間の交差反応については、検討すべき種類が膨大なため、TOBIRA を介した共同研究を模索する。
- (5) RNA 検出(逆転写+超高速 PCR)の実証(ヒト由来インフルエンザウイルスの検出)

収集されたヒト由来試料中のインフルエンザウイルス検出を実施する。プライマー設定はすでに報告済である(J Virol Methods. 2011; 178: 75)。

- (6) 融解曲線(PCR 産物バリデーションと変異・多型検出)解析の実証
融解曲線解析によって、PCR 反応産物の均一性の評価が実現するほか、がんや遺伝病での遺伝子変異や多型の検査が可能となる。高速 PCR プログラムの後、65 から 95 まで一定速度で徐々にチップ温度を上げて蛍光量を連続測定する。
- (7) 遠心機を使わない前処理法の開発
前年度に引き続き、企業との共同研究により、遠心機を使わない前処理方法の開発を実施する。

研究体制

研究の実施

大保木啓介(研究代表者)、芝崎太、梶原直樹(研究分担者)、遠藤典子、東瞳、小川美奈、大屋友紀、貞任大地(研究協力者)

□研究のデザイン - 大保木、芝崎、遠藤、梶原

□アッセイの実施 - 大保木、東、遠藤、貞任
□臨床検体の収集と個人情報管理 - 大屋(リサーチコーディネーター)

□論文執筆 - 大保木、芝崎、遠藤、梶原

測定環境の提供

積水化学工業機能材料開発センター

山内博史、赤木良教、乾延彦(研究協力者)

前処理法の共同開発

シンセラテクノロジーズ社

小林行治(研究協力者)

4. 研究成果

初年度は、我々のリアルタイム PCR 装置はペルティエ素子で温度管理をし、大幅な小型化を図り、新設計の小型ポリマーチップ使用を特徴とする。すでに「40 サイクル 10 分」のリアルタイム PCR を実現した。既存のリアルタイム PCR 装置(Thermo 社 StepOnePlus、Roche 社 LightCycler480II)でもペルティエ素子が採用されているが、同一材料、同一プログラムで PCR を行くと、所要時間は、それぞれ 40 サイクル 36 分、25 分であった。研究責任者らのリアルタイム PCR 装置では 40 サイクル 10 分であることから、加熱冷却スピードは既存機種をすでに凌駕していた(加熱速度 13.6 /秒、冷却速度 11.0 /秒)。

高速 PCR 条件、即ち、変性 - 会合 - 伸長反応が短時間で繰り返される条件下では、特にプライマーと鋳型 DNA の会合が不十分であることが予想される。我々は先入観を排除し、高速 PCR サイクル条件下では、会合イベントの不足を補う固有の至適濃度が存在すると仮定し、至適条件の探索を実施し、上記について、反応系とプログラムのさらなる最適化を検討することによって、これまで「40 サイクル 10 分」であったところ、「40 サイクル 9 分」を実現できた。

2 年目は、高速 PCR 条件の検討を進め、予想通りプライマーについて至適濃度の決定が必要であり、これを決定することが出来た。さらに、スピードの点では「40 サイクル 9 分」であったところ、「40 サイクル 8 分」を達成した。また、感度としても、1000 コピーから 50-100 コピー程度にまで改善が出来た。最後に残る装置ヒーター部分の温度斑が生じる問題に対応し、おおよそ解決策を見出した。しかしながら、共同研究先企業による遺伝子診断市場規模予測が芳しくないとの説明により、共同研究が終了し、機器の使用が不可能となった。新しい共同研究パートナーを探す必要が生じ、研究課題はペンディングとなった。高速 PCR の試薬組成条件を最適化できたことは収穫であったので、今後の展開を模索中である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大保木 啓介 (OBOKI, Keisuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号: 80415108

(2) 研究分担者

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号: 90300954

梶原 直樹 (KAJIWARA, Naoki)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・主任研究員
研究者番号： 70453917

(3)研究協力者

遠藤典子 (ENDO, Fumiko)
東瞳 (AZUMA, Hitomi)
小川美奈 (OGAWA, Mina)
大屋友紀 (OYA, Yuki)
貞任大地 (Daichi, Sadato)
山内博史 (YAMAUCHI, Hiroshi)
赤木良教 (AKAGI, Yoshinori)
乾延彦 (INUJI, Nobuhiko)