

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K12842

研究課題名（和文）超迅速/高感度遺伝子検査を実現できる新規試薬の研究開発

研究課題名（英文）Research and development of new reagents that enable ultra-rapid and highly sensitive genetic testing

研究代表者

上原 雅行（Uehara, Masayuki）

岐阜大学・高等研究院・准教授

研究者番号：10533309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、迅速に病原体遺伝子を検出できる新たな検査試薬キットを開発・試作した。特に、肺炎マイコプラズマ（薬剤耐性型を含む）や百日咳菌などの病原体を迅速に検出するため、機能性物質修飾型蛍光プローブやプライマーの開発に注力し、既存の検査システムと同等の検出感度を維持しつつ、4分程度で安定した検出（核酸増幅）を実現した。本研究成果は医療や検査分野において重要な意義を持ち、実用化に向けた道も開かれている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、わずか4分程度で遺伝子検査を可能にする高感度な検査試薬キットの開発・試作に成功した。本成果により、感染症や遺伝子疾患の迅速な診断が可能となり、医療分野での活用が期待される。さらに、家畜の感染症対策や食品衛生管理、犯罪捜査にも応用でき、社会全体の安全性向上にも寄与する。学術的にはPCR法の迅速化と高感度化に新たな可能性を示し、また、実用化に向けた重要な成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new test reagent kit that can rapidly detect pathogen genes. In particular, in order to rapidly detect pathogens such as Mycoplasma pneumoniae and Bordetella pertussis, we focused on the development of functional substance-modified fluorescent probes and primers, and achieved stable detection in only 4 minutes, while maintaining detection sensitivity equivalent to existing testing systems. The results of this research have important significance in the medical and testing fields, and have also paved the way for practical applications.

研究分野：医用システム

キーワード：遺伝子検査 病原体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、医療現場におけるインフルエンザ(新型含む)の確定検査を始めとして、結核、ヘルペス脳炎、臓器移植時(手術時)の感染検査、さらにはガン等の診断には、感染ウイルスや細菌、ガン特有の遺伝子を検査するPCR(Polymerase Chain Reaction)法が広く用いられている。また、遺伝子疾患等の診断においても、PCR法による遺伝子解析が多用されている。さらに、口蹄疫、鳥インフルエンザ、鯉ヘルペスといった家畜等の重大な感染症、ノロウイルスといった食品衛生分野、DNA鑑定等警察鑑識分野においても、PCR法が確定検査に用いられている。感染ウイルス等の特定遺伝子を増幅させて検査できるPCR法は、検体試料が比較的少なく、感染症状が重篤化する前に診断できることもあり、非常に有効な診断手法である。

一方で、通常のPCR機器を使用した場合、検体試料の前処理時間に加え、遺伝子の増幅で40分~1時間程度、増幅された遺伝子発現を定性的に判断するための電気泳動で30分~1時間以上、加えて種々の準備の時間が必要になり、現状のPCR法はその検査自体に合計3~4時間を要する。また、通常のPCR法では定性的な判定のみ可能であり、感染症等の度合いを的確に診断するには、増幅された遺伝子の定量機能をもつリアルタイムPCR法が有効であるが、定量型のリアルタイムPCRは高価で機器自体も大型である。したがって、専門施設内での利用に限られ、現場からサンプルを送付する必要がある等、普及の妨げとなっている。

そこで、現在、原因となるウイルスや細菌、ガン特有の遺伝子、一塩基多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)等を「その場」で迅速に特定できる遺伝子検査システムが求められている。

もし、「その場」遺伝子検査が実現できれば、病気の迅速な診断や適切な治療薬の選定など医療の領域における有用性は当然のことながら、医療以外の領域、例えば、家畜の伝染病検査(高病原性鳥インフルエンザ等)、食品工場での管理検査、空港港湾での感染症検査(水際対策)、犯罪捜査等、幅広い分野で活用され、感染拡大の防止にも有効な対策になることが期待される。

2. 研究の目的

これまでに、応募者は、液滴昇降式高速リアルタイムPCR装置(10分/50cycle)や全自動高速遺伝子検査システム(核酸抽出からPCR増幅まで13分以内)等の研究開発を実施し試作化に成功した。しかし、液滴昇降式PCR法といった新規手法及び装置の改良による更なる高速/高感度検出化には限界があり、オリジナル試薬キットを開発する必要性が生じた。

そこで、本研究では、迅速リアルタイムPCR装置に対応した「高速/高感度検出可能なオリジナル試薬キットの開発と試作化」を目的に実施する。具体的には、従来のリアルタイムPCRシステムと同等の検出感度を維持しながら、4分以内で遺伝子検出できる試薬キットを開発・試作化する。

3. 研究の方法

(1) 高速/高感度検出対応試薬の開発に向けた調査・準備

学術論文や先行特許文献を網羅的に調査分析し、高速/高感度化を実現し得る試薬成分/添加剤/ポリメラーゼ候補を選定・購入等準備を実施した。

(2) 高速/高感度検出対応試薬の開発

高速PCR実験系「1分~5分/40cycle」の構築

高速 PCR 実験系にて、前述(1)の試薬成分/添加剤/ポリメラーゼ等の効果検証を実施。

増幅対象遺伝子は「培養菌由来のゲノム(市販品)」を活用、また当該ゲノム配列を含む「プラスミド DNA」を外部製造委託し使用。肺炎マイコプラズマや百日咳菌など細菌由来の DNA ゲノムを用いた。

遺伝子解析ソフトウェアを駆使し、プライマー/プローブの設計対象ゲノム領域を選定、高速遺伝子増幅に有効なプライマー/プローブの独自設計を行い、検証した。

機能性物質(人工核酸やペプチドなど)を修飾した蛍光プローブ/プライマーを開発し、効果の有無、挿入位置・挿入配列による影響の有無を検証した。

増幅対象は、肺炎マイコプラズマ・百日咳菌に加えてアデノウイルスなど DNA ゲノムや、インフルエンザウイルス・新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)など「RNA ウイルス由来のゲノム」および当該ゲノム配列を含む「プラスミド DNA」を使用。逆転写時間の短縮化も試みた。

目標検出感度は、従来と同等の検出感度「菌由来 DNA 20copies/ μ l、ウイルス濃度 50pfu/ml」を有し、4分以内で遺伝子増幅を確認できていること、とした。

(3) 高速/高感度検出対応オリジナル試薬キットの試作化

各種リアルタイム PCR 試薬成分の全体最適化。

ヒトゲノム等夾雑物が添加された条件下で実験を実施した。

4. 研究成果

本研究では、高速条件下でも安定して核酸を増幅できる独自の実験系(検出装置を含む)を構築し、従来システム(既存装置や市販試薬等)と同等の検出感度を維持しながら、4分程度で遺伝子を検出できる試薬キットの試作に成功した。

特に、肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)や百日咳菌(*Bordetella pertussis*)などの各病原体に対応した「機能性物質修飾型蛍光プローブやプライマーの開発」に注力し、蛍光プローブへの新規機能性物質の修飾検討、機能性物質の修飾位置・挿入配列・挿入頻度の効果検証、試作試薬の各種パラメーターの最適化、検出装置・測定チップの改良などに取り組んだ。

その結果、4分程度の迅速検出条件下で病原体由来のゲノム DNA(精製済み)の増幅を確認し、従来システムと同等の検出感度を達成した。ヒトゲノムなどの夾雑物が添加された条件下でも同等の結果が得られ、夾雑物による影響は見られなかった。さらに、本検出システムを活用し、薬剤耐性肺炎マイコプラズマ菌(プラスミド DNA)の検出実験を行い、迅速判別にも成功した。

これまでの研究で得られた各種データを大学の知財部門と共有し、特許出願に向けた検討を進めるとともに、研究成果を公表するために学术论文の執筆や学会誌への投稿準備を行った。また、遺伝子検査装置の開発・製造販売を手掛ける医療機器メーカーや診断薬メーカーとも情報交換を行い、今後の協業に向けた検討も進めた。

本研究は、従来の遺伝子検査システムと同等の検出感度を維持しつつ、迅速かつ高感度な遺伝子検査を可能にする新しい検査試薬の開発を目的として実施してきた。本研究成果により、感染症や遺伝子疾患の迅速な診断が可能となり、医療分野での活用が期待される。さらに、家畜の感染症対策、食品衛生管理、犯罪捜査などにも応用でき、社会全体の安全性向上にも寄与すると考えられる。学術的には PCR 法の迅速化と高感度化に新たな可能性を示し、また、企業等との協業により実用化への道も開かれている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------