

呼吸器感染症の検査を自宅で可能とする小型高速リアルタイム PCR 技術の開発

(産総研 PhotoBio-OIL) ○永井 秀典

Development of compact high-speed real-time PCR systems for point-of-care-testing of respiratory infections (*Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*) ○Hidenori Nagai

We have developed high-speed quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) devices based on the oscillatory-flow in a microchannel. As the target for the high-speed microfluidic RT-qPCR, E gene, N gene, and S gene of SARS-CoV-2 was examined. Reverse transcription and qPCR were carried out countinuously in the same microchannel as a one-step RT-qPCR. In the optimum condition for high-speed RT-qPCR, the amplification of target genes was obserbed from the above 5 pfu/run of SARS-CoV-2 within only 15 minutes. Thus, we expected that the developed high-speed microfluidic RT-qPCR system would rapidly detect various pathogenic virus at sites such as quarantine and event venues.

Keywords : Polymerase Chain Reaction; Infection Diseases; Telemedicine; Point of Care Testing

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的な蔓延により、核酸同定検査法である Polymerase Chain Reaction (PCR) 検査が広く知られる様になった。PCR 法は、試料 DNA (鋳型 DNA) の中の標的配列を認識して挟む様に結合する 2 種類の 20 塩基程度の短い 1 本鎖オリゴ DNA (プライマー) と、DNA の材料となる核酸モノマー (dNTP) を混合し、それらを重合するための触媒として耐熱性 DNA ポリメラーゼ酵素を用いて、標的遺伝子のコピーを生成する原理に基づいている。特に、試料から抽出した DNA とこれらを混合した PCR 溶液を専用のサーマルサイクラーにセットし、二本鎖 DNA を一本鎖に解離させる変性温度 (約 95°C) と、プライマーを結合 (アニーリング) させ一本鎖の鋳型 DNA から 2 種類のプライマー配列に挟まれた領域を二本鎖 DNA に複製する伸長温度 (50~70°C 程度) の間を繰り返し温度変化 (サーマルサイクル) させることで、標的配列の DNA を指数関数的に増幅することが可能である。さらに、RNA から逆転写反応 (Reverse Transcription : RT) により塩基配列が相補的な DNA を合成後、PCR 法に供する手法を RT-PCR 法と呼び、特に、逆転写酵素をあらかじめ反応系に混合することで、RT と PCR を同一反応液中で行う RT-PCR 法を One-step RT-PCR 法と呼ぶ。また、標的配列の合成と同時に蛍光を発するプローブを用いて、PCR による DNA 増幅と定量を同時に実施するリアルタイム PCR (qPCR) 法と呼び、特に、RT を組み合わせた RT-qPCR 法や One-step RT-qPCR 法が RNA をゲノムとする多くのウイルスの検査に広く利用されている。

我々は、あらかじめ PCR 法に必要な変性温度と伸長温度のヒーターを複数用意しておき、それらに接する様に数十～数百 μm 幅のマイクロ流路を配置し、その中で PCR 溶液が往復送液することで、繰り返し変性温度と伸長温度に交互に触れるサーマルサイクラーを考案した^{1,2)}。実際に、変性反応と伸長反応の時間を変化させ、PCR を実行可能なサーマルサイクル条件として確かめられた温度変化の平均速度は約 18°C/s であり、汎用のサーマルサイクラーの数 $^\circ\text{C/s}$ に比べ桁ほど高速であることが確認された。また、マイクロ流路内の往復送液には、ピエゾ素子を用いた超小型なマイクロブローアを使用した。一般的に使用されるシリンジポンプ等の加圧や減圧により駆動する送液機構と異なり、送風の静圧により駆動することで、マイクロブローアの停止と同時に速やかにマイクロ流路内の圧力を解放させ瞬時に停止させることができる。そのため、圧力解放用のバルブ機構が不要な小型なシステムを構築可能である。

このように開発した高速リアルタイム PCR 装置を用いて、SARS-CoV-2 の E, N, S の各遺伝子を標的とした One-step RT-qPCR 法を検討したところ、60 s の RT を含め 15 分で $5\text{ pfu}/\mu\text{l}$ のウイルスを検出できることを確認した。これは、Point-of-care-testing (POCT) 用途に利用されているイムノクロマトグラフィー法と比較して、分析時間として同等である。

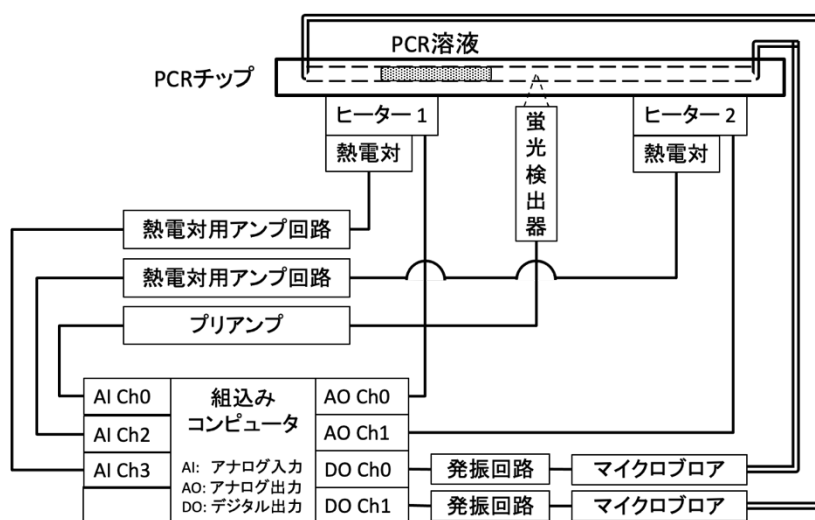


図1 高速リアルタイム PCR システムの構成

- 1) Development of an on-site rapid real-time polymerase chain reaction system and the characterization of suitable DNA polymerases for TaqMan probe technology. S. Furutani, N. Naruishi, Y. Hagihara and H. Nagai, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 408, 5641.
- 2) On-site identification of meat species in processed foods by a rapid real-time polymerase chain reaction system. S. Furutani, Y. Hagihara and H. Nagai, *Meat Sci.* **2017**, 131, 56.