

極微量ウイルスの高感度・ 高精度PCR検出技術

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
化学プロセス研究部門 有機物質変換グループ
主任研究員 松浦 俊一

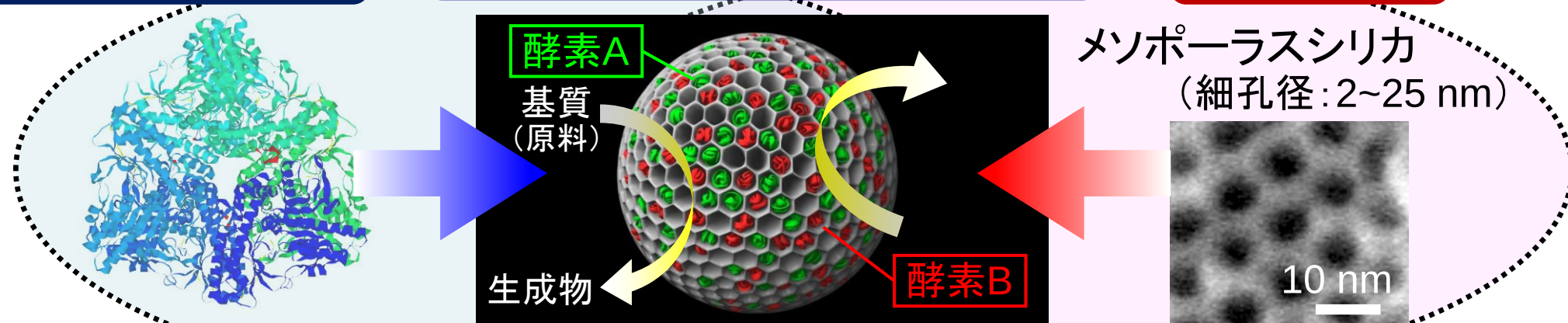
2023年1月20日

ナノ空間材料のバイオ分野への新利用

生体触媒(酵素)

酵素-メソポーラスシリカ複合体

固定化担体



▶ 本技術の特徴

- 凝集体の形成を抑制
- 細孔サイズの最適化

適用技術・用途

CREST

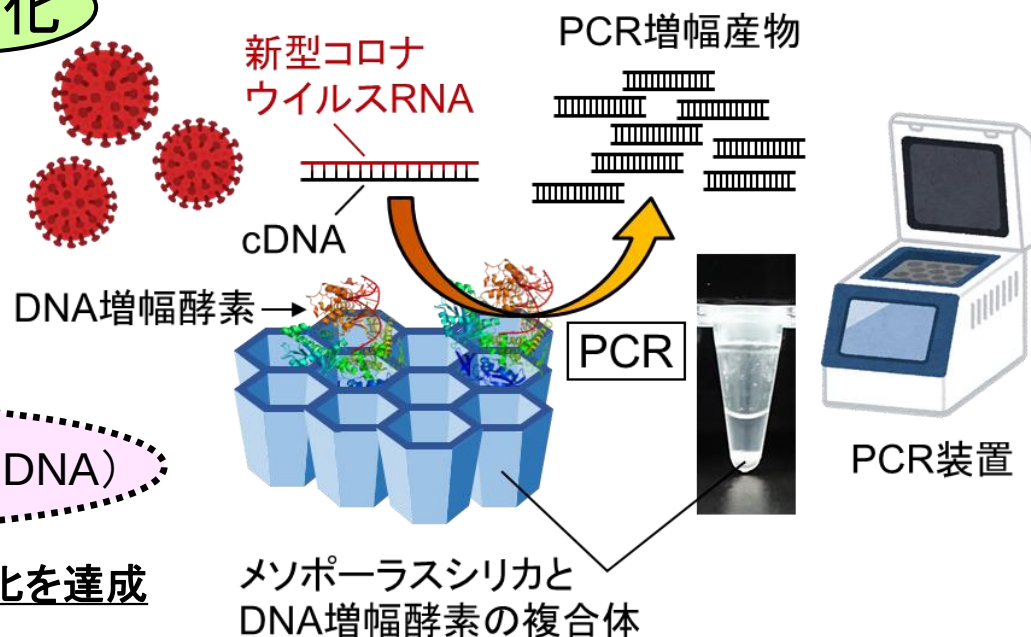
研究領域「コロナ基盤」(R2~R5)

高感度・高精度
PCR法の開発

遺伝子の診断

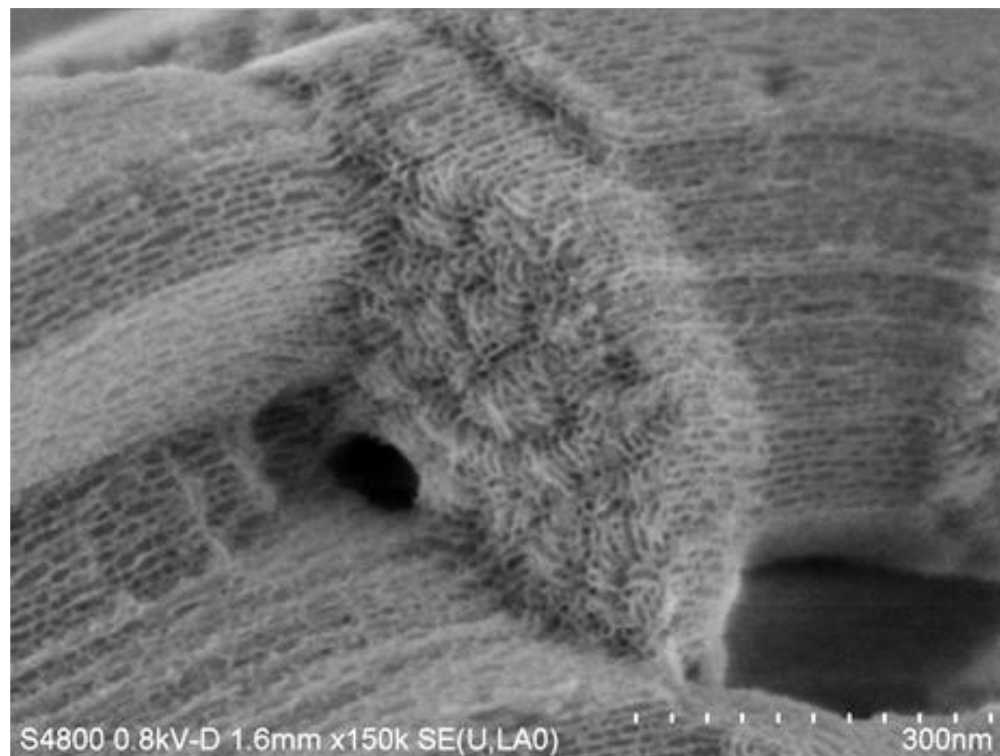
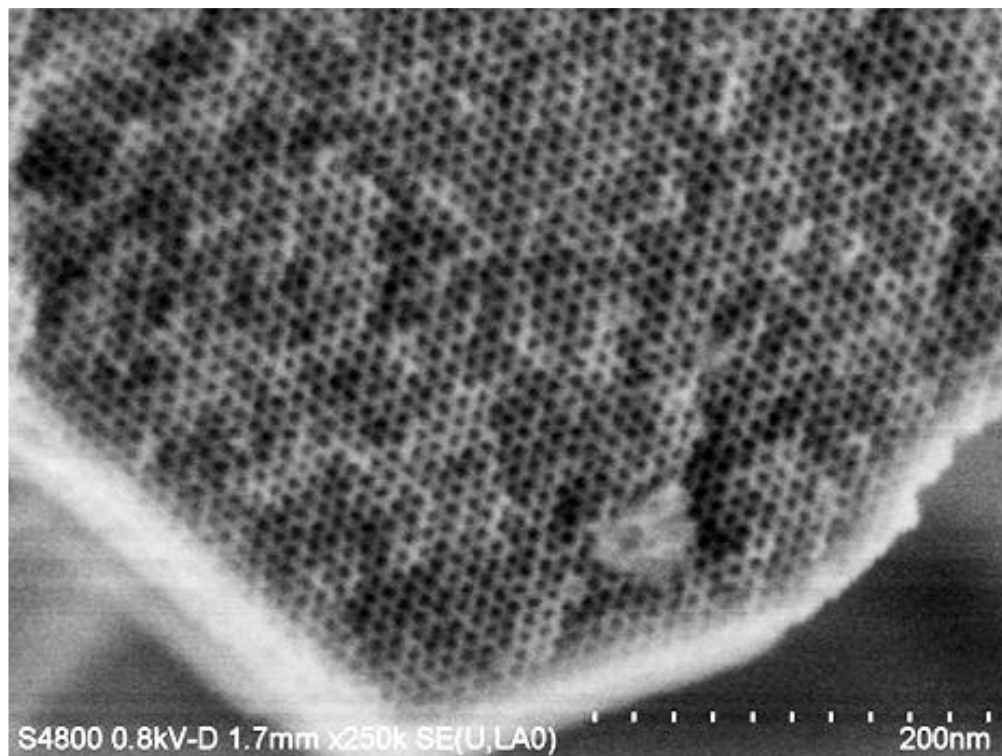
極微量の核酸(RNA, DNA)

→ 現行法に対して約100倍の高感度化を達成



メソポーラスシリカと
DNA増幅酵素の複合体

メソポーラスシリカの電子顕微鏡像

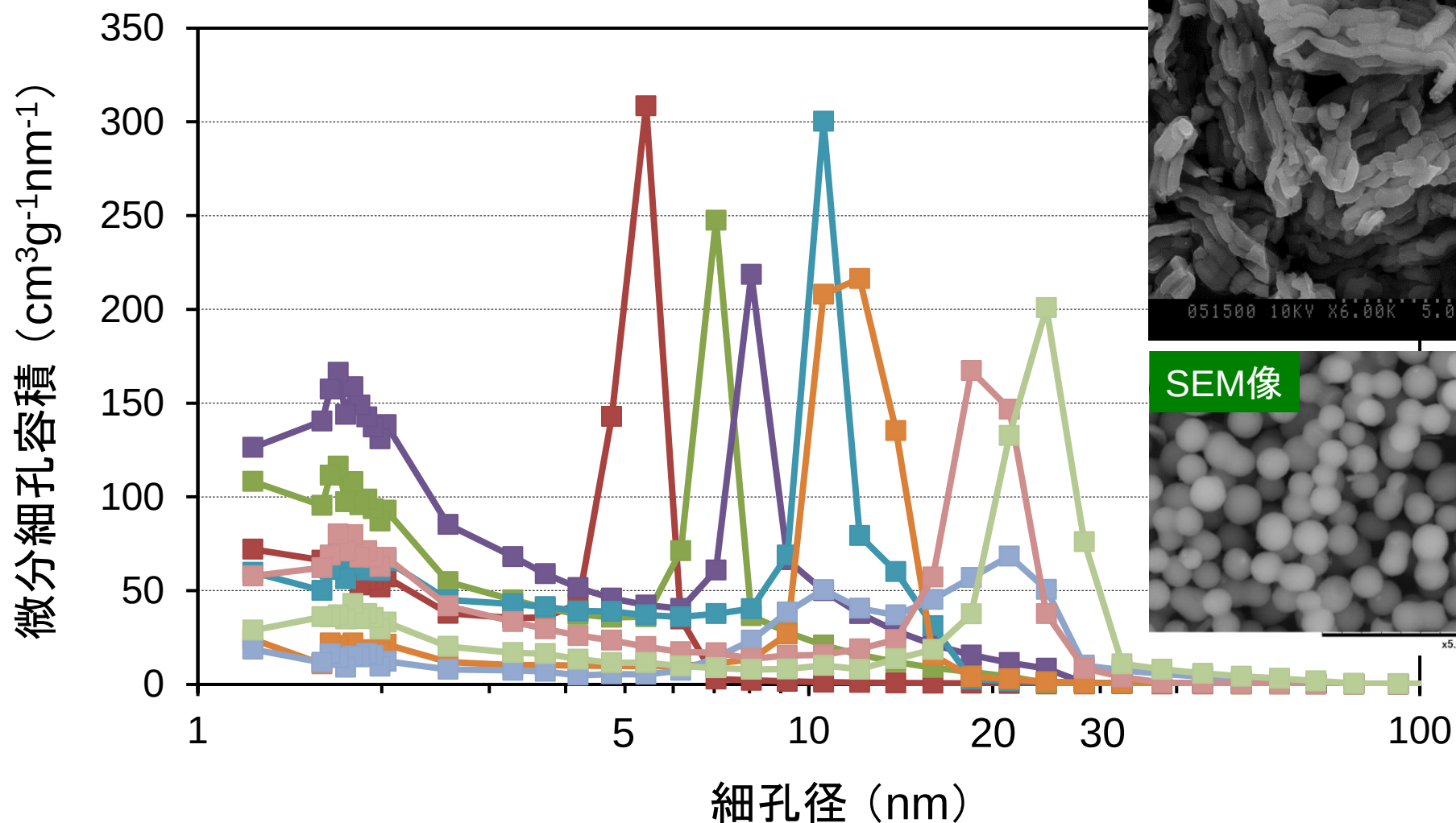


特徴

- ▶ 極めて大きな比表面積 ($\sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$) と細孔容積 ($\sim 2 \text{ cm}^3/\text{g}$)
- ▶ 酵素サイズに合わせた細孔サイズの制御が可能 (2~25 nm)
- ▶ シリカ表面の親疎水性制御による反応の最適化

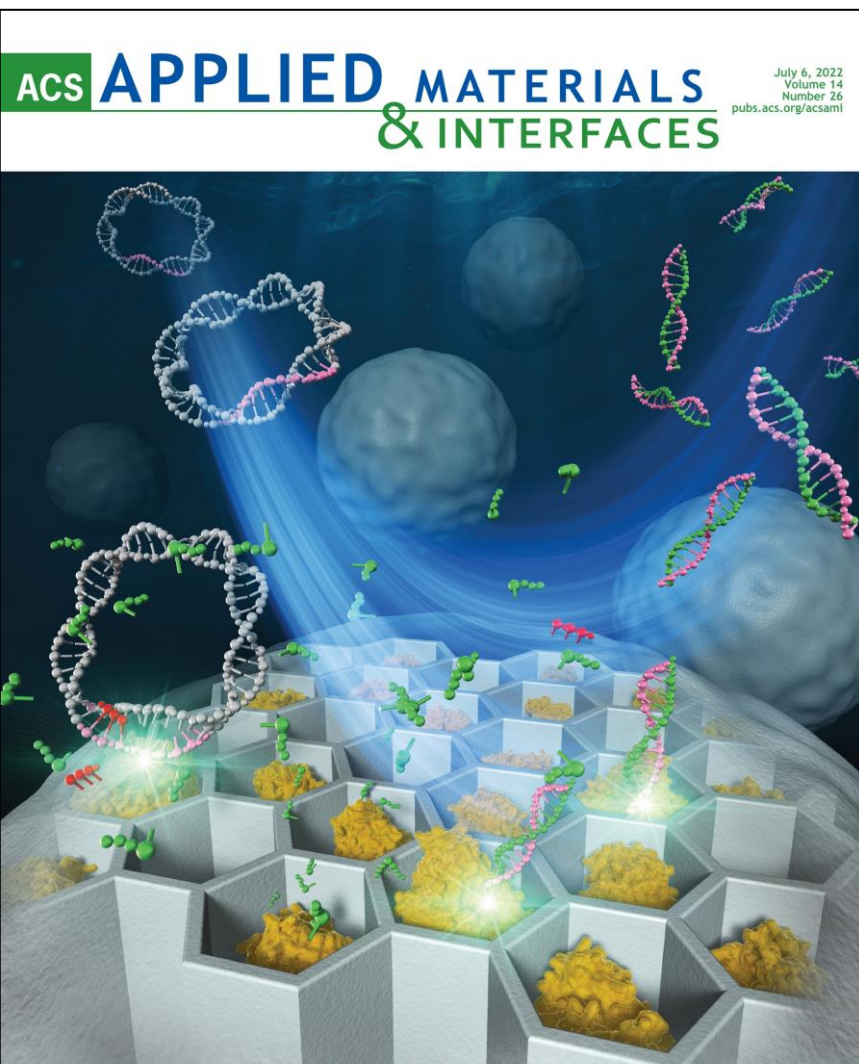
メソポーラスシリカの細孔径制御

細孔径分布



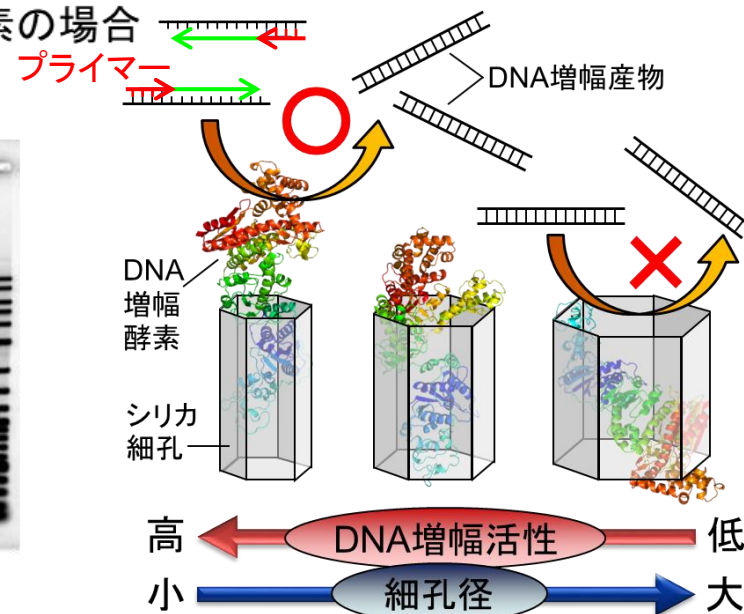
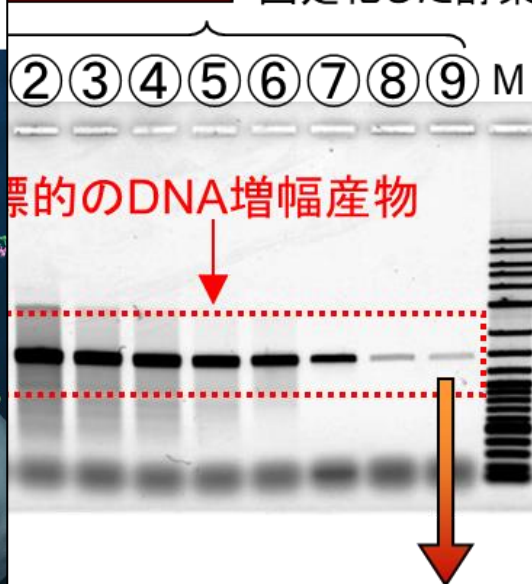
極微量DNAの高感度増幅

Mesoporous Silica-Enhanced PCR (MSE-PCR法)



開発技術

メソポーラスシリカの規則性細孔に
固定化した酵素の場合



従来法では増幅が困難な1分子レベルの
極微量DNAからの選択的かつ高精度の
増幅を実現
特許第6714251号

Matsuura, S. et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14, 26, 29483–29490 (2022)



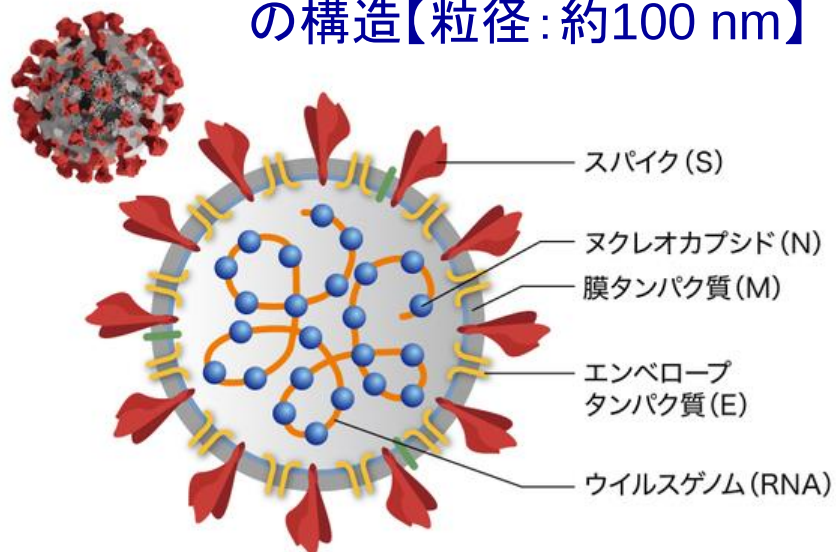
大学共同利用機関法人

情報・システム研究機構 (国立遺伝学研究所 馬場知哉先生)との共同研究

Research Organization of Information and Systems

従来技術とその問題点

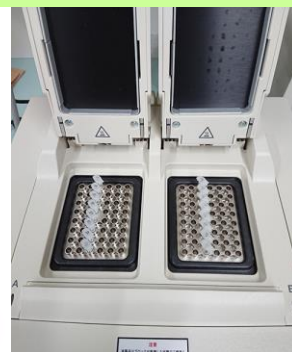
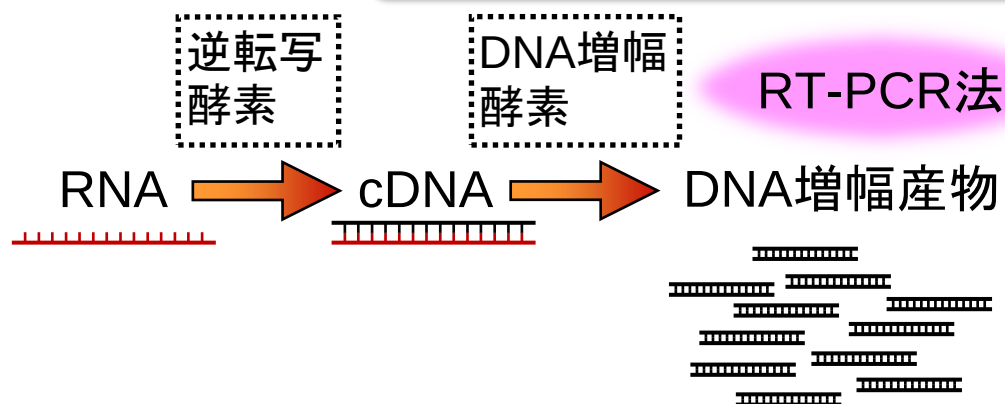
新型コロナウイルス(SARS-CoV-2) の構造【粒径:約100 nm】



▶ **課題:** 新型コロナウイルス感染症の診断において、感染初期の患者からは、極めて微量の検体しか得られないことが多く、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)による検査を行ったとしても偽陰性(または偽陽性)と判定されるケースが頻発している。
(※ 標的RNAが10コピー以下では感度が不十分)

→ より微量の検体に対する高感度かつ高精度なPCR法の確立が急務な状況

【定性PCR】Nested RT-PCR法



定性的

【定量PCR】リアルタイムone-step RT-PCR法



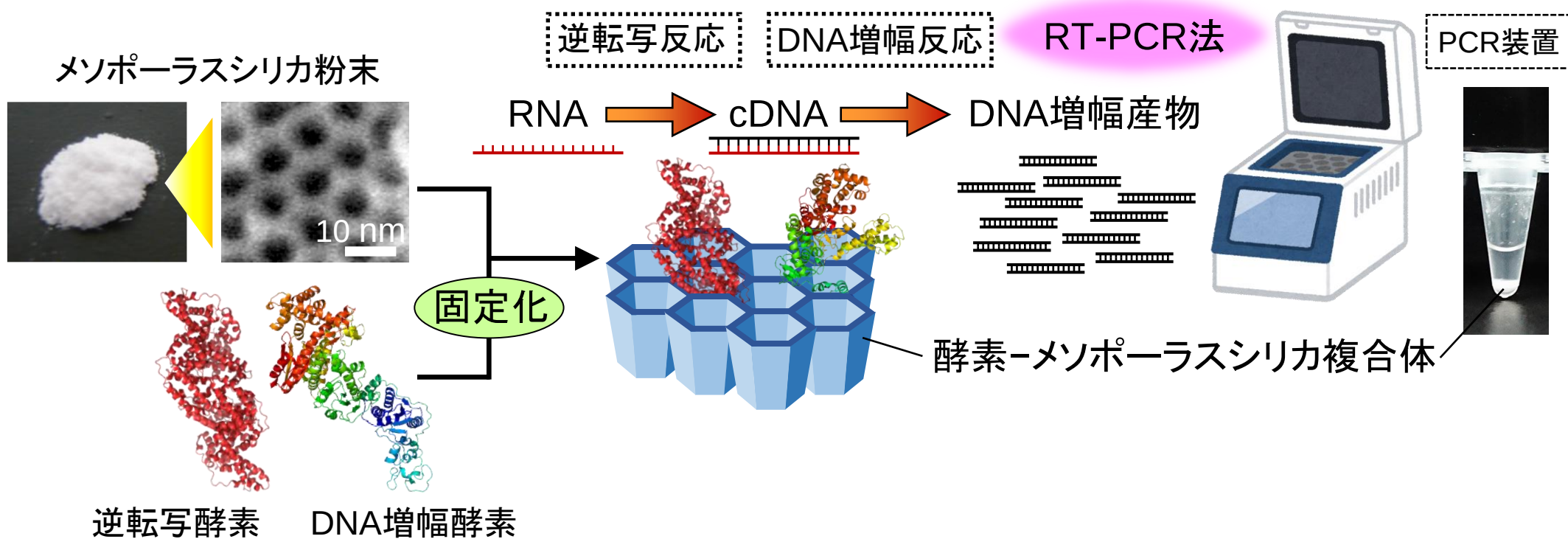
定量的(相対定量)

リアルタイム
PCR装置

新技術の特徴・従来技術との比較

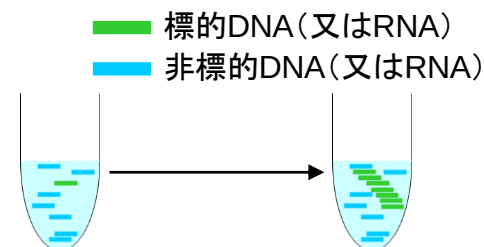
新技術の概要

新型コロナウイルスを対象とした現行のPCR技術では、標的のウイルスRNAが10コピー以下では検出感度が不十分である。本研究では、**メソポーラスシリカの規則性細孔にDNA増幅酵素を固定化し、酵素周辺の反応環境を最適化することによって非特異的DNA増幅(副反応)を抑制し、現行法に対して約100倍の高感度化を達成した。**1分子レベルでの高感度増幅を可能にするため、**現行法では検出が困難であった環境中の希薄なサンプル(下水、空気・エアロゾルなど)からの新興ウイルス感染症の検査、さらには全ゲノム増幅・解析にも応用可能である。**



新技術の特徴・従来技術との比較

定性PCR



ウイルス

RNA抽出

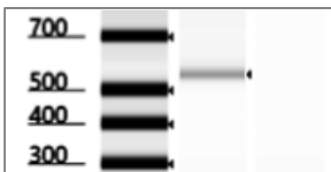
逆転写反応(RT反応)

PCR

DNAサイズ
マーカー (bp)

増幅

あり なし



PCR
コスト

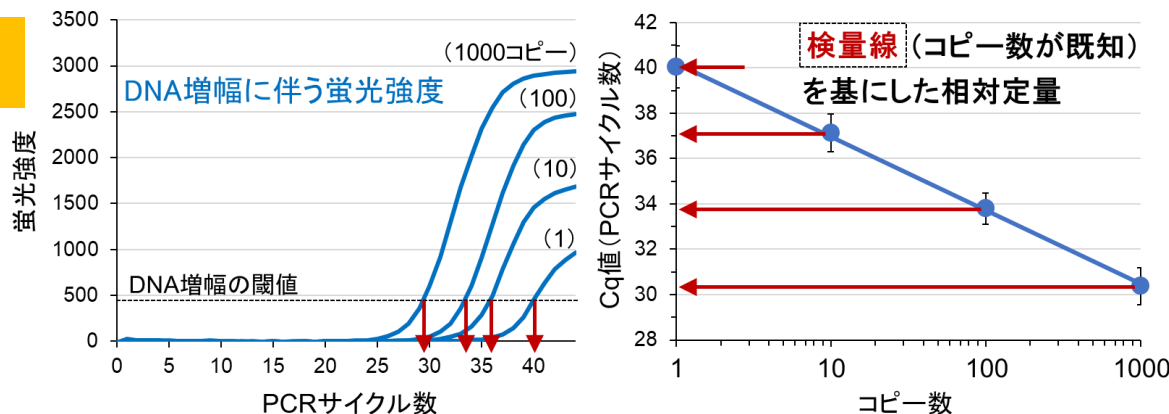
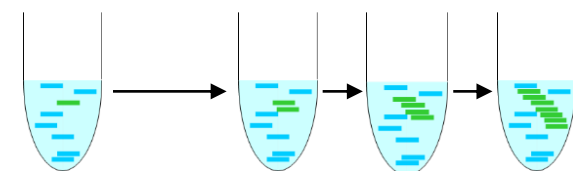
¥300

新技術
の効果

(大) + ¥10

定量PCR【相対定量】

(qPCR, リアルタイムPCR)

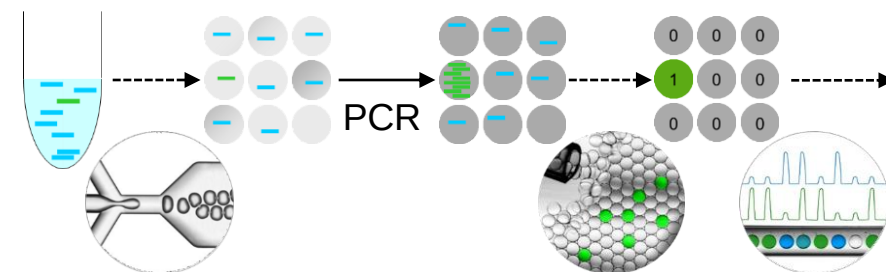


¥500

(中) + ¥10
最適化中

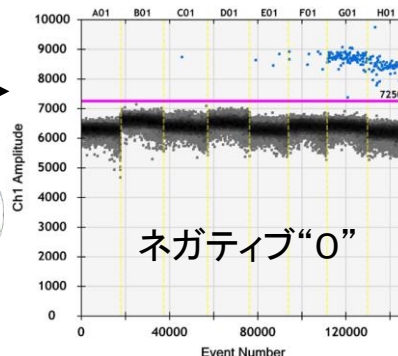
デジタルPCR【絶対定量】

(dPCR)



約20,000個のDroplet
(微小区画)に分割

蛍光の有無より、ポジティブ“1”、
ネガティブ“0”を直接カウント



Droplet Digital PCR
QX200 (Bio-Rad社)

¥1,500

未知数
(要検討)

新技術の特徴・従来技術との比較

	【新技術】 DNA増幅酵素－メソポーラス シリカ複合体			【従来技術】 遊離のDNA増幅酵素 (※1)		
	定性 PCR	定量PCR (qPCR)	デジタルPCR (dPCR)	定性 PCR	定量PCR (qPCR)	デジタルPCR (dPCR)
①感度・精度	◎	◎	(要検討)	△	○	◎
②反応時間	◎	○		△	○	×
③コスト	○	△		○	△	×
④反応安定性	◎	○		○	○	○
⑤保存安定性	◎	○		○	○	○

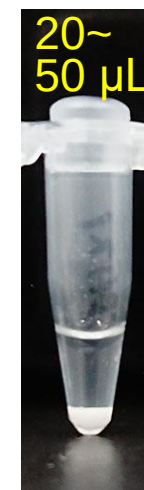
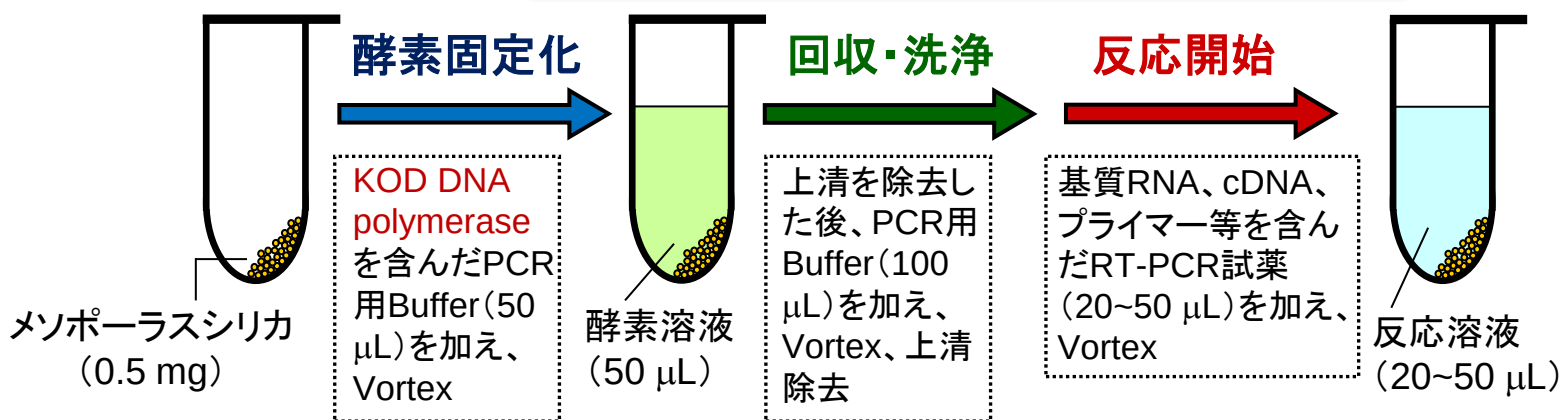
(※1) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル(2019-nCoV Ver.2.9.1)

メソポーラスシリカとDNA増幅酵素の複合化

本提案技術 メソポーラスシリカに固定化したDNA増幅酵素(KOD)をRT-PCRに適用

(実験手順)

簡便な操作により酵素の吸着が可能

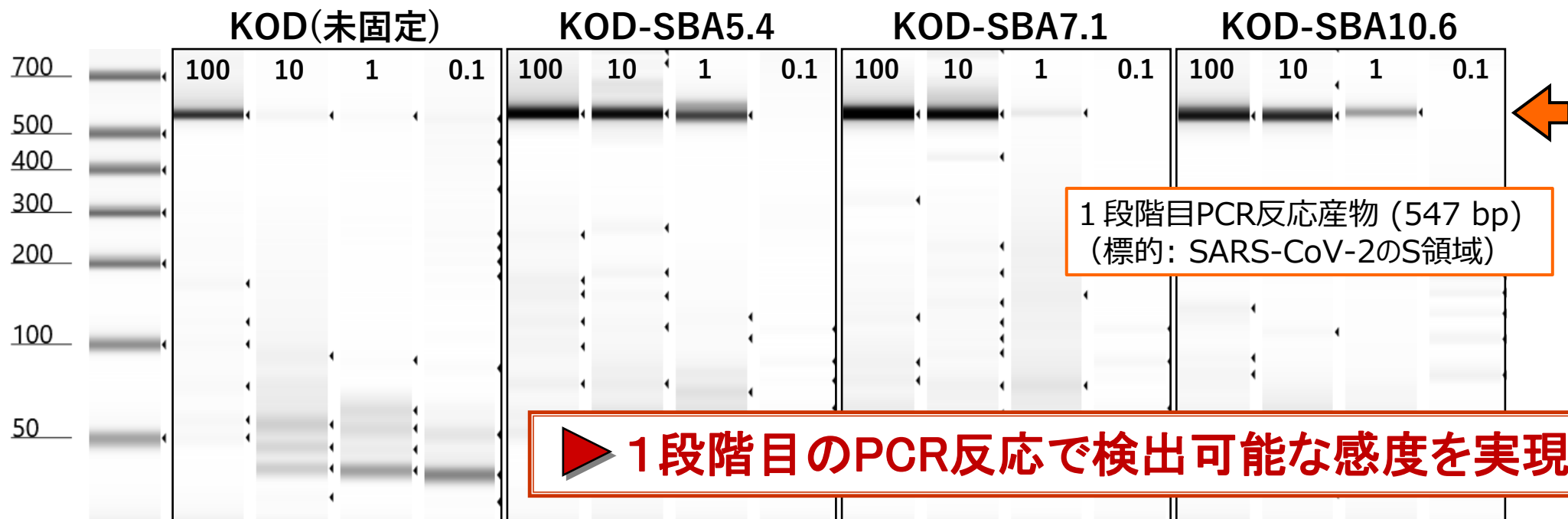


【定性PCR】 Nested RT-PCR法

【定量PCR】 リアルタイムone-step RT-PCR法



定性PCR【標的: S領域】



現行法: 40サイクル、2段階PCR

反応条件

95°C, 1 min

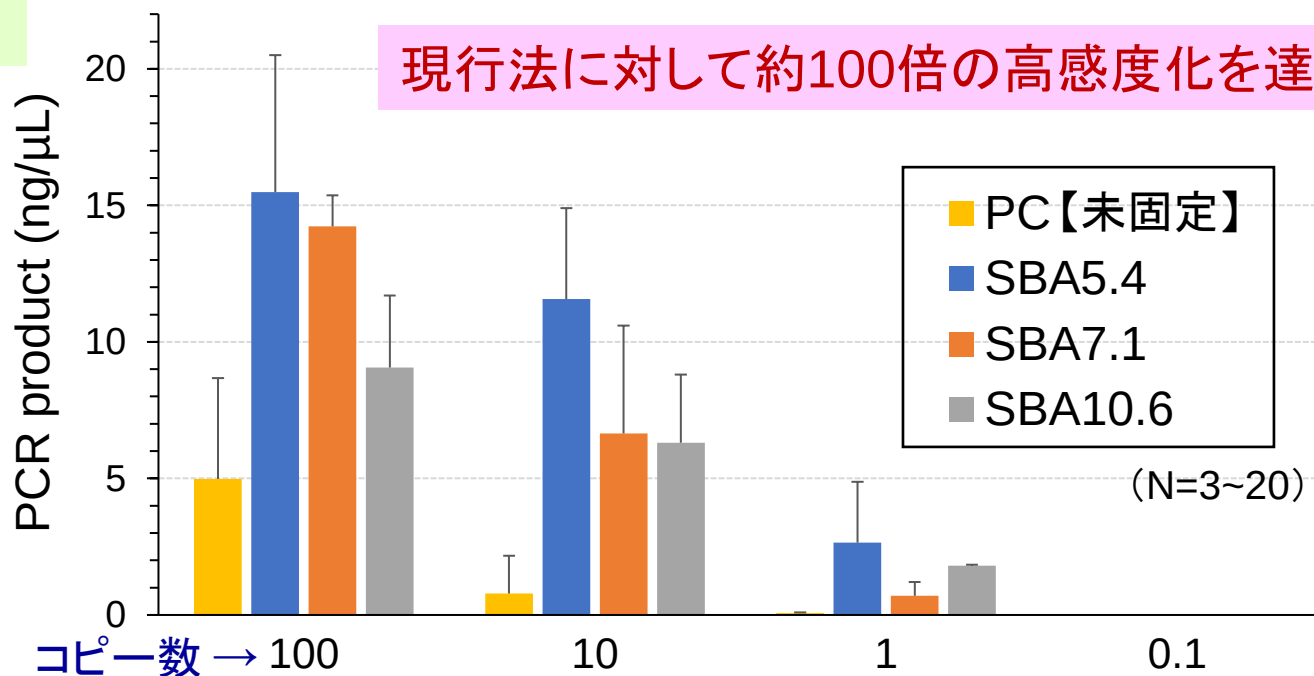
98°C, 15 s
56°C, 30 s
74°C, 30 s

40サイクル

74°C, 1 min

反応時間: 1 h 30 min

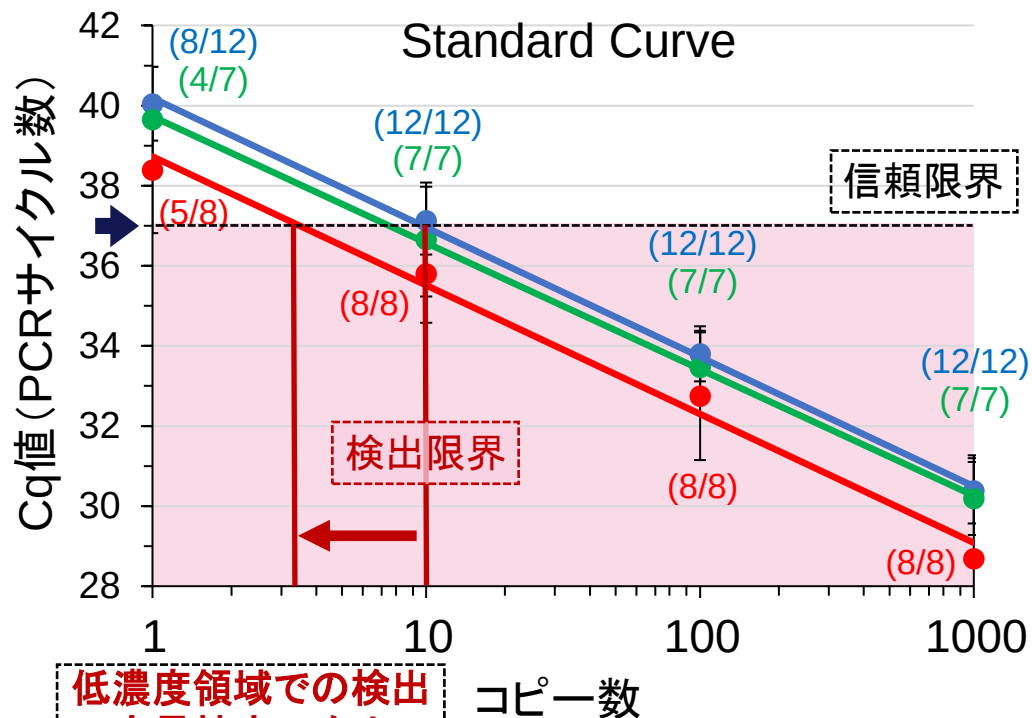
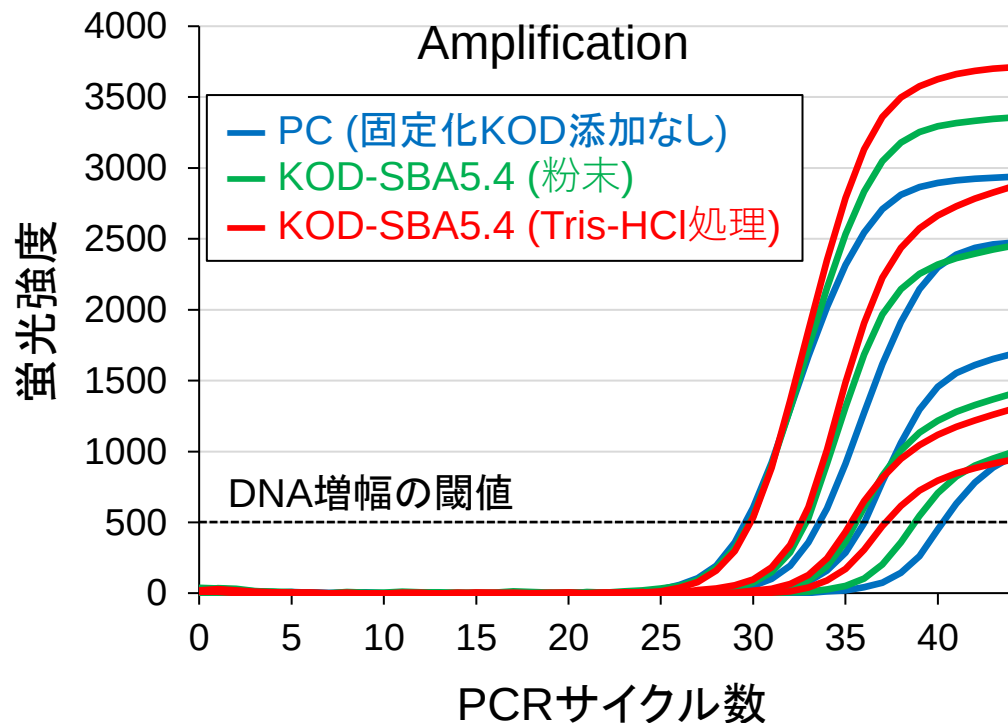
現行法に対して約100倍の高感度化を達成



定量PCR【標的: N領域】

【リアルタイムPCR試薬】Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (Bio-Rad社製)

固定化KOD(100倍希釈)を導入 検量線が平行移動(Cq値が1.5サイクル減少) → 高感度化を示唆



— PC (固定化KOD添加なし) $E=103.8\%$, $R^2=0.9987$, Slope= -3.2334
— KOD-SBA5.4 (粉末) $E=107.3\%$, $R^2=0.9996$, Slope= -3.1578
— KOD-SBA5.4 (Tris-HCl) $E=104.5\%$, $R^2=0.9894$, Slope= -3.2166

【Cq値(平均)】 (N=7~12)

target/コピー数	1	10	100	1000
PC (固定化KOD添加なし)	40.04	37.13	33.80	30.37
KOD-SBA5.4 (粉末)	39.65	36.65	33.46	30.18
KOD-SBA5.4 (Tris-HCl)	38.39	35.80	32.74	28.68

反応条件 50°C, 10 min

↓
95°C, 10 min

↓
95°C, 15 s
60°C, 60 s

45サイクル

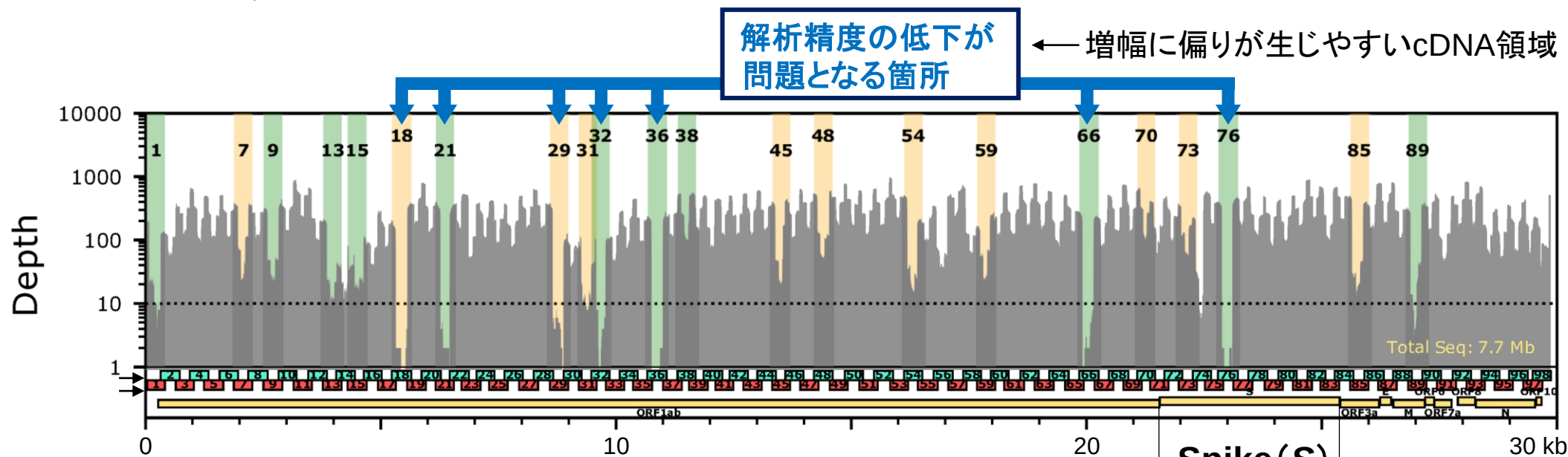
従来技術とその問題点(その2)

▶ SARS-CoV-2ゲノム(29,903 nt)の解析におけるマルチプレックスPCRの増幅の偏りと精度の低下(例)

課題

現行法では、1本のPCRチューブ内で多数のゲノム領域のRT-PCRを行うため、領域によってcDNA増幅に偏りが生じ、ゲノム解析の精度が低下する

→ 精度の高いゲノム解析には、5,000コピー以上のウイルスRNAが必要

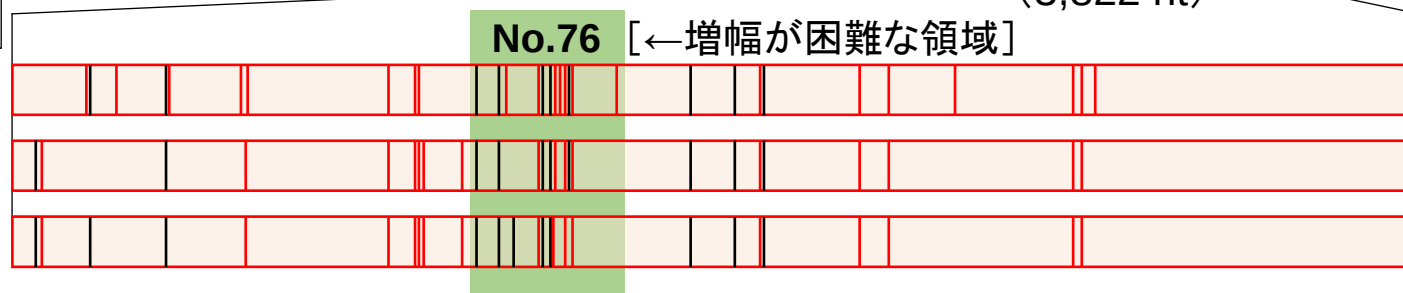


現行法: ゲノム全長を98の領域に分割
49領域を1本のPCRチューブ内で増幅

Omicron BA.1

BA.2

BA.5



Sタンパク質領域のオミクロン系統における新規の変異箇所(実線[赤])と、これまでの系統と共通の変異箇所(実線[黒])

(PLoS One. 2020 Sep 18;15(9):e0239403を一部改変)

長鎖cDNAの高感度増幅検証

SARS-CoV-2ゲノム (29,903 nt)

Delta株, Omicron株の
変異箇所と各標的領域
の位置関係

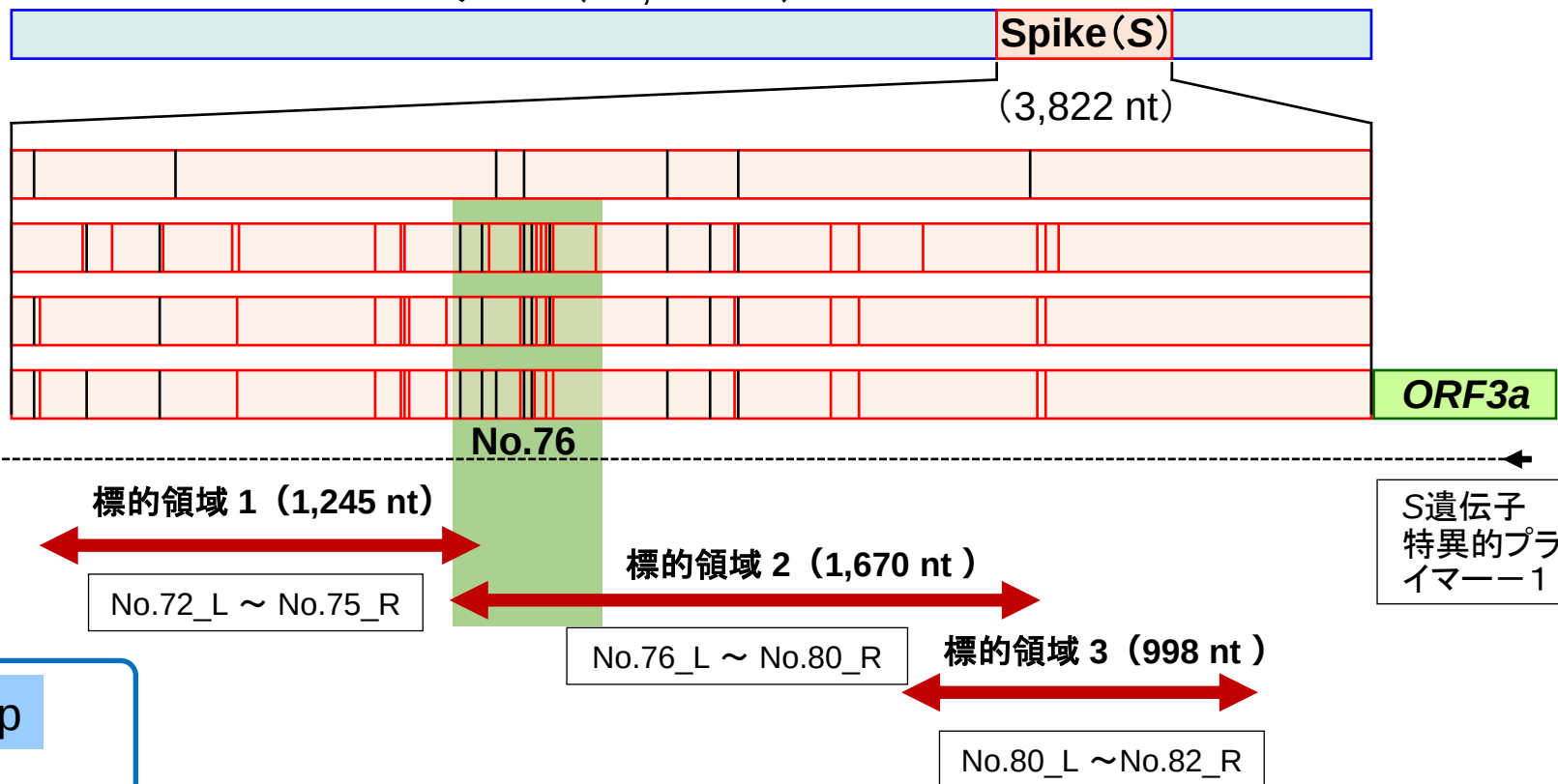
Delta

Omicron BA.1

BA.2

BA.5

cDNA



PCR条件: 2-step

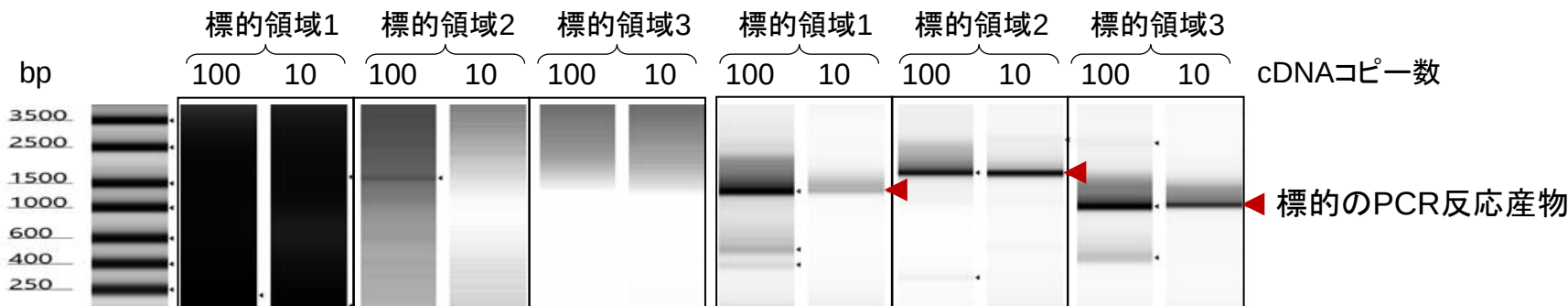
98°C, 30 s

98°C, 15 s
65°C, 90 s

40サイクル

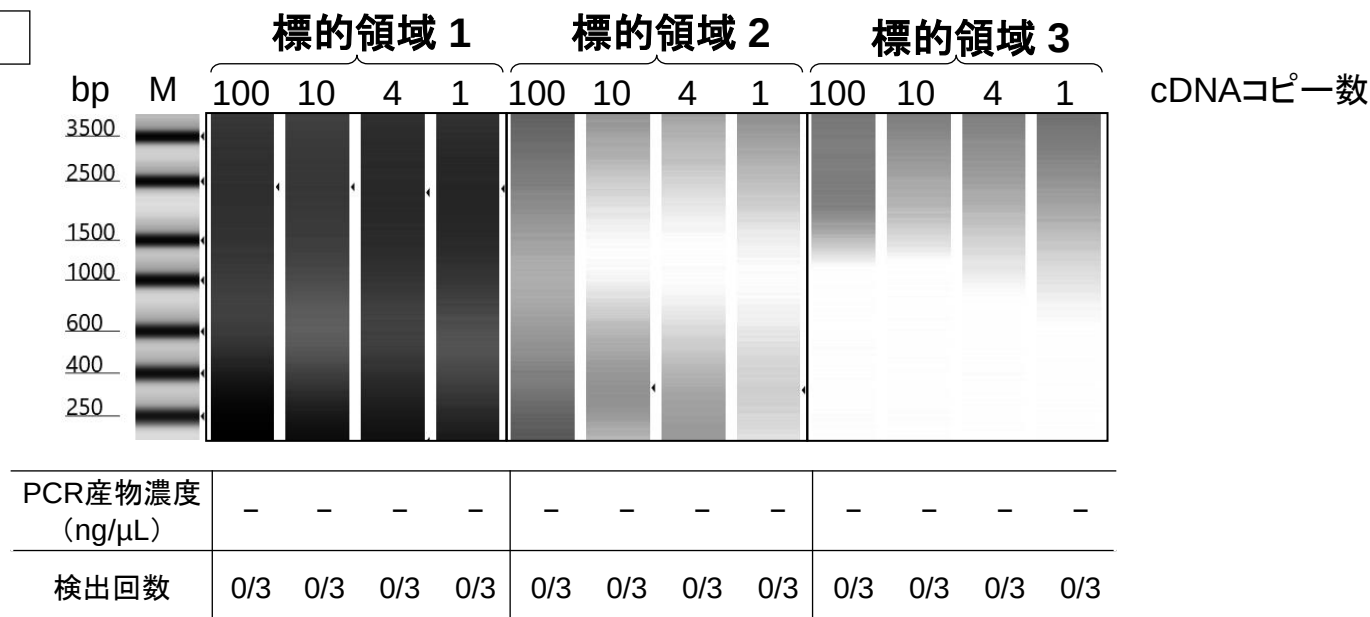
遊離のDNA増幅酵素

DNA増幅酵素-メソポーラスシリカ複合体 (KOD-SBA5.4)

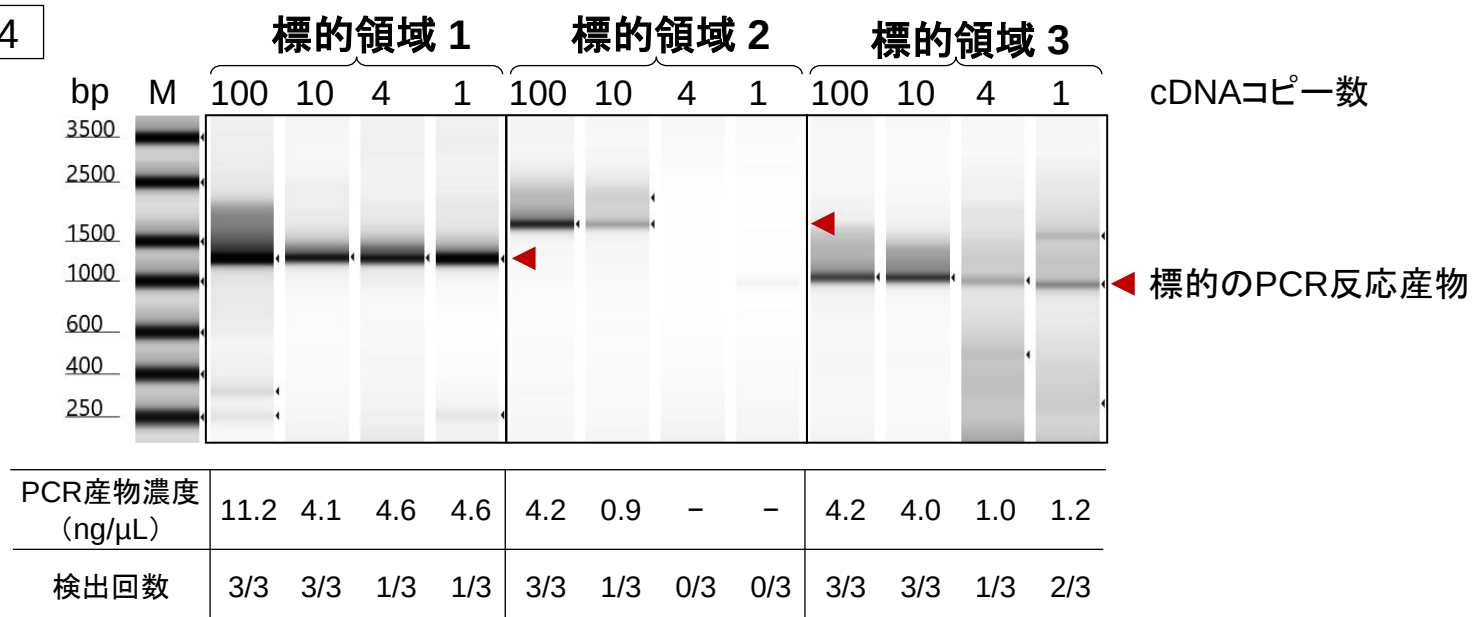


長鎖cDNAの高感度増幅検証

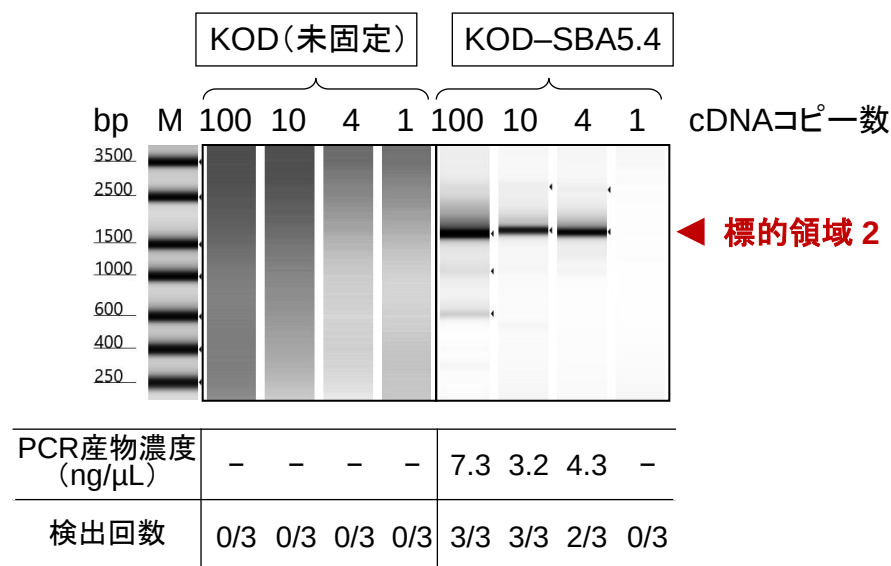
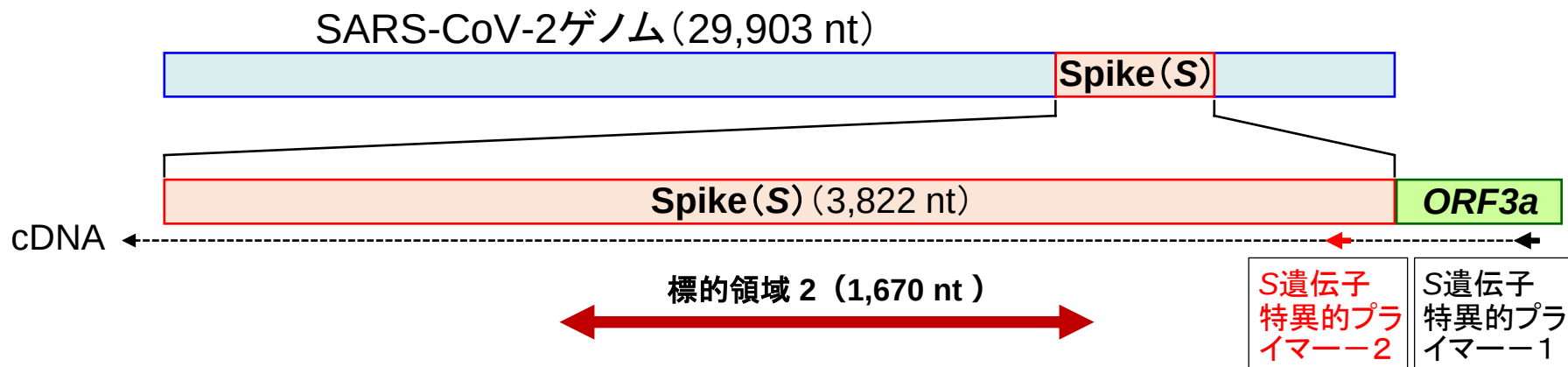
KOD(未固定)



KOD-SBA5.4



長鎖cDNAの高感度増幅検証

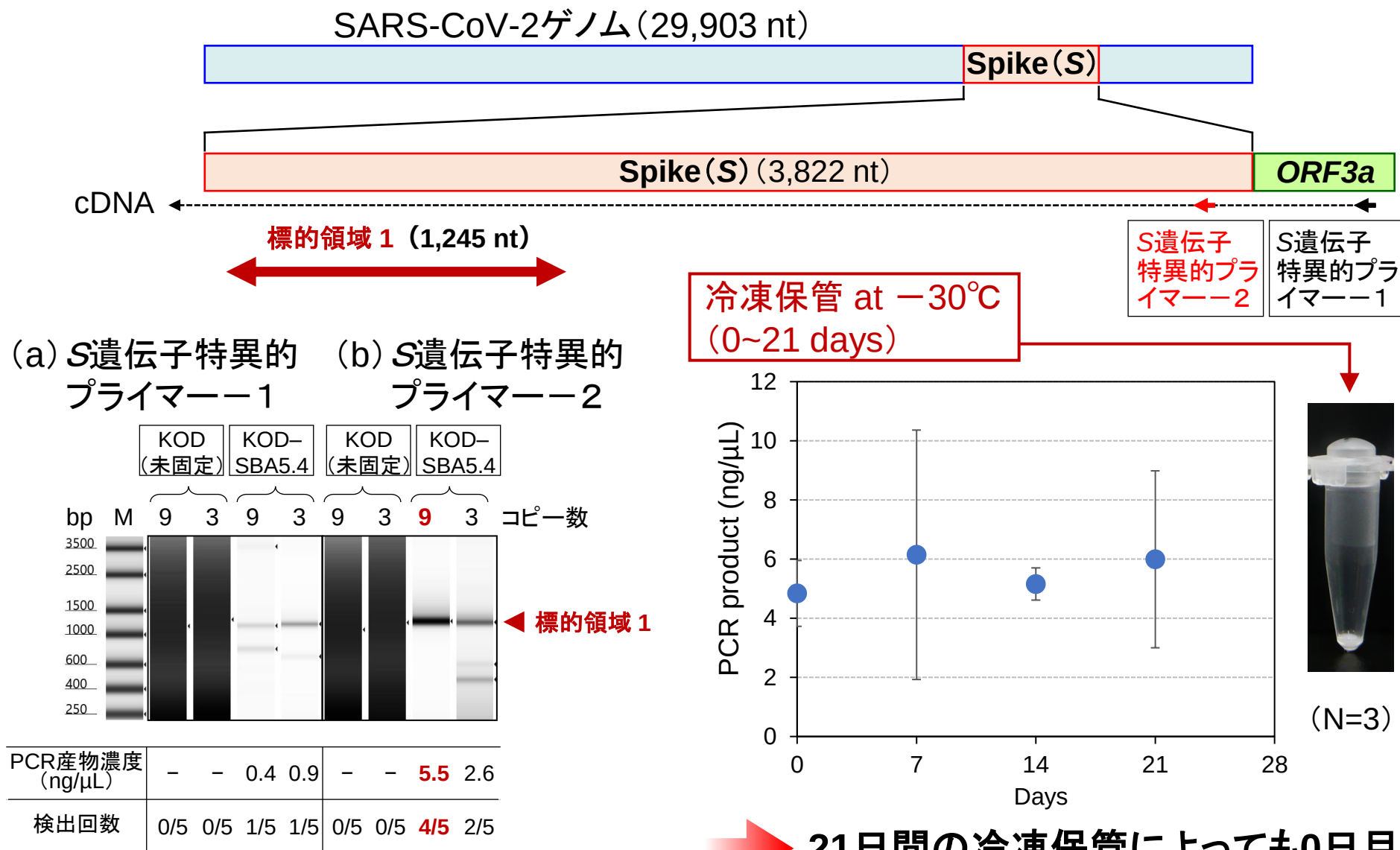


➡ KOD-メソポラスシリカ複合体を用いたMSE-PCR法により
4~100コピー程度の微量cDNAから(感染研法では5,000コピー以上が必要)
1,500 bp以上の長鎖cDNAの増幅に成功

変異が入りやすい領域の影響を最小限にすることが可能

長鎖cDNAの高感度増幅検証

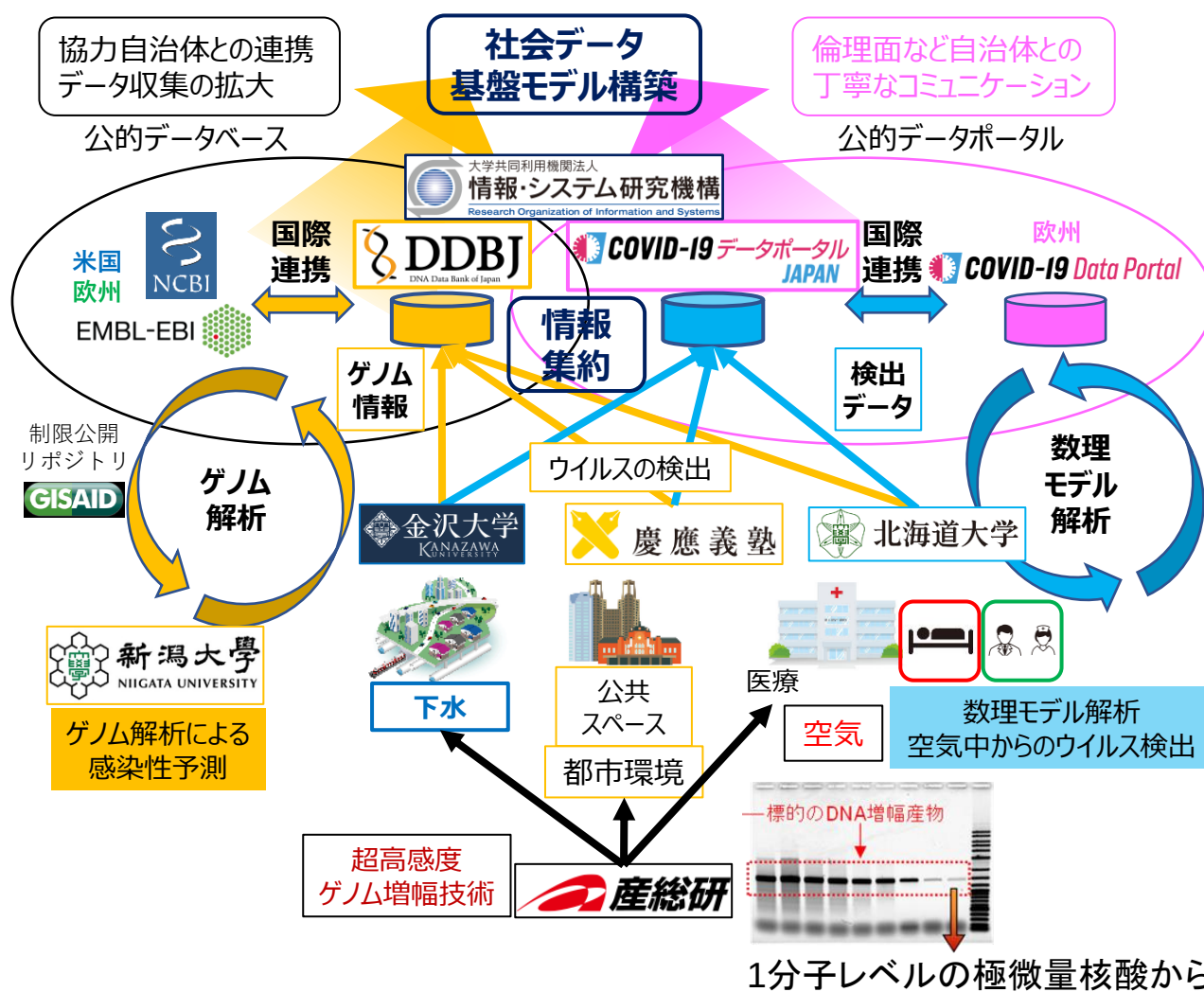
不活化ウイルス(Delta株, 完全長RNA)での検証



21日間の冷凍保管によっても0日目と同等のPCR産物濃度が示された

想定される用途

- ・ 既存のPCR装置を利用した1分子レベルのウイルスRNAからの高感度・高精度PCR増幅検出および検査キット
- ・ マルチプレックスPCR法では増幅が困難な領域での1分子レベルでのPCR増幅および希薄な環境サンプル等のゲノム解析への応用
- ・ 固定化酵素サンプルの常温での長期安定保管・輸送によるフィールドワークでの環境DNA等のPCR検出への活用



CREST

研究領域「コロナ基盤」

超高感度ウイルス計測に基づく感染症対策データ基盤

(研究期間 2021年2月～2024年3月)

研究代表者 有田正規(国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJセンター センター長)

各種の環境サンプルにおけるウイルス検出系の確立

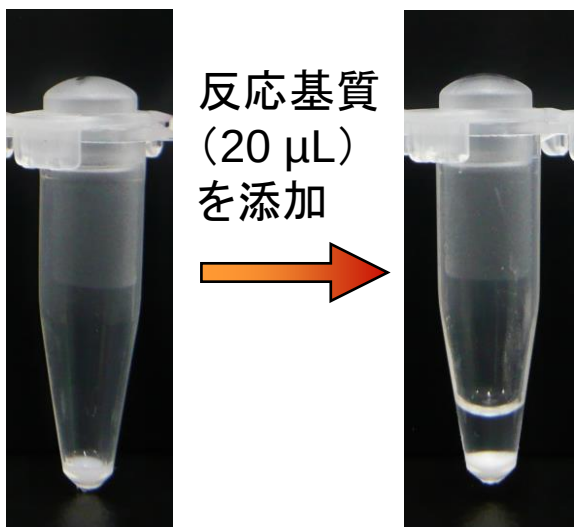
- ・ 下水
- ・ 都市構造物の表面
- ・ 空気・エアロゾル

実用化に向けた課題

社会実装に向けて越えなければならない技術的ハードル

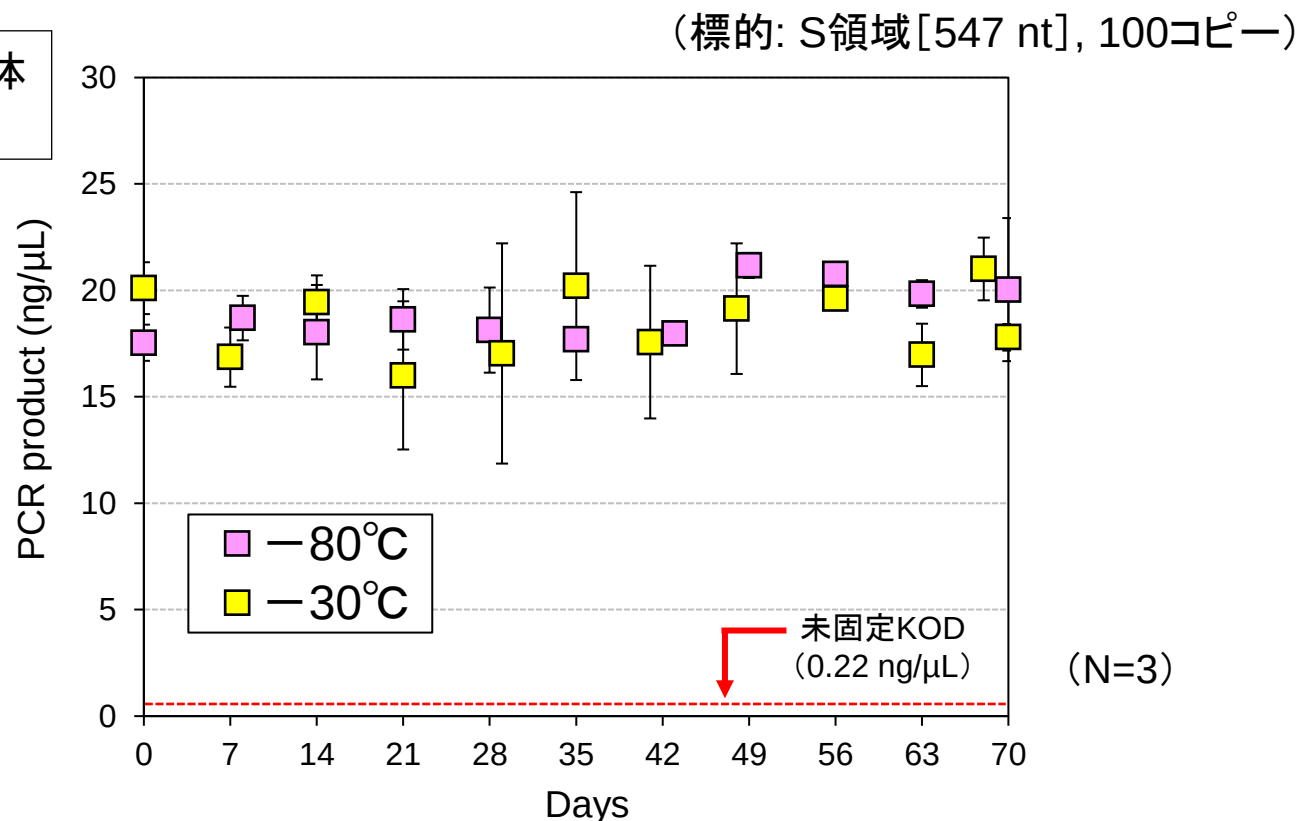
- ◆ PCR阻害物質を含んだ実サンプルでの検証(夾雑物に対する耐性)
- ◆ 冷凍条件下での長期保存安定性(目標: ~6ヶ月)
- ◆ DNA増幅酵素ーメソポーラスシリカ複合体の量産化

DNA増幅酵素(KOD)ーメソポーラスシリカ複合体
(冷凍保管[-30°C 及び -80°C])



液量: 0 μL

液量: 20 μL



➡ KODーメソポーラスシリカ複合体の長期冷凍保存の実行可能性が示唆された。

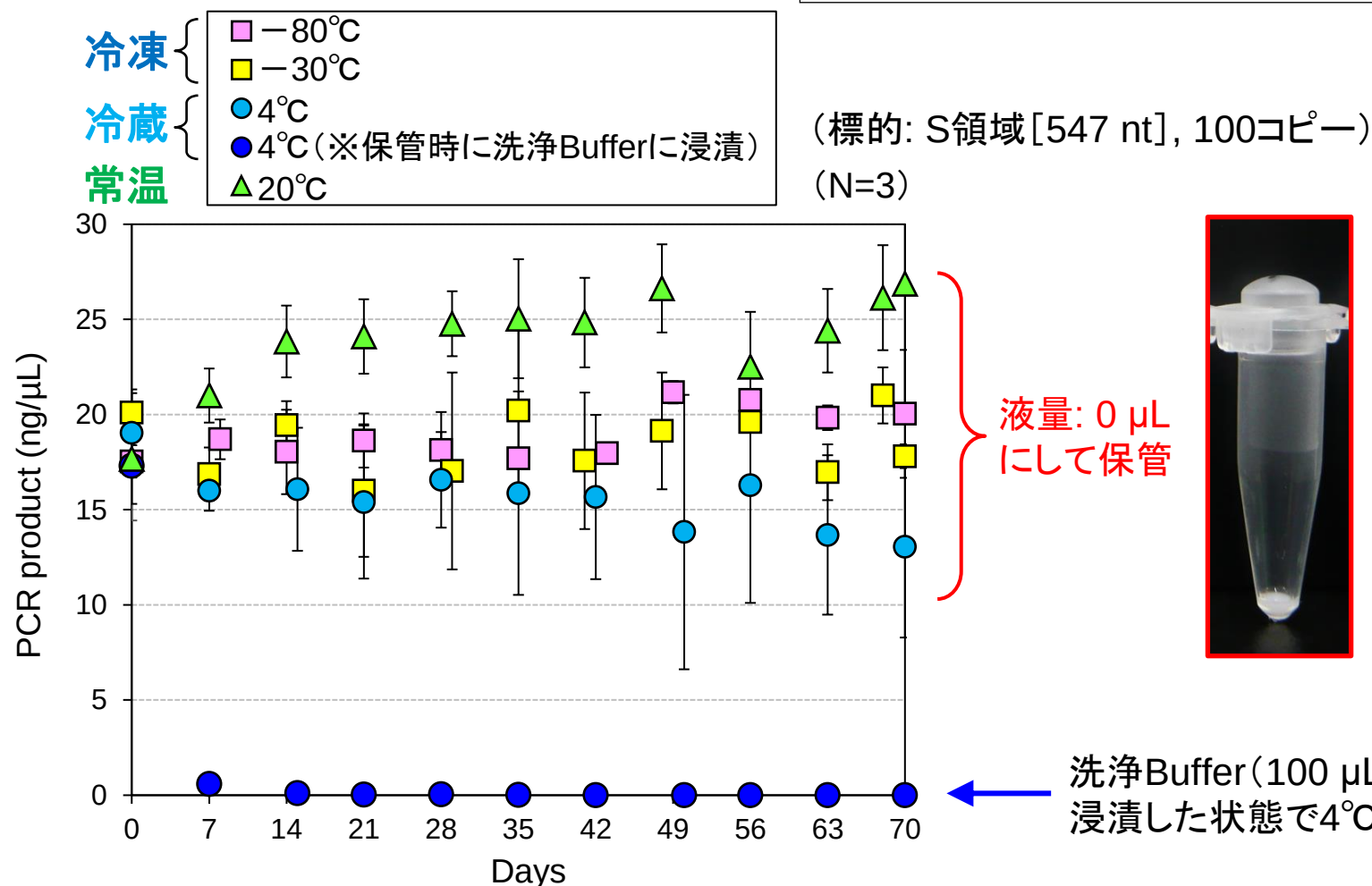
実用化に向けた課題

◆ 冷凍条件下での長期保存安定性



冷蔵・常温条件下で検証

DNA増幅酵素 (KOD) – メソポーラスシリカ複合体
(冷蔵保管[4°C], 常温保管[20°C])



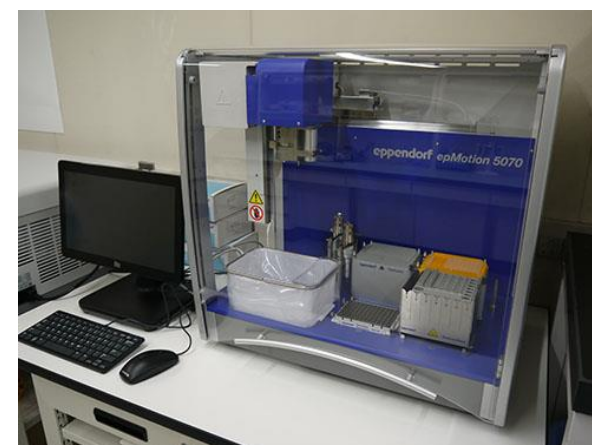
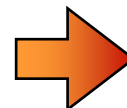
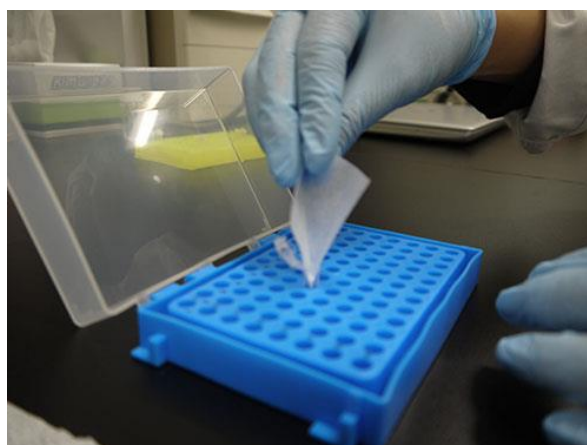
➡ KOD – メソポーラスシリカ複合体の長期冷蔵・常温保存の実行可能性が示唆された。

実用化に向けた課題

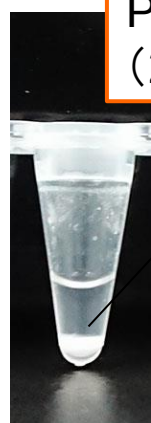
◆ DNA増幅酵素－メソポーラスシリカ複合体の量産化

課題: 微量(0.5 mg)のメソポーラスシリカの取り扱い・秤量が難しい

自動分注システム
の導入



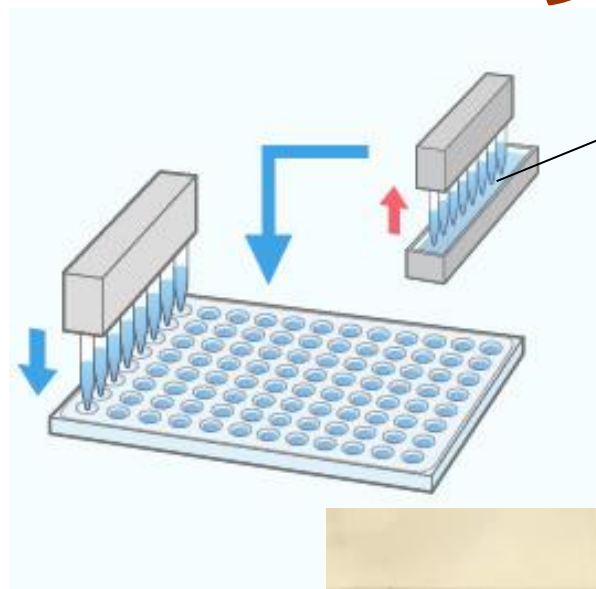
epMotion (エッペンドルフ製)



PCR反応液
(20~50 μ L)

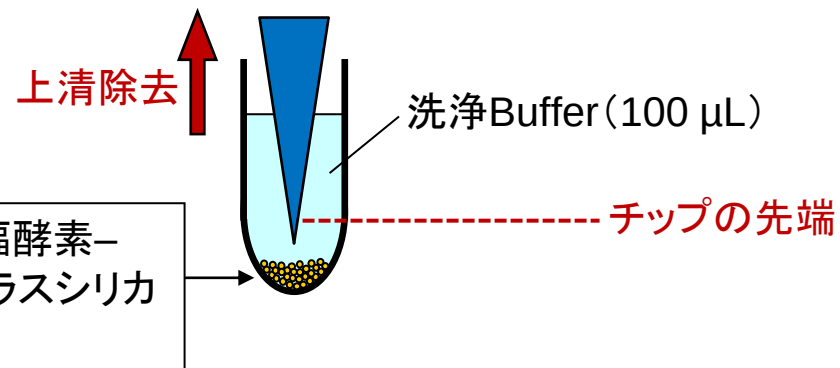
シリカ粉末
(0.5 mg)

実用化に向けた課題



シリカ粉末 (25 mg [50本分])
を含んだ緩衝液 (5 mL)

100 μ L ずつ分注
【0.5 mg / 100 μ L】



(1.5倍速)

企業への期待

新技術の特徴

- ▶ 非特異的DNA増幅(副反応)を抑制することで標的の極微量ウイルスRNAからのPCR増幅検出を実現
- ▶ 既存のPCR装置をそのまま利用可能(高汎用性)
- ▶ 固定化酵素サンプルの冷凍・冷蔵・常温での長期安定保管・輸送も可能



次のようなことが可能な企業パートナーを求めています！

- ① 環境サンプル等を対象としたPCR検出キットの製品化(技術移転)および全ゲノム増幅・解析技術の開発に向けた研究開発パートナー
(DNA増幅酵素－メソポーラスシリカ複合体の量産化、長期保存安定性の評価などに関する技術協力も)
- ② PCR以外の核酸増幅技術、例えば、LAMP法(等温遺伝子増幅法)等による新興ウイルス感染症の高感度検出に向けた研究開発パートナー

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 高感度・高精度RT-PCR法
 - 出願番号 : 特願2022-106718
 - 出願人 : 産業技術総合研究所、情報・システム研究機構
 - 発明者 : 松浦俊一、池田拓史、山口有朋、馬場知哉
-
- 発明の名称 : 極微量核酸の増幅方法
 - 登録番号 : 特許第6714251号
 - 出願人 : 産業技術総合研究所、情報・システム研究機構
 - 発明者 : 松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場知哉

お問い合わせ先

**国立研究開発法人 産業技術総合研究所
東北センター 産学官連携推進室**

TEL 022-237-5218

FAX 022-231-1263

e-mail tohoku-counselors-ml@aist.go.jp