

新型コロナウイルスの迅速核酸検出法の開発

神奈川県衛生研究所は、ダイヤモンド・プリンセス号の感染者検体より新型コロナウイルス3株の分離に成功しました。その遺伝子試料を用いて、理化学研究所は SmartAmp 法、Eprimer 法を用いたウイルス検出のためのプロトコルを作成しました。それを基に神奈川県衛生研究所は、検体を用いて試薬の評価試験を実施しました。本取り組みは、新型コロナウイルス核酸を迅速かつ高感度に検出できる技術として、新型コロナウイルス対策に有効な検出法を提供するものです。

神奈川県衛生研究所(所長:高崎智彦)と国立研究開発法人理化学研究所(理研)(理事長:松本紘)は、神奈川県(知事:黒岩祐治)の支援を受けた委託事業および文部科学省・国立研究開発法人科学技術振興機構の支援により、新型コロナウイルスの迅速核酸検出試薬の開発に成功しました。今回、ダイヤモンド・プリンセス号の感染者検体より分離された新型コロナウイルス3株とそれを用いて開発された迅速核酸検出技術に用いた基本原理について説明します。

1. 新型コロナウイルス株(図1)の分離

2019 新型コロナウイルスは、急性呼吸器疾患(COVID-19)を引き起こすコロナウイルスの一種で SARS 関連コロナウイルスに類され、SARS-CoV-2(英: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)と命名されています(図2)。

今回、神奈川県衛生研究所はダイヤモンド・プリンセス号の新型コロナウイルス感染者の検体を培養細胞(Vero 細胞)に接種し、増殖してきたウイルスを培養上清から回収することで、独立した3株を分離しました。これらの独立3株より精製した RNA のうち2株(SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020、SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027)の全ゲノム解析を行い、GENBANK に登録しました。このデータは、迅速核酸検出システムの標的配列の開発に役立ちました。

2. SmartAmp 法(図3)

SmartAmp 法は、理研が開発した、PCR に変わる DNA 増幅技術で、一定の温度で増幅反応が進行する「等温核酸増幅法」の一つです(特許出願番号 2005-516642, 2015-10814)。

SmartAmp 法の特長は、従来の PCR 法と比較すると、①等温増幅(PCR のようにサーマルサイクルではないため、温度コントロールに大量のエネルギーを必要とせず、機器の小型化に最適)、②高速検出(10-30 分)、③増幅の検出で陽性判定できるのでデータ解析がシンプル、④PCR より高い検出特異性、⑤高感度(PCR 法と同等以上)、などの特長を持ちます。

図4と図5は、増幅したいターゲットの鋳型 DNA に対してプライミングする複数の特徴的なプライマー群(ターンバックプライマー(TP)、フォールディングプライマー(FP)、アウトプライマー(OP)、および2種類のブーストプライマー(BP))と、鎖置換活性を有する

DNA ポリメラーゼによる触媒反応によって、アンプリコンが連結された増幅物を生ずる連続的な核酸伸長反応が等温条件下の反応液内で進行する SmartAmp 法の原理を示している。そのため、SmartAmp 法は 10~30 分程度の反応時間により核酸増幅がプラトーに達する迅速性を有しています。

3. Exciton primer (Eprimer) (図6、図7)

SmartAmp 法の増幅物を可視化する 1 つの手段として、増幅物を蛍光標識する方法があります。この場合、増幅していないときには積極的に消光して非特異的バックグラウンドを下げ、増幅した時に蛍光を出す標識法が望まれます。理研では、増幅の有無を可視化できる蛍光標識プローブ「Eprimer/Eprobe」(特許出願番号 2008-035325, 2009-504009, 2013-558854, 2014-534372)を開発し、SmartAmp 法と組み合わせた高感度迅速核酸増幅システム系を確立しました。図6に示すように、Eprimer/Eprobe は、従来市販されている末端標識型蛍光プローブとは異なり、核酸の 2 重らせん構造で生じる塩基対へのインターカレート能(溝に入り込むこと)を有する蛍光色素(チアゾールオレンジ等)が、2 つ同一塩基に架橋された蛍光オリゴヌクレオチドです。Eprimer が一本鎖状態で存在する場合において、架橋された2つの同一色素は、チアゾール環側面のπ軌道上での相互作用に伴い、励起光の照射を受けた場合にも消光効果を生じ蛍光を発生しません。また、Eprimer が標的核酸にハイブリダイゼーションし、2本鎖状態で存在する場合には、二重鎖 DNA に2つの蛍光色素がインターカレーションし、蛍光色素同士が離れるために、消光状態が解かれ、蛍光を発生し始めます。

図7-a と図7-b に示すように、Eprimer は、非特異的バックグラウンドを抑えるメカニズムにより、標的配列特異的なシグナルが得られ、さらにそのシグナルは目視でも判定可能です。また、反応量が定量的に見え(図7-c)、様々な波長(4 色)の色素を作成することに成功しました(図7-d)。

4. 今後の展開

本研究開発は、平成 28 年度から神奈川県衛生研究所と理化学研究所予防医療・診断技術開発プログラムによる外来感染症の防疫に資する技術開発研究を神奈川県の支援により推進してきた成果です(*1)。また、その取組を推進するため、神奈川県は「世界に誇る地域発研究開発・実証拠点(リサーチコンプレックス)推進プログラム」(文部科学省・国立研究開発法人科学技術振興機構)の追加予算を配分いただくこととなり、神奈川県衛生研究所にて本技術の実証研究を推進して参ります。

(*1)平成 28,29 年度は、県の「先進異分野融合プロジェクト」、平成 30,31 年度は、「世界に誇る地域発研究開発・実証拠点(リサーチコンプレックス)推進プログラム」(文部科学省・国立研究開発法人科学技術振興機構)の一環として実施。

※注意点

今回公表した研究成果は、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づく体外診断用医薬品等の承認を現時点では得ておりません。あくまでも研究(実証研究)段階のものとなりますので、同法に抵触するような取扱や広報は避ける必要があることから、その点につきましてご配慮のほど、よろしくお願い致します。

問合せ先

神奈川県衛生研究所 所長 高崎智彦

Tel: 0467-83-4400

Email: fm1540.kikaku@pref.kanagawa.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 048-467-9272 / Fax: 048-462-4715

Email: ex-press@riken.jp