

●自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80 の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 システム G 伊澤 祐一

1. はじめに

遺伝子検査は、迅速性と高感度を両立し得る検査方法である。弊社で開発した TRC 法¹⁾は、一定温度で RNA を複写増幅する「転写逆転写協奏法 (TRC 反応: Transcription - Reverse transcription Concerted reaction)」と標的核酸に特異的に相補結合することで蛍光増感する INAF (INtercalation Activating Fluorescence probe) プロブを組み合わせた方法であり、標的 RNA の増幅と検出を 1 本のチューブ内で 30 分以内に実施することができる。TRC 法を用いた従来の弊社検査試薬 (結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCRapid[®] M.TB²⁾、MAC rRNA 検出試薬 TRCRapid[®] MAC、等) は迅速性と高感度において一定の評価を得たが、核酸精製や試薬の分注など測定開始までの操作 (用手法) が煩雑である、多項目同時測定に対応していない、などの課題があった。今回、上記課題を克服するために開発された新形態の遺伝子検査試薬に対応する自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80 (図 1) を開発したので報告する。

2. 開発の目的

以下の試薬に対応する装置を開発し、簡便性・迅速性・2 項目同時測定を実現する。



図 1 TRCReady[®]-80 外観

画像は本体と PC (プリンターも別途含まれる)

【TRCR[®] 核酸精製キット】

- ・個別包装 (カートリッジ形態。試薬調製は不要)
- ・核酸吸着方式 (吸引吐出洗浄により検体由来の夾雑物を除去した後に核酸吸着フィルターから核酸を溶出する。操作が単純で自動化が容易である)

【TRCReady[®] 検出試薬】

- ・専用チューブに個別充填済み (試薬調製は不要)
- ・最大 3 種類の蛍光 (2 項目同時測定用 + 内部コントロール用) を発する。
- ・反応速度と特異性向上のため、反応温度は 46°C に変更された。

[1] 簡便性 (自動化)

ユーザーが検体または前処理済み検体を変性試薬に混合した後、核酸精製カートリッジと検出試薬を装置にセットして測定開始を指示すると、①核酸精製工程 (検体由来の夾雑物を除去して精製核酸を得る工程) と、②検出工程 (核酸増幅および反応液の蛍光強度測定を実施する工程) を自動で処理するように設計する (図 2)。

[2] 迅速性

反応温度の変更 (43°C から 46°C) に対応する。また、試薬類の吸引吐出時間を短縮するために、8 連シリンジを用いて 8 テスト同時に吸引吐出を行うように設計する。

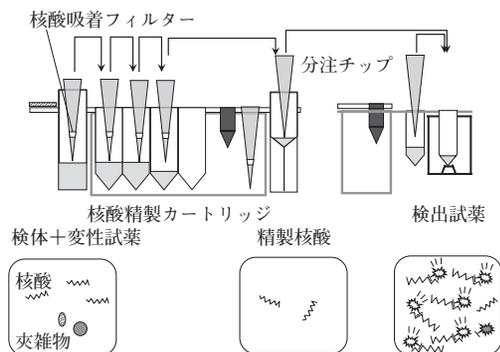


図 2 自動化工程

[3] 2項目同時測定

標的核酸2項目と核酸増幅反応不良を示す内部コントロールを測定する。

3. 主な仕様

主な仕様と従来の装置 (TRCRapid[®]-160、TRCRapid[®]-480) との比較を表1、本体機構を図3に示す。

[1] 装置構成

- ・本体 (TRCReady[®]-80)
- ・コントローラーセット (デスクトップ PC 一式、プリンター)

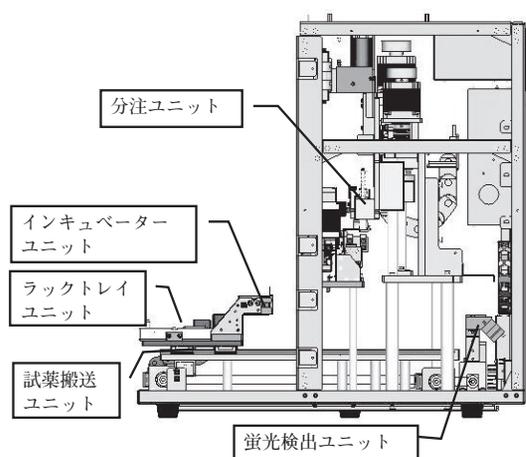


図3 本体機構 (右側画像。筐体カバー非表示)

[2] 本体寸法と質量

中小規模の病院検査室にも導入しやすいように考慮して設計した。特に幅寸法は従来装置 TRCRapid[®]-160 と同じにした (350 mm)。また、大人2名で持ち上げられる質量 (47 kg) に抑えた。

[3] 処理能力

8テスト/バッチ (約40分) × 最大6バッチ/日 (最大48テスト/日) 対応とした。

[4] 簡便性 (自動化)

自動処理のために、試薬類を吸引吐出する分注機構を追加した。下記の分注精度を達成し、核酸精製工程と検出工程の自動化を実現した。

分注精度：n = 8 ポジションにおいて、
分注量平均値 ± 3SD ≤ 目標値 ± 10%

[5] 迅速性

上記対応の結果、核酸精製から結果報告まで約40分を実現した (図4)。

[6] 2項目同時測定対応

検出器は3波長励起光、3蛍光検出の構成とした。

なお、開発当初、散乱した励起光 (ブランク) を大量に検出してしまい、高感度測定に支障を生じたが、光学系の見直しにより SN 比を実用的なレベルまで向上させた。改善例として、光学系の構造を図5、ブランクの測定結果を表2に示す。光路に凹凸を設けると

表1 主な仕様

	TRCReady [®] -80	(従来装置)	
		TRCRapid [®] -160	TRCRapid [®] -480
測定原理	TRC 法		
対応試薬 (精製)	TRCR [®] 核酸精製キット	市販キット (用手法)	同左
対応試薬 (検出)	TRCReady [®] 検出試薬	TRCRapid [®] 検出試薬	同左
処理能力	8テスト/バッチ	16テスト/バッチ	48テスト/バッチ
標準所要時間*1	約40分間	約60分間*2	約60分間*2 (16テスト/バッチ時)
本体寸法 (W×D×H)	350×600×600mm	350×320×240mm	690×580×560mm
質量	47kg	17kg	70kg
反応温度	標準設定 46°C	標準設定 43°C	標準設定 43°C
分注機能 (分注機構)	分注量 15~200 μL (8連シリンジ)	無し	分注量 5 μL (単一シリンジ)
蛍光測定	3波長励起、3波長蛍光検出 (標的用×2、内部コントロール用×1)	1波長励起、2波長蛍光検出 (標的用×1、内部コントロール用×1)	1波長励起、2波長蛍光検出 (標的用×1、内部コントロール用×1)

*1、核酸精製から結果報告までの所要時間。

*2、市販核酸抽出キット (用手法) を用いた核酸精製の所要時間を含む。

ともに、チューブ付近に低反射率の部材を用いて、散乱した励起光（ブランク）の成分のみを低減した。

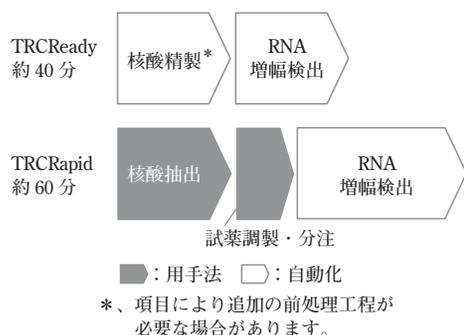


図4 所要時間の短縮

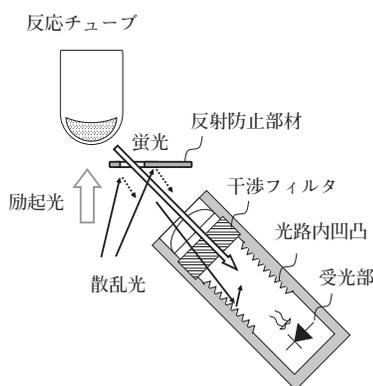


図5 光学系の構造図

表2 ブランク測定結果

項目	改善前	改善後
評価用試薬 (A)	7573	6376
ブランク (B)	4642	2400
SN比 (A / B)	1.63	2.66

※n=8の測定値の平均

※A-Bが蛍光の成分、Bが散乱した励起光の成分に相当する。

4. 測定性能

[1] 最小検出感度

「結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCReady® MTB」(以下、MTB 試薬)と「MAC rRNA 検出試薬 TRCReady® MAC」(非結核性抗酸菌症の起因菌として最も多い *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* の RNA の 2 項目同時検出が可能な試薬。以下、MAC 試薬)各 3 ロットを用いて、合成 RNA を 6 重測定した。その結果、結核菌群 RNA 300 分子、*M.avium* RNA 1000 分子および *M.intracellulare* RNA 1000 分子の検出率はそれぞれ 100% (6/6) であり (表 3 ~ 5)、弊

表3 結核菌群 RNA の検出率 (MTB 試薬)

RNA [分子]	試薬ロット		
	No.1	No.2	No.3
300	100%	100%	100%
0	0%	0%	0%

表4 *M.avium* RNA の検出率 (MAC 試薬)

RNA [分子]	試薬ロット		
	No.1	No.2	No.3
1000	100%	100%	100%
0	0%	0%	0%

表5 *M.intracellulare* RNA の検出率 (MAC 試薬)

RNA [分子]	試薬ロット		
	No.1	No.2	No.3
1000	100%	100%	100%
0	0%	0%	0%

社従来試薬と同等の最小検出感度を達成していることを確認した。

[2] 既承認品との相関性

臨床検体を用いて MTB 試薬、MAC 試薬と既存の他社検査キット (リアルタイム PCR 法キット) との相関性を評価した。

(1) 結核菌群

体液 137 検体 (喀痰 94、胸水 20、胃液 14、尿 2、腹水 3、耳漏 3、血液 1)、組織 2 検体、気管支洗浄液 1 検体、培養液 16 検体を用いて実施した結果、全体一致率は 96.8% (151/156) であった (表 6)。

他社キットと一致しなかった検体 5 例は、他の検査結果からいずれも菌量が少ない陽性検体と考えられた。菌量が少ない検体を分割して試料とする場合、菌の偏在の影響が大きく、同一検体の検査結果が異なることがある。上記 5 例の不一致も菌の偏在が一因と推測する。

表6 相関性 (結核菌群検査)

		他社キット	
		陽性	陰性
MTB 試薬	陽性	49	3
	陰性	2	102

全体一致率 96.8% (151/156)

(2) *M.avium* および *M.intracellulare*

喀痰 112 検体を用いて実施した結果、*M.avium* の全体一致率は 100% (112/112)、*M.intracellulare* の全体一致率は 98.2% (110/112) であった (表 7、8)。

他社キットと一致しなかった検体 2 例は、他の検査や検討結果から菌量が少ない陽性検体であった可能性が示唆されており、菌の偏在が影響して一致しなかった可能性があるかと推測する。

表 7 相関性 (*M.avium* 検査)

		他社キット	
		陽性	陰性
MAC 試薬	陽性	33	0
	陰性	0	79

全体一致率 100% (112/112)

表 8 相関性 (*M.intracellulare* 検査)

		他社キット	
		陽性	陰性
MAC 試薬	陽性	31	1
	陰性	1	79

全体一致率 98.2% (110/112)

5. まとめ

本装置は、新形態の遺伝子検査試薬に対応し、十分な検査性能を示すことを確認した。核酸精製から検出までの操作を自動化するとともに、2 項目同時測定にも対応しており、遺伝子検査の省力化と更なる迅速化に大きく貢献すると考える。

6. 謝 辞

臨床検体を用いた評価結果に関して、地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターへの委託研究によって得られた結果を使用しました。また、本遺伝子検査システムの評価に際して、東ソー・ハイテック(株)、バイオサイエンス事業部の営業部、カスタマーサポートセンター、開発部遺伝子 G にも多大なご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

7. 開発担当者

TRCReady®-80 の開発担当者は以下の通りである。
太田 義彦、大沢 正、野中 一功、杉田 哲也、青

柳 雄大、後藤 浩二、中村 竜也、秋山 聖、大野雄成、村田 直哉、池田 貴文、久保田 寛人

8. 引用文献

- 1) T. Ishiguro et al., *Anal. Biochem.*, **314** (1), 77 (2003)
- 2) S. Takakura et al., *J. Clin. Microbiology*, **43** (11), 5435 (2005)

TRCReady®、TRCRapid®、TRCR® は東ソー株式会社の登録商標です。