

遺伝子診断システムの開発

林		俊	典
栗	原	芳	文
増	井	健	治
斉	藤	寿	一
堀	江	隆	一
保	川		清
石	黒	敬	彦

Development of Automated System of Nucleic Acid Based Infectious Disease Testing : Extraction of Nucleic Acids and Fluorescence Real-time Monitoring of Isothermal Nucleic Acid Amplification.

Toshinori HAYASHI
Yoshihumi KURIHARA
Kenji MASUI
Juichi SAITOH
Ryuichi HORIE
Kiyoshi YASUKAWA
Takahiko ISHIGURO

We developed a novel automated system of NAT (nucleic acid amplification technology) based infectious disease testing. The system consists of the automated nucleic acid extractor using the manual DNA/RNA extraction kit 'EXTRAGEN' as the reagent and the fluorescence real-time monitor of the TRC (transcription-reverse transcription concerted) amplification in the presence of the INAF (intercalation-activating fluorescence) DNA probe. The present system was applied to the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and demonstrated that the nucleic acids were extracted from as much as 32 specimens within 30 minutes, and 10 copies of the target RNA, mRNA of *mecA* gene, was detected and quantified in 10 minutes.

1. 緒 言

ヒトの全ゲノム配列情報¹⁾の全貌が明らかにされつつある現在、遺伝子検査は従来の感染症における初期のスクリーニングや治療効果の観察にとどまらず、造血器腫瘍、固形腫瘍、生活習慣病などヒト遺伝子を対象とした検査にまで急速に拡大しつつある。この動向は、ポストゲノムのハイスループットな分析ツールとしてマイクロアレイやDNAチップが実用化されたこ

とにより、さらに加速されつつあると言えよう。

一般に、検体中のわずかな核酸を増幅する遺伝子検査は、「核酸抽出」、「増幅反応」、「検出」の各工程から構成される。既に、これらの工程のうち部分的に自動化した装置が出回っているが、全工程を自動化したシステムは血液スクリーニングなどの大規模処理を目的とした大型システムしかない。そのため、一般の検査室では個人の手技に依存せざるを得ず、検査の精度管理が課題となっており、多数試料を簡便に実施でき

る小型な自動化システムが望まれている。

我々は、「核酸抽出」技術として、DNAとRNAの全核酸を遠心沈降方式により抽出するキット試薬「EXTRAGEN」を開発し、既に市販している。また、「増幅反応」技術として、転写反応と逆転写反応を巧みに組み合わせることで標的RNAを極めて効率的に複製する転写・逆転写協奏増幅法（TRC反応：Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction）を開発してきた²⁾。さらに、「検出」技術として、標的核酸と相補結合を形成することによって顕著な蛍光増感を与える発蛍光プローブ（INAFプローブ：Intercalation Activating Fluorescence Probe）を開発し³⁻⁵⁾、TRC反応と組み合わせることで、一定温度下にて増幅反応工程と検出工程を一段階で実施するTRC蛍光モニタリング法を構築した²⁾。

この度、上記のTRC蛍光モニタリング法の専用装置「TRC蛍光モニター」、および、「EXTRAGEN」の使用をベースとする自動核酸抽出装置を開発し、一般の検査室においても遺伝子検査を簡便に実施できる小型なトータルシステムを構築し、実質的に全工程を自動化したので、以下に報告する。

2. 材料および方法

(1) TRC蛍光モニタリングの自動化

TRC蛍光モニタリング法では、TRC反応により標的RNAを増幅しつつ、その経時変化をリアルタイムかつ連続的（または断続的）に蛍光検出する必要がある。しかも、臨床診断などの市場ニーズに適した仕様とするためには多サンプルを同時に実行しなければならない。

我々は、これらの課題に対し、TRC反応のインキュベーターとして、ヒーターと温度センサーを装備したリング形状のアルミ合金製温調ブロックを用意し、32本のサンプル容器を密着して同心円上に静置できるよ

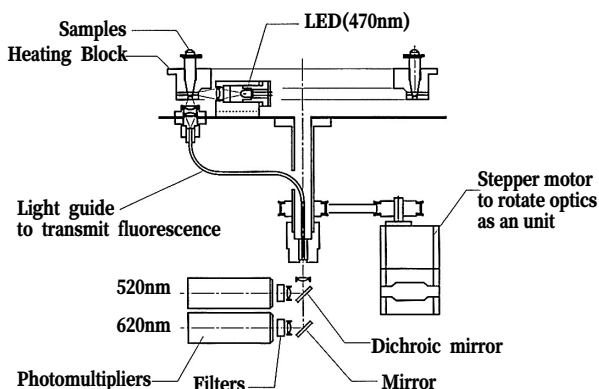


Fig. 1 Diagram of the 'TRC fluorescence monitor' instrument system.

うにした。さらに、蛍光検出ユニットのうち、励起光源を含む励起光学系や蛍光信号伝達系などの光学部分を一体で回転させ、32本のサンプルからの蛍光信号を順次計測できるようにした。(Fig. 1)

上記のインキュベーターでは、サンプル間の温度差を解消するため、テープ状ヒーター（坂口電熱株式会社）を温調ブロックのリング外周部に均一に巻き付け、32本の全サンプルにおける熱収支が一律となるようにした。なお、制御用の温度センサーには、白金測温抵抗体（NR-181-1507、株式会社ネツシン）を用い、温調ブロック内に埋め込んだ。また、装置全体を小型化するために、励起光源として青色発光ダイオード（NSPB500S、日亜化学工業株式会社）を採用し、干渉フィルターを介して470nm（FWHM10nm）の励起光を温調リングの内側から反応溶液に集光した。反応溶液からの蛍光は、温調リングの底部から採取し、光ファイバーで伝達した後、干渉フィルターで特定波長を選別してメタルパッケージ光電子増倍管（H5784、浜松ホトニクス株式会社）で検出した。なお、蛍光検出波長は520nm（FWHM10nm）と620nm（FWHM10nm）の二系統を用意し、インターナルコントロールの検出や二項目同時検出にも対応できるようにした。

(2) 核酸抽出の自動化

核酸抽出試薬には検体中の全核酸を遠心沈降方式により抽出するキット試薬「EXTRAGEN」（東ソー株式会社）を用いた。この抽出性能（回収率）を維持したまま自動化するために、Fig. 2に記した「EXTRAGEN」の標準プロトコールのうち、遠心操作と上清吸引を繰り返す最も煩雑な操作部分（Fig. 2の

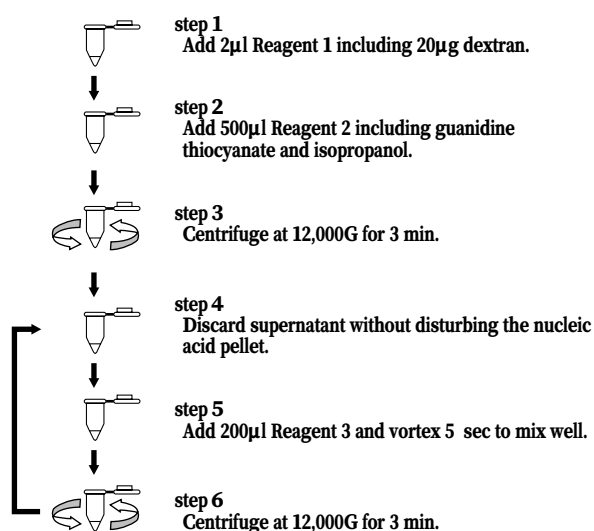


Fig. 2 Standard procedure for the DNA/RNA extraction kit 'EXTRAGEN'.

step 3～6) をそのまま自動化することにした。

自動核酸抽出装置の中核部品として、半径107mmのサンプルローターをポリアセタール樹脂を加工して成形し、32本のサンプル容器を45°に傾斜して放射状に収納できるよう、ホルダー穴を形成した。サンプルローターには一個のステッピングモーター (AS91AA、オリエンタルモーター株式会社) を連結し、遠心操作時の高速回転、および、試薬注入/上清吸引操作時のインデックス回転 (位置決め制御回転) の両操作を自動制御できるようにした。さらに、試薬注入と上清吸引の自動制御ノズルを45°に傾斜して装備することにより、サンプルローターに検体を設置したまま全操作 (Fig. 2のstep 3～6) を実施できるようにした。なお、サンプルローターの標準回転速度は5,000rpm (遠心加速度3,000G)、インデックス回転時の位置決め精度は±0.2mm以内である。

(3) TRC蛍光モニタリング

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のペニシリン結合蛋白 (PBP2') をコードする耐性遺伝子 *mecA* に着目し、そのmRNAを標的とするTRC蛍光モニタリング法の検出試薬を開発し²⁾、上記自動化装置の評価試薬とした。

mecA mRNAのTRC蛍光モニタリングに使用したプライマー配列とプローブ配列は以下のとおりである。

プロモータープライマー (DNA)

5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACTAA
CTATTGATGCTAAAGTTCAAA-3'

アンチセンスプライマー (DNA)

5' TTCTTTTTTATCTTCGGT-3'

切断プローブ (DNA)

5' GTTAGTTGAATATCTTTGCCATCTTTTTCTTT
TTCTCT-3'

発蛍光プローブ (INAFプローブ、DNA)

5' TGTTTG*AGGGTGGATAGCAG-3'

上記のうち、プロモータープライマーの下線部はT7プロモーター配列であり、発蛍光プローブの*はインターカレーター性蛍光色素オキサゾールイエロー (YO) の修飾位置を示している。なお、切断プローブの3'末端はアミノ基で、発蛍光プローブの3'末端はグリコール酸で修飾し、それぞれからの伸長反応を防止した。これらのプライマーとプローブの配列は、特別な変性処理のない条件下でもアニールできるよう、41℃の反応液中で標的RNAが分子内結合フリーとなる領域に設定した²⁾。さらに、*mecA* mRNAキャリブレーターとして、鋳型DNAからの *in vitro* 転写により、MD Song et al.⁶⁾ が同定した塩基番号1～2013を含む

Reagent 1 (20.8 μl)

Tris-Acetate(pH8.2)	60 mM
KOAc	120mM
Mg(OAc) ₂	13mM
Dithiothreitol	10mM
dNTPs	0.75mM
NTPs	3.6mM
Scissor Probe	0.2 μM
Primer Set	each 0.2 μM
INAF Probe	25nM
Ribonuclease Inhibitor	60U/assay

Reagent 2 (4.2 μl)

T7 RNA Polymerase	171U/assay
AMV Reverse Transcriptase	42U/assay
RNaseH	0.03U/assay
BSA	0.01%

Sample (5 μl)

Fig. 3 Procedure for the real-time fluorescence TRC monitoring of *mecA* mRNA.

2016merのRNAを調製した。

また、TRC蛍光モニタリング法の試薬組成と操作手順は、41℃の一定温度下において、Fig.3に示した操作手順に従って実施した。すなわち、サンプルに対して二種類の試薬Reagent 1と2を添加し、直ちに密閉栓を閉じてTRC蛍光モニターにセットした。なお、YOの蛍光はTRC蛍光モニターが装備する二系統の検出系のうち520nmの経路で検出した。

3. 結果および考察

(1) TRC蛍光モニタリングの自動化

(1) TRC蛍光モニターの開発

開発したTRC蛍光モニターの写真と主な仕様をFig. 4に示す。本装置のインキュベーターは、サンプルを静置した効果とリング外周部にヒーターを設置した効果として、高い温調精度 (温度の時間変動; ±0.1℃

SPECIFICATIONS	
<i>Sample</i>	
Sample Number	: 32 tubes
Sample Volume	: 30 μl
<i>Heating</i>	
Temperature	: 41 ± 0.1 °C
Heating Block	: Aluminum (Fixed)
<i>Fluorescence</i>	
Light Source	: LED (470nm)
Fluorescence	: 520nm and 620nm
<i>Dimensions</i>	
280mm(W) × 500mm(D) × 370mm(H)	



Fig. 4 Specifications and photograph of the 'TRC fluorescence monitor' instrument system.

以内)と一律な温度制御(サンプル間の温度較差; $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 以内)を実現でき、TRC反応を多サンプルに対して高精度に実施することが可能となった。また、蛍光検出ユニットを一系統とし、しかも、励起光源に発光ダイオードを採用したことにより、小型な卓上型装置(サイズ; 280mm(W)×500mm(D)×370mm(H))とすることができた。しかも、蛍光検出ユニットの光学部分の回転を繰り返すことで、32本のサンプルすべてに対して断続的に蛍光を検出できる。このように、高い精度でTRC反応を実施しつつ、RNAの増幅過程をリアルタイムな蛍光検出により追跡することが可能となった。

(2) TRC蛍光モニター (TRC蛍光モニタリング) の有用性評価

1) MRSA *mecA*の発現検出への応用

Fig. 5は、TRC蛍光モニターを使用し、*mecA* mRNAキャリブレーターをサンプルとして測定したTRC蛍光モニタリングの結果である。Fig. 5における時間原点は、TRC増幅反応の開始時間であり、具体的には、Fig. 3における各種酵素を含んだReagent 2の添加時点に相当する。また、縦軸の蛍光強度比は、反応時間原点の蛍光強度(バックグラウンド蛍光)に対する各時間の蛍光強度の比を表している。

Fig. 5に示したように、反応液中に標的RNAが存在しない場合、蛍光信号は一定値(バックグラウンド蛍光)で推移した。これに対し、反応開始前のmRNA量が10コピーの場合は約10分で蛍光信号の立ち上がりが認められた。このことは、本システムによって極めて短時間に高感度分析が実現できることを示している。また、蛍光信号の立ち上がり時間と標的RNAの初期コピー数の間には相関が認められた。すなわち、立ち上がり時間と初期コピー数から検量線を作成すること

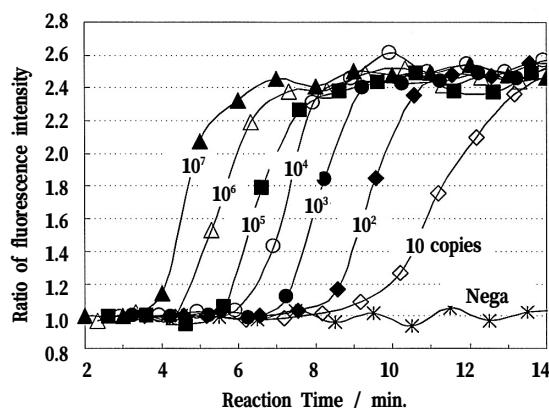


Fig. 5 Fluorescence profile of various copies of *mecA* mRNA calibrator obtained using the 'TRC fluorescence monitor'.

によって定量的な分析も可能であると言える。

このように、本装置はTRC反応の進行に伴うRNAの増幅過程をリアルタイムに検出することを可能とし、TRC蛍光モニタリングによる迅速・高感度な定性・定量分析を実現する上で有用な分析ツールであることが示された。

2) 臨床検体への応用

TRC蛍光モニターとTRC蛍光モニタリング法を臨床検体に応用するため、患者検体に由来するMRSAの培養コロニー(菌数; 10^6 個)をサンプルとして用いた。まず、核酸抽出試薬「EXTRAGEN」(東ソー株式会社)を使用して1コロニーから全核酸を用手法で抽出し、その10倍希釈系列を調製してサンプルとした。

Fig. 6に、TRC蛍光モニターを用いてTRC蛍光モニタリング法で測定した結果を示す。図に示したように、 10^6 倍に希釈したサンプルまで蛍光信号の立ち上がりが認められた。このことから本法はMRSAに対して菌1個の検出感度をもつことがわかる。

PCR法に代表されるDNAの増幅反応を利用した遺伝子検査では、生菌のみならず死菌をも検出することがしばしば問題となる。しかし、本法は、*mecA* mRNAのように遺伝子の発現過程をみることで生菌のみを選択的に検出できると考えられる。そのため、従来の培養法との相関が良好であると考えられ、臨床的有用性が期待される。

3) 感染症7項目への応用

上述のMRSAを含めて、HCV (C型肝炎ウイルス)、HIV-1 (ヒト免疫不全ウイルス)、SRSV (小型球型ウイルス: ノーウォーク様ウイルス: NLV-GI)、腸炎ビブリオ菌、腸管出血性大腸菌O-157、サルモネラ菌、の感染症7項目に対して本法を適用した。

HCV、HIV-1、NLV-GI⁷⁾はRNAウイルスであり、そ

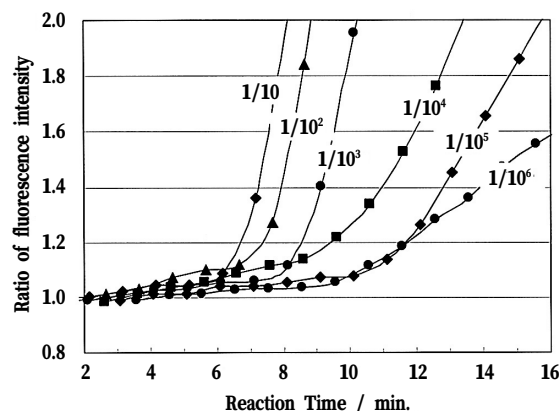


Fig. 6 Fluorescence profile of variously diluted solution of MRSA suspended colony obtained using the 'TRC fluorescence monitor'.

れ自体の特異的配列をTRC増幅反応のターゲットとした。また、感染毒素型の食中毒菌である腸炎ビブリオ菌⁸⁾と腸管出血性大腸菌O-157は、腸管感染症や食品中における毒素産生性の判定に有用な毒素遺伝子に着目し、それぞれ、耐熱性溶血毒遺伝子*tdh2*とペロ毒素VT2遺伝子のmRNAをTRC増幅反応のターゲットとした。また、感染侵入型の食中毒菌であるサルモネラ菌に対しては、侵入性因子関連遺伝子*invA*に着目し、そのmRNAをTRC反応の増幅ターゲットとした。

各項目の標準RNAをサンプルとして、TRC蛍光モニターを使用したTRC蛍光モニタリングを実施した。得られた蛍光プロファイルから、初期コピー数と蛍光信号の立ち上がり時間の関係をFig. 7にまとめた。なお、蛍光信号の立ち上がり時間は、蛍光プロファイルにおいて蛍光強度比がカットオフ値1.2 (蛍光初期値+3SD) に到達する時間に設定して算出した。図からわかるように、すべての項目において迅速・高感度な検出と定量性を達成することができ、本法の有用性を確認できた。

以上のように、本開発のTRC蛍光モニターを使用すれば、二種類の試薬を添加するだけの操作により、迅速・高感度なTRC蛍光モニタリング法を高精度に実施でき、増幅反応工程から検出工程を実質的に自動化することができた。

(2) 核酸抽出の自動化

(1) 自動核酸抽出装置

開発した自動核酸抽出装置の写真をFig. 8に示す。本装置では、遠心操作と試薬注入/上清吸引の全工程をサンプルローター上で自動的に実施でき、そのため、装置全体を小型な卓上サイズ (500mm(W)×540mm(D)×500mm(H)) とすることができた。さらに、本装置を用いれば、検体に「EXTRAGEN」のReagent 1と2を添加して本装置にセットするだけの操作で良



Fig. 8 Photograph of the automated nucleic acid extraction system.

く、その後は最大32検体を30分以内に処理することが可能であった。

また、試薬注入と上清吸引の各ノズルは、試料容器の内面に接触しないように制御し、さらに、上清吸引ノズルは一検体処理ごとに蒸留水による洗浄操作を繰り返すよう制御した。これにより、ノズルによるキャリーオーバー (検体間汚染) が発生しないことを確認した。

(2) 核酸抽出試薬の改良

上記の自動核酸抽出装置の遠心加速度3,000Gは、抽出試薬「EXTRAGEN」の標準プロトコルで必要とされる遠心加速度 (12,000G) の1/4に過ぎない。この遠心加速度にて、標準法と同じ回収率を得ることを目的に、「EXTRAGEN」に含まれるデキストラン (核酸の共沈補助剤) の使用量に着目した。

37コピー/100 μ lのHCV cDNA (塩基番号1~1487を含む⁹⁾) を試料として用い、遠心加速度3,000G (標準プロトコルの1/4に相当) で遠心沈降したとき

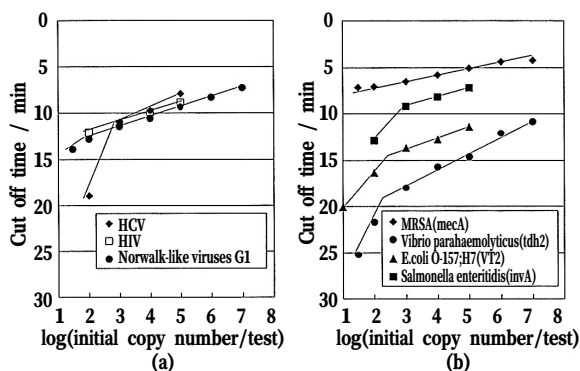


Fig. 7 The relationship between the log of initial copies of RNA and the time required for fluorescence enhancement to reach a cutoff level of 1.2 in the profile.

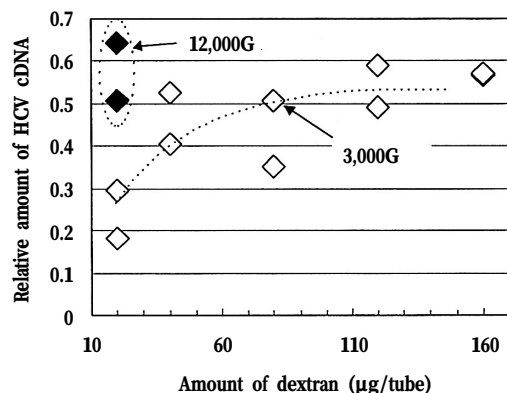


Fig. 9 Results of HCV cDNA extraction with various amounts of dextran. Relative amounts of HCV cDNA were estimated by the electrophoretic analysis of PCR products.

Table 1 Efficiency of *mecA* mRNA extraction by the automated nucleic acid extraction system and 'EXTRAGEN' kit. The efficiency was estimated from the results of TRC fluorescence monitoring.

Sample <i>mecA</i> mRNA (copies/100 μ l)	Extraction efficiency (number of detected samples/number of tested samples)		
	Automation system	Standard manual procedure	
		person 1 (expert)	person 2 (beginner)
1000	2 / 2	2 / 2	1 / 2
300	3 / 3	3 / 3	3 / 3
100	3 / 3	3 / 3	2 / 3
30	3 / 3	3 / 3	3 / 3
10	2 / 3	2 / 3	1 / 3

に得られる回収核酸の相対量を求めた。Fig. 9は、デキストラン使用量をパラメータとし、回収した核酸をPCR (40サイクル) で増幅後、電気泳動で検出されたバンドの黒化度をデンシトメーターで求めたものである。図からわかるように、標準プロトコールに比較して5倍量に相当する100 μ g/テストのデキストランを使用することにより、標準プロトコールに相当する回収率を得ることができた。

(3) 抽出効率の評価

改良した抽出試薬「EXTRAGEN」(デキストラン量; 100 μ g/テスト)を用い、本装置の核酸の回収率を、「EXTRAGEN」の標準プロトコール(用手法、デキストラン量; 20 μ g/テスト、遠心加速度: 12,000G)と比較した。サンプルは、MRSAの耐性遺伝子*mecA*のmRNAキャリブプレータをTris-saline-5% BSAに添加して用い、TRC蛍光モニタリング法の検出率で評価した。Table 1に示した結果からわかるように、改良した抽出試薬「EXTRAGEN」を用いて本開発装置で核酸抽出することにより、30コピー以上の核酸を含むサンプルでは100%の検出率、10コピーの核酸を含むサンプルに対しても2/3の検出率を得ることができ、従来の「EXTRAGEN」を用いた標準プロトコールに匹敵する性能であることがわかった。また、用手法により標準プロトコールでは回収率の結果に個人間差が認められるが、本開発装置は熟練者の技術力に相当する性能を容易に実現できることがわかった。

4. 結 論

以上のように、遺伝子検査の全工程にわたる操作を実質的に自動化したトータルシステムの構築に見通し

を得た。本トータルシステムは、「EXTRAGEN」の使用をベースとした自動核酸抽出装置とTRC蛍光モニタリング法の専用装置「TRC蛍光モニター」から構成され、最大32本のサンプルに対して、全工程を1時間以内(核酸抽出: 30分以内、増幅・検出: 30分以内)で実施することが可能である。

それぞれの装置は、試薬を添加してセットした後は放っておける“walk away”システムであるため、多数の検体を処理する場合にも、一方の待ち時間の間に他方を処理(試薬添加と装置へのセット)することができ効率的と言える。また、各装置ともに小型な卓上装置であるため、一般の検査室でも手軽に導入でき、個人の手技に依存しない高度な精度管理や検査の標準化に寄与すると考えられる。

文 献

- 1) JC Venter et al., *Science*, **291**, 1304-1351 (2001)
- 2) 田谷敏貴, 斉藤寿一, 林俊典, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, **43**, 1-8 (1999)
- 3) 斉藤寿一, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, **41**, 13-21 (1997)
- 4) T. Ishiguro et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4992-4997 (1996)
- 5) 石黒敬彦, *Jpn.J.Electroph.*, **41**, 293-300 (1997)
- 6) MD Song et al., *FEBS Lett.*, **221**, 167-171 (1987)
- 7) 武田直和 et al., *臨床栄養*, **94**, 768-774 (1999)
- 8) 西瀧光昭, *最新医学*, **52**, 2079-2085 (1997)
- 9) N. Kato et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9524-9528 (1990)

著 者
氏名 **林 俊 典**
Toshinori HAYASHI
入社 昭和**60**年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員
(現在)科学計測事業部
営業部学術グループ

著 者
氏名 **栗 原 芳 文**
Yoshifumi KURIHARA
入社 昭和**64**年1月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著 者
氏名 **増 井 健 治**
Kenji MASUI
入社 昭和**62**年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
研究員

著 者
氏名 **斉 藤 寿 一**
Juichi Saito
入社 昭和**62**年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著 者
氏名 **堀 江 隆 一**
Ryuichi HORIE
入社 昭和**61**年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著 者
氏名 **保 川 清**
Kiyoshi YASUKAWA
入社 昭和**59**年4月2日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著 者
氏名 **石 黒 敬 彦**
Takahiko ISHIGURO
入社 昭和**58**年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主席研究員