



## ●核酸精製補助試薬 TRCR<sup>®</sup> P-ASSIST の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ  
 (現：東ソー・ハイテック株式会社 TRC 工場製造課)  
 バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ

庄司麻土香

宇根 蔵人  
 塚本 悠  
 川西 隆仁

### 1. はじめに

新型コロナウイルス (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) の遺伝子検査には、鼻咽頭拭い液や鼻腔拭い液など様々な検体が検査材料として用いられている。これらの検体は、ウイルス輸送液に懸濁して保存・輸送される場合がある<sup>1)</sup>。このウイルス輸送液に懸濁された検体を東ソー株式会社の自動遺伝子検査装置 TRCReady<sup>®</sup>-80 にて核酸を精製したところ、核酸精製効率の著しい低下が見られ、使用が困難であった。

そこで、我々はウイルス輸送液に懸濁された検体による核酸精製阻害の原因を解析した。その結果、ウイルス輸送液中に多量に含まれる BSA (Bovine Serum Albumin) が核酸精製を阻害していることが判明した。この対策として、BSA などの高濃度のタンパク質による核酸精製阻害を低減する核酸精製補助試薬 TRCR<sup>®</sup> P-ASSIST (以下、本試薬) を開発したので報告する (図 1)。本試薬の開発を通じて、感染症の早期診断および適切な治療の実現に貢献するとともに、「すべての人に健康と福祉を」の達成に寄与することを目指している。

### 2. TRCReady<sup>®</sup> システムの概要

自動遺伝子検査装置 TRCReady<sup>®</sup>-80 は検体から核酸を精製し、遺伝子増幅法により増幅・検出するシステムである (図 2)。精製は専用の TRCR<sup>®</sup> 核酸精製キットが使用でき、その基本原理はアルコールで不溶化した核酸をシリカベースの固相に吸着させ、洗浄・溶出することで標的核酸を得る方法である。増幅・検出は遺伝子増幅法の一つである TRC 法により実施される。TRC 法は 46℃ の一定温度で RNA を増幅する TRC 反応 (Transcription Reverse-transcription Concerted reaction) と増幅された RNA に特異的に結合することにより蛍光を発する INAF プローブ (INtercalation



図 1 核酸精製補助試薬 TRCR<sup>®</sup> P-ASSIST

Activating Fluorescence probe) を組合せた方法であり、標的 RNA の増幅と検出を 1 本のチューブ内で行う、迅速性と高感度性を両立した方法である<sup>2)</sup>。TRCReady<sup>®</sup>-80 ではこれらが全自動でおこなわれ、核酸精製から検出までを 40 分で実施可能である<sup>3)</sup>。

この TRC 法を用いた新型コロナウイルスの遺伝子検査は、TRCReady<sup>®</sup>-80 専用試薬である 2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady<sup>®</sup> SARS-CoV-2 i が用いられており、迅速かつ簡便に測定可能な試薬として広く利用されている<sup>4)</sup>。



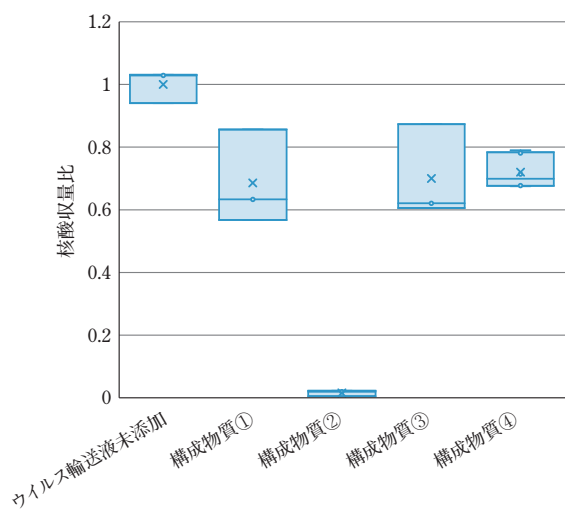
自動遺伝子検査装置 TRCReady<sup>®</sup>-80

TRCR<sup>®</sup> 核酸精製キット

図 2 TRCReady<sup>®</sup> システム概要

### 3. 核酸精製補助試薬 TRCR® P-ASSIST の開発および特徴

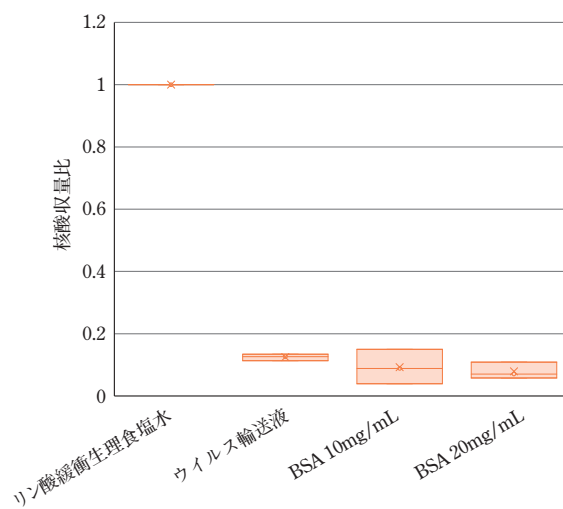
ウイルス輸送液は、ウイルスや細菌を安定した状態で輸送・保存するため、塩類、糖類、タンパク質、抗生剤など、様々な物質から構成されている。これら構成物質のうち、どの成分が TRCReady®-80 の核酸精製効率低下の原因となっているかは不明であった。そこで我々は、核酸精製効率低下がどの構成物質に起因しているのか調査を実施した。はじめに、ウイルス輸送液の構成物質を4つのグループに分け、グループごとに溶液（構成物質①～④）を作製した。つぎに、構成物質①～④それぞれに新型コロナウイルス N 遺伝子領域の RNA を添加し、TRCR® 核酸精製キットおよび TRCReady®-80 を用いて核酸精製を行い、得られた核酸をリアルタイム RT-PCR 法にて定量し、核酸精製効率低下の原因物質を調査した。その結果、構成物質②において、著しい核酸精製効率の低下が認められた（図3）。そこで、構成物質②を構成する物質のうち、多量に含まれている BSA に着目し、BSA による核酸収量への影響を前述の方法を用いて検討した。その結果、高濃度の BSA 溶液ではウイルス輸送液と同様に核酸精製効率が低下することが明らかとなった（図4）。これらの結果から、ウイルス輸送液中に多量に含まれる BSA が核酸精製効率低下の主な原因であることが示唆された。また、BSA による核酸精製阻害の機序として、検体中の核酸の不溶化が阻害され、その結果、シリカベースの固相への核酸吸着が抑制されている可能性を見出した。この現象を改善するため、核酸の不



ウイルス輸送液未添加時の核酸収量を1としたときの数値を示す。

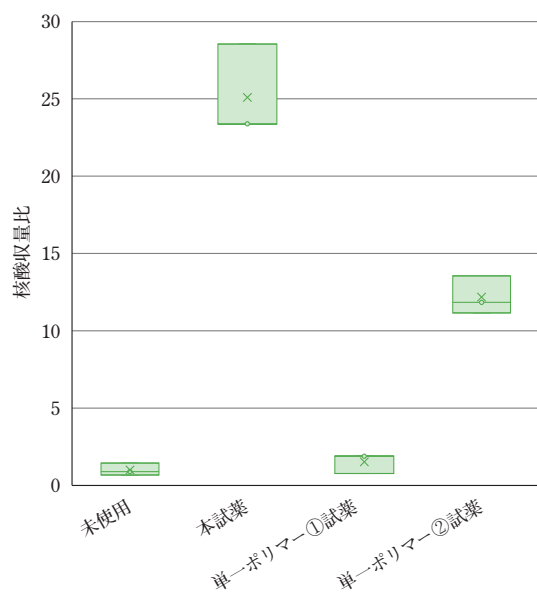
図3 ウイルス輸送液構成物質別の核酸収量比較

溶化を促進する効果が知られている高分子ポリマーを用いて検討を行った。その結果、単一ポリマー②試薬で核酸精製効率の改善がみられた。さらに、単一ポリマー②試薬に単一ポリマー①試薬を組み合わせた試薬（本試薬）は、さらなる核酸精製効率の改善がみられた（図5）。以上の検討結果より、核酸精製効率を改善する複数種の高分子ポリマーを組み合わせた試薬として本試薬を製品化した。



コントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水使用時の核酸収量を1としたときの数値を示す。

図4 高濃度 BSA による核酸収量への影響



コントロールとして核酸精製補助試薬未使用時の核酸収量を1としたときの数値を示す。

図5 核酸精製補助試薬組成の検討

#### 4. 基本性能評価

本試薬の性能評価のため、ウイルス輸送液中に各濃度の新型コロナウイルス N 遺伝子領域 RNA を添加し、TRCR<sup>®</sup> 核酸精製キットおよび 2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady<sup>®</sup> SARS-CoV-2 i を用いて核酸精製および測定を行った (表 1)。対照のウイルス輸送液を使用しない条件 (リン酸緩衝生理食塩水) では、200 コピー/精製で全ての検体が陽性となった。一方、ウイルス輸送液を用いた場合、本試薬を添加しない条件では 800 コピー/精製においても陽性検出は得られなかった。一方、本試薬を添加した場合には、ウイルス輸送液を用いても 200 コピー/精製で全ての検体が陽性となった。

これらの結果から、本試薬の添加により、高感度で安定した核酸の検出が可能となることが示された。

さらに、本試薬の適用可能なウイルス輸送液を調査するため、9 社 11 種類のウイルス輸送液を用いて検討した。その結果、全てのウイルス輸送液において 800 コピー/精製の N 遺伝子領域 RNA を陽性と判定できた。これにより、本試薬は本検討で用いた範囲のウイルス輸送液に適用可能であることが確認された。

表 1 核酸精製からの最小検出感度

コピー/精製	陽性数/テスト数		
	リン酸緩衝生理食塩水	ウイルス輸送液	
		本試薬使用	本試薬未使用
800	6/6	18/18	0/6
400	6/6	18/18	1/6
200	6/6	18/18	1/6
10	1/6	3/18	0/6

#### 5. 実検体を用いた評価

[評価方法]

全 69 検体 (鼻咽頭拭い液 69 検体をウイルス輸送液に懸濁したもの) を用いて、図 6 に示すフローに従い、TRC 法と国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」記載のリアルタイム one-step RT-PCR 法 (以下、感染研法) との比較検討を実施した<sup>5)</sup>。TRC 法は、本試薬、TRCReady<sup>®</sup>-80、TRCR<sup>®</sup> 核酸精製キット、2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady<sup>®</sup> SARS-CoV-2 i を組み合わせて核酸精製および検出を行った。

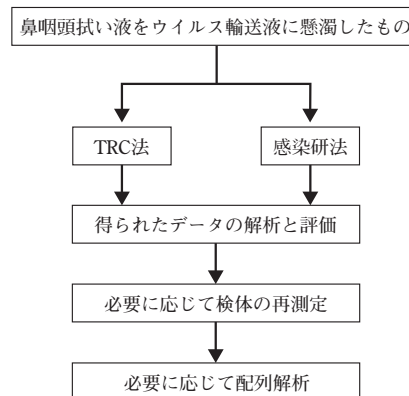


図 6 評価のフロー

表 2 相関性試験

ウイルス輸送液検体		感染研法		
		陽性	陰性	合計
TRC 法	陽性	33	1	34
	陰性	2	33	35
	合計	35	34	69

全体一致率：95.7% (66/69)

陽性一致率：94.3% (33/35)

陰性一致率：97.1% (33/34)

[評価結果]

TRC法と感染研法の相関性試験結果を表 2 に示す<sup>6)</sup>。全体一致率は 95.7%、陽性一致率が 94.3%、陰性一致率が 97.1%と 90%以上の良好な相関が得られた。TRC 法は、感染研法と同等の性能を有しているものと推察される。乖離した 3 検体のうち、感染研法で陽性かつ TRC 法で陰性となった 2 検体は、感染研法で得られた Ct 値が高く、ウイルス量が少なかった可能性が示唆された。残りの感染研法で陰性かつ TRC 法で陽性となった 1 検体は、感染研法により再測定を行った結果、陽性となり、配列解析を行ったところ、SARS-CoV-2 の配列が確認された。

#### 6. まとめ

ウイルス輸送液に懸濁された検体を TRCReady<sup>®</sup>-80 にて測定可能とする核酸精製補助試薬 TRCR<sup>®</sup> P-ASSIST を開発した。また、臨床検体を用いた評価においても、感染研法と同等の感度および特異度を有することが確認された。

さらに本試薬の開発により、核酸精製の阻害メカニズムへの理解が深まり、今後の核酸精製技術の発展に貢献できることが期待される。本試薬は、ウイルス輸

送液に懸濁された検体や新型コロナウイルスの検査に限らず、様々な検体種、項目への応用が可能とされており、今後新たな感染症のパンデミックが発生した際にも迅速な検査体制強化に役立つと考える。

本試薬は既に施設で導入が開始されており、人々の健康維持のため、感染症の早期診断および治療に貢献している。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針 第6版
- 2) T. Ishiguro et al., *Anal. Biochem.*, 314 (1), 77-86
- 3) 斉藤寿一, *臨床病理*, 66(5), 515-521, 2018.
- 4) 東ソー研究・技術報告書 第65巻(2021)、2019新型コロナウイルスRNA検出試薬 TRCReady<sup>®</sup> SARS-CoV-2 i の開発
- 5) 国立感染症研究所、病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1  
<https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/2019-nCoV20200319.pdf>
- 6) 2019新型コロナウイルスRNA検出試薬 TRCReady<sup>®</sup> SARS-CoV-2 i 添付文書 第7版

TRCReady<sup>®</sup>, TRCR<sup>®</sup> は東ソー株式会社の登録商標です。