

全自動 PCR 検査装置 geneLEAD システムの開発と COVID-19 検査への利用

澤上 一美^{1*}・田島 秀二¹・養王田正文²

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 検査において、PCR 法は、感染者の特定・隔離と治療の判定に供され、きわめて重要な検査ツールとなっている。PCR 検査には約 6 時間かかっているとされているが、そのうち 2 時間以上はサンプルからの核酸抽出などの前処理に要している。前処理には感染リスクがあり、同時に手技が精度に影響を与えるため、律速段階になる。核酸抽出を行わない方法も提案されているが、検出精度に問題を生じることがある。弊社プレジジョン・システム・サイエンス株式会社は核酸抽出を含む PCR 検査の全工程を自動化した geneLEAD システムを開発し、上市している。geneLEAD システムは検体および試薬をセットするだけで検査が可能であり、すべての操作が装置内で行われるため、検査員の感染の心配もない。本稿では、geneLEAD システムの開発の経緯とその性能および今後の開発の方向性について紹介する。

緒 言

中国の武漢から発生した新しい感染症は、次世代 DNA シーケンサーによる解析により感染源となるウイルスのゲノム情報が早期に解析され、新規なコロナウイルス感染症 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) であることが明らかになった¹⁾。この感染源である Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) の配列情報を基に、早い段階から PCR による遺伝子検査が行われている。

PCR による感染症の遺伝子検査は、検体 (COVID-19 の場合は鼻腔ぬぐい液や唾液) からウイルスの核酸を抽出・精製し、遺伝子を増幅して検出する。現在は、リアルタイム PCR により増幅と検出を同時に行うことが一般的である。リアルタイム PCR は核酸に酵素やプライマーなどの試薬を混合して反応装置にかけるだけで行うことが可能であり、384 サンプルを同時に解析する装置も市販されている。しかし、実際は COVID-19 の遺伝子検査に多くの労力と時間がかかることから、検査が遅れるという問題が発生し、社会問題となった。この問題は現在でも続いている。

PCR 検査の律速段階

国立感染症研究所 (感染研) のマニュアル (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) によると、検体の取り扱いは、バイオセーフティーレベル (BSL) 2 で行うことが指示されている。BSL2 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱い、操作中はディスプレイのガウン、手袋 (2 重)、マスク、キャップなどの Personal Protective Equipment を着用し、QIAamp Viral RNA Mini でウイルス RNA の精製を行っている。この方法は、ウイルス RNA をフィルターにトラップして溶出する方法である。140 μ L の検体から RNA を 60 μ L に溶出して、5 μ L をリアルタイム PCR に用いていることから、収率を 100 %、検出感度を 2 copy と仮定すると、170 copy/mL が一般的かつ理論的な検出限界となっている。抽出、精製操作では、ウイルスで汚染された検体を扱うこと、クロスコンタミネーションのリスクがあることから、熟練した技術者が時間をかけて行う必要があり、PCR 検査の律速段階になっている。また、核酸抽出操作の後のサンプルには感染性がないので、リアルタイム PCR は BSL2 で行う必要はない。

核酸抽出・精製の時間と労力の問題を回避するために、核酸の精製を行わず、直接 PCR を行う方法もある (Direct PCR)。メーカーによって若干異なるが、数 μ L のサンプルとサンプル調製液とを混合して PCR に用いる。この場合の理論的な検出感度は 1000 copy/mL 程度となる。Direct PCR では、精製の段階でサンプルロスはないが、共存物質による影響があり、検査に用いられるサンプルの量には限界がある。

ウィンドウ・ペリオド

ウィンドウ・ペリオドとは、感染してから病原体が増殖して検査で検出できるまでの期間である。輸血サンプル中の HIV の PCR 検査では、5 日程度である。一方、抗原検査では 15 日、抗体検査では 20 日は必要となる。ウィンドウ・ペリオドの間は検出できないだけなので、感染させるリスクは存在する。ウィンドウ・ペリオドは検出感度とサンプルの量で決まる。たとえば、400 mL の輸

著者紹介 ¹プレジジョン・システム・サイエンス株式会社 (部長) E-mail: kazumi.sawakami@pss.co.jp

²東京農工大学大学院工学研究院
生物工学 第98巻 第11号 (2020)

血サンプル中に400個のウイルスが存在した場合に、1 mLのサンプルには平均で1個のウイルスが存在するので、原理的にはPCRで検出できる。しかし、0.1 mLのサンプルではウイルスが存在しない確率が高く、検出はほぼ不可能である。サンプル量が0.1 mLの場合には10倍程度増殖するまで検出できないことになる。さらには、検体採取のタイミング次第では検体中ウイルス数が少なく、検査で陽性とならない偽陰性になることがあることから²⁾、感染症の検査では、一旦、陰性の結果を得たとしても複数回の検体採取と検査を行うことが重要である。

Magtration法を用いた核酸精製の自動化

ウイルス核酸抽出・精製工程は、まず、核酸を覆っているウイルスのエンベロープと核酸に結合したタンパク質を溶解し核酸をむき出しにし、次に、タンパク質や脂質などの夾雑物と核酸を分離精製し、最後に核酸だけを濃縮して回収する。この工程は、一般的には遠心分離やフィルターによる分離を必要とするため、自動化は困難であった。磁性粒子を用いた自動抽出装置は分離操作に磁石を用いれば良いため装置構成を簡略化できる特徴を持つ^{3,4)}。筆者らは、独自に開発した磁性粒子ハンドリング技術であるMagtration法を用いて核酸精製の自動化を実現している。Magtration法では、磁性粒子の再懸濁などをチップ内で行うために、ミストによるクロスコンタミネーションの可能性が低くなっている。

Magtration法は、分注機に磁石を付けるだけで核酸精製に必要な操作の自動化を実現している。プレパックした試薬カートリッジとの組合せにより、装置の小型化を実現しており、特別なスキルなしに核酸抽出などを実行することができる。このように、小型・迅速・簡便な特徴を持つMagtration法を搭載した核酸抽出装置は、OEMを中心としてこれまでに2万台以上を販売している。1999年には、日本赤十字社の血液センターで行われる輸血の核酸検査の前処理用に同様の機構を有する装置が採用され、2007年までルーチン検査で活躍した。

全自動PCR検査装置geneLEADの開発

Magtration法を用いることで、磁気分離機構を備えた分注ユニットによりさまざまな操作が自動化できることから、自動遺伝子解析装置の開発が行われてきた⁵⁻⁷⁾。遺伝子解析でもっとも汎用性が高く重要な方法はリアルタイムPCRであることから、核酸抽出からリアルタイムPCRまでの全自動遺伝子解析装置の開発が行われた。リアルタイムPCRのためには、密閉型のチューブで核酸と試薬を混合し、温度サイクルを行いながら蛍光を検出

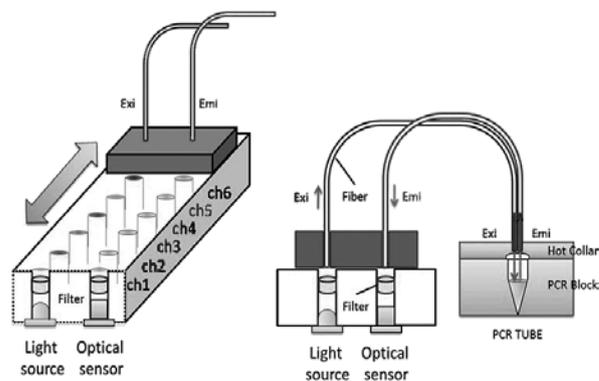


図1. 蛍光検出システムL&Lスキャナー

する必要があり、このために弊社は、蛍光検出モジュールであるL&Lスキャナーを開発した(図1)。L&Lスキャナーは、6つの蛍光色素に対応した6色のLight Sourceと6色のDetectorを有し、光ファイバーにより、PCRチューブに励起光を送り、蛍光を検出することができる。

L&Lスキャナーの特徴は、以下の通りである。

- ①小型化・完全モジュール化：特殊な電氣的信号処理が複数の励起光・受光素子の近接配置を可能にし、手のひらサイズの光学モジュールを実現した。同時に複雑な光学設定を必要とせず、簡単な工具のみで取り付け・使用が可能である。
- ②高速読み取り：特許技術である光ファイバースイッチング機構を採用することで、6色×12サンプルの蛍光測定をわずか、数秒で完了できる。
- ③サーマルサイクル独立制御とランダム解析：独自のデータ解析技術により、各サンプル独立のランダムサーマルサイクル制御における、リアルタイムPCR解析を可能にした。

Magtration法とサーマルサイクラーL&Lスキャナーによる蛍光検出システムを備えた全自動PCR検査装置が開発され、geneLEADと命名された。geneLEADは検体をサンプルチューブに入れるだけで、リアルタイムPCRまで完全に自動化された装置である。すべてのプロセスが装置内で行われるので、感染の心配もない。また、検査の手技による違いもなく、再現性の高い検査結果を得ることができる。当然、サンプルの取り違いによるミスもない。特筆すべきことは、核酸抽出・精製装置と同様に、一方向に動く単純な分注ユニットで全自動を実現していることである。シンプルな機構で自動化を実現していると同時に、サンプル間のクロスコンタミネーションのリスクを軽減している。解析の時間は約2時間である。

geneLEADには、8本のノズルを備えて8サンプル同時処理が可能なジーンリードエイトと12本のノズルを



図2. geneLEADシステム. 左: ジーンリードエイト, 右: エリートインジニアス.

有するエリートインジニアスの2種類がある(図2). いずれも, それぞれのサンプルについて独立にサーマルサイクルの条件を設定することが可能である. また, エリートインジニアスはPCR試薬分注のための分注ユニットも備えている. 装置および核酸抽出試薬は欧州医療機器指令98/79/EC (IVDD) に則り, 医療機器としての品質, 安全性, そしてユーザーの利便性に関する厳格な規格に従って設計開発されている.

COVID-19検査への利用

geneLEADの能力に着目したのはフランスに本拠を構えるELITech社であった. 同社は, 臓器移植に伴う感染症検査の装置としてエリートインジニアスを販売した. 当初, COVID-19は中国で発生し, 中国国内の問題であると考えられていた. しかし, ヨーロッパやアメリカに波及し, 世界中で大流行を引き起こし, 現在も大きな問題となっている. フランスでもCOVID-19の感染が問題となっていたが, エリートインジニアスはその検査に大きな効果を発揮した. 日本では, その存在はあまり知られることはなかったが, 東京農工大学の協力により, SARS-CoV-2の検出に有効であることが確認された. geneLEADシステムでは抽出前検体中の約10 copyの検出が可能であり, 80 copy/mLが検出限界となっている. これは, 感染研のマニュアル法よりも高い感度である. その後, エリートインジニアスがフランスにおけるCOVID-19の検査に貢献したことについてフランス大使館から弊社社長の田島宛に礼状が送られたことなどから知名度が上がり, 国内でも認識されるようになった.

geneLEAD以外の全自動PCR検査装置

geneLEAD以外の全自動PCR検査装置としては,

Roche社のcobasやベックマンコールター (Cepheid) 社のGeneExpertが代表的なものである. それぞれ, ドイツとアメリカの検査で活躍している. cobasには6800と8800の2機種あり, 6800は8時間のシフトで最大384件の検査, 8800は8時間シフトで最大960件の検査が可能である. GeneExpertはカートリッジ内ですべての反応を行う装置であり, 測定構成単位であるモジュールの搭載数によって, 3タイプがある. もっとも多数のモジュールを備えたGX-XVIでは16サンプルの検査を行うことが可能である. cobasは大規模検査に有効なシステムであり, GeneExpertはすべての操作がカートリッジ内で行われ, geneLEADと同様, 検査室での簡易な検査が実現できる^{8,9)}.

結 言

geneLEADは全自動でPCRが可能な装置であることから, 感染症の検査に有効な装置である. COVID-19のパンデミックを克服できたとしても, 感染症の脅威は今後も続くことから, geneLEADへの期待は大きい. 操作が簡単なことから, 病院へ備え付けることで, 迅速な検査が可能となる. しかし, 解析できるサンプル数が8または12であり, 解析に要する時間が2時間程度であることから, 大規模な検査への利用には限界がある. この問題を解決するために, 24または96サンプル処理が可能な多サンプル処理装置の開発を進めている. また, 解析のプロトコルを最適化することで, 解析時間の短縮化を行う. また, 現在のPCR検査試薬は冷凍庫で保存する必要があり, 特に, 開発途上国では輸送や保管で大きな問題となっている. この問題を解決するために, 凍結乾燥した試薬の開発も行っている. 筆者らのgeneLEADがCOVID-19だけでなく, 将来起こりうる他の感染症のパンデミックへの対策に貢献できるよう, 多方面からの開発を進めていきたい.

文 献

- 1) Wu, F. *et al.*: *Nature*, **579**, 265 (2020).
- 2) Wikramaratna, P. *et al.*: medRxiv, 10.1101/2020.04.05.20053355 (2020).
- 3) Obata, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 500 (2001).
- 4) Obata, K. *et al.*: *Pharmacogenomics*, **3**, 697 (2002).
- 5) Akutsu, J. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 667 (2004).
- 6) Kakihara, F. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **341**, 77 (2005).
- 7) Tojo, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 120 (2005).
- 8) Broder, K. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **58**, e01187-20 (2020).
- 9) Moran, A. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **58**, e00772-20 (2020).