

2021年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

「検査時間を大幅に短縮できる超高速 PCR 反応とその装置の開発」

[山口大学・教授] [赤田 倫治]
[山口 TLO] [二階堂 正隆]

1. はじめに

コロナパンデミックにより、世界中で膨大な数のコロナウイルス検査が行われている。今でもその主流は PCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) 検査である。多検体を処理するためには、PCR 検査を迅速に行うことが課題であるが、検査時間が長いという問題がある。通常、新型コロナウイルス検査では 98°C→56°C→68°C の 40 サイクルで PCR 反応を行うが、約 2 時間かかる。そこで、本研究開発では PCR 反応時間を短縮できる反応液の開発と超高速 PCR 装置を開発し、短時間 PCR を達成する。最終的に、96 サンプルを 10 分以内で PCR ができる装置とその反応液が開発できた。これにより、数多くの検体を短時間で検査することが可能となる。

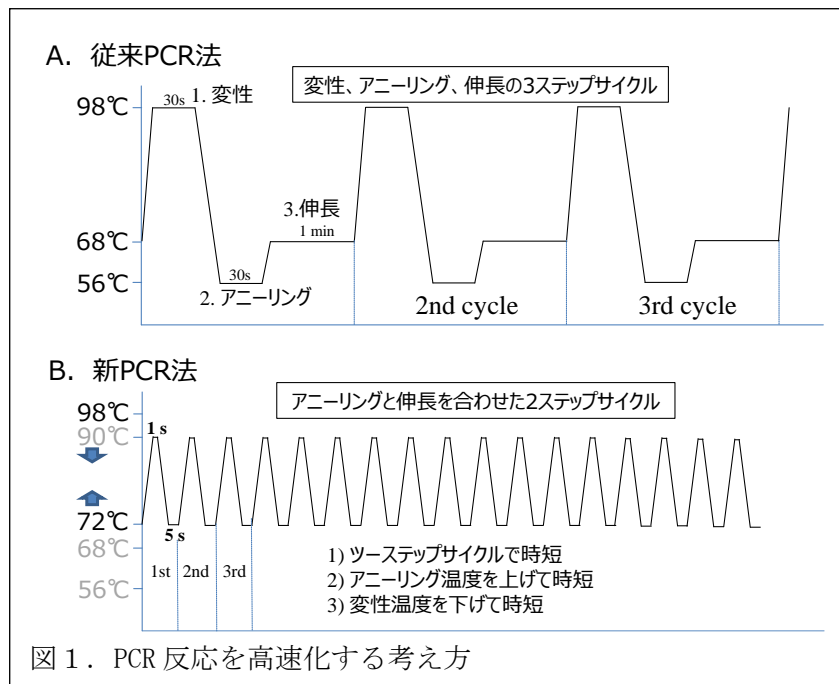
2. 概要

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 を検出するために PCR 検査が行われている。その検査時間は、臨床検査技師一人で少なくとも約 4 時間かかるため、検査結果通知まで数日かかることも珍しくない。この PCR 検査は、検体の採取→ウイルス遺伝子(核酸)の抽出→ウイルス遺伝子の増幅(PCR 反応)→増幅産物検出の工程で行われ、4 時間の内、PCR 反応時間が約 2 時間をしめ、PCR 反応時間短縮が課題である。

特に新型コロナでは、無症状の時期に人への感染が起こるので、感染した恐れのある人は、症状がなくても検査をすべきである。しかし、検査の煩雑さや検査時間がかかり、処理検体数に限界が来ている。

そこで、本研究では、PCR 反応と装置を一から見直し、時間短縮できる DNA ポリメラーゼと最適な反応条件を探索、および、超高速 PCR 装置を開発することを目的とした。これにより、PCR 反応を現在の 2 時間から、10 分以下に短縮することを目標とし、新型コロナなどのパンデミック検査体制構築に貢献する。

PCR 反応開発の考え方を図 1 に示す。従来の PCR 反応では、変性、アニーリング、伸長の 3 つの反応があるが、アニーリングと伸長反応を同一温度にしたツーステップサイクルを採用し、変性温度を下げ、アニーリング・伸長反応温度を上げ、高速反応が可能な DNA ポリメラーゼを用意し、同時に高速の温度制御が可能なサーマルサイクラーを開発することにした。特に装置の開発には、山口県宇部市の食品機械メーカーである(株)ヤナギヤの全面的な協力を得て進めた。



3. 研究成果および今後の課題

PCR 反応の開発

DNA の変性温度を調べると、通常の 98°C から 90°C に下げても反応が進行することがわかった。また、プライマーを通常の 25 塩基程度から 50 塩基程度のプライマーに変更することにより高温 (72°C~80°C) でも反応が進行することを見出した。これらのことからアニーリング反応と伸長反応を同時に実施することができるようになり、PCR 反応サイクルは通常の 3 ステップから 2 ステップで実施できるようになった。

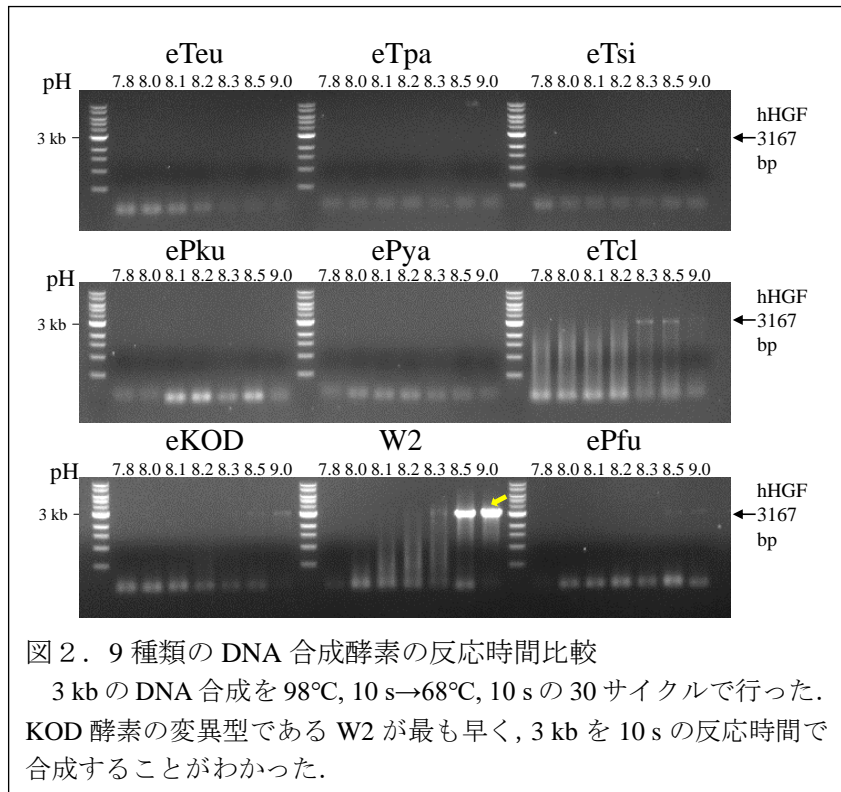


図 2. 9 種類の DNA 合成酵素の反応時間比較

3 kb の DNA 合成を 98°C, 10 s → 68°C, 10 s の 30 サイクルで行った。KOD 酵素の変異型である W2 が最も早く、3 kb を 10 s の反応時間で合成することがわかった。

高速反応用の DNA ポリメラーゼの選定

高速反応用の DNA 合成酵素を選択するために 9 種類の DNA 合成酵素を比較して解析を行った (図 2)。この結果、変異を持つ W2 酵素が非常に速い合成を行うことがわかった。

そこで、この酵素と市販の酵素を比較した (図 3)。市販の酵素を含む 3 つの酵素では、711 bp の合成が最短設定である 1 秒の伸長反応でもできることがわかった。しかし、この反応でも時間が 17 分かかるので、これは装置に問題がある。そこで、超高速の装置の開発が必要となった。

超高速水冷 PCR 装置の開発

PCR 装置には PCR 用ペルチェ素子 (温度制御用熱素子) が使われ、装置の冷却は空冷で行われている。ハイパワーペルチェ素子は強力すぎて、空冷では冷却できないので PCR 用としては使用されていない。そこで、ハイパワーペルチェ素子と冷却

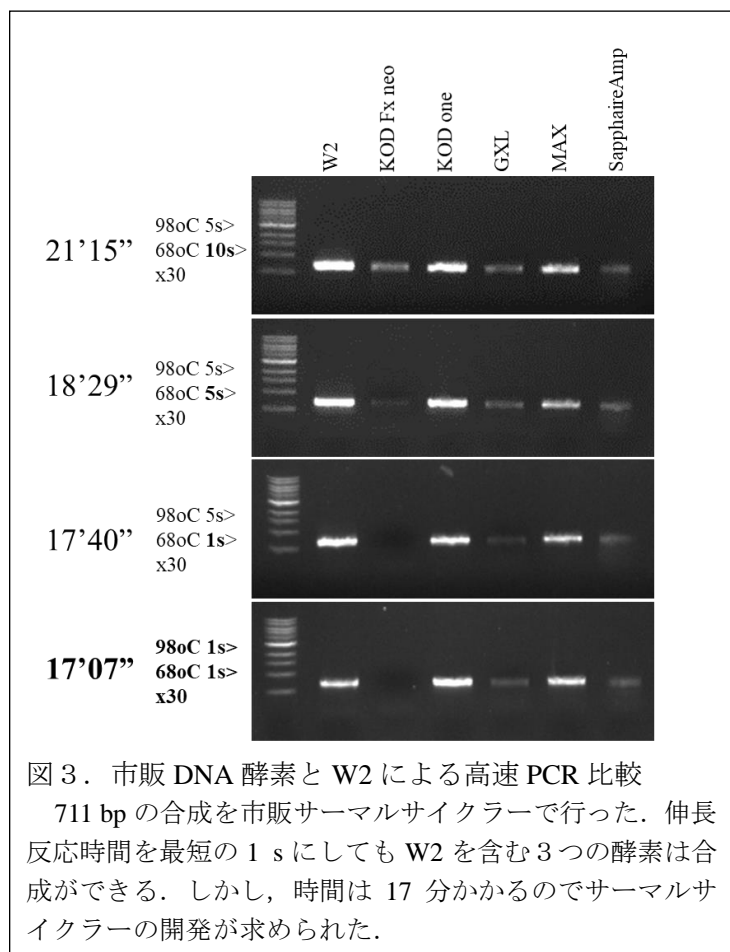


図 3. 市販 DNA 酵素と W2 による高速 PCR 比較

711 bp の合成を市販サーマルサイクラーで行った。伸長反応時間を最短の 1 s にしても W2 を含む 3 つの酵素は合成ができる。しかし、時間は 17 分かかるのでサーマルサイクラーの開発が求められた。

能力の大きな水冷装置を合体させた水冷高速 PCR 装置を作製した(図 4).

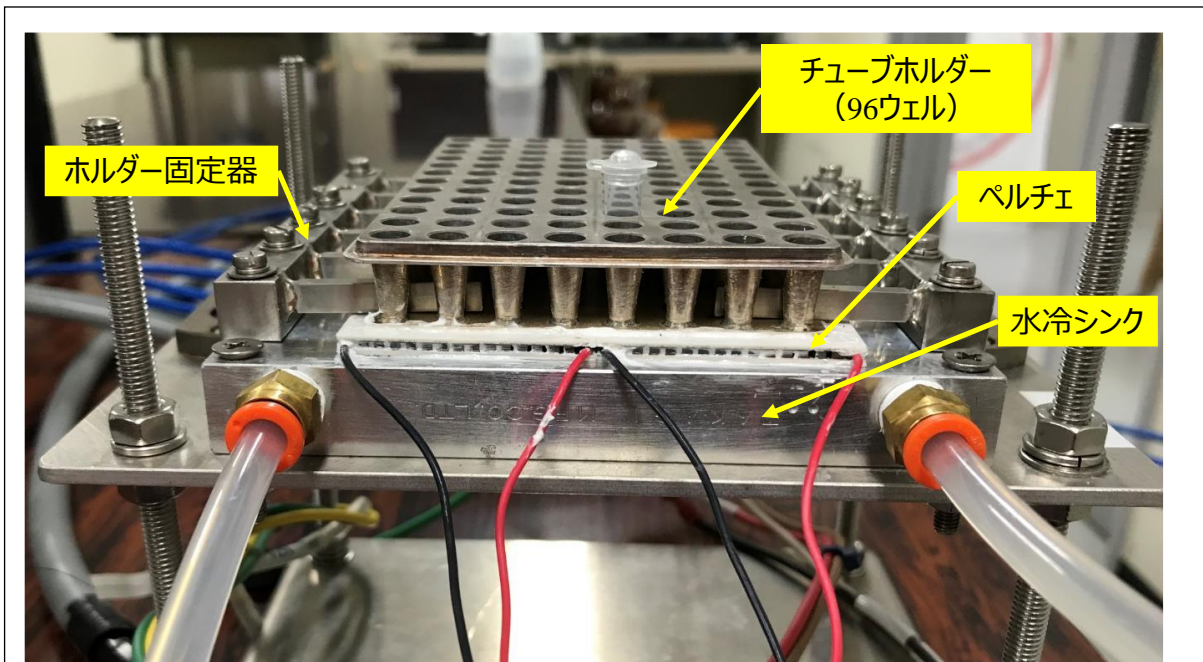


図 4. 水冷高速 PCR 装置試作機

開発した超高速 PCR 装置と従来の装置での反応時間を比較した(図 5).

従来の PCR 装置の上昇と下降の時間が超高速 PCR 装置では著しく短縮されたので、伸長時間が長い設定でも従来の装置よりも早いサイクルが達成できる. この装置で、最短サイクル反応を調べた(図 6).

超高速 PCR 反応

図 6 に示したように、 102°C , 1 s と 68°C , 5 s の 30 サイクルで PCR を行っても、8 分以内で反応が終わり、W2 は十分な DNA を合成することが

できた. 図 4 に示すように、これは 96 ウェルでの反応装置なので、96 検体を同時に 8 分以内で、PCR ができることを示している. これは、PCR 検査において、格段の時間短縮ができる装置となった.

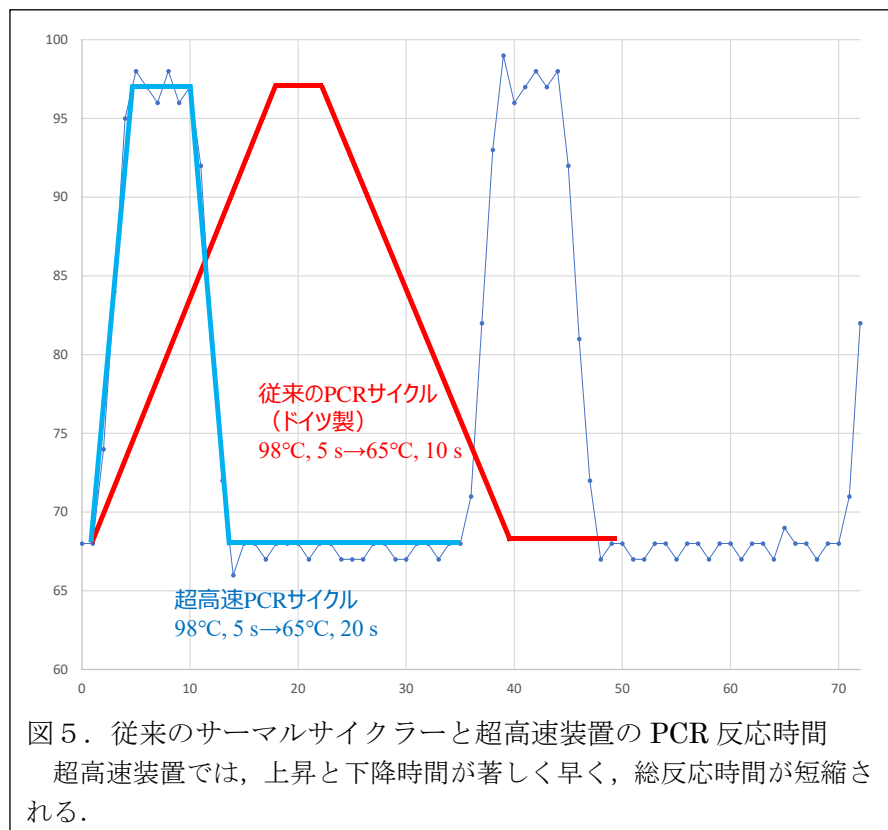


図 5. 従来のサーマルサイクラーと超高速装置の PCR 反応時間
超高速装置では、上昇と下降時間が著しく早く、総反応時間が短縮される.

超高速水冷サーマルサイクラー

これまで、超高速サーマルサイクラーの試作機を開発できたが、量産装置を求めるために、水冷冷却装置を既存の水冷コンピュータの冷却ユニットを利用して開発してみた。水冷PC用ラジエーターやポンプで十分な能力を得ることができたので、水冷装置の実用化も達成できることがわかった。

4. おわりに

本研究で開発した超高速水冷PCR装置は、96サンプルを扱える世界最速のPCR装置となっている。新型コロナウイルスなどの新興感染症の検査において、必要な検査体制を構築できる貴重な検査装置技術となる

5. 本研究の今後の計画

量産、市販化する企業を探している。

6. その他

(1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

水冷サーマルサイクラーの基本特許は出願されていたが、権利化されてはいなかったため、本装置は日本においては侵害する特許はないと予想された。現在、特許化が可能な部分を探している。

(2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

特になし

(3) 本研究会の参加企業・団体名

株式会社ヤナギヤ

山口県宇部市大字善和 189-18

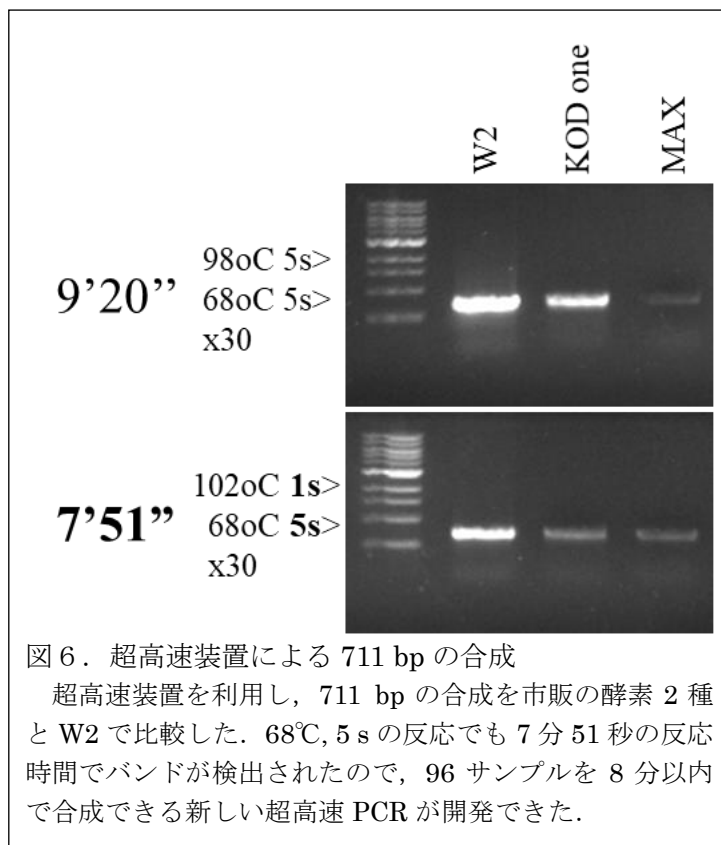


図6. 超高速装置による711 bpの合成

超高速装置を利用し、711 bpの合成を市販の酵素2種とW2と比較した。68°C、5sの反応でも7分51秒の反応時間でバンドが検出されたので、96サンプルを8分以内で合成できる新しい超高速PCRが開発できた。



競輪の補助事業

この報告書は、競輪の補助により作成しました。

<https://jka-cycle.jp>