

〈特集：検査技術の新たな展望（1）〉

全自動遺伝子解析装置「GENECUBE®」 を用いた遺伝子検出法の開発

曾家 義博

Development of molecular testing using novel gene analyzer, GENECUBE system

Yoshihiro Soya

Summary Recently, the associations of several genetic differences with the pathogenesis of several diseases, therapeutic outcomes by some treatments, and other important issues related to human health care have been intensively studied after the total full genome sequence of human has been completed. Therefore, simple and reliable methods for genetic analyses have been also intensively studied and developed. The GENECUBE®, a novel fully-automated rapid genetic analyzer, is one of the new genetic analysis devices. GENECUBE® can run all procedures automatically (e.g., extraction nucleic acids from bio-materials, mixing reagents with sample, amplification of nucleic acid and detection of the target gene). In addition, it takes about only one half hour to complete all procedures. Analysis by the GENECUBE® is based on the hybridization of the allele-specific fluorescence-conjugated probe for the site including SNPs of the PCR products Using the specific DNA polymerase, PCR amplification can be completed within 20 min. The hybridization is followed by melting analysis. The time required for one SNP analysis is within 30 min, and the system can analyze several samples at the same time. Therefore, the GENECUBE® is now considered the most clinically practical device for genotyping analysis. Thus, we intended to fur ther develop the GENECUBE®-based system for the analyses of SNPs of CYP2C19 and 23S rRNA of *H. pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. We confirmed that the SNP analyses of CYP2C19, 23S rRNA of *H. pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* by the GENECUBE® completely correlated with the results by the other genetic testing methods.

Key words: Molecular testing, Rapid analysis, Full-automated, SNP, Infections disease

I. はじめに

近年、遺伝子解析技術の進歩により病気や治療、病原菌に関する多くの遺伝子情報が明らか

になってきました。それに伴い、臨床検査にも遺伝子を利用した検査法が広がりつつあります。遺伝子検査は血液や組織などの生体試料に含まれる遺伝子を抽出し、得られた遺伝子を酵素反

東洋紡株式会社 敦賀バイオ研究所
〒914-0047 福井県敦賀市東洋町10番24号

Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO Co., Ltd.,
10-24 Toyo-cho, Tsuruga, Fukui 914-0047, Japan

応で増幅することによって、病気に関与する因子を特定する検査です。ごく少量の生体試料から病原菌を特定することが可能で、感染症検査分野においては非常に有用な方法と期待されてきました。しかし、検査にかかる操作が煩雑な上、結果を得るまでに長時間を要するため、その有用性にもかかわらず、特定の感染症項目を除き臨床現場では広く普及していませんでした。そこで弊社は長年培ってきた遺伝子研究用試薬の独自技術を基盤とし、その技術を診断分野に応用して簡便性と迅速性を兼ね備えた全自動遺

伝子解析装置「GENECUBE®」を開発しました。以下、GENECUBE®システムについて概説します（図1）。

Ⅱ. 「GENECUBE®」システムの特長

GENECUBE®は、遺伝子検査に要求される3つの工程、すなわち核酸抽出、増幅、検出までの全ての工程を、全自動でかつ短時間（1時間以内）で行うことのできるシステムです。



図1 GENECUBE®外観

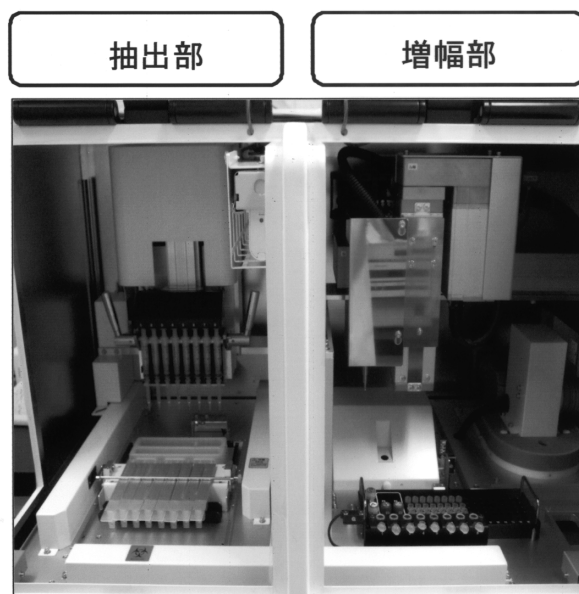


図2 GENECUBE®内部

1) 簡便性

検査対象となる試料、試薬および消耗品をGENECUBE®のタッチパネルに表示される指示に従って装置にセットするだけの簡単な準備で遺伝子検査を実施することができます(図2)。

従来の遺伝子検査の課題であった核酸抽出工程や試薬分注工程の操作の煩雑さは自動化により解決し、本システムでは装置内でコンタミネーション対策を行うことでコンタミネーション防止のためのエリア分けも必要ありません。

2) 迅速性

専用の核酸抽出試薬と増幅検出試薬を用いることによって、1時間以内で結果が得られます。検査結果を当日の診療に反映することが可能になります。

これまでの遺伝子検査では検体の前処理を行う工程、標的遺伝子の特定領域を増幅する工程及び増幅された産物を検出する工程からなり、少なくとも解析完了まで2時間以上かかっていました。本システムは、高速な核酸増幅が可能な試薬、独自の反応容器、急速な温度変化可能な装置により迅速測定を可能にしました。

3) 発展性

核酸の増幅には、最も汎用され、信頼性の高いPCR法を採用しておりますので、これまでの知見を生かした様々な核酸解析に応用可能です。ハウスメイドで使用されているPCR用プライマーを用いることで、既に実施されている遺伝子検査の特異性を低下させることなく、必要な測定項目を適用することができます。

Ⅲ. 測定原理

1) 核酸抽出

カオトロピック剤と検査対象試料を混合し、細胞や組織、菌体から核酸を抽出します。粘性の強い試料や、血液が混入している場合には、試料の均一化あるいは細胞を破壊する手段としてジルコニアビーズを用いた前処理を行うことによって、核酸の抽出効率を向上させることができます。均質化された試料から、カオトロピック剤存在下で核酸がシリカに吸着する性質を

利用して、核酸を抽出します。核酸吸着担体には、シリカモノリスチップを使用し、市販の注射用ディスポーザルシリンジと組み合わせることによって装置内へのエアロゾルの発生を回避し、吸引吐出による核酸精製・濃縮を行いません(図3)。

2) 核酸増幅、検出

核酸の増幅は「Polymerase Chain Reaction (PCR) 法」で行います。PCRは、温度変化を伴う増幅方法のため、これまでのブロックタイプの増幅装置では溶液の温度変化を迅速に行うことが困難でした。高速な温度変化を達成するため、容積あたりの表面積を大きくすることができるキャピラリーを増幅容器として使用し、温度媒体に空気を用いたエア−サイクラーを採用することによって、迅速な温度変化が可能な増幅システムを構築しました。またPCR酵素に高速増幅可能なKOD DNAポリメラーゼを用いることで解析まで1時間以内という迅速な測定が可能になりました。

増幅された核酸の検出には「蛍光標識プローブ (QProbe)」を用いた融解曲線解析を用いました。QProbeは検出対象の核酸配列と相補的な配列であり、末端のシトシンに蛍光色素が結合した、非常にシンプルな設計にも関わらず、一塩基の相違まで検出が可能な特異性を有しています(図4、5)。

配列の設計がシンプルなため、様々な項目に応用しやすく、汎用性の点でも優れています。

Ⅳ. 臨床応用

GENECUBEシステムには、検出対象の核酸配列を検出することができるプライマーとプローブを設計することによって、様々な遺伝子を検出できるようになります。に臨床応用されている分野には、感染症検査とヒト遺伝子検査が挙げられます。以下にそれぞれの分野で応用されている試薬について紹介します。

1) 感染症検査

現在、臨床検査で用いられている遺伝子検査の中で、広く使用されているシステムは結核菌

や肝炎ウイルス、性感染症原因菌などの感染症原因微生物を検出、定量する方法です。感染症の原因菌の中には培養に時間のかかる微生物や培養できない微生物があります。感染拡大防止と治療の観点から、それらの病原微生物をより迅速で正確に同定できる方法が必要でした。そこで培養よりも短時間で微生物の同定が可能な遺伝子検査が注目され、多くの施設で遺伝子検査が行なわれています。

弊社では感染症の中でも特に、培養に時間を

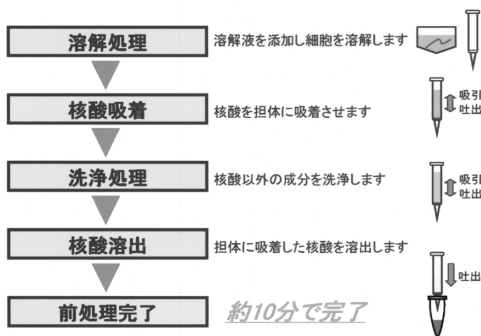


図3 GENECUBE®システムの核酸抽出

要し、かつ迅速な検査が必要である結核菌検査に着目しました。従来法では検査結果がわかるまで半日以上かかること、またシステムの構成のため検体をまとめて測定するなど、迅速性が求められる検査でありながらその要望に十分応えることが困難でした。そのため、弊社ではGENECUBEシステムを抗酸菌検査に適用することによって、塗抹検査の結果が得られてから、1時間以内に結核菌の同定結果がわかる結核菌群検出試薬「ジーンキューブ®MTB」、非結核性抗酸菌のマイコバクテリウムアビウム・イントラセラーを検出するMAC検出試薬「ジーンキューブ®MAC」を開発しました(図6)。抗酸菌の中から結核菌群と非結核性抗酸菌のMACを迅速に同定することができるので、早期治療および、院内感染防止に貢献することが期待されます。

試薬はプレミックスタイプで、消耗品類も1サンプルずつ使用できるため、少ない検体数でもロスが少ないことも特徴です。

その他の感染症検査試薬としては、胃がんのリスクとして知られているヘリコバクターピロリの薬剤耐性検査「ジーンキューブ®テストピロ

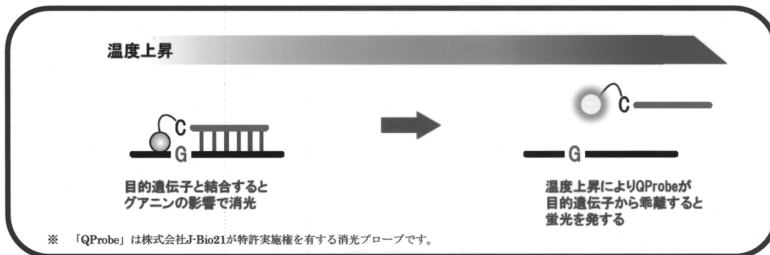


図4 GENECUBE®システムの検出原理 (QProbe法)

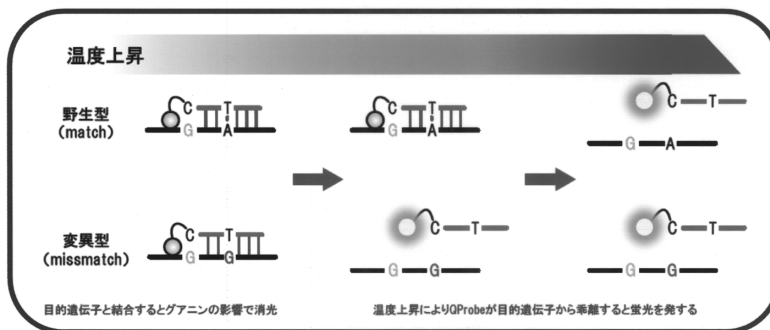


図5 QProbeによるSNPs検出

リ23SrRNA」があります。胃液あるいは胃粘膜を簡易な処理を行った後、試料中に存在するヘリコバクターピロリの23SrRNA遺伝子上に存在する変異を検出することによって、除菌治療に用いられるクラリスロマイシンに対する耐性を判定することができます。23SrRNAに変異が生じると、リボゾームの構造が変化するため、クラリスロマイシンが結合することができず結果としてピロリ菌に対して抗菌活性が大きく低下してしまいます。ピロリ菌の除菌投薬前にマク

ロライド系抗菌薬に対して耐性のピロリ菌か感受性のピロリ菌かが判定できれば、有効な治療法を選ぶことができるため、除菌成功率が改善することが報告されています（図7）。

今後も感染症起因菌の迅速検査ラインナップを拡充することによって、早期診断および早期治療ならびに院内感染対策に繋げられるシステムへと進化させていく予定です。

2) ヒト遺伝子検査

ヒトの遺伝子検査は大きく2つに分けることができます。がん細胞の変異などを検査する体細胞遺伝子検査と体質などを検査する遺伝学的検査です。

体細胞遺伝子検査は体の一部の細胞に起こった遺伝子変異を検査します。がん細胞の遺伝子変異を検出することで抗体医薬の効果を予測する検査が2007年保険適用されました。あらかじめ遺伝子検査により薬剤の効果を予測して、患者さんに適した投薬量とすることで副作用の低減や不要な薬剤を投与しなくなることで医療費の削減が期待できます。

遺伝学的検査は先天的な遺伝子の異常から病気の発症予測や薬物に対する反応性の個体差を判定する目的で行われています。例えば、「CYP2C19遺伝子多型に基づくテララーメードのヘリコバクター・ピロリ除菌療法」など先進医療として認められているものもあります。GENECUBE®の研究用試薬として薬物代謝酵素であるCYP2C19*2及びCYP2C19*3を検出する試薬「ジーンキューブ®テストCYP2C19*2」「ジーンキューブ®テストCYP2C19*3」を開発しました（図8）。SNPs解析を行うことで薬剤の効果を予測することが可能となります。本試薬では、血液から2～3分の前処理を行うだけで、核酸抽出を行うことなくCYP2C19の多型を30分程度で調べることができます。

薬物代謝酵素の多型によって様々な薬剤の効き方が異なっていることが明らかになってきていることから、検出可能な遺伝子多型のラインナップを拡充予定です。

3) ハウスメイドの遺伝子検査

遺伝子検査は多くの施設で利用されており、

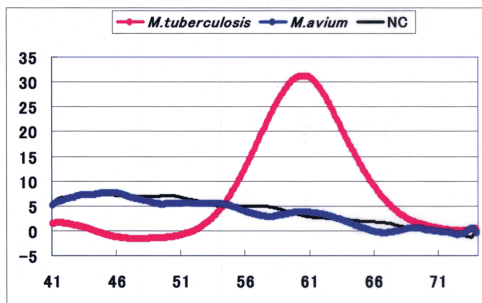


図6 ジーンキューブ®MTBにおける結核菌群のDNA検出例

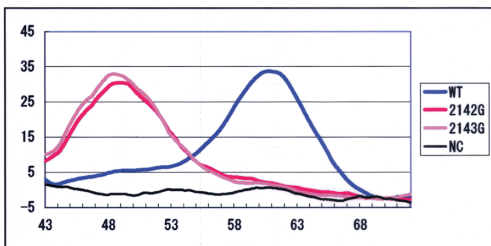


図7 ジーンキューブ®テストピロリ23SrRNAにおけるピロリ菌23SrRNA遺伝子変異の検出例

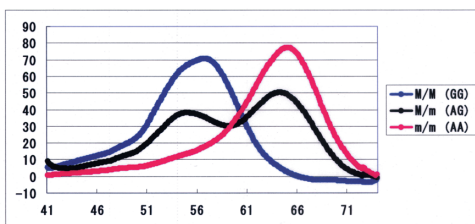


図8 ジーンキューブ®テストCYP2C19*3における検出例

様々な測定項目が施設独自の方法で実施されています。

SNPs解析や薬剤耐性遺伝子検査は1つの施設でもPCRシーケンス解析やRFLP法、リアルタイムPCR法などの複数の遺伝子検査手法を用いて検査していることも少なくありません。このような複数の異なる遺伝子解析を統一するためのツールとしてGENECUBE®を利用することができます。汎用試薬として販売している「ジーンキューブ®テストベーシック」は、既存のプライマーとシンプルな設計のQProbeを新たに合成して使用することでユーザー独自の項目を本システムに適用することができます。

V. おわりに

GENECUBE®システムは従来の遺伝子検査の煩雑さ、時間がかかるという課題を解決するため「簡便」「迅速」をコンセプトとして開発して参りました。核酸抽出、試薬分注を含めた自動化、解析まで1時間以内という短時間化を達成し、臨床的にも有用性の高いプラットフォームを構築することができました。感染症検査では体外診断用医薬品として「ジーンキューブ®MTB」「ジーンキューブ®MAC」、研究用試薬

としてピロリ菌23SrRNA遺伝子変異検出試薬、ヒト遺伝子検査では研究用試薬として薬物代謝酵素CYP2C19*2,*3検出試薬に加え、今後はさらに感染症を中心にがん関連遺伝子検査などへも測定対象項目を拡大し、臨床での遺伝子検査をトータルでサポートしていきたいと考えています。

簡便、迅速な検査ができる本システムは、感染症の拡大抑制や病気の早期治療、さらにはテーラーメイド医療に貢献できるシステムであると思います。

文献

- 1) M.Kitabayashi et al.: Gene cloning and polymerase chain reaction with proliferating cell nuclear antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(10): 2194-2200, 2002.
- 2) S. Kurata et al.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res*, 29(6): E34, 2001.
- 3) S. Kurata et al.: Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Anal Sci*, 17(1): 155-160, 2001.