

特別 WEB
コラム

PCR 法による検査(原理)

永井秀典

産業技術総合研究所

1. まえがき

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に関するニュース等において、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法の名称がしばしば取り上げられたこともあり、最近では、「PCR」という用語は世間一般にも広く知られる様になった。PCR 法は、キャリー・マリス博士が、ベンチャー企業に在籍時に発明した核酸の増幅法であり、1993 年度ノーベル化学賞を受賞するに至った技術である。DNA や RNA を扱う基礎研究のみならず、臨床検査や環境衛生、犯罪捜査といった幅広い領域にも、現在 PCR 法は利用されている¹⁾。

PCR 法の基本原理を図 1 に示す。試料 DNA (鋳型 DNA) と、その中の標的配列を認識して挟む様に結合する 2 種類の 20 塩基程度の短い 1 本鎖オリゴ DNA (プライマー) と、DNA の材料となる核酸モノマー (dNTP) に、それらを重合する耐熱性 DNA ポリメラーゼ酵素を混合して PCR 溶液を調製する。その PCR 溶液を専用のサーマルサイクラーにて、二本鎖 DNA を一本鎖に解離させる変性温度 (約 95°C) と、プライマーを結合 (アニーリング) させる一本鎖の鋳型 DNA から 2 種類のプライマー配列に挟まれた領域を二本鎖 DNA に複製する伸長温度 (50~70°C 程度) の間を繰り返し温度変化 (サーマルサイクル) させることで、標的配列の DNA を指数関数的に増幅する手法である。また、RNA から逆転写反応 (RT) により DNA を合成後、PCR 法に供する手法を RT-PCR 法と呼び、特に、逆転写酵素をあらかじめ反応系に混合することで、RT と PCR を同一反応液中で行う RT-PCR 法を One-step RT-PCR 法と呼ぶ。また、標的配列の合成と同時に蛍光を発するプローブを用いて、PCR による DNA 増幅と定量を同時に実施するリアルタイム PCR 法、さらには、RT を組み合わせたリアルタイム RT-PCR 法やリアルタイム One-step RT-PCR 法といった派生技術も広く利用されている。特に、リアルタイム PCR 法については、複数の標的配列を同時に定量できる様に、異なる蛍光色素で標識したオリゴ DNA タイプのプローブとプライマーのセットを複数混在させた系をマルチプレックスリアルタイム PCR 法と呼び、感染症の多項目同時検査などに活用されている。

上述の通り、PCR 法は手法の組み合わせにより多岐にわたるが、プライマーを用いて標的となる遺伝子配列を特異的に認識できる点が特徴である。仮にプライマーの長さが 20 塩基の場合、DNA の塩基は 4 種類であるから $4^{20}(=1兆)$

種類の組み合わせが存在し、原理的に多種多様な生物種に対しても特異的に検出可能である。

そして、PCR 法の最大の特徴は、理論上、反応液中に鋳型 DNA が 1 分子でも存在すれば指数関数的に増幅することで、例えば 40 回のサーマルサイクルであれば、 $2^{40}(=1兆)$ 倍まで増幅し、標的配列の DNA を極めて高感度に検出できることである。とはいえ実際には、試料 DNA を数分子 / 反応まで希釈すると、確率的に反応液中に DNA を含まない場合が増え、サンプルサイズが少ないと検出が困難となり、現実的な検出限界は 10~100 コピー / 反応となる。

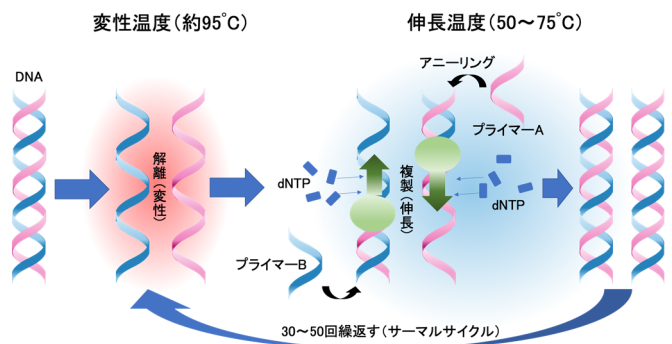


図 1 PCR の原理。

2. 新型コロナウイルスの PCR 検査

2.1 新型コロナウイルスの標的遺伝子

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) も RNA をゲノムとする RNA ウイルスであることから、RT-PCR 法により高感度に検出が可能である。新型コロナウイルスの PCR 検査における標的遺伝子は、感染症対策を担う研究所が提供するプロトコルが国によって異なっているが、主には、ヌクレオ (N) タンパク質、エンベロープ (E) タンパク質、非構造タンパク質をコードする ORF1ab やその一部の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) が選定されている。本邦においては、国立感染症研究所のプロトコル (病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1) に従えば、リアルタイム One-step RT-PCR 法による検出には、N タンパク質の 2 ヶ所の領域を標的としている。また、米国 CDC では N タンパク質の 3 ヶ所、中国では N タンパクと ORF1ab、ドイツでは RdRP と E タンパク、フランスでは RdRP の 2 ヶ所と E タンパク質を標的としているが、E タンパク質を除く各標的

遺伝子については国毎に異なる配列を選定しており、国際的には統一されていない。なお、SARS-CoV-2においては、突然変異が頻発することが知られているため、標的遺伝子には1種類ではなく、複数種類を検査するプロトコルがほとんどである。

2.2 PCR検査の性能

PCR検査においては、標的配列の選定が検査の感度や特異度に影響するため極めて重要である。標的配列がゲノムに複数コピー存在すれば検出限界において有利に働き、一方、ヒトゲノムやその他の病原体の遺伝子配列と相溶性が高いと特異度において問題となる。また、プローブを用いるリアルタイムPCR法においては、鋳型DNAとの結合親和性に寄与するプライマーとプローブの融解温度(T_m)のバランスも重要なファクターであり、プローブの T_m がプライマーに比べ低めであると、プローブの利用効率が低下し感度も低下する。実際に、SARS-CoV-2の代表的な標的遺伝子ごとに検査キットの性能を比較した結果、標的遺伝子によって感度が異なるという報告がある²⁾。

また、PCR検査の性能として、検査時間と処理能力も用途に合わせ考慮すべきである。最も汎用的なリアルタイムPCR装置のスペックにおいては、遺伝子増幅に1~2時間を要するが96サンプルを同時に検査可能である。時間あたりの処理数(スループット)で考えると、0.8~1.6サンプル/分であるが、当然、検体が届いてから1分程度で検査ができるわけではない。大量の検体を集めて纏めて検査する場合には、同時処理能力を重視すべきであるが、例えばクリニックの様に、次々と検体が提出され速やかに結果を返す必要がある場合、検査時間の迅速さが求められる。

2.3 高速PCR技術

そのため、PCR検査の迅速化のため、高速なサーマルサイクラーの開発が長年進められてきた³⁻⁵⁾。高速な温度変化には、大過剰の熱量を供給すれば良いが、通常PCR溶液は12~25 μ lと僅かなため、急激な温度変化条件はオーバーシュートを招き、容易に変性温度の95°Cを超えて瞬時に蒸発しかねない。そこで、あらかじめPCR法に必要な変性温度と伸長温度のヒーターを複数用意しておき、それらに接する様に数十~数百 μ m幅のマイクロ流路を配置し、その中をPCR溶液が送液することで、繰り返し変性温度と伸長温度に交互に触れるサーマルサイクラーが考案された(図2)^{3, 6, 7)}。この原理であれば、マイクロ流路を介して高速な熱交換が可能であるが、変性温度以上に加熱される恐れは全くない。また、容器となるマイクロ流路のヒーター接触部は、常に一定温度に加熱された状態であるから、実際に温度変化する物体は、マイクロ流路内を移動するPCR溶液のみであり、理論上最も効率的と言える。実験により確かめられた温度変化の平均速度は約18°C/sであり、実際に40サイクルのPCR検査を比べた場合、汎用機の1

時間に比べ7分以内までPCRの時間を短縮可能であった。この高速PCR技術を用いて、SARS-CoV-2のゲノムRNAからリアルタイムOne-step RT-PCR法により検出感度を確認した場合、検出限界レベルの10コピー/反応の濃度であっても、15分以内に検出が可能であった⁸⁾。

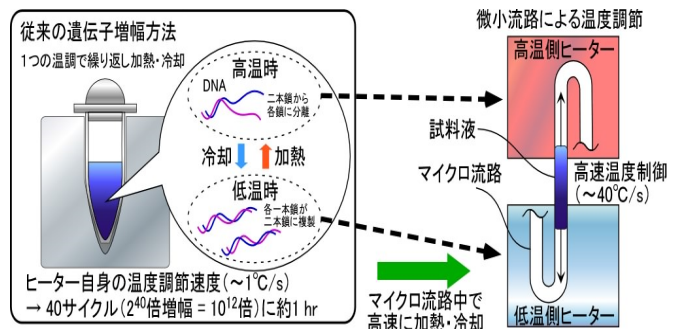
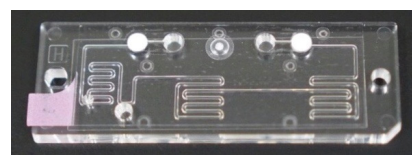


図2 マイクロ流路を用いた高速PCR技術のイメージ。



サイズ: 76 x 26 mm
流路幅: 500~700 μ m

図3 杏林製薬株式会社から製品化された高速PCR用マイクロ流路。

3. むすび

上述の高速PCR技術を用いたSARS-CoV-2に対する機器と検査試薬は既に市販化されているが、検体採取や試料前処理を含めた精度管理などPCR法以外のプロセスも肝要である。今後、採取が容易な唾液を用いた検査や、前処理不要なPCR試薬の活用が進めば、SARS-CoV-2のPCR検査はより身近になると考えられる。そして、SARS-CoV-2をはじめ様々な新興ウイルス感染症に対して、PCR検査が空港の検疫等の迅速検査として活用され、我々の安全と安心を守るために活用されることを期待している。

文献

- 1) Y.M. Denis Lo, Rossa W.K. Chiu and K.C. Allen Chan: *Clinical Applications of PCR* (Human Press, 2006).
- 2) X. Liu, J. Feng, Q. Zhang, D. Guo, L. Zhang, T. Suo, W. Hu, M. Guo, X. Wang, Z. Huang, Y. Xiong, G. Chen, Y. Chen and K. Lan: *Emerg. Microbes. Infect.* **9**, 1175 (2020).
- 3) M.U. Kopp, A.J. de Mello and A. Manz: *Science* **280**, 1046 (1998).
- 4) E.K. Wheeler, C.A. Hara, J. Frank, J. Deotte, S.B. Hall, W. Benett, C. Spadaccini and N.R. Beer: *Analyst* **136**, 3707 (2011).
- 5) P. Neuzil, C. Zhang, J. Pipper, S. Oh and L. Zhuo: *Nucleic Acids Res.* **34**, e77 (2006).
- 6) S. Furutani, N. Nariishi, Y. Hagihara and H. Nagai: *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5641 (2016).
- 7) S. Furutani, Y. Hagihara and H. Nagai: *Meat Sci.* **131**, 56 (2017).
- 8) J. Sakai, N. Tarumoto, Y. Orihara, R. Kawamura, M. Kodama, N. Matsuzaki, R. Matsumura, K. Okane, T. Kawamura, S. Takeuchi, K. Imai, T. Murakami and T. Maeda: *J. Hosp. Infect.* **105**, 615 (2020).

脱稿日 2020年7月1日



永井秀典(ながい ひでのり)

2001年3月北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士課程修了、博士(材料科学)。02年4月より現職。15年ベンチャー創業と共にCTOを兼務後、17年杏林製薬株式会社へ事業譲渡に伴い同職を退任。平成28年度日本感染症学会東日本地方会最優秀賞受賞。趣味:ドライブ。