

研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム
FS ステージ シーズ顕在化タイプ 事後評価報告書

研究開発課題名	: ローリングサークル型増幅法を用いた、「生きた微生物の直接検出法」の開発
プロジェクトリーダー	: 関東化学(株)
所属機関	: 関東化学(株)
研究責任者	: 小堀俊郎((独)農業・食品産業技術総合研究機構)

1. 研究開発の目的

ローリングサークル型増幅法を基盤として開発された RNA の特異的検出技術である RPRCA 法は、RNA 検出にあたって逆転写反応が不要であることに加えて室温付近で反応が進行するといった特色がある。そこで本研究開発では RPRCA 法をシーズ候補として活用し、生きた微生物やウイルスに発現する mRNA の新規検出方法を開発する。最終目標には POCT 市場への展開を志向し、従来の生化学的手法(イムノクロマト等)の簡便性と分子生物学的手法(PCR 等)の高い検出感度と特異性を併せ持つ検出試薬の製品化を据え、目標達成に不可欠な要素技術である高感度化に焦点を当てた研究を行う。

2. 研究開発の概要

①成果

シーズ候補である従来型 RPRCA 法による mRNA の検出感度は 109 コピー/mL であり、微生物検出技術として実用化するには不十分であったため、本課題では大腸菌 O-157 のペロ毒素 mRNA を対象として RPRCA 法の高感度化に取り組んだ。開発目標値としてペロ毒素 mRNA の簡易検出に必要な感度を 106 コピー/mL に設定した。RPRCA 法の反応溶液を最適化するとともに、ペロ毒素 mRNA 検出に用いる 1 本鎖環状 DNA プローブの構造を制御することにより、検出感度を目標値まで向上させることに成功した。これにより技術改良の目標は達成できたことから、改良した RPRCA 法の実用性評価については今後も継続して検討を進める。

②今後の展開

RPRCA 法の検出感度は目標値に到達したため、実用性評価の後に POCT 試薬としての製品要求事項について検討する。具体的な検討項目として、①検出時間の更なる短縮、②RNA 抽出から検出までのシステム化、③更なる高感度化、が考え得るが、対象とする微生物によって検討項目を適切に設定することが必要である。当面は、培養に非常に時間がかかる微生物を対象として RNA 抽出から検出までのシステム化について検討する。

3. 総合所見

一定の成果は得られており、イノベーション創出が期待される。RPRCA法を基礎として感度改善に関しては目標を達成する事が出来たが、実用性検証では、非特異的核酸増殖に由来すると推定される要因で、十分な成果が得られていない。