

PRESS RELEASE

2021年4月19日
理化学研究所
東京大学
京都大学
科学技術振興機構

新型コロナウイルスの超高感度・世界最速検出技術を開発

— 汎用的な感染症診断技術としての応用展開に期待 —

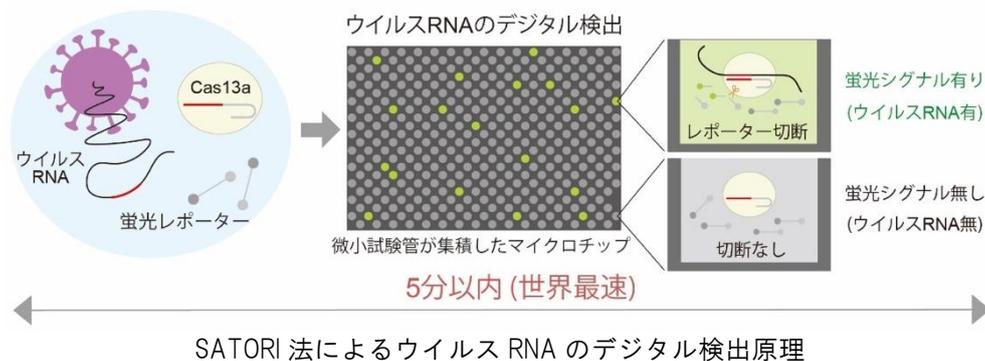
理化学研究所（理研）開拓研究本部渡邊分子生理学研究室の渡邊力也主任研究員、篠田肇研究員、東京大学先端科学技術研究センターの西増弘志教授、同大学大学院理学系研究科の濡木理教授、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の野田岳志教授らの共同研究グループ^{*}は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）由来のウイルス RNA を「1 分子」レベルで識別して 5 分以内に検出する革新的技術の開発に成功しました。

本研究成果は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）などの超高感度・迅速診断装置の開発を含む、次世代の感染症診断法の核心技術としての応用展開が期待できます。

現在、新型コロナウイルスの確定診断には、ウイルス RNA を精製した後 PCR 法^[1]などで増幅して検出する PCR 検査が主に行われています。しかし PCR 検査は、検出に最短で 1 時間程度かかり、検出エラーも発生することから、大量の検体を短時間かつ高精度に解析することが困難です。

今回、共同研究グループでは、世界最先端のマイクロチップ技術^[2]と核酸検出技術 CRISPR-Cas13a^[3]を融合させることで、世界最速の新型コロナウイルスの検出法「CRISPR-based amplification-free digital RNA detection; SATORI」法を開発しました。SATORI 法を用いると、5 分以内でウイルス RNA を 1 個ずつ識別して検出できます。検出感度は 5 フェムトモラー（fM、fM は 1000 兆分の 1 モーラー）であり、新型コロナウイルス感染者の検体中のウイルス RNA 量を検出する感度を満たしています。また、ランニングコストは 9 ドル程度と安価であるという利点もあります。

本研究は、科学雑誌『*Communications Biology*』のオンライン版（4 月 19 日付：日本時間 4 月 19 日）に掲載されます。



※共同研究グループ

理化学研究所 開拓研究本部	渡邊分子生理学研究室
主任研究員	渡邊 力也 (わたなべ りきや)
研究員	篠田 肇 (しのだ はじめ)
研究員	安藤 潤 (あんどう じゅん)
特別研究員 (研究当時)	田口 裕也 (たぐち ゆうや)
テクニカルスタッフ I	牧野 麻美 (まきの あさみ)
テクニカルスタッフ II	高橋 千春 (たかはし ちはる)
東京大学 先端科学技術研究センター	
教授	西増 弘志 (にします ひろし)
学術専門職員	岡崎 早恵 (おかざき さえ)
東京大学 大学院理学系研究科	
教授	濡木 理 (ぬれき おさむ)
大学院生	中川 綾哉 (なかがわ りょうや)
京都大学 ウイルス・再生医科学研究所	
教授	野田 岳志 (のだ たけし)
助教	中野 雅博 (なかの まさひろ)
助教	村本 裕紀子 (むらもと ゆきこ)

研究支援

本研究は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST 「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出 (JPMJCR19H5)」、三菱財団自然科学研究特別助成「新型コロナウイルス等感染症に関する学術研究助成」、日本医療研究開発機構 (AMED) ウイルス等感染症対策技術開発事業 (20he0622032h0001)、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (19fk0108113436、20fk0108270h0001)、JSPS 科研費 JP20H05931 をはじめとする諸機関からの支援によって行われました。

1. 背景

現在、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染診断では、主にタンパク質抗原を検出する方法 (抗原検査) とウイルス RNA を増幅して検出する方法 (PCR 検査) が利用されており、それぞれスクリーニング、確定診断など用途に応じて使い分けされています (図 1)。

感染が疑われる場合、抗原検査を用いたスクリーニングが行われます。抗原検査は 30 分程度と迅速かつ簡便にウイルスを検出できるため、スクリーニングには適していますが、検出感度や特異度^[4]の低さに起因する検出エラーの多さが問題となっています。一方、次のステージの確定診断として用いられている PCR 検査では、専門的な技術や装置を用いて検体から RNA を精製し、さらに増幅の過程を経て検出に至ります。PCR 検査は感度が優れ、確定診断に適していますが、検出の前処理に最短で 1 時間程度がかかること、また増幅に起因する検出エラーも発生することから、大量の検体を迅速に解析し、診断につなげることが困難です。そのため、PCR 検査の「感度の高さ」と抗原検査の「迅速・簡便さ」を両立させた新しいウイルス検出法の開発が急務とされてきました。



図1 従来の新型コロナウイルス感染症の診断法

抗原検査はスクリーニング用として行われ、PCR 検査で診断が確定される。

2. 研究手法と成果

今回、共同研究グループでは、理学と工学の異分野融合研究を推進することで、SARS-CoV-2 由来のウイルス RNA を「1 分子」レベルで識別して 5 分以内に検出する革新的技術を開発することに成功し、その手法を「CRISPR-based amplification-free digital RNA detection; SATORI) 法」と名付けました。

SATORI 法は、渡邊力也グループが専門とする「マイクロチップを利用した酵素反応の 1 分子検出技術」と西増弘志・濡木理グループが専門とする「核酸切断酵素 CRISPR-Cas13a (Cas13a)」に関する先進技術を融合させたものであり、特定の RNA 配列を認識する Cas13a と蛍光レポーター^[5]の混合液をバイオセンサーとして利用することで、検体中の標的ウイルス RNA の有無を高感度・高精度・迅速に検出できます。

SATORI 法によるウイルス RNA の検出原理は以下の通りです (図 2)。

- 1) 核酸切断酵素 Cas13a と蛍光レポーターの混合液にウイルス RNA を混ぜると、特異的にウイルス RNA と Cas13a の複合体が形成されます。
- 2) 複合体が形成されると Cas13a の酵素活性がオンとなり、蛍光基と消光基がつながった蛍光レポーターが切断されます。
- 3) 2) の複合体と蛍光レポーターの混合液を、3 フェムトリットル (fL、1 fL は 1000 兆分の 1 リットル) の微小試験管が 100 万個集積されたマイクロチップアレイに小分けにして封入すると、Cas13a の切断活性に伴いウイルス RNA が存在する試験管だけ蛍光シグナルが 1 分以内に大きく上昇します。
- 4) 蛍光シグナルの有無を二値化^[6]し、そのデジタル信号からシグナル有の微小試験管の個数をカウントします。カウントされる試験管の個数が検体中のウイルス RNA の個数に相当するため、ウイルス RNA の存在を 1 分子レベルで判別・検出できます。

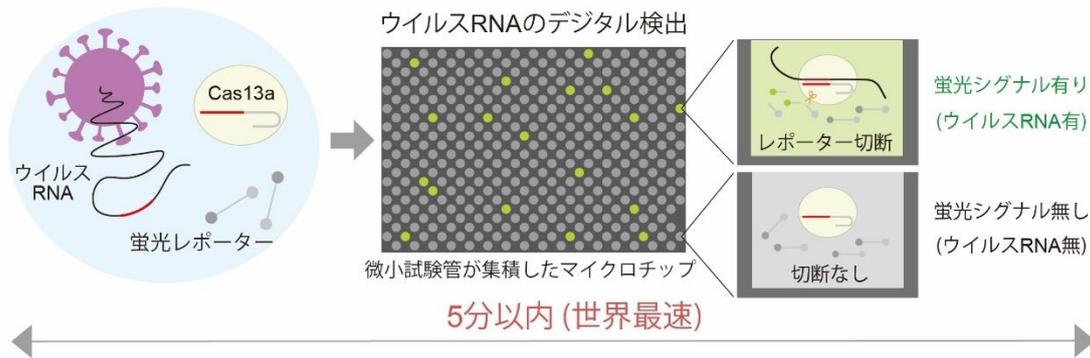


図 2 SATORI 法によるウイルス RNA のデジタル検出原理

核酸切断酵素 Cas13a と蛍光レポーター、検体のウイルス RNA を混ぜると、特異的にウイルス RNA と Cas13a の複合体が形成される。複合体が形成されると Cas13a の酵素活性がオンとなり、蛍光基と消光基がつながった蛍光レポーターが切断される。これをマイクロチップアレイに小分けにして封入すると、ウイルス RNA が存在する微小試験管だけ蛍光シグナルが 1 分以内に上昇する。マイクロチップの蛍光シグナルの有無を二値化し、そのデジタル信号からシグナル有の微小試験管の個数をカウントする。微小試験管内にウイルス RNA は 1 個だけ存在するため、カウントされる試験管の個数はサンプル中のウイルス RNA の個数に相当する。

SATORI 法を用いると、5 分以内にウイルス RNA を 1 個ずつ識別して検出できます (図 3a)。検出感度は 5 フェムトモラー (fM、1fM は 1000 兆分の 1 モーラー) であり、これはウイルス RNA の量で表すと、1 マイクロリットル (μL 、1 μL は 100 万分の 1 リットル) あたり約 10^3 個となります (図 3b)。この感度は従来の抗原検査法の $10^4 \sim 10^5$ 個/ μL と比較すると 10~100 倍高く、PCR 検査の $10 \sim 10^2$ 個/ μL と比較すると 10~100 倍低いということになります。ただし、SARS-CoV-2 感染者の検体中のウイルス RNA 量は、 $10^3 \sim 10^6$ 個/ μL であることから、SATORI 法は SARS-CoV-2 の感染診断を実施する上で必要な感度を満たしているといえます。

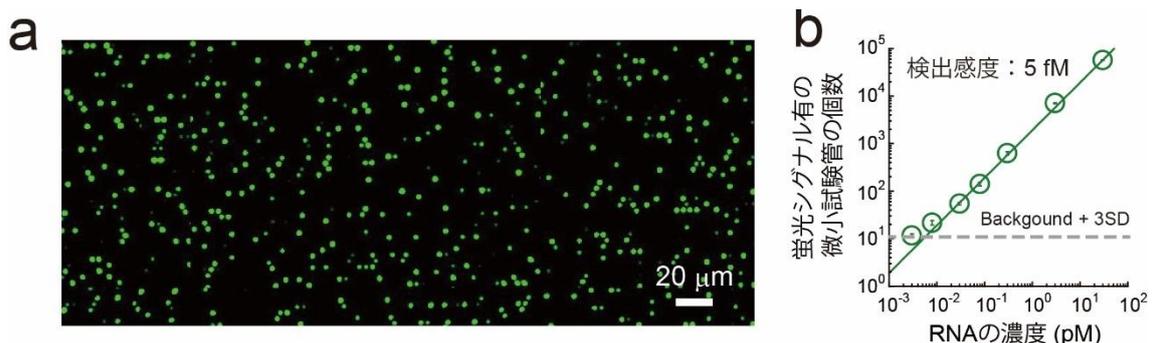


図 3 SATORI 法によるデジタル検出例

- (a) SATORI 法によるマイクロチップの蛍光画像。個々の輝点が 1 分子のウイルス RNA に相当する。
 (b) ウイルス RNA の濃度と蛍光シグナルが確認された微小試験管の個数の相関関係。検出感度は 5 fM。これをウイルス RNA の量にすると、 3×10^3 個/ μL となる。

3. 今後の期待

SATORI 法は、ウイルス RNA を「1 分子」レベルで識別して世界最高速度で検出できる革新的技術です。また、SATORI 法のランニングコストはおよそ 9 ドルで PCR 検査の 5 ドル程度とほぼ同等であるため、今後、消耗品の大量生産や検出装置の小型化により、安価で素早く多種のウイルス感染症を正確に診断できる次世代の感染症診断法となることが期待できます（図 4）。

また、SATORI 法は、疾患バイオマーカーの検出などにも活用できるため、がんなどの基礎疾患の早期・層別化診断などを指向した次世代のリキッドバイオプシー^[7]の技術基盤となることも期待できます（図 4）。

本研究成果は特許出願済みであり、今後は実用化を希望する企業との研究開発を進めていく予定です。

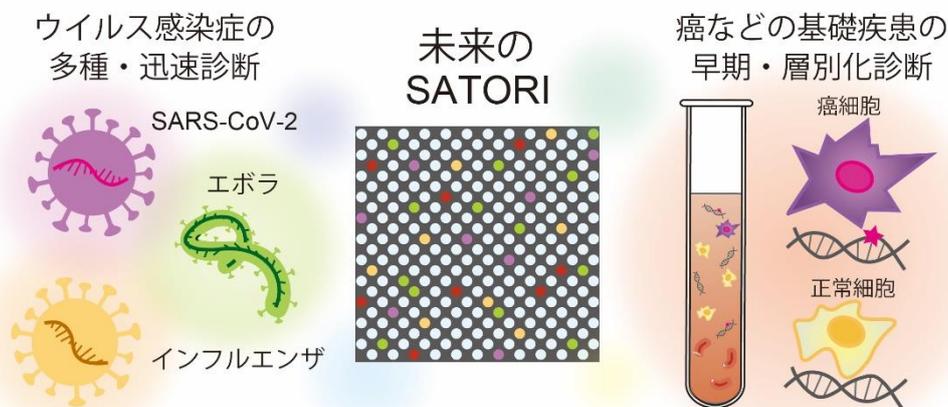


図 4 リキッドバイオプシーにおける SATORI 法の将来展望

ウイルス感染症の多種・迅速診断から癌などの基礎疾患の早期・層別化診断に至る「核酸のデジタル検出」を基盤とした次世代のリキッドバイオプシーのイメージ。

4. 論文情報

<タイトル>

Amplification-free RNA detection with CRISPR-Cas13

<著者名>

Hajime Shinoda, Yuya Taguchi, Ryoya Nakagawa, Asami Makino, Sae Okazaki, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Chiharu Takahashi, Ikuko Takahashi, Jun Ando, Takeshi Noda Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu, Rikiya Watanabe

<雑誌>

Communications Biology

5. 補足説明

[1] PCR 法

PCR 法はポリメラーゼ連鎖反応法のことである。最初に、増幅対象の DNA、DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ)、大量のプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを混合して、反応液を作る。反応液を加熱すると、2 本鎖 DNA が変性して 1 本鎖 DNA になる。次に急速冷却すると、結合 (アニーリング) したプライマーの 3' 端を起点として DNA ポリメラーゼが働き、1 本鎖部分と相補的な 2 本鎖 DNA が合成される。これで 2 倍量の DNA ができたことになる。再び高温にして DNA 変性から繰り返す。このように、PCR 法は、DNA 鎖長の違いによる変性とアニーリングの違いを利用して、温度の上下を繰り返すだけで DNA 合成を繰り返し、DNA を 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍…と増幅する。PCR は polymerase chain reaction の略。

[2] マイクロチップ技術

半導体製造プロセスを活用して微細構造をチップ上に造形する技術のこと。本研究では、容積 3 フェムトリットルの世界最小レベルの微小試験管を約 100 万個集積したマイクロチップを造形した。

[3] 核酸切断酵素 CRISPR-Cas13a

多くの細菌は、「CRISPR-Cas システム」と呼ばれる獲得免疫システムを備えている。VI 型 CRISPR-Cas システムに關与する CRISPR-Cas13a は、ガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA と結合すると活性化し、1 本鎖 RNA を切断する RNA 依存性 RNA 切断酵素である。

[4] 特異度

検査の性能を表す指標の一つ。陰性のものを正しく陰性と判定した割合。

[5] 蛍光レポーター

標的 RNA と Cas13a の複合体を検出するための蛍光性の機能分子。核酸のウラシル (U) が五つ連なった 1 本鎖 RNA の両端に、それぞれ蛍光基と消光基が結合した構造を持つ。複合体はウラシルが連なった構造を特異的に切断する性質を持つため、蛍光レポーターが複合体により切断されると、蛍光基は消光基から物理的に解離し、蛍光を発するようになる。

[6] 二値化

基準となる閾値を設定し、閾値より蛍光強度が低い状態を「蛍光シグナル無(0)」、高い状態を「蛍光シグナル有(1)」として二値に変換すること。

[7] リキッドバイオプシー

血液や尿などの身体への負担が少ない低侵襲性の液性検体の解析を基盤とした基礎疾患・感染症の診断方法。

6. 発表者・機関窓口

<発表者>

理化学研究所 開拓研究本部 渡邊分子生理学研究室
主任研究員 渡邊 力也 (わたなべ りきや)
研究員 篠田 肇 (しのだ はじめ)



渡邊力也

東京大学 先端科学技術研究センター
教授 西増 弘志 (にします ひろし)
東京大学 大学院理学系研究科
教授 濡木 理 (ぬれき おさむ)
京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
教授 野田 岳志 (のだ たけし)

<機関窓口>

* 今般の新型コロナウイルス感染症対策として、理化学研究所では在宅勤務を実施しておりますので、メールにてお問い合わせ願います。

理化学研究所 広報室 報道担当
E-mail: ex-press[at]riken.jp

東京大学 先端科学技術研究センター 広報・情報室
TEL: 03-5452-5424
E-mail: press[at]rcastr.u-tokyo.ac.jp

京都大学 総務部広報課国際広報室
TEL: 075-753-5729 FAX: 075-753-2094
E-mail: comms[at]mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

科学技術振興機構 広報課
TEL: 03-5214-8404 FAX: 03-5214-8432
E-mail: jstkoho[at]jst.go.jp

<JST事業に関すること>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ
保田 睦子 (やすだ むつこ)
TEL: 03-3512-3524 FAX: 03-3222-2064
E-mail: crest[at]jst.go.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。