

PCR-EM 法による SARS-CoV-2 変異検出試薬について

県では、ヘルスケア・ニューフロンティアの取組みの中で、平成 28 年度から、外来感染症の防疫に資する技術開発研究を支援し、令和 2 年度は、新型コロナウイルス感染症の検出試薬・機器の開発を支援してきた。

令和 3 年度は、新型コロナウイルス感染症対策として、最先端技術を活用した検出試薬等の開発を支援し、SARS-CoV-2 変異株を検出する研究用の検出試薬を、県内の民間企業である（株）ダナフォームが開発した。

1 変異株の状況

国内の新型コロナウイルス感染は、B. 1. 617. 2 系統の変異株（デルタ株[インド株]）が国内でも増加しつつあり、感染・伝播性が高いとみられている。

国では、変異株のまん延状況を踏まえ、6/4 にデルタ株のスパイク L452R 変異を確認するための PCR 検査を、全陽性者の約 4 割で実施するよう全自治体に要請した。

2 変異株の検出試薬の概要（PCR-EM 法による SARS-CoV-2 変異検出試薬）

現在、スパイク L452R 変異の確認は、感染の有無を判別した後、陽性検体に対して L452R 変異検出用の試薬を用いて再度検査し判別している。

今回開発した試薬は、感染の有無の判別と併せ、一連の検査でスパイク L452、E484 に生じた変異を判別し、アルファ株か、ベータ株/ガンマ株、およびデルタ株かを一度に判別する。

<参考>PCR-EM 法

スマートアンプ法による新型コロナ検出試薬でも使われている蛍光プローブ技術「Eprimer™/Eprobe®」*を用いた PCR 法。新型コロナウイルス RNA の Spike 領域を RT-PCR 法で増幅し、Eprobe®がその増幅産物に結合すると蛍光を示すため、PCR の DNA 増幅過程でウイルス陽性・陰性判定が可能となる。

また、Eprobe®をスパイクタンパク上の各変異部位 (L452, E484 等) に合わせて設計しておく、Eprobe®が結合する配列に変異が起きている場合、Eprobe®の DNA 増幅断片への結合が不安定になる。そのため、PCR の後、低温から高温まで温度を変化させ、蛍光の強さの変化をみる「融解曲線解析」を行うと、より低い温度で蛍光が消えるものが「変異あり」、より高い温度まで蛍光が残るものが「変異なし」と判定することができる。

この PCR-EM は、①新型コロナウイルス RNA の有無と、変異の存在を一度に判別する、②L452 と E484 に生じる変異を一つの反応チューブで同時に検出できる、③それら 2 つの変異パターンから、アルファ株、ベータまたはガンマ株、そしてデルタ株を区別できる、④さらに、3 種あるインド株のうち、最も感染性等が高く注意が必要なデルタ株と、他の変異株を区別し判別できる、⑤E484 が、E484K や E484Q に変異したように、今後 L452 が L452R 以外に変異した際、ゲノム解析を待たず、未知の変異の有無の把握が可能、という特徴を持つ。

* Eprobe®は、確認したいターゲット配列に結合したときにのみ蛍光を生じる一本鎖の蛍光標識オリゴDNA。Eprobeが示す蛍光は、ターゲット配列から離れると消光し、その傾向はリバーシブル（可逆的）である。