

赤羽俊章 氏 (鹿児島大学病院腫瘍センター特例助教)

脳腫瘍診断のためのカスタム遺伝子パネルの開発と検証

融合遺伝子解析はRNA収量の高い試薬キットを使用



「2019年に脳腫瘍の遺伝子診断を目指して、次世代シーケンサ(NGS)用の遺伝子パネルを独自開発し、共同研究者と検証を進めてきました。さらに今年からは共同研究先を広げ、最終的に1,000検体程度を解析する予定です。この遺伝子パネルには融合遺伝子が含まれるため、DNAだけでなくRNAも解析対象となります。FFPE検体からのDNA抽出は、これまで使ってきた試薬キットで純度も収量も十分でしたが、問題なのがRNA抽出。検体中の組織量が少なく解析に必要なRNAを十分回収できないことが想定されます。そのため回収率が高いRNA抽出キットを探していました」と鹿児島大学の赤羽俊章氏。赤羽氏は現在、この遺伝子パネルの核酸抽出にApplied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kitと自動サンプル処理システムのThermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime Purification Systemを使用しています。RNA抽出キットの選択ポイントとカスタムパネルの開発を赤羽氏に伺いました。

回収率が高いRNA抽出キットを探す

「単一サンプルからDNAとRNAを回収できる試薬キットは、複数の企業から提供されていますが、多くは遠心後の上清からDNAを抽出し、沈殿からRNAを抽出するタイプ。私たちのパネルでは、1検体当たりFFPEスライド10枚を使いますが、組織量が少なく沈殿物が目視できず、回収

が困難になります。そこで回収法が異なるMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを試してみました。このキットではDNAをビーズに吸着させて分離後、次にDNA除去上清からRNAを回収するので沈殿物の有無を目視で確認せずに済みます。問題となる回収率を従来法と比較したところ、RNA回収量は全9検体においてMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitが多く、さらにマニュアル操作よりも自動化システムを使うと収量が上がることを確認しました。特によかった点は、従来法ではRNA回収量がゼロの検体でもこのキットではRNAが回収できたこと。私たちのNGS解析系では、FFPE検体からは核酸200ngを使います。通常はDNAとRNAを200ngずつそれぞれ6μLの溶液に溶かしてアプライします。DNAが高純度であれば、ある程度量を減らして、RNA添加量を増やすこともできますが、それにも限界があります。今回の比較からDNA回収率には両キットで大差なく、操作性は従来品の方が若干楽ですが、脳腫瘍診断用の遺伝子パネル解析にはRNA回収量が多いMagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを使うことにしました。また山梨県立中央病院ゲノム解析センターのスタッフの雨宮健司氏からKingFisher Purification Systemを使用中と伺い、自動化装置も導入することにしました」と続けます。

脳腫瘍診断は統合的に判断する時代に

「2016年、2021年とWHOの脳腫瘍病理分類が改定され、多くの腫瘍型において



組織診断だけではなく遺伝子/分子診断を含めた統合的な診断が必要になりました。現在、WHOの脳腫瘍の病理分類では7-8遺伝子に対するコピー数を含めた変異を調べることになっています。その中には、発生初期に起こるIDH1/2遺伝子変異やメチル化異常のH3-K27M変異、染色体1番短腕(1p)と19番長腕(19q)の相互転座による1p/19qの共欠失が含まれています。しかし脳腫瘍に関わる遺伝子はいくつ多いとの報告もあり、私たちが開発した遺伝子パネルでは、DNA解析による50遺伝子とRNA解析による37融合遺伝子の変異解析を網羅しています。すでにこれまでの研究からWHOでは分類できないサブグループも検出しており、WHOの現分類よりもさらに多くの遺伝子の解析が今後必要になると予想されます。また脳腫瘍における遺伝子変異は予後との相関性が高いと考えられており、遺伝子診断の重要性は増すと思われます。正確な脳腫瘍診断をサポートする遺伝子パネルの開発と検証をさらに進めていきたい」と赤羽氏は最後に語ります。

KingFisher Purification System シリーズ

DNA、RNA、タンパク質、細胞を磁気ビーズで自動精製



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑えます。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁気ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kitを使用すれば、FFPEサンプルからのDNA/RNA抽出が行えます。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとチップコムの組み合わせで異なります。

	KingFisher Duo Prime	KingFisher Apex	KingFisher Presto
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	低～中スループット	中～高スループット	高スループット
処理サンプル数	1回あたり 12 / 6 サンプル	1回あたり 96 / 24 サンプル	1回あたり 96 / 24 サンプル
処理容量	50～5,000 μL	15～5,000 μL	50～5,000 μL
加熱	あり(プレートA列のみ)	あり	あり
冷却	あり(エリクションストリップのみ)	あり	なし
UVランプ	あり	あり	なし
バーコードリーダー	オプション(外付け)	あり(内蔵)	なし



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑えます。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁気ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。エクソソームを単離するキットを使用して、エクソソームの単離も可能です。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとチップコムの組み合わせで異なります。

	KingFisher Duo Prime	KingFisher Apex	KingFisher Presto
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	低～中スループット	中～高スループット	高スループット
処理サンプル数	1回あたり 12 / 6 サンプル	1回あたり 96 / 24 サンプル	1回あたり 96 / 24 サンプル
処理容量	50～5,000 µL	15～5,000 µL	50～5,000 µL
加熱	あり(プレートA列のみ)	あり	あり
冷却	あり(エリュージョンストリップのみ)	あり	なし
UVランプ	あり	あり	なし
バーコードリーダー	オプション(外付け)	あり(内蔵)	なし

User's Voice

足立 淳 氏(医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬標的プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー)

エクソソーム精製の多検体自動化により疾患バイオマーカーや創薬標的探索を加速 磁気ビーズによるサンプル調製をKingFisher Presto Purification Systemがサポート



「近年、疾患バイオマーカーの開発において、がんなどの細胞から血液中に分泌されるエクソソームが注目されています。私たちも2017年に血清のエクソソーム中に含まれるタンパク質を質量分析計で網羅的に解析し、大腸がんの新たな早期診断マーカーとなるタンパク質を発見しました。エクソソーム精製は一般的に超遠心法で行いますが、臨床に役立つバイオマーカーを開発しても、超遠心による精製法は煩雑で多検体処理に向かず、臨床応用は難しいと思いました。そこで私たちは、2021年にエクソソームの多検体自動精製システムを開発し、疾患バイオマーカーの開発や創薬標的の同定などの研究開発に広く活用してもらうことにしました」と医薬基盤・健康・栄養研究所の足立淳氏は語ります。足立氏に、多検体自動化システム開発や質量分析計によるプロテオーム解析について伺いました。

エクソソーム多検体精製システム開発のポイント

「大腸がんの早期診断マーカーの発見では、約160人分のサンプルから超遠心法でエクソソームを精製しました。しかしこの方法では1台あたり6サンプルを6時間かけて超遠心したので、もっと簡単に素早く純度が高い精製法の開発を目指しました。また質量分析計は技術革新のスピードが速く、細胞からのタンパク質の同定数は

年々増加しているのに、血液からの同定数はほとんど向上していません。その理由は、血液中にはアルブミンのように非常に量が多いタンパク質が存在し、低濃度のタンパク質の解析を妨げることも一因です。もし高純度のエクソソームを血液から回収できれば、解析対象ではない大量のタンパク質を除けるだけでなく、膜に囲まれてエクソソーム内で安定して存在するタンパク質は質量分析を用いたバイオマーカー開発の対象として適していると思いました。このような観点から、臨床応用に適したエクソソームの多検体自動精製法を開発することにしました」と足立氏は語ります。

インタクトなエクソソームを磁気ビーズで精製

「エクソソーム精製にはTim4タンパク質をコンジュゲートさせた市販の磁気ビーズキットを使うことにしました。Tim4はエクソソーム膜の外側に露出するホスファチジルセリンとカルシウム依存的に結合するので、溶出時にはEDTAなどのキレート剤を使ってインタクトで高純度のエクソソームを回収できます。超遠心精製法は、密度が高い分子を沈降させて物理的に精製するので不純物も含まれますが、この方法は生物学的な親和性を利用しているので特異性が高く、高純度で精製できます。さらに磁気ビーズ用多検体自動化システムを比較検討した結果、96サンプ



ル同時処理可能なThermo Scientific™ Kingfisher™ Presto™ Purification Systemを選びました。この製品は他社の自動分注装置ともスムーズに連結でき、サンプルをセットすれば質量分析用の酵素処理までを最大96サンプル自動精製します。これまでに官民研究開発投資拡大プログラム(PRISM)の『新薬創出を加速する人工知能の開発』におけるエクソソームのプロテオーム解析の一環として1000検体以上を精製しましたが、超遠心法よりも高純度かつ再現性よく質量分析に適したサンプルが得られました」(足立氏)。

今後の発展について

「私たち創薬標的プロテオミクスプロジェクトの目的は、最先端のプロテオミクス技術を用いて、主に臨床検体を材料として新規創薬標的を発見することです。その一環としてエクソソームだけでなく、がんのシグナルを伝えるリン酸化タンパク質の解析技術の向上にも取り組むことで、疾患を深く理解し、創薬研究をサポートしていきたい」と足立氏は最後に語ります。

吉見一人 氏(東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野講師)

ゲノム編集技術の基盤技術と多様な応用研究推進へ

編集の確認は自動化システムの高純度DNAで効率化



「私が所属する先進動物ゲノム研究分野では、主に2つのテーマで研究を進めています。1つ目は私たちが開発した国産の新規ゲノム編集技術CRISPR-Cas3を使って、ヒト細胞療法や遺伝子治療への応用研究を展開すること、2つ目はゲノム編集技術を用いて、新しい疾患モデル動物、特にヒト遺伝子を保有する『(ゲノム)ヒト化動物』を開発すること」と吉見一人氏は語ります。吉見氏が所属する研究室では、ゲノム編集の成否やオフターゲットの確認のためのDNA精製用に自動化システムを導入しました。ゲノム編集ツールの開発と基盤技術の整備、多様な応用の可能性とともに自動化システムの活用を、吉見氏に伺いました。

国産ゲノム編集技術Cas3の開発と応用

「2019年、私たちは共同研究者とともに真核細胞で利用できる新しいゲノム編集ツールCRISPR-Cas3を開発し、実際にヒトiPS細胞の遺伝子修復に利用できることを発表しました。すでに世界中で利用されているCRISPR-Cas9とは異なり、

CRISPR-Cas3は大きくゲノムを削り、認識標的配列が長いオフターゲットへの影響が極めて低いという特徴があります。CRISPR-Cas3は、従来よりも安全性の高い日本発ゲノム編集基盤ツールとして、新たな創薬や遺伝子治療、農水産物への利用など、さまざまな分野への応用が期待されています」と吉見氏は語ります。また最近では、CRISPR-Cas3の特徴を生かした新型コロナウイルスの検出キットを開発しました。このキットはPCRと同等の高い感度を有し、特別な測定装置を必要とせずに40分という短時間でウイルスを検出できることで注目されています。さらにCRISPR-Cas3によるCAR-T治療への活用も共同研究者と進めているそうです。

ゲノム編集の確認は純度の高いDNAで

「10年ほど前からCRISPR-Cas9や他のゲノム編集ツールを使って、従来法では遺伝子改変が困難だったラットで長いゲノム領域を挿入、欠失する技術開発を行ってきました。ラットやマウスで、狙った通りにゲノムが編集されたかどうかは離乳後すぐに遺伝子型を調べて選択する必要があります。一度に10-20匹程度の個体を調べるのですが、DNA精製をマニュアルやカラム法で行うと手間がかかったり、失敗してやり直したりしました。また私たちは汎用性のある技術開発を目指しているので、特定のゲノム領域だけではなく、GCリッチやリピート配列を有する遺伝子や長い配列など、PCRがかかりにくい領域も標的です。そのため高純度DNAが得られる磁気

ビーズ法を使って精製してきましたが、最近では検体数も増えてきたのでThermo Scientific™ KingFisher™ Duo Primeシステムを導入しました。このシステムを使えば、12検体同時に、最大24検体まで1回の設定で処理できます。また自動化システムなので誰でも扱え、動物担当とゲノム解析担当者の分業もスムーズになり、実験を効率化できました。核酸だけでなく、タンパク質精製といったアプリケーションが豊富な点も考慮して導入しています。今後、ゲノム編集時のDNA修復機構の挙動をChip-Seqで調べたいので、その時に活用したいですね」(吉見氏)。

CRISPR-Casシステムの
特徴に合わせた応用開発へ

「1つのタンパク質でDNAを切断するCRISPR-Cas9とは異なり、CRISPR-Cas3は27塩基を標的として認識するcrRNAと5つの因子から成るCascade複合体がゲノム上の標的配列を認識後、Cas3がDNA切断を誘導します。Cas3はヘリカーゼドメインを持ち、二本鎖DNA構造をほどこしながら標的配列の上流側で数百から数万塩基の広範囲にわたってDNAを切断できるので、確実に遺伝子を破壊する用途や広範囲の変異導入に適すると考えられます。CRISPR-Cas3の特徴を踏まえ、ゲノム編集の分子機構を詳細に解明し、国産ゲノム編集ツールとして安全性が高く、使いやすい技術として普及できるように研究を進めていく予定です」と吉見氏は最後に語ります。

KingFisher Purification System シリーズ

DNA、RNA、タンパク質、細胞を磁性ビーズで自動精製



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑える精製システムです。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁性ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。

	KingFisher Apex	KingFisher Flex	KingFisher Duo Prime
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	低～中スループット、 1回あたり 6 / 12 サンプル
処理容量*	10 – 5000 µL	10 – 5000 µL	30 – 5000 µL
加熱	あり	あり	あり
冷却	あり	なし	あり
UV ランプ	あり	なし	あり
バーコードリーダー	あり(内蔵)	あり	オプション(外付け)

*処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとTip Combの組み合わせで異なります。

北澤淳一 氏(青森県立中央病院臨床検査部・臨床遺伝科部長)

薬剤耐性菌の管理研究やがんの臨床研究を次世代シーケンスで加速

核酸精製を自動化し、臨床と研究を滞りなく進める



薬剤耐性菌の病院内での流行株特定や青森県のがん患者におけるドライバー遺伝子変異に関わる臨床研究を進める青森県立中央病院臨床検査部・臨床遺伝科部長の北澤淳一氏。「2020年6月に一連の遺伝子解析関連機器を整備し、核酸精製から次世代シーケンス(NGS)、そして解析レポートまでのワークフローを自動化システム中心に構築しました。使いやすくシームレスなフローですが、途中で中断して、時間があるときに再スタートするなど柔軟に運用できます。このフローであれば、長時間実験に拘束されず、少人数でも複数の臨床研究に同時に取り組みます」と語ります。

薬剤耐性菌の遺伝子を網羅的にNGSで解析

「薬剤耐性菌による院内感染は深刻な状況をもたらし、感染状況の把握や抗生物質の適正な使用が求められています。世界的にも大きな問題であり、将来的にはがんよりも多くの方が亡くなるとも言われています。私たちは院内で過去に流行したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の耐性遺伝子を網羅的にNGS解析し、菌種や株、そして薬剤耐性遺伝子を特定する研究に取り組んでいます。例えば黄色ブドウ球菌ではどんな株がどのようなペースで増減するか、またどんな薬剤耐性遺伝子が存在するか、サルモネラ菌では食中毒を起こした株がすべて同じかどうかなど、Ion AmpliSeq™ Pan-Bacterial Research Panelを使って調べています。標準的な細菌検査では培養や生化学



北澤氏と共に遺伝子解析関係の研究を進める馬場千華子さん(右)と野坂知加さん(左)

的検査、またPCRベースの簡易検査が主流ですが、NGS解析をおこなうことで正確で詳細な遺伝子関連情報が得られます。実験フローもシンプルなので、前日までに菌株を培養で増やしておけば、自動化システムを使って1時間程度で核酸を精製できます。また精製サンプルを保管しておけば、1-2時間ほど時間が取れる時にNGS用のライブラリを調製してIon GeneStudio™ S5 Plus NGSシステムにセットし、結果は自分のデスクで確認しています。Ion Reporter™ ソフトウェアの表示もわかりやすく助かっています」

と北澤氏。Pan-Bacterial Research Panelは属および種レベル、さらに異なる抗生物質クラスで細菌を検出するためのパネルであり、21種類の特定種検出用の269アンプリコンと364個の抗生物質耐性(AMR)遺伝子の存在を評価するための716アンプリコン用のプール、さらに公共のGreengenesデータベースに登録されている最大約400,000の16S配列から16Sプロファイリングを行うための24アンプリコン用のプールに分かれています。「この研究を通して、院内での過去の感染状況の傾向を把握し、今後の対策に生

KingFisher Purification System シリーズ

DNA、RNA、タンパク質、細胞を磁性ビーズで自動精製



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑える精製システムです。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁性ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとTip Combの組み合わせで異なります。

	KingFisher Apex	KingFisher Flex	KingFisher Duo Prime
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	低～中スループット、 1回あたり 6 / 12 サンプル
処理容量*	10 – 5000 µL	10 – 5000 µL	30 – 5000 µL
加熱	あり	あり	あり
冷却	あり	なし	あり
UV ランプ	あり	なし	あり
バーコードリーダー	あり(内蔵)	あり	オプション(外付け)

鈴木孝一郎 氏(一般財団法人阪大微生物病研究会バイオメディカルサイエンスセンター バイオ技術課主査)

新型コロナウイルスPCR検査の核酸精製を多検体で精度よく KingFisher Apex Purification Systemで核酸精製を自動化



「今年8月の新型コロナウイルス感染第5波において、自治体から変異株スクリーニング強化を依頼されました。すでに新型コロナウイルスのPCR検査・変異株スクリーニングを実施しており、さらに変異株スクリーニングの検査数拡大を行うことになりました。そこで検体からの核酸精製ステップを自動化してサンプル処理のキャパシティを数倍向上させることにしました」と阪大微生物病研究会の鈴木孝一郎氏は語ります。「従来は5名のスタッフで1日数百検体の核酸を精製していましたが、自動化システムを使えば、担当者1人でもこれまでの約5倍の検体数を処理できるようになりました。貴重な人的リソースを他業務にも振り分けられます」と続けます。鈴木氏に核酸自動化システムの導入のメリットと今後の活用について伺いました。

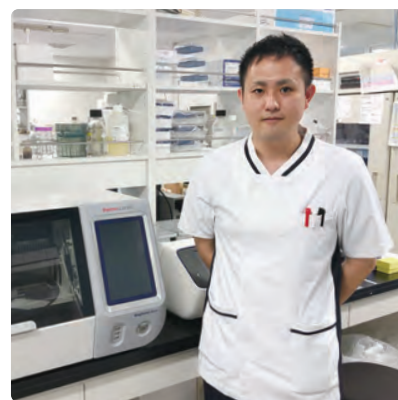
自動化核酸精製システム導入のメリット

「5人体制で核酸精製を行っていたころは、スピニングを使うマニュアル作業でした。スタッフそれぞれが1回に24サンプルずつ処理し、1日で最大200-300検体が限界。しかも人的ミスが起きないように、とても気をを使う作業なので、サンプルの取

り扱いや試薬添加には緊張しました。自動化システム導入後は、スタッフ1人で96サンプルを一度に精製しています。手間が減り、処理時間も30分に短縮できたことも大きいのですが、人的ミスやコンタミネーションの心配がなくなりスタッフのストレスが緩和された点も良かったです」と鈴木氏は、Thermo Scientific™ Kingfisher™ Apex Purification Systemの導入についてコメントします。「導入前に、他の衛生研等への納入実績や、磁気ビーズ法はトラブルが少ないこと、また試薬の供給が安定していることなどの情報を得て、総合的な判断でこのシステムを導入しました。実際に導入直後に既知サンプルを測定して従来法と比較検証しましたが、以前は検出できなかったサンプルを検出できることがあり、検査精度も向上しました。また、精製サンプルの一部は、ゲノム解析のために他機関に回すこともありますが、シーケンス解析も問題ないようです」と続けます。

幅広い活用を見据えて

「新型コロナウイルスのPCR検査以外にも、今後は微生物の遺伝子検査などに、このシステムを活用しようと思っています。



また、私たちは長年培った検査技術を応用し、新たな検査技術、試薬の研究・開発にも取り組んでいます。その研究で行うタンパク質や抗体の精製にも試してみたいと思っています。その際は一度に20サンプル程度の解析となるので、24サンプル測定用の付属品を揃えて柔軟に使い分けていきたいと考えています。磁気ビーズ法の試薬キットであるApplied Biosystems™ MagMAX™ キットシリーズにはさまざまな種類があり、目的に応じて使う予定です。新型コロナウイルス感染終息後も、自動化核酸精製システムを幅広く活用しようと思っています」と鈴木氏は語ります。

KingFisher Apex Purification System

核酸・タンパク質・細胞をハイスループットで自動抽出・精製

Thermo Scientific™ KingFisher™ Apex Purification Systemは、KingFisher シリーズの最新モデルです。各種生体サンプルからのウイルス核酸精製を始め、多様なサンプルから核酸・タンパク質・細胞を、最大96サンプルまで自動で精製します。タッチスクリーンで全てを設定でき、クラウドにも対応する使いやすいシステムです。

- 生体サンプルからのウイルス核酸精製や免疫沈降、抗体精製など、多様なアプリケーションに対応
- 当社従来製品よりも小容量のサンプル処理を実現
- チューブへのエリューションにも対応
- サンプルの加熱だけでなく冷却も可能
- 2個のUVランプで、庫内を滅菌
- 標準装備のバーコードリーダーで、誤ったプレートの設置ミスを防止



製品名	サイズ	製品番号	価格
KINGFISHER APEX 96 COMBI HEAD	1 式	5400920	¥8,400,000
KINGFISHER APEX 24 COMBI HEAD	1 式	5400940	¥8,400,000
KINGFISHER APEX 96 DW HEAD	1 式	5400930	¥8,400,000
KINGFISHER APEX 96 PCR HEAD	1 式	5400910	¥8,400,000

増田曜子 氏(東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻土壌園科学研究室・特任研究員)

稲の力となる水田土壌の養分を維持する微生物メカニズムの解明へ

核酸精製はKingFisher Duo Prime Purification Systemで再現性良く



「古くから日本では『稲は地力で、麦は肥料でとる』との言い伝えがあり、水稻の収量は土壌が有する養分(窒素肥沃度)に支えられ、麦などの畑作物の収量は窒素肥料に大きく依存します。稲の生育を支える水田土壌の養分は、窒素固定をはじめとする微生物の働きに支えられていると考えられてきましたが、実際にその役割を担う微生物の種類やメカニズムは未解明でした」と東京大学の増田曜子氏は語ります。「私たちは、窒素固定に関わる機能遺伝子を標的として水田土壌微生物のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を実施し、従来の手法では見逃されてきた鉄還元菌が窒素肥沃度の維持に中心的な役割を果たしている可能性を見出しました」と増田氏は続けます。

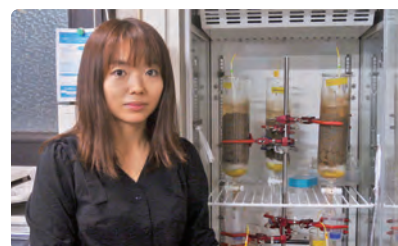
水田土壌のメタトランスクリプトーム解析

「水田土壌で窒素固定反応を駆動する微生物群の探索は分離培養やPCRベースの手法を用いて古くから行われてきました。しかし分離培養法では培養が難しい9割以上の微生物を取り逃す可能性があり、PCR法では条件設定やプライマーのミスマッチから微生物群集の多様性を低く見積もってしまう危険性があります。そこで私たちは、それらのバイアスを回避できるメタトランスクリプトーム解析を行うことにしました。具体的には連作水田の土壌サンプルに含まれるRNA配列データから微生物の窒素固定酵素(*nif*)をコードしたものを抽出して由来微生物を解析しました。すると従来からよく知られた微生物群とは全く異なる、*Deltaproteobacteria*綱由来で鉄還元反応を駆動する*Anaeromyxobacter*や*Geobacter*属細菌の*nif*転写産物が高頻度に検出されました」と増田氏。窒素固定への関

与が全く議論されてこなかった嫌気性鉄還元菌が水田土壌の窒素固定を駆動するキープレイヤーであることを初めて示しました。

鉄還元菌の単離培養と窒素固定能の検証

「次に発見した鉄還元菌の窒素固定能について調べました。鉄還元菌は水田土壌に優占的に存在していることは知られてきましたが、窒素固定能に着目した研究や単離培養例は限られています。私たちは一般的な最小培地を用いた培養法とは異なる、水田土壌そのものを滅菌して鉄還元菌を集積培養する手法を用いて、*Anaeromyxobacter*や*Geobacter*属細菌を複数株単離することに成功しました。そして*Anaeromyxobacter*属細菌が窒素固定活性を有し、水田土壌中で窒素固定能を発揮することを確認しました。単離した鉄還元菌のほとんどは既知の種との相同性が低く、新種もしくは新属として提唱しました」と増田氏。さらに「現在、鉄還元菌の窒素固定活性を強化して水田土壌の窒素肥沃度を向上できないかを検討中です。例えば水田土壌に鉄還元菌が鉄呼吸を行う際に利用する Fe^{3+} を添加して鉄還元菌の窒素固定活性を人為的に上昇させる技術開発に取り組み、水田土壌室内モデル系では鉄還元菌の窒素固定活性が上昇すること、ほ場試験でも鉄散布区の方が非散布区よりも年間を通して窒素固定活性が高く、水稻収量が10%向上するという結果を得ています」と続けます。「また単離した細菌を様々な条件下で培養し、各種機能遺伝子の発現量や時間経過における変動をリアルタイムPCRで解析しています。サンプル数が多いので、核酸精製は自動化システムのKingFisher Duo Prime Purification



増田氏と水田土壌を再現したカラムミクロコズム

Systemを活用し、再現性の高いデータを得ています」と培養実験についても語ります。

研究の発展について

「今回単離した*Anaeromyxobacter*や*Geobacter*属細菌は窒素固定だけでなく、窒素化合物を分子状窒素として大気中に放散させる『脱窒』や硝酸態窒素をアンモニア態窒素に変換する『DNRA』の過程にも関与しています。また、窒素固定、脱窒、DNRA等の還元的窒素変換反応以外にも、メタン生成や水素生成、酢酸生成等に関わる機能遺伝子についてもメタトランスクリプトーム解析を行いました。これらのオミクスデータと単離培養から得られる機能遺伝子の挙動や土壌中の物質動態の流れを統合することで、土壌における窒素循環や炭素循環を包括的に理解していきたい」と増田氏はさらに大きな視野から土壌の研究を進めます。「水田に限らず、過剰な窒素施肥は地下水や河川水の硝酸汚染や温室効果ガス N_2O の排出につながります。物質循環の研究成果を活かして、世界規模で窒素施肥に対する過剰依存を回避しつつ作物生産量の増加を促進する技術を提案していきたい」と増田氏は研究成果の社会還元への意欲を語ります。

KingFisher Purification System シリーズ

核酸やタンパク質精製におけるサンプル処理を自動化

Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸精製およびタンパク質のアフィニティ精製における磁気ビーズの工程処理を自動化するシステムです。マニュアル操作時間を最小限に抑え、さまざまなサンプルタイプからDNA、RNA、およびタンパク質を自動で分離します。Applied Biosystems™ MagMAX™シリーズによる核酸抽出・精製キットから、各種磁気ビーズキットまで幅広いサンプルや容量に対応します。用途やスルーputにに合わせて機種を選択できます。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとTip Combの組み合わせで異なります。

	KingFisher Apex	KingFisher Flex	KingFisher Duo Prime
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スルーput	中～高スルーput 1回あたり 24 / 96 サンプル	中～高スルーput 1回あたり 24 / 96 サンプル	低～中スルーput 1回あたり 6 / 12 サンプル
処理容量*	10 – 5000 µL	20 – 5000 µL	30 – 5000 µL
加熱	あり	あり	あり
冷却	あり	なし	あり
UV ランプ	あり	なし	あり
バーコードリーダー	あり(内蔵)	あり	オプション(外付け)

東方美保 氏(福井県衛生環境研究センター保健衛生部 細菌・ウイルス研究グループ主任研究員、写真前列右)／永田暁洋氏(同グループ 主任研究員、写真後列右)

日々のCOVID-19検査を確実に実施するために

多検体は自動核酸精製システムで効率的に解析



「新型コロナウイルス感染(COVID-19)に対するPCR検査では、18時までに受け付けた検体は原則としてその日のうちに結果を返しています」と福井県衛生環境研究センターの東方美保氏と永田暁洋氏は語ります。お二人が所属するグループは、2020年2月初旬には感染症研究所のプロトコルに準じた検査系を立ち上げ、検体が搬入され始めた2月中旬から、12月初旬までには約9600検体の検査を実施しました。またこのPCR検査を実施していく中で、新たに自動核酸精製システムとリアルタイムPCRシステムを増設し、多検体にも対応できる体制を整えてきました。東方氏と永田氏に、COVID-19検査の効率的な実施について伺いました。

勤務体制を整え、当日中には結果を報告

「私たちのグループは7名からなり、細菌とウイルスのチームに分かれていましたが、COVID-19のPCR検査にはグループ全員で取り組むことにしました。検体を受け取って当日中に結果を返すために、勤務体制をシフト制に変更し、土日や祝日の出勤や午後から勤務する体制を整えました。

これにより県内各所で集めた検体が夕方までに届いても、遅くとも搬入当日の22時前には結果を報告できる体制が構築できました」と東方氏。さらに他部門の職員からの応援体制も構築済みです。また、「各地の衛生研究所のCOVID-19検査担当者のメーリングリストに参加し、問題点などの解決や新しい情報の収集に努めています」と話します。

40検体以上は自動核酸精製システムを活用

「当初、核酸精製はマニュアル法で行っていましたが、夏に第2波を迎えて検体数が増えてきたので、自動核酸精製システムを使うようになりました。福井県では感染抑制のために、濃厚接触者だけでなく、接触はないが不安を感じている人も検査するため検査数が多くなります。持ち込まれる検体数には波がありますが、複数回に分けて持ち込まれば計算上は1日に最大250検体程度は解析可能です。ただしサンプルの種類でも解析可能な検査数や時間は変わってきます。例えば唾液サンプルは、鼻咽頭ぬぐい液よりも取り扱いに注意が必要で時間がかかるため、250検体は無理です。現在、40検体以上を一度に測定する時や、土日や祝日などでスタッフ数が少ない時には、自動核酸精製システム(Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex Purification System)を使っています。自動システムの場合、溶液等を準備してセットすれば、後は機械を稼働させるだけなので別の作業を進めることが

でき、業務を効率化できます。また溶液の準備などは応援スタッフへ任せられることのできるため、業務がある程度軽減できて助かります。もちろんマニュアル法ではカラム、自動システムでは磁気ビーズ(Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit)を使うので精製法は異なりますが、機器導入時に両者を比較して感度や精度に遜色がないことを確認しました」と永田氏は、日々の検査の流れや検査法の使い分けについて説明します。

日々の検査を着実にこなしていく

「これまでノロウイルス感染症検査や麻疹検査等でリアルタイムPCR法を使ってきたので、COVID-19に対するPCR検査でも特に技術的には戸惑うことなく対応できました。麻疹検査のリアルタイムPCRで陽性となったときは、私たちのグループでDNAシーケンサを使って系統解析を行います。これに対してCOVID-19検査では、リアルタイムPCRでウイルスゲノム量が多いと思われる陽性検体を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに送って次世代シーケンサで全ゲノム解析を行うプロジェクトに協力しています。この場合、精製したRNAが必要なので、自動システム等で核酸精製した保管検体を送っています。新たに精製する必要がなく便利ですね」と東方氏と永田氏は語ります。各自治体での確実な検査と中央での詳細な解析から、COVID-19感染拡大を抑制する努力が続けられています。

KingFisher Purification System シリーズ

核酸やタンパク質精製におけるサンプル処理を自動化

Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸精製およびタンパク質のアフィニティ精製における磁気ビーズの工程処理を自動化するシステムです。マニュアル操作時間を最小限に抑え、さまざまなサンプルタイプからDNA、RNA、およびタンパク質を自動で分離します。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズによる核酸抽出・精製キットから、各種磁気ビーズキットまで幅広いサンプルや容量に対応します。用途やスループットに合わせて機種を選択できます。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとTip Combの組み合わせで異なります。

COMING SOON

	KingFisher Apex	KingFisher Flex	KingFisher Duo Prime
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	中～高スループット 1回あたり 24 / 96 サンプル	中～高スループット 1回あたり 24 / 96 サンプル	低～中スループット 1回あたり 6 / 12 サンプル
処理容量*	10 – 5000 µL	20 – 5000 µL	30 – 5000 µL
加熱	あり	あり	あり
冷却	あり	なし	あり
UV ランプ	あり	なし	あり
バーコードリーダー	あり(内蔵)	あり	オプション(外付け)

中川隆太郎 氏 (株式会社メレコム代表)

「無症状者向けの新型コロナウイルスPCR検査」の実施に向けて

自動化核酸精製システムで信頼性の高い迅速検査を実現



株式会社メレコムは「医療の未来を想像し、IoTを活用することで未病を改善」することを目指しています。代表の中川隆太郎氏は、糖尿病予防のアプリケーションや職場環境改善ヘルスケアデバイスの開発を手掛けるなど、幅広くヘルスケアに貢献するとともに医療をサポートするビジネスを展開しています。今年8月1日からは、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する日本初となる「法人向け定額制PCR検査サービス」の提供を開始し、多くの企業ニーズに応え、社員等のPCR検査を請け負うとともに、移動式PCR検査車両を導入

し、車両内検査ルームでPCR検査と結果判定を迅速に提供するサービスを開始しました。

産業医からの強い要請でPCR検査を立ち上げる

「職場環境改善をサポートするために産業医を企業へ派遣する業務を運営していますが、COVID-19の広がりとともに主に運輸・運送業関連の産業医から社員のPCR検査への希望を受けていました。まずは海外で開発されCOVID-19用の抗原検査キットをいち早く輸入して提供しましたが、やはり高感度で信頼性が高いPCR検査を行う必要性を感じていました」と中川氏はコメントします。「PCR検査法を調べてみましたが、基礎研究的な実験の様で手が出せずにいました。医学生時代の実験は好きでしたが、RNA抽出が難しそうだと、今年4月時点では一旦諦めました」と振り返ります。「ところがニュースで核酸抽出の簡易法の情報を得て、サーモフィッシャーサイエンティフィックに問い合わせると、実験室で核酸抽出からリアルタイムPCR解

析までの一連の流れを自分で目と手で確かめることができ、実施へ向けて前向きに考えるようになりました」と中川氏は語ります。「当初は簡易法で核酸抽出を行っていましたが、多くのサンプルを処理し、検査の信頼性を高めるために核酸抽出をビーズベースで行うApplied Biosystems™ MagMAX™ Viral / Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kitに変更し、専用の自動化システムであるThermo Scientific™ KingFisher™ Flexシステムを導入しまし



た。今後この方法を標準法として柔軟に対応していく予定です」と話します。現在1日の処理数は少ないときでも100検体、多い日には500検体ほどですが、1度に96サンプルを同時処理可能なKingFisher Flexシステムを導入したことで一日最大1,500検体の処理も可能となったそうです。検査は平日に加え土日にも実施し、結果は翌日には返しています。

全国移動式PCR検査車両で地域医療を支えたい

「今年5月に地方で医院を開業している父から、院内でCOVID-19のPCR検査を実施すべきかどうかの相談を受けました。地方には高齢者が多く、COVID-19以外にも高血圧などの生活習慣病を抱えた患者さんもいて、しかも高齢の医師が一人で診療を担当する医院も少なくありません。もし医師が感染すれば、その地域の医療は崩壊する危険もあり、無理をしないように伝えました」と中川氏。「しかし地方ではCOVID-19のPCR検査を行える機関は限られています。また今回、無症状者向け

PCR検査業務を保健所へ申請した時、県をまたぐサンプルの移動はできる限り控えてほしいとの要請もありました。そこで国内どこでも検査できる移動式PCR検査車両を設計から携わり、検査を必要とする地域でサンプル採取から解析、結果提供まですべて行うサービスを立ち上げました。検査が行き届かない地域の医療を少しでも支えられればと思っています」と中川氏は新規事業について語ります。

質の高い医療を継続的に提供するために

「医学部生の頃から医師の働く環境を整え、医療体制を改善する必要性を強く感じていました。そのため大学2年の時には医師の派遣業を立ち上げ、医学部とクリニックを仲介しました。卒業後は米国の大学へ留学して公衆衛生を学び、国内の大学の経済学部で医療経済を学んだりもしました」(中川氏)。そして留学から帰国後に、会社を立ち上げます。「将来的には、新型コロナウイルス以外のPCR検査も企画中です。例えばストレスを客観的に評価するために唾液中のヘルペスウイルスの測定を



PCR法で行う事業も視野に入れて検討中です」と中川氏は語ります。「先日、近所のクリニックが閉鎖されることを知りました。その時、医療の提供には、質を高めるとともに継続性が必要だと強く感じました。そのためにもビジネスとして健全な体制を維持していきたいと思っています。今回打ち出した『法人向け定額制PCR検査サービス』は1カ月最大3回まで、市場的にも破格の値段設定をしました。また経費節約だけでなく、会社経営者にとって一番悩ましい問題となる月ごとの経費の上下を抑えることで利用者の便宜を図りました」と中川氏は長期的な事業展開を見据えます。

MagMAX Viral / Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
ウイルス核酸単離のニーズを満たすスケールアップへ

Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kitは、さまざまな種類のサンプルから高品質のDNAやRNAを単離するために、磁気ビーズをベースとした技術を使用しています。さらに精製の自動化のためにThermo Scientific™ KingFisher™ 装置と組み合わせることで、ワークフローを簡略化でき、時間を節約できます。



- スケール：標準的なインプット容量 (自動化ワークフロー) または大容量 (手動ワークフロー) の2種類のプロトコルから選択するだけで簡単にサンプル調製でき、トレーニングも容易
- サンプル：唾液を含む様々なサンプルタイプに適合し、唾液用プロトコルもダウンロード可能
- 回収：力価の低いサンプルにも適合
- キャリア添加不要：キャリア RNA を添加する必要がないため、次世代シーケンシングへの干渉が少なく、ステップ数も少なくて済みます
- 効率：96 サンプルを40分未満で処理

製品名	サイズ*	製品番号	価格
MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	~200 回	A42352	¥67,500
	~2,000 回	A48310	¥438,200
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit NEW!	~2,000 回	A48383	¥438,200

※サンプル量200μLの場合

製品詳細はこちら → thermofisher.com/magmaxviralpathogen

10

KingFisher Flex Purification System
核酸やタンパク質精製における多サンプル処理を自動化

Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex Purification Systemは核酸精製およびタンパク質のアフィニティ精製における磁気ビーズの工程処理を自動化するシステムです。再現性に優れ、さまざまなサンプルタイプからDNA、RNA、およびタンパク質を分離するために必要なマニュアル操作時間を最小限に抑えます。ユーザーが簡単に交換できる4種類のマグネットヘッドを備え、MagMAXシリーズによる核酸抽出・精製キット、さらに各種磁性ビーズキットにおいて幅広いサンプル容量に対応します。



- 装置の準備が容易：10分以内にスタート
- ユーザーフレンドリーなインターフェース
- 1度に最大96サンプルを精製
- 幅広い容量範囲 (20-5,000μL) に対応する4種類のマグネットヘッド
- MagMAXシリーズの核酸抽出・精製キットに対応する各種内蔵プロトコル
- 装置の制御やプロトコルの変更、作成、およびアップロードを可能にするThermo Scientific™ BindIt™ ソフトウェア (Windows7、8 および10に対応)

製品名	サイズ	製品番号	価格
KingFisher Flex Purification System, 96DWプレートヘッド ヒートブロック含む	1 式	5400630	¥7,200,000
KingFisher Flex Purification System, 24DWプレートヘッド ヒートブロック含む	1 式	5400640	¥7,200,000
KingFisher Flex Purification System, 96KFプレートヘッド ヒートブロック含む	1 式	5400620	¥7,200,000
KingFisher Flex Purification System, 96PCRヘッド ヒートブロック含む	1 式	5400610	¥7,200,000

11

製品詳細はこちら → thermofisher.com/kingfisher

User's Voice

弘津陽介 氏 (山梨県立中央病院ゲノム解析センター研究員/ゲノム検査科チーフ)

ヒト血漿中のcfDNAを効率的に回収し、信頼性の高いがんゲノムシーケンスへ 磁性ビーズMagMAX cfDNA Preparation キットと自動精製システムKingFisher Duo Primeを活用



がんの病態解析、治療の奏功性、薬剤の選択など、臨床分野におけるがんゲノム解析の重要性が増えています。山梨県立中央病院ゲノム解析センターの弘津陽介氏は、研究の一環として、がんの患者さんの血漿や尿からセルフリーDNA (cfDNA) を回収し、複数のがん種における多様な遺伝子解析を実施しています。「抗がん剤の奏功性を経時的に調べる場合など、解析したい日時 of 患者さんのサンプルは一度しか得られず、非常に貴重。サンプル調製には失敗が許されません」と語ります。弘津氏に最新のがんゲノム研究とサンプル調製のポイントを伺いました。

免疫チェックポイント阻害剤の効果予測におけるcfDNAの有用性の検討

「昨年、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果をcfDNAで検証できるかどうか、すでに治療が終了した患者さんの保存サンプルで実施してみました^{*}。治療前後の血漿からcfDNAを回収し、カスタム作成した肺がん用の遺伝子パネルを使って次世代シーケンサでターゲットシーケンスを行う

と、治療開始6-14日目という、かなり早い段階から薬の効き目が予測可能という結果を得ました。将来的には抗がん剤の効き目を迅速に見極め、効果がないと予測される方には異なる薬を選択するための情報として活用できればと思います」と弘津氏は話します。

磁性ビーズと自動化システムでcfDNA回収を簡便化

「以前はカラム式の精製キットを使っていましたが、吸引に時間がかかり、多検体処理は手間がかかります。また、ビーズ式精製も実験経験が浅い人がマニュアルで行うと、ビーズを吸い取ってしまったり、ビーズからの溶出時に乾燥させてしまうなど、手間や時間がかかり、気を使う作業でした。そこで2年ほど前から磁性ビーズと自動化システムを組み合わせでcfDNAの回収を効率化しました。サンプルと試薬を機械にセットするだけなので、初心者でも個人差もなく、しかも再現性良くcfDNAを回収できます」と弘津氏。「またこの組み合わせであれば、血漿や尿など2-5mL単位のサン



プルを処理できます。検討した他社製品では、スタート時のサンプル量が数百μL程度なので、微量なcfDNAを効率的に回収するには工夫する必要があり、大変でした」と続けます。「現在10-20本程度のサンプルを月に1,2回のペースで処理していますが、このシステムでほぼ対応できています。ただしサンプル数は変わらなくても複数の遺伝子パネルを使う場合もあるので、さらにスループットを高めていきたいですね」。ルーチンのサンプル調製を効率化し、弘津氏は臨床への応用研究へと一層集中していきます。

^{*} 'Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer' Eur J Cancer. 2017 Nov;86:349-357 Iijima Y, Hirotsu Y, et al

MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit

微量な血中循環DNA (cfDNA) を効率良く単離

Applied Biosystems™ MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit は血清や血漿、尿などの生体サンプルから、cfDNAを分離するキットです。磁性ビーズテクノロジーにより、高品質なcfDNAを簡単に単離できます。

- KingFisher シリーズとの併用で40分以内に分離
- 血漿、血清、尿から、100 μL-10 mLと幅広いサンプル量に対応
- 最終ボリュームは15-50 μL、フェノールフリーの溶出可能
- マニュアルにも自動化にも対応するフレキシブルなフォーマット
- プロテアーゼKなしでもタンパク質の混入は最小限



KingFisher Duo Prime

短時間で高純度な核酸を自動精製



Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Primeは、MagMAXシリーズを始め、磁性ビーズを使う核酸・タンパク質精製の自動化システムです。

- 6または12サンプルを同時精製 (連続処理で最高24サンプル)
- 専用の24または96 ディープウェルプレートを使用
- BindItソフトウェアを標準添付し、オリジナルプロトコルの作成や既存のプロトコルの編集が可能
- 生体分子との親和性の低いポリプロピレン製を使用し、精製収量や再現性を高める優れた形状の専用プラスチック消耗品を提供

製品名	サイズ	製品番号	価格
MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit	1 キット	A29319	¥80,000
KingFisher Duo Prime	1 式	5400110	¥3,000,000