

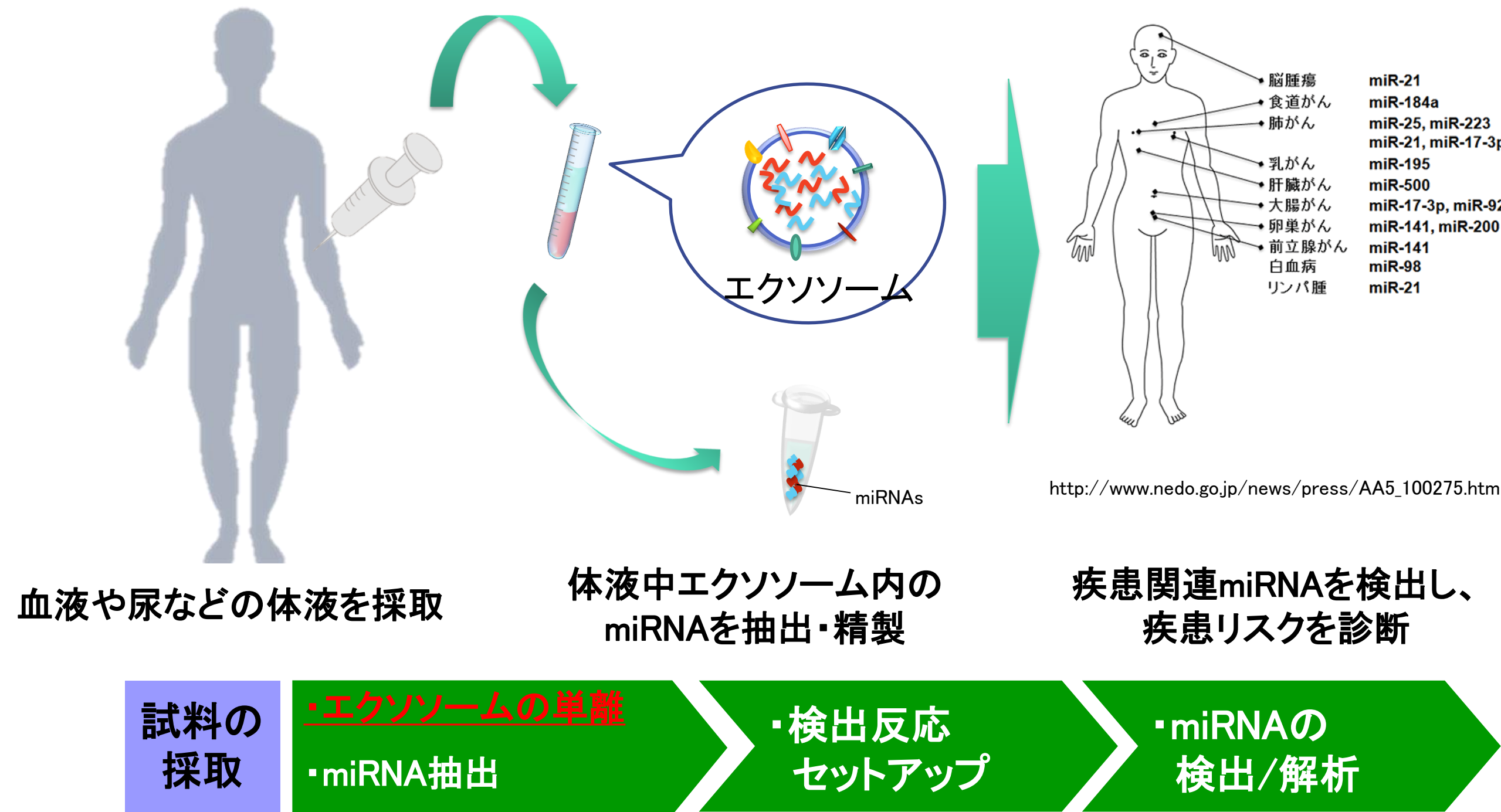
臨床現場での検査実現に向けた 体液からのエクソソーム及びmiRNA自動抽出精製装置の開発

Development of automated nucleic acid extraction system for
exosome and miRNA from body fluids for clinical site inspection

【はじめに】

エクソソームに含まれる分泌した体細胞由来の情報を解析することによって、病態の進展状況を把握することができ、疾患の早期診断を行える可能性が示されている。血清等の体液からエクソソームを抽出する方法には、超遠心法、カラム法、抗体法などが存在するが、工程は自動化されていない。本研究では、臨床現場でのエクソソーム解析に基づく検査を実現するため、基礎研究や臨床検査に使用可能なエクソソーム及びmiRNAの自動抽出システムを開発した。

【診断スキーム】



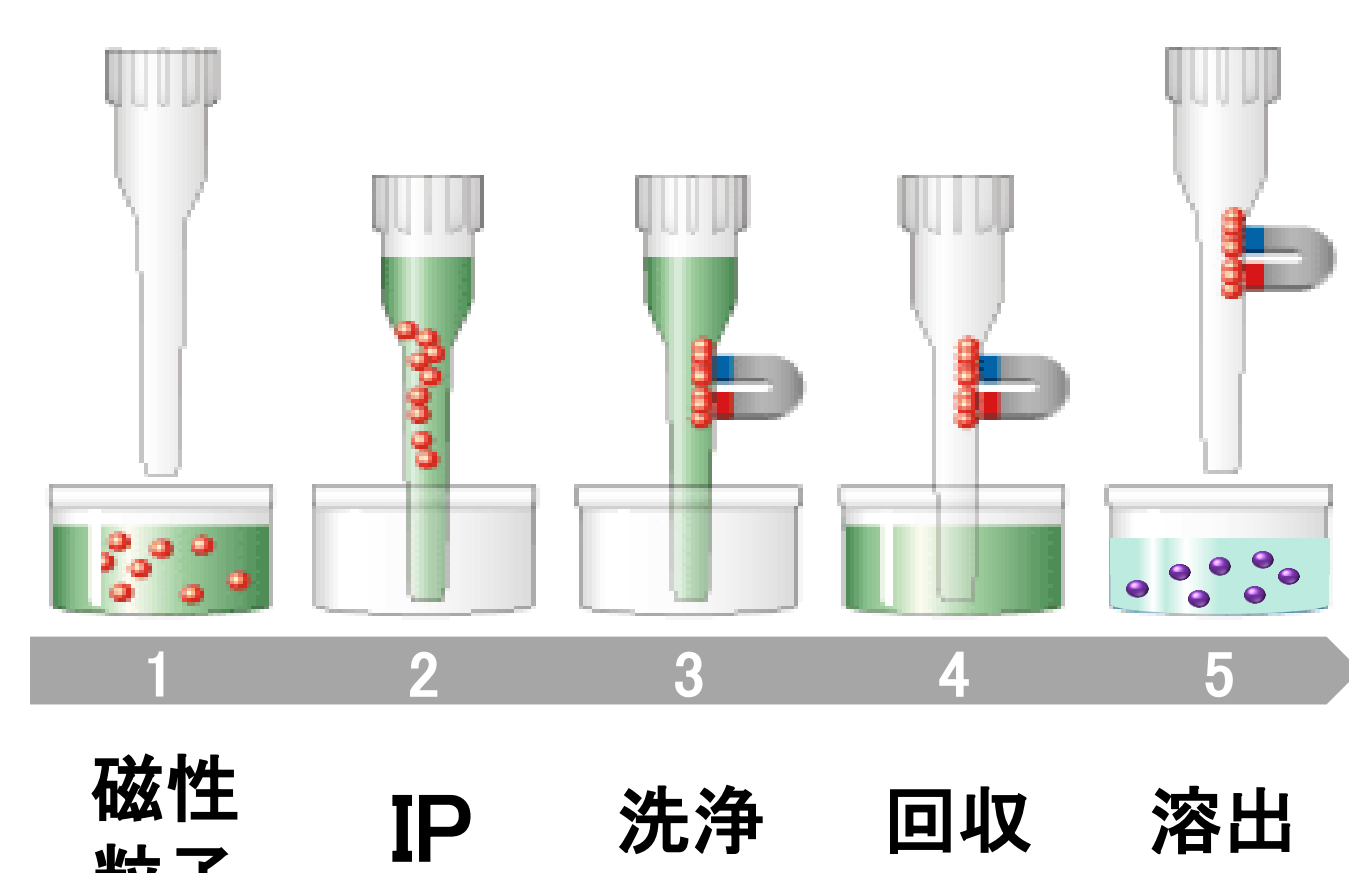
【開発計画】

簡便かつ全自動の検査工程を実現するために下記の5項目の課題を設定

検討・実施項目	
1	・対象とする疾患臓器由来の特定なエクソソームの分離・精製 ・エクソソーム単離法の自動化及び標準化
2	単離されたエクソソームからのmiRNA抽出
3	高感度なmiRNA検出を可能とし、低コピー数のmiRNA検出を目標とするPCR法の開発
4	多種類のmiRNAの同時検出及び解析を可能とする検出システムの開発
5	これらの工程の完全な自動化機器の開発、検査試薬のパッケージ化

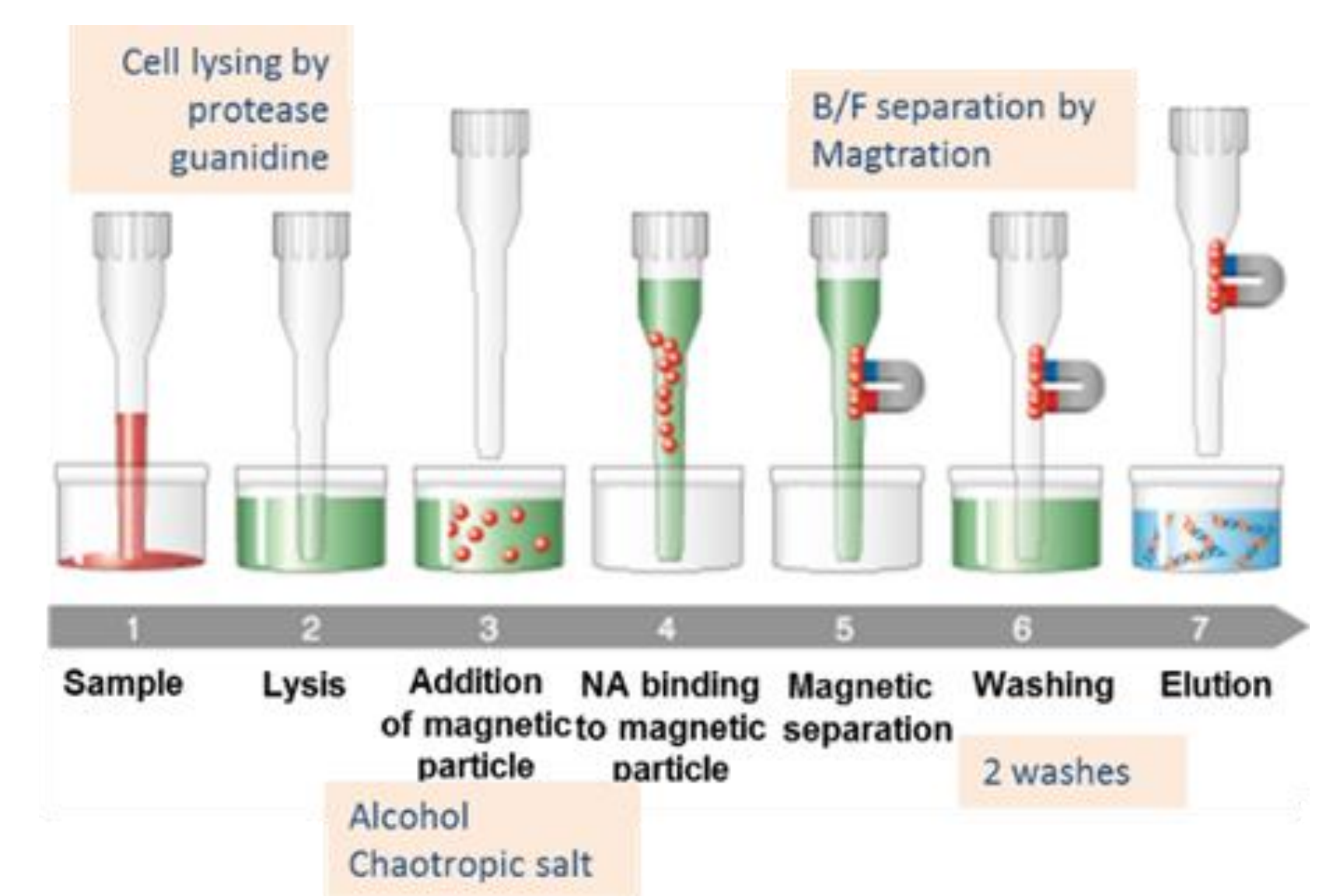
ここでは1、2、5の内容について報告する。

【エクソソームの単離法の開発】



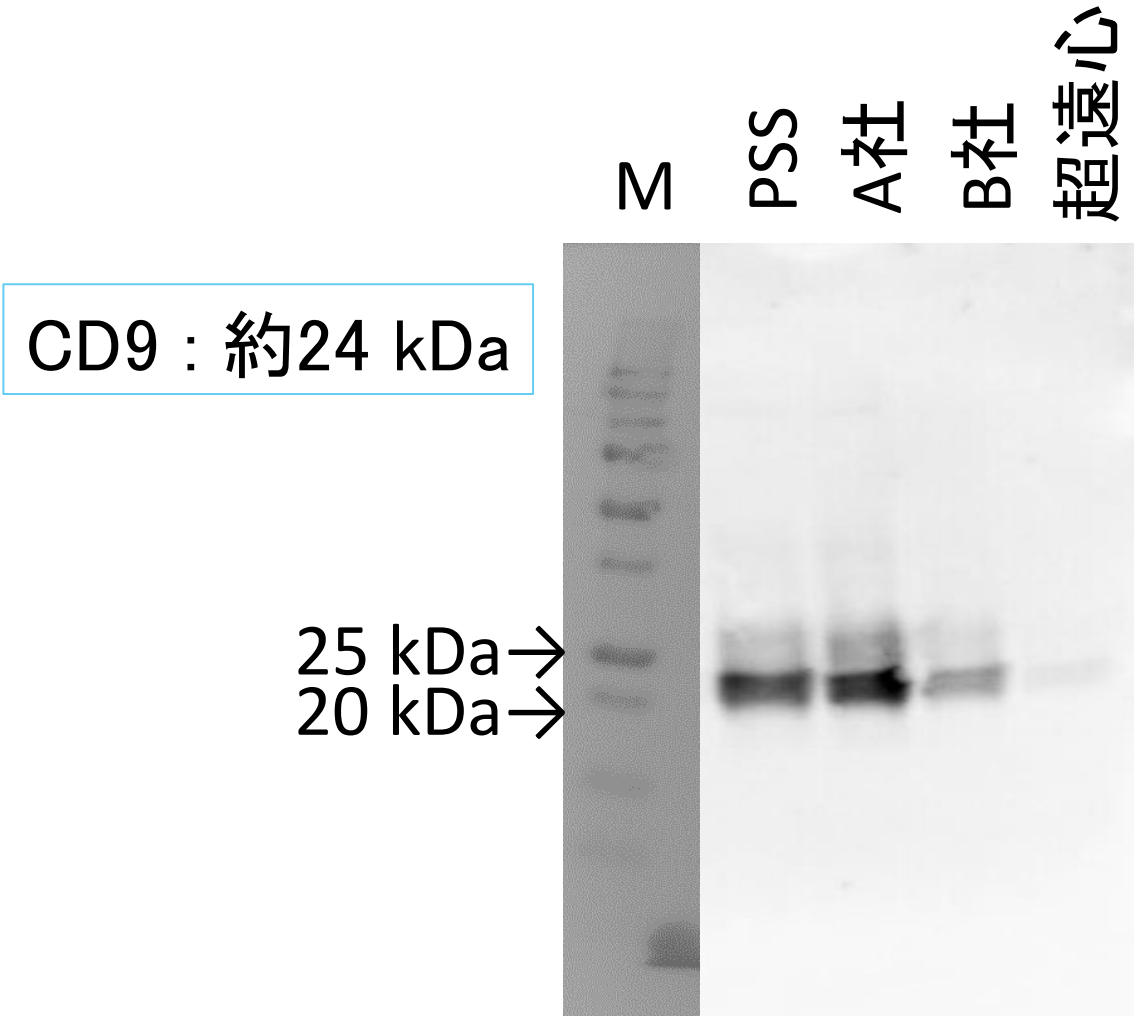
サンプルを1.5 mL tubeに入れ、試薬入りのカートリッジとともに自動抽出装置に架設し、自動単離・抽出を行った。

【miRNA抽出試薬の開発】

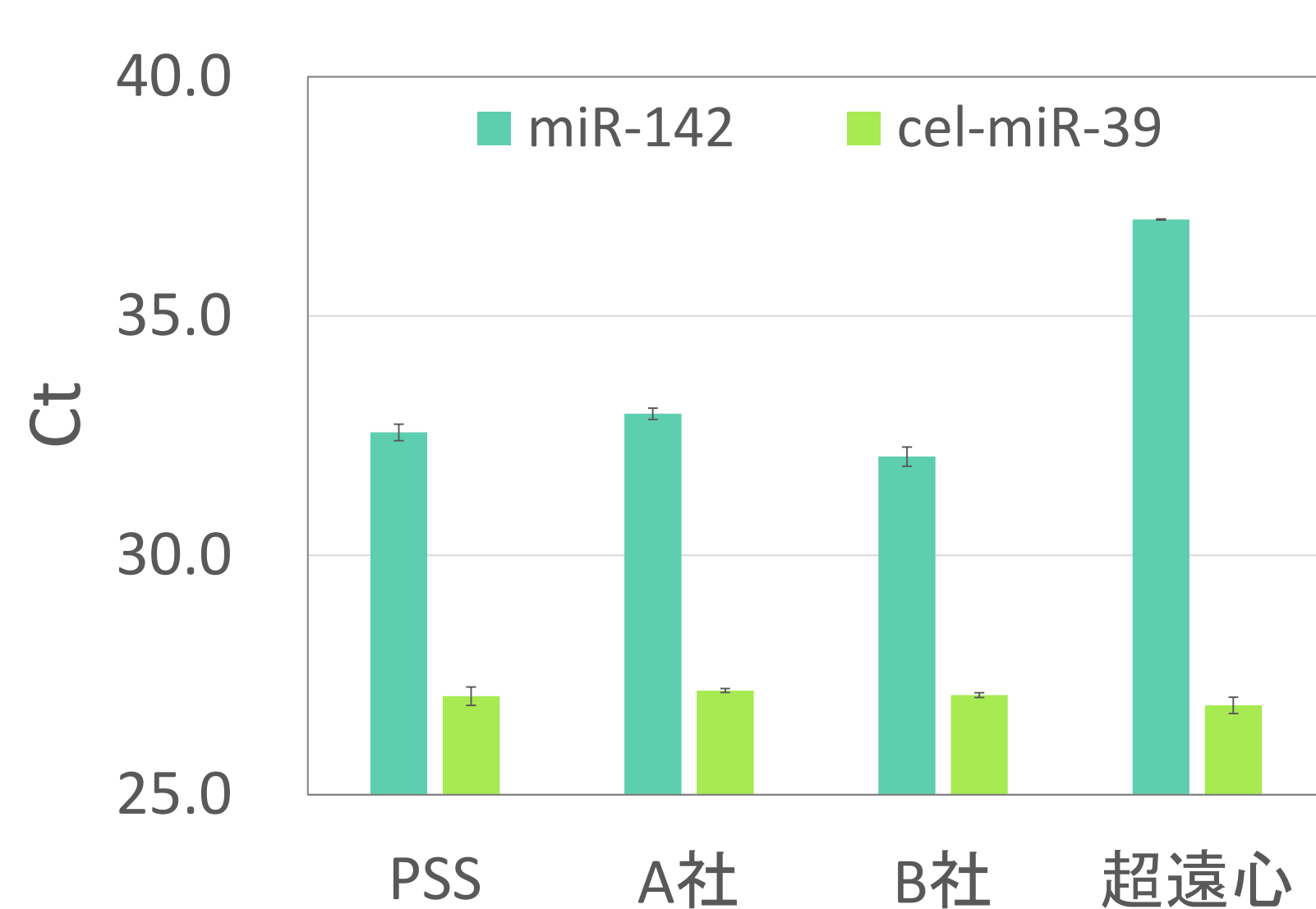


単離結果

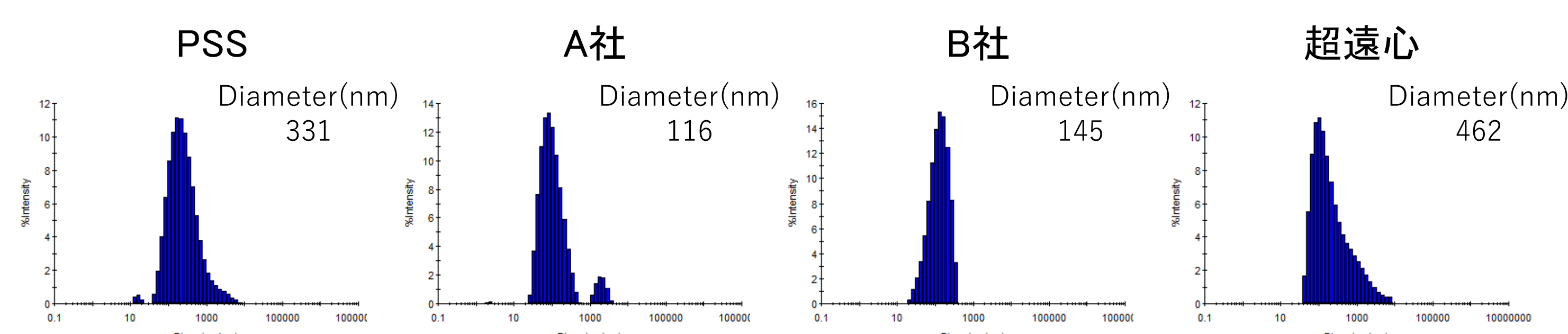
A) ウェスタンブロッティング



B) リアルタイムPCR



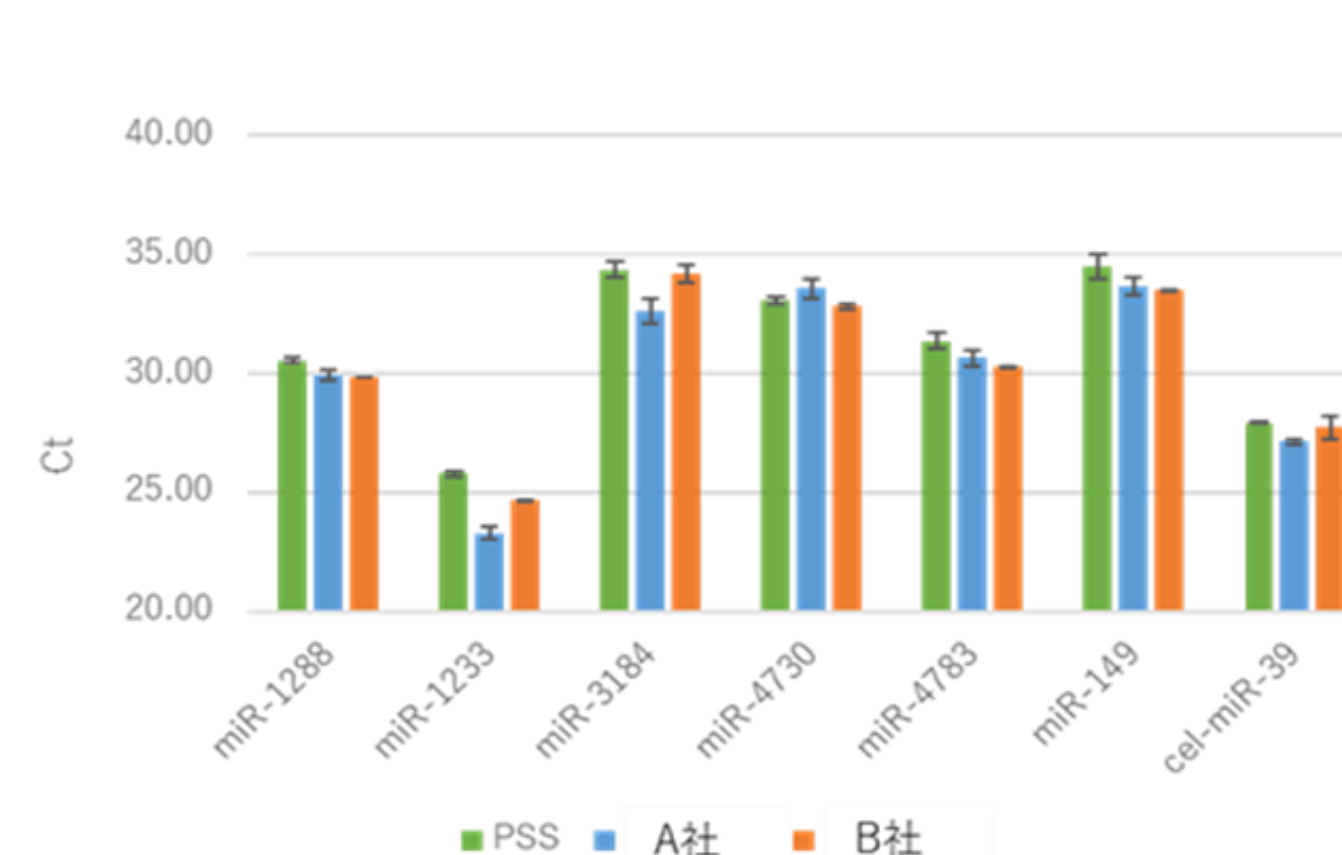
C) 粒径測定



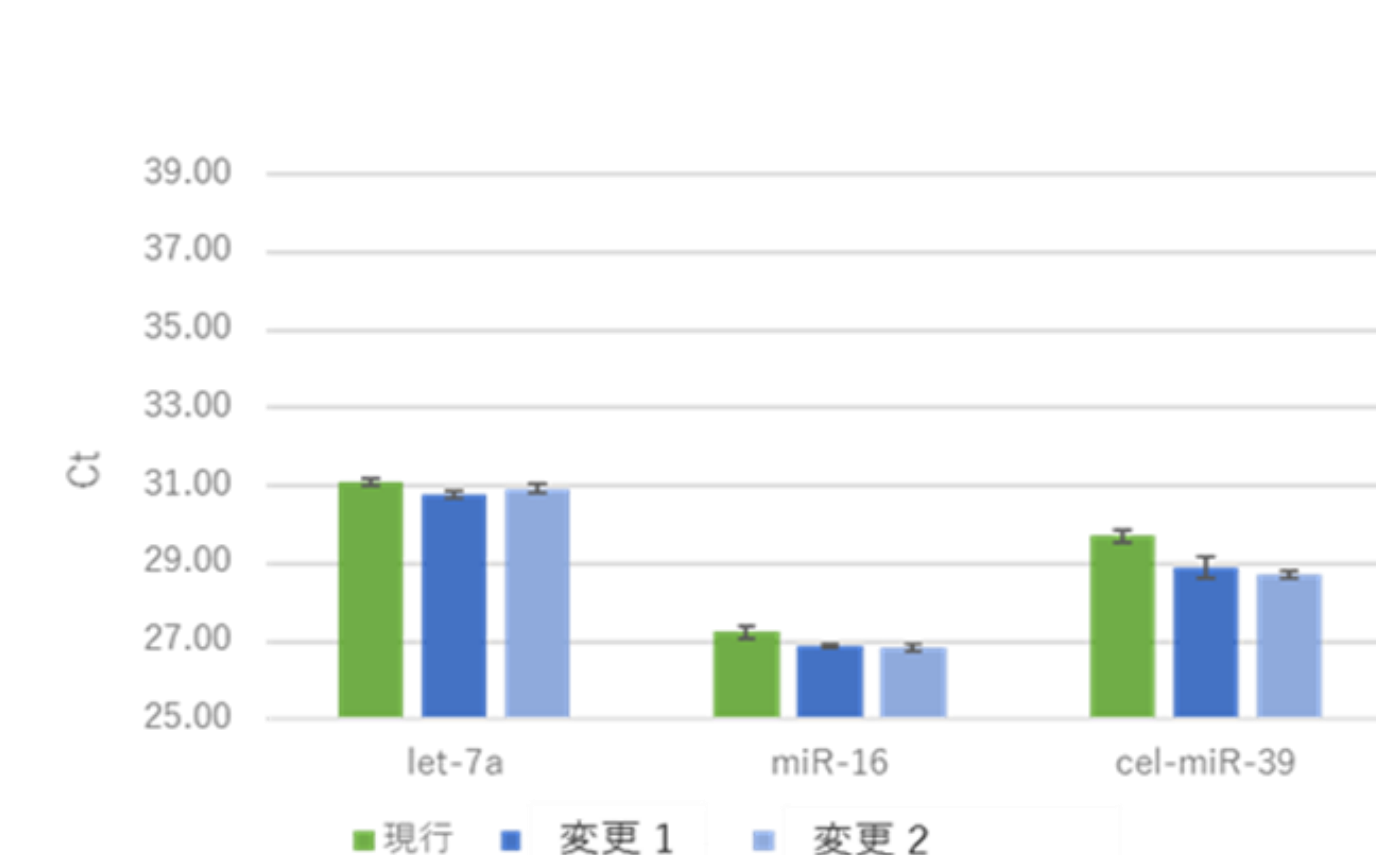
血清100 uLをサンプルとしてエクソソームを単離し、各評価に用いた。
A) 単離したエクソソーム9 uL分を泳動し、CD9抗体により検出した。
B) エクソソーム50 uLからmiRNAを抽出し、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRを行った。
C) エクソソーム45 uLを使用し、DelsaMax Pro (BECKMAN COULTER)を用いて粒径測定を行った。

抽出結果

A) 他社キットとの比較



B) 洗浄動作変更



【完全自動化機器の開発】



【結果と今後の予定】

エクソソームの単離効率は、超遠心法と比較して同等以上であることが示され、他社との比較でも同程度であった。miRNAの抽出においては、他キットに劣っていたが、洗浄動作を変更することにより、改善の傾向が見られた。エクソソーム単離及びmiRNA抽出の工程は自動化することによって、手技に依存することなく再現性の良い結果が得られる可能性を有している。本研究で開発したエクソソーム単離及びmiRNA抽出の試薬は、既に市販している核酸抽出試薬と同じカートリッジを使用して作製した。このことによって既存装置の使用が可能になり、実施したいプロトコルの範囲(アプリケーション)や装置サイズによって、装置を選択することができる。今後、エクソソーム単離及びmiRNA抽出の自動化装置用試薬については、上市に向けた開発を進めていく予定である。