

2021 年度 病院医学教育研究助成成果報告書

報告書提出年月日	2022年3月22日
研究・研修課題名	Droplet Digital PCR (ddPCR)を用いた新型コロナウイルス感染症の早期診断技術の確立
研究・研修組織名(所属)	COVID19検査センター専門部会
研究・研修責任者名(所属)	矢野 彰三 (検査部)
研究・研修実施者名(所属)	竹谷 健 (小児科)

成果区分	<input type="checkbox"/> 学会発表 <input type="checkbox"/> 論文掲載 <input type="checkbox"/> 資格取得 <input type="checkbox"/> 認定更新 <input type="checkbox"/> 試験合格 <input type="checkbox"/> 単位取得 <input type="checkbox"/> その他の成果 ()
該当者名(所属)	
学会名(会期・場所)、認定名等	
演題名・認証交付元等	
取得日・認定期間等	
診療報酬加算の有・無	<input type="checkbox"/> 加算有 () <input type="checkbox"/> 加算無

目的及び方法、成果の内容**①目的**

2020年より新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)による感染症(COVID-19)の診断と伝播抑止を目的として核酸増幅法を用いた検査の需要が高まった。本邦においては国立感染症研究所が公表する病原体検出マニュアルに則った方法による検査体制が地方衛生検査所、病院、衛生検査所で導入された。体外診断用医薬品として20種類以上の検査キットが承認され、主にリアルタイムPCRを検出原理とした検査方法が用いられている。リアルタイムPCR法では40サイクル程度の増幅反応を行い、ある一定の蛍光強度(Threshold)に達した時のサイクル数をCq値とし、カットオフCq値を定めることで陽性と陰性(感度以下)の判定を行う。カットオフ値の設定によっては低コピー領域が陰性(感度以下、検出せず)と判断される。低コピーのものは増幅曲線の立ち上がりが遅いのが特徴的であり、増幅曲線の形状から目的の増幅であるか非特異的な増幅かある程度は推測できるが、カットオフ値の境界ではその判断が難しい。そのため確認の目的も含めて、異なる検出原理を用いた別の手法で測定することは有用とされる。デジタルPCRは検量線を引くための標準試料を必要とせず、チップ上の約18,000個の超微小なウェル中で1分子から増幅させる手法であり、ターゲット分子の絶対濃度(copies/ μ L)を直接的に算出できる。デジタルPCRを用いたSARS-CoV-2検出例は報告されており(Y.Jiang,2020、C.Alteri,2020)、国内での普及も期待されている。微量なウイルスを感度良く検出してクラスターの拡大を抑制することはCOVID-19対策として重要であり、本研究ではデジタルPCR法を用いてSARS-CoV-2を検出する測定系を構築し、その技術をさらに他の感染症診断や遺伝子関連検査に活かせるものと期待する。

②方法

SARS-CoV-2 PCR検査のワークフローをFig.1に示す。鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液由来の検体を熱処理してウイルスを不活性化し、RNA抽出もしくはRNA抽出をせずにダイレクトに逆転写反応(Reverse transcription)を行いcDNAを合成する。そしてcDNAからSARS-CoV-2に特異的な配列を増幅し、検出する。本研究では増幅・検出反応をデジタルPCR(Digital PCR; dPCR)とリアルタイムPCR(Real-time PCR; rtPCR)でそれぞれ行い精度を比較する。

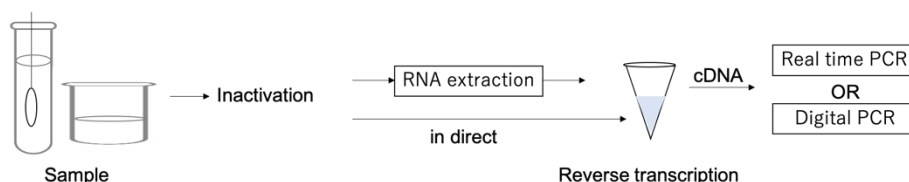


Fig. 1 Schematic overview of SARS-CoV-2 testing.

第一段階として、dPCR 測定系を構築するために反応条件の検討を行い、検出感度、正確性、再現性、最小検出感度 (Limit-of-detection; LOD) 等の妥当性確認 (Validation) を行う。第二段階では臨床検体を測定し、dPCR と rtPCR の陽性一致率、陰性一致率を確認する。SARS-CoV-2 検出用の primer および probe は NIID_2019-nCoV_N (N2) を使用する (Primer/Probe Set (2019-nCoV)、タカラバイオ)。内部標準遺伝子として RNaseP 遺伝子を使用する (Human RNase P Primer/Probe Mix、WAKO)。各配列は米国 Centers for Disease Control and Prevention の発行する 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes, May 29, 2020 で指定されている配列に準拠している。

③成果

1. SARS-CoV-2 検出感度

SARS-CoV-2 RNA 標準試料を段階希釈して 10^5 - 10^1 copy/ μ L 溶液を調製し、 5μ L を逆転写反応に使用して cDNA を合成し、cDNA 2.5μ L を用いて dPCR (増幅サイクル; 39) および rtPCR (増幅サイクル; 40) を行った。dPCR における CoV-2 の threshold の設定は、Non-template control および陰性コントロール RNA (ヒト由来細胞株 KCL-22 RNA) 100 ng を測定し、その蛍光強度から 2,800 とした。逆転写効率を 100% とした場合の 25,000、2,500、250、25、2.5 copies/ μ L 希釈標準試料に対して、dPCR では 9,143、592、103、7.8、1.4 copies/ μ L を示し、予測されるコピー数 (理論値) と実測値の相関は $R^2=0.9943$ だった (Fig. 2A, B)。

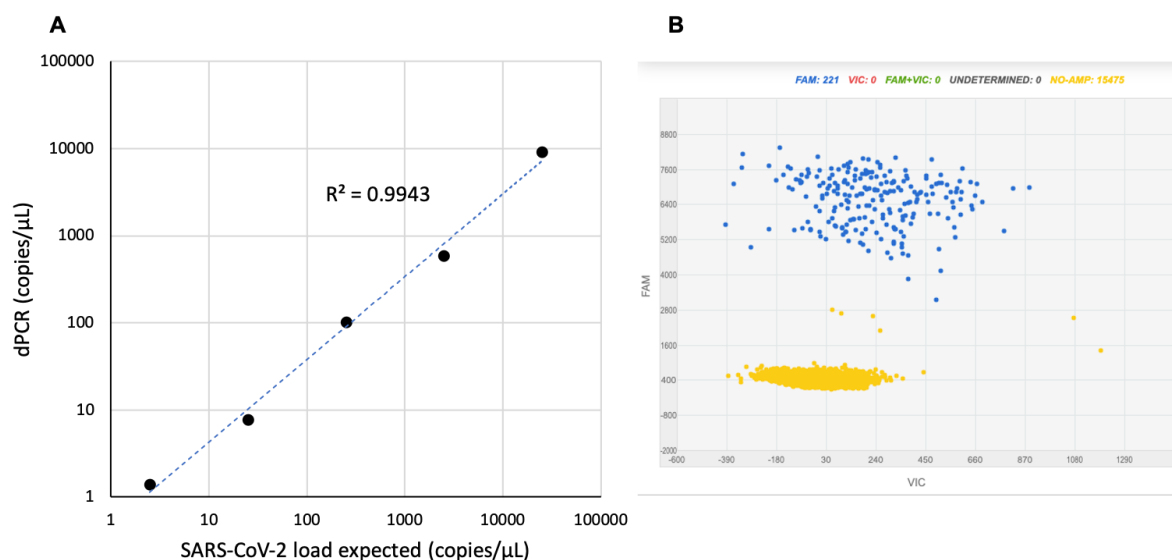


Fig. 2 Quantification of SARS-CoV-2 RNA reference samples by dPCR. A) The graph shows the liner relationship between the expected and the observed concentrations using serial dilutions of SARS-CoV-2 RNA. B) Result of SARS-CoV2 detection using dPCR (e.g. 250 copies/ μ L). Blue dots (FAM) indicate positive of SARS-CoV-2.

rtPCR における C_q 値は 23.4、27.0、30.5、34.1、37.2 を示し、検量線を作成してその傾きから増幅効率を検証したところ、傾きが -3.5 で増幅効率は 93.1 % だった (Fig. 3A, B)。

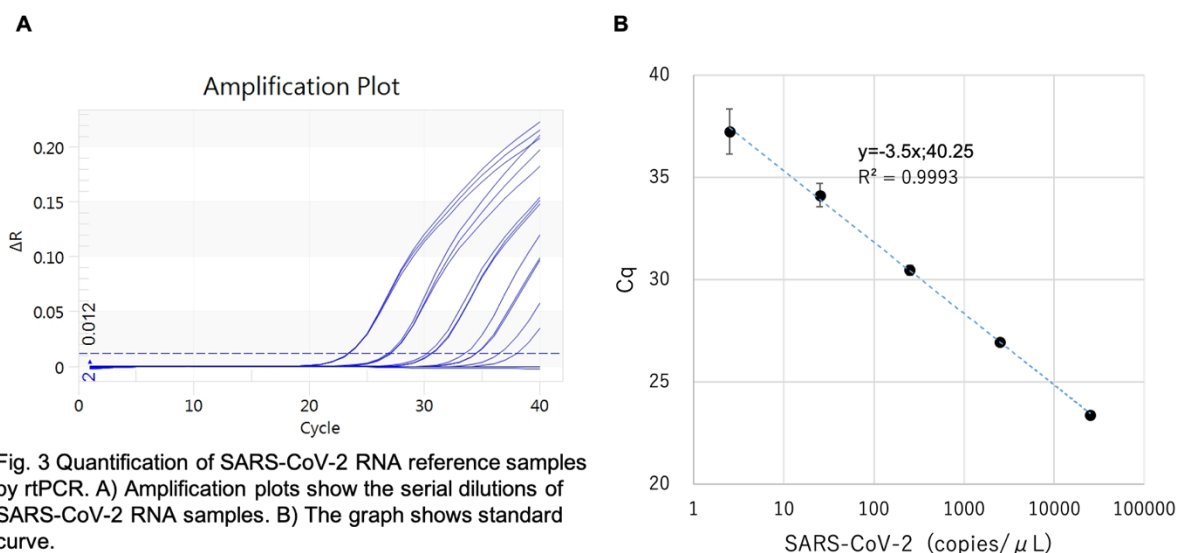


Fig. 3 Quantification of SARS-CoV-2 RNA reference samples by rtPCR. A) Amplification plots show the serial dilutions of SARS-CoV-2 RNA samples. B) The graph shows standard curve.

2. Multiplex digital PCR

SARS-CoV-2 は RNA をゲノムとするウイルスであり、RT-PCR 法で増幅・検出する場合、検体の劣化 (RNA の degradation) や反応阻害物質の影響で cDNA 合成のエラーを招くことがある。cDNA の合成不良や増幅不良によるウイルスの偽陰性判定を防ぐために、内部標準遺伝子として Human RNaseP 遺伝子を用いて、1つの PCR チップ内で SARS-CoV-2 と RNaseP を同時に検出する Multiplex digital PCR の系を構築した。CoV-2 を検出する probe を FAM で標識し、RNaseP の probe を VIC で標識した。primer と probe の最終濃度は、N2 F-primer; 500 nM、N2 R-primer; 700 nM、N2 probe; 200 nM、RNase P F-primer; 400 nM、RNase P R-primer; 400 nM、RNase probe; 130 nM とした。陰性 RNA (ヒト細胞株 KCL-22 RNA) 10 ng に 10^5 - 10^1 copy/ μ L の RNA 標準試料を添加した spiked 試料を調製して測定し検出感度を検証した。転写効率を 100%とした場合に CoV-2 が 25,000、2,500、250、

Table 1 Sensitivity of multiplex RT-dPCR.

SARS-CoV-2 (FAM)		RNase P (VIC)	
Expected	dPCR	KCL-22 RNA	dPCR
(copies/ μ L)	(copies/ μ L)	(ng)	(copies/ μ L)
25,000	8,536	10	4,445
2,500	759	10	3,646
250	82	10	3,854
25	7.9	10	3,955
2.5	0.9	10	3,711

25、2.5 copies/ μ L の spiked 試料に対して dPCR では 8,536、759、82、7.9、0.9 copies/ μ L を示し、予測されるコピー数と実測値の相関は $R^2=0.9997$ だった (Table 1、Fig. 4A、B)。SARS-CoV-2 を含まない陰性試料を連続 4 回測定した結果、4 回全て 0 copy/ μ L で陰性と判定された (data not shown)。rtPCR における Cq 値は 23.5、27.0、30.9、37.7 を示し、2.5 copies/ μ L 試料は増幅・検出されなかった (Table 2)。

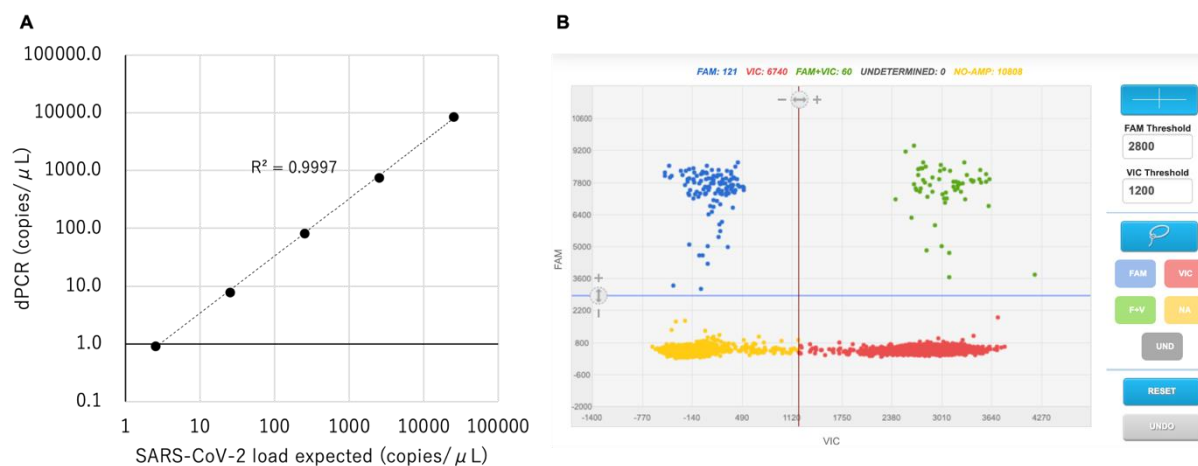


Fig. 4 Quantification of SARS-CoV-2 RNA spiked samples by multiplex RT-dPCR. A) The graph shows the liner relationship between the expected and the observed concentrations. B) Result of multiplex dPCR. Blue dots and green dots are SARS-CoV-2(+). Red dots and green dots are RNaseP(+).

Table 2 Sensitivity of multiplex RT-rtPCR.

SARS-CoV-2 (FAM)			RNase P (VIC)		
Copies/ μ L	Cq Mean	Std. Dev.	KCL-22 RNA (ng)	Cq Mean	Std. Dev.
25,000	23.5	0.10	10	25.6	0.05
2,500	27.0	0.06	10	25.7	0.06
250	30.9	0.25	10	25.7	0.12
25	37.7	0.38	10	25.6	0.08
2.5	N/D		10	25.5	0.19

N/D; No detected

3. 考察

dPCR を用いた SARS-CoV-2 の検出系を構築した。検出感度は 2.5 copies/ μ L まで検出し、陽性 RNA 希釈試料、陽性 RNA 添加試料ともに良好な直線性が得られた。dPCR の実測値が予測値より一定して低値となった要因として、今回構築した dPCR の測定系は cDNA 合成と PCR を別々に行う 2-step RT-PCR 法を用いており、逆転写効率や 2-step RT-PCR による増幅効率の誤差が要因のひとつに考えられる。rtPCR においても dPCR と同等の感度を得たが、低コピー領域 (2.5 copies/ μ L) では 3 重測定した内、増幅されないウェルがあり、コピー数の低い領域においては rtPCR と比較して dPCR の精度が高いと予測されるが、低値領域の再現性 (LOD) を引き続き検証する予定である。コロナ禍で dPCR 関連の物品の供給が遅延しており当初の計画より進捗が遅れているが、供給が再開した後、臨床検体の測定を行い rtPCR との陽性一致率および陰性一致率を検証する。