

## 自動化 4 検体プール方式 PCR 検査についての実証研究報告 (2)

田中十志也 (東京大学先端科学技術研究センター 特任教授)

大澤毅 (東京大学先端科学技術研究センター 特任准教授)

### [要旨]

(AMED) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構のウイルス等感染症対策技術開発事業 (早期・大量の感染症検査の実現に向けた実証研究支援) 課題: 安全・効率的な大量感染症検査システムの構築とプール方式の実証研究 (研究開発代表者: 大澤毅) にて支援をうけて 4 検体プール方式の実証研究を行った。非カオトロピック剤の新規ウイルス不活化剤にて不活化処理した陽性唾液廃棄検体 48 検体を含む合計 504 検体につき自動液体処理装置を用いて 4 検体プールを作成し 2019 新型コロナウイルス検出試薬キットによる PCR 検査を実施した。その結果、陽性検体を含む 48 プール検体中 45 検体が陽性と判定された。一方、3 プール検体が陰性と判定されたが、これらはいずれも個別の PCR 検査において 1 反応あたり 10 コピー未満のウイルス量の陽性検体を含んだプール検体であった。個別の PCR 検査にて 10~20 コピー/反応のウイルス量を有する陽性検体を含むプール検体では、N2 領域が検出限界以下になった例が 9 プール検体中 4 例認められたが、N1 領域では全例が陽性判定となり、偽陰性例は認められなかった。本研究で実施した 4 検体プール方式による PCR 検査の感度は 0.938、特異度は 1 であり偽陽性は認められなかった。

### [背景]

SARS-CoV-2 感染症 (COVID19) 拡大の背景には高い伝播率と無症候感染者率があげられ、流行を的確に予測し感染拡大を防止するためには安全で簡便かつ迅速な検査方法の構築と大量検査に資する安価なサーベイランスシステムの実装が急務である。しかし、国内で実施されている PCR 検査の多くは、カオトロピック剤にてウイルスを不活化して核酸抽出した検体、あるいは採取検体をチューブ等に移し替えてウイルス処理液と混合・熱処理して不活化した後に PCR 反応に用いている。前者は安全ではあるものの処理工程が多く時間と費用がかかること、後者は感染性検体を安全に処理する必要があることから BSL2+ 施設および専門知識と経験を有する技術者が必要とされる。また、流行時に迅速

に大量検査するには、試薬、検査関連プラスチック製品、および測定技術者など医療資源不足対策が必須である。海外では効率的な検査体制を確保する目的でプール方式の導入が進み (Nature 583: 506, 2020)、米国では最大 12 検体 (多くは 5 検体) のプール方式に緊急使用許可 (EUA) が発行されているが、わが国の検査体制整備は十分に進んでいる状況ではない。また、わが国においては唾液を用いた One-step PCR 法が汎用されているが、唾液を用いた One-step PCR 法を用いたプール方式の PCR 検査は海外では実施されていない。

これまでに我々は、企業 ((株) 医学生物学研究所、島津製作所、パーキンエルマーなど) および世田谷区などと連携し PCR 検査の自動化と 4 検体プール方式の構築を行ってきた。本研究では、PCR 反応を阻害しない新規ウイルス不活化剤処理した陽性唾液廃棄検体およびボランティア陰性検体を用いて 4 検体プール方式による PCR 検査の有用性を検討した。

#### [方法]

本研究は、東京大学先端科学技術研究センター倫理審査委員会の承認 (審査番号 20-292) を取得し、ボランティア検体の鼻咽頭スワブ液および衛生検査所より入手した陽性唾液廃棄検体を用いて実施した。陽性唾液廃棄検体は非カオトロピック塩系新規ウイルス不活化剤 ((株) 医学生物学研究所) と 1:4 の比率で混合した後、70°Cにて 5 分間処理し、3,000 rpm にて 5 分間遠心して使用した。検出限界の測定には Zept Metrix 社 NATrol™ SARS-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Stock (Lot No. 325098) を用いた。自動液体処理装置はパーキンエルマー製 JANUS G3 4Tip、新型コロナウイルス検査キットは島津製作所の 2019 新型コロナウイルス検出試薬キット、PCR 装置は Thermal Cycler Dice® Real Time System III (タカラバイオ) および CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)、PCR プレートは FrameStar 96 well qPCR plate (タカラバイオ) および SARSTEDT 96 FastPCR-P1 full skirt を用いた。すなわち、96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 5  $\mu$ l の Sample Treatment Reagent と検体 5  $\mu$ l (自動分注装置を使用した場合、検体採取するチップに残存する検体が約 0.2  $\mu$ l であったことから通常測定の場合の検体採取量の設定を 5.2  $\mu$ l、4 検体プールの場合の検体採取量の設定を 1 検体あたり 1.5  $\mu$ l に変更している (田中十志也ら、自動化 4 検体プール方式 PCR 検査についての実証研究報告。2020 年 10 月 9 日、<https://www.ric.u-tokyo.ac.jp/topics/2020/ig-20201009.pdf>) を添加

し混合した後、90°Cにて5分間インキュベートした。インキュベート後15 µlのRT-PCR反応液を添加・混合、PCR装置にて42°C 10分および95°Cにて1分間インキュベートした後、95°C 5秒および60°C 30秒のサイクルを45サイクル行った。陽性判定は、Cy5、ROX、およびFAM蛍光フィルターによる増幅曲線（Ct値）から判定した。すなわち、内部コントロール（IC）のCy5の増幅曲線の立ち上がりが40サイクル以内であり、かつROXの増幅曲線が45サイクル以内の場合にN（Nucleocapsid）遺伝子のN1領域が陽性、FAMの増幅曲線が45サイクル以内の場合N2領域が陽性と判定した。SARS-CoV-2ウイルスPCR検査の判定はN1およびN2の両方または片方が陽性の場合SARS-CoV-2陽性、N1およびN2の両方が陰性かつCy5が40サイクル以内の増幅が認められた場合に陰性、ROX、FAM、Cy5の全ての増幅が認められなかった場合は測定不成立とした。

判定	ROX: N1 (≦45サイクル)	FAM: N2 (≦45サイクル)	Cy5: IC (≦40サイクル)
陽性	+	+	+または-
	+	-	+または-
	-	+	+または-
検出感度以下	-	-	+
不成立	-	-	-

### [結果]

#### 1. 検出限界に及ぼす逆転写時間の影響

これまでに、Ampdirect™ 2019-nCoV検出キットではN1領域（ROX）と比較してN2領域（FAM）のCt値が大きくなること、コピー数の少ない陽性検体を含む4検体プールの場合ではCt値がより大きくなる傾向があることを確認している。このことからコピー数が少ないウイルスの場合には、逆転写反応時のプライマーのアクセシビリティがN2領域では低い可能性が考えられた。そこで、逆転写反応時間の影響を検討した結果、N2領域では逆転写反応時間が10分の時には5コピー/反応を検討した8例中2例が検出限界以下であった（図1）。また、10分の反応時間ではバラツキが大きい、時間を延長することでバラツキが減少し低コピー数のウイルスが検出できること、40分の反応時間では検討した5~1000コピー/反応においてN1領域とほぼ同等のCt値が得られた（図2）。

なお、10~20 コピー/反応のウイルス数に相当する Ct 値は N1 および N2 領域においてそれぞれ 38.32~35.75 および 38.72~36.94 であった。

5 copies/reaction						100 copies/reaction					
ROX (N1)			FAM (N2)			ROX (N1)			FAM (N2)		
RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40
38.16	37.91	37.14	ND	39.06	36.85	33.15	32.74	33.03	33.56	32.73	33.06
38.94	39.18	38.45	37.68	41.75	38.85	33.42	33.18	33.20	33.83	33.27	33.03
38.30	38.10	38.30	ND	39.78	37.73	32.92	33.30	33.07	33.35	33.23	32.78
38.97	37.35	37.71	40.34	37.49	37.28	33.30	32.95	33.15	31.34	32.87	32.67
37.88	37.88	37.19	37.53	37.42	37.71	32.92	32.77	33.26	29.22	32.87	32.95
37.63	38.07	36.91	42.71	39.94	36.81	32.79	33.11	33.17	33.59	32.98	33.05
38.16	37.42	38.92	40.99	37.88	38.34	32.63	33.11	32.81	32.25	33.35	32.52
37.40	37.44	37.96	39.39	37.30	36.84	32.42	33.09	33.60	31.45	33.35	33.18

10 copies/reaction						1000 copies/reaction					
ROX (N1)			FAM (N2)			ROX (N1)			FAM (N2)		
RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40
36.56	37.01	37.09	37.00	37.84	36.89	29.85	29.73	29.65	30.31	29.86	29.44
37.32	35.23	37.60	37.09	35.55	37.42	29.98	29.60	29.80	30.32	29.74	29.60
36.97	36.75	36.60	37.44	38.09	36.61	29.87	29.42	29.63	30.54	29.50	29.60
36.41	37.54	37.09	36.87	38.72	36.44	29.60	29.56	29.61	29.84	29.41	29.22
36.32	37.18	36.56	37.18	36.03	36.16	29.43	29.60	29.72	30.40	29.69	29.64
36.40	36.50	35.70	37.38	36.05	35.42	29.51	29.89	29.80	28.49	30.01	29.64
35.62	36.48	38.32	34.05	37.09	37.46	29.53	29.74	29.79	29.55	29.84	29.56
32.93	36.08	37.12	30.64	36.97	36.59	29.84	29.74	29.93	28.92	29.82	29.99

20 copies/reaction					
ROX (N1)			FAM (N2)		
RT10	RT20	RT40	RT10	RT20	RT40
35.22	35.17	34.78	35.53	35.57	34.77
35.29	35.39	35.41	36.20	35.45	35.31
35.45	35.65	35.21	35.67	35.64	34.89
34.73	35.40	35.11	34.40	35.40	34.89
34.77	35.65	35.38	35.19	35.27	34.68
35.03	35.59	35.44	36.94	35.14	35.34
34.87	35.75	35.17	34.87	36.28	35.30
35.17	35.46	35.18	35.77	36.51	35.26

図 1 5~1000 コピー/反応時の個別 Ct 値データ

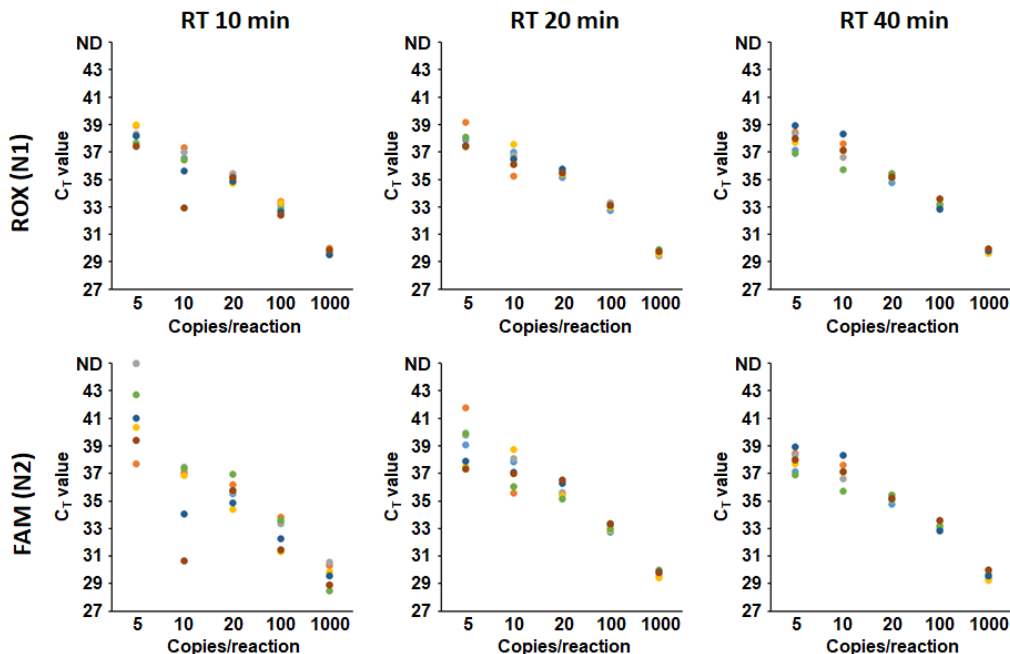


図 2 5~1000 コピー/反応のウイルス量の Ct 値に及ぼす逆転写反応時間の影響  
逆転写反応時間を延長することにより N2 領域の Ct 値の減少とバラツキの改善が認められる。

## 2. プール方式の実証研究

最適化した自動液体処理装置を用いて4検体プール方式によるPCR検査の精度を検討した(図3)。開発中のウイルス不活化剤にて処理した陽性廃棄唾液48検体および456本の陰性ボランティア検体を用いてしてプール検体のCt値の変動および陽性一致率等に及ぼす影響を検討した。ほぼ全てのプール検体においてCt値の増加が認められ、とくにウイルス量が少なくCt値が高い陽性検体ほど影響を受けやすいことが示唆された。今回測定した陽性検体を含むプール検体48検体中N1領域では3検体、N2領域では10検体が検出限界以下となった。全体では、陽性検体を含むプール検体48検体中45プール検体が陽性、3プール検体が陰性と判定された。ただし、陰性となった検体はいずれも個別のPCR検査においてN1領域のCt値が39以上、N2領域のCt値が42以上であり、1反応あたり10コピー未満のウイルス量を含む陽性検体であったと考えられた。次に、検出限界の検討の結果(図1および図2)から個別のPCR検査にて10~20コピー/反応に相当するウイルス量を有する陽性検体を含んだプール検体9検体について検討した。その結果、N2領域が検出限界以下になった例が9プール検体中4例認められたが、N1領域では9プール検体中全てが陽性判定とな

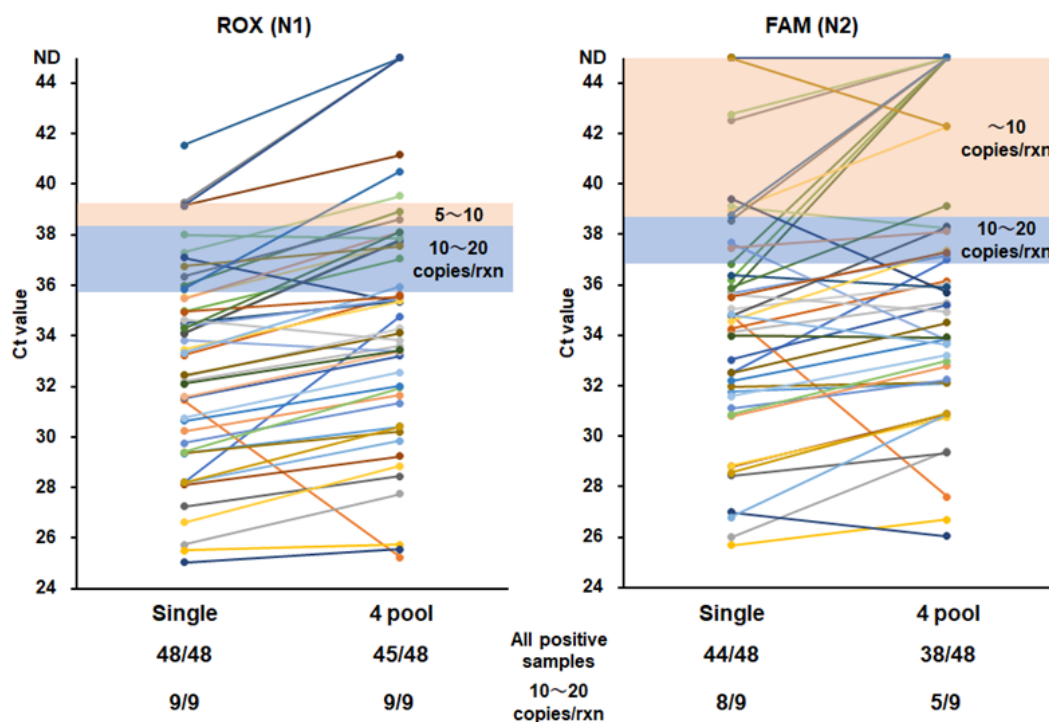


図3 プール検体におけるCt値の変化

り、総合判定として陰性となった例は認められなかった。今回実施した 4 検体プール方式による PCR 検査の感度は 0.938、特異度は 1、偽陰性率は 0.063、偽陽性率は 0、陽性的中率は 1、陰性的中率は 0.963 であった。

#### [本研究成果の意義]

無症状者の PCR 検査などの社会的検査の拡充および検査試薬等の医療資源の不足に対応するため、わが国においてもプール方式による PCR 検査が検討されている。しかし、海外で実施されているプール方式の PCR 検査は、ぬぐい液を含む輸送培地をプールしてウイルスから精製した核酸を用いており、わが国の多くの衛生検査所において導入している唾液検体、RNA 精製が不要の One step RT-PCR 法を用いたプール方式の PCR 検査の性能について十分には評価されていない。これらを踏まえて本研究は、非カオトロピック塩の新規ウイルス不活化剤にて不活化した陽性唾液検体、One-step RT-PCR 法、および自動液体処理装置を用いた 4 検体プール方式での PCR 検査を評価したものであり、プール方式の検査導入の参考となるものである。

#### [ポイントと今後の課題]

- エssenシャルワーカーや無症状者を対象とした社会的検査の拡充に伴う医療資源の逼迫に対応するにはプール方式の PCR 検査が有効である
- コンタミネーションなどのヒューマンエラーを回避するため、プール化における検体採取は自動化が必須である
- 使用する機器毎、試薬毎に検体採取量設定および、検体、試薬の分注速度や、Tip を抜くスピード等の分注の設定を最適化する必要がある
- プール方式の導入およびプール検体数の決定にあたっては検査前確率を考慮する必要がある
- RNA 精製が不要の One step RT-PCR 法を用いた 4 検体プール方式において陽性一致率が約 94%と良好な結果が得られたが、それ以上の検体数をプールする場合には偽陰性率の増加などに注意する必要がある
- 検体希釈に伴う偽陰性を減少させるためにはホワイトの PCR プレートおよび逆転写反応時間の延長も有効な手段である
- 自動液体処理装置、検体採取チューブや PCR プレート等のプラスチック製品の不足対策は喫緊の課題である

- トレーサビリティーを確保するためのソフトウェア開発
- 試薬毎に陽性判定のカットオフを設定する必要がある