

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08497

研究課題名（和文）新規病原体核酸検査に用いる汎用的精度管理標品の迅速な作成を検証に資する研究

研究課題名（英文）Conducting research aimed at validating the rapid development of standardized quality control reagents for utilization in pathogen nucleic acid testing

研究代表者

石井 良和 (Ishii, Yoshikazu)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90246695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新型コロナウイルス核酸検査をモデルとして、新興感染症検査の標準化および精度管理のための迅速かつ安価なフルプロセスコントロール試薬の作出方法を確立した。作出したフルプロセスコントロールにNIBSCから購入した標準品をもとに国際単位を付した組換えレンチウイルス試料は、凍結融解を経ても4℃で7日間安定であり、試行した外部精度管理調査における冷蔵輸送では問題が起こらないことを確認した。標準品をもとに国際単位を付したフルプロセスコントロールは、二次標準物質として国際標準化や精度管理、機器導入の際の妥当性確認などへの活用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症のような新興感染症にかかる核酸検査は、標的塩基配列が明らかになれば、プライマーおよびプローブを迅速に作成して検査系を迅速に構築することが可能である。しかし、その検査の国際標準化や精度管理、検査機器や試薬の妥当性確認において、国際単位を付した安定で安全な試料を容易に入手する必要があり、タイムリーな対応をすることが困難であった。本研究で確立した手法を用いれば、将来の新興感染症の核酸検査の国際標準化と精度管理、および妥当性確認に対して迅速な対応が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study established a rapid and inexpensive method for producing full-process control reagents for standardization and accuracy management of emerging infectious disease testing, using the novel coronavirus nucleic acid test as a model. Recombinant lentivirus samples with assigned international units, based on reference materials purchased from NIBSC, were produced. These samples remained stable at 4°C for 7 days even after freeze-thawing, and no issues were encountered during refrigerated transport in external proficiency testing. Full-process controls with assigned international units based on reference materials are expected to be utilized as secondary reference materials for international standardization, accuracy management, and validation during equipment implementation.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：病原体核酸検査 精度管理 レンチウイルス SARS-CoV-2 RT-qPCR

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症の急速な流行に伴い、その診断のための核酸検査の需要が急激に高まった。しかしながら、すべての検査実施施設が新型コロナウイルス核酸検査の質を確保するための、検査の全工程を確認するためのコントロール試料（フルプロセスコントロール試料）を入手できる状況ではなかった。さらに、フルプロセスコントロール試料の入手が困難であったために、新型コロナウイルス核酸検査の精度管理を十分に行うことができなかった。また、検査の国際標準化がなされておらず、検査結果を互いに比較することができなかった。これらの事例は、将来の新興感染症の流行に対する検査の普及において国際標準化された検査に資するフルプロセスコントロール試料を迅速かつ安価に供給できる体制を備えることの必要性を示している。

2. 研究の目的

World Health Organization が定める SARS-CoV-2 のフルプロセスコントロールの国際標準物質は、The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) を通じて入手可能である。一方、RT-qPCR の結果である Ct 値から IU/mL に換算することで、使用する機器や試薬に関わらず、自施設の検査結果の検証とその結果に基づく是正を行う内部精度管理や自施設の検査能力を把握するために他施設の検査と比較する外部精度管理に利用することが可能となる。ただ、NIBSC の IU/mL の値付けされたフルプロセスコントロールは、市販されるまでに時間を要したことおよび高額なことが問題である。

レンチウイルスを用いて任意の遺伝子をパッケージングした偽ウイルスは、効率的に作成することができる。また、レンチウイルスの発現ベクターは、哺乳類細胞やモデル動物にエフェクター分子などを安定的且つ長期間発現されることができ、汎用されている。また組み換えレンチウイルスは自己複製能力を有さないことが特徴である。

本研究では、SARS-CoV-2 核酸検査をモデルとして、RNA ウイルス病原体核酸検査のための国際標準物質に準じた精度管理試料を迅速かつ安定的に供給することを目的として試験的に実施した。すなわち、このレンチウイルスの特徴を利用して、SARS-CoV-2 の RT-qPCR で標的とされる複数の遺伝子配列を直列に配置し、且つタンパク質を発現しないようにデザインした合成核酸をレンチウイルスにパッケージングした。さらに、NIBSC の試薬を用いて作成されたレンチウイルスを含む溶液に WHO の IU/mL を値付けして、2 次標準物質を作成した。この試作した 2 次標準物質を用いて外部精度評価を試行した。

3. 研究の方法

フルプロセスコントロールに組込む標的は、国立感染症研究所および米国 Center for Disease Control and Prevention が公表する reverse-transcription (RT)-PCR の標的に加え、本邦で利用可能な RT-PCR 検査キットの標的とされている、Orf1b, S, および E 遺伝子の一部を直列につなぎ合わせた配列を、人工遺伝子合成サービスに委託した (図 1)。

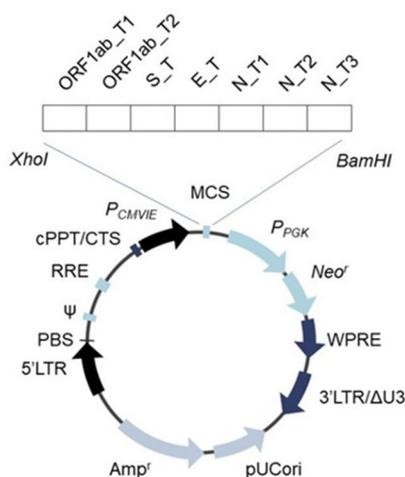


図1. 人工合成してレンチウイルスベクターに組み込んだSARS-CoV-2の検出標的の模式図

MCSを利用してクローニングされた各遺伝子はタンパク質に翻訳されないように工夫されている

この配列は、"pLVSIN-CMV_Neo_v4.0_complete" と名付け、GenBankへ登録した (accession number: OR900247)。

レンチウイルスの作成には、Lentiviral High Titer Packaging Mix with pLVSIN シリーズ (タカラバイオ) を用いた (図 1)。得られた組換えレンチウイルスによるフルプロセスコントロール試料は、高濃度および低濃度、凍結融解の有無、4 あるいは 25 の保存条件における安定性を検討した。RNA 抽出には

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。核酸増幅検査の参照法には感染研法 N2 のプライマー・プローブを用いた RT-quantitative PCR (RT-qPCR) とした。リアルタイム PCR サーマルサイクラーには Quant Studio 5 (Thermo)、試薬には TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR (Thermo) を用いた。参照法を国際標準化するため、新型コロナウイルス 1 次国際標準物質 20/146 (NIBSC) を原液から 5 段階希釈後、RNA を抽出し、RT-qPCR で得られた Ct 値と IU/mL の理論値を用いて検量線を作成した。そして得られた 2 次標準物質を高濃度試料、低濃度試料に分け、さらに陰性試料を外部精度管理の配布試料として

国内の31施設へ配布し、それぞれの日常検査の方法で測定された結果を集計した。

4. 研究成果

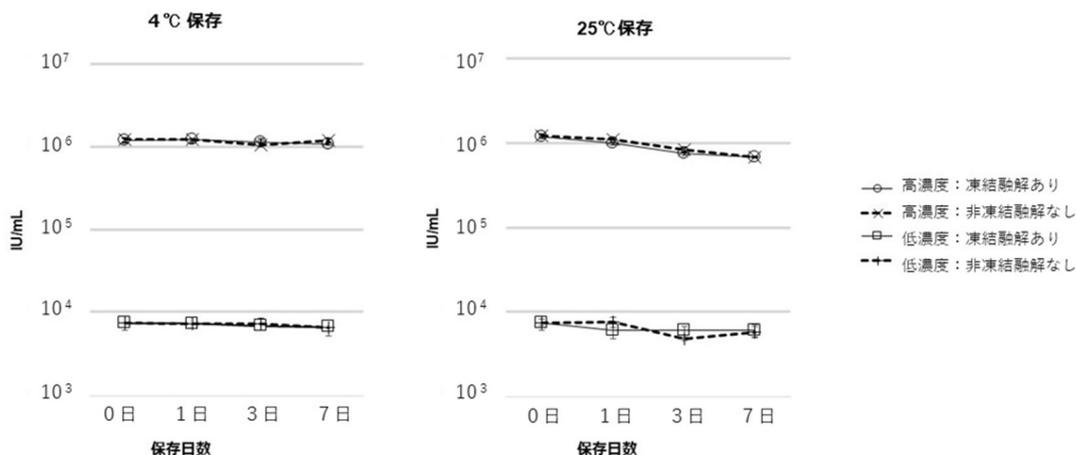


図2. レンチウイルスベクターを用いて作成したSARS-CoV-2の2次標準試料の保管条件の違いによる経日的安定性

4℃および25℃にて保存したレンチウイルスベクターを用いて作成したSARS-CoV-2の2次標準資料はいずれも7日まではほぼ安定であることが確認された

保管条件の検討のため、組換えレンチウイルスで作成したフルプロセスコントロール試料を高濃度 (1.2×10^6 IU/mL) あるいは低濃度 (7.4×10^3 IU/mL) へ分けた後、さらに-80℃の凍結融解ありとなしの条件に分けた。4 で7日間の保管した場合、いずれの条件も RT-qPCR の測定値に影響しなかった。一方で、25 で7日間の保管した場合、7日後に高濃度サンプルは61%まで、低濃度サンプルは78%まで濃度が減少した(図2)。

外部精度管理調査に参加した31施設は、高濃度試料では30施設、低濃度試料では27施設が陽性と回答した。陰性試料は30施設が陰性と回答し、1施設は内部コントロールが陰性的のために検査無効と回答した。31施設のうち25施設が Ct 値を返す装置を用いていた。ある同一機器および同一試薬を使用した8施設間での Ct 値の幅は、高濃度試料で22.6から26.7(平均25.4, 標準偏差2.2)、低濃度試料で32.5から37.0(平均35.4, 標準偏差2.9)だった。これらの結果から、任意の配列を組換えたレンチウイルスは一本鎖RNAウイルス核酸検査のフルプロセスコントロールとして用いることができることが確認できた(図3、4)。

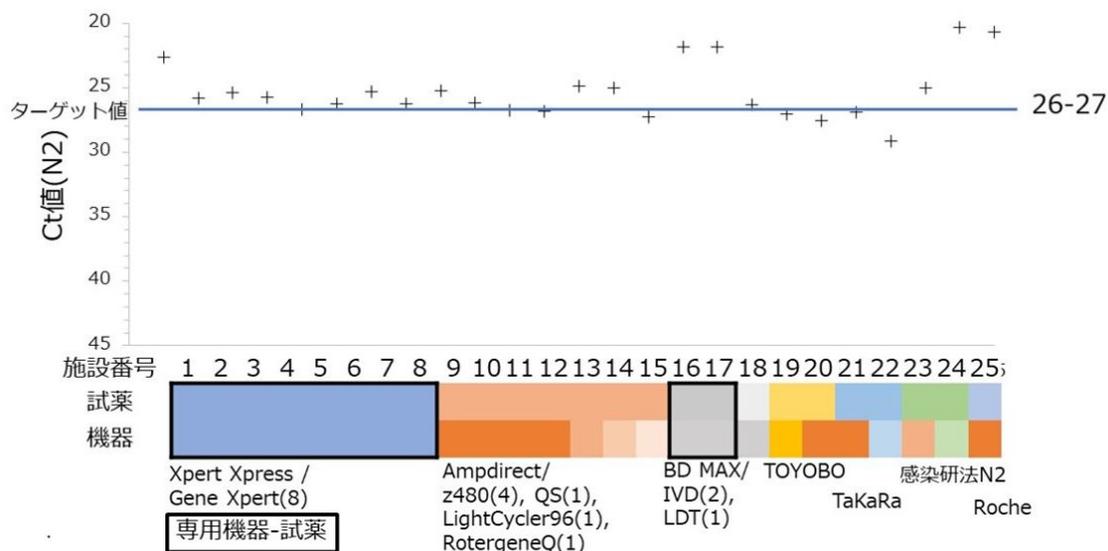


図3. Ct値が報告された25施設の高濃度試料の測定結果と使用した機器・試薬

施設番号1、24および25の報告地は2SDを超えており、何らかの是正が必要な可能性がある。BD MAXを使用した施設番号16と17のCt値は低値を示しているが、この機種は使用する検体量が他の検査法と異なることが影響している可能性がある

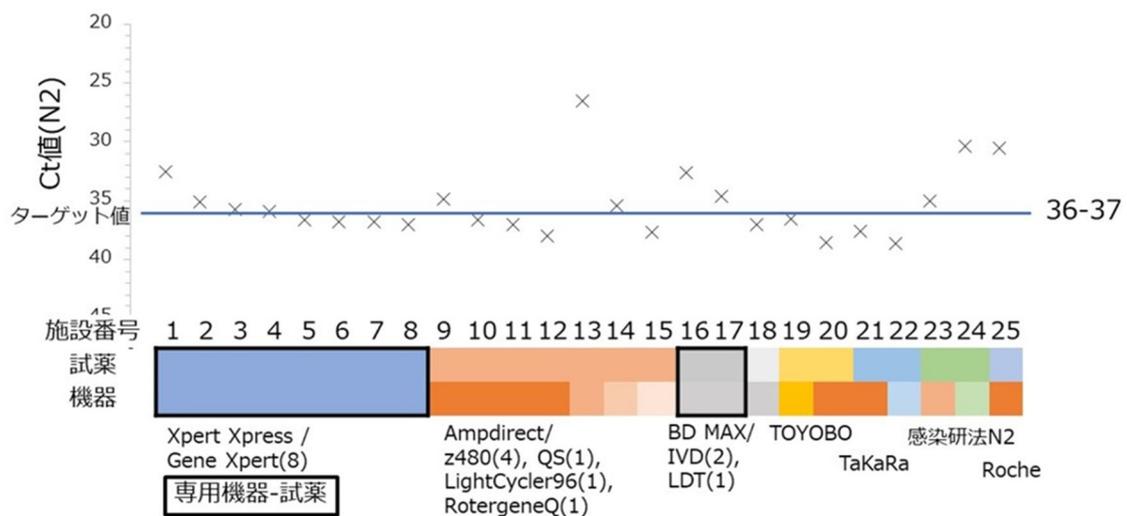


図4. Ct値が報告された25施設の低濃度試料の測定結果と使用した機器・試薬
施設番号13は2SDを超えており、是正が必要なことが分かる

少なくとも今回作成した2次標準物質は、4で7日間安定であることから、外部精度管理評価のための冷蔵による配布も可能であった。配布するプロセスコントロールにIU/mLの値付けをすることで、標準物質としての活用が可能であると考えられた。

外部精度管理調査の結果、一部の施設で低濃度サンプルの定性的判定結果が異なったことから、低濃度サンプルを用いた精度管理の重要性が再確認された。同一機器および同一試薬を用いた施設同士で返却されたCt値に大きな差があったことから、試薬間差あるいはロット間差や機種間差が大きいと考えられた。肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスを除くと、いまだわが国では、病原体核酸検査におけるIU/mLの概念が普及していないことから、Ct値の報告にとどめたが、各施設が標準物質を用いてあらかじめキャリブレーションすることで、機種や試薬に関係なく測定精度の比較が可能になることが期待される。

なお、組換えレンチウイルスは「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の使用規制対象となるため、適切に取り扱うことが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	舘田 一博 (Tateda Kazuhiro) (20236558)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	青木 弘太郎 (Aoki Kotaro) (50821914)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	
研究協力者	加村一中川 晴香 (Kamura-Nakagawa Haruka)		
研究協力者	板野一菅原 瑞希 (Itano-Sugawara Mizuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関