核酸認証標準物質の開発と 新型コロナウイルス感染症検査への対応*

Development of Nucleic Acid Certified Reference Materials and Response for Testing for Coronavirus Infection

藤井紳一郎** 野田尚宏*** 柴山祥枝** 関口勇地*** 加藤 愛**

Shin-ichiro FUJII, Naohiro NODA, Sachie SHIBAYAMA, Yuji SEKIGUCHI and Megumi KATO

Key words

nucleic acid, certified reference material, SARS-CoV-2, COVID-19, PCR test, quality control, international comparison study

1. はじめに

デオキシリボ核酸 (DNA) やリボ核酸 (RNA) といった核酸を対象とした検査や分析は、臨床検査や食品検査などバイオ計測において、近年急速に普及してきた。昨今話題となっている新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に起因する新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 検査において、PCR 検査の測定対象となっているのはウイルス由来の RNA 分子である。産業技術総合研究所 (産総研) では、臨床検査だけでなく、核酸を対象とした測定技術や分析装置から得られる結果の妥当性を確認することのできる核酸認証標準物質の開発を進めてきた。本稿では、その認証標準物質の特性を解説するとともに、PCR 法を用いた COVID-19 検査の妥当性評価への適用を紹介する。また、COVID-19 検査の対象塩基配列をデジタル PCR 法で測定する国際比較試験が国際度量衡委員会の物質質量諮問委員会で行われているため、その概要も紹介する。

2. 核酸認証標準物質の開発

産総研計量標準総合センター (NMIJ) では、製品評価技術基盤機構認定制度 (ASNITE) において標準物質生産者 (ISO 17034) および校正事業者 (ISO/IEC 17025) としての施設認定を受け、約 20 年にわたって認証標準物質 (Certified Reference Material: CRM) 開発を進めてきた。CRM は、ISO 17034:2016¹⁾において、「一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の値及びそれに付随する不確かさ、並びに計量計測トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質」と定義されている。この規定特性 (物質の濃度や純度等) の決定について、NMIJ は原則、国際単位系 (SI) に

トレーサブルな手法を採用することとしており、開発時点において計量学的に最高の質を有すると思われる方法による普遍的な値付けを目指している。現在、30 種類以上のバイオメディカル関連物質を含む約 300 種類の CRM を頒布しており、核酸 CRM としては、図 1 に示すような定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液 (NMIJ CRM 6204-b) と

図 1 定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液: NMIJ CRM 6204-b (上) と定量分析用デオキシリボ核酸 (DNA) 水溶液 (1 ng/ μ L, 600 塩基対): NMIJ CRM 6205-a (下)

*原稿受付 令和 2 年 10 月 20 日

**国立研究開発法人産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門 (茨城県つくば市梅園 1-1-1)

***国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 (茨城県つくば市東 1-1-1)

表 1 NMIJ CRM 6204-b の認証値と不確かさ

NMIJ CRM 6204-b 試料名	総 RNA	
	認証値	拡張不確かさ ($k=2$)
	質量濃度 (ng/μL)	質量濃度 (ng/μL)
RNA500-A	33.4	2.6
RNA500-B	32.3	2.6
RNA500-C	32.1	3.1
RNA1000-A	68.2	5.8
RNA1000-B	64.1	5.5

表 2 NMIJ CRM 6205-a の認証値と不確かさ

NMIJ CRM 6205-a 試料名	総 DNA	
	認証値	拡張不確かさ ($k=2$)
	質量濃度 (ng/μL)	質量濃度 (ng/μL)
DNA600-G	1.38	0.12
DNA600-T	1.09	0.10

定量分析用デオキシリボ核酸 (DNA) 水溶液 (1 ng/μL, 600 塩基対) (NMIJ CRM 6205-a) を頒布中である²⁾⁻⁴⁾。これらの核酸 CRM は、国際単位系 (SI) にトレーサブルな核酸質量濃度を付与できる評価技術により値付けされている。核酸 CRM の認証値は、核酸のモノマーであるヌクレオチドや核酸塩基を測定対象とした同位体希釈質量分析法 (IDMS) や試料中のりん元素を測定対象とした誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) から得た測定値から試料中の総核酸濃度を算出しており、認証書には認証値 (表 1, 2) のほか、不確かさや計量計測トレーサビリティを現示している。一方、市販されている核酸試薬や分子量マーカーとして用いる核酸ラダーなどにも濃度表記がなされているが、260 nm における吸光度測定による濃度評価が主体であり、SI トレーサブルな値ではない。

また、これらの核酸 CRM の基となる塩基配列は、臨床化学やその他のバイオ計測分野における核酸検査や次世代型シーケンサー (NGS) といったスループットの高い核酸解析技術の妥当性評価や精度管理に用いることを念頭に、産総研バイオメディカル研究部門において次のような特徴をもって設計されたものである。核酸 CRM は異なる塩基配列の核酸水溶液 (DNA は 2 種類、RNA は 5 種類) である。DNA は 600 塩基対から成り、RNA は 533 塩基と 1033 塩基の 2 種類がある。それぞれの塩基配列は人工的に設計したものであり、自然界に存在する既知のゲノム配列などとの類似性が低く、グアニンとシトシンの組成比がほぼ均一で繰り返し配列が少ないなどの特徴をもつ。DNA に関しては、2 本鎖であり、600 塩基中の真ん中に位置する 300 塩基座位のみが異なるように設計されており、一塩基多型などのタイピング解析にも適用可能である。RNA に関しては、前述したように 2 種類の鎖長を有する 1 本鎖 RNA であるが、各々の塩基配列は異なり、高次構造を取りにくい特徴を有する。なお、塩基配列情報はそれぞれの認証書に示してあるほか、DDBJ 等のデータベ

ースに登録され、それらの情報は公開されている。したがって、PCR 法で用いられる増幅用プライマーや検出用プローブ塩基配列の設計、DNA マイクロアレイのハイブリダイゼーションプローブ塩基配列の設計について、使用者が個々の条件に合わせて行うことが可能である。これらの特徴によって、DNA マイクロアレイや NGS のような一度の分析で多数の異なる塩基配列を評価するような分析系においても、測定試料に CRM をスパイクすることで内標準としても機能するものである⁵⁾。また、CRM としての認証にあたり、CRM の均質性評価と安定性評価について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて実施しており、品質が担保された状態で入手することが可能である。これらの CRM は、ISO 規格にも定義されている「計量学的に妥当な手順」として、質量分析技術等の化学的機器分析手法を利用して濃度が認証されている。このような核酸 CRM は世界的に見ても希少で、特に人工的な配列を有し、濃度が認証されている核酸 CRM は他に類を見ない。測定対象となる任意の遺伝子配列とは相同性が低いことから、前処理工程や分析装置の動作確認のための内標準試料として有効である。

3. 新型コロナウイルス検査の精度管理に向けた取り組み

COVID-19 検査では、行政検査として PCR 検査か抗原検査が用いられている。冒頭で示したように、PCR 検査ではウイルス由来の RNA 分子が測定対象とされている。これは、コロナウイルスが 1 本鎖 RNA をウイルスゲノムとして有するためであり、今回対象となる SARS-CoV-2 が特異的に有する塩基配列部分を測定対象としている。RNA1 分子を特異的に検出することは技術的に困難であるため、PCR 法によってその特徴的な塩基配列を増幅して検出を行う。ただし、PCR 法で増幅されるのは DNA 分子であるため、検体から抽出された RNA 分子は相補的な DNA 分子である cDNA に逆転写する必要がある。この逆転写された cDNA を鋳型として、ポリメラーゼで鋳型を増幅し、その増幅曲線から元々の試料に含まれる核酸濃度を測定するのがリアルタイム逆転写反応 PCR (リアルタイム RT-PCR) 法である。検査所においては、図 2 に示すようなフローで検査が行われており、リアルタイム RT-PCR 法で測定結果が導き出されるまでに、多段階の工程を経ている。COVID-19 に限られないが、PCR 検査において正しい結果を得るためには、この多段階の操作工程や測定に用いる機器が適切に動作することを確認する必要がある (精度管理)。国立感染症研究所からは、COVID-19 の PCR 検査に関わる手順書⁶⁾が公開されており、リアルタイム PCR 部分の陽性コントロールも配布されていることから、検査現場での内部精度管理を実施することは可能である。ただし、検体試料の均質化前処理後の RNA 抽出工程では、自動化が進む中で一部手作業での抽出作業も行われており、抽出効率の評価が必要と考える。

図2 新型コロナウイルスのPCR検査工程

実際、抽出効率が低下すると、続く逆転写反応工程とPCR検査工程での鋳型RNA量が少なくなることから、偽陰性の結果を誘発することとなる。逆転写反応の効率、PCRでの増幅効率でも同様のことが考えられるため、個々の工程が正しく動作していることを確認する必要がある。そのためには、濃度情報が正しく付与された核酸試料が必要であるとともに、測定対象遺伝子の塩基配列とは異なる配列を有する核酸試料が必要となる。

そこで、前述の核酸CRMのうち、定量解析用リボ核酸(RNA)水溶液(NMIJ CRM 6204-b)を用いて、ウイルスの検出・同定に用いる機器や操作手順の信頼性を検証する方法を確立することとした。現在、この精度管理手法の開発に関する研究は、政府の「ウイルス等感染症対策技術の開発」事業から国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の支援を受け、AMEDの課題番号【JP20he0522002】の一環として実施している。

4. 新型コロナウイルスRNA測定に関する国際比較

メートル条約に基づいて設立された国際度量衡委員会(CIPM)では、量や単位に区分けされた各諮問委員会において、各国の国家標準の同等性あるいは測定能力を確認するために国際的な比較試験を行っている。バイオ計測に関しても物質量諮問委員会(CCQM)の作業部会で実施されており、核酸計測については、核酸計測作業部会(NAWG)で議論されている。今般のCOVID-19の世界規模での拡大を受け、NAWGでは、SARS-CoV-2 RNA遺伝子を測定するための標準測定法の確立や各国の国家計

量研究機関が関連する標準物質を開発するにあたっての測定能力を確認する目的で国際比較試験が企画された。当該国際比較試験(パイロットスタディ P199b: SARS-CoV-2 RNA copy number quantification)では、米英中の3カ国が幹事国となり、新型コロナウイルスの遺伝子配列の一部を含む3種類の合成RNAを作製し、比較試料としている。今回の比較試料については、日本の国立感染症研究所の手順書でも対象としているN遺伝子の増幅部位も含んでいる。参加するにあたっての測定法は遺伝子を高感度に絶対定量可能な技術であるデジタルPCR法と質量分析法などの化学的計測技術である。現在、各国での測定が行われており、わが国もNMIJが代表として参加し、結果を取りまとめている。前述のとおり、わが国の検査現場において、COVID-19の検査にはリアルタイムRT-PCR法が用いられており、本国際比較で用いられるデジタルPCR法とは原理が異なる。しかし、デジタルPCR法は検量線を用いずにPCR反応で増幅したウェルまたはドロップレットを計数することで試料中の元の核酸濃度を算出する絶対定量技術として位置づけられる。本国際比較に参加することにより各国の国家計量研究機関は、国際的に整合性の取れた信頼性の高いRNAウイルス遺伝子定量技術をもつことの証明ができ、SARS-CoV-2のPCR検査においてトレーサビリティ上位の関連標準物質への値付けや標準測定法の開発が可能となる。すでにいろいろな国のメーカーや検査機関などが独自の検査キットやプロトコルに従って検査を行っていると思われるが、それぞれの製品の性能保証や検査機関で出された検査結果の信頼性付与を各々の国家計量研が担うことで、国際的な商取引や経済活動がスムーズに行えるようになると思われる。

5. おわりに

核酸検査技術は、近年、デジタルPCR法やNGSの台頭によって、一度の分析で多数の計数を行い、遺伝子配列を網羅的に解析するハイスループットな手法として一般化してきた。また、PCRなどの増幅技術を利用することで、数copies/ μ Lという結果は現実的なものとして扱われている。このように、検出下限付近の極低濃度領域において核酸分子の定量値を議論したり、その結果をもって診断を下したりする現状となっていることから、定量情報の付与された標準物質は今後重要度が増してくると思われる。特に、国際的にも妥当性確認がなされているCRMを精度管理や妥当性確認の頂点に置くことで、計量計測トレーサビリティが確保され、測定結果の信頼性向上につながる事が期待できる。整備されている核酸の種類CRMの種類は多いとはいえないが、適用可能な測定技術の範囲は広いことから、検査現場での精度管理、妥当性確認等に利用してもらえればと考える。

なお、本稿に記載した内容の一部は、AMEDの課題番号【JP20he0522002】の支援を受けたものである。

参 考 文 献

- 1) ISO 17034:2016:General requirements for the competence of reference material producers, Geneva, Switzerland, (2016).
- 2) 藤井紳一郎, 関口勇地, 高津章子: 核酸計測における DNA 標準物質, 臨床化学, **41**, 3 (2012) 215.
- 3) 藤井紳一郎, 関口勇地, 高津章子: 定量分析用 DNA 認証標準物質, 臨床化学, **41**, 4 (2012) 363.
- 4) S. Shibayama, S. Fujii, K. Inagaki, T. Yamazaki, M. Yoshioka, S. Matsukura, A. Sasaki, T. Suyama, N. Noda, Y. Sekiguchi and A. Takatsu: Development of Certified Reference Material NMIJ CRM 6205-a for the Validation of DNA Quantification Methods: Accurate Mass Concentrations of 600-bp DNA Solutions Having Artificial Sequences, Anal. Bioanal. Chem., **411**, (2019) 6091.
- 5) S. Adachi, H. Aoki, Y. Ueda, T. Sudo, A. Nozawa, S. Koga, H. Suzuki, S. Shibayama, N. Noda, S. Fujii, S. Itoh, S. Kawashima, Y. Suda and H. Nakae: Practical determination of LODP (limit of detection for microarray platform) for the evaluation of microarray platforms, Anal. Biochem., **583**, (2019) 113360.
- 6) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9, 国立感染症研究所, (2020).

藤井紳一郎

東京大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了, 博士(農学).《研究内容》核酸定量技術と標準物質の開発.《著書等》“Capillary Electrophoresis”(分担執筆, Nova Science Publishers).

野田尚宏

早稲田大学大学院理工学研究科博士課程終了, 博士(工学).《研究内容》生体分子解析技術の開発と応用および標準化.《著書等》“RNA Remodeling Proteins”(分担執筆, Springer).

柴山祥枝

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物産業科学専攻修了, 博士(生物工学).《研究内容》正確な核酸の定量法および標準物質の開発.

関口勇地

長岡技術科学大学大学院工学研究科博士課程修了, 博士(工学).《研究内容》マイクロバイーム関連計測技術開発等.《著書等》“Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)”(分担執筆, John Wiley & Sons, Inc.)等多数.

加藤 愛

筑波大学大学院人間総合化学研究科博士後期課程修了, 博士(医学).《研究内容》アミノ酸定量技術とアミノ酸および蛋白質標準物質の開発.《著書等》“Amino Acid Analysis”(分担執筆, Humana Press).