

香川県立保健医療大学リポジトリ

サイトメガロウイルス (CMV) の核酸同定検査における精度管理試料の有用性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上野, 一郎, 中桐, 逸博, 風間, 文智, 和山, 行正 メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/187

サイトメガロウイルス (CMV) の核酸同定検査における 精度管理試料の有用性

上野一郎^{1)*, 5)}, 中桐逸博²⁾, 風間文智³⁾, 和山行正⁴⁾

¹⁾香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科

²⁾川崎医科大学病院中央検査部, ³⁾山梨大学医学部附属病院検査部

⁴⁾北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所, ⁵⁾信州大学医学部附属病院臨床検査部

Usefulness of a Quality Control Material in Cytomegalovirus (CMV) DNA Assays.

Ichiro Ueno^{1)*, 5)}, Itsuhiro Nakagiri²⁾, Fuminori Kazama³⁾, Yukumasa Kazuyama⁴⁾

¹⁾Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences

²⁾Department of Clinical Pathology, Kawasaki Medical School

³⁾Department of Laboratory Medicine, Yamanashi University Hospital

⁴⁾Kitasato-Otsuka Biomedical Assay Laboratories. Co. Ltd.

⁵⁾Department of Laboratory Medicine, Shinshu university Hospital

Abstract

In recent decades, molecular diagnostic tests mainly for infectious diseases have been introduced to many clinical laboratories. However, the tests have sometimes caused unexpected false-negative or -positive results due to the complicated procedures for extracting nucleic acids from various materials and a large number of amplifications of nucleic acids by polymerase chain reactions (PCR). There have not been suitable control materials to guarantee the quality of genetic tests such as for the identification or quantitative detection of Cytomegalovirus (CMV) DNA. The authors, therefore, made quality control materials, consisting of human embryonic lung cells (HEL) infected with AD-169 strain (CMV), and delivered them at under -20°C to 13 clinical laboratories. Moreover, we had the materials measured to assess their reliability for CMV DNA assay and evaluate their usefulness as control materials.

This study revealed that the inter-laboratory differences among assay values of CMV DNA were smaller than we expected. The quality control materials were also stable when frozen at -80°C for a long period of more than 6 months and useful for keeping test data stable, and for reducing variations of assay values among the laboratories.

Key Words: サイトメガロウイルス DNA (Cytomegalovirus DNA; CMV DNA), 精度管理試料 (quality control material), 遺伝子検査 (molecular diagnostic tests), 施設間差 (inter-laboratory differences)

*連絡先: 〒761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 上野 一郎

*Correspondence to: Ichiro Ueno, Department of medical technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Kita-gun, Kagawa, 761-0123 Japan

はじめに

ここ10年余りの間に、臨床検査分野における遺伝子検査は感染症の核酸同定検査を中心に多くの施設に導入されてきた¹⁾。今では検査項目も増え、用いる方法も施設により多様である。ところが、感染症の遺伝子検査は性状の異なるさまざまな検体から微量な核酸を抽出し、それを増幅して検出することから、核酸抽出時のロスや増幅阻害因子の混入による偽陰性、検査工程の汚染による偽陽性などが懸念されている²⁾。実際、個々の検査室では、一部の市販検査キットを除き、施設独自に精度管理試料を立てて遺伝子検査を実施しており、施設間での測定精度が比較可能な、統一された精度管理試料はないのが現状である。

そこで我々は、比較的多くの臨床検査室で実施されているサイトメガロウイルス (CMV) DNA の遺伝子検査を対象に、サイトメガロウイルス感染細胞 (ヒト胎児肺由来) を用いた精度管理試料を作製し、それを対象13施設に配布し精度管理試料としての有用性について評価を行った。

1. 材料および方法

1) 配布試料

サイトメガロウイルス AD-169株をHEL細胞 (ヒト胎児肺由来) に感染させ、10%牛胎児血清 (国際試薬) 加 RPMI-1640培地 (日水製薬) でCO₂フラン器にて7日間培養した³⁾。この培養細胞液から培養液を用いて約 4.2×10^5 コピー/ml (試料S1)、 1.1×10^4 コピー/ml (試料S2)、陰性 (試料S3) の3濃度を調製した。

2) 対象施設

サイトメガロウイルス DNA の定性検査を行っている7施設、定量検査を実施している6施設に、-80℃に凍結させた試料をドライアイスで梱包して配布した。定性検査と定量検査は同一試料を用いた。

3) 測定方法

配布した試料200μlを用い、核酸抽出の段階から毎回2重測定を行い、2ヶ月間にわたり3回測定した。定性結果は、各施設の基準に従い(-) ~ (+3) の4段階で判定し、定量結果は、各施設の核酸定量法により測定された試料1ml中のウイルスのコピー数として得た。

4) 定量検査における施設間差の解析

定量値の施設間差の原因を分析するため、予め試料からDNAを抽出した後、以下のようにDNA試料A、B、Cを調製し、再度、施設に測定を依頼した。すなわち、試料Aは試料S1の4倍濃度、試料Bは試料Aの10分の1の濃度、試料Cは試料S2の4倍の濃度とした。測定は1日で、定量値は施設から報告される重複測定の平均値として得た。統計学的解析には、一元配置分散分析法⁴⁾を用いた。

5) 試料の安定性

-80℃に凍結保存した試料S1、S2を1施設で月1回 (2重測定) 6ヶ月間定量し、試料の安定性を評価した。

2. 結果

1) 定性

参加7施設の測定条件と同定結果を表1の上段に示した。定性結果は1日2回、3日間 (n=6) を総合した判定値として示した。核酸抽出法は、セパジーン (三光純薬) が4施設、DNA Extractor WB Kit (和光純薬)、IsoQuick (MicroProbe)、フェノール/クロロホルム法がそれぞれ1施設であった。遺伝子増幅法は、1回のPCR法 (表中のシングルPCR法) が3施設と最も多く、nested PCR法が2施設、PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法およびPCR-制限酵素処理 (PCR-RFLP) 法が各1施設であった。増幅領域は、表に示す通りほぼ2ヶ所であり、増幅サイズは106bp~462bpまで多様であった。精度管理試料として感染培養細胞 (Towne) が3施設、サイトメガロウイルスゲノムDNA、あるいはその一部を組み込んだプラスミドDNAをそれぞれ2施設で使用していた。定性結果は、1日2回、3日間、合計6個の全結果を総合して判定すると、全施設で作製した試料に対し期待通りの結果が得られた。しかし、毎回の検査結果を施設ごとに見ると、施設2、3、5では、低濃度の試料S2で2重測定のうち1本を陰性としたり、施設4では、同じく試料S2で2本とも陰性とした日が1日認められた (表1の*, **).

2) 定量

定量検査を行った6施設の測定条件と結果を表1の下段に示した。定量値は1日2回、3日間 (n=6) の平均値で示した。核酸抽出法として、QIAamp DNA Bood Mini Kit (キアゲン) が4

表1 CMV-DNAの測定条件と結果

施設	核酸抽出キット	測定方法	増幅領域(bp)		精度管理試料	S 1	S 2	S 3
(定性)								
1	セパジーン	single PCR	(-)	(198)	ウイルス DNA	3 +	1 +	-
2	〃	〃	HVLF4	(305)	〃	2 +	1 + *	-
3	〃	〃	MIE	(435)	プラスミド DNA	3 +	1 + *	-
4	〃	PCR-RFLP ^{#1}	〃	(426)	感染培養細胞	3 +	2 + **	-
5	DNA Extractor WB Kit	nested PCR	IE	(106)	プラスミド DNA	3 +	2 + *	-
6	IsoQuick	PCR-MPH ^{#2}	〃	(159)	感染培養細胞	3 +	1 +	-
7	フェノール/クロロホルム	nested PCR	〃	(462)	〃	3 +	2 +	-
					検量用標準液			
(定量)								
8	QIAamp DNA Blood Kit	TaqMan probe	US17	(151)	プラスミド DNA	1.1E+ 6	9.6E+ 3	-
9	〃	〃	MIE	(130)	〃	2.8E+ 5	6.2E+ 3	-
10	〃	〃	IE	(-)	〃	1.9E+ 4	5.0E+ 2	-
11	〃	〃	MIE	(79)	〃	6.3E+ 5	2.1E+ 4	-
12	スマイテスト Ex-R&D	〃	〃	(157)	〃	3.3E+ 5	1.5E+ 4	-
13	チオシアン酸グアニジン	PCR-MPH ^{#2}	(-)	(-)	(-)	1.5E+ 5	1.3E+ 4	-

結果は, 1日2回, 3日分 (n=6) の平均を示した. 表の (-) は, 調査により不明との回答を得た.

*; 2重測定のうち1本が陰性の日が1日あった. **; 2重測定のうち2本とも陰性の日が1日あった.

#1; RFLP: restriction fragment length polymorphism. #2; MPH: microplate hybridization.

表2 CMV-DNA 定量における測定精度

試料	S1		S2	
総平均	4.20E + 5 (copies/ml)		1.10E + 4 (copies/ml)	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)
総変動	5.30E + 5	126.4	1.00E + 4	93.6
施設間変動	3.25E + 5	77.5	6.31E + 3	57.8
施設内変動	4.20E + 5	99.9	8.00E + 3	73.6
日間変動	3.51E + 5	83.6	3.25E + 3	32.2
日内変動	2.30E + 5	54.7	7.23E + 3	66.1

施設, スマイテスト Ex-R&T (MBL), チオシアン酸グアニジン法がそれぞれ1施設で用いられていた. 定量方法は TaqMan probe 法 (アプライドバイオシステムズ) が5施設, PCR-MPH 法が1施設であった. 増幅領域は多様であったが, 160 bp 以下の狭い領域で増幅を行っている施設がほとんどであった. また, 標準液はすべて, PCR の増幅領域をカバーする組換えプラスミド DNA を使用していた. 定量値は最大58倍の施設間差が認められた. 一元配置分散分析法⁴⁾を用いて測定精密度を解析した結果, 試料 S1, S2 ともに施設間変動より施設内変動 (日間, 日内) の方が大きかった. さらに施設内変動のうち, 試料 S1 では日間変動が, 低濃度の試料 S2 では日内変動の占める割合が大きかった (表2).

3) 定量検査における施設間差の解析

ウイルス感染細胞 (試料 S1, S2) を配布した時, 最大58倍を示した施設間差も, ウイルス

DNA (試料 A, B, C) を用いると, どの試料でも10倍以内に収束した (表3). 施設10を除く5施設の試料 A, C の定量値は, 試料 S1, S2 から調製した理論濃度にほぼ一致した. 施設10は, 試料 A と S1 および試料 C と S2 の濃度比がいずれも理論的濃度比 ($A/S1 \div 4$, $C/S2 \div 4$) より著しく大きいことから, S1, S2 の核酸の抽出効率に問題が有ると考えられた.

4) 試料の安定性

作製した精度管理試料を毎月1回 (二重測定), 6ヶ月間測定したところ, 少なくとも6ヶ月間は安定であった (図1). なお, 図には各月の二重測定の平均値をプロットした.

3. 考察

定性検査は, 1日2回, 3日間の全結果を総合して判定すると, 全施設で作製した試料に対し期待通りの結果が得られた. しかし, 施設ごとに詳細に観察すると, 低濃度試料 S2 の判定値が測定日により 3+ ~ 1+ に分かれていた施設が2施設で存在した (データ略). また, 同じく試料 S2 で, 2重測定のうち2本とも陰性と出たり, あるいは1本が陰性となる測定日があったことが4施設から報告された (表1の*, **). これは, 施設による核酸の抽出方法や測定条件の違いが, 直接, 検査の安定性や検出感度の差としてデータに反映されたものと考えら

表3 CMV 感染培養細胞と抽出 DNA の施設間差 (コピー数/ml)

試料 施設	感染培養細胞		DNA					
	S1	S2	A	A/S1 (4)*	B	A/B(10)*	C	C/S2 (4)*
8	1.1E+6	9.6E+3	3.8E+6	3.5	3.5E+5	10.9	1.4E+5	14.6
9	2.8E+5	6.2E+3	6.6E+5	2.4	4.9E+4	13.5	2.3E+4	3.7
10	1.9E+4	5.0E+2	5.0E+6	263.0	4.0E+5	10.0	4.0E+4	80.0
11	6.3E+5	2.1E+4	2.2E+6	3.5	3.4E+5	6.5	1.8E+5	8.6
12	3.3E+5	1.5E+4	1.1E+6	3.3	9.1E+4	12.1	3.9E+4	2.6
13	1.5E+5	1.3E+4	6.1E+5	4.0	5.3E+4	6.6	2.0E+4	1.5
Max./Min.	58	42	8	—	8	—	9	—

*; DNA 試料 A と C はそれぞれ試料 S1, S2 の 4 倍の濃度に, DNA 試料 B は試料 A の 10 分 1 の濃度に調整した. 抽出操作を省くことにより施設間差は 10 倍以内に減少した. 太字は各試料の定量値の最大値と最小値を示した.

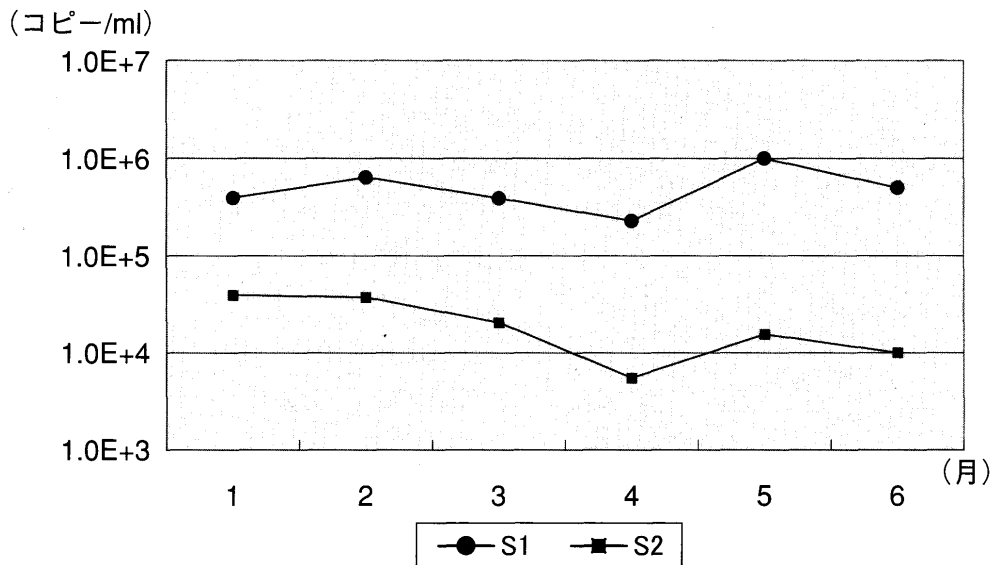


図1 精度管理試料の安定性 (−80℃)

れた. 試料 S2 のウイルス量は約 10^4 コピー/ml であり, 試薬の改良により反応チューブ当たり 10^2 コピー前後が検出可能な現在, このレベルの検出感度は求められる.

今回の調査で, 精度管理試料としてウイルス感染培養細胞を用いていた施設が 3 施設, 残り 4 施設は陽性検体の DNA あるいはプラスミド DNA を使用していた. DNA は試料の安定性に優れているが, 核酸の抽出工程における精度管理はできない. 日常の精度管理には, 可能な限り実際の検査材料に類似した性状を有し, 検査の全工程をカバーできる精度管理試料が適していると考えられた.

定量検査において, 核酸抽出法はシリカメンブレンフィルターを用いる方法が 4 施設, エタノール沈殿法により核酸ペレットを得る方法が 2 施設に大分された. 定量法は 6 施設中, 5 施設が TaqMan probe 法で行われていた. 毎回 2 重測定で, 3 日間の測定値 ($n = 6$) を一元配置分散分析 (日間, 日

内) と枝分かれ分散分析 (施設間, 施設内) 法⁴⁾を用いて誤差の要因を解析したところ, 試料 S1, S2 はともに施設間変動より施設内変動 (日間, 日内) の方が大きかった. 施設内変動をさらに詳細に分析すると, 試料 S1 は日内変動より日間変動が大きく, 核酸抽出, 増幅試薬, 標準液いずれかの不安定性に起因するものと考えられた. また, 試料 S2 は日間変動より日内変動が大きく, 低濃度における分析法自体のばらつきが大きいことが示唆された.

定量値の施設間差の原因を詳細に分析するため, 配布試料から予め DNA を抽出し, DNA 試料として再調製し, 再度測定を依頼した. その結果, 施設間差はウイルス感染細胞試料を用いた時の最大 58 倍から 10 倍以内に収束した (表 3). また, この DNA 試料を用いた追加検討により, 施設 10 はウイルス感染細胞試料の核酸の抽出効率に問題があることが示唆され, 施設間のばらつきの原因を核酸抽出とその後の測定系に分けて評価することが可能となった.

DNA 試料を測定しても認められる施設間差は、施設独自の核酸の増幅条件や標準液の濃度、測定ポイントの違いによるものである。実際、標準物質の作製にあたり、増幅領域を挿入した組換えプラスミド DNA の濃度からコピー数に換算し、10倍ごとの濃度設定を行っている現状を考慮すると、現段階では10倍前後の施設間差は一つの限界と考えられた。今回、最初に配布した試料 S1, S2 の施設間差が最大58倍と、我々が当初予想していた100倍以内に収束していたのは、核酸抽出法や定量法などの測定条件が施設間でかなり共通していたことによると考えられた。

現在、感染症の遺伝子検査において、国内で行われている外部精度管理の主なものには、市販キットを対象としたメーカー主催の精度管理調査⁵⁾、日本臨床衛生検査技師会が主催する精度管理調査がある⁶⁾。その内容は、HCV-RNA の定性・定量、抗酸菌 DNA の定性・定量検査である。これらの外部精度管理調査は国内で最大規模のものであるが、一部のメーカーの検査キットの評価にとどまっているのが現状である。

また、世界保健機構 (WHO) からは、C 型肝炎ウイルスの RNA 定量に使用できる国際標準物質が提供されているが⁷⁾、高価であり検査室に普及するには至っていない。

遺伝子検査に用いられる精度管理試料には、被検体と同様に別々の工程で測定が行われる外部管理試料と、被検体と同じ容器の中で同時に検査が進められる内部管理試料がある。感染症の核酸同定検査では、病原微生物の存在の有無を調べるケースが多いため、一般的には外部管理試料が使用されている。現在、外部管理試料のマトリックスとして、検体と性状が近似した試料のほか、検査対象のゲノム DNA (または RNA)、検出領域を挿入した組換えプラスミド DNA、人工的に合成した核酸などが用いられている⁸⁾。今回の研究は、どのような検査方法に対しても使用可能で、核酸の抽出から測定結果までの全検査工程が監視できる精度管理試料を作製することを目的とした。そのために、試料は対象となる検体の性状により近いものとした。さらに、作製した試料のおおよその定量値を把握することにより、各施設における定性検査の検出感度や定量値の施設間差を数字で比較することが可能となった。

平成12年度から、遺伝子検査システムの評価方法の標準化作業が、基準創成研究開発事業と称して国家的なプロジェクトで進行している⁹⁾。これは、国際

標準化機構 (ISO) が目指す遺伝子検査システムの標準化に狙いを定めて行われている。一方、海外でも遺伝子検査のガイドラインの作成、標準物質の供給、精度管理調査が一部で始まっており、その動向にも注目していく必要がある¹⁰⁾。

これまでの感染症の遺伝子検査は、健常人には病原性レベルでは存在しない病原微生物 (外因性) の核酸 (DNA または RNA) を同定・定量する検査が主体であった。しかし最近、常在菌と起炎菌、死菌と生菌、不顕性レベルでの感染と発症とを鑑別するために、菌やウイルスの mRNA の定量化が注目されている¹¹⁾。今回は、サイトメガロウイルスの DNA 同定検査を対象とした精度管理試料を作製したが、RNA 同定検査の精度管理試料としても使用できることが予想され、これからの研究課題とした。

4. 結語

ヒト胎児肺由来の CMV ウイルス感染細胞を用いた精度管理用の試料を作製した。この試料は -80℃ 以下の凍結保存で少なくとも 6 ヶ月は安定であることが確かめられた。さらに、濃度が既知の精度管理試料を用いることで、検査室内および施設間の検出感度や検査精度が数字で把握でき、検査法の改良に役立てることが可能である。以上のことから、今回作製した試料は、サイトメガロウイルスの核酸同定検査の精度管理試料として有用であることが確認された。また、定量法における施設間差の原因を解明するためには、サイトメガロウイルス DNA を用いた精度管理調査も不可欠であった。

今後、この精度管理試料を用いて、RNA 検査への応用性、推奨できる核酸抽出方法について検討を行っていく予定である。

本研究は、平成15年度日本臨床衛生検査技師会プロジェクト研究の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) 上野一郎, 宮西節子, 亀子光明 (1997) 遺伝子・染色体検査に関する実態調査. 医学検査46: 1389-1394
- 2) 上野一郎, 亀子光明, 行正信康, 風間文智, 横田浩充 (2000) PCR 法を用いた遺伝子検査における分析誤差の解析とその回避方法. 医学検査49: 1350-1354
- 3) 沼崎義夫 (1978) サイトメガロウイルスの分離・同定

- 法. 臨床病理 臨時増刊 (特集35号) 26: 151-157
- 4) 細萱茂実 (2000) 臨床検査に必要な統計処理法 第1回: 測定条件を指定した精密度測定の意義-従来の精密さ評価法は不適切!? 検査と技術28: 81-85
- 5) 渡辺正治, 上野一郎, 奥住捷子, 貞升健志, 長沢光章, 平井徳幸, 行正信康, 立花勇一 (2000) アンプリコアマイコバクテリウムサーベイ・アンケート集計結果報告. 医学検査 49: 1449-1452
- 6) 平成15年度日臨技精度管理調査報告書 (2003) 日本臨床衛生検査技師会
- 7) Saldanha J, Lelie N, Heath A, WHO Collaborative Study Group (1999) Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. Vox Sang 76: 149-158
- 8) 上野一郎 (2002) 遺伝子検査の内部精度管理. 医学検査 51: 1343-1344
- 9) 財団法人バイオインダストリー協会 (2002) 基準創成研究開発事業 遺伝子検査システムの評価方法の標準化. (平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託業務成果報告書): 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の技術情報サービスの Web サイト (<http://www.tech.nedo.go.jp/index.htm>) よりユーザー登録を済ませた後, 内容を選択してダウンロードできる.
- 10) 宮地勇人 (2002) 2) 遺伝子検査における精度管理. 検査と技術 (増刊号) 30: 1156-1160
- 11) 豊川真弘, 西 功, 浅利誠志 (2002) サイトメガロウイルス. 検査と技術 (増刊号) 30: 1016-1020
-

受付日 2004年10月29日