

# 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

東京大学先端科学技術研究センター・システム生物医学ラボラトリー

田中十志也、杉山暁、児玉龍彦

## [要旨]

新型コロナウイルス感染症対策として提唱されている世田谷モデルのPCR検査の実施に向け、大量計測可能な自動分注機の最適化およびプール方式での陽性率に及ぼす影響について検討した。自動分注機の動作を最適化した後、下北沢商店街等のボランティア検体および既知陽性検体を用いて4検体プール方式の精度を検証した。その結果、4検体プールによりCt値の増加が認められたが、鼻咽頭ぬぐい液（12/12）および唾液検体(12/12)の陽性率はいずれも100%であり、偽陽性(0/70)は認められなかった。また、Ct値に及ぼすプレートの影響を検討した結果、高感度プレートを用いることによりCt値を2程度（感度4倍）改善できることが明らかとなった。自動分注機を用いて376検体を測定した場合、通常検査と比較して検査時間を約半分、PCR検査費用を約1/3にできることが明らかとなった。以上の結果より、高感度PCR プレートを用いた4検体プール方式によるPCR検査は、これまでのPCR検査と同等の感度と検出力を維持しつつ時間と費用を節約可能であることが示唆された。

## [緒言]

SARS-CoV-2感染（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る。とりわけ、流行時における感染拡大および介護や保育などの福祉施設内でのクラスターの発生を防止するには、大量検査にて無症候感染者を特定して封じ込める必要がある。また、流行時に迅速に大量検査するには医療資源不足対策が必須である。海外ではプール方式の導入が進んでおり（Nature 583: 506, 2020）、米国では最大5検体のプール方式に緊急使用許可（EUA）が発行されている一方、わが国の検査体制整備は遅れている。

本研究では、自動分注機の最適化ならびに4検体プール方式での自動化検査の精度の検証を行った。

## [方法]

本研究では、下北沢商店街および劇場関係者ならびに東京大学先端科学技術研



図1 手動と最適化した自動液体処理装置のCt値に及ぼす影響

究センターのボランティア検体である鼻咽頭スワブ液、一部唾液検体を用いた。また、都内健老施設の陽性者から得られた鼻咽頭スワブ液および唾液の臨床廃棄検体を陽性検体として使用した。自動液体処理装置として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として島津製作所のAmpdirect™ 2019-nCoV検出キット、PCR装置はThermal Cycler Dice® Real Time System III（タカラバイオ）、PCRプレートはFrameStar 96 well qPCR plate（タカラバイオ）を用いた。具体的には、96ウェルプレートの1ウェル当たり5  $\mu$ lのSample Treatment Reagentと検体5  $\mu$ l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  $\mu$ lのRT-PCR反応液を添加・混合した後、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サイクル実施した。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. 自動液体処理装置の最適化

手動と同等の分注精度およびチップへの試薬吸着によるロスを最小限にすることを目的として、プログラム設定する採取液量および試薬が入っているチューブからTipを抜くスピードの最適化を行った。検討を行った結果、検体採取するチップに残存する検体が約0.2 μl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5.0 μl から5.2 μl、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1.25 μlから1.5 μlに変更した。また、粘性の高いRT-PCR試薬のロスを最小限にするため、試薬チューブからのTipを抜くスピードを最適化し1.5 mm/秒とした。次に、最適化した自動液体処理装置の設定条件を用いて通常検査および4検体プール方式検査の精度を確認するため手動との比較を行った（図1）。その結果、RT-PCR試薬のロスを10%以内に抑えられること、手動とほぼ同等のCt値が得られることが明らかとなった。

#### 2. プール方式の実証研究

表2 Ct値に及ぼすPCRプレートの影響

FrameStar 96 well qPCR plate		White plate	
ROX (N1領域)	Ct値 28.84	ROX (N1領域)	Ct値 26.40
FAM (N2領域)	Ct値 29.17	FAM (N2領域)	Ct値 27.17
Cy5 (内部標準)	Ct値 33.49	Cy5 (内部標準)	Ct値 31.14

最適化した自動液体処理装置を用いて4検体プール方式の実証研究を行った。376検体の中に、陽性スワブ検体あるいは陽性唾液検体を各12ヶ所にセットして陽性率およびCt値に及ぼす影響について検討した。376検体を1ウェルあたり4検体プールし、Sample Treatment Reagentとの混合、90°Cにて5分間インキュベート、RT-PCR試薬を全てのウェルに添加しPCR装置にセットするまでに1時間55分要した（図2）。PCR反応に1時間5分を必要とすることから、今回使用した自動液体処理装置を用いた場合には約3時間で検査が終了することが明らかとなった。また、陽性検体が入っていた全てのウェルにおいて通常の測定に比較してCt値の増加が認められたもののROX（N1領域）またはFAM（N2領域）の増幅曲線の立ち上がりは認められ陽性率は100%であった。また、偽陽性は認められなかった（表1）。

プール方式を用いた検査では、検体が希釈されるためCt値の増加が認められ偽陰性となる可能性がある。PCRは目的とする塩基配列を短時間に1コピーから数百万コピーに増幅させる高感度かつ効率的な実験であることから、最適な結果を得るためには使用するPCRプレートの品質も重要である。とりわけ、PCRの反応自体には影響は及ぼさないが、高感度で正確な蛍光検出を可能にするためには屈折を最小限に抑えることが効果的であることが知られている。そこで、本試験で使用していた透明のFrameStar 96 well qPCR plateおよび白色プレートがCt値に及ぼす影響について検討した（表2）。その結果、N1, N2, および内部標準いずれにおいてもCt値が2程度低下することが明らかとなった。このことより、使用するPCRプレートを4検体プール方式時には白色にすることによって、感度を落とすことなく検査が可能となることが示唆された。

#### [考察]

感染流行時あるいはクラスター発生防止の観点からエッセンシャルワーカーの定期的な検査を実施するには、安全かつ迅速・簡便な検査に加え大量の検査体制が求められるだけでなく、試薬、機器、検査技師など医療資源の不足を防ぐことが必須である。これらの観点から、本研究では自動液体処理装置を用いた4検体プール方式PCR検査の実証研究を行った。その結果、自動液体処理装置の最適化により手動とほぼ同じ精度での検査が可能であること、白色プレートを用いることにより通常のPCR検査から感度を下げる事なく、短時間かつ安価に検査することが可能であると考えられた（図2）。とりわけ、大量検査の自動化が進むことにより、必要とされる検査技師の人数だけでなく感染リスクと精神的負担が軽減される効果は非常に大きい。また、本研究では4Tipタイプ



図2 本研究で実施した通常方式とプール方式の比較まとめ

の自動液体処理装置を使用した。8Tipタイプの機器を使用することで検査時間はさらに短縮することが可能であり、1日8時間の作業で2,632検体のPCR検査が可能となる。また、PCR検査試薬も大量購入あるいは安価なキットを購入することで、1人あたりの検査試薬費は700円程度にすることが可能であると考えられた。今回、コピー数が少ない唾液サンプルを用いた4検体プール方式でのCt値の増加がコピー数の多いスワブ検体と比較して大きかった（表1）。このことについては、今後検体数を増やしてコピー数の問題なのか、あるいは唾液サンプルの問題であるのか、白色プレートの使用により改善されるのかさらなる検討が必要であると考えられる。