

精確な新型コロナPCR検査に向けたNMIJの取り組み

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

計量標準総合センター

バイオメディカル標準研究グループ

加藤 愛

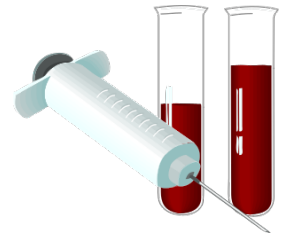
2022/2/25

第9回JMACシンポジウム

計量標準総合センター(NMIJ)のミッション ～生体関連物質計測における信頼性確保のために～

標準物質の 開発及び供給

バイオ分野および臨床化学分野
におけるトレーサビリティ上位の
標準物質の開発・供給



臨床検査分野

分析技術の開発

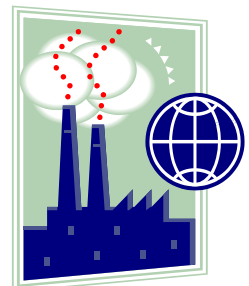
生体関連物質を高精度に
測定する手法の確立



食品分野

国際統合化活動

国際比較試験等への参加による
開発した標準物質や測定手法の
国際統合性の担保



環境分野

供給中のバイオ関連認証標準物質(CRM)の例

(計31物質, 2022/2/25 現在)

低分子化合物



加水分解アミノ酸(17種)
(CRM6011-a~6027-a)



血清アルドステロン
(CRM6402-b)

ペプチド・タンパク質



C反応性蛋白
(CRM6201-c)



C-ペプチド
(CRM6901-c)

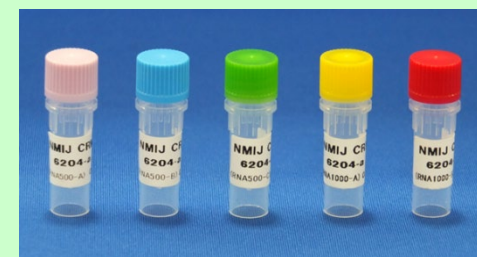


ヒト血清アルブミン
(CRM6202-a)

核酸



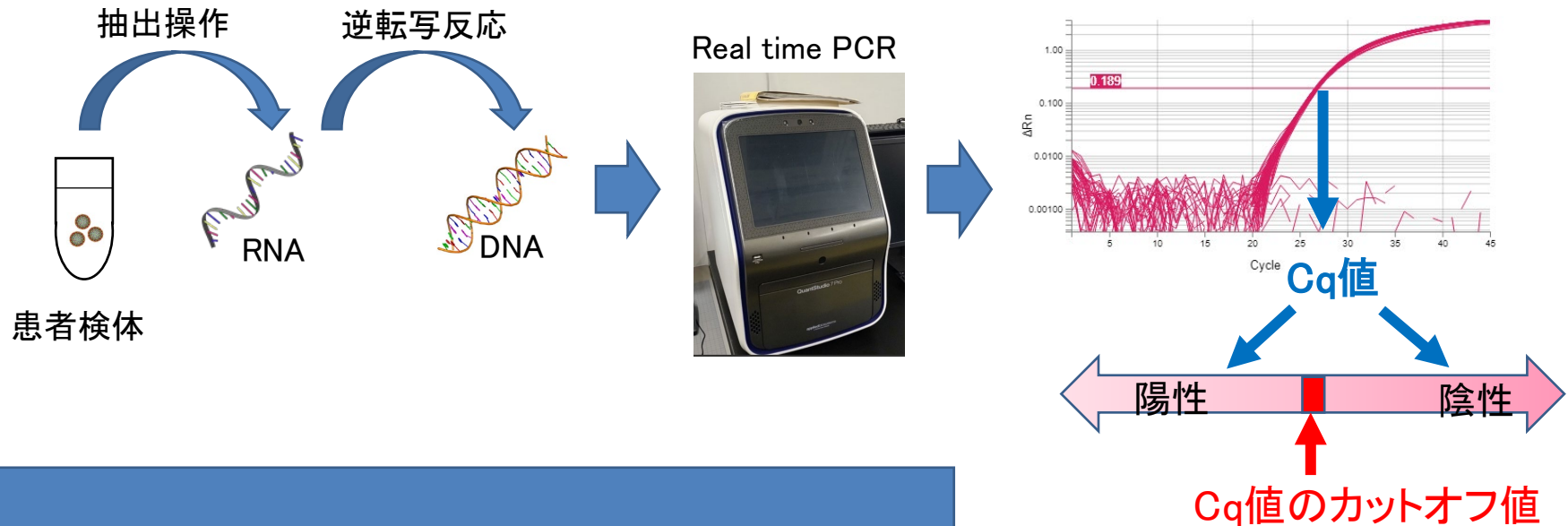
DNA水溶液(人工配列)
(CRM6205-b)



RNA水溶液(人工配列)
(CRM6204-b)

・測定における校正、分析法の妥当性確認等に使用可能

SARS-CoV2・PCR検査における一般的な手順



著作権の関係上、掲載不可

- ・Cqのカットオフ値をもとにした判定を実施
- ・測定対象の遺伝子領域は国内外で統一されていない
- ・前処理～PCRのプロセスでは様々なキット、装置を利用

3つのコホート研究におけるPCR検査のCq値の比較

(Evans. D et. al, Clin Chem, 2022)

- ・有症状者のCq値の分布がLabごとに異なる

- ・前処理法の有無やキットの違い
- ・逆転写反応やPCR反応キットの違い
- ・測定対象遺伝子領域の違い
- ・装置や実施者の違い …etc.

- ・Lab間で共通のCqのカットオフ値を設定した場合には臨床感度が大幅に違う結果に



- ・Cq値をもとにした判定は危険
- ・濃度値(コピー数濃度)での基準の設定が有効



標準物質/精確な核酸定量技術開発の必要性

著作権の関係上、掲載不可

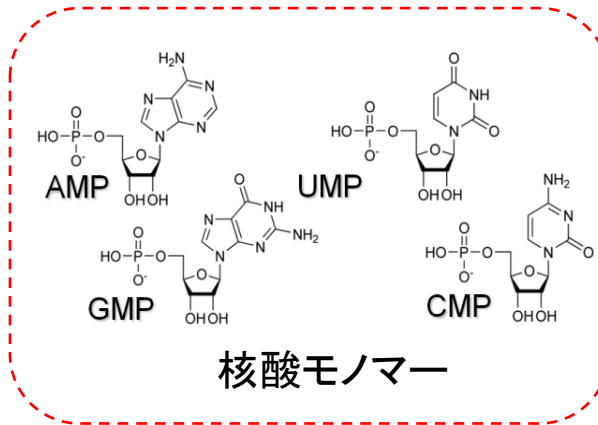
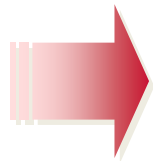
核酸絶対定量のためのNMIJのコア技術①

核酸モノマー、構成元素を指標とした絶対定量

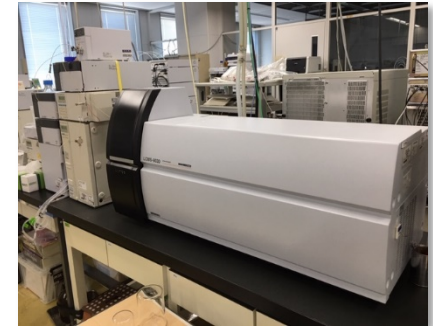
LC-IDMS法の原理



DNA or RNA



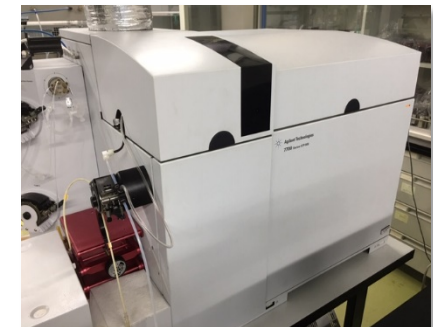
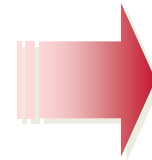
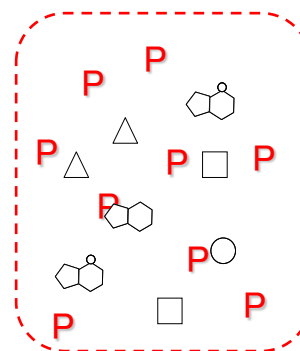
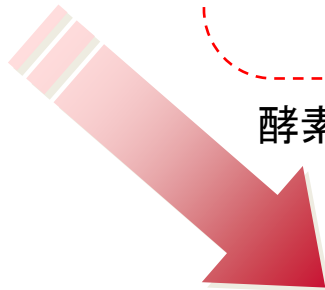
酵素あるいは酸による分解



LC/MSによる核酸モノマー分析

本法の特徴

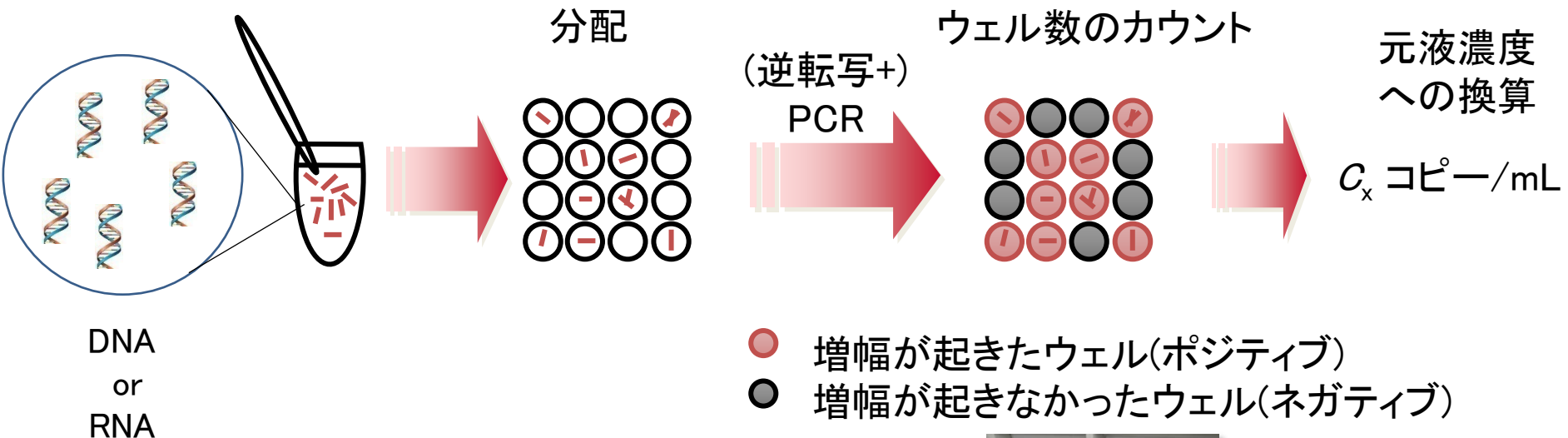
- ・LC-MS等の高精度分析技術を利用
- ・同位体希釈質量分析法 (IDMS) 等を用いた一次標準測定法
- ・分析の過程で核酸情報が消失



ICP-MSによる元素分析

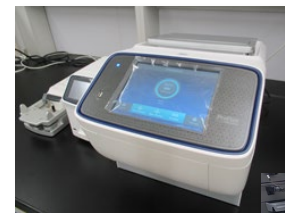
核酸絶対定量のためのNMIJのコア技術② 核酸配列を考慮した絶対定量

デジタルPCR法の原理

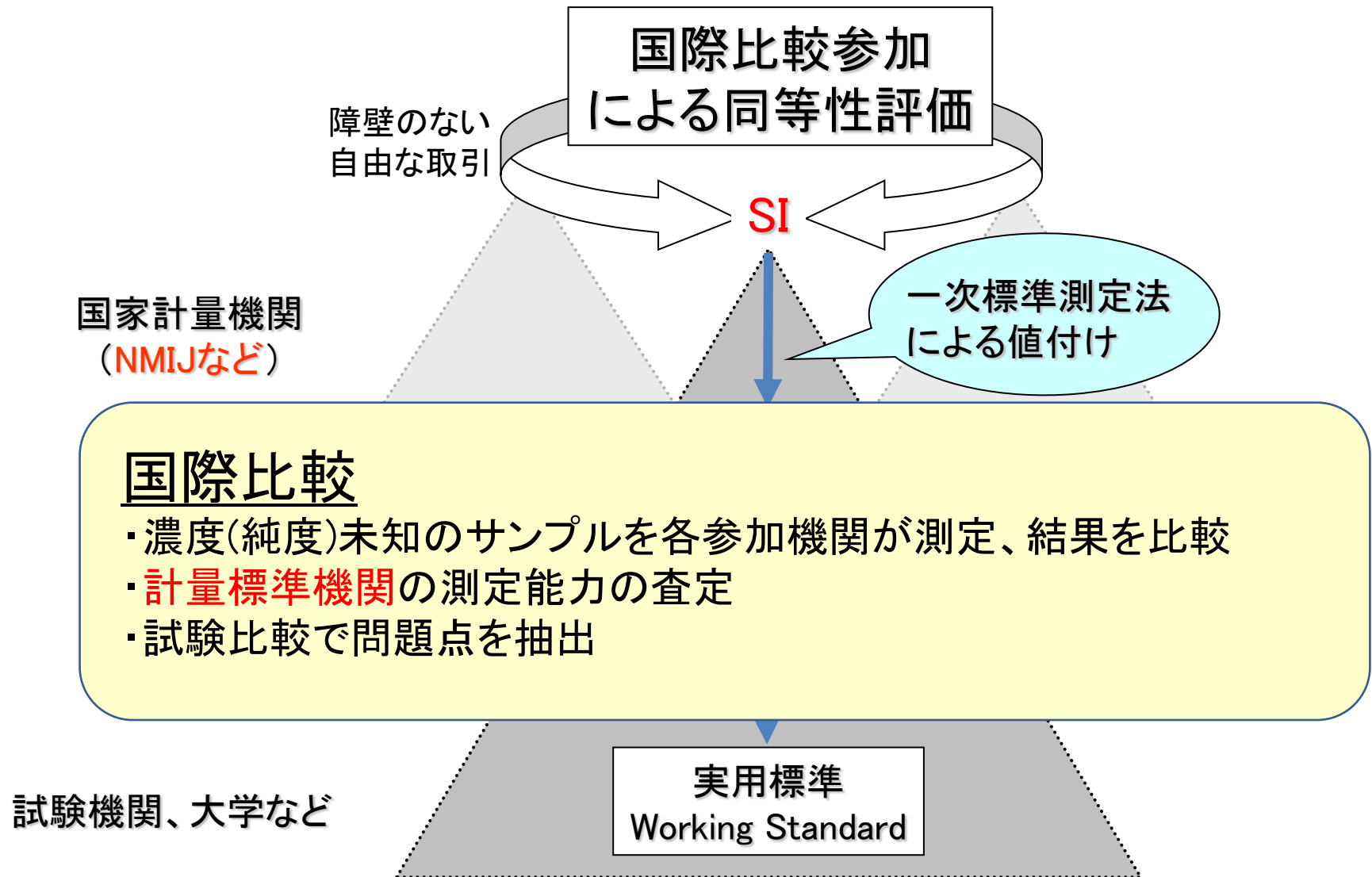


本法の特徴

- ・目的の核酸配列を特異的に定量可能
- ・従来のPCRよりもより高感度・高精度な定量が可能
- ・参照核酸標準を必要としない絶対定量法
⇒新たな一次標準測定法として期待



国際比較と国際整合性確保



NMIJの参加した国際比較リスト(核酸分析関連)

名称	測定項目	実施年度
P94.1	メチル化DNA測定	2008－2010
K86.b *	遺伝子組み換え米の定量	2015-2016
K86.c * /p113.4	遺伝子組み換え菜種の定量	2016-2018
p184	がん遺伝子変異（SNP， in-del ）の 定量	2017-2018
p199	低レベル病原体ウイルス（HIVウイルス）由来RNAの定量	2019-2020
p199b	低レベル病原体ウイルス（SARS-CoV2）由来RNAの定量	2020 -

* 基幹比較(K study)の結果については、国際度量衡局(BIPM)の基幹比較データベースにて公開される。

国際比較 (p199b: SARS-CoV2 RNA遺伝子の定量)

○目的:

- ・各国NMIs/DIsが関連する標準物質を開発するにあたっての標準測定法の確立
- ・
//
測定能力の評価

○測定サンプル: SARS-CoV2 RNA遺伝子の*in vitro*転写産物ほか

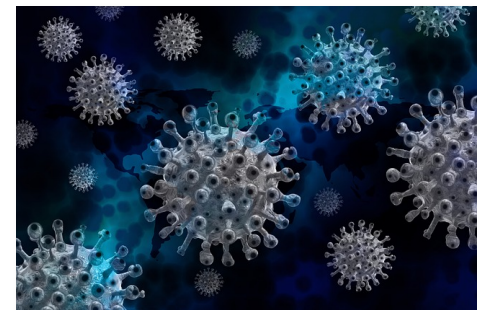
○内容: SARS-CoV2遺伝子を対象として各参加機関のプロトコールに基づいたRT-dPCR法やLC-IDMS等による定量を行い、測定結果を比較

○参加機関:

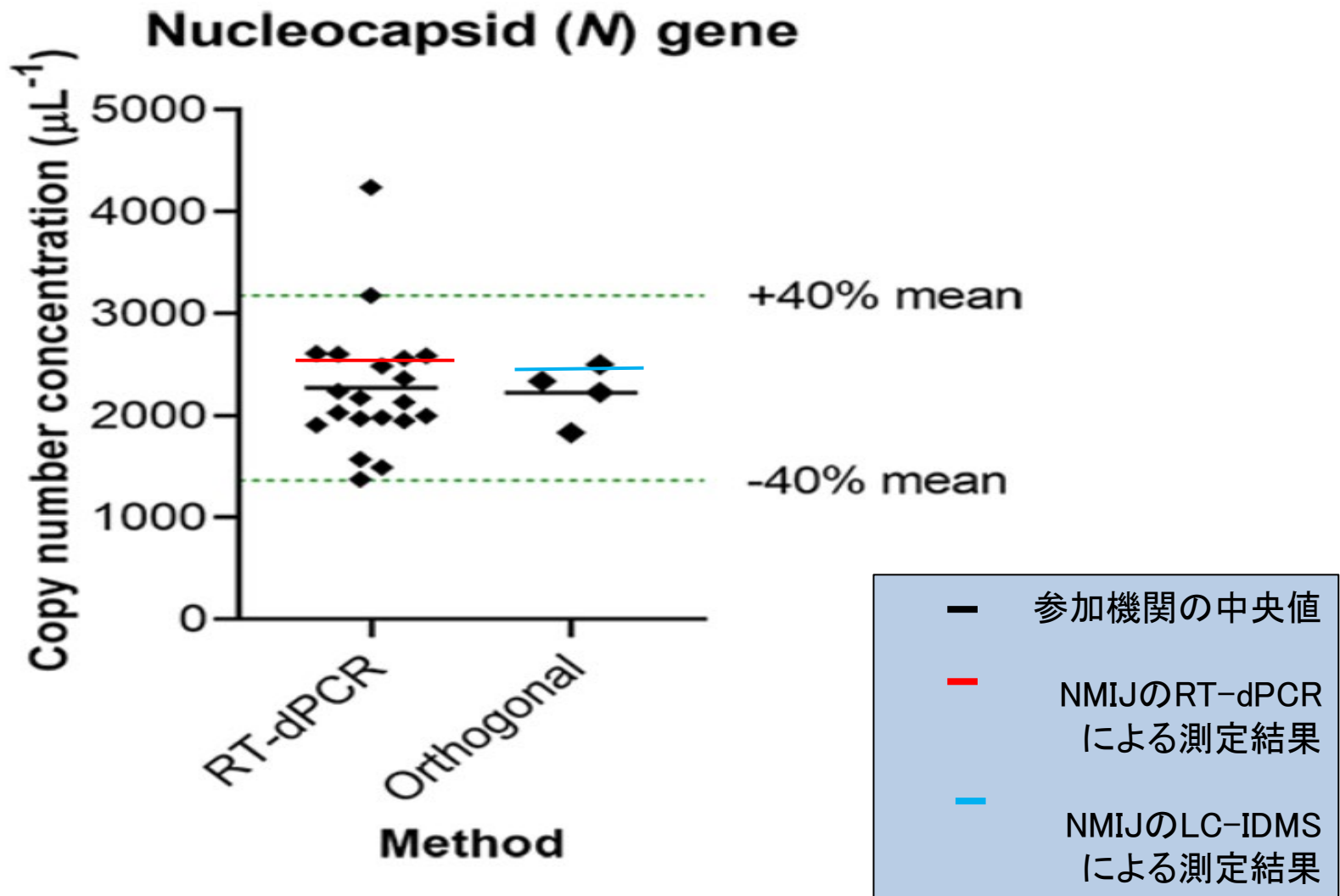
NMIJ(日本)、NIMC(中国)、NIST(米国)、JRC(欧州)、NIBSC(英国)、KRISS(韓国)、NMIA(豪州)など16か国から21機関

○スケジュール:

- ・参加登録締切: 2020年6月上旬
- ・試料の配布: 2020年6月下旬
- ・測定結果の返送: 2020年10月中旬
- ・プレスリリース: 2020年12月
- ・現在レポートを取りまとめ中

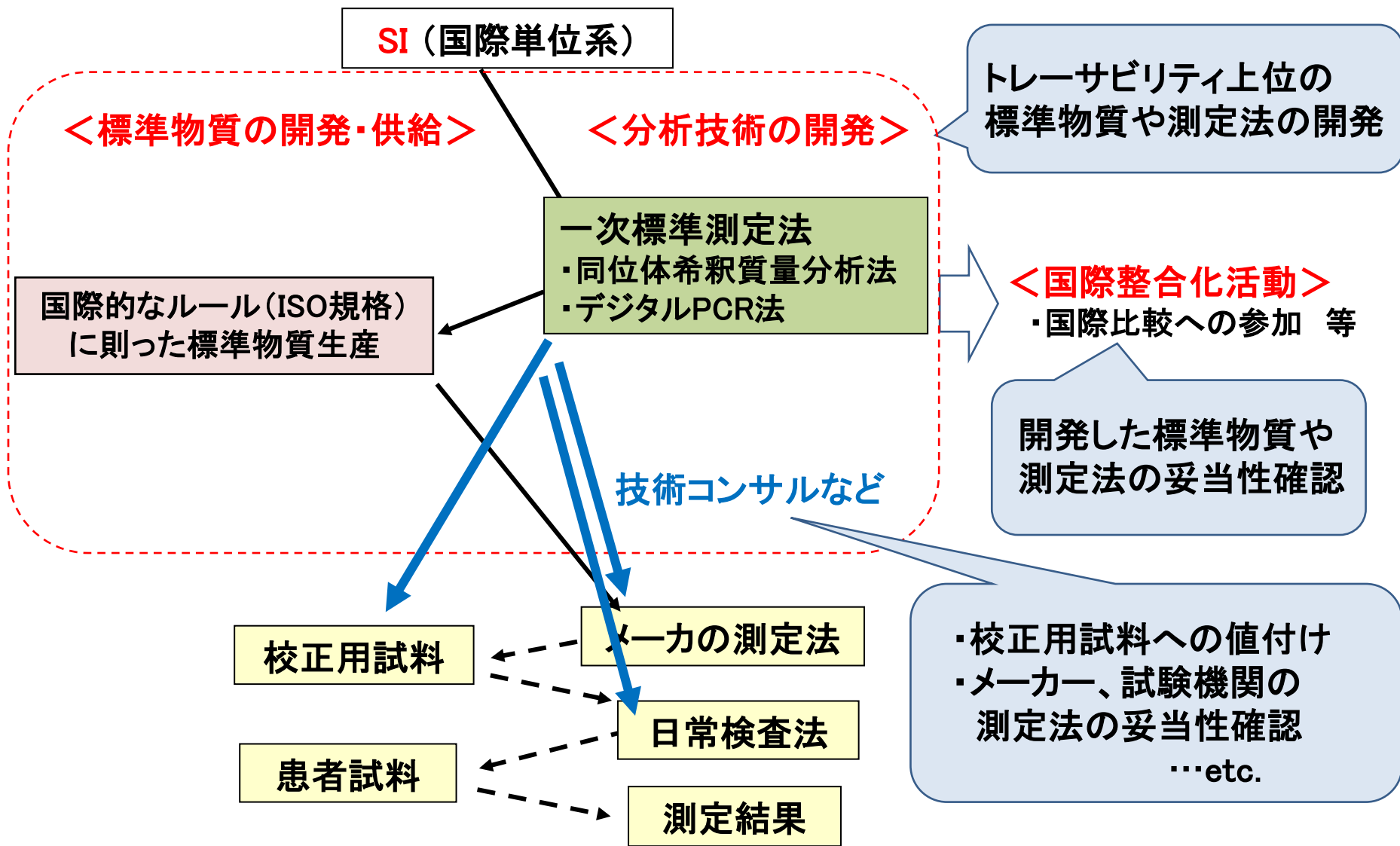


国際比較における各参加機関の比較結果

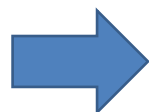
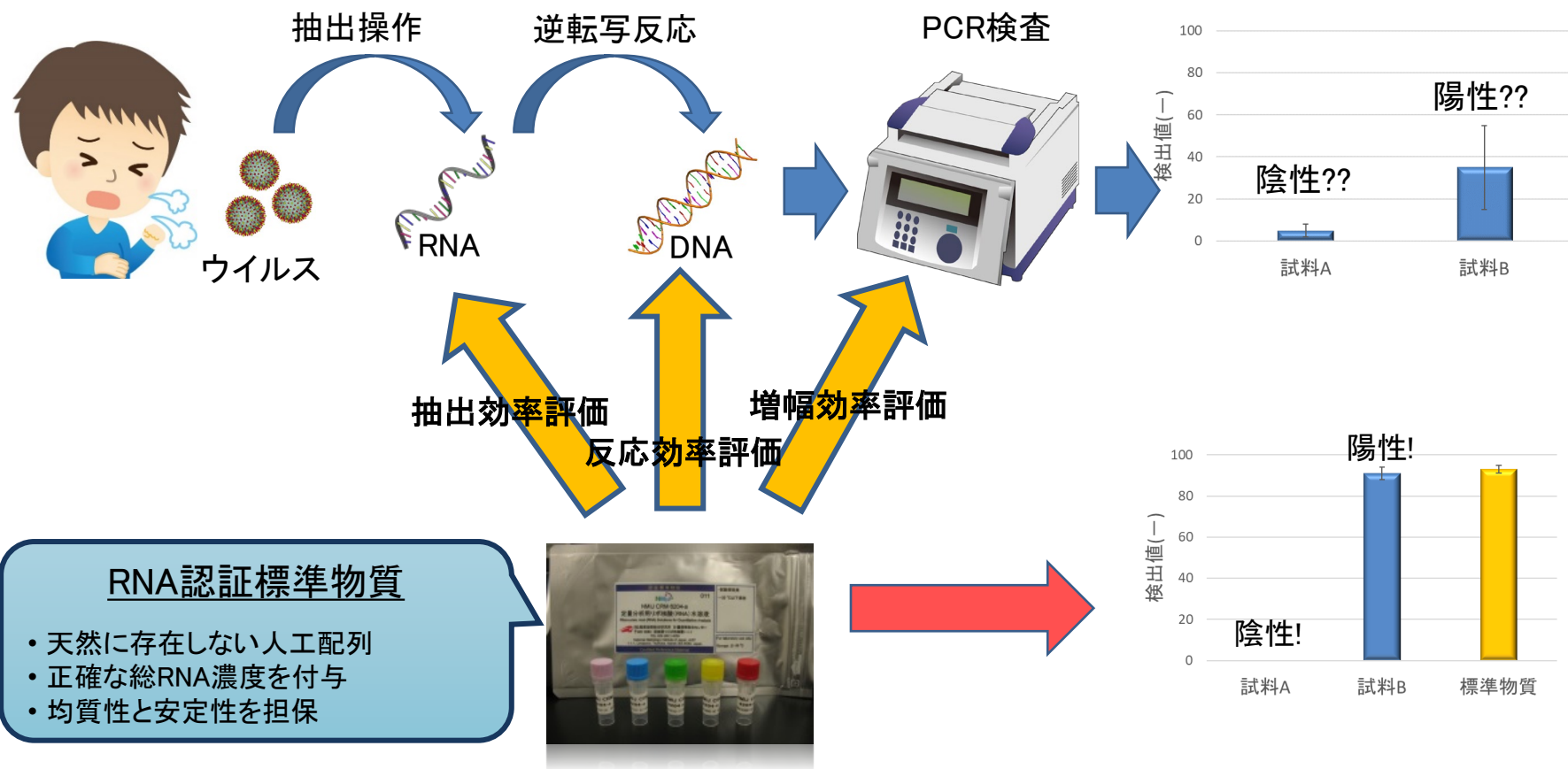


* BIPMホームページ・プレスリリース(<https://www.bipm.org/en/-/2020-nmi-covid>)より転載

計量トレーサブルな核酸計測に向けたNMIJの活動



人工核酸標準物質を用いたPCR検査の信頼性確保に向けた取り組み (2020年度・AMED指定案件)



RNA認証標準物質(RNA CRM)を利用した精度管理法の確立

PCR検査の精度管理のためのコントロール物質の分類

分類	陽性コントロール	内在性コントロール	外来性コントロール
	ターゲット遺伝子の人工合成核酸	検体に含まれるハウスキーピング遺伝子	ターゲットウイルス遺伝子配列と相同性の低い人工合成核酸
利点	・逆転写やPCRプロセスの妥当性確認やノーマライズに使用可能 ・定量のための検量線作成に使用可能	・検体からのRNA抽出以降のプロセスの妥当性確認やノーマライズに使用可能	・検体からのRNA抽出以降のプロセスの妥当性確認やノーマライズに使用可能 ・人検体を扱う実験において、外来性コントロールが実験者本人からコンタミするリスクはゼロ ・ターゲット遺伝子に併せて添加量が任意でコントロール可能
懸念点	・検体からのRNA抽出～逆転写のプロセスについて精度管理ができない ・検体そのものへのコンタミネーションが擬陽性の原因になりうる	・ターゲット遺伝子との同時定量に影響を及ぼさない遺伝子配列を選択する必要がある ・ターゲット配列と同程度の発現量の遺伝子を選択する必要がある ・各検体において発現量にバラツキが出る可能性あり	・ターゲット配列との同時抽出・同時定量に影響を及ぼさない配列を選択する必要がある
代表配列	陽性コントロールRNA (感染研)	RNaseP (感染研プロトコールにて推奨)	EAVウイルスRNA (ロシュ・ダイアグノスティックス (株))

RNA CRM (NMIJ CRM 6204-b) の特徴

Date of Shipment: XXXXXX XX, 20XX

6204600-160210-200401

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

National Metrology Institute of Japan



Reference Material Certificate

NMIJ CRM 6204-b

No. +33



Ribonucleic Acid (RNA) Solutions for Quantitative Analysis

This certified reference material (CRM) is produced in accordance with the NMIJ's management system and is in compliance with ISO 17034 and ISO/IEC 17025. This CRM consists of five solutions of ribonucleic acid (RNA) having different lengths (533 or 1033 bases of single-strand RNA) and sequences. This CRM is primarily intended to be used in the evaluation, and control of the precision, of RNA analytical methods such as DNA microarrays (DNA chips), quantitative reverse-transcriptase PCR methods, and next-generation DNA sequencers. It can also be used to assign the value of an RNA sample for evaluation of DNA chips.

Certified Values

The certified values for the mass concentrations of total RNA (i.e., whole RNA materials in the sample solution regardless of sequence) of the five solutions (RNA500-A, -B, -C, RNA1000-A, and -B) at 25 °C are given in the table below. The uncertainty of the certified value is the half-width of the expanded uncertainty interval calculated using a coverage factor (k) of 2, which gives a level of confidence of approximately 95 %.

Sample name	Total RNA	
	Certified value Mass concentration (ng/μL)	Expanded uncertainty Mass concentration (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

RNA500-A, -B, -C, RNA1000-A, and -B are the solutions of RNA designed and prepared as shown in Fig. 1 in this certificate.

Analysis

The certified values for each material were based on the mass fractions of the total RNA obtained using the following analytical methods:

(1) Isotope dilution mass spectrometry (IDMS)

Ribonucleotides, which were obtained from RNA using enzymatic digestion, were quantified by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS).

(2) Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

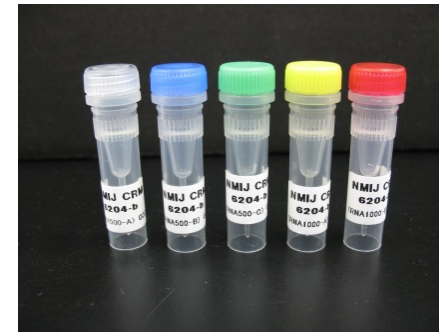
The phosphorus content in each solution was quantified by ICP-MS after acid digestion.

The mass concentration of the total RNA was calculated from the determined mass fraction of the total RNA and the density of the solution.

Metrological Traceability

The certified values of this CRM are traceable to the International System of Units (SI) via IDMS with the ribonucleotide standard solutions which were evaluated by ^1H NMR using internal standards calibrated with potassium hydrogen phthalate CRM (NMIJ CRM 3001-b), by ICP-MS with a phosphate ion standard solution from the Japan Calibration Service System (JCSS), and by

1/6



NMIJ CRM 6204-b

コンセプト:

- ・一本鎖RNA (533 and 1033 bases)
- ・5種類のRNA配列
- ・特定の遺伝子配列をコードしない(人工配列)
- いろいろなターゲットと組み合わせて使用可能
- ・均等な塩基組成、GC含量は約50%
- ・化学分析による精確な濃度値を付与
- ・均質性・安定性を担保した溶液の形状での頒布
- 定量分析における妥当性評価に使用可能

厚労省・新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等における精度管理マニュアル 別添(2021/4/17公開)より

4) 内部精度管理

PCR 検査を含めた遺伝子関連検査を実施する場合、医療法等により、内部精度管理の実施は義務として求められている。実施内容として、コントロール測定は頻度はラン毎に行う。内部精度管理は、測定システムの安定性による精度(再現性)を確保する上で必要であり、その際に統計学的に妥当な許容範囲(管理限界)の指標と基準について、あらかじめ定めておく。許容範囲(管理限界)とは、精度管理データのばらつきが許容できる範囲(限界)をいう。精度管理データには、管理試料として陽性コントロールを測定し、その Ct 値や Threshold time (Tt) 値を用いることが考えられる

具体的には、陽性コントロールの測定値の日内・日間の変動を管理するため、代表的な 管理図では、検査導入時に評価した測定値の精度(再現性)に基づくばらつきの管理限界(例えば、 $\pm 3SD$)を設定し、検査導入後に日常検査の実施中に測定した管理試料の結果について、その平均($\bar{X}$)と個々の測定値の最大と最小の差(R)を経時的(例えば、毎日)にプロットしてグラフ化し、モニターする。 $\bar{X}$ と R が管理限界内にある場合は、測定結果が安定的に得られていると見なす。管理限界を外れた場合、あるいは管理限界内でも偏位の傾向(トレンド、シフトなど)が見られる場合は、測定結果の安定性が確保されていない可能性が考えられ、原因の究明とそれに基づく是正を行う。原因として、測定装置(保守管理)や測定試薬(試薬劣化など)の不具合がないか、試薬管理(遮光、保管温度など)、装置操作手順、測定者の手技・技能(ピペット操作など)、検体管理が不適切でないかの確認を行う。

定期的に、また測定試薬のロット変更時など必要時に、患者検体またはフルプロセスコントロールを用いて、各プロセス(検体の前処理、RNA 抽出、逆転写、核酸増幅と検出)で患者検体と同じ挙動(反応過程)をモニターすることが望ましい。

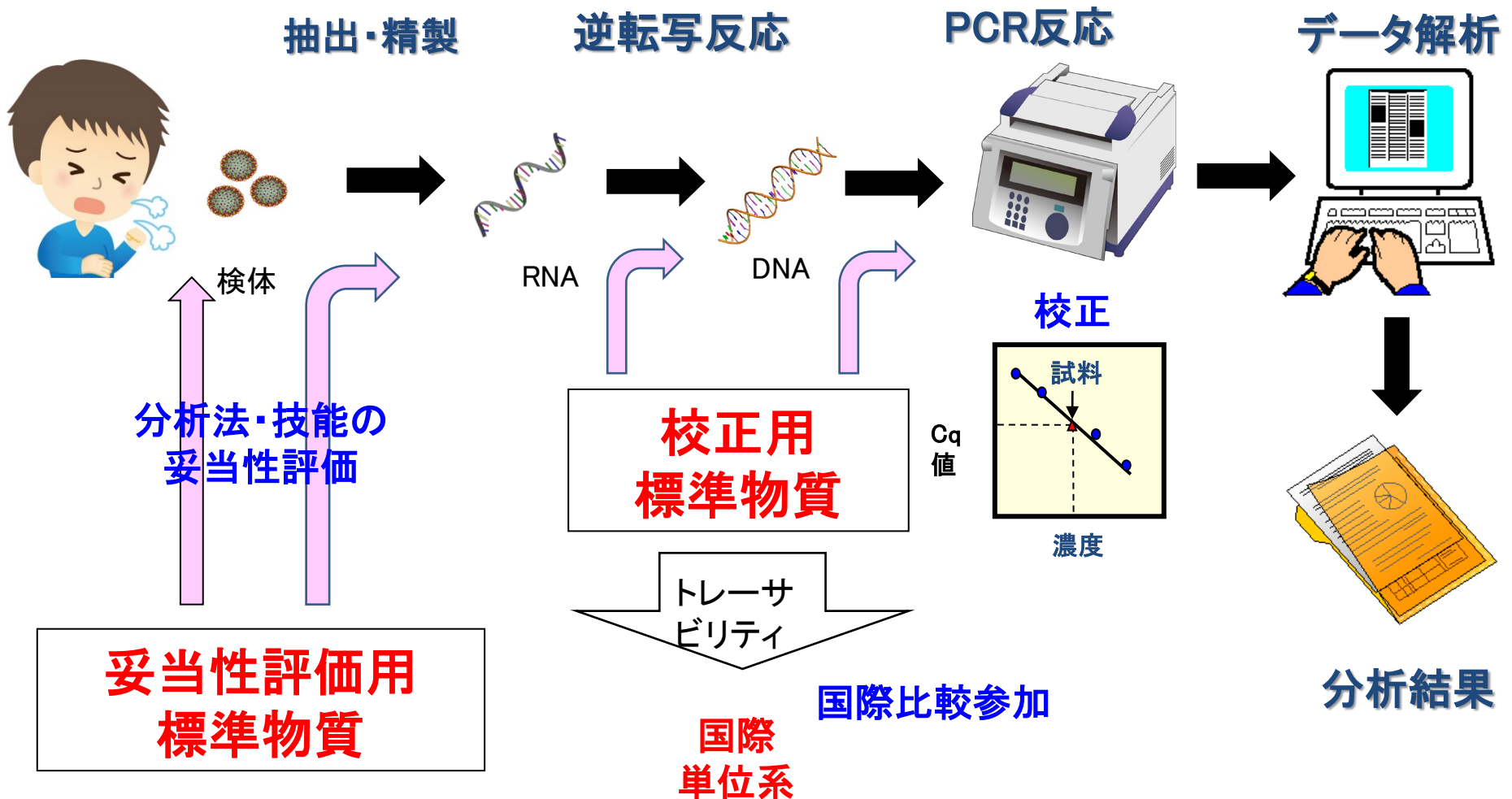
主な検討結果

- 新型コロナウイルス遺伝子と同時定量可能なRNA CRM, プライマー・プローブペアを同定済み。
- 感染研のプロトコルをベースに、RNA CRMが抽出～逆転写～PCR(duplex測定)のフルプロセスにおいて、外来性コントロールとして使用できることを確認済み。
- 実験者や装置が変わった場合にも、抽出～RT-qPCR(duplex測定)の工程を経たRNA CRM のC_q値の相対標準偏差が5%以下に収まることを確認済み。
- フルプロセスを経た際、検出下限域のC_q値が得られるように調整した希釈RNA CRMについては、別途安定性評価を実施し、十分安定であることを確認済み。



管理限界の設定が可能な、新たなフルプロセス用
外来性コントロール標準物質として利用可能

まとめ ～PCR検査における標準物質の役割～



謝辞

本研究の遂行にあたり、以下の関係者の皆様方に多大なるご理解とご協力を頂きました。
この場を借りて改めて深くお礼申し上げます。

○バイオ計測技術コンソーシアム(JMAC)



○産総研・生命工学領域 バイオメディカル研究部門



Life Science
and
Biotechnology



○産総研・計量標準総合センター・物質計測標準研究部門



National
Metrology
Institute of Japan



* 本研究成果の一部は国立研究開発法人・日本医療研究開発機構(AMED)からの受託研究
「新型コロナウイルスの信頼性の高い迅速診断システムの開発」の支援を受けたものである。