

新しいMagMAXキットとOpenArrayテクノロジーを用いた ハイスループット病原体検出

はじめに

病原体（特定の細菌、ウイルス、真菌など）の検出・分離に関連する各種技術はここ数十年間にわたり研究分野や医学分野の一角を担っており、今日も飛躍的な進化と発展を続けています。特定の病原体の存在を確認する技術は、培養、ウイルスプラーク、ELISAといった検査から、PCRやシーケンシングなど近年開発された分子生物学的手法まで多岐にわたります。これらの手法の多くは、極めて高い価値が得られる一方で多大な労力や時間を要し、中には結果が確定するまでに数日または数週間かかるものさえあります。また、感度にばらつきがあり、結果が一貫しなかったり確定しなかったりすることもあり、スピードと正確性が不可欠な状況で足を引っ張る形となっています。

近年の病原体検出手法は、このような欠点を持たないリアルタイムPCR[1]や次世代シーケンシングを主体とした核酸（DNA、RNA）ベースの検査へと進化しています。それでもなお、時間のかかるサンプル操作に頼らなければならないことも多く、サンプルや病原体の種類に応じて複数のキットやプロトコルが必要となるなど、さらなる改善の余地が残されています。

本アプリケーションノートは、呼吸器病原体陽性の臨床試験サンプルを用いた2つのパートから構成される試験を通して、異なるサンプルタイプを対象に多様な種類の病原体を単一手法で検出できる新しいワークフローの利点を解説します。ご紹介する病原体検出ワークフローは、Applied Biosystems™ MagMAX™ 核酸抽出ケミストリーとThermo Scientific™ KingFisher™ 核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置のスピード、感度、簡便性に、Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™ テクノロジーとApplied Biosystems™ QuantStudio™ 12K FlexリアルタイムPCRシステムの検出力と柔軟性を組み合わせた、ハイスループットかつ自動化可能な検出手法です。

材料・方法

臨床試験サンプル

臨床試験の複数被験者から採取された呼吸器病原体陽性(>300)サンプルを入手し、核酸抽出を実施するまで-80℃で保管しました。これらのサンプルは、幅広い患者背景（人口統計学的特性）や採取・保管方法を網羅しており（図1A）、本試験用のサンプル受け渡し前に、さまざまな検査手法で病原体を検出・確認済みです（図1B）。

A. サンプルタイプ	B. 検査タイプ	初回検出検査	パネルに含まれるターゲット数	サンプル数
BAL（気管支肺胞洗浄）	分子診断検査	GenMark eSensor™ RVP パネル	14	206
ETA（気管内吸引）		GenMark ePlex™ RP パネル	17	23
血漿（ヘパリンリチウム採血管）		Luminex™ NxTAG™ 呼吸器病原体パネル	20	31
鼻咽頭（NP）ぬぐい液		SolGent DiaPlexC™ RV13 検出PCR	13	8
血清		Bio-Rad Bio-Plex™ 2200	1	2
ぬぐい液		Cepheid SmartCycler™	1	3
気管		Focus Simplex™	1-3	2
UTM; NP ぬぐい液		呼吸器ウイルスパネル+リアルタイムPCR	1-3	12
VTM M5		Alere BinaxNOW™ (RSV)	1	13
VTM; 気管支		Alere BinaxNOW™ インフルエンザA&Bカード	2	6
VTM; 鼻／鼻孔	イムノクロマトグラフィ	bioMérieux API/ID32	15	2
VTM; 鼻洗浄		QuickVue™ インフルエンザA+B	2	2
VTM; 鼻喉				
M4 マイクロテストチューブ	染色	IFA／手動／FA 染色	N/A	4
M6 マイクロテストチューブ	染色	Inova QUANTA-Lyser™	N/A	2
	培養	培養	N/A	12
	ELISA	ELISA DSX™ Wampole	N/A	5

UTM=標準輸送液、VTM=ウイルス輸送液

図1. 臨床試験サンプルに関する情報 (A) 幅広い採取手法を網羅したサンプルタイプ。(B) 病原体の確認に使用した検査法

コントロール

本試験の第1パートでは、抽出・検出ワークフローの初期テストとして、少数の気管支肺胞洗浄 (BAL) サンプルを対象に、インタクトウイルスおよび細菌を添加したスパイクインコントロールを使用しました。

トータル核酸の分離

最大96サンプルを1グループとして、氷上解凍したサンプルからApplied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kitを用いてトータル核酸を抽出しました。200~400 µLの各サンプル (スパイクインコントロール添加または未添加) に酵素ミックスを加えて、Thermo Scientific™ KingFisher™ Flexシステムで溶菌作業を行いました。インキュベーション後、装置から取り出したプレート中の各サンプルに結合液と磁気ビーズ入りの混合試薬を追加し、プレートを装置に戻してその後の結合、洗浄、溶出ステップを行いました。溶出済みサンプルは、解析を実施するまで一時的に氷上 (長期保管が必要な場合は-80 °C) で保管しました。

リアルタイムPCR解析

リアルタイムPCR解析に先立ち、解析感度を高めるために、抽出した核酸サンプル5 µLにApplied Biosystems™ TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CGとApplied Biosystems™ TaqMan™ 呼吸器マイクロバイオータ (RTM) プライマープールを混合し、核酸を14サイクルプレ増幅させました。プレ増幅が完了したサンプルは、ヌクレアーゼフリー水で1:10に希釈して氷上保管しました。その後、プレ増幅・希釈済みサンプル2.5 µLとApplied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR Master Mix 2.5 µLを混合し、Applied Biosystems™ OpenArray™ AccuFill™システムでApplied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™ RTMプレート (バージョンA) を作製し、このプレートをQuantStudio 12K Flexシステムにかけてデータ解析しました。



図2. 呼吸器病原体の検出ワークフロー MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kitを用いてサンプルからトータル核酸を抽出し、OpenArray プレートまたは Applied Biosystems™ TaqMan™ Array Card (TAC) パネルを用いてプレ増幅およびリアルタイムPCR 解析を行うまでのワークフローを示したものです。最終結果として、44種類の病原体ターゲット (細菌、RNAウイルス、DNAウイルス、真菌) それぞれについて検出/未検出が表示される。

陽性および偽陰性の判定

スパイクインコントロール添加および未添加サンプルの分離・解析

いこと以外は全て同じ抽出・OpenArray プレート解析ワークフローで、トータル核酸を分離し、解析結果を事前にベンダーから提供されていた検査の検出結果と比較しました。図 4A に、検出が予想されていたターゲットと、分子検査および OpenArray RTM プレートの対象ターゲットをまとめています。分子診断検査結果のみと比較した場合、MagMAX/OpenArray RTM ワークフローでは、事前検査で検出されていた確定ターゲットと約 91% の一致率を示すとともに、検査パネルに含まれていたにもかかわらず事前に検出できていなかった 68 個のターゲットが新たに検出陽性となりました (図 4B)。同様に、全ての事前検査結果と比較した場合も、MagMAX/OpenArray RTM ワークフローは事前に検出されていた確定ターゲットと約 91% の一致率を示しました。また、事前に検出されていなかったターゲットも数多く追加検出されました。これらは事前検査パネルに含まれていなかったターゲットや、偽陰性、偽陽性、およびサンプルに含まれていた常在微生物叢 (マイクロバイーム) の組み合わせである可能性が高いと考えられましたが、追加検出ターゲットの一部を対象に独立した別の検査を行ったところ陽性が確定したため、追加検出ターゲットの大半が真陽性であろうことが示唆されています。

* 複数種をカバーするアッセイ

図3. スパイクインコントロール添加(+)／未添加(-)のBALサンプルを対象としたターゲット検出 (A) 核酸抽出および解析前にBALサンプルに添加したインタクトウイルス・細菌。(B) プレ増幅リアルタイムPCRによる検出結果

結論

MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation KitとKingFisherシステム、そしてTaqMan OpenArrayテクノロジーとQuantStudio 12K FlexリアルタイムPCRシステムを使用した新しいワークフローを使用することで、さまざまな臨床試験呼吸器サンプルから効率的に核酸を抽出し、市販の既存検査（分子診断検査、その他の検査のいずれも）の結果と一致する優れた検出結果が得られました。また、多様な種類の病原体からの核酸抽出に適合している点や、OpenArray RTMプレートおよびアッセイの広い対象ターゲットによって、結果が出るまでの追加時間を最小に抑えながらも検出能力の向上が実現できます。

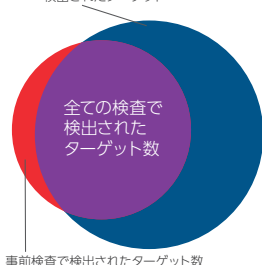
本資料では当該ワークフローの有用性を呼吸器病原体の検出に絞ってご紹介しましたが、迅速かつ包括的な検出手法によって大きなベネフィットが期待できる他の感染性疾患領域の研究にももちろん適用可能です。

参考文献

1. Caliendo AM (2011) Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 52 Suppl 4:S326-30.

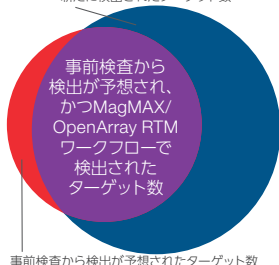
B 分子検査パネルの検出ターゲット

MagMAX/OpenArray RTMワークフローで検出されたターゲット



C 全パネルを合わせた検出ターゲット

MagMAX/OpenArray RTMワークフローで新たに検出されたターゲット数



A

病原体タイプ	ターゲット	陽性が予想されるターゲット	分子診断検査のターゲット	OpenArrayのターゲット
(-) ssRNA ウイルス	インフルエンザA型	◇	●	△
	インフルエンザA型 (H1)	◇	●	△
	インフルエンザA型 (H3)	◇	●	△
	インフルエンザB型	◇	●	△
	パラインフルエンザ1型	◇	●	△
	パラインフルエンザ2型	◇	●	△
	パラインフルエンザ3型	◇	●	△
	パラインフルエンザ4型	◇	●	△
	メタニューモウイルス	◇	●	△
	RSウイルス	◇	●	△
	RSウイルスA	◇	●	△
	RSウイルスB	◇	●	△
	麻疹ウイルス			△
	ムンプス (おたふくかぜ) ウイルス			△
(+) ssRNA ウイルス	ヒトパレコウイルス (HPeV)			△
	エンテロウイルス	◇	●	△
	ライノウイルス	◇	●	△
	コロナウイルスOC43		●	△
	コロナウイルス229E		●	△
	コロナウイルスNL63		●	△
	コロナウイルスHKU1		●	△
dsDNA ウイルス	アデノウイルス	◇	●	△
	水痘帯状疱疹ウイルス (HHV3)			△
	エプスタイン・バー・ウイルス (HHV4)			△
	サイトメガロウイルス (HHV5)			△
	ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6)			△
ssDNA ウイルス	ヒトボカウイルス		●	△
グラム陰性菌	百日咳菌	◇		△
	百日咳 類縁菌			△
	コクシエラ菌 (Q熱)			△
	ボルデテラ菌			△
	インフルエンザ菌	◇		△
	肺炎クラミジア		●	△
	肺炎マイコプラズマ		●	△
	肺炎桿菌			△
グラム陽性菌	モラクセラ・カタラーリス			△
	黄色ブドウ球菌			△
真菌*	肺炎レンサ球菌			△
	ニューモシスチス肺炎			△

図4. 臨床試験サンプルにおけるターゲット検出 (A) ターゲット名とそのタイプ。◇は事前検査結果から検出が予想されたターゲット、●は分子検査パネルのターゲット（免疫クロマトグラフィや培養/染色検査との比較）、△はOpenArray RTMプレートのターゲット。(B) 事前の分子検査パネル結果とMagMAX/OpenArray RTMワークフロー結果を比較したベン図。(C) 全ての事前検査結果とMagMAX/OpenArray RTMワークフロー結果を比較したベン図

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/magmaxviralpathogen

研究用にも使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

eSensor and ePlex are trademarks of GenMark Diagnostics, Inc.

Luminex and NxTAG are trademarks of Luminex Corporation. DiaPlexC is a trademark of SolGent Co.

Bio-Plex is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. SmartCycler is a trademark of Cepheid Corporation.

Simplexa is a trademark of Quest Diagnostics Investments Inc. BinaxNOW is a trademark of Binax Inc.

QuickVue Influenza is a trademark of Quidel Corporation. QUANTA-Lyser is a trademark of Inova Diagnostics Company.

DSX is a trademark of Abbott Laboratories.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-1c SPA046-A22110B

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jpotech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584

営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)

[@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)