

# デジタルPCRの高感度化と臨床診断への応用

柳原 格\*・名倉由起子・吉村 芳修

## はじめに

加速する物流、ヒトの移動は、多くの社会経済的な効果をもたらす。他方、グローバル化は、潜在的に感染症の世界的な拡散の危機を内包する。もはや地球の裏側で発生した感染症は数日以内に、我が国に侵入するかもしれないのだ。昨今の新興・再興感染症の起因微生物として日々更新される病原体に対応するには、従来の古典的な培養同定法だけでは不十分である。また、メタゲノム解析などで難培養性微生物を含む細菌叢の変化による病態が明らかにされるにつれ、包括的な遺伝子レベルの病原体同定法は必須の技術となりつつある。

大阪母子医療センター（旧名称：大阪府立母子保健総合医療センター）では、WHO指定協力センターとして胎児、新生児、小児、妊娠や出産などに関する女性のさまざまな疾患の診断や治療を行い、当該医療分野を牽引してきた。筆者らの研究室では、周産期分野における感染症、あるいは遺伝的な背景が関与する疾患の解析目的で年間およそ800件程度の臨床検体の遺伝子同定や解析を行っている。PCR法、DNAサンガーシーケンス、リアルタイムPCR法、RNAを用いた発現解析、細菌叢解析を目的としたメタゲノム解析、あるいは次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析、レコンビナント技術や*in silico*の構造予測プログラムを用いたタンパク質構造機能相関など、さまざまな遺伝学的、蛋白工学的な手法を駆使して解析を行い臨床に役立てるための情報を提供している<sup>1-6)</sup>。本稿では、高感度な遺伝子同定法として開発されたデジタルPCR法について、リアルタイムPCR法との違いを中心として概説し、臨床診断における高感度遺伝子同定の意義について理解を深めたい。

## 従来の遺伝子定量法（リアルタイムPCR）

感染症においては、病原体と宿主免疫系とのせめぎ合いの中でその病態が刻々と変化する。一般的に感染した病原体量が多いほど、臨床的にはより重症化しやすい。したがって病原体の同定のみならず、病原体量を定量することは重要である。たとえば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染の診療において“ウイルス学的な治療の失敗（virologic failure）”とは、血中HIV RNA量が200コ

ピー/ml未満を維持できない状態である（抗HIV治療ガイドライン、2016）。また、腸管出血性大腸菌（O157など）は、100個程度の菌体があれば感染が成立するとされ、感染力がきわめて高い病原細菌と言える。

リアルタイムPCRがまだ実用化されていなかった時代、competitive PCRを用いてエンドポイントにおける遺伝子増幅産物のバンドの濃さで遺伝子量を半定量化していた。御記憶にある諸兄諸姉もおられるのではなからうか。その後、competitive PCRは急速にリアルタイムPCRに取って代わられる。リアルタイムPCRは、PCR増幅産物の増加を文字通りリアルタイムに測定する技術で、従来のエンドポイントでの増幅量の比較に比べ、より正確に遺伝子量が定量できる。臨床現場では、ゲル電気泳動などを使用せず閉鎖系で定量できるリアルタイムPCR法は、検査技師の負担のみならず、バイオハザードの観点や、コンタミネーションを極力回避する意味においても歓迎される手法であった。また、遺伝子定量には、ハウスキーピング遺伝子と同時に測定し相対定量する方法と、検量線を作成し絶対定量する二つの手法が選択できたことも汎用性があり、浸透した。一方で、わずかな病原体などの遺伝子増幅が検出された場合には、その判断には苦慮を強いられた。たとえば30サイクルを超えた辺りから遺伝子増幅を認めた場合、非特異的な増幅であるのか、コンタミネーションであるのか、ごくわずかな特異的な核酸が検出されたのか、悩ましい。マルチング解析を行って、特異的な増幅であるのか否か判断することが多いが、コンタミネーションによる増幅の可能性は除外できない。また、理想的な条件下では、リアルタイムPCRの検出感度は10コピー前後とされているが、特に臨床検体の場合、病態によってはサンプル中のPCR反応阻害物質の影響を受けることがあり、検出感度は実検体では一定とならないのが常である。

## デジタルPCRの原理と応用

デジタルPCRはサンプル中の核酸の初期量を絶対定量する手法である。デジタルPCRには大きく二つの方式がある。ドロップレット方式（Bio-Radなど）は、反応液をたとえば2万個のナノリットルサイズのドロップレットに分画した後に、エンドポイントPCRを行う。

\*著者紹介 大阪母子医療センター研究所（免疫部門部長） E-mail: itaruy@mch.pref.osaka.jp

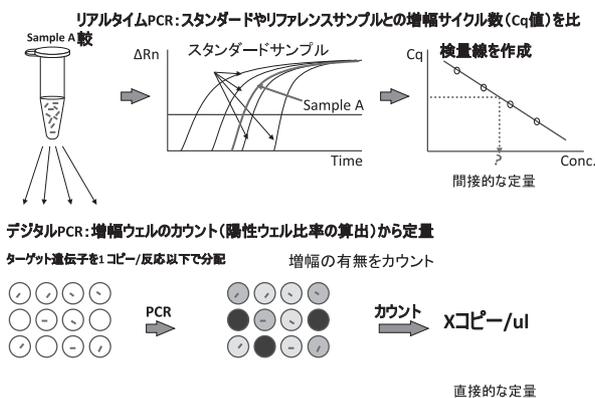


図1. リアルタイムPCRとdPCRの違い

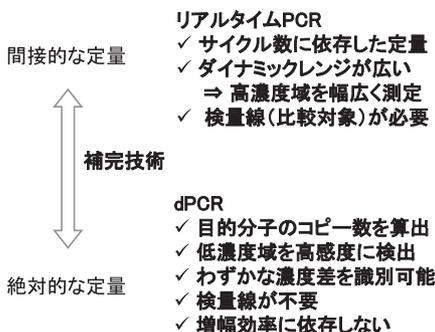


図2. リアルタイムPCRとdPCRの違い

PCR反応後にドロップレットリーダーを用いて、エマルジョン化したドロップレットを蛍光検出し、絶対定量を行う(QX200™ Droplet Digital™ PCRシステム)。他方、ウエルチップ方式(Thermo Fisher Scientific)では、多数のウエル(市販品は20,000ウエル)に反応液を希釈分配し、その後エンドポイントPCRを行う。最終的には蛍光リーダー(QuantStudio™ 3DデジタルPCRシステム)を用いてチップ上の核酸増幅を可視化し、ウエルごとの陽性・陰性を判定する。上記二つの方法はどちらも絶対定量を行うが、PCR後に陽性反応数を陰性反応数と比較検討するため、リアルタイムPCRのように、標準曲線の作成や、相対比較の必要がない(図1, 2)。サンプルは適宜希釈調整するが、各PCR反応単位においてターゲット分子が入らない場合や、1, 2, 3など複数コピー入る場合がある。そこで、ポワソンモデルを用いた補正によりサンプル中のターゲット分子数を計算する。デジタルPCRは、従来のリアルタイムPCRでは難しかったきわめて低い発現量あるいは、核酸の検出に威力を発揮する。たとえば癌腫などの摘出材料における既

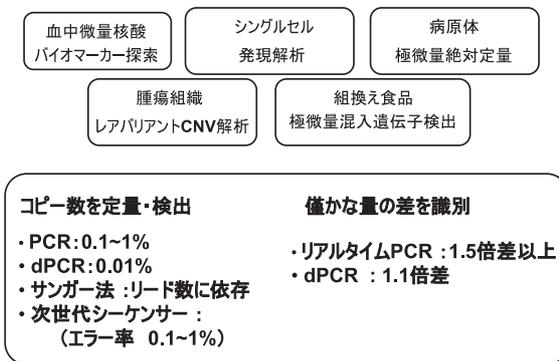


図3. dPCRの応用例と特徴

知レアバリエントの検出、病原体(RNA, DNA)の絶対定量などには有効な手段である(図3)。次世代シーケンスに比べると安価で汎用性があり、定まった標的遺伝子の微量検出に威力を発揮する。次世代シーケンス用のライブラリの絶対定量にも応用可能である。

### まとめ

デジタルPCRは利点としては、1) 検量線不要な絶対定量が可能な技術で、2) リアルタイムPCRと異なりエンドポイントPCRを用いるため、PCRの増幅効率の影響を受けにくく、3) リアルタイムPCRに比べて検出が困難な微量核酸の定量・発現解析や、ごくわずかな核酸濃度差を識別することも可能である。欠点としては、リアルタイムPCRと比べるとダイナミックレンジが低く、高発現遺伝子の検出には適さない。また、ランニングコストは次世代シーケンスと比べれば格段に安価ではあるが、リアルタイムPCRよりは高価である。

### 謝辞

発表の機会を与えていただいた京都大学大学院農学研究科保川清教授、関西学院大学理工学部藤原伸介教授、ならびに資料をご提供いただいたサーモフィッシュャーサイエンティフィック有賀博文氏に深謝いたします。

### 文献

- 1) Namba, F. *et al.*: *Pediatr. Res.*, **80**, 433 (2016).
- 2) Kawai, Y. *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 2358 (2015).
- 3) Nakahira, K. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e77099 (2013).
- 4) Sakamoto, S. *et al.*: *J. Immunol.*, **188**, 5547 (2012).
- 5) Mitobe, J. *et al.*: *EMBO Rep.*, **12**, 911 (2011).
- 6) Yamashita, K. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 321 (2011).