

# 遺伝子検査が分かるミニハンドブック

—PCR技術と精度管理編—

知ってるようで  
知らなかった、  
PCRの基礎知識。

# PCRという歴史的な発見。 そのアイデアは、温泉から湧き出た。

ある金曜日の夜、科学者キャリー・マリス氏は彼女とのドライブにでかけた。道中、彼の脳裏にあるアイデアが浮かぶ。それは彼が当時シータス社で取り組んでいたオリゴDNA(短いDNA断片)の研究を応用した、特定のDNA配列を連鎖的に合成する方法であった。マリス博士はこれを思いついたとき、興奮を抑えきれず、クルマを路肩に停め、一心

不乱にノートに書き留めたとされている。彼の「誰もが思いつきそうで思いつけなかったアイデア」は、彼とシータス社の更なる研究によって、好熱性細菌*Thermus Aquaticus*が持つ、高温でも活性を保つことができる耐熱性DNA合成酵素へと辿り着く。この耐熱性DNAポリメラーゼは「DNAを合成するための熱処理で一般的なDNA





写真:アフロ

合成酵素は失活してしまうため、限られた条件でしかDNAを増殖できない」というジレンマを解消に導くものだった。こうして1983年に発明されたPCR (polymerase chain reaction:ポリメラーゼ連鎖反応) は、その後世界中の遺伝子研究を加速させることとなった。この功績が讃えられ、マリス博士は1993年にノーベル賞を受賞している。

## PCR (Polymerase Chain Reaction)

-ポリメラーゼ連鎖反応-

今日では特定の遺伝子の配列のみを簡単に増幅させる技術として、世界中の研究や医療の分野で使われています。イエローストーン国立公園の温泉から採取された好熱性のバクテリア「*Thermus Aquaticus*」がもつ耐熱性DNAポリメラーゼがPCR技術の礎に。ロシュの遺伝子測定装置TaqMan PCRの「Taq」は、この細菌の名前に由来しています。



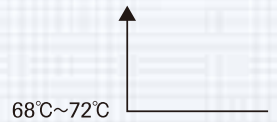
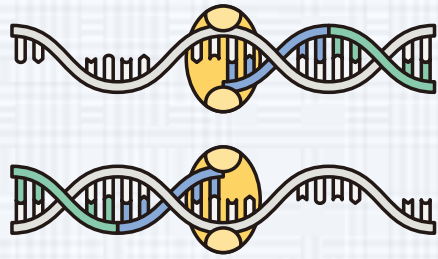
# 二本鎖のDNAをバラバラにして増やす。

## PCRの原理を知っていますか？

DNAの研究は困難の連続でしたが、PCRの発明がブレークスルーに。PCRは鋳型となるDNAの狙った配列を特異的に増幅する技術です。プライマーと呼ばれる15~25塩基ほどの短いオリゴヌクレオチド(DNA断片)を狙った領域の両端に設計。このプライマーで挟んだ部分だけを増やすことができます。



### 3. 増幅



68°C~72°C

## DNA増幅の「サイクル」

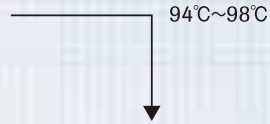
1~3の解離→アニーリング→増幅を「サイクル」と呼びます。PCR反応を1サイクル完了すると、理論上一組の二本鎖DNAは、2組みの二本鎖DNAに増えることになります。

### 1. 解離 (Denaturation)

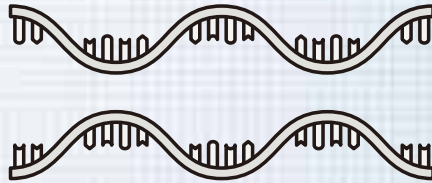
通常は二本鎖の構造を持つDNAですが、95°C前後の高温で一本鎖DNAに解離します。



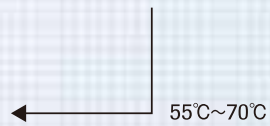
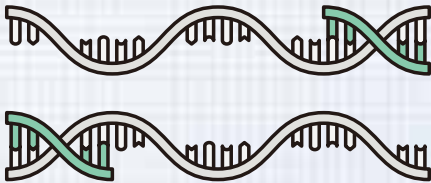
## 鋳型 DNA



### 1. 解離



### 2. アニーリング



### 2. アニーリング (Annealing)

徐々に冷やしていくとDNAは再び二本鎖DNAに戻ろうとします。この時、プライマーと呼ばれる人工的に合成した短い一本鎖DNAの断片を入れておくと、その配列に相補的な部分に張り付きます。

### 3. 増幅 (Extension)

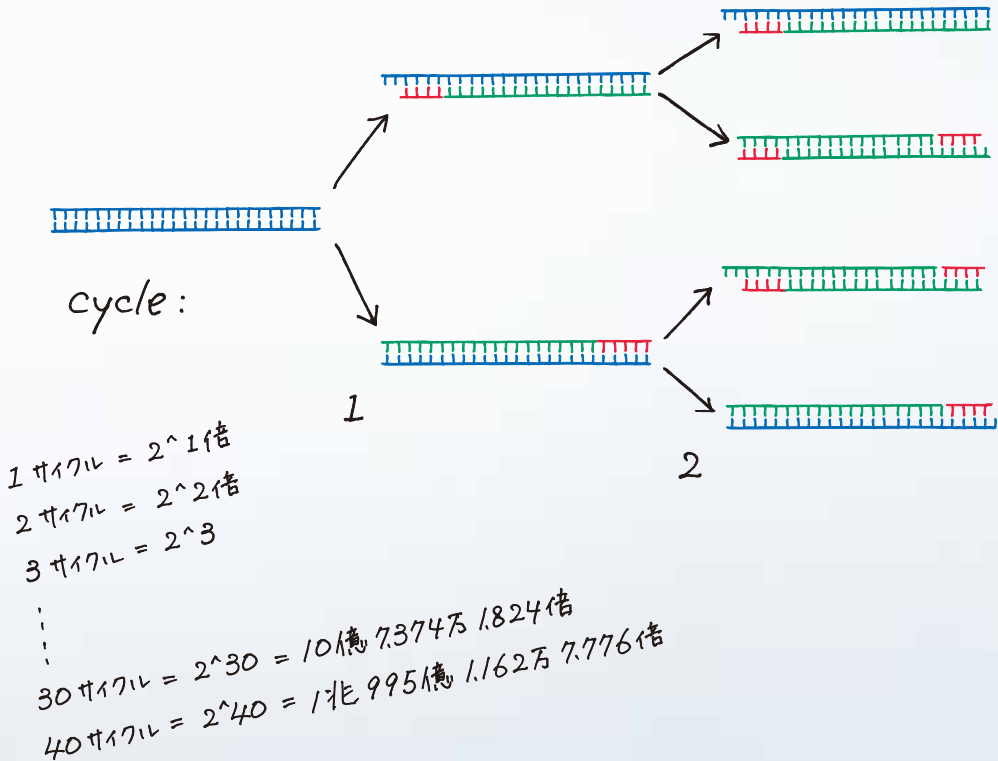
プライマーがアニーリングして二本鎖になった部分を足場に、DNAポリメラーゼが鋳型となる一本鎖DNAの配列を元に、二本鎖DNAを合成していきます。このDNAポリメラーゼの合成には、足場となるプライマーのアニーリングが必要なため、狙った場所だけを増幅できます。

1サイクルで、理論上2倍ずつ増えていく。

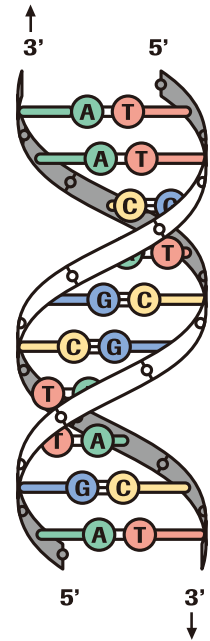
それが、PCR法が高感度に検出できる理由です。

2倍、そのまた2倍という計算を繰り返すと、わずか40回目で1兆倍を優に超えます。

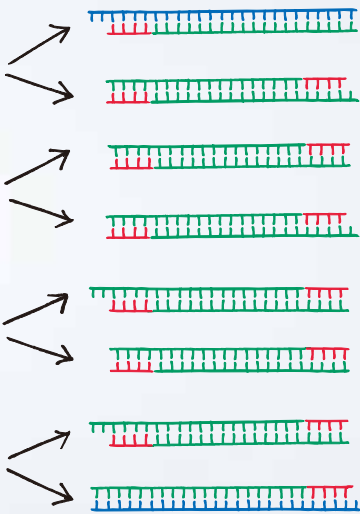
PCRサイクルはその数式と同じように、1サイクル完了するごとに増幅産物が2倍ずつ増えていく計算に。最後は数億から数兆倍まで増幅させることが可能です。DNAの熱によって二本鎖と一本鎖という2つの構造を行き来する性質を活用し、微小な情報を増幅し、目的とするDNA配列を自在に増やすことができます。



## 二重らせん構造の不思議



DNAはA(アデニン)とT(チミン)、G(グアニン)とC(シトシン)が特異的に結合。二本鎖DNAのうち片側のDNAの配列が決まれば、その反対側の配列も決まります。また、DNAには向きがあり、5'末端が上流、3'末端が下流となり、DNAの合成もこの向きに沿って合成されます。DNAはお互いに逆向きに、相補的に結合した二重らせん構造をとっています。



3

# DNAの増幅をリアルタイムに観察できる。 それが、リアルタイムPCR (TaqMan PCR)です。

通常のPCRではDNAを増幅させた後、電気泳動などで増幅産物を確認します。

この方法は、手間がかかったり、何サイクルしたら十分に増幅されているのか分からなかったりと、遺伝子検査に用いるにはいくつかの課題があります。

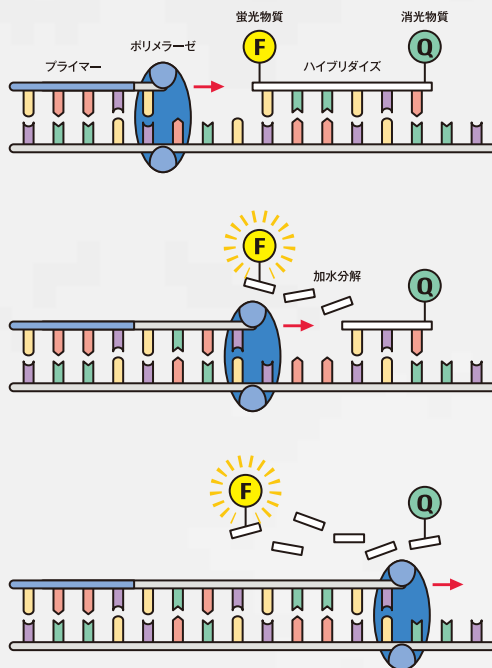
そこで開発されたのが、リアルタイムPCR (TaqMan PCR)。

その名前の通り、DNAの増幅をリアルタイムに観察する方法です。

TaqMan PCRでは  
TaqManプローブと呼ばれる  
蛍光物質で標識した短いDNA断片を  
使用します。このプローブは  
DNAが合成される時に加水分解され、  
その際、蛍光が観察できるのです。

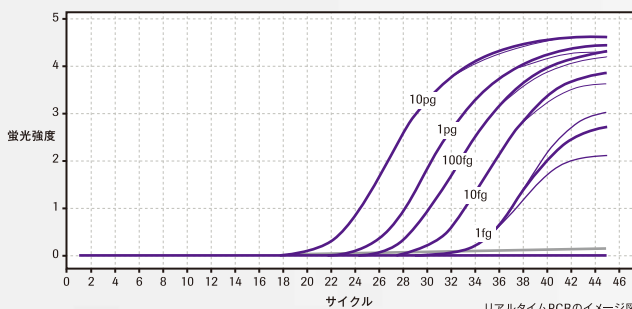






## リアルタイムPCRは定性だけでなく、定量もできる技術です。

DNA合成が1回行われると1つのTaqManプローブが加水分解されます。2回なら2つ、4回なら4つと、DNA合成の回数だけ蛍光エネルギーが観察でき、蛍光カメラでその強度を測定すれば、DNA増幅がどれだけ起こったのが推測可能です。逆算すれば増やす前のDNAが、どのくらい存在していたのかも分かります。増幅後の産物を開封することなく、手間をかけずに定性・定量のどちらも測定できるリアルタイムPCRは、様々な検査の分野で活躍しています。



リアルタイムPCRのイメージ図

# 遺伝子検査のオートメーション化の歴史は、 ロシュの測定装置を見れば分かります。

1992年、ロシュはシータス社からPCRの特許を購入し、この技術を検査の分野に応用することを試みました。日本においても1993年、遺伝子検査として初となる用手法の体外診断用医薬品 AMPLICORを発売。1998年にはオートメーション化された遺伝子検査装置コバス アンプリコアが発売されました。以来、ごくわずかな量のDNAも増幅して検出することができるPCRは、迅速・高感度な検査法として、主に感染症の検査を中心に現在も進化を続けています。

1993年  
AMPLICOR

シータス社から特許を購入したロシュが開発した、初めての体外診断用医薬品としてのPCR法による遺伝子検査キット。高感度な感染症検査ができるキットとして世界中で使われました。  
(現在は販売していません)



ロシュは世界に先駆けて自動化されたPCR遺伝子検査装置を発売し、遺伝子検査をより身近なものにしました。

(現在は販売していません)

1998年  
コバス  
アンプリコア

2006年  
コバス TaqMan  
アナライザー



増幅と検出を1ステップで実施できるTaqMan法を採用した自動化遺伝子検査装置。ロシュのPCRの歴史を支えてきた信頼のシリーズで、現在でも多くの病院で使われています。

販売名:コバス TaqMan 48  
製造販売届出番号:13B1X00201000027

2007年  
TaqMan  
「オート」システム



核酸抽出のステップを自動化するコバス AmpliPrepをコバス TaqManに組み合わせた自動測定装置。抽出済みサンプルの移動以外、抽出から増幅まで一貫した自動化を実現しました。

販売名:コバス AmpliPrep  
製造販売届出番号:13B1X00201000025  
販売名:コバス TaqMan  
製造販売届出番号:13B1X00201000026

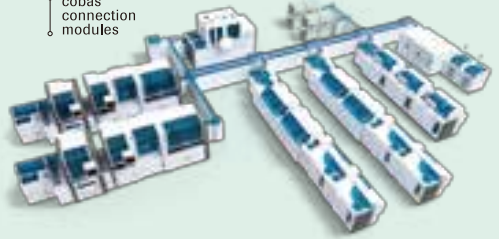
2011年  
コバス  
4800システム



PCRの技術をコンパクトなボディに凝縮し、完全自動化を実現。省スペースかつシンプルなワークフローをカタチにし、いつでも、どこでも、患者さんに寄り添いながら、迅速に検査が行える遺伝子検査装置が登場しました。

販売名:コバス Liat  
製造販売届出番号:13B1X00201000067

CCM  
cobas  
connection  
modules



検体前処理・後処理プロセスを自動化する装置と、生化学・免疫検査・遺伝子検査の測定装置を高速搬送ラインで連結。検査フローの一本化により、TATの短縮と確かな品質管理を実現します。

2017年

コバス  
Liatシステム

よりオールラウンドに、  
よりシンプルに。  
遺伝子検査のニーズは、  
二極化が進んでいます。

2017年

CCM  
(cobas connection  
modules)

2015年

コバス  
6800/8800  
システム



核酸増幅にかかる時間を大幅に短縮し、検査の効率化を実現しました。また、核酸増幅装置 コバス z 480は、ユーティリティチャンネルを採用。カスタマイズした検査へのニーズに対応しています。

販売名:コバス z 480  
製造販売届出番号:13B1X00201000056



抽出から増幅までを完全自動化。これまで提供してきた検査項目の数々を一台に統合する、ハイスループットシステムとして開発されました。フレキシブルな検体ハンドリングと、より簡単なオペレーションを実現しています。

販売名:コバス 6800システム  
製造販売届出番号:13B1X00201000063

販売名:コバス 8800システム  
製造販売届出番号:13B1X00201000061



開発当初から大切にしてきたもの。  
それは、TaqMan PCRに込めた  
精度管理技術です。

世界で初めてPCR法の臨床検査キットを登場させた当時から、  
検査の「精度」を大切に捉え、ロシュは独自の精度管理技術を導入してきました。  
そのポリシーは現在でも変わることなく、TaqMan PCRに息づいています。  
高感度なテクノロジーとして広く知られるリアルタイムPCRの検査結果を、  
より確かなものにしていきます。

## —ロシュならではの精度管理技術—

### インターナルコントロール (IC、内在性コントロール)

PCR法では、検体中のDNAに目的の塩基配列があって、増幅が起こったら「陽性」、目的の塩基配列がなくて増幅が起こらなかったら「陰性」と判断します。しかし、PCR反応自体が不成功の場合でも増幅は起こりません。そこで、ターゲット遺伝子とは関係のないDNA断片を用い、目的のPCR反応と同時に検出。PCR反応の不成功による「偽陰性」を防ぎます。

IC=陽性

ターゲット遺伝子=陰性

検体中にターゲット遺伝子は存在しなかった

Negative (陰性)

IC=陰性

ターゲット遺伝子=陰性

PCR反応が上手くいっていなかった

Invalid (測定不能)

### UNG (ウラシル-N-グリコシダーゼ処理)

通常のDNA合成に使われるT(チミン)の代わりにU(ウラシル)を使用。PCR反応の前に必ずU(ウラシル)が含まれた増幅産物のみを特異的に切断する酵素で検体を処理し、万が一、キャリアオーバーコンタミネーションが起こってもPCR検査に影響しないようにしています。

UNG (ウラシル-N-グリコシダーゼ)で検体処理

キャリアオーバーコンタミネーションが起こってもPCRの鑄型にならない

PCR検査に影響しない

### 陽性コントロール / 陰性コントロール

IC (インターナルコントロール) は、PCR反応が起こったかどうかを判断できますが、反応系全体の劣化や不具合を察知できません。また、UNGはキャリアオーバーコンタミネーションを低減できますが、検体由来の鑄型DNAのコンタミネーションは検出できません。そこでロシュは、特にリスクの高い多検体同時処理の測定装置において、陽性コントロールと陰性コントロールを同時に測定しています。

陽性コントロール:

PCR反応の効率に低下が見られた場合に陰転化。

Invalid (測定不能)

陰性コントロール:

装置や実験環境に陽性検体による汚染が見られた場合に陽転化。

Invalid (測定不能)



今後、遺伝子検査に求められるのは、  
精度管理に対する高い意識です。

### 精度管理が必要な理由

近年、国際的に検査結果の妥当性、有効性を担保することが重視されるようになってきています。日本でも「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン」の中で、遺伝子関連検査の実施設は原則としてすべて「品質保証に関する認定を受けるべきである」とされ、「実施する検査の分析的妥当性、臨床的妥当性および臨床的有用性についての情報を文書で用意しておかなければならない」とされています。

品質保証に関する  
認定を受けるべき

妥当性・有用性を  
文書で用意するべき

求められるのは精度管理への対応策

ゲノム医療が現実のものとなってきている今、遺伝子検査を取り巻く環境は、急速に変化しています。特に、遺伝子検査の品質を担保するための精度管理は、今後ますます重要視されることが予見されます。たとえば、2017年11月に日本臨床検査医学会から出された「ゲノム医療における検体検査の品質確保に関する提言」では、分析学的妥当性を担保するために、米国疾病管理予防センターが提唱しているACCEモデルを例示しています。

### ACCEモデルで例示された分析学的妥当性の例

1. 検査は定量的なものか、定性的なものか。
2. 変異があるときに、どれくらいの割合で陽性となるか(感度・sensitivity)。
3. 変異がないときに、どれくらいの割合で陰性となるか(特異度・specificity)。
4. 内部精度管理をしているか
5. 外部精度管理をしているか
6. 精密度(繰り返し分析したときの再現性はどうか)
7. 検査室内での精密度、検査室間の精密度
8. 偽陽性を避けるための確認試験は
9. どんな状態の試料で検査したか
10. 正しい結果を出せない確率は
11. 多施設で検査したときにどれくらい似通った結果が得られたか



ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 〒108-0075 東京都港区港南1-2-70  
カスタマーソリューションセンター ☎0120-600-152 <http://www.roche-diagnostics.jp>