白血病関連遺伝子検査ワーキンググループ(WG)の活動報告

遺伝子・プロテオミクス技術委員会 公益財団法人かずさDNA研究所 糸賀 栄

【今回のテ-マ】

qPCR法における検出限界値(LOD)/定量限界値(LOQ)の算出法の確立
—Major BCR-ABL mRNA定量検査を例として—

【報告概要】

白血病関連遺伝子検査WGでは、白血病関連遺伝子検査の外部精度評価を実施してきた。前回の第5回外部精度評価において、改めて検出感度付近の施設間差が大きいことが分かった。

そこで、qPCR法の検出限界値(LOD)/定量限界値(LOQ)を正確に求めることのできる外部精度評価を計画している。リコー社ではインクジェット技術を利用して反応ウェルプレートへ遺伝子を1コピーから正確に打つ技術を開発している(DNA標準プレート)。このDNA標準プレートと各施設での健常者RNA抽出液を用いて各施設でのLOD/LOQを算出する方法を検討している。

現在、Major BCR-ABL mRNA定量検査についてリコー社の自家調製法での検証を行い、本委員会委員の施設でパイロット試験を実施している。その結果を踏まえて、DNA標準プレートを用いたLOD/LOQ算出試験への参加施設を募る予定であり、今回セミナーではその検証結果を中心に報告する。

遺伝子・プロテオミクス技術委員会 白血病関連遺伝子検査WG (最近の活動内容)

2013年 9~10月		第3回白血病遺伝子検査外部精度管理
		(BCR-ABL1 mRNA定量)の実施
10~	~11月	各施設へ参考変換係数の報告
2014年	10月	BCR-ABL1 mRNA定量の外部精度管理報告
2015年	4月	白血病関連遺伝子検査のアンケート調査(18施設)
2016年	4月	第4回白血病遺伝子検査外部精度管理
		(BCR-ABL1 mRNA定量)の実施
	9月	第4回外部精度管理報告
2017年	5月	外部精度管理用試料の作製(各40本)
	6月	凍結乾燥試料でのクロスチェック(2施設)
2018年	9月~	第5回白血病関連遺伝子検査外部精度管理の実施
2019年	10月	第5回外部精度評価報告(各施設・大会シンポジウム)
2020年	11月	(総説)白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み 医療検査と自動化 Vol.45 No.5 2020 で報告

LDT(自家調製法)施設において検出感度付近の施設間差が大きい

【結果報告2】Major BCR-ABL1 mRNA(18施設)

4.0

3.0

2.0

1.0

0.0

B1/B5

報告値(Log Reduction)

② 報告値(Log Reduction)

		LOG I	\Guu	Cuoi
試料施設#	B2 (B1か)	B3 らのLo	B4 g Redu	B5 uction)
а	1.00	1.9	2.6	4.5
b	1.11	2.1	2.8	3.8
с1	1.01	2.0	2.9	4.3
i	0.85	2.1	3.4	4.9
с2	0.87	1.9	2.8	(量不足)
g	0.86	1.9	3.0	4.3
ı	0.91	2.0	2.9	4.8
m	0.95	1.9	3.0	4.9
n	1.55	3.0	3.3	4.5
f	0.97	1.9	3.0	4.7
k	0.73	1.6	2.4	3.3
d	1.18	2.0	2.4	(↓)
h	1.14	2.3	3.0	(-)
j	0.89	1.8	2.6	(-)
сЗ	0.98	2.0	(1)	(1)
0	0.91	2.0	(1)	(↓)
р	1.00	2.4	(↓)	(↓)

(↓)定量限界以下,(-)検出せず

白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み .医療検査と自動化 Vol.45 No.5 2020

B1/B2

B1/B3

Major BCR-ABL1 mRNA定量 報告值

B1/B4

SDI評価 A.B評価 C評価

D評価

IVDキット: 8施設

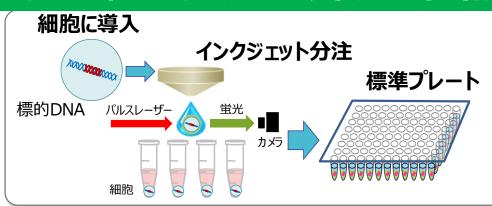
: 8施設

LDT

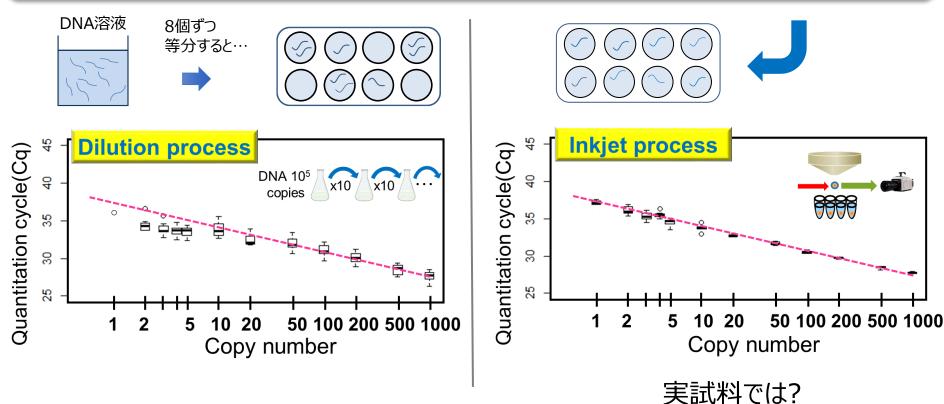
※SDIを求めるにあたりMadiE ,SDEは標準化(IS) キット(n=8)の平均値、SD値を用いました。

表の赤枠内

リコー社のインクジェット分注技術を遺伝子関連検査へ応用する



インクジェット技術で標的配列を遺伝子組み換えした細胞をカウントしながら1分子レベルで正確にプレートへ分注する。



⇒各施設での核酸増幅法の正確な検出限界値・定量限界値を求める

リコー社のDNA標準プレートを臨床検査で利用するには?

(現状)

(問題点)

(解決案)

①水溶液ベースのサンプル測定



マトリックス等の 影響を受けない 理想的な状態



健常者試料に融合遺伝子 を正確にスパイクするような かたちで

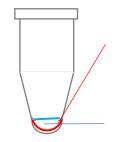
②得られた結果 「コピー数/well」



実用的でない



日常報告値に換算する



BCR-ABL1 (Ricoh Standard)

BCR-ABL1 コピー数

× 100(%) ×CF

健常者RNA/cDNA

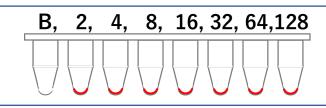
ABL1 コピー数

International scale(IS)値

※再発・微小残存病変の検出が重要 (ご施設での健常者の平均的なABL1 コピー数)

標準DNAプレートを用いた各施設でのqPCR法の検出限界値/定量限界値の算出

標準DNAプレート (BCR-ABL1のみ)



B:水対照 コピー/well 乾燥状態

健常者サンプルを同量ずつ添加

RNA(1 step法)

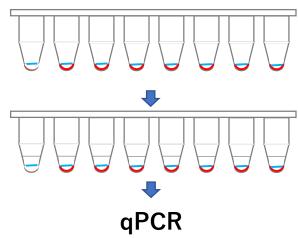
または

cDNA(2 step法)

試薬の添加

健常者サンプルを添加する利点

- ・ご施設のInternal controlでの日常 報告値でLOD,LOQが求められる。
- ・サンプルのマトリックスの影響を考 慮できる(融合遺伝子の場合、健常者 もprimer配列を持っている)。
- ・RT試薬やDNA抽出液の影響を反映 できる。

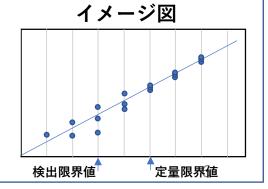


個別検出法の場合は、予め健常 者サンプルのInternal control値 を各施設の方法で測定しておく。

(健常者サンプルに融合遺伝子) を正確にスパイクしたようにし たい。)

報告値算出(各施設での補正式)

検出限界値/定量限界値の算出



DNA標準プレート(リコー社)を用いて検出限界値/定量限界値を 求める手順

【方法】

①ご施設の方法で健常者のRNA/cDNAを準備。

③第2段階: コピー数域を限定したDNA標準プレート(n=4) を用いて合計5回程度測定する。

⇒LOD/LOQの算出 [Forootanらの方法(2017)等を参照]

検出限界・定量限界の決め方

検出限界(LOD)検出率が95%以上の最小コピー数

* **Forootan**, A. *et al.* Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* **12**, 1–6 (2017).

※ 定量限界(LOQ)

CV_{In}*が35%以下の最小コピー数として考えた。

E:增幅効率

$$CV_{ln} = \sqrt{(1+E)^{(SD(Cq))^2 * ln(1+E)} - 1}$$

DNA標準プレート: 0,2,4,8,16,32,64,128コピー/well (*BCR-ABL1* P210)



コピー/well(テスト)

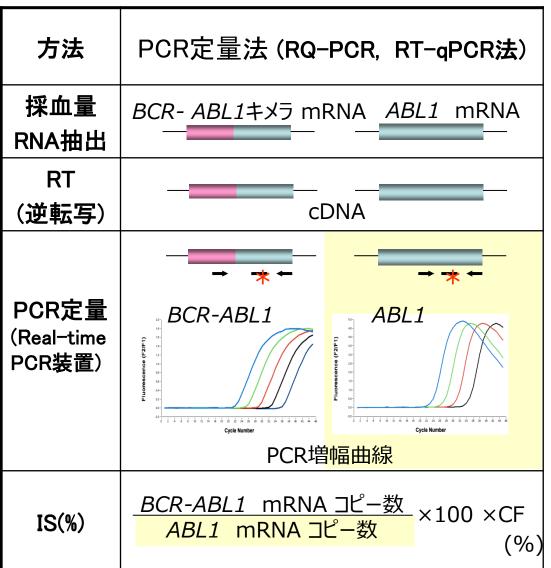
⇒ IS値(%)

BCR-ABL1 コピー数 × 100 × Conversion Factor ABL1 コピー数

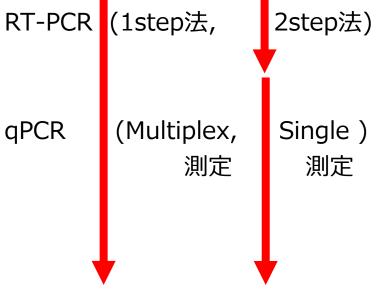
血液量: 2.5mL健常者(WBC数6.5E+03個/µL)

RNA抽出: Maxwell RSC (プロメガ社)

BCR-ABL1 mRNA定量法の種類



①1step-multi法, ②2step-single法 (オオツカ社) (シスメックス社)



WG活動スケジュール

(DNA標準プレートを用いたMajor BCR-ABL mRNA測定法のLOD/LOQの算出)

1. 予備実験 2021年 3月~6月

測定法:LDT(①1step-multi法, ②2step-single法)(リコー社)

方法 : 1)二次標準物質の測定(International scale:ISで報告)

2)第1段階:コピー数領域の限定

3)第2段階: n=20測定でLOD/LOQ算出

- 2. パイロット試験(本委員会委員の施設) 2021年 7月~
 - ・IVDキット(オオツカ社製、シスメクッス社製)
 - ·LDT(CF取得済)
- 3. 外部精度評価の一環として参加施設を募り実施

予備実験 概要 (DNA標準プレートを用いたMajor BCR-ABL mRNA測定法のLOD/LOQの算出)

期間: 2021年3月~6月

測定法:リコー社自家調製法(①1step-multi法, ②2step-single法)

リアルタイムPCR装置: QuantStudio 12K Flex Fast96wellブロック

材料:

- 1) DNA標準プレート(リコー社) DNA 0,2,4,8,16,32,64,128コピー/well (BCR-ABL1 P210/ ABL1)
- 2) 健常者ボランティアRNA:血液2.5mL健常者(WBC数6.5E+03個/µL)
 Maxwell RSC (プロメガ社)よりRNA抽出

方法:

- 1) 二次標準物質の測定(International scale:ISで報告)
- 2) 第1段階: コピー数領域の限定 DNA 0,2,4,8,16,32,64,128コピー/well 検体阻害評価(検体なし/あり)も実施
- 3) 第2段階: DNA 0,2,4,8,16,32コピー/well n=20測定でLOD/LOQ算出

二次標準物質を用いたConversion Factor (CF)を算出

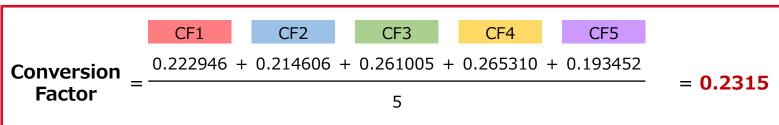
■ 二次標準物質

PHILADELPHIA P210 RNA Reference (ELITech社) Lot: U0920-052

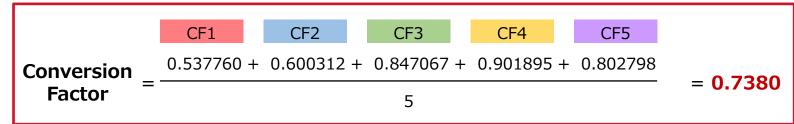
Tube	1	2	3	4	5
P210 b3a2	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ^{-4.5}
Reference Titre	20.4444%	2.6124%	0.3569%	0.0434%	0.0135%



①1step-multi法



②2step-single法

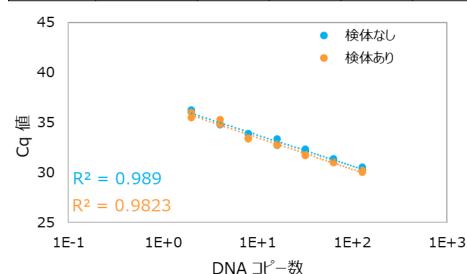


予備実験結果 ①1step-multi法のLOD/LOQ領域の限定

■ PCR結果 BCR-ABL1 P210

検体阻害評価(検体なし/あり): DNA 0,2,4,8,16,32,64,128コピー/well

	コピー/well	2	4	8	16	32	64	128
	Cq Ave	36.14	34.82	33.88	33.05	32.26	31.25	30.40
検体なし	σ	0.15	0.06	0.01	0.44	0.10	0.16	0.19
(水)	CV%	0.43	0.18	0.02	1.34	0.30	0.53	0.63
	Cq Ave	35.73	35.09	33.41	32.79	31.76	31.03	30.13
検体あり	σ	0.40	0.31	0.04	0.08	0.10	0.05	0.12
(RNA)	CV%	1.12	0.88	0.12	0.24	0.31	0.15	0.41



LODは検体なし/あり、 ともにDNA 2コピー

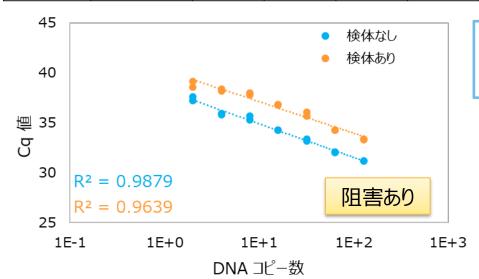
	検体なし	検体あり
Slope	-3.082	-3.152
R^2	0.989	0.982
Eff%	111.1%	107.6%
Y-Inter	36.826	36.644

予備実験結果 ②2step-single法のLOD/LOQ領域の限定

■ PCR結果 BCR-ABL1 P210

検体阻害評価(検体なし/あり): DNA 0,2,4,8,16,32,64,128コピー/well

	コピー/well	2	4	8	16	32	64	128
	Cq Ave	37.40	35.86	35.48	34.24	33.25	32.07	31.20
検体なし	σ	0.30	0.11	0.29	0.01	0.14	0.04	0.01
(水)	CV%	0.81	0.32	0.82	0.02	0.43	0.11	0.03
	Cq Ave	38.87	38.27	37.89	36.78	35.87	34.28	33.34
検体あり	σ	0.40	0.15	0.16	0.04	0.25	0.02	0.01
(cDNA)	CV%	1.02	0.39	0.42	0.11	0.69	0.07	0.04



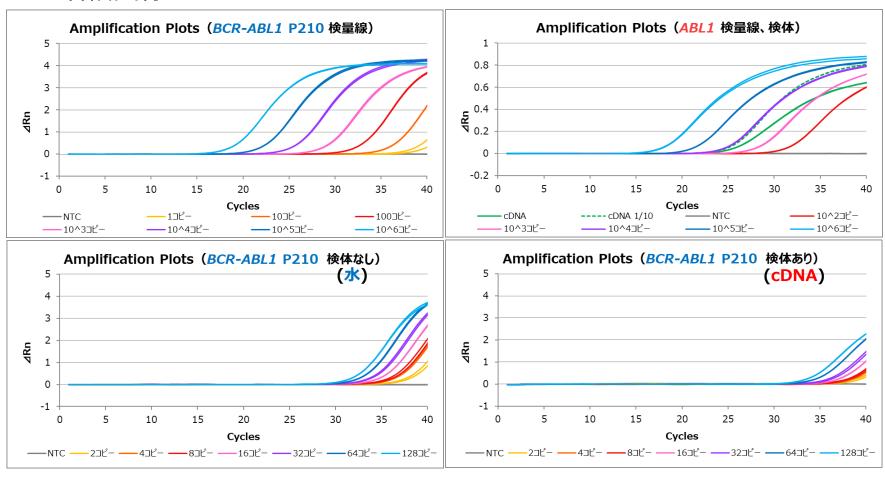
LODは検体なし/あり、 ともにDNA 2コピー

	検体なし	検体あり
Slope	-3.370	-3.155
R^2	0.988	0.964
Eff%	98.0%	107.5%
Y-Inter	38.276	40.270

予備実験結果 ②2step-single法のRT試薬の影響

※qPCR法のサンプル(cDNA)量を10μLから5μLへ変更した。

■増幅曲線

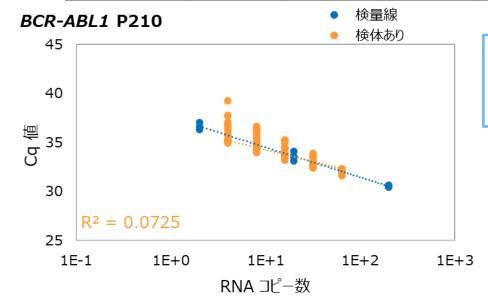


予備実験結果 ①1step-multi法のLOD/LOQの算出(1)

■ PCR結果 BCR-ABL-1 P210

検体阻害評価: DNA 0,2,4,8,16,32コピー/well + RNA 5μL/well 各20well

コピー/well	2	4	8	16	32
Cq Ave	36.27	35.30	34.12	33.06	31.97
σ	1.12	0.83	0.65	0.45	0.20
CV%	3.08	2.36	1.90	1.36	0.61
検出率	95.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CV _{In}	81.5%	57.3%	43.2%	29.4%	12.6%



BCR-ABL1 P210の 低コピー数で阻害が確認された

Slope	-3.599
R^2	0.827
Eff%	89.6%
Y-Inter	37.393

予備実験結果 ①1step-multi法のLOD/LOQの算出(2)

■ qPCR法の検出限界値/定量限界値を算出

・検出限界: RNA 4コピー/well (DNA 2コピー/well)

・定量限界: RNA 32コピー/well (DNA 16コピー/well)

RNA	ABL1	<i>ABL1</i> 59705				
コピー/well	<i>BCR-ABL1</i> P210	4	8	16	32	64
検出率 (LODは95%以上の最小コピー数)		95.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CV_{In} (LOQは35%以下の最小コピー数)		81.5%	57.3%	43.2%	29.4%	12.6%

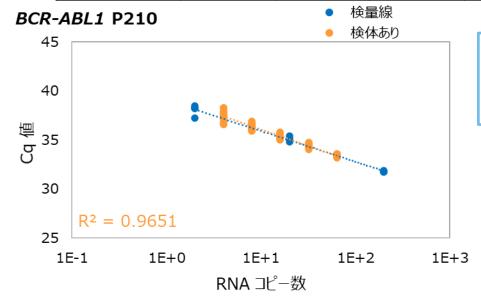
検出限界値 =
$$\frac{4}{59705}$$
 × 100 × 0.231464 = **0.0016%**

予備実験結果 ②2step-single法のLOD/LOQ領域の算出(1)

■ PCR結果 BCR-ABL-1 P210

検体阻害評価: DNA 0,2,4,8,16,32コピー/well + cDNA 5μL/well 各20well

コピー/well	2	4	8	16	32
Cq Ave	37.51	36.32	35.34	34.42	33.40
σ	0.46	0.25	0.23	0.17	0.11
CV%	1.23	0.69	0.65	0.48	0.32
検出率	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CV _{In}	32.5%	17.3%	15.8%	11.4%	7.4%



低コピー数でも阻害がなかった

Slope	-3.358
R^2	0.965
Eff%	98.5%
Y-Inter	39.442

予備実験結果 ②2step-single法のLOD/LOQ領域の算出(2)

■ qPCR法の検出限界値/定量限界値を算出

・検出限界: RNA 4コピー/well (DNA 2コピー/well)

・定量限界: RNA 4コピー/well (DNA 2コピー/well)

cDNA コピー/well	ABL1	80126				
	<i>BCR-ABL1</i> P210	4	8	16	32	64
検出率 (LODは95%以上の最小コピー数)		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CV_{In} (LOQは35%以下の最小コピー数)		32.5%	17.3%	15.8%	11.4%	7.4%

Conversion Factor 検出限界値 =
$$\frac{4}{80126}$$
 × 100 × 0.737966 = **0.0037%**

定量限界値 =
$$\frac{4}{80126}$$
 × 100 × 0.737966 = **0.0037%**

まとめ

遺伝子・プロテオミクス技術委員会 白血病関連遺伝子検査WGでは、これまでの活動を受けて、各施設でのLOD/LOQを算出する方法の検討を開始した。

先ずは、Major BCR-ABL mRNA定量検査を例として、リコー社の開発したDNA標準プレートを用いて日常検査報告値(IS値)でLOD/LOQを算出する予備実験を行い報告した。

今後は、現在実施中の本委員会委員の施設でパイロット試験を経て、外部精度評価の一環として参加施設を募り、この活動を実施していく予定である。