

感染症流行下における遺伝子検査用サンプリング法の確立

尾崎 真理¹, 吉田 彩夏², 村田 成範²

(¹ 武庫川女子大学 PCR センター, ² 武庫川女子大学薬学部健康生命薬科学科)

Establishment of sampling kit for genetic testing under epidemic of infectious diseases

Mari OZAKI¹, Ayaka YOSHIDA² and Shigenori MURATA²

¹Mukogawa Women's University PCR center

²Department of Health and Bio-Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and
Pharmaceutical Sciences Mukogawa Women's University

Abstract

Under the current global epidemic of infectious diseases such as COVID-19, there is a concern that the conventional sampling methods using saliva as the biological sample carry the risk of spreading viral infections to others during sampling, transportation, and genetic testing. In this paper, we propose a new methodology to prevent these risks by using several methods and materials that decrease infectability during sampling by test subjects, transportation by delivery persons, and genetic testing by experimenters. We verified the new sampling methodology as reliable for usual DNA tests operated by our laboratory.

緒言

生活習慣の見直しや医療機関受診の機会に繋げることを目的として、これまでゲノム機能解析学研究室では、本学の女子学生、中学、高校の女子生徒を対象とした遺伝子多型解析を実施してきた¹⁻⁵⁾。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の拡大により、感染リスクのあるヒト唾液サンプルの取り扱いが困難となった。従来の唾液サンプリング方法では、サンプリング時や輸送時、また遺伝子検査の際に、感染拡大のリスクが他人へ広がる可能性が懸念された。

従来のサンプリングキットは、耐水性素材で作った折り畳み式の台紙にプレートを貼り、キットを折り畳む単純な構造により、唾液を塗布した水溶紙面をカバーし外部からの DNA の混入を防止している⁶⁾。また、内部に空間ができるよう設計されており、通気性の良い所での乾燥の必要がなく、即時に回収して解析することができる利点があった。しかしながら、新型コロナウイルスの感染リスクが高まる状況では、この従来のサンプリング法では、サンプリングを行う個人と実験者の両方に感染リスクがあると同時に、唾液塗布部分が露出しているため、サンプルを回収する際に感染症を広げる恐れも生じた。また、集団でのサンプリング時には、サンプル採取時に起こるクラスター化も問題となる。

したがって、これらの問題を解決し、感染リスクを最小限に抑えつつ、ゲノム情報の収集を可能にする新たなサンプリング法の開発が急務である。他の被験者及びその周囲の人間への感染リスクを排除するため、①一般家庭を想定した設備においても個人で病原体を一定程度不活化でき、特定のゲノム情報が検出可能 DNA を残存していること、②サンプル輸送中に輸送者及び周囲の人間への感染リスクを抑えるためにサンプルを完全密閉でき、③実験者の安全確保のため、検査前に完全にウイルスを不活化できる、以上の3点を兼ね備えた新たな手法を開発する必要があると考えた。

そこで本研究では、従来のサンプリング法の問題点を解決する新たな方法を提案し、新たに開発したサンプリングキットの実用性を実証することを目的とし、これまで当研究室で解析対象としたことのある遺伝子が増幅可能かどうか、既存の反応条件やプライマーを用いて検証を行った。

材料及び方法

1. ヒト唾液検体

本解析に用いた検体は、実験者本人のものまたは書面によるインフォームド・コンセントを受け同意を得た武庫川女子大学薬学部学生 54 名より提供を受けたものを解析に使用した。また、本研究プロトコルは武庫川女子大学倫理委員会にて承認されたものである(認証番号: No.21-38)。上記サンプルには ID 番号を付し、この後の実験解析では個人情報とリンクしない配慮をした。

2. 材料及び機器

唾液サンプリングに用いた水溶紙(60MDP, 日本製紙パピリア社製)はサンオーク株式会社より、フレーム密閉スライドチャンバー (SLF0601)は Bio-Rad Laboratories 社より、口腔ケア用マウスポンジ(小さめサイズ)はオオサキメディカル株式会社より、それぞれ購入した。

PCR プロセスで使用した生検パンチ(BPP-40F, BPP-20F)は斐工業株式会社より、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (QPS-101)、50 × ROX reference dye 及び 20 × KOD FX NEO Buffer は東洋紡株式会社より、TaqMan SNP Genotyping Assays キット (ADH1B; C_2688467_20, ALDH2; C_11703892_10)は Applied Biosystems 社より購入した。制限酵素 Hph I は New England Biolabs Japan 社より購入した。アガロース X、OneSTEP Ladder 50 (0.05-2 kbp)及び Gene Ladder 100 (0.1-2 kbp) は株式会社ニッポンジーンより購入した。EZ-Vision BPB は AMRESCO より購入した。

装置は QuantStudioTM12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)、9700 PCR GeneAmp PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)及び紫外線トランスイルミネーター (Bio-Rad Laboratories 社)を使用した。

3. ウイルス不活化処理

本解析では、被験者及び検体を輸送する際に接触する可能性がある者全ての安全を確保するため、エンベロープウイルスに対する不活化処理として、文献情報を参照し⁷⁻⁹⁾、① 80% 以上のエタノールを唾液を塗布した水溶紙に適量滴下し十分な換気下で自然乾燥させる方法及び②唾液を塗布した水溶紙を 500W で 3 分間電子レンジ加熱による二つの不活化法を検証した。さらにサンプリングキット到着後の実験者の安全確保のため、③ポリ袋に封入したサンプリングキットを 95°C で 10 分間煮沸したものを解析に使用した。

4. TaqMan Probe 法による遺伝子多型解析

唾液を塗布した水溶紙サンプルを生検パンチで 4mm サイズに切り取り、紙片を滅菌水 100 μ L に懸濁し、95°C で 5 分間加熱して、抽出した DNA を用いて、TaqMan プローブを用いた SNP タイピングを以下の条件により実施した。反応液の組成及び反応条件は東洋紡社及び Thermo Fisher Scientific 社の使用説明書に準じ、SNP タイピングは以下の条件で実施した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix 5 μ L、50 × ROX reference dye 0.2 μ L、20 × ADH1B TaqMan Probe & ADH1B Primer Mix (C_2688467_20)を 0.5 μ L、乾燥唾液サンプル加熱処理液 5.0 μ L、合計 10.7 μ L の反応溶液とした。反応条件は Denaturation 95 °C 1min、Annealing 95 °C 15sec、Extension 60°C 1min を 40 サイクルにて実施した。なお、本解析に用いた検体については、実証実験用に当研究室で保管しているサンプルを使用した。

5. PCR-RFLP 法による遺伝子多型解析

新規サンプリングキットの有用性を実証するため、本学の健康な女子学生 54 名の唾液検体を用いて、当研究室において解析法が確立している月経痛関連遺伝子 Interleukin 1 alpha (IL1A) rs80111889 の多型解析を行なった。本解析では、水溶紙を生検パンチで 2 mm の紙片にして、PCR 反応試薬に直接懸濁して反応を行った。PCR 反応試薬は、20 × KOD FX NEO Buffer 9.75 μ L、デオキシヌクレオチド三リン

酸(dNTPs) 1.95 μ L、10 μ L プライマーをそれぞれ 0.78 μ L、滅菌水 6.35 μ L、KOD FX NEO 0.3 μ L、合計 20 μ L の反応溶液とした。反応条件は Denaturation 98 °C 10sec、Annealing 55°C 20sec、Extension 68 °C 30sec を 40 サイクルにて実施した。その後制限酵素反応液として滅菌水 7.5 μ L、10 \times Cuts Smart buffer 2 μ L、遺伝子多型を判定するために Hph I 0.5 μ L を混ぜて全量 10 μ L で調整し、PCR 産物 10 μ L を加え、37°C で 1 時間加温した。その後、消化産物 10 μ L を EZ-Vision BPB 1 μ L および 60% グリセロール 1 μ L と混合し、4% (w/v) のアガロース X ゲルにより 100V で約 30 分間の電気泳動を行った。泳動バッファーは 1 \times TAE バッファーを使用した。泳動後のゲルは、直接、紫外線トランスイルミネーター上で観察した。本解析で使用したプライマーの情報は以下の通りである。IL1A (rs80111889) Forward primer : 5'-CACCCATTGTTTCTCCCTCT-3', Reverse primer : 5'-ACAGGGGGCTCTGACCTTAT-3'

結果

1. ウイルス不活化処理が DNA 増幅に及ぼす影響の検証

安全で簡便な新規サンプリング手法を開発するためには、まずは一般家庭を想定した設備においても個人で病原ウイルスを一定程度不活化でき、ゲノム情報が検出可能な簡便な手法を確立させることが必要である。そこで、各種ウイルス不活化処理が DNA 増幅に及ぼす影響を検証することを目的とし、当研究室において TaqMan Probe 法による解析系が確立しているアルコール関連遺伝子である ADH1B (alcohol dehydrogenase-1B) を対象とした遺伝子多型解析を行なった(図 1)。本研究では、従来型サンプリングキットを用いて電子レンジで加温する不活化法(電子レンジ法)とエタノール塗布による不活化法(エタノール法)の二つを検証した。その結果、電子レンジ法及びエタノール法のどちらにおいても十分な遺伝子増幅が確認でき、その過程においても異常はみられず、TaqMan Probe 法による SNP タイピングに必要な十分な結果を得ることができた。また、本検討で得られた ADH1B 多型の結果は、従来法を用いた多型解析の結果と一致している。

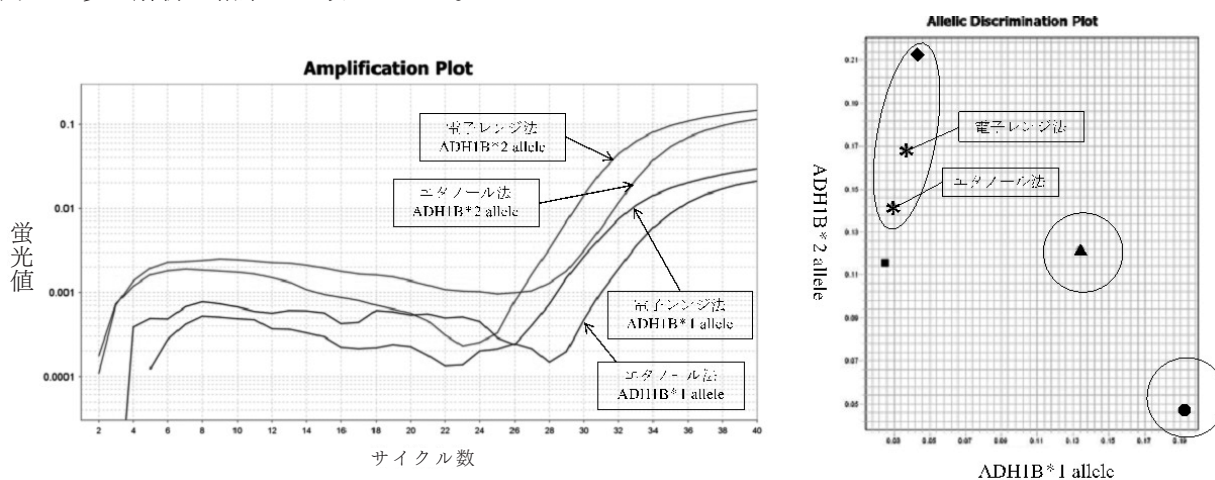


図 1. 電子レンジ加熱および自然乾燥による DNA 増幅への影響

ADH1B 遺伝子(rs1229984)電子レンジ法とエタノール法それぞれの DNA 増幅曲線(左)とその多型解析結果(右)。ADH1B 遺伝子(rs1229984)◆*2/*2; ▲*1/*2; ●*1/*1 ポジティブコントロール, ■NTC.

2. 従来型サンプリングキットの問題点解決のためのデザイン検討

本研究で検討した電子レンジ加熱及びエタノールを用いた不活化処理では、病原菌を完全には不活化しきれない可能性があるため、このままではサンプリングキットを輸送する際に、病原菌の拡散の原因となる可能性がある。そこで、唾液塗布部分の露出を改善するため、水溶紙に唾液を塗布後、被験者自らが簡単に唾液塗布部分を密閉できる素材と密閉手順を検討した。そこで、ハイブリダイゼーションで 사용되는密閉性と耐熱性を兼ね備えたフレーム密閉スライドチャンバーを採用し、最終的に図 2 に示すようなサンプリングキットを作製した。唾液を塗布した水溶紙を電子レンジ加熱及びエタノールを用

いた不活化処理をした後、透明フィルムで密封し、ポリ袋にサンプリングキットを封入することで輸送時の感染リスクを下げることに成功した。また、新型コロナウイルスは、75°Cで3分間加熱することで不活化されると報告されている⁷⁻⁹⁾。新型コロナウイルスのみならずインフルエンザウイルスなどエンベロープを有するウイルスにも有効であるとされているため、実験室へ輸送されたサンプリングキットは、ポリ袋に入れたままの検体を煮沸することで、残存したエンベロープウイルスを再度不活化することができ、実験者の安全を確保することが可能となった。

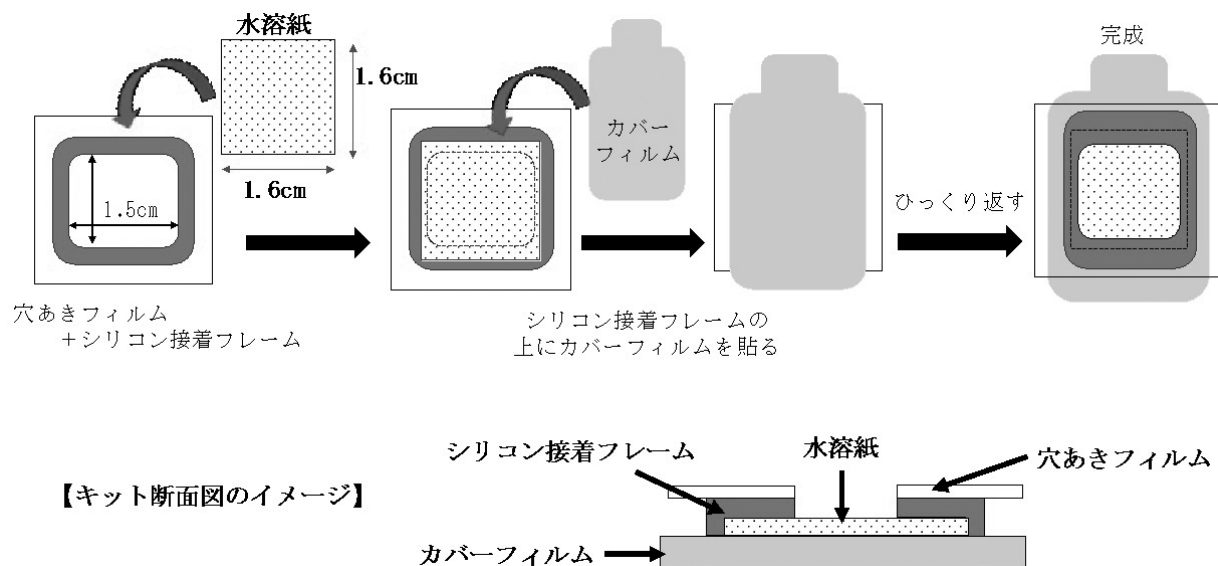


図2. サンプリングキットの作製手順とキットの断面図イメージ

サンプリングキットの作製手順(左)サンプリングキットの断面図のイメージ(右)

⇒一番下からカバーフィルム、シリコン接着フレーム、水溶紙、透明フィルムの順で重なっている。

3. 従来のサンプリング手法と新規サンプリング手法との DNA 増幅効率の比較検討

新規サンプリング手法の有用性を検証するため、TaqMan Probe 法を用いて、ウイルス不活化操作を行わない従来型サンプリングキットを用いる手法と、本検討で新たに作製したサンプリングキットを用いて電子レンジによる不活化操作を行う新規サンプリング手法において、双方の DNA 増幅効率を比較検討した(図3)。その結果、従来型サンプリング手法及び新規サンプリング手法のどちらにおいても十分な遺伝子増幅が確認でき、その過程においても異常はみられず、TaqMan Probe 法による SNP タイピングに必要な十分な結果を得ることができた。

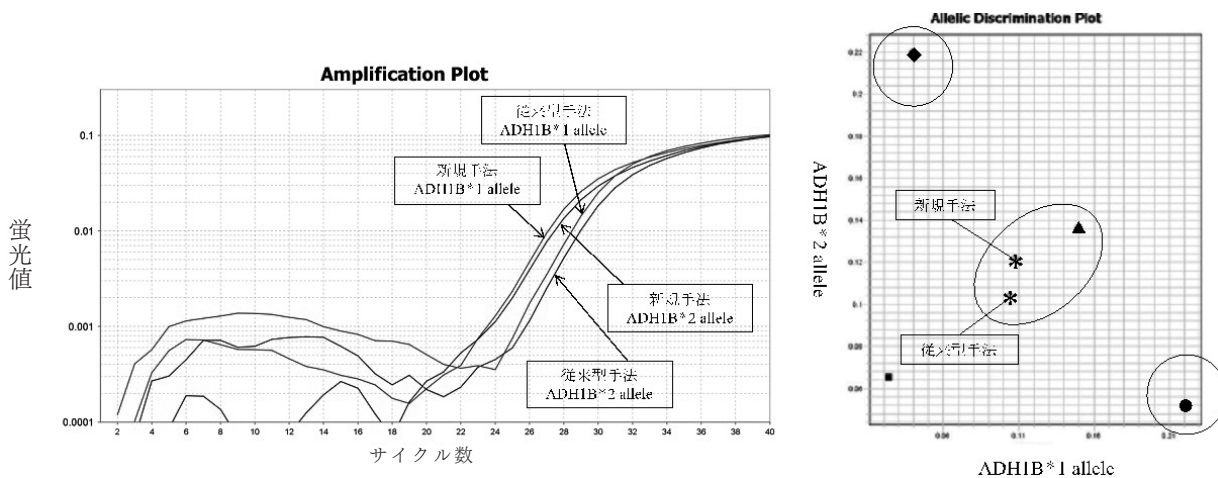


図3. 従来型サンプリング手法と新規サンプリング手法における DNA 増幅効率の比較

従来型サンプリング手法と新規サンプリング手法それぞれの DNA 増幅曲線(左)とその多型解析結果(右) ADH1B 遺伝子(rs1229984) ◆ *2/*2; ▲ *1/*2; ● *1/*1 ポジティブコントロール, ■ NTC.

また、当研究室では一度に多数のサンプルを扱うため、比較的方法が簡便でかつ正確性の高い遺伝子解析手法として PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism：制限酵素切断片長多型)法を採用している。そこで、本学の健康な女子学生 54 名の唾液検体を用いて、当研究室において PCR-RFLP 法による解析法が確立している月経痛関連遺伝子 Interleukin 1 alpha (IL1A) rs80111889 の多型解析を行った(図 4)。その結果、制限酵素処理を行うにあたり十分な量の増幅産物が確認でき、制限酵素処理後の消化産物も予測された位置に確認した。これにより、ホモ接合型である GG 型、TT 型、ヘテロ接合型である GT 型の 3 種類が観察され、それぞれの多型(GG 型、TT 型、GT 型)の判別が可能であることが確認できた。

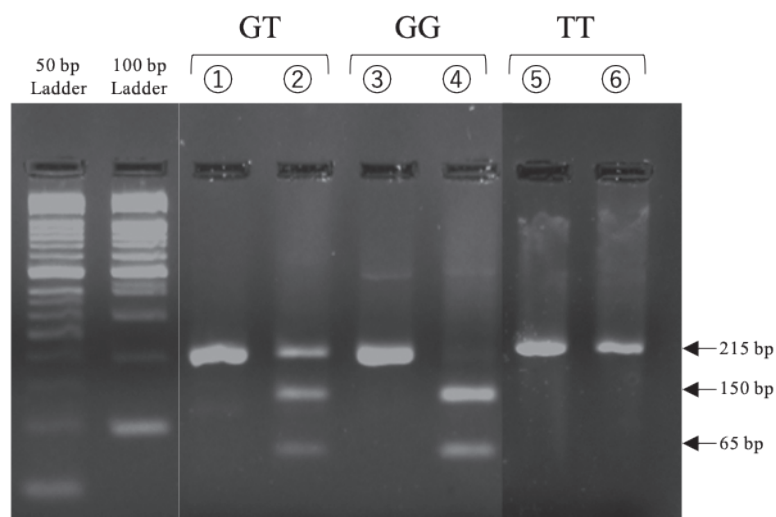


図 4. 新規サンプリング手法を用いた遺伝子多型解析の結果

IL1A (rs80111889)多型解析。PCR 産物：①③⑤、制限酵素処理後の消化産物：② GT 型(215 bp、150 bp 及び 65 bp)、④ GG 型(150 bp 及び 65 bp)、⑥ TT 型(215 bp)

考 察

従来のサンプリング手法における問題点を解決した新規サンプリング手法を開発することを目的として、まず我々は、唾液からのウイルス感染を防ぎ、唾液を完全乾燥させ、効率よく DNA を増幅させるための様々なウイルス不活化法を検討した。その結果、電子レンジ法及びエタノール法のどちらにおいても十分な遺伝子増幅が確認でき、その過程においても異常はみられず、TaqMan PCR 解析に必要な十分な結果を得ることができた(図 1)。しかしながら、エタノール法においては、唾液塗布部分の自然乾燥に多大な手間と時間がかかるとともに、乾燥時の感染リスクが懸念される。さらに、個人宅で採取する際の同居人への感染リスクもある。また、唾液塗布部分が露出された状態での乾燥を必要とするため、唾液塗布部分に不純物が混入してしまう恐れも考えられる。以上のことから、エタノールを用いた自然乾燥によるウイルス不活化方法は、遺伝子解析には問題は無いが、解析前の処理におけるリスクが多い。そのため、我々は、被験者自ら行うウイルス不活化処理の方法として、電子レンジ法を採用するのが適切であると考えた。電子レンジは 500 W で 3 分間加熱することで、ウイルスの不活化かつ唾液の乾燥が可能となる。つまり、電子レンジ法を用いることで短時間での唾液からのウイルス不活化かつ乾燥が可能となる。ただし、家庭によっては、家庭用電子レンジを用いることに抵抗を感じる場合もある。その場合には、エタノール法を用いて不活化処理をすることが可能である。

次に、従来のサンプリングキットの構造上、感染拡大の原因となる唾液塗布部分の露出を改善するため、水溶紙に唾液を塗布後、被験者自らが簡単に唾液塗布部分を密閉できる素材と密閉手順を検討した。本研究では、ハイブリダイゼーションに用いられる高い密閉性と耐熱性を兼ね備えたフレーム密閉スライドチャンバーを採用し、従来使用していたサンプリングキットに付属している水溶紙をフレーム密閉スライドチャンバーのシール用シリコン接着フレームに張り合わせて使用することにより、ウイルス不

活化ならびに乾燥の際に、加熱により変形することなく、高い密閉性を維持することに成功した(図2)。しかし、ここで水溶紙をシリコン接着フレームより大きくした場合、カバーフィルムでラミネートする際に、シリコン接着フレームによる密閉性が低下する恐れがあるので、キット作製時には注意が必要である。

また、新型コロナウイルスの感染が収束していない現在、本学では実際に新型コロナウイルスを用いた不活化検証を行うことができなかった。この点に関しては、サンプリングが完了したサンプルをポリ袋に入れて密封することで安全性を確保することとした。また、安全性を確保するために、サンプルを受け取った後、再度ポリ袋ごと95°Cで10分間煮沸し、ウイルスを不活化した後、実験に供与した。

最後に、新規サンプリングキットの有用性を実証するため、TaqMan Probe 法及び PCR-RFLP 法を用いた遺伝子多型解析を行った(図3, 4)。TaqMan Probe 法においては、従来型サンプリング手法及び新規サンプリング手法のどちらにおいても十分な遺伝子増幅が確認でき、その過程においても異常はみられず、TaqMan PCR 解析に必要な結果を得ることができ、PCR-RFLP 法においても、制限酵素処理を行うにあたり十分な量の増幅産物と、制限酵素処理後の消化産物も予測された位置に確認できた。

以上のことから、新規サンプリングキットの有用性が実証できたと考える。本研究で確立した新規サンプリング手法のスキームは図5に示した通りである。また、このサンプリング手法は、サンプリング後一週間経過したサンプルでも解析可能である。

[被験者による操作]

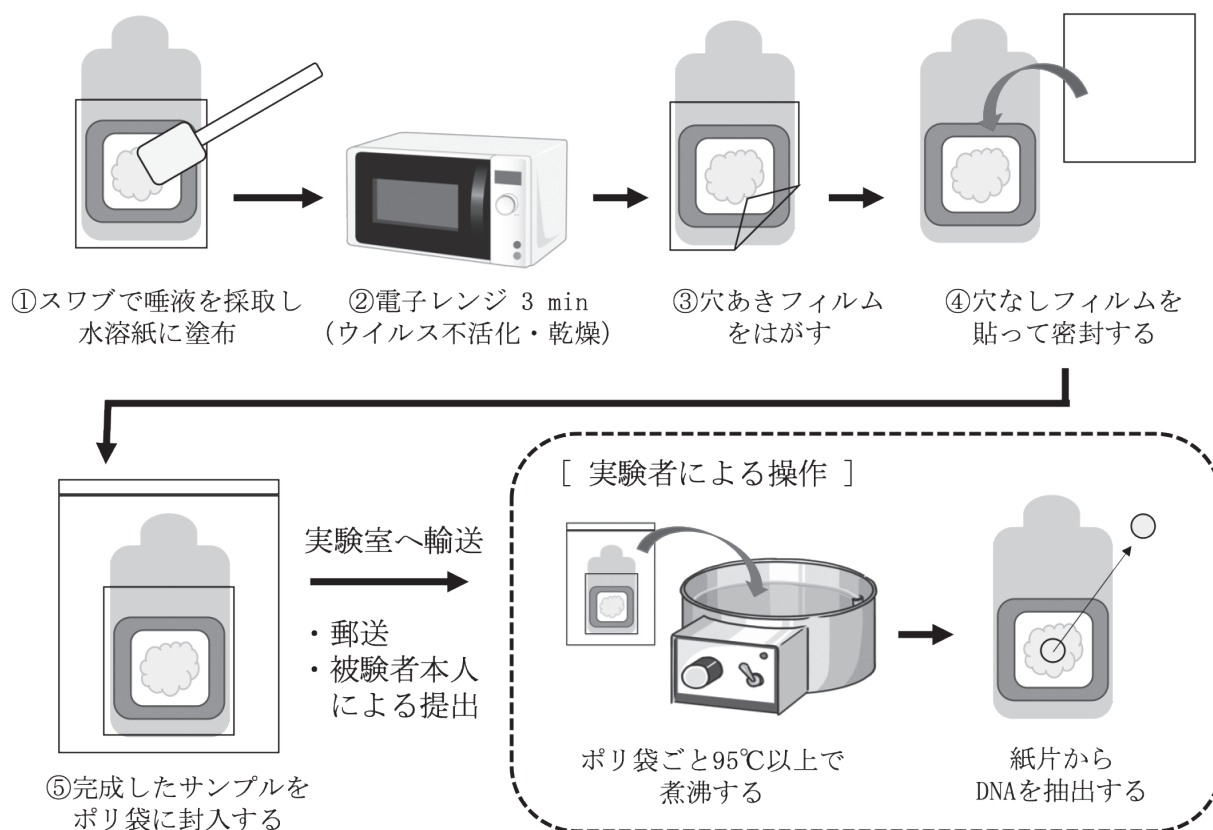


図5. 安全性を担保した遺伝子解析唾液サンプリング手法

各操作は本文参照。

総括

当研究室ではこれまで、様々な遺伝子を対象とした遺伝子解析研究を実施してきた。遺伝子解析研究において解析集団の1%程度の変異率を有意に議論できるデータを収集するためには1000人のサンプル

ルという膨大なサンプル数が必要であるため、従来型の唾液サンプリングキットは、効率的に輸送中にサンプルを乾燥できるような簡素な設計になっていた。そのため、サンプリング時や輸送時、また遺伝子検査の際に、感染拡大のリスクが他人へ広がる可能性が懸念された。本研究では、他の被験者及びその周囲の人間への感染リスクを排除するため、①一般家庭を想定した設備においても個人で病原体を既報⁷⁻⁹⁾に準じて一定程度不活化でき、特定のゲノム情報が検出可能 DNA を残存していること、②サンプル輸送中に輸送者及び周囲の人間への感染リスクを抑えるためにサンプルを完全密閉でき、③実験者の安全確保のため、検査前に完全にウイルスを不活化できる、以上の3点を兼ね備えた新たな手法を開発することができた。

なお、本研究では新型コロナウイルスやインフルエンザなどのエンベロープを有するウイルスに適用できるが、エンベロープを有さないウイルスに関しては別途検討する必要がある。

利益相反：発表内容に関連し、開示すべき利益相反はない。

謝 辞

本研究については武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学研究室の前助手である競 和佳さんより多大な協力を得ましたのでここに深謝を致します。

文 献

- 1) M. Kiso, et al. Unique Genotyping Protocol of CYP2D6 Allele Frequency using Real Time Quantitative PCR from Japanese Healthy Women. *Biol. Pharm. Bull.* 2020; 43, 904-907.
- 2) T. Ota, et al. Combination Analysis in Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 in the Japanese Population, *Int. J. Medical Sci.* 2015; 12, 78-82.
- 3) 競和佳, その他. 唾液中カフェイン薬物動態に薬物代謝酵素 CYP1A2 遺伝子多型が及ぼす影響に関する研究. *武庫川女子大紀要*. 2017; 65, 1-5.
- 4) 林田真梨子, その他. 女子大学生におけるエタノールパッチテストの反応性と ALDH2 および ADH1B 遺伝子多型との関連. *日本衛生学会誌*. 2015; 70 巻 2 号.
- 5) 村田成範, 林田真梨子, 石黒裕子. 乾燥唾液を用いたアルコール代謝関連遺伝子 ADH1B および ALDH2 の SNP タイピング解析法の検証実験と妥当性確認. *日本臨床検査医学会誌*. 2015; 63 (11): 1253-1258.
- 6) 今井美穂, その他. 新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2019; 139: 1111-1119.
- 7) M.R. Sanborn, S. K. Wan, and R. Bulard, Microwave Sterilization of Plastic Tissue Culture Vessels for Reuse. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1982; 44, 960-964.
- 8) A. Siddharta, et al. Inactivation of HCV and HIV by microwave: a novel approach for prevention of virus transmission among people who inject drugs. *Sci. Rep.* 2016; 6, 36619.
- 9) J.P. Abraham, et al. Using heat to kill SARS-CoV-2. *Rev. Med. Virol.* 2020; 30 (5), e2115.

受理日 2023 年 11 月 27 日