

磁性ビーズ式自動核酸抽出装置の性能評価

香川県東部家畜保健衛生所

○中嶋亜威、上村圭一

はじめに

当所では、核酸抽出方法としてスピнкаラム式抽出法（以下、カラム法）と簡易抽出法（以下、簡易法）を使用してきた。令和7年度、抽出作業の省力化のため、磁性ビーズ式自動核酸抽出装置（以下、ビーズ法）を導入した。PCR 検査では、核酸抽出が時間を要する。さらに、検体の種類、抽出試薬及び PCR 試薬の組み合わせが結果に影響し、これらの組み合わせで偽陰性となった報告もある。よって、本調査では、ビーズ法を従来法と比較し性能を評価した。

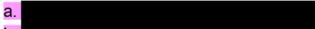
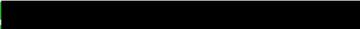
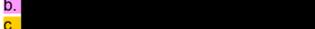
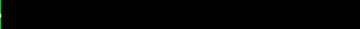
材料と方法

鳥インフルエンザウイルス（以下、AIV）、豚熱ウイルス（以下、CSFV）、牛伝染性リンパ腫ウイルス（以下、BLV）及び牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）を対象とし、検体は野外材料に近づけるため、生のサンプルを使用できなかったウイルスは、陽性検体を正常サンプルにスパイクした（表 1）。抽出試薬と PCR 試薬は図の組み合わせで使用した。以下、簡易法をピンク、ビーズ法を黄色、カラム法を緑で示す。

表 1

材料と方法			
検査対象	検体	抽出試薬	PCR試薬
鳥インフルエンザウイルス (AIV)	精度管理検体を鶏気管スワブにスパイク	a c e	①,②,③
豚熱ウイルス (CSFV)	精度管理検体を豚10%脾臓乳剤上清にスパイク	b c f	④
牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV)	BLV陽性EDTA血液	d g	⑤
牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)	ウイルス培養上清を牛血清にスパイク	c e	②

抽出試薬

a.		e.	
b.		f.	
c.		g.	
d.			

PCR試薬

- ① TaKaRa, AIV RT-qPCR Mix & Primer/Probe (H5/H7eu/M) (AIV 新マルチqPCR)
- ② Applied Biosystems, AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (AIV IDqPCR)
- ③ TaKaRa, PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit
- ④ TaKaRa, CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (with ROX Reference Dye) Ver.2
- ⑤ TaKaRa, Ex Premier DNA Polymerase Dye plus

抽出法の違いによる感度差を、遺伝子量の差として直感的に把握しやすくするため、本調査独自の指標として相対抽出効率を定義した（表 2）。PCR 検査の結

果として示される Ct 値は対数 (log) の値であるため、数値上のわずかな差が実際の遺伝子量では大きな差となる。そこで、従来のカラム法を基準「1」とし、各抽出法で得られた Ct 値の差を 2 のべき乗「 2^{4Ct} 」で換算することで、実運用上の感度差が何倍に相当するかを可視化した。

表 2

抽出効率の計算方法					
◆ 相対抽出効率 (≒実運用上の感度差)					
相対抽出効率 = $2^{(Ct_{\text{カラム法}} - Ct_{\text{Method}})}$					
カラム法を基準=1、手順書どおりの検体量を使用					
例)	希釈倍率	Target	抽出法	Ct	相対抽出効率
	× 10	A	簡易法	26.9	0.5
			ビーズ法	24.6	2.4
			カラム法	25.8	1
Ctが低い→遺伝子量が多い					

結果

AIV のリアルタイム PCR (以下、qPCR) について、令和 6 年に新たに発売された AIV 新マルチ qPCR キットの結果を示す (表 3)。10 倍及び 100 倍希釈を試験し、ターゲットは鳥インフルエンザの A 型と H5 亜型である。希釈倍率及びターゲットにかかわらず、感度は簡易法<カラム法<ビーズ法の順で高くなり、ビーズ法はカラム法より、1.3~2.4 倍の遺伝子量が抽出された。

表 3

結果 : AIV TaKaRa 新マルチqPCR				
希釈倍率	Target	抽出法	Ct	相対抽出効率
× 10	A	簡易法	26.9	0.5
		ビーズ法	24.6	2.4
		カラム法	25.8	1
	H5	簡易法	27.8	0.5
		ビーズ法	26.4	1.3
		カラム法	26.8	1
× 100	A	簡易法	30.2	0.4
		ビーズ法	28.2	1.8
		カラム法	29.0	1
	H5	簡易法	31.4	0.6
		ビーズ法	29.5	2.2
		カラム法	30.7	1
感度は : 簡易法 < カラム法 < ビーズ法				

次に、AIV 旧 qPCR 試薬の結果を示す（表 4）。これは主に出荷のための検査や再開検査に使用している試薬である。10 倍及び 100 倍希釈を試験した。希釈倍率・ターゲットにかかわらず、ビーズ法の感度が 1.8～4.7 倍高くなった。両法とも希釈しても理論上の Ct 上昇（+3.3）と同等だったため、抽出効率の低下や PCR 阻害は少ないと考えられた。

表 4

結果：AIV 旧qPCR（出荷・再開検査）

希釈倍率	Target	抽出法	Ct	相対抽出効率	×10からの Ctの上昇
×10	A	ビーズ法	23.4	2.3	
		カラム法	24.6	1	
	H5	ビーズ法	25.1	4.7	
		カラム法	27.3	1	
×100	A	ビーズ法	26.9	1.8	3.5
		カラム法	27.7	1	3.1
	H5	ビーズ法	28.4	4.6	3.3
		カラム法	30.6	1	3.3

感度：カラム法<ビーズ法
10倍希釈により、理論上のCt上昇（+3.3）と同等

次に、AIV のコンベンショナル PCR（以下、cPCR）の結果を示す（図 1）。図左が A 型で右が H5 亜型である。隣り合った well の左が 100 倍希釈で右が 10 倍希釈である。増幅の強さは簡易法がやや薄く、カラム法とビーズ法は同等となった。簡易法は非特異増幅が多く確認された。

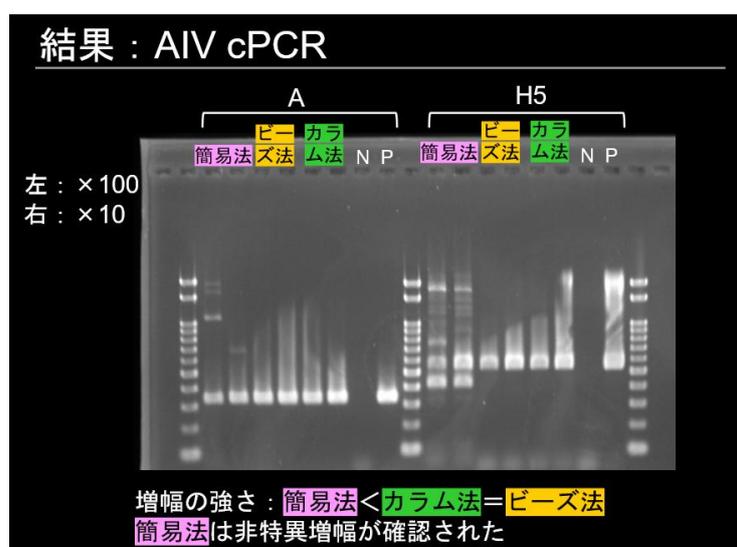


図 1

令和 7 年度、県内で高病原性鳥インフルエンザが発生し、発生農場検査はビーズ法を使用した。すべての検体で qPCR、cPCR とともに問題なく検出された (図 2)。

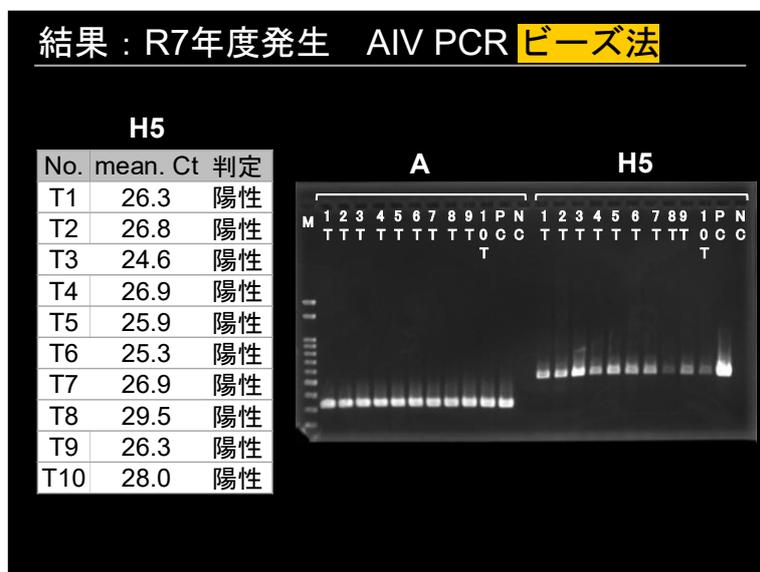


図 2

次に CSFV の qPCR 結果を示す (表 5)。精度管理検体を豚脾臓乳剤上清にスパイクしたため、本試験で最も不純物の多い検体と言える。原液、20 倍及び 100 倍希釈で試験した。原液検体の感度は簡易法<ビーズ法<カラム法の順に高くなったのに対し、希釈検体の感度はカラム法<簡易法<ビーズ法となった。簡易法がカラム法を上回るというのは注目すべき結果である。20 倍希釈の理論値 Ct 上昇+4.3、100 倍希釈+6.6 であるが、カラム法が大きく外れたため、抽出効率の低下や PCR 阻害があったと考えられた。

表 5

結果 : CSFV qPCR

検体 : 精度管理検体を豚10%脾臓乳剤上清にスパイク
→本調査で最も不純物の多い検体

希釈倍率	抽出法	Ct	相対抽出効率	×1からの Ctの上昇	理論上の Ct上昇
× 1	簡易法	29.2	0.08		
	ビーズ法	26.8	0.4		
	カラム法	25.5	1		
× 20	簡易法	35.0	2.6	5.9	4.3
	ビーズ法	32.6	13.9	5.8	
	カラム法	36.4	1	10.9	
× 100	簡易法	36.2	1.7	7.0	6.6
	ビーズ法	34.4	5.8	7.7	
	カラム法	37.0	1	11.5	

原液検体の感度 : 簡易法 < ビーズ法 < カラム法
希釈検体の感度 : カラム法 < 簡易法 < ビーズ法

CSFV の試験について、カラム法の感度低下の原因を明らかにするために、抽出後の RNA を希釈した (表 6)。RNA の希釈は水で行ったため、脾臓成分が薄くなり、PCR 阻害が原因だとすれば Ct が改善されると推測した。両法で RNA を 2 倍希釈で理論上と同等の Ct となり、5 倍希釈で Ct が改善されなかったため、PCR 阻害は少なく、カラム法の感度低下は検体が低コピーになったことによる回収ロス、つまり単純にウイルスが少ないと取り逃しが大きくなること、または臓器由来の不純物による抽出阻害が原因と推察した。

表 6

結果 : CSFV qPCR 感度低下の原因調査

RNAを希釈すると脾臓成分が薄くなる
→Ctが改善されるならPCR阻害がある

希釈倍率	抽出方法	Ct	×1からの Ctの上昇	理論上の Ct上昇
RNAを×1	ビーズ法	32.0		
	カラム法	34.8		
RNAを×2希釈	ビーズ法	32.9	0.9	1.0
	カラム法	35.5	0.8	
RNAを×5希釈	ビーズ法	34.6	2.6	2.3
	カラム法	37.6	2.8	

脾臓成分によるPCR阻害は少ない。
カラム法の感度低下は、低コピーの回収ロスまたは不純物による抽出阻害が原因と推察

次に BLV プロウイルス DNA を検出する nested PCR の結果を示す (図 5)。ビーズ法の全血用キットは、全血を 50-500 μ L 加えることになっているため、300、400 及び 500 μ L で比較した。左がビーズ法で右がカラム法である。①と②は超低コピー牛で③が陽性牛、④が陰性牛である。両法ともに超低コピー牛と陽性牛を検出でき、陰性牛は不検出となった (③陽性牛のカラム法は別日に PCR したため画像なし)。ビーズ法は検体投入量で増幅に違いは見られなかった。

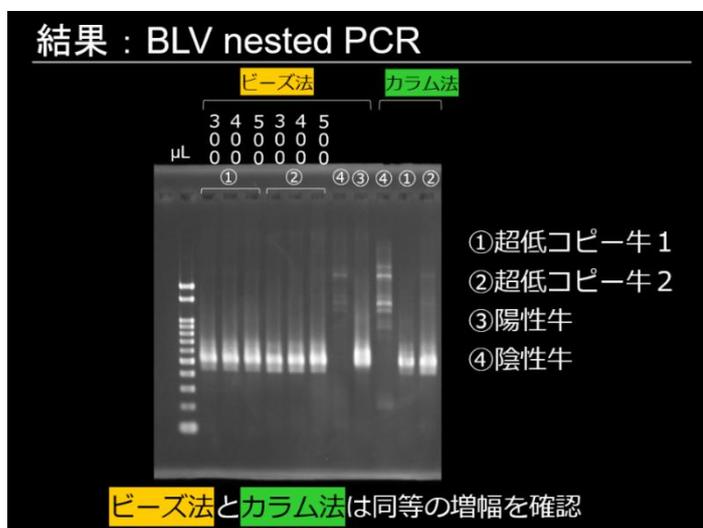


図 5

最後に BVDV を正常な牛血清で 10 倍階段希釈した qPCR 結果を示す (表 7)。感度はビーズ法が高くなり、カラム法より 5.3~20.2 倍高かった。カラム法は理論上の Ct 上昇より高くなったため、やはり低コピーの回収ロスが考えられた。

表 7

結果：BVDV qPCR

希釈倍率	抽出方法	Ct	相対抽出効率	×1からの Ctの上昇	理論上の Ctの上昇
× 10 ¹	ビーズ法	23.6	5.3		
	カラム法	26.0	1		
× 10 ²	ビーズ法	27.0	10.4	3.3	3.3
	カラム法	30.4	1	4.3	
× 10 ³	ビーズ法	30.4	14.6	6.7	6.6
	カラム法	34.2	1	8.2	
× 10 ⁴	ビーズ法	33.7	20.2	10.1	10.0
	カラム法	38.1	1	12.0	

感度：カラム法 < ビーズ法
 ビーズ法は5~20倍感度が高い。
 カラム法は理論上よりCtの上昇が高い
 →低コピーの回収ロス

各抽出法の抽出時間について、AIV の RNA 抽出を例に、準備時間と抽出時間の合計と、うち手作業が占める時間を比較した (表 8)。簡易法は最も速いが、使用目的に限られるため参考に示す。合計時間はカラム法、ビーズ法ともに 60 分と変わらないが、手作業が占める時間はおよそ 75%削減された。また、ピペット操作やチューブ開閉が 60 回から 20 回へ減少したことで、コンタミネーションのリスクも減少した。

表 8

結果：抽出時間

例) AIVのRNA抽出

抽出法	準備	抽出		合計	手作業時間
簡易法	5分	10分		15分	10分
ビーズ法	5分	前処理 20分	抽出 35分	60分	15分
カラム法	10分	50分		60分	60分

ビーズ法で抽出作業時間は、およそ75%削減
 ピペット操作・チューブ開閉：10羽×6回→10羽×2回
 →コンタミネーションリスクも減少

まとめと考察

全ての検査対象でビーズ法はカラム法と同等以上の感度を示した。

簡易法は、検体使用量が少ないが CSFV ではカラム法を上回り、AIV では下回った。洗浄しないため回収ロスが少ないのが影響していると考えられた。

ビーズ法は、高希釈でも高い検出感度を示し、臓器成分存在下でも、感度を維持した。ビーズ表面積が大きく、微量核酸も効率よく回収されたと考えられた。

カラム法は、原液では抽出効率が高いが、高希釈または臓器成分により感度低下した。シリカ膜への吸着効率の低下や、低濃度域における不可逆的な結合による回収率の減少が生じたと考えられた。