

SARS-CoV-2および異なる呼吸器系病原体の同時検出用Twist呼吸器系ウイルスコントロールの有用性

はじめに

新しいウイルス感染症には、検出・測定用のアッセイ開発に迅速な対応が求められます。これは新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックには特に当てはまります。研究者は定量PCR（qPCR）や次世代シーケンス（NGS）など、SARS-CoV-2ウイルスのゲノム検出のための迅速検査法を開発することで対応しました。

SARS-CoV-2による症状は、呼吸器疾患を引き起こすその他のさまざまなウイルス性病原体によるものと似ています。インフルエンザの流行する季節が近づき、1回の検査で複数の病原体を検出できる検査法を開発する動きがあります。これにより、さまざまな種類の病原体について一つずつ除外していくような時間のかかる体系的な検査なしに、迅速な病原体の特定が可能になります。

マルチプレックスアッセイ（1回の検査で複数の病原体を検出するアッセイ）では、より多くの異なるウイルスコントロールを含むセットが必要となります。このテクニカルノートでは、Twist Respiratory Virus Research Panelのポジティブコントロールとしての、さまざまなTwist呼吸器系ウイルスコントロールの適合性をご紹介します。また、それらの同じウイルスコントロールがSARS-CoV-2のルーチン検査用の有用なネガティブコントロールとして機能することもご紹介します。

結果

Twist Respiratory Virus Research Panel（品番：103066、103067、103068）のポジティブコントロールとしてのTwist呼吸器系ウイルスコントロールの適合性を判定するために、NGSターゲットエンリッチメント用ライブラリを調製しました。ライブラリは50 ngのヒト参照RNAに当該ウイルスコントロール100万コピーを加えて調製されました。Twist Standard hybridization kit（品番：101279、101025、101026）を用いた16時間のハイブリダイゼーションによってキャプチャを行いました。

100万コピーでのウイルスコントロールのキャプチャは優れたカバレッジ、濃縮、均一性を示しました。すべてのウイルステンプレートは、入力画分の2500倍以上に濃縮され、塩基の99.9%以上が1x以上のカバレッジでカバーされました（図1）。キャプチャ後は、インフルエンザなど断片化されたウイルスであっても、ウイルスゲノム全体でカバレッジは比較的均一でした。この均一なカバレッジはキャプチャ効率によるものですが、当該ウイルスコントロールの合成および製造における卓越性も反映しています。図2は、塩基の99.9%が少なくとも20xカバレッジでキャプチャされ、読み取った配列の95%以上が期待通りの参照アレル（参照対立遺伝子）を含むことを示しています。

ウイルスコントロールでは、ハイブリッドキャプチャは非常に特異的なため、コンタミネーションやクロスアラインメントはほとんど起こりません。クロスコンタミネーションやクロスアラインメントを測定するために、それぞれのTwist呼吸器系ウイルスコントロールに対してキャプチャ結果を並べました。キャプチャされたすべてのコントロールについて、パネルのキャプチャスペースに位置する読み取り配列の少なくとも99.3%がターゲットゲノムにマッピングされました（図3）。

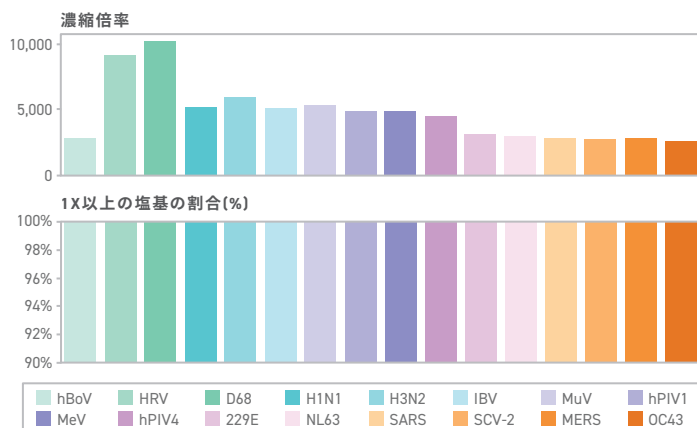


図1：ターゲットエンリッチメント後のウイルスコントロールにおける濃縮倍率と1xカバレッジのゲノムの割合。各ウイルスの完全な名称は表1に記載しています。

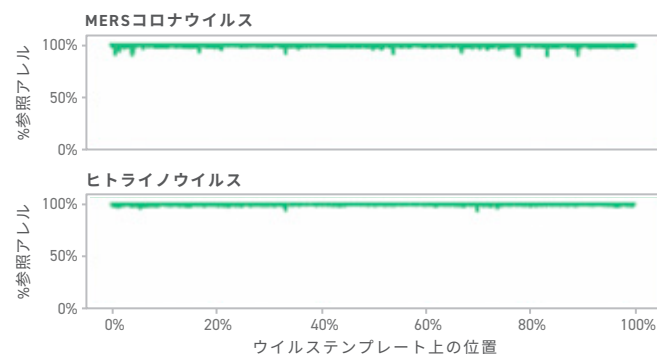


図2：MERSコロナウイルス（上）およびヒトライノウイルス（下）の合成テンプレートの全塩基における、参照アレルを含む読み取り配列の割合。

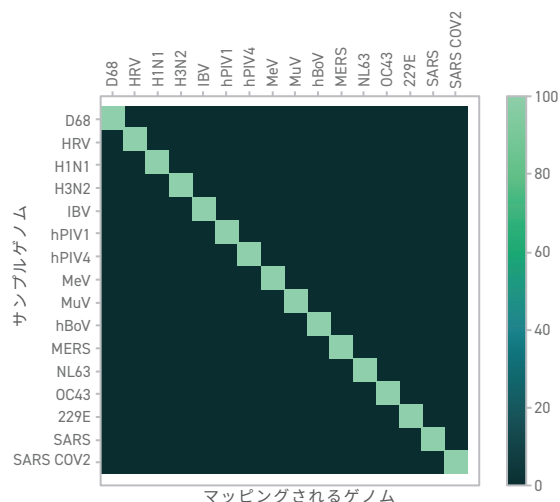
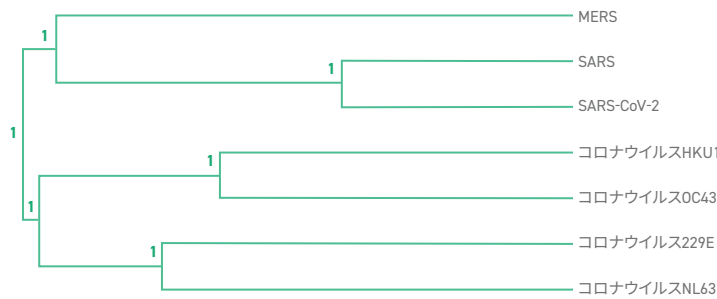


図3：濃縮パネルでカバーされる各ゲノム（列）に対してマッピングされる各濃縮サンプルからの読み取り配列（行）の割合。対角線上には読み取り配列がターゲット通りである割合が示され、対角線以外の位置にはターゲットから外れた読み取り配列の割合が示されています。各ウイルスの完全な名称は表1に記載しています。

A. 系統樹



B. SARS-CoV-2キャプチャからのカバレッジ

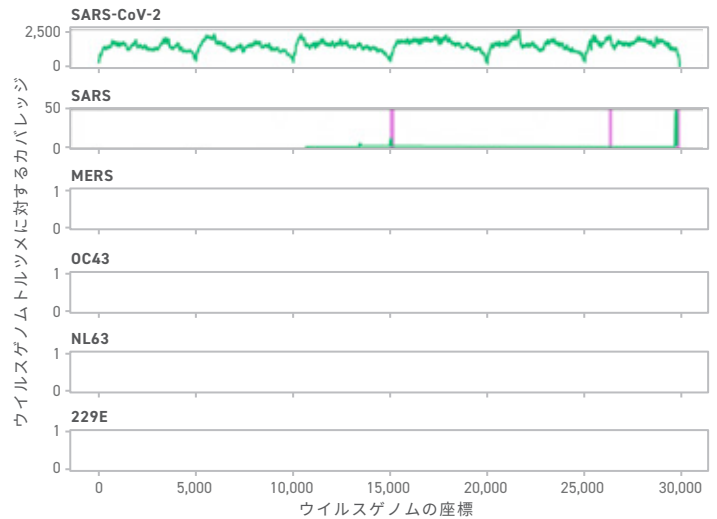


図4：A. すべてのヒト感染性コロナウイルスの参照ゲノム全体のマルチプルアライメントから作成した系統樹。B. スタンドアロートとして合成されたすべてのコロナウイルスゲノムに対するSARS-CoV-2キャプチャ実験のカバレッジ。紫色の領域は、SARS-CoV-2と特定の種の間で非常に高い相関性（97%超）を示す領域。

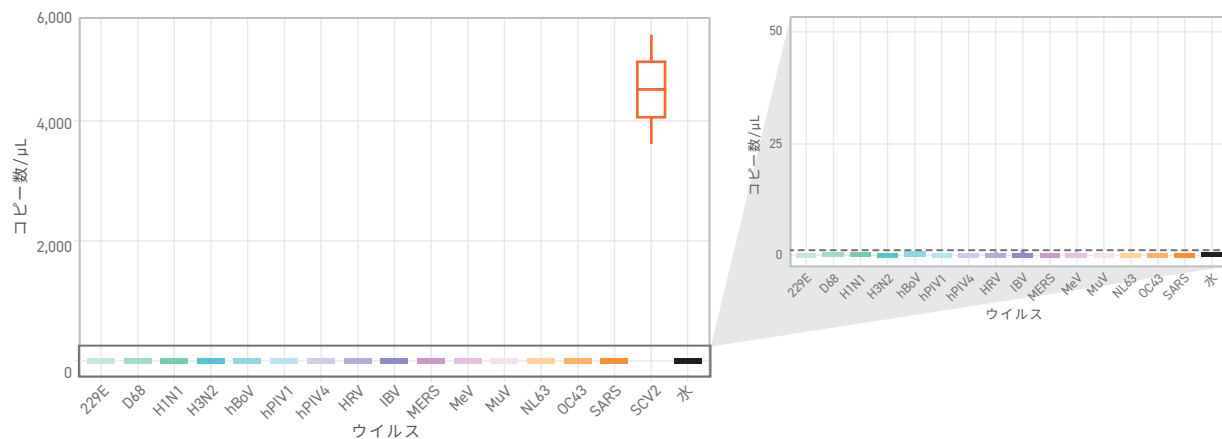


図5：Twist呼吸器系ウイルスコントロールのそれぞれについて、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用したqPCRデータを示す箱ひげ図。Twist SARS-CoV-2 RNAコントロール2をポジティブコントロールとして5,000コピーを加えました。すべてのウイルスは、テンプレートなしの水コントロールと類似の挙動を示し、μLあたり1コピー未満のSARS-CoV-2を含んでいます。各ウイルスの完全な名称は表1に記載しています。右の拡大図は、上記のRNAコントロール（0～50コピー/μL）からのqPCRデータを示しています。

SARSとSARS-CoV-2ゲノムは近縁であり、配列レベルで約80%が同一です（図4A）。これらのゲノムでは、2種類のウイルス間の相関性の高い領域で発生する相互クロスアライメントは非常に低レベル（読み取り配列の0.05%未満）でした（図4B）。読み取り配列の大半はこれら2種類のコントロール間の正しいゲノムに割り当てられましたが、SARS-CoV-2コントロールを使用する場合はSARSゲノムへのアライメント、またはSARSコントロールを使用する場合はSARS-CoV-2ゲノムへのアライメントを解釈する際に注意が必要です。

また、これらのTwist呼吸器系ウイルスコントロールを診断検査のネガティブコントロールとして利用できるかを判断するために、FDAがEUA（緊急使用許可）として承認したSARS-CoV-2用qPCR診断アッセイで試しました。CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルをTaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mixと共に使用して、テンプレートとして約 10^6 コピー/μLの各Twist呼吸器系ウイルスコントロールを用いて一連のアッセイを実施しました。さらに、定量的参照標準としてのATCC Quantitative Synthetic SARS-CoV-2 RNAに対するポジティブコントロールとしてTwist SARS-CoV-2 RNA Control 2（品番：102024）を5,000コピー使用しました。予想通り、各ウイルスの6回のテクニカルレプリケートではSARS-CoV-2は事実上検出されず、SARS-CoV-2ゲノムのコピー数はμLあたり1コピー未満でした。Twist呼吸器系ウイルスコントロールは、本質的にテンプレートを含まない水コントロールのように機能します。以上の結果は、これらのウイルスコントロールがSARS-CoV-2検出におけるルーチン分析において有用なネガティブコントロールとして機能することを示しています。

まとめ

本文書では、ターゲットエンリッチメントによる異なる呼吸器系病原体の同時検出のポジティブコントロールとして、またSARS-CoV-2を検出するqPCRアッセイのネガティブコントロールとしての、15種類のTwist呼吸器系ウイルスコントロールの有用性をご紹介します。15種類のTwist呼吸器系ウイルスコントロールによって、Twist Respiratory Panelでキャプチャした後、99.9%の配列のカバレッジと2500倍以上の濃縮が得られました。FDA-EUA承認のqPCR SARS-CoV-2検出アッセイでTwist呼吸器系ウイルスコントロールを使用した場合、テンプレートなしの水コントロールと同様のバックグラウンドレベルを示し、これらのコントロールがSARS-CoV-2アッセイで有用なネガティブコントロールとして機能することが示されました。

品番	名称	略称	核酸の種類	保管
102024	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3)	SCV-2	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103001	Twist Synthetic Influenza H1N1 (2009) RNA control	H1N1	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103002	Twist Synthetic Influenza H3N2 RNA control	H3N2	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103003	Twist Synthetic Influenza B RNA control	IBV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103004	Twist Synthetic Human bocavirus 1 DNA control	hBoV	一本鎖DNA	-90°C~-70°C
103005	Twist Synthetic Human enterovirus 68 RNA control	D68	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103006	Twist Synthetic Human rhinovirus 89 RNA control	HRV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103007	Twist Synthetic Mumps virus RNA control	MuV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103008	Twist Synthetic Human parainfluenza virus 1 RNA control	hPIV1	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103009	Twist Synthetic Measles virus RNA control	MeV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103010	Twist Synthetic Human parainfluenza virus 4 RNA control	hPIV4	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103011	Twist Synthetic Human coronavirus 229E RNA control	229E	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103012	Twist Synthetic Human coronavirus NL63 RNA control	NL63	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103013	Twist Synthetic Human coronavirus OC43 RNA control	OC43	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103014	Twist Synthetic SARS coronavirus Tor2 RNA control	SARS	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103015	Twist Synthetic MERS coronavirus 2c EMC/2012 RNA control	MERS	一本鎖RNA	-90°C~-70°C

表1：Twist Respiratory Synthetic Controls。