

デジタルPCRを用いたバイオアナリシス 効果的な使い方の提案と実践例

Bioanalysis supported by digital PCR: Suggestion of
effective deployment and the practices

JBFディスカッショングループ DG2024-69

**井手 亮佑、鈴木 晶子、藤田 選子、
村田 崇人、八代 百合子**

デジタル PCR (dPCR) は、従来のリアルタイム PCR (qPCR) に比べて高感度かつ高精度な定量解析が可能な技術として注目されており、**遺伝子・細胞治療製品の分析やバイオマーカー分析**において活用され始めている。

一方、dPCR は qPCR と比べて定量範囲が狭いなどの**技術的な短所**も持ち合わせている。dPCR および qPCR を効果的に使いこなすためには、**機器の特性を理解し、目的に応じた手法を選択**することが求められる。

本ディスカッショングループでは、dPCR のバイオアナリシス分野での利用に着目し、バイオアナリシスに関連した **dPCR の機器の特徴の整理**、dPCR および qPCR の**目的に応じた使い分け**に関する提言、**dPCR の短所を解消するための具体的な方策**の紹介を行う。また、**dPCR/qPCR 共通の実験上の疑問点、分析法バリデーションに関連した実践例**も取り扱う。

本発表を通し、バイオアナリシス分野における dPCR の効果的な利用が進むことを企図する。

Digital PCR (dPCR) has been in the spotlight as a technology capable of **sensitive and accurate** quantitative analysis compared to conventional real-time PCR (qPCR). dPCR is utilized **in the analysis of gene and cell therapy products as well as biomarker analysis.**

On the other hand, dPCR has **technical disadvantages**, such as a narrower quantitative range compared to qPCR. To effectively deploy both platforms, **it is essential to understand the characteristics and select the appropriate method based on the intended use.**

In this discussion group, we are focusing on the use of dPCR in the field of bioanalysis. We will show the **instrumental characteristics of dPCR** related to bioanalysis and provide **recommendations on the appropriate use of dPCR and qPCR according to their purposes.** We will make practical suggestions to overcome the disadvantages of dPCR as well. Additionally, we will address **common experimental questions related to both dPCR and qPCR, as well as practical examples related to the bioanalytical method validation.**

Through this presentation, we aim to promote the effective use of dPCR in the field of bioanalysis.

氏名 Name	所属企業 Affiliation
井手 亮佑 (リーダー) Ryosuke Ide (Leader)	田辺三菱製薬株式会社 Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
鈴木 晶子 Akiko Suzuki	株式会社新日本科学 Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
藤田 選子 Eriko Fujita	アステラス製薬株式会社 Astellas Pharma Inc.
村田 崇人 Agato Murata	株式会社住化分析センター Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.
八代 百合子 Yuriko Yatsushiro	シミックファーマサイエンス株式会社 CMIC Pharma Science Co., Ltd.

ポスターで使用される用語・略語 (A-D)

本DGポスターで使用されている用語・略語です。

一般に認知されていないものも含まれますのでご注意ください。

略語・用語	正式名称・定義	略語・用語	正式名称・定義
AAPS	American Association of Pharmaceutical Scientists	CV	coefficient of variation
ACTB	β -actin	CtDNA /CTC	Circulating Tumor DNA/Circulating Tumor Cell (循環腫瘍DNA/細胞)
cDNA	complementary DNA	ddPCR	droplet digital PCR
CNV	Copy Number Variation (コピー数多型)	DG	discussion group
COU	context of use (使用目的・特性。分析設計を決定づける要素。)	dMIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. dPCR実験の公表に必要な最低限の情報を示した指針。2023年に初版が公表され2020年に更新された。
CRO	Contract Research Organization		
Cq/Ct	threshold cycle (qPCRにおいて、核酸の増幅によりシグナルが閾値に達したときのPCRサイクル数)		

ポスターで使用される用語・略語 (D-M)

略語・用語	正式名称・定義	略語・用語	正式名称・定義
DNA	deoxyribonucleic acid	IL-4	interleukin-4
DNase	deoxyribonuclease	IPC	internal positive control
dPCR	digital PCR	ITR	inverted terminal repeat
dsDNA	double stranded DNA	JBF	Japan Bioanalysis Forum
FDA	Food and Drug Administration	LLOQ	lower limit of quantification
FIH	First in Human。開発製品を初めて人に使用する治験。	LOB	limit of blank
Fit for Purpose	一律の規制に則らず目的に応じた	LOD	limit of detection
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LOQ	limit of quantification
GCC	Global CRO Council	MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. qPCR実験の公表に必要な最低限の情報を示した指針。
GOI	gene of interest	mRNA	messenger RNA
ICH	International Council for Harmonisation		

ポスターで使用される用語・略語 (N-和語)

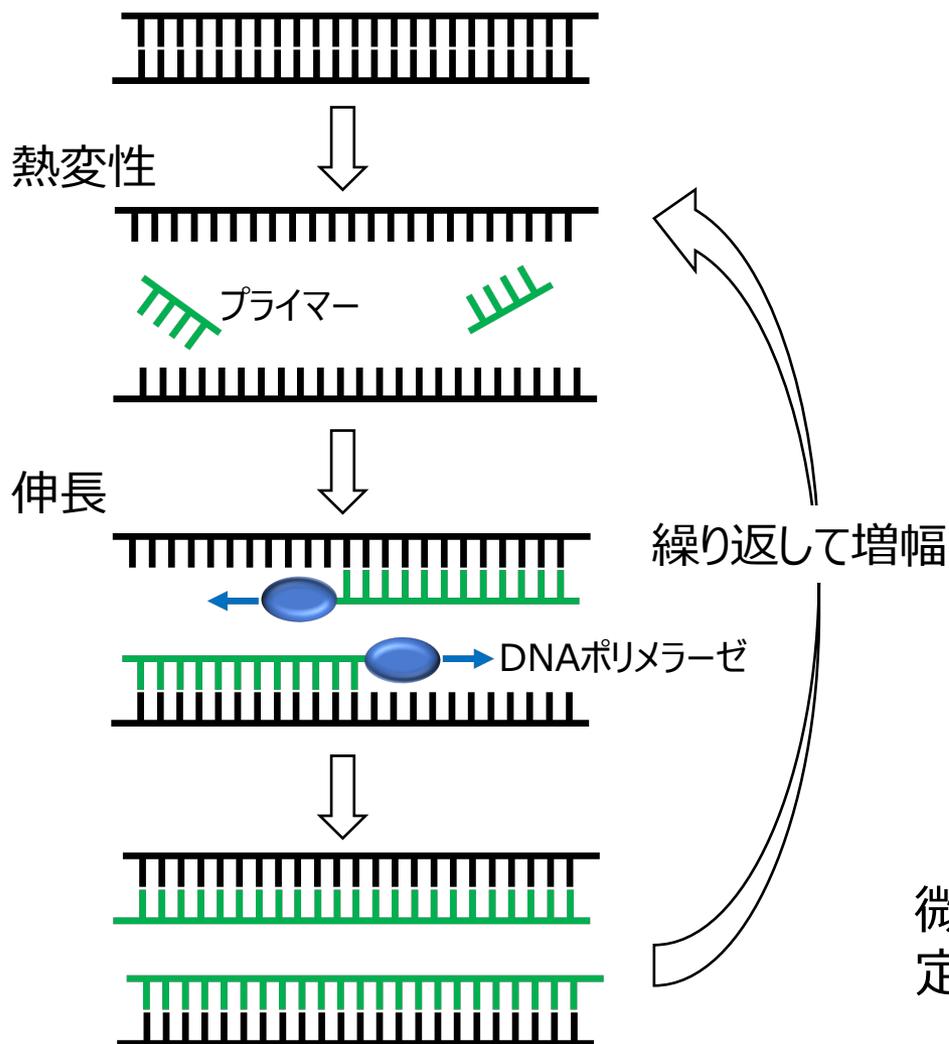
略語・用語	正式名称・定義	略語・用語	正式名称・定義
NTC	no template control	RT-PCR	reverse transcription PCR
P&A	precision and accuracy	SD	standard deviation
PCR	polymerase chain reaction	ssDNA	single stranded DNA
pdPCR	Physical partition digital PCR (固定パーティション式デジタルPCR)	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
polyA	polyadenylic acid	TFRC	transferrin receptor protein 1
QC	quality control	vgDNA	vector genomic DNA
qPCR	quantitative PCR	WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
RE	relative error	WRIB	Workshop on Recent Issues in Bioanalysis
replicate	同一サンプルの繰り返し	検証的試験	規制当局判断において重要な試験
RNA	ribonucleic acid	探索的試験	社内判断のみを目的として実施される 試験
RNase	ribonuclease		
rRNA	ribosome RNA		

セクション	該当ページ
本DGの概要、DGメンバー	2-4
用語・略語	5-7
目次	8
dPCR/qPCRの基礎的な情報の整理	9-18
dPCRとqPCRの比較・使い分け	19-44
分画方式によるdPCRの機種間差、dPCR/qPCR実験時の実践的ノウハウ	45-57
dPCR/qPCRバイオアナリシスに関するレギュレーション、公知情報の整理	58-90
dPCR/qPCRを利用する実験関連の全般的な留意点	91-109
DGサポーターアンケート その他の疑問点	110-117
まとめ	118-119
謝辞	120
問合せ先	121



dPCR/qPCRの基礎的な情報の整理

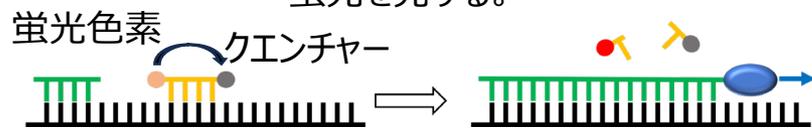
PCRの原理



核酸の検出方法

・加水分解プローブ

加水分解によってクエンチャーが解離、
蛍光を発する。



・インターカレーター法

2本鎖DNAに入り込み蛍光を発する。



微量な核酸をPCRで増幅して検出し
定量を行うことができる。

PCRを用いた定量技術の変遷



・PCRの発明

核酸電気泳動

泳動を用いた方法、定量性には乏しい。

qPCR (リアルタイムPCR)

現状、核酸定量法として広く普及している。

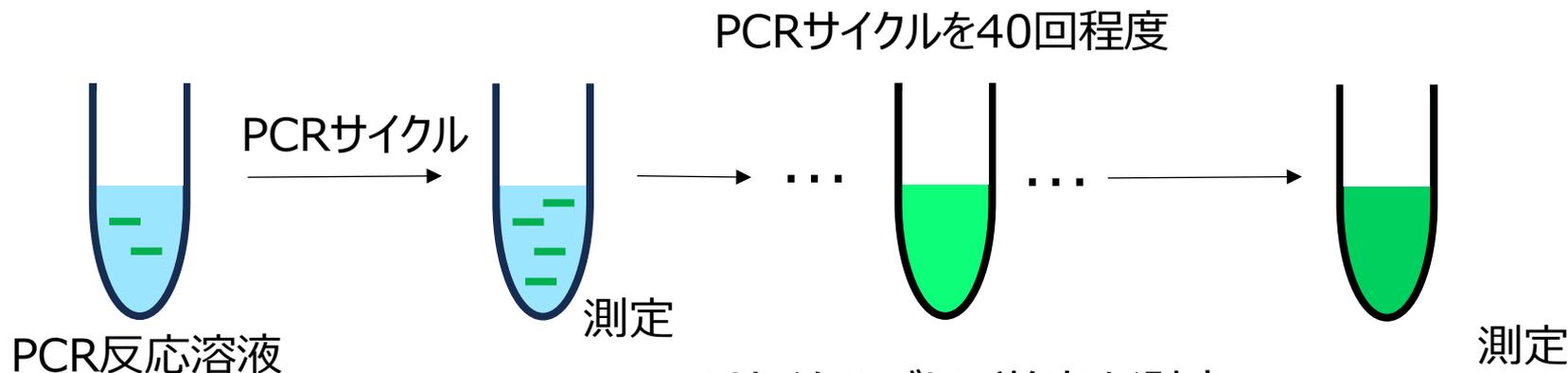
dPCR

比較的最近普及している核酸定量方法

現在使われている核酸定量に有用な二つの方法



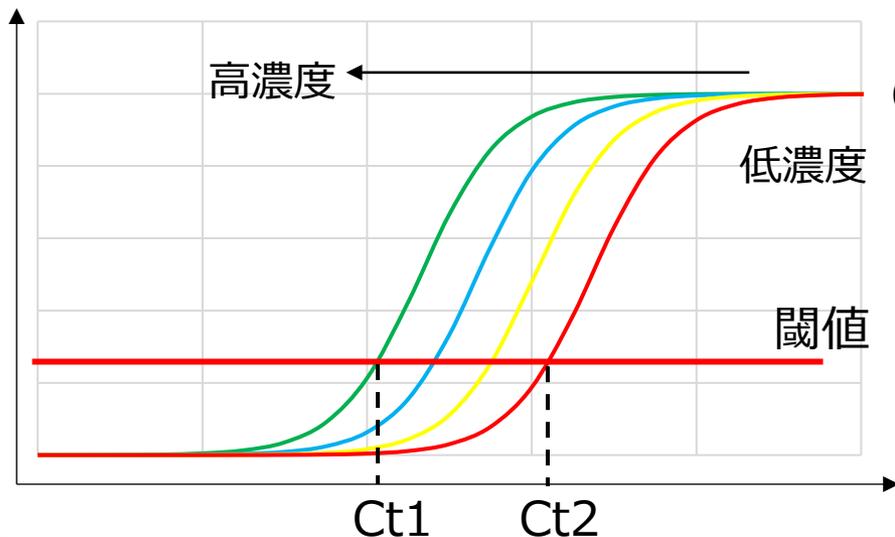
qPCRの原理-検出方法



1サイクルごとに蛍光を測定

理想的には1サイクル毎に目的物が2倍に増幅される

得られるデータは核酸の増幅曲線



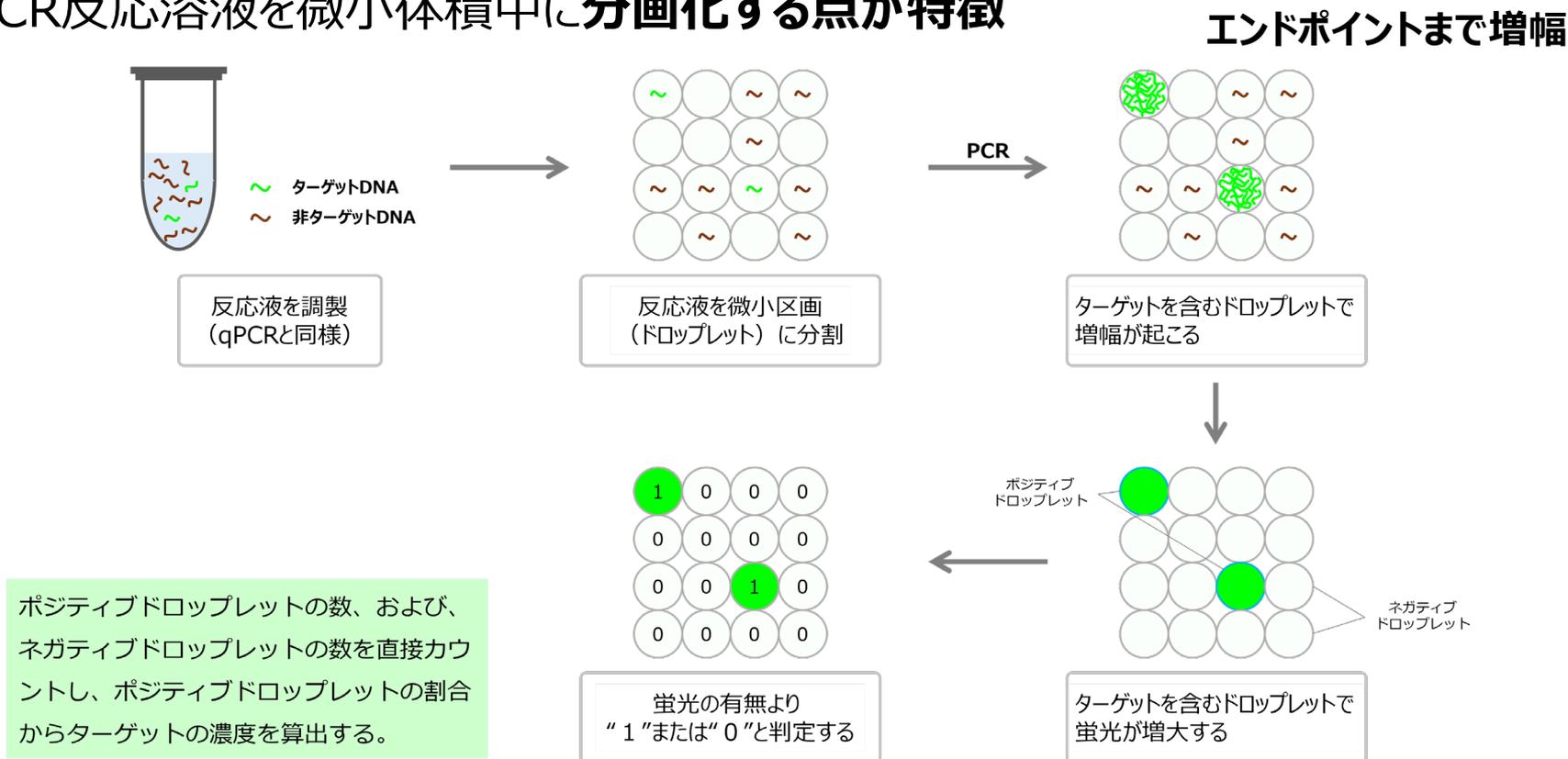
Ct/Cq値：シグナルが閾値に到達するまでのサイクル数

Ct/Cq値を比較することで絶対定量や相対定量を行う

<http://bioanalysisforum.jp/>

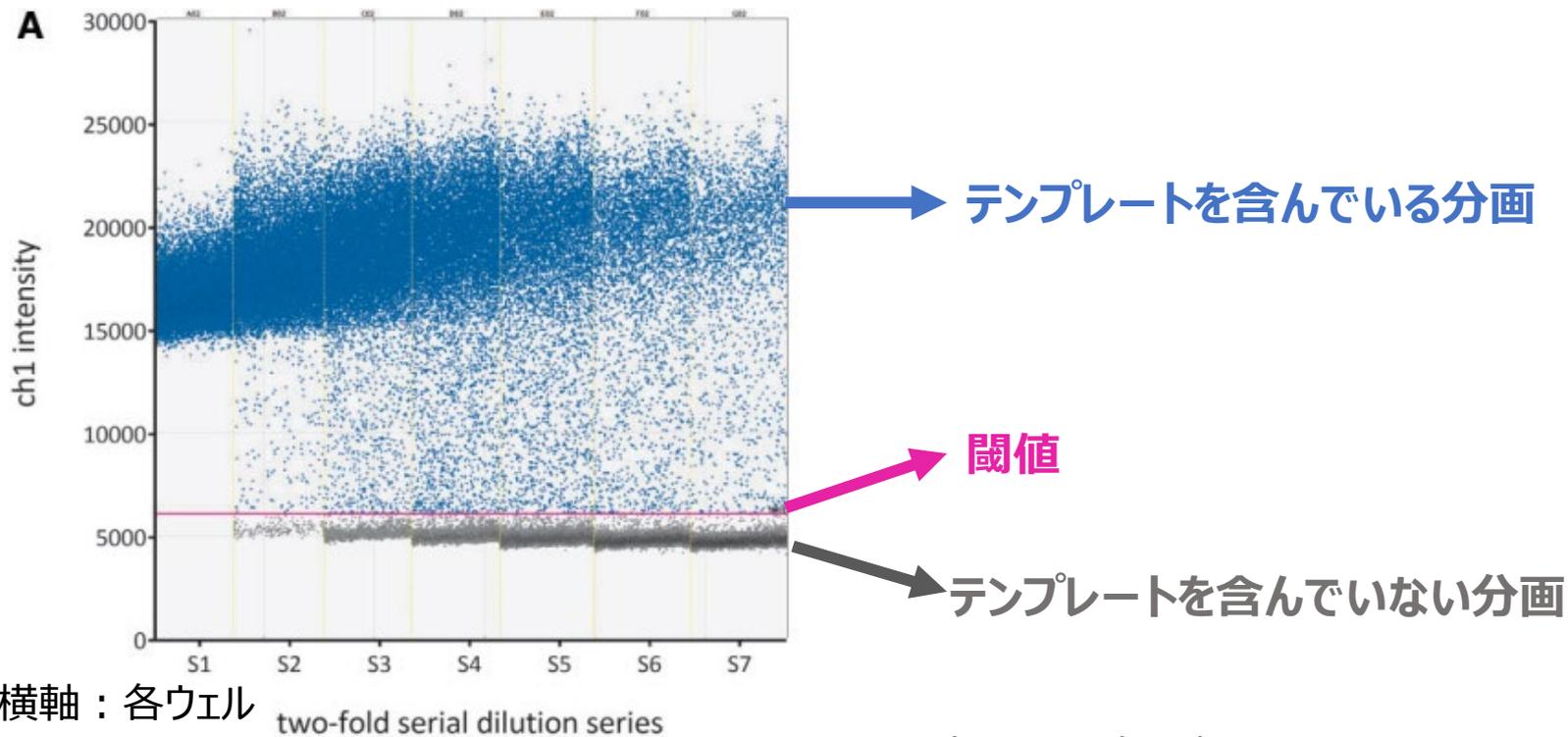
dPCRの原理-検出方法

PCR反応や核酸の検出方法はqPCRと同様
PCR反応溶液を微小体積中に**分画化する点**が特徴



dPCRの原理-検出方法

縦軸：各ウェルで検出された蛍光強度



横軸：各ウェル

dMIQE : Clin Chem. 2020 Aug 1;66(8)

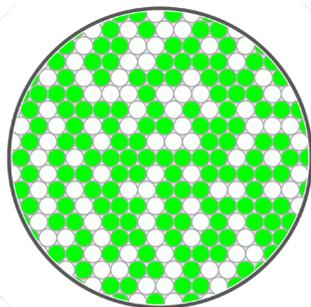
閾値を設定して陰性分画数と陽性分画数を計測

dPCRの原理-濃度算出方法

陽性/陰性分画の割合はポアソン分布に従う。

例：ターゲットDNA250個を250個の分画に分割する場合、各分画におけるDNA数は下表に従う。

→陽性分画は160個程度(約64%)



0コピー	約36.8%存在
1コピー	約36.8%存在
2コピー	約18.4%存在
3コピー	約6.1%存在
4コピー	約1.5%存在
5コピー	約0.3%存在

ポアソン分布に従う条件

- ・ターゲットがランダムに分画化される。
- ・各分画の液量が等しい

陽性と陰性分画数の割合から分画内の平均濃度を算出

$$\lambda = -\ln\left(\frac{w}{n}\right)$$

λ : 1分画当たりの平均コピー数

w : 陰性分画の数

n : 総分画数

分画の液量から濃度を算出

$$C = \lambda \times \left(\frac{1}{V_p}\right) \times D$$

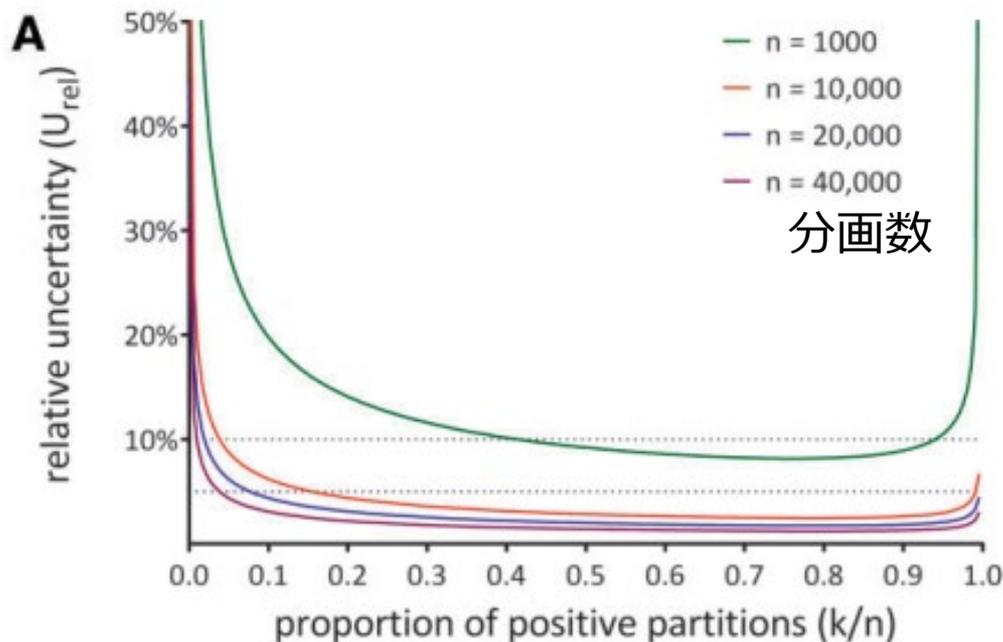
C : サンプルの濃度

V_p : 各分画の平均液量

D : 希釈倍率

分画数の影響

各分画数における不確かさと陽性/陰性分画の割合の関係



横軸：総分画数に対する
陽性分画数の割合

縦軸： λ の不確かさ（95%信頼区間）

λ : ポアソン分布より求められる
1分画当たりの平均コピー数

dMIQE : Clin Chem. 2020 Aug 1;66(8)

陽性or陰性分画の割合が極端に高くなると精度が低くなる。
分画数が多いほど得られる定量値の精度は高い。

dPCRにおける2つの分画方式

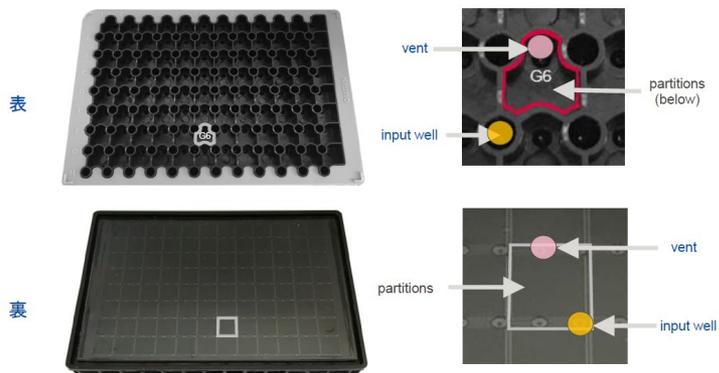
ドロップレット方式



油中液滴（ドロップレット）中に試料を封入しPCR
ドロップレットリーダーで測定

Bio-Rad Laboratories Inc.提供資料を引用

プレート方式



プレート内に作成された
マイクロチャンバー内に試料を
封入しPCR
プレートリーダーで測定

©QIAGEN, all rights reserved

dPCRの特徴：遺伝子や遺伝子発現量の**高感度かつ高精度な定量**

具体的な用途例

- ・各種医薬品開発プロセスにおける定量試験
細胞、遺伝子治療製品における非臨床・臨床試験
- ・リキッドバイオプシー
ctDNA、CTC等腫瘍由来物の検出
- ・がんの解析
希少変異や微細なコピー数多型の解析
- ・食品や排水中の細菌やウイルス病原体の検出
- ・胎児の出生前診断

本DGではBA分野におけるdPCRの利用法について議論を行った。

dPCRとqPCRの比較・使い分け

DGサポーターアンケート；概要

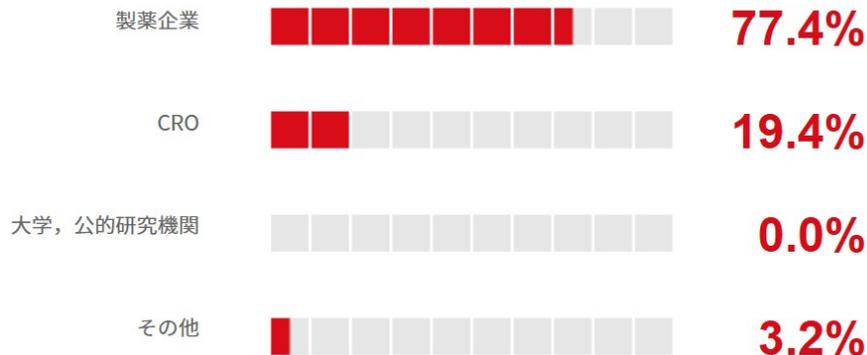
DGサポーターアンケート「デジタルPCRを用いたバイオアナリシス：効果的な使い方の提案と実践例」

実施目的：デジタルPCRとqPCRの比較・使い分けに関する考えdPCR/qPCRの適用対象となるバイオアナリシス実験の動向の調査。

回答対象者：全DGサポーター（1施設から複数回答可能）

実施期間： 2024年11月1日 - 2024年11月29日

総回答数： 31名



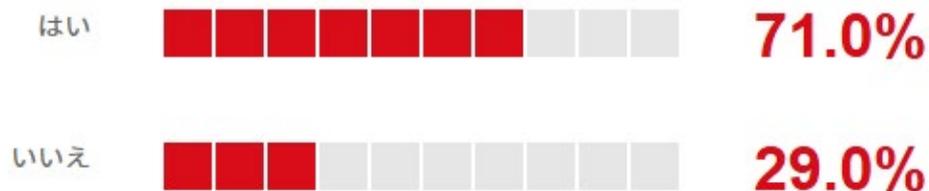
ご協力いただいた皆様、ありがとうございました。

DGサポーターアンケート ; dPCRの利用状況

Q1.

デジタルPCR/qPCRの比較・使い分けに関してお伺いします。

あなた自身または所属する施設でデジタルPCRを利用していますか？



考察

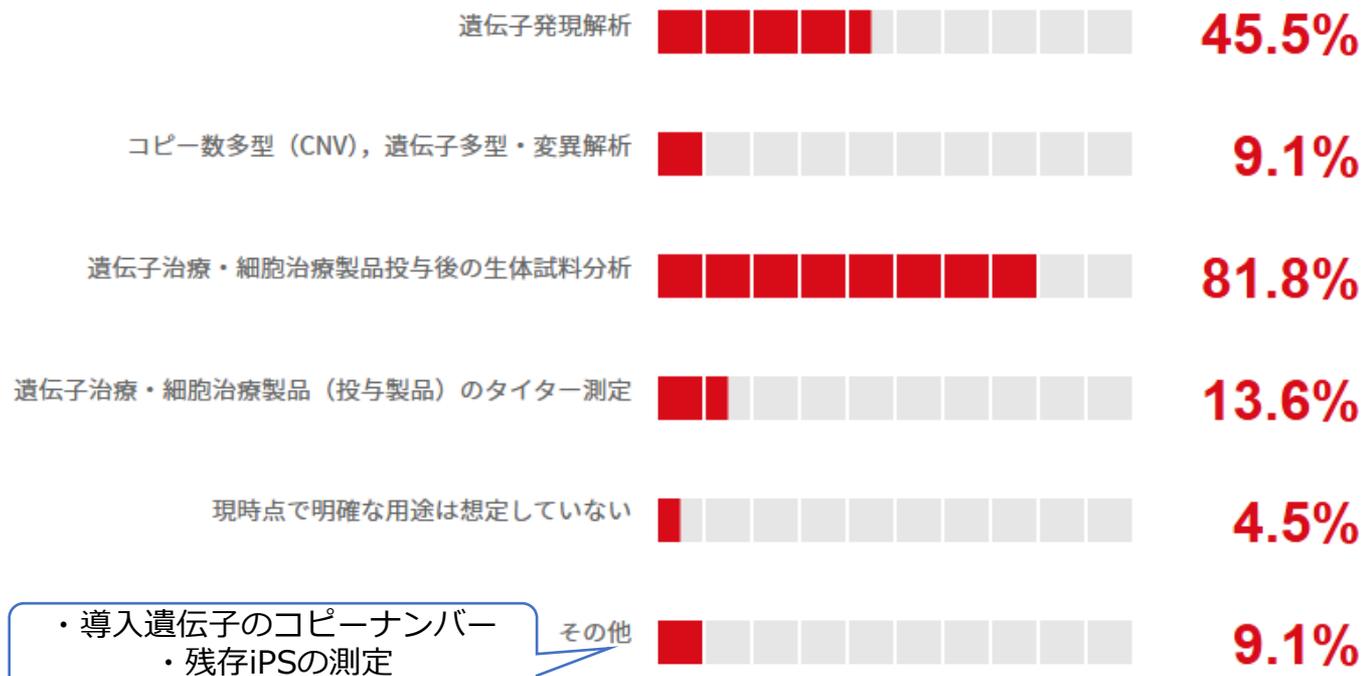
各施設1回答でないため同一施設からの回答も含まれるが、多くのバイオアナリストがデジタルPCRを使用している、または使用できる環境にある。

DGサポーターアンケート；dPCRの利用目的（使用者）

Q5.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

デジタルPCRをどのような実験に利用していますか？



考察

遺伝子治療・細胞治療製品の生体試料分析、全般的な遺伝子発現解析の用途で使用しているという回答が多かった。

DGサポーターアンケート ; dPCRの長所

Q6.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

リアルタイムPCRと比較して、デジタルPCRのどのような点を長所と感じていますか？

考察

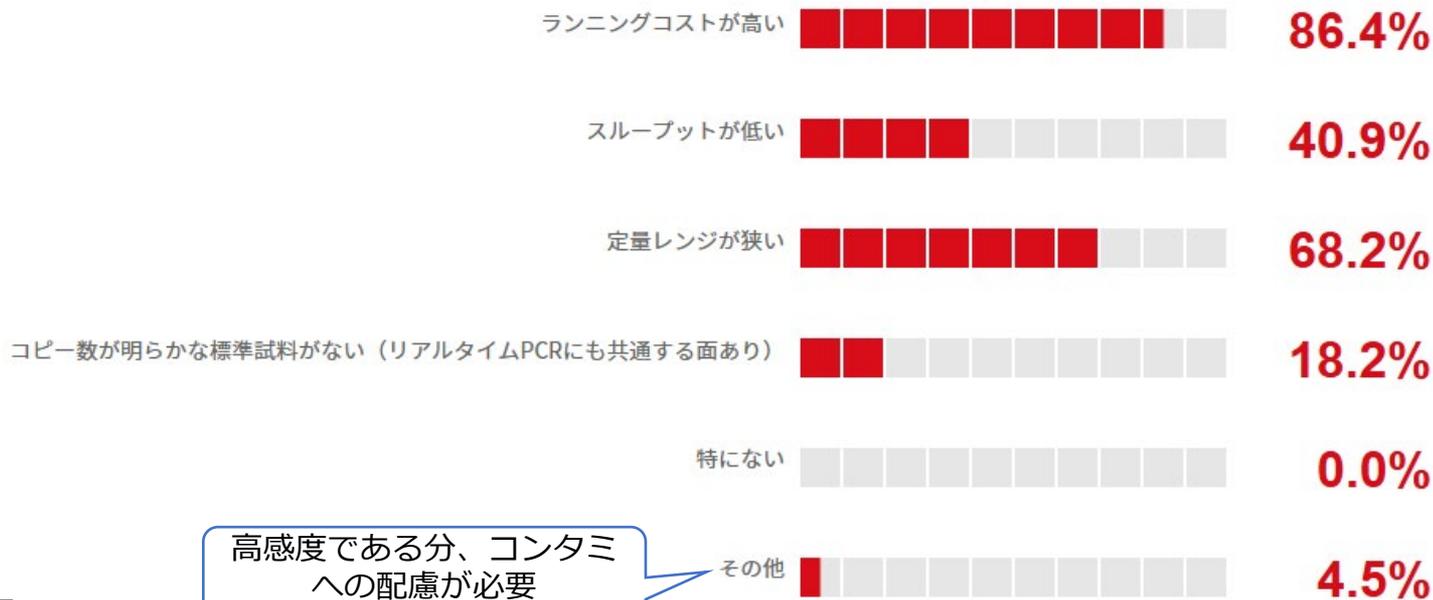
dPCRの恩恵として使用者が実感できている点は、高感度/微量遺伝子の検出、PCR阻害の影響を受けにくいこと、標準試料不要で絶対定量できること、定量精度が高いことに主に集約されている。

DGサポーターアンケート ; dPCRの短所

Q7.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

リアルタイムPCRと比較して、デジタルPCRのどのような点を短所と感じていますか？

考察

ランニングコストの高さを気にしているユーザーが多数見受けられた。次いで定量レンジが狭いことを短所と上げる意見が多かった。その他の回答として高感度ゆえのコンタミへの配慮という意見もあった。

DGサポーターアンケート；dPCRの短所克服法

Q8.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

短所を最小化するために実践している工夫があれば具体例を教えてください。

PCR専用の区画もしくはクリーンベンチ内でサンプル調製

回答者自身がddPCRをハンドリングしないのでわからないが、検量線範囲については予備検討や希釈倍率に幅を持たせて対応している認識。

定量レンジ内に収めるための希釈倍率検討用のScreening assayと、定量値を得る目的のConfirmatory assayという2段階の測定を行っている。

- ・予備的に測定してから本測定を実施する
- ・サーマルサイクラーの数を増やす

考察

コンタミ対策としてPCR専用の区画・器具の利用が望ましい。

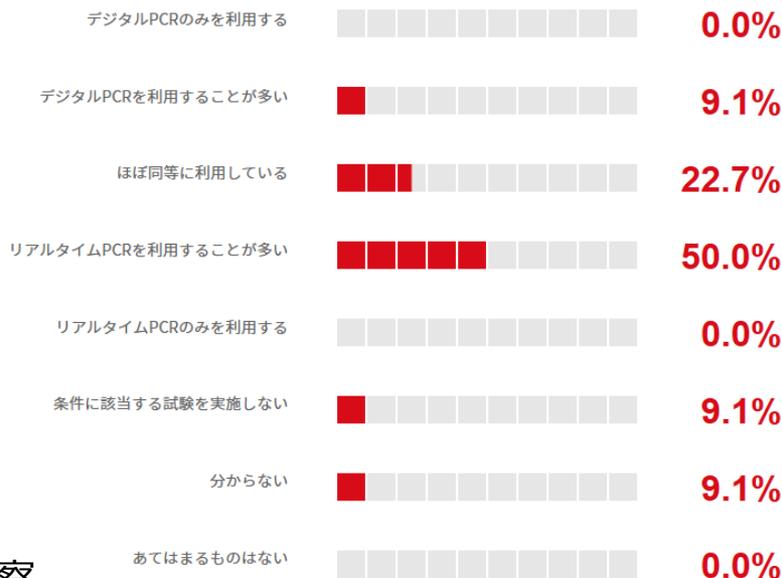
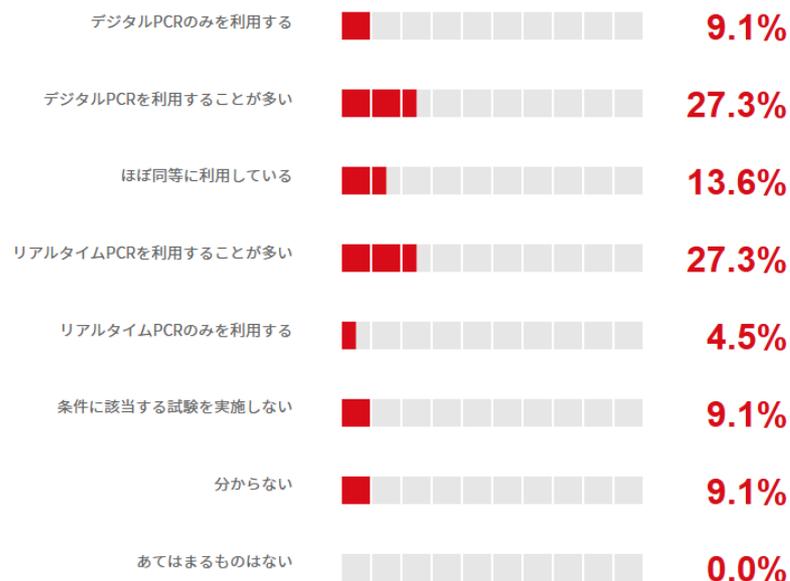
定量レンジの狭さに対しては、予備検討の実施、Stepwise assay/Serial dilution assay format（後述）の採用が効果的と思われる。

DGサポーターアンケート；dPCRの使い分け-生体内分布

Q9.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

次のような場面においてデジタルPCRとリアルタイムPCRのどちらを利用しますか？

遺伝子治療製品・細胞治療製品の生体内分布試料の分析：探索的非臨床試験
(回答数: 22)遺伝子治療製品・細胞治療製品の生体内分布試料の分析：検証的非臨床試験・臨床試験
(回答数: 22)

考察

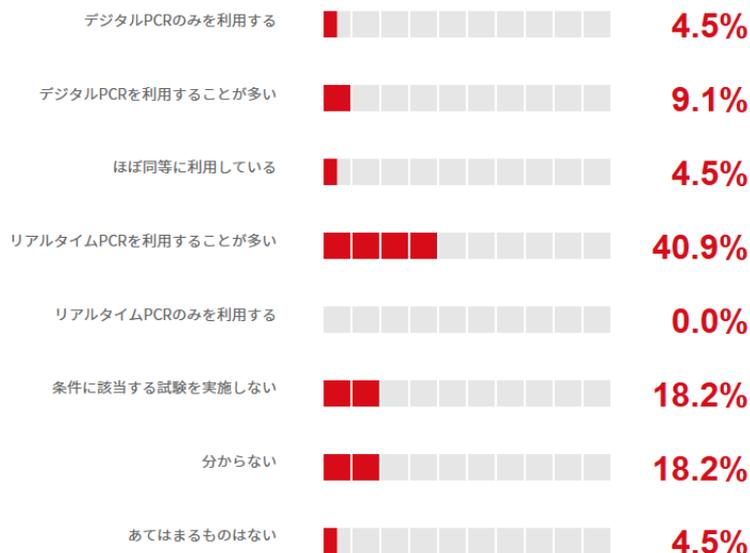
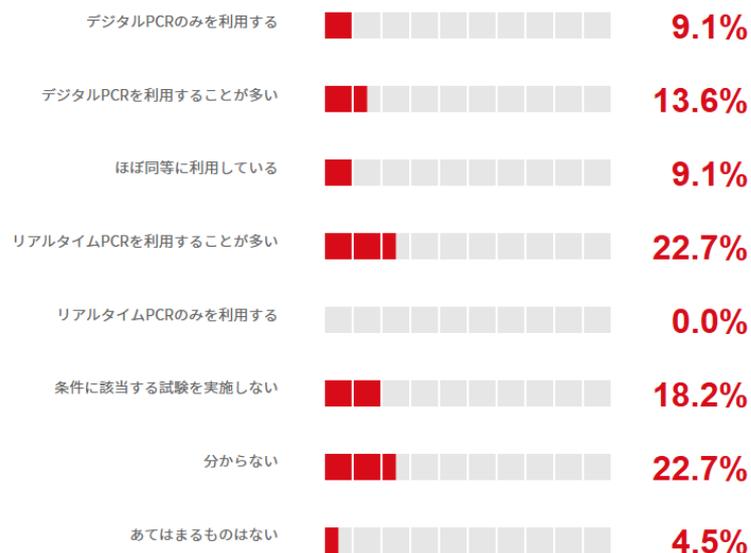
生体内分布試験においては、探索的非臨床試験（社内判断目的）と比較し、検証的非臨床試験（当局提出目的）や臨床試験の実施に当たってdPCRの利用にシフトしている状況が見受けられる。

DGサポーターアンケート；dPCRの使い分け-排出評価

Q9.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

次のような場面においてデジタルPCRとリアルタイムPCRのどちらを利用しますか？

遺伝子治療製品・細胞治療製品の排出試料の分析：探索的非臨床試験
(回答数: 22)遺伝子治療製品・細胞治療製品の排出試料の分析：検証的非臨床試験・臨床試験
(回答数: 22)考察

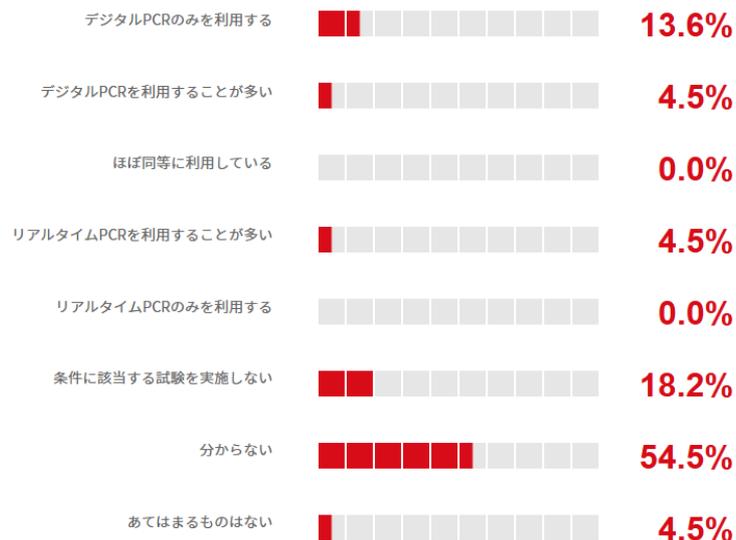
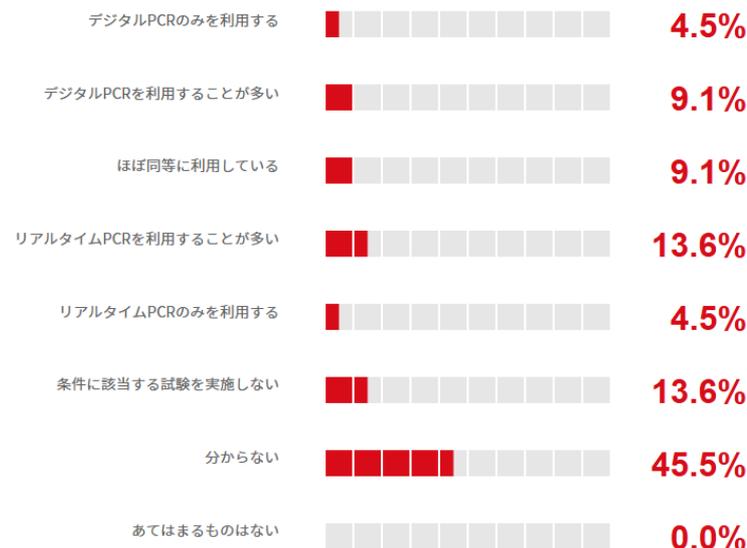
排出試験でも生体内分布試験と同様の傾向が認められるが、該当試験を実施しない、分からないという回答も多数あり、生体内分布試験の場合の方がデジタルPCRを積極的に使用する傾向がより明確となった。

DGサポーターアンケート；dPCRの使い分け-特性・毒性試験

Q9.

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

次のような場面においてデジタルPCRとリアルタイムPCRのどちらを利用しますか？

遺伝子治療製品・細胞治療製品の特性/タイター測定：製造
(回答数: 22)遺伝子治療製品・細胞治療製品の特性/被験物質濃度分析：毒性試験
(回答数: 22)

考察

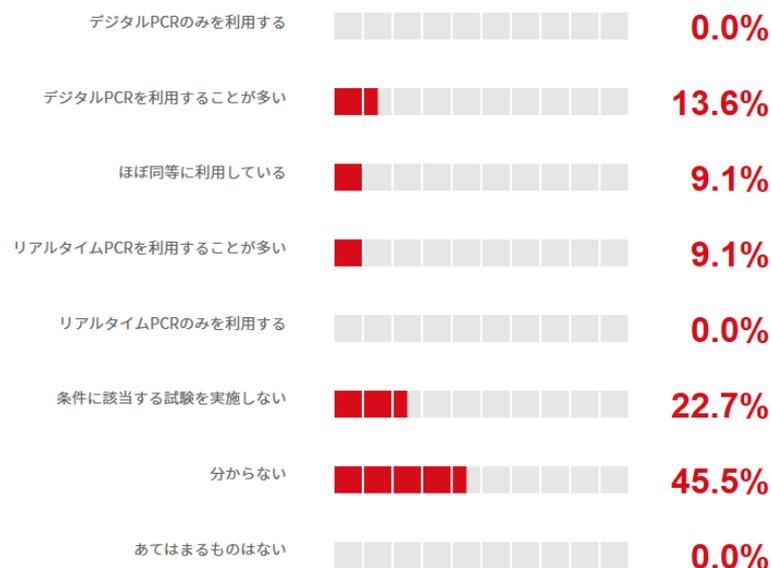
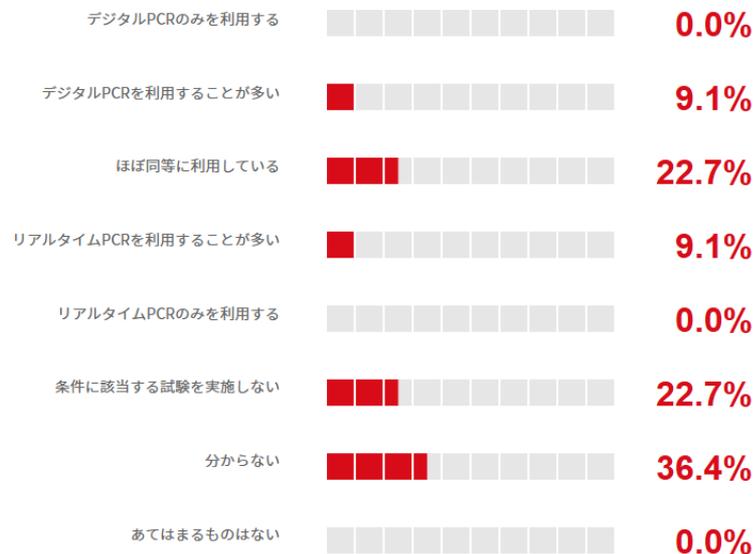
回答対象がバイオアナリストだったため、製品の特性試験・タイター測定に関する設問では半数以上の有効回答が得られなかった。毒性試験については生体内分布試験等と抱き合わせで実施することが多く、単独試験としての回答が難しかったと思われる。

DGサポーターアンケート ; dPCRの使い分け-バイオマーカー

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていると回答した方に限定

Q9.

次のような場面においてデジタルPCRとリアルタイムPCRのどちらを利用しますか？

少数の核酸を測定対象とした体液中バイオマーカーの測定 (ctDNA/RNA, エクソソーム・血中循環細胞中の核酸など)
(回答数: 22)少数の核酸を測定対象とした組織中バイオマーカーの測定
(回答数: 22)

考察

有効回答数は少なかったが、バイオマーカー分析における利用においてはデジタルPCRもリアルタイムPCRも同等に利用されている状況が認められた。バイオマーカー分析はContext of Useに従ったFit for Purposeな分析設計が浸透しており、創薬・開発ステージや利用用途に基づいて、より柔軟にプラットフォームの選択が可能であることを反映した結果だろう。また、サンプルサイズやサンプルの種類も多様であることも影響しているかもしれない。

DGサポーターアンケート ; dPCRの想定利用場面 (非使用者)

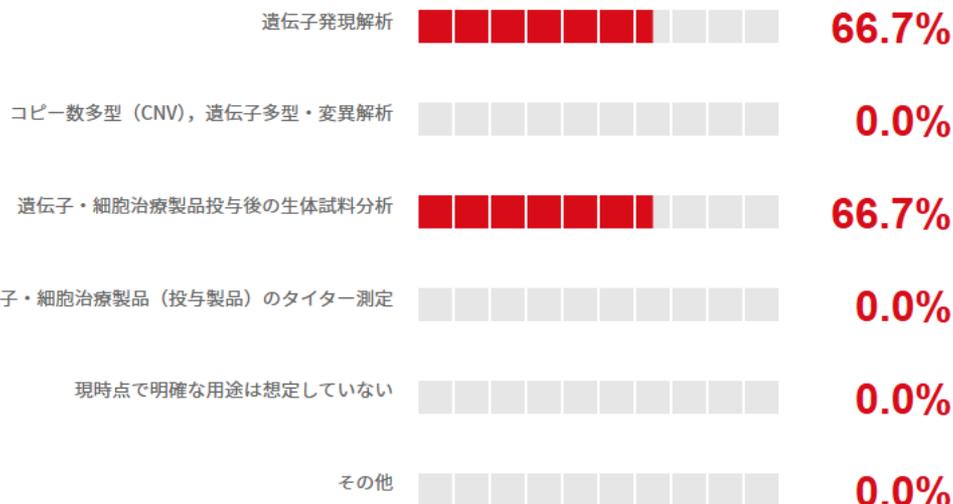
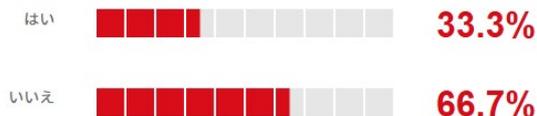
Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていないと回答した方に限定

Q3.

デジタルPCRを導入したと仮定してどのような実験に利用したいですか？

Q2.

デジタルPCRを利用して実験したい場面がありますか？



考察

dPCRをまだ使用していないという回答者の大部分にはそもそもニーズが存在していないという回答だったが、潜在的なニーズに気づいていない可能性も考えられた。想定される利用目的の内訳は、実際に利用しているという回答者と同様に遺伝子治療・細胞治療製品のバイオアナリシス、遺伝子発現解析で占められていた。

DGサポーターアンケート ; dPCRの想定利用場面 (非使用者)

Q1にて自身または所属施設でdPCRを使っていないと回答した方に限定

Q4.

デジタルPCRの導入に至っていない理由は何ですか？



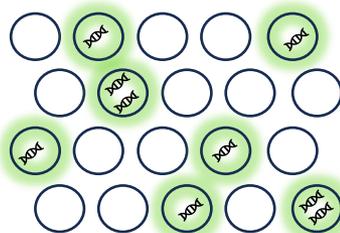
考察

リアルタイムPCRで事足りているという回答とスループットの低さを指摘する回答が多かった。前者についてはdPCRが有用である場面を整理して例示する必要もあると考えられ、本DGによる提案もその一助になることを望む。どのように運用してもdPCRがリアルタイムPCRのスループットに勝ることはないため、それ以外の面でdPCRを求める理由があるか否かが重要となる。

dPCRとqPCRの比較

デジタルPCR (dPCR)

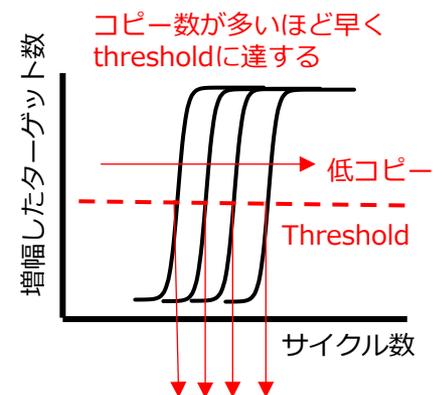
サンプルを微細なパーティションに分配する。PCRの増幅量をエンドポイントでモニターし、パーティションの数をカウントする手法。



パーティション総数とポジティブなパーティション数（閾値を超える蛍光を検出したパーティション数）をカウントする。

qPCR
(=リアルタイムPCR)

PCRの増幅量をリアルタイムでモニターし、増幅量の閾値に達するまでの反応サイクル数をカウントする手法。



Thresholdに達したときのサイクル数 (Ct, Cq等)

	dPCR	qPCR
定量方式	絶対定量	相対定量 または検量線法による絶対定量
定量レンジ	△	◎
感度	○～◎	○
精度	◎	○
PCR阻害の影響	◎	△
スループット	△～○	◎
コスト	△	◎

dPCR

パーティション全体にランダムにターゲットが分配されるため、ターゲットの分配は**ポアソン分布**に従う。この仮定のもと総パーティション数とポジティブパーティション数をカウントすることにより絶対定量が可能。**標準試料は不要**。

qPCR

リアルタイムPCRの出力値 (Ct/Cq値) とコピー数を直結させることができないため、検量線を用いなければ絶対定量ができない。**標準試料が必要**。

使い分けのポイント

標準試料の調達が難しいが絶対定量したい場合、dPCRは有用。想定される利用場面はmRNAの定量、とりわけmiRNAの定量など。

dPCR

ターゲットのパーティションへの分布が飽和する（全パーティションにターゲットが分布する）と定量不能になる．このため定量レンジは狭い（良くて $10^4 \sim 10^5$ 倍）．

qPCR

Ct/Cq値が約15~35の範囲ではCt/Cq値とコピー数が良好に相関するため、定量レンジは広い（約 2^{20} 倍 = 約 10^7 倍）．

使い分けのポイント

想定されるコピー数が広い範囲（特に高コピー数側）に及ぶ場合はqPCRの方が希釈倍率を気にしなくてよいため便利．想定される利用場面は生体内分布試験（標的組織・非標的組織が混在）など．

dPCR

微小なパーティションにターゲットを分配するため、パーティション内には少数のターゲットのみが含まれる。PCR阻害やバックグラウンドの基となる夾雑物の持ち込みが少ないため高感度測定が可能。また、定量がPCR阻害の影響を受けにくいいため、反応系へのサンプルのインプット量を増やすことができ、感度を稼ぐことができる。

qPCR

大きな反応系に多量の夾雑物を持ち込むため、PCR阻害やバックグラウンドが生じやすく、dPCRに比べて感度は劣る。また、PCR阻害が定量値に直接的な影響を及ぼすため、反応系へのサンプルインプット量に制限があり、感度を稼ぐことは難しい。

使い分けのポイント

感度を必要とするケースではdPCRが有用。想定される利用場面は、微量遺伝子・レア変異の検出・定量。

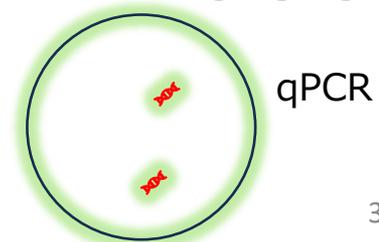
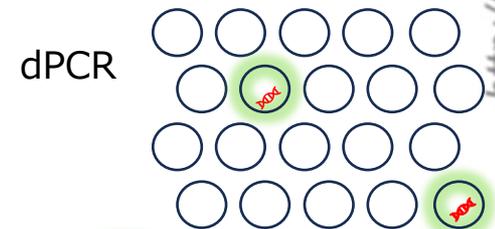
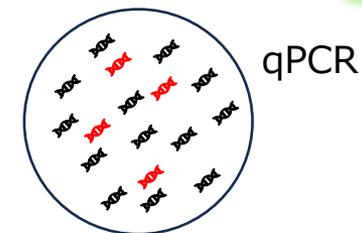
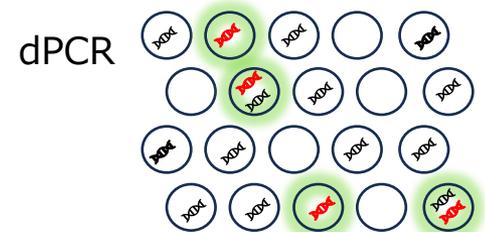
「感度」に関する注意点

一般的にqPCRに比べてdPCRの方が感度がよいと表現されるが、条件によって当てはまらない場合もあるため注意されたい。

検出対象と競合して増幅する核酸が多量に含まれる場合、dPCRはqPCRより感度よく検出することができる。

これは各パーティションに含まれる核酸が少量であり、競合して増幅する核酸の影響を受けにくい。主に**レア変異検出**などのアプリケーションが想定される。

一方、競合して増幅する核酸が多量に含まれない**試料**において、ごく微量の検出対象を検出するという意味ではdPCRとqPCRに感度面で大差はない。ただし、これは同量のサンプルを用いた場合であり、PCR阻害を受けにくいdPCRはサンプル量により感度を稼げる余地が大きい。



定量レンジと感度の両方を必要とするケース

分布評価における製品の非標的組織（毒性発現組織・生殖組織），排出評価などにおいて，より高感度な分析法を用いてリスクを否定することは製品の価値を正しく示す上で重要と言える。

実際に2020年にFDAから発出されているGuidance for Industry Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products では，生体内分布試験における分布の持続性を確認するために，検出下限を ≤ 50 copies/ μg genomic DNAにするよう求めている。

details of such preclinical studies, please refer to section IV.B of this document. Specifically, we recommend the polymerase chain reaction (PCR) assay for determining vector persistence in biodistribution studies. Following administration of the product, persistence is indicated by detectable levels of GT product sequences above the threshold level (≤ 50 copies/ μg genomic DNA) of the PCR assay, and absence of an apparent downward trend over several time

この要求水準はqPCRにおいては困難なケースが多く，デジタルPCRの利用が望まれる。一方，標的組織と非標的組織の混在する生体内分布試験においては，デジタルPCRの定量レンジの狭さが足枷となる。どのようなアプローチがあるだろうか？

狭い定量レンジへの対処

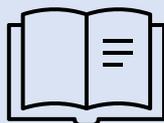
オプションA **Stepwise assay format**

希釈倍率設定のための測定を実施する。

想定されるケース：濃度想定の精度が低い（各動物種の最初の試験、FIH試験）、定量範囲が狭い、測定検体数が多い（生体内分布）、検体量が限られる（マウス等）

① コピー数の見積もり

同じベクターを使用した過去の生体分布試験や文献情報をもとに各組織中のコピー数を見積もる

② 希釈倍率設定のための測定 (Screening assay)

見積もった倍率で希釈し、 $n=1$ で測定する。測定精度管理は不要。

③ 本測定 (Confirmatory assay)

希釈倍率を確定し、本測定を実施する。 $n=3$ で測定し、阻害確認等の精度管理を必要とする。

④ 再測定

必要に応じて再測定を実施する



狭い定量レンジへの対処

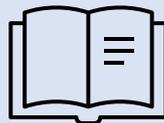
オプションB: **Serial dilution assay format**

希釈倍率設定のための測定を実施せず，本測定で複数の希釈倍率で測定する。

想定されるケース：濃度想定の精度が高い（各動物種の2回目以降の試験・後期臨床試験，排出試験），定量範囲が広い（>1000倍），測定検体数が少ない，個体あたりの測定検体量が豊富（サル、臨床等）

① コピー数の見積もり

同じベクターを使用した過去の生体分布試験や文献情報をもとに各組織中のコピー数を見積もる



③ 再測定

必要に応じて再測定を実施する



② 本測定

各検体を段階希釈*し，それぞれの倍率についてn=3で測定する。定量範囲内に収まる定量値が複数の希釈倍率で得られた場合，最も希釈倍率の低い試料の定量値を採用する。また阻害確認等の精度管理を必要とする。



* 希釈倍率の数は想定濃度の精度と定量範囲の兼ね合いで決まる。

dPCR

ポジティブとネガティブに二分して定量値を算出するため、ポジティブとネガティブのクラスターが十分に分離されている分析法においてはプレート内・プレート間共にばらつきが生じにくい。

qPCR

測定原理上、およそ1PCRサイクル、すなわち約2倍以内のわずかな差を精度よく検出することはできない。

使い分けのポイント

微量な差を検出したいケースやより高い精度・再現性を求められる試験ではdPCRが有用。想定される利用場面は、CNV (copy number variation) 解析、核酸標準品の定量、各種の検証的な試験。

dPCR

サンプル調製，パーティション化，PCR，パーティションのリードが必要であり，時間を要する．サンプル調製後の工程を自動化した機種もある．

qPCR

サンプル調製後にそのままリアルタイムPCRを行うため短時間で測定結果が得られる．また，PCRの時間を短縮するマスターミックスも入手できる．

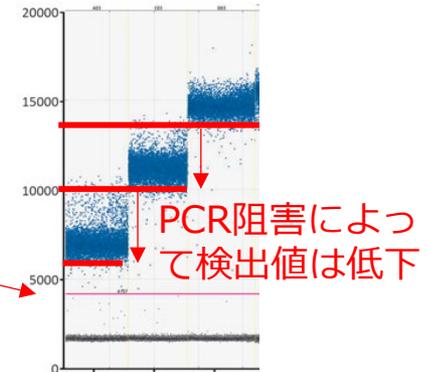
使い分けのポイント

多検体を測定したい場合，簡易的な判断に用いるためのデータを取得する場合はqPCRが有用．想定される利用場面は，社内判断にのみ結果を用いる生体内分布測定（組織数が多い）など．

dPCR

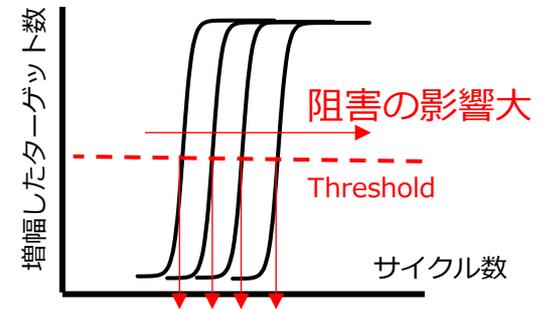
エンドポイントPCRであり、ポジティブとネガティブを分離して解析する。PCR阻害が掛かることによってシグナルが低下するが、ポジネガ分離には影響を及ぼさないため、定量値が阻害の影響を受けにくい。

閾値を超えない範囲で検出値が低下しても、ポジネガの判断は変わらない
 → 定量値に影響なし

**qPCR**

PCR阻害が掛かると増幅が遅れるため、Ct/Cq値が高くなる。すなわち定量値に直接的な影響が生じる。

阻害の影響が大きいほど増幅が遅れ、Ct/Cq値が高くなる。
 → 定量値の過小評価

**使い分けのポイント**

PCR阻害を起こしやすいサンプルを測定する場合、感度が必要でサンプルインプット量を大きく増やしたい場合にはdPCRが有用。核酸抽出方法の見直し等によりPCR阻害を最小化できる場合もある。想定される利用場面は排出試験など。

dPCR

機器本体価格，ランニングコスト共にやや高め．機器メーカーの努力によりコストは下がってきている印象。

検量線試料が不要であり，分析精度が高く replicate の数を減らせる可能性もある．また，定量値が増幅効率の影響を受けないため，qPCR に比べてマルチプレックス測定を採用できる可能性が高い。

ランニングコストに限れば，qPCR と遜色ないコストに抑えられるかもしれない。

qPCR

機器本体価格，特にランニングコストが抑えられる。

使い分けのポイント

dPCR を導入するに足る利用用途が見込めるか精査する．導入してしまったらランニングコストは気にせず使い倒すのが結果的に投資効果を引き出せるのではないだろうか。

使い分け まとめ

dPCRとqPCRには分析パフォーマンス, スループット, コスト等の観点で一長一短がある。各分析プラットフォームの特徴と利用目的（求められるデータ品質・迅速性）を理解し、適切に選択することが求められる。

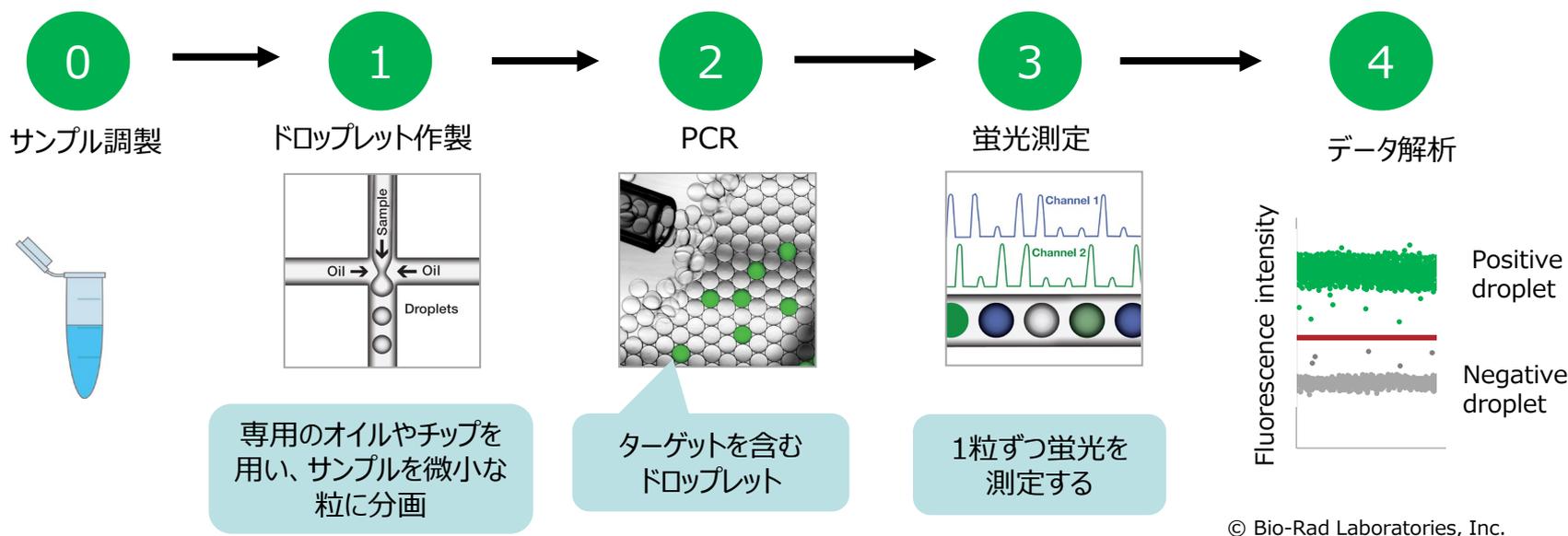
DGサポーターアンケートからは、ランニングコストや定量レンジの狭さを短所に感じているユーザーが多いことが明らかになった。ランニングコストについては、マルチプレックス測定の採用や目的に応じたreplicate測定の削減が解決策になり得る。また、定量レンジの狭さに対しては、Stepwise assay/Serial dilution assay formatの採用が効果的と思われる。

なお、複数の結果を統合的に解析する場合は一つの分析プラットフォームに統一することが望ましい。例として、生体内分布試験において一部のマトリックスはdPCR, 一部のマトリックスはqPCRとすることは望ましくない。

分画方式によるdPCRの機種間差、 dPCR/qPCR実験時の実践的ノウハウ

ドロップレット方式デジタルPCR (ddPCR)

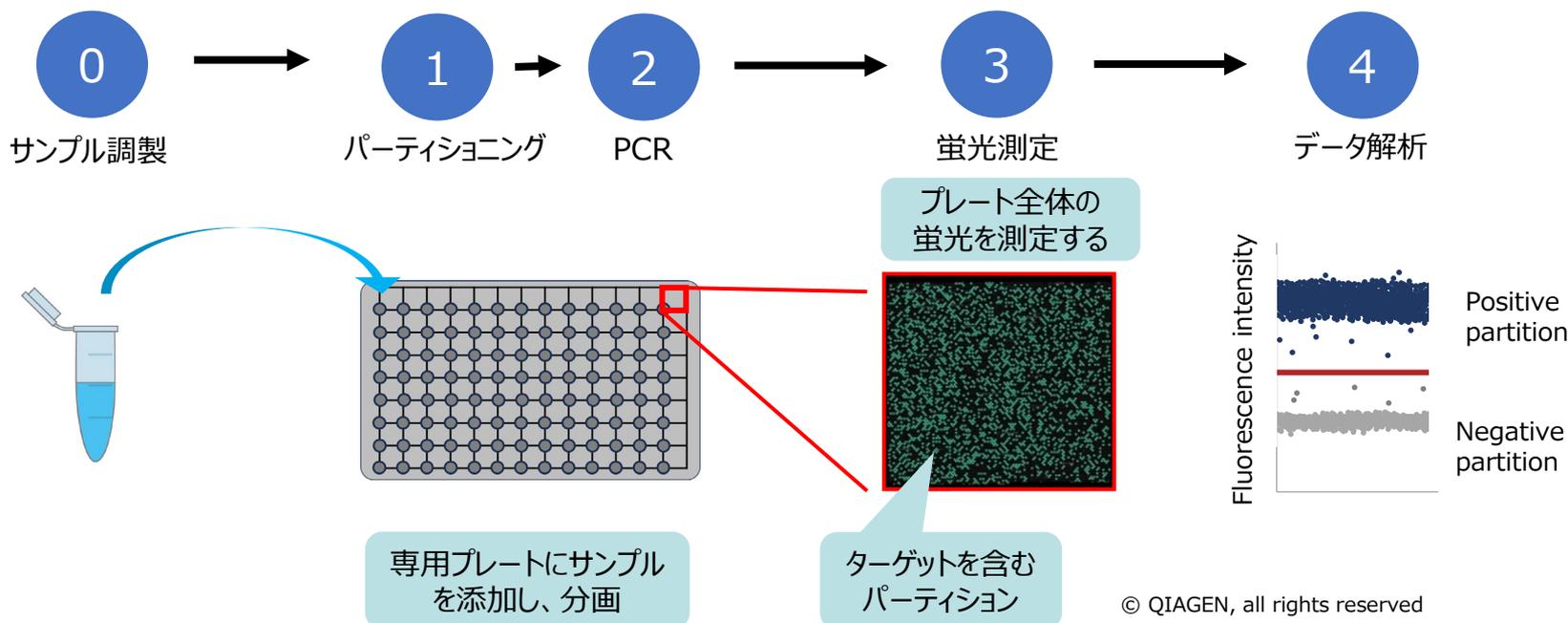
ワークフロー



サンプルを約20000個のドロップレット（エマルジョン）に分画し、PCRを実施。ドロップレットの蛍光を一つずつ測定し、サンプル中に含まれるターゲットDNAのコピー数を定量

固定パーティション方式デジタルPCR (pdPCR)

ワークフロー



サンプルをパーティションに分画し、PCRを実施。
 蛍光を測定し、サンプル中に含まれるターゲットDNAのコピー数を定量

ddPCR vs pdPCR

機種	分画の方法	分画数
ddPCR	ドロップレット方式	QX200 (Bio-Rad) <ul style="list-style-type: none"> 約20,000個 Nio system (Stilla Technologies) <ul style="list-style-type: none"> 約17,000個
pdPCR	固定パーティション方式 (プレート/チップ)	QIAquity (QIAGEN) <ul style="list-style-type: none"> 8,500個 (96 well/Plate) 26,000個 (24 well/Plate) QuantStudio AbsoluteQ (Thermo Fisher) <ul style="list-style-type: none"> 20,480個 (16 sample/plate) Digital LightCycler (Roche) <ul style="list-style-type: none"> 20,000個(8 sample/plate) 28,000個 (8 sample/plate) 100,000個(8 sample/plate)

ddPCR vs pdPCR

機種	分画数の選択
ddPCR	ドロップレット方式 であり、通常約17,000個～20,000個に分画される。分画数を選択する必要はない。
pdPCR	固定パーティション方式 のため、目的により分画数の異なるプレートを選択することができる（8,500個～100,000個）。分画数が多いほど測定の感度は高くなるが、1プレートあたりに測定できるサンプル数は少なくなる。

ddPCR vs pdPCR

機種	測定方法	スループット (96 wellあたり)
ddPCR	PCR後のドロップレットの蛍光を一つずつ測定	ドロップレット作製～測定終了まで QX200 (Bio-Rad) <ul style="list-style-type: none"> 約6時間 Nio system (Stilla Technologies) <ul style="list-style-type: none"> 約5時間
pdPCR	PCR後のプレート/チップを一度に撮影	パーティショニング～測定終了まで QIAquity (QIAGEN) <ul style="list-style-type: none"> 約2時間 (96 well/Plate) 約8時間 (24 well/Plate×4) QuantStudio AbsoluteQ (Thermo Fisher) <ul style="list-style-type: none"> 約9時間 (16 sample/plate×6) Digital LightCycler (Roche) <ul style="list-style-type: none"> 約4時間 (8 sample/Plate×12)

ddPCR vs pdPCR

機種	利点
ddPCR	<p>フローサイト方式で励起光を1区画に照射し蛍光を検出するため、</p> <ul style="list-style-type: none"> 取得できる蛍光のダイナミックレンジが広い。 ポジティブ区画/ネガティブ区画の蛍光値の分離が大きく明瞭であり、分離能がよいためレインからも情報が得られる。 各クラスターの蛍光が集束する・同一光源・検出器で同じ距離からデータを採取するため、ウェル内・ウェル間で均一な蛍光が得られる。
pdPCR	<p>プレートタイプでパーティション容量が固定であるため、</p> <ul style="list-style-type: none"> 実験環境やサンプル・試薬の影響を受けにくい。 測定終了後にサイクルを追加したり露光条件を変えて再度解析することが可能である。

qPCR及びデジタルPCR実験時の注意点及び工夫

Step	機器	注意点及び工夫
サンプル調製	デジタルPCR	デジタルPCRのサンプル調製時は調製用プレートにキャップで蓋をすることができないため、添加ミスやコンタミネーションが起きないように工夫が必要。
	共通	<p>PCR反応プレートに陰性対照、サンプル、陽性対照を添加する際は操作エリアを分けたり、専用のワークステーションを用い、クロスコンタミネーションを避ける。</p> <p>粘性の高いサンプルについては希釈してサンプルの粘性を低くする。粘性により、ddPCRでは十分な数のドロップレットが作製できない、また、qPCRではマトリックス阻害が見られるケースがある。</p>
ドロップレット作製	ddPCR	<p>ddPCRのドロップレット作製時にホコリが多い状況だとドロップレットがうまく作製できないためクリーンな環境で実施する。</p> <p>複数のプレートについてドロップレット作製を実施する場合は、待機時間を短くするためサンプル数の少ないプレートから作製する。</p>

qPCR及びデジタルPCR実験時の注意点及び工夫

Step	機器	注意点及び工夫
パーティショニング	pdPCR	プレートにサンプルを添加する際に空気が入らないようにする。 サンプル調製プレートからパーティショニングプレート/チップへのサンプル添加にマルチピペットを用いることで添加誤りの防止とスループットの改善が図れる。
		パーティショニングプレート/チップへサンプルを添加後、2時間以内にデジタルPCR装置にセットしパーティショニングを開始する必要がある機器もある。そのため、プレート作製のタイミングに気を付ける必要がある。
PCR	ddPCR	ドロップレット作製後、PCRを開始するまでの時間に制限が設けられている場合があること、また、PCRに約2.5時間を要することから、サーマルサイクラーを複数台準備することでスループットの改善が図れる。
蛍光測定	デジタルPCR	dPCRではqPCRと異なり、インターカレーター法で測定した際に非特異的な増幅を見分けることが難しい。事前にqPCR測定を実施することで非特異的増幅がないか確認することが有用。

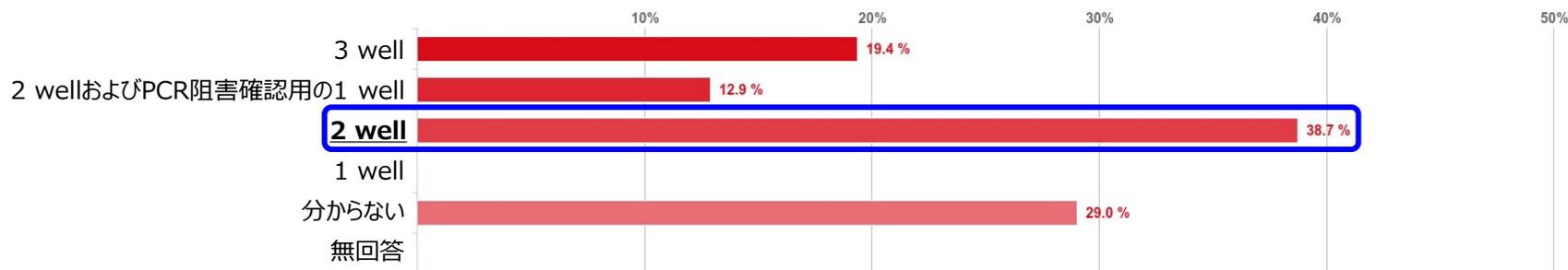
qPCR及びデジタルPCR実験時の注意点及び工夫

Step		注意点及び工夫
解析	デジタルPCR	ネガティブパーティションの蛍光強度を確認する必要があるため、必ず陰性コントロール試料を測定する。
全般	デジタルPCR	デジタルPCRではサンプルの希釈倍率を見積もるためにn=1で測定し、その結果をもとに本測定（n=3）を実施するとよい。
		デジタルPCRにてリファレンス遺伝子の測定をマルチプレックスで実施する際は、ターゲット遺伝子と同程度の発現量のものを選択する。
		デジタルPCRにてマルチコピー遺伝子を測定する際は制限酵素処理を実施する。
	共通	スループット改善のため、ターゲットが複数ある場合やリファレンス遺伝子も測定する場合はマルチプレックス測定の実施を検討する。
		スループットを上げるため、測定時のreplicate（well数）を減らせる場合がある。

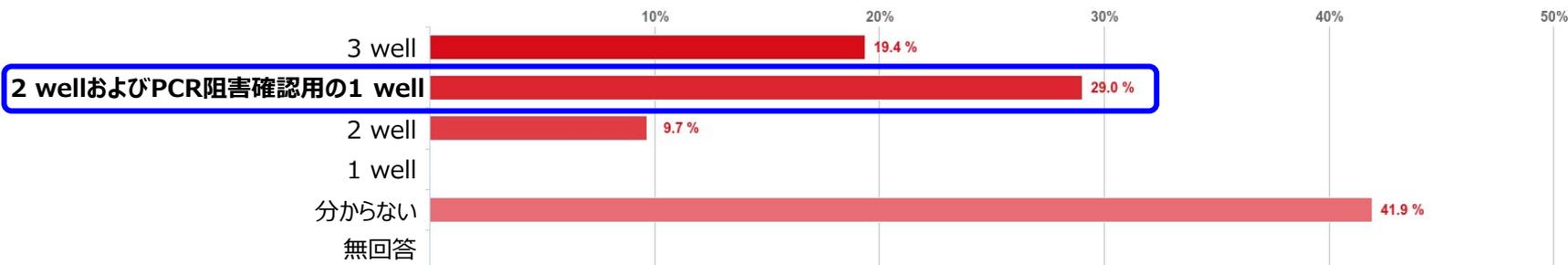
PCR実験時の注意点及び工夫

実試料測定時のreplicate (well数) の設定 (アンケート結果 : 回答数31)

探索的非臨床試験 : 製品中DNA (vgDNA等) の測定時



検証的非臨床試験・臨床試験 : 製品中DNA (vgDNA等) の測定時



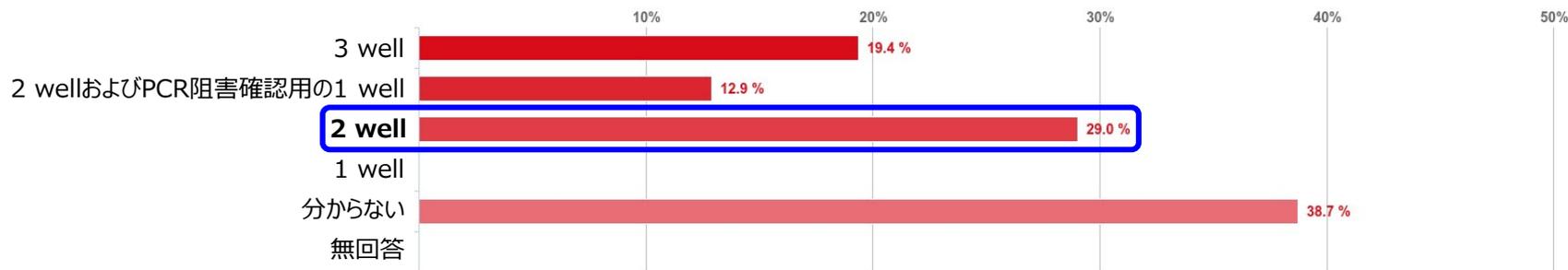
まとめ

探索的非臨床試験ではwell数を2 wellに設定、検証的非臨床試験・臨床試験では2 well+PCR阻害確認用の1 wellを設定しているという回答が最も多かった。DNA測定の探索的試験ではサンプルごとの阻害確認を実施しないケースが多いという結果であった。

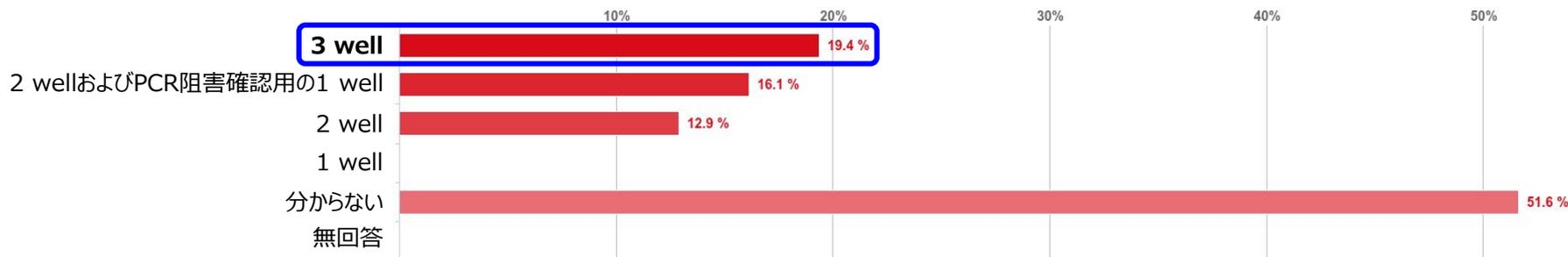
PCR実験時の注意点及び工夫

実試料測定時のreplicate (well数) の設定 (アンケート結果 : 回答数31)

探索的非臨床試験 : 発現遺伝子 (transgene mRNA発現等) の測定時



検証的非臨床試験・臨床試験 : 発現遺伝子 (transgene mRNA発現等) の測定時



まとめ

DNA測定と同様に探索的試験ではwell数を2 wellに設定しているが、検証的試験・臨床試験では3 wellに設定しているという回答が多かった。また、DNA測定の約半数ではあるが、遺伝子発現測定でもサンプルごとの阻害確認を実施されている方が多い印象であった。

dPCRの要約統計量の算出方法

要約統計量（平均値や標準偏差など）の算出においては、原則としてパーティションボリューム（パーティション分配後のPCRの反応区画の容積）を考慮する必要がある。

$$\text{平均値 (copies/}\mu\text{L)} = \frac{\sum (C_i \times V_i)}{\sum V_i}$$

C_i : サンプルiのコピー数濃度 (copies/volume)

V_i : サンプルiのパーティションボリューム (volume)

$$\text{例) サンプルA, サンプルB, サンプルCの平均値} = \frac{(C_A \times V_B) + (C_B \times V_B) + (C_C \times V_C)}{V_A + V_B + V_C}$$

$$\text{標準偏差 (copies/}\mu\text{L)} = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \bar{C})^2}{n - 1}}$$

\bar{C} : サンプル1からnまでの平均コピー数濃度 (copies/volume)

n : サンプル数

$$\text{例) サンプルA, サンプルB, サンプルCの標準偏差} = \sqrt{\frac{(C_A - \bar{C})^2 + (C_B - \bar{C})^2 + (C_C - \bar{C})^2}{3 - 1}}$$

パーティションボリュームが実測値か固定値か、どのように要約統計量算出の処理を行っているかは機種・ソフトウェアにより異なる。自身の使用する機種・ソフトウェアにおいて、パーティションボリュームや要約統計量の算出方法を確認する必要がある。

dPCR/qPCRバイオアナリシスに関する レギュレーション、公知情報の整理

qPCR/dPCRの分析法バリデーションに関するレギュレーションは無い**ICH**

- ICH S12ガイドライン「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方」(2023)
- ICH見解「ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方」(2009)

FDA

- FDA Guidance for Industry. Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products (2020).
- FDA Guidance for Industry. Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products (2015).
- FDA Guidance for Industry. Gene Therapy Clinical Trials-Observing Subjects for Delayed Adverse Events (2006).

ICH S12ガイドライン「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方」（2023）

<https://www.pmda.go.jp/files/000265131.pdf>

5.1. 分析法からの抜粋

- 組織や体液中の遺伝子治療用製品を経時的に検出する場合、確立された核酸増幅法（例：qPCR、dPCRなど）を用いて、インプットゲノムDNAに対するベクターゲノムや導入遺伝子のDNA/RNAを定量することが標準と考えられている。
- 試料（例：体液）中の細胞含量が著しく変動する場合、DNA/RNA濃度（例：copies/ μ L）を使用することができる。
- 分析法開発の一部とされる**添加回収実験**により、様々な組織や体液中で標的核酸配列の検出が可能であることを示すべきである。
- 試験法の包括的な説明を提示し、性能パラメータ（例：**感度**、**再現性**）を含め、用いられている技法の適切性を説明することが重要である。

ICH見解「ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方」 (2009)

<https://www.pmda.go.jp/files/000270116.pdf>

3.0 分析法に関する考慮事項 からの抜粋

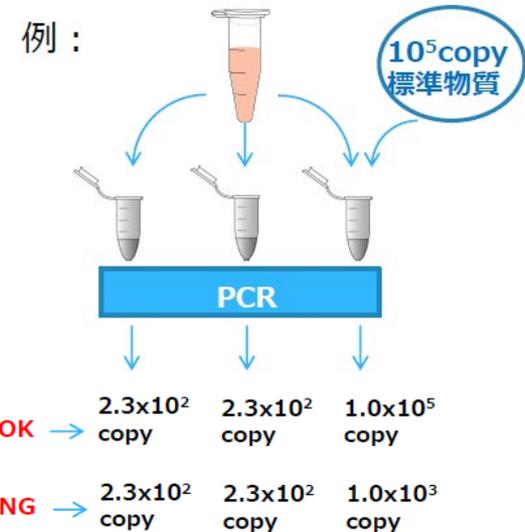
- 排出試験の実施には、適格な分析法を用いることが非常に重要である。分析法は、**特異性**、**十分な感度**、**再現性**を示すものである必要がある。伝播の可能性を定量的に推定できるように、定量的な分析法を用いることが望ましい。
- 生体試料マトリクスによる**測定妨害の評価**が重要であり、過度の妨害を避けるためには分析前にサンプルを希釈することが適切であろう。
- ウイルス/ベクターの遺伝子配列の検出には**qPCR法**の使用が推奨される。
- qPCR法の利点は、高感度、再現性、迅速性である。qPCR法の欠点は、感染性のあるインタクト (intact) なウイルス/ベクターと非感染性又は分解したウイルス/ベクターとを区別できないことである。

FDA Guidance for Industry. Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products (2020)

<https://www.fda.gov/media/113768/download>

2. Tissue Collection and Analysis からの抜粋

- 検出下限は ≤ 50 copies/ μg genomic DNA
The assay should have a demonstrated limit of quantitation of ≤ 50 copies/ μg genomic DNA, so that your assay can detect this limit with 95% confidence.
- 1組織に対し3重で試料を用意し、1試料に既知量の標準物質をスパイクする
The DNA samples should be run in triplicate for each tissue. (中略) One replicate of each tissue sample should include a spike of control DNA, including a known amount of the vector sequences.



NGの場合、サンプルを希釈して再測定

内山 朝子ほか、9th JBF Symposium, DG2017-33

https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/9th_JBF_DG2017-33.pdf

FDA Guidance (2020): 過去のガイダンスとの比較

2020年版ガイダンスには、**組織サンプルの均一性**に関する記述は無い

2. Tissue Collection and Analysis からの抜粋

FDA (2006) ¹⁾	FDA (2020)
検出下限は ≤ 50 copies/ μg genomic DNA (前頁参照)	
1組織に対し3重で試料を用意し、1試料に既知量の標準物質をスパイクする (前頁参照)	
<p>組織全体および実際に使用するサンプルの大きさを考慮し、各組織のn数が適切な理由を述べる</p> <p>Provide a rationale for the number of replicates for testing per tissue, taking into account the size of the sample relative to the tissue you are testing.</p>	<p>In the final study report, individual animal data should be provided. The method for how values below the Limit of Quantitation of the assay are categorized and calculation of the median or mean value should be specified.</p>

- 1) FDA Guidance for Industry. Gene Therapy Clinical Trials-Observing Subjects for Delayed Adverse Events. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/GOVPUB-HE20-PURL-LPS112486/pdf/GOVPUB-HE20-PURL-LPS112486.pdf>

qPCR/dPCRの分析法バリデーションに関するレギュレーションは無いが、各コンソーシアムよりWhite Paperが発出されている。

MIQE

- **qPCR:** Bustin et al. Clinical Chemistry (2009).
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- **dPCR:** Group et al. Clinical Chemistry (2020).
<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125>

White Paper (qPCR & dPCR)

- **AAPS:** Hays et al. The AAPS Journal (2024).
<https://doi.org/10.1208/s12248-023-00880-9>
- **WRIB:** Mora et al. Bioanalysis (2024). <https://doi.org/10.4155/bio-2024-0024>
- **GCC:** Wissel et al. Bioanalysis (2022). <https://doi.org/10.4155/bio-2022-0109>

AAPS White Paper (2024): バリデーション項目の比較

Item	JBF (2021) ¹⁾	AAPS (2024)
Precision & Accuracy	✓	✓
PCR efficiency & Linearity	✓	✓
Matrix interference	✓	—
Dilution linearity	—	✓ (If applicable)
Co-linearity	—	✓ (If applicable)
Sensitivity	✓ : LOD, LLOQ	✓ : LOB (If applicable), LOD, LLOQ
Specificity	✓	✓
Selectivity	—	✓
Robustness & Ruggedness	—	✓
Stability	✓	✓ (If applicable)
Extraction efficiency	✓	✓

1) 花田 雄志ほか、13th JBF Symposium, DG2021-50

https://bioanalysisforum.jp/images/2022_13thJBFS/DG2021-50.pdf

16th JBF Symposium, DG2024-69

AAPS White Paper (2024): Validation Acceptance Criteria からの抜粋 ①

Item	qPCR	dPCR
Precision & Accuracy Sensitivity (LLOQ)	Intra/Inter-assay precision: $\leq 30\%CV$ for QCs, $\leq 50\%CV$ for LOQs.	
	Intra/Inter-assay accuracy: -50 to 100%RE.	$ \%RE \leq 30$ for QCs, ≤ 50 for LOQs.
PCR efficiency & Linearity	$R^2 \geq 0.98$, Slope between -3.1 and -3.6 (90-110% efficiency). The 95% confidence interval of the estimated reaction efficiency can also be reported.	
Dilution linearity (If applicable)	Precision & accuracy of concentrations within the ROQ conform to that established in overall assay P&A.	
Co-linearity (If applicable)	PCR efficiency is within acceptable criteria for both calibrator curves (qPCR). The 95% confidence interval of the estimated reaction efficiencies can also be reported.	
Sensitivity (LOB, if applicable)	LOB < LOD. LOB is reported as determined.	

AAPS White Paper (2024): Validation Acceptance Criteria からの抜粋 ②

Item	qPCR/dPCR
Sensitivity (LOD)	LOB < LOD ≤ LLOQ. LOD should be reported as determined with 95% confidence interval.
Specificity & Selectivity	100% of unspiked individual lots must demonstrate measured (dPCR) or interpolated results (qPCR) below the LOD. At least 8 out of 10 spiked individual lots or 67% (2/3 individuals) should meet the P&A acceptance criteria for LLOQ, or QCs if used.
Robustness & Ruggedness	P&A of results for runs with varied analysts, instruments, and days should demonstrate P&A conforming to that established in the validation P&A assessment. For reagent comparability, each calibrator curve assessed should demonstrate linearity (qPCR). QCs prepared in each respective master reaction mix should yield PCR results within established P&A criteria (qPCR/dPCR).

**AAPS White Paper (2024): Validation Acceptance Criteria からの抜粋 ③**

Item	qPCR/dPCR
Stability (If applicable)	Stability QC sample yields a mean result which is 70–130% of the baseline QC sample result and <30%CV between replicates.
Extraction efficiency	Generally acceptable with a spike recovery between >20% and <120%. Values outside of this range may be acceptable based on data obtained during method development optimization.

各論 ① : Precision & Accuracy

AAPS White Paper (2024)

Accuracy の適合基準の設定根拠 (qPCR)

Intra and inter-assay accuracy of -50 to $100\%RE$ on interpolated copies for qPCR, due to the doubling nature of qPCR reactions, where a difference of 1 Cq can land the interpolated result within $1/2$ or $2\times$ of a given nominal concentration.

本DGの見解 :

JBF DG¹⁾においても、qPCR の Cq値変動の適合基準を $<\pm 0.75$ としている。

Variation at the time of measurement is often deemed insignificant if the variation in Cq values is ± 0.75 or less. This corresponds to a variation of -41 to $+68\%$ when Cq values are converted to copy numbers.

一方 dPCR では、qPCR (リアルタイムでの PCR 増幅量のモニター) とは異なり、エンドポイントでのPCR増幅量をモニターしているため、dPCR により Accuracy の改善が期待される。

1) Uchiyama et al. Bioanalysis (2022). <https://doi.org/10.4155/bio-2022-0190>

各論 ② : Sensitivity

AAPS White Paper (2024)

LOB およびLOD の評価方法 (Statistical/Empirical Approach)**LOB (Limit of Blank):**

LOB may be selected **empirically at a 95% confidence** (19/20 copies are negative in the assay) independent of PCR platform.

LOB at 95% confidence limit may also be derived **statistically** in dPCR if one assumes a Normal/Gaussian distribution of analytical signal response (positive partitions) from blank samples using the equation below:

$$\text{LOB} = \text{Mean}_{\text{NTC}} + 1.645(\text{SD}_{\text{NTC}})$$

LOD (Limit of Detection):

In the **empirical approach**, the LOD is determined to be the target template concentration at which **95% of replicates have assay response values exceeding those of the previously determined LOB** (lower Cq or greater positive partitions).

An alternative **statistical approach** may be applied for linear-scaled dPCR LOD determinations, much like with the determination of LOB, with the following formula:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645(\text{SD}_{\text{low concentration sample}})$$

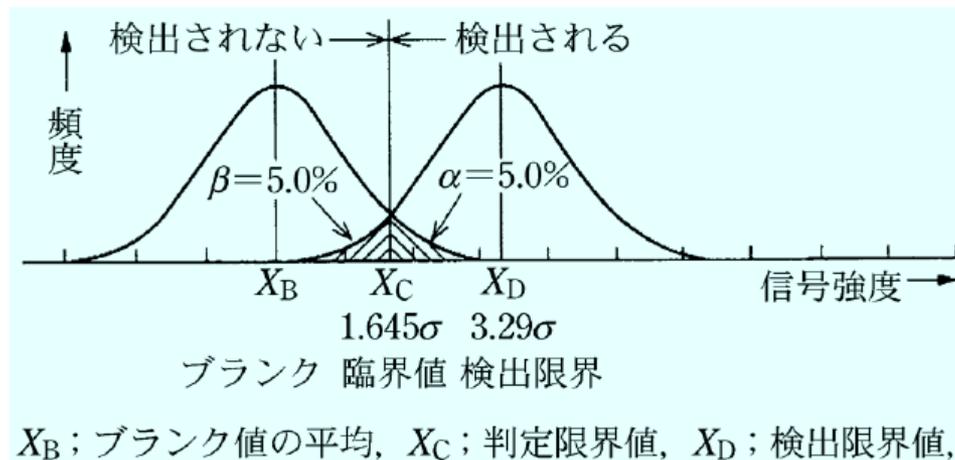
“low concentration sample”: A sub-LLOQ concentration, which may contain as few as 3 nominal copies.

各論 ② : Sensitivity (続き)

本DGの見解 :

Statistical Approach による **LOB** の算出方法は、右図¹⁾の**判定限界値** (X_C) を参照。

1) 上本 道久、ぶんせき (2010) 5:216-221.



LOD に関して、AAPS White Paper では、一例として LOB および “low concentration sample” の実測値から算出する手法²⁾が紹介されている。

As defined in EP17, LoD is determined by utilising both the measured LoB and test replicates of a sample known to contain a low concentration of analyte³⁾. (中略) Again assuming a Gaussian distribution of the low concentration samples, 95% of values will exceed the previously defined LoB, and only 5% of low concentration samples will produce values below the LoB and erroneously appear to contain no analyte.

2) Armbruster et al. Clin Biochem Rev (2008) 29(Suppl 1):S49-52.

3) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document EP17 (2004).

各論 ③ : Matrix Interference

AAPS White Paper (2024)

評価するマトリクス

When multiple tissues and/or biofluids are to be analyzed in a study, **each tissue and biofluid should be evaluated for matrix interference in method development** and guide the selection of a representative matrix for validation. (中略) The performance of two matrices is considered equivalent if the measured copy number of candidate matrix spiked controls **fall within $\pm 20\%RE$** of the measured copy number of comparator matrix spiked at equal concentrations.

本DGの見解 :

AAPS White Paper では、バリデーションに用いるマトリクスの選定のため、Method Development にて各々の Matrix Interference を評価すべきとされている。**qPCR** では、PCR阻害物質を含有するマトリクス (Skin, Muscle, Bone, Blood) ¹⁾ に関して注意を要する。

一方 **dPCR** では、PCR阻害によりシグナルが低下した場合も、ポジティブ・ネガティブの分離には影響を及ぼさないため、定量値がPCR阻害の影響を受けにくい。**dPCRにより Matrix Interference の改善が期待される。**

1) Schröder et al. Cells (2023). <https://doi.org/10.3390/cells12131788>

各論 ③ : Matrix Interference (続き)

本DGの見解 (続き) :

Matrix Interference の評価方法の一例¹⁾を以下に紹介する。

Method Development または バリデーションにて、**代表的なマトリクス**の評価を実施する。

- It is recommended that the analytical site performs a thorough evaluation of the potential matrix effects of **the commonly tested tissues, blood, and biofluids** using an internal established assay when the analytical site establishes its qPCR services.
- DNA purified from urine, serum, plasma, or other sample types that **require plate loading by volume** rather than concentration should be evaluated to ensure that the loading volume will not impact amplification.
- Furthermore, potential matrix effects should be evaluated if **a novel tissue** is to be tested or a **new purification method** is implemented prior to the start of a new study sample analysis.
- Otherwise, historical data and **the inclusion of the third spiked well during sample analysis** should provide enough data to assess any possible issues with amplification.

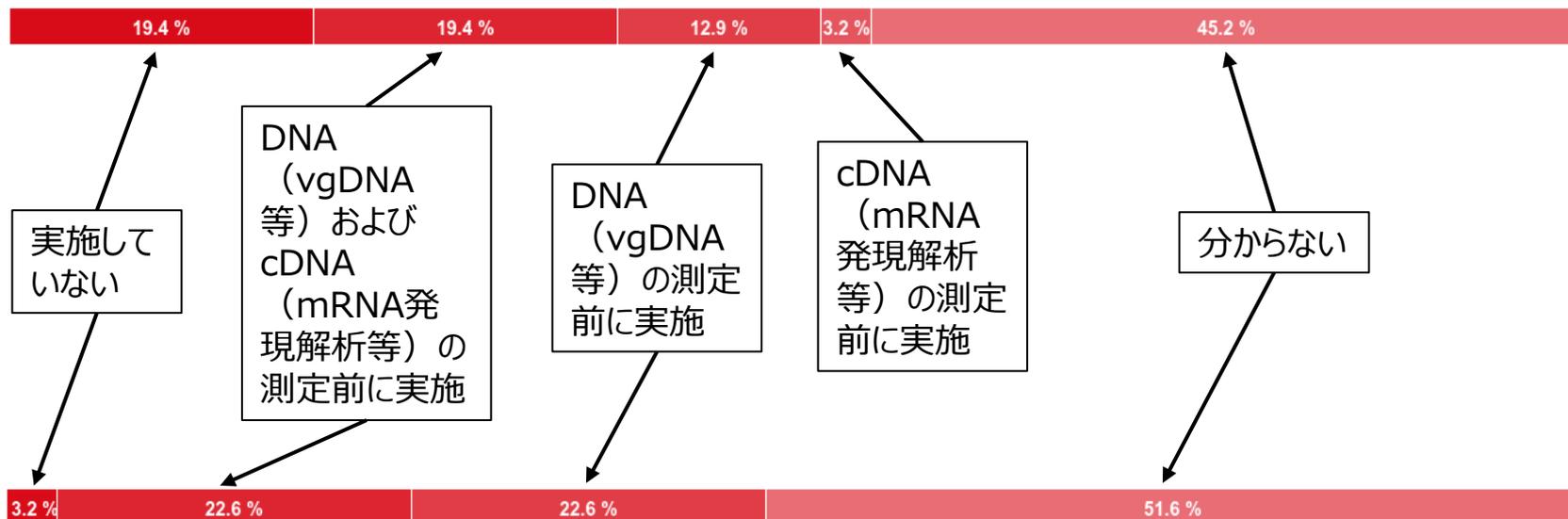
1) Ma et al. Mol Ther Methods Clin Dev (2021). <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>

マトリクスエフェクト (PCR阻害)

Q18. 実試料の測定前にマトリクスエフェクト (PCR阻害) の検討を実施していますか？実施している場合、どのように実施していますか？

(回答数: 31)

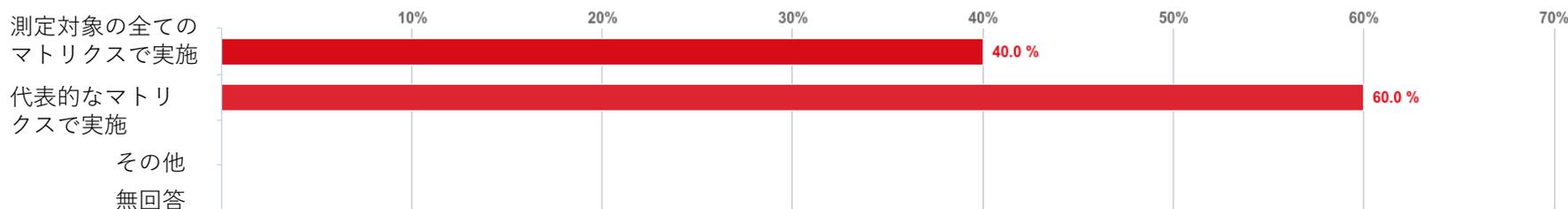
探索的
非臨床
試験



<http://bioanalysisforum.jp/>

マトリクスエフェクト (PCR阻害)

Q19. マトリクスエフェクト (PCR阻害) の検討をどのように実施していますか？
(回答数: 10)



考察 (マトリクスエフェクト、Q18-19):

- 探索的非臨床試験および検証的非臨床試験・臨床試験において、実試料の測定前にマトリクスエフェクトの評価を実施している施設が多数であった。
- DNA (vgDNA等) および cDNA (mRNA発現解析等) の評価を実施している施設と、DNAの評価のみ実施している施設はほぼ同数であった。

各論 ④ : Reference Material

AAPS White Paper (2024)

標準物質の選択

Using the **drug product** and a full process standard curve is preferable, but the choice of reference material should be guided by assay COU.

Biodistribution studies: **Plasmid DNA** is acceptable given that vector DNA is often no longer encapsidated and may appear in episomal or other forms following in vivo processing. (中略) Delivered encapsidated ssDNA vector constructs are likely to be taken up into cells over time, released from their capsids, and assembled into dsDNA episomes. Therefore, the target analyte template is unlikely to remain encapsidated in tissues and biofluids for the duration of the study.

Shedding studies: **Encapsulated material** is preferred, but if not feasible, extraction efficiency studies should be executed to understand quantification differences between encapsulated material and free-plasmid DNA. (中略) In vector shedding studies, the aim is to detect potentially infectious material, so drug product would be the ideal assay positive control material.

各論 ④ : Reference Material (続き)

AAPS White Paper (2024)標準物質の選択 (続き)

RT-PCR assays: An RNA template (synthesized or purified from dosed animals in early studies) is advantageous in that it more closely mimics the target nucleic acid molecule and allows an assessment of the entire PCR process from reverse transcription to amplification.

Assay validation: It is recommended to use drug product or plasmids manufactured for drug product (in the case of cell and gene therapies) when possible.

各論 ④ : Reference Material (続き)

本DGの見解 :

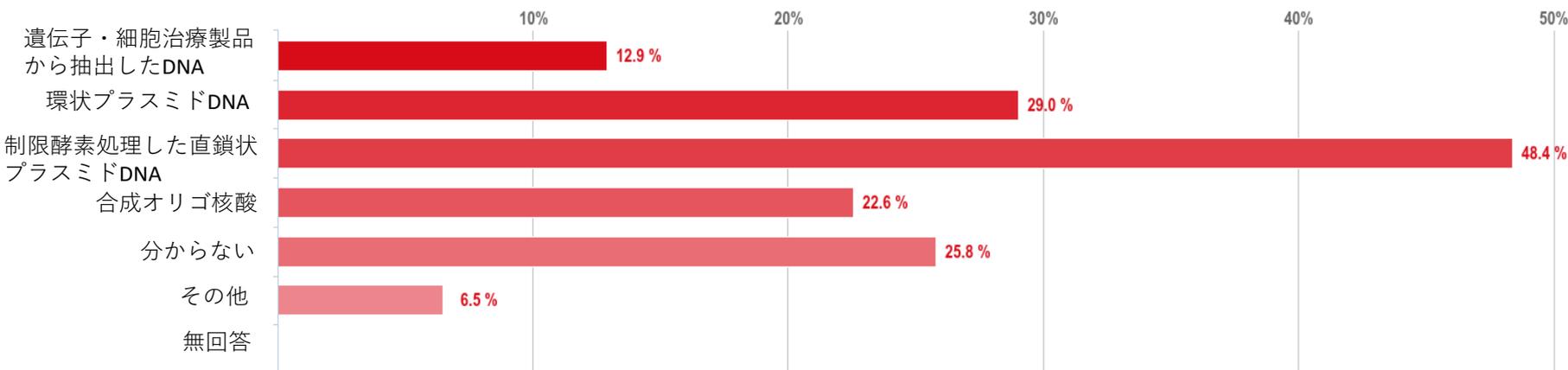
DGサポーターの現状は、アンケート Q25 「DNAコピー数定量の標準試料に何を using していますか？」の回答 (下記) の通り。

- 遺伝子治療・細胞治療製品から抽出したDNA (12.9%)
- 環状プラスミドDNA (29.0%)
- 制限酵素処理し直鎖状にしたプラスミドDNA (48.4%)
- 合成オリゴ核酸 (22.6%)
- その他 (6.5%)

AAPS White Paper では、試験目的に応じた標準物質の選択と、代替標準物質を用いる場合 **Co-linearity** (各論⑤) の検討が提唱されている。

Shedding study の標準物質としてカプシド体が推奨されている。PCRではカプシド内外のDNAの測り分けができないものの、サンプル中のDNAとの同等性の観点から、カプシド体から抽出した1本鎖DNAの使用を推奨していると解釈した。

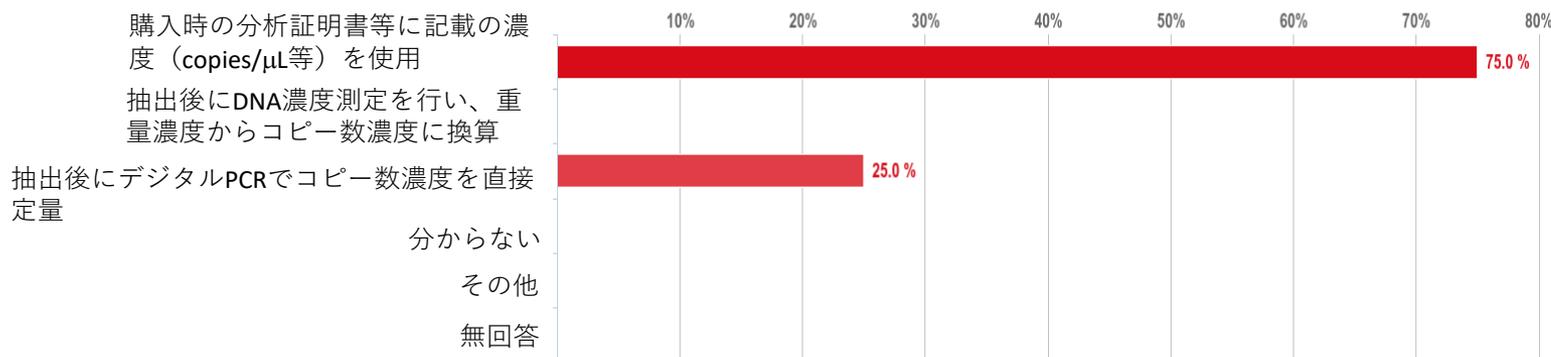
Q25. DNAコピー数定量の標準試料に何を用いていますか？ (回答数: 31)



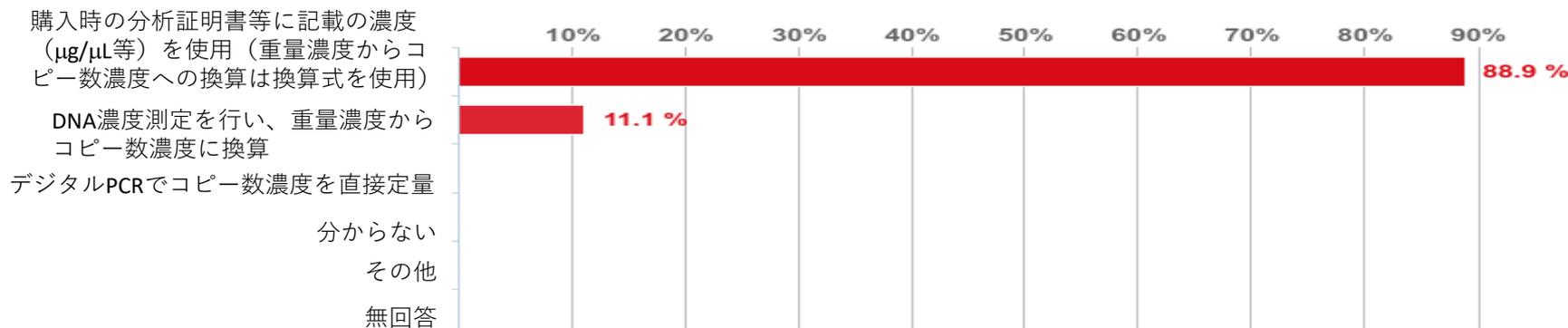
その他 (自由記載):

- ケース by ケース
- 細胞治療製品ライセンス

Q26. Q25で「遺伝子治療・細胞治療製品から抽出したDNA」と回答した場合、標準試料のコピー数濃度はどのように算出していますか？(回答数: 4)

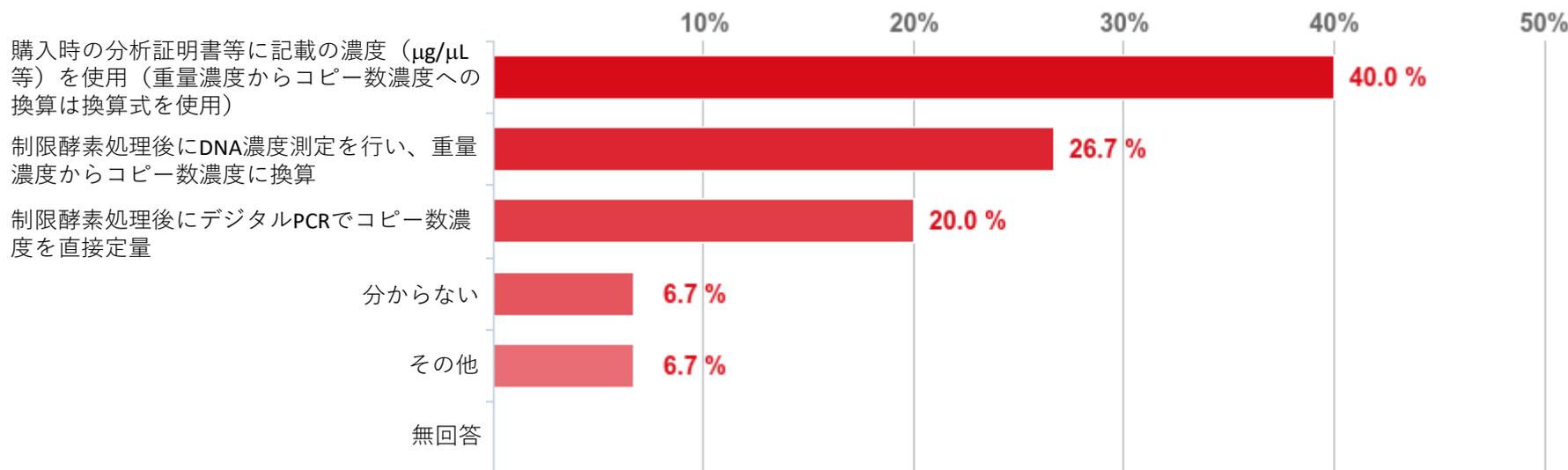


Q27. Q25で「環状プラスミドDNA」と回答した場合、標準試料のコピー数濃度はどのように算出していますか？(回答数: 9)



Q28. Q25で「制限酵素処理し直鎖状にしたプラスミドDNA」と回答した場合、標準試料のコピー数濃度はどのように算出していますか？

(回答数: 15)

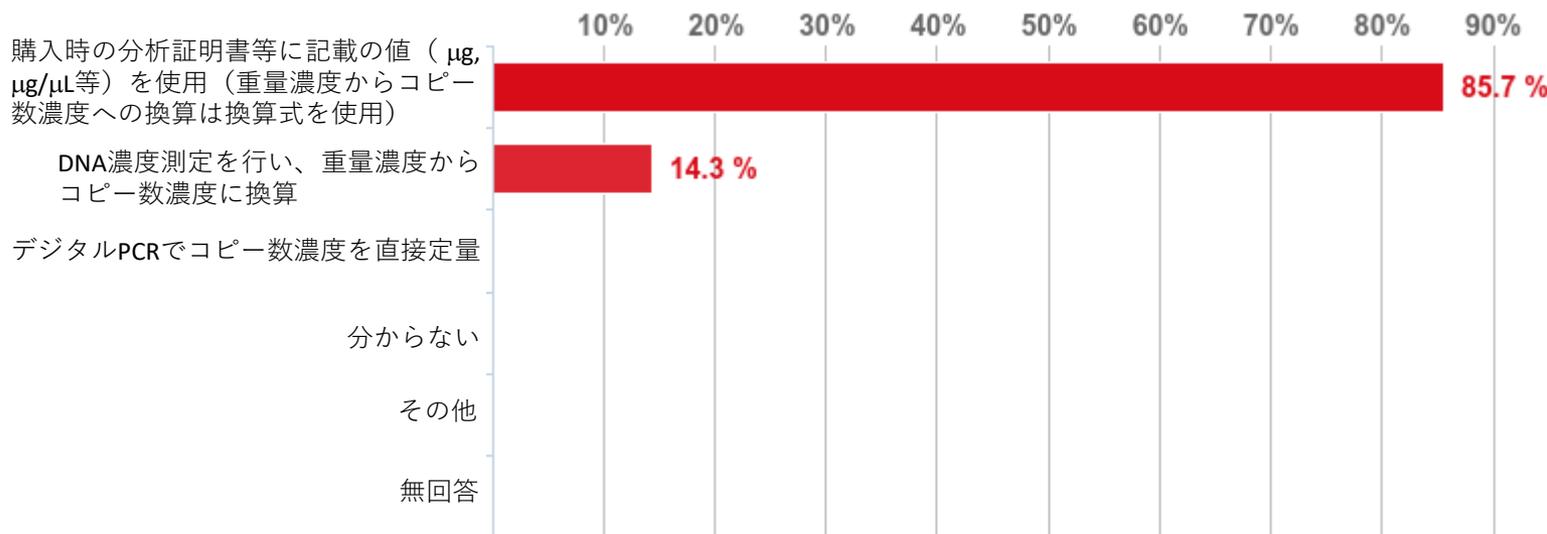


その他 (自由記載):

- 探索では重量濃度からコピー数濃度に換算、バリではデジタルPCRでコピー数濃度を予定。

Q29. Q25で「合成オリゴ核酸」と回答した場合、標準試料のコピー数濃度はどのように算出していますか？

(回答数: 7)



考察 (標準試料、Q25-29):

- 標準試料として、プラスミドDNA (制限酵素処理後のプラスミド>環状プラスミド) および合成オリゴ核酸が多く施設で用いられていた。
- コピー数濃度は、分析証明書等に記載の数値を使用している施設が多数であった。一方、一部の施設にてデジタルPCRによるコピー数濃度が使用されていた。

各論 ⑤ : Co-linearity

AAPS White Paper (2024)

代替標準物質の同等性確認

When it may not be desirable or possible to employ actual drug product for use as a calibrator or QC material in an assay, **it becomes necessary to demonstrate that a surrogate reference material (e.g., plasmid DNA) behaves equivalently in the assay.** An assessment of linearity between the two reference materials in the same nucleic acid matrix would support the substitution of the test article with the surrogate reference material.

本DGの見解 :

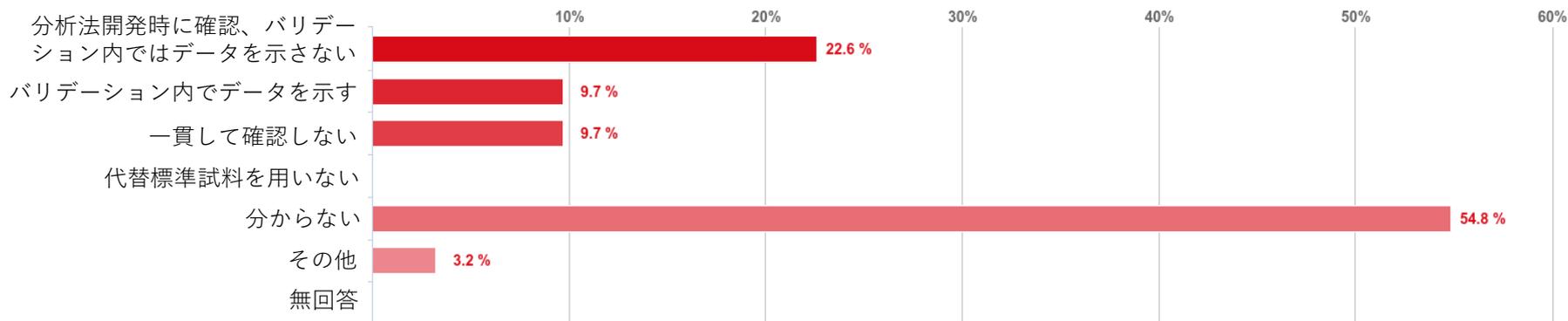
AAPS White Paper では、投与製品および代替標準物質（プラスミドDNA等）から作成した検量線を比較して同等性を評価することとしている。

Co-linearity is typically performed in development to allow for the use of any surrogate template in further development and validation. If an assessment of co-linearity is desirable for validation, **perform at least a single run in which identical calibrator curves or dilution series are created with each reference material and perform linear regression analysis on both.**

代替標準試料の同等性確認

Q31. 検証的非臨床試験，臨床試験にてプラスミド等の代替標準試料を用いる場合，遺伝子治療・細胞治療製品中のターゲットDNA（実試料中の分析対象）との同等性を確認していますか？

(回答数: 31)



<http://bioanalysisforum.jp/>

その他 (自由記載):

- バリデーション内で被験物質を用いた添加回収実験を実施し、分析対象が検出できることを確認しています。

考察 (代替標準試料の同等性確認、Q31):

- 分析法開発時またはバリデーション時に同等性の確認を実施している施設が多数であった。

各論 ⑥ : Extraction Efficiency

AAPS White Paper (2024)添加回収実験に用いる標準物質

In validation, spike a known amount of **drug product and/or reference material (if no drug product availability or not applicable)** at a minimum of one QC level that is within the standard curve range (e.g., 10 times LLOQ, or MQC or HQC levels) in biofluids and representative tissue homogenates and perform at least three independent extractions in each matrix (as applicable, depending on assay COU).

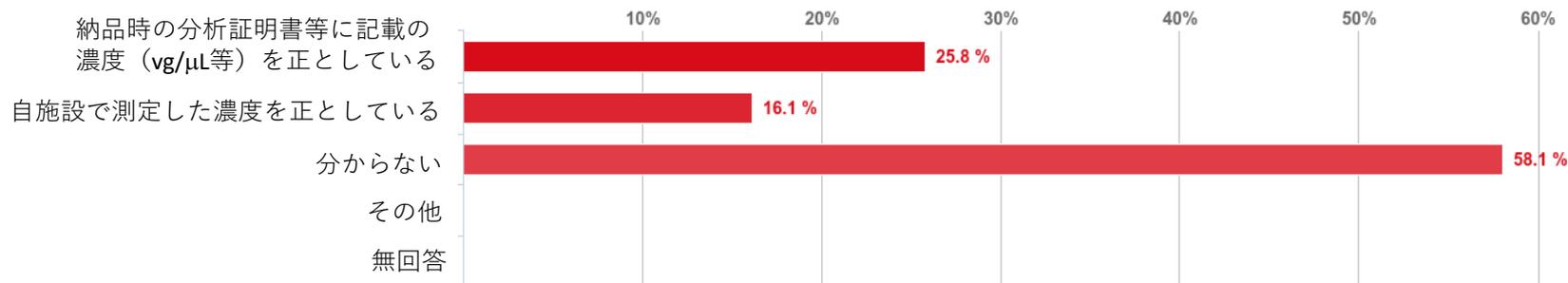
本DGの見解 :

AAPS White Paper と同様、添加回収実験での投与製品の使用を推奨する（投与製品の使用が難しい場合は、代替標準物質の使用も可とする）。

投与試料の添加濃度

Q30. 検証的な非臨床in vivo試験（毒性試験等）に用いる遺伝子治療製品の濃度（投与液濃度，安定性評価や生体内分布試験等に用いるQCサンプルの濃度算出に用いる）はどの値を正としていますか？

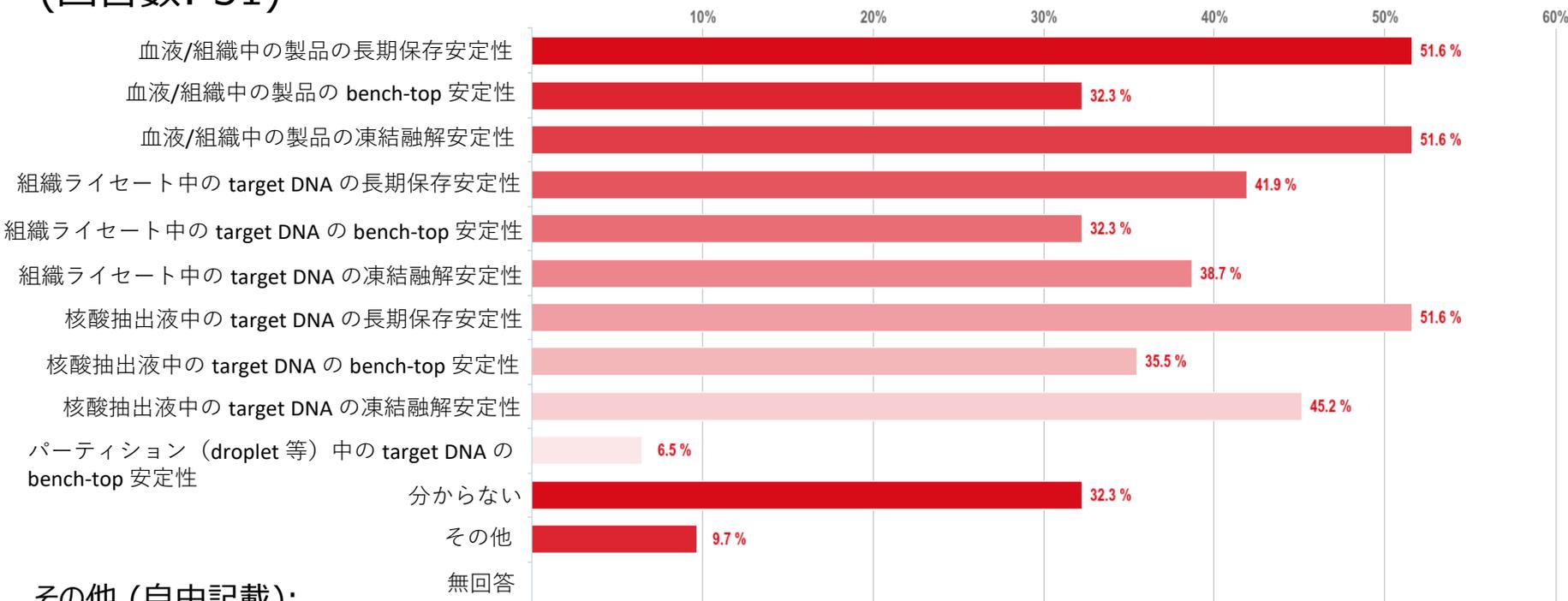
(回答数: 31)



考察 (投与試料の添加濃度、Q30):

- 分析証明書等に記載の濃度を正としている施設が、自施設で測定した濃度を正としている施設より若干多かった。
- 実施する試験により方針が異なる可能性 (例: 毒性試験とそれ以外の試験) も考えられた。

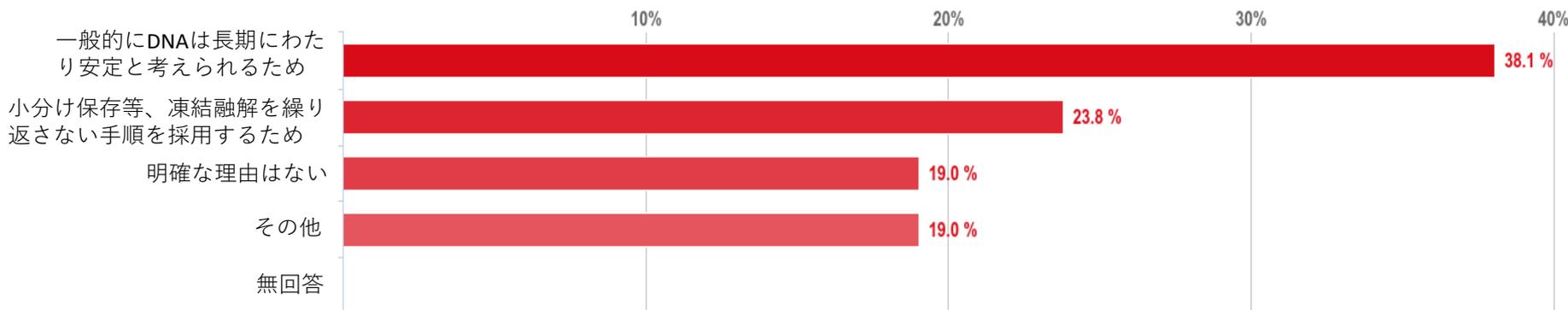
Q15. 検証的非臨床試験・臨床試験のためのバイオアナリシス分析法のバリデーションにおいて、遺伝子治療製品・細胞治療製品，ターゲットDNAの安定性評価はどこまで必要だと考えますか。
(回答数: 31)



その他 (自由記載):

- 実際に保管する可能性のある時点での安定性を取得。抽出まで一気に進める場合が多いが、組織ライセートで止める場合は組織ライセート中の安定性確認も必要。
- ドロップレット中の冷蔵安定性 (JBF DG注: PCR反応後から分析まで)
- 測定対象がDNAの場合は要らないかもしれない。

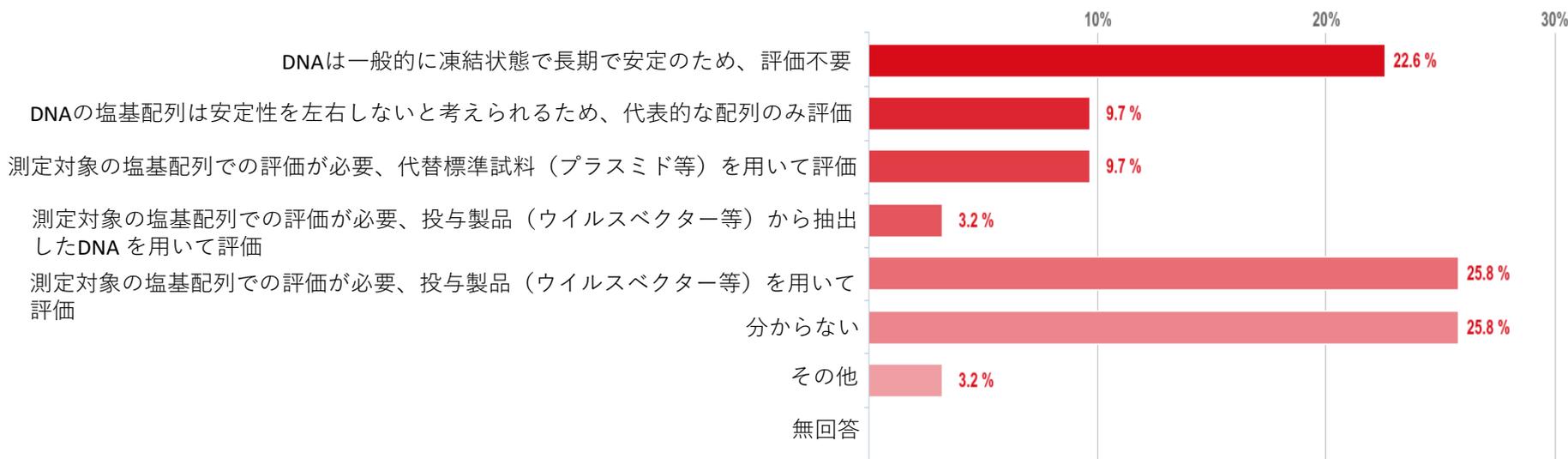
Q16. Q15で全てもしくは一部の凍結融解安定性を必要と回答されなかった方にお伺いします。その理由を教えてください。
(回答数: 21)



その他 (自由記載):

- 組織ライセートの凍結保存を想定していない。
- 組織については均一なサンプルを作成するのが難しいため、実施は不要と考えています。ライセートについては必要があれば実施します。
- 等々

Q17. 検証的非臨床試験・臨床試験におけるDNAの安定性の担保の考え方（本設問は血液中安定性を想定）について、最も近いものを選んでください。経験がない場合もどのように考えるか想定して選択してください。（回答数：31）



その他（自由記載）:

- 測定対象として塩基配列での評価が必要であり、投与製品での評価が望ましいが、代替品での評価も可とする。

考察（安定性評価、Q15-17）:

- 多くの施設において、試料の保管から前処理までの各ステップに対応した安定性評価が実施されていた。
- サンプル中DNAの安定性について、投与製品や代替標準試料等を用いて評価している施設が多い一方で、一部の施設からDNA安定性の評価を不要とする考えが示された。評価を実施しない場合は、科学的合理性のある説明が必要と考える。

レギュレーション :

Biodistribution および Shedding に関するレギュレーションでは、qPCR法が推奨されている。

ICH S12ガイドライン (2023) では、従来の qPCR法に加え dPCR法が標準と考えられている。

分析法バリデーション :

レギュレーションはまだ無いものの、近年、各コンソーシアムよりWhite Paperが発出された。

AAPS White Paper (2024) では、qPCR および dPCR のバリデーション項目および適合基準が示された。

dPCRにより、Accuracy および Matrix Interference の改善が期待される。



dPCR/qPCRを利用する実験関連の 全般的な留意点

qPCR及びdPCRにおける定量方法について

◆ qPCR及びdPCRにおける定量方法は2種類ある

定量方法	計算方法	検量線の必要性	内在性コントロールの必要性	使用用途
絶対定量 (qPCR及びdPCR)	検量線法	あり	必要に応じて同時に測定しておくことで、補正が可能である ⇒アンケートを実施した	ベクター力価測定、遺伝子治療製品の生体内分布、等
相対定量 (qPCRのみ)	$\Delta\Delta C_t$ 法	なし 標的遺伝子と内在性コントロールの増幅効率が同程度であることを、希釈系列を作成して確認しておくことが望ましい	あり	遺伝子発現解析
	Pfaffl法	あり	あり	遺伝子発現解析
	Vandesompele法	なし	あり (2種類以上)	遺伝子発現解析

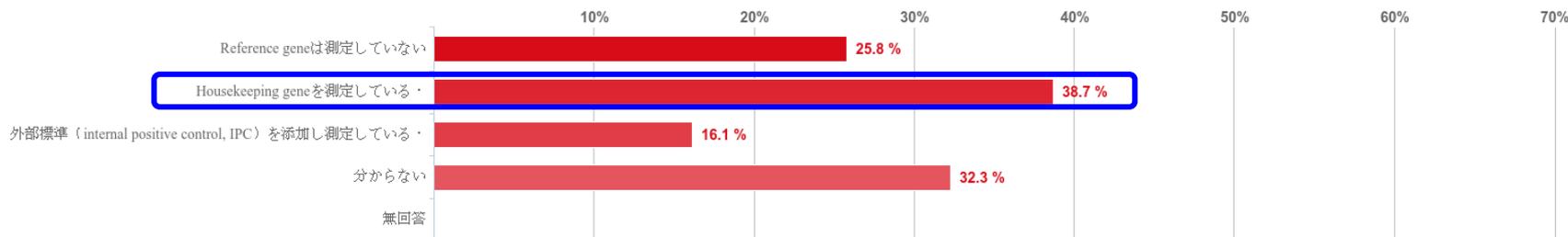
定量方法に応じて検量線及び内在性コントロールを適切に選定する必要がある

内在性コントロール (Reference gene, Housekeeping gene) : 実験サンプルで同様のレベルで発現しているRNAまたはDNA
 外来性コントロール (IPC, Internal Positive Control) : 実験サンプルに含まれない配列を有するRNAまたはDNA

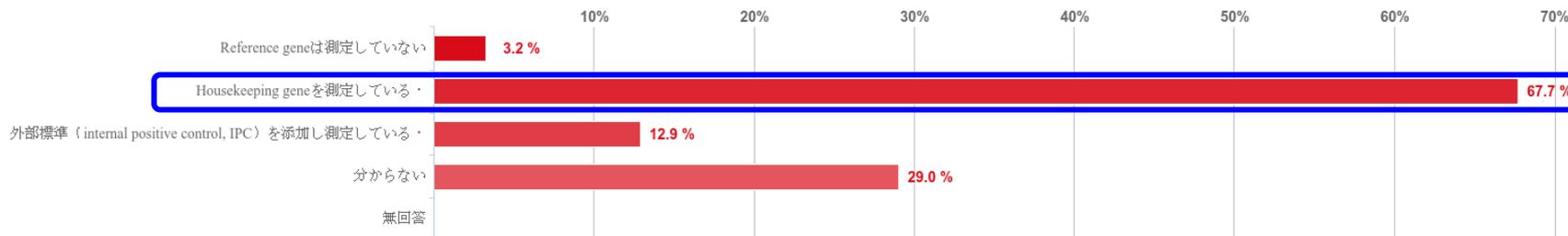
絶対定量における内在性コントロール測定の有無

回答数：31

DNA（遺伝子・細胞治療製品中のターゲットDNA）の測定時



cDNA（mRNA発現解析）の測定時

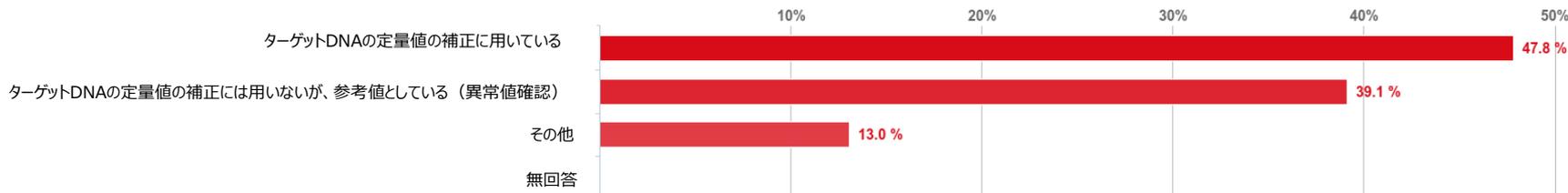


考察

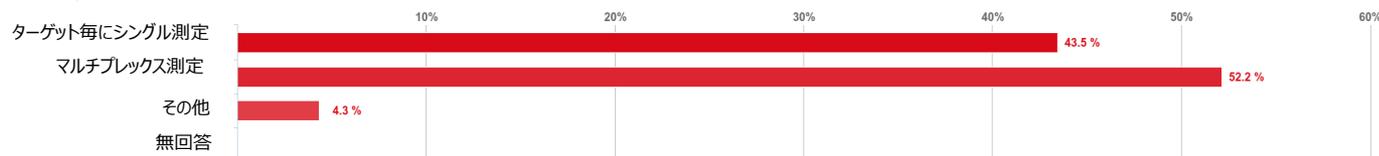
- cDNA測定時に内在性コントロールを測定する施設が多かった。
- 続けて、内在性コントロールを測定する目的についてアンケートを実施した。

絶対定量における内在性コントロール測定の目的と方法

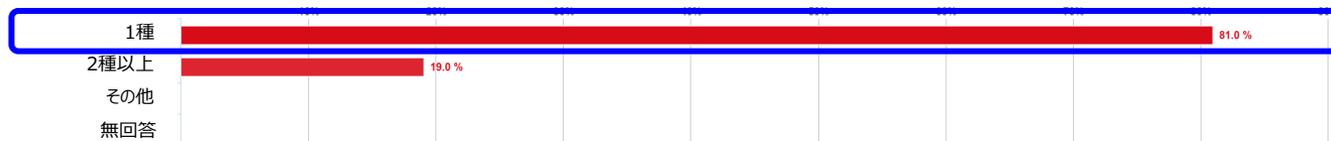
測定目的（回答数：23）



測定方法（回答数：23）



内在性コントロールの数（回答数：21）



考察

- ターゲットDNAの補正に用いる施設と、補正には用いないが異常値が見られた時の確認用に内在性コントロールを置いている施設に分かれた。
- 測定方法もわずかにマルチプレックス測定を実施している施設が上回った。

内在性コントロールの選択について

遺伝子名	用途	機能	留意点
GAPDH	DNA、遺伝子発現ともに使用可	糖代謝に関与する酵素で、広範な細胞タイプで発現が安定	いくつかの癌細胞、腫瘍抑制因子で処理した細胞、低酸素状態およびマグネシウムまたはインスリン処理した試料においては、過剰発現されることが知られている ¹⁾
ACTB	DNA、遺伝子発現ともに使用可	細胞骨格の構成要素であり、多くの細胞で安定して発現	乳房上皮細胞、割球、ブタ組織およびイヌ心筋など多くの条件下で一貫性が疑問視されている
rRNA	遺伝子発現のみ	タンパク質合成に関与するリボソームの構成要素で、ほぼすべての細胞で安定して発現	中程度または低い発現量のターゲットの標準化には、その存在量が問題とされている

目的に応じて検量線及び内在性コントロールを適切に選定する必要がある

1) Sandra K Becker et al. Int J Mol Sci (2021)

内在性コントロールの選択について

遺伝子名	用途	機能
TFRC	DNAで使用可	鉄の細胞内への輸送に関与する受容体タンパク質
STAT6	DNAで使用可	IL-4受容体の主要な細胞質内シグナル伝達物質

- ✓ 選択を誤ると、ターゲット遺伝の発現を過大／過小評価する可能性がある
- ✓ 選択時に考慮するポイントとして、安定して発現しているか、mRNAの総量と相関しているかなどが挙げられる
- ✓ dPCRでマルチプレックスを行う場合、標的遺伝子と内在性コントロールの測定レンジを同等にする必要がある

内在性コントロールの選択について

1

市販されているプライマーセットなどを使用して、対象となるcDNAを網羅的に測定する。以下の比較ができるサンプルを用意する。

- ✓ 希釈直線性・増幅効率
- ✓ 組織間差*)

2

2～3遺伝子のプライマーセットに絞り込む。

- ✓ 増幅効率は良好か
- ✓ 組織間で Universalに発現しているか*)

3

選定したプライマーセットの最適化を行う。

- ✓ 温度条件
- ✓ プローブ付与
- ✓ マルチプレックス

*) 異なる組織間の遺伝子発現を比較する場合に実施する

qPCRにおける相対定量について

◆ $\Delta\Delta Ct$ 法

標的遺伝子発現の相対比 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ target}) - (Ct \text{ ref})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ sample}) - (\Delta Ct \text{ control})$$

◆ Pfaffl法

標的遺伝子発現の相対比 = $\frac{(E \text{ target})^{\Delta Ct \text{ target}}}{(E \text{ ref})^{\Delta Ct \text{ ref}}}$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ control}) - (Ct \text{ sample})$$

$$E = 1 + \text{増幅効率}$$

◆ Vandesompele法

標的遺伝子発現の相対比 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ target}) - (\text{Mean of } Ct \text{ ref genes})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ sample}) - (\Delta Ct \text{ control})$$

- ✓ 単一組織内で内在性コントロールが一種類の場合は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いる
- ✓ ターゲットと内在性コントロールの増幅効率が一致しない場合はPfaffl法を用いる
- ✓ 複数の内在性コントロールを用いる場合にはVandesompele法を用いる

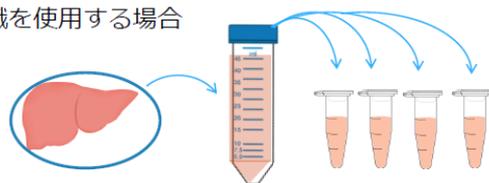
抽出工程・核酸精製の留意点

- ✓ 組織採取～抽出工程・核酸精製時はコンタミや汚染が発生しやすい
- ✓ コンタミネーションを防ぐために、媒体群と投与群のサンプルは別バッチで取り扱う
- ✓ 可能であれば別日に抽出し、同日に抽出を実施する場合は媒体群を先に実施するのが望ましい
- ✓ 実験終了後の作業スペースはRNaseやDNAを除去できる試薬を用いて清拭することが望ましい

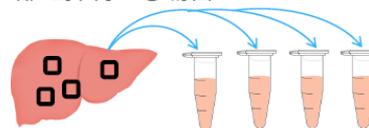
ホモジナイズ

- ✓ 組織内の均一性に応じて、一部を分取するか全組織を溶解するかを判断する
ただし2020年版ガイダンスには、組織サンプルの均一性に関する記述は無い
- ✓ 試験の目的及び必要性に応じて、各採取方法のPros/consを考慮し、実務面で実施可能な方法を決定する。

全組織を使用する場合



組織の一部を採材する場合

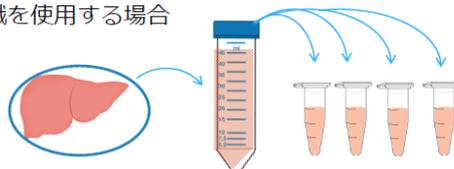


図は9th JBF Symposium, DG2017-33より引用

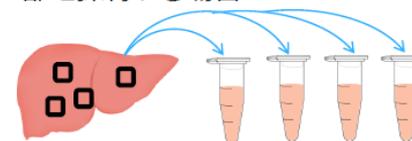
抽出工程・核酸精製の留意点

ホモジナイズ

全組織を使用する場合



組織の一部を採材する場合



図は9th JBF Symposium, DG2017-33より引用

	全組織を均一化後、一部を使用	組織の一部を分取
組織内分布	組織内の分布に 偏りがあっても評価可能 組織学的・解剖学的均一性 を示すことが困難な場合に有用	組織内の分布に偏りがある場合、 採取部位によって定量値が変動する可能性があること に留意する。採取する部位を限局する、数か所サンプリングし、平均値を使用するなどの工夫が有効。
投与経路	得られる結果が組織全体の平均であること留意する	局所投与で 投与部位やその周りへの漏出等 を評価したい場合に選択
組織の体積	小動物では可能だが、組織の体積が大きい 大動物 では 溶解や粉碎工程にかかる時間と試薬コストの面で困難	組織の体積にかかわらず 一定の時間と試薬コストで実施が可能
動物数とコスト	生体内分布群で各検査項目分の動物の例数を確保する必要があり、 動物数が増える 。	ほかの検査と組織を共用することが可能であるため 動物数を削減 できる。探索的試験で有用。

抽出工程・核酸精製の留意点

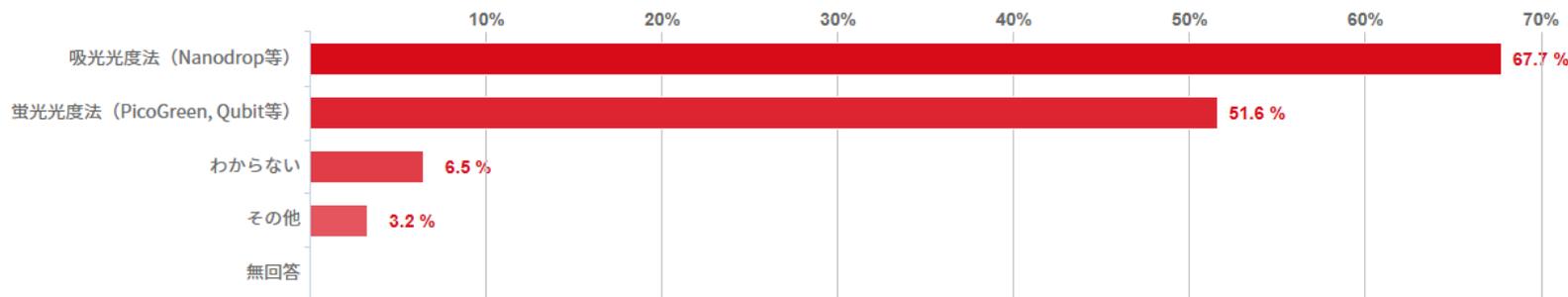
抽出・精製

✓ 目的に応じて適切な抽出方法を選択する（下表参照）

カラム法	Pros		Cons	
用手法	高濃度のサンプルを確実に得られる	多くのキットが販売され目的や性質に応じて選択可能	多検体の場合時間がかかり、取り違い等のリスクがある	カラムの目詰まり キットの違いにより回収率やマトリクス効果が異なる
自動法	多検体を効率よく処理できる		カラムのオーバーフローのリスク、メンテナンスの必要性	
磁気ビーズ法	Pros		Cons	
自動法	抽出効率が安定している印象		磁気ビーズが取り切れないことがある dPCRのパーティション時に影響する可能性がある	

核酸濃度測定

✓ 総DNA/RNA濃度はどのように測定していますか（回答数：31）



その他：電気泳動

考察

- 吸光度法と蛍光光度法を採用する施設がほとんどであった。

見解

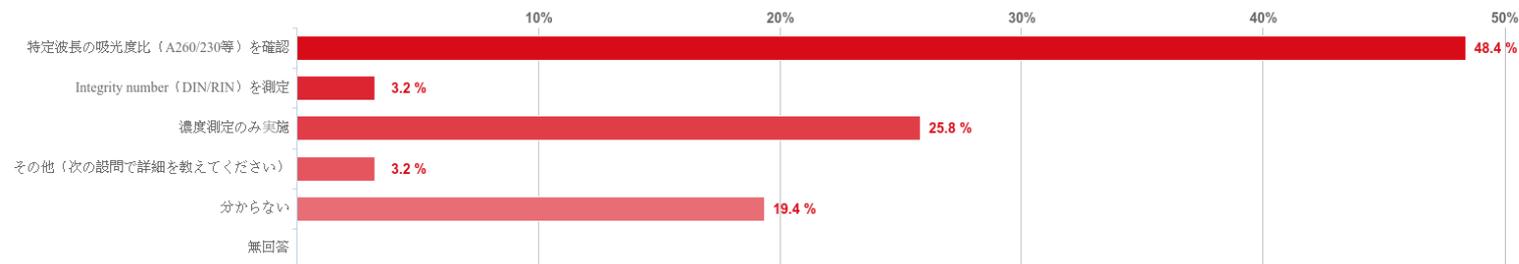
- 総DNA/RNA濃度あたりのコピー数で補正するケースがあるため、適切な方法で総DNA/RNA濃度を確認しておくことが、その後続くqPCR/dPCRの測定結果の品質向上に寄与する。

抽出工程・核酸精製の留意点

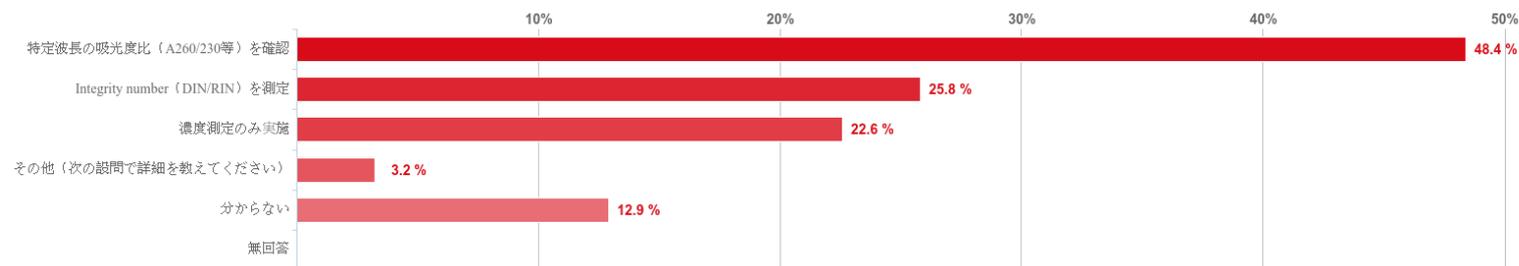
核酸濃度測定

✓ 抽出・精製した核酸の品質をどのように確認していますか（回答数：31）

DNAの場合



RNAの場合

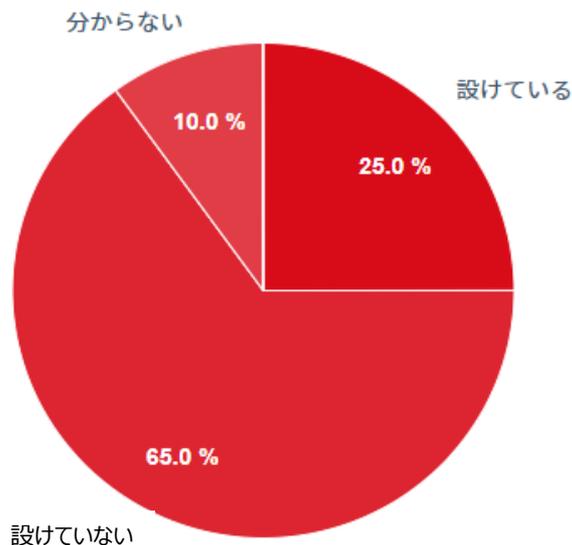


考察

- DNAに比べてRNAはRINを算出して核酸の品質を確認する施設が多かった。DNAに比べてRNAは分解のリスクが大きいことや、抽出液をNGS等に用いる場合には品質の高いRNAを抽出する必要があるためと考えられた。

核酸濃度測定

✓ 品質の基準を設けていますか（回答数：20）



考察

- 多くの施設で品質の基準を設けていなかった理由として、微小な組織・体液の場合に再抽出用のサンプルを残せないケースがあることや、たとえ品質の悪い核酸抽出液であってもqPCR/dPCRでは増幅されることが考えられた。後者はPCR中の阻害物質の持ち込みの影響を評価するため、PCR時に阻害確認ウェルを含めることが望ましい。

ホモジナイズ・核酸抽出

Protease処理

- ✓ 内在性のヌクレアーゼの除去
- ✓ 膜タンパクの分解

DNase処理

- ✓ RNA抽出の場合にDNAのコンタミを除去

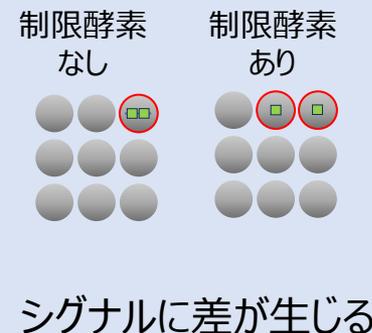
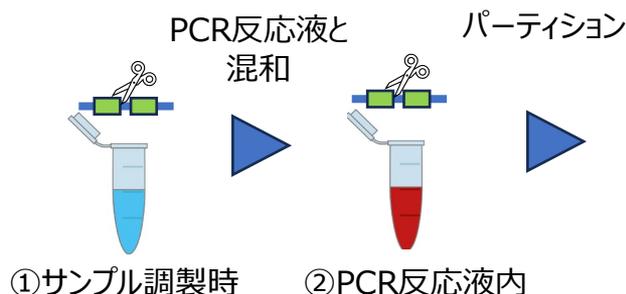
RNase処理

- ✓ DNA抽出の場合にRNAのコンタミを除去

dPCR

制限酵素処理

- ✓ ターゲットが同一染色体上にマルチで存在する場合に必要

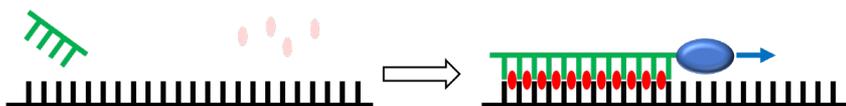


酵素処理タイミング	Pros	Cons
① サンプル調製時	選択肢が多い 至適条件で反応	手間がかかる
② PCR反応液内	簡便	メーカーでラインナップ されている酵素のみ可

核酸の検出時の留意点ーインターカレーター法vsプローブ法

・インターカレーター法

2本鎖DNAに入り込み蛍光を発する



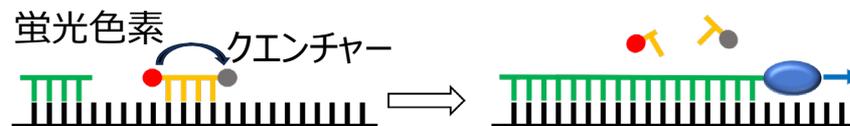
Pros.

- ✓ 解離曲線からプライマーの特異性を検証可 (qPCRに限る)
- ✓ 比較的安価に実験ができる

Cons.

- ✓ プライマーダイマーや非特異的増幅もシグナルとして検出される

・加水分解プローブ



Pros.

- ✓ プライマーとプローブで特異性を高めることができる
- ✓ 1つのウェルでマルチプレックス測定が可能

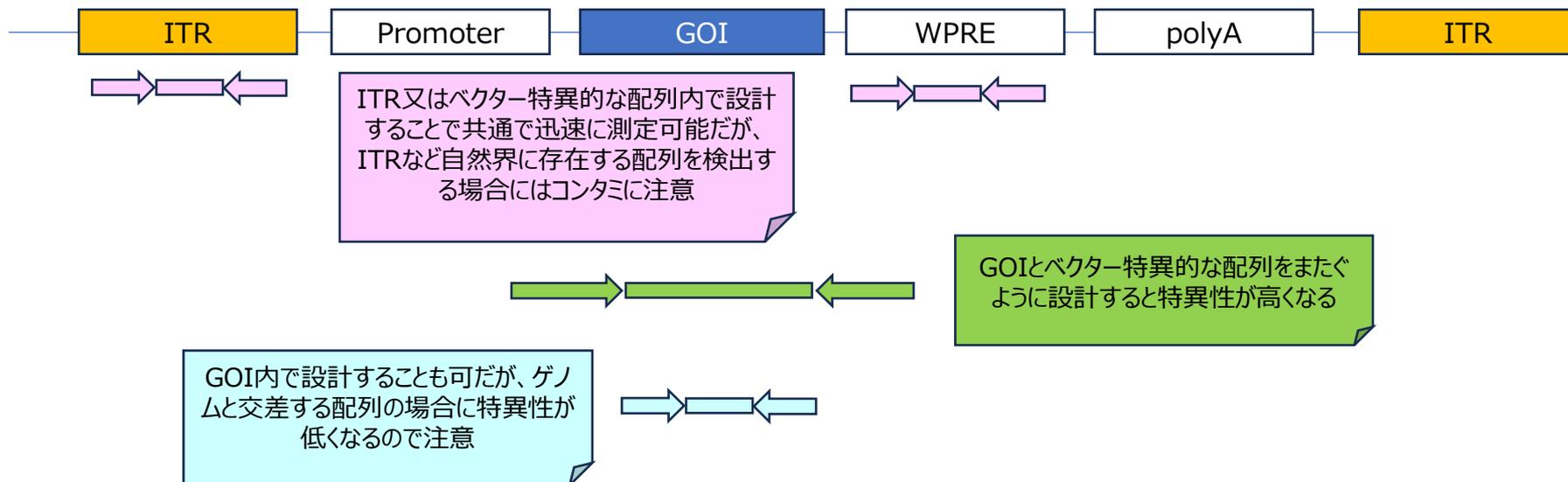
Cons.

- ✓ 各ターゲットに対してプローブを設計・合成する必要がありコストと手間がかかる

- ✓ 探索的試験では汎用性の高いインターカレーター法でも問題なく、検証的試験に移行する段階で特異性の高いプローブ法を選択することが望ましい

核酸の検出時の留意点ープライマーの設計

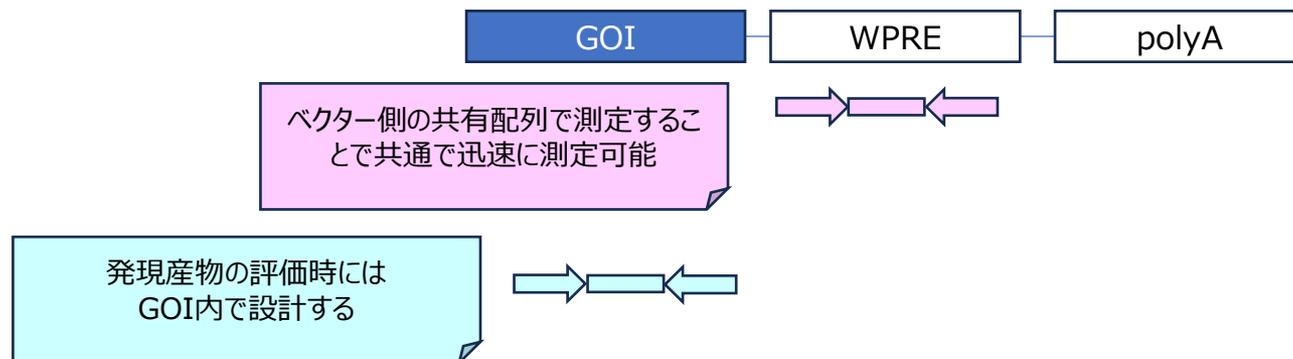
例) ベクター測定時



- ✓ 探索的試験では共通配列で設計することで、時間とコストを抑えることができる
- ✓ 最終的には目的遺伝子を特異的に認識する場所にプライマーを設計すべきである
- ✓ BLAST等の*in silico*で内在性遺伝子との交差性を確認し最適なプライマーを選定する

核酸の検出時の留意点—プライマーの設計

例) cDNA測定時 (遺伝子発現)



- ✓ 探索的試験の段階ではベクター側の共有配列で問題ないが、検証的試験ではGOI側の配列を含む配列でプライマー設計することが望ましい。
- ✓ cDNA時の測定時には特にベクターDNAや宿主ゲノムと交差しないように留意する必要がある
- ✓ 抽出時にDNase処理を行うとともに、空白サンプルの逆転写サンプルでの発現レベルを確認しておく、などの工夫が必要

プライマー設計ではDNA/cDNAに共通して**目的に応じて使い分けることが重要**

dPCR及びqPCRを利用する実験の全般的な疑問点に対する留意点として、以下のポイントについて議論した

- ◆ 内在性コントロールの選択方法
- ◆ 酵素処理の必要性和選択方法
- ◆ 抽出工程・核酸精製の留意点
- ◆ 核酸の検出方法
- ◆ プライマーの設計方法

開発フェーズに合わせて分析法の最適化を実施し、最終的に精度の高い分析方法を構築することが求められる



DGサポーターアンケート その他の疑問点

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-手法の使い分け

Q32.

デジタルPCR/qPCRを用いた遺伝子治療製品・細胞治療製品のバイオアナリシス、バイオマーカーの分析について、疑問点や動向を知りたい点があれば記入ください。ディスカッショングループ内の議論で参考にさせていただく場合があります。

分析法についてqPCRからdPCRにシフトしていくのか、それとも用途によって使い分けるような形になるのでしょうか。

DGの見解

dPCR, qPCRともに利点と欠点があり、分析の目的、求められる定量性・感度・堅牢性、サンプルサイズ、分析試料の性状等によって使い分けをするのが望ましい。使い分けにあたって考慮すべきポイントの具体例を本ポスターで紹介している。

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-求められる堅牢性

Q32.

デジタルPCR/qPCRを用いた遺伝子治療製品・細胞治療製品のバイオアナリシス、バイオマーカーの分析について、疑問点や動向を知りたい点があれば記入ください。ディスカッショングループ内の議論で参考にさせていただく場合があります。

バイオアナリシスとバイオマーカー目的では求められるRobustnessが異なると考えている。各社、どのような基準を設けてPCR技術を目的ごとに使い分けているかに興味あり。

DGの見解

一般的に遺伝子・細胞治療製品等自体の定量とバイオマーカーの定量で分析法に求められる堅牢性は異なる。ただし、いずれの定量においても規制当局判断や結果利用におけるデータの重要性などを考慮して求められる堅牢性の水準を設定すべき。

一般的に、より堅牢性の求められる遺伝子・細胞治療製品等自体の定量ではdPCRが有利であり、同等の堅牢性までは求められないバイオマーカーの定量ではqPCRで十分なケースも多いと考えられる。

ただし、堅牢性以外の面でdPCRとqPCRには一長一短があり、堅牢性とは異なる観点で手法を採用されるケースも多い。本DGでは両目的に関する使い分けについてもアンケートを実施している。

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-標準物質の同等性

Q32.

デジタルPCR/qPCRを用いた遺伝子治療製品・細胞治療製品のバイオアナリシス、バイオマーカーの分析について、疑問点や動向を知りたい点があれば記入ください。ディスカッショングループ内の議論で参考にさせていただく場合があります。

代替標準試料を使った場合の同等性の確認に関するアンケート

Q31の回答は希望であり、実際にはどのように同等性を確認すれば良いでしょうか？また同等性と判断するクライテリアは？

DGの見解

AAPS White PaperではCo-linearityを評価することで同等性を確認することが提案されている。pp. 83-84にて詳述しているため参照されたい。

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-定量値の正確性

Q32.

デジタルPCR/qPCRを用いた遺伝子治療製品・細胞治療製品のバイオアナリシス、バイオマーカーの分析について、疑問点や動向を知りたい点があれば記入ください。ディスカッショングループ内の議論で参考にさせていただく場合があります。

dPCRのバリデーションで算出した定量値が、正しいかまで見る必要はあるか

DGの見解

dPCRは機器からコピー数が出力されるが、分析対象としている核酸の定量値が真に正しいかどうかを示すことは現時点で難しく、dPCR/qPCRによる定量では課題と考えられている。

これは各分析対象となる核酸について、他の標準化された手法（例として同位体希釈質量分析法/IDMS）にて定量された“既知量”の標準物質を入手することが一般的に難しいためである。

この現状を踏まえ、**機器性能として適格性を示すこと**、および**一定の条件で得られた定量値であることをトレーサビリティをもって示すこと**が重要と考えられる。すなわち、前者は機器メーカーが提供する標準物質を用いた機器適格性確認の実施、後者は使用した標準物質、分析機器、解析ソフトウェア（解析アルゴリズム）、標準物質や試料の処理方法、分析方法、結果（dPCRの場合はコピー数だけでなく、total/positive/negativeパーティション数や反応ボリューム等）に関する記録が適切に保存され報告されることが重要と考える。

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-データ採用基準

Q32.

デジタルPCR/qPCRを用いた遺伝子治療製品・細胞治療製品のバイオアナリシス、バイオマーカーの分析について、疑問点や動向を知りたい点があれば記入ください。ディスカッショングループ内の議論で参考にさせていただく場合があります。

分析データの採用基準の明確化、試薬の取り扱い（LBAにおける重要試薬のように管理すべき試薬があるか）

DGの見解

実試料分析結果の採用基準は試験の位置づけやデータの使用目的等を考慮して設定すべき。また、分析法バリデーションの判定基準と一貫性を持った設定が望ましいと考えられる。

dPCRによる設定基準の一例（判定基準値がある場合はAAPS Whitepaper 2024からの引用）

- Replicates（同一サンプルの繰り返し分析）の定量値の精度
- PCR阻害：既知量（実試料中コピー数に対して十分に過剰な量）の標準物質をスパイクした実試料の真度／乖離度
- QC試料：同一バッチ内のLLOQ・低・中・高濃度（少なくともLLOQ・低・高濃度）において、全体の67%以上のQC試料で真度の判定基準を満たすこと、かつ同一濃度のQC試料のうち50%以上で真度の判定基準を満たすこと
- 特異性：NTC試料、negative extraction control試料（分析対象を含まないブランクマトリックスの抽出試料）の定量値が分析法バリデーションで定められたLOD未満であること

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-重要試薬

DGの見解

試薬：本DGはAAPS Whitepaper 2024で紹介されているアプローチを支持する。

AAPS Whitepaper 2024では、重要試薬（分析結果に直接影響する試薬）の一例として、以下の試薬が挙げられている。

核酸抽出試薬・キット、代替マトリックス、プライマー/プローブ、マスターミックス、標準物質（調製済みの検量線試料・QC試料を含む）、制限酵素

重要試薬の品質は、分析法バリデーションおよび実試料分析に使用される期間を通じて適切に確保される必要があり、プライマー/プローブの変更はフルバリデーション、キット内の一部の試薬やマスターミックスの変更はパーシャルバリデーション、標準物質・検量線試料・QC試料のロット変更の場合はブリッジングが必要である。その他の例については次表が参考となる。

DGサポーターアンケート；その他の疑問点-重要試薬

DGの見解

Table 2 Evaluating Assay Reagent and Platform Changes

Proposed minimum evaluation approach ^a	Full validation	Partial validation	Bridging study
Change	<ul style="list-style-type: none"> • Extraction platform or kit change • PCR Platform • Primer/probe sequence change 	<ul style="list-style-type: none"> • Single reagent change within extraction kit initiated by manufacturer • PCR Mastermix or RT Reagent Part Change 	<ul style="list-style-type: none"> • Single Extraction Reagent • Provider Change • PCR Oligo Provider Change • TLDA card lot change • Calibrator/QC lot change • Surrogate matrix lot change • DNase manufacturer or enzyme (i.e., benzonase or MNase) change

^aThe proposed approach should be on a case-by-case basis and determined based on the COU

Hays et al. The AAPS Journal (2024)

ブリッジングとは、パーシャルバリデーションよりも小規模に実施される変更の妥当性検証である。AAPS Whitepaper 2024では、変更後のロットや試薬を採用した $n \geq 20$ のサンプルにて精度を評価し、フルバリデーションと同様の判定基準にて合格することが求められている。

本ディスカッショングループからポスターを通して以下の点を提言した。

- dPCR, qPCRの分析原理
- dPCR, qPCRの機器的特徴、それに基づく有効な活用場面や使い分けの考え方、dPCRの短所をカバーするための工夫
- 分画方式によるdPCRの機種間差、dPCR/qPCR実験時の実践的ノウハウ
- バイオアナリシス分析法バリデーションに関連した公知情報の整理、実践的な提案
- dPCR, qPCRを利用する実験の全般的な疑問点に対する見解、留意点

本発表を通し、バイオアナリシス分野における dPCR/qPCRの使い分けに関する見識が深まり、手法の効果的な使い分け、各手法の長所を最大限に引き出しつつ短所を最小化するための実践的ノウハウの普及が進むことを期待する。

Conclusion

Through this poster, the discussion group proposes the following points:

- Analytical mechanism of dPCR and qPCR
- Instrumental characteristics of dPCR and qPCR, effective utilization scenarios and considerations based on these characteristics, and measures to cover the disadvantages of dPCR
- Examples of available dPCR formats and considerations in dPCR experiments
- Summary of publications related to bioanalysis method validation and practical suggestions
- Suggestions and considerations regarding general experiments using dPCR and qPCR

Through this presentation, we hope to deepen the understanding of the differentiation between dPCR and qPCR in the field of bioanalysis, promote the effective application of the methods, and disseminate practical know-how to maximize the advantages of each method while minimizing their disadvantages.

本DG内のディスカッションにおいて機器やアプリケーションに関する情報を提供いただきました。

株式会社キアゲン

バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社

本ポスターに関するお問い合わせは以下の連絡先までお願いいたします。

DGリーダー

田辺三菱製薬株式会社 井手 亮佑

Email: ide.ryousuke@ma.mt-pharma.co.jp

For queries, please contact the following:

DG Leader

Ryosuke Ide, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation

Email: ide.ryousuke@ma.mt-pharma.co.jp