

製品コード： 69243

ウイルス遺伝子検出キット

VirFinder Type-A

(HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV, PVB19)

取扱説明書

1. 背景

再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則において、提供する再生医療等が同種の場合には、細胞提供者について、次に掲げるウイルスについて、問診及び検査（血清学的試験、核酸増幅法等を含む）により感染していないことを確認することとされています。

B 型肝炎ウイルス（HBV）

C 型肝炎ウイルス（HCV）

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）

パルボウイルス B19（PVB19）

また、免疫抑制状態の再生医療等を受ける者に特定細胞加工物の投与を行う場合は、必要に応じて、サイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）及びウエストナイルウイルス（WNV）について検査により感染していないことを確認することとされています。

更に、再生医療等を受ける者の細胞を用いる場合は、必ずしも当該者のスクリーニングを必要としないが、製造工程中での交差汚染の防止、製造を行う者への安全対策等の観点から問診及び検査の実施を考慮することとされています。

2. 使用目的

本品は 6 種類のウイルス（HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV、PVB19）をリアルタイム RT-PCR 法を用いて迅速かつ高感度に検出するためのキットです。

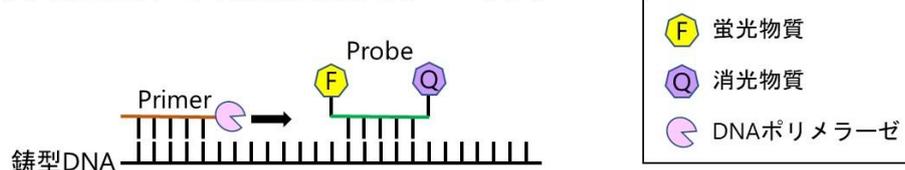
※CMV、EBV、WNV に関しては VirFinder Type-B での販売となります。

3. 検出原理

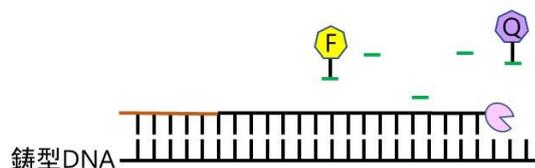
本品は Probe 法の原理を用いて検出を行います。検出に用いる Probe は、5'末端に蛍光物質 (Fluorescence)、3'末端に消光物質 (Quencher) が修飾されたオリゴヌクレオチドです。PCR のアニーリングステップで Probe、続いて Primer が鋳型 DNA へと結合し、次のステップで DNA ポリメラーゼによる伸長反応が始まります (下図 (A))。Probe が鋳型 DNA に結合した状態では、励起光を照射しても蛍光は消光物質により抑制されています。DNA ポリメラーゼによる伸長が進行すると、DNA ポリメラーゼの 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により Probe が分解されます。Probe が分解されると蛍光色素が修飾されたヌクレオチドが遊離し、消光色素による抑制が無くなり、蛍光が検出されます (下図 (B))。

※RNA を鋳型とした場合は逆転写酵素による cDNA 合成を介して反応が進行します。

(A) 鋳型DNAへの Primer/Probe のアニーリング



(B) DNAポリメラーゼによる伸長反応および Probe の分解



4. キット構成 (25 テスト用)

試薬	本数	容量
2× RT-PCR Buffer	3 本	各 1 mL
RT Enzyme Mix	1 本	120 µL
DNA Polymerase	1 本	120 µL
HBV PP Mix *1	1 本	60 µL
HCV PP Mix *1	1 本	60 µL
HIV-1 LTR PP Mix *1	1 本	60 µL
HIV-1 pol PP Mix *1	1 本	60 µL
HIV-2 PP Mix *1	1 本	60 µL
HTLV PP Mix *1	1 本	60 µL
PVB19 PP Mix *1	1 本	60 µL
hB2M PP Mix *2	1 本	60 µL
Negative Control (DNase Free Water)	1 本	1 mL
Positive Control (2 × 10 ³ copies/µL)	1 本	400 µL

*1: Primer Probe Mix (PP Mix) は蛍光プローブを含んでいるため遮光に留意してください。

*2: リファレンスとして使用します。検体が培養上清や血清などヒト細胞でない場合は検出されない可能性があります。

5. 貯蔵方法・有効期間

【貯蔵方法】

-30 ~ -20°C で保存してください。

【有効期間】

製造日から 12 ヶ月

※外装および容器のラベルに使用期限を表示してあります。

6. 本キット以外に準備するもの

【試薬】

核酸抽出キット QIAamp UltraSens Virus kit(50回分) (QIAGEN社 製品コード:53704)
詳細はキットの取扱説明書をお読みください。

【器具】

- マイクロピペット (1,000 µL, 200 µL, 10 µL)
- マイクロピペット用フィルター付きチップ
- 1.5 mL マイクロチューブ
- 2.0 mL マイクロチューブ
- リアルタイム PCR 用チューブまたはプレート

【機器】

- チューブミキサー
- 卓上小型遠心機
- ヒートブロック（2台が好ましい）
- 高速微量遠心分離機
- リアルタイム PCR 装置（FAM が検出可能なリアルタイム PCR 装置）

7. 全般的な注意

1. 検体およびウイルスは感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。感染の危険を避けるため、眼鏡、手袋、マスク等の防護具を着用の上、十分に注意してください。
2. 検体の取扱いは安全キャビネット内等で行ってください。コンタミネーションを避けるため、核酸抽出と反応液の調製はエリアを分けることを推奨します。
3. RNA サンプル調製の際、RNase による RNA 分解を避けるため、器具は可能な限り RNase フリーのディスポーザブルなものを使用してください。また、作業者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため、作業中はマスクおよび手袋を着用し、不必要に話さず、細心の注意を払ってください。
4. PCR 終了後のチューブは密封して廃棄してください。
5. 使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
6. 本品は研究用試薬であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。診断目的には使用できません。

8. 操作方法

8-1. 検体

細胞懸濁液（最大 1×10^6 個の細胞）および培養上清 1 mL など

※1 mL に満たない場合には PBS(-)等で 1 mL に調製してください。

※血清を含まない検体の場合は、検体 900 μ L に血清を 100 μ L 加えて 1 mL に調製して下さい。セルバンカー等の血清を含む細胞保存液でも代用可能です。無血清や少量の血清のみでは目的核酸とタンパク質の複合体がうまく形成されず、抽出される核酸の回収率が低下する恐れがあります。

8-2. 検体からのウイルス核酸抽出（QIAamp UltraSens Virus kit を用いる場合）

- 核酸抽出キットを用い、検体からの核酸抽出を行います。
- 使用前に核酸抽出キットの説明書をよく確認してください。
- 遠心分離機の温度が設定できる場合は室温（25°C）に設定し、全工程を行って下さい。
- チューブミキサーは最大出力で使用して下さい。
- 抽出操作前に、ヒートブロックを 60°C にセットし、抽出に必要な分量の Buffer AR を加温しておいて下さい。

8-3. 核酸抽出

下記の通り、核酸抽出を行ってください。

※サンプルの抽出効率・精製純度の向上のため、QIAGEN 社が提示しているプロトコルを一部改変しています。

- 1) 2.0 mL マイクロチューブに検体 1 mL を加える。
- 2) 0.8 mL の Buffer AC を添加し、チューブのフタにキャリア RNA を 5.6 μ L 添加する。
(キャリア RNA はサンプルに直接添加すると分解する恐れがあります。)
- 3) チューブをゆっくりと 3 回転倒混和した後、チューブミキサーを用いて 10 秒間よく混合する。
- 4) 室温で 10 分間静置する。
- 5) $2,400 \times g$ で 3 分間遠心する。
- 6) ペレットを崩さないようにマイクロピペットを用いて上清を完全に除去し、タッピングでペレットを均一に崩す。
- 7) あらかじめ 60°C に加温した 300 μ L の Buffer AR に 20 μ L の Proteinase K を加え、直ちにペレットに全量を加える。
- 8) ペレットをチューブミキサーで 1 分間混合し、完全に溶解させる。
- 9) ヒートブロックで 40°C 、10 分間インキュベーションする。
(チューブミキサーで 5 分後に 5 秒間、攪拌操作を行うことをお勧めします。その際はサンプル温度が低下しないよう注意してください。)
- 10) スピンドアウン後、300 μ L の Buffer AB を添加し、チューブミキサーで 30 秒間混和する。
- 11) スピンドアウン後、全量をスピнкаラムに移し、 $5,000 \times g$ で 1 分間遠心する。
- 12) カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW1 を添加後、 $6,000 \times g$ で 1 分間遠心する。
- 13) カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW2 を添加後、 $20,000 \times g$ で 3 分間遠心する。
- 14) カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、25 μ L の Buffer AVE を添加後、 $6,000 \times g$ で 1 分間遠心して核酸を溶出する。
- 15) 更に 25 μ L の Buffer AVE をカラムに添加後、 $6,000 \times g$ で 1 分間遠心し、再度核酸を溶出する (合計 50 μ L)。
- 16) すぐに PCR を行わない場合には、溶出した核酸抽出液は -20°C で保管する。

8-4. リアルタイム RT-PCR によるウイルス核酸検出

本品の試薬を用いて RT-PCR 反応液のマスターミックスを調製し、8-3.で調製した核酸抽出液を添加します。試験する検体数に応じて必要量のマスターミックスを調製してください。

【RT-PCR のコントロールについて】

RT-PCR の結果を正しく判定するためにランコントロールの設定が必要です。

陽性ランコントロール：Positive Control を 5 μ L 添加する。

陰性ランコントロール：Negative Control (DNase Free Water) を 5 μ L 添加する。

8-4-1. RT-PCR 反応液の調製

下記に示す RT-PCR 反応液を氷上で調製します。試薬調製例を参考にして RT-PCR 反応液のマスターミックスを調製してください。

<RT-PCR 反応液組成>

試薬	液量 (1 反応分)
2 \times RT-PCR Buffer	10 μ L
PP Mix	2 μ L
RT Enzyme Mix	0.4 μ L
DNA Polymerase	0.4 μ L
Negative Control (DNase Free Water)	2.2 μ L
Total	15 μ L

試薬調製例

- 1) 2 \times RT-PCR Buffer、PP Mix を融解し、ミキサーでしっかりと混和後にスピンドウンする。RT Enzyme Mix、DNA Polymerase はスピンドウン後に氷上にて保管する。
- 2) 氷上にて各種 PP Mix 毎にサンプル数 (各核酸抽出液、陽性ランコントロール、陰性ランコントロール) +1 本分の RT-PCR 反応液のマスターミックスを調製する。
- 3) 2)で作製したマスターミックスを PCR 用チューブまたはプレートに 15 μ L ずつ分注する。
- 4) 陽性ランコントロールとして Positive Control を、陰性ランコントロールとして Negative Control を 5 μ L ずつ添加する。
- 5) 8-3.で調製した核酸抽出液を 5 μ L ずつ添加する。
- 6) PCR 用チューブまたはプレート内の反応液をピペティング (もしくはミキサー) で混合し、卓上遠心機等でスピンドウンする。

※Type-B を用いて同時に測定を行う場合は 9-3. リアルタイム PCR を参考に測定を行ってください。

8-4-2. PCR 装置の設定

以下の RT-PCR プログラムを設定し、リアルタイム PCR を実施します。

※詳しい操作方法はリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従ってください。

<RT-PCR プログラム>

ステップ	温度	時間	cycle 数	蛍光検出
逆転写反応	42°C	10 min	1 cycle	無し
	95°C	10 sec		
PCR (1 st step)	95°C	10 sec	5 cycles	無し
	56°C	30 sec		
PCR (2 nd step)	95°C	10 sec	50 cycles	有り FAM
	56°C	30 sec		

※PCR ステップのはじめの 5 サイクルはバックグラウンドシグナル検出の可能性があるので、蛍光検出は行わないでください。

※Passive Reference (パッシブリファレンス) 設定がある場合は、「None」を選択し、測定を開始してください。

8-4-3. PCR 結果の判定

各 PCR 装置ソフトウェアを用いて結果の判定を行います。解析方法は 2 種類あり、2nd Derivative Maximum 法 (BioRad 社 CFX Connect では Regression 法) または、Crossing point 法により Cq 値を算出します。両者の解析が行える装置の場合は、Threshold の設定によって Cq 値が変動することがなく、試験間での再現性も高くなる前者を用いた解析を推奨します。下記に陽性、陰性の判定方法が示されています。陽性、陰性いずれにも該当しない場合には試験不成立となります。

試験不成立の場合は 9. **トラブルシューティング**に従ってください。

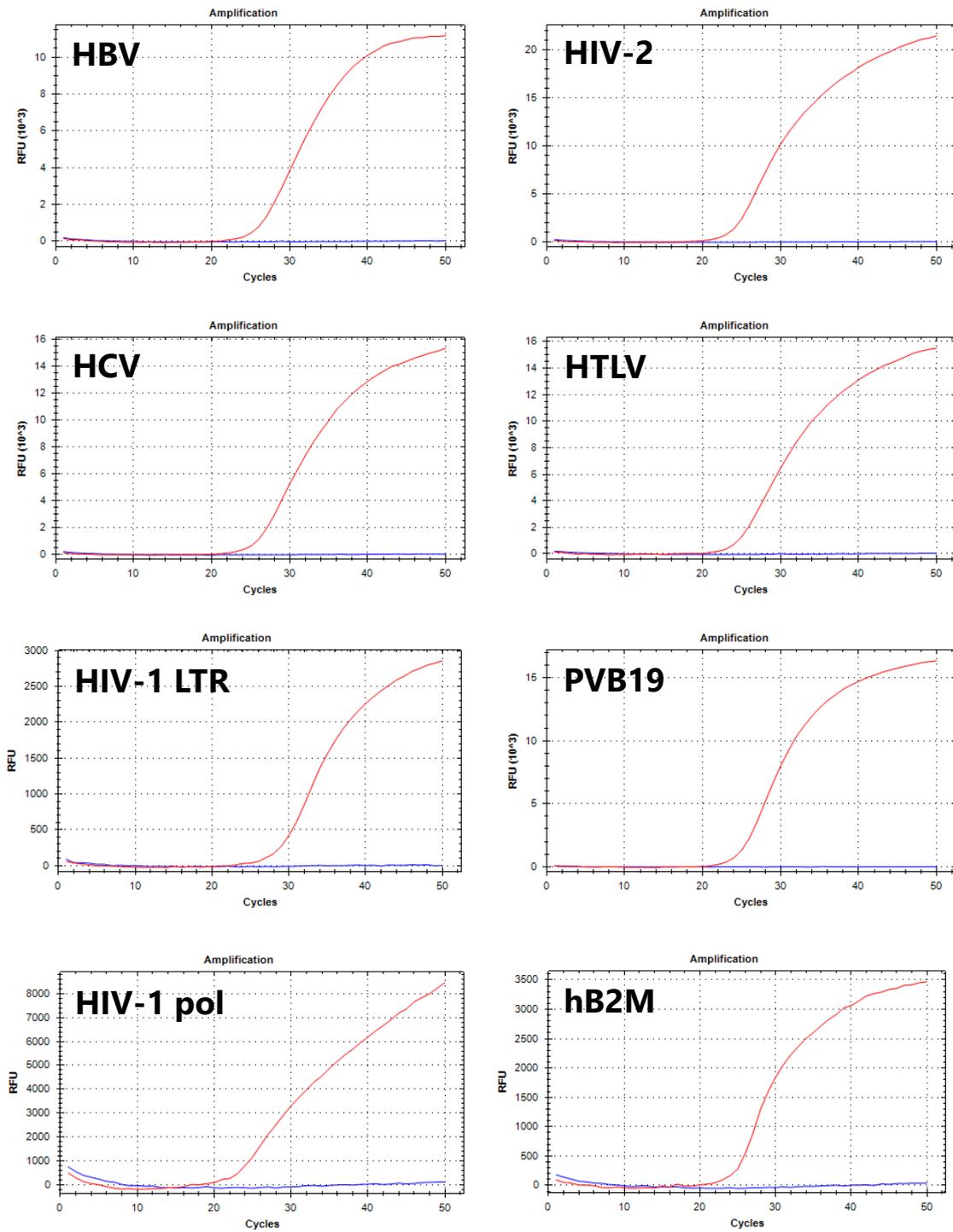
<RT-PCR 結果の判定方法>

判定	HBV / HCV / HIV-1 / HIV-2 / HTLV / PVB19	hB2M	陽性 ランコントロール	陰性 ランコントロール
陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
陰性	陰性	陽性	陽性	陰性
試験不成立例	陽性	陽性	陽性	陽性
	陰性	陰性	陽性	陰性
	陰性	陰性	陰性	陽性

※陽性：Cq 値が算出された 陰性：Cq 値が算出されなかった

<リアルタイム RT-PCR 検出結果例>

陽性ランコントロール：(赤線) 陰性ランコントロール：(青線)



9. トラブルシューティング

9-1. 検体

Q1：細胞懸濁液以外に QIAamp UltraSens Virus kit が対応している検体はありますか？

A1：血清および血漿からの核酸抽出にも対応しています。**8.3** と同様の手順で操作を実施してください。（ただし、検体準備の際に実施する血清添加は不要となります。）

Q2：全血は QIAamp UltraSens Virus kit で核酸抽出できますか？

A2：全血からの核酸抽出には対応していません。他のキットを使用する必要があります。

9-2. 核酸抽出

Q1：検体が培養上清や血清の場合、核酸抽出の成否をどのように判定すればよいですか？

A1：核酸抽出の際に下記に示す操作を実施し、測定を行ってください。

【陽性コントロールの作製方法】

1. 検体 1 mL を 2 つ用意し、それぞれ①ウイルス測定用、②核酸抽出の成否確認用とします。
2. ②に対してのみ、**8-3. 核酸抽出の 2)** の工程で、キット付属の Positive Control を 5 μ L 添加します。（検体量が多い場合は、あらかじめキャリア RNA との混合液を作製することを推奨します。混合液はチューブフタに添加し、**8-3. 2)**以降の作業を行います。）
3. ①と並行して核酸抽出を行い、各ウイルス検出系で測定してください。判定は 8-4 PCR 結果の判定表の内、hB2M を Positive Control と読み替えて判定して下さい。ここが陰性だった場合は **9-3. の A1** の「hB2M 陰性の場合」をご参照ください。

9-3. リアルタイム PCR

Q1：hB2M の役割は何ですか。

A1：核酸抽出が正常に行われたことを判断するために使用します。hB2M はヒトのハウスキーピング遺伝子であり、ヒト細胞や組織から正しく核酸抽出されていると検出されます。（血清からは hB2M が検出されない恐れがあります。血清を用いる場合は **9-2. 核酸抽出** に従い試験することを推奨します。）

Q2：陽性、陰性、いずれの判定にも当てはまらない結果になりました。どう判断すればよいですか？

A2：試験不成立として再試験を実施することをお勧めします。

➤ hB2M 陰性の場合

⇒核酸抽出が正しく行えていない可能性、PCR に持ち込まれた核酸量が過剰である可能性が疑われます。抽出操作、検体の細胞量を確認してください。また、検体がヒト細胞でない場合、hB2M が陰性となる場合があります。

➤ 陽性ランコントロールが陰性の場合

⇒PCR が正常に行われていない可能性が疑われます。

➤ 陰性ランコントロールが陽性の場合

⇒コンタミネーションの疑いがあります。

Q3：核酸抽出液中の夾雑物による PCR 阻害はどのように判定すればよいですか？

A3：核酸抽出液に Positive Control を添加した場合の Cq 値と、陽性ランコントロールの Cq 値の比較により考察が可能です。

Q4：Type-B も併せて使用したい場合、どのように測定を行えばよいですか。

A4：Type-B も併せて測定される場合、検体 1 mL からの核酸抽出では試験に必要な核酸抽出液が足りなくなる恐れがあります。1 mL の測定検体を 2 つ用意し、それぞれ核酸抽出した後に、2 つの核酸抽出液を混合させたサンプルを測定してください。測定の際には Negative Control と Positive Control は 1 測定毎に 1 つ、hB2M は検体毎に 1 つ設定してください。

<PCR 配置例：Type-A、Type-B を用いて 2 つの検体を測定する場合>

		1	2	3	4	5	6	7	8
A	PP Mix	HBV	CMV	HBV	CMV	HBV	CMV	HBV	CMV
	Sample	NC	NC	PC	PC	検体①	検体①	検体②	検体②
B	PP Mix	HCV	EBV	HCV	EBV	HCV	EBV	HCV	EBV
	Sample	NC	NC	PC	PC	検体①	検体①	検体②	検体②
C	PP Mix	HIV-1 LTR	WNV						
	Sample	NC	NC	PC	PC	検体①	検体①	検体②	検体②
D	PP Mix	HIV-1 pol		HIV-1 pol		HIV-1 pol		HIV-1 pol	
	Sample	NC		PC		検体①		検体②	
E	PP Mix	HIV-2		HIV-2		HIV-2		HIV-2	
	Sample	NC		PC		検体①		検体②	
F	PP Mix	HTLV		HTLV		HTLV		HTLV	
	Sample	NC		PC		検体①		検体②	
G	PP Mix	PVB19		PVB19		PVB19		PVB19	
	Sample	NC		PC		検体①		検体②	
H	PP Mix	hB2M		hB2M		hB2M		hB2M	
	Sample	NC		PC		検体①		検体②	

10. 包装単位

VirFinder Type-A 25 テスト用 Code 69243

11. 問い合わせ先

〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6
 日水製薬株式会社 カスタマーサポート担当
 電話：03(5846)5707