# ウイルススクリーニングのための核酸増幅検査法の自動化に関する検討

―HCV RNA PCR 検査における自動核酸抽出装置 GT-12 の評価―

野口 幸一 室塚 剛志 脇坂 明美 松本 脩三 日本赤十字社血漿分画センター

# EFFICIENT VIRAL SCREENING SYSTEM BY NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY (NAT)

—Evaluation of automatic extraction system GT-12 in HCV RNA testing—

Koichi Noguchi, Takasi Murozuka, Akemi Wakisaka and Syuzo Matumoto Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

Since NAT is a highly sensitive technique for detecting low amounts of viral genomes, it is applied to the screening of source plasma to reduce the risk of viral infection through plasma-derived blood products.

For this purpose we have used an NAT test for HBV, HCV and HIV by PCR in pooled plasma from of 500 individuals since November, 1997.

Because nucleic acid extraction is the most time-consuming and laborious job in this NAT test, an automated method was sought to reduce the operation time and human error. This would allow processing of more samples than the currently used extraction.

Recently, Roche Diagnostic K.K. has developed an automated extraction system named GT-12 and an extraction reagent for HCV RNA. In this study we compared GT-12 with the manual technique. The results show GT-12 extraction caused no contamination and had good reproducibility without any inter-day variation. Although GT-12 is less sensitive than the manual extraction method, it is sensitive enough to detect  $100 \, \text{IU/m}l$  as required by the CPMP guideline (CPMP/BWP/390/97) . Operation time of extraction by GT-12 was about 2/3 of that by manual extraction. Introduction of GT-12 may contribute to the increased efficiency of the NAT test.

Key words: NAT, HCV RNA, Automated extraction system GT-12, WHO international standard

# 緒 言

血液中のウイルス検査における最近の動向として核酸増幅検査法(NAT: Nucleic Acid Amplification Technology)の導入があげられる。NATは検出感度が極めて高く、従来に比しウィンドウ期を大幅に短縮でき、血液製剤の安全性を大きく向上させるものと期待されている。そこで、日本赤十字社血漿分画センターでは平成9年11月より分画製剤用原料血漿の適否の判定にPCR法によるNATを導入している。すなわち500人分の血漿検体をプールし、それを1検体としてHBV、HCV、HIVの3ウイルスについてPCR検査を行

い, ウイルス陽性血漿を特定し, 原料から排除している (以後 500NAT とする).

この PCR 法には抽出, 増幅, 検出の 3 行程があるが, 特に核酸の抽出作業には多大な労力と時間を必要とする. そのため, PCR 検査の合理化, 時間短縮には第一に抽出方法の自動化が望まれる.

一昨年ロシュ・ダイアグノスティックス(以後ロシュとする)は約2時間で96検体の抽出処理能力を持つ自動核酸抽出装置GT-12とそのHCVRNA抽出試薬(アンプリキャップHCV-GT)を開発した。このGT-12は大量の検体処理に適するのみならず、ヘパリン等のPCR反応阻害物質の除去

も容易であり、また、従来の遠心操作が不要である<sup>11</sup>. そこで我々は、今後 500NAT に GT-12 を導入する是非を判断するため、現在行っている SMI TEST EX R&D (住友金属工業)を用いた HCV RNA の抽出方法 (以後用手法とする)と検出感度や作業性等について両者の比較、評価を行った.

現在、NATに関する世界的な動向として CPMP(Committee for Proprietary Medicinal Products) よりガイドライン(BWP/390/97)が勧告されている $^2$ . これによって欧州では 1999 年 7月1日より血漿分画製剤において、その原料血漿に HCV RNA の NAT が義務付けられた. この検査の実施に先だって WHO により HCV について国際標準品が定められた. この国際標準品は HCV を表わす指標として新たに国際単位 IU を採用しており、ガイドラインで要求している NAT の検出感度は 100IU/ml である. そこで GT-12 の評価には、この国際標準品を含む5種の HCV RNA 陽性検体を用いて行った.

### 材料及び方法

#### 1. 棒体

GT-12 の評価には、以下に述べる 5 種類の検体を使用した。

1) WHO 国際標準品(WHO International Standard 96/790)

NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) より提供された国際標準品を使用した。genotype は1である。使用に当っては添付された調整方法に準じて10,50,100IU/mlの3濃度を3系列作成した<sup>3</sup>.

2) NIBSC 作業用品(NIBSC Working Reagent 96/586)

国際標準品と同様に NIBSC より提供された作業用試薬を使用した。 HCV RNA 量は IU で表され、genotype3 である。使用に当っては添付された調整方法に準じて 10,50,100~IU/ml の 3 濃度を作成した $^{4}$ .

### 3) Seroconversion Panel

Boston Biomedica, Inc. 社から販売されている 検体で、感染後から抗体陽転まで、経時的に頻回 採血したものである。用いたのは ID. PHV907、 PHV908 の 2 種でそれぞれの系列について陰性血 漿で 500 倍希釈したものを用いた.

#### 4) 自家標準品

genotype が 1 (1b) である HCV RNA 陽性検体をアンプリコア HCV モニター (ロシュ) によりコピー数を測定し、これを陰性血漿で希釈して 3.4, 34,340copies/ml に濃度調製した.

#### 5) 500NAT 陽性検体

現行の用手法による500NATで、HCV RNA 陽性となった7例の実際の検体である。その後の検査で500人の血漿プールの中に1人 HCV RNA 陽性者が含まれていた事が判明している。

#### 2. 測定方法及び測定機器

#### 1) 用手法による抽出

抽出は SMI TEST EX R&D (住友金属工業), アンプリコア HCV 検体希釈液 (ロシュ) を使用した. 尚, 使用した検体量は  $100\mu l$  である.

#### 2) GT-12 による抽出

アンプリキャップ HCV-GT による GT-12 での抽出は以下の様に行った<sup>1)</sup>. すなわち,溶解試薬により検体中の HCV 粒子から HCV RNA を溶出させ,ビオチン化プローブとのハイブリダイゼーションにより HCV RNA を捕捉し,ハイブリダイズ産物をアビジン固相磁性粒子により捕捉させる. その後,磁性粒子に捕捉されない未反応物を洗浄除去し,HCV RNA を捕捉した磁性粒子を専用緩衝液に再浮遊させた.使用した検体量は300 ェリである.

# 3) 核酸増幅と検出

増幅はアンプリコア HCV 増幅試薬 (ロシュ) によりサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600, PERKIN ELMER 社製) で行った. 検出はアンプリコア HCV 検出試薬 (ロシュ) により自動 ELISA 測定装置 (BEP III, DADE BEHRING 社製) で行った. 尚, アンプリキャップ HCV-GT にはインターナルコントロールが添付されており, 毎回の検査にはこのインターナルコントロールを検体と同時に測定し, PCR 反応の阻害等の確認を行った.

#### 3. 評価方法

以下に述べる項目について, GT-12 使用時にお

Table 1 Detection end point of the two HCV RNA assays: Comparison between automated (GT-12) and manual nucleic acid extraction methods,

0 1	Concentration –	Percentage of 1	positive results	95% detection end point *2			
Sample		GT-12	Manual	GT-12	Manual	P value *	
WHO International standard							
(96/790)	(IU/ml)						
(genotype 1)	100	99 (103) *1	100(20)				
	50	83 (103)	100(20)	66.0 IU/m <i>l</i>	23.7 IU/m <i>l</i>		
	10	39 (99)	50(20)	55.1~79.0 *3	17.1~32.8	≪ 0.001	
NIBSC working reagent							
(96/586)	(IU/ml)						
(genotype 3)	100	70 (20)	95 (20)				
	50	60 (20)	65 (20)	264 IU/m <i>l</i>	115 IU/m <i>l</i>		
	10	5(20)	45 (20)	169~411	80.6~164	≪ 0.005	
In-house standard	(Copies/ml)						
(genotype 1b)	340	100 ( 40)	100(40)				
	34	68 (40)	90 (40)	91.2 copies/ml	64.8 copies/ml		
	3.4	5(40)	10(40)	59.7~139	46.5~89.3	N.S.	

<sup>\*1:</sup> number of tests, \*2:95% detection end point as calculated by probit analysis, \*3:95% confidence interval, \*4: Paired t-test, N.S.: Not significant

#### ける成績を用手法と比較した.

#### 1) コンタミネーション否定

GT-12 使用時のコンタミネーションの有無を確認するため、48 個の陽性検体と陰性検体をそれぞれ交互に並べて検査を行った。陽性検体としてHCV RNA 量、 $3.6 \times 10^5$  copies/mI (アンプリコアHCV モニターで測定)を、陰性検体として遺伝子工学用水(ニッポンジーン)を使用した。

#### 2) 検出感度の日較差変動

検出感度の日較差変動は国際標準品,10,50,100 IU/ml の濃度を3系列(計9種)について4日間にかけて1回につき各々,8~10検体測定を行い検出率を比較した.

## 3) 検出感度

国際標準品, 10,50,100 IU/ml, NIBSC 作業用品, 10,50,100 IU/ml, 自家標準品, 3.4,34,340 copies/ml の 3 種の検体を使用し,用手法及び GT-12 による抽出で各々  $20\sim103$  回測定を行い,各濃度における検出率を調べた。検出感度は、検出率が 95% となる濃度をプロビット法50 により求め、これを検出限界とした。また BBI Seroconversion Panel 及び,500 NAT 陽性検体については各 2 回測定を行い、検出の可否から感度を比較した。

#### 4) 作業性

用手法と GT-12 の作業性の比較を作業時間,検体処理能力,操作性について評価を行った.

#### 結 果

# 1) コンタミネーション否定確認

 $3.6 \times 10^{\circ}$  copies/ml の HCV RNA 陽性の検体と陰性検体を交互に配置して GT-12 にて抽出後測定を行った結果,疑陽性はなくコンタミネーションは認められなかった。その後の試験実施時にも陰性コントロールへのコンタミネーションは認められなかった。

#### 2) 検出感度の日較差変動

測定を行った4日間において、いずれの検体でも変動係数(検出率の標準偏差/検出率の平均値×100)の範囲を大きく超えるものは無く、測定日による検出感度の変動は認められなかった。

#### 3) 検出感度

国際標準品、NIBSC 作業用品、自家標準品について GT-12 及び用手法で測定した結果を Table 1 に示した。国際標準品の測定結果は用手法では 50,100 $\mathrm{IU/m}l$  とも 100% 検出することができたのに対し、GT-12 での検出率は少し下がり各々、83%、99% であった。検出限界は GT-12 と用手法でそれぞれ 66.0 $\mathrm{IU/m}l$ 、23.7 $\mathrm{IU/m}l$  と両者には有意の差があった (P<0.001)。一方、NIBSC 作業用品

Table 2 Detection of HCV RNA in 500-fold diluted BBI seroconversion panels.

ID.(Genotype) PHV907(1b)

Days since lst sampilng	0	4	7	13	18	21
Concentration						
neat $(\times 10^6 \text{ copies/m}l)$	3	2	1	1	1	1
500 × dilution (copies/ml)	6,000	4,000	2,000	2,000	2,000	2,000
HCV Ab(PHA)	-	_	-	_	_	+
HCV RNA						
Manual	+/+	+/+	+/+	+/++/+	+/+	+/+
GT-12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

ID.(Genotype) PHV908(1a)

Days since 1st sampling	0	3	5	11	13	19	25	27	32	35	41	45	48
Concentration neat (× 10 <sup>5</sup> copies/ml) 500 × dilution (copies/ml) HCV Ab (PHA)	2 400 -	3 600 –	3 600 –	1 200 –	2 400 +	1 200 +	0.5 100 +	0.8 160 +	1 200 +	0.2 40 +	0.1 20 +	0.2 40 +	2 400 +
HCV RNA Manual GT-12	+/+	+/++/+	+/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/+	+/++/-	+/+	+/+	+/+

<sup>+ :</sup> positive, - : negative

では、100IU/ml においても GT-12 及び用手法の どちらも 100% 検出することができなかった。検 出限界は GT-12 と用手法でそれぞれ 264IU/ml, 115IU/ml でこれにおいても差があった(P<0.005)。自家標準品の測定結果では、340copies/ml は GT-12 及び用手法のどちらも 100% 検出することができたが 34copies/ml では陰性となる事があり、検出限界は GT-12 と用手法でそれぞれ 91.2copies/ml, 64.8copies/ml であった。用手法の 感度が優れていたが有意差はなかった。

次に BBI Seroconversion Panel の結果を Table 2に示した.各検体の濃度は BBI より提供されたコピー数で示した.測定は我々の行っている 500 NAT を考慮して検体を 500 倍希釈して行った.又,血清学的検査との比較のために原液を PHA 法で測定した. Panel PHV907 は GT-12 及び用手法ですべて検出することができた.一方, Panel PHV908 は用手法ではすべて検出することができが, GT-12 では一部で陰性となった.すなわち,GT-12では PHA 法陰性のウィンドウ期の検体および陽転後しばらくの検体はすべて検出できたが,陽転 3 週 (初回採血より 35 日) 以降の検体で2回測定中 1 回もしくは 2 回とも検出されないこ

とがあった。

Table 3 は 500NAT 陽性の 7 例についての結果をまとめたものである。いずれも PHA 法による抗 HCV 抗体は陰性であった。用手法と同様,GT-12 ですべてを陽性と検出した。この検体は,500人の血漿がプールされているが,その中に 1 名のHCV RNA 陽性者が含まれている。その陽性者の血漿のうち,コピー数の最も低いものは Sample. No4 で  $1.5 \times 10^4$  copies/ml であった。従って 500倍希釈しているので HCV RNA 量は 30 copies/ml を検出できたことになる。尚 7 例の genotype の内訳は 5 例は 1b であり,2 例は 2b であった.

#### 4) 作業性の比較

GT-12 を使用した抽出の検体処理能力は1回に96 検体である.作業時間は抽出工程については約2時間であるが,前準備が必要であり,検体,試薬,反応トレイの準備等を含めると約5時間程度必要であった.この前準備は比較的,作業量が多く,操作性に難があった.一方,用手法では検体処理能力は一人,約36 検体を約3時間程度で行っている.そのため,GT-12を使用した場合,用手法による作業と比べ,約2/3となり,1.5倍作業の効率化を図ることができた.

PCR screening by the manual method.									
Sample	genotype	Concentration (copies/ml)		HCV Ab (single)	HCV RNA (500pool)				
		single	500pool	PHA	GT-12				
No.1	1b	$5.0 \times 10^{6}$	10,000	-	+/+				
No.2	1b	$4.6 \times 10^4$	92	_	+/+				
No.3	1b	$8.4 \times 10^4$	168	_	+/+				
No.4	1b	$1.5 \times 10^4$	30	_	+/+				
No.5	1b	$5.0 \times 10^{4}$	100	_	+/+				
No.6	2b	$1.3 \times 10^{6}$	2,600	_	+/+				
No.7	2b	$1.0\times10^{5}$	200	_	+/+				

Table 3  $\,$  Detection of HCV RNA in HCV RNA-positive samples found by 500 pool

+ : positive, - : negative

#### 考 察

500NATの自動化に向けてロシュが開発した 自動核酸抽出装置 GT-12 を使用した HCV RNA 検査への適応評価を行った. その結果, コンタミ ネーション, 日較差変動については特に大きな問 題はなかった、しかし今回の評価を通して、GT-12で HCV RNA を抽出した場合の検出感度が用 手法より劣ることが示された. これは、国際標準 品, NIBSC 作業用品, 自家標準品のいずれの検体 の場合も同様であった. 抽出に使用する検体量が GT-12 では 300μl に対し, 用手法は 100μl であり, この点を考慮すると GT-12 での抽出効率は用手 法の1/3以下と考えられる.しかし用手法で行っ た 500NAT 陽性検体は GT-12 を使用した場合で もすべて検出できること, CPMP ガイドラインの 要求している国際標準品 100IU/ml の感度を満た していることから、多検体処理の 500NAT には、 この感度差は許容できる範囲なのかもしれない.

また、genotype の違いにより HCV RNA の検出率に差があり、genotype1 に比べ genotype3 の検出感度が悪かった。これは GT-12 使用のみならず、用手法による抽出の場合も同様の傾向があり、この原因はアンプリコア HCV 増幅試薬に起因するものと考えられ、今後改良の必要性が示された。 HCV RNA の PCR 法における genotype間による検出感度の差異について同様に Lelieら®も PCR の方法によっては genotype1 に比べgenotype2,3 は検出感度が低い場合があると述べている。要因としては、プライマーやプローブの選択位置やテンプレートの 2 次構造による影響等

が考えられている.

今回の評価実験を通じて HCV 国際標準品を使用した. この標準品の HCV RNA 量については公式には 1IU/ml = 5genom equivalent/ml と報告されているが,アンプリコア HCV モニターで測定すると 1IU/ml = 1.3copies/ml となった. また,EPFA/NIBSC 共催の血液由来ウイルスの NATに関するワークショップや第 VIII 回 SoGAT会議での 討論によると 1IU/ml = 2.3~2.7genom equivalentと言う意見もある. 今回の評価では,試料のウイルス濃度を公称されている値を基にした為,推定された検出限界が用いた試料により大きな差があった. この点を含め今後の評価で補正する必要がある.

作業性に関しては、GT-12を使用することにより HCV RNA 抽出操作は用手法に比べ人による作業は 2/3 程度へ簡略化された. 今後は更なる自動化に向けて抽出後の増幅、検出までの一連の自動化機器の開発や HCV GT 試薬の感度の向上、そして HBV, HIV 試薬の開発が望まれる. これにより短時間で多検体処理が可能となり検体プール数を減少させ、検出感度の向上につながるのみならず、人的過誤を減少させることでより高い安全性が期待できる.

謝辞:本実験にあたって500NAT, HCV RNA 陽性の7例のgenotypeとコピー数の測定をして頂きました中央センター医薬情報部の方々及び,多大な協力を頂きましたロシュ・ダイアグノスティックス, PCR ビジネス部の鈴木徹 哉様に深く感謝いたします。本論文の要旨は第47回日本輸血学会総会(仙台)において発表した。

#### 文 献

- 1) ロシュ・ダイアグノスティックス. 自動核酸抽出 装置「GT-12」使用マニュアルより.
- 2) CPMP [THE INTRODUCTION OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY (NAT) FOR THE DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN PLASMA POOLS (CPMP/BWP/390/97)] [ADDENDUM TO NOTE FOR GUIDANCE ON PLASMA DERIVED MEDICINAL PRODUCTS (CPMP/BWP/269/95)] London, 24March 1998 CPMP/BWP/390/97.
- 3) NIBSC FIRST WHO INTERNATIONAL STANDARD FOR HEPATITIS C VIRUS RNA GENO-

- MIC AMPLIFICATION TECHENNOLOGY AS-SAYS NIBSC code: 96/790 Instructions for use (25 November 1997: second Version).
- NIBSC WORKING REAGENT FOR TESTING PLASMA POOLS FOR HCV RNA (96/586) Instruction for use.
- 5) 細菌学実習提要, 医科学研究所学友会編, 丸善株式会社, 1984.
- 6) P.N.Lelie, H.T. M. Cuyper, A.A. J. van Drimmelen, W.G. V. Quint, et al; Quality Assessment of Hepatitis C virus Nucleic Acid Amplification Methods, Infusionsther Transfusionsmed 25: 102—110, 1998.