

あること、およびRCLに関する試験・検査の一つとしてRCLにenv配列が含まれていないことを確認しなければならないこと、の2点を推奨することとされた。また、レンチウイルスベクターの体内動態、染色体への挿入および生殖細胞系列への伝達を調べるための適切なモデル動物を用いたアッセイ系を開発することが推奨された。

その後EUより、“レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針”案が提案され、ICHの共通のガイドラインとしては取り扱わないものの、EUの指針案についての論議がGT-DGでもつづけられた。各極から出された意見を採り入れた改正案が示され(表4)、2005年に正式にCPMPガイドラインとして発出された⁵⁾。

4. X-SCID 遺伝子治療における白血病発症とリスク評価

フランスでX1連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の遺伝子治療を受けた患児2例に白血病発症⁶⁾したことを受けて、2004年のワシントン会議ではフランスでの最新情報と各極の対応が報告され、そのリスク評価を実施した。このリスク評価の前提として、X-SCIDおよびアデノシンデアミンゼ欠損症(ADA/SCID)の遺伝子治療臨床試験から、SCIDに対する遺伝子治療の臨床的有用性が確認された。

このような有用性を前提として、SCIDの遺伝子治療における一般的リスク要因とリスクベネフィットに基づくX-SCID遺伝子治療の実施の是非について議論を行った。その結果、①患者の年齢、②細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数、③投与量、④遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクが一般的リスク要因であるとされた。

このようなリスク要因を考慮したうえで、現時点でのX-SCIDの治療の第1選択肢としては骨髄移植を考慮すべきこと、さらに骨髄移植が失敗に終わった場合や適切なドナーがない場合、リスクベネフィットの観点から現行のベクターを用いた遺伝子治療を選択するのもやむをえないとされた。

患者の年齢に関しては、当初の2例の白血病発症患児は投与時に生後6カ月未満であったことから、

表4 レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針の項目

- | |
|--------------------------------------|
| 1. 序 |
| 2. もとになるレンチウイルスの性質とレンチウイルスベクター開発への影響 |
| 3. レンチウイルスベクターの設計 |
| 4. レンチウイルスベクターの製造方法 |
| 5. レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験 |
| 5.1 遺伝子導入活性 |
| - 遺伝子組み込み能 |
| - 導入遺伝子の機能 |
| 5.2 レンチウイルスベクターの粒子数測定 |
| 5.3 増殖性レンチウイルス(RCL)否定試験 |
| 6. がん原性 |

6カ月以内の患児ではリスクが高いとされた。しかし、その後、3例目の白血病発症が確認され、3例目の患児の投与時の年齢が9カ月であったことから見直しが必要となっている。しかし、年齢(月齢)の低い患児ほどリスクが高いと想定されていることには間違いないであろう。

また、細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数・染色体挿入頻度が大きなリスク要因とされ、細胞当たり平均1を超えること、すなわち1個の細胞に複数のベクターが挿入されることを出来るかぎり避けるべきとされた。また、投与量、すなわち患者に投与した遺伝子導入細胞の総数が多いほどリスクが高いとされた。

さらに、遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは、選択的優位性を持つと予想される幹細胞(すなわち、他の幹細胞にくらべて増殖能が高い幹細胞)、幹細胞、T細胞または他のすでに分化した細胞の順にリスクが高いとされた。

染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するためのいくつかの新しい技術が開発中であり、現在用いられているこれらの技術は、まだ十分にバリデーションはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用な手法であるとされた。特に、LAM-PCR(linear amplification mediated PCR: 片方向増幅を介するポリメラーゼ連鎖反応)法⁷⁻⁹⁾が広く用いられており、またその改良法の開発も進められているが、LAM-PCR法はまだバリデーションされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要とされた。特に、LAM-PCR法において検出される主要なバンドは、疾患の過程

でも変化することが知られており、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病などの副作用の発現の目安として使うことは出来ないと言われた。特に、遺伝子導入細胞のクローナリティー(クローン増殖)の傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻繁に被験者のモニタリングを行う必要があるとの結論が出された。

臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティーをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するため、複数の方法を組み合わせることが科学的に妥当であると議論で確認された。さらに、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう、被験者の検体などの試料の保管が推奨されている。

その後、4例目の白血病発症も確認され、現在もフォローアップがつづけられている。X-SCID 遺伝子治療による白血病発症の主要因についてはいまだ不明であるが、同様の治療を実施してまだ白血病発症が認められていないイギリスでの遺伝子治療を含め、従来のベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療はこれ以上行わないとされている(イギリスでは患児の治療が予定されたエントリー数に達したためとされている)。近いうちに、より安全性を高めたベクターを用いて X-SCID 遺伝子治療が再開される予定になっている。

5. 遺伝子治療臨床試験に参加した被験者の長期フォローアップ(追跡)調査の FDA ガイドラインに関する議論

FDA は、遺伝子治療を受けた被験者の長期フォローアップに関するガイダンスとして、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療薬治験に参加した被験者の増殖性ウイルス(RCV)感染の監視に特化したガイダンス「レトロウイルスベクターをもとにした遺伝子治療薬に混入する増殖性レトロウイルス試験およびレトロウイルスベクターを用いた治験の患者の追跡調査に関するガイダンス追補」を2000年9月に発出した(2006年11月改正¹⁰⁾。

しかしその後、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療による白血病発症という深刻な

有害事象が発生し、また、その他のベクターによる遺伝子治療の長期フォローアップに関するガイダンスも必要とされたことから、FDA は、長期フォローアップに関するガイドラインの作成を検討し、原案について2004年のGT-DGで議論を行った。

その後、FDA は2005年8月に「製薬業界へのガイダンス：遺伝子治療臨床試験-遅発性の有害事象に関する被験者の観察」案を提出した。このガイドライン案では、遺伝子治療臨床研究のうち遅発性有害事象のリスク評価により長期フォローアップが必要と判断されるものについては、① 被験者の長期フォローアップ調査を遺伝子治療実施後15年間は実施するよう計画する必要がある。② その間に収集しなければならないデータとしては、悪性腫瘍、神経疾患、リウマチ性疾患、免疫性疾患・血液疾患などの新たな臨床症状の発症の有無のほか、ベクター配列の持続性をベクターが検出されなくなるまで継続実施する必要がある。また、組み込み型ベクターによる造血幹細胞遺伝子治療の場合には、クローナリティーの評価を実施する必要がある。③ 遺伝子治療実施後5年間は最低、年に一度の健康診断・検査によるフォローアップ調査を、その後6~15年目までは調査票によるフォローアップ調査を実施しなければならない。また、これに用いる調査票の内容は、わかりやすいものにとどめておく必要があるとされている。④ このフォローアップ調査の結果は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者における長期リスクを評価するために、毎年とりまとめて FDA に報告することを求めている。

FDA は、2006年11月に上記ガイダンスを発出した¹¹⁾。本ガイダンスは前出のレトロウイルスベクターに関するガイダンス¹⁰⁾を補足する内容ともなっている。

6. 腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保と公開ワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常細胞では増殖できず、腫瘍細胞で選択的に増殖して細胞を溶解することが可能な制限増殖ウイルスであり、これまで十分な効果がみられてこなかった従来のがん治療遺伝子治療にかわる新たな治療法として期待されている

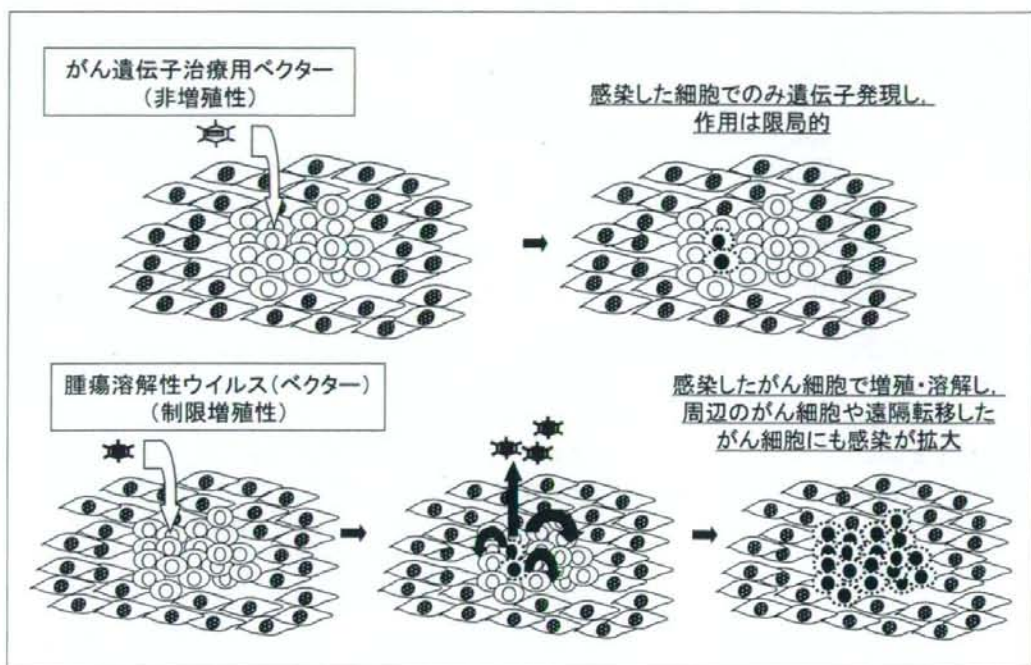


図1 遺伝子治療用ベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い
腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞内では増殖できないが、標的とするがん細胞内で選択的に増殖可能な制限増殖型ウイルスである。

ものである(図1)。腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスベクターを用いるものへと移行しつつある(図2)。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている¹²⁻¹⁶⁾。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床適用は未知・未経験の要素も多い領域であり、基礎となる科学的知見も充分に集積されていないことから、GT-DGでは、品質確保の方策、安全性や有効性評価のための動物を用いた非臨床試験のあり方、さらには臨床研究における安全性・有効性評価などを議論するために、公開ワークショップを開催して議論を行い、その成果をコンセプトペーパーとして公開した。

腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性には、①腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、②動物やヒトで期待される効果の

評価、③ウイルス複製の腫瘍選択性、④臨床上の安全性、④動物試験に用いる適切な動物モデル、⑤腫瘍溶解性ウイルスの体外排出の測定法とデータ、などが特に重要な課題とされている。

(1) 腫瘍溶解性ウイルスの設計および特性解析

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクター中のRCVの検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限複製能を持つことから、RCVの検出よりも目的ウイルスの変化体をどのように検出するかが重要とされている。また、品質の恒常性の観点から、ウイルス感染力力価ばかりでなく、力価に対する粒子数の比を規格化することが重要とされた。

(2) 非臨床試験

腫瘍溶解性ウイルスの安全性評価や目的とする効

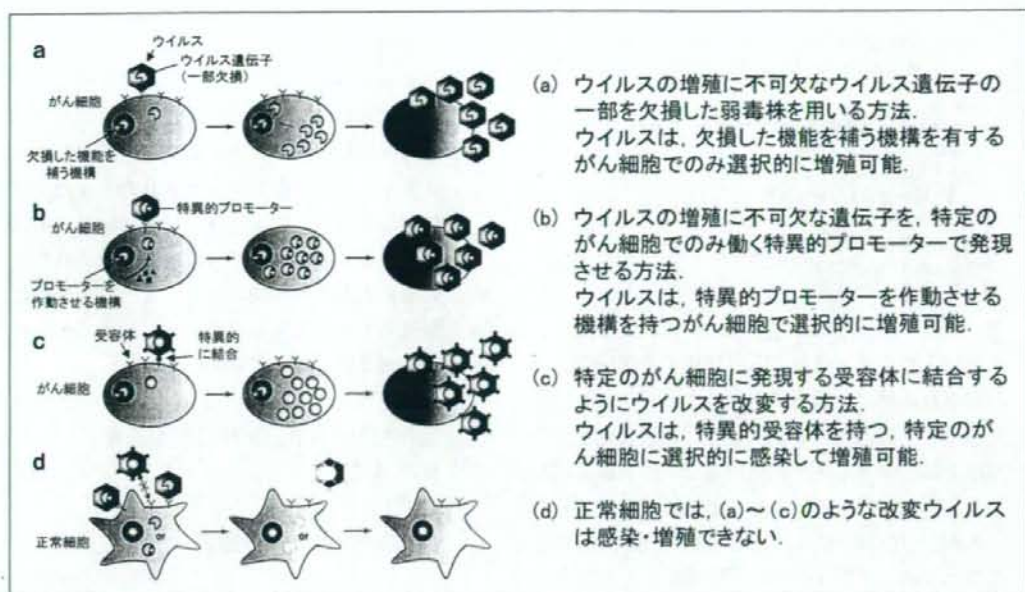


図2 ウイルスをがん細胞で選択的に増殖させる方法
(Ries SJ et al, 2004¹³⁾, Fig 1より改変)

果が得られるかの評価に、動物モデルが有用であることが一致した意見であった。しかし、① 腫瘍溶解性ウイルスの感染および複製能に動物種特異性があること、② 動物にヒト腫瘍細胞を移植した腫瘍モデル動物では、ウイルスがヒト体内とは異なる指向性・分布を示すこと、③ 動物での免疫反応がヒトとは異なること、などから動物モデルの限界も指摘されている。

しかし、生体内分布や安全性・毒性の評価、臨床での投与経路や用法・用量の選択などに関して、動物モデルが有用な情報を与えるということについてはコンセンサスが得られている。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株および腫瘍細胞培養株を用いた試験、またはヒト正常組織およびヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験が有用とされている。

(3) 臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスは、その複雑な特性から、開発の基礎段階で十分に特性解析することが困難であり、また有用な動物モデルが必ずしも存在するわけではないことから、臨床研究の開始に当たっては多

くの検討すべき課題があるとされた。

(4) 臨床薬物動態

臨床薬物動態の解析手法として、被験者のモニタリングにはPCR、感染性力価試験のいずれも用いられている。いくつかの腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究において、血液中に検出されるウイルス量は投与直後と4~7日目にピークが認められた。このような2相性のピークは、局所投与および静注した場合のいずれでも観察されており、ウイルスの複製をモニターする手段となりうるとされている。

また、用法・用量設定の必要性、腫瘍溶解性ウイルスに対する患者の中和抗体の影響が重要な課題であるとされている。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外排出に関する予防措置も大きな課題である。

(5) 腫瘍溶解性ウイルス開発の今後の展望

腫瘍溶解性ウイルスの開発の新たな流れとして、化学療法や放射線療法と腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせる併用療法の有用性が示唆されており、今後このような併用療法の開発が進むものと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの設計改良のアプローチとしては、免疫反応を活性化させる遺伝子などの治療

表5 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方

1. 緒言
2. 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みにおけるリスク要因
 - 2.1 ベクター
 - 2.2 投与量および投与経路
3. 非臨床試験
 - 3.1 一般に考慮すべき事項
 - 3.2 生体内分布試験
4. 患者のモニタリング

用遺伝子をウイルスゲノムに挿入する遺伝子治療との組み合わせや、腫瘍細胞へのターゲティング能の増強などが行われている。また、殺腫瘍効果の作用機序を解明できるデータを得るための非臨床試験および臨床試験の取り組みも行われている。

現在、GT-DGでは、2008年を目途に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性評価に関するICH見解案を作成中である。

7. ICH見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方

GT-DGでは、2005年から「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方」に関するICH見解をまとめるための議論が開始された。本見解の最も大きな目的は、遺伝子改変された次世代をつくらないということに尽きている。遺伝子治療用ベクターが生殖細胞の染色体へ組み込まれなくとも、生殖細胞へ遺伝子導入されただけでも発生毒性など他の安全性の懸念はもちろん生じるが、発生毒性などは他のガイドラインなどで対応していくものとされた。

本見解では、非臨床試験を通じて体内分布試験の実施によって生殖組織へのベクターの分布が起こるか否か、またベクターが生殖組織で検出された場合にはその検出が持続的か一過性を明らかにすることを求めている。さらに、生殖組織で持続的に検出された場合、生殖細胞そのものに遺伝子が組み込まれているのか、白血球など周辺細胞にのみ局在するかを明らかにすることが求められている。これらの試験を通じて、ベクターが生殖細胞内に持続的に保持されることが明らかになった場合には、ヒトへの使用に際しては規制当局と十分な議論をすること

を求めている。

非臨床試験でベクターが一過性にせよ生殖腺に局在する可能性が示された場合には、臨床試験において患者の精液にベクターが局在することがないかモニタリングを考慮すべきとされた。また、臨床試験の期間中は、非臨床生体内分布試験の結果にかかわらず避妊手段をとるべきことが推奨された。なお、対象患者が生殖不能な場合、または余命が短いことが見込まれる重篤な疾患では、精液のモニタリングは必要ないとされている。

本見解は、2006年のICHシカゴ会議で最終案がとりまとめられ、ICH運営委員会によって承認された(表5)¹⁷⁾。

GT-DGの今後の活動

ICH GT-DGの活動では、遺伝子治療をめぐって取り組むべき課題がより明確になりつつあることや、ここにきてICH各極で遺伝子治療用医薬品の規制当局への承認申請が出されていることへの早急な対応もあり、ICH見解の作成やガイドライン策定を見据えた議論も行われるようになってきている。今後、ベクターの排出に関する見解の作成やガイドライン化、腫瘍溶解性ウイルスに関する見解の作成など、いくつかの重要な科学的コンセプトが出されていく予定になっている。

わが国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米にくらべて非常に少なく、臨床研究での情報は多くが海外に依存している現況であることは否めない。しかし、ここ数年はわが国においても遺伝子治療薬の開発が急速に進んでおり、遺伝子治療薬に関するICH見解やガイドラインの策定が、わが国における遺伝子治療薬開発の促進につながっていくと期待される。

文 献

- 1) Marshall E: Clinical trials: gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286: 2244-2245, 1999.
- 2) Hutchins B: Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *BioProcessing Journal* 1: 25-28, 2002.
- 3) Hutchins B, Sajjadi N, Seaver S, Shepherd A, Bauer SR et

- al : Working toward an adenoviral vector testing standard. *Molecular Therapy* 2 : 532-534, 2000.
- 4) Bamford KB, Wood S, Shaw RJ : Standards for gene therapy clinical trials based on pro-active risk assessment in a London NHS Teaching Hospital Trust. *Q J Med* 98 : 75-86, 2005.
 - 5) CHMP Guideline : Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03, 2005. (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/245803>)
 - 6) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
 - 7) Schmidt M, Glimm H, Wissler M, Hoffmann G, Olsson K et al. : Efficient characterization of retro-, lenti-, and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 996 : 112-121, 2003.
 - 8) Schmidt M, Carbonaro DA, Speckmann C, Wissler M, Bohnsack J et al. : Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9 : 463-468, 2003.
 - 9) Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K et al. : Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell : risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101 : 1284-1289, 2003.
 - 10) FDA Guidance for Industry : Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/retrogt1000.pdf>)
 - 11) FDA Guidance for Industry : Gene therapy clinical trials - observing subjects for delayed adverse events, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/gtclin.pdf>)
 - 12) European Medicines Agency (EMA) : Report from the CPMP gene therapy expert group meeting 26th-27th. EMA/CPMP/1879/04/Final 2004, February, 2004.
 - 13) Ries SJ, Brands CH : Oncolytic viruses for the treatment of cancer : current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today* 9 : 759-768, 2004.
 - 14) Lin E, Nemunaitis J : Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther* 11 : 643-664, 2004.
 - 15) Aghi M, Martuza RL : Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24 : 7802-7816, 2005.
 - 16) Yamaguchi T, Uchida E : Regulatory aspects of oncolytic virus products. *Curr Cancer Drug Targets* 7 : 203-207, 2007.
 - 17) ICH Considerations : General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors, October 2006. (<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA3363.pdf>)

原 著

C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための 第一次国内標準品の作製

水沢左衛子^{1)h)} 岡田 義昭^{1)a)h)} 堀内 善信^{2)h)} 田中 建志^{3)h)}
佐藤 功栄^{3)h)} 金子 健二^{4)a)h)} 佐々木祐子^{5)h)} 田中 利明^{6)a)}
伴野 丞計^{7)a)} 友水 健雄^{8)h)} 速水 照一^{9)a)h)} 土方美奈子^{8)h)c)}
平子 一郎^{9)a)h)d)} 真弓 忠^{10)a)} 三上 貢一^{11)a)h)e)} 三代 俊治^{8)a)h)}
宮本 誠二^{12)a)h)} 牟田 健吾^{12)h)} Thomas Weimer^{13)h)}
Todd Gierman^{14)h)} 小室 勝利^{15)a)} 山口 照英^{15)a)}

¹⁾国立感染症研究所血液・安全性研究部, ²⁾国立感染症研究所細菌第二部, ³⁾埼玉県赤十字血液センター,

⁴⁾日本製薬株式会社, ⁵⁾株式会社ベネシス, ⁶⁾バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,

⁷⁾日本赤十字社血漿分画センター, ⁸⁾東芝病院研究部, ⁹⁾バイエル薬品株式会社, ¹⁰⁾自治医科大学,

¹¹⁾アベンティス ファーマ株式会社, ¹²⁾財団法人化学及血清療法研究所, ¹³⁾アベンティス ベーリング,

¹⁴⁾バイエルヘルスケア, ¹⁵⁾国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,

^{a)}血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会

(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),

^{b)}NAT 国内標準品作製のための共同研究グループ

^{c)}現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,

^{d)}現シェリング・プラウ株式会社, ^{e)}現バイエル薬品株式会社

(平成 17 年 1 月 5 日受付)

(平成 17 年 5 月 6 日受理)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa^{1)a)}, Yoshiaki Okada^{1)a)h)}, Yoshinobu Horiuchi^{2)h)}, Takeshi Tanaka^{3)h)},
Koei Sato^{3)h)}, Kenji Kaneko^{4)a)h)}, Yuko Sasaki^{5)h)}, Toshiaki Tanaka^{6)h)},
Tsugikazu Tomono^{7)a)}, Takeo Tomomizu^{8)h)}, Shouichi Hayami^{9)a)h)}, Minako Hijikata^{8)h)c)},
Ichiro Hirako^{9)a)h)d)}, Makoto Mayumi^{10)a)}, Koichi Mikami^{11)a)h)e)}, Shunji Mishiro^{8)h)},
Seiji Miyamoto^{12)a)h)}, Kengo Muta^{12)h)}, Thomas Weimer^{13)h)}, Todd Gierman^{14)h)},
Katsutoshi Komuro^{15)a)} and Teruhide Yamaguchi^{15)a)}

¹⁾Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,

²⁾Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,

³⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center, ⁴⁾Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,

⁵⁾Benesis Corporation, ⁶⁾Baxter Limited BioScience, ⁷⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,

⁸⁾Department of Medical Science, Toshiba General Hospital, ⁹⁾Bayer Yakuin Ltd.,

¹⁰⁾Jichi Medical School, ¹¹⁾Aventis Pharma Co. Ltd.,

¹²⁾The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, ¹³⁾Aventis Behring Ltd., ¹⁴⁾Bayer Healthcare,

¹⁵⁾Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science.

³⁾Subcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman: Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences),

⁴⁾Working Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,

Present address: ¹⁾Department of Respiratory Diseases, Research Institute,

International Medical Center of Japan, ²⁾Schering-Plough K.K., ³⁾Bayer Yakuin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assay (96/790) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma (119 and 122) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately 10^5 international units (IU)/ml in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay (Version 1) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was $10^{5.00}$ ($10^{4.88} \sim 10^{5.20}$) IU/ml. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU/ml. Each vial of the National Standard contains 0.5 ml of HCV plasma (genotype 1b) diluted in cryosupernatant and should be stored at -80°C .

Key words: HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology (NAT) assay, Blood safety

1. はじめに

供血者のC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤によるHCVの感染が報告された。これは、HCVに感染してから抗体が検出されるまでのウインドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた^{1,2)}。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは1999年7月1日から原料血漿プールでHCV-RNAの核酸増幅検査(NAT)を実施することになった。すでにイギリスをはじめオランダ、ドイツ、イタリア、アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており、NATを実施する施設で使用されていたが、HCV-RNA量がコピー数やgenome equivalent等まちまちの単位で表示されていたので、標準品のHCV-RNA量やNAT法の感度を相互に比較することが出来なかった。イギリスのNIBSCによってHCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され、1997年10月にWHO国際標準品(96/790)が制定され、国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった^{3,4)}。わが国においては厚生省告示第427号によって、平成13年3月1日から製造され、又は輸入される血液製剤の原料血漿についてB型肝炎ウイルスDNA、C型肝炎ウイルスRNA及びヒト免疫不全ウイルスRNAに対するNATを実施しなければならないことに改められた。実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについてHCV-RNAのNATが実施された。しかし、施設ごとにNAT法が異なり、自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため、それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった。国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより、施設間の比較や評価が可能になると考えられた。一方、国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次HCV-RNA国内標準品を作製したので報告する。国際標準品は genotype 1 であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高い genotype 1b とした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場で NAT が実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスの NAT のための国内標準品でもある。

2. 材料および方法

1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与された HBs 抗原、抗 HIV-1/2 抗体、HBV-DNA、HIV-RNA のすべてが陰性で、HCV 陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られる genotype 1b の 2 つの血漿 (119 と 122) を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 10^6 国際単位 (IU)/ml に希釈して -80°C で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA 国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいバイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して 10 倍希釈系列 (10^{-1} から 10^{-7}) を調製することとし、日を替えて 2 回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した (第 1 回測定)。このとき使用した国際標準品は小分けして -80°C に凍結保存して第 2 回測定に用いた。

2) HCV-RNA 国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿 122 (PHA 力価 2^4 、RNA 量 $2\sim 3 \times 10^6$ IU/ml、容量 185ml) をあらためて約 10^6 IU/ml に脱クリオ血漿で希釈、0.5ml ずつガラス瓶に分注し -80°C で凍結して、HCV-RNA 国内参照品候補 122 (候補品) とし、参加施設に送付した。各施設は初回は 10 倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために 2 回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで 7 段階の 10^4 希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて 4 回測定を実施した (第 2 回測定)。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA 国内標準品候補の WHO 国際標準品に対する力価を推定した。

3) 参加施設と測定方法

日常的に HCV-NAT を実施している 9 施設 (国内 6 施設、米国 2 施設、ヨーロッパ 1 施設) に候補品を配布し、7 施設 (国内 5 施設、米国 1 施設、ヨーロッパ 1 施設) から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその 95% 信頼区間を推定した。7 施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

3. 結果

1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所 5 施設 (国内 3、海外 2)、公的機関 1 施設、その他 1 施設の合計 7 施設から結果が返送された。Table 1 に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4 施設がアンプリコア HCV (Ver. 1) 変法、2 施設が自家法の nested PCR 法、1 施設が自家法の single PCR 法を用いて測定した。反応当たりの試料の量は $40\sim 400\mu\text{l}$ の血漿に相当した。

2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々な NAT 法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では 2 つの HCV 陽性血漿 119 と 122 を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能のように容量の大きい血漿 122 を候補品の原料として選択した。血漿 122 の HCV コア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction ^a	Eq. Vol. Amplified ^b
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house Nal	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D : Smi-test EX-R&D (Nippon Genetics Co. Ltd.)

Amplicor : Amplicor HCV version 1 (Roche)

QIAamp : QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

b) Eq. Vol. Amplified: the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

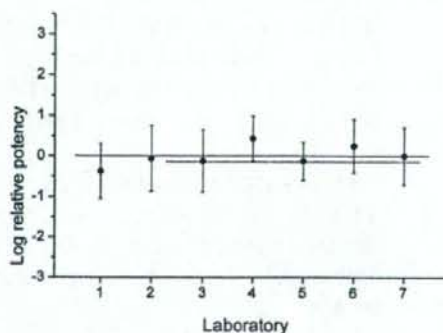


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard (96/790). The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data, $-0.001 (-0.204 + 0.201)$. The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2, $+0.066 (-0.161 + 0.292)$.

配列を決定して genotype 1b であることを確認した。

3) 候補品 122 の国際標準品 (96/790) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し、7施設において $10^{6.5}$ 希釈系列で測定した (第2回測定)。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard (96/790). Overall (a) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall (b) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	log ₁₀ IU/ml		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall (a)	5.00	4.80	5.20
Overall (b)	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその95%信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log_{10} 10^{5.00}$ であった。WHO国際標準品(96/790)の力価は 10^5 IU/ml であるから、候補品の力価は $10^{5.00}$ ($10^{4.80-5.20}$) IU/ml、即ち 100,000 IU/ml

と推定された (Table 2).

参加7施設中、施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった。また施設2では不連続な陽性結果が多く、測定結果のばらつきが大きかった。そこで、この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果、5施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{6.000}$ であった (Fig. 1)。よって、候補品の力価は $10^{6.00}$ ($10^{6.00-0.20}$) IU/ml、即ち 116,300 IU/ml と推定され、全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2)。最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は $10^{6.00}$ ($10^{6.00-0.20}$) IU/ml となり、2つの分析法による推定値はよく一致した。

以上の結果から、候補品 122 の国際標準品に対する力価は $10^{6.00}$ IU/ml と推定され、力価 100,000 IU/ml の国内標準品として 1999 年 12 月に小委員会承認された。

4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので、異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である。HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である。本共同研究によってわが国で初めて、国際単位表示された HCV-RNA の国内標準品が制定された。候補品の 95% 信頼区間は力価 $10^{5.80}$ IU/ml に対して $10^{6.00-0.20}$ IU/ml であった。また参加施設のなかの力価の最大は $10^{6.40}$ IU/ml (施設 4)、最小は $10^{5.60}$ IU/ml (施設 1) で $10^{0.80}$ 倍の相違であった (Table 2)。これらの値はエンドポイントの測定を $10^{6.5}$ 倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる。これは本共同研究の参加施設を日常的に HCV-NAT を実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる。国内標準品は分与される予定であるので、血液製剤の安全性確保のための NAT 試験法や診断薬の評価、臨床

検査センターにおける HCV-RNA 検査の評価に広く用いられるようになれば、相互の性能を容易に比較することが可能になり、試験法・検査技術の向上が期待できる。各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である。こうして得られた有効検出限界をもとに、たとえば 95% 陽性反応を得られる濃度と 50% 陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し、継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる。

5. 結 論

血漿の HCV-RNA の NAT のための国内標準品を作製した。国内標準品は HCV 抗体陽性の HCV genotype 1b 陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し、0.5 ml ずつバイアルに分注、 -80°C で凍結保存したもので、その力価は 100,000 IU/ml である。

謝辞：本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された。本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業、血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた。

文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*. 345: 1173-1174, 1995.
- 2) Vrielingk H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*. 68: 55-56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*. 76: 149-158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*. 78: 217-224, 2000.



An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products

Eriko Uchida^{a,*}, Koei Sato^b, Akiko Iwata^b, Akiko Ishii-Watabe^a,
Hiroyuki Mizuguchi^a, Mikio Hikata^c, Mitsuhiro Murata^c,
Teruhide Yamaguchi^a, Takao Hayakawa^a

^aNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^bInstitute of Saitama Red Cross Center, 398-1 O-aza-narashinden, Kumagaya, Saitama 368-0806, Japan

^cJSR Corporation, Tsukuba Research Laboratories, Miyukigaoka 25, Tsukuba, Ibaraki 305-0841, Japan

Received 20 February 2004; accepted 19 August 2004

Abstract

Contamination by replication-competent retrovirus (RCR) is one of the most important safety issues of retrovirus vector products for gene therapy clinical research. To improve the sensitivity of RCR detection and to shorten the assay period, we have developed a novel RCR detection method (infectivity RT-PCR method) based on real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in combination with virus infection and a novel virus concentration method using polyethyleneimine (PEI)-conjugated magnetic beads. In this method, permissive cells were infected with RCR samples, and amplified RCR in the culture supernatants was adsorbed by PEI-beads. Then RCR RNA extracted from PEI-beads was quantified by real-time RT-PCR. We demonstrated that 1 infectious unit (iu) of RCR spiked in 10^6 cfu/ml of vector products could be detected within 3 days, and the sensitivity for viral detection was increased 3- to 10-fold compared with the direct S + L- assay. By this method, the presence of retroviral vector interfered with RCR detection only slightly. In conclusion, infectivity RT-PCR conducted in conjunction with virus concentration using PEI-beads can detect RCR more sensitively and rapidly than the conventional infectivity assay.

© 2004 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Retrovirus vectors are widely used in human gene therapy to treat genetic diseases, cancer, and other conditions. The retroviral vector products currently used in gene therapy clinical researches are replication-defective retroviruses, and the primary safety concern

associated with the use of retroviral vector products is contamination by replication-competent retrovirus (RCR). RCR is the major risk factor for insertional mutagenesis, and exposure to retrovirus vector contaminated with a high titer of RCR has been shown to lead to lymphoma in rhesus monkeys [1].

The most likely source of RCR is the vector-packaging sequence. Since RCR can arise by homologous recombination during the production of retroviral vector supernatants, sensitive assays for the screening of RCR in vector products are required. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has developed guidelines for testing of RCR in clinical grade vectors and transduced cells, as well as for monitoring patients

Abbreviations: RCR, replication-competent retrovirus; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; PEI, polyethyleneimine; iu, infectious units; cfu, colony forming units; MLV, murine leukemia virus; AMLV, amphotropic MLV.

* Corresponding author. Tel./fax: +81 3 3700 9217.

E-mail address: uchida@nihs.go.jp (E. Uchida).

treated with gene therapy protocols [2]. The FDA guidelines recommend that retrovirus vector products be tested for the presence of RCR by inoculation and passage of the test sample with a permissive cell line for a minimum of 5 passages in order to amplify any potential RCR present, followed by subsequent testing with an appropriate indicator cell assay. The PG-4 S + L- focus-forming assay and the marker rescue assays have been routinely used for the detection of RCR [3–7]. However, these conventional cell-based assays are known to have several disadvantages: the assays take a long time (weeks), visual evaluation of the results requires skill and is labor intensive, and the limited dynamic range requires many dilutions. Therefore, there is need for a more sensitive and rapid quantitative detection method for RCR.

Polymerase chain reaction (PCR) is a highly sensitive method for the detection of viral genomes [8]. It has been reported that PCR assays were capable of detecting one or more copies of RCR provirus in 500,000 cells [9]. PCR-based assay for RCR is used for biosafety monitoring of transduced cells with retroviral vectors [10] and of patients receiving retroviral gene therapy [9,11].

Moreover, the recently developed fluorescence-based real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay allows precise quantification of RNA genomes. Since quantitative RT-PCR can be performed in a short time with a wide dynamic range and high throughput, it is expected to be particularly suitable for quantifying RCR in viral stocks with high sensitivity. However, the PCR-based assay detects not only infectious virus genomes. In previous studies, PCR-based assays detected viral DNA fragments derived from packaging cell lines contaminated into retrovirus vector supernatants and caused false-positive findings [12,13]. Therefore, when quantitative RT-PCR is used for RCR detection, some process is required to distinguish infectious RCR RNA and viral DNA fragments prior to the quantitative RT-PCR assay. Infection of RCR into a permissive cell line is suitable for this purpose, because infectious RCR selectively replicates in cells without replication of viral DNA fragments and retrovirus vectors.

In addition, if RCR could be concentrated when preparing the sample for quantitative RT-PCR, it is expected that the sensitivity of RCR genome detection could be improved. In a previous study, our group demonstrated that polyethyleneimine (PEI)-conjugated magnetic beads efficiently adsorbed many types of viruses, with the exception of some non-enveloped viruses, and this novel virus concentration method using PEI-beads enhanced the sensitivity of virus detection by both PCR and RT-PCR [14].

In the present study, we have established a novel RCR detection method based on infectivity RT-PCR. Infectivity RT-PCR is a hybrid method that attempts to

combine the best features of infectivity assays and quantitative RT-PCR. Samples are allowed to amplify in cell culture, as in conventional assays. Replication-competent retrovirus is quantified by real-time quantitative RT-PCR rather than by counting foci. In addition, we applied a novel virus concentration method using PEI-beads to concentrate RCR in culture supernatants before quantitative RT-PCR. We demonstrated that this novel method could detect RCR more sensitively and rapidly than the conventional culture assays.

2. Materials and methods

2.1. Virus and cells

Hybrid Moloney/amphotropic *Murine leukemia virus* (MLV) obtained from ATCC (Manassas, VA; VR-1450; virus titer: $6.9 \pm 2.0 \times 10^7$ infectious unit (iu)/ml) was used as the RCR Reference Material. This hybrid virus, which was established by both the FDA and ATCC as an MLV RCR Reference Material, consists of Moloney MLV with a substitution of the *env* coding region from the 4070A strain of amphotropic MLV (AMLV), and represents a typical recombinant virus that could be generated in a retroviral packaging cell line containing coding sequences for an AMLV *env* [2].

Mus dunni cells (CRL-2017) and cat fibroblast PG-4 (S + L-) cells (CRL-2032) were obtained from ATCC. NIH/3T3 cells (JCRB0615) were obtained from the Japanese Cancer Research Resource Bank (Tokyo, Japan). Ψ CRIP-P131 cells (RCB1088) were obtained from the RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan). *M. dunni* cells and PG-4 (S + L-) cells were maintained in McCoy's 5A medium with 10% fetal calf serum (FCS). NIH/3T3 cells and Ψ CRIP-P131 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum.

2.2. Preparation of recombinant retrovirus vector

The retrovirus vector plasmid pLEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) contains the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistance gene. Ψ CRIP-P131 cells which contain the *gag/pol* gene of Moloney MLV and *env* gene of 4070A in different expression vectors were used as a high titer retrovirus vector-packaging cell line. Ψ CRIP-P131 cells (1×10^6 cells) were transfected with pLEGFP-N1 (2 μ g) by Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany). Two days after transfection, cells were trypsinized and replated. The next day, Geneticin (GIBCO-BRL, Grand Island, NY; final concentration 1 mg/ml) were added to each dish and cultured for an additional 2 weeks. Eighteen clones of neomycin-resistant cells were picked up, and a clone (Ψ CRIP-LEGFP1) which showed the

highest EGFP expression when the NIH/3T3 cells were infected with the culture supernatants of cloned cells was used as a line of retrovirus vector-producing cells. For the preparation of retrovirus vector sample, Ψ CRIP-LEGFP1 cells were cultured to subconfluence, the medium was replaced with fresh medium, and after 24 h of culture, the culture supernatants were collected as retrovirus vector samples (vector titer: 1×10^6 cfu/ml). Vector supernatants were stored at -80°C until use.

2.3. RCR concentration by PEI-beads

PEI-beads were made by coupling of PEI (MW 70,000; Wako Pure Chemical Inc., Tokyo, Japan) with magnetic beads (IMMUTEX-MAG™; mean diameter: $0.8 \mu\text{m}$; JSR Inc., Tokyo, Japan) by the 1-ethylene-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide coupling method as described previously [14]. RCR concentration using PEI-beads was done as follows: various dilutions of RCR solution were prepared from RCR Reference Material diluted with DMEM. Then 1 or 10 ml of each RCR dilution was incubated with $100 \mu\text{l}$ of PEI-beads for 10 min at room temperature. Then the complexes of virus and PEI-beads were trapped by a magnetic field (for 1 ml: Magnetic Trapper™, Toyobo Co., Tokyo, Japan; for 10 ml: Dynal MOC-1™, Dynal AS, Oslo, Norway). The virus genome was extracted from the PEI-beads adsorbed fraction (the whole volume) or unadsorbed supernatant ($100 \mu\text{l}$) with an SMI-TEST EX R&D Kit (Genome Science Laboratories, Fukushima, Japan). Extracted nucleic acids were dissolved in $50 \mu\text{l}$ of DNase/RNase-free distilled water, and $10 \mu\text{l}$ of this solution was used for the quantitative RT-PCR reaction.

2.4. Real-time quantitative RT-PCR

The real-time quantitative RT-PCR for RCR was monitored on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reaction was carried out in a $50 \mu\text{l}$ reaction mixture containing $10 \mu\text{l}$ of extracted sample, $1 \mu\text{M}$ each of the forward and reverse primer, $0.2 \mu\text{M}$ of TaqMan probe, and $25 \mu\text{l}$ of TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents with $1.25 \mu\text{l}$ of $40\times$ MultiScribe and RNase Inhibitor (Applied Biosystems). The reaction conditions were as follows: the viral RNA was reverse-transcribed into cDNA for 30 min at 48°C , then heat-inactivated for 10 min at 95°C ; PCR was then performed for 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . Standard curves were generated from RCR RNA extracted from RCR Reference Material in each RT-PCR assay and validated using linear regression analysis. The RCR genomes were quantified in infectious units (iu). One infectious unit of RCR measured by quantitative RT-PCR means that the sample contains virus genome RNA equivalent to 1 iu of RCR Reference Material.

The sequences of the primer pair and the probe used were as follows: forward primer (AMLVenv-1018F): 5'-GCG GTC GTG GGC ACT TAT A-3'; reverse primer (AMLVenv-1082R): 5'-TGT TGG GAA GTG GCC GTA C-3'; TaqMan probe (AMLVenv-1040TM): 5'-(FAM)-ATC ATT CCA CCG CTC CGG CCA-(TAMRA)-3'. These sequences were designed to detect the *env* gene of 4070A AMLV using Primer Express Ver 1.0 Software (Applied Biosystems). The amplified product is predicted to be 64 base pairs (bp) in length.

2.5. Amplification of RCR by culture cells

M. diurni cells were plated in 60-mm dishes at 2×10^5 cells/dish and cultured overnight. Culture medium was replaced with 1 ml of polybrene solution ($16 \mu\text{g}/\text{ml}$) as well as 1 ml of virus solution and incubated for 4 h at 37°C . Cells were washed with 1 ml of medium 3 times and incubated with 5 ml of fresh culture medium. Culture supernatants were collected at the indicated days for RCR concentration using PEI-beads and detected by quantitative RT-PCR.

2.6. S + L- focus-forming assay

The PG-4 cells were plated in 6-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C in 5% CO_2 overnight. On the day of infection, the medium was discarded, 1 ml of DEAE-Dextran ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$ in medium) was added to each well, and the cells were incubated for 30 min at 37°C . Then 1 ml of test sample was added to each well and the cells were incubated for 2 h at 37°C . Finally, the samples were replaced with 2 ml of fresh culture medium and cultured at 37°C in 5% CO_2 . Foci of transformed cells were examined microscopically on day 3 and day 7.

3. Results

3.1. Detection of RCR RNA by real-time quantitative RT-PCR

We first established the detection method of RCR RNA by real-time quantitative RT-PCR. Serial log dilutions of RCR solution were prepared, and viral genome RNA extracted from $100 \mu\text{l}$ of each RCR solution was analyzed by TaqMan quantitative RT-PCR. Forward and reverse primers as well as the TaqMan probe used for the detection of RCR were designed to detect the AMLV *env* sequence that exists in the RCR genome but not in the retroviral vector sequence (Fig. 1). Fig. 2 shows the standard curve generated from an amplification plot of the quantitative RT-PCR assay for RCR. A linear relationship was observed between the threshold cycle (C_T , the PCR cycle at which the

fluorescence of amplification first exceeds baseline) and the log-transformed input retroviral RNA genomes. The linearity of the standard curve was obtained at a range of 10^{-1} – 10^6 iu of RCR in 100 μ l of the sample with a correlation coefficient of 0.998. The standard curve was reproducible for repeated assay (data not shown). Since C_T could not be calculated from virus solutions having concentrations below 0.1 iu, the detection limit of the quantitative RT-PCR for RCR was 0.1 iu.

3.2. Concentration of RCR by PEI-beads

In order to detect very low titers of RCR in the culture supernatants of infected cells, we tried to concentrate retrovirus particles using PEI-beads. One and 10 ml of RCR solution (10^{-5} dilution of RCR in DMEM) were incubated with 100 μ l of PEI-beads, and fractionated into the PEI-beads adsorbed fraction and the unadsorbed supernatant fraction. Viral genome RNA extracted from each fraction was applied to RT-PCR and analyzed by agarose gel electrophoresis. As shown in Fig. 3A, RCR *env* RNA was detected by RT-PCR from the PEI-beads adsorbed fraction but not from the unadsorbed supernatant, indicating that RCR was efficiently adsorbed in the PEI-beads. When the starting volume of virus solution used for concentration was increased from 1 to 10 ml, the amounts of RCR RNA obtained in the PEI-beads adsorbed fraction were increased without any change in the unadsorbed fraction. To analyze the concentration of virus with PEI-beads quantitatively, serial log dilutions of RCR solution were fractionated with PEI-beads, and the amounts of RCR RNA in the adsorbed fraction and the unadsorbed fraction were quantified by real-time RT-PCR (Table 1, Fig. 3B). When solutions containing low concentrations of RCR were applied to PEI-beads, all of the retrovirus particles in the viral solutions were efficiently collected in the PEI-beads fraction. On the other hand, when a solution containing high concentration of RCR was applied to the PEI-beads, unadsorbed

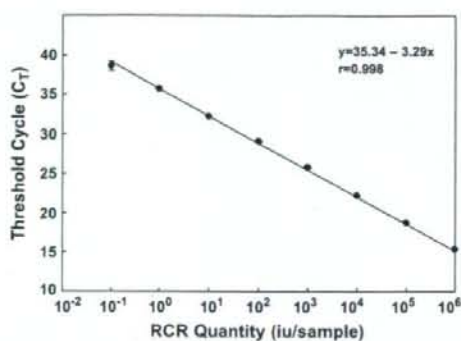


Fig. 2. Standard curve for the determination of RCR quantity generated from an amplification plot of real-time quantitative RT-PCR. Serial dilutions of RCR solution were analyzed by quantitative RT-PCR. A standard curve was generated from the amplification plot of RCR using real-time quantitative RT-PCR. The correlation coefficient is 0.998. Data are the mean \pm S.D. ($n = 3$).

viruses were detected in the supernatant (Table 1). As a result, RCR treated with PEI-beads were maximally concentrated about 10-fold from 1 ml of virus solution and 100-fold from 10 ml of virus solution compared to direct extraction from 100 μ l of original virus solutions, and at the same time, the assay sensitivity was increased about 10- and 100-fold, respectively (Table 1, Fig. 3B). These results clearly demonstrated that PEI-beads efficiently adsorbed RCR, and that this novel virus concentration method is useful for improving the sensitivity and lowering the limits of RCR detection.

3.3. Amplification of RCR in cell culture for infectivity RT-PCR

For the screening of RCR in retrovirus vector products, it is necessary to detect very less amounts of RCR among large amounts of retrovirus vectors. In our preliminary study, however, viral *env* DNA sequences derived from a packaging cell line were used to

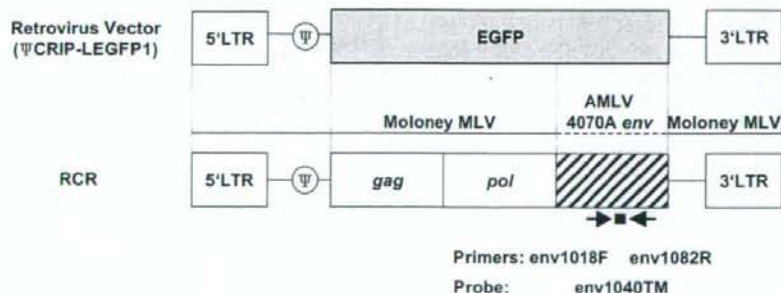


Fig. 1. Structure of RCR and retrovirus vector used in this study. The open bars represent Moloney MLV genome, the gray bar represents the expression cassette for the EGFP gene, and the striped bar represents the AMLV 4070A *env* gene. Black arrows and a small black square underneath the RCR genome indicate the location of the primers and a probe for RCR detection, respectively.

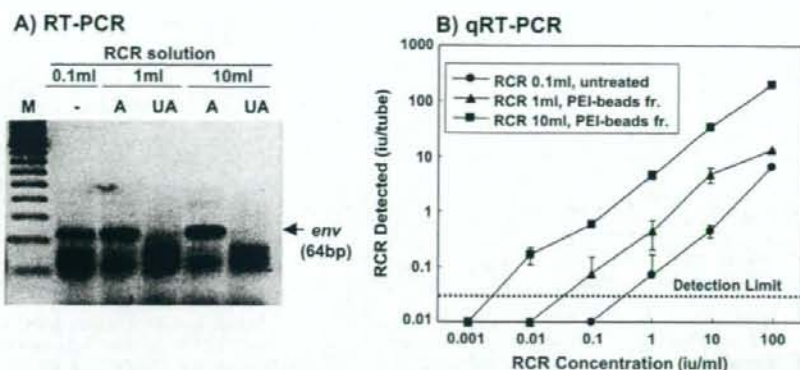


Fig. 3. Concentration of RCR by PEI-beads. (A) RCR solution (10^{-5} dilution) was fractionated with PEI-beads. Viral genome RNA extracted from the PEI-beads adsorbed fraction and unadsorbed supernatant were amplified with RT-PCR and analyzed by 5% agarose gel. M: 20 bp DNA ladder; -: untreated RCR solution; A: PEI-beads adsorbed fraction; UA: PEI-beads unadsorbed supernatant fraction. (B) One or 10 ml of serial dilutions of RCR solution was incubated with PEI-beads. Viral genome RNA extracted from the PEI-beads adsorbed fraction and untreated RCR solution was analyzed by real-time quantitative RT-PCR.

contaminate Ψ CRIP-LEGFP1 retrovirus vector supernatants and detected using the same conditions used for the detection of RCR RNA (data not shown). Then, in order to detect only infectious RCR in retrovirus vector products by quantitative RT-PCR, we developed an infectivity RT-PCR. We first infected *M. dunnii* cells with solutions containing various titers of RCR and cultured for several days. The replicated RCR in culture supernatants was then concentrated by PEI-beads and quantified by real-time RT-PCR.

Fig. 4 demonstrates the time course of the detection of RCR by infectivity RT-PCR. When *M. dunnii* cells were infected with 10 or 100 iu of RCR, the viruses were linearly amplified from day 3 to day 7 (Fig. 4), and all 3 dishes had detectable amounts of virus even on day 2 (Table 2). When the cells were infected with 1 or 0.1 iu of RCR, amplification of RCR could be detected in more than one of the dishes after day 2 and day 5, respectively, though the level of amplification varied

widely between the dishes (Table 2). RCR could not be amplified when the cells were infected with 0.01 iu of RCR. The same RCR solutions were also examined by direct S + L- assay using PG-4 cells (Table 2). We could not detect any foci after 3 days of infection. On day 7, only when cells were infected with 100 iu of RCR, foci were observed in 100% of wells. However, infection with 10 or 1 iu of RCR induced focus formation in only 1/2 or 1/6 of infected wells, respectively. These results demonstrated that infectivity RT-PCR was able to detect RCR more rapidly and 10- to 100-fold more sensitively than conventional S + L- assay.

3.4. Detection of RCR in retrovirus vector supernatant by infectivity RT-PCR

Finally, various amounts of RCR spiked in 10^6 cfu of retrovirus vector supernatant were examined by infectivity RT-PCR with RCR concentration by PEI-beads

Table 1
Quantitative analysis of RCR concentration using PEI-beads

RCR dilution	RCR quantity (iu/sample)				
	RCR 0.1 ml		RCR 1 ml		RCR 10 ml
	Untreated	Adsorbed fr.	Unadsorbed fr. (0.1 ml)	Unadsorbed fr. (0.1 ml)	Adsorbed fr.
10^{-1}	2.0×10^6	4.0×10^6	4.9×10^1	—	6.3×10^6
10^{-2}	9.6×10^4	1.4×10^6	—	—	3.8×10^6
10^{-3}	3.7×10^3	3.4×10^4	—	—	7.2×10^5
10^{-4}	4.8×10^2	3.3×10^3	—	—	6.6×10^4
10^{-5}	2.4×10^1	1.2×10^2	—	—	2.6×10^3
10^{-6}	2.1×10^0	6.9×10^0	—	—	1.2×10^2
10^{-7}	—	3.8×10^{-1}	—	—	1.0×10^1
10^{-8}	—	—	—	—	5.0×10^{-1}
10^{-9}	—	—	—	—	—

Serial log dilutions of RCR solution (RCR Reference Material; original concentration: 6.9×10^7 iu/ml) were fractionated with PEI-beads. The amounts of RCR RNA extracted from the PEI-beads adsorbed fraction and unadsorbed fraction were quantified by real-time RT-PCR. —: Under detection limit.

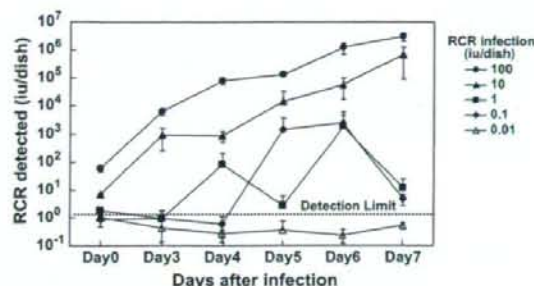


Fig. 4. RCR growth curve in *M. dunnii* cells. *M. dunnii* cells were infected with serial log dilutions of RCR solution. Culture supernatants were harvested at the indicated time, and RCR was concentrated by PEI-beads. Viral genome RNA was extracted from PEI-beads and the amount of RCR was determined by real-time quantitative RT-PCR. Data are the mean \pm S.D. ($n = 3$).

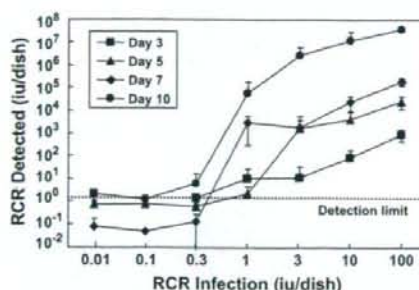


Fig. 5. Detection of RCR spiked in retrovirus vector supernatant by infectivity RT-PCR. *M. dunnii* cells were infected with serial dilutions of RCR solution in 10^6 cfu/ml of Ψ CRIP-LEGFP1 retrovirus vector supernatant. Cell culture supernatants of infected cells were harvested on day 3, 5, 7 and 10, and then RCR was concentrated by PEI-beads. The amount of RCR genome RNA extracted from the PEI-beads adsorbed fraction was determined by real-time quantitative RT-PCR. Data are the mean \pm S.D. ($n = 5$).

(Fig. 5, Table 3). The amount of RCR was evaluated on 3, 5, 7, and 10 days after infection. Infectivity RT-PCR was able to detect 1 iu of RCR on day 3, and 0.3 iu of RCR on day 10 (Fig. 5). The detection ratio of 100% could be achieved for 10 iu on day 3 and 3 iu on day 5. We could not detect any *env* DNA from the culture supernatant of *M. dunnii* cells after infection and cultivation of retrovirus vector supernatant (data not shown). When the same RCR samples were evaluated by direct S + L- assay, we could not detect any focuses on day 3, and focuses could be detected at 1 iu on day 7, although 100 iu was required for 100% detection (Table 3). Therefore, it is demonstrated that infectivity RT-PCR improved the level of sensitivity for the detection of RCR in retrovirus vector products 3- to 10-fold and shortened the assay period compared with the conventional S + L- assay.

4. Discussion

In the present study, we have developed a novel RCR detection method based on an infectivity RT-PCR and a virus concentration method using PEI-beads. Real-time

quantitative RT-PCR is a suitable alternative to conventional RCR detection by infectivity assays because it is not only a quantitative but also a more sensitive method. However, viral *env* DNA derived from packaging cells was also detected in retrovirus vector supernatants used in this study under the same conditions used to detect RCR RNA (data not shown). Although RCR spiked in retrovirus vector supernatants was concentrated with PEI-beads, *env* DNA was also detected in the PEI-beads adsorbed fraction (data not shown). The mechanism of virus-adsorption by PEI-beads remains unclear, but it is hypothesized that the positive charge field of the PEI molecule might tightly interact with the negative charge of surface lipids or negatively charged proteins on viruses [14]. It is possible that PEI-beads adsorbed RCR particles as well as negatively charged DNA fragments. Therefore, to detect only infectious RCR by quantitative RT-PCR, infection and replication of virus in permissive cells is inevitable. The method of amplifying a virus in a permissive cell line, as used in infectivity RT-PCR, is also a common method to increase the assay sensitivity for virus detection, and is often used before conventional indicator cell

Table 2
Comparison of sensitivity of RCR detection by direct S + L- assay and infectivity RT-PCR

RCR infection (iu/dish)	Direct S + L- assay		Infectivity RT-PCR					
	Day 3	Day 7	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
100	– (0/6)	+ (6/6)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)
10	– (0/6)	\pm (3/6)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)
1	– (0/6)	\pm (1/6)	\pm (1/3)	\pm (1/3)	\pm (1/3)	\pm (1/3)	+ (3/3)	\pm (2/3)
0.1	– (0/6)	– (0/6)	– (0/3)	– (0/3)	– (0/3)	+ (3/3)	\pm (2/3)	+ (3/3)
0.01	– (0/6)	– (0/6)	– (0/3)	– (0/3)	– (0/3)	– (0/3)	– (0/3)	– (0/3)

Serial log dilutions of RCR solution were evaluated by direct PG-4 (S + L-) assay or infectivity RT-PCR conducted in conjunction with virus concentration using PEI-beads. Data are presented as positive assays (dishes or wells) over the total number of assays performed. +: All the dishes or wells were positive for RCR; \pm : at least one dish or well was positive; -: none of the replicates were positive.

Table 3
Comparison of direct S + L- assay and infectivity RT-PCR on RCR detection spiked in retrovirus vector supernatant

RCR infection (iu/dish)	Direct S + L- assay		Infectivity RT-PCR			
	Day 3	Day 7	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10
100	– (0/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (5/5)
10	– (0/5)	± (4/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (5/5)
3	– (0/5)	± (2/5)	± (1/5)	+ (5/5)	± (3/5)	+ (5/5)
1	– (0/5)	± (1/5)	± (2/5)	± (2/5)	± (4/5)	± (3/5)
0.3	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	± (1/5)
0.1	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)
0.01	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)	– (0/5)

Serial dilutions of RCR in 10^6 cfu/ml of Ψ CRIP-LEGFP1 retrovirus vector supernatant were evaluated by direct PG-4 (S + L-) assay or infectivity RT-PCR conducted in conjunction with viral concentration using PEI-beads. Data are presented as positive assays (dishes or wells) over the total number of assays performed. +: All the dishes or wells were positive for RCR; ±: at least one dish or well was positive; -: none of the replicates were positive.

assays. In infectivity RT-PCR, the indicator cell assay was replaced by quantitative RT-PCR subsequent to the amplification of viruses.

Concentration of retrovirus particles is a simple method to increase the sensitivity of RCR detection. Several approaches to concentrate viruses have been tried in an attempt to enhance the sensitivity of virus genome detection [15–17]. Ultra-centrifugation is widely used for virus concentration, although it is associated with loss of infectivity of MLV [18]. Centrifugation at high-speeds for long duration has been used for concentration of retrovirus vectors [19,20], but this method is very time-consuming and not suitable for virus screening. Polyethylene-glycol (PEG) precipitation is a simple and easy method to concentrate several viruses, but the excess amount of PEG hampers the PCR reaction. In the present study, we have demonstrated that PEI-beads efficiently concentrated RCR in proportion to the volume of virus solution used for the assays. Virus concentration with PEI-beads is a simple and rapid method and is suitable for multiple sample preparation for quantitative RT-PCR.

By the combination of infectivity RT-PCR and virus concentration with PEI-beads, we have developed a novel RCR detection method. We demonstrated that 1 iu of RCR spiked in 10^6 cfu/ml of vector products could be detected within 3 days, and the sensitivity for viral detection was increased 3- to 10-fold compared with the direct S + L- assay. By this method, the presence of retroviral vector interfered with RCR detection [5] only slightly. As a result, this method can detect infectious RCR more rapidly and more sensitively and less labor intensive than conventional cell assays. However, the detection sensitivity was not additively improved as expected from the data of quantitative RT-PCR and virus concentration by PEI-beads. We consider that the limiting step of the detection of RCR by infectivity RT-PCR is the initial infection of the permissive cells with the virus, and thus it is difficult to improve the sensitivity after the replication step. In this

case, improvement of the infection process may increase the detection sensitivity. We used polybrene for enhancing viral infectivity, as is done in conventional infectivity assays, but the effect was limited. It has been reported that spinoculation, in which RCR samples are inoculated under centrifugation, increased the sensitivity of RCR detection by the S + L- assay and marker rescue assays [6]. Alternatively, co-precipitation of retrovirus vector with calcium phosphate [21] or complexation with polybrene and chondroitin sulfate C [22] has been shown to increase the transduction efficiency. Utilizing these methods may be useful for increasing the infectivity sensitivity of RCR detection by infectivity RT-PCR.

The RCR detection method described here was designed to specifically detect infectious AMLV RCR in retrovirus vector products. The same strategy should be applied to RCRs other than AMLV by using primers and a probe designed to detect the specific RCR RNA. Furthermore, the infectivity (RT-) PCR strategy may be applicable to the detection of other replication-competent viruses. We have demonstrated that the infectivity PCR method was superior to the conventional cell culture/CPE method for detecting replication-competent adenovirus and useful for the detection of RCA in adenovirus vector products [23].

In conclusion, infectivity RT-PCR conducted in conjunction with virus concentration using PEI-beads can detect infectious RCR more sensitively and rapidly than the conventional infectivity assay. This novel method would be useful for detecting RCR in retrovirus vector products.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- [1] Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 1992;176:1125–35.
- [2] Supplemental guidance on testing for replication-competent retrovirus in retroviral vector-based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001;12:315–20.
- [3] Bassin RH, Ruscetti S, Ali I, Haapala DK, Rein A. Normal DBA/2 mouse cells synthesize a glycoprotein which interferes with MCF virus infection. *Virology* 1982;123:139–51.
- [4] Markowitz D, Goff S, Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 1988;167:400–6.
- [5] Printz M, Reynolds J, Mento SJ, Jolly D, Kowal K, Sajjadi N. Recombinant retroviral vector interferes with the detection of amphotropic replication competent retrovirus in standard culture assays. *Gene Ther* 1995;2:143–50.
- [6] Forestell SP, Dando JS, Bohnlein E, Rigg RJ. Improved detection of replication-competent retrovirus. *J Virol Methods* 1996;60:171–8.
- [7] Miller AD, Bonham L, Alfano J, Kiem HP, Reynolds T, Wolgamot G. A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials. *J Virol* 1996;70:1804–9.
- [8] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487–91.
- [9] Long Z, Lu P, Grooms T, Mychkovsky I, Westley T, Fitzgerald T, et al. Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving *in vivo* retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999;10:733–40.
- [10] Morgan RA, Cornetta K, Anderson WF. Applications of the polymerase chain reaction in retroviral-mediated gene transfer and the analysis of gene-marked human TIL cells. *Hum Gene Ther* 1990;1:135–49.
- [11] Long Z, Li LP, Grooms T, Lockey C, Nader K, Mychkovsky I, et al. Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells. *Hum Gene Ther* 1998;9:1165–72.
- [12] Chen J, Reeves L, Sanburn N, Croop J, Williams DA, Cornetta K. Packaging cell line DNA contamination of vector supernatants: implication for laboratory and clinical research. *Virology* 2001;282:186–97.
- [13] Chen J, Reeves L, Cornetta K. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001;12:61–70.
- [14] Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Hayakawa T, Yamaguchi T. Virus concentration using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads for improving the sensitivity of nucleic acid amplification tests. *J Virol Methods* 2003;114:11–9.
- [15] Sanyal D, Kudesia G, Corbett G. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to HBe antigen and anti-HBe status. *J Med Microbiol* 1991;35:291–3.
- [16] Kittigul L, Khamoun P, Sujirarat D, Utrarachkij F, Chitpirom K, Chaichantanakit N, et al. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:815–21.
- [17] Li JW, Wang XW, Rui QY, Song N, Zhang FG, Ou YC, et al. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods* 1998;74:99–108.
- [18] Kamps CA, Lin YC, Wong PK. Oligomerization and transport of the envelope protein of Moloney murine leukemia virus-TB and of ts1, a neurovirulent temperature-sensitive mutant of Mo-MuLV-TB. *Virology* 1991;184:687–94.
- [19] Bowles NE, Eisensmith RC, Mohiuddin R, Pyron M, Woo SL. A simple and efficient method for the concentration and purification of recombinant retrovirus for increased hepatocyte transduction *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1996;7:1735–42.
- [20] Yang J, Friedman MS, Bian H, Crofford LJ, Roessler B, McDonagh KT. Highly efficient genetic transduction of primary human synoviocytes with concentrated retroviral supernatant. *Arthritis Res* 2002;4:215–9.
- [21] Morling FJ, Russell SJ. Enhanced transduction efficiency of retroviral vectors coprecipitated with calcium phosphate. *Gene Ther* 1995;2:504–8.
- [22] Le Doux JM, Landazuri N, Yarmush ML, Morgan JR. Complexation of retrovirus with cationic and anionic polymers increases the efficiency of gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12:1611–21.
- [23] Ishii-Watabe A, Uchida E, Iwata A, Nagata R, Satoh K, Fan K, et al. Detection of replication-competent adenovirus spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity-PCR. *Mol Ther* 2003;8:1009–16.

Virus Concentration Using Sulfonated Magnetic Beads to Improve Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests

Akiko IWATA,^a Koei SATOH,^b Mitsuhiro MURATA,^c Mikio HIKATA,^c Takao HAYAKAWA,^a and Teruhide YAMAGUCHI^{*a}

^aThe National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Tokyo 158-8501, Japan; ^bThe Institute of Saitama Red Cross Center; 8-3-41 Kamiyochi, Saitama, Saitama 338-0001, Japan; and ^cJSR Corporation, Tsukuba Research Laboratories; 25 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-0841, Japan. Received February 28, 2003; accepted April 26, 2003

To enhance the sensitivity of virus detection by polymerase chain reaction (PCR) and reverse-transcription (RT)-PCR, we developed a novel virus-concentration method using sulfonated (SO-) magnetic beads in the presence of divalent cations. In the presence of either Zn²⁺ or Cu²⁺ ions, we showed that SO-magnetic beads were able to concentrate non-enveloped model viruses, such as porcine parvovirus (PPV) and poliovirus, which were not concentrated by polyethyleneimine (PEI)-magnetic beads.¹⁾ Using the SO-magnetic beads, the sensitivity of virus genome detection by PCR or RT-PCR can be enhanced. Therefore, an efficient virus concentration method using either SO-magnetic beads or PEI-magnetic beads enhances the sensitivity of virus detection by PCR or RT-PCR.

Key words polymerase chain reaction (PCR); virus; divalent cation; nucleotide amplification tests (NAT)

Many useful biological drugs (biologicals) are produced from blood or by cell-culture techniques. Furthermore, new biologicals such as gene-therapy and cell-therapy products have created new hope for the treatment of grave genetic diseases or lethal ailments. These conventional and innovative biologicals, however, involve some risks regarding the spread of transmissible diseases such as virus-mediated infectious diseases. To ensure the viral safety of these biologicals, viral tests should be performed at the various stages of the drug production process, namely the raw material, cell bank, intermediate product, and final product stages. The development of more sensitive methods of virus detection is pivotal for the viral safety of new biotechnology products, especially for cell therapy or gene therapy, because in these new therapeutic technologies the target cells or cell-derived vectors are directly induced in patients.

Polymerase chain reaction (PCR) is a highly sensitive method for the detection of virus genomes.²⁾ In many countries, recently, several nucleotide amplification tests (NAT) including PCR have been employed to screen for specific viruses in raw materials such as blood products and cell therapy products.³⁾ These tests are able to detect several copies of virus genome,^{4–7)} but there is a detection limit even in the NAT methods. For example, it has been reported that these methods are unable to detect the viral genome in the early stages of specific viral infections. Therefore, if target viruses could be concentrated, the sensitivity of NAT must be enhanced.

Several approaches to the concentration of viruses have been attempted to enhance the sensitivity of virus genome detection.^{8–10)} Ultracentrifugation of viruses has been shown to be a superior method of virus concentration, but it is very time-consuming and not suitable for screening. Polyethylene-glycol (PEG) precipitation techniques are simple and make it easy to concentrate viruses, but the excess amount of PEG in the extract hampers the PCR reaction. Therefore, a simple and feasible method for virus concentration is needed.

Recently, we reported that polyethyleneimine-conjugated magnetic (PEI-magnetic) beads efficiently concentrated the

enveloped model viruses and simianvirus 40 (SV-40).¹⁾ However, PEI-magnetic beads could not be applied to some nonenveloped viruses, such as poliovirus or porcine parvovirus (PPV).

In the present study, we report that the sulfonated-magnetic (SO-magnetic) beads were useful for the concentration of poliovirus or PPV in the presence of divalent cations, such as Zn²⁺ or Cu²⁺ ions. We discuss herein the usefulness of SO-magnetic beads in enhancing the sensitivity of virus genome detection by PCR or RT-PCR.

MATERIALS AND METHODS

Materials Magnetic beads, IMMUTEX-MAGTM (JSR Inc., Japan), were used throughout this study. IMMUTEX-MAG beads are acrylic latex beads that contain magnetite inside and are conjugated with carboxylic groups on the surface. The IMMUTEX-MAG beads used in the present study were 0.8 μ m in diameter, and the surface charge density was 21 μ mol/g. Polyethyleneimine (PEI, Mw 70000) and 1-ethylene-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC) were purchased from Wako Pure Chemical Inc., Japan. The primer sets used in the PCR or RT-PCR for the detection of viruses were used as reported previously^{11,12)} or designed from the virus genomic information (Table 1).

Table 1. Primer Sets Used in the PCR and RT-PCR

	Primer set
Sindbis virus	5'-GGATTGGSTTYGAYACCACYCAGTTCATGT-3' 5'-TGCCCYATGCGKAGYCCMGAAGAYCC-3'
PPV ^{a)}	5'-TTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGC-3' 5'-TATGTTCTGGTCTTCTCCTCGATC-3'
Poliovirus ^{b)}	5'-TGCAGATACCACAT-3' 5'-ATCATGCTTTCAAGCATCTG-3'
Cytomegalovirus	5'-TGCCGGATGATGCAGGA-3' 5'-GTGAGCCCGACGGTCT-3'

^{a, b)} Each primer set was prepared according to the original papers: PPV¹¹⁾ and Poliovirus.¹²⁾ The primer sets of Sindbis virus and cytomegalovirus were designed according to the sequence published.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: yamaguch@nihs.go.jp