

201034078A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による

HCV 遺伝子検査に関する研究

(H22-医薬-指定-032)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による

HCV 遺伝子検査に関する研究

(H22-医薬-指定-032)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 23 (2011) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による HCV 遺伝子検査
に関する研究 P 1 - P 13

II. 標準手順書 (SOP) P 14 - P 18

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 19

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総括研究報告書

過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による HCV 遺伝子検査に関する研究

研究代表者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

平成22年6月23日に薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会と同医薬品等安全対策部会安全対策調査会の合同開催において、血漿分画製剤によるC型肝炎ウイルス(HCV)感染のリスクが過去の血漿分画製剤の製造方法や症例報告の情報に基づいて評価された。その際、現存する過去の血漿分画製剤に対し、企業からのデータだけでなく核酸増幅検査によるHCV遺伝子検査の必要性が指摘された。本研究班では、それに基づき、血漿又は血液製剤5mLに存在する3IUのHCVを検出可能な高感度検出系を確立した。この検出法を用いてティシール(日本臓器)14ロット、トロンビン(ミドリ十字)33ロット、コンコエイト-HT(ミドリ十字)6ロット、クリスマシン-M(ミドリ十字)12ロットからHCV遺伝子の検出を行なった。ティシールにおいて7ロットのインターナルコントロールが陽性とならず判定保留となったが、他の58ロットからは何れの製剤からもHCV遺伝子は検出されなかった。

分担研究者

野島 清子	国立感染症研究所 研究員
楠 英樹	国立感染症研究所 主任研究官
浜口 功	国立感染症研究所 部長

A.研究目的

これまでに、フィブリノゲン製剤等によるC型肝炎ウイルス感染については、「特定フィブリノゲン製剤及び特定血液凝固第IX因子製剤によるC型肝炎感染被害者を救済するための給付金の支給に関する特別措置法」が制定されている。フィブリノゲン製剤以外の過去の血漿分画製剤に対しては、ウイルス性肝炎又はその可能性のあった症例について、情報提供を製造販売業者に対し求め

るなど、平成19年11月から厚生労働省により調査が行われた。平成22年6月23日に薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会と同医薬品等安全対策部会安全対策調査会の合同開催において、血漿分画製剤によるC型肝炎ウイルス（HCV）感染のリスクが過去の血漿分画製剤の製造方法や症例報告の情報に基づいて評価された。その際、現存する過去の血漿分画製剤に対し、企業からのデータだけでなく核酸増幅検査によるHCV遺伝子検査の必要性が指摘された。そのため、客観的にリスクが高い製剤や原料血漿のNAT検査が実施されていない時期の製剤を対象としてHCV遺伝子の検出を目的に研究を実施した。

最終製品での核酸増幅検査は、血漿分画製剤の構成成分が検出感度に大きく影響を与え、さらに当時の製造工程においてもウイルス除去が期待できる工程が導入されていることを考慮すると、高感度にHCV遺伝子が検出できる検査法が必要となる。そのために我々は、簡便に大容量の検体から核酸を抽出し、そのほぼ全量を検出に用いることができるHCV遺伝子検出系を構築することも目的にした。

B. 研究方法

1. 抽出法

HCV検出感度を向上させるために、

QIAamp Circulating Nucleic Acidキット（QIAGEN社）を使用した。キットに添付されている溶解液にタンパク分解酵素（proteinase K）とインターナルコントロール（IC）を添加し溶解液を調整した。これを5mLの血漿または、血漿分画製剤に加え溶解した。この液をメーカーが推奨する圧で吸引しカラム内の膜に吸着させた。洗浄液で洗浄することによって核酸以外の夾雑物を取り除き、さらにDNaseを作用させることによってDNAを除去した。最終的に55 μ Lのelutionバッファーを加え、50 μ Lの核酸を調整した。製剤は、指定された量の注射用水、又は生理食塩水によって溶解した。ティシールの2mL製剤の場合は、PBSを3mL加えて5mLとして抽出した。

2. 増幅・検出法

HCV-RNAの増幅・検出は、血液のHCVスクリーニング検査に用いられているコバサンプリスクリーンHCV v2.0キットを使用した。核酸を増幅するためのバッファーに抽出した50 μ LのRNA溶液を添加し、増幅・検出を行なった。

判定は、

HCV陽性：HCV-RNA陽性

HCV陰性：HCV-RNA陽性、IC陽性

判定保留：HCV-RNA陰性、IC陰性

3. 核酸増幅法の感度評価

血漿分画製剤から核酸を抽出する場合に粘稠度とタンパク濃度から最も抽出が困難なフィブリノゲンと血漿にそれぞれPBS、3IUのHCV、10IUのHCVを添加し、

それぞれから核酸を抽出し、HCV 遺伝子を増幅・検出した。また、検出対象製品が現在でも市販されている場合には、市販品を購入し、HCV 陰性を確認後、製剤にそれぞれ PBS、3 IU の HCV、10IU の HCV を添加し、それぞれから核酸を抽出し、HCV 遺伝子を検出し、血漿との感度を比較した。製剤ティシールの場合は、市販品がなく静注用フィブリノゲン（最終濃度 20mg/mL）を 90mg/mL に溶解して HCV を添加して感度を求めた。また、実際の製剤の検査時には、現行の製品にそれぞれ PBS、3 IU の HCV、10IU の HCV を添加したものを一緒に抽出・検出を行ない、陽性となった最小 HCV 量をそれぞれの検出感度とした。なお、添加した HCV は国内標準品を 30IU/mL 及び 100IU/mL に PBS で希釈して 100 μ L ずつ添加した。

4. 検査した血漿分画製剤

原料血漿の NAT が要求されていない時期に製造された血漿分画製剤や客観的にリスクが高い製剤（凝固因子製剤や生体接着剤）を対象にした。各製造所が保管していた以下の製剤が提供された。ティシール（日本臓器）14 ロット、クリスマシン-M（ベネシス）12 ロット、コンコエイト-HT（ベネシス）6 ロット、トロンビン（ベネシス）33 ロットの計 65 ロットが提出された。

C. 結果

1. HCV 検出感度

血漿とフィブリノゲンに HCV を添加し、感度を検討したところ、血漿では検討した全ての 3IU/5mL と 10IU/5mL が陽性となり、陰性コントロールは陰性を示した。また、フィブリノゲンも同等の検出感度であった。以上から、用いた検出法の感度は 3IU/mL とし、精度管理としてその 3 倍量の 10IU/mL を陽性コントロールとした。

2. 製剤からの HCV 遺伝子検出結果

3IU/5mL のランコントロールは陽性となったが、クリスマシン-M12 ロットとトロンビン 33 ロットから HCV 遺伝子は検出されなかった。また、コンコエイトでは、10IU/5mL の陽性コントロールは陽性となったが、3IU/5mL のランコントロールは陰性となったが、コンコエイト 6 ロットから HCV 遺伝子は検出されなかった。

一方、ティシールはトロンビンとフィブリノゲンの 2 つの成分から構成されているため、それぞれから HCV 遺伝子を検出した。ティシールのトロンビン 14 ロットでは、3IU のランコントロールが陽性となったが 14 ロットのトロンビンは全て陰性であった。ところが、フィブリノゲンでは 14 ロット中 7 ロットにおいてインターナルコントロールが陽性とならず判定保留となった。判定できた 7 ロットでは 3IU のランコントロールが陽性となったが、7 ロットのティシールのフィブリノゲンは全て陰性であった。

試験が成立した 58 ロットから HCV 遺伝

子が検出できたロットはなかった。

D. 考察

最終製品では構成する成分の性状が検出感度に大きな影響を及ぼし、一般的に血漿からのウイルス検出の感度より悪くなる。また、今回対象とした各製剤は 1990 年の半ばから 2000 年にかけて製造されており、この頃は、原料血漿での HCV-NAT 検査は実施されていなかったが、既に HCV 抗体検査が導入されており HCV 陽性血漿が混入する可能性は少なくなっていた。また、製造工程にウイルスを除去する工程や不活化する工程も既に導入されていた。以上のことから最終製品に HCV 遺伝子が混入する可能性は非常に少ないと考えられていた。我々は、血漿で用いられているウイルスの検出法では HCV 遺伝子は検出できないと考え、最終製品から HCV 遺伝子を検出するために高感度の HCV 検出系を構築した。コンコエイト以外はランコントロールで 3 IU/5mL が検出できた。血漿での通常の HCV 検出感度が約 50 IU/mL であることを考えると約 100 倍の感度である。この高感度検出法を持ってしても HCV 遺伝子が検出できなかったことは、製造当時の原料血漿での HCV 抗体検査や製造工程でのウイルス除去が有効に機能していた結果と考えられた。この方法は、血漿分画製剤の最終製品からウイルス遺伝子を検出する他に、感染していてもウイルス量が少ないウイルスを検出したり、また、局地的なウイ

ルス感染が生じた時にその周辺地域で迅速なスクリーニングを行なうなどに応用できる。

一方、ティシールのフィブリノゲンに判定保留が出た原因としては、フィブリノゲンに界面活性剤が添加されていたためと考えられた。界面活性剤によって核酸が膜につき難くなるためと推定した。

E. 結論

5mL の検体から 3IU の HCV が検出できる高感度検出系を構築し、HCV の NAT 検査が原料血漿で実施していない時期の血漿分画製剤 65 ロットから HCV 遺伝子の検出を行なった。7 ロットがインターナルコントロールが陽性とならず判定保留となったが、検査が成立した 58 ロットからは HCV 遺伝子は検出されなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

H. 論文発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

結果

製剤	製造所	HCV 陽性ロット/ 検査成立ロット数	感度 (IU/5ml)	備考
ティシール (フィブリノゲン) (トロンビン)	日本臓器	0/7	3	7ロット
		0/14	3	判定保留
クリスマシン-M	ベネシス	0/12	3	
コンコエイト-HT	ベネシス	0/6	10	
トロンビン	ベネシス	0/33	3	

- 1) 5mLの血漿及びフィブリノゲンにHCV国内標準品を添加し、検出感度を評価した。その結果、検出感度は3 IU/5mLとし、その3倍の10IU/5mLを試験成立の条件とした。
- 2) 予備検査として、現在市販されている製品を指定されている容量に溶解後、5mLに3 IUと10IUのHCVをそれぞれ添加し、感度を評価した。その後、古い製剤の検査を実施した。
- 3) ティシールは、日本での販売が中止されているため感度評価のための製品が入手できなかった。そのため、日本で市販されている静注用フィブリノゲンをティシールと同濃度(90mg/mL)に溶解して感度評価を実施した。7ロットで判定保留となったのは、ティシールのフィブリノゲンには界面活性剤が添加されており、これが添加したICの核酸(短いRNA)の回収を抑制したためICが陰性となったと推定している。
- 4) コンコエイトの検査では、ランコントロールの3 IUが陰性のため感度は10IUとした。

1 販売名：ティシール（ロット各1検体ずつ）

日本臓器製薬株式会社

(1) フィブリノゲン	試験実施日	平成23年2月16日（抽出）
		平成23年2月17日（検出）
(2) トロンビン	試験実施日	平成23年2月 2日（抽出）
		平成23年2月10日（検出）

コントロール

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	陰性コントロール	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性
2	ランコントロール 3 IU/5 mL	フィブリノゲン トロンビン	陽性 陽性	陽性 陽性
3	陽性コントロール 10 IU/5 mL	フィブリノゲン トロンビン	陽性 陽性	陽性 陽性
4	システムコントロール (フィブリノゲン)	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -
5	システムコントロール (トロンビン)	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

ティシール

No.	規格	ロット番号 (製造日)	製剤成分	HCV	IC	判定
1	5.0mL	D001 (1994.11)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
2	5.0mL	D002 (1995.1)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性

3	2.0mL	C042 (1994.5)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
4	2.0mL	C043 (1994.6)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性
5	2.0mL	C044 (1994.7)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
6	2.0mL	C045 (1994.8)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性
7	2.0mL	C046 (1994.11)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性
8	2.0mL	C047 (1994.12)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
9	2.0mL	C048 (1995.2)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
10	2.0mL	C049 (1995.4)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性
11	2.0mL	C050 (1995.4)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
12	2.0mL	C051 (1995.6)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陰性 陽性	判定保留 陰性
13	2.0mL	C052 (1995.10)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性
14	2.0mL	C053 (1995.10)	フィブリノゲン トロンビン	陰性 陰性	陽性 陽性	陰性 陰性

2 販売名：クリスマシン-M (献血由来)
株式会社ベネシス

試験実施日 平成23年2月14日 (抽出)
平成23年2月15日 (検出)

コントロール

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	陰性コントロール	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性
2	ランコントロール 3 IU/5 mL	血液凝固 第IX因子	陽性	陽性
3	陽性コントロール 10 IU/5 mL	血液凝固 第IX因子	陽性	陽性
4	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

No.	規格	ロット番号 (製造日)	製剤成分	HCV	IC	判定
1	1000U	B006MXB (1997.10)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
2	1000U	B007MXB (1998.1)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
3	1000U	C008MXB (1998.3)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
4	1000U	C010MXB (1998.12)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
5	1000U	D011MXB (1999.3)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
6	1000U	D012MXB (1999.10)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
7	1000U	E013MXB (2000.5)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
8	1000U	E014MXB (2000.10)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
9	1000U	E015MXB (2001.1)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
10	1000U	F016MXB (2001.4)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
11	1000U	F017MXB (2001.8)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性

1 2	1000U	F018MXB (2001.12)	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性	陰性
-----	-------	----------------------	---------------	----	----	----

3 販売名：コンコエイト・HT（献血由来）
株式会社ベネシス

試験実施日 平成23年2月25日（抽出）

平成23年2月25日（検出）

コントロール

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	陰性コントロール	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性
2	ランコントロール 3 IU/5 mL	血液凝固 第IX因子	陰性	陽性
3	陽性コントロール 10 IU/5 mL	血液凝固 第IX因子	陽性	陽性
4	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

No.	規格	ロット番号 (製造日)	製剤成分	HCV	IC	判定
1	500U	B001SXB (1997.11)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性
2	500U	C002SXB (1998.10)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性
3	500U	D003SXB (2000.2)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性
4	500U	F004SXB (2001.8)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性
5	500U	G005SX (2002.7)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性
6	500U	G006SX (2002.7)	血液凝固 第VIII因子	陰性	陽性	陰性

4 販売名：トロンビン-ミドリ（献血由来）
株式会社ベネシス

試験実施日： 平成23年1月26日（抽出）：ロット B005VX～F021VX（17ロット）
平成23年1月27日（抽出）：ロット F022VX～J019HX（16ロット）
平成23年1月27日（検出）：ロット B005VX～F021VX（17ロット）
平成23年1月28日（検出）：ロット F022VX～D008HX（9ロット）
平成23年2月 3日（検出）：ロット D009HX～G014HX（5ロット）
平成23年2月10日（検出）：ロット G015HX～J019HX（2ロット）

コントロール（第1回目：平成23年1月27日（検出）：ロット B005VX～F021VX）

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	陰性コントロール	トロンビン	陰性	陽性
2	ランコントロール 3 IU/5 mL	トロンビン	陽性	陽性
3	陽性コントロール 10 IU/5 mL	トロンビン	陽性	陽性
4	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

コントロール（第2回目：平成23年1月28日（検出）：ロット F022VX～D008HX）

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	陰性コントロール	トロンビン	陰性	陽性
2	ランコントロール 3 IU/5 mL	トロンビン	陽性	陽性
3	陽性コントロール 10 IU/5 mL	トロンビン	陽性	陽性
4	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

コントロール（第3回目：平成23年2月 3日（検出）：ロット D009HX～G014HX）

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

コントロール（第4回目：平成23年2月10日（検出）：ロットG015HX～J019HX）

No.	規格	製剤成分	HCV	IC
1	システムコントロール	-ACH +ACH	陰性 陽性	- -

No.	規格	ロット番号 (製造日)	製剤成分	HCV	IC	判定
1	1万U	B005VX (1998.9)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
2	1万U	C006VXA (1999.2)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
3	1万U	C007VX (1999.3)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
4	1万U	C008VX (1999.4)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
5	1万U	C009VX (1999.5)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
6	1万U	C010VX (1999.8)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
7	1万U	C011VX (1999.10)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
8	1万U	D012VX (1999.12)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
9	1万U	D013VX (2000.3)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
10	1万U	D014VX (2000.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
11	1万U	D015VX (2000.8)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
12	1万U	D016VX (2000.9)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
13	1万U	E017VX (2001.2)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
14	1万U	E018VX (2001.5)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
15	1万U	E019VX (2001.8)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
16	1万U	E020VX (2001.10)	トロンビン	陰性	陽性	陰性

17	1万U	F021VX (2002.1)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
18	1万U	F022VX (2002.2)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
19	1万U	F023VX (2002.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
20	1万U	F024VX (2002.9)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
21	1万U	F025VX (2002.11)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
22	1万U	G026VX (2003.1)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
23	1万U	H029VX (2004.1)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
24	1万U	C006HX (1999.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
25	1万U	C007HX (1999.11)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
26	1万U	D008HX (2000.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
27	1万U	D009HX (2000.9)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
28	1万U	E011HX (2001.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
29	1万U	E012HX (2001.11)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
30	1万U	F013HX (2002.6)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
31	1万U	G014HX (2003.1)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
32	1万U	G015HX (2003.8)	トロンビン	陰性	陽性	陰性
33	1万U	J019HX (2005.4)	トロンビン	陰性	陽性	陰性

HCV 検出標準手順書 (HCV SOP)

(目的)

C 型肝炎ウイルス (以下 HCV) のスクリーニングが実施されていない原料血漿から製造された最終製品に混在する HCV の遺伝子を検出する。

(検出方法)

1. ピペットの校正 (重量法)

- | 校正日 | 年 | 月 |
|---------------------------------|---|-----------|
| <input type="checkbox"/> P200 | | (誤差 1%以内) |
| <input type="checkbox"/> P200N | | (誤差 1%以内) |
| <input type="checkbox"/> P1000 | | (誤差 1%以内) |
| <input type="checkbox"/> P1000N | | (誤差 1%以内) |

2. 抽出

キット : QIAamp Circulating Nucleic Acid (50 回) ロット番号 : _____

検体 : 本試験法で陰性を確認したベリプラストと同一ロット (609006A) のフィブリノゲンとトロンビンを陰性コントロールとする。ランコントロールは陰性コントロールのフィブリノゲンとトロンビンにそれぞれ国内標準品の HCV を 3IU 添加したものをを用いる。陽性コントロールは、陰性コントロールのフィブリノゲンとトロンビンに国内標準品の HCV を 10IU 添加したものをを用いる。

陰性コントロール (現行の製品に PBS を添加したもの 1 本)

ランコントロール (現行の製品に 3 IU の HCV を添加したもの 1 本)

陽性コントロール (現行の製品に 10 IU の HCV を添加したもの 1 本)

検査対象の製剤

- A. バッファー調整 :
- Buffer ACB 200mL isopropanol 添加
 - Buffer ACW1 25 mL ethanol 添加
 - Buffer ACW2 30 mL ethanol 添加
 - DNase 1 の調整 550 μ L に溶解。
110 μ L に分注し、-20°C に凍結保存。
 - Carrier RNA の調整 310 μ g の carrier RNA を
310 μ L の AVE に溶解し、65 μ L ずつ分注し、-20°C に凍

結保存する。使用后、残余があれば廃棄する。

B.吸引ポンプの操作

- 800～-900 mbar の陰圧の確認
- 廃液タンクに十分な余裕があるか？

C.血液製剤の溶解法

室温に戻してから製剤の添付文書に記載されている溶解法に従って溶解する。

D.ランコントロールと陽性コントロールに添加する HCV 国内標準品の希釈法

凍結保存されている HCV 国内標準品 (10^5 IU/mL、血漿) を室温で溶解し、PBS を用いて 10 倍希釈 (10^4 IU/mL) する。さらに 10 倍希釈した $50\mu\text{L}$ を $450\mu\text{L}$ の PBS で 10 倍希釈 (10^3 IU/mL) 後、その $100\mu\text{L}$ を $900\mu\text{L}$ の PBS で 10 倍希釈する (10^2 IU/mL)。 $100\mu\text{L}$ を取り、陰性が確認されている製剤 5mL に添加し、陽性コントロール (HCV $10\text{IU}/5\text{mL}$) とする。さらに、 10^2 IU/mL を $300\mu\text{L}$ 取り、 $700\mu\text{L}$ の PBS に添加し $30\text{IU}/\text{mL}$ とする。これを陰性が確認されている製剤 5mL に添加し、ランコントロール (HCV $3\text{IU}/5\text{mL}$) とする。陰性コントロールは、HCV の代わりに PBS を $100\mu\text{L}$ 添加する。なお、希釈する場合は、希釈毎にピペットで溶液を 10 回出し入れすることで良く混合する。

E.抽出操作

* Buffer ACL (carrier RNA と internal control 入) の調整

- 検体 10 本の場合 : Buffer ACL 44.0mL に carrier RNA $61.6\mu\text{L}$ と internal control $66\mu\text{L}$ (コバスアンプリスクリーン HCV v2.0 キットに添付されている) を添加
- 恒温槽は 60°C か？
- ヒートブロックは 56°C か？

- 50mL 遠心管に proteinase K (PK) を $500\mu\text{L}$ 添加
- 5mL の検体を PK の入った遠心管に加える
- 陰性コントロール : PBS を $100\mu\text{L}$ 添加
- ランコントロール : HCV 国内標準品希釈液 $30\text{IU}/\text{mL}$ を $100\mu\text{L}$ 添加
- 陽性コントロール : HCV 国内標準品希釈液 10^2 IU/mL を $100\mu\text{L}$ 添加

- carrier RNA 入りの ACL を 4mL 添加し、vortex 30 秒
- 60°C で 30 分 incubation
- 軽く遠沈管を遠心
- 9mL の Buffer ACB を添加し、vortex 30 秒
- on ice で 5 分 incubation
- 吸引器にカラムをセットし、各カラムに extender を付ける
- ライセートを全量入れ、吸引 (-800~900 mbar を確認) する
- DNase1 の調整
 - 検体 10 本の場合 : DNase 110 μ L に Buffer RDD 770 μ L 添加
 - 検体 ___ 本の場合 : DNase ___ μ L に Buffer RDD ___ μ L 添加
- 全量が吸引されたら extender を外す
- カラムを 2mL collection tube に移し、20,000g X 1 分間遠心
- カラムを吸引器の元の位置にセットし、RDD に溶解した DNase 80 μ L をカラムの膜に添加。15 分間 incubate する。
- カラムに 600 μ L の ACW1 を添加し、吸引する
- カラムに 750 μ L の ACW2 を添加し、吸引する
- カラムに 750 μ L の ethanol を添加し、吸引する
- カラムの蓋をして吸引器から取り外し、2mL の collection tube に移す。20,000g で 3 分間遠心
- カラムを新しい 2mL の collection tube に移し、ふたを開け 56°C で 10 分間完全に膜を乾燥させる
- 新しい 1.5mL の collection tube に移し、55 μ L の AVE Buffer を膜の中心に添加、3 分間室温で incubation する
- 20,000g で 1 分間遠心し、RNA を回収する。

D.増幅・検出

装置 : コバスアンプリコア

試薬 : コバス アンプリスクリーン HCV v2.0 ロット番号 : _____

有効期間 : _____ 年 _____ 月

- 洗浄液の調整 : ミリ Q4500mL に wash Buffer 500mL を加え攪拌する
- 調整日 月 日 (有効期間 14 日間)

- Working MMX の調整 : HCV MMX 1バイアルに $Mn^{2+}100\mu L$ 添加し、10～15回転倒混和 (12テスト)
- 用事調整 (2～8°Cで4時間)
- ターゲットプローブ液の調整 : CHPS1 試薬をボルテックスし、2.5mL を CH4 カセットに添加 (混和不要)
- 有効期間の確認 (30日)
- IC プローブ液の調整 : CI PS1 試薬をボルテックスし、2.5mL を CI4 カセットに添加 (混和不要)
- 有効期間の確認 (30日)
- 基質の調整 : 基質 SB5mL を基質 SB3 カセットに添加し 5回ピペッティング
- 用事調整 (有効期間の確認 16時間)

操作: A-リングに1検体当たり $50\mu L$ の working MMX と抽出した $50\mu L$ の RNA を加えて軽く混ぜる。以後の操作は、コバス操作法に従ってバーコードによる入力と認識によって行なう。

E.判定

Internal control (IC) と HCV をそれぞれ増幅するプライマーと検出のための probe によって判定が行なわれ、吸光度が基準を超えた場合に陽性と自動的に判定される。また、システムコントロールが適正な反応を示した場合に検出系は成立したと判断する。

検体の判定に関しては下記に従って行なう。

陽性: HCV が陽性

陰性: HCV が陰性、IC が陽性、陽性コントロールが陽性