

2023年10月1日

VirFinder Type-A
VirFinder Type-B
バリデーションデータ
(簡易版)

1. 概要

ウイルス遺伝子検出キット (VirFinder Type-A、Type-B) の性能を評価するために、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」及び「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドライン」を参考にバリデーションデータを取得した。

2. Myco Finder バリデーション内容と実験条件

リアルタイム PCR 装置にて行った実験条件を表 1.に、本バリデーションに使用したウイルス参照品情報を表 2.および表 3.に示した。

表 1. VirFinder バリデーション検出条件

DNA 抽出試薬	QIAamp UltraSens Virus Kit (株式会社キアゲン)
PCR 装置	CFX Connect (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)
PCR 条件	42°C、10 分 95°C、10 秒 95°C、10 秒 } 5 サイクル 56°C、30 秒 } 95°C、10 秒 } 50 サイクル 56°C、30 秒 } 蛍光検出波長：FAM
測定結果の判定	PCR 装置付属ソフト (CFX Manager™ ソフトウェア) にて実施 解析法：Regression 法、Baseline Subtracted Curve Fit モード

表 2. バリデーションに用いたウイルス参照品 [HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、PVB19、CMV、EBV (NIBSC)]

Virus	WHO International Standard	NIBSC Code
HBV	4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	10/266
HCV	Hepatitis C virus (HCV) For nucleic acid amplification techniques (5th International standard 2015)	14/150
HIV-1	HIV-1 RNA (4th International Standard)	16/194
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus type 2 RNA (HIV-2) for Nucleic Acid Amplification Techniques (2nd International Standard)	16/296
PVB19	Parvovirus B19 (3rd International Standard)	12/208
CMV	Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	09/162
EBV	Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	09/260

表 3. バリデーションに用いたウイルス参照品 [HTLV-1、WNV (ZeptoMetrix)]

Virus	Product Description	Lot No.
HTLV-1	NATtrol Human T Lymphotropic Virus Type I Stock	318359
WNV-Ia	NATtrol West Nile Virus (NY2001-6263)	319025
WNV-II	West Nile Lineage 2 Lysate (B-956 Uganda)	316969

3. 特異性 (他のウイルス種に対する交差反応)

検査対象以外のウイルス種に対して反応を認めないことを検証するため、表 3.に示すウイルスを用いて試験を行った。試験対象としたウイルスは、ヒトへの感染力が高いウイルス、潜在感染しているウイルスなどから選定した。これに加え、本試薬の検査対象ウイルス (HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV-1、HTLV-2、PVB19、CMV、EBV、WNV) を含めた計 19 種のウイルスを用いて交差反応性試験を実施した。なお、本試薬の検査項目 HTLV は、HTLV-1 に加えて HTLV-2 についても同様に検出できるため、本試験においては、検査対象ウイルスとして扱った。

試験の結果、9 種の検査項目全てにおいて、検査対象とするウイルス以外では反応は認められなかった。したがって、本試薬は、試験に供試した検査項目以外のウイルスとは反応せず、検査項目を特異的に検出することが明らかとなった。

表 4. 交差反応性試験に供試したウイルス (検査対象ウイルス以外)

ウイルス	
BKV	BK ウイルス
HAdV	ヒトアデノウイルス
HHV-6B	ヒトヘルペスウイルス 6B 型
HPV-16	ヒト乳頭腫ウイルス 16 型
HPV-18	ヒト乳頭腫ウイルス 18 型
HSV-1	単純ヘルペスウイルス 1 型
HSV-2	単純ヘルペスウイルス 1 型
JCV	JC ウイルス
VZV	水痘・帯状疱疹ウイルス

4. 検出感度

各検査項目のウイルス参照品を 100、500、1000 IU もしくは 100、500、1000 copies となるようにヒト細胞およびヒト血清に添加した被検サンプルを調製し、核酸抽出後、1/10 容量を本試薬に供試して、100 IU/ PCR reaction*（以下 rxn）もしくは 100 copies/rxn のウイルス参照品が検出できることを検証した。

感度試験の結果を表 5.に示す。ヒト細胞およびヒト血清に添加した 100 IU/rxn もしくは 100 copies/rxn のウイルス参照品が検出できることを確認した。

*PCR reaction : 1 テスト分の PCR 反応

表 5. 感度試験結果

検体	試験ウイルス	Type-A							Type-B			
		HBV	HCV	HIV-1		HIV-2	HTLV	PVB19	CMV	EBV	WNV	
				HIV-1 LTR	HIV-1 pol							
ウイルス量/単位	IU	IU	IU	-	-	IU	copy	IU	IU	copy		
ヒト細胞	10	8/8	8/8	8/8	3/8	7/8	8/8	5/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	50	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	20/24	24/24	24/24	24/24	24/24
	100	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
ヒト血清	10	8/8	8/8	6/8	5/8	5/8	8/8	5/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	50	24/24	23/24	24/24	24/24	24/24	23/24	16/24	24/24	24/24	24/24	23/24
	100	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

※8/8 は 8 検体中 8 検体すべて陽性となったことを示す。

HIV-1 については、検査項目とした HIV-1 LTR、HIV-1 pol の陽性数をそれぞれの結果欄に示し、HIV-1 結果欄には LTR、pol のいずれかが陽性であった数を示す。

5. 頑健性

検出機器間差が VirFinder の性能に及ぼす影響について、リアルタイム PCR 装置間のウイルス検出性能差を検証した。

機器間差の試験結果を表 6. に示す。バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 CFX Connect 及び CFX Opus、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 7500 FAST および QuantStudio 5 の 4 機種全てにおいて、100 IU/rxn もしくは 100 copies/rxn のウイルス参照品を検出できることが確認された。

表 6. 機器間差検証結果

検体	試験ウイルス	測定機種	Type-A								Type-B		
			HBV	HCV	HIV-1		HIV-2	HTLV	PVB19	CMV	EBV	WNV	
					HIV-1 LTR	HIV-1 pol							
ウイルス量/単位	IU	IU	IU	-	-	IU	copy	IU	IU	copy			
ヒト細胞	100	CFX	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
		7500FAST	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		Quant	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		CFX Opus	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
ヒト血清	100	CFX	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
		7500FAST	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		Quant	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		CFX Opus	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

※6/6 は 6 検体中 6 検体すべて陽性となったことを示す。

HIV-1 については、検査項目とした HIV-1 LTR、HIV-1 pol の陽性数をそれぞれの結果欄に示し、HIV-1 結果欄には LTR、pol のいずれかが陽性であった数を示す。

以上