

2025 年 6 月 12 日改訂

# VirFinder 核酸抽出試薬 代替品評価 報告書

島津ダイアグノスティクス株式会社  
製品開発部

## 1. 概要

ウイルス遺伝子検出キット VirFinder で推奨している核酸抽出試薬である QIAamp UltraSens Virus Kit（株式会社キアゲン）が販売終了となった。したがって、核酸抽出試薬の代替品として、キアゲン社より提示された後継製品である QIAamp MiniElute Virus Spin Kit の性能を評価した。

## 2. 評価実施期間

自 2025 年 3 月 ～ 至 2025 年 4 月

## 3. 実施場所

島津ダイアグノスティクス株式会社  
茨城県結城市北南茂呂 1075 番 2 号

## 4. 評価実施者

### 4.1. 研究統括責任者

島津ダイアグノスティクス株式会社 製品開発部 猪井 俊敬

### 4.2. 評価実施担当者

島津ダイアグノスティクス株式会社 製品開発部 益子 侑里

### 4.3. 報告書作成担当者

島津ダイアグノスティクス株式会社 製品開発部 益子 侑里

## 5. 試験条件

リアルタイム PCR 測定条件を表 1、使用したウイルス情報を表 2 および表 3 に示す。

表 1. リアルタイム PCR 測定条件

|         |                                                                                                           |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 核酸抽出試薬  | QIAamp MiniElute Virus Spin Kit（株式会社キアゲン）：Lot.178040234                                                   |
| PCR 試薬  | VirFinder Type-A：Lot.24H448、25B581<br>VirFinder Type-B：Lot.25B582                                         |
| PCR 装置  | CFX Opus（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）                                                                             |
| PCR 条件  | 42℃、10 分<br>95℃、10 秒<br>95℃、10 秒 } 5 サイクル<br>56℃、30 秒 }<br>95℃、10 秒 } 50 サイクル<br>56℃、30 秒 }<br>蛍光検出波長：FAM |
| 測定結果の判定 | PCR 装置付属ソフト（CFX Maestro™ ソフトウェア）にて実施<br>解析法：Regression 法、Baseline Subtracted Curve Fit モード                |

表 2. 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 RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)                       | 18/184     |
| 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. 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 | 328887  |
| WNV    | NATtrol West Nile Virus (NY2001-6263)           | 326716  |

## 6. QIAamp MiniElute Virus Spin Kit の性能評価

### 6.1. ウイルス 8 種類（9 項目）の検出性能評価

QIAamp MiniElute Virus Spin Kit を核酸抽出試薬として使用した場合の VirFinder の性能を評価した。

1.0×10<sup>6</sup> 個のヒト細胞（Jurkat cell：ヒト T 細胞性白血病由来 ECACC No.88042803）および 200 μL のヒト血清（コスモ・バイオ株式会社 Cat#12181201C）にウイルス参照品を 1000 IU もしくは 1000 copies 添加し、被検サンプルとした。核酸を抽出後、得られた核酸抽出液を VirFinder に供試し、添加したウイルス参照品が検出可能であるか試験した。詳細な測定方法を以下に示す。

#### 6.1.1. サンプル調製

ウイルス参照品を下記 3 つのグループに分けた。PBS を用いて、それぞれのグループのウイルス参照品を 50 μL あたり 1000 IU もしくは 1000 copies に混合調製した。

ウイルス混合液 A：HBV/HIV-1/PVB19

ウイルス混合液 B：HCV/HIV-2/HTLV-1

ウイルス混合液 C：CMV/EBV/WNV

ヒト細胞サンプルの調製については、予め凍結保存した Jurkat cell（1.0×10<sup>6</sup> cells/mL）を使用した。凍結細胞を室温にて解凍後、1.5 mL 遠心チューブに 1 mL 分取した。分取後、遠心して細胞を回収し、150 μL の PBS を加えて懸濁した。調製した 1.0×10<sup>6</sup> cells/150 μL の細胞懸濁液にウイルス混合液を 50 μL 添加し、被検サンプルとした。

ヒト血清サンプルの調製については、150 μL のヒト血清にウイルス混合液を 50 μL 添加して被検サンプルとした。

#### 6.1.2. 核酸抽出

以下の手順で実施した。

- 1) 調製した検体 200 μL に QIAGEN プロテアーゼを 25 μL 添加した。
- 2) キャリア RNA を加えた Buffer AL を 200 μL 添加し、15 秒間ボルテックスした。
- 3) 56°C で 15 分間インキュベート後、スピンドウンした。
- 4) エタノールを 250 μL 加え、15 秒間ボルテックスした。
- 5) 室温（15～25°C）で 5 分間インキュベートした。
- 6) スピンドウンし、全量をスピincラムに移した。
- 7) 6,000×g で 1 分間遠心した。
- 8) カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μL の Buffer AW1 を添加後、6,000 × g で 1 分間遠心した。
- 9) カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μL の Buffer AW2 を添加後、6,000 × g で 1 分間遠心した。
- 10) カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 μL のエタノールを添加後、6,000 × g で 1 分間遠心した。
- 11) カラムを新しいコレクションチューブに移し、空のまま 20,000 × g で 3 分間遠心した。

- 12) カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、Buffer AVE を 60  $\mu$ L 入れた。
- 13) 室温で 5 分間インキュベートした。
- 14) 20,000  $\times$  g で 1 分間遠心し、核酸抽出液を回収した。

### 6.1.3. 試薬の調製

以下の手順で実施した。

- 1) 2 $\times$ RT-PCR Buffer、PP Mix を融解し、ミキサーでしっかりと混和後にスピンドウンした。RT Enzyme Mix、DNA Polymerase はスピンドウン後に氷上に保管した。
- 2) 表 4 に従い、氷上で各種 PP Mix 毎に RT-PCR 反応液マスターミックスを調製した。
- 3) 2) で作製したマスターミックスを PCR 用チューブに 15  $\mu$ L ずつ分注した。
- 4) 陰性ランコントロールとして Negative Control を、陽性ランコントロールとして Positive Control を 5  $\mu$ L ずつ添加した。
- 5) 検体の核酸抽出液を 5  $\mu$ L ずつ添加した。

表 4. RT-PCR 反応液組成

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

### 6.1.4. リアルタイム RT-PCR による検出

以下の手順で実施した。

- 1) リアルタイム PCR 装置の蛍光検出波長を FAM に設定した。
- 2) 表 5 に従ってリアルタイム PCR を実施した。

表 5. RT-PCR プログラム

| ステップ                      | 温度   | 時間     | Cycle 数   | 蛍光検出        |
|---------------------------|------|--------|-----------|-------------|
| 逆転写反応                     | 42°C | 10 min | 1 cycle   | なし          |
|                           | 95°C | 10 sec |           |             |
| PCR(1 <sup>st</sup> step) | 95°C | 10 sec | 5 cycles  | なし          |
|                           | 56°C | 30 sec |           |             |
| PCR(2 <sup>nd</sup> step) | 95°C | 10 sec | 50 cycles | あり<br>(FAM) |

### 6.1.5. 測定結果

結果を表 6 に示す。QIAamp MinElute Virus Spin Kit を使用した場合に、検体に添加した 1000 IU または 1000 copies のウイルス 8 種類（9 項目）が検出可能であることを確認した。

表 6. 測定結果

| 検体   | Type-A |     |       |              |              |       |      |       | Type-B |     |     |
|------|--------|-----|-------|--------------|--------------|-------|------|-------|--------|-----|-----|
|      | HBV    | HCV | HIV-1 |              |              | HIV-2 | HTLV | PVB19 | CMV    | EBV | WNV |
|      |        |     |       | HIV-1<br>LTR | HIV-1<br>pol |       |      |       |        |     |     |
| ヒト細胞 | 3/3    | 3/3 | 3/3   | 3/3          | 0/3          | 3/3   | 3/3  | 3/3   | 3/3    | 3/3 | 3/3 |
| ヒト血清 | 3/3    | 3/3 | 3/3   | 3/3          | 3/3          | 3/3   | 3/3  | 3/3   | 3/3    | 3/3 | 3/3 |

※3/3 は 3 検体中 3 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。

## 6.2. HIV-1 の検出性能 追加評価

### 6.2.1. サンプル調製

6.1.1において、 $1.0 \times 10^6$  個のヒト細胞に添加した HIV-1 について LTR は検出されたが pol は不検出となった。そこで、検体の細胞数を  $5.0 \times 10^5$  個へ変更した場合に pol が検出可能であるか評価した。

サンプルの調製については、予め凍結保存した Jurkat cell ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) を室温にて解凍後、1.5 mL 遠心チューブに 500  $\mu$ L 分取した。分取後、遠心して細胞を回収し、150  $\mu$ L の PBS を加えて懸濁した。調製した  $5.0 \times 10^5$  cells/150  $\mu$ L の細胞懸濁液に 50  $\mu$ L あたり 1000 IU に調製した HIV-1 希釈液を 50  $\mu$ L 添加し、被検サンプルとした。核酸抽出後、得られた核酸抽出液を VirFinder に供試し、添加した HIV-1 参照品が検出可能であるか試験した。

### 6.2.2. 核酸抽出

6.1.2 と同様の手順で実施した。

### 6.2.3. 試薬の調製

6.1.3 と同様の手順で実施した。

### 6.2.4. リアルタイム RT-PCR による検出

6.1.4 と同様の手順で実施した。

### 6.2.5. 測定結果

結果を表 7 に示す。 $5.0 \times 10^5$  個のヒト細胞に添加した 1000 IU の HIV-1 が LTR と pol の両方で検出可能であることを確認した。

表 7. HIV-1 測定結果（ヒト細胞  $5.0 \times 10^5$  個）

| 検体   | Type-A |              |              |
|------|--------|--------------|--------------|
|      | HIV-1  |              |              |
|      |        | HIV-1<br>LTR | HIV-1<br>pol |
| ヒト細胞 | 3/3    | 3/3          | 3/3          |

※3/3 は 3 検体中 3 検体すべて陽性となったことを示す。

※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