

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529098

(P2017-529098A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017.10.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 9
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53 T	
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 A	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	G O 1 N 33/569 H	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-526763 (P2017-526763)	(71) 出願人	517038811
(86) (22) 出願日	平成27年8月5日 (2015.8.5)		ゲーエフエー ブルート エムペーハー
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月7日 (2017.2.7)		ドイツ, 60438 フランクフルト ア
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/068101		ム マイン, アルテンハーフェルアレー
(87) 国際公開番号	W02016/020455		3
(87) 国際公開日	平成28年2月11日 (2016.2.11)	(74) 代理人	100088904
(31) 優先権主張番号	102014111210.5		弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成26年8月6日 (2014.8.6)	(74) 代理人	100124453
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 プールサンプルの自動処理のための方法及び装置

(57) 【要約】

本発明は、プールサンプル、特に血液サンプルの自動処理のための新規の方法に関する。さらに、本発明は上記方法を行う装置及びそれに伴う使用に関する。上記方法及びそれに応じて、上記装置を、特に供血血液及び血液製剤を試験するための核酸増幅法 (NAT) を行うために使用することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

分析するサンプルを自動処理する方法であって、

a) 分析するサンプルを機械により判読可能なラベルをそれぞれ貼付した複数の容器に準備する工程と、

b) 適宜、同じように機械により判読可能なラベルをそれぞれ貼付した複数の容器内においてa)のサンプルを組み合わせで少なくとも1つのサンプルプールにする(プール作製を行う)工程と、

c) 細胞溶解に適した溶液とa)又はb)のサンプルに核酸を結合させるのに適した磁性ビーズとを合わせて添加する工程と、

d) 該サンプル中の該核酸を該磁性ビーズに結合させる工程と、

e) 該サンプル中の該磁性ビーズを磁石に結合させる工程と、

f) 少なくとも2つのサンプルからの磁性粒子を新しい共有の容器に移すことにより、e)の該ビーズのプール作製を行う工程と、

g) 少なくとも1つの他の分析対象のサンプルセットを用いて工程a)～f)を繰り返す工程と、

h) 工程f)及びg)の該サンプルプールの該ビーズを少なくとも4つのサンプルプールから共有のビーズプールにプール作製する工程と、

i) 少なくとも1つの他の分析対象のサンプルセットを用いて工程a)～h)を繰り返す工程と、

j) 工程h)及びi)の該サンプルプールの該ビーズを少なくとも8倍のビーズプールに移す工程と、

k) 溶出緩衝液を用いてj)の該プールを溶出する工程と、

l) 工程k)の溶出した核酸を1つ又は複数の更なる検出方法に移す工程と、を含む、方法。

【請求項 2】

洗浄緩衝液及び磁石を用いた1つ又はいくつかの洗浄工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

工程b)において1サンプルプール当たり2サンプル～15サンプルを組み合わせる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記分析対象のサンプルが、血液サンプル及び他の体液、又は全血、血漿、血清、血液細胞成分及び/又は他の血液製剤から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

血液サンプルの該プール作製をバーコードで標識した容器で直接行う、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

この手順全体を手動により介入することなく行う、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプルの核酸の有無、又はHCV、HCMV、WNV、HIV、HBV、HAV及びPB19等のウイルスの核酸の有無を分析する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記血漿中に循環するもの等の遊離核酸を検出する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

15サンプルを各100 µl又は2サンプルを各750 µl混和させる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

工程I)における前記更なる検出方法は、PCR、TaqMan PCR、Real Time-PCR、TMA、NASBA、SDA又はLCR等の核酸の増幅を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅させた核酸を検出する方法、又は前記サンプルプールの前記核酸を予め増幅させずに検出することを更に含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項1～11のいずれか一項に記載の前記方法を行うのに適していることを特徴とする、装置。

【請求項 13】

前記サンプルプールの作製、ビーズプール作製を含む自動核酸抽出、PCR作製及び／又は未処理データ分析に適していることを特徴とする、請求項12に記載の装置。

【請求項 14】

以下の構成要素：

少なくとも1つの自動ピペット処理ワークステーションと、

少なくとも1つの磁気分離器と、

少なくとも1つの液体処理アームと、

少なくとも1つのロボットアームと、必要な場合は、

少なくとも1つの増幅ユニットと、

少なくとも1つの検出ユニットと、

を備えることを特徴とする、請求項12又は13に記載の装置。

【請求項 15】

全ての構成要素が一体化した装置として設計され、筐体内に配置されることを特徴とする、請求項12～14のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 16】

請求項1～11のいずれか一項に記載のプールサンプル又は個々のサンプルの自動処理のための請求項12～15のいずれか一項に記載の装置の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、プールサンプル、特に血液サンプルの自動処理のための新規の方法に関する。さらに、本発明は上記方法を行う装置及びそれに伴う使用に関する。上記方法及びそれに応じて、上記装置を、特に供血血液及び血液製剤を試験するための核酸増幅法（NAT）を行うために使用することができる。

【背景技術】**【0002】**

ヒト血液は、医薬において非常に有益な、今では不可欠な原材料であり、現在多くの成分及び製剤を抽出又は製造するために使用されている。1990年代初期のいわゆるAIDS事件では、血液及び血液製剤のウイルスに対する安全性について、にわかに一般的及び専門的関心を招くこととなった。

【0003】

核酸増幅法（NAT）では、輸血中の感染の危険が少ない。

【0004】

輸血中のHIV 1/2、HCV、HBV又はHAV等のウイルス病原体に感染する危険は、供血血液に対する分析方法の改善により過去数年間にわたりかなり低下している。NATの導入は、感染した予備血液を検出する可能性を大幅に増大させていることが報告されている。

【0005】

ドナー血液は、患者に投与する前に病原体のスクリーニングをしなければならない。NATの導入以前には、予備血液中のHIV及び肝炎ウイルス等の病原体は主に抗体検出を用いて同定されていた。免疫系が実際の感染に応答するような抗体を産生するには或る特定の時

10

20

30

40

50

間を要することから、これらの管理には空白の時間枠（open time window）（診断窓）が設けられる。該当する供血血液中の病原体を感染の初期に検出することは不可能であり、このことは感染した血液が医療で使用されることになる可能性があることを意味した。感染した血液製剤を輸血する危険を最小限にするには、治療用の新鮮な血漿では、少なくとも2カ月～3カ月の間隔を空けた後に2回目の供血を行うよう全ての血液ドナーにお願いすることしかできなかった。これにより、感染していた場合、その間にドナーの体内に産生された抗体を検出することができた。最初に供血された血漿は凍結され、2回目の供血での抗体試験が陰性となるまで医療的処置に使用することができなかった。このアプローチは、保存期間がほんの数日間と短い赤血球又は血小板等の血液製剤では実行可能なものではない。このような場合、試験が陰性となった時点で供血してすぐに製剤を使用（released）する必要がある。これは、血液ドナーが感染していた場合、試験では陽性結果を可能な限り早い時期に出し、診断窓を最短にすべきであることを意味する。これに伴い供血血液中のウイルス混入の感度の高い直接検出のためのスクリーニング試験として、NATが導入された。

【 0 0 0 6 】

1990年代中期以降、核酸をベースにウイルスを検出する方法の開発が順調に進んだ。第VIII凝固因子又は第IX凝固因子等の血漿製剤の産生物プールからウイルス量の高いものを排除することに関心のある血漿処理産業の提案により、1990年代中期に輸血関連ウイルスのHIV-1/2、HCV及びHBV並びに後期にパルボウイルスB19（PB19）及びHAVに品質管理の測定手段としてNATが導入された。1999年、パウルエールリッヒ研究所（the Paul Ehrlich Institute）（PEI）は血漿及び血液細胞成分に必須なものとしてHCVNAT検査を行った。ドイツ赤十字（DRK）及びバイエルン赤十字（BRK）の献血サービスは当初から、一部は早くも1997年にはNATを用いて輸血関連ウイルスのHCV、HIV及びHBVに対する全ての供血血液の検査を開始した。彼らは2000年に初めてパルボウイルスPB19及びHAVにまでNAT検査を拡大しているが、これは現在、全てのDRK献血サービスの基準となっている。PEIはまた、2004年5月にHIV-1 NATを義務化した。

【 0 0 0 7 】

こうして、1997年～2002年の中欧での研究において、NATを用いておよそ360万の供血血液サンプルのHCV及びHIV-1（非特許文献1）及びHBV（非特許文献2）の検査が行われた。これにより、6つのHCV及び2つのHIV-1のPCRにより確定された陽性の、抗体陰性供血血液（それぞれ600000分の1又は180万分の1の割合）及び6つのHBVのPCRにより確定された陽性供血血液（最終的にHBsAg陰性となる）を識別することが可能となった。

【 0 0 0 8 】

ドナー選択、ELISA検査及びNAT検査等の種々の測定により、スクリーニングした輸血関連ウイルスに対して課題として残されていたウイルスによる危険が、これまでに知られていない、限りなく低いレベルに低下した。したがって、輸血関連ウイルスのHCV、HIV及びHBVの3種に対してPCRを導入した後のドイツでの課題として残されていた危険は、HCVでは1：20000000より低く、HIV-1では1：4000000より低く、HBVでは1：1000000より低いほどの最小限なものとなり、実際に課題として残されていたウイルスによる危険と本質的にはもはや呼べるものではないかもしれない。

【 0 0 0 9 】

概して、複雑かつ高価なNATの導入は、献血サービスに対して更なる経済的な負担を生じた。費用を減らす方法の1つとして、いわゆるミニプールを作製することによって多くの個々のドナーサンプルを組み合わせて単一のサンプルにすることがある（非特許文献3を参照のこと）。このアプローチは、特に1日当たり2000～4000の供血血液を提供する大規模のDRK献血サービスにとって有益なものである。現在6種のウイルスに対するこのような多くのドナーサンプルの検査には、それぞれの検査において、1日当たり個々に最大24000回のNAT検査を行うことが求められる。この種の処理能力を実現させるサーマルサイクラー／分析装置も方法も存在していないことから、8時間のシフトにおいて、このような多くの個々のNAT検査を行うには依然克服できない技術的な限界がある。

【 0 0 1 0 】

プール作製 (pooling) により、技術的及び経済的に実行可能な程度に検査の数を減らせる。最大96個のドナー血液サンプルを組み合わせると1つのプールにし、これにより少ない検査で高いサンプル処理能力を可能にする (非特許文献4; 非特許文献5)。

【 0 0 1 1 】

それでもなお、供血血液検査用のプールのNATでも、依然として一部に手動による手順があり、これによって潜在的に大きなサンプル数に対する莫大な費用が許容可能なレベルに削減されるが、プール作製を用いた全体のプロセス及び続く工程を自動化させることはまだ可能ではない。自動化はプロセスの安全性に対する主要かつ重要なステップとなるだろう。

10

【 0 0 1 2 】

ドナーサンプルを組み合わせるとより大きなミニプールにすることは、小規模から中規模のドナー数の献血サービスに対して、及びウイルスの有病率が高い諸国に対しての利点は少ないかもしれない。ウイルスの流行が特定のレベルを超えて広まる場合、あまりに多くの陽性を含むミニプール又は最もひどい場合の全てのミニプールを解除し、個々の陽性サンプルに分離する必要がある。これにより、初めに陰性サンプルを含むこれらの陽性プールの全てのサンプルが中断 (blocking: 保留) される。それゆえ、プールに含まれていた血液製剤が用途に応じて利用可能になるのは1日~3日かかる恐れがある。それに応じて、最大96個のドナー血液サンプルのみを含むミニプールを作製するという構想だけでは、ドナー収集において有病率の高い諸国でのNAT検査に適合させるには限界がある。

20

【 0 0 1 3 】

特許文献1は、大規模の献血サービスのニーズを満たす非常に高い処理能力を得るNAT法の使用について教示している。しかし、それでもなお、手動の介入が必要となる。

【 0 0 1 4 】

個々のサンプル又はプールサンプル由来に関わらず核酸を磁性粒子と結合させることは、概ね有益なものである。プロセスは理論的には無制限に継続することができるが、現実には、核酸の溶出に徐々に大量の緩衝液容量を必要とする3工程~4工程の後にはかなり多くのビーズが蓄積し、これは個々のサンプル源に対して不利な希釈作用となるに違いないことを意味する。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 特許文献 1 】 ドイツ特許出願公開第10258258号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 非特許文献 1 】 Roth, WK et al. Transfusion 2002; 42:862-868

【 非特許文献 2 】 Roth, WK et al. Transfusion 2002; 42:869-875

【 非特許文献 3 】 Roth, WK and Seifried, E, Transfusion Medicine 2002; 12:255-258

【 非特許文献 4 】 Roth, WK et al. The Lancet 1999

【 非特許文献 5 】 Roth, WK et al. Vox Sang 2000; 78 (suppl 2):257-259

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

それゆえ、本発明の目的は、有病率の高い諸国に対して核酸増幅法の性能を迅速化及び改善させるだけでなく、大規模の献血サービスのニーズを満たす非常に高い処理能力が得られる方法を開発することである。

【 0 0 1 8 】

さらに、プール作製は、個々の供血血液に対するデフォルトによって検査感度に影響を与えず、かつ個々のサンプル検査では均等となる必要がある。こうすることで、過去にプール作製について生じていた主な懸念が排除されるだろう。

50

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は、プールサンプル又は個々のサンプルを好ましくは自動処理する方法を提供することによってこの課題を解決する。本方法は、

a) 分析するサンプルを機械により判読可能なラベルをそれぞれ貼付した複数の容器に準備する工程と、

b) 適宜、同じように機械により判読可能なラベルをそれぞれ貼付した複数の容器内においてa)のサンプルを組み合わせ、少なくとも1つのサンプルプールにする(プール作製を行う)工程と、

c) 細胞溶解に適した溶液とa)又はb)のサンプルに核酸を結合させるのに適した磁性ビーズとを合わせて添加する工程と、

d) 該サンプル中の該核酸を該磁性ビーズに結合させる工程と、

e) 該サンプル中の該磁性ビーズを磁石に結合させる工程と、

f) 少なくとも2つのサンプルからの磁性粒子を新しい共有の容器に移すことにより、e)の該ビーズのプール作製を行う工程と、

g) 少なくとも1つの他の分析対象のサンプルセットを用いて工程a)～f)を繰り返す工程と、

h) 工程f)及びg)由来の該サンプルプールの該ビーズを少なくとも4つのサンプルプールからビーズの共有のビーズプールにプール作製する工程と、

i) 少なくとも1つの他の分析対象のサンプルセットを用いて工程a)～h)を繰り返す工程と、

j) 工程h)及びi)の該サンプルプールの該ビーズを少なくとも8倍のビーズプールに移す工程と、

k) 溶出緩衝液を用いてj)の該プールを溶出する工程と、

l) 工程k)の溶出した核酸を1つ又は複数の更なる検出方法に移す工程と、を含む。

【0020】

好ましい実施の形態において、本方法は、洗浄緩衝液及び磁石を用いた1つ又はいくつかの洗浄工程を含む。

【0021】

更に好ましい実施の形態において、本方法は、工程b)においてサンプルプール当たり2サンプル～15サンプル、つまり2サンプル、3サンプル、4サンプル、5サンプル、6サンプル、7サンプル、8サンプル、9サンプル、10サンプル、11サンプル、12サンプル、13サンプル、14サンプル若しくは15サンプル、更には30サンプルを組み合わせる。

【0022】

プールサンプルの代わりに、個々のサンプルをビーズプール作製に添加することも実行可能であり、これにより高い処理能力を有し、個々のサンプルに対する一般的な感度より高いものが得られる。

【0023】

本発明は、プールサンプル又は個々のサンプルを自動処理し、2つ以上の個々のサンプル又はサンプルプールとビーズプール作製とを組み合わせる方法を提供することによって、この課題を解決する。本発明による方法は、有病率の高い諸国におけるサンプル処理能力を増大させ、サンプル作製及び処理に必要な時間を短縮し、及び/又はサンプル作製及び処理の信頼性を高める。

【0024】

本方法は、例えば個々の供血血液の場合、供給源から大量の容量を使用することができることから、サンプル源に対する感度が消失することを防ぐ。プール作製の効果は、ビーズと、ビーズに結合する核酸とを組み合わせ、2サンプル、4サンプル、8サンプル等のプールにすることにより更に得られる。

【0025】

10

20

30

40

50

核酸が溶出工程の間にビーズから分離され、反応を検出する工程に移る。それに応じて、2、4、8、．．．n倍以上のビーズが溶出緩衝液に残る。個々のサンプルを参照して核酸濃度が変化しない場合、溶出緩衝液の量（容量）は一定に保たれるはずであり、それに応じて増加することはない（2倍、4倍、8倍等）。このことから溶出緩衝液中のビーズ濃度が増加すると同時に、ビーズからビーズまでに占められる空間も2倍、4倍等になるため溶出緩衝液の利用できる量が減少する。これは一般に不利であると考えられる。

【0026】

しかし、驚くべきことに、これには寛容性があることがわかった。本発明者らは2倍のビーズプール作製を用いた比較検査において何ら感度を消失しないことを認め、溶出容量のみが、最大4倍のビーズプール作製においてわずかに増加した。

10

【0027】

プールの大きさに応じたプロセスでは、個々のサンプルで必要となる材料（容量）は少ないため、サンプル自体を再度プールすることができる点で、感度の減少という不利な点が知られているが、処理能力は増大する。現在の計画は、プロセスに必要なサンプル容量として1.5 mLだけでなく2.0 mLを使用することができると推測される。これにより個々のサンプル容量を1.5mL又は例えば、15サンプルのプールにおいて個々のサンプル容量100 μ L、10サンプルのプールにおいて150 μ L及び5サンプルのプールにおいて300 μ Lを抽出することが可能である。処理能力に関して、15サンプルのプールを4倍のビーズプール作製と組み合わせる場合、サンプルのプール作製にビーズプール作製を掛け合わせて、「プール」当たり例えば60サンプルになる。8時間当たりのプロセス時間と試行数とを組み合わせると、シフト当たりの最大処理能力が得られる。

20

【0028】

本方法は、使用者が個々の供血血液及び／又はプールを抽出することを可能にし、同時に可能な場合、新たなプラットフォームがビーズプール作製を行うだけでなく、最大15サンプルのプールに対して上流にてサンプルのプール作製を自動的に行う。このサンプルのプール作製は、抽出／PCRプラットフォームで自動的に行われるが、予備の実行を必要とせず、本質的に有利となる。プール作製（ビーズプール作製において最大8倍）は、個々の供血血液検査と同様の感度で行われ、更に高い処理能力のサンプルのプール作製と同じプラットフォームで行うことができ、これにより個別のプール作製装置（現行の技術水準等の場合）の必要性がなくなるという更なる利点がある。個々の供血血液の検査と同様に、使用者が個々のドナーの主要なバイアルに入れるだけであり、これもドナー当たり1つの結果が得られるに過ぎないが、プール作製が（自動的に）行われる。それゆえ、使用者はプール作製について「忘れる」ことができる。陽性プールの結果の場合、罹患している個体のバイアルのみを、陽性の個体サンプルを識別するデバイスに戻す必要がある。

30

【0029】

好ましい実施の形態において、工程a)で準備されるサンプルは、液体又は液化サンプルであるものとする。

【0030】

サンプルは血液サンプル及び他の体液、特に全血、血漿、血清、血液細胞成分及び／又は他の血液製剤が好ましい。血液サンプルは、血液の成分を含有するサンプルであることが好ましい。供血血液及び輸血製剤となり、またこれらに使用されるサンプルを使用することが好ましい。

40

【0031】

サンプルはまた、全血又はアフエレーシス供血血液由来の以下の血液調製物を含み得る。

アフエレーシスした、新鮮な凍結血漿（FFP）由来の赤血球濃縮物（EC）、血小板濃縮物（PC）、幹細胞調製物、顆粒球又はリンパ球等の個々の供血血液製剤、

バフィーコート由来のプールPC等のプールされた血小板製剤、

SD（溶媒／界面活性剤）病原体不活性化、アルブミン、凝固因子、フィブリン糊、阻害剤、免疫グロブリンを含むFFP等の血漿プール由来の製剤。

50

【 0 0 3 2 】

好ましい実施の形態において、プロセスの工程c)、d)及びe)を繰り返し行うことができる。

【 0 0 3 3 】

本発明による方法の好ましい実施の形態において、血液サンプルのプール作製を、バーコードで標識した容器又はプレートのウェルにおいて直接行う。本発明の方法は、サンプルが混合する危険を効率よく排除し、ウイルス富化のための部分的に手動の工程を含むこれまでの方法とも併用される(existedwith)。このため、血液サンプルのプール作製をバーコードで標識した容器又はプレートのウェルにおいて直接行う。

【 0 0 3 4 】

好ましい実施の形態において、本発明による方法は、手動による介入がない単一の均質なプロセスを示す。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、工程c)に添加される溶液は、溶菌のための試薬、例えば溶解緩衝液又は界面活性剤、プロテアーゼ、カオトロピック塩、有機溶剤又は当業者に既知の、核酸の抽出に好適である追加の溶液及び懸濁液並びに抽出試薬を用いた溶解/結合緩衝液の組合せからなる。緩衝液は、アルカリ性、中性又は酸性pH値であり得る。放出した核酸を結合するための固体相を緩衝液に添加することができる。固体相は、常磁性、第一鉄であってよく、被覆されておらず、若しくは被覆されていてもよく、官能基を含有し、若しくは含有しなくてよい。

【 0 0 3 6 】

更なる好ましい実施の形態において、サンプル、特に血液サンプルの核酸の有無をスクリーニングする。核酸はDNA、RNAであることが好ましい。さらに、核酸は好ましくはウイルスのものであるものとする。

【 0 0 3 7 】

ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス1及び2(HIV-1及びHIV-2)並びにHIV-1亜型M、N及びO、C型肝炎ウイルス(HCV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、サイトメガロウイルス(CMV、HHV5)、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス、パルボウイルスB19(PB19)、ヒトT細胞白血病ウイルスI/II(HTLV I/II)、ウエストナイルウイルス(WNV)、SARSコロナウイルス(SARSCoV)、MERSコロナウイルス、デング等のウイルス並びにEBV、HHV8、HGV/GBVC、TTV又はチクングニアからなる群から選択することができる。本方法はまた、これまでに知られていないウイルスの核酸の有無をスクリーニングすることが可能である。

【 0 0 3 8 】

好ましい実施の形態において、本方法は、複数のウイルスの核酸の有無を同時にスクリーニングすることを含む。本方法を、最大7種のウイルス、例えばHCV、WNV、HCMV、HIV-1、HIV-2、HBV、HAV、HEV及びPB19を同時にスクリーニングするために使用することが好ましい。

【 0 0 3 9 】

代替の実施の形態は、遊離核酸、例えば血漿中に循環するものをスクリーニングすることを含み得る。本方法の好ましい実施の形態は、患者の血液成分の大容量のサンプルを使用する。その中に含有される核酸に上記の方法を行う。

【 0 0 4 0 】

好ましい抽出方法は、界面活性剤を用いた溶解、カオトロピック塩系の抽出試薬を用いた酸性条件下での放出した核酸と磁性粒子との結合(固体相としての膜又は磁性粒子との結合と同じく)又は当業者が既知の更なる抽出方法である。

【 0 0 4 1 】

更に好ましい実施の形態において、使用者により選択される次の増幅工程用サンプルプール(複数の場合もある)を作製する。好ましくは、この工程は、固体相に核酸を結合することによる核酸の精製と1つ又は複数の洗浄工程と精製及び濃縮された核酸の溶出とを含む。

10

20

30

40

50

【0042】

特に、7種のウイルス、例えばHCV、HIV-1、HIV-2、HBV、HAV、HEV及びPB19の抽出及びPCR作製は同時に行われる。

【0043】

本発明による方法の好ましい実施の形態は、8時間に3780サンプルを分析することが可能であり、最大プールの大きさは $n=15$ 及び3回の試行で多くて4倍（2工程）のビーズプール作製である。

【0044】

好ましくは、2サンプル～15サンプル又は最大30サンプルを本方法のサンプルプール（工程b）当たりに組み合わせる。好ましくは、本発明による方法を使用して、2サンプル、5サンプル、10サンプル又は15サンプルを組み合わせる1つのサンプルプール（工程a）にすることができる。好ましい実施の形態において、15サンプルを各100 μ L、5サンプルを各300 μ L又は2サンプルを各750 μ L組み合わせることができる。好ましいサンプルプールの合計容量は1.5 mL、場合により2.0 mLである。

【0045】

本発明による方法は、考えられる規模の拡大に対しての適応性が高いことが利点として提供される。それに応じて、高い感度を必要とする場合、サンプルの供給源の容量を増加させることができる。好ましい実施の形態において、15サンプルを各100 μ L、5サンプルを各300 μ L又は2サンプルを各750 μ L使用する。

【0046】

さらに、本発明による方法は、サンプルの処理能力を最大3つの工程における精製過程にわたり少なくとも2つのサンプルプールを組み合わせる（「ビーズプール作製」）ことにより2倍、4倍又は8倍に増大させる選択肢を提供する。

【0047】

本方法の好ましい実施の形態において、追加の検出法は、核酸増幅からなる。本発明による核酸増幅は、PCR、TaqMan PCR、リアルタイムPCR、TMA、NASBA、SDA又はLCRを含み得る。

【0048】

更に好ましい実施の形態において、増幅の後に、増幅された核酸の検出方法が続く。しかし、サンプルプールに、予め増幅させることを必要としない検出方法も行うことができる。

【0049】

本方法のかなり好ましい実施の形態は、リアルタイムPCRの形態の核酸増幅を含み、これは、増幅した核酸の同時のオンライン検出を可能にする。

【0050】

本発明の別の態様は、本発明による方法を行うのに好適であることを特徴とする装置である。

【0051】

好ましい実施の形態において、本発明による装置は、サンプルプールの作製、ビーズプール作製を含む自動核酸抽出、PCR作製及び未処理データの分析に好適である。本発明による装置は、サンプルプールを入れる容器と自動抽出法とを有利に結合させることを可能にする。

【0052】

本発明による装置は、いくつかの構成要素：

少なくとも1つの自動ピペット処理ワークステーションと、

少なくとも1つの磁気分離器と、

少なくとも1つの液体処理アームと、

少なくとも1つのロボットアームと、必要かつ好ましい場合は、

少なくとも1つの増幅ユニットと、

少なくとも1つの検出ユニットと、

10

20

30

40

50

を備える。

【 0 0 5 3 】

該当する構成要素は一般に当業者に既知のものである。磁気分離器を自動ピペット処理ワークステーションに一体化させることができる。液体を（磁性固体相を添加して）サンプルプール又は個々のサンプルに添加した後に混合プロセス（例えば、ピペット採取及びピペット排出による）を行う。次いで液体を磁気分離器の液体処理アームを介して反応管に移す。場合により、磁性固体相を電磁石又は永久磁石を介して反応管に移す（「浸漬法」）。この工程では、移送によって同じ反応管で2つのサンプルプール又は個々のサンプルそれぞれの磁性固体相を組み合わせることができる。

【 0 0 5 4 】

本発明による装置の好ましい実施の形態において、全ての構成要素は、一体化した装置として設計され、筐体内に配置される。

【 0 0 5 5 】

本発明による装置に対する好適な構成要素は、例えばスイスのHamilton companyによるデバイスである。したがって、好適な自動ピペット処理デバイスは、例えばHamilton Star又はHamilton Vantageの分注器（pipettor）からなり得る一方で、例えばKingFisher型のデバイスを磁気分離器として使用することができる。Tecan、Beckman、Xiril、Sias、ThermoFisher及びQiagen等の他の製造業者によるデバイスも好適な構成要素となる。

【 0 0 5 6 】

更に好ましい実施の形態において、本発明による装置はソフトウェアにより制御される。抽出プロセスを、本発明によるソフトウェアを用いて制御することができる。プロセス全体（プール作製、抽出、ビーズプール作製、検出、評価）のモニタリングを、ソフトウェアを用いて実現することができる。ソフトウェアはプロセス全体をモニタリングする。これに関し、ソフトウェアは個々の部分工程及び部分プロセスのソフトウェアプログラムにワークリストを提供し、例えばエラーメッセージ及び部分工程の結果を評価し、記録化する。好ましくは本発明によるソフトウェアを、プール作製、抽出、ビーズプール作製、PCR作製及びリアルタイムPCRを一体化するようプログラムすることができる。

【 0 0 5 7 】

それに応じて、本発明の更なる態様は、本発明による方法を制御し、モニタリングするコンピュータプログラムを含む。

【 0 0 5 8 】

更に特に好ましい実施の形態において、サンプル、例えば供血血液サンプルを、バーコード標識を用いて最終結果まで追跡し、そのバーコードにより識別することができる。NAT検査プロセス全体にわたり、バーコードを用いて標識した容器における直接のプール作製及び自動化されたバーコード制御された核酸抽出、増幅及び検出後の濃縮プロセスでは、サンプルが混合しないようにしている。それに応じて、本発明による方法は、濃縮工程を含む方法の高い処理能力及び高い感度と、自動化され、完全にバーコード制御されたプロセスの高い安全性レベルとを組み合わせている。

【 0 0 5 9 】

本発明による方法は、サンプルの混合の危険を効率よく排除し、これをウイルス富化のための部分的に手動の工程を含むこれまでの方法と併用する。このため、サンプル、特に血液サンプルを、バーコードを用いて標識した容器に直接プールする。次いで、これらの容器をバーコードモニタリング又は固定の物理的配分によるサンプル混合が全くない抽出法に移す。これは手動の介入がない完全に自動化された均質なプロセスであることが好ましい。ビーズプール作製を含む抽出プロセスの後に自動化及びソフトウェアモニタリングしたPCRのセットアップ、増幅及びソフトウェアを使った検出及び評価が続く。

【 0 0 6 0 】

本発明の別の態様は、上記の本発明によるプールサンプル又は個々のサンプルの自動処理のための本発明による装置の使用に関する。

【 0 0 6 1 】

予めプールしたサンプルを処理し、次の特定のプロセスにおいて、そのプールサンプルを再度組み合わせるより大きなプールにする選択肢も利用可能であり、同じ自動装置でこの事前のプール作製を行う選択肢も含まれる。この選択肢により、この場合では個別のプール作製デバイスを用いずにプラットフォームに直接主要なバイアルを入れ、同じプロセスにおいて自動化された事前のプール作製を行うことも実行可能になる。

【0062】

血液容量が少なく、有病率が高い場合個々のサンプルの検査は最適な方法である。容量が大きい場合、続くいくつかの工程における抽出過程にわたり少なくとも2つの個々のサンプルをそれぞれ組み合わせ、又は小さいミニプール、例えば10以下の供血血液サンプルを作製することが好ましい。この方法は、有病率が高くても十分な処理能力を得ることができる。有病率が低い場合、更に処理能力が高いNATが実行可能である。

10

【0063】

本発明を、包含する図を参照して以下の実施例において更に説明するが、それらの実施例に限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1-1】実施例1の選択肢1の装置及びフローチャートを示す図である。

【図1-2】同上

【図1-3】同上

【図1-4】同上

20

【図2】実施例2の選択肢2の装置及びフローチャートを示す図である。

【図3】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値の平均値(MW)及び標準偏差を示すグラフである。

【図4】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値の平均値(MW)及び標準偏差を示すグラフである。

【図5】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値の平均値(MW)及び標準偏差を示すグラフである。

【図6】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値の平均値(MW)及び標準偏差を示すグラフである。

【図7】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値の平均値(MW)及び標準偏差を示すグラフである。プレート1(非プール型)及び最終の4倍のプールプレートのHBVのそれぞれに対する1回の不具合を観察した。

30

【図8】実施例3の、1つのサンプルの種類当たりのCp値及び標準偏差の概要を示すグラフである。プレート全体のサンプルの種類(それぞれ非プール型、2倍又は4倍のプール型)の全ての複製産物をまとめる。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0065】

以下の実施例1及び2は、8倍又は4倍のビーズプール作製として上記の原理の2つの可能な選択肢について説明し、連続プロセスにおいて3つの区分全てを単一の検査プラットフォームにて組み合わせる。個々のドナーサンプルの代わりに、「予め」プールしたサンプルを用いることができ、これを個別に又は同じプラットフォームにピペット処理する。

40

【0066】

サンプルプールを、個々のサンプルの代わりに使用することができる。本明細書において示される2つのサンプル(サンプルプレート)それぞれの代わりに、3個以上のサンプル又はサンプルプールも組み合わせることができる。

【0067】

実施例1: 48サンプルの処理(およそ4時間)

プール作製は、抽出及びPCRのセットアップと同じ自動ピペット処理ワークステーションにおいて行われる。

50

【 0 0 6 8 】

このために最大48個の主要なバーコード標識されたバイアル（EDTA採血管、Greiner、ドイツ、フリッケンハオゼン）を、5500×g、15分間にて予め遠心分離し（Multifuge、Kendro、ドイツ、オステロデー）、血漿及び血液細胞成分を分離しておき、それをピペット処理ロボットを介してストリップラックに移動させる。さらに最大48個のバーコード標識したプール容器（例えばバイアル）をピペット処理ロボットのワークスペースに置く。ピペット処理デバイスは、自動で核酸を単離する磁気分離器を備える。例えば、ウイルスの核酸の抽出には、特許文献1に開示の磁性粒子をベースとする抽出化学物質を使用する。48個のバーコード標識したバイアルに加えて、抽出デバイスは消耗品（使い捨てチップ、反応管）、抽出試薬（autoX抽出キット、GFE Blut）並びにHIV、HCV、HBV、HAV及びPB19用PCR試薬（いわゆるマスターミックス）を備える。

10

【 0 0 6 9 】

完全に自動化した抽出プロセスを開始した後、主要なバイアルのバーコードを読み取る。血漿100 µLを主要なバイアル毎に抽出し、遠心分離用バイアルに入れる（プール容器）。800 µLの結合緩衝液をサンプルプールに添加する。次いでこれらを10分間攪拌する。その後2つのバイアルからの溶解物をそれぞれ反応管中で混和させる。残存する溶解物を磁性粒子から分離し、核酸が結合した磁性粒子のみを更に処理する。この後にプロテアーゼ含有洗浄緩衝液を用いた2つの洗浄工程及び80 のイオン強度の低い緩衝液中での核酸の溶出（磁気分離器の加熱ブロック）が続く。各場合において、磁気分離器の磁性分離によって液体と核酸結合マトリクスとの分離が生じる。

20

【 0 0 7 0 】

核酸の単離が完了すると、完全に自動化されたPCRのセットアップが続く。核酸抽出の場合とまさに同様に、この工程は完全にバーコード制御され、ソフトウェアによるワークリストの作製が続く。このため、当該ウイルス特異的PCRマスターミックスを、抽出デバイスのワークスペースに予め位置付けておき、それを各PCRプレートに配置し、続いて抽出物を添加する。抽出及びPCRのセットアップの合計時間はおよそ2.5時間である。

【 0 0 7 1 】

好適なピペット処理デバイス及びその構成要素は、例えば、ドイツ、クライルスハイムのTecanによるデバイスである。したがって、好適な自動ピペット処理デバイスは、FreedomEVOからなることができる一方で、TeMagS型等のデバイスを磁気分離器として使用することができ、IKA KSコントロール130型等のデバイスを攪拌用を使用することができる。

30

【 0 0 7 2 】

ドイツ、ダルムシュタットのMerckのMagPrep（商標）シリカは、好適な磁性粒子の一例である。

【 0 0 7 3 】

バーコード並びに抽出及びPCRのセットアップのモニタリングをソフトウェアにより制御する。

【 0 0 7 4 】

最終の工程では、PCRプレートを手動又は自動で密封し、それらをリアルタイムPCRサーマルサイクラーに移す。これまでに公開されている通りに増幅を行う；HIV-1において、Drosten C. et al.（J. Clin. Microbiol., 2001, 39: 4302-4308）を参照のこと；HBVにおいて、Drosten C. et al.（Transfusion, 2000, 40: 718-427）を参照のこと；HCV、HBV及びHIV-1において、RothWK et al.（Lancet, 1999, 353: 359-363）を参照のこと。増幅には競合的内部対照を用いたTaqMan PCRアッセイを含むことが好ましい。

40

【 0 0 7 5 】

上記の増幅及び検出はおよそ2時間である。

【 0 0 7 6 】

Roche DiagnosticsのLightCycler（商標）480デバイスは好適なサーマルサイクラーの例である。

【 0 0 7 7 】

50

結果：上記の試験により、NAT検査プロセスの完全なバーコード制御を得た。サンプルの混合は確実に除外された。GFEBlutによるautoXシステムにおいて得られた95 %の検出限界（HCVにおいて102 IU/mL、HIV-1において1046 IU/mL、HBVにおいて91IU/mL、HAVにおいて40 IU/mL及びPB19において483 IU/mL）を個々の供血血液を参照して各ウイルスに対する三濃度法に使用した。不具合は観察されず、上記の方法の感度は同等のものであると結論することができた。

【0078】

実施例2：192サンプルの処理（およそ3時間）

サンプルを手動で作製するが、これもピペット処理プラットフォームで行うことができる。抽出を、ThermoFisherのKingFisher Flexを用いて行い、本実施例のPCRのセットアップを手動で行う（ピペット処理プラットフォームでも行うことができる）。

【0079】

このために最大192個の主要なバーコード標識したバイアル（EDTA採血管、Greiner、フリッケンハオゼン）を5500×g、15分間にて予め遠心分離し（Multifuge、Kendro、オステローデ）、血漿及び血液細胞成分を分離しておき、これをピペット処理ロボットを介してストリップラックに移動させる。さらに最大2個のバーコード標識したプール容器（例えば、96ウェルのプレート）をピペット処理ロボットのワークスペースに置く。核酸の単離を自動化するため、ピペット処理デバイスは磁性分離器（KingFisher）を備える。しかし、単離がまだ実行されていなかったため、抽出を個別のKingFisherモジュールで行っている。例えば、ウイルス核酸の抽出には、特許文献1に開示の磁性粒子をベースとする抽出化学物質を使用する。4個のバーコード標識した96ウェルプレートに加え、抽出デバイスは、消耗品（使い捨てチップ、反応管、深型ウェルプレート）、抽出試薬（autoX抽出キット、GFE Blut）並びにHIV、HCV、HBV、HAV及びPB19のPCR試薬（いわゆるマスターミックス）を備える。

【0080】

サンプル作製プロセス（プール作製用についても）を開始した後、主要なバイアルのバーコードを読み取る。血漿100 µLを主要なバイアル毎に抽出し、96ウェルプレートに入れる。800 µLの結合緩衝液をサンプルプールのそれぞれに添加し、混合物をKingFisherモジュールに入れる。次いでサンプルを10分間攪拌する。続いて残存する溶解物を磁性粒子から分離し、2つのプレート位置から、核酸が結合した磁性粒子のみを更なる処理用の96ウェルプレートの1つで混和させる。この後に、プロテアーゼ含有洗浄緩衝液を用いた2つの洗浄工程及び80 のイオン強度が低い緩衝液中での核酸の溶出（磁気分離器の熱ブロック）が続く。各場合において、磁気分離器の磁性分離によって液体と核酸結合マトリクスとの分離が生じる（永久磁石ヘッドを用いた浸漬プロセス）。

【0081】

核酸の単離が完了すると、完全に自動化されたPCRのセットアップを開始することができる（これは本実施例において手動で行われた）。核酸の抽出とまさに同様に、この工程は完全にバーコード制御され、ソフトウェアによるワークリストの作製が続く。このため、当該ウイルス特異的PCRマスターミックスを、抽出デバイスのワークスペースに予め置き、これを各PCRプレートに入れ、続いて抽出物を添加する。抽出及びPCRのセットアップの合計時間はおよそ1時間である。

【0082】

好適なピペット処理デバイス及びそれらの構成要素は、例えばクライルスハイムのTecanのデバイスである。したがって、好適な自動ピペット処理デバイスは、FreedomEV0デバイスからなり得る一方で、KingFisher Flex型等のデバイスを磁気分離器として使用することができる。ダルムシュタットのMerckのMagPrep^{（商標）}シリカは、好適な磁性粒子の一例である。システムソフトウェアはバーコードを制御し、抽出及びPCRのセットアップを制御し、モニタリングする。

【0083】

最終工程はPCRプレートを手動又は自動で密封し、それらをリアルタイムPCRサーマルサ

10

20

30

40

50

イカラーに移す。これまでに公開されている通りに増幅を行う；HIV-1において、Drosten C. et al. (J. Clin. Microbiol., 2001, 39: 4302-4308)を参照のこと；HBVにおいて、Drosten C. et al. (Transfusion, 2000, 40: 718-427)を参照のこと；HCV、HBV及びHIV-1において、RothWK et al. (Lancet, 1999, 353: 359-363)を参照のこと。増幅には競合的内部対照を用いたTaqMan PCRアッセイを含むことが好ましい。

【0084】

上記の増幅及び検出はおよそ2時間である。Roche DiagnosticsのLightCycler (商標) 480デバイスは好適なサーマルサイクラーの例である。

【0085】

結果：上記の試験により、NAT検査プロセスの完全なバーコード制御を得た。サンプルの混合は確実に除外された。GFEBIutによるautoXシステムにおいて得られた95 %の検出限界 (HCVにおいて997 IU/mL、HIV-1において1029 IU/mL、HBVにおいて59 IU/mL) を個々の供血血液を参照して各ウイルスに対する三濃度法に使用し、各場合の陰性サンプルとビーズプール作製を組み合わせた。不具合は観察されず、上記の方法の感度は同等のものであると結論できた。

【0086】

実施例3

2倍のビーズプール作製

本方法の機能性に対する裏付けを得るため、抽出モジュール (EM、サンプルの加熱、磁性分離及び磁性粒子の再懸濁のためのデバイス) を使用するが、2倍のビーズプール作製、すなわち、2つのサンプルプールの磁性粒子を混和させた。このため、24ウェルフォーマットの2つのサンプルプレートには以下のようなサンプルプールが含まれた：

【表1】

Plate1:

	1	2	3	4	5	6	
A	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	A
B	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE	POSITIVE	POSITIVE	B
C				NEGATIVE + IC	NEGATIVE + IC	NEGATIVE + IC	C
D				NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	D
	1	2	3	4	5	6	

Plate 1: プレート1

POSITIVE: 陽性

NEGATIVE: 陰性

【表 2】

Plate 2:

	1	2	3	4	5	6	
A				POSITIVE	POSITIVE	POSITIVE	A
B				POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	B
C	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE	POSITIVE	POSITIVE	C
D	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	POSITIVE + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

10

Plate 2: プレート2

POSITIVE: 陽性

陽性 = 15サンプル（アッセイ1）又は13サンプル（アッセイ2）のプール各100 μ l、これらのうち14サンプル又は12サンプルは、GFE autoXシステムの2倍の検出限界に相当するウイルス陰性サンプル（NHP）であり、1つはウイルス陽性サンプルであった。

20

【表 3】

Pos (2xNWG)					
Parameter	Material-ID	Aliquot	Starting concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Final concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Volume to be pipetted [μ l]
HCV	6695706	U	1.00E+04	196	127.4
HBV	40307073007	K	1.00E+04	106	68.9
HIV-1	213-210906	Y	1.00E+05	2092	136.0
HIV-2	210-210906	G	1.00E+05	184	12.0
HAV	411-180908	H	1.00E+04	80	52.0
PB19	6451553	F	1.00E+05	966	62.8
NHP					6041.0
Sum					6500

30

Parameter: パラメータ

Material-ID: 材料番号

Aliquot: 分割量名

Starting concentration: 開始濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Final concentration: 最終濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Volume to be pipetted: ピペット処理する容量

Sum: 合計

40

陰性 = 1.5 ml (アッセイ1) 又は1.3ml (アッセイ2) の陰性ヒト血漿 (NHP)

IC = 内部対照、ビーズ移送の対照と同じく、溶菌からRT-PCRまでのプロセスの工程をモニタリングするための組換えRNAウイルスからなる。

【 0 0 8 8 】

溶菌し、核酸を磁性粒子に結合させた後に、プレート1及びプレート2由来の磁性粒子を混合した：

【表 4】

Plate 3:

	1	2	3	4	5	6	
A	POSITIVE + IC Plate 1	POSITIVE + IC Plate 1	POSITIVE + IC Plate 1	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	A
B	POSITIVE + IC Plate 1	POSITIVE + IC Plate 1	POSITIVE + IC Plate 1	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	2x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	B
C	POSITIVE + IC Plate 2	POSITIVE + IC Plate 2	POSITIVE + IC Plate 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	C
D	POSITIVE + IC Plate 2	POSITIVE + IC Plate 2	POSITIVE + IC Plate 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	1x POSITIVE + IC Plate 1 + 2	D
	1	2	3	4	5	6	

Plate 3: プレート3

Positive: 陽性

Plate: プレート

【表 5】

Plate positions in plate 3	content	material
A1, A2, A3, B1, B2, B3	Only magnetic particles from plate 1	Single amount of positive material Single amount IC
C1, C2, C3, D1, D2, D3	Only magnetic particles from plate 2	Single amount of positive material Single amount IC
A4, A5, A6, B4, B5, B6	magnetic particles from plate 1 and 2	Double amount of positive material Single amount IC
C4, C5, C6, D4, D5, D6	magnetic particles from plate 1 and 2	Single amount of positive material Single amount IC

Plate position inPlate 3: プレート3のプレート位置

Content: 内容物

Material: 材料

Only magnetic particles from plate 1: プレート1由来の磁性粒子のみ

Only magnetic particles from plate 2: プレート2由来の磁性粒子のみ

Magnetic particles from plate 1 & plate 2: プレート1及びプレート2由来の磁性粒子

Single amount of positive material: 1陽性度 (Single amount: 一倍量) の陽性材料

Single amount IC: 1陽性度のIC

Double amount of positive material; 2陽性度 (Double amount: 二倍量) の陽性材料

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

主要なプレート当たりに利用可能な24個の複製産物のうち、プレート1又はプレート2由来のそれぞれ6つの複製産物のそれぞれに対して、ビーズプール作製を行わなかった。更に6つの複製産物に対して、陽性材料と陽性材料とを合わせてプールし、そのうち、列の半分だけICをそれぞれ含有させた。これにより、理論的に2倍の陽性材料及び1陽性度のICが得られる。したがって、各ウイルスが、非プールサンプルと同じく、Cp値が早い段階（理論シフト-1）で検出されるはずであるが、ICの検出は変化しないはずであった。残りの6つの複製産物に対して、陽性材料と陰性材料とを合わせてプールし、そのうち、列の半分にだけICをそれぞれ含有させた。ここでは、各ウイルス及びICは何らかの変化をすることなく検出されるはずであり、すなわち、Cpがシフトすることなく、ビーズプール作製をしないアッセイに相当する。このプレート構成を使用して、使用する磁性粒子の種類が異なる2つの独立したアッセイ及び抽出プロトコルにおいて（それぞれアルコールを含み、又は含まない）、方法の感度が2倍のビーズプール作製に影響を与えないことを示すことができた。

10

【 0 0 9 0 】

アッセイ1：1.5 mlの血漿、カオトロピック溶解並びに磁性粒子をシリカ表面に結合、刺激の弱い（mild）非アルコール洗浄緩衝液の使用

【 0 0 9 1 】

様々な種類のサンプルを1ウェル当たり深型24ウェルKFプレートに以下の通りに作製した：

20

陽性 + IC：100 μ lのPos+1.4 mlのNHP+10 μ lのICキット

陽性：100 μ lのPos+1.4 mlのNHP

陰性+IC：1.5 mlのNHP+10 μ lのICキット

陰性：1.5 mlのNHP

【 0 0 9 2 】

手動の工程を含む、抽出モジュールでの抽出の順は、
深型24ウェルプレートに抽出（上記を参照のこと）するためのサンプルの準備、
975 μ lのプロテイナーゼK溶液の添加、
磁性粒子を含む1.970 μ lのカオトロピック結合緩衝液の添加、
溶解（56 にて混合 / インキュベーション）、ビーズの回収及びEMにより500 μ lの洗浄緩衝液に移動、
混合、ビーズの回収及びEMにより500 μ lの洗浄緩衝液2に移動、
混合、ビーズの回収及びEMにより130 μ lの溶出緩衝液に移動、80 での溶出、
EMによるビーズの回収、
手動により溶出液（約80 μ l）をPCR反応に移動（以下を参照のこと）。

30

【 0 0 9 3 】

PCR反応：ベースミックス（BM）を各オリゴミックス（OM）に添加して、パラメータHBV/HCV（bc）、HIV-1（i1）、HIV-2/HAV（i2a）及びPB19（b19）用のPCRマスターミックス（MM）を作製。

40

bc、i2a：132 μ lのOM当たりそれぞれ858 μ lのBM

30 μ lのMM / ウェル

溶出液又はPosKo（陽性対照用キット）又はNTC（陰性対照用キット）をそれぞれ20 μ l添加、

i1、b19：84 μ lのOM当たりそれぞれ546 μ lのBM

15 μ lのMM / ウェル

溶出液又はPosKo（陽性対照用キット）又はNTC（陰性対照用キット）をそれぞれ10 μ l添加

Roche LightCycler 480 IIシステムを用いた96ウェルプレートの定量的RT-PCRの試行

【 0 0 9 4 】

結果：

50

- + ビーズプール作製（それぞれプレート1又はプレート2）を含まない1陽性度の陽性材料
- + + 2つの陽性サンプルのビーズプール作製の後の2陽性度の陽性材料
- + - 1つの陽性サンプル及び1つの陰性サンプルのビーズプール作製後の1陽性度の陽性材料

Cp値の平均（MW）

【表 6】

MW Cp	HCV	HBV	HIV- 1v3	HIV- 2v2	HAV v2	PB19	IC (bc)	IC (il)	IC (i2a v2)	IC (b19)
+										
(Plate 1)	34.74	32.12	30.72	28.66	27.63	31.04	28.35	26.30	25.74	27.23
+										
(Plate 2)	34.53	31.87	31.39	28.89	28.32	31.85	28.54	26.85	26.20	27.24
++	33.51	31.43	29.79	28.58	27.52	30.72	28.62	26.92	26.32	27.38
+-	34.46	32.35	30.72	28.75	27.68	31.67	28.72	26.50	26.10	26.99

10

Plate: プレート

【 0 0 9 5 】

20

図3は、サンプルの種類当たりのCp値の平均値（MW）及び標準偏差をグラフで図示したものを示す。HIV-2（+（プレート1）の不具合が1つ）を除き、不具合は観察されなかった。結果は少しの感度も失うことなく、ビーズプール作製が行われたことを示す。一方で、この結果ICにおいては、1陽性度の全てのサンプル（ビーズプール作製を含まず、また含み）に最終的に認められており、全てのパラメータ（bc、il、i2a、b19）がそれぞれかなり同等のCp値となることを同定することができたことが示されている。

【 0 0 9 6 】

一方、全てのウイルスパラメータ（HCV、HBV、HIV-1、HIV-2、HAV、PB19）はそれぞれ最終的に（ビーズプール作製を含まず、また含み）1陽性度（+）の陽性材料の全てのサンプルに対してかなり同等のCp値を示した。さらに、2陽性度（++）の陽性材料を含有する全てのサンプルは、予測したように、ビーズプール作製後のCp値がいくらか小さく、ウイルス量の増加を反映していた。

30

【 0 0 9 7 】

要約すると、1陽性度のビーズプール作製に対する予測が一致した。ビーズ量が最終的に増加することは、非プールサンプルに比べ、溶出の効率を大幅に悪化させることにならない。

【 0 0 9 8 】

アッセイ2では、この結果を、様々な磁性粒子及び様々なプロトコルを用いた2陽性度のビーズプール作製に対して確認した。

【 0 0 9 9 】

40

アッセイ2：1.3 mlの血漿、カオトロピック溶解及び核酸と磁性粒子（官能基を用いて修飾した表面）とを結合させるためのイソプロパノールによる析出、アルコール含有洗浄緩衝液を用いた洗浄。様々な種類のサンプルを1ウェル当たり深型24ウェルKFプレートに以下の通りに作製した：

陽性 + IC：100 μ lのPos + 1.2 mlのNHP + 10 μ lのICキット

陽性：100 μ lのPos + 1.2 mlのNHP

陰性 + IC：1.3 mlのNHP + 10 μ lのICキット

陰性：1.3 mlのNHP

【 0 1 0 0 】

手動の工程を含む、抽出モジュール（EM）での抽出の順は、

50

深型24ウェルプレートに抽出（上記を参照のこと）するためのサンプルの準備、
 325 μ lのプロテイナーゼK溶液の添加、
 磁性粒子を含む1.300 μ lのカオトロピック結合緩衝液の添加、
 EMによる溶解（56 にて混合 / インキュベーション）、
 10 μ lの磁性粒子の添加、
 2.050 μ lのイソプロパノールの添加、
 ビーズの回収及びEMにより700 μ lの洗浄緩衝液1に移動、
 混合、ビーズの回収及びEMにより800 μ lの洗浄緩衝液2に移動、
 混合、ビーズの回収及びEMにより130 μ lの溶出緩衝液に移動、80 での溶出、
 EMによるビーズの回収、
 手動により溶出液（約80 μ l）をPCR反応へ移動（以下を参照のこと）。

10

【0101】

PCR反応：ベースミックス（BM）を各オリゴミックス（OM）に添加して、パラメータHBV/H
 CV（bc）、HIV-1（il）、HIV-2/HAV（i2a）及びPB19（b19）用のPCRマスターミックス（M
 M）を作製。

bc、i2a：132 μ lのOM当たりそれぞれ858 μ lのBM

30 μ lのMM / ウェル

溶出液若しくはPosKo（陽性対照用キット）又はNTC（陰性対照用キット）をそれぞれ20
 μ l添加、

i1、b19：84 μ lのOM当たりそれぞれ546 μ lのBM

15 μ lのMM / ウェル

溶出液若しくはPosKo（陽性対照用キット）又はNTC（陰性対照用キット）をそれぞれ10
 μ l添加

20

Roche LightCycler 480 IIシステムを用いた96ウェルプレートの定量的RT-PCRの試行

【0102】

結果：

+ ビーズプール作製（それぞれプレート1又はプレート2）を含まない1陽性度の陽性材
 料

+ + 2つの陽性サンプルのビーズプール作製の後の2陽性度の陽性材料

+ - 1つの陽性サンプル及び1つの陰性サンプルのビーズプール作製後の1陽性度の陽性
 材料

30

Cp値の平均（MW）

【表7】

MW Cp	HCV	HBV	HIV-1v3	HIV-2v2	HAVv2	PB19	IC (bc)	IC (il)	IC (i2a v2)	IC (b19)
+ (Plate 1)	34.03	32.86	29.17	27.21	26.56	30.26	29.31	26.05	25.78	26.09
+ (Plate 2)	33.73	32.39	29.40	26.96	26.36	30.16	28.90	25.76	25.61	26.04
++	33.12	31.76	29.08	25.80	25.24	29.29	29.86	26.30	25.55	26.55
+-	33.56	33.04	30.07	27.31	26.30	30.47	30.04	26.56	26.05	26.48

40

Plate: プレート

【0103】

図4は、サンプルの種類当たりのCp値の平均値（MW）及び標準偏差をグラフで図示した
 ものを示す。不具合は観察されなかった。

【0104】

この結果により、様々な実験設定においてもビーズプール作製の実際の実行が成功した
 ことを確認した。一方、この結果は、ICにおいては、1陽性度の全てのサンプル（ビーズ

50

プール作製を含まず、また含み)に最終的に認められており、全てのパラメータ(bc、i1、i2a、b19)が、それぞれかなり同等のCp値となることを同定することができたことが示されている。ビーズプール作製による大幅な悪化を観察することはできなかった。

【0105】

一方、全てのウイルスパラメータ(HCV、HBV、HIV-1、HIV-2、HAV、PB19)はそれぞれ最終的に(ビーズプール作製を含まず、また含み)1陽性度(+)の陽性材料の全てのサンプルに対してかなり同等のCp値を示した。さらに、2陽性度(++)の陽性材料を含有する全てのサンプルは、予測したように、ビーズプール作製後のCp値がいくらか小さく、ウイルス量の増加を反映していた。要約すると、この結果は予測と一致し、ビーズ量が最終的に増加することは、非プールサンプルに比べ、溶出の効率を大幅に悪化させることにならない。

10

【0106】

アッセイ3では、この結果を、4倍のビーズプール作製に対して確認した。

【0107】

アッセイ3：方法の機能性を確認するため、いわゆる4倍のビーズプール作製、すなわち4つのサンプルプール由来の磁性粒子のプール作製は、抽出モジュール(EM、サンプルの加熱、磁性分離及び磁性粒子の再懸濁のためのデバイス)を用いて行われた。

【0108】

実験設定：4倍のビーズプール作製において、2つのEMを必要とし、そのそれぞれが同時に2つのサンプルプレート溶解し、すなわち合計4つのサンプルプレートを処理した。各EMでの溶解の後に、両方のサンプルプレートのビーズを洗浄緩衝液1(→2倍のプール作製)で混和させた。次の工程において、2つのWB1プレートをEMの外側のネストに置き、両方のプレートのビーズを、洗浄緩衝液2で混和させる(中間ネスト)(→つまり、4倍のプール作製)。本実験では、個々のそれぞれのプレートの溶解並びに2倍及び4倍のビーズプール作製を、Cp値を読み取り値として用いた定量的RT-PCRにおいて最終的に制御することができることを計画している。このため、抽出時に、非プール型、2倍プール型及び4倍プール型のサンプルを作製する。ICをサンプルプレートに一行に交互に連続して添加し、その結果、各サンプル位置でのビーズプール作製に成功した後、ICを1陽性度で検出することができる。プール作製の効率及びプール作製の考えられる負の作用の両方に対して試験するため、一方で「陽性材料及び陽性材料」を比較し、一方で「陽性材料及び陰性材料(NHP)」をプールする。

20

30

【0109】

アッセイ3：「陽性材料及び陽性材料」の4倍のプール作製 1.5 mlの血漿、カオトロピック溶解及び磁性粒子とシリカ表面との結合、刺激の弱い非アルコール洗浄緩衝液の使用

【0110】

24ウェルフォーマットの最初の4つのサンプルプレートに以下の通りにサンプルプールを充填し、そのうち、種類の異なる2つのサンプルを使用した：

Pos + IC : 100 µlのPos + 1.4 mlのNHP + 10 µlのICキット

Pos : 100 µlのPos + 1.4 mlのNHP

【0111】

陽性(Pos) = 15サンプルのプール、100 µl、14種のウイルス陰性サンプル(NHP)及びGFE autoXシステムの2倍検出限界に該当するウイルス陽性サンプル1つ：

40

【表 8】

Parameter	Material-ID	Aliquot	Starting concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Final concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Volume to be pipetted [μl]
HCV	6695706	U	1.00E+04	196	127.4
HBV	40307073007	K	1.00E+04	106	68.9
HIV-1	213-210906	Y	1.00E+05	2092	136.0
HIV-2	210-210906	G	1.00E+05	184	12.0
HAV	411-180908	H	1.00E+04	80	52.0
PB19	6451553	F	1.00E+05	966	62.8
NHP					6041.0
Sum					6500

10

Parameter: パラメータ

Material-ID: 材料番号

Aliquot: 分割量名

Starting concentration: 開始濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Final concentration: 最終濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Volume to be pipetted: ピペット処理する容量

Sum: 合計

【 0 1 1 2 】

IC = ビーズ移送の対照と同じく、溶菌からRT-PCRまでのプロセスの工程をモニタリングするための組換えRNAウイルスからなる。

20

プレート1 (EMv2、ネスト1) :

【表 9】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	A
B							B
C				Pos	Pos	Pos	C
D				Pos	Pos	Pos	D
	1	2	3	4	5	6	

30

プレート2 (EMv2、ネスト3) :

【表 10】

	1	2	3	4	5	6	
A				Pos	Pos	Pos	A
B							B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	C
D				Pos	Pos	Pos	D
	1	2	3	4	5	6	

40

プレート3 (EMv1、ネスト1) :

【表 1 1】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	B
C				Pos	Pos	Pos	C
D				Pos	Pos	Pos	D
	1	2	3	4	5	6	

プレート4 (EMV1、ネスト3) :

10

【表 1 2】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B				Pos	Pos	Pos	B
C				Pos	Pos	Pos	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

【0 1 1 3】

20

WB1の2倍のビーズプール作製後 : $2 \times \text{Pos} = 2$ 倍のビーズプール作製の結果としての2陽性の陽性材料

WB1のプレート1 + 2 (EMV2) :

【表 1 3】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	A
B							B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	C
D				2x Pos	2x Pos	2x Pos	D
	1	2	3	4	5	6	

30

WB1のプレート3 + 4 (EMV1) :

【表 1 4】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	B
C				2x Pos	2x Pos	2x Pos	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

40

50

【 0 1 1 4 】

WB2の4倍のビーズプール作製後： $4 \times \text{Pos} = 4$ 倍のビーズプール作製の結果としての4陽性度の陽性材料

$\text{WB1 (EMv1)} + \text{WB1 (EMv2)} = \text{プレート1} + 2 + 3 + 4$

【表 1 5】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	2x Pos + IC	B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	4x Pos + IC	4x Pos + IC	4x Pos + IC	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	4x Pos + IC	4x Pos + IC	4x Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

10

【 0 1 1 5 】

主要なプレート当たりに含まれる24個の複製産物のうち、プレート1～プレート4のそれぞれの3個の複製産物に対して、ビーズプール作製を行わなかった（合計12個の複製産物）。2倍のビーズプール作製の両方の更なる3つの複製産物に対して、陽性材料及び陽性材料をプールし、そのうち、一列のみにICを含有させた（合計6個の複製産物）。これにより、理論的に2倍の陽性材料（ $2 \times \text{Pos}$ ）及びそれぞれ1陽性度のICが得られる。したがって、各ウイルスが、非プールサンプルと同じく、Cp値が早い段階（理論シフト-1）で検出されるはずであるが、ICの検出は変化しないはずであった。

20

【 0 1 1 6 】

残り6個の複製産物に対して、2工程において、陽性材料及び陽性材料をそれぞれプールし、そのうち、一列のみにICを含有させた。これにより、2回連続のビーズプール作製工程による、理論的に4倍の陽性材料（ $4 \times \text{Pos}$ ）及び1陽性度のICが得られる。したがって、各ウイルスは非プールサンプルに比べ、2倍のプールサンプルと同じく、Cp値が早い段階（理論的シフト-1）でも検出されるはずであり、理論的シフト-2 Cpが観察されるはずであった。ICの検出は変化しないはずであった。

30

【 0 1 1 7 】

手動の工程を含む、抽出モジュール（EM）での抽出の順は、
 深型24ウェルプレートに抽出（上記を参照のこと）するためのサンプルの準備、
 975 μl のプロテインアーゼK溶液の添加、
 磁性粒子を含む1.970 μl のカオトロピック結合緩衝液の添加、
 EMによる溶解（56 $^{\circ}\text{C}$ にて混合/インキュベーション）、ビーズの回収、
 2倍のビーズプール作製：EMにより2つの最初のサンプルプレートそれぞれからビーズを500 μl の洗浄緩衝液1に移動、
 混合、ビーズの回収、
 4倍のビーズプール作製：EMにより2倍のプールサンプルを500 μl の洗浄緩衝液2に移動、
 混合、ビーズの回収及びEMにより150 μl の溶出緩衝液に移動、80 $^{\circ}\text{C}$ での溶出、
 EMによるビーズの回収、
 手動により溶出液（約80 μl ）をPCR反応に移動（以下を参照のこと）。

40

PCR反応：2倍のビーズプール作製に対するアッセイの類似性

【 0 1 1 8 】

結果：

Pos + IC ビーズプール作製を含まない1陽性度の陽性材料、1陽性度のIC、

50

2 × Pos + IC 2つの陽性サンプルの2倍のビーズプール作製後の2陽性度の陽性材料、1陽性度のIC

4 × Pos + IC 4つの陽性サンプルの4倍のビーズプール作製後の4陽性度の陽性材料、1陽性度のIC

【 0 1 1 9 】

図5は、パラメータ及びプレート当たりのCp値の平均 (MW) 及び標準偏差 (standard deviation) をグラフにより図示したものを示す。不具合は観察されなかった。図6は、Cp値の概要を示す：サンプルの種類の全ての複製産物 (それぞれ非プール型、2倍プール型又は4倍プール型) をプレート全体で要約した。

【 0 1 2 0 】

結果は4倍のビーズプール作製も少しの問題もなく行うことができることを示している。一方、この結果は、ICにおいては、1陽性度の全てのサンプル (それぞれ2倍又は4倍のビーズプール作製を含まず、また含み) に最終的に認められており、全てのパラメータ (bc、il、i2a、b19) が、それぞれかなり同等のCp値となることを同定することができたことが示されている。一方、全てのウイルスパラメータ (HCV、HBV、HIV-1、HIV-2、HAV、PB19) はそれぞれ予測通りに、非プール型から2倍プール型、最大4倍プール型の材料から明示され得るようにCp値の改善を示した。これはウイルス量の増加を反映する。要約すると、結果は予測と一致し、ビーズ量が最終的に増加することは、非プールサンプルに比べ、溶出の効率を大幅に悪化させることにならない。

【 0 1 2 1 】

アッセイ4：「陽性材料及び陰性材料」の4倍のプール作製 1.5 mlの血漿、カオトロピック溶解及び磁性粒子とシリカ表面との結合、刺激の弱い非アルコール洗浄緩衝液の使用

【 0 1 2 2 】

24ウェルフォーマットの最初の4つのサンプルプレートに以下の通りにサンプルプールを充填し、そのうち、種類の異なる4つのサンプルを使用した：

Pos + IC : 100 µlのPos + 1.4 mlのNHP + 10 µlのICキット

Pos : 100 µlのPos + 1.4 mlのNHP

Neg + IC : 1.5 mlのNHP + 10 µlのICキット

Neg : 1.5 mlのNHP

【 0 1 2 3 】

陽性 (Pos) = 15サンプルのプール、100 µl、14種のウイルス陰性サンプル (NHP) 及び GFE autoXシステムの2倍検出限界に該当するウイルス陽性サンプル1つ、

【表 1 6】

Parameter	Material-ID	Aliquot	Starting concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Final concentration [IU/ml] or [Kop/ml]	Volume to be pipetted [µl]
HCV	6695706	U	1.00E+04	196	127.4
HBV	40307073007	K	1.00E+04	106	68.9
HIV-1	213-210906	Y	1.00E+05	2092	136.0
HIV-2	210-210906	G	1.00E+05	184	12.0
HAV	411-180908	H	1.00E+04	80	52.0
PB19	6451553	F	1.00E+05	966	62.8
NHP					6041.0
Sum					6500

Parameter: パラメータ

Material-ID: 材料番号

Aliquot: 分割量名

Starting concentration: 開始濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Final concentration: 最終濃度 [IU/ml] 又は [Kop/ml]

Volume to be pipetted: ピペット処理する容量

Sum: 合計

【 0 1 2 4 】

陰性 (Neg) = 100 μ l 中の15ウイルス陰性 (NHP) のプール

IC = 内部対照、ピーズ移送の対照と同じく、溶菌からRT-PCRまでのプロセスの工程をモニタリングするための組換えRNAウイルスからなる。

プレート1 (EMv1、ネスト1) :

【表 1 7】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	A
B							B
C				Neg	Neg	Neg	C
D				Neg	Neg	Neg	D
	1	2	3	4	5	6	

10

20

プレート2 (EMv1、ネスト3) :

【表 1 8】

	1	2	3	4	5	6	
A				Neg	Neg	Neg	A
B							B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Neg + IC	Neg + IC	Neg + IC	C
D				Neg	Neg	Neg	D
	1	2	3	4	5	6	

30

プレート3 (EMv2、ネスト1) :

【表 1 9】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	B
C				Neg	Neg	Neg	C
D				Neg	Neg	Neg	D
	1	2	3	4	5	6	

40

プレート4 (EMv2、ネスト3) :

【表 2 0】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B				Neg	Neg	Neg	B
C				Pos	Pos	Pos	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

【 0 1 2 5】

10

WB1の2倍のビーズプール作製後：

WB1のプレート1 + 2 (EMv1)：

【表 2 1】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	A
B							B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Neg	Neg	Neg	C
D				Neg	Neg	Neg	D
	1	2	3	4	5	6	

20

WB1のプレート3 + 4 (EMv2)：

【表 2 2】

	1	2	3	4	5	6	
A							A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	B
C				Pos	Pos	Pos	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

30

【 0 1 2 6】

WB2の4倍のビーズプール作製後：

WB1 (EMv1) + WB1 (EMv2) = プレート1 + 2 + 3 + 4

【表 2 3】

	1	2	3	4	5	6	
A	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	A
B	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	B
C	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	C
D	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	Pos + IC	D
	1	2	3	4	5	6	

40

50

【 0 1 2 7 】

主要なプレート当たりに含まれる24個の複製産物のうち、プレート1～プレート4のそれぞれの3個の複製産物に対して、ビーズプール作製を行わなかった（合計12個の複製産物）。2倍のビーズプール作製の両方の更なる3つの複製産物に対して、陽性材料及び陽性材料をプールし、そのうち、一列のみにICを含有させた（合計6個の複製産物）。残りの6つの複製産物に対して、2工程において、陽性材料は4倍を1回、陰性材料は3回プールし、そのうち、一列のみにICを含有させた。したがって、実験は、24個の理論的に同一のサンプルを得て、陽性材料及びICを1陽性度で含有した（Pos + IC）。したがって、これらのサンプルは、PCRにおいて同様に挙動するはずであり、同様のCp値が検出されるはずであった。実験は、上記のこの実施例における他のアッセイと同様に行われた。

10

【 0 1 2 8 】

図7は、パラメータ及びプレート当たりのCp値の平均（MW）及び標準偏差をグラフにより図示したものを示す。プレート1（非プール型）及び最終4倍のプール型のプレートにおけるそれぞれのHBVに対して不具合が1つ観察された。さらに、図8はCp値の概要を示す：サンプルの種類の全ての複製産物（それぞれ非プール型、2倍型又は4倍型のプール）を、プレート全体を通して要約した。

【 0 1 2 9 】

結果は、4倍のビーズプール作製も少しの問題もなく行うことができることを示している。一方、この結果は、IC、またウイルスパラメータ（HCV、HBV、HIV-1、HIV-2、HAV、B19）においては、1陽性度の全てのサンプル（それぞれ2倍又は4倍のビーズプール作製を含まず、また含み）に最終的に認められており、全てのパラメータが、それぞれかなり同等のCp値となることを同定することができたことが示されている。要約すると、陽性プールサンプル及び3つの陰性プールサンプルの4倍のビーズプール作製の結果は予測と一致するものであった。ビーズ量が最終的に増加することは、非プールサンプルに比べ、溶出の効率を大幅に悪化させることにならない。

20

【 符号の説明 】

【 0 1 3 0 】

図面記

図1

30

48 Primary-samples or primary sample pools 48個の主要サンプル又は主要サンプルプール

1-fold beads pooling in 24 24ウェルにおける1倍のビーズプール作製

MTP=2-fold pool in WP1 MTP = WP1の2倍のプール

4x24 PCRs (4 Parameter/Pool) 4 × 24のPCR (4パラメータ / プール)

96er Plate 96ウェルプレート

96er Cycler 96ウェルサイクラー

96 primary samples or Primary sample pools 96個の主要サンプル又は主要サンプルプール

40

2-fold Beads Pooling in 24er 24ウェルの2倍のビーズプール作製

MTP=4-fold Pool WP2 MTP = WP2の4倍のプール

192 Primary samples or Primary sample Pools 192個の主要サンプル又は主要サンプルプール

4-fold Beads Pooling in 24er 24ウェルの4倍のビーズプール作製

MTP=8-fold Pool in EB MTP = EBの8倍のプール

384 Primary samples or Primary sample Pools 384個の主要サンプル又は主要サンプルプール

50

4-fold Beads Pooling in 48er 48ウェルの4倍のビーズプール作製
MTP=8-fach Pool in WP2 MTP = WP2の8倍 (fold) のプール
384er Plate 384ウェルプレート
384er Cyclor 384ウェルサイクラー

図2

384 individual donors 384個の個々のドナー
Quadruple pooling in 48-well microtiter plate (3.5mL) 48ウェルマイクロタイター
プレート (3.5 mL) の4倍のプール作製
384-unit PCR 384ユニットのPCR

10

図3

plate プレート

図4

plate プレート

図5

plate プレート
fold 倍

20

図6

w/o pooling プール作製なし
fold 倍

図7

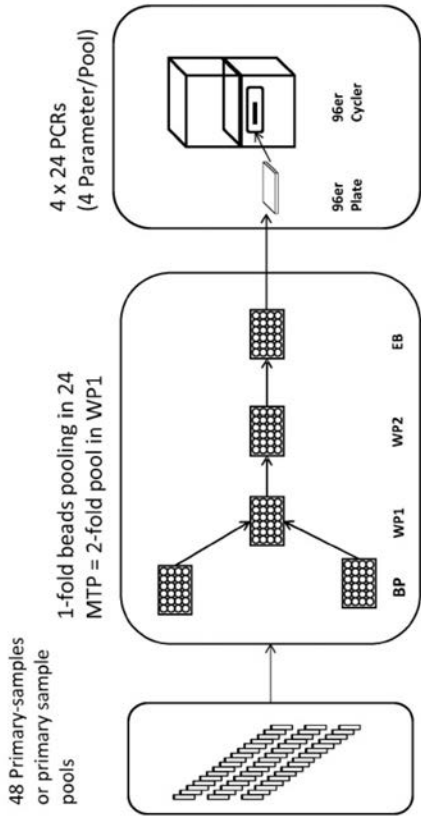
plate プレート
fold 倍

図8

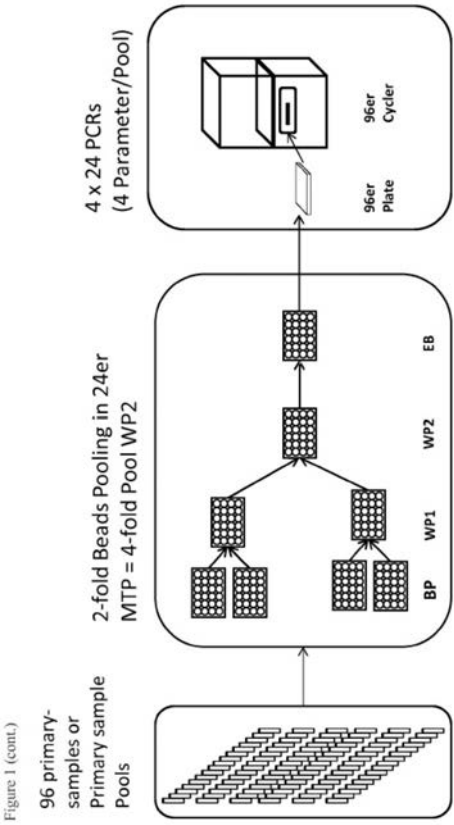
w/o pooling プール作製なし
fold 倍

30

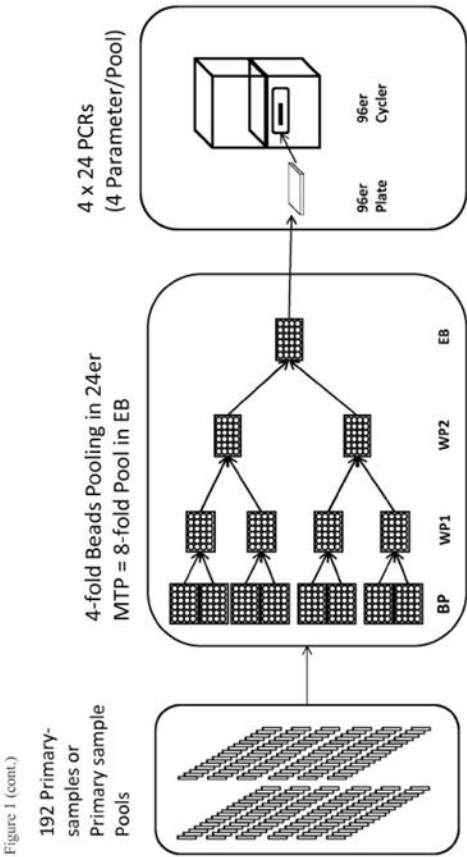
【 図 1 - 1 】



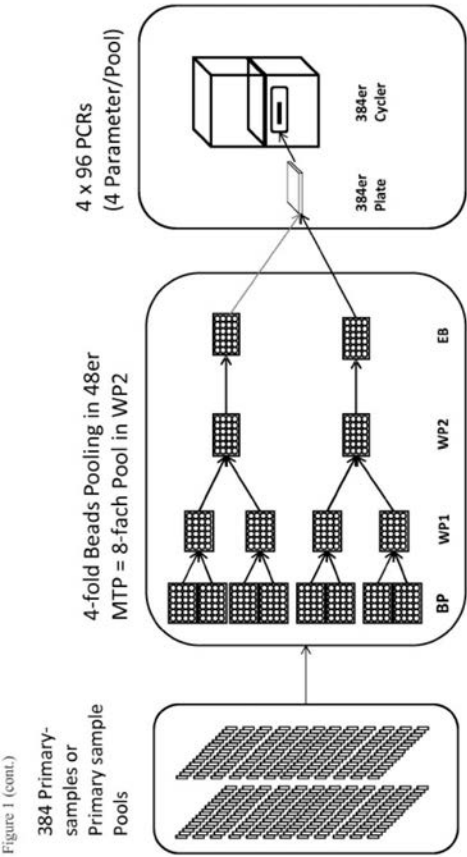
【 図 1 - 2 】



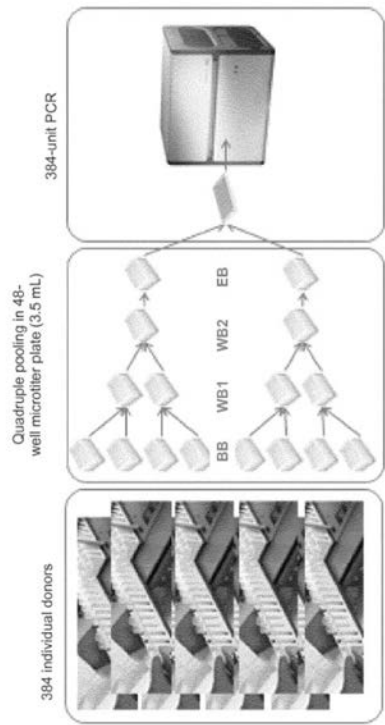
【 図 1 - 3 】



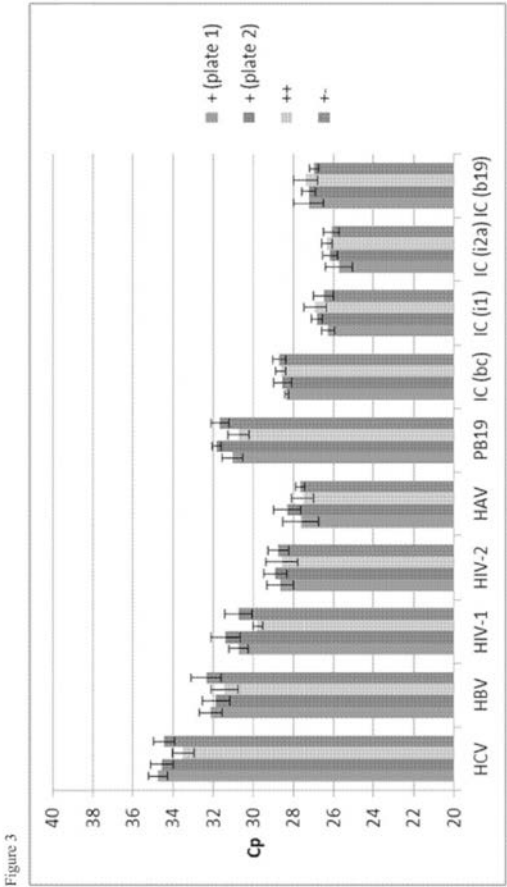
【 図 1 - 4 】



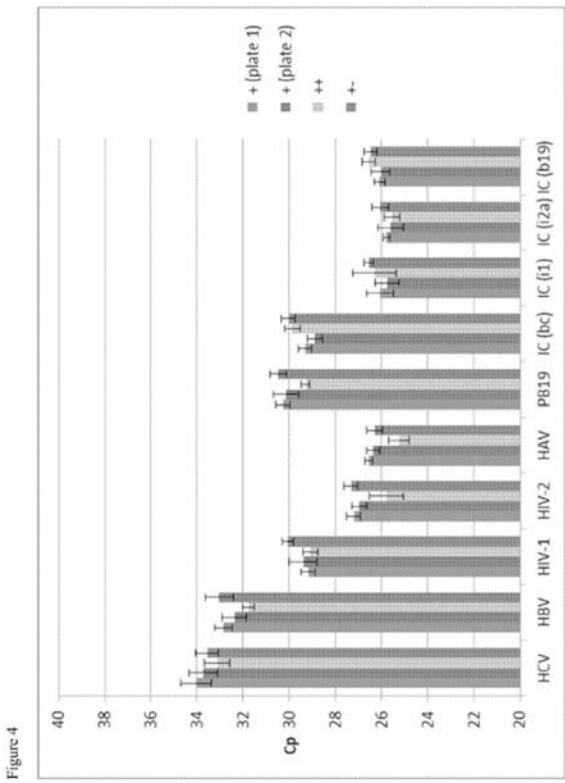
【 図 2 】



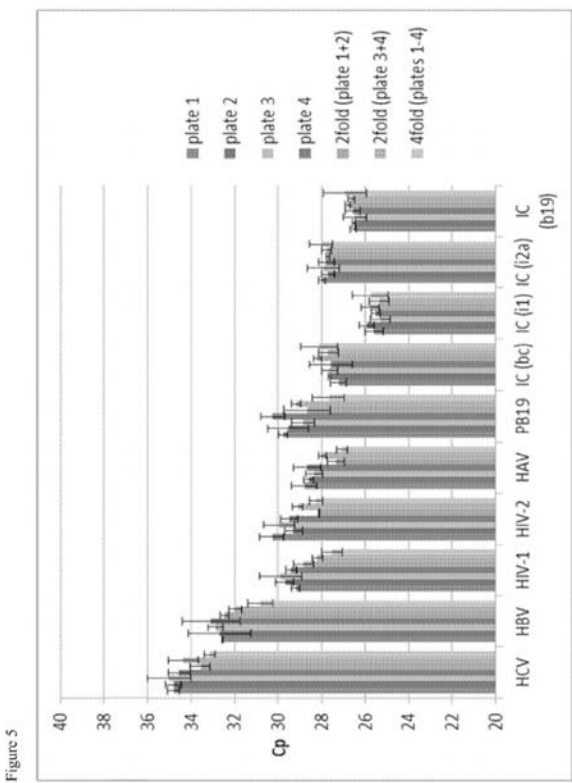
【 図 3 】



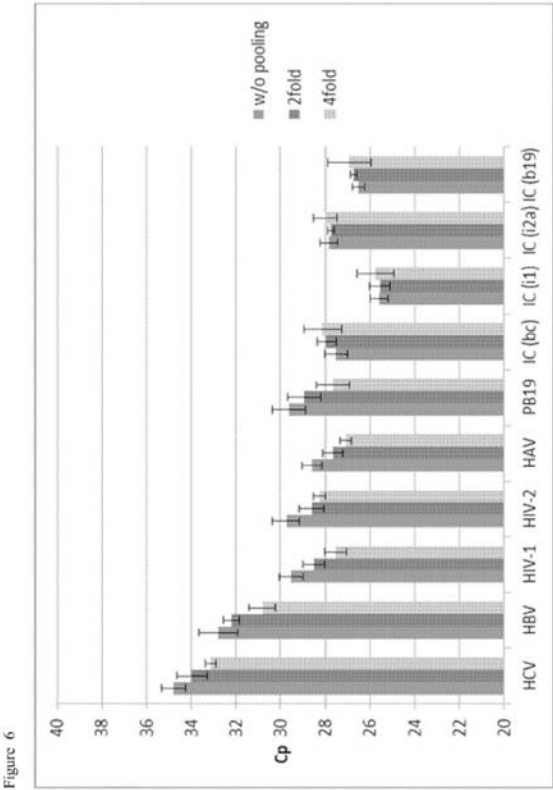
【 図 4 】



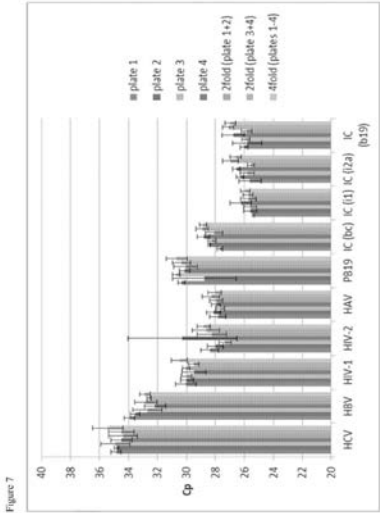
【 図 5 】



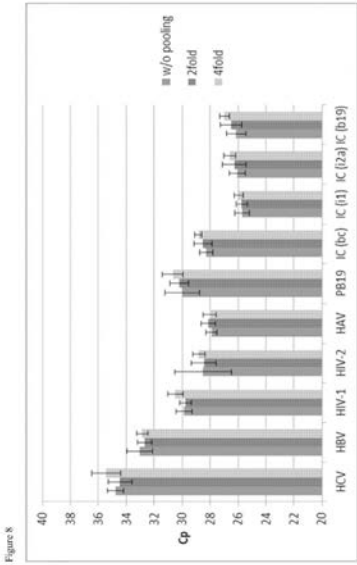
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/068101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N35/00 C12N15/10 C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. K. HOURFAR ET AL: "Evaluation of an automated high-volume extraction method for viral nucleic acids in comparison to a manual procedure with preceding enrichment", VOX SANGUINIS., vol. 89, no. 2, 1 August 2005 (2005-08-01) , pages 71-76, XP055223964, CH ISSN: 0042-9007, DOI: 10.1111/j.1423-0410.2005.00649.x page 72, column 1; example 1 -----	12-15
X	WO 2012/013733 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; EICKHOFF MEIKE [C] 2 February 2012 (2012-02-02) page 8; example 1 ----- -/-	12-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2015

Date of mailing of the international search report

04/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/068101

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PICHL L ET AL: "Magnetic based technology in viral RNA and DNA extraction from plasma minipools", TRANSFUSION, AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, BETHESDA, MD, US, vol. 45, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 1106-1110, XP008103254, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1111/J.1537-2995.2005.04356.X [retrieved on 2005-05-09] the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/068101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012013733 A1	02-02-2012	CA 2802563 A1	02-02-2012
		CN 103025891 A	03-04-2013
		DE 112011102524 T5	11-07-2013
		EP 2598654 A1	05-06-2013
		JP 2013543370 A	05-12-2013
		WO 2012013733 A1	02-02-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 33/569	L
	C 1 2 M 1/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ロート, ヴィリー クルト
ドイツ, 6 5 1 8 5 ヴィーズバーデン, ガイザー - フリードリッヒ - リング 3 3

(72) 発明者 ケルン, ステファニー
ドイツ, 6 4 3 1 9 プフングシュタット, ヒンターガッセ 4

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB01 BB20 CC01 DG10 FA10
4B063 QA01 QA13 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QR72 QR77 QS25 QS36

专利名称(译)	用于池样本的自动处理的方法和设备		
公开(公告)号	JP2017529098A	公开(公告)日	2017-10-05
申请号	JP2017526763	申请日	2015-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	GFE BLOOD MBH		
[标]发明人	ロートヴィークルト ケルンステファニー		
发明人	ロート, ヴィリー クルト ケルン, ステファニー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 C12M1/00		
CPC分类号	C12N15/1013 C12Q1/6806 C12Q1/686 C12Q1/701 C12Q2600/158 C12Q2537/143 C12Q2563/143 C12Q2563/149		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.T G01N33/543.541.A G01N33/569.H G01N33/569.L C12M1/00. A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB01 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/DG10 4B029/FA10 4B063 /QA01 4B063/QA13 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS36		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe 百合子		
优先权	102014111210 2014-08-06 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种自动处理合并样品，特别是血液样品的新颖方法。此外，本发明涉及一种用于执行上述方法及其相关用途的装置。该方法以及相应地该设备可以用于执行核酸扩增方法（NAT），特别是用于测试捐献的血液和血液制品。[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公 表 特 許 公 報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-529098 (P2017-529098A)
		(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード（参考）
C 1 2 Q 1 / 6 8 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 6 8 A	4 B 0 2 9
G O 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 M	4 B 0 6 3
G O 1 N 3 3 / 5 4 3 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 T	
G O 1 N 3 3 / 5 6 9 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 4 3 5 4 1 A	
C 1 2 M 1 / 0 0 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 6 9 H	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2017-526763 (P2017-526763)	(71) 出願人 517038811	
(86) (22) 出願日 平成27年8月5日 (2015. 8. 5)	ゲーエフエー ブルート エムペーハー	
(85) 翻訳文提出日 平成29年2月7日 (2017. 2. 7)	ドイツ, 6 0 4 3 8 フランクフルト ア	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/068101	ム マイン, アルテンハーフェルアレ	
(87) 国際公開番号 W02016/020455	3	
(87) 国際公開日 平成28年2月11日 (2016. 2. 11)	(74) 代理人 100088904	
(31) 優先権主張番号 102014111210. 5	弁理士 庄司 隆	
(32) 優先日 平成26年8月6日 (2014. 8. 6)	(74) 代理人 100124453	
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	弁理士 寛延 由利子	
	(74) 代理人 100135208	
	弁理士 大杉 卓也	
	(74) 代理人 100152319	
	弁理士 曾我 亜紀	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 プールサンプルの自動処理のための方法及び装置		