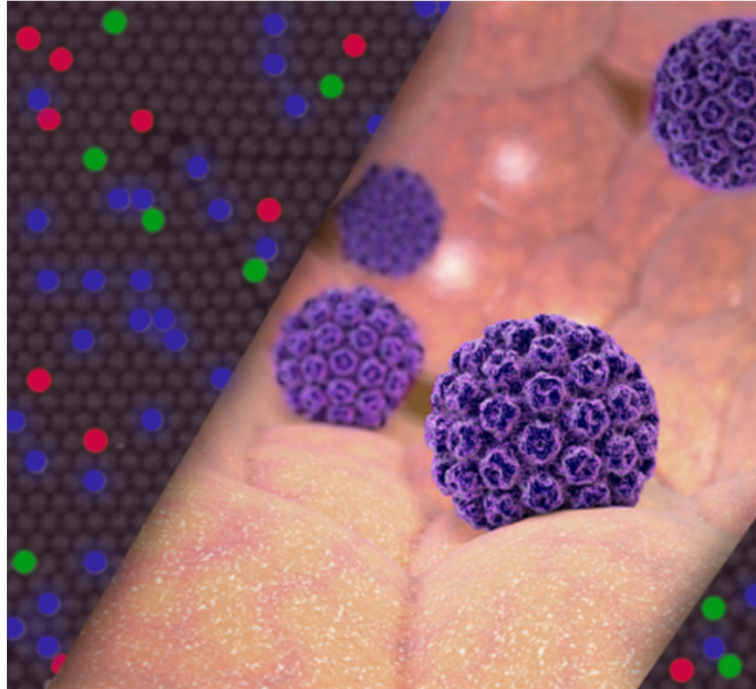




3-color Crystal Digital PCR™ HPV16とHPV18の検出



富士フイルム 和光純薬株式会社

ヒトDNA中のHPV16およびHPV18の高感度で特異的な検出

性感染症であるヒトパピローマウイルス(HPV)は、世界中の癌の5%以上を引き起こしています[1]。数十を超えるHPVサブタイプは、細胞への形質転換に直接関与し子宮頸癌および中咽頭癌率を増加させるため、ハイリスクと見なされています。これらのサブタイプの中でHPV16とHPV18が最も多く、子宮頸がんの約70%と中咽頭がんの90%で検出されます[1]。HPV16および18は、ウイルスシーケンス(発癌性のE6およびE7領域を含む)を細胞ゲノムに組み込むことにより、細胞の不死化と形質転換をおこないます。高リスクHPVタイプと低リスクHPVタイプを区別できる高感度で特異的な技術を使用した早期HPV検出は、前癌病変の治療と子宮頸癌の進行防止に重要です。ここでは、Naica™システムの3カラーCrystal Digital PCR™アッセイ(表1)が、ヒトDNAサンプル内のHPV16、HPV18、および参照遺伝子ALBを確実に検出および定量化する方法を示します(図1)。

表1: HPV16、HPV18、ALB検出用プライマー・プローブ配列

Primers/Probes	5' Reporter	Sequence	3' Quencher
HPV16 E6 Fw	-	TATGCACAGAGCTGCAAAACA	-
HPV16 E6 Rv	-	GCAAAGTCATATACCTCACGTC	-
HPV E6 Probe	Yakima Yellow	TGTGTGTA CTGCAAGCAACAGTTACTG	BHQ-1
HPV18 E7 Fw	-	AACATTTACCA GCCC GACGA	-
HPV18 E7 Rv	-	TCGTCTGCTGAGCTTTCTAC	-
HPV18 E7 Probe	Cy5	AACCACAAGT CACACA	MGB-NFQ
ALB Fw	-	TGAAACATACGTTCCCAAAGATTT	-
ALB Rv	-	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGCATAT	-
ALB Probe	FAM	TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCA	BHQ-1

最適化された3カラーCrystal Digital PCR HPVアッセイを使用して、最終濃度400 copies/μL のヒト野生型ゲノムDNAのみを含む36の複製サンプルを測定しました。偽陽性は検出されなかったため、ブランクの限界は0です。ヒト野生型DNA(最終濃度400 copies/μL)のバックグラウンドでHPV16およびHPV18シーケンスの合成DNAを使用した段階希釈測定を3回繰り返して評価しました。ターゲットであるHPV16およびHPV18シーケンスは、最終濃度が0.2 copies/μL まで、95%の信頼水準で検出され、変異対立遺伝子頻度は0.05%でした(図2)。

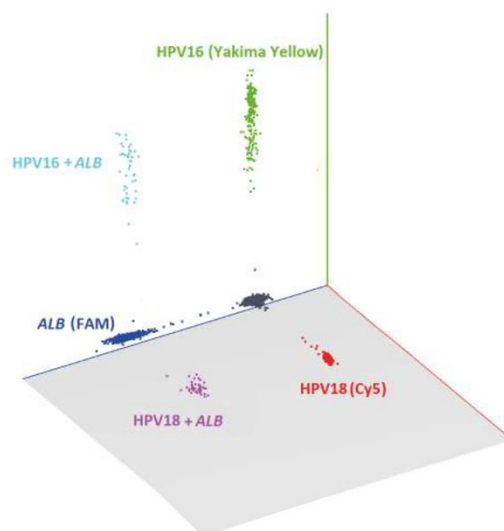


図1: Crystal Minerソフトウェアによって示された3Dドットプロット。HPV16、HPV18、ALB参照遺伝子検出を同時に表示します。蛍光標識試薬は括弧内に示されています。

[1]: T. A. Berman et J. T. Schiller, "Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases", Cancer, vol. 123, no 12, p. 2219-2229, 2017.

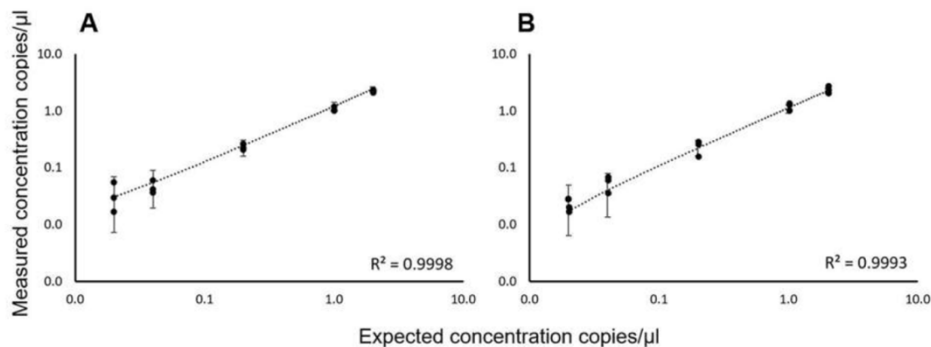


図2: (A) HPV16、および(B) HPV18ターゲットを検出するための3カラー-Crystal Digital PCRアッセイの直線性と感度。20～0.2 copies/μL (25μL 反応あたり500～5コピー)の範囲の希釈系列を400 copies/μL WT DNA (25μL 反応あたり10,000コピー)のバックグラウンドで3回繰り返して測定しました。縦線は実験平均値での理論的な95%信頼区間を表します。合計で0.2 copies/μL のHPV16およびHPV18 (25μL 反応あたり5コピー)が確実に検出されました。

患者サンプル中でのロバストなHPV16およびHPV18検出

中咽頭癌患者とHPV非感染の非小細胞肺癌(NSCLC)患者の各4つのホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍組織から抽出したDNAサンプルを、3カラー-Crystal Digital PCR HPVアッセイを使用して分析しました(表2)。中咽頭癌のFFPEサンプルは、先にリアルタイムPCRを使用して特性が明らかにされています[2]。4つ全てでHPV16およびHPV18陽性サンプルが3カラー-Crystal Digital PCR HPVアッセイを使用して検出され、非HPVサンプルではHPVは陰性でした。

表2: がん患者のFFPE DNAサンプルにおけるHPV16およびHPV18の定量。結果は、サファイアチャンバー(最終濃度)内の1μLあたりのコピー数で表示しています。

Sample	Tumor type	HPV status	ALB copies/μl	HPV16 copies/μl	HPV18 copies/μl
1	Oropharyngeal	HPV16	6.6	186	0
2	Oropharyngeal	HPV16	25.2	0.3	0
3	Oropharyngeal	HPV18	3.5	0	14.6
4	Oropharyngeal	HPV18	52	0	0.2
5	NSCLC	-	24.5	0	0
6	NSCLC	-	219.9	0	0
7	NSCLC	-	239.8	0	0
8	NSCLC	-	326.9	0	0

[2]: Melkane AE, Mirghani H, Aupérin A, Saulnier P, Lacroix L, Vielh P, Casiraghi O, Griscelli F, Temam S. HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinomas: a comparison between three diagnostic approaches. Am J Otolaryngol. 2014 Jan-Feb;35(1):25-32.

FFPE samples were the kind gift of Ludovic Lacroix, Institut Gustave Roussy.

アプリケーションノートハイライト



Naica 3カラーCrystal Digital PCRシステムは、HPV16とHPV18、およびヒト参照遺伝子の同時検出と定量を可能にします。



HPV16とHPV18は確実に検出され、25 μ Lの反応あたり10,000コピーの野生型DNAの存在下で0.05%の変異対立遺伝子頻度で95%の信頼水準をもって定量化されました。一方、偽陽性は検出されませんでした。



連続希釈系列実験では、3カラーHPVアッセイはHPV16とHPV18の予想濃度と測定濃度の間に優れた相関関係を示します。



3カラーCrystal Digital PCRは、中咽頭癌患者のFFPE腫瘍サンプルから抽出したDNAからHPV16およびHPV18の検出に成功しました。



デジタルPCRの詳細については、StillaのデジタルPCRラーニングセンターを参照ください。
www.gene-pi.com

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
TEL: 06-6203-2759 (機器システム部)

東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
TEL: 03-3270-8124 (機器システム部)

- 九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代)
- 中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)
- 東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代)
- 筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)
- 東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代)
- 北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)
- 横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>