

UV:0.022mW/cm<sup>2</sup>

L :光活性化物質

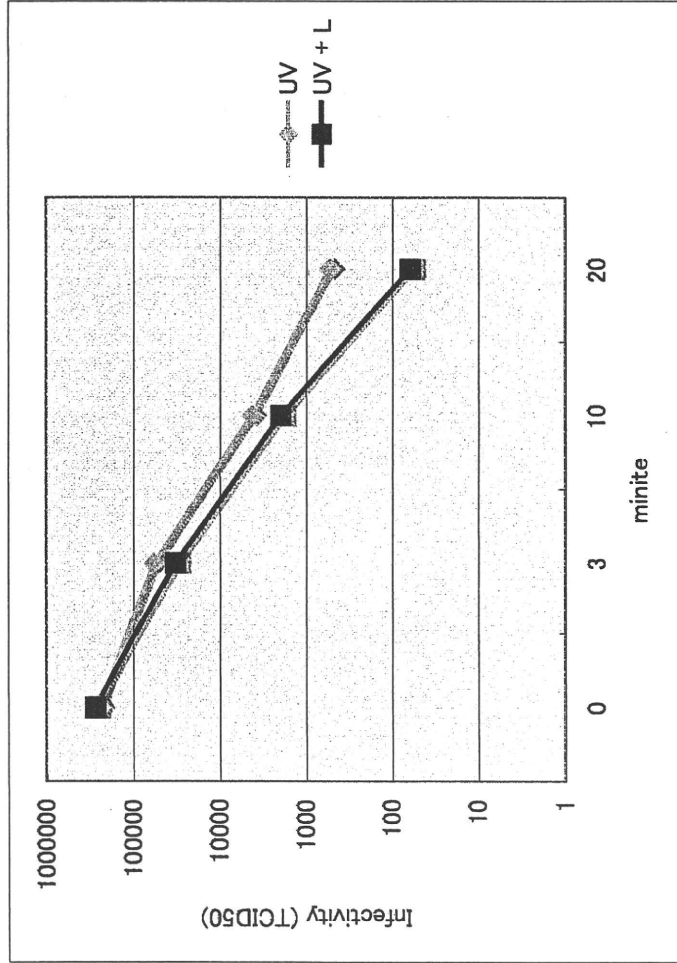
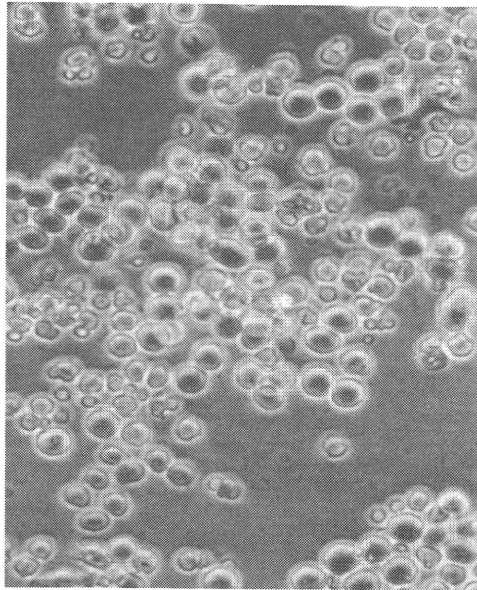
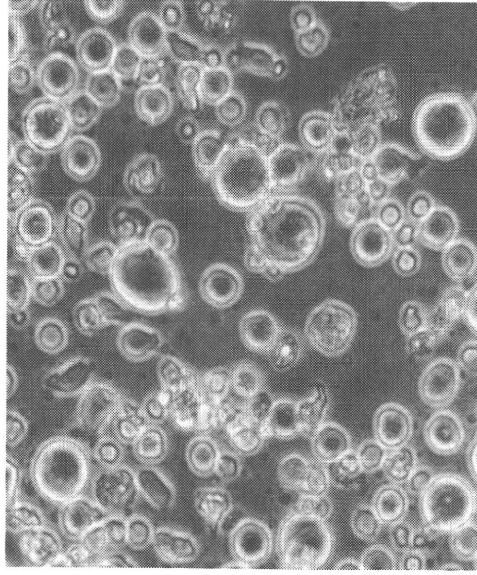


図1.アルブミン製剤の紫外線照射における  
BVDVの不活化



非感染細胞



B19感染細胞

図2 B19感染によって誘導された巨細胞

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)  
分担研究報告書

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の開発と不活化評価法の開発  
分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

## 研究要旨

血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) を不活化させるため本研究を行っている。昨年度に作製した HCV を用いて、1. アルブミン中の 60°C の液状加熱、2. 最終濃度 8% エタノールの添加、3. イムノグロブリン中での長時間保存の各条件での HCV の安定性を調べた。これまで HCV のモデルウイルスとして用いられてきたウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の場合と比較した。その結果、アルブミン中での 60°C 液状加熱では HCV、BVDV 共に加熱後 1 時間で検出限界以下に不活化された。一方、8% エタノール添加後、2 時間、或いはイムノグロブリン中で 6 日間では、HCV、BVDV 共に殆ど不活化されないことが明らかとなった。

### A. 研究目的

本研究は血液製剤の安全性を向上させるため、血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) の、血液製剤中での不活化法の確立と、その不活化の評価法を開発することが目的である。

C 型肝炎の治療法はビバビリンとペグインターフェロンとの併用療法により治療効果 (それでも約 50%) が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型 (1b 型) の HCV では治療効果が未だ上がっていない。しかも HCV に対するワクチンも確立されていない。これまで HCV 感染のモデルはチンパン

ジーのみで、その価格の高さ、扱い難さから研究がなかなか進展しなかった。そのため、HCV に対するワクチン、効果的な治療法が未だ確立されていない。しかし、最近、培養細胞で HCV の増殖をさせることが可能な系が開発された。本研究ではこの系を用いて HCV を増殖させ、増殖した HCV を血液製剤に混ぜ、これまでに検討してきた高圧処理、瞬時の酸性処理などを行い HCV の不活化条件と不活化の評価法を開発する。

本年度は昨年度作製した HCV を用いて、1. アルブミン中の 60°C の液状加熱、2. 8% エタノール添加、3. イムノグロブリン

ン中での長期間保存の各条件での HCV の安定性を調べた。これまで HCV のモデルウイルスとして用いられてきたウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の場合と比較した。

#### 研究方法

ウイルスの不活化試験のとき用いられる方法に従い、体積で 10%のウイルス (HCV 或いは BVDV) と、90%のアルブミン、或いはイムノグロブリンを加え、以下の 3 種類の条件の実験を行った。HCV は昨年度の本研究で、培養細胞から得た JFH-1 クローンを用いた。

##### 1. 60°Cでの液状加熱

アルブミンに HCV 或いは BVDV を加え、60°Cに加熱し、60分までの各時間に一部サンプリングし、各サンプルをマイナス 80°Cで保管した。これらを培養細胞 (HCV は Huh7.5.1 細胞、BVDV は Vero 細胞) に加え、HCV の場合、コア蛋白質の発現、BVDV の場合、細胞障害性を見ることにより、これらウイルスの感染性の経時変化を調べた。

##### 2. 最終濃度 8%エタノール処理

アルブミンに HCV 或いは BVDV を加え、そこに最終濃度 8%となるようにエタノールを加え、4°Cで最長 4 時間までの各時間にサンプリングし、DMEM (10%FBS を含む) 培地で 2 倍に希釈し、マイナス 80°Cで保管した。1.の場合と

同じ方法で HCV 及び、BVDV の感染性の経時変化を調べた。

##### 3. イムノグロブリン中

イムノグロブリンに HCV 或いは BVDV を加え、4°Cで、6 日間の各時間に一部サンプリングし、各サンプルをマイナス 80°Cで保管した。1.の場合と同じ方法で HCV 及び、BVDV の感染性の経時変化を調べた。

感染価の測定は、各サンプルを DMEM (10%FBS を含む) 培地で段階希釈し、培養細胞に感染させた。

HCV の感染価の測定法: 感染 3 日後、HCV の構造蛋白質の一つであるコア蛋白質の発現を、コア蛋白質に対するモノクロナール抗体 (マウス, MA1-080, Thermo Scientific, IL) と蛍光二次抗体 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, OR) を用いて蛍光顕微鏡で検出し、励起波 (495nm) により蛍光 (519nm) する細胞の数をカウントし、また、トリプシン、EDTA 処理により細胞をプレートから剥がし、この時の各 well の全細胞数をカウントすることにより感染価を計算した。或いは、蛍光 (519nm) する細胞が無くなるサンプルの希釈段階から感染価を計算した。

BVDV の感染価の測定法: 感染 3 日後、各サンプルに含まれる BVDV 感染による細胞障害性を観察し、細胞障害性の無くなるサンプルの希釈段階から感染

価を計算した。

(倫理面への配慮)

HCV JFH-1 クローン及び、BVDV は培養細胞でウイルスが増殖する系で、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。

## B. 研究結果

### 1. 60°Cでの液状加熱

加熱後 10 分で HCV の感染価が半分以下になり、60 分では検出限界以下となり、少なくとも 3 Log 感染価が減少した。モデルウイルスである BVDV の場合、加熱後 5 分で感染価が半分以下となり、60 分では検出限界以下となり、少なくとも 5 Log 感染価が減少した。

### 2. 最終濃度 8%エタノール処理

8%エタノール添加後、HCV の場合 4 時間後、BVDV の場合 2 時間後、各ウイルスの感染価は殆ど減少しなかった。

### 3. イムノグロブリン中

HCV 及び BVDV をイムノグロブリン中に 6 日間保存していても殆ど感染価は減少しなかった。

## C. 考察

### 1. 60°Cでの液状加熱

血液製剤の不活化法として 60°Cでの液状加熱が用いられるので、この処理方法を HCV の不活化法として検討した。そ

の結果、HCV は 60°Cの液状加熱で効率よく (60 分の加熱で感染価が少なくとも 3 Log 減少) 不活化されることが明らかとなった。BVDV の場合、60 分の加熱で感染価が少なくとも 5 Log 減少することが明らかとなった。このことは、これまで HCV のモデルウイルスとして用いられてきた BVDV の 60°Cでの液状加熱による不活化は、HCV の 60°Cでの液状加熱による不活化を良く反映していたことが明らかになった。

### 2. 最終濃度 8%エタノール処理

8%エタノールでは HCV、BVDV 共に殆ど不活化されないことが明らかとなった。以前 Chon エタノール分画法によって得られたフィブリノゲンで HCV の感染事故が起こったが、この時のフィブリノゲンは 8%エタノールで分画されたものであったので、今回得られた結果より、感染事故が起こった理由が推察される。

### 3. イムノグロブリン中

イムノグロブリン中では HCV は長期間 (少なくとも 6 日間) 保存しても感染性が殆ど減少しないことが明らかとなった。

Cohn エタノール分画法で、20%エタノール処理により得られたイムノグロブリンでは、これまで感染事故が起こっていないので、今後、20%エタノール処理による HCV の不活化を注意深く調べる予定である。また、フィブリノゲン中での HCV の不活化、安定性を調べる予定であ

る。

#### D. 結論

1. アルブミン中での 60°C液状加熱では HCV、BVDV 共に加熱後 1 時間で検出限界以下に不活化された (HCV は少なくとも 3 Log の感染価の減少、BVDV は少なくとも 5 Log の感染価の減少)。一方、8%エタノール添加後、2 時間、イムノグロブリン中で 6 日間では、HCV、BVDV 共に殆ど不活化されないことが明らかとなった。
2. これまで HCV のモデルウイルスとし

て用いられてきた BVDV は、今回行った不活化において、HCV と似た挙動であることが明らかとなった。

#### G. 研究発表

- (ア) 論文発表 なし
- (イ) 学会発表： 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1 60°C液状加熱

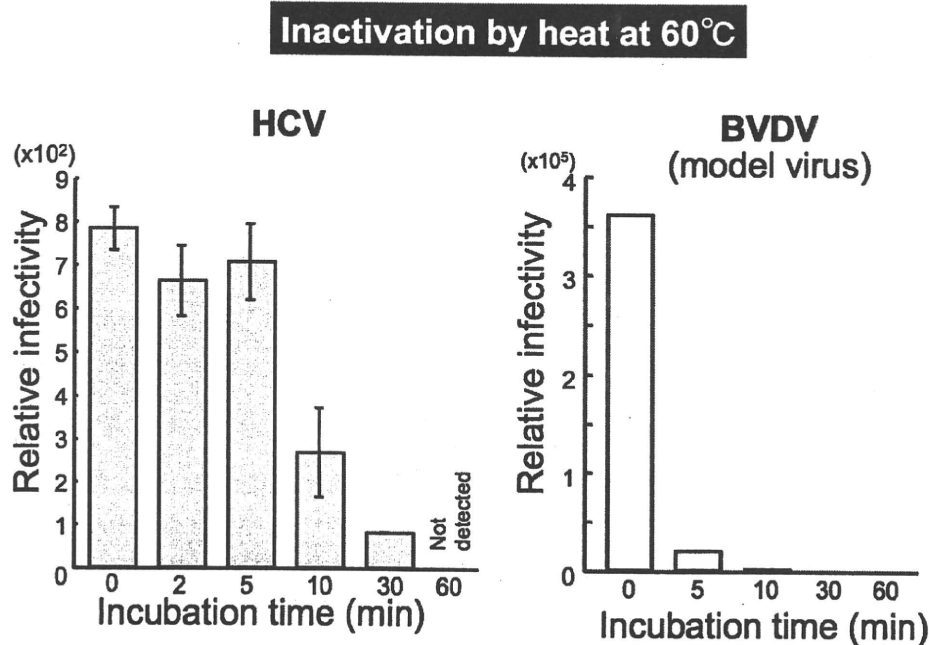


図2 最終濃度 8%エタノール処理

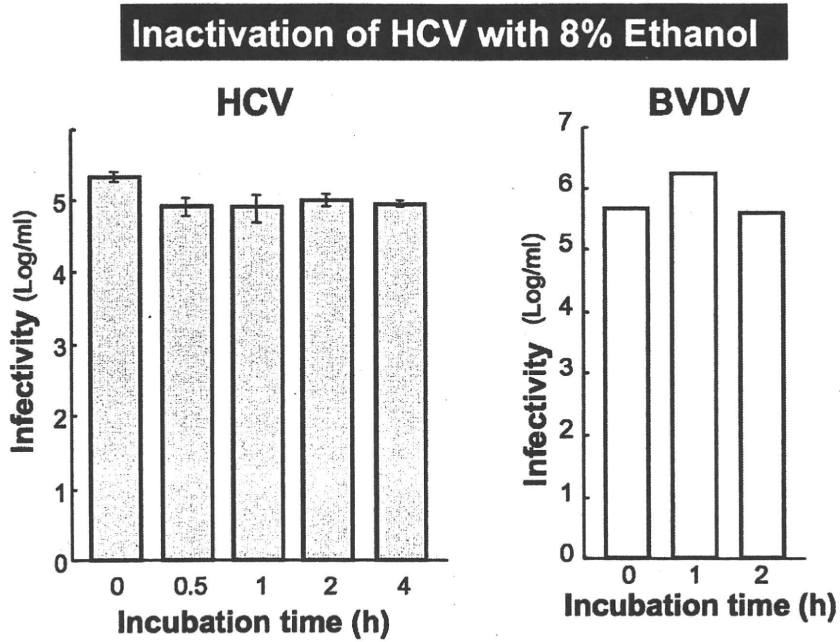
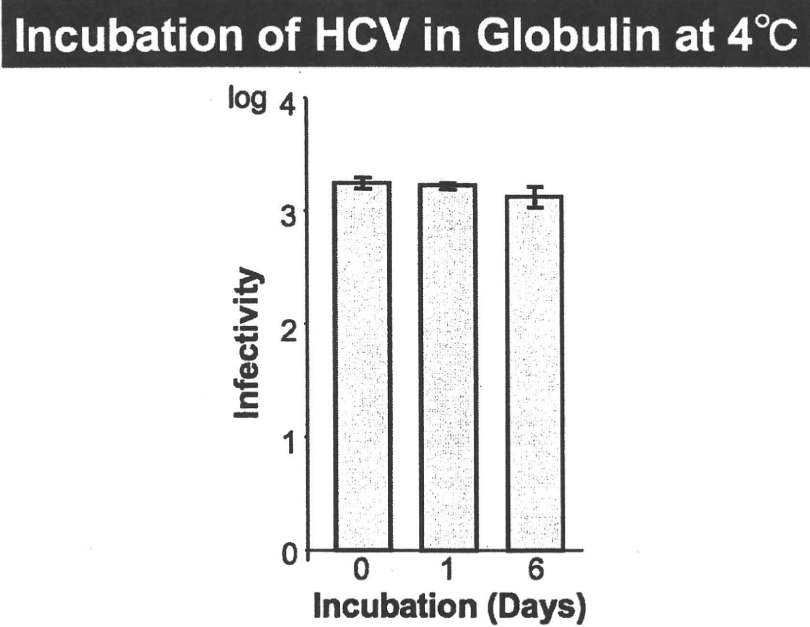


図3 イムノグロブリン中



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）  
研究分担報告書

E 型肝炎ウイルス国内標準品の作製

研究分担者 水澤 左衛子（国立感染症研究所）

研究分担者 岡田 義昭（国立感染症研究所）

研究要旨

従来、E型肝炎は衛生状態の悪い発展途上国においてEHVが経口感染して起こる病気と考えられてきた。しかし、近年、先進国において海外渡航歴のない患者で食物や輸血が原因と疑われる症例が報告され、先進国においても定着していると考えられるようになった。このように、血液スクリーニングや診断におけるHEV-NATの重要性が認識され、2009年にWHOはHEV-RNA国際標準品を作製することを決定した。一方、わが国においては日本赤十字社がE型肝炎の発生率が高い北海道において献血血液のHEV-NATスクリーニングを実施しており、国内標準品の作製が求められていた。今般、ドイツのポールエーリッヒ研究所が組織するHEV-RNA国際標準品作製のための国際共同研究において、日本の国内標準品を同時に作製することになった。両方の標準品候補品を同一のISO17511:2003取得施設で製造した。国際共同研究には世界中の実績のある多数の施設が参加し、日本からも6施設が参加して、候補品の力価を測定した。本共同研究によって国内標準品の正確な表示力価を決定することが可能になる。国際標準品は2011年にECBSで承認を受ける予定であり、ほぼ同時に国際標準品と同等の高品質な国内標準品を制定することが期待できる。

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（HEV）は経口感染で急性肝炎を起こす。患者の大半は約1ヶ月で治癒するが、妊婦や肝臓に基礎疾患がある人が感染すると重症化する場合がある。今まで、E型肝炎は衛生状態の悪い発展途上国においてEHVが感染して起こる病気、先進国での発生は海外渡航先での感染が原因と考えられていた。しかし、近年、先進国において海外渡航歴のない患者で食物や輸血が原因と疑われる症例が報告された。発展途上国のHEVがGenotype 1,2であるのに対し、先進国では人畜共通に感染するGenotype 3,4であることから、食肉を介して感染する急性肝炎としてこれらの地域においても定着していると考えられるようになった。無症候の感染初期に血液中のウイルス量が多いことから、輸血を介した感染も問題となっている。

このように、血液スクリーニングや診断におけるHEV-NATの重要性が認識され、2009年のWHO ECBSにおいてHEV-RNA国際標準品を作製することが決定され、候補品を選定するための試験的共同研究が実施された。一方、わが国においては日本赤十字社がE型肝炎の発生率が高い北海道において献血血液のHEV-NATスクリーニングを実施しており、国内標準品の作製が求められていた。

しかし、一般に、国際標準品が制定されてから国内標準品作製のための国内共同研究を開始すると、国内標準品の制定は更に1年後になることが問題であった。今般、HEV-RNA国際標準品作製の責任者であるBaylis博士（PEI: Paul Ehrlich Institute）の提案によって、国際標準品作製のための国際共同研究において、国際標準品候補品と日本の国内標準品候補品とを同時に評価することになった。PEIとの共同



研究によって日本の国内標準品候補品の力価を決定し、国際標準品と同等の高品質の国内標準品を国際標準品の承認とほぼ同じ時期に制定することを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

1. SoGAT-BV 会議 (2009 年 5 月) と WHO ECBS (2009 年 10 月) に出席し、初代 HEV-RNA 国際標準品作製に関する情報交換を行った。

2. PEI を訪問し、国際標準品と国内標準品の候補品の製造、国際共同研究における日本の参加者の位置づけについて担当者と打合せを行った。

3. 国際共同研究の実施に当たっては、プロトコルは PEI が作製し、試験的共同研究の参加者と感染研のコメントを加味した。国際標準品候補品と国内標準品候補品の製造と共同研究参加施設への配布は PEI が行った。日本の施設の参加登録と検体の配布は感染研が取りまとめた。日本の参加者は海外の参加者と同様に検体を測定し、結果を PEI に報告した。感染研にも結果報告書の写しを提出した。検体の移動は国立感染症研究所病原体等安全管理規定に従った。

### 倫理面への配慮

本研究においては日本赤十字社より承認を受けて譲渡された血漿を用いるために倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

### 1. 国際標準品候補品の原料の選択

当初、ヒト陽性血漿の入手が困難なため、感染ブタの胆汁をヒト陰性血漿で希釈して候補品を製造する計画であった。その後、北海道赤十字血液センターから遺伝子型の異なる高ウイルス濃度の血漿が提供されることになったため、ヒト血漿を原料とすることが可能になった。PEI は試験的共同研究を実施して、ブラインド

化した遺伝子型パネルを実績のある 20 施設が参加して測定した。その結果、ほとんどの測定法が遺伝子型に係わりなく高感度に HEV-RNA を検出できることが明らかになった。

### 2. 標準品候補品の製造

試験的共同研究の結果に基づいて PEI と感染研が協議し、由来の異なる陽性血漿からそれぞれの候補品を製造することにし、日本赤十字社から夫々の原料血漿の譲渡を受けた。PEI が二つの候補品の製造を担当した。原料血漿を陰性血漿で希釈し、ISO17511:2003 取得施設である

Greiner Diagnostic AG 社 (Langenthal, Switzerland) に委託して分注量 0.5 mL の凍結乾燥品を製造した。同社が分注誤差と含湿量を測定した。二つの候補品の製造費用は夫々が負担した。国内候補品の製造本数 2153 本のうち 200 本を国際共同研究用検体として PEI に送付し、残りの 1853 本を 2 日に分けて感染研に常温輸送した。到着後は -80°C のフリーザーに保管した。

### 3. HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本の国内標準品作製のための国際共同研究

HEV-NAT を実施している世界中の施設が参加した。全参加施設が国際標準品候補品 2 本と日本の国内標準品候補品 2 本からなるブラインド化したパネルを 4 セット受取り、プロトコルに従って、日常実施している定性法又は定量法で測定し、結果を PEI に報告した。日本からは感染研、日本赤十字社の 2 施設、血漿分画メーカー 3 社の計 6 施設が参加した。現在、PEI が結果の解析を行っている。2011 年の ECBS において HEV-RNA 初代国際標準品として承認を受ける予定である。

## D. 考察

1. 今回、WHO Collaboration Center の一つである PEI と感染研との協力によって、国際標準品候補品と日本の国内標準品候補品とを国際標準品作製のための国際共同研究において同時に評価する機会を得た。本研究において、PEI

が国際標準品候補品の製造を委託している ISO17511:2003 取得施設において凍結乾燥加工した国内標準品候補品を製造した。また、実績のある世界中の多数の施設で二つの候補品を同時に測定するので、国内 6 施設のみで測定した場合と比較してより正確に力価を決めることができる。共同研究で得られた国内標準品候補品の力価を以って国内標準品の表示力価とする予定である。本共同研究により、高品質で正確な表示力価の国内標準品を国際標準品制定とほぼ同時に制定することが期待できる。

2. 国内標準品候補品の製造を海外の業者に委託したが、海外の業者にとって日本の経理処理は理解しにくい。感染性のあるウイルスを含む候補品の製造を受託する国内施設を確保することが課題である。

3. 今後も WHO Collaboration Center (WHO CC) と共同で国際標準品と国内標準品の力価を測定するためには、日頃から WHO CC と密接な情報交換を行って国際標準品作製の具体的なスケジュールを把握し、それに合わせて国内標準品の製造計画を立てておくことが大切である。

#### E. 結論

HEV-RNA の WHO 国際標準品作製のための国際共同研究において日本の国内標準品の作製を同時に進めている。二つの候補品を同一の ISO17511:2003 取得施設で凍結乾燥加工した。

国際共同研究には日本からも 6 施設が参加し、候補品を測定した。国際共同研究の結果を 2011 年 ECBS に報告し、承認される予定である。国際標準品の制定とほぼ同時に、高品質な国内標準品を制定することが期待できる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### H. 謝辞

国際標準品と国内標準品の候補品の原料として日本赤十字社から輸血用製剤として規格外となった高濃度 HEV 陽性血漿の譲渡をうけた。貴重な血漿を提供していただいた日本赤十字社と北海道赤十字血液センターに感謝いたします。

## 厚生労働科学研究費補助金

(輸血関連研究班)

分担研究報告書

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の開発と不活化評価法の開発

『献血血液血漿に由来する HEV を用いた in vitro 感染培養系の構築』

研究分担者 鈴木 光 日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所

研究協力者 大和田尚 日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所

### 研究要旨

E 型肝炎ウイルス (HEV) について、血液由来製剤に関わるウイルス安全性評価の体制を整備するため、in vitro における HEV の感染培養系を構築することを目的に、本研究を開始した。その結果、以下の知見を得た。

(1) 献血血液由来 HEV 陽性血漿の、培養細胞 (PLC/PRF/5) に対する感染性を認めた。

(2) HEV の感染性は、用いた陽性血漿 (遺伝子 3 型・4 型/IgM 陽性・陰性/IgG 陰性) のすべてにおいて、確認された。

(3) HEV 感染に伴う PLC/PRF/5 の細胞変性効果 (CPE) は、確認されなかった。

(4) HEV 感染成立の指標を、嬢 HEV の産生とすることで、限界希釈法による HEV 感染価定量が可能と考えられた。

### A. 研究目的

E 型肝炎は、発展途上国のみならず先進国においても、近年にわかに注目されるようになった新興・再興感染症の一つである。特に、原因ウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV) が輸血によって伝播する事実が明らかとなり、血液製剤について HEV に関わるウイルス安全性評価の体制を整備することは、今後益々重要になると思われる。安全性の評価に必須である HEV の感染培養系については、これまでに成功例を報じたものは幾つかある。しかし信頼性・再現性あるものは、我が国を含めても極一部からに

限られる。HEV は血中や糞便中からも検出されるが、近年両者の構造や感染機構の相違が、明らかにされつつある。また、これまでに報じられてきた HEV 感染培養系については、ブタやヒトの糞便由来、或いは肝炎発症患者由来血清をオリジナルとしている。我々は、免疫学的作用を受ける以前 (抗体陰性) の献血血漿由来 HEV をオリジナルとする感染培養系を構築し、本系を用いた HEV に関わるウイルス安全性評価の体制を整備することを目的に研究を開始した。

### B. 研究方法

ヒト肝癌由来細胞株 (PLC/PRF/5) を単層培養し、コンフルエント状態で HEV を感染させた。オリジナル HEV として、HEV 陽性血漿 (遺伝子 3 型・4 型 / IgM 陽性・陰性 / IgG 陰性) を使用した。PLC/PRF/5 の培養上清を除去し、約  $10^6$  コピー相当の HEV を一定時間作用させた。作用後 PBS(-) で PLC/PRF/5 を洗浄し、5%CO<sub>2</sub>37°C インキュベーターで培養を開始した。培養には 30mM Mg<sup>2+</sup>/2%FCS 含有培地 (維持培地) を用いた。培養中の一定期間ごとに維持培地を交換し、得られた培地中の HEV について、RNA を逆転写の後リアルタイム PCR を用いて定量し、作用させたウイルス量との関係から、感染成立の有無を調べた。

#### C. 研究結果

HEV 作用約 3 週間経過後より、感染成立の証である嬢 HEV が確認された。培養中は嬢ウイルス産生が継続的に確認され、得られる HEV 量も経時的に増大し、 $10^7 \sim 10^8$  コピー/mL でプラトーとなった。HEV 産生は実験終了時 (210 日) まで継続的に認められた。本実験では、HEV 感染に伴う細胞変性効果 (CPE) は確認されなかった。嬢 HEV 産生までに要する時間に差はあったものの、HEV の遺伝子型や抗体の有無には関係なく、全ての HEV 陽性血漿について、感染性が確認された。

#### D. 考察

培養細胞である PLC/PRF/5 を用いて、献

血血漿由来 HEV を用いた感染培養系が構築できた。HEV の感染培養系についてはこれまで、糞便や患者血清 (IgM 陽性, IgG 陽性) 由来 HEV をオリジナルとしていた。しかし血液製剤の HEV に関わる安全性評価を行う場合、ウイルスの構造や感染機構の違いが示唆されている糞便由来や、免疫学的作用を既に受けている患者血清由来を用いる系と比して、抗体が作用する前の献血血漿由来 HEV をオリジナルとするのが、より効果的・合理的な系と考えられた。本実験では、HEV 感染に伴う CPE は全く確認されなかった。その為 HEV 感染価として、感染の結果得られる嬢ウイルスの存在を指標とすることが最良と考えられた。希釈後の HEV について、感染後に細胞上清に産生される嬢ウイルスが、どの限界希釈倍率まで検出されるかを求め、その倍率から HEV の感染価を求めることが、今後検討可能と思われた。

今回の検討では、遺伝子型や抗体の有無に関係なく、全ての HEV について PLC/PRF/5 に対する感染性を確認することができた。生体内における、抗体の HEV 感染におよぼす影響については、未だ不明点も多いが、少なくとも PLC/PRF/5 を用いた検討では、抗体に感染阻害作用は認められなかった。今後は本系を使って、具体的に感染価を定量する為の検討を進め、安全性を評価できる体制を整備していく。また HEV の感染増殖機構の解明も行っていく。

### E. 結論

献血血液由来 HEV 陽性血漿をオリジナルとする HEV 感染培養系を構築することができた。本系を応用することで、HEV の感染性評価系が構築でき、血液由来製剤に関わる安全性評価ができるものと考えられた。また HEV の詳細な、感染複製機構解明の重要な手がかりになると考えられた。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

学会発表

大和田尚 他

E型肝炎ウイルス (HEV) 感染・培養系の構築について

第59回日本輸血・細胞治療学会総会

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

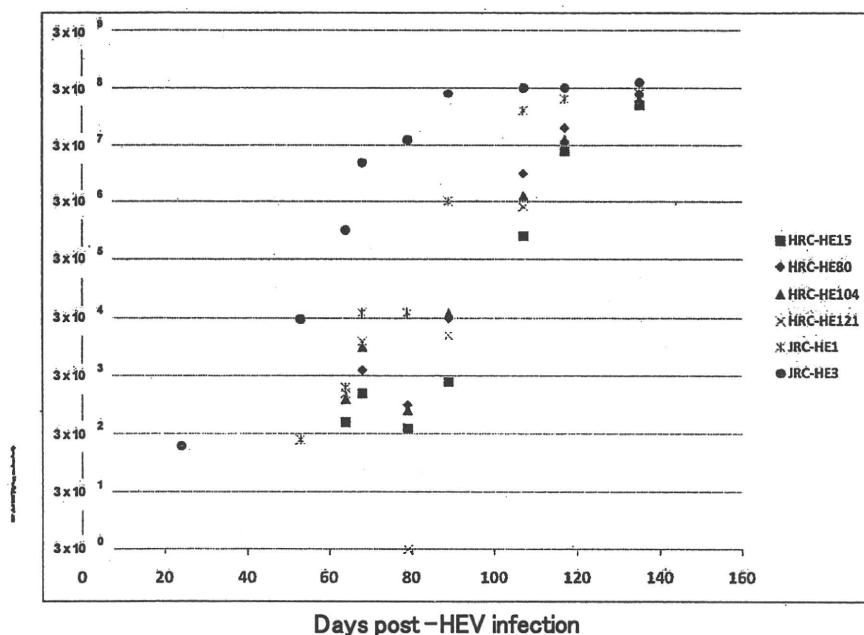


図) HEV産生量(PLC/PRF/5培養上清)の推移

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）  
分担研究報告書

血液製剤の安全性向上のために実施される  
ウイルスの核酸増幅試験の精度管理評価に関する研究

研究分担者：水澤左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官  
協力研究者：山口 照英 独立行政法人医薬品医療機器総合機構  
岡田 義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長  
第二回 NAT コントロールサーベイ打ち合わせ会

### 研究要旨

NAT ガイドラインに基づく NAT の検出感度は、血漿分画製剤製造販売業者等が原料血漿プールで実施する B 型肝炎ウイルス(HBV), C 型肝炎ウイルス(HCV)及びヒト免疫不全ウイルス(HIV)の 3 ウイルスの NAT についてはその目標を 100IU/mL としている(4 課長通知)。一方、輸血用血液のスクリーニング検査の HCV-NAT の検出感度については 5000IU/mL の個別陽性血漿を検出できる試験法で行うこととされ、HBV-NAT と HIV-NAT については HCV-NAT の感度を準用してきた。既に各ウイルスの感度パネルを用いてコントロールサーベイを実施し、各施設が実施している試験の感度が適切に精度管理されていることを確認した。その後、献血血液の NAT スクリーニング検査のミニプールサイズが 50 人から 20 人に変更になり、続いて、新しい検査試薬が導入されるとともに九州血液センターでのスクリーニングが始まった。これらの技術の向上を踏まえて、平成 22 年度第 1 回血液事業部会安全技術調査会において献血血液のスクリーニングで実施している NAT の感度が新たに定められ、個別検体当たり HCV と HBV は 2000 IU/mL, HIV は 4000 IU/mL のウイルスゲノムを検出できる感度の NAT を用いることになった。そこで、本研究においては新しい基準と新しい検査体制の下で実施されている献血血液の NAT スクリーニングの精度管理の実情把握を目的として、HIV-NAT を対象とした第 4 回コントロールサーベイを実施した。また、血漿分画製剤製造所と献血血液の NAT スクリーニング施設で実施している HCV-NAT が HCV ゲノムを遺伝子型に係わらず検出できることの確認を目的として、第 5 回 NAT コントロールサーベイの実施計画を立て、検体パネルを作製中である。

#### A. 研究目的

「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」(平成16年7月、NATガイドライン)及び「血液製剤等に係る

遡及調査ガイドライン」(平成17年3月、遡及調査ガイドライン)が発せられ、当該施設での NAT のバリディションと精度管理が求められるようになった。また、国際標準品に基づいた HCV、HBV 及び HIV の 3 つのウ

イルスの国内標準品が作製され、ウイルスパネルの作製も進んでいることから、性状の明らかな同一の試料を使用したコントロールサーベイの実施が可能になった。薬事・食品衛生審議会血液事業部会の指示に基づいて HBV, HCV 及び HIV 検出のための NAT についてコントロールサーベイの実施が同部会安全技術調査会の山口照英委員に付託され、国立感染症研究所が検体の作製と配布及び結果の解析を担当することになった。

既に各ウイルスの感度パネルを用いて第一回及び第二回のコントロールサーベイを実施し、各施設が実施している試験の感度が適切に精度管理されていることを報告した。平成21年度に HBV 遺伝子型パネルを用いた第三回コントロールサーベイを実施して日本で見られる A-D の4つの遺伝子型の HBV ゲノムを遺伝子型による相違なく検出あるいは定量できていることを確認した。

第二回コントロールサーベイ実施後、献血血液の NAT スクリーニング検査のミニプールサイズが50人から20人に変更になり、続いて、新しい検査試薬が導入されるとともに九州血液センターでのスクリーニングが始まった。これらの技術の向上を踏まえて、次の通り、献血血液のスクリーニングで実施している NAT の感度が新たに定められた。(平成22年度第1回血液事業部会安全技術調査会)。献血血液の個別検体当たり、HCV と HBV は 2000 IU/mL, HIV は 4000 IU/mL のウイルスゲノムを検出できる NAT の感度が求められることになった。これは20人プールあたり HCV と HBV は 100 IU/mL, HIV は 200 IU/mL に相当する。

そこで、本研究においては新しい基準と新しい検査体制の下で実施されている献血血液の NAT スクリーニングの精度管理の実情把握を目的として NAT コントロールサーベ

イを実施した。

## B. 材料と方法

### 1. 第4回 NAT コントロールサーベイ

#### (1) 実施組織

実施要綱(資料1)に示すとおり、調査会の山口照英委員を座長とし、国立感染症研究所が検体の作製と配布及び結果の解析を担当することとした。検体の配布は国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従った。

#### (2) 対象とする施設と検査

献血血液の NAT スクリーニング検査を実施している施設の HIV-NAT を対象とした。

#### (3) 検体

HIV-RNA 国際標準品及び国内標準品を陰性血漿を用いて希釈し、NAT ガイドラインで新たに定めた HIV-NAT の感度に基づいて、200IU/mL とその3倍の濃度の 600IU/mL の検体を調製し、強陽性と陰性血漿を加えた8本からなるブラインド化したパネルを作成した。一回の測定に必要な検体の容量を事前に調査し、各参加施設に分注量 1.1mL のパネル検体3組を送付した。検体の配布は国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従った。

#### (4) 検体の測定

NAT ガイドラインに基づいてバリデートされ現に実施している試験法により日をかえて3回測定した。同じ検体の測定は1回限りとし、原則として再測定及び多重測定は行わないこととした。(資料3)

#### (5) 結果の提出

対象施設は結果報告書(資料2)に陽性/陰性を記載し、検体の受け取り後30日以内に測定結果を国立感染症研究所に提出することとした。

### 2. 第5回 NAT コントロールサーベイ

献血血液のスクリーニング実施施設と血漿分画製剤製造販売業者等において現在実施している HCV-NAT を対象とする。日本で見られる 1b, 2b 及び 2a の主な 3 つの遺伝子型の HCV ゲノムを遺伝子型による相違なく検出できていることを確認することを目的として、HCV 遺伝子型パネルを作製中である。

### 倫理面への配慮

本研究においては国際標準品、国内標準品および日本赤十字社より承認を受けて譲渡された輸血に適さない血漿を用いるために倫理面の問題はない。

## C. 結果

### 1. 第4回 NAT コントロールサーベイ

(1) 献血血液の NAT スクリーニングを実施している 1 機関 4 施設を対象とした。試薬メーカー等 2 施設がオブザーバー参加した。

(2) 4 つの対象施設が夫々 2 種類の測定法 (TaqScreen MPX, TaqScreen HIV : ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて合計 8 組の測定を実施した。TaqScreen MPX は 3 ウイルス同時検出のスクリーニング用試薬、TaqScreen HIV はスクリーニングで陽性となった検体が HIV 陽性であるかを確認するための試薬である。

(3) 既に検体を配布し、期日までに結果が提出されることになっている。

### 2. 第5回 NAT コントロールサーベイ

HCV 遺伝子パネルの原料血漿を選択し、パネルを調製中である。原料血漿は国内の HCV ウィンドウ期血漿を集めて作製した「HCV 用の標準パネル血漿」(厚生労働省「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する

研究」班)の中から、日本で見られる主な遺伝子型である 1b, 2b 及び 2a で高タイトーの HCV 陽性血漿を選択した。

## D. 考察

1. NAT ガイドラインに基づく NAT の検出感度は、血漿分画製剤製造販売業者等が原料血漿プールで実施する 3 ウイルスの NAT についてはその目標を 100IU/mL としている (4 課長通知)。一方、輸血用血液のスクリーニング検査の HCV-NAT の検出感度については 5000IU/mL の個別陽性血漿を検出できる試験法で行うこととされ、HBV-NAT と HIV-NAT については HCV-NAT の感度を準用してきた。その後、① NAT コントロールサーベイを実施して調査した 3 ウイルスについての精度管理の実情、② 諸外国における NAT 検出感度の基準、③ 現在、日本赤十字社が NAT スクリーニングで用いているミニプールサイズ (20 人) と新しい試薬による NAT の感度の確認結果、を踏まえて、献血血液の個別検体当たり、HCV と HBV は 2000 IU/mL, HIV は 4000 IU/mL のウイルスゲノムを検出できる NAT を用いるように感度が定められた。いずれのウイルスについても、この基準は諸外国が定めている基準と比較してより安全性が高くなっており、ことに HBV を定めているのは日本のみである (表 1)。新しい基準を 20 人ミニプールに換算すると HCV と HBV は 100 IU/mL, HIV は 200 IU/mL に相当する。新しい基準と新しい検査体制の下で実施している献血血液の NAT スクリーニングの精度管理の実情把握を目的として、今年度は HIV-NAT を対象としたコントロールサーベイを実施した。HBV-NAT の感度については昨年度の厚生労働科学研究「血液製剤の安全性向上のために実施される肝炎ウイルス等の精度管理評価に関する



研究」によって感度 100 IU/mL が達成されていることを確認している。HCV-NAT については次回実施する第 5 回 NAT コントロールサーベイ(HCV genotype)において、感度の精度管理評価を考慮した検体パネルを作製する計画である。

## E. 結論

1. NAT ガイドラインにおいて献血血液の NAT スクリーニングの感度について、個別検体当たり、HCV と HBV は 2000 IU/mL, HIV は 4000 IU/mL と新たに定められた（平成 22 年度第 1 回血液事業部会安全技術調査会）。新しい基準に対する新しい検査体制における献血血液の NAT スクリーニングの実情把握を目的として、今年度は HIV-NAT を対象とした第 4 回コントロールサーベイを実施した。

2. 血漿分画製剤製造所と献血血液の NAT スクリーニング施設で実施している HCV-NAT を対象に第 5 回 NAT コントロー

ルサーベイの実施計画を立て、検体パネルを作製中である。第 5 回サーベイの目的は①genotype に係わらず HCV ゲノムを検出できていることを確認する②新しい基準と新しい検査体制の下で実施している献血血液の HCV-NAT スクリーニングの感度の精度管理評価、の二つである。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 謝辞

パネル調製に用いる希釈血漿の原料として日本赤十字社から輸血用製剤として規格外の新鮮凍結血漿の譲渡をうけた。本研究報告書は第二回 NAT コントロールサーベイ打合せで確認された実施要綱等に基づいている

## 第二回 NAT コントロールサーベイ打合せ会メンバー

(2007年現在)

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長  
吉澤 浩司 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授  
柚木 久雄 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所  
山口 一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長  
水落 利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長  
岡田 義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長  
水澤左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

財団法人 化学及血清療法研究所

日本製薬株式会社

株式会社 ベネシス 京都工場

日本赤十字社血漿分画センター

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

日本赤十字社血液管理センター

バクスター株式会社

CSL ベーリング株式会社

株式会社 エスアールエル

株式会社 江東微生物研究所

株式会社 苫小牧臨床検査センター

株式会社 ビー・エム・エル

ファルコバイオシステムズ総合研究所

株式会社 保健科学研究所

三菱化学メディエンス株式会社

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

表1 日本及び諸外国における血液製剤のウイルス安全性確保を目的とした NAT試験に求められる検出感度の比較

| 国名   | 血漿分画製剤の原料血漿プール |         |         | 輸血用血液（個別） |         |         |
|------|----------------|---------|---------|-----------|---------|---------|
|      | HCV-RNA        | HIV-RNA | HBV-DNA | HCV-RNA   | HIV-RNA | HBV-DNA |
| 日本   | 100            | 100     | 100     | 5000      | 実施      | 実施      |
| アメリカ | 100            | 100     | NM      | 5000      | 10000   | NM      |
| ドイツ  |                |         |         | 5000      | 10000   | NM      |
| イギリス | 100            | NM      | NM      | 5000      | NM      | NM      |

(国際単位/mL)

NM: 法的に求められていない

平成22年度第1回血液事業部会安全技術調査会 資料2 より引用。

同調査会において、輸血用血液（個別）の NAT の感度を HCV-RNA、HIV-RNA 及び HBV-DNA について各々2000IU/mL,4000IU/mL 及び 2000IU/mL と定めた。

平成 23 年 1 月 28 日改訂(第 2 版)

## 第 4 回 HBV-NAT 等感染症検査に係るコントロールサーベイ実施要綱

## 1. 目的

平成 19 年度に HIV-NAT のコントロールサーベイを実施した。その後、献血血液の NAT スクリーニング検査においては新しい検査試薬を導入するとともに九州血液センターでのスクリーニングが開始されたので、新しい検査体制における HIV-NAT の実情把握を目的とする。

## 2. 対象とする検査

HIV-NAT

## 3. 参加施設

献血血液の NAT スクリーニング検査を実施している施設。試薬メーカーの参加はオプザバーとする。

参加・不参加については参加登録票にて回答する。

## 4. 検体

HIV RNA 国内標準品並びに HIV-1 RNA 国際標準品を希釈した低濃度検体、及び陰性血漿。

## (1) 表 1 のパネルを用いる

表 1. パネルの構成

| 材料              | Subtype | 濃度 (IU/mL) | 本数  |
|-----------------|---------|------------|-----|
| HIV RNA 国内標準品   | B       | 10000      | 1 本 |
| HIV RNA 国内標準品   | B       | 600        | 1 本 |
| HIV RNA 国内標準品   | B       | 200        | 1 本 |
| HIV RNA 国内標準品   | B       | 100        | 1 本 |
| HIV-1 RNA 国際標準品 | B       | 600        | 1 本 |
| HIV-1 RNA 国際標準品 | B       | 200        | 1 本 |
| HIV-1 RNA 国際標準品 | B       | 100        | 1 本 |
| 希釈血漿            | 陰性血漿    | 0          | 1 本 |

合計 8 本

## (2) 分注量： 各 1.1mL 以上

## (3) 配布

国立感染症研究所から参加施設にブラインド化された検体 3 セットを送付する。

一回の測定に必要な検体の容量を事前に調査し、1mL よりも多量の検体が必要な施設には対応する。