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

C型肝炎ウイルスの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。本年度はより詳しく不活化効率を知るため感染価の高いHCVを作製し、1.アルブミン中の60℃液状加熱、2.イムノグロブリン中での長期保存、3.イムノグロブリン中での60℃液状加熱、4.40%エタノール添加、5.撹拌しながらのUV照射により、HCVの不活化を調べた。またこれまで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、1.アルブミン中での60℃ 2時間の液状加熱でHCVは効率よく不活化されることが明らかとなった。2.イムノグロブリン中、4℃では、HCV、BVDV共に非常に安定であることが明らかとなった。しかし、60℃で加熱するとHCVは効率よく不活化されることが明らかとなった。3.HCVは40%エタノール処理1時間で効率よく不活化されることが明らかとなった。4.撹拌しながらのUV照射でHCVは効率よく不活化されることが明らかとなった。5.BVDVは今回行った不活化法においてHCVと似た挙動である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型肝炎の治療法はリ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方法でのHCVの不活化条件と不活化の評価法を開発する。

本年度は、より詳しく不活化効率を知るため感染価の高いHCVを作製し、1.アルブミン中の60℃液状加熱、2.イムノグロブリン中での長期保存、3.イムノグロブリン中での60℃液状加熱、4. 40%エタノール添加、5.撹拌しながらのUV照射により、HCVの不活化を調べた。またこれまで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。

B.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、イムノグロブリンを加え、以下の5種類の条件の実験を行った。HCVは、JFH-1クローンを培養細胞から得、その後、限外濾過カラム（Vivaspin 30k；GEヘルスケア)を用いて濃縮し、感染価の高い（$TCID_{50}$　$3x10^6$/ml）HCVを用いた。

1. 60℃での液状加熱

アルブミンにHCVを加え、60℃に加熱し、10時間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℃で保管した。これらを培養細胞（HCVはHuh7.5.1細胞）に加え、HCVコア蛋白質の発現を見ることによりウイルスの時間経過による感染性の変化を調べた。

2.イムノグロブリン中での安定性

イムノグロブリンにHCV或いはBVDVを加え、4℃で、28日間（HCVの場合）、或いは64日間（BVDVの場合）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℃で保管した。HCVの感染性は1.の場合と同じ方法で、BVDVの感染性はVero細胞での細胞障害性で調べ、それぞれの感染性の経時変化を調べた。

3.イムノグロブリン中での60℃液状加熱

イムノグロブリン、アルブミン、及びPBSにHCVを加え、60℃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℃で保管した。HCVの感染性は1.の場合と同じ方法で、それぞれの時間経過による感染性の変化を調べた。

4.最終濃度40%エタノール処理

アルブミンにHCVを加え、そこに最終濃度8%、或いは40%となるようにエタノールを加え、４℃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）培地でそれぞれ５倍、10倍に希釈し、マイナス８０℃で保管した。1.の場合と同じ方法でHCVの時間経過による感染性の変化を調べた。

5. 撹拌、UV 照射による不活化

アルブミン、或いは新鮮凍結血漿（FFP）に HCV、BVDV をそれぞれ加え、撹拌しながら、或いは撹拌せずに波長 260nm の紫外線（UV）を 1J、或いは 2J 照射し、2. の場合と同じ方法でそれぞれの時間経過による感染性の変化を調べた。

HCV の感染価の測定法：各サンプルを DMEM（10%FBS を含む）培地で段階希釈し、Huh7.5.1 細胞に感染させ、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）する細胞の数を調べ、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、$TCID_{50}$/ml で表した。

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、$TCID_{50}$/ml で表した。

（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。

C. 研究結果

1. 60℃での液状加熱（図１）

加熱後 30 分、1 時間で HCV の感染価がそれぞれ 3.3 Log、4.0 Log 減少し、2 時間後には少なくとも 5.7 Log 減少した。モデルウイルスである BVDV の場合、加熱 1 時間後で検出限界以下となり、少なくとも 5.6 Log 感染価が減少した。

2. イムノグロブリン中での安定性（図２）

HCV 及び BVDV を 4℃で、イムノグロブリン中にそれぞれ 28 日、64 日間保存していても殆ど感染価は減少しなかった。

3. イムノグロブリン中での 60℃液状加熱（図３）

加熱後 30 分で、イムノグロブリン、アルブミン、PBS 中の HCV の感染価は少なくとも 3 Log 減少した。

4. 最終濃度 40%エタノール処理（図４）

40%エタノール添加後 1 時間では HCV の感染価は少なくとも 4.4 Log 減少した。（右図）

5. 撹拌、UV 照射による不活化(図５）

撹拌、1J の UV 照射で、HCV、BVDV の感染価は、アルブミン中、FFP 中共に、それぞれ 3.4 Log, 4.2 Log 減少した。一方、1J の UV 照射のみ（撹拌せず）では、HCV、BVDV の感染価は、アルブミン中では、それぞれ 2.8、2.3 Log、FFP 中では、それぞれ 2.4、2.0 Log 減少した。

考察

1. 60℃での液状加熱

昨年度報告したように、HCV は 60℃の液状加熱で効率よく不活化されること（1 時間で、感染価が少なくとも 3 Log 減少）を明らかにした。今年度はより詳しく HCV の不活化効率を知るため、感染価の高い HCV を作製し、試験を行った。その結果、1 時間の加熱で、感染価が 4.0 Log 減少し、2 時間の加熱で、少なくとも 5.7 Log 減少することが明らかとなった。

2. イムノグロブリン中での安定性

イムノグロブリン中では HCV、BVDV は、それぞれ少なくとも 28、64 日間安定であることが明らかとなった。

3. イムノグロブリン中での 60℃液状加熱

イムノグロブリン中、4℃では、HCV は安定であることが分かったので、60℃に加熱したときを調べた結果、アルブミン中の場合と同程度に HCV は不活化されることが明らかとなった。

4. 最終濃度 40%エタノール処理

昨年度、8%エタノールでは HCV、BVDV 共に殆ど不活化されないことを明らかにした (図 4 の左のグラフ参照)。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、この結果より、感染事故が起こった理由が推察される。そこで、今年度はより高濃度（40%）のエタノール処理での HCV の不活化を検討した。その結果、HCV は 40%エタノール中、1 時間で少なくとも感染価が 4.4 Log 減少することが明らかとなった。

5. 撹拌、UV 照射による不活化

HCV、BVDV はアルブミン、及び FFP 中、撹拌しながらの 1J UV 照射で、感染価が、それぞれ少なくとも 3.4 Log、4.2 Log 減少することが明らかとなった。また、撹拌せず 1J の UV 照射のみでは、HCV、BVDV 共に感染価の減少は FFP の方がアルブミンの場合より少なかったことより、HCV、BVDV 共に FFP 中の方が、あるアルブミン中よりも安定であると考えられる。

（ウ） 結論

1. アルブミン中での 60℃ 2 時間の液状加熱で HCV の感染価は少なくとも 5.7 Log 減少し、この方法で HCV は効率よく不活化されることが明らかとなった。

2. イムノグロブリン中、4℃では、HCV、BVDV 共に非常に安定であることが明らかとなった。しかし、60℃で加熱すると HCV は効率よく不活化されることが明らかとなった。

3. 8%エタノール処理では HCV は殆ど不活化されない（BVDV も同様、昨年度の報告参照）が、40%エタノール処理 1 時間で効率よく不活化（感染価が少なくと

も4.4 Log 減少) できることが明らかとなった。

4. 撹拌しながらの UV (260nm, 1J) 照射で、HCV は効率よく不活化されることが明らかとなった。

5. 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： International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS) 2011 年 9 月北海道

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

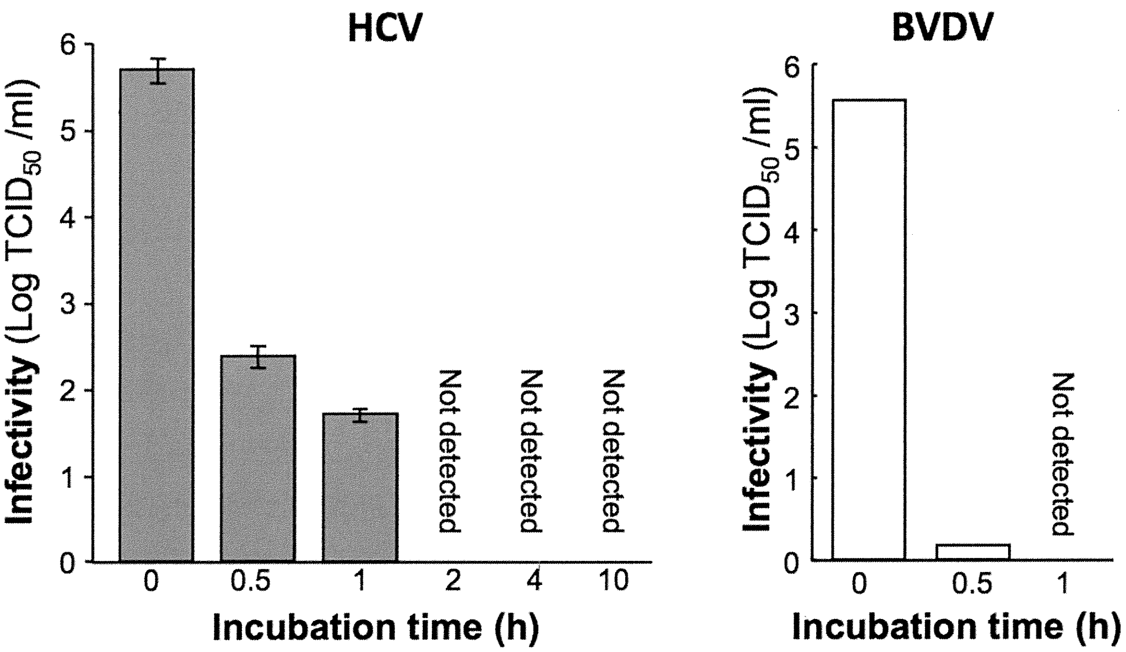

図1. 60℃液状加熱

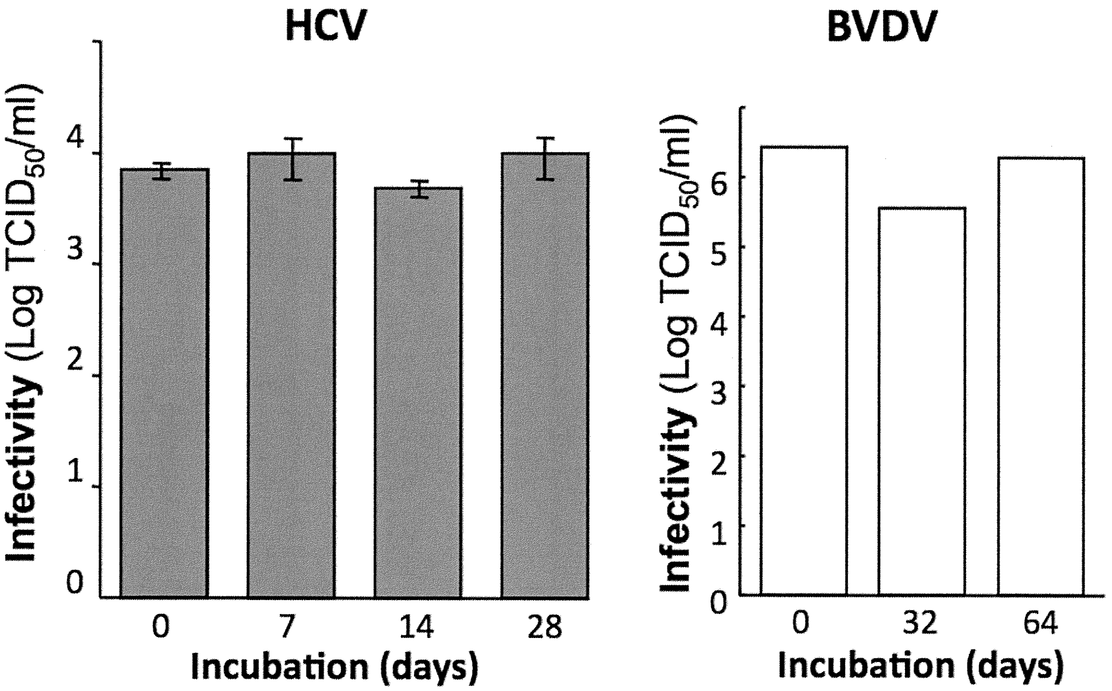

図2. イムノグロブリン中でのHCVの安定性

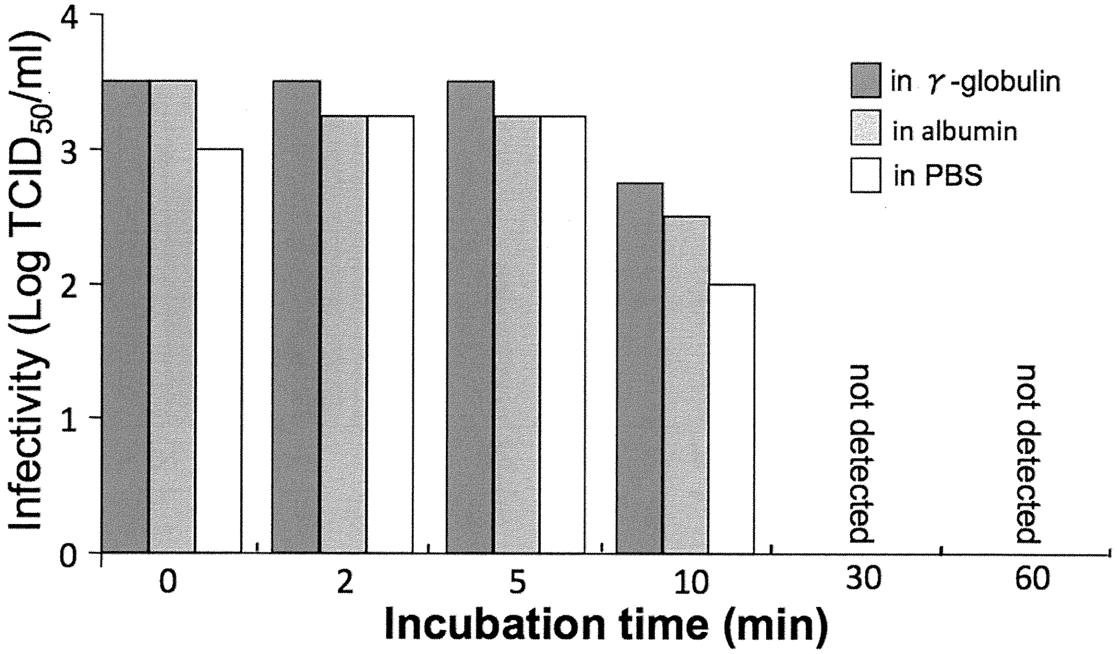

図3. イムノグロブリン中での60℃液状加熱

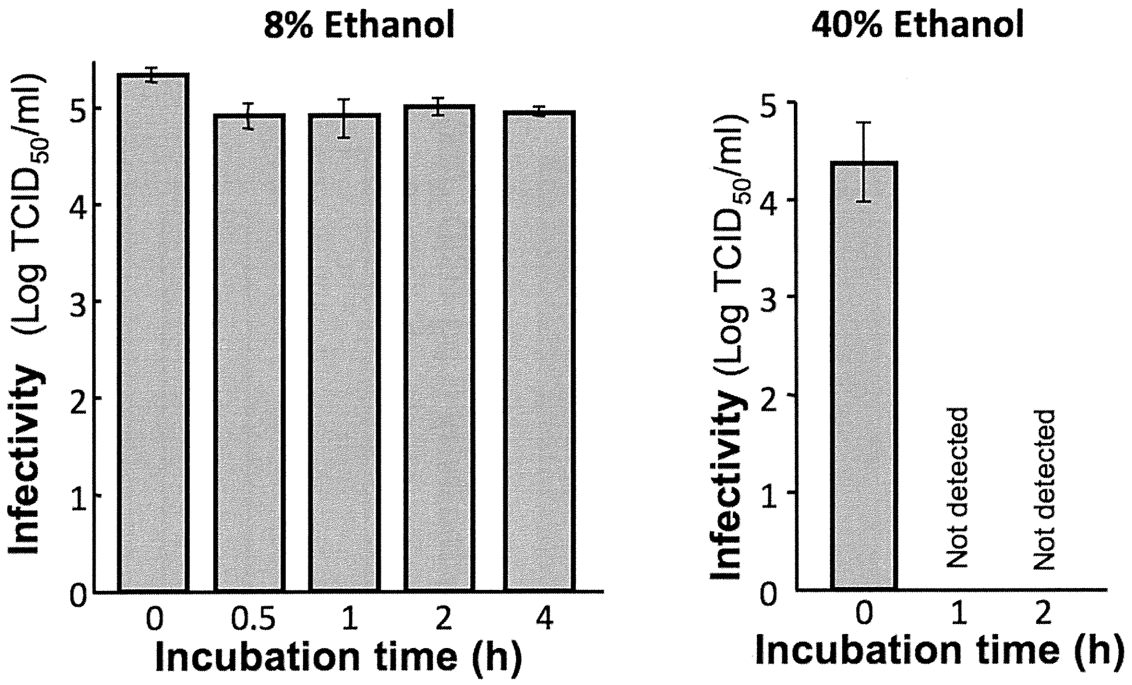

図4. エタノールによるHCVの不活化

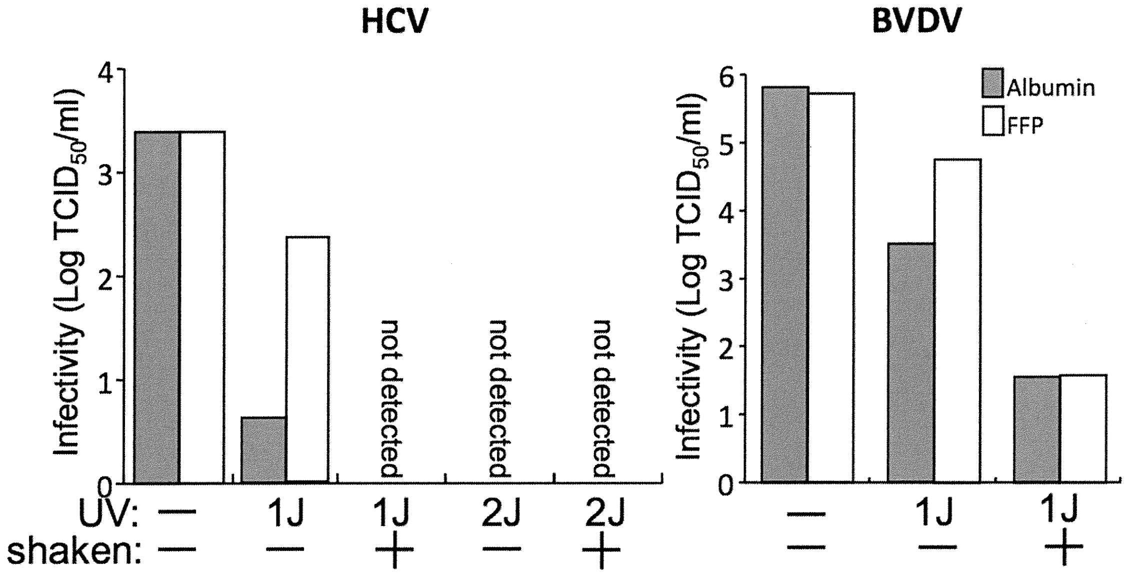

図5. 撹拌、UV照射によるHCVの不活化

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 HEV 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、HEV-RNA 国際標準品作製のための国際共同研究において、ドイツのポールエーリッヒ研究所と日本の国立感染症研究所とが共同で国際標準品と日本国内標準品を同時に作製することになった。昨年度は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。今年度は測定結果を解析し、国際標準品候補品の力価を 250,000IU/mL と決定し、国際標準品に適していることを示した。2011 年 ECBS に報告書を提出し、HEV-RNA 初代国際標準品（code 6329/10）が制定された。また、本共同研究によって国内標準品候補品の力価が 250,000IU/mL、品質が国際標準品と同等であることが示された。

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で、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。（2010 年 6 月）

３．WHO 国際標準品候補品と日本国内標準品候補品は夫々、日本国内献血血液由来の陽性血漿 HRC HE 104 genotype 3a と JRC HE3 genotype 3b を濃度約 10^5～$10^{5.5}$ copies/ml に希釈、ISO17511:2003 取得施設である Greiner Diagnostic AG 社（スイス）に委託して 0.5ml ずつ分注、凍結乾燥した。同社が分注誤差を PEI が含湿量を測定した。

４．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（資料１）。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（資料２）。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。検体の国内移動は国立感染症研究所病源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

既に PEI が実施した試験的共同研究の結果、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。そこで、二つの候補品を日本国内献血血液由来の別々の陽性血漿から製造することとし、国際標準品候補品は陽性血漿 HRC HE 104 genotype 3a を原料とし、国内標準品候補品は陽性血漿 JRC HE3 genotype 3b を原料とした。

２．標準品候補品の製造

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0.5mLの凍結乾燥品を製造した。製造費用は夫々が負担した。分注のCV%は国際標準品が1.1、国内標準品候補品が1.0、両方の含湿度は0.73％だった。国際標準品候補品3900本を製造した。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。（Table 1）

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各国の施設が参加し、国際標準品候補品 2 本と日本国内標準品候補品 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た。参加 24 施設のうち 23 施設が結果を PEI に報告した。日本からは感染研、北海道赤十字血液センター、日本赤十字社中央血液研究所、一般財団法人化学及血清療法研究所、株式会社ベネシスおよび日本製薬株式会社の合計 6 施設が参加した。定

性法 20 セット、定量法 14 セットの測定結果が返送され、PEI が結果を解析した。全てが自家法で大多数が Real-time PCR 法であった。試験法毎にプラズミド、合成オリゴ、*in vitro* 転写 RNA 等、HEV 配列を含む様々な核酸を使用して copies/mL を求めていた。定量法により測定した推定力価は、国際標準品候補品が 5.60 $\log_{10}$ copies/mL、国内標準品候補品が 5.60 $\log_{10}$ copies/mL であった。定性法により測定した推定力価は、国際標準品候補品が 5.26 $\log_{10}$ NAT detectable units/mL、国内標準品候補品が 5.29 $\log_{10}$ NAT detectable units/mL であった。定量法と定性法の両方の測定結果に基づいて決定した国際標準品候補品の力価は 250,000 IU/mL (5.39 $\log_{10}$ IU/mL)であった。二つの候補品の測定値の差は無視しうる程度に小さいことから、国内標準品候補品の力価を 250,000 IU/mL (5.39 $\log_{10}$ IU/mL)とした。（Table 2） 国際標準品候補品は 2011 年の ECBS において初代 HEV-RNA 国際標準品（code 6329/10）として承認された。一方、国内標準品候補品は薬事・食品審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会において HEV-RNA 国内標準品（第一世代）として承認された後に、感染研によって交付される予定である。

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、HEV-RNA 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したことによって、国内施設のみで測定した場合より正確に力価を決めることができた。本共同研究により、国際標準品と同等の品質と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可能になった。

２．国内標準品候補品の製造を海外の業者に委託したが、日本の会計年度に合わせて海外の業者との経理手続きをいつも処理できるとは限らない。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た。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。本共同研究の結果を 2011 年 ECBS に報告し、力価 250,000IU/mL の HEV-RNA 初代国際標準品（code 6329/10）が制定され、PEI によって交付されることになった。一方、国内標準品候補品は薬事・食品審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会において力価 250,000IU/mL の HEV-RNA 国内標準品（第一世代）として承認を受けた後、感染研によって交付される予定である。

F. 研究発表

１．論文発表

Sally A. Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, Kay-Martin O. Hanschmann: Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays. WHO/BS/2011.2175
EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION Geneva, 17-21 October 2011

2. 学会発表

Sally Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, C. Micha Nubling, Kay-Martin Hanshmann: Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, September 2011.

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 PEI と国立感染症研究所が夫々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。

定量法により測定した推定力価　(log_{10} copies/ml)

Candidate	N	Mean	Sd	Lowercl	Uppercl	Median	Min	Max	cv_geo
WHO	248	5.60	0.30	5.18	6.02	5.46	4.36	6.85	99%
NIID	249	5.60	0.20	5.31	5.89	5.48	4.49	6.77	76%

定性法により測定した推定力価 (log_{10} NAT detectable unit/ml)

Candidate	N	Mean	Sd	Lowercl	Uppercl	Median	Min	Max	cv_geo
WHO	39	5.26	0.56	5.08	5.44	5.32	4.00	6.37	163%
NIID	40	5.29	0.71	5.07	5.52	5.30	3.72	7.42	202%

WHO/BS2011.2175

Table 1.　国際標準品候補品と国内標準品候補品の推定力価（全体の平均）

	WHO International Standatd	Japanese National Standard
Assigned Unitage	250,000 IU/ml (5.4 $\log_{10}$IU/ml)	250,000 IU/ml (5.4 $\log_{10}$IU/ml)
Origin	Human plasma JRC-HE104	Human plasma JRC-HE3
Genotype & Accession No.	Genotype 3a AB630970	Genotype 3b AB630971
Filling	0.5 ml/vial, CV 1.1% Lyophilized Residual moisture 0.73% 4251 vials filled	0.5 ml/vial, CV 1.0% Lyophilized Residual moisture 0.73% 2115 vials filled
Storage	3900vials -20C	1953 vials -80C
	1st·World·Health·Organization·International·Standard· for·Hepatitis·E·Virus·RNA·Nucleic·Acid·Amplification· Techniques·(NAT)-Based·Assays¶ ¶ PEI·code·6329/10¶	The 1st National Standard for HEV-RNA NOT FOR ADMINISTRATION TO HUMANS INFECTIOUS MATERIAL NIID, Japan

Table 2. Summary for WHO-IS & Japanese-NS

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO International Standard for Hepatitis E Virus RNA for NAT-Based Assays

Background

Currently there is no standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for the detection of HEV RNA. A proposal drafted by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI) to develop an IS for HEV RNA for use in nucleic acid amplification (NAT)-based assays was endorsed by the World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) at their meeting in Geneva in October 2009 (WHO/BS/09.2126). An initial study of laboratory performance organised by the PEI highlighted the lack of standardization with wide differences observed in assay sensitivities. The practical part of the initial study was completed in January 2010 and a report was drafted and distributed to participants for comment. The report, incorporating the comments of the participants, was sent to the WHO in April 2010 and the progress has been noted by the chair of the ECBS sub-committee dealing with blood products and *in vitro* diagnostics.

In this second stage of the study, selected strains have now been lyophilised for further evaluation. The study will a evaluate candidate WHO International Standard for HEV RNA. The study will also evaluate a candidate National Standard in collaboration with the National Institute for Infectious Disease in Japan.

Objective

In the present collaborative study the potency of the candidate standard preparations will be determined using a range of NAT-based assays for HEV RNA with the aim of assigning an internationally agreed unitage.

Materials

The study materials comprise lyophilised HEV positive plasma samples. Participants will be sent four vials of each reagent coded Sample 1 (labelled HEV S1), Sample 2(labelled HEV S2), Sample 3 (labelled HEV S3), and Sample 4 (labelled HEV S4). Participants will receive differing numbers of vials, depending upon the extraction volume which has

been communicated to PEI prior to the start of the study. Each sample contains in the order of 5.5 $\log_{10}$ copies/ml of HEV RNA.
These materials should be stored at or below -20°C upon receipt and kept frozen until use.

Participants are requested to perform testing (and as appropriate, dilutions) of these reagents in four independent assay runs (see below). A fresh vial of each reagent should be used in each assay run.

On the day of each test run, the lyophilised samples **should be reconstituted in 0.5 ml of deionised, nuclease-free, molecular biology grade water and left for a minimum of 20 minutes with occasional agitation before use.**

Storage of Materials
The collaborative study materials should be stored frozen at or below -20 °C until use.

Caution
These preparations contain material of human origin and potentially infectious HEV. These preparations should be regarded as potentially hazardous to health. They should be used and discarded according to your own laboratory safety procedures.

These materials are not for *in vitro* diagnostic use, they are for evaluation purposes only and should not be used to determine the validity of assays for HEV RNA.

Study protocol
Participants are requested to perform testing of the samples using their routine assay for HEV RNA.

For qualitative assays:

1st Assay

Participants should assay ten-fold dilutions of each preparation in order to determine the HEV RNA end-point. The dilutions should be prepared in the normal diluent used in the laboratory (ideally this will represent the matrix of the normal test specimens).

We suggest using the neat material and seven ten-fold (neat to 10^{-6}) to determine the end points of the preparations. If, in the second assay, all dilutions are positive, or all negative, then the dilution series should be adjusted accordingly for subsequent assays.

Replicate extractions and replicate amplification/detection steps may be performed; however analysis of any replicates should be indicated in the accompanying results forms. The results should be reported in a qualitative way as either positive i.e. HEV RNA detected or negative on the attached reporting sheets. A separate sheet is attached to record the methods used by each laboratory (additional sheets may be used as necessary).

In the three remaining assays, samples should be treated as follows:
Participants are requested to assay a minimum of two half $\log_{10}$ dilutions either side of the pre-determined end-point. It is therefore not necessary to carry out more than five half $\log_{10}$ dilutions (centred around the estimated end-point) unless individual labs wish to do so.

Where real-time PCR assays are used, we ask that C_T values be recorded as well. Please use additional reporting forms as required.

For quantitative assays:
Where participants have access to quantitative HEV RNA assays, we suggest testing dilutions that are expected to fall within the linear range of the assay. The material may be tested without dilution, but this is dependent upon the linear range of the assay and the sample volume required for the assay. It is preferable if at least two further 10-fold dilutions are performed. Once again, replicate extractions and replicate amplification/detection steps may be performed; however analysis of any replicates

should be indicated in the accompanying results forms. Results should be reported in copies/ml.

For the real-time methods please record the C_T values as well as the concentration of HEV RNA in copies/ml.

For the quantitative assays, the panel of four samples should be tested in four separate assay runs.

Results

Results of each assay should be recorded on the appropriate Data reporting Sheet form included with this information sheet. Methods used should also be reported on the Methods reporting Sheet and copies of raw data should be provided.

Data should be returned by Friday the 21st of January 2011.

Please return the data reporting sheets electronically as Word documents. All completed forms should be sent to:

Dr Sally A. Baylis
Paul-Ehrlich-Institut
Federal Institute for Vaccines and Biomedicines
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen
Germany

Electronically to baysa@pei.de

Or by Fax: +49 6103 77 1285

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Method Reporting Sheet

Laboratory: Date:

Operator: Analyst:

Contact person's email address:

Short description of in-house NAT / Test Kit

Extraction platform:

Amplification/detection system:

Assay reference (if available):

Region of genome amplified:

Primer sequences:

Probe sequence(s):

Qualitative ☐ Quantitative ☐

Plasma volume used for RNA extraction:

Elution volume of RNA:

Volume of eluted RNA used for amplification:

(Please use additional sheets as necessary)

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 1 (Qualitative)

Name of Participant:	
Date of Assay:	

Assay Run 1

Qualitative Test

Estimation of Putative End-Point

Material / Dilution	Neat	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sample 1								
Sample 2								
Sample 3								
Sample 4								

Please record C_T values as well as "pos or neg" for real-time methods

Please record "-" instead of C_T values in case of negative results

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 2 (Qualitative)

Name of Participant:

Assay 2	Date of Assay:	Results (pos or neg)					
	Dilution (10^{-x})						
	Sample 1						
	Dilution (10^{-x})						
	Sample 2						
	Dilution (10^{-x})						
	Sample 3						
	Dilution (10^{-x})						
	Sample 4						

Please record C_T values as well as "pos or neg" for real-time methods

Please record "-" instead of C_T values in case of negative results

Please attach copy of raw data