

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 3 (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

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 4 (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

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 1 (Quantitative)

Name of Participant:

Assay 1	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	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 the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 2 (Quantitative)

Name of Participant:

Assay 2	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	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 the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 3 (Quantitative)

Name of Participant:

Assay 3	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	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 the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 4 (Quantitative)

Name of Participant:

Assay 4	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	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 the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

予備登録書（和文）

機関／施設:

担当者名:

住所:

Tel:

Fax

E-Mail:

参加する 参加しない (どちらかにチェックしてください)

**WHO Collaborative Study to Establish the 1st WHO International Standard and
the 1st Japanese National Standard for HEV RNA NAT Assays**

Preliminary Entry Sheet

Laboratory: Name of Investigator: Address: Tel: Fax: E-Mail:

Short description of in-house NAT / Test Kit :

Qualitative

Quantitative

Amplified region:

Volume of plasma used for nucleic acid extraction:

Elution volume of extracted nucleic acid:

Volume of extracted nucleic acid used for amplification:

Diluent used in the study:

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

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、血液由来製剤に係るウイルス不活化率・低減化率等に代表される「安全性評価系」を構築するため、その基盤技術となる、「in vitro における HEV の感染培養系」を、確立することを目的に本研究を開始した。その結果 2011 年度までに以下の知見を得た。

(1) 献血/患者血液由来 HEV 陽性血漿/血清の、ヒト培養細胞(肝癌細胞株 PLC/PRF/5、肺癌細胞株 A549) に対する感染性を認めた。

(2) HEV の感染性は、HEV JRC-HE3 株 (献血血液血漿由来)、HEV UA-1 株 (患者血液血清由来) の二株で確認された。

(3) HEV 感染に伴う培養細胞の変性効果 (CPE) は、確認されなかった。

(4) HEV 感染成立の指標を、培養細胞の上清に得られる「嬢 HEV」とすることで、限界希釈法による HEV 「感染価」定量が可能となった。

(5) 嬢 HEV について、ウイルス粒子を電子顕微鏡的に観察することで、文献的に示されている直径 30nm 前後の小型球形粒子を確認した。免疫学的手法によって、これらが HEV 粒子であることが示された。

(6) 4 回の継代とその後の長期培養によって得られた嬢ウイルスの RNA 配列を、培養前の HEV とで比較したが、変異は殆ど確認されなかった。

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。これまで、その原因となる E 型肝炎ウイルス (HEV) は、発展途上国においては主に水によって、一方先進国では豚や猪、鹿など

の食肉による、共に経口感染が主な原因であると考えられてきた。しかし昨今、原因ウイルスである HEV が輸血によっても伝播する事実が明らかとなり、また HEV の抗体陽性率が、欧州の一部地域やアメリカ、中国などでは、日本よりも遥かにハイリスクである 15~20%にも達する事実が明らかに

なるなど、血液由来製剤による HEV 感染を懸念する気運は今や、ワールドワイドである。従って、血液由来製剤について HEV に係るウイルス安全性評価の体制を整備することは、極めて重要である。安全性評価に必須である基盤技術即ち、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・再現性のある系は、我が国からの報告を含めても極一部に限られる。また HEV は、感染者の血中や糞便中から検出されるが、近年両者の構造や感染機構の相違が、徐々に明らかにされつつある。我々は、献血血漿由来・患者血清由来 HEV をオリジナルとする感染培養系を構築し、これを基盤技術として HEV に係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

ヒト培養細胞として、肝癌細胞株 (PLC/PRF/5) 肺癌細胞株 (A549) を単層培養し、コンフルエント/セミコンフルエント状態で HEV を感染させた。HEV サンプルとして、14 種類の HEV 陽性血漿あるいは陽性血清 (遺伝子 3 型・4 型/IgM 陽性・陰性/IgG 陽性・陰性) を使用した。細胞株の培養上清除去後、希釈済み HEV サンプル 2.5ml を作用させ、37°C5%インキュベーター中で 2 時間感染させた。感染後 HEV サンプルを除去し、30mM Mg²⁺/2%FCS 含有培地 (維持培地) を用いて長期培養を行った。培養 1 週間毎に全ての維持培地を交換し、

得られた維持培地中の HEV (嬢 HEV) について、HEV RNA を逆転写してリアルタイム PCR で定量し、HEV の感染成立を確認した。

C. 研究結果

(1) HEV JRC-HE3 株、UA-1 株を用いた感染培養系の確立

両株とも、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た。UA-1 株では 10³~10⁴ コピー/mL で、JRC-HE3 では 10⁷~10⁸ コピー/mL で、それぞれプラトーとなった。HEV 産生は実験終了時 (112 日) まで継続的に認められた。

(2) 細胞変性効果 (CPE)

両ウイルス株とも、HEV 感染に伴う細胞変性効果 (CPE) は確認されなかった。そのため、感染性の指標や感染価定量については、嬢 HEV の産生を HEV 感染の指標とした。

(3) HEV の継代

JRC-HE3 株について、4 回の継代を実施し、さらに長期に渡って培養し続けて得られた嬢 HEV について、ウイルス増殖曲線、HEV RNA の変異などを調べた。その結果ウイルス増殖率の違いや RNA の変異は殆ど確認されなかった。

(4) 嬢 HEV の電子顕微鏡観察

超遠心によって得られた JRC-HE3 株について、ウイルス固定後透過電子顕微鏡観察を行ったところ、約 30nm の小型球形粒子が確認された。免疫学的手法によって、

これらが HEV 粒子であることが確認された。

(5) HEV 感染価定量

HEV 感染価は限界希釈法によって求めた。感染性が認められたウイルス最大希釈倍率と、用いたウイルス容量から、感染価 (TCID) を算出した。JRC-HE3 株について、PLC/PRF/5 と A549 に対する感染価 (性) を調べたところ、それぞれ 1TCID あたり、 $10^{5.4}$ コピー、 $10^{5.5}$ コピーとほぼ同様の値が得られた。

D. 考察

ヒト培養細胞である PLC/PRF/5、A549 を用いて、血液由来 HEV を用いた感染培養系が確立できた。HEV の感染培養系についてはこれまで、ヒト・ブタ糞便をオリジナルとしたものが多かったのに対し、血液由来 HEV を用いた報告は極僅かであった。当然、得られた感染培養系を利用して、ウイルス感染価とコピー数の関係等について論ずる報告や、安全性評価への応用に繋げていく検討もほぼ皆無であった。これに関連し、糞便由来 HEV は、血液由来ウイルスと比べて構造や感染機構相違の可能性が示唆されている。以上の理由から我々は、血液由来 HEV をオリジナルとする感染培養系を構築し、これを基盤技術として HEV に係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。14 種類のサンプルを検討した結果、JRC-HE3 株、UA-1 株で感染性が確認された。このうち、特に感染

複製効率の高い JRC-HE3 株について詳細な検討を加えたところ、複数回の継代や長期培養を行っても、嬢ウイルスの増殖効率、RNA 配列に殆ど相違は確認されなかった。このことから、少なくとも JRC-HE3 株については、培養細胞に対して馴化しやすい HEV であり、常に安定して培養細胞にウイルス感染・増殖・継代を起こしやすい株であると推測された。ただ、各培養細胞に対して感染性 (TCID) を認めるまでに、 $10^{5.5}$ コピー程度の HEV が必要であることから、今後も引き続き、HEV 学の詳細な検討を加え、感染に必要な培養細胞側レセプター、ウイルス側結合リガンドの解明などを行い、より感染効率の良い感染培養系を模索していくことが重要と考えられた。またこれまでの検討から、HEV 関連 IgM、IgG 共存状態のサンプルではあっても、HEV の感染培養系が確立できた訳であるが、実際の生体内においては、これら抗体が HEV に対して感染阻止能を発現するか否か精査することは、ウイルス安全性評価・輸血学・ウイルス学に関連する研究を進める上で、極めて重要である。これらの検討に対しても、今後は重要な課題として注力していく予定である。

E. 結論

血液由来 HEV をオリジナルとする HEV 感染培養系を確立することができた。本系を応用することで、HEV に係るウイルス安全性評価系が構築でき、血液由来製剤の評価が

可能になると期待された。また HEV の感染増殖機構解明の重要な手がかりにもなると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

学会発表

大和田尚、鈴木光、松本千恵子 他

「Establishment of an in vitro culture system for HEV using HEV-RNA- positive plasma obtained from blood donors in Japan」 IUMS2011 第 15 回国際ウイルス学会

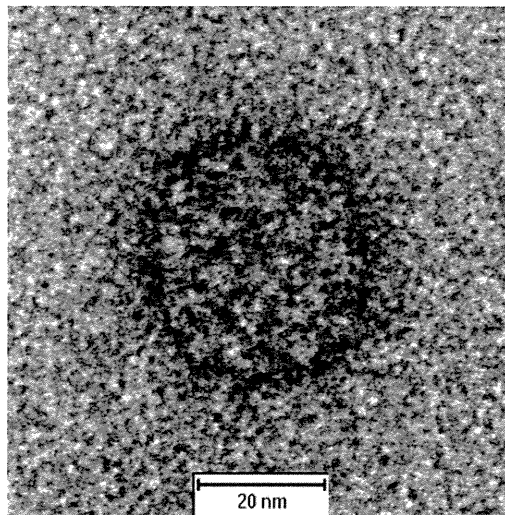
議 (2011 年 9 月開催)

大和田尚、鈴木光、松本千恵子 他

「Establishment of an in vitro culture system and the methodology for evaluating an infectious titer of hepatitis E virus (HEV) using HEV-RNA-positive plasma obtained from blood donors in Japan」 ISBT TAIPEI 2011 第 22 回 ISBT Regional Congress (2011 年 11 月開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



(培養によって得られた HEV の電子顕微鏡画像)

研究分担報告書

**異常プリオンの不活化法の研究
—海外事例調査—**

研究分担者： 太組一朗 日本医科大学武蔵小杉病院 脳神経外科

研究要旨

輸血用血液を含む血液製剤の感染症対策では病原不活化法の開発と不活化評価法の開発が必要である。今年度は海外 vCJD 新規発症症例における動向等を調査した。今後とも外国事例について継続的にモニターする必要があると考えられた。

A. 研究目的

輸血用血液を含む血液製剤の感染症に対する安全性は飛躍的に向上した。しかし、検査感度以下のウイルスやスクリーニングを実施していない病原体が血液に混入し、感染を生じる危険性は常に存在する。また、血小板製剤では細菌感染も問題となっている。血液製剤の安全性向上のためには、赤血球製剤にも導入可能な病原体の不活化法を開発する必要がある。

本分担研究では異常プリオンに焦点をあて、①異常プリオン不活化法についての諸外国における情報を広く集め、さらにこれを血液製剤に応用できるか検討する②原料血漿に発症前のプリオン病感染者の血漿が混入した場合の製剤のリスク、及び製造ラインの除染法の研究・情報収集を行なう。これら情報を通じて本邦における血液製剤病原不活化対策に反映させることにより、医療現場における安全性を担保するのが本研究の目的である。

B. 研究方法

異常プリオンが血液製剤不活化管理上問題と

なる海外事例を調査する目的で、海外 vCJD 新規発症症例における分析動向を調査した。

C. 研究結果

今年度はトルコから『vCJD 新規症例』として論文報告された。

The First Report of a Patient with Probable Variant Creutzfeldt-Jakob disease in Turkey. Adanipar et al, Dement Geriatr Cogn Disord Extra, 2011;1:429-432

これについて UKCJDSU の RG Will 博士から以下の内容で、平成 24 年 2 月に当該誌編集長あてにレターが送付された。

To The Editor
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders
S Karger AG
Basel

Response to the article:

The First Report of a Patient with Probable

Variant Creutzfeldt-Jakob disease in Turkey. Adanipar et al, *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*, 2011;1:429-432

It is essential that all cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) are reported as the incidence and geographic distribution of cases inform public health policy. Validated criteria for the classification of cases of suspected vCJD (1) have been agreed internationally and contain obligatory preconditions, the presence of specific clinical features and the results of specialist investigations, including the 'pulvinar sign' on MRI brain scan. A definitive diagnosis of vCJD requires neuropathological confirmation, either at brain biopsy or autopsy.

The case described by Adanipar et al has been reported as a case of 'Probable Variant Creutzfeldt-Jakob Disease'. However, although the clinical features would be compatible with this condition, other characteristics of the case make this diagnosis unlikely. One of the preconditions for the diagnosis of vCJD is that there should be 'No evidence of a familial form of TSE', but the authors have identified a P102L mutation, an abnormality associated with the familial prion disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, which occasionally has a sporadic CJD-like phenotype (2). The codon 129 genotype was heterozygous, which has not been identified,

to date, in any definite or probable case of vCJD. The MRI scan images published in the article show high signal in the caudate and lentiform nuclei, appearances seen in sporadic CJD (3), and not the 'pulvinar sign' which is characteristic of vCJD.

The case reported is of significant interest, but the suggested diagnosis of vCJD cannot be considered unless there is neuropathological verification of this diagnosis.

Yours sincerely,

The EURO-CJD Group
National CJD Research and Surveillance Unit
Western General Hospital
Edinburgh
UK

References

1. Heath CA, Cooper SA, Murray K, Lowman A, Henry C, Macleod MA, Stewart GE, Zeidler M, Mackenzie JM, Ironside JW, Summers DM, Knight RS, Will RG. Validation of diagnostic criteria for variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2010; 67(6):761-770.
2. Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RSG, Budka H. Mutations of the prion protein gene: phenotypic spectrum. *J Neurol* 2002;

249:1567-1582.

3. Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, Breithaupt M, Varges D, Meissner B, Ladogana A, Schuur M, Haik S, Collins SJ, Jansen GH, Stokin GB, Pimentel J, Hewer E, Collie D, Smith P, Roberts H, Brandel J-P, van Duijn C, Pocchiari M, Begue C, Cras P, Will RG, Sanchez-Juan P. Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2009; 132(10):2659-2668.

本レター送付には、EUROCCJD and related countries 参加者のメール会議を経ている。すなわち、①当該症例で見られる P102L 変異②当該症例に見られるコドン 129 ヘテロザイガス③当該症例で視床枕サインを欠いている、などから、当該症例が vCJD であるという診断には懐疑的であるという立場を表明したものである。

D. 考察

トルコで『vCJD 症例が報告された』という事例については懐疑的であるという考えが大半を占めている。本事例については今後も動向を注目しておく必要がある。

E. 結論

輸血用血液を含む血液製剤の感染症対策では病原不活化法の開発と不活化評価法の開発が必要であるが、このために諸外国における関連事例を継続的にモニターすることの重

要性が再認識された。各国研究者との連携が重要である点が改めて浮き彫りとなった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

%_ 論文発表

なし

2. 学会発表

CJD サーベイランスにおけるプリオン病発症と加齢の関連についての検討

坂井健二¹、中村好一^{2,5}、北本哲之^{3,5}、水澤英洋^{4,5}、森若文雄⁵、志賀裕正⁵、三條伸夫^{4,5}、黒岩義之⁵、西澤正豊⁵、武田雅俊⁵、犬塚貴⁵、阿部康二⁵、村井弘之⁵、村山繁雄⁵、立石潤⁵、調漸⁵、本組一朗⁵、原田雅史⁵、山田正仁^{1,5}

第 52 回日本神経学会 20110518-0520 愛知県名古屋

Sakai, K.¹⁾, Nozaki, I.¹⁾, Hamaguchi, T.¹⁾, Noguchi-Shinohara, M.¹⁾, Nakamura, Y.²⁾, Kitamoto, T.²⁾, Mizusawa, H.²⁾, Sanjo, N.²⁾, Moriwaka, F.²⁾, Shiga, Y.²⁾, Kuroiwa, Y.²⁾, Nishizawa, M.²⁾, Inuzuka, T.²⁾, Takeda, M.²⁾, Abe, K.²⁾, Murai, H.²⁾, Murayama, S.²⁾, Tateishi, J.²⁾, Shirabe, S.²⁾, Takumi, I.²⁾, Harada, M.²⁾, Yamada, M.¹⁾ Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999 AOSPD (Asia-Oceania Symposium on Prion Disease) 2011, 20110710-0711, Nagano Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

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

III.研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION			2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷



**World Health
Organization**

**WHO/BS/2011.2175
ENGLISH ONLY**

**EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION
Geneva, 17-21 October 2011**

**Collaborative Study to Establish a World Health Organization
International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid
Amplification Technology (NAT)-Based Assays**

Sally A. Baylis¹, Saeko Mizusawa², Yoshiaki Okada², Kay-Martin O. Hanschmann¹

*¹Paul-Ehrlich-Institut,
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D 63225 Langen, Germany
²National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1, Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan*

© World Health Organization 2011

All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int) or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int).

Requests for permission to reproduce or translate WHO publications – whether for sale or for noncommercial distribution – should be addressed to WHO Press through the WHO web site: (http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use. The named authors alone are responsible for the views expressed in this publication.

Summary

The aim of the collaborative study was to evaluate candidate standards for hepatitis E virus (HEV) RNA for use in nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. The candidate standards consisted of lyophilized preparations of genotype 3a and genotype 3b HEV strains, obtained from blood donors, diluted in human plasma. The genotype 3a HEV strain has been developed as the candidate World Health Organization International Standard and the genotype 3b strain has been developed as the candidate Japanese National Standard. Coded duplicate samples of the two virus strains were distributed to the participating laboratories; genotype 3a HEV (Sample 1 and Sample 2) and genotype 3b HEV (Sample 3 and Sample 4). Each laboratory assayed the samples on 4 separate occasions and the data were collated and analyzed at the Paul-Ehrlich-Institut. Twenty-four laboratories from 10 countries participated in the study. Data were returned by twenty-three laboratories using both qualitative and quantitative assays. All assays were able to detect both candidate standards. It is proposed that the genotype 3a strain be established as the 1st International Standard for HEV RNA with a unitage of 250,000 International Units per ml. On-going real-time and accelerated stability studies of the proposed International Standard are in progress.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped single stranded RNA virus belonging to the *Hepeviridae* family (Purcell and Emerson, 2008; Meng, 2010). In developing countries HEV is a major cause of acute hepatitis, transmitted by the faecal-oral route and associated with contamination of drinking water. In industrialized countries, HEV infection is being more frequently reported and whilst some cases are imported after travel to endemic areas, autochthonous cases are also increasing and infection with HEV appears more prevalent than originally believed (Ijaz *et al.*, 2009). Prospects for control of HEV infection are encouraged by recent efforts in vaccine development (Shrestha *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010). Four main genotypes, representing a single serotype, of HEV infect humans. Genotype 1 viruses are found mainly in Africa and Asia and genotype 2 in Africa and Central America. Genotype 3 and 4 viruses are generally less pathogenic, although some exceptions have been reported, particularly for genotype 4; these genotypes infect not only humans, but also animals including swine, wild boar and deer. While genotype 4 strains are restricted to parts of Asia, genotype 3 viruses are found throughout the world. Zoonotic transmission of HEV occurs, either by consumption of contaminated meat and meat products, or by contact with infected animals (Purcell and Emerson, 2010). An alternative route of transmission is by transfusion of blood components with reports from several different countries including, for example, the UK, France and Japan (Boxall *et al.*, 2006; Colson *et al.*, 2007; Matsubayashi *et al.*, 2004; Matsubayashi *et al.*, 2008). Studies in Japan and China have identified acute HEV infections in blood donors confirmed by the detection of HEV RNA (Guo *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2008).

It is now recognized that, in some countries at least, HEV infection is underreported, and where other causes of acute hepatitis have been excluded, HEV infection should be considered (Waar *et al.*, 2005). The diagnosis of HEV infection is based upon the detection of specific antibodies (IgM and IgG), however there are issues concerning the sensitivity and specificity of these assays (Bendall *et al.*, 2010; Drobeniuc *et al.*, 2010). Analysis of HEV RNA using nucleic acid amplification techniques (NAT) is also used for diagnosis and can identify active infection and help to confirm serological results (Huang *et al.*, 2010).

Infection with HEV may be particularly severe during pregnancy and in individuals with existing liver disease. Chronic HEV infection is an emerging problem amongst solid organ transplant recipients (Kamar *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2010). In chronically infected patients, viral loads are monitored to investigate the efficacy of antiviral treatment (Haagsma *et al.*, 2010;

Kamar *et al.*, 2010a; Kamar *et al.*, 2010b) and effects of reduction of immunosuppressive therapy (Kamar *et al.*, 2010c).

Several NAT assays have been reported for the detection of HEV RNA in serum and plasma or faecal samples, including conventional reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) as well as real-time RT-PCR, and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (Lan *et al.*, 2009). The NAT tests include generic assays developed for the detection of HEV genotypes 1-4 (Jothikumar *et al.*, 2006; Gyarmati *et al.*, 2007). A recent study organized by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI) on behalf of the World Health Organization (WHO), investigated the performance of HEV NAT assays in an international study (Baylis *et al.*, 2011). Dilution panels of different HEV strains were blinded and tested by laboratories with experience in detection of HEV RNA. The results of the study demonstrated wide variations in assay sensitivity (100-1000 fold, for the majority of assays). The proposal by the PEI to prepare a standard for HEV RNA for use in NAT-based assays was endorsed by the WHO Expert Committee on Biological standardization (ECBS) in 2009 (WHO/BS/09.2126) and following the initial study, two virus strains were selected for further development as a candidate International Standard for the WHO and a candidate Japanese National Standard in collaboration with the National Institute of Infectious Diseases (NIID) in Japan. The viral strains being developed as standards are genotype 3a and 3b HEV strains, which were equally well detected in the initial study and belong to genotype 3 which is widely distributed. The strains are both derived from blood donors with sufficient titres of HEV RNA to prepare standards of good potency. The aim of the present study is to establish the respective standards and demonstrate their suitability for use, evaluate the potency and assign an internationally agreed unitage.

Preparation of bulk materials

After the initial proficiency/strain evaluation study (Baylis *et al.*, 2011), two HEV strains were selected for the preparation of the candidate WHO International Standard and the candidate Japanese National Standard. The samples were kindly provided by Keiji Matsubayashi from the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center. The genotype 3a HEV strain HRC-HE104 was used to prepare the candidate WHO standard. The genotype 3b HEV strain JRC-HE3 was used to prepare the candidate Japanese National Standard. Characterization of the virus strains is shown in Table 1. The target concentration for the two bulk preparations was approximately $5.5 \log_{10}$ HEV RNA copies/ml based upon the concentrations reported in the initial study (Baylis *et al.*, 2011) and the concentrations determined by the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Centre. The two virus strains tested negative for HIV-1/2 RNA, HBV DNA and HCV RNA using the Cobas TaqScreen MPX test (Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, USA).

For the preparation of the candidate WHO standard bulk, 131 ml of the HEV strain HRC-HE104 were mixed with 2015 ml of plasma. For the preparation of the candidate Japanese National Standard bulk, 30 ml of the HEV strain JRC-HE3 were mixed with 1070 ml of plasma. The bulk preparations were cooled (4-8°C) until processing (~18 hours later). The respective preparations were diluted using pooled citrated plasma which had been used in the initial HEV collaborative study (Baylis *et al.*, 2011). The plasma was centrifuged and filtered twice before use. The plasma diluent tested negative for anti-HEV IgG and IgM (Ulrich Mohn, Mikrogen GmbH, Neuried, Germany, personal communication) and tested negative for HEV RNA (data not shown) and HIV-1/2 RNA, HBV DNA and HCV RNA, testing was performed as described above. In addition, the plasma was negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HBc and anti-HIV-1/2.

The filling and lyophilization was performed by an ISO 13485:2003 accredited Swiss company. For processing, 0.5 ml volumes were dispensed into 4 ml screw-cap glass vials. Rubber seals were then placed on top of the filled vials before loading into the freeze drier (CHRIST Epsilon 2-25 D) for lyophilization. After freeze-drying the vials were sealed with screw caps and vials stored at -20°C.