

201132013B

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

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
(H21-医薬-一般-015)

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 24 (2012) 年 3 月

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

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
(H21-医薬-一般-015)

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 24 (2012) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告書

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

P 1-P 9

研究代表者 岡田 義昭

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

P 10

III. 研究成果の刊行物・別刷

P 11-P 41

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サイエンス総合研究事業)

総合研究報告書

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法開発と不活化評価法の開発
研究代表者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

1. 紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化法を開発した。不活化効果に影響を与える因子について解析し、紫外線量、赤血球溶液の液層の厚さ、ヘマトクリット値、混合する速度の4つが重要であることを明らかにした。
2. 各種のヒト免疫グロブリン製剤に紫外線を照射したところ、液状製剤は2Jまで著明な変化は認められなかったが、乾燥製剤においては2Jの照射によってオリゴマーや重合物の増加が認められた。
3. C型肝炎ウイルス (HCV) の培養系を用いて、60°Cの液状加熱、8%及び40%エタノール処理、紫外線照射による不活化を評価した。8%エタノール処理以外は検出感度以下まで不活化された。また、ヒト免疫グロブリン製剤中では、4°Cで極めて安定であることも明らかにした。これらはHCVのモデルウイルスであるBVDVの結果と一致し、BVDVはHCVの良いモデルウイルスであることが判明した。
4. WHOのE型肝炎ウイルス (HEV) の国際標準品と一緒に国内標準品を作製し、国内製造メーカーを含む多施設参加の国際共同研究によって力価を決定した。国際標準品と国内標準品の力価は、共に250,000IU/mLに決定した。
5. 献血由来の2つ異なる血漿から2株の*in vitro*で増殖するHEV株の培養に成功し、電顕によってHEVに相当する大きさの粒子が確認できた。
6. 海外や論文等からvCJDの情報を集め、解析した。今後ともEU以外の国や地域を含めたvCJD発生状況を把握する必要があると考えられた。
7. パルボウイルスB19の国内標準品を整備した。

分担研究者		鈴木 光	日本赤十字社血液事業本部
野島 清子	国立感染症研究所 研究員		中央血液研究所 課長
下池 貴志	国立感染症研究所 主任研究官	太組 一郎	日本医科大学小杉病院 講師
水澤 左衛子	国立感染症研究所 主任研究官		

A. 研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤は、ヒトの血液を原料に製造される医薬品であり、血液の中に多種の病原体が混入する可能性がある。安全対策として問診や各種の病原体に対するスクリーニング検査が導入され、安全性は飛躍的に向上したが、検査のすり抜けや新興・再興感染症のアウトブレイク、さらにはプリオン病も報告されるなど、スクリーニングだけで血液製剤の安全性を確保することは限界がある。本研究班では、最も重要な血液製剤にも関わらず実用的な病原体の不活化法が開発されていない赤血球製剤の病原体不活化法の開発を目指した。

C型肝炎ウイルスの不活化評価法の研究では、*in vitro* で増殖可能な JFH-1 を用いて液状加熱、エタノール処理、紫外線照射等の方法を用いて HCV の不活化について解析し、HCV のモデルとして用いられてきたウシ下痢症ウイルス (BVDV) と比較検討した。

また、E 型肝炎ウイルス (HEV) はこれまで開発途上国等からの輸入感染症と我が国を含めた欧米では考えられていたが、先進国でも国内に常在していることが明らかになった。WHO では血液の安全性向上のために HEV-NAT のための国際標準品を作製したが、本研究班では国際標準品作製に協力し、同時に国内標準品の候補品を作製した。力価決定のための国際共同研究では、日本のメーカーも参加し国際及び国内標

準品のそれぞれの力価を決定した。

さらに HEV は エンベロープを持たないウイルスであることから血漿分画製剤に導入されている不活化法に抵抗性である可能性がある。これまでブタ等の動物由来の HEV 株はあったが、血液製剤の不活化法の評価に使用するウイルスはヒト血液由来である必要がある。また、ヒト血中の HEV の性状を正確に解析するためには血液由来の *in vitro* 増殖可能な HEV 株を樹立する必要があり、献血者由来の血漿を用いて検討した。

また、vCJD の新規発症者は激減したが、潜伏期が長いこと、血液製剤の安全性確保のためには発生状況を把握しておくことが重要である。そのために海外を含めた広い範囲から情報を収集し、評価した。

また、パルボウイルス B19 (以下 B19) は日本赤十字社が抗原を用いたスクリーニング法を導入し、他の分画メーカーも自主的に原料血漿の品質管理を実施しているが、核酸増幅検査の精度管理のための国内標準品が整備されていなかった。本研究班では、B19 の国内標準品の整備を行う。併せて B19 の感染性を評価するための感染系を作り、従来法と比較した。

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。

B. 研究方法と結果

1. 赤血球製剤の病原体不活化の研究

低温加熱や酸性処理による病原体の不活化を試みたが、最終的に紫外線照射による病原体不活化法に到達した。1 年目の実験経験から血漿が病原体の不活化を抑制する機能を有していることがわかったので、赤血球はヘマトクリット 40% に生理食塩水で調整し、赤血球溶液とした。赤血球溶液の容量の 1/10 の BVDV を添加し、検体とした。過去の報告から赤血球の液層を可能な限り薄くしないと不活化効果が期待できないとされていたが、実用化を考慮すると液層の厚さが 1.5mm で効果がないならば、他の方法を開発する必要があると考えた。静置した状態で照射したが、全く BVDV を不活化することはできなかった。これは、表面に存在する赤血球によって紫外線が吸収され内部まで処理できないためと推定し、赤血球溶液の内部まで紫外線が照射できるように照射法を工夫した。その結果、赤血球溶液に添加した BVDV を不活化できるようになった。より正確に不活化法を評価するために以後の実験は、紫外線照射は紫外線 C を主に発生させるランプを使用し、照射線量

は紫外線 C のみ測定する線量計を用いて測定した。実験の直前に単位時間の線量を測定し、照射時間を決定した。コントロールとして紫外線照射のみによる不活化の評価も併せて行った。照射する赤血球溶液の液層の厚さは、原則として 4.1mm に調整した。不活化の至適条件を求めるために、1) 照射線量、2) 赤血球溶液の液層の厚さ、3) ヘマトクリット値、4) 混合速度について検討した。変えて検討したところ、照射量が多い程ウイルスを不活化することができた。また、ヘマトクリットが低いこと及び液層が薄いことによって指数的に不活化効率は上昇した。さらに、混合する頻度を高くしても不活化効果は高くなった。一方、紫外線の照射量と溶血傾向は、照射量が増加する程溶血は増加したが、著明な増加は確認できなかった、

2. 血漿における病原体不活化法

全血製剤に紫外線照射した場合の血漿由来タンパクに与える影響を検討した。市販されているヒト免疫グロブリン製剤に 1~2J/cm² の紫外線 C を照射し、照射前との比較をサイズ排除クロマトグラフによって解析した。検討した製剤において、1J/cm² 照射では凝集体およびオリゴマーは産生されるものの静注可能な量であることが確認できた。2J/cm² の照射では、液状製剤においては現行の生物学的製剤基準を満たしたが、乾燥製剤では製剤によって白濁が認められ、凝集体の産生が顕著となるものも確認できた。さらにサイズ排除クロマトグラフにお

いても現行の生物学的製剤基準を満たしていないことが確認できた。

3. C型肝炎ウイルスの不活化評価法の開発

JFH1 HCV cDNA が T7 プロモーター下にクローニングされたプラスミドから *in vitro* で HCV RNA を合成し、この RNA をヒト肝臓細胞由来 Huh7.5.1 培養細胞にトランスフェクションすることにより感染性 HCV 粒子を調製した。不活化効率を詳細に解析するためにウイルスを濃縮し感染価の高い HCV を作製し、以下の検討を行った。1) アルブミン中での 60°C 2 時間の液状加熱で HCV の感染価は少なくとも 5.7 Log 減少した。即ち、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。また、ヒト免疫グロブリンにおいても 60°C で加熱すると HCV は効率よく不活化 (30 分加熱で、感染価が少なくとも 3.5 Log 減少) され、検出感度以下になった。2) 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) 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。3) ヒト免疫グロブリン製剤中では、4°C において HCV は 28 日間感染価の減少は認められなかった。ヒトグロブリン製剤中では、非常に安定であることがわかった。4) UV 照射により HCV は効果的に不活化された。これらの特徴は、これまで HCV のモデルとして用いられてきたウシ下痢症ウイルス (BVDV) と同じであった。従って、BVDV は HCV の

モデルウイルスとして非常に適したウイルスであることも明らかにできた。

4. HEV 国内標準品作製に関する研究

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。

5. 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

血液由来製剤の 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、信頼性・再現性ある系として、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 を用いた報告は極わずかであった。必然、このようにして得られた血液由来 HEV 感染培養系を利用し、ウイルス感染性とウイルスコピー数等の関係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。ところで HEV は、感染者の血中や糞便中から検出されるが、近年両者の化学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。

ヒト培養細胞株（肝癌由来細胞株 PLC/PRF/5、肺癌細胞株 A549）を単層培養し、コンフルエント状態で HEV を感染させた。HEV 陽性血漿の HEV JRC-HE3 と HEV UA-1 から由来する 2 つの HEV 培養株が得られた。2 つのウイルス株は、感染細胞に

CPE を誘導しなかった。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 $10^3 \sim 10^4$ コピー/mL で、JRC-HE3 では $10^7 \sim 10^8$ 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。また、JRC-HE3 株については、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。各培養細胞に対して感染性 (TCID) を認めるまでには、現状ウイルス量として $10^{5.5}$ コピー程度が必要であり、HEV 感染効率の悪さが懸念される。そのため今後も引き続き、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。

6. 異常プリオン不活化法の研究

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。海外 vCJD 新規発症症例における動向等を調査した。平成 21 年度には英国血友病患者サーベイランスで偶発的に CJD 陽性となった事例の情報をあつめ、解析した。当該英国患者は 73 歳男性の神経症状を呈しなかった血友病患者剖検例 (129M/V) で、vCJD をドナーに含む 9000 単

位の第 8 因子製剤と、vCJD をドナーに含まないと推定される 400,000 単位の第 8 因子製剤を投与されていた。平成 22 年度は、①スペインにおける vCJD 5 例（すべて確実例）につき検証された。5 例の発症はマドリードの 1 例を除きスペイン北西部に集中しており、BSE の好発地域に一致する。2 例は家族例であり、息子が 40 歳で、母が 63 歳で共に 2007 年に発症。さらに 2 例の疑い例が EuroCJD network meeting で報告された。②フランスにおける vCJD は累積 25 例であるが、2010 年の新規発症はない。vCJD 様の臨床所見を呈した 129MV 例があるが、これは剖検なし（sCJD-MV2 としても矛盾しないと思われる）。③英国における累積発症数は 175 例であり、2010 年の新規発症は 3 例である。同国では TMER（Transfusion Medicine Epidemiology Review）研究が継続している。④台湾・サウジアラビアからの新規 vCJD 発症が各 1 例報告された、以上の情報を集め検討した。平成 23 年度は、トルコから vCJD の症例報告がなされたが、精査した結果、懐疑的であることが判明した。今後とも EU 以外の国や地域を含めた vCJD 発生状況を把握する必要がある。

7. B19 国内標準品の作製

B19 国内標準品の整備では、国内標準品作製のための、B19 陽性血漿、及び希釈用血漿の準備を行った。さらに、国内に感染性の血漿を分注してくれる受託業者がないために 0.5mL ずつガラスバイアルに分注するための装置の評価と購入、-80℃凍結に耐えら

れるガラスバイアルとそれに貼るラベルの選択と購入を行った。

8. 末梢単核球を用いた B19 感染系の確立

B19 の感染性を評価する系では、末梢血から分離した単核球から赤芽球を誘導したところ実験に使用できる細胞数を得ることができた。これに B19 を感染させたところ、感染が確認できた。従来 of 細胞株を使用した場合と B19 に対する感受性を検討したが、感受性に著明な差は認められなかった。

9. NAT サーベイランス

平成 22 年に 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。HIV-RNA 国際標準品及び国内標準品を陰性血漿で希釈し、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。それを対象施設に発送し、各検体の結果を集めた。新しい NAT ガイドラインの NAT の精度管理のためのサーベイランスを実施し、適切に精度管理がなされていることを確認した。基準を満たし、適切に精度管理がなされていることが確認できた。

C. 考察

本研究班のメインテーマである「赤血球製剤の病原体不活化法の開発」は、いろいろな不活化法を検討したが、これまで効果がないと考えられていた紫外線 C による不活化法が有効であることを見いだした。紫外線の照射だけでは病原体の不活化はでき

なかったが、赤血球溶液の内部まで紫外線が達するように照射法を改良したためである。より効果的に病原体を不活化するために不活化効率に影響を及ぼす因子を解析し、紫外線の照射量、ヘマトクリット値、赤血球溶液の厚さ、混合する速度、が重要であることを明らかにすることができた。特に、ヘマトクリット値と赤血球溶液の厚さは重要な因子であり、これらの値を 1/2 にすることによって Log スケールで不活化効率が増加した。しかも検討した範囲内では、赤血球の不活化処理によって溶血はほとんど生じなかった。しかし、溶血は問題ないにしろ紫外線照射によって赤血球や血漿タンパクにどのような障害を与えるのか慎重に検討する必要がある。

HCV の培養系を用いた不活化法の評価では、液状加熱、8%及び 40%エタノール処理、紫外線照射の 3 つの不活化法を用いて HCV の不活化効果を評価し、併せて BVDV と比較検討した。結論として、これらの 3 つの方法によって容易に HCV が不活化されることを初めて示すことができた。驚くべきことに BVDV と全く同じ結果となり、BVDV が HCV のモデルとして非常に適していることを証明することができた。また、8%エタノール処理では HCV と BVDV は全く不活化されず、フィブリノゲン製剤による HCV 感染事例を実験的にも示した。血漿分画製剤のウイルスバリデーションでは、HCV の代わりに BVDV が使用されてきた歴史があり、BVDV を使用した莫大なデータが HCV の評価として使

用できると考えられる。一方、ウイルスを我々が保存する場合、 -80°C に凍結保存するのが一般的であるが、HCV と BVDV においては、 4°C のヒト免疫グロブリン製剤中で少なくとも 28 日間感染性が変化しなかった。グロブリン製剤中では極めて安定であることが明らかになった。過去の文献に免疫グロブリンにおける BVDV の安定性を記載した報告があるが、これを追試した結果となった。

また、HEV に関し、我が国を含めた先進国にも常在していることが明らかになった。抗体陽性率が高いことから多くの場合、不顕性感染となっていることが推定される。エンベロープがないウイルスであることから種々の不活化法に抵抗性である可能性もあり、原料血漿等の品質管理として NAT が自主的に実施されている。精度管理のための標準品の整備が必要であった。国際標準品と国内標準品を同時に作製することができ、しかも国内製造メーカーも参加した国際共同研究によって国内標準品の力価を決定することができた。一方、ヒト血液由来の HEV の培養株はなかったが、2 つの異なる株を得ることができた。細胞株に馴化する前後の塩基配列を比較し、これまでは特定のクローンウイルスが選択されて増殖すると想像されていたが、実際には塩基の変異は極僅かであった。血液製剤の安全性確保のために HEV の除去・不活化の評価にこれらのウイルス株は有用であると考えられた。

B19 に関しては、平成 24 年度には国内標準品として承認が得られ、配布する予定で

ある。これによって原料血漿の B19 の基準等が決められ、血漿分画製剤の安全性向上に貢献すると思われた。

D. 結論

紫外線照射による赤血球製剤の病原体の不活化法を開発した。また、HCV の不活化の評価を行い、これまでモデルウイルスとして用いられてきたウシ下痢症ウイルスと極めて類似していることを明らかにできた。また、HEV の国内標準品の力価を決定し、in vitro で増殖する 2 つのヒト由来の HEV 株を樹立した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) “a., determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. *Clinica chimica Acta*, 2010.vol.411:605-606
- 2) 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

- 1) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析、第 79 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2009 年
- 2) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立とその応用（第 3 報）、プリオンシンポジウム 2009、蔵王（宮城）、2009 年
- 3) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年
- 4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、浜口 功：新規レトロウイルス XMRV の検出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年
- 5) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年
- 6) 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.

7) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、
浜口 功：新規レトロウイルス XMRV の検
出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、
徳島、2010 年

8) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、
岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウ
イルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイル
ス学会、徳島、2010 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

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 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 log₁₀ 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.

For the candidate WHO standard, 4256 vials were lyophilized; the coefficient of variation of the fill volume was 1.1%. In the case of the candidate Japanese National Standard, 2154 vials were lyophilized; the coefficient of variation of the fill volume was 1.0%. In both cases, measurements were made for a total of 26 vials. For analysis of residual moisture, vials filled with 0.5 ml volumes of plasma diluent were distributed throughout the freeze-drier. Residual moisture was 0.73%, as determined by testing of 12 vials (Karl Fischer analysis). The freeze-drying process did not affect the HEV RNA titre of the lyophilized samples when compared to aliquots of the respective bulk preparations which were stored at -80°C (data not shown).

Vials of the candidate WHO standard are held at the Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Straße 51-59, D-63225 Langen, Germany. The vials are kept at -20°C with continuous temperature monitoring.

All manufacturing records are held by PEI and are available on request by the ECBS.

Collaborative study

The collaborative study comprised 24 laboratories from 10 countries. The participants in the collaborative study who returned data are listed in Appendix 1.

The samples analysed in the study were labelled as Sample 1, Sample 2, Sample 3 and Sample 4. Sample 1 and Sample 2 were replicates of the candidate WHO standard; and Sample 3 and Sample 4 were replicates of the candidate Japanese National Standard. The collaborative study materials were shipped to participants at ambient temperature.

Participants were asked to test the panel using their routine assay for HEV RNA, testing the samples in four separate assay runs, using fresh vials of each sample for each run. Where laboratories performed quantitative tests, they were requested to report results in copies/ml, testing samples in the linear range of the assay. In the case of qualitative assays, participants were requested to assay each sample by a series of one log₁₀ dilution steps, to obtain an initial estimate of an end-point. For the three subsequent assays, they were requested to assay half-log₁₀ dilutions around the end-point estimated in their first assay. Participants reported diluting the materials using plasma, water or phosphate buffered saline. Data sheets and a method form were provided so that all relevant information could be recorded.

Statistical Methods

Quantitative Assays

Evaluation of quantitative assays was restricted to dilutions in the range between 0.0 log₁₀ and -2.5 log₁₀ where the assays of most participants seem to produce comparable data. For comparison of laboratories, the replicate results of each laboratory, corrected for the dilution factor, were combined as arithmetic mean of log₁₀ copies/ml. Furthermore these estimates were combined to obtain an overall estimation for each sample by means of a mixed linear model with *laboratory* and (*log*) *dilution* as random factors.

Qualitative Assays

The data from all assays were pooled to give series of number positive out of number tested at each dilution. For each participant, these pooled results were evaluated by means of probit analysis to estimate the EC50 i.e. the concentration at which 50% of the samples tested were positive (for assays where the change from complete negative to complete positive results occurred in two or fewer dilution steps, the Spearman-Kaerber method was applied for EC50 estimation). The calculated end-point was used to give estimates expressed in log₁₀ NAT-detectable units/ml after correcting for the equivalent volume of the test sample.

Relative potencies

Potencies of Samples 2, 3 and 4, for the quantitative assays, were estimated relative to Sample 1 using parallel line analysis of log transformed data. In the case of the qualitative assays, the relative potencies were determined using parallel line analysis of probit transformed data.

The statistical analysis was performed with SAS®/STAT software, version 9.2, SAS System for Windows. Estimation of end-point dilution and relative potencies were done with CombiStats Software, version 4.0, from EDQM/Council of Europe.

Stability studies

Stability of the candidate WHO standard is under continuous assessment, through both real-time and accelerated thermal degradation stability studies. Vials of the candidate WHO standard have been stored at -20°C (the normal storage temperature) and -80°C (to provide a baseline if there is any suggestion of instability at higher temperatures). For the accelerated thermal degradation, vials have been incubated at +4°C, +20°C, +37°C and +45°C for up to 4 months. After incubation at the respective temperatures, the contents of the vials were reconstituted in 0.5 ml of nuclease free water and analysed by real-time PCR (Jothikumar *et al.*, 2006).

Data Received

Data were received from a total of 23 participating laboratories; one laboratory failed to complete the study within the specified time frame. Data from 20 qualitative and 14 quantitative assays were reported. The types of assays used by participants are listed in Table 2; all assays were developed in-house. The assays used by participants were mainly based upon real-time PCR, although some conventional PCR methods were also used.

For the purposes of data analysis, each laboratory has been referred to by a code number allocated at random and not representing the order of listing in Appendix 1. Where a laboratory performed more than one assay method, the results from the different methods were analyzed independently, as if from separate laboratories, and coded, for example, laboratory 16a and laboratory 16b. In the case of 9 assays, quantitative values were reported covering the linear range of the respective assays; in addition, further dilutions have been performed allowing end-point determination. These data have been analysed separately and the number of estimates therefore exceeds the number of assay sets returned by the participants.

Results

Quantitative Assay Results

Initially evaluation of quantitative assays was performed without removing any outlying data; subsequently the data was restricted to a range between 0.0 log₁₀ and -2.5 log₁₀ where reproducible results were obtained across dilutions. The laboratory mean estimates in copies/ml (log₁₀) are shown in histogram form in Figure 1. Each box represents the mean estimate from an individual laboratory, and is labelled with the laboratory code number. The individual laboratory means are given in Table 3. The relative variation of the individual laboratory estimates is illustrated by the box-and-whisker plots in Figure 2.

Qualitative Assay Results

The NAT-detectable units/ml (log₁₀) for the qualitative assays are shown in histogram form in Figure 3. Each box represents the mean estimate from an individual laboratory and is labelled with the laboratory code number. The individual laboratory means are given in Table 4. From Figure 3, it can be seen that the estimates of NAT detectable units/ml (log₁₀) from the qualitative

assays are more variable than the quantitative assays, reflecting the different sensitivities of the various assays. This observation is not unexpected and is in line with other studies.

Determination of Overall Laboratory Means

The overall means for the laboratories performing quantitative assays are shown in Table 5a. The means for both Sample 1 and Sample 2, replicates for the candidate WHO standard, are 5.58 \log_{10} and 5.60 \log_{10} copies/ml HEV RNA respectively, which demonstrates excellent agreement between the replicate samples. The candidate Japanese National Standard showed identical mean results of 5.66 \log_{10} copies/ml HEV RNA for replicate Samples 3 and 4. The combined mean values for the replicate samples are shown in Table 5b.

The overall means for the qualitative assays are shown in Table 6a; there is good agreement between the duplicate samples as seen previously for the quantitative assays. The combined mean values for the replicate samples are shown in Table 6b. The qualitative assays show 0.3 \log_{10} lower mean estimates than the quantitative assays.

Relative Potencies

Based upon the data from both qualitative and quantitative assays, the candidate WHO standard was estimated to have a potency of 5.39 \log_{10} units/ml (95% confidence limits 5.15 – 5.63). This value was estimated with a combined end-point evaluation of qualitative and quantitative (restricted to dilutions in the range of 0.0 \log_{10} to - 2.5 \log_{10}) data by means of a mixed linear model.

The potencies of Samples 2, 3 and 4 were calculated relative to Sample 1, taking the value of Sample 1 as 5.39 \log_{10} units/ml. The relative potencies are shown in Tables 7 and 8 for the quantitative and qualitative assays, respectively. For the quantitative data from laboratory 9, no potency was estimable since there was only one dilution tested for each sample. The data is plotted in histogram form (Figures 4-6). The data demonstrate that expressing the results as potencies relative to Sample 1, as a standard with an assumed unitage of 5.39 \log_{10} units/ml gives a marked improvement in the agreement between the majority of methods and laboratories. These data provide some evidence for commutability of the candidate standard for evaluation of HEV from infected individuals, since Samples 1 and 2 represent a different strain of HEV compared to Samples 3 and 4.

Results of Stability Studies

Vials of the candidate WHO standard were incubated at +4°C, +20°C, +37°C and +45°C for up to four months and tested by real-time PCR for HEV RNA. The heat-treated vials were assayed concurrently with vials that had been stored at -20°C and at -80°C. All samples were tested in duplicate and were compared to a standard curve prepared using vials of the candidate WHO standard stored at -80°C.

There was no evidence of instability of the samples stored at -20°C when compared to samples stored at -80°C. After 4 months incubation at +20°C a small loss of titre was observed. The observed drop in titre at higher temperatures (+37°C and +45°C) may be related to problems with reconstitution of the samples rather than actual degradation and has previously been observed for some other preparations, particularly for RNA viruses formulated in pooled plasma. The potency of the reconstituted material, after freezing and thawing, has not been investigated. Further stability studies (both real-time and accelerated) are on-going and will be communicated to the WHO.

All raw data for the collaborative study and stability analysis are held by PEI and are available on request by the ECBS.