

201235014A

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

血液製剤への核酸増幅検査（NAT）の実施
及びその精度管理に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 恵理子

平成25（2013）年 5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

血液製剤への核酸増幅検査（NAT）の実施
及びその精度管理に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 恵理子

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

血液製剤への核酸増幅検査 (NAT) の実施及びその精度管理に関する研究----- 1

内 田 恵 理 子

資料 1 FDA CBER: Guidance for Industry : Nucleic Acid Testing (NAT) for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Hepatitis C Virus (HCV): Testing, Product Disposition, and Donor Deferral and Reentry (May 2010) の要旨(和文)及び原文

資料 2 FDA CBER: Guidance for Industry : Use of Nucleic Acid Tests on Pooled and Individual Samples from Donors of Whole Blood and Blood Components, including Source Plasma, to Reduce the Risk of Transmission of Hepatitis B Virus. DRAFT GUIDANCE (Nov. 2011) の要旨(和文)及び原文

II. 分担研究報告

1. 血液製剤の NAT ガイドラインの評価技術の開発と国際動向の研究-----117

山 口 照 英

2. 原料血漿に関するパルボウイルス B19 の規格値に関する研究-----143

岡 田 義 昭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 149

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（レギュラトリーサイエンス研究事業）
総括研究報告書

血液製剤への核酸増幅検査（NAT）の実施及びその精度管理に関する研究

研究代表者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

血液製剤のウイルス安全性のさらなる向上と合理的な技術適用を図るため、平成 16 年に発出された「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」の改定に寄与するための研究と、ガイドラインへの適合を評価するための技術開発を行うことを目的とした研究を実施し、以下の成果が得られた。

- 1) 昨年度の調査結果を基礎に、NAT ガイドラインの改定すべき点について専門家を含めた班会議を開催し検討を進めた。その結果、①国際標準品の整備に伴うガイダンス全体記載のコピー数表示から IU 表示への変更、②最終製品での NAT 検査の要否についての記載の削除、③適用するウイルスの範囲、④Ready-to-use の NAT 試薬の利用や NAT に用いられる機器等の自動化が進んでいることを反映した施設・設備要件の記載事項の整備、⑤定量 PCR や Multiplex PCR などの最新技術の取り込みなどの必要性が指摘された。また、NAT ガイドラインに関連して、国内標準品や参照パネルの整備について検討を行った。NAT ガイドラインは主として HBV、HCV、HIV を対象とする NAT 検査を想定して書かれているが、パルボウイルス B19 や北海道で限定的に試行されている HEV の NAT 検査、ウエストナイルウイルスのアウトブレイクを想定した対応なども検討する必要があるとの意見が出された。これを受けて、パルボウイルス B19 の参照パネル作製の検討を行い、次年度に共同検定によりその評価を行うこととした。
- 2) 2004 年に厚生労働科学研究費で作製された HBV、HCV、HIV の各参照パネルについて、長期保存後の安定性を評価するため力価の再測定を行った。その結果、極めて低濃度の検体以外は安定に保存されていることが確認された。
- 3) 血漿分画製剤の原料血漿の安全性確保の点から許容できる科学的なパルボウイルス B19 のウイルス量を検討するため、原料血漿に含まれるパルボウイルス B19 の中和抗体量の推定を行った。パルボウイルス B19 に高感受性を示す人白血病細胞株を用いて、人免疫グロブリン製剤中の抗 B19 抗体の中和活性を解析した。製剤中の IgG 量と中和活性から原料血漿におけるパルボウイルス B19 中和活性を推定した結果、 10^5 IU/mL 以上のウイルスを中和できる計算になった。従って、血漿分画製剤の原料血漿におけるパルボウイルス B19 の規格値 10^4 IU/mL 以下という値は適正な数値であることが示された。

研究分担者

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部研究員
岡田 義昭 国立感染症研究所
血液・安全性研究部第一室長

研究協力者

化学及血清療法研究所 下瀬 克郎
日本血液製剤機構 井阪 達也
皆木 隆男
広尾 彰彦
大橋 伸一
日本製薬 小西 久郎
赤石 暁弘
大野 陽一
日本赤十字社 日野 学
平 力造
星 友二
内田 茂治
松倉 晴道
バクスター 田中 利明
池田 昇司
CSL ベーリング 平原 敬三

A. 研究目的

血液製剤のウイルス安全性は長年にわたる検出手法の開発、改良により大きく向上してきている。特に、1990年代後半より、原料血漿のウイルススクリーニングとして核酸増幅試験（NAT）が実施されるようになり、その安全性は飛躍的に増してきている。しかしながら、NAT検査においても検出限界があり、現在の技術では検出できないウィンドウ期や低濃度キャリアーが存在する。そのためにきわめて低頻度であるが検査をすり抜けたウイルス陽性血液製剤に

より感染が起こることが報告されてきている。また、輸入感染症とも言われる海外のみで見られるサブタイプ、ジェノタイプへの対応や、遺伝子が大きく変異したサブタイプの出現への対応の必要性も指摘されてきている。

一方で、NATの技術開発にも大きな努力が払われており、試験に用いる検体量や抽出効率の改良、さらには輸入感染症への対応などに多くの努力が払われている。わが国でも、欧米と同様に血液製剤のウイルス安全性指針の下位指針として NAT によるウイルス検査に関するガイドラインを発出しているが、平成 16 年に発出された後、NAT 試験が求められる HCV、HBV、HIV の感度についての改定は行われているものの、ガイドライン本文の改定は行われていない。一方、FDA 等では既に、このような技術進歩や社会的要因を含めた対応のためにガイドラインの策定や改定が行われている。

そこで本研究では、平成 16 年に発出された血液製剤の NAT ガイドラインについて、NAT を取り巻く技術進歩や血液製剤のウイルス感染症に関する情報の更なる蓄積や疫学的な変化等を調査、研究し、時代に即応した血液製剤の NAT ガイドラインの改定を目指す。また、NAT のバリデーションのためのウイルス標準パネル等についての必要性を明らかにし、その策定を目指すものである。

昨年度は NAT ガイドラインの改訂に資するため、血液製剤のウイルス検出のための NAT 関連技術の進歩や欧米の規制当局の最新のガイドラインについて検討を行ったが、本年度は、昨年度の調査結果を基礎

に、NAT ガイドラインの改定すべき点について専門家を含めた班会議を開催し、検討を進めた。また、NAT ガイドラインに関連する研究として、NAT 用参照パネルに関する研究及び原料血漿に関するパルボウイルス B19 の規格値に関する研究を行った。

B. 研究方法

B.1 NAT ガイドライン改定に向けた検討

NAT ガイドライン改定に向け、研究主任者、研究分担者のみならず、日本赤十字社をはじめとする各血液製剤メーカーの専門家の協力を得るために作業グループ (WG) を立ち上げ、現行の NAT ガイドラインの問題点とその対応案の検討を行った。その際、昨年度実施した NAT 関連技術の進歩や欧米の規制当局の最新のガイドラインを含む海外の規制動向に関する調査結果も参考にしながら、改定すべき事項について議論を行った。特に最新の NAT 関連技術についての調査結果から市販キットの利用や自動化システムの採用など、従来の用手法とは異なる視点が必要な点や NAT の高感度化が進み、ランコントロール等で用いる標準品や標準物質の作製での考慮点等を議論の中心とした。

B.2 ウイルス参照パネルの検討

2004 年に厚生労働科学研究費で作製された HBV、HCV、HIV 参照パネルについて、作製後、長期にわたって保存されてきたことから、安定性を評価するとともに広く活用するための検討として各パネル候補品の力価の再測定を実施した。また、パルボウイルス B19 のパネル候補品について、樹立した EPO 依存性の細胞株を用いて感

染能の違いを解析した。

B.3 原料血漿に関するパルボウイルス B19 の規格値に関する研究

1) パルボウイルス B19 の感染性の評価

パルボウイルス B19 は細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、パルボウイルス B19 を構成する数種類のウイルスタンパクが作られる。その際に 全長の RNA は、数カ所でスプライシングされて最終的にタンパク質に翻訳される。この性質を利用してパルボウイルス B19 を感染させた細胞から RNA を抽出し、RT-PCR によってパルボウイルス B19 由来のスプライシングされた RNA を増幅・検出することによって感染性を評価することが可能である。抽出した RNA にウイルス由来の DNA も混入しているため、スプライシングされて取り除かれる塩基配列を挟み、増幅産物の大きさが 200~300 塩基となるように核酸増幅法のプライマーを設計した。スプライシング後の RNA はスプライシングで取り除かれた塩基数だけ短くなっており、核酸増幅後にウイルス由来の DNA とスプライシングされた RNA とを増幅産物の大きさから容易に区別できる。従って、スプライシングされた RNA が検出された場合に「感染性あり」と評価した。

2) ヒト免疫グロブリン製剤中のパルボウイルス B19 中和活性の測定

原料血漿が入手困難であるため市販されている筋注用ヒト免疫グロブリン製剤を代用として用いた。筋注用人免疫グロブリン製剤 100 μ L (IgG 量 15mg 含む) に 10^{-2} から 10^{-9} まで種々の濃度に希釈したパルボ

ウイルス B19 陽性血漿 100 μ L を添加し、5%アルブミン製剤 800mL を加え 1mL とした。コントロールは、筋注用人免疫グロブリン製剤の代わりに 5%アルブミン製剤を加え、1mL とした。室温で 1 時間反応後 KU812 由来のクローン株である F10 (当研究室で分離・維持している) を 2X10⁵/100 μ L に調製し、これに中和させた溶液 1mL から 100 μ L を添加した。ローテーターで回転させながら室温で 1 時間ウイルスを感染させた。感染後、1mL の 10%FCS-RPMI (エリスロポエチン 3 単位/mL 含む) を加え 2 日間培養し、遠心にて細胞を回収した。細胞に RNAsol を添加して RNA を抽出し、最終的に RNA は 15 μ L の蒸留水に溶解した。RT-PCR には、抽出した RNA10 μ L を用いて、one-step RT-PCR を行い、さらに増幅産物 2 μ L を用いて nested-PCR を行った。PCR 産物は電気泳動し、スプライシングされた RNA 由来のパルボウイルス B19 遺伝子の増幅の有無を解析した。

C. 研究結果

C.1 NAT ガイドライン改定に向けた検討

1) NAT ガイドラインが対象とするウイルス等について

国内の献血血液の NAT 検査は、日本赤十字社で HCV、HBV、HIV を対象として 1997 年 (輸血用血液製剤は 1999 年) から開始され、当初のスクリーニングにおける NAT のプール本数は 500 本であったが、2000 年からは 50 本に、そして 2004 年以降は 20 本に縮小することで NAT の高感度化が図られている。また直近では、採取する検体量も増量されており、これまで様々な方策により感度の向上が図られて

いる。また、国内の NAT スクリーニングは、当初より、対象とする HCV、HBV、HIV を同時に検出する Multiplex PCR として開発された。さらに、NAT の検査手法として増幅産物をリアルタイムで検出する方法 (real-time PCR) が採用されている。また、検査対象としては、HCV、HBV、HIV のみならず、北海道での HEV の輸血後感染が増加したことを受け、HEV の NAT 検査が北海道で試験的に実施されている。一方、血漿分画メーカーなどではパルボウイルス B19 などのウイルスを社内受け入れスクリーニングとして実施しているとされる。

さらに現在、米国等の海外ではウエストナイルウイルス (WNV) の NAT 試験が行われており、万が一、国内で WNV が発症した場合を想定して、WNV の NAT 試験の準備が行われている。また、バイレミアを起こすような新型インフルエンザウイルスの発症時の対応としても NAT 試験が利用される可能性がある。したがって、NAT ガイドラインが対象とするウイルスは、初期の 3 ウイルス (HCV、HBV、HIV) 以外にも適用できるような記載が望ましいと考えられる。

2) NAT のウイルス除去工程評価への利用

血漿分画製剤を含め、バイオ医薬品製造におけるウイルスクリアランス試験、特にウイルス除去能の評価に NAT の利用が広がっている。NAT の迅速性や real-time PCR 等による高い定量性を利用することが有用とされるようになってきている。この場合には定量が重要である点と、ウイルスゲノムだけを対象にした試験で本当に

評価すべきウイルス粒子の除去能を正確に反映しているかという問題が指摘されている。ウイルス感染価とウイルスコピー数に乖離がある場合には、ウイルス除去能を過大評価あるいは過小評価する可能性がある。

このように NAT 試験のウイルスクリアランス評価への適用が増加している背景としては、real-time PCR 装置の目覚ましい進歩があり、定量性については非常に正確度が上がってきていると考えられる。一方で、ウイルス粒子の除去能との相関性については様々な取り組みが行われている。ウイルス除去能を評価するために当該工程にスパイクするウイルスの感染価とそのゲノムコピー数の相関性を評価することが必要である。一方、スパイクするウイルス粒子のウイルスタンパク質を定量することによりウイルス粒子数を推定したり、電子顕微鏡でウイルス粒子をカウントし、ゲノムコピー数との相関性を調べたりすることが必要とされている。さらに実際にウイルスをスパイクした工程評価で、工程の前後でのウイルス感染価の減少とウイルスコピー数の減少についての相関性を確認することにより、試験の妥当性を示す試みも行われている。特に RNA ウィルスについては、ウイルス粒子外に RNA が存在する場合には RNase による速やかな分解を受けやすいことから、測定における過大評価や過小評価は受けにくいとする意見も多いが、感染価と粒子数とが必ずしも相関するわけではないために、調製したウイルスロットごとに評価を行う必要もある。ただし、ウイルスクリアランス能の評価に NAT を用いる場合には、現行の

NAT ガイドラインに示されている定性的な NAT とは異なる要件の記載が必要と考えられることから、この点についてはさらに検討を続ける必要がある。

3) 各種 NAT 試験法について

ウイルス遺伝子の増幅法としては PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法や RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) が主として用いられているが、PCR 法以外にも様々な NAT 法が採用されている。例えば T7 RNA ポリメラーゼを用いて等温で RNA ウィルスゲノムを増幅する Transcription Mediated Amplification (TMA) 法が PCR について利用されており、逆転写酵素と併用することにより DNA ウィルスも対象として用いられている。他にも多数の NAT 試験法が開発されている。

WG で出されたガイドライン全般にわたる意見の一つとして、海外の規制当局との調和の問題がある。FDA や EMA から血液製剤の NAT 試験によるスクリーニングや検査に関してこれまでいくつかのウィルスガイドラインや考慮事項 (Points-to-consider) が発出されており、またその改定も行われている。2004 年に現行の国内 NAT ガイドラインが策定された時点では海外規制当局の動向も考慮した上で策定されており、国際調和は取れていたと考えられる。一方 FDA からは、その後に HIV と HCV に関する追加のガイドライン (参考資料 1) や、HBV の NAT 検出を対象としたガイドライン案 (参考資料 2) が出されている。HIV 及び HCV に関する FDA の追加ガイドラインでは、いったん陽性と

判定された供血者のリエントリーの方法やそのためのアルゴリズムについて書かれており、我が国における血液製剤の NAT ガイドラインの目的とは異なる点にまで言及されている。同様に、HBVの NAT ガイドライン案でもリエントリーにおける条件などの記載がされている。また、ミニプールで陽性にもかかわらず個別 NAT で陰性となった場合の最終判定のあり方や判定基準などについても我が国のガイドラインでは言及していない点であり、参考になると考えられる。さらに、ミニプールで陽性判定が出た場合に、個別 NAT を実施する際の同定方法についての記載もされている。NAT ガイドラインの改定に当たっては、これら海外の規制当局の最新動向も取り入れることが望ましいと考えられる。

4) 市販の NAT 試験の ready-to-use キットの利用と操作の自動化

NAT 試験の大きな課題のひとつは、増幅産物による汚染で偽陽性が起こることであり、NAT が高感度になればなるほどその対策が重要とされてきた。一方、スクリーニングでは膨大な検体を対象として試験を実施するために、各試験機関で試薬の調製をするよりもキット化試薬を購入して用いる方が利便性が高いとされ、様々なキットが開発されている。究極には、対象とするウイルスゲノム抽出検体を添加するだけで測定可能なキットもある。また、real-time RCR が汎用されるようになり、増幅産物の抽出工程や検出のための調製操作をすることなく解析が可能な手法が一般化してきている。このような

ready-to-use のキットと real-time RCR の普及により、増幅産物の汚染のリスクは以前と比べて非常に低減化されている。またウイルスゲノムの抽出操作の自動化も進んでおり、ready-to-use キットの利用や、抽出・検出の自動化システムの利用により、高感度の NAT における汚染対策に求められる施設要件を緩和すべき時期に来ているといえる。

5) NAT の検出感度とバリデーション

NAT の高感度化が進むに従い、従来の検出感度の定義である「95%検出限界の3倍のウイルスゲノムが検出されること」あるいは、「定量限界の検出」が、数コピーから数十コピーというオーダーになりつつある。実際の測定に際してはコピー数ではなく国際単位 (IU) での表示となるが、いずれにせよ、このような低濃度のウイルスゲノムを対象とした場合に、検出感度を明確に示すことが困難になりつつあり、またランコントロールを正確に調製することも容易ではない。すなわち希釈操作において、採取するウイルス量が極めて少ない条件下では、必ずしも均一にウイルスが採取できない可能性があり、数コピーから数十コピーでは希釈誤差は非常に大きくなる可能性が高い。従って、バリデーションやスクリーニングにおけるランコントロールの要件について見直しが必要との意見も多く出された。

6) バリデーションにおける陽性、陰性検体について

確立した NAT 試験のバリデーションにおいて検討すべき陽性検体や陰性検体に

ついて、その入手法や対象数について見直すべき時期にきているのではないかとの意見があった。従来の NAT ガイドラインでは、陰性検体と陽性検体をランダムに配置し、それぞれを的確に判定できることが求められているが、これは本来自動化されていない用手法での交差汚染を念頭においた記載であった。しかし、上記したように、試験の自動化やキットの使用などによって、交差汚染のリスクが低減されている現状に合わせる必要も出てきていると考えられる。

7) 製造工程での NAT の適用

NAT のウイルス検査は、血液製剤の製造の様々なステージで実施される。すなわち、献血された血液のスクリーニングから、血漿分画製剤を製造するメーカーでの受け入れ試験、さらには原料をプールした段階や中間工程での試験、またミニプールで陽性反応が出た場合の個別検体を特定するための試験や、頻回献血者が陽性であった場合の遡及調査での NAT 試験などもある。一方、現行ガイドライン策定時には、血液製剤基準に合わせて血漿分画製剤の製剤試験として NAT 試験が記載されていた。しかし、血液製剤安全性技術調査会において、NAT 試験の高感度性を考慮した場合に、スクリーニングや原料血漿で NAT 陰性となった原料から製造された最終製剤が陽性になる可能性は極めて低く、ありえる可能性としては人為的な錯誤によることしか考えにくいこと、また長年の製造経験でも最終製剤で陽性になったというデータがないことなどを考慮し、最終製剤での NAT 試験については削除されることと

なった。そこで、本ガイドラインの改定でも、最終製剤での NAT 試験の記載については削除するべきと考えられた。

8) Multiplex PCR

国内での献血血液の NAT スクリーニングでは、HBV, HCV, HIV の 3 ウイルスを同時に検出する Multiplex PCR が実施されている。また、それ以外でも Multiplex PCR が汎用されており、FDA のガイドラインでも Multiplex PCR について言及されている。したがって、ガイドラインの改定では Multiplex PCR についての記載が必要と思われるが、ミニプール検体を対象として Multiplex PCR で陽性になった場合に、3 ウイルスのどのウイルスが陽性になったのか、また、個別血液の同定方法についての記載も必要になるとと思われる。さらに、ウイルスごとの NAT 試験とは異なる Multiplex PCR そのもののバリデーションで求められる要件についても記載が必要と考えられる。個別血液の同定とウイルスの同定には、図 1 に挙げたようなフローが考えられる。

9) ウイルスゲノム変異

NAT によるウイルスの検出試験は、当然のごとくターゲット配列特異的である。そのために、例えば初期の NAT 試験では海外でしか伝播していない特殊な HIV のジェノタイプなどが検出されにくいケースも報告されていた。その後、NAT の特異性が大きく改良され、また広範なウイルスパネルを用いた評価により、種々のウイルスジェノタイプやサブタイプの検出が可能になってきている。一方で、ウイルス

の変異は次々と起きており、特に RNA ウイルスでは変異の程度が激しいと言われている。EU では、EMA が CE マークを与えた一部の HIV NAT 試験キットで、検出ができない変異が報告されている。このような結果を受けて、ドイツの生物製剤の審査機関であるポールエーリッヒ研究所は、HIV NAT 試験キットの構成として、対象とするウイルス配列の1カ所を検出するシングルターゲットではなく 2 カ所を検出するダブルターゲットにすることを推奨している。これは、同時に 2 カ所の変異が起こる確率がきわめて低いことから、一方で変異が起きても、もう一方のターゲット配列によりウイルスを同定できるとするものである。

このようなウイルスゲノムの変異による偽陰性を回避するには、常にウイルスの疫学状況を把握しておくことが重要である。その一つの方策として、ウイルスの血清学的試験で陽性となったドナー血液について、ウイルスゲノムシーケンス解析を行うことにより、変異の状況をつねに把握するように努めることが推奨される。しかし、血清学的試験で陽性となる検体はかなりの数に上ると想定されることより、全陽性検体のシーケンスを行うのか、あるいは NAT 試験でターゲットとしている配列のみを対象とするようにするのは今後の検討課題である。また、シーケンスの手法についても、ゲノムアレイなどの利用も考慮する必要があると思われる。

さらに変異したウイルスが同定された場合に、NAT 試験の改良にどのように取り組むかも重要な課題となる。特に、Multiplex PCR を採用している場合に、新

たな変異に対応するプライマーやプローブを導入することは、ウイルスゲノム検出の精度に大きく影響する可能性がある。これは、ダブルターゲット NAT を導入することを考慮する際も同様であろう。したがって、NAT ガイダンスの改定では、NAT 試験の改良や変更で考慮すべき事項についても記載しておく必要があると考えられる。

10) NAT 試験と増幅産物の特異性の確認

NAT 試験の最適化と増幅産物の特異性の確認に関して、現在、様々な技術革新が行われていることから、どのような手法があるかについて言及する必要があると考えられた。例えば、2 段 PCR や制限酵素切断解析、配列解析、増幅産物の分子サイズ、特異プローブを用いた方法などが利用されており、これらを単独で行ったり、複数組み合わせ合わせた解析などが必要と考えられる。

11) NAT 試験における市販キットの利用

現行のガイダンスでは、市販キットを用いる場合に、キット供給メーカーのバリデーションデータを用いることが可とされている。キット供給メーカーが広範なバリデーションを行っている場合に、血液製剤メーカーが重複してバリデーションを実施することは合理的ではない場合もある。ただし知財等の関係で、キットで用いられているプライマーやプローブの配列が公開されていない場合に、上記のようなウイルスゲノムの変異が起こった場合の対応など、製品のライフサイクルを通じた情報の共有が重要と思われる。また、エンドユ

ーザーが気づかない間に市販の NAT 試験キットの内容が変更されることのないように、十分な情報の共有も重要である。NAT ガイダンスの改定の際は、市販キットを用いる場合の注意点についても記載しておくことが望ましいと考えられる。

12) NAT 試験におけるウイルス標準品とその調製等

ウイルスの NAT 試験のバリデーションやランコントロールでは、ウイルス標準品やウイルスパネルの利用が必須である。多くの場合、公的標準品と社内標準物質が用いられていると考えられるが、その安定性の評価についても考慮が必要と考えられる。より安定な保存条件の評価について言及する必要があると思われる。また、バリデーションやランコントロールの設定では標準品や標準物質を希釈する必要があるが、その希釈方法についても記載することが望ましいと考えられる。たとえば、ウイルスを陰性血漿や血清で希釈する場合と PBS などの無機塩溶液で希釈する場合では、抽出したウイルスゲノムの安定性が異なってくることが知られており、NAT の検出感度を過大評価してしまう可能性がある。可能な限り、血液中のウイルスの抽出プロトコールに沿った条件での抽出が必要と考えられる。

13) NAT 試験と判定

NAT 試験において、ミニプールで陽性で個別 NAT 試験で陰性の場合のみならず、原料血漿の NAT 試験で複数検体の試験結果に陰性と陽性が混在する場合など、再試験が必要となる場合も考えられる。どのよ

うな場合に再試験の実施が可能なのか、再試験を行うべきなのかの判断基準について検討する必要があると思われる。偽陽性が想定されるような結果はどのような場合と考えられるのかも検討する必要があると思われる。

C.2 ウイルス参照パネルの検討

1) パルボウイルス B19 参照パネルの作成に関する検討

昨年度に引き続いて、パルボウイルス B19 の参照パネルの樹立に関する検討を行った。パネルの評価のためにパルボウイルス B19 パネル候補品についてどのような共同検定を行うべきかについて WG で検討した。その結果、①パネルの測定は統一したキットを用いるのではなく、genotype 2 が検出できる方法であれば共同検定に参加する各施設で行われている方法で良い、②定量的な方法が望ましいが、定性的な方法でも良い、③NAT には WHO のパルボウイルス B19 標準品を用いるが、WHO 標準品の濃度を考慮すると、パルボウイルス B19 参照パネル候補品の高濃度試料は 10^6 程度まで希釈して測定する必要がある、希釈には陰性血漿を使用するという方針を決定し、次年度に共同検定によりその評価を行うこととした。

また、参照パネルに含まれる 2 つのジェノタイプ (ジェノタイプ 1 とジェノタイプ 3) について我々が樹立した EPO 依存性細胞株 (Ku812 E2-4) を用いて感染価に差異がないか検討した。2 つのジェノタイプの血漿を Ku812 E2-4 株に感染させ、経時的に細胞内のウイルスゲノムを測定した。その結果、細胞外のウイルスゲノムは殆ど増

加せず、感染したパルボウイルスは細胞内でのみゲノムの増加が認められた。また、我が国で主として検出されるパルボウイルス B19 のジェノタイプ 1 は 3 日ほどでゲノムの増幅はプラトーに達するが、ジェノタイプ 3 は、ジェノタイプ 1 にくらべより遺伝子の増幅が多いことが明らかになった (図 2)。

2) 参照パネルの再評価に関する検討

2004 年に厚生労働科学研究により作製された HCV、HIV、HBV パネルについて、作製後 9 年以上経過していることから安定性を評価するためパネルの力価の再検査を実施した。その結果、 10^4 から 10^5 以上の力価 (IU) を含むパネルは -70°C の長期保存で殆どゲノム量に変化は認められなかった (表 1)。

一方、非常に低濃度のゲノム価の参照パネルでは、長期保存でタイターの変化が認められた。これがタイターの変化なのか、測定の際のばらつきなのかについてはさらに検討が必要と考えられた。

C.3 原料血漿に関するパルボウイルス B19 の規格値に関する研究

パルボウイルス B19 は一過性に高いウイルス血症を生じるが、抗体出現と共に感染性は著明に低下することが知られている。また、パルボウイルス B19 感染の多くは、不顕性感染となり献血者の 40~50% がパルボウイルス B19 抗体陽性と考えられている。そのため、血漿分画製剤の原料血漿におけるパルボウイルス B19 の規格は中和抗体を考慮して決定する必要がある。これまで、米国における S/D 処理プラズマ (多く

の新鮮凍結血漿をプールして製造) の治験中に発生したパルボウイルス B19 感染事例において、パルボウイルス B19 のウイルス量が 10^4 コピー/mL を超えた血漿を輸血された患者が抗 B19 抗体陽性となり、 10^4 コピー/mL 以下の血漿では陽転化しなかった解析結果から、米国においては血漿分画製剤の原料血漿は 10^4 IU/mL 以下と規制されている。

昨年度、人免疫グロブリン製剤と非血液系細胞株を用いた *in vitro* 感染系から免疫グロブリン製剤中に存在する中和抗体によって感染価が免疫グロブリン $2.5\mu\text{g}$ 当り 4 Log 以上低下することから血漿中の免疫グロブリン量からすると比例計算で 7Log 以上感染価は低下すると推定した。従って 1000 倍のセーフティマージンを考慮しても、原料血漿 1mL 当りのパルボウイルス B19 混入量が 10^4 IU/mL 以下であれば、中和されて感染性はなくなると考えられた。この数値は、米国の感染症例から出された値と一致した。しかし、昨年度の解析は、本来の標的細胞ではないこと、及び非常に低濃度の免疫グロブリンを用いた解析から単純計算したデータであり中和活性を過大評価している危険性があった。そこで今年度は、パルボウイルス B19 の本来の標的細胞である血球系細胞株を用いて免疫グロブリン製剤中に存在するパルボウイルス B19 に対する中和活性を測定し、前年度の結果と比較検討した。

研究方法に記載したように、IgG 量 15mg を含む筋注用人免疫グロブリン製剤または陰性コントロールのアルブミン製剤に種々の濃度に希釈したパルボウイルス B19 陽性血漿を添加し、KU812 由来のクローン細胞

株 F10 の培養液に添加してウイルスを感染させた後、RT-PCR および nested PCR によりプライミングされた RNA 由来のバルボウイルス B19 遺伝子の増幅の有無を解析した。

その結果、独立に 2 回の試験を実施したが、2 回とも陰性コントロールのアルブミン製剤では、 10^{-2} から 10^{-6} 希釈までバルボウイルス B19 の感染が認められた。一方、筋注用人免疫グロブリン製剤 15mg では最も高濃度である 10^{-2} においてもプライミングされた RNA 由来のバルボウイルス B19 遺伝子の増幅は認められなかった (図 3)。従って、IgG15mg によってバルボウイルス B19 の感染価は少なくとも 5 Log 減少することが明らかになった。

D. 考察

D.1 NAT ガイドライン改定に向けた検討

NAT ガイドライン改定に向けた検討では、特に対象とするウイルスを HCV、HBV、HIV からどこまで広げるかについて検討したが、これらの 3 ウイルス以外に現行で試行的に実施されている HEV や、受け入れ試験として一部の血液製剤メーカーで実施されているバルボウイルス B19 などが検討された。また、将来的な対応として、新興感染症としての WNV などの検討も必要とされた。

バルボウイルス B19 については、FDA が原料血漿で 10^4 コピー以上の感度を求めているが、その点についても議論がされた。

また NAT 試験に関しても、PCR だけでなく TMA 法など他の試験法への言及や PCR 以外の試験法での要件についても言及が必要と考えられた。

現行のガイダンスでは、Multiplex PCR 法に関する記載が無いことから、Multiplex PCR 法への言及と共に、Multiplex PCR で陽性となった場合の陽性ウイルスの同定と個別検体の同定についての言及も必要と考えられた。

また、NAT ガイダンスの対象として、スクリーニングやプール血漿での工程評価などに限定せず、血漿分画製剤のウイルスクリアランス工程への適用についても議論がなされた。ウイルスクリアランスへの応用については非常に有用と考えら得るものの、海外規制当局でも NAT ガイドラインでそこまでの言及は無いことから、今後議論を継続していくこととされた。

現行ガイダンスの策定後、NAT 関連技術として市販キットの普及や自動化システムが汎用されていること、さらに real-time PCR の利用が進んでいることから、ウイルス検出において増幅産物による汚染の機会が大幅に減少しているとされた。このために NAT 試験における施設要件について再検討したところ、それぞれの工程で施設等の分離が不要になっている工程も多い。従って、NAT 試験における施設要件について、どのような手法を用いている場合に施設要件が不要になるのかについて言及する必要があるとされた。

NAT の高感度化が進むに従い、従来の検出感度の定義である「95%検出限界の 3 倍のウイルスゲノムが検出されること」あるいは、「定量限界の検出」が数コピーから数十コピーになっており、低濃度のウイルスゲノムランコントロールを担保することが困難になってきている。そこで、スクリーニングにおけるランコントロール

の要件について見直すことが必要とされた。

また、ウイルスの変異についての疫学的なモニタリングが必要と考えられる。特にウイルスゲノムの変異による偽陰性を回避するには、常にウイルスの疫学状況を把握しておくことが重要である。そこでウイルスの血清学的試験で陽性となったドナー血液について、ウイルスゲノムシーケンス解析を行うことにより変異の状況をつねに把握するように努めることが推奨される。

さらに、市販キットを用いる場合の注意点について記載が必要とされた。

一方、ウイルス NAT 試験のバリデーションやランコントロールでは、ウイルス標準品やウイルスパネルの利用が必須である。そのためにガイダンスの改定のみならず、可能な限り標準品の策定を進めることや参照パネルの整備が望まれる。

以上の検討結果を表2にまとめた。また、表2ではそれぞれの項目についての現時点での対応案についてもまとめてみた。

D.2 ウイルス参照パネルの検討

本年度は昨年度に引き続いてパルボウイルス B19 の参照パネルについて検討を行った。パルボウイルス B19 の参照品樹立については、候補品の共同検定方針を決定し、次年度にその評価を行うこととした。また、本年度はパルボウイルス B19 の2つのジェノタイプ(ジェノタイプ1とジェノタイプ3)についての感染価の評価に我々の開発した EPO 依存性細胞株 (Ku812 E2-4) が適用できるかを検討した。その結果、本細胞株を利用することに

より、ジェノタイプによる差異が簡便に評価可能なことが明らかになった(図2)。また、本細胞株を用いることにより中和抗体等の有用性などについても評価可能と思われる。

一方、2014年に厚生労働科学研究で作製した HCV、HIV、HBV パネルについて作製後9年以上経過していることからパネルの再検査を実施した。その結果、 10^4 から 10^5 以上のIU価を含むパネルは-70℃の長期保存で殆どゲノム量に変化は認められなかった(表1)ことより、低タイター以外のパネルは引き続き利用可能と考えられた。また、今後も安定性について継続した評価が必要と考えられた。

D.3 原料血漿に関するパルボウイルス B19 の規格値に関する研究

パルボウイルス B19 は、一過性であるが 10^{10} IU/mL を超えるウイルス血症を引き起こすため、このような高濃度のウイルス陽性血漿のバッグが原料血漿プールに混入した場合、プール血漿全体が汚染されてしまう危険性が存在する。また、パルボウイルス B19 の感染は一過性であるが末梢血から1年以上も核酸増幅法でパルボウイルス B19-DNA が検出されることもある。そのため、高感度の核酸増幅法を用いて献血者を調べると数百人に1人の頻度でパルボウイルス B19-DNA が検出されるとの報告もされている。パルボウイルス B19 感染では感染によって中和抗体が産生されパルボウイルス B19 の再感染を阻止する。抗体保有率は、大人の40~50%と言われており、多くの献血者がパルボウイルス B19 に感染した

既往があることになる。米国の S/D 処理した新鮮凍結血漿によるパルボウイルス B19 感染事例から、 10^4 IU/mL 以下では感染が成立しなかったことが報告されている。そのため米国では 10^4 IU/mL 以下を原料血漿の規格値としている。しかし、経験から感染が成立しなくても科学的にその根拠を明らかにしておくことは安全性を確保するために必要である。

我々は、パルボウイルス B19 の不活化の評価のために様々な細胞株を調べ、さらに最も感受性の高い細胞株からクローニングすることによってパルボウイルス B19 に高感受性を有する細胞株を分離し、保存していた。高感受性の細胞株は人白血病由来の KU812 細胞株であり、我々は、赤芽球に分化する傾向の強い細胞をクローン株として選択した。従って、昨年使用した人胎児性細胞株よりも体内におけるパルボウイルス B19 感染を反映していると推定できる。筋注用人免疫グロブリンは、静注用製剤と異なり高濃度の IgG を含有し中性であるためコントロールとして 5%アルブミン製剤を用いた。そのため、ほぼ血漿蛋白に近いタンパク濃度で *in vitro* 感染実験を行うことができた。昨年度の検討では 2.5 μ g という低濃度の IgG の評価から原料血漿 1mL 当り 10^7 IU/mL 以上のウイルスが中和できると推定したが、今回 15mg の免疫グロブリンを用いた評価からは 5 Log 以上が中和される計算となった。今回使用した IgG は製剤化され、中和活性を阻害するような成分が含まれていないためにそのまま血漿の評価に用いることは、慎重にしなければならないが、原料血漿におけるパルボウイルス B19 の 10^4 IU/mL 以下という規格

値は妥当な数値と言える。さらに実際の血漿分画製剤の製造工程では、2 種類以上の原理が異なる病原体の除去・不活化法が導入されており、最終製品の安全性は高いものになっている。

E. 結論

1) NATガイドライン改定のための検討を行った。NATガイドラインが作成されて10年近くが経過し、関連技術の進歩が著しいことから多くの課題が抽出された。特に、NAT実施施設要件、対象とすべきウイルスの範囲、最終製品でのNATの適用の妥当性などについて問題点が明らかになった。またNATの高感度化が進展したために、極めて低濃度のランコントロールの設定が困難になりつつあることなども指摘されている。最終年度には改定NATガイドラインの素案を提示する予定である。

2) HBV、HCV、HIVの感度の評価可能なゲノムサブタイプごとの参照パネルに関して、2004年に作製したパネルの安定性等を再評価した。その結果、極めて低濃度の検体以外は安定に保存されていることが示された。また、NATの新たなパネル候補であるパルボウイルスB19のパネルの作製とその評価を開始した。

3) 人免疫グロブリン製剤に存在するパルボウイルスB19に対する抗B19抗体の中和活性を解析した。製剤中に存在するIgGの量と中和活性から原料血漿におけるパルボウイルスB19中和活性を推定すると、 10^5 IU/mL以上のウイルスを中和できる計算になった。従って、原料血漿におけるパルボウイルス B19 の規格値： 10^4 IU/mL以下という値は、妥当な数値であることが *in vitro* の実験からも示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 内田恵理子：講座こうすればできる日本薬局方微生物試験7 日局生物薬品

- のウイルス安全性確保の基本要件, *防菌防黴*, 40 (7), 435-444 (2012)
- 2) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
 - 3) Yamaguchi T, Uchida E: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies. *Curr Cancer Drug Targets*, in press
 - 4) 山口照英: バイオシミラーについて. *分子標的薬(日本臨床)*, 671-677 (2012)
 - 5) 山口照英: 第十六局方第一追補に収載された生物薬品と関連する試験法について. *Pharm Tech Japan*, 28(14), 39-46 (2012)
 - 6) 山口照英, 内田恵理子; 核酸医薬品: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 「世界の薬事規制対応・承認申請」技術情報, 印刷中
 - 7) 山口照英: バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況、バイオインダストリー、30巻、47-53 (2013)
 - 8) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J. Biosci Bioeng.* 2013.115(19): 104-10.
 - 9) Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, and Komano J. : Toll-like receptor(TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012.424(3):519-23
 - 10) Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneich m, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H. Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, and Hamaguchi I.: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan,A pilot study. *Transfus Apher Sci.* 2012 Sep.3
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biologics. **CMC Forum Japan**, Tokyo (2012)
 - 2) Yamaguchi,T.: Japanese Perspective on Regulation of Biosimilar Products. **APEC Biosimilar Symposium.** Seoul/Korea (2012)
 - 3) 山口照英: 10年後に再生医療はどのようになっているのか? 日本再生医療学会. ワークショップ、横浜 (2012)
 - 4) 山口照英: バイオ医薬品のウイルス安全性. 日本ウイルス学会. シンポジウム (2012)
 - 5) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功: 末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

- 6) 岡田 義昭:血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
- 7) 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 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
- 8) 水澤 左衛子、岡田 義昭:核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作成について、第 60 回日本輸血細胞治療学会、郡山、2012 年

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表1. HBV、HCV、HIV の再測定
HBV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ						ロシュ			最終成績
		HBsAg		HBV-DNA				AMPLICOR HBV Monitor			
		(RPHA)	(EIA 法)	定量測定	ジェノタイプ	サブタイプ	Pre-C 点 突然変異	copies/mL			
		2 ⁿ		copies/ml				1 回目	再検査	再々検査	
P1-045	1-066		+	3.3×10^5	A	adw	Wild	2.5×10^5	-	-	2.5×10^5
P1-059	1-084		+	1.3×10^5	A	adw	Wild	6.9×10^4	-	-	6.9×10^4
P1-036	1-056		+	3.0×10^4	B	adw	Wild	1.6×10^4	-	-	1.6×10^4
P1-041	1-061		+	1.3×10^5	B	ayw	Wild	5.0×10^4	-	-	5.0×10^4
P1-023	1-038		+	1.4×10^5	C	adr	Wild	1.0×10^5	-	-	1.0×10^5
P1-024	1-040		+	1.1×10^5	C	adr	Wild	6.3×10^4	-	-	6.3×10^4
P1-018	1-022		+	2.2×10^4	D	ayw	Wild	6.3×10^3	-	-	6.3×10^3
P1-083	1-119	8.5/2.5						3.2×10^4	-	-	3.2×10^4
P1-089	1-125	10/2						1.3×10^5	2.0×10^5	-	1.3×10^5
P1-087	1-123	9/3						1.3×10^4	-	-	1.3×10^4
P1-100	1-136	12 ↑ / 6.5						1.6×10^3	-	-	1.6×10^3
P1-078	1-114	7.5/1						<400	<400	-	(+)
P1-081	1-117	8.5/2.5						<400	5.0×10^2	-	5.0×10^2

HCV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ			ロシュ			
		HCV PA 2 ⁿ	HCV-RNA	ジェノタイプ	AMPLICOR HCV Monitor ver. 2.0			最終成績
			定量測定		IU/mL			
			copies/ml		1 回目	× 10 希釈再検査	× 20 希釈再検査	IU/mL
P2-009	2-009		1.1×10 ⁶	II (1b)	1.04×10 ⁶	2.35×10 ⁶	-	2.4×10 ⁶
P2-016	2-016		2.0×10 ⁵	II (1b)	1.90×10 ⁵	-	-	1.9×10 ⁵
P2-035	2-036		2.0×10 ⁵	II (1b)	9.48×10 ⁵	1.45×10 ⁶	-	1.5×10 ⁶
P2-002	2-002		5.7×10 ⁶	III (2a)	1.26×10 ⁶	2.15×10 ⁶	-	2.1×10 ⁶
P2-006	2-006		1.4×10 ⁶	III (2a)	1.50×10 ⁶	2.91×10 ⁶	-	2.9×10 ⁶
P2-028	2-029		1.5×10 ⁸	III (2a)	1.37×10 ⁶	3.53×10 ⁶	-	3.5×10 ⁶
P2-003	2-003		4.3×10 ⁷	IV (2b)	2.00×10 ⁶	4.00×10 ⁶	-	4.0×10 ⁶
P2-007	2-007		7.7×10 ⁵	IV (2b)	2.80×10 ⁶	3.46×10 ⁶	-	3.5×10 ⁶
P2-017	2-017		1.8×10 ⁶	IV (2b)	1.00×10 ⁶	2.41×10 ⁶	-	2.4×10 ⁶

P2-080	2-129	11			3.32×10 ⁶	2.05×10 ⁶	-	2.0×10 ⁶
P2-087	2-137	12 ↑			1.43×10 ⁶	2.57×10 ⁶	-	2.6×10 ⁶
P2-088	2-138	12 ↑			1.58×10 ⁶	1.74×10 ⁶	-	1.7×10 ⁶
P2-090	2-140	12 ↑			2.20×10 ⁶	3.92×10 ⁶	-	3.9×10 ⁶
P2-093	2-143	12 ↑			1.60×10 ⁶	4.32×10 ⁶	-	4.3×10 ⁶
P2-095	2-145	12 ↑			8.85×10 ⁵	1.46×10 ⁶	-	1.5×10 ⁶
P2-098	2-151	genotype 1a 型			2.52×10 ⁵	-	-	2.5×10 ⁵