

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非常に低減化されている。またウイルスゲノム抽出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になりつつある。実際の測定に際して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

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の数について、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る。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。

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の特定のための試験、さらには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、ガイダンス策定時には血液製剤基準に合わせ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、本ガイダンス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) Multi-plex PCR

国内での献血血液の NAT スクリーニングでは 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、それ以外にも Multiplex PCR が汎用されており FDA のガイドラインでも Multiplex PCR についての言及がなされている。したがってガイダンスの改定では 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思われる。さらに、ウイルスごとの NAT 試験と異なる 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、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 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をシングルターゲットではなく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 つ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、あら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、知財等の関係で用いているプライ

マーやプローブ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に対する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、エンドユーザーの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。市販キットを用いる場合 n 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も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望ましいと考えられる。

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。

B-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ウイルス参照パネルとしてパルボウイルス B19 の検討を行った。パネルの評価のためにどのような共同検定を行うべきかについて検討した。

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)。

次に 2014 年に厚生労働科学研究費により作製された 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 以上の力価 (IU) を含むパネルは -80°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。

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パルボウイルス 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。

パルボウイルス B19 について 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。

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である。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。

市販キットを用いる場合に注意点について記載が必要とされた。

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ウイルス参照パネルとしてパルボウイルス B19 の検討を行ったが、本年度はパルボウイルスの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°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) 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。

E. 結論

我が国の NAT ガイドラインについて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) 国際標準品の整備が進んでいることから、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、4) NAT に用いられる機器等の自動化が進んでいることから施設・設備要件について記載事項の整備、5) 定量的 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する事項として、国内標準品や参照パネルの整備についての検討を行った。NAT ガイドラインでは主として HBV、HCV、HIV を対象とする NAT 検査を想定して書かれていたが、パルボウイルス B-19 や北海道で限定的に試行されている HEV の NAT 検査やウエストナイルウイルス (WNV) 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 B-19 のパネル作製を行い次年度にその評価を行うこととした。

作成後 9 年以上経過した参照パネルの安定性が示された。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 2) Yamaguchi T, Uchida E: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies. *Curr Cancer Drug Targets*, in press
- 3) 山口照英: バイオ(抗体)医薬品・後続品のコンパラビリティ(同等性/同質性)評価方法とバイオ後続品としての抗体医薬品の要件. バイオ抗体医薬品・後続品における CMC 研究・申請と同等性確保. サイエンス&テクノロジー出版, 1-16 (2012)
- 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 Tec 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)

G-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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

参考資料

1. FDA の HIV、HCV NAT ガイドライン
2. FDA の HBV NAT ガイドライン案

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) 2 ⁿ	(EIA 法)	定量測定 copies/ml	ジェノ タイプ	サブ タ イプ	Pre-C 点 突然変異	copies/mL			
						1 回目	再検査	再々検査	copies/mL		
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

HIV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ		ロシュ				最終成績
		定量測定 copies/ml	HIV サブ タイプ	AMPLICOR HIV Monitor v1.5				
				Normal assay				
				copies/mL		x10 Dil assay		
P3-002	3-002	4.2×10^4	B	48045	4.8×10^4	-	-	4.8×10^4
P3-001	3-001	4.1×10^6	B	1224238	1.2×10^6	181806	1.8×10^6	1.8×10^6
P3-013	3-013		B	311839	3.1×10^5	-	-	3.1×10^5
P3-027	3-027		B	145336	1.5×10^5	-	-	1.5×10^5
P3-049	3-049		B	456238	4.6×10^5	-	-	4.6×10^5
P3-060	3-060		A	2600	2.6×10^3	-	-	2.6×10^3
P3-034	3-034		A	1020	1.0×10^3	-	-	1.0×10^3
P3-086	3-086		A	14294	1.4×10^4	-	-	1.4×10^4
P3-061	3-061		B	54439	5.4×10^4	-	-	5.4×10^4
P3-081	3-081		B	44447	4.4×10^4	-	-	4.4×10^4
P3-085	3-085		B	71776	7.2×10^4	-	-	7.2×10^4
P3-017	3-017		E	262527	2.6×10^5	-	-	2.6×10^5
P3-023	3-023		E	118330	1.2×10^5	-	-	1.2×10^5
P3-072	3-072		E	130554	1.3×10^5	-	-	1.3×10^5

表 2. NAT ガイドライン改定のための検討事項一覧

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(コメント)			
コメント		理由、根拠、修正案	対応案
ガイドライン全体へのコメント			
	修正案はEP、及びICHのガイドラインから逸脱しない内容であることを希望	当社ではNATはEP、及びICHのガイドラインに準拠して行われているため	FDA や EMA のガイドラインとの整合性は取れていると理解していますが、EP や USP のガイドラインについてはこれまで十分な比較検討を行ってきておりません。
	技術の進歩に合わせて内容を見直すことは大切だが、minimum requirement であること		規制的要件については安全技術調査会等での議論に基づいて整備をする必要があると思います。本ガイドラインは技術的要件を中心に記載されるものと理解しております。
	海外の NAT に関するガイダンスとの整合性を図っておく必要があること。		NAT ガイドライン作成時には FDA 及び EMEA ガイドラインとの整合性は取れていたと考えられます。最新のガイドラインとの比較では、制度の違いに基づくと思われる差異も見られるようですが、本ガイドラインの目的を超えているかどうかの判断をしたいと思います。
	注意事項(Q&A)の整備		必要に応じて見直します

個別項目へのコメント			
1. ガイドラインの目的及び適用範囲			
1-1) 目的			
	現在は、代表的なウイルスについて国際標準品が設定されていることから、コピー数表記ではなくIUに変更するほうがよい。		全体を通して見直して、IU 標記に統一したいと思います。
1-2) 適用範囲			
	最終製品のウイルス検査は、安全技術調査会で実施しないこととされたことから削除するほうがよい		ご提案どおりとしたい。
	HCV, HBV, HIV 以外のウイルス検出への適用をどう考えるか: パルボウイルス B19 は FDA でもその要件が示されており、検討が必要となるであろう。(FDA の 10^4 IU/ml に準じるのがよい。) HEV は北海道で限定して試行されており、また各社で受け入れ試験として行われている実態もある。WNV など将来的に必要なかもしれない。		NAT ガイドラインに HIV, HCV, HBV 以外のウイルスについて規制的要件を挿入するには、上の委員会での結論を待つ必要がある。技術的要件としてパルボウイルス B19 や HEV、WNV について、特に注意すべき事項があればそれを記載することは可能では。
2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策			
	NAT ガイドライン中に「試験・検査」という言葉ができてきますが((項目 2-1)の最後)、試験と検査の違いがあれば教えてください。		
	HBV への適用では、血清学的試験により高タイターの血漿を排除したうえで NAT を適用しないと汚染が起きやすいが、その点についての記載がない。		交差汚染に可能性の言及については、実態に関する調査を含めて判断したい。

	Multiplex PCR に関する記載がないが、記載の必要性も含めて議論が必要。		FDA のガイドラインでは Multiplex PCR に関する記載も整備されており、Multiplex PCR を導入するときの注意点やバリデーションのあり方については記載が可能ではないか。
	①個別 NAT の実施に当たっての記載が必要か。あまり具体的に書き過ぎても困る可能性あり。 ②他の方法(TMA 法等)の必要性 ③Taq polymerase の化学修飾(Hot start など)への言及		
2-1)施設・設備の整備等に関する事項			
	2-1)の修正(追記)を希望	NAT は数十コピーのウイルス遺伝子を検出できることから、増幅産物による汚染などが起きないように十分な配慮をする必要がある。留意事項には作業者の導線や更衣、材料の流れ、エアフローや給気、除染法などが含まれる。最近の市販 NAT キットは自動化されたインハウスシステムと同様に NAT 試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調製	

		<p>済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系の NAT 試験を採用している場合には、NAT 試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。マスターミックスの調製、試料の処理や抽出、NAT による増幅、及び増幅産物の検出といった NAT 試験の各ステップを開放系で行う場合には、原則的通りに、試験をそれぞれ異なるエリアや区画で実施する必要がある。(*1)</p>	
	<p>2-1)で引用されているように、NAT のこの部分の記載について、時間も経過しており、最近の市販 NAT キット等は調整済みで、閉鎖系かつ分注済みのものが利用可能である。試薬もチューブやカセットに入った調製済みのものが用いられており、最近の市販システムを用いる場合には本記載はもはや不要である。この記載は変更する必要がある。</p>	<p>最近の市販 NAT キットは自動化されたインハウスシステムと同様に NAT 試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行</p>	

		<p>われる。従って、このような閉鎖系の NAT 試験を採用している場合には、NAT 試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。種々の試薬やテストキットを用いる NAT 試験をインハウスのシステムを用いて開放系で実施する場合には、ANT が数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できることから、NAT による増幅産物の汚染が起きないように最善の注意を払う必要がある。従って開放系で実施する NAT の試験設備はガイダンスに示された条件に適合する必要がある。(*1)</p>	
	<p>自動化機器が普及している中で、本文の(*1)の内容について、例えば「交差汚染の防止等がなされている場合はこの限りではない。」など、本文中に記載し、条件設定した方がよいのではないのでしょうか</p>		

2-2)機器, 器具の保全、管理に関する事項			
	NAT 検査におけるシステム適合性試験とは、具体的にどういことをすればよいのでしょうか。		検出の確認(ランコントロール)、検出系の性能(特異性)、再現性が挙げられますが、試験ごとに実施するというのではなくバリデーションも含めてのことです。
2-3)(被験)検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事項			
	抽出法やプライマー、プローブ等の市販キットの使用:バリデーション、キットの受け入れ試験、キット変更の場合などの記載が必要ではないか。(USP にはキットの要件が記載されている。)		USP の市販キットの使用に関する General Chapter を参考に案文を作成してみます
2-4)核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項			
	ウイルスゲノムの変異により検出が出来なくなる可能性について、適切な評価を行うことを記載すべき(HIV のゲノム変異)。	EMA が HIV のゲノム変異により検出が出来ないキットがあることについて注意喚起を行った(シングルターゲットに代えてデュアルターゲット PCR の推奨)	ゲノムの変異が起きている可能性を日ごろから検討することとして、血清試験で陽性になった検体のゲノム解析を行う必要性について言及する案文を提案。また、デュアルターゲット PCR を行う場合に考慮すべき事項についての記載についても案文を提案します。

	Realttime PCR/RT-PCR での検出の確認 に関してカットオフ値の設定に関する記載 がない。		用手法での記載と比較して適切に整備したい と思います
2-5) 試験の最適化と特異 性の確認、非特異的反応 の除去に関する事項			
	(3) 増幅産物の特異性の確認 「増幅産物が目的としたものであることを2 段 PCR、制限酵素マッピング、配列解析、 増幅産物の分子サイズ、特異的なプロー ブを用いたハイブリダイゼーションなどによ り確認する必要がある」と記載すべきであ る。		
	①特異性の確認 ○核酸→ウイルス遺伝子		ウイルス遺伝子に修正します
	③増幅産物が特異的である確認 キットの使用者で、様々なジェノタイプ のウイルスを入手する場合は困難な場合 もあることから、次の一文を記載する。 ・ウイルス遺伝子型等に対する検出感度 ○最終行に、「市販キットを使用する場 合は、試薬製造メーカーのデータをもつて 代えることができる。」を追記する。		市販キットの使用に関する考慮事項と共に、 どのように記載するかを検討する。

	<p>・NAT 検査におけるばらつきは、一般的にどれくらいまでを許容すると考えればよいでしょうか。</p>		<p>一概には言えないのではないのでしょうか。検出限界近くの低濃度のウイルス溶液では、採取サンプル中に含まれるウイルス量は非常にばらつくことが想定されています。一方で、FDA のパルボウイルスの検出限界のように、10^4 IU/ml であればこのような希釈液でのサンプリングによる誤差はそれほど大きいとは考えにくい。</p>
	<p>・定量 NAT 試験系は、分析法バリデーションに従った方がよいのでしょうか。</p>		<p>ICH Q2A 及び ICH Q2B が参考になると考えられるが、全てが適用可能か検討させていただきます。</p>
	<p>陰性パネル: 陰性血漿の調達法、現行の記載は十分か? 「100 検体を試験し、陰性であることを確認」の妥当性(従来の打率の考え方に基づいたものであり、現行のリアルタイム PCR とは考え方が異なる。)</p>		<p>リアルタイム PCR での陰性血漿の評価法については再検討させていただきます。</p>
	<p>凍結乾燥されていない RNA ウイルス標準品(社内標準品を含め)の安定性についてどのように考えられるか説明してほしい。</p>	<p>標準品の安定性について、DNA ウイルスでは問題が少ないと思われませんが、RNA ウイルスでは長期保存によりコピー数が低下する傾向があるように思われます。</p>	

2-6)検出感度に関する事項			
	<p>②検出感度の求め方</p> <ul style="list-style-type: none"> ・3回以上の独立した試験の実施 ○最終行に、「自動化機器の場合は、製造メーカーのデータをもって代えることができる。」 		
	<p>NATガイドラインに記載されている、n数に関する制定当時の考え方(根拠)を明示してほしい(例;頑健性のn=20、95%感度の3倍など)。</p>		
	<p>検出限界の解析のための標準品の希釈法:希釈には陰性血漿を用いるべき。</p>		<p>PBS等で希釈系列を作製すると、実サンプルとの抽出効率等の齟齬が出来る可能性を記載したいと思います。</p>
	<p>バリデーションのための標準品や参照パネル;標準品、自社標準物質の記載について ①国際標準品、②国際標準品で校正された国内標準品 ③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質等(参照品)</p>		<p>国内標準品は、IU単位で表示されている場合には国際標準品に対して校正されています。自社標準物質の作製について追記する必要があるか議論を行いたと思います。</p>
	<p>ランコントロールについて、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスが必ず陽性になることを求めているが、HBVの検出感度はすでに数IUと非常に高感度であり、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスを設定することが困難である。ランコントロールの設定について適切な記載にしていきたい。</p>	<p>NAT法の技術革新が進み、高感度になったために非常に低濃度のランコントロールの調製が難しくなっている。</p>	

2-7)判定基準の設定に関する事項			
	再試験の基準に関する記載が必要。		FDA ガイドラインの記載を参考に記載案を提案させていただきます。
2-8)従事者の技術の標準化と向上に関する事項			
2-9)汚染防止に関する事項			
	汚染防止対策は、最新の市販されている閉鎖系システムを用いないで、インハウスの開放系を用いる場合に適用すべきである。		上記のコメント同様、適切な閉鎖系での対応をとる場合には、ここで書かれているような部屋の区別は不要とする記載を追記したいと思います。
3. 試験、検出結果の意義づけ			
3-1)「陽性」と判定した結果の意義	ミニプール NAT で陽性と判断された場合に、個別検体を同定するスキームを明らかにする必要がある		個別検体を同定するフローを考慮するようにします
3-2)「陰性」と判定した結果の意義			
3-3)必要とされる検出限界値(*8)について			安全技術調査会の審議事項