

201328003A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田恵理子

平成26(2014)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

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 恵理子

平成26（2014）年 3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

参考資料 1 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(改正案)(修正箇所マーカー付)

参考資料 2 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(改正案)

参考資料 3 パルボウイルス B19DNA 参照パネル候補品の力価の評価 (NAT 小委員会資料)

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.....	45
--	----

山 口 照 英

参考資料 1 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(改正案)(修正箇所マーカー付)

参考資料 2 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)

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.....	69
--	----

岡 田 義 昭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	75
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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）

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年に制定された「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」（NATガイドライン）の改訂に寄与するための最新技術の調査とその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) 最終年度となる今年度は、昨年度に引き続き NAT ガイドラインの見直しのための作業グループ（WG）でガイドライン改正に向けた検討を行い、NAT 小委員会へ提案するための NAT ガイドラインの改正案を作成した。改正案の主なポイントとして、1) 全体の記載をコピー数表示から IU 表示に変更すること、2) ガイドラインの適用となるウイルスの範囲として HBV、HCV、HIV のみならず、現在試験的に検査されているウイルスや、今後導入される可能性のあるウイルスも含めること、3) NAT に用いられる機器等の自動化が進んでいることから、汚染防止のための施設・設備要件に関する記載事項の整備や、自動化機器を使う場合でも廃液等からの汚染のリスクに関する記載の追加、4) 定量的 PCR におけるカットオフ値の設定、5) Multiplex PCR などの最新技術の導入に当たっての注意点、6) NAT の高感度化により低濃度のランコントロール設定にあたっての注意点、7) 検出機器のシステム適合性、8) ウイルスの変異について適切なモニタリングを行うことの必要性や対応策、などが挙げられた。

2) Parbovirus B19 (PV B19) 検出のための NAT の精度評価に必要となる参照パネルの樹立に関する共同検定を行った。その結果、Genotype 1 高濃度サンプル、Genotype 1 低濃度サンプル、Genotype 2 高濃度サンプル、Genotype 2 低濃度サンプルのそれぞれの力価は、 6.6×10^{10} IU/ml、 6.6×10^5 IU/ml、 7.1×10^{10} IU/ml、 8.3×10^5 IU/ml と計算された。

3) 中和活性や病原体不活化の評価等に必要となる PV B19 の感染性を簡便に測定法する方法として、従来の nested RT-PCR による定性法を改良し、リアルタイム RT-PCR 法による感染性の評価系を構築した。従来法では結果が得られるまで RNA 調製後6時間を要したが、リアルタイム RT-PCR 法では2.5時間で結果を得ることができ、感染性の検出感度も従来法と同等であった。昨年度報告した PV B19 に対して高感受性を示すヒト白血病細胞株を用いることで、PV B19 の感染性を高感度で簡便に評価できるようになった。

研究分担者

岡田 義昭 埼玉医科大学病院
輸血・細胞移植部部長
山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部主任研究官

A. 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し、そのために極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平成16年に発出しているが、その後、ガイドライン本文の改訂は行われていない。一方、FDA 等では既に、このような技術的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。

その一方で、平成25年度にはNATのすり抜けによるHIV感染が我が国で発生

し、現行の高感度なNAT試験法でも検出されないほどの低濃度のHIV感染血であっても伝播が起こりうることが判明した。血液製剤のウイルス安全性にゴールはないかもしれないが、可能な限りそのリスクを低減化していく対応が求められる。

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、昨年度の調査に基づき、最新の情報を盛り込んだ血液製剤のNATガイドラインの改定案の作成を目指した。また、NATの実施と精度管理に関する研究として、パルボウイルスB19（PV B19）の参照パネルの作製とPV B19の感染性のリアルタイムRT-PCR法による評価系の確立に関する研究を実施した。

B. 方法

B.1. NATガイドライン改定

昨年度立ち上げたNATガイドライン改定のための作業グループ（WG）で検討した海外の規制動向も含めたガイドラインの改正ポイントについて、詳細な解析を行った。その解析に基づいて、最新のNAT関連技術を考慮して、どのような改正を行うことが望ましいか検討を行い、その素案を作成することとした。特に市販キットの利用や、市販キットの一部を使用する際の考慮事項、自動化システムの採用に当たった対応事項など、またウイルス変異についての情報の収集、陽性血のゲノム解析の必要性などについてもガイドラインに盛り込むこととした。

B.2. PV B19 参照パネル候補品の共同検定

(1)パネル候補品の製造

PV B19 参照パネル候補品は、株式会社ベネシス(現・一般社団法人日本血液製剤機構)が調製し、国立医薬品食品衛生研究所に供与されたものを用いた。候補品の調製は以下のように行われた。まず、米国で採血された PV B19 ゲノム陽性のヒト血漿を原料血漿として入手し、高濃度サンプルとして Genotype 1 の F15 と genotype2 の F27 を選択して血清化した。これらの未希釈血清のゲノム濃度は artus parvo B19 TM PCR Kit (QIAGEN) を用いた測定により、Genotype 1 (F15)は 11.2 Log₁₀ IU/mL、Genotype2 (F27)は 11.0 Log₁₀ IU/mL であった。これらの未希釈サンプルを希釈用ヒト血清 (Anti-HIV、Anti-HCV、HBsAg、HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、B19-DNA、Anti-B19 陰性)を用いて約 10¹⁰ 及び 10⁵ IU/mL となるように希釈してそれぞれ高濃度及び低濃度サンプルとした。Genotype 1 と 2 の高濃度サンプル及び低濃度サンプルをそれぞれ 0.5mL ずつ分注したもの、及び陰性コントロール血清(希釈用血清)をパネルの 1 セットとして-80℃で保存した。調製時の F15 と F27 の高濃度及び低濃度サンプルのゲノム量は F15 高濃度: 10.0 Log₁₀ IU/mL、F15 低濃度: 4.4 Log₁₀ IU/mL、F27 高濃度: 10.1 Log₁₀ IU/mL、F27 低濃度: 4.2 Log₁₀ IU/mL であった。また、F15 と F27 は HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、HEV-RNA、HBsAg、Anti-HIV、Anti-HCV、Anti-HEV、anti-B19 IgG がいずれも陰性であることが確認されている。これらのサンプルが国立医薬品食品衛

生研究所に 305 セット供与された。なお、パネル候補品は、分注の均一性と-80℃での保存安定性が確認されている(平成 23 年度の報告書で報告済)。

(2)共同検定の実施方法

参加各施設には以下の検体等を配布した。

1)参照パネル

- ①Genotype 1 高濃度サンプル(ラベル: B19-G1 F15conc)
 - ②Genotype 1 低濃度サンプル(B19-G1 F15)
 - ③ Genotype 2 高濃度サンプル(B19-G2 F27conc)
 - ④Genotype 2 低濃度サンプル(B19-G1F27)
 - ⑤陰性コントロール(B19 Negative control)
- 2)パルボウイルス B19 DNA 第二次国際標準品 (99/802) (力価 10⁶ IU/mL) 1 本
- 3)希釈用陰性血漿 (日本赤十字社より供与)

参加各施設は、定量 NAT または定性 NAT(エンドポイント法)によりパネル候補品の力価測定を行った。試験毎に新たに候補品を融解し、日を変えて 3 回測定した。

定量 NAT: 高濃度サンプルは希釈用陰性血漿を用いて 10,000 倍程度に希釈後、さらに 3 段階以上の 10 倍希釈列を調製した。低濃度サンプルは原液または測定可能な濃度に希釈して使用した。B19 DNA 第二次国際標準品は 3 段階の 10 倍希釈列を調製し、定量のスタンダードとした。各サンプルについて定量 PCR を実施し、国際標準品の力価で換算して力価を IU/mL で算出した。測定は 1 回につき 3 重測定を行った。

定性 NAT: 希釈用陰性血漿を用いて検出限界付近の 0.5 Log 希釈段階系列を作成し、連続して陽性となった最高希釈倍数から力

価を IU/mL で算出した。国際標準品も同様に希釈列を作成して力価を算出し、得られた力価を 6.0Log_{10} IU/mL と置いて候補品の力価を換算した。

(3)測定値の分析

参加各施設から返送された結果を基に、国立医薬品食品衛生研究所が統計解析を行い、各パネルの力価を算出した。パネル候補品について、施設毎に測定値を対数力価で算出し、3回の試験より得られた力価の平均値と標準偏差を算出した。また、各施設から得られた対数力価の平均値を基に、全施設及び定量 NAT を実施した施設全体の平均値と標準偏差及び 95%信頼区間を算出した。

B.3. PV B19 の感染性評価系の確立

(1) PV B19 の感染性の評価

PV B19 は細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、数力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 PV B19 を感染させた細胞からスプライシングされた RNA が検出できた場合に感染性を有すると判断した。塩基配列の 584 番と 585 番の間で切れ、同様に 2087 番と 2088 番の間で切れて 584 番と 2088 番が結合した RNA ができるためスプライシング部位を挟むようにプライマーを設計した。増幅産物を検出するためのプローブはスプライシング部位を跨ぐように設計した。スプライシングされてできる RNA からの cDNA と PV B19-DNA とを明確に区別できる。

(2)spliced B19-RNA の調製法及びリアル

タイム RT-PCR の方法

研究室で分離・維持している KU812 由来のクローン株である F10 を $3 \times 10^5/100\mu\text{L}$ に調製し、これに $10^2 \sim 10^7$ 倍に PBS で希釈した PV B19 陽性血漿 $100\mu\text{L}$ 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 $15\mu\text{L}$ の蒸留水に溶解した。リアルタイム RT-PCR は、キアゲン社の QuantiTect RT-PCR キットを使用し、プライマー及びプローブの濃度、RT-PCR の温度は仕様書に従った。また、サイクル数は 40 回とした。

(3)リアルタイム RT-PCR 法の評価

PV B19 陽性血漿を 100 倍希釈して感染させた細胞由来の spliced B19-RNA を 10^7 感染価として 10 倍ずつ 10^7 まで PBS で希釈し、検量線を作製した。また、非感染細胞由来の RNA、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 コピーの B19-DNA をリアルタイム RT-PCR に添加し、増幅の有無を検討した。

(4)リアルタイム RT-PCR を用いた液状加熱による PV B19 不活化評価

5%アルブミン液 PV B19 を添加し、 60°C にて 0、1、2、6、10 時間液状加熱を実施した。PBS を用いてそれぞれの検体を 1 倍～ 10^6 倍まで希釈し 2) に従って感染させ、RNA を調整し、リアルタイム RT-PCR を行い、不活化効果を評価した。

C. 結果

C-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、研究班全体で取り組むこととし、研究代表者、研究分担者に加え、日本赤十字社をはじめ各血液製剤メーカーの専門家の協力を得て作業グループ（WG）を形成し、現行の NAT ガイダンスの問題点を抽出し、どのような改正を行うことによりガイドラインとして目指すウイルス安全性を担保していけるか検討を行った。

国内の献血血液の NAT 検査は、HCV、HBV、HIV を対象として 1997 年（輸血用血液製剤は 1999 年から）から開始され、当初のスクリーニングにおける NAT プール本数は、500 本であったが、2000 年から 50 本に、そして 2004 年からは 20 本に縮小することにより、高感度化が図られてきた。また日赤のスクリーニングのみならず、各血漿分画メーカーでも原料血の受け入れに際して NAT による受け入れ検査が実施されているが、この受け入れ試験において、各社が HBV、HCV、HIV のみならず、PV B19 や HEV など複数のウイルスに関する NAT 検査を実施している。NAT の高感度化、血液製剤の生物由来基準で求められるウイルス以外にも NAT の適用が増えている現状、また、万が一ウエストナイルウイルス（WNV）などの新興・再興ウイルスのアウトブレイクが起きた際の対応を考慮すると、ガイドラインの範囲としては HBV、HCV、HIV に限らず適用可能とすることが妥当と考えられた。

現行の NAT ガイドラインは、リアルタイム

PCR や複数のウイルスゲノムを同時に検出する Multiplex PCR に関する記載がされておらず、各社で利用されている技術が必ずしもガイドラインに反映されていない。また、このようリアルタイム PCR や Multiplex PCR では、陰性と陽性を区別するためのカットオフ値の設定が重要であり、そのカットオフ値の設定のための評価手法とその妥当性の説明を求めることとした。さらに結果の判定として、ミニプール血漿を用いた検査で陽性結果が検出された場合に、個別検体での検査で全てが陰性になることもあり、確認試験で一回目の NAT 検査と一致しない結果が得られることも考えられる。したがって、陰性と陽性の判定基準をあらかじめ明確化することをガイドライン案に盛り込むこととした。

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、対象とするウイルスは初期の 3 ウイルス（HBV、HCV、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。

近年 NAT に関する技術開発が急速に進展しており、特にプレミックス反応液の利用や、被検液を添加するだけで解析が可能な検出キットが数多く市販されるようになり、多くの場合、検出キットと自動化された抽出キットや測定機器が利用されている。本来、NAT は目的遺伝子を $2^{30} \sim 2^{40}$

に増幅するために、非常に高感度なウイルスゲノムの検出が可能な試験法であるが、そのために増幅産物の汚染が起これると測定結果に大きな影響を与えることになり、場合によっては施設そのものが使えなくなることもある。これは、前立腺がんや慢性疲労症候群の原因ウイルスが XMRV であるとの論文報告がされたが、その結果は NAT での増幅産物の施設汚染によるものと判断されている。この例からも明らかのように、NAT では汚染に対する対応が最も重要とされ、ガイドラインにも施設要件が記載されている。しかし、近年の NAT 試薬のキット化の進展や機器の自動化が進むことにより、試薬調製のための独立した施設や、検出のための独立施設が不要とされつつある。従って、改正 NAT ガイドライン案では、自動化機器の導入やキット試薬の使用により汚染のリスクが低減化されている場合には、試験の汚染が起きる可能性がある操作だけに限定した施設要件でよいとすることを記載することとした。

一方、キット化試薬の使用に際して、キットを製造しているメーカーの精度や感度に関するバリデーションデータの使用が可能との意見があり、現行 NAT ガイドラインではキットメーカーのバリデーションデータの使用が明記されている。しかし、キットの中身について試薬メーカーから全てのデータが開示されているわけではない点、また、キットの構成が血液製剤メーカーの知らない間に変更されるリスクもあることから、適切な対応をとることを求めることとした。また、少なくともキットの導入時やキットの構成が変更され

た際には、キットに記載されたウイルス検出性能があることを確認する試験が必要であることを明記することとした。また、キットの構成が変更された場合には、適切に情報を得られる体制の必要性も記載することとした。

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」が、HBV では数 IU にもなると言われている。一方で、日常の検査では「95%検出限界」の3倍量のウイルスゲノムが確実に検出されるか、あるいは定量限界のウイルスが確実に検出されることとされている。しかし、本来このような低濃度のウイルス液を調製することは困難であり、採取したウイルス液の中に目的のウイルスが想定される濃度で入る確率はポアソン分布に近くなるといわれている。従って、ランコントロールとして陽性ランコントロールを調製しても、必ずしも目的とするウイルス量が採取されていない可能性がある。

そこで、非常に高感度のウイルス検出が可能な NAT 試験では、ランコントロールの設定で「95%検出限界」の3倍量のウイルスゲノム、あるいは定量限界のウイルス量とするのではなく、HBV、HCV、HIV では少なくとも 100 IU/mL より少ない量で、ランコントロールとして適切に管理できる量を設定することとした。

NAT によるウイルスの検出では、様々なジェノタイプ・サブタイプが検出されることを評価する必要がある。特定のジェノタイプ・サブタイプの検出能が悪ければウ

ウイルス安全性上問題となり、例えば海外でのみ認められるジェノタイプ・サブタイプの検出ができなければ輸入感染症に対して無防備であることになる。EU で EMA が CE マークを与えた一部の HIV NAT 試験キットでの検出ができなくなるようなウイルスの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。

このような事例を考慮すると、定期的に陽性ウイルスのシーケンス解析を行い、国内で検出されるウイルスのトレンドを把握しておくことが重要と思われる。しかし、全てのウイルスのゲノム解析を行うことは膨大なエネルギーを投資する割りに、得られる情報はそれほど多くない可能性がある。そこで、検出されたウイルス陽性血漿について、適宜ウイルスゲノム解析を行うことが有用であるとした。これは意図としては、血清学的に陽性となったウイルスを対象として NAT の検査を実施し、もしも検出能が十分でなかったり、NAT で検出ができない場合には、ゲノム解析を行うという発想も込められている。

輸血用血液製剤の HBV、HCV、HIV に対する検出感度は、ミニプール前の血漿での感度が安全性技術調査会で結論が得られているが、血漿分画製剤については明記されていない。そこで、4 課長通知で記載されているプール血漿での感度 (100IU/mL) を記載するように提案することとした。

以上の検討に基づいて、参考試料 1 及び 2 に示す改正案を取りまとめ、NAT 小委員会に提案した。

C.2. PV B19 参照パネルの共同検定

PV B19 は血液製剤での検査は必須とはされていないが、輸血による感染事例が認められていることから、血液製剤関連各社により自主的に NAT 検査等が実施されている。しかし、市販の B19 NAT 測定キットのうち、Genotype 1 を検出するが Genotype 2 を検出できないものがあると報告されており、PV B19 の検出能を評価するために参照パネルを用いた NAT の検出確認の必要性が指摘されている。PV B19 参照パネル候補品が国立医薬品食品衛生研究所に供与されたことから、PV B19 参照パネル候補品について、国内外 11 施設による共同研究を実施し、国際標準品の力価に基づいて参照パネル候補品の力価を決定することとした。

11 施設から 11 組の結果が得られ、10 施設が定量 NAT、1 施設が定性 NAT を実施した。定量 NAT では、6 施設が Real-time PCR 法に基づく市販の試験法で測定し、残りの 4 施設はそれぞれ異なるプライマーとプローブを用いた TaqMan PCR 法で測定した (Table 1)。

各パネルの施設毎の推定対数力価を Fig.1 に示す。施設間で測定値にはややばらつきが認められた。定量 NAT では特定の測定法による偏りは認められなかったが、定性 NAT は定量 NAT よりもやや高めの値を示した。各パネルの力価を求めるため、定量 NAT のみの対数力価の平均と、

定性 NAT の値も加えた全体の平均を算出したところ、両者の差は最大で 0.05 Log₁₀ (1.1 倍)であり、また各施設の測定値のばらつきはいずれも 2SD の範囲で一致した (Table 2)。この結果より、全体の平均値を各パネルの力価として決定することとした。なお、パネル⑤の陰性コントロール血清は、どの施設も陰性であった。

この結果について、NAT 小委員会に報告した(参考資料 3)。

C.3. PV B19 のインビトロ感染系の検討

PV B19 の感染評価系が報告され、各不活化法に対する PV B19 の不活化効果について解析が行われた結果、これまで PV B19 のモデルウイルスとして用いられてきたブタパルボウイルスやイヌパルボウイルスに比較して、PV B19 は加熱処理に対して感受性が高いこと(不活化され易いこと)が明らかとなった。

このことから PV B19 を用いた感染性の評価法が必要になった。我々を含め感染性の評価は、段階希釈した PV B19 を細胞に感染させ、転写された PV B19-RNA を検出する方法が実施されていた。そのため RNA 精製、逆転写、1st-PCR、2nd-PCR、電気泳動による特異的バンドの検出の 5 行程が必要であり、RNA 精製後、結果が得られるまで約 6 時間を要した。行程が多いためコンタミ等も問題となる。そこで今年度は、リアルタイム RT-PCR 法を確立して、1 工程で結果が得られる検出系の確立を目指した。

1)リアルタイム RT-PCR の評価

増幅産物を検出するためのプローブは

スプライシング部位を跨ぐように設計した (Fig.2)。100 倍に希釈した B19V 陽性血漿を感染させた F10 細胞由来の RNA を 10 倍ずつ 10⁷まで PBS で希釈し、リアルタイム RT-PCR 法を行なったところ 10 倍希釈から 10⁷まで直線性が得られ、感染価の検量線を得ることができた。また、非感染細胞由来の RNA、及び 10⁹、10⁸、10⁷、10⁶ コピーの B19-DNA を添加してリアルタイム RT-PCR を行っても増幅は認められなかった。

2)リアルタイム RT-PCR を用いた液状加熱による PV B19 不活化評価

増幅が得られた場合を感染性陽性として検討した。Fig.3 に示すように、2 時間以上の液状加熱によって 5Log の不活化効果が認められた。不活化の効率、従来の nested RT-PCR から得られた結果と同じであった。

D. 考察

NAT ガイドライン改定に向けた検討で、HCV、HBV、HIV のみならず試行的に NAT 検査が実施されている HEV や PV B19 にも適用可能な改定を提案し、さらにリアルタイム PCR や Multiplex PCR など検査の現状をできる限り取り込む記載にした。さらに、検査溶液のみを添加するだけで解析可能なプレミックス試薬キットや、抽出から測定まで自動化された機器が多数使われている現状に合わせた記載とすることを提案している。このような検査手法は、多くの場合、キットメーカーが知的財産権の観点から試薬の組成やプライマー、プローブ配列が非公開である場合が多く、キットの変更等の情報が必ずしも十

分に得られない可能性があることから、キットメーカーと情報の共有についてあらかじめ取り決めを行う等の体制の構築を推奨している。

今回の改正では、NAT 技術のウイルスクリアランスへの適用やシングル NAT の要件については十分に検討できていない。今後の取り組みが求められる。

一方、PV B19 参照パネルの共同研究では、得られた結果を基に統計処理を行い、Table 3 に示すような単位を決定した。本参照パネルを用いることにより、ジェノタイプ 1 とジェノタイプ 2 についての各施設の感度と評価に利用されることが期待される。なお、参照パネルの表示力価及び 95%信頼区間は測定の際の参考情報として提示するものである。WHO 国際標準品に基づいて力価を定めた国内標準品は別に制定されており、本パネルをもって国内標準品に代えるものではない。

また、PV 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。その一方で、PV B19 感染では感染によって中和抗体が産生され、PV 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 PV 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 B19V 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から、米国では 10^4 IU/mL 以下を原料

血漿の規格値としている。経験からではなく、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、これまで PV B19 の感染性の評価を行ってきたが、RNA の抽出、RT 反応、1st-PCR、2nd-PCR、電気泳動による特異的なバンドの確認の行程があり、RNA 精製後、結果が得られるまで 6 時間を要した。これをリアルタイム RT-PCR で実施すると 2.5 時間で結果を得ることができた。PCR の操作が 1 回しかないため操作中のコンタミのリスクを減少させることもできる。また、増幅産物を取り扱うことがないので、測定室等を汚染させる可能性も減少させることもできる。

感染細胞と共に多量の PV B19 が検体に混入しているため、精製した RNA に v-DNA が混入し、スプライシングされていない PV B19 のゲノムを増幅しないようなプライマーとプローブを設計することがこの測定系を確立するためのポイントとなる。従来法を確立する段階で、PV B19 のゲノムを増幅しないでスプライシングされた RNA のみを増幅できるプライマーの検討を行っていたことが大いに役立った。スプライシングされる部位を跨ぎ、プローブの機能に支障をきたさない塩基配列を有するプローブを作製することができた。

作製した系を用いて PV B19 の感染性を評価したが、スプライシングされた RNA を定量するため、従来法で感染価が判明している血漿を 10^8 /mL として感染価を測定したが、陽性血漿を 100 倍希釈して感染させた細胞由来の RNA は、1 倍希釈や 10 倍希釈では検量線から外れてし

まい定量性はなかった。それ以上に希釈した RNA では定量性が認められた。さらに陽性血漿を種々に希釈してから細胞に感染させ、それぞれの細胞中のスプライシング RNA を定量すると、誤差が大きいがある程度の定量性が認められた。今回の測定系では、検体を種々に希釈して感染させることで感染価を求めたが、感染細胞内のスプライシング RNA の値から、コントロールと比較して不活化や中和活性が求められるようになると検体数が大幅に減少し、利便性が高い測定法になると考えられた。

E. 結論

我が国の現行の NAT ガイドラインの改定すべき点について NAT 試験を担当されている専門家を含めた研究班を組織しし、検討を進めた。その結果、1) 最終製品での NAT 検査の要否についての記載の削除、2) 適用するウイルスの範囲、3) 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・設備要件に関する記載事項の整備、4) 定量的 PCR や Multiplex PCR などの最新技術の取り込みなどについて改正案を提示した。

また、NAT の精度管理に用いる PV B19 の参照パネルを樹立し、力価を設定した。

さらに、PV B19 の中和活性や不活化効率を評価するために、リアルタイム RT-PCR 法を用いた感染性の評価法を確立した。従来の方法では、RNA 精製後に最終的な結果が得られるまで試薬の調製を含め約 6 時間を要したが、新たに確立した測定法では 2.5 時間で従来法と同等の感度で

感染性を検出することができた。

G. 研究発表

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh,S. Hiruta,Y., ashii,N., Fujita,N., Natsuga,T., Hattori,T., Bandoc,A., Sekimoto,Y., Miyata,K., Namekawa,H., Mabuchi,K., Sakai,T., Shimahashi,H., Kawai,K., Yoden,H., Koyama,S., Odgaard Herr,S., Natsuka,S., Yamaguchi,T., Kawasaki,N.: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press
- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス (印刷中)
- 5) 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..115, 104-110. (2013)
- 6) Baylis,SA,Blumel,J,Mizusawa,S, Matsubayashi,K, Sakata,H, Okada,Y, Nubling,CM, Hanschmann,KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize Assays for detection of hepatitis E Virus RNA. Emerg.Infect.Dis. 19(5):729-735.(2013)
- 7) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発. 検査と技術、42、pp4-7、(2014)
- Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium **Soul Korea**, (2013)
- 2) 岡田義昭、水沢左衛子、浜口功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第61回日本輸血・細胞治療学会、横浜 (2013)
- 3) 岡田義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸 (2013)
- 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

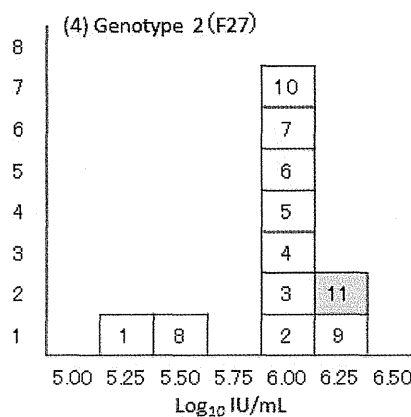
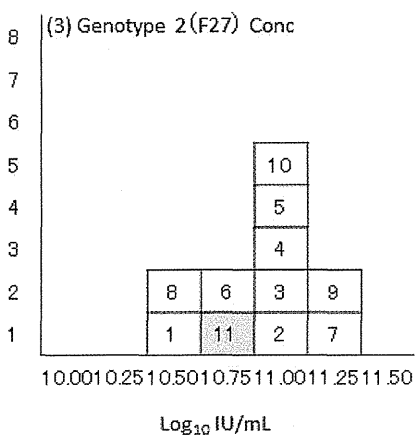
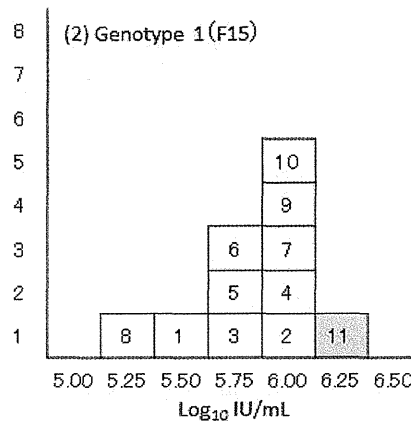
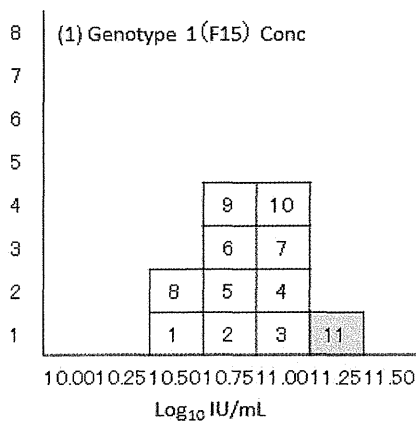
G-2 学会発表

- 1) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.:

Table 1 PV B19 参照パネルの力価測定で用いられた試験法と施設数

NAT の方法	定量 NAT : 10 施設 定性 NAT: 1 施設
核酸抽出法	Cobas s201 NAT system 4 施設 QIA Symphony Virus/Pathogen mini kit 2 施設 SMI-TEST EX R&D 3 施設 MagNA Pure 96 system 1 施設 QIAamp MinElute virus spin 1 施設
核酸増幅法	Cobas TaqScreen DPX test 4 施設 Artus parvo B19 1 施設 RealStar ParvoB19 PCR kit 1 施設 マイテストパルボウイルス B19 遺伝子定性キット Ver2 1 施設 In house 4 施設

Fig.1 Histograms of the potencies of each panel member relative to the 2nd International Standard (99/802)



(Results from quantitative assay is shown as gray box.)

Table 2 Overall means and inter-laboratory variation for potencies of panel members relative to 2nd International Standard (09/802)

samples	Assay Type	N	Overall Mean log ₁₀ IU/mL	Std. Dev.	Min.	Max.	Range	95% Confidence Interval log ₁₀ IU/mL	
(1)B19-G1 F15conc	Quant.	10	10.77	0.16	10.44	10.92	0.48	10.67	10.87
	All	11	10.82	0.22	10.44	11.30	0.86	10.69	10.95
(2)B19-G1 F15	Quant.	10	5.78	0.20	5.35	5.96	0.61	5.66	5.91
	All	11	5.82	0.23	5.35	6.22	0.87	5.69	5.96
(3)B19-G1 F27conc	Quant.	10	10.86	0.27	10.40	11.15	0.75	10.69	11.03
	All	11	10.85	0.26	10.40	11.15	0.75	10.69	11.00
(4)B19-G1 F27	Quant.	10	5.89	0.28	5.32	6.20	0.88	5.72	6.06
	All	11	5.92	0.29	5.32	6.25	0.93	5.74	6.10

Table 3 PV B19 参照パネルの力価

パルボウイルス B19 参照パネル (ラベル表記)	容量 (mL)	表示力価 (IU/mL)	95%信頼区間 (IU/mL)
Genotype 1 高濃度サンプル (B19-G1 F15conc)	0.5	6.6×10^{10}	$4.9 \sim 8.9 \times 10^{10}$
Genotype 1 低濃度サンプル (B19-G1 F15)	0.5	6.6×10^5	$4.9 \sim 9.1 \times 10^5$
Genotype 2 高濃度サンプル (B19-G2 F27conc)	0.5	7.1×10^{10}	$4.9 \sim 10.0 \times 10^{10}$
Genotype 2 低濃度サンプル (B19-G2 F27)	0.5	8.3×10^5	$5.5 \sim 12.6 \times 10^5$
陰性コントロール血清 (B19 Negative control)	0.5	-	-

原料：ヒト血漿

HIV-RNA, HAV-RNA, HBV-DNA, HCV-RNA, HEV-RNA, HbsAg, Anti-HIV, Anti-HCV, Anti-HEV, Anti B19 IgG のいずれも陰性

保存温度：-80℃ BSL2

注：参照パネルの表示力価及び 95%信頼区間は測定の際の参考情報として示すものであり、本パネルをもって国内標準品に代えるものではない。

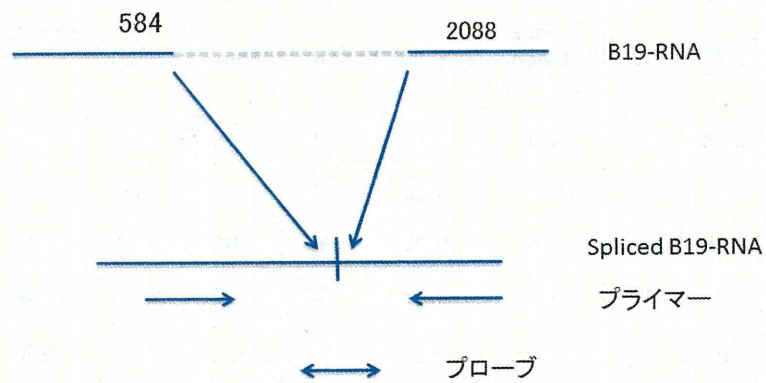


Fig.2 プライマーとプローブの位置

希釈	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1
0 h	—	+	+	+	+	+	+
1 h	—	—	—	—	+	+	+
2 h	—	—	—	—	—	—	+
6 h	—	—	—	—	—	—	+
10h	—	—	—	—	—	—	—

Fig.3 B19の液状加熱による不活化

<参考資料1>ガイドライン改正案（修正箇所マーク付）

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(改正案)

1. ガイドラインの目的及び適用範囲

1-1) 目的

ウイルス遺伝子の検出法として用いられる核酸増幅検査（Nucleic Acid Amplification Test、以下「NAT」という。）は、主として目的とするウイルス遺伝子の有無を陽性又は陰性として判定する定性的な検査手法であり、**数分子から数十分子**のウイルス遺伝子の検出が可能とされている。特に、このような微量のウイルス遺伝子の検出が要求される NAT をスクリーニング検査として用いる場合、検出感度等に係る精度管理が適切に行われていることが極めて重要である。

本ガイドラインは、血液製剤の安全性確保を目的として NAT を行う場合において適切な精度管理が実施されるよう、検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策等に関する基本事項を示すことを目的とするものであり、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン（平成 11 年 8 月 30 日付け医薬発第 1047 号）」を補完するものとして位置付けられるものである。

なお、血漿分画製剤の製造工程におけるウイルスクリアランスを評価する場合や国際あるいは国内ウイルス標準品から自社の標準品を作製する場合など、ウイルス遺伝子の定量的な検出にも NAT は利用されることがある。このため、本ガイドラインにおいては、NAT は原則的に定性的な検査法として用いられるものとして記載しているが、必要に応じ定量的に用いる際に考慮すべき必要事項についても言及することとしている。

1-2) 適用範囲

本ガイドラインは、国内で使用されるすべての輸血用血液製剤及び血漿分画製剤に係るドナースクリーニング検査、原料血漿の製造工程への受入れ時の試験、さらには必要に応じて行われる血漿分画製剤の製造過程における工程内管理試験におけるウイルス検査として NAT を行う場合に適用されるものであるが、他のヒトあるいは動物から抽出した生物由来の医薬品についても参照することができる。また、対象となるウイルスは、主としてヒト免疫不全ウイルス（HIV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）及び B 型肝炎ウイルス（HBV）であるが、その他のウイルスについても試験系の開発や感度・精度のバリデーションに適用することができる。

2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策

ウイルス遺伝子の検出を目的として定性試験である NAT を採用する場合、その分析法を

検証するための重要な項目は特異性と検出感度である。特に、プール血漿やミニプール血漿のスクリーニング検査に NAT を採用する場合には、特異性と検出感度が一層重要なものとなる。特に、検査機関等において、NAT を恒常的に実施し検査法として確立するには、ウイルス遺伝子の抽出、目的塩基配列の増幅、検出、定量、及びこれらを行うための機器の設定と試験に関する最適化した規格・基準を定めておく必要がある。

さらに、NAT の場合、分析条件の小さな変動が結果に大きな影響を与えることもあるため、分析法の頑健性についても、分析条件を小さい範囲で変化させても測定値が影響されないという信頼性を示すことで評価する必要がある。具体的には、塩化マグネシウム、プライマー、dNTP のような試薬の濃度を小さい範囲で変動させて最適な条件を求めるなど、試験法を確立していく過程で示すことができる。市販キットを用いる場合には、これらのデータについては、試薬製造メーカーのデータをもって代えることができる。

頑健性を示すための具体的方法には、例えば陰性試料（目的とするウイルスが陰性のプール血漿、あるいは試験を行うのと同様の組成の試料）及び陽性試料（目的ウイルスが陰性の血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の試料に検出感度（95%の確率で検出されるウイルス量）の 3 倍量のウイルスをスパイク（添加）したものを、それぞれ少なくとも 20 検体を用いて試験を実施し、すべての陰性試料が陰性となり、すべての陽性試料が陽性となることによって示すことができる。ウイルス遺伝子の抽出前に超遠心を使用する方法などでは頑健性に関して特に注意を払う必要がある。この場合、可能であれば目的とするウイルスに対する特異的抗体陰性のウインドウ期の複数の血漿を使用して試験することにより示すことができる。

一方、一つの NAT 反応系で複数のプライマー／プローブを同時に使用することにより複数のウイルスや遺伝子構造の大きく異なる複数のジェノタイプを同時に検出するマルチプレックス NAT が実施されることも多い。マルチプレックス NAT では、複数のプライマー／プローブを使用することから温度やプライマー濃度などの増幅条件の最適化や非特異反応防止のための条件設定が煩雑とされている。この場合、個々のウイルスやジェノタイプごとに検出感度等のバリデーションが十分になされている必要がある。また、対象とする検体に複数のウイルスが存在する場合、NAT の増幅反応で dNTP の取り込みの競合が起きる可能性があり、目的とするウイルス全てに対して十分な検出力を持つかについても検討を行っておくこと。

またマルチプレックス NAT で陽性反応が出た場合のウイルス種確認のための試験法を規定しておく必要がある。

2-1) 施設・設備の整備等に関する事項

NAT は、数分子から数十分子のウイルス遺伝子を検出できるため、増幅産物による汚染等に細心の注意を払う必要がある。このため、NAT に用いる施設については、原則として

下記の条件を満たしていることが望まれる。(*1)

①試薬の保管場所及び試薬の調製場所

可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと。

②核酸抽出を行う場所

可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと

③ 核酸増幅を行う場所

可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと。

④ 増幅産物の検出を行う場所

増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋とを区別すること。

一方、NAT に用いる緩衝液、酵素、プライマー／プローブ等をあらかじめ混合した調製済み試液を使用したり、さらにその試液を反応容器に充填してキット化された製品が広く利用されるようになってきている。このようなキット製品と閉鎖系のウイルス遺伝子の自動抽出装置や自動反応装置を利用して NAT を行う場合には、上記のような独立した施設・設備を必ずしも使用する必要はない。但し、このような自動反応装置を使う場合であっても機器からの廃液等による汚染についても十分考慮すること。特に複数の機器を同時に使用している場合、機器間の交差汚染に対して十分な対策をとっておくことが求められる。

また、NAT では、感染性のある標準品や陽性試料を取り扱うことから、試験・検査は、製造区域とは明確に区別された場所で行うことが必要である。

2-2) 機器、器具の保全、管理に関する事項

ピペット、サーマルサイクラーの校正等、機器操作による検査結果の変動に関して評価を行うこと。この評価に加え、分析法全体の有効性と信頼性について評価を行うこと（システム適合性試験）。また、重要な装置（例えば自動抽出機やサーマルサイクラーなど）を何台か使用する場合、検査精度の確保及び試験方法の標準化に準じ各装置のバリデーションを行っておくこと。機器のシステム適合性としては、検出の確認や検出の再現性があげられる。

2-3) (被験) 検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事項

① 検体の移送・保管に関する事項

検体の移送あるいは保管中の温度等が NAT の結果に与える影響についてあらかじめ評価をしておくこと。また得られた結果に基づいて、移送や保存中の温度等について条件設定をしておくこと。

また凍結保存を行う場合には、凍結融解が NAT の結果に及ぼす影響について評価して