

おくこと。

## ② 試薬の保管・管理に関する事項

核酸の抽出や NAT に用いる試薬について、後述する品質確保の他、保存期間中の安定性について評価を行いその実測値に基づいて保存条件を決めておくこと。

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って代えることもできるが、キット内容が変更された場合に変更内容の情報提供がされる対策が求められる。また必要に応じて性能の確認を行うべきである。(\*2)

## 2-4) 核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項

### ① 抽出に関する事項

スパイク実験等により、用いる抽出法について評価を行うこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることもできるが、キットの性能通りの抽出が行えることを確認しておく必要がある。またキット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

### ② プライマー及びプローブに関する事項

プライマー及びプローブ（以下「プライマー等」という。）は核酸検出系の中心的役割を果たしており、その品質が NAT の重要な要素となっている。このため、選択したプライマー等の科学的合理性を説明できることが必要であり、プライマー等の大きさ、GC 含量、 $T_m$  値、想定されるヘアピン構造や 2 次構造についての情報を明らかにしておくとともに、次のような情報も明らかにしておくこと。

- ・ 目的とするウイルス遺伝子（亜）型（ジェノタイプ）等 (\*3) への対処として、採用しようとしている NAT が目的とするウイルスについてできる限り多くのサブタイプ／バリエーションを検出できるようにデザインされていることを示す情報。
- ・ 検出しようとするウイルス遺伝子の最も共通する塩基配列の選択等、どのように複数のサブタイプ／バリエーションを検出できるようにしているのかを説明する情報。
- ・ 使用濃度等の条件設定に関する情報

血清学的試験により陽性となった検体を含めて陽性検体のウイルスゲノムの解析を適宜実施することが有用である。ウイルスゲノムの変異を検出した場合には、使用しているプライマー／プローブによる検出能について再評価を行うことが求められる。また必要に応じてプライマー／プローブの再設計を考慮すること。例えば複数の遺伝子配列をターゲットとする Dual target PCR なども考慮すること。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができるが、キットの性能通りの感度でウイルスゲノムの検出が可能なことを確認しておくことが求められる。またキット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

### ③ プライマー等の純度、ロット間差等の品質の確保に関する事項

プライマー等の純度について適切な測定法を用いて解析し、解析結果を示すとともに、必要に応じてその規格値を定めておくこと。さらに、プライマー等の最適用量について、段階的希釈法での検出能を指標とするなどして解析するとともに、ロット間の均一性についての情報や、複数のロットの合成プライマー等の特性解析結果やイールド等についての詳細な情報を明らかにしておくこと(\*4)。なお、プライマー等の化学修飾を行う場合には、その詳細に係るデータを含む説明資料を作成しておくこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができるが、キット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

### ④ 使用する酵素の品質の確保に関する事項

NAT に用いるすべての酵素について、その由来と機能を明らかにしておくこと。酵素の純度、力価、比活性について受入れ規格を定めておくこと。調製した酵素について、エクソヌクレアーゼ活性、DNA 及び RNA 依存性のポリメラーゼ活性等を明らかにしておくこと。市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

### ⑤ 受入れ基準の設定

試薬や反応液の受入れ規格を、適切な評価に基づいて作成しておくこと。

## 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

### ① 特異性の確認 (目的とするウイルス遺伝子の検出)

NAT における特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、目的とするウイルス遺伝子を確実に検出する能力をいう。NAT の特異性は、プライマーの選択、プローブの選択 (最終産物の検出に関する)、試験条件の厳密さ (増幅及び検出工程の両方) に依存している。プライマー等をデザインする際には、用いるプライマー等が目的とするウイルス遺伝子を特異的に検出できるとする根拠を示せること。



さらに、検出しようとするウイルス核酸の塩基配列については、遺伝的によく保存されている配列が用いられる。検出しようとするウイルス遺伝子の塩基配列、GC 含量の程度、さらには長さなどについて科学的合理性を説明できる必要がある。また、複数種のジェノタイプ等を検出できる根拠を、説明できること。定量的なアッセイを行う場合には、プライマー等のデザインと定量のための標準品の性質について説明できること。(\*5)

## ② 交差反応性（非特異的反応）の排除

類似ウイルスへの交差反応性の可能性についても特に注意すること。この場合、公開されているデータバンクにより、選んだ全ての塩基配列をデータ検索する方法が有効である。さらに、解析に用いたソフト、解析条件についても説明できること。なお、多くの場合、プライマー等を設計する際には、遺伝的によく保存されているウイルス遺伝子の領域が用いられる。(\*4)

## 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、塩基配列解析、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。増幅した産物は、ネステッド・プライマーによる増幅、制限酵素による解析、シータエンシングあるいは特異的なプローブによるハイブリダイゼーション等の方法によって確実に同定できることを示すこと。

NAT により目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できる能力はプライマー等、反応条件に依存する。これは適切な参照パネルを使用することによって証明すること。

プライマー等が非特異的な反応を示さないことを評価するために、例えば陰性の血漿又はミニプール血漿、100 検体を対象とするか、あるいは可能な限り多くの陰性検体を対象として試験を実施し、陰性結果が得られることを確認し、記録を保存しておくこと。またリアルタイム PCR による NAT ではできる限り多くの陰性血漿ないしは陰性ミニプール血漿を用いて評価を行い、後述するカットオフ値の妥当性を示すこと。

### ・ ウイルス遺伝子（亜）型（ジェノタイプ）等 (\*3) に対する検出感度

複数のジェノタイプ等のウイルスパネルを用いて試験を行い、各ジェノタイプ等に対してどれほどの検出能があるか評価しておくべきである。ウイルスパネルの選択にあたってはウイルスの分布と流行に関する地理的な疫学データ等を参照すること。(\*5)

## 2-6) 検出感度に関する事項

### ① 検出感度

検出感度とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量で、定量できるとは限らない量のことをいう。NAT によるウイルス否定試験は通常、定性試験であっ



て、結果は陰性か陽性のいずれかである。NAT では 95%の確率で検出される検体一定量あたりのウイルス遺伝子の最低量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。検出感度は、検体中のウイルス遺伝子の分布や酵素の効率などの因子により影響され、個々のウイルス NAT でそれぞれの検出感度が存在する。

## ② 検出感度の求め方

### ・希釈系列の作製

標準品の希釈系列を作製すること。希釈液の数を処理しやすい数にするためには、予備試験（例えば指数系列での段階的な希釈液を作製するなど）を行い予備的な陽性検出感度値（すなわち陽性シグナルが得られる最大希釈倍率）を決定する。本試験の希釈範囲は、予備的な検出感度値付近を選択する（希釈液として陰性血漿を用い、希釈率として 0.5log またはそれ以下を使用する）。あるいはバリデートされた定量的 NAT を用いることも可能である。95%の確率で検出されるウイルス遺伝子の量は適切な統計学的手法等により算出し、その妥当性について説明できること。

検出感度を求めるためのウイルス標準品等の希釈では、通常の被検検体からの抽出と同じ条件での抽出を行うために、例えば検体が血漿であれば陰性血漿を用いた希釈系列の作製を行う必要がある。

NAT において、各試験の精度や感度を管理するためには標準品あるいは標準物質（参照品）が必須である。通常、NAT の開発過程において、ウイルス濃縮、核酸の抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、定量、汚染をモニターするためには、ウイルス標準品又は参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

ランコントロールとしては、95%の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含む陽性コントロール（~~striketrough~~:標準検体）を用いることが推奨される。試験では、この陽性コントロール（~~striketrough~~:標準検体）は必ず陽性にならないといけない。このように陽性コントロール（~~striketrough~~:標準検体）を用いることにより、各試験の成立をモニターすることが可能となる。

一方、NAT 関連技術の向上により NAT でのウイルス検出が非常に高感度化されてきているため、95%の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含むランコントロールは極めて低濃度で調製が容易でない場合もある。このためにランコントロールの設定として、例えば HBV、HCV、HIV を対象とした NAT で検出感度が極めて高いウイルスに関しては原則的に 100IU/mL 以下で、かつ再現性良く試験が成立する最小のウイルス標準検体をランコントロールとして設定することも可能である。

### ・3 回以上の独立した試験の実施

少なくとも 3 つの独立した希釈系列を用い、十分な回数の試験を繰り返し、各希釈段階での総試験回数が 24 になるように試験を実施する。例えば、3 つの希釈系列を別々の日に

8 回行う、4つの希釈系列を別々の日に6回行う、6つの希釈系列を別々の日に4回行うなどである。これらの結果は試験法の日差変動を示す役目も果たしている。

・使用する標準品

- ① 国際標準品
  - ② 国際標準品とのデータの互換性が保証された国内標準品
  - ③ 国際標準品又は国内標準品に対して校正された自社標準物質等（参照品）
- のいずれかを使用すること。

なお、ウイルス量の表示は国際標準品が制定されている場合はIUでの表示が望ましい。

バリデーション試験が実施された自動抽出装置や自動反応装置を用いる場合には、機器の製造メーカーが実施したバリデーション試験を引用することも可能であるが、導入に当たっては各施設で機器の性能が担保されていることを確認する試験を行う必要がある。

#### 2-7) 交差汚染がないことの評価

交差汚染が防止できていることを示すために、陰性プール血漿と陰性プール血漿に高い濃度で目的とするウイルスをスパイクした陽性検体（濃度としては95%の確率で検出されるウイルス量の100倍量以上）について、少なくとも20検体をランダムに配置するなどして、試験することにより確認しておくこと。（\*6）

#### 2-8) 判定基準の設定に関する事項

① 陽性及び陰性の判定基準の文書化

陽性及び陰性の判定基準を文書化しておく必要がある。

② 再試験を行う時の基準及び判定基準の文書化

再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておく必要がある。例えばミニプールで陽性反応を検出したにもかかわらず個別検体では全て陰性であった場合の対応について明確にしておくこと。

#### 2-9) 従事者の技術の標準化と向上に関する事項

NATは、数分子から数十分子のウイルス遺伝子の検出が可能とされる高感度検査であるため、操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。市販のキットを試験法の一部または全てに使用する場合で、キットの製造元で実施されたバリデーション資料がある場合はユーザーによるバリデーションデータに加えることができる。しかし、その目的に応じたキットの性能を示す必要がある。



例えば、二人以上の者が試験を実施する場合、試験者ごとに、目的とするウイルスの陽性コントロール（95%の確率で検出される検出感度の3倍量の標準品あるいは標準物質等を陰性プール血漿あるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料にスパイクしたもの）について試験を実施すること。この試験（8本の試験検体）を別々の日に3回繰り返すこと（すなわちのべ3日の試験により計24試験が実施されることになる）。その結果が全て陽性になることを確認し、結果を保存しておくこと。

#### ① 作業手順の標準化と作業手順書の作成

NATは分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の要因の影響を受け易いので、試験操作法を標準化し、正確な作業手順書を作成すること。作業手順書には以下の項目を含むものとする。

- ・ サンプルングの方法（容器の種類等）
- ・ ミニプールの調製方法
- ・ 試験までの保存条件
- ・ 交叉汚染やウイルス遺伝子・試薬・標準検体（陽性コントロール）の劣化を防止するための試験条件の正確な記述
- ・ 使用する装置の操作方法と保守についての正確な記述
- ・ 統計解析を含む結果の詳細な計算式

#### ② 検査従事者を対象とした教育・訓練、技能検査の実施

NATの恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT従事者に対して教育・訓練を行うとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

#### ③ 作業記録の作成、保管・管理

作業記録を作成し、必要に応じ照会できるよう必要な期間にわたって適切に保管・管理を行うこと。

### 2-10) 汚染防止に関する事項

#### ① 試験操作中の器具などを介した汚染の防止策

試験操作中において器具などを介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ② 着衣、履物等を介した汚染拡大の防止策

着衣、履物等を介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ③ 増幅産物の飛散等による汚染の防止策

増幅産物の飛散による汚染の防止策を講じておく必要がある。

バリデーション試験が実施された自動抽出装置や自動反応装置を用いることにより閉鎖系としてウイルス遺伝子の抽出・増幅・検出が行える場合には、これらの対応が必ずしも必要というわけではない。ただしそれ以外に、不測の事態・不具合が起こったとき等、機器の性能が担保されていることを確認すること。また、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。

### 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

NATで「陽性」と判定した際に、取るべき手順を文書化しておくこと。

#### 3-2) 「陰性」と判定した結果の意義

NATで「陰性」と判定した結果について、検出限界を考慮したその意義を考察しておくこと。また、他の事由から結果が偽陰性の可能性がでてきた場合、取るべき手順を文書化しておくこと。

#### 3-3) 必要とされる検出限界値 (\*7) について

必要とされる検出限界値については、対象となるウイルス毎に別途に示す。

### 4. 新技術の導入に関する事項

NAT 及び NAT 関連技術の進歩は急速であるため、可能な限り最新の科学的水準に基づいた技術導入を図ること。なお、その際には、導入される新技術について適切な評価を行っておくこと。



(付 録)

【用語集】

○ 標準品

国際的ないしは国内の公機関によって制定された国際標準品あるいは国内標準品

○ 標準物質 (参照品)

標準品に対して校正された標準となる物質

#### 注意事項\*1

「原則として下記の条件を満たしていることが望まれる」とは、自動化された閉鎖系での抽出装置を用いるなど、交差汚染を防ぐ装置が用いられていたり、調製済みのキット製品等が採用されている場合などでは、「下記の条件」を満たすことが可能な場合もあることを意味している。この場合、そうした対策の妥当性を説明するとともに、必要に応じて交差汚染防止が十分に成されていることを示すデータの提示が求められるであろう。

#### 注意事項\*2

2-3) 及び 2-4) 等で、試薬製造メーカーのデータを提出することによって必要とされるデータに代えようとする場合にどの程度のデータが必要とされるかは、採用しようとしている試験法等に依存するためにケースバイケースで判断する必要がある。しかし、少なくともガイドラインの趣旨に添ったデータが提出される必要があり、もし十分なデータが試薬製造メーカーによって提供されない場合には、各申請者が必要なデータを作成しなくてはならないケースも想定される。また企業の知的財産等の関係で試薬製造メーカーから全てのデータが申請者に提出されない場合、診断薬等としてすでに承認を受けている場合には、その承認書に関するデータを試薬製造メーカーより直接規制当局へ提出するか、あるいはドラッグマスターファイルに準じた取り扱いが必要となると考えられる。但し、診断薬としての承認に必要とされるデータと血漿分画製剤の NAT において必要とされるデータは必ずしも同一ではない可能性があり、追加のデータが必要となることも考慮すべきである。

#### 注意事項\*3

遺伝子型の分類として、HBV と HCV ではジェノタイプが、HIV については主としてサブタイプという表現が使用されている。HIV のサブタイプ等とは HIV-1 M グループ内の各サブタイプ、HIV-1 のその他のグループ及び HIV-2 等の広義の HIV 遺伝的変異を包括する。ここでの記載の目的は、NAT によるウイルス遺伝子の検出に当たって、ウイルス遺伝子の塩基配列の差異によらず、できる限り多くのジェノタイプやサブタイプ等を検出できることを示すことを求めているものである。従ってここでは、それらを全て包含することを目



的として「等」としている。

#### 注意事項\*4

ここで述べられている詳細な情報とは、プライマー等の特性解析結果としての純度、最適  
量、ロット間の一定性等を含めた情報であり、さらにロット間のイールド等のデータも含  
めて情報を明らかにしておくことにより、イールド等がその基準に達しないときには製造  
されたプライマーの品質が何らかの問題がないか検討する必要性を指摘したものである。

#### 注意事項\*5

2-5)試験の最適化と特異性の確認や 2-6) 検出感度は NAT によるウイルス検出の根幹であ  
り、市販試薬等でその製造メーカーからの情報ではその妥当性が立証されない場合が想定  
され、必要に応じて複数のウイルスジェノタイプ等の検出能や、国内あるいは国際標準品  
を用いた検出感度の評価が必要になることもあると思われる。この点に関して、試薬製造  
メーカーからガイドラインで求められている程度に必要なデータが提供される場合に  
は、それで代えることも可能である。

#### 注意事項\*6

陰性血漿とウイルスをスパイクした血漿を合わせて 20 本以上を適切な比率でならべて試験  
を行う。具体的な比率については自動化された機器をもちいるのか、用手法によるのか等  
によって異なると考えられる。

#### 注意事項\*7

NAT による検出感度について、安全技術調査会で議論を行い、輸血用血液製剤のプール前  
の原血漿に対して HCV、HBV については 2000IU/mL、HIV については 4000IU/mL とす  
るとの結論を出している。なお、血漿分画製剤については、プール後の原料血漿の NAT の  
検出限界が 100IU/mL を担保できるべく精度管理を行うこと。

## ＜参考資料2＞ガイドライン改正案

### 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



おくこと。

## ② 試薬の保管・管理に関する事項

核酸の抽出や NAT に用いる試薬について、後述する品質確保の他、保存期間中の安定性について評価を行いその実測値に基づいて保存条件を決めておくこと。

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って代えることもできるが、キット内容が変更された場合に変更内容の情報提供がされる対策が求められる。また必要に応じて性能の確認を行うべきである。(\*2)

## 2-4) 核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項

### ① 抽出に関する事項

スパイク実験等により、用いる抽出法について評価を行うこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることもできるが、キットの性能通りの抽出が行えることを確認しておく必要がある。またキット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

### ② プライマー及びプローブに関する事項

プライマー及びプローブ（以下「プライマー等」という。）は核酸検出系の中心的役割を果たしており、その品質が NAT の重要な要素となっている。このため、選択したプライマー等の科学的合理性を説明できることが必要であり、プライマー等の大きさ、GC 含量、 $T_m$  値、想定されるヘアピン構造や 2 次構造についての情報を明らかにしておくとともに、次のような情報も明らかにしておくこと。

- ・ 目的とするウイルス遺伝子（亜）型（ジェノタイプ）等 (\*3) への対処として、採用しようとしている NAT が目的とするウイルスについてできる限り多くのサブタイプ／バリエーションを検出できるようにデザインされていることを示す情報。
- ・ 検出しようとするウイルス遺伝子の最も共通する塩基配列の選択等、どのように複数のサブタイプ／バリエーションを検出できるようにしているのかを説明する情報。
- ・ 使用濃度等の条件設定に関する情報

血清学的試験により陽性となった検体を含めて陽性検体のウイルスゲノムの解析を適宜実施することが有用である。ウイルスゲノムの変異を検出した場合には、使用しているプライマー／プローブによる検出能について再評価を行うことが求められる。また必要に応じてプライマー／プローブの再設計を考慮すること。例えば複数の遺伝子配列をターゲットとする Dual target PCR なども考慮すること。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができるが、キットの性能通りの感度でウイルスゲノムの検出が可能なことを確認しておくことが求められる。またキット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

#### ③ プライマー等の純度、ロット間差等の品質の確保に関する事項

プライマー等の純度について適切な測定法を用いて解析し、解析結果を示すとともに、必要に応じてその規格値を定めておくこと。さらに、プライマー等の最適用量について、段階的希釈法での検出能を指標とするなどして解析するとともに、ロット間の均一性についての情報や、複数のロットの合成プライマー等の特性解析結果やイールド等についての詳細な情報を明らかにしておくこと(\*4)。なお、プライマー等の化学修飾を行う場合には、その詳細に係るデータを含む説明資料を作成しておくこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができるが、キット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる。

#### ④ 使用する酵素の品質の確保に関する事項

NAT に用いるすべての酵素について、その由来と機能を明らかにしておくこと。酵素の純度、力価、比活性について受入れ規格を定めておくこと。調製した酵素について、エクソヌクレアーゼ活性、DNA 及び RNA 依存性のポリメラーゼ活性等を明らかにしておくこと。市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

#### ⑤ 受入れ基準の設定

試薬や反応液の受入れ規格を、適切な評価に基づいて作成しておくこと。

### 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

#### ① 特異性の確認 (目的とするウイルス遺伝子の検出)

NAT における特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、目的とするウイルス遺伝子を確実に検出する能力をいう。NAT の特異性は、プライマーの選択、プローブの選択 (最終産物の検出に関する)、試験条件の厳密さ (増幅及び検出工程の両方) に依存している。プライマー等をデザインする際には、用いるプライマー等が目的とするウイルス遺伝子を特異的に検出できるとする根拠を示せること。



さらに、検出しようとするウイルス核酸の塩基配列については、遺伝的によく保存されている配列が用いられる。検出しようとするウイルス遺伝子の塩基配列、GC 含量の程度、さらには長さなどについて科学的合理性を説明できる必要がある。また、複数種のジェノタイプ等を検出できる根拠を、説明できること。定量的なアッセイを行う場合には、プライマー等のデザインと定量のための標準品の性質について説明できること。(\*5)

## ② 交差反応性（非特異的反応）の排除

類似ウイルスへの交差反応性の可能性についても特に注意すること。この場合、公開されているデータバンクにより、選んだ全ての塩基配列をデータ検索する方法が有効である。さらに、解析に用いたソフト、解析条件についても説明できること。なお、多くの場合、プライマー等を設計する際には、遺伝的によく保存されているウイルス遺伝子の領域が用いられる。(\*4)

## 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、塩基配列解析、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。

NAT により目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できる能力はプライマー等、反応条件に依存する。これは適切な参照パネルを使用することによって証明すること。

プライマー等が非特異的な反応を示さないことを評価するために、例えば陰性の血漿又はミニプール血漿、100 検体を対象とするか、あるいは可能な限り多くの陰性検体を対象として試験を実施し、陰性結果が得られることを確認し、記録を保存しておくこと。またリアルタイム PCR による NAT ではできる限り多くの陰性血漿ないしは陰性ミニプール血漿を用いて評価を行い、後述するカットオフ値の妥当性を示すこと。

### ・ ウイルス遺伝子（亜）型（ジェノタイプ）等 (\*3) に対する検出感度

複数のジェノタイプ等のウイルスパネルを用いて試験を行い、各ジェノタイプ等に対してどれほどの検出能があるか評価しておくべきである。ウイルスパネルの選択にあたってはウイルスの分布と流行に関する地理的な疫学データ等を参照すること。(\*5)

## 2-6) 検出感度に関する事項

### ① 検出感度

検出感度とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量で、定量できるとは限らない量のことをいう。NAT によるウイルス否定試験は通常、定性試験であって、結果は陰性か陽性のいずれかである。NAT では 95%の確率で検出される検体一定量あたりのウイルス遺伝子の最低量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。検出

感度は、検体中のウイルス遺伝子の分布や酵素の効率などの因子により影響され、個々のウイルス NAT でそれぞれの検出感度が存在する。

## ② 検出感度の求め方

### ・希釈系列の作製

標準品の希釈系列を作製すること。希釈液の数を処理しやすい数にするためには、予備試験（例えば指数系列での段階的な希釈液を作製するなど）を行い予備的な陽性検出感度値（すなわち陽性シグナルが得られる最大希釈倍率）を決定する。本試験の希釈範囲は、予備的な検出感度値付近を選択する（希釈液として陰性血漿を用い、希釈率として  $0.5\log$  またはそれ以下を使用する。）。あるいはバリデートされた定量的 NAT を用いることも可能である。95%の確率で検出されるウイルス遺伝子の量は適切な統計学的手法等により算出し、その妥当性について説明できること。

検出感度を求めるためのウイルス標準品等の希釈では、通常の被検検体からの抽出と同じ条件での抽出を行うために、例えば検体が血漿であれば陰性血漿を用いた希釈系列の作製を行う必要がある。

NAT において、各試験の精度や感度を管理するためには標準品あるいは標準物質（参照品）が必須である。通常、NAT の開発過程において、ウイルス濃縮、核酸の抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、定量、汚染をモニターするためには、ウイルス標準品又は参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

ランコントロールとしては、95%の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含む陽性コントロール (strikethrough:標準検体) を用いることが推奨される。試験では、この陽性コントロール (strikethrough:標準検体) は必ず陽性にならないといけない。このように陽性コントロール (strikethrough:標準検体) を用いることにより、各試験の成立をモニターすることが可能となる。

一方、NAT 関連技術の向上により NAT でのウイルス検出が非常に高感度化されてきているため、95%の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含むランコントロールは極めて低濃度で調製が容易でない場合もある。このためにランコントロールの設定として、例えば HBV、HCV、HIV を対象とした NAT で検出感度が極めて高いウイルスに関しては原則的に 100IU/mL 以下で、かつ再現性良く試験が成立する最小のウイルス標準検体をランコントロールとして設定することも可能である。

### ・3 回以上の独立した試験の実施

少なくとも 3 つの独立した希釈系列を用い、十分な回数の試験を繰り返し、各希釈段階での総試験回数が 24 になるように試験を実施する。例えば、3 つの希釈系列を別々の日に 8 回行う、4 つの希釈系列を別々の日に 6 回行う、6 つの希釈系列を別々の日に 4 回行うなどである。これらの結果は試験法の日差変動を示す役目も果たしている。

・使用する標準品

- ① 国際標準品
  - ② 国際標準品とのデータの互換性が保証された国内標準品
  - ③ 国際標準品又は国内標準品に対して校正された自社標準物質等（参照品）
- のいずれかを使用すること。

なお、ウイルス量の表示は国際標準品が制定されている場合はIUでの表示が望ましい。

バリデーション試験が実施された自動抽出装置や自動反応装置を用いる場合には、機器の製造メーカーが実施したバリデーション試験を引用することも可能であるが、導入に当たっては各施設で機器の性能が担保されていることを確認する試験を行う必要がある。

#### 2-7)交差汚染がないことの評価

交叉汚染が防止できていることを示すために、陰性プール血漿と陰性プール血漿に高い濃度で目的とするウイルスをスパイクした陽性検体（濃度としては 95%の確率で検出されるウイルス量の 100 倍量以上）について、少なくとも 20 検体をランダムに配置するなどして、試験することにより確認しておくこと。（\*6）

#### 2-8) 判定基準の設定に関する事項

① 陽性及び陰性の判定基準の文書化

陽性及び陰性の判定基準を文書化しておく必要がある。

② 再試験を行う時の基準及び判定基準の文書化

再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておく必要がある。例えばミニプールで陽性反応を検出したにもかかわらず個別検体では全て陰性であった場合の対応について明確にしておくこと。

#### 2-9) 従事者の技術の標準化と向上に関する事項

NAT は、数分子から数十分子のウイルス遺伝子の検出が可能とされる高感度検査であるため、操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。市販のキットを試験法の一部または全てに使用する場合は、キットの製造元で実施されたバリデーション資料がある場合はユーザーによるバリデーションデータに加えることができる。しかし、その目的に応じたキットの性能を示す必要がある。

例えば、二人以上の者が試験を実施する場合、試験者ごとに、目的とするウイルスの陽性コントロール（95%の確率で検出される検出感度の 3 倍量の標準品あるいは標準物質等



を陰性プール血漿あるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料にスパイクしたもの) について試験を実施すること。この試験(8本の試験検体)を別々の日に3回繰り返すこと(すなわちのべ3日の試験により計24試験が実施されることになる)。その結果が全て陽性になることを確認し、結果を保存しておくこと。

#### ①作業手順の標準化と作業手順書の作成

NATは分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の要因の影響を受け易いので、試験操作法を標準化し、正確な作業手順書を作成すること。作業手順書には以下の項目を含むものとする。

- ・ サンプルングの方法(容器の種類等)
- ・ ミニプールの調製方法
- ・ 試験までの保存条件
- ・ 交叉汚染やウイルス遺伝子・試薬・標準検体(陽性コントロール)の劣化を防止するための試験条件の正確な記述
- ・ 使用する装置の操作方法と保守についての正確な記述
- ・ 統計解析を含む結果の詳細な計算式

#### ②検査従事者を対象とした教育・訓練、技能検査の実施

NATの恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT従事者に対して教育・訓練を行うとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

#### ③作業記録の作成、保管・管理

作業記録を作成し、必要に応じ照会できるよう必要な期間にわたって適切に保管・管理を行うこと。

### 2-10) 汚染防止に関する事項

#### ① 試験操作中の器具などを介した汚染の防止策

試験操作中において器具などを介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ② 着衣、履物等を介した汚染拡大の防止策

着衣、履物等を介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ③ 増幅産物の飛散等による汚染の防止策

増幅産物の飛散による汚染の防止策を講じておく必要がある。

バリデーション試験が実施された自動抽出装置や自動反応装置を用いることにより閉鎖

系としてウイルス遺伝子の抽出・増幅・検出が行える場合には、これらの対応が必ずしも必要というわけではない。ただしそれ以外に、不測の事態・不具合が起こったとき等、機器の性能が担保されていることを確認すること。また、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。

### 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

NATで「陽性」と判定した際に、取るべき手順を文書化しておくこと。

#### 3-2) 「陰性」と判定した結果の意義

NATで「陰性」と判定した結果について、検出限界を考慮したその意義を考察しておくこと。また、他の事由から結果が偽陰性の可能性がでてきた場合、取るべき手順を文書化しておくこと。

#### 3-3) 必要とされる検出限界値 (\*7) について

必要とされる検出限界値については、対象となるウイルス毎に別途に示す。

### 4. 新技術の導入に関する事項

NAT 及び NAT 関連技術の進歩は急速であるため、可能な限り最新の科学的水準に基づいた技術導入を図ること。なお、その際には、導入される新技術について適切な評価を行っておくこと。

(付 録)

【用語集】

○ 標準品

国際的ないしは国内の公機関によって制定された国際標準品あるいは国内標準品

○ 標準物質 (参照品)

標準品に対して校正された標準となる物質

注意事項\*1

「原則として下記の条件を満たしていることが望まれる」とは、自動化された閉鎖系での抽出装置を用いるなど、交差汚染を防ぐ装置が用いられていたり、調製済みのキット製品等が採用されている場合などでは、「下記の条件」を満たすことが可能な場合もあることを意味している。この場合、そうした対策の妥当性を説明するとともに、必要に応じて交差汚染防止が十分に成されていることを示すデータの提示が求められるであろう。

注意事項\*2

2-3) 及び 2-4) 等で、試薬製造メーカーのデータを提出することによって必要とされるデータに代えようとする場合にどの程度のデータが必要とされるかは、採用しようとしている試験法等に依存するためにケースバイケースで判断する必要がある。しかし、少なくともガイドラインの趣旨に添ったデータが提出される必要があり、もし十分なデータが試薬製造メーカーによって提供されない場合には、各申請者が必要なデータを作成しなくてはならないケースも想定される。また企業の知的財産等の関係で試薬製造メーカーから全てのデータが申請者に提出されない場合、診断薬等としてすでに承認を受けている場合には、その承認書に関するデータを試薬製造メーカーより直接規制当局へ提出するか、あるいはドラッグマスターファイルに準じた取り扱いが必要となると考えられる。但し、診断薬としての承認に必要とされるデータと血漿分画製剤の NAT において必要とされるデータは必ずしも同一ではない可能性があり、追加のデータが必要となることも考慮すべきである。

注意事項\*3

遺伝子型の分類として、HBV と HCV ではジェノタイプが、HIV については主としてサブタイプという表現が使用されている。HIV のサブタイプ等とは HIV-1 M グループ内の各サブタイプ、HIV-1 のその他のグループ及び HIV-2 等の広義の HIV 遺伝的変異を包括する。ここでの記載の目的は、NAT によるウイルス遺伝子の検出に当たって、ウイルス遺伝子の塩基配列の差異によらず、できる限り多くのジェノタイプやサブタイプ等を検出できることを示すことを求めているものである。従ってここでは、それらを全て包含することを目