

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3>

血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会 資料

平成26年3月19日

国立医薬品食品衛生研究所

内田 恵理子

パルボウイルスB19 DNA参照パネル候補品の力価の評価

1. 経緯

パルボウイルス B19 (以下 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、キットの幅広い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。これまで、国内では B19 ジェノタイプパネルは整備されていなかったが、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、厚生労働科学研究班によりパネルの樹立を行うこととした。平成24年度第1回の「血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会」では、B19 参照パネル候補品の調製と均一性試験及び保存安定性について報告するとともに、今後、共同検定によりパネルの力価を測定することを報告した。今回、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した。

2. 参加施設

以下の3カ国、11施設（国内9、ヨーロッパ2）が共同検定に参加し、全施設が結果を報告した。内訳は血漿分画製剤製造所及び原料血漿検査所9施設、公的機関2施設である。

国立医薬品食品衛生研究所

国立感染症研究所

一般財団法人 化学及血清療法研究所

一般社団法人 日本血液製剤機構 千歳工場

一般社団法人 日本血液製剤機構 京都工場

日本製薬株式会社 成田工場

日本赤十字社 血液事業本部中央血液研究所

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

日本赤十字社 北海道ブロック血液センター

バクスター株式会社

CSL ベーリング株式会社

なお、参加施設の記載順と報告書及び関連資料中の施設コード番号とは無関係である。

3. 参照パネル候補品の製造

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 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 24 年度第 1 回 NAT 小委員会で報告済)。

4. 配付試料

参加各施設に以下の試料を配付した。

- ・パルボウイルス B19 参照パネル候補品 4 セット
 - 1 セットの内容 (1)Genotype 1 高濃度サンプル(ラベル：B19-G1 F15conc)
 - (2)Genotype 1 低濃度サンプル(B19-G1 F15)
 - (3)Genotype 2 高濃度サンプル(B19-G2 F27conc)
 - (4)Genotype 2 低濃度サンプル(B19-G1F27)
 - (5)陰性コントロール (B19 Negative control)
- ・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
- ・希釈用陰性血漿 (日本赤十字社より供与)

5. 力価の測定

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。

6. 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。

7. 結果

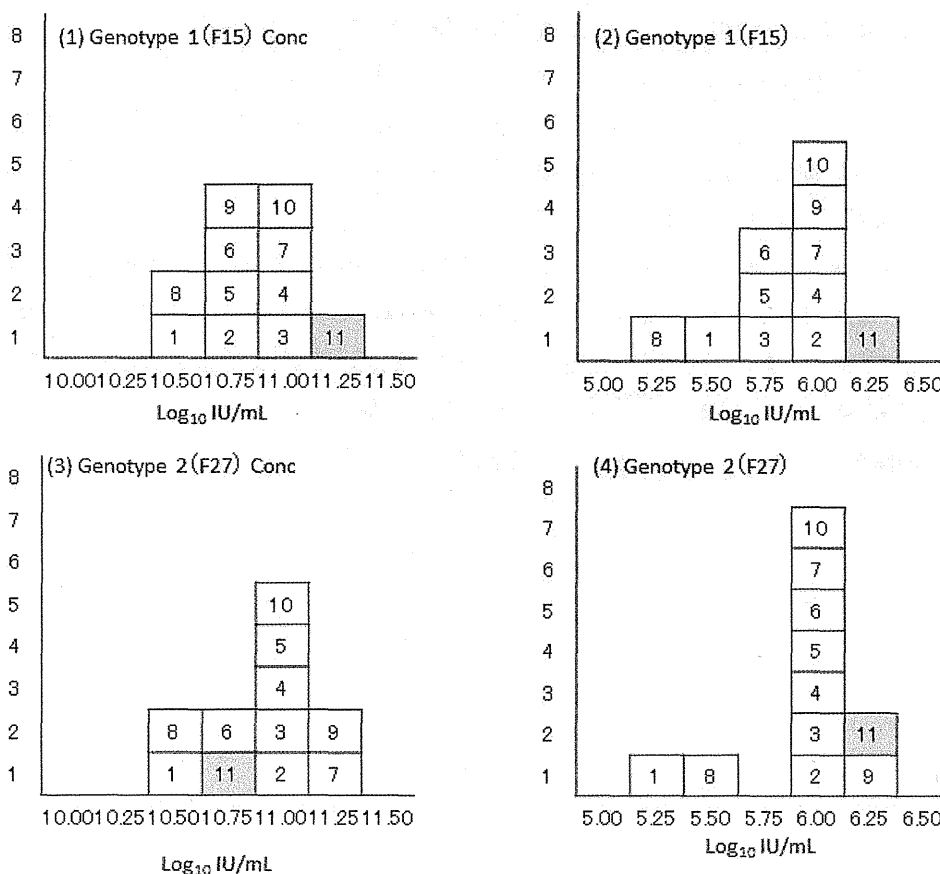
11施設から11組の結果が得られた。10施設が定量 NAT、1施設が定性 NAT を実施した。定量 NAT では、6施設が Real-time PCR 法に基づく市販の試験法で測定し、残りの4施設はそれぞれ異なるプライマーとプローブを用いた TaqMan PCR 法で測定した (Table 1)。

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 0.05Log_{10} (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。

Table 1 実施さ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 マインストパルウイルス 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

8. 結論

本共同研究によって、次の通り B19 参照パネルを樹立し力価を決定した。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。

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。			

謝辞：参照パネル候補品は、株式会社ベネシス（現・般社団法人日本血液製剤機構）の協力により、厚生労働省医薬品・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」班に供与されたものである。本共同研究は、厚生労働省科学研究費補助金により実施された。

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

分担研究者 山口照英（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品）

研究要旨：

本年度は、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)において改正に向けた検討を行った。特に昨年度提案された改正事項について、NAT 小委員会へ提案するために改正案を作成した。

改正案に記載された主な事項としては、1) 全体記載についてコピー数表示から IU 表示に変更すること、2) 適用するウイルスの範囲として HBV、HCV、HIV にのみならず試験的に検査されているウイルスや今後導入されてくる可能性のあるウイルスも含むこと、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・設備用件について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ついて、4) 定量的 PCR におけるカットオフ値の設定、5) Multi-Plex 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。

研究協力者

作業グループメンバー（表 1）

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）が実施される様になり、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が存在し、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たいして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 のウイルス検査についてのガイド

ラインを発出しているが、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。

その一方で、平成 25 年度には NAT のすり抜けによる HIV 感染が起こり、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分かった。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ている。

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を目指した。

本年度は海外の血液製剤のウイルス NAT の規制に関するガイドラインの動向や NAT 関連の公定書に関して特に米国の状況について検討した。これらの検討を通じてウイルス NAT 検査の最新の科学的状況についても整理し、わが国の NAT ガイドライン改定において考慮すべき要件に

についても明らかにすることを旨とした。

B. 方法

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。その解析にも基づいて、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ての対応事項など、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への盛り込むこととした。

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、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を形成し (WG)、現行の NAT ガイダンスの問題点についてどのような改正を行うことにより血液製剤のウイルス安全性に寄与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いる。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 のみならずパルボウイルス B19 や HEV など複数のウイルスに関する NAT 検査が実施されている。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 の適用が増えていっている現状、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。

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 Multi-Plex 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、このようなリアルタイム PCR や Multi-Plex 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盛り込むこととした。

さらに現在米国等、海外で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、パ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。その点を読み取れるような記載とすることとした。

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キットが数多く市販されるようになり、多くの場合、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 は目的遺伝子の一部を増幅することにより数コピーから数十コピーのウイルス遺伝子を検出することができ、非常に高感度にウイルスゲノム検出が可能な試験法である。そのために増幅産物の汚染が起こ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

使えなくなったりする。これは前立腺がんや慢性疲労症候群の原因ウイルスとして X-MuIV とする論文報告での経験からも確認されており、この報告は 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なように、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抽出や検出機器の自動化が進むことにより試薬調製のための独自の施設や検出のための独自の施設が不要とされつつある。従って、改正 NAT ガイドライン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可能と明記されている。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エンドユーザーである血液製剤メーカーが知らない間に変更されるリスクもあることから、情報の伝達等の適切な対応をとることを求めることとした。また、少なくともキット導入時やキットの構成が変更された際には、キットの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適切に情報を得られる体制の必要性に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ウイルスが想定される濃度に入る確立はポアソン分布(1つのウイルスが採取した溶液に入る確立は67%となる)による分配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かなら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最小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/サイ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/サイブタイプの検出能が悪ければ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/サイブタイプの検出ができなければ輸入感染症に対して防御が不完全となってしまう。EU で市販されている診断薬の中で、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くなるような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わ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、もし検出能が十分でなかったり、NAT で検出ができ

ない場合に、ゲノム解析を行うという発想もこめられている。

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 (100 IU/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、参考に示す改正案を取りまとめ、NAT 小委員会に提案した。

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 PVB19 等にも適用可能な改定を提案し、さらにリアルタイム PCR や Multi-Plex 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か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する時間が取れなかった。今後の課題としている。

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 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、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・設備用件について記載事項の整備、4) 定量的 PCR や Multi-Plex 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。

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

G-2 学会発表

- 1) Kishioka, Y., Sakurai, K., Yamaguchi, T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. *APEC International Symposium Soul Korea*, (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

表1 NAT 検討会 WG メンバー

埼玉医科大学	岡田義昭
日本赤十字社血液事業本部	日野 学
日本赤十字社血液事業本部	平 力造
日本赤十字社中央研究所	星友二
日本赤十字社中央研究所	内田茂治
日赤血漿分画センター(旧所属)	広尾 彰彦
化学血清療法研究所	下瀬克郎
日本製薬株式会社	赤石 暁弘
日本製薬株式会社	大野陽一
日本製薬株式会社	小西久郎
日本血液製剤機構	井阪 達也
日本血液製剤機構	宮本尚
日本血液製剤機構	皆木隆男
CSL ベーリング株式会社	平原敬三
バクスター株式会社・	池田 昇司
バクスター株式会社・	田中利明

<参考資料>

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

何台かを使用する場合、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、Tm 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値について、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、結果は陰性が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ければならない。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。

- ・ サンプリングの方法(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、機器間の交叉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。