

201328003B

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23～25年度

総合研究報告書

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23～25年度

総合研究報告書

研究代表者 内田 恵理子

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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-----45
（NAT）の実施に関するガイドライン（コメント）

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-----53
（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-----65
（血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会資料）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 71

III. 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

研究要旨

本研究では、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 年制定の「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て平成 23 年度から 25 年度までの 3 年間研究を実施し、以下の成果を得た。

- 1) ウイルスゲノムの高感度検出手法としての NAT 関連技術の最新動向とその規制に関する研究として、米国食品医薬品局 (FDA) のガイドライン案と米国薬局方 (USP) の General Chapter 等を中心に調査研究を行い、米国における血液製剤の NAT を用いたウイルス安全性確保の動向を明らかにした。
- 2) NAT ガイドライン見直しのために専門家を含めた研究班 (WG) を組織して、現行指針の課題を抽出した。抽出された課題と、1) の調査により明らかにした海外動向等を踏まえてガイドライン改正に向けた検討を行い、NAT ガイドラインの改正案を作成して、血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会 (NAT 小委員会) へ提案した。改正案の主なポイントとして、①最終製品での NAT 検査に関する記載の削除、②ガイドラインの適用となるウイルスの範囲、③市販プレミックス反応キットや自動化機器の利用による施設・設備要件に関する記載の整備、③定量的 PCR や Multiplex PCR などの最新技術導入の注意点、④低濃度のランコントロール設定にあたっての注意点、⑤検出機器のシステム適合性、⑥ウイルスの変異に関する適切なモニタリングの必要性と対応策、などを盛り込んだ。
- 3) NAT の精度管理に必要となる参照パネルの樹立に関する研究として、パルボウイルス B19 (PV B19) の genotype 1 及び 2 からなる参照パネル候補品について力価測定に関する共同検定を実施し、PV B19 の参照パネルを樹立した。また、2004 年に作製した HBV、HCV 等の感度の評価可能なサブタイプごとの参照パネルの安定性等を再評価し、極めて低濃度の検体以外は安定に保存されていることを示した。
- 4) 血液製剤における PV B19 の規格値に関する研究として、PV B19 の感染性を nested RT-PCR 法とリアルタイム RT-PCR 法を用いて評価できる評価法を確立した。ヒト免疫グロブリン製剤中には高力価の中和活性が存在していることが判明し、原料血漿等で PV B19 の規格値を決める際には、中和活性も考慮する必要がある。原料血漿の基準を 10⁴IU/mL 以下にすることは、過去の感染例や我々の感染実験から妥当な規格値であると考えられた。

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 主任研究官

岡田 義昭 埼玉医科大学病院
輸血・細胞移植部部長

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、この間のNAT関連技術の進歩、海外の規制状況の調査及び現行指針の問題点や追加すべき事項に関する調査に基づき、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行った。また、NATの精度管理に必要な参照パネルの樹立に関する研究として、PV B19の参照パネルの作製を行った。さらに、血液製剤におけるPV B19の規格値に関する研究を実施した。

B. 方法

B.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

調査対象として、FDAのガイドラインとしては“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. (2010)” (HIV/HCV NATガイドラインと略)及び、“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 (2011) “ (HBV NAT ガイドライン案と略) を取り上げた。また USP の NAT 試験法として USP に収載されている General Information / <1127> Nucleic Acid-based Amplification Techniques (USP NAT 試験法と略)を取り上げた。また、適宜、他の FDA ガイドラインや関連文献も対象とした。

B.2 NAT ガイドライン改正にむけた研究

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 ガイダンスの問題点とその対応案の検討を行った。その際、B.1で調査した 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。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に盛り込むこととした。

B.3 NAT 実施のための標準品や参照パネルに関する検討

1) PV B19 パネルの樹立

血液製剤の NAT の評価実施に必要な

標準品や参照パネルの整備状況を調査した。また、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 genotype 1 と 2 からなる PV B19 参照パネル候補品についての特性解析と、力価設定のための共同検定を実施した。

(1) パネル候補品の製造

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。

(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。

A.参照パネル

- 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)

B.パルボウイルス B19 DNA 第二次国際標準品 (99/802) (力価 10^6 IU/mL) 1 本

C.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。

2) HBV、HCV、HIV 参照パネルの安定性

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、長期間にわたり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。

B.3 血漿分画製剤の原料血漿における PV B19 の規格値に関する研究

1) PV B19 の感染性の評価

PV B19 は DNA ウイルスだが、細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され PV B19 を構成する数種類のウイルスタンパク質が作られる。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 PV B19 を感染させた細胞から RNA を

抽出し、RT-PCRによってPV 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PV B19中和活性の測定

原料血漿が入手困難であるため、市販されている静注用ヒト免疫グロブリン製剤を代用として用いた。静注用人免疫グロブリン製剤を50 μ LにIgGが25ng~250 μ g含まれるように希釈した。PV B19は、既にこれまでの感染実験から 10^7 ~ 10^8 感染価/mLと判明しているPV B19陽性血漿を 10^3 ~ 10^6 倍に希釈し、各10 μ Lを用いた。これらに40 μ LのPBSを添加し、計100 μ Lとした。検体は、4 $^{\circ}$ Cで1.5時間反応させた。感染1日前に24穴プレートに 3×10^5 個/穴のNCC(ヒト胎児性癌)を播き、これに検体を以下の方法で感染させた。細胞から培養液を完全に除去し、各ウェルに100 μ Lの培養液を加えた後、中和したウイルス液を添加し37 $^{\circ}$ Cで2時間吸着させた。反応後、1mLの10%FCS-RPMIを加えて2日間培養し、RNAso1にて

RNAを抽出し、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PV B19遺伝子の増幅の有無を解析した。抗B19抗体陰性のグロブリン製剤はないため、5%アルブミン製剤を中和活性のない陰性コントロールとして用いた。

C. 研究結果

C.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

1999年にFDAはHIV-1,-2を検出するためのNATガイドラインを発出したのをはじめとして、2004年にHIVとHCVを検出するためのミニプール血漿及び個別血漿を対象としたNATガイドラインを発出した。その後、2010年には、その改訂版となるHIV/HCV NATガイドラインを発出した。引き続き、2011年にHBV NATガイドライン案を発出し、我が国の生物由来原料基準でNATによるスクリーニングの実施が求められているHIV、HCV、HBVを3つのウイルスを検出するためのNATのガイドラインが揃ったことになる。一方で、2009年にPV B19、及びウエストナイルウイルス(WNV)検出のためのそれぞれのNATガイドラインを発出している。このように、FDAはウイルスごとにそれぞれのウイルスの特徴や疫学的観点を含め、血液製剤に必要なと考えられるウイルスを網羅するようなNATガイドラインを発出している。

これらのガイドラインのなかで、我が国の生物由来原料基準で検査が求められてい

る HIV、HCV、HBV に関する NAT ガイドラインについて FDA の最新の規制スタンスを明らかにすることを試みた。

<FDA HIV/HCV NAT ガイドライン>

I. ガイドラインの背景

最近の血液製剤の安全性確保の技術は進展しているが、HIV や HCV に関してウィンドウ期(1)のドナーによる感染が懸念される。また、遺伝的あるいは免疫学的な変異に対する対応や測定エラーに対する安全対策が求められている。

NAT による HIV RNA の検出を行うことにより、抗 HIV 抗体の検査よりも 11~15 日のウィンドウ期の短縮が期待され、また、HIV-1p24 抗原の検出よりも 5~9 日間の短縮となると推定されている(2-4)。NAT による HCV RNA の検出を行うことにより、抗 HCV 抗体の検査より 50~60 日のウィンドウ期の短縮が期待されている。

また、NAT をしなければ HCV が陽性である確率は 100,000 ドナーあたり 299 人であり、HIV が 9.7 人である。NAT を導入することにより HIV の検査のすり抜けによる感染リスクは 1/2,135,000 に、HCV は 1/1,935,000 に減少する(3)。

ガイドラインは HCV と HIV の NAT 試験、製品の廃棄、ドナーの適格性判断、ドナーへの結果の通知、ドナーのリエントリー、遡及調査について記載されている。

また HIV の HIVp24 抗原検査に代替できることの妥当性が評価されていれば、HIV NAT を HIVp24 抗原検査に代えて使用することができると思われる。

A. NAT アルゴリズム

ミニプール血漿を対象とした HCV と HIV NAT で陽性結果が得られた場合には、どのドナーが陽性であるのかを追加試験を実施する必要あがる。さらに、陽性ドナーが判明した場合には、そのドナーの適格性を否定し、ドナーに結果を報告する必要がある。またドナー由来の原料を使用してはならない。ドナーが以前にも献血している場合には、NAT 陰性であっても感染する可能性があることを認識し、対応をとる必要がある。

血液製剤や血漿分画製剤は、連邦法の cGMP に基づいて製造されなければならないとされる。

HCV や HIV 陽性となったドナーは、過去にバイレミアとなる感染を起こしていることを意味しており、過去の献血血液の安全性を確認するために、上記の対応に加えて遡及調査を行う必要がある。遡及調査の期間は 1 年とする。1 年以上に亘る遡及調査はウィンドウ期の概念にはなく、それ以上の遡及調査が求められることはない。

血液製剤委員会に HCV や HIV NAT の実施に当たってのアルゴリズムについて諮問した。例えば、ミニプール NAT で陽性でも個別 NAT を実施したところ陽性検体が見つからなかった時の対応などである。これは、ミニプール NAT が擬陽性であったとも考えられるが、詳細な解析が終了するまで検体を隔離保管すべきと結論された。

本ガイドラインには、NAT 陽性の結果が出た場合のアルゴリズムが示されている。アルゴリズムの設定にあたっては、HCV 及び HIV の血清学的試験が陰性で NAT 陽性になった場合の対応が示され、その中には、製品の廃棄、ドナーの不適格基準、ドナー

のフォローアップ試験、ドナーへの通知、
遡及調査が含まれている。

B. ドナーのリエントリー

多くの献血者が擬陽性や結果の確定判定
ができないために適格性が否定され、献血
適格性がないと判断されることも多い。こ
のような場合、再度適格性を判断する基準
が必要とされている。再適格性の判定は複
雑であり、既に HIV-1、HIV-2 に対する抗
体や HCV 抗体試験が繰り返し陽性になっ
た場合には不適格と判断するようにガイダ
ンスを出していた。

この新しいガイダンスでは適格性の判断
に HCV HIV NAT を用いる。新しい判定基
準では NAT と血清学試験によって実施さ
れることになる。

II. NAT アルゴリズムの推奨

現在、HCV 及び HIV NAT 試験として採
用されているのは HCV RNA と HIV RNA
を同時に検出する Multiplex NAT ないしは、
2つのウイルス RNA を別々に検出する単
一ウイルス NAT 試験である。

II-A. Multiplex NAT で陽性の場合のサブ プールまたは個別ドナーの試験法、製品の 廃棄、ドナー管理、遡及調査

FDA の承認を受けた Multiplex HIV
RNA/HCV RNA NAT によりミニプールが
陽性である事が明らかになった場合には、
承認製品の指示に従い、どのドナーサンプ
ルが陽性であるのかを明らかにすること。
試験のアルゴリズムに関してはキットの添
付文書の指示に従うこと。通常 2 つの方法
が指示されている(図 1、表 1)。

方法 1 ; ミニプールから作製したサブプー
ルを用いて NAT 検査を行う。この場合、す
でに作製してあったサブプールを用いるの
と新たにサブプールを作製するのと 2 通り
ある。その上で、陽性サブプールの検査結
果から個別陽性検体を探索することになる。

1. 試験ではミニプールに適用したのと同
じ Multiplex NAT を適用することになる。

a. もし同じ Multiplex NAT 試験をサブ
プールに適用して全てのサブプール
が陰性であった場合には、全ての個別
ドナーについて血清学的試験が陰性
であること、ドナーとしての適格性が
示されることにより、全ての個別ドナ
ーを出荷してもよいであろう。

b. 一つないしは複数のサブプールが陽
性反応を示した場合には、血清学的試
験が陰性であること、ドナーとしての
適格性が示されることにより、陰性の
反応を確認したサブプールの個別ド
ナーは全て出荷してよいとされる。サ
ブプールでミニプール陽性反応を確認
したのと同じ Multiplex NAT によ
り陽性反応を示す個別ドナーを特定
する必要がある。

個別 NAT で陰性であった全ての個
別ドナーは血清学的試験が陰性であ
ること、ドナーとしての適格性が示さ
れることにより、出荷判定をしてよい
であろう。

方法 2 : 24 人程度などのミニプールのサイ
ズが比較的小さい場合、ミニプールを構成

する個別ドナーについて直接 NAT 試験を適用することも可能である。

2. ミニプールを構成する全てのドナーの個別 NAT を適用する場合には、ミニプールと同じ Multiplex NAT を適用するべきである。

注：試験法の添付文書に、個別 NAT の実施に際して異なる方法が指示されていたとしてもミニプール NAT と同じプライマー・プローブを用いるべきである。

- a. 全ての個別ドナーを対象とした NAT 試験が陰性であった場合には上記と同様にドナーの適格性が判断されたとしてよい
- b. 1 つないし複数の個別ドナーが陽性であった場合、どのウイルス感染かの確認試験、製品の廃棄、ドナーへの対応、遡及調査などの対応が必要である。

個別 NAT で陰性であった全ての個別ドナーは血清学的試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることにより、出荷判定をしてよいであろう。

II-B. 単一ウイルス NAT で陽性の場合のサブプールまたは個別ドナーの試験法、製品の廃棄、ドナー管理、遡及調査

ミニプールを用いて実施した HIV RNA 及び HCV RNA NAT で陽性結果が得られた場合に、試験キットの指示で単一のウイルスに関する NAT により、どの検体が陽性なのかを判定する必要がある。一般に、ミニプール中のどのロットが反応性を有しているのかを判定するには 2 つの方法がある (図 2、表 2)。

方法 1：NAT 陽性となったミニプールを構成するサブプールを再構築することができ、このミニプールを再構築した検体を用いて、個別ドナーを確認することができる (縦横のマトリクスを組んでサブプールを作製する) ようにしなければならない。

1. NAT 陽性のミニプールからサブプールを作製する場合に、ミニプールで実施したのと同じ単一ウイルスを検出する NAT を元のミニプールから作製したサブプール、あるいは新たに作製したサブプールについて試験を行う。

注：測定キットの指示書には異なるサンプルの調製法が示されているかもしれないが、再試験の際は同じプライマー・プローブを用いる必要がある。

- a. 陰性であったサブプールを構成する個々のドナー血漿は、血清学的試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることとあわせて、ロットリリースが可能となる。
- b. 1 つないし複数のサブプールが陽性反応を示した場合には、血清学的試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることにより、他の陰性反応を示したサブプールの個別ドナーのロットリリースが可能となる。陽性反応を示したサブプールの個々のドナーについて、元のミニプールと同じ単一のウイルスを検出する NAT によりどのドナーが陽性であるのかを明らかにする必要がある。

- (1) 全ての個別ドナーが陰性であった

場合には、血清学的試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることにより、全ての個別ドナーのロットリリースが可能となる。

- (2) 1つないし複数の個別ドナーが陽性であった場合には、陽性ドナーに他の場合と同様に通知や対応が求められる。

方法2：24人程度の比較的小さいミニプールの場合には、ミニプールを構成する個別ドナーを直接 NAT により検査することも可能である。

2. NAT 陽性ミニプールを構成する個別ドナーについて試験を行う場合には、ミニプールで実施したのと同じ単一ウイルスに対する NAT を実施する必要がある。

注：測定キットの指示書には異なるサンプルの調製法が示されていることもあるかもしれないが、再試験の際は同じプライマー・プローブを用いる必要がある。

- a. 全てのドナーが陰性の場合には、II-B 1.b (1)に従い、血清学的試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることにより、全ての個別ドナーのロットリリースが可能となる。
- b. 一つないしは複数の個別ドナーが NAT 陽性であった場合には、血清学的試験が陰性であって個別 NAT 陽性のドナーに対する対応としてドナー血液の廃棄、ドナーの管理、遡及調査などの実施する必要がある。

ドナーが陰性の個別ドナーは、血清学的

試験が陰性であること、ドナーとしての適格性が示されることにより、ロットリリースが可能となる。

次に、最近 FDA が承認した HIV-1 RNA と HCV RNA の個別 NAT 試験は、HIV-1 RNA と HCV RNA を同時に検出する Multiplex NAT と 2つのウイルスの RNA を別々に検出する NAT がある。

II-C. 血清学的検査で陰性後、Multiplex NAT で陽性の場合の個別ドナーサンプルの試験法、製品の廃棄、ドナー管理、遡及調査

個別ドナーサンプルを用いて HIV-1 RNA/HCV RNA の Multiplex NAT で陽性反応が見られた場合には次のような対応を取らなければならない。

1. いずれのウイルスかを明らかにするための試験を実施する必要がある。
 - a. HIV と HCV を分別できる NAT により HIV-1 RNA や HCV RNA が陽性との判定が出た場合には、献血バックを貯留保管しなければならない。FDA610.40(h)(2)(ii)(A)に記載されている例外以外には陽性バックを出荷あるいは使用してはならない。

もし陽性バックを廃棄しない場合で、研究用に用いる場合や、FDA 610.40(h)(2)(ii)(A)に従う記載に基づき、特殊な目的の製造に用いることも可能である。陽性バックの一つをこのような目的で使用する際には、バイオハザードのラベルをすること。
 - b. もし分別のための HIV-1 RNA と

HCV RNA NAT 結果の反応性が認められなかったときには、分別反応での陰性サンプルとみなす。

<FDA HBV NAT ガイドライン>

全血、血液コンポーネント及び原料血漿の HBV の伝播リスクを低減化するためのミニプール及び個別 NAT を用いる際のガイダンス案 (FDA 2011 年)

I. ガイドライン案の背景

I-1. HBV NAT によるドナースクリーニングを実施する理由

HBV は人に急性肝炎や慢性肝炎を引き起こし、さらには肝がんの原因ともなる(5)。成人で HBV に感染すると大部分の人ではウイルスが血中からはクリアランスされ、持続性の免疫反応が形成される。成人で HBV に感染した場合キャリアー化するのは 5%以下である。しかし幼児期に感染すると慢性の HBV ウイルスの感染状態になり、少年期の後期や成人になっても慢性的な感染を引き起こすことになる(いわゆるキャリアーである)。健康管理防御センターが 2004 年に出したデータによると、事前に免疫反応のない成人が HBV に感染した場合にキャリアーになるのは 1%ぐらいであると言われており、5 歳以上の幼児が感染した場合には 2~10%がキャリアーになると言われている。5 歳以下の幼児の場合には 30~90%が慢性的な感染が成立してしまう(6)。さらに、輸血を受ける多くの患者は免疫状態が抑制されていることからより HBV が持続感染しやすいとされている。HBV のキャリアーになった患者の約 20%が肝硬変になると言われている。HBV キャ

リアーは非感染者に比較して 100 倍肝がんになりやすいと言われている(5)。

HBV は HIV や HCV より血液輸血で伝播の頻度が高い。HBV の感染率はおおよそ 1/357,000 から 1/280,000 の確率であると推定されている。HIV と HCV はそれぞれ 1/1,467,000 及び 1/1,149,000 と推定されている(7)。HBV NAT を実施することにより、HIV や HCV と同様に HBV の感染リスクを低減できる。HBsAg や抗 HBc 抗体の兆候がない血液で、かつ HBV DNA 陽性の血液ドナーであれば HBV の感染が成立してしまう(8-9)。HBsAg と HBV NAT の感度の比較をすると、HBV DNA は感染後 2-5 週で検出できるようになり、HBsAg が検出できる前の最高で 40 日前(平均では 6~15 日前)に検出できるとされている(6)。HBV DNA は比較的ゆっくりと上昇し、血清学的なウィンドウ期での血中レベルは低いとされている。HBV DNA はウィンドウ期のみならずキャリアー期の HBsAg や抗 HBc コア抗体と共に検出されることもあり、一部の献血者では抗 HBs 抗体や HBc コア抗体が陽性、HBsAg 陰性で HBV 感染が起こることもある(5,10)。非常にまれであるが、HBsAg 陰性で抗 HBs 抗体や HBc コア抗体が陰性にもかかわらず HBV DNA が検出されることもある(11)。

HBc コア抗体が血液検査として実施されている。HBc コア抗体は HBsAg が検出されるようになって数日で検出可能になり、HBV 感染が起こったことを見出すマーカーとして機能している。従って HBc コア抗体検査の特徴からすると、HBV NAT の方が輸血により HBV の感染を防御するとい

う観点からは有用であり、HBsAg の検出よりもウインドウ期を 40 日ほど短くすることが可能になる。

最近、全血あるいは血液コンポーネントを用いた HBV NAT 検査が FDA より承認されている。この HBV NAT を用いた検査キット (Roche 社の COBAS AmpliScreen で 24 ミニプールまで対応している) について、FDA は 2005 年の時点では HBV NAT スクリーニング検査として推薦してこなかった。当時の FDA の判断は、Health and Human Services Secretary Advisory Committee on Blood Safety and Availability の推薦によっている。委員会では、ドナーの HBV 検出に関するデータに加え、費用対効果バランスの評価、実施可能性、公衆衛生を考慮して答申がだされた。FDA のその時点での大きな懸念は、HBV NAT の検出感度であり、血清学的検査の感度を十分に上回るだけの安全性の-margin が得られるわけではないとの判断であった。その時点でのミニプールのサンプルサイズは 24 人であり、これは個別 NAT よりも 1/24 に希釈されることを意味している。

その後、2005 年から今日まで次のような状況変化があった。

1. FDA は COBAS に加えて他の HBV NAT 検査薬を承認している。これらの検査キットは 6~16 のミニプール血漿を対象としている。さらに Multiplex 検査を採用しており、HBV のみならず HCV や HIV を同時に測定できるようにルーチン検査として適用しやすくなっている。FDA は原料血漿や血漿分画製剤用のスクリーニングで事前の採血での血漿検査に対応する PCR 検

査キットを承認している。これは市販されているものではなく、インハウスキットで用いるものとして承認されている。

2. 検査のための血漿のプーリングや他の処理を自動化する動きが進んでおり、このためにミニプールの作製が容易になってきている。また自動化技術の進展により個別 NAT も容易になりつつある。

3. HBV ワクチン効果の持続性が完璧ではないために HBV ワクチンをしていても受血により HBV に感染するリスクがあることが分かってきた。HBV のワクチンを受けた患者が HBV に感染することをブレイクスルー感染と呼ぶが、HBV NAT 陽性で、中和能をもつ抗 HBs 抗体陽性、低濃度のウイルス感染と無症候とを特徴としている。低濃度の HBV 感染では血中 HBsAg の出現や HBc 抗体の出現が起らないことが知られており、特にワクチン接種者で内在性の抗体があるにもかかわらず感染した場合には、抗体や抗原の出現が起らないことが知られている。

4. HBV のブレイクスルー感染では HBsAg や抗 HBc 抗体の出現が遅れたり、あるいはまったく起らないことがありえる。HBV NAT が開発されてくるに従い、HBV の初期感染の検出ができるようになった。さらに、HBV ワクチンを受けた集団が非常に多くなってきたことより、ドナーの適格性の判断にワクチン接種者のことを考える必要が出てきている。HBV の通常の感染よりも、HBV ブレイクスルーによる感染が増えつつあることを考慮する必要が出

てきている。このようなブレイクスルーによる無症候の HBV 感染者では、HBsAg や HBc コア抗体の出現が遅れるので、感染初期の HBV DNA の存在を HBV NAT により検査することが有用になってくる。さらに HBV 変異株は HBsAg を検出する血清学的試験よりも HBV NAT の方がより検出されやすいことも重要な考慮事項である。

非常に多くの論文で、HBV DNA 陽性／抗 HBs 抗体陽性／HBsAg 陰性の血液は HBc 抗体の有無にかかわらず HBV の伝播が起こらないと報告されている（10-11, 12-15）。しかし一方で、このような献血者であったとしても HBV の伝播が起こる可能性あるとする報告もある（16-17）。さらに一報だけであるが、HBV DNA 陽性／抗 HBs 抗体陽性／HBsAg 陰性の献血者からの血液で HBV の伝播が起こったとする報告もある（18）。従って、HBV NAT 陽性の HBV ワクチン接種者は中和抗体があることから感染性を有しないと根拠はないようである。また、受血者の病的状態や致死性疾患の罹患状況では免疫反応が抑制されている可能性が高く、より感染がoccurりやすい可能性がある。

2009 年の BPAC 会議では、ブレイクスルー感染を起こしているドナーからの献血により患者が HBV を発症しないと根拠はないとの FDA の立場を委員会が支持する答申を出した（19）。そこで、本ガイドラインにあるように、FDA は全ての輸血用血液について FDA が承認した HBV NAT を実施することを推奨することにした。委員会は同時に血液及び血液コンポーネントについて個々のバックにつき 200IU/mL 以上の感度を要求するとする FDA の立場に

についても支持した。しかし、2009 年からのその後の技術的な進展もあることから、個々のドナーバックについて 100IU/mL の感度を要求することとしている。技術的な進展や自動化装置の導入により 100IU/mL は十分達成可能な感度であり、輸血用血液の精度として実施可能であると判断している。

一方、分画製剤については、注射用製剤としてさらなる精製工程があることから、原料血漿の抗 HBs 抗体が存在することに加え、精製工程でウイルス不活化除去工程があること、原料血漿に混入してくるウイルス量がわずかと考えられることから、輸血用血漿製剤に比べて異なる安全性リスクの判断があってもよいと考えている。2011 年の BPAC 会議で、現時点での科学的な観点から原料血漿に対して HBV NAT を実施することは安全性のマージンを広げることにつながるとの FDA の判断が支持された。

そこで FDA は血漿分画製剤についても FDA が承認した HBV NAT を実施することを推奨することにした。一方、血漿分画製剤はウイルス不活化・除去工程があることから、FDA はその感度として 100IU/mL ではなく 500IU/mL でよいと推奨している。これらの感度については BPAC で支持された。

血漿分画製剤と同様、原料白血球より製造される製品の HBV 安全性については同様にウイルス不活化・除去工程がある。しかし、白血球由来製品は全血から製造されることから、HBV NAT の感度として輸血用血液製剤と同様に 100IU/mL とすることを推奨している。

I-2. ドナーの再評価

610.41(b)条により、献血保留となったドナーは FDA による適格性基準に照らして再度適格性を評価した後に血液や、血液コンポーネントの出荷の妥当性が判断される。

BPAC 委員会は HBV NAT 陽性となった献血者の全血及び血液コンポーネントの再評価基準の提案を了承した。陽性の結果が出てから 6 か月後に実施される HBsAg、抗 HBc 抗体、及び HBV DNA の NAT による検査で陰性であること示され、HBV の感染性が否定されればよいとしている。このために実施される NAT の検査では、FDA が承認する HBV NAT で 95%の検出感度が 2 IU/ml 以下であることが求められるとした。これは 10 コピー/mL 以下の感度に匹敵する。この感度で HBV DNA が否定されることになると HBV の感染性は通常否定されるとされている(20)。

II. 勧告

II-A. HBV NAT を用いたドナースクリーニング

610.40(b)条に従い、FDA により承認された試験法でスクリーニングを実施する必要がある。複数のスクリーニング検査により HBV をはじめとするウイルス伝播のリスクを低減化することが求められる。

1. 輸血用及び白血球由来製品の製造のための全血及び血液コンポーネントのための 610.40(b)条に従い、HBsAg や HBc コア抗体に加えて HBV DNA を検出するための FDA が承認した NAT 検査を実施することを推奨している。FDA が承認した HBsAg や HBc コア抗体が陰性あるいは反応性が

無いことを確認した上で、FDA が承認した HBV NAT を用いてドナースクリーニングを実施しなければならない。またその感度としては 100IU/mL であることが求められるとした。FDA が承認した HBV のスクリーニングにはミニプール検体もあり、個別検体もある。また HIV や HCV を同時に検出する Multiplex NAT も含まれ、ウイルスごとの NAT もあり得る。HBV NAT と同時に HBsAg や HBc コア抗体の検査を行うことも可能である。

2. 610.40(b)条に従い血漿分画製剤のスクリーニング試験として HBsAg の検査を実施しなければならない。HBsAg の検査が陰性であるか反応性が認められない場合には、FDA は個別ドナーのレベルで 500IU/mL HBV DNA 以下の感度で HBV NAT を実施することを強く推奨する。FDA が承認した HBV NAT ではミニプール検体を用いてもよいし個別検体でもよい。また Multiplex NAT で HCV と HIV を同時に検出してもよいし、HBV のみを検出する個別 NAT でもよい。HBsAg と HBV DNA の NAT を同時に実施してもよい。しかし、FDA は血漿分画製剤の原料血漿試験として HBc コア抗体試験を推奨しない。

610.40(h)(1)条にしたがえば、FDA が承認した検査試薬を用いて HBsAg 陽性あるいは HBc コア抗体陽性が検出された場合には献血血液を出荷及び投与はすべきでないとしている。この場合、製造業者は HBV の基準にしたがってバックの廃棄やドナーの献血停止など対応をしていると考えられ、このようなケースでは FDA が承認した HBV NAT を実施する必要性はない。しか

し、ドナーに関する有用な情報が得られることから FDA が承認している HBV NAT をこのような血清学的試験で陽性になったドナーに対して行うこともできる。また、リエントリーのためのデータを得るために HBV NAT を実施することも可能である。

610.40(h)(1)条にしたがえば、HBsAg の補助的な試験として HBsAg の反応性を確認するための試験を実施する必要がある。あるいは偽陽性であることを確認する試験として、中和試験や HBV NAT を実施することも必要である。HBV NAT 検査で HBV DNA が陰性であるドナー血液が繰り返し HBsAg 試験で陽性である場合には HBsAg 中和試験を実施すべきである。この場合、調和試験の結果は記録しておく必要がある。現在、HBc コア抗体試験は FDA が承認したものはないが、HBc コア抗体試験陽性のドナーは文献 3 に従って再評価することができる(3)。

II-B.ドナーと HBV 試験結果を考慮した輸血ユニットの管理

1. HBV DNA NAT 検査結果の陰性であったドナーの輸血バックの管理

- a. 個別 NAT でもミニプール NAT でも陰性であった場合には、FDA のガイダンスに従い適格性が示されていると考えてよく、出荷可能である。
- b. HBV NAT、HBsAg、及び HBc コア抗体試験が陰性であり、他の感染因子のスクリーニングにより適格性が示されることにより、全血及び血液コンポーネントのバックの輸血が可能で

あり、さらには原料白血球を用いた製造を実施してよい。

- c. 原料血漿及び全血から調製した血漿について FDA が承認した HBV NAT 及び HBsAg が陰性であることが確認されることにより次の工程に進むことができる。

2. HBV DNA NAT 結果が陽性であった場合のドナーとバックの管理(表 3)

- a. ミニプールで陽性になった検体の個別 NAT ないしは再構成してマトリクスを組むことにより NAT で HBV DNA 陽性と特定された採血バックは、全血及び血液コンポーネント、原料白血球の製造に用いてはならない。
- b. HBV NAT 陽性ドナーについては献血を保留すること、さらにドナーに陽性であることを通知しなければならない。NAT 及び血清学的試験で次の様な結果が得られたドナーは全血及び血液コンポーネント、原料白血球の製造原料として永久に保留すべきである。
 - i) HBV NAT 陽性、HBsAg は繰り返し反応性があり中和活性や NAT を用いた確認試験で陽性が確認された場合、ただし HBc 抗体の有無にかかわらない。
 - ii) HBV NAT 陽性で HBsAg のシグナルが繰り返し認められさらに中和反応により確認できない場合であって HBc コア抗体が繰り返し反応性がある場合

- c. 次のようなHBV試験が陽性反応を示す場合にはドナーの献血保留をしなければならない
- i) HBV NAT 陽性、HBsAg シグナルの反応性が認められない場合であって HBc 抗体が繰り返し反応性がある場合
 - ii) HBV NAT 陽性で HBsAg 及び HBc コア抗体の反応性がない場合
 - iii) NAT 試験により HBV NAT 陽性で HBsAg の繰り返しの反応性が中和活性により確認できない場合であって HBc コア抗体の反応性がない場合
- d. 表4のカテゴリ－1から3の結果が得られた場合には、FDA が特別に承認した場合を除いてHBV個別NAT 陽性の原料血漿バックは廃棄しそれ以降の製造工程に進めることは出来ない。
- e. HBV 試験で陽性であったドナーに対しては、その結果を通知する義務がある。HBV NAT 陽性で HBsAg に関して繰り返し陽性でありかつ追加試験で中和が確認された場合、ドナーからの献血は永久に保留されなければならない（表4、カテゴリ－1）
- f. 表4のカテゴリ－2と3では、ドナーの献血を保留しなければならないか、条件によってリエントリーが可能になる。

II-C. 陽性検体のフォローアップとしてHBV NAT 及び HBV 血清学的試験に基づいたドナーの再評価

HBV 陽性であったドナーのリエントリー条件が記載されている。リエントリーではHBV NAT の検出感度として95%の確率で検出される感度を2IU/mL 以下のHBV DNA を検出できるように設定されていなければならない。

<USP NAT 試験法>

I. 序論に引き続き、NAT アッセイに用いる試薬等について一般的考慮事項を詳細に説明している。耐熱酵素、反応液や反応液の組成、プライマーの最適条件について説明がされている。NAT アッセイについても、アッセイごとの特徴を例示し、PCR については通常のPCRのみならず nested PCR、RT-PCR とその増幅産物の検出条件、Real-time PCR や Real-time RT-PCR のアッセイ条件の最適化などについて、プライマー以外にプローブの設定を含めて情報提供されている。また、Real-time PCR や Real-time RT-PCR の定量性について情報が記載されている。

II. NAT の品質保証と品質管理

NAT の品質管理で問題となる、別に実施した NAT の増幅産物が新たに調製した NAT の反応液に混入することにより偽陽性を引き起こすなど測定結果に間違いをもたらす可能性が高いことや、最適条件以外での試験条件では偽陰性の可能性があることから、厳密な品質保証と品質管理を必要としている。そのための試料調製室や

増幅室などの NAT 関連施設の設計や管理、試料の調製、ゲノムの抽出、ゲノム増幅、シグナルの検出等の動線の管理、機器の管理などが重要としている。また、ICH Q2B ガイドラインである「分析法バリデーション」を参照することが推奨されている。

II-1. 実験室の品質保証と品質管理

NAT 測定室のデザインは増幅した NAT 産物を新たな NAT 試験に混入させないような設計がなされている必要がある。PCR の開発初期よりクロスコンタミネーション(交差汚染)が問題にされていたことと同様に、いかに交差汚染を防ぐかが他の NAT アッセイでも重要な課題である。PCR を例にとると、増幅するためのゲノムの調製、PCR マスターミックスの調製、個々の反応チューブへのマスターミックスの添加、ゲノムテンプレートの添加等を実施する部屋、PCR 反応を行う部屋、場合によっては PCR 産物を測定するためのスペースなどが必要となる。これらのスペースは閉鎖系を用いる場合には不要とされる。汚染の防止として実験室を使用時以外に UV 照射しておくことも有用である。もし汚染が起きた場合には 10% ブリーチによる機材の洗浄が PCR 産物を分解するのに有用とされている。

II-2. 測定機器や機材の品質保証と品質管理

NAT における GLP 対策としては、PCR 産物の汚染を防ぎ使用する機器をクリーンな状態にしておくことが重要である。チップ等はフィルター付の使い捨てのものを使用し、プライマーやプローブの管理も重要

である。

II-3. PCR 産物の交差汚染を防ぐための Uracil-N-Glycosylase

PCR 産物が次の PCR 反応液を作製したときに混入していた場合、Uracil-N-Glycosylase (UNG) を添加することによりその分解が可能である。

II-4. NAT システムのバリデーション

NAT 分析法のバリデーションでは、

- ① 使用する試薬の品質や一定性を担保することにより達成される。
- ② NAT アッセイにおける再現性、正確性、堅牢性、頑健性、特異性、精度、分析及び臨床的な感度を担保することにより達成される。

臨床的に意義のある感度は 95% の確率で検出される限度値で表されるが、分析法上の感度は検出限界の参照品の濃度で規定される。

アッセイバリデーションの対象となる基本的なステップは、

- (1) 試料の調製
 - (2) 重要な試薬の一定性担保
 - (3) コントロールや濃度校正用品、定量用校正品の使用
 - (4) 目的試料や試薬の安定性
 - (5) 機器やソフトウェアの機能
 - (6) 作業者の教育訓練
 - (7) 実験室のサーベイランス
- などである。

C.2 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、各方面

の専門家を招いて研究班を組織して取り組むこととした。このために研究代表者、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表5に示す作業グループ(WG)を形成し、現行のNATガイドラインの問題点を抽出し、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。現行のNATガイドラインの問題点と対応案について、参考資料1にまとめた。その中でポイントとなる点を以下に示した。

(1) NATガイドラインが対象とするウイルスについて

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。さらに現在、米国等の海外では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。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、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。

(2) リアルタイムPCRやMultiplex PCR導入の注意点

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、このようなリアルタイム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。

(3) 市販キットや自動化機器の利用と施設・設備要件

近年NATに関する技術開発が急速に進