

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  $2^{30}$  倍～ $2^{40}$  倍に増幅するために、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。

#### (4) NAT 試験における市販キット利用時の注意点

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。

#### (5) ランコントロール設定の注意点

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言われている。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。

#### (6) ウイルスゲノムの変異への対応

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。

#### (7) 血漿分画製剤でのウイルスの検出感度

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課長通知に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、参考資料2に示す改正案を取りまとめ、NAT小委員会に提案した。

### C.3 NAT実施のための標準品や参照パネルに関する検討

#### C.3.1 ウイルスの標準品や参照パネルの整備状況

ウイルスゲノムのNATによる検出では、そのバリデーションを行うために目的とするウイルスの標準品や参照パネルを用いた評価が必須である。血液製剤で問題とされるウイルスの標準品や参照パネルの整備状況の調査結果を表6に示した。血液製剤においてNATによる検査が必須とされるHIV-1、HBV、HCVについてはWHOでは標準品、参照パネルが整備されている。WHOではその他にHIV-2、HAV、HEV、PVB19の標準品が整備されている。国内でもHIV、HCV、HBVの標準品は策定されているが、参照パネルはHIV、HBV、HCVの標準パネル血漿作製に関する検討が厚生労働科学研究において行われたものの、現在このパネルは公開されていない状況である。

一方、血液製剤での検査は必須とはされていないが、血液による感染事例が認められている E 型肝炎ウイルス (HEV) や PV B19 は、血液製剤関連各社により自主的に検査が行われているものの、これまで国内では標準品や参照パネルは整備されていなかったが、HEV については、2011 年に WHO により標準品が制定され、国内標準品も制定された。また、HEV の参照パネルは 22 年度の厚生労働科学研究において、国内で見いだされる HEV の 4 種類のクラスターからなる参照パネルが樹立されたが、コピー数での表示となっているため、今後、HEV の国内標準品により単位換算を行い公開する予定である。PV B19 については、国内標準品作成のための共同研究が 25 年度に実施され、近く制定される予定である。また PV B19 の参照品は樹立のための検討を 25 年度に以下の通り実施した。

### C.3.2 PV B19 参照品の樹立

#### (1) 参照品の特性解析

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、共同検定により力価を求めることとした。

まず、予備検討としてパネル候補品の特性解析と、検出のための PCR プライマーの検討を行った。パネル分注品の特性解析としては分注品の均一性と保存安定性及び凍結融解の影響を検討した。分注品の均一性試験は、各パネル分注品 5 本の PV B19 ゲノム濃度を artus parvo B19 PCR kit (Qiagen) を用いて測定し、大きなばらつきが認められないことを確認した。また、保存安定性は -80℃ に保存後、2 か月目および凍結融解を 2 回、3 回繰り返した前後での PV B19 ゲノム濃度により評価したが、著しい影響は認められなかった。

また、定量 PCR による検出に用いるプライマーについて検討を行った。PV B19 については、LightCycler Parvovirus B19 quantification kit (Roche Diagnostics) では genotype 2 を検出できないことが確認されており、artus parvo B19 PCR kit では genotype 2 も検出可能であるが、プライマー配列やキットに添付されている定量用スタンダードの領域が公開されていないという問題がある。そこで、genotype 1,2 を検出可能と報告されている 2 種類のプライマー、プローブセット (NS1 gene 検出用: J. virol, 78, 12169, 2004; VP2 gene 検出用: J. Clin. Microbiol., 42, 5189, 2004) と artus parvo B19 PCR kit で B19 参照パネル候補品の検出を比較した。その結果、いずれも artus parvo B19 PCR kit よりも高感度に genotype 1, 2 を検出可能なことが確認された。

#### (2) 共同検定プロトコールについて

パネルの評価のために PV B19 パネル候補品についてどのような共同検定を行うべ

きかについて WG で検討した。その結果、①パネルの測定は統一したキットを用いるのではなく、genotype 2 が検出できる方法であれば共同検定に参加する各施設で行われている方法で良い、②定量的な方法が望ましいが、定性的な方法でも良い、③NAT には WHO の PV B19 標準品を用いるが、WHO 標準品の濃度を考慮すると、PV B19 参照パネル候補品の高濃度試料は  $10^6$  程度まで希釈して測定する必要がある、希釈には陰性血漿を使用するという方針を決定した。

### (3) PV B19 参照パネルの共同検定

参照品候補品について、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 (表 7)。

各パネルの施設毎の推定対数力価を図 3 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  $0.05 \text{ Log}_{10}$  (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 (表

8)。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。最終的に表 9 に示すパネルを PV B19 参照パネルとして樹立した。この結果について、NAT 小委員会に報告した(参考資料 3)。

### C.3.3 参照パネルの再評価に関する検討

2004 年に厚生労働科学研究により作製された 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安定性を評価するためパネルの力価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  $-70^{\circ}\text{C}$  の長期保存でもほとんどゲノム量に変化は認められなかった (表 10)。

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。

### C.4 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

輸血用血液を含めた血液製剤の安全性向上に HBV、HCV、HIV を対象とした核酸増幅検査の貢献は、計り知れない。これらの検出感度は、可能な限りの高感度が要求されたため、検出試薬の感度を考慮して決定されていることが多い。一方、PV B19 は一過性に高いウイルス血症を生じるが、抗体出現によって感染性は著明に低下することが知られている。また、PV B19 感染の多くは、不顕性感染となり献血者の 40~50% が PV B19 に対する抗体陽性と

考えられている。また、感染後1年以上 PV B19 と抗体が共存し、NAT 法でウイルス遺伝子が検出されることも報告されている。そのため、血漿分画製剤の原料血漿における PV B19 の規格は中和抗体を考慮して決定する必要がある。米国の FDA では、治験中に発生した PV B19 の感染事例の解析から、感染が成立しなかった（抗体が陽転しなかった症例）ウイルス濃度を根拠に血漿分画製剤の原料血漿は 10<sup>4</sup> IU/mL 以下と規制している。

一方、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プタパルボウイルスやイヌパルボウイルスと比較して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。

以上のことから PV B19 の感染性の評価法が必要になった。そこで、PV B19 の本来の標的細胞である血球系細胞株を用いた感染評価の測定系を確立し、免疫グロブリン製剤中に存在する PV B19 に対する中和活性の解析を目指した。その一方で、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。また行程が多いためコンタミ等が問題となる。そこでリアルタイム RT-PCR 法を確立し、1 行程で結果が得られる検出系の確立を目指した。

#### (1) nested RT-PCR による PV B19 感染性の評価、及びヒト免疫グロブリン製剤中の PV B19 中和活性の測定

PV B19 は細胞に侵入すると 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。

筋注用人免疫グロブリン製剤 100  $\mu$ L (IgG 量 15mg 含む) に 10<sup>-2</sup> から 10<sup>-9</sup> まで種々の濃度に希釈した PV B19 陽性血漿 100  $\mu$ L を添加し、5%アルブミン製剤 800  $\mu$ L を加え 1mL とした。コントロールは、筋注用人免疫グロブリン製剤の代わりに 5%アルブミン製剤を加え、1mL とした。室温で 1 時間反応後、KU812 由来のクローン株である F10 を 3 $\times$ 10<sup>5</sup>/100  $\mu$ L に調製し、これに中和させた溶液 1mL から 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 時間ウイルスを細胞に感染させた。感染後、 $1\text{mL}$  の 10%FCS-RPMI (エリスロポエチン 3 単位/ $\text{mL}$  含む) を加えて 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 を  $15\mu\text{L}$  の蒸留水に溶解した。RT-PCR には、抽出した RNA  $10\mu\text{L}$  を用いて、one-step RT-PCR を行い、さらに増幅産物  $2\mu\text{L}$  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。

陰性コントロールのアルブミン製剤では、 $10^2$  希釈から  $10^6$  希釈まで PV B19 の感染が認められた。一方、筋注用人免疫グロブリン製剤  $15\text{mg}$  では、最も高濃度である  $10^2$  希釈においてもスプライシングされた RNA 由来の PV B19 遺伝子の増幅は認められず、IgG  $15\text{mg}$  によって感染価は少なくとも 5 Log 減少した。PV B19 は、細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、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。

## (2) リアルタイム RT-PCR による感染性の評価系の構築

細胞に感染して RNA に転写された PV B19 は、塩基配列の 584 番と 585 番の間、及び 2087 番と 2088 番の間でスプライシングされ 584 番と 2088 番が結合した RNA ができる。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。これにより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。

1)と同様に KU812 由来のクローン株である F10 に PV B19 を  $10^2\sim 10^7$  倍に希釈して PV B19 を感染させ、感染 2 日後に RNA を抽出した。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。

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 PV 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。さらに実際に液状加熱による PV B19 不活化を行い感染性の評価を実施した。

その結果、100 倍に希釈した PV B19 陽性血漿を感染させた F10 細胞由来の RNA を 10 倍ずつ  $10^7$  まで PBS で希釈し、リアルタイム RT-PCR 法を行なったところ、Ct 値と希釈倍率から見ると 10 倍希釈から  $10^7$  希釈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  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  コピーの PV 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。これによって、本検出系は PV B19 のスプライシングされた RNA を特異的に検出することができることが明らかになった。リアルタイム RT-PCR を

用いた液状加熱による PV B19 の不活化の評価は、2 時間以上の液状加熱によって 5 Log の不活化効果が認められた。不活化の効率は、従来の nested RT-PCR から得られた結果と同じであった。

## D. 考察

### D.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

FDA のガイドラインや USP の NAT 試験法の記載について抜粋し、その要件について調べてきた。FDA の NAT ガイドライン(案)では、HCV、HIV、HBV ウイルス検査における背景や現時点での FDA の科学的なスタンスを明確にし、さらに NAT 検査結果と血清学的試験をどのように最終判定に結び付けるのかについて記載されている。特に NAT でシグナルが陽性となった場合であっても擬陽性の可能性も考慮し、血清学的検査の結果に再現性があるのか等、様々な条件を組み合わせることによりデシジョンツリーを作成している。さらに NAT 検査や血清学的試験により献血保留になったドナーに対する対応や、リエントリーの条件などが記載されている。

また、HBV のガイドラインではリエントリーを決定するための条件として具体的な感度についても記載されており、おそらく現時点での HBV の NAT による検出で最も高い感度を要求している。また、HBV のミニプールや個別 NAT の条件が記載されているが、我が国の NAT ガイドラインで規定されている感度より高い値が求められており、我が国でも議論が必要かもしれない。

一方で、精度管理やバリデーション法などについては記載されておらず、これは我

が国のガイドラインと異なる点である。

FDA の 2 つのガイドラインで共通している点は、血清学的試験と NAT をどのように組み合わせる合理的にドナーの適格性を判断し、検査対象となった輸血バック等の使用に当たっての基準を示していることである。

一方、USP の General Chapter の NAT 法は、特にウイルス検査に広く使われていることを前提に、精度管理やバリデーション法などについて記載されている。米国では NAT の精度管理等については公定書である USP にゆだねていると考えることが出来る。

米国での血液製剤の NAT を用いたウイルス安全性についての動向は、我が国の血液製剤の NAT ガイドラインの改定に向けて有用な情報と考えられた。

### D.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た検討として、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、今後導入が予想されるシングル NAT によるスクリーニングで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。

### D.3 NAT 実施のための標準品や参照パネルに関する検討

血液製剤の NAT ガイドラインでは、NAT の検出感度、精度管理のためにウイルスの標準品や参照パネルの使用が求められている。血液製剤の安全性を確保するために検査することが望ましいウイルスのうち、標準品や参照パネルが設定されていないものについては今後、順次整備していくことが必要と考えられる。また、我が国では厚生労働科学研究費により参照パネル樹立の検討が行われてきたが、研究終了後、十分に活用されていない現状がある。今後、参照パネルとして適切に公開され、NAT の評価に有効活用されることが望まれる。

PV B19 の参照パネル樹立のための共同研究では、得られた結果を基に統計処理を行い、表 9 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。

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  $-70^{\circ}\text{C}$  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 10) 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。

### D.4 血液製剤における PV B19 の規格値に関する研究

PV B19 は、一過性であるが  $10^{10}\text{IU/mL}$  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 PV B19 感染事例から、 $10^4\text{IU/mL}$  以下では感染が成立しなかったことから米国では  $10^4\text{IU/mL}$  以下を原料血漿の規格値としている。一方、PV B19 の感染は一過性であるが末梢血から 1 年以上も核酸増幅法で微量な PV B19-DNA が検出されることが報告されている。そのため、高感度の核酸増幅法を用いて献血者を調べると、数百人に 1 人の頻度で PV B19-DNA が検出されるとの報告もある。これらの献血者の血漿には中和抗体が存在し、感染性はないと考えられている。従って、PV B19 の血漿分画製剤の原料基準を定める際には、HBV や



HCV 等のように、中和抗体が高力価で存在しないウイルスと同一の基準を策定することは多くの貴重な血液を失うことになり、中和抗体を考慮した感染性がない PV B19 の基準値を決める必要がある。我々は、ヒト白血病由来の細胞株と nested RT-PCR 法を用いて PV B19 の感染性を評価できる系を確立し、免疫グロブリン中に高い中和活性があることを明らかにしてきた。また、60°C の液状加熱によって PV B19 が容易に感染性を失うことも明らかにしてきた。今後も我々の確立した系は有用であると考えられるが、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等、RNA 精製後結果が得られるまで 6 時間を要した。操作が多い分汚染が生じるリスクは多くなる。そこで、リアルタイム RT-PCR で実施することにより、解析時間の短縮を図ることとし、2.5 時間で結果を得ることができるようになった。PCR の操作が 1 回しかないため操作中の増幅物等の汚染のリスクを減少させることができる。また、増幅産物をチューブ等から取り出して取り扱うことがないので、測定室等を汚染させる可能性を減少させることもできる。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

- 1) 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の研究として、専門家を含めた 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を踏まえて NAT ガイドラインの改正案を作成し、NAT 小委員会へ提案した。
- 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、PV B19 の genotype 1, genotype 2 からなる参照パネルを樹立し、力価を設定した。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) 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。我々の実験結果から原料血漿の基準を  $10^4$  IU/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だと考えられた。

## F. 参考文献

- (1) Busch MP.: Closing the windows on viral transmission by blood transfusion.

- (In ed. Blood Safety in the New Millennium, ed. Stramer,SL) Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2001: Chapter 2, p.36.
- (2) Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the incidence rate/window period model. *Transfusion* 42:966-972 (2002).
  - (3) Dodd RY, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 42:975-979 (2002).
  - (4) Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV-1 viremia and antibody seroconversion in plasma donors: Implications for diagnosis and staging of primary HIV-1 infection. *AIDS* 17:1871-1879 (2003).
  - (5) Ganem, D, Prince, AM., Hepatitis B infection — Natural History and Clinical Consequences. *New England Journal of Medicine*, 350, 1118-1129 (2004).
  - (6) Alter, MJ, Centers for Disease Control and Prevention, Epidemiology of HBV Infection and Prevention Programs. Presentation to the Advisory Committee on Blood Safety and Availability, August 27, 2004.
  - (7) Epstein, J.S., Holmberg, J.A., Progress in monitoring blood safety. *Transfusion*, 50, 1408-1412 (2010).
  - (8) Roth, W.K., Weber, et al., NAT for HBV and Anti-HBc Testing Increase Blood Safety. *Transfusion*, 42, 869-875 (2002).
  - (9) Kleinman SH, Lelie, N, et al., Infectivity of Human Immunodeficiency Virus-1, Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus and Risk of Transmission by Transfusion. *Transfusion*, 49, 2454-2489 (2009).
  - (10) Prince, AM, Lee, DH, Brotman, B., Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion*, 41, 329-332 (2001).
  - (11) Hollinger, FB., Hepatitis B infection and Transfusion Medicine: Science and the Occult. *Transfusion*, 48,1001-1026 (2008).
  - (12) StataCorp. Stata Statistical Software: Release 10. 2007. College Station, TX, StataCorp LP.
  - (13) Gerlich, WH., Breakthrough of Hepatitis B Virus Escape Mutants After Vaccination and Virus Reactivation. *Journal of Clinical Virology*, 36 (Suppl. 1):S18-S22 (2006).
  - (14) Mosley JW, Stevens, CE, et al., Donor Screening for Antibody to Hepatitis B Core Antigen and Hepatitis B Virus Infection in Transfusion Recipients. *Transfusion*, 35, 5-12 (1975).
  - (15) Satake, Tairo, R, et al., Infectivity of Blood Components with Low Hepatitis B Virus DNA Levels Identified in a Lookback Program. *Transfusion*, 47, 1197-1205 (2007).
  - (16) Hui, CK, Sun, J, et al., Occult Hepatitis

- B Virus Infection in Hematopoietic Stem Cell Donors in a Hepatitis B Virus Endemic Area. *Journal of Hepatology*, 42, 813-819 (2005).
- (17) Gerlich, WH, Wagner, FF, et al., HBsAg Non-Reactive HBV Infection in Blood Donors: Transmission and Pathogenicity. *Journal of Medical Virology*, 2007, 79 (Suppl. 1), S32-S36 (2007).
- (18) Levicnick-Stezinar, S, Rahne-Potocar, Urska, et al., Anti-HBs Positive Occult Hepatitis B Virus Carrier Blood Infectious in Two Transfusion Recipients. *Journal of Hepatology*, 48, 1022-1025 (2008).
- (19) Blood Donor Screening for Hepatitis B Virus (HBV) Infection by Nucleic Acid Testing (NAT): Blood Products Advisory Committee 94th Meeting; Transcript April 1, 2009. <http://www.fda.gov/AdvisoryCommittee/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/BloodProductsAdvisoryCommittee/ucm121612.htm>.
- (20) Reesink, H.W., Engelfriet, CP, et al., Occult Hepatitis B Infection in Blood Donors. *Vox Sanguinis*, 94, 153-166 (2008).
- 2) 山口照英：バイオ(抗体)医薬品・後続品のコンパビリティ(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)
- 3) 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)
- 4) 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 Tech Japan*, 28(14), 39-46 (2012)
- 5) 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)
- 6) Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, and Komano J. : Toll-like receptor(TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 424(3), 519-23 (2012)
- 7) Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneich m, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H. Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, and Hamaguchi I.: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan, A pilot study. *Transfus Apher Sci*. Sep.3 (2012)
- G. 研究発表**
- (1) 論文発表
- 1) 内田恵理子：講座こうすればできる日本薬局方微生物試験7 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件, *防菌防黴*, 40 (7), 435-444 (2012)

- 8) 内田恵理子：バイオ医薬品・生物製品のウイルス安全性に関する国際動向、「医薬品の品質管理とウイルス安全性」、日本医薬品等ウイルス安全性研究会編、文光堂、東京、pp53-63 (2011)
- 9) 山口照英：バイオ医薬品の薬事法改正におけるウイルス安全性確保および関連する国内外の情報。「医薬品の品質管理とウイルス安全性」(山口一成編、文光堂) pp.,42-52 (2011)
- 10) 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)
- 11) 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
- 12) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 13) 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)
- 14) Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, *Current Cancer Drug Targets* (in press)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- (2) 学会発表
- 1) 内田恵理子、岡田義昭、水澤左衛子、柚木幹広、辻川宗男、皆木隆男、稲田耕一、小西久郎、五十嵐 正志、鈴木 光、嘉悦 洋、下瀬克郎、萩原克郎、安江博、生田和良、鈴木和博、山口照英：E型肝炎ウイルス RNA の核酸増幅検査 (NAT) 用参照パネルの作製、第 84

- 回日本生化学会大会、京都 (2011.9)
- 2) Sally Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, C. Micha Nubling, Kay-Martin Hansmann: Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira (2011.9)
  - 3) 梅森 清子、岡田 義昭、浜口 功: 過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による HCV 遺伝子検査について、第 59 回日本ウイルス学会、札幌 (2011.9)
  - 4) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭: 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化、第 59 回日本ウイルス学会、札幌 (2011.9)
  - 5) Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biologics. CMC Forum Japan, Tokyo (2012)
  - 6) Yamaguchi,T.: Japanese Perspective on Regulation of Biosimilar Products. APEC Biosimilar Symposium. Seoul/Korea (2012)
  - 7) 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)
  - 8) 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)
  - 9) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功: 末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪 (2012)
  - 10) 岡田 義昭: 血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪 (2012)
  - 11) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭: 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイルス学会、大阪 (2012)
  - 12) 水澤 左衛子、岡田 義昭: 核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作成について、第 60 回日本輸血細胞治療学会、郡山 (2012)
  - 13) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium Soul Korea (2013)
  - 14) 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)
  - 15) 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

図1. Multiplex HIV/HCV NAT でミニプール検体が陽性の場合

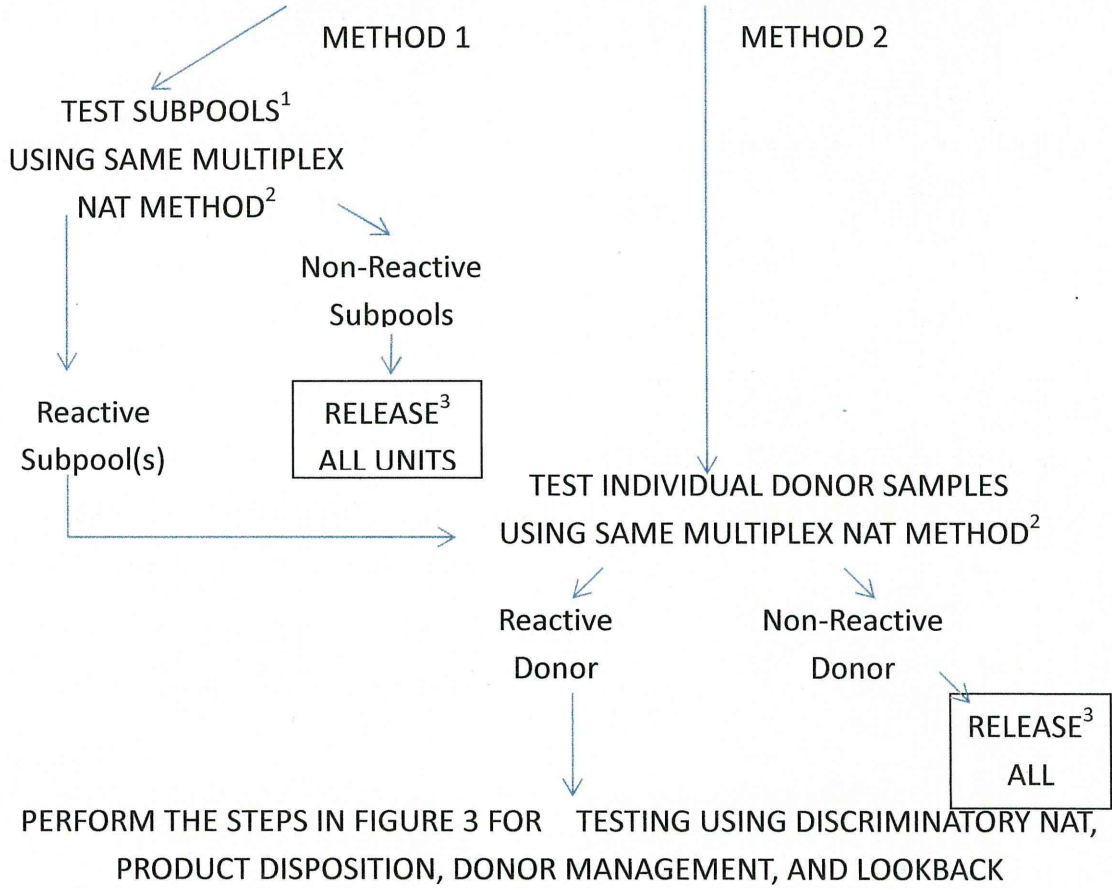
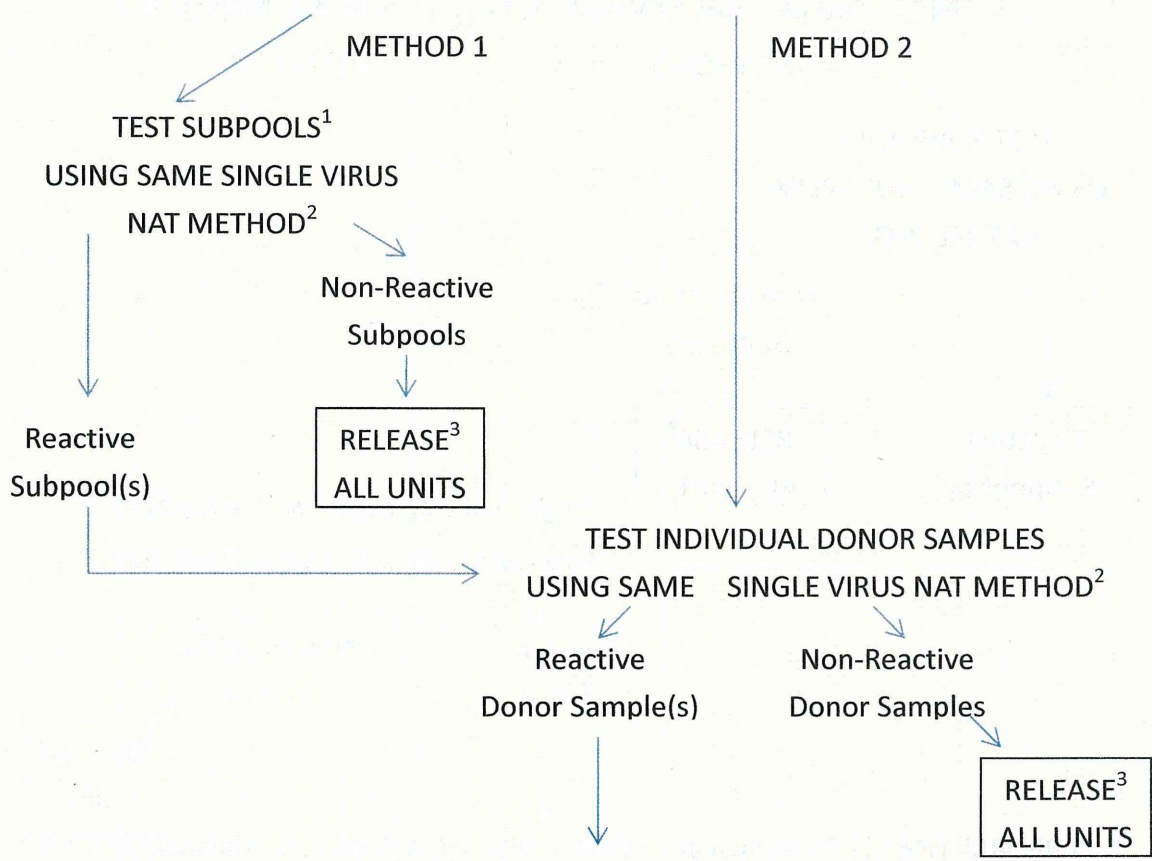




図2. HIV-1NAT やHCV NAT でミニプール検体が陽性の場合



PERFORM THE STEPS IN FIGURE FOR PRODUCT DISPOSITION, DONOR MANAGEMENT, AND LOOKBACK

表1. Testing, Product Disposition, Donor Management, and Lookback for a Minipool that is Reactive on a Multiplex NAT(MP-NAT): Resolution by Testing Subpools or by Testing Individual Donor Samples

If	Then	After that if	Then	After that if	Then
Minipool Reactive on a Multiplex HIV-1/HCV MP-NAT	METHOD1:Test subpools <sup>1</sup> using same Multiplex NAT method <sup>2</sup>	Reactive subpool(s)	Test the individual donor samples using same Multiplex NAT method <sup>2</sup>	Reactive donor sample(s)	Perform the steps in Table 3 for testing (discriminatory NAT), product disposition, donor management, lookback
				Non-reactive donor samples	Release <sup>3</sup> all units
		Non-reactive subpool(s)	Release <sup>3</sup> all units		
	OR METHOD2:Test the individual donor samples using same Multiplex NAT method <sup>2</sup>	Reactive donor sample(s)	Perform the steps in Table 3 for testing (discriminatory NAT), product disposition, donor management, lookback		
				Non-reactive donor samples	Release <sup>3</sup> all units

33



表2. Testing, Product Disposition, Donor Management, and Lookback for a Minipool that is Reactive on a Single Virus NAT(MP-NAT): Resolution by Testing Subpools or by Testing Individual Donor Samples

If	Then	After that if	Then	After that if	Then
Minipool Reactive on HIV-1 MP-NAT and/or HCV MP-NAT	METHOD1:Test subpools <sup>1</sup> using same Single Virus NAT method <sup>2</sup>	Reactive subpool(s)	Test the individual donor samples using same Multiplex Single Virus NAT method <sup>2</sup>	Reactive donor sample(s)	Perform the steps in Table 4 for product disposition, donor management, and lookback
				Non-reactive donor samples	
		Non-reactive subpool(s)	Release <sup>3</sup> all units		
	OR METHOD2:Test the individual donor samples using same Single Virus NAT method <sup>2</sup>	Reactive donor sample(s)	Perform the steps in Table 4 for product disposition, donor management, and lookback		
Non-reactive donor samples		Release <sup>3</sup> all units			

表 3. HBV DNA NAT 陽性の結果が得られた場合の輸血用全血、血液コンポーネント、及び製造原料に用いる白血球のドナー及びバックの管理

カテゴリー	HBV NAT 結果	HBsAg 結果	HBc コア抗体結果	ドナー及びバック
1	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陽性	陰性	輸血バックの廃棄；
2	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陽性	繰り返し陽性	ドナーの献血を永久保留
3	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陰性	繰り返し陽性	リエントリーの禁止
4	陽性	陰性	繰り返し陽性	
5	陽性	陰性	陰性	
6	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陰性	陰性	

表 4. HBV DNA NAT 陽性の結果が得られた場合の原料血漿のドナー及びバックの管理

カテゴリー	HBV NAT 結果	HBsAg 結果	ドナー及びバック
1	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陽性	バックの廃棄 ドナーの献血を永久保留
2	陽性	陰性	輸血バックの廃棄；
3	陽性	繰り返し陽性/ 確認試験陰性	ドナーの献血を暫定的に保留 リエントリーの可能性あり

表 5 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

表6 NAT用標準品、参照パネルの整備状況

ウイルス	国際標準品 (WHO)	国内標準品	参照パネル (WHO)	参照パネル (国内)
HCV	Code 06/100 (3 <sup>rd</sup> standard) Genotype 1a 154881 IU/mL	JCV-1bNo.122 Genotype 1b 100000IU/mL	Code 08/264 (2 <sup>nd</sup> panel) 6 サンプル(主要な6 種類の genotype)	100 サンプル* (Genotype 5 種 類、陰性対照)
HBV	Code 97/750 (2 <sup>nd</sup> standard) Genotype A2/HBsAg subtype adw2 5x10 <sup>5</sup> IU/vial	HBV-129 Genotype C HBsAg subtype adr 4.4x10 <sup>5</sup> IU/mL	Code 5086/08 (1 <sup>st</sup> panel) 15 サンプル (genotype 7 種類)	100 サンプル* (Genotype 5 種 類(Subtype 4 種 類),陰性対照)
HIV-1	Code 10/152 (3 <sup>rd</sup> standard) Genotype B 185,000 IU/mL	HIV-00047 Genotype B 1.4x10 <sup>5</sup> IU/mL	Code 08/358 (1 <sup>st</sup> panel) 11 サンプル (Genotype 10 種類, 陰性対照)	100 サンプル* (Subtype A, B, E, 陰性対照)
HIV-2	Code 08/150 1,000 IU/mL	—	—	—
HAV	Code 00/560 5 x 10 <sup>4</sup> IU/vial	—	—	—
HEV	Code 6329/10 Genotype 3a 250,000IU/mL	Genotype 3b 250,000IU/mL	—	6 サンプル** (G3jp, G3sp, G3sp (culture), G3us, G4jp), negative cont.)
Parvovirus B19	Code 99/802 (2 <sup>nd</sup> standard) 5 x 10 <sup>5</sup> IU/vial	—	Code 09/110 (1 <sup>st</sup> panel) Genotype 1, 2, 3, negative cont.	—

\*厚生労働科学研究：安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究（任研究者：吉澤浩司、平成13～15年度）

\*\*厚生労働科学研究：再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等確保に関する基盤技術開発研究（研究代表者：山口照英、平成22年度）