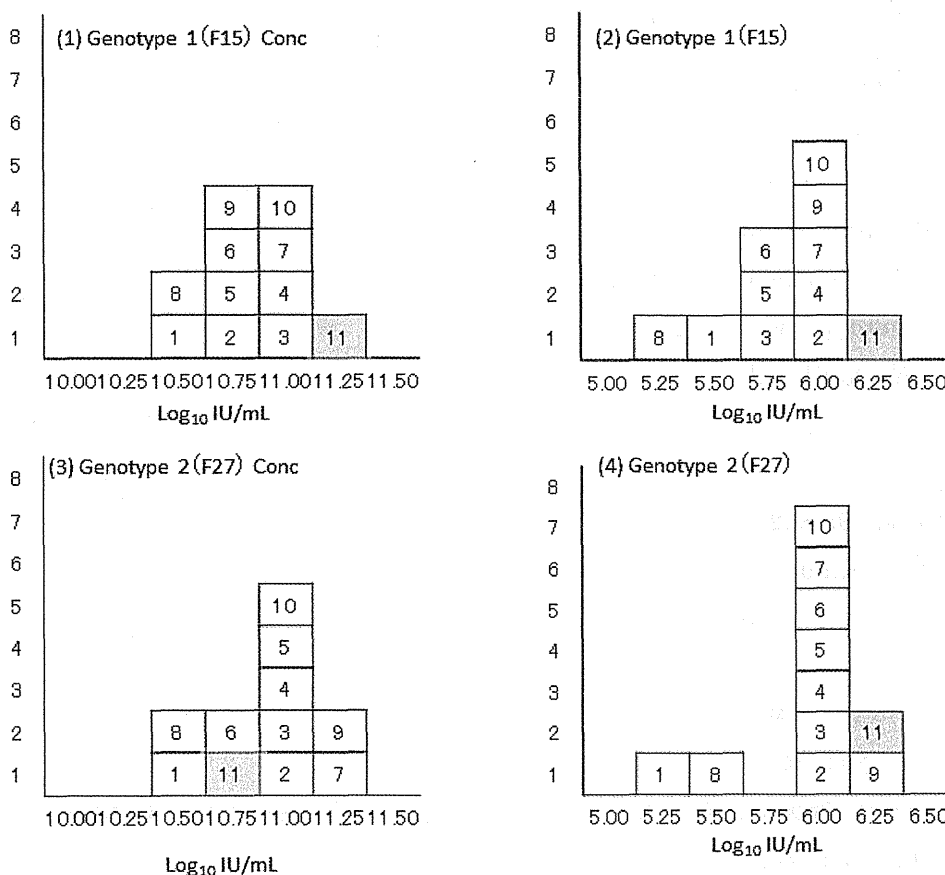


表7 PV B19 参照パネルの力価測定で用いられた試験法と施設数

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

図3 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.)

表 8 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

表9 PV B19 参照パネルの力価

バルボウイルス 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。

表 10. HBV、HCV、HIV の再測定
HBV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ						ロシュ			最終成績
		HBsAg		HBV-DNA				AMPLICOR HBV Monitor			
		(RPHA)	(EIA 法)	定量測定	ジェノタイプ	サブタイプ	Pre-C 点突然変異	copies/mL			
		2 ⁿ		copies/ml				1 回目	再検査	再々検査	
P1-045	1-066		+	3.3×10^5	A	adw	Wild	2.5×10^5	-	-	2.5×10^5
P1-059	1-084		+	1.3×10^5	A	adw	Wild	6.9×10^4	-	-	6.9×10^4
P1-036	1-056		+	3.0×10^4	B	adw	Wild	1.6×10^4	-	-	1.6×10^4
P1-041	1-061		+	1.3×10^5	B	ayw	Wild	5.0×10^4	-	-	5.0×10^4
P1-023	1-038		+	1.4×10^5	C	adr	Wild	1.0×10^5	-	-	1.0×10^5
P1-024	1-040		+	1.1×10^5	C	adr	Wild	6.3×10^4	-	-	6.3×10^4
P1-018	1-022		+	2.2×10^4	D	ayw	Wild	6.3×10^3	-	-	6.3×10^3
P1-083	1-119	8.5/2.5						3.2×10^4	-	-	3.2×10^4
P1-089	1-125	10/2						1.3×10^5	2.0×10^5	-	1.3×10^5
P1-087	1-123	9/3						1.3×10^4	-	-	1.3×10^4
P1-100	1-136	12↑/6.5						1.6×10^3	-	-	1.6×10^3
P1-078	1-114	7.5/1						<400	<400	-	(+)
P1-081	1-117	8.5/2.5						<400	5.0×10^2	-	5.0×10^2

HCV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ			ロシュ			
		HCV PA 2 ⁿ	HCV-RNA	ジェノタイプ プ	AMPLICOR HCV Monitor ver. 2.0			最終成績
			定量測定		IU/mL			
			copies/ml		1 回目	×10 希釈再検査	×20 希釈再検査	IU/mL
P2-009	2-009		1.1×10 ⁶	II (1b)	1.04×10 ⁶	2.35×10 ⁶	-	2.4×10 ⁶
P2-016	2-016		2.0×10 ⁵	II (1b)	1.90×10 ⁵	-	-	1.9×10 ⁵
P2-035	2-036		2.0×10 ⁵	II (1b)	9.48×10 ⁵	1.45×10 ⁶	-	1.5×10 ⁶
P2-002	2-002		5.7×10 ⁶	III (2a)	1.26×10 ⁶	2.15×10 ⁶	-	2.1×10 ⁶
P2-006	2-006		1.4×10 ⁶	III (2a)	1.50×10 ⁶	2.91×10 ⁶	-	2.9×10 ⁶
P2-028	2-029		1.5×10 ⁸	III (2a)	1.37×10 ⁶	3.53×10 ⁶	-	3.5×10 ⁶
P2-003	2-003		4.3×10 ⁷	IV (2b)	2.00×10 ⁶	4.00×10 ⁶	-	4.0×10 ⁶
P2-007	2-007		7.7×10 ⁵	IV (2b)	2.80×10 ⁶	3.46×10 ⁶	-	3.5×10 ⁶
P2-017	2-017		1.8×10 ⁶	IV (2b)	1.00×10 ⁶	2.41×10 ⁶	-	2.4×10 ⁶
P2-080	2-129	11			3.32×10 ⁶	2.05×10 ⁶	-	2.0×10 ⁶
P2-087	2-137	12 ↑			1.43×10 ⁶	2.57×10 ⁶	-	2.6×10 ⁶
P2-088	2-138	12 ↑			1.58×10 ⁶	1.74×10 ⁶	-	1.7×10 ⁶
P2-090	2-140	12 ↑			2.20×10 ⁶	3.92×10 ⁶	-	3.9×10 ⁶
P2-093	2-143	12 ↑			1.60×10 ⁶	4.32×10 ⁶	-	4.3×10 ⁶
P2-095	2-145	12 ↑			8.85×10 ⁵	1.46×10 ⁶	-	1.5×10 ⁶
P2-098	2-151	genotype 1a 型			2.52×10 ⁵	-	-	2.5×10 ⁵

HIV パネル

パネル番号	検体番号	日赤データ		ロシュ				最終成績
		定量測定 copies/ml	HIV サブ タイプ	AMPLICOR HIV Monitor v1.5				
				Normal assay		x10 Dil assay		
copies/mL						IU/mL		
P3-002	3-002	4.2×10 ⁴	B	48045	4.8×10 ⁴	-	-	4.8×10 ⁴
P3-001	3-001	4.1×10 ⁶	B	1224238	1.2×10 ⁶	181806	1.8×10 ⁶	1.8×10 ⁶
P3-013	3-013		B	311839	3.1×10 ⁵	-	-	3.1×10 ⁵
P3-027	3-027		B	145336	1.5×10 ⁵	-	-	1.5×10 ⁵
P3-049	3-049		B	456238	4.6×10 ⁵	-	-	4.6×10 ⁵
P3-060	3-060		A	2600	2.6×10 ³	-	-	2.6×10 ³
P3-034	3-034		A	1020	1.0×10 ³	-	-	1.0×10 ³
P3-086	3-086		A	14294	1.4×10 ⁴	-	-	1.4×10 ⁴
P3-061	3-061		B	54439	5.4×10 ⁴	-	-	5.4×10 ⁴
P3-081	3-081		B	44447	4.4×10 ⁴	-	-	4.4×10 ⁴
P3-085	3-085		B	71776	7.2×10 ⁴	-	-	7.2×10 ⁴
P3-017	3-017		E	262527	2.6×10 ⁵	-	-	2.6×10 ⁵
P3-023	3-023		E	118330	1.2×10 ⁵	-	-	1.2×10 ⁵
P3-072	3-072		E	130554	1.3×10 ⁵	-	-	1.3×10 ⁵

<参考資料1>

血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン(コメント)			
コメント		理由、根拠、修正案	対応案
ガイドライン全体へのコメント			
	改正案はEP、及びICHのガイドラインから逸脱しない内容であることを希望	当社ではNATはEP、及びICHのガイドラインに準拠して行われているため	FDAやEMAのガイドラインとの整合性は取れていると理解していますが、EPやUSPのガイドラインについてはこれまで十分な比較検討を行ってきておりません。
	技術の進歩に合わせて内容を見直すことは大切だが、minimum requirementであること		規制的要件については安全技術調査会等での議論に基づいて整備をする必要があると思います。本ガイドラインは技術的要件を中心に記載されるものと理解しております。
	海外のNATに関するガイダンスとの整合性を図っておく必要があること。		NATガイドライン作成時にはFDA及びEMAガイドラインとの整合性は取れていたと考えられます。最新のガイドラインとの比較では、制度の違いに基づくと思われる差異も見られるようですが、本ガイドラインの目的を超えているかどうかの判断をしたいと思います。
注意事項(Q&A)の整備			必要に応じて見直します
個別項目へのコメント			
1. ガイドラインの目的及び適用範囲			
1-1) 目的			

	現在は、代表的なウイルスについて国際標準品が設定されていることから、コピー数表記ではなくIUに変更するほうがよい。		全体を通して見直して、IU表記に統一したいと思います。
1-2)適用範囲			
	最終製品のウイルス検査は、安全技術調査会で実施しないこととされたことから削除するほうがよい		ご提案どおりとしたい。
	HCV, HBV, HIV以外のウイルス検出への適用をどう考えるか: パルボウイルスB19はFDAでもその要件が示されており、検討が必要となるであろう。(FDAの 10^4 IU/mlに準じるのがよい。)HEVは北海道で限定して試行されており、また各社で受け入れ試験として行われている実態もある。WNVなど将来的に必要なかもしれない。		NATガイドラインにHIV、HCV、HBV以外のウイルスについて規制的要件を挿入するには、上の委員会ので結論を待つ必要がある。技術的要件としてパルボウイルスB19やHEV、WNVについて、特に注意すべき事項があればそれを記載することは可能では。
2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策			
	NATガイドライン中に「試験・検査」という言葉ができてきますが((項目2-1)の最後)、試験と検査の違いがあれば教えてください。		
	HBVへの適用では、血清学的試験により高タイトーの血漿を排除したうえでNATを適用しないと汚染が起きやすいが、その点についての記載がない。		交差汚染に可能性の言及については、実態に関する調査を含めて判断したい。
	Multiplex PCRに関する記載がないが、記載の必要性も含めて議論が必要。		FDAのガイドラインではMultiplex PCRに関する記載も整備されており、Multiplex PCRを導入するときの注意点やバリデーションのあり方については記載が可能ではないか。

	<p>①個別NATの実施に当たっての記載が必要か。あまり具体的に書き過ぎても困る可能性あり。</p> <p>②他の方法(TMA法等)の必要性</p> <p>③Taq polymeraseの化学修飾(Hot startなど)への言及</p>		
2-1)施設・設備の整備等に関する事項			
47	2-1)の修正(追記)を希望	<p>NATは数ダースコピーのウイルス遺伝子を検出できることから、増幅産物による汚染などが起きないように十分な配慮をする必要がある。留意事項には作業者の導線や更衣、材料の流れ、エアフローや給気、除染法などが含まれる。最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起りやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。開放系では、マスターミックスの調製、資料の処理や抽出、NATによる増幅、及び増幅産物の検出といったNAT試験の各ステップを開放系で行う場合には、原則的通りに、試験はそれぞれ異なるエリアや区画で実施する必要がある。(*1)</p>	

	<p>2-1)で引用されているようにNATのこの部分の記載について時間も経過しており、最近の市販NATキット等は調整済みで、閉鎖系かつ分注済みのもので利用可能である。試薬もチューブやカセットに入った調整済みのもので用いられており、最近の市販システムを用いる場合には本記載はもはや不要である。この記載は変更する必要がある。</p>	<p>最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのもので用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。種々の試薬やテストキットを用いるNAT試験をインハウスのシステムを用いて開放系で実施する場合には、ANTが数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できることから、NATによる増幅産物の汚染が起きないように最善の注意を払う必要がある。従って開放系で実施するNATの試験設備はガイダンスに示された条件に適合する必要がある。(*1)</p>	
	<p>自動化機器が普及している中で、本文の(*1)の内容について、例えば「交差汚染の防止等がなされている場合はこの限りではない。」など、本文中に記載し、条件設定した方がよいのではないのでしょうか</p>		
2-2) 機器, 器具の保全、管理に関する事項			
	<p>NAT検査におけるシステム適合性試験とは、具体的にどういふことをすればよいのでしょうか。</p>		<p>検出の確認(ランコントロール)、検出系の性能(特異性)、再現性が挙げられますが、試験ごとに実施するというのではなくバリデーションも含めてのことです。</p>
2-3) (被験) 検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事項			
	<p>抽出法やプライマー、プローブ等の市販キットの使用:バリデーション、キットの受け入れ試験、キット変更の場合などの記載が必要ではないか。(USPにはキットの要件が記載されている。)</p>		<p>USPの市販キットの使用に関するGeneral Chapterを参考に案文を作成してみます</p>
2-4) 核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項			

	ウイルスゲノムの変異により検出が出来なくなる可能性について、適切な評価を行うことを記載すべき(HIVのゲノム変異)。	EMAがHIVのゲノム変異により検出が出来ないキットがあることについて注意喚起を行った(シングルターゲットに代えてデュアルターゲットPCRの推奨)	ゲノムの変異が起きている可能性を日ごろから検討することとして、血清試験で陽性になった検体のゲノム解析を行う必要性について言及する案文を提案。また、デュアルターゲットPCRを行う場合に考慮すべき事項についての記載についても案文を提案します。
	Realtime PCR/RT-PCRでの検出の確認に関してカットオフ値の設定に関する記載がない。		用手法での記載と比較して適切に整備したいと思います
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			
	(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、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」と記載すべきである。		
	①特異性の確認 ○核酸→ウイルス遺伝子		ウイルス遺伝子に修正します
	③増幅産物が特異的である確認 キットの使用者で、様々なジェノタイプのウイルスを入手する場合は困難な場合もあることから、次の一文を記載する。 ・ウイルス遺伝子型等に対する検出感度 ○最終行に、「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ができる。」を追記する。		市販キットの使用に関する考慮事項と共に、どのように記載するかを検討する。

	<p>・NAT検査におけるばらつきは、一般的にどれくらいまでを許容すると考えればよいでしょうか。</p>		<p>一概には言えないのではないのでしょうか。検出限界近くの低濃度のウイルス溶液では、採取サンプル中に含まれるウイルス量は非常にばらつくことが想定されています。一方で、FDAのパルボウイルスの検出限界のように、10^4 IU/mlであればこのような希釈液でのサンプリングによる誤差はそれほど大きいとは考えにくい。</p>
	<p>・定量NAT試験系は、分析法バリデーションに従った方がよいのでしょうか。</p>		<p>ICH Q2A及びICH Q2Bが参考になると考えられるが、全てが適用可能か検討させていただきます。</p>
	<p>陰性パネル：陰性血漿の調達法、現行の記載は十分か？「100検体を試験し、陰性であることを確認」の妥当性（従来の打率の考え方に基づいたものであり、現行のリアルタイムPCRとは考え方が異なる。）</p>		<p>リアルタイムPCRでの陰性血漿の評価法については再検討させていただきます。</p>
	<p>凍結乾燥されていないRNAウイルス標準品（社内標準品を含め）の安定性についてどのように考えられるか説明してほしい。</p>	<p>標準品の安定性について、DNAウイルスでは問題が少なくは思われますが、RNAウイルスでは長期保存によりコピー数が低下する傾向があるように思われます。</p>	
2-6) 検出感度に関する事項			
	<p>②検出感度の求め方 ・3回以上の独立した試験の実施 　○最終行に、「自動化機器の場合は、製造メーカーのデータをもって代えることができる。」</p>		
	<p>NATガイドラインに記載されている、n数に関する制定当時の考え方（根拠）を明示してほしい（例；頑健性のn=20、95%感度の3倍など）。</p>		

	検出限界の解析のための標準品の希釈法：希釈には陰性血漿を用いるべき。		PBS等で希釈系列を作製すると、実サンプルとの抽出効率等の齟齬が出来る可能性を記載したいと思います。
	バリデーションのための標準品や参照パネル；標準品、自社標準物質の記載について ①国際標準品、②国際標準品で校正された国内標準品 ③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質等(参照品)		国内標準品は、IU単位で表示されている場合には国際標準品に対して校正されています。自社標準物質の作製について追記する必要があるか議論を行いたいと思います。
	ランコントロールについて、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスが必ず陽性になることを求めているが、HBVの検出感度はすでに数IUと非常に高感度であり、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスを設定することが困難である。ランコントロールの設定について適切な記載にしていきたい。	NAT法の技術革新が進み、高感度になったために非常に低濃度のランコントロールの調製が難しくなっている。	
2-7) 判定基準の設定に関する事項			
	再試験の基準に関する記載が必要。		FDAガイドラインの記載を参考に記載案を提案させていただきます。
2-8) 従事者の技術の標準化と向上に関する事項			
2-9) 汚染防止に関する事項			
	汚染防止対策は、最新の市販されている閉鎖系システムを用いなくて、インハウスの開放系を用いる場合に適用すべきである。		上記のコメント同様、適切な閉鎖系での対応をとる場合には、ここで書かれているような部屋の区別は不要とする記載を追記したいと思います。
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			
3-2) 「陰性」と判定した結果の意義			
3-3) 必要とされる検出限界値(*8)について			

<参考資料 2>

血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン(改正案)

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的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 0.5log 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 (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。