

厚生労働科学研究補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

血液製剤のウイルス等安全性確保のための評価技術開発に関する研究

HBV-NAT の国内標準品の再値付けのための国内共同研究

担当責任者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長  
担当協力者 水澤左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨: 血液製剤のウイルス安全性の確保対策として 1990 年代後半より実施されている原料血漿と輸血用血液のウイルス核酸増幅試験(NAT)のための国内標準品は当時の WHO 国際共同研究の方法に準じてエンドポイント法によって力価が定められた。その後、定量法の性能が飛躍的に向上したことから国際標準品の更新のための共同研究において定量法を用いて標準品の力価を決定するようになった。そこで、本研究においては国際標準品の共同研究に準じ、現在使用されている定量法を用いて NAT のための国内標準品の力価を再評価することを目的として共同研究を実施することとした。平成 26 年度は HBV-DNA 国内標準品の力価の再評価を目的とする共同研究を実施し、国内 7 施設が参加した。

A. 背景と研究目的

血液製剤のウイルス安全性は 1990 年代後半より、原料血漿のウイルスの核酸増幅試験 (NAT) が実施されるようになり、飛躍的に増した。NAT 技術の進歩に応じて、科学的根拠に基づいた新技術の評価基盤の整備の必要性が高まり、その一環として国際整合性のある国内標準品等の整備が求められている。わが国で現在使用されている HCV, HBV 及び HIV の NAT のための国内標準品は当時の WHO 国際共同研究の方法に準じてエンドポイント法によって国際標準品に対する相対力価が定められた。その後、定量法の性能が飛躍的に向上したことから国際標準品の更新のための共同研究において主に

定量を用いて標準品の力価を決定するようになった。また、これらの共同研究において、定量法による測定結果に基づいて決定するほうがエンドポイント法の測定結果に基づくよりも力価の誤差の小さことが示された。そこで、本研究においては、現在使用されている定量試験法を用いて NAT のための国内標準品の力価を国際標準品に準拠して値付けすることを目的として、国内共同研究を実施する。平成 26 年度は HBV-DNA 国内標準品を対象とした。

B. 研究方法

1. 参加施設

国立感染症研究所、国立医薬品食品衛

生研究所、血液事業者等、民間の衛生試験所、体外診断薬メーカー。

## 2. 材料

標準品 (S): 第三次 HBV-DNA 国際標準品 (10/264)、力価 850,000 IU/mL、分注量 0.5mL/vial の凍結乾燥品。試料 (J): 第一次 HBV-DNA 国内標準品 (HBV-129)、力価 430,000 IU/mL。HBV genotype C 陽性血漿を脱クリオ又はそれと同等の陰性プール血漿で希釈、0.5mL/vial に分注、-80°C で凍結したもの。希釈用血漿: HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性、HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性のプール血漿。希釈用血漿には日本赤十字社から譲渡を受けた輸血に適さない血液を使用した。

## 3. 力価の測定

標準品として国際標準品を用いて定量法で力価の測定を実施した。各参加施設において定量性が確認されている範囲で標準品と試料を 3 段階以上の 10 倍段階希釈し、それぞれの値を測定した。日を替えて 3 回測定した。

## 4. 力価の決定

各施設が報告した測定値を感染研において統計解析し、国際標準品に対する相対力価として決定する。

## C. 研究結果

共同研究には国内の 7 施設 (公的機関 2、血液事業者等 1、民間の衛生試験所 2、体外診断薬メーカー 2) が参加し、日常実施している定量試験法を用いて国内標準品と国際標準品を測定した。4 施設がコバス TaqMan HBV 「オート」 v2.0 で、3 施設がアキュジーン m-HBV

で 2 施設が In-house の TaqMan PCR を用いて測定し、合計 9 セットの測定結果が得られた (表 1)。参加施設から報告された結果を国立感染症研究所が解析して、HBV-DNA 国内標準品の力価を国際単位を用いて改めて決定することになっている。

## D. まとめ

本研究において、今年度は定量試験法を用いて NAT のための HBV-DNA 国内標準品の力価を国際標準品に準拠して再評価することを目的として、国内共同研究を実施した。7 か所の参加施設から報告された結果を国立感染症研究所が解析して、国内標準品の力価を国際単位を用いて改めて決定することになっている。国内で使用されている血漿分画製剤を製造する国内外のメーカーの参加を募ったが、原料プールの試験で日常実施している定性法での参加希望のみであったため、今回の研究には加えなかった。

## E. 謝辞

希釈用血漿を譲渡していただいた日本赤十字社に感謝いたします。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Epstein J, Ganz PR, Seitz R, Jutzi M, Schaerer C, Michaud G, Agbanyo F, Smith G, Prosser I, Heiden M, Saint-Marie I, Oualikene-Gonin W, Hamaguchi I, Yasuda N: A shared regulatory perspective on deferral from blood donation of men who have sex with

- men (MSM). *Vox Sang*, 107(4):416-9,2014
- 2) Okuma K, Fukagawa K, Tateyama S, Kohma T, Mochida K, Hiyoshi M, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hirose K, Buonocore L, Rose JK, Mizuochi T, Hamaguchi I: Development of an Infectious Surrogate Hepatitis C Virus Based on a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins and Green Fluorescent Protein. *Jpn J Infect Dis. In press*
  - 3) Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I, Identification of TL-Oml, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. *J. Clin. Microbiol.* 53(2):587-96, 2015
2. 学会発表
- 1) Kitazawa J, Odaka C, Hamaguchi I, and the Hemovigilance Research Group supported by Japan's Ministry of Health, Labour and Welfare. Hemovigilance in Japan: 2<sup>nd</sup> Interim Report, AABB annual meeting, 2014.10.25 Philadelphia, USA
  - 2) 井上由紀子、守田麻衣子、相良康子、後藤信代、倉光球、浜口功、迫田岩根、入田和男、清川博之、WB判定保留事例のFollow-up –HTLV-1抗体確認検査に関する考察-第1回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2014. 8.
  - 3) 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、浜口功、HTLV-1モデルマウスであるHBZ-Tgマウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析、第1回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2014. 8.
  - 4) 大隈和、日吉真照、滝澤和也、齋藤益満、浜口功、CCR4リガンドTARCを用いた新規抗HTLV-1分子標的治療薬の開発、第1回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2014. 8.
  - 5) 佐竹正博、相良康子、岩永正子、浜口功、献血者のデータから明らかになったHTLV-1水平感染の実態、第1回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2014. 8.
  - 6) Kuribayashi W, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Asada Y, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I, Identification and characterization of cancer stem cells in an HBZ transgenic mouse model of ATL、第76回日本血液学会学術集会、大阪、2014. 10.
- G . 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

| 測定法                      | 測定セット数 |
|--------------------------|--------|
| コバス TaqMan HBV 「オート」v2.0 | 4      |
| アキュジーンm-HBV              | 3      |
| In-house/TaqMan PCR      | 2      |
| 合計                       | 9      |

表1 . HBV-DNA国内標準品の再評価に用いた測定法

平成27年1月27日

「HBV-DNA国内標準品の力価再評価  
のための共同研究」 参加者 各位

厚生労働科学研究委託費  
医薬品等規制調和・評価研究事業「血液製剤  
のウイルス等安全性確保のための評価技術  
開発に関する研究」研究班（研究代表者 山  
口 照英）  
研究分担者 濱口 功

### HBV-DNA 国内標準品の力価再評価のための共同研究実施要綱

#### 1. 目的

現行の HBV-DNA 国内標準品は当時の WHO 国際共同研究に準じて定性法を用いたエンドポイント法によって WHO 国際標準品に対する相対力価を決定した（平成 16 年 NAT 小委員会報告）。その後、定量法が広く用いられるようになったことから WHO 国際標準品の更新のための共同研究においては主に定量法の測定結果に基づいて新しい標準品の力価を決定するようになった。これらの共同研究において、定量法による測定結果に基づいて決定するほうがエンドポイント法の測定結果に基づくよりも力価の誤差の小さことが示された。また、現在は第三次 HBV-DNA 国際標準品が使用されている。そこで、本共同研究において、現行の HBV-DNA 国内標準品の力価を第 3 次国際標準品に基づいて定量法を用いて測定し、力価を再評価することとする。

#### 2. 参加施設

国立感染症研究所（担当：血液・安全性研究部）、日本赤十字社、民間の衛生検査所、試薬メーカー及び HBV-NAT の標準化に関する専門家。

#### 3. 材料

試料(S)：第三次 HBV-DNA 国際標準品( 10/264 )、力価 850,000 IU/mL、分注量 0.5mL/vial の凍結乾燥品（1 本）

【事前調製】国際標準品を室温に戻し、内容が全てバイアルの下半分にあることを確認してから開封する。注射用水 0.5mL に溶解し、室温で混和しながら 20 分以上置く。4 等分ずつエペンドルフ試験管に分注し、-80 で凍結保管する。小分けした国際標準品は用時解凍する。

試料(J)：第一次 HBV-DNA 国内標準品(HBV-129)、力価 430,000 IU/mL。HBV genotype C 陽性血漿を脱クリオ又はそれと同等の陰性プール血漿で希釈、0.5mL/vial に分注、

-80°C で凍結したもの。用時に温浴で手早く解凍して使用する。

希釈用血漿： HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性、HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性の脱フィブリンプール血漿。輸血に適さない血漿を原料に調製した希釈用血漿を日本赤十字社から供与された。

【事前処理】希釈用血漿を温浴で手早く解凍する。沈殿や浮遊物があれば遠心して除く。コンタミ防止のために、新しいキャップ付きプラスチック試験管等に適宜分注して4℃で保存。

#### 4. 力価の測定

試験法：力価の測定は各施設が日常実施している定量法で行う。測定は日を替えて3回実施する。原則として多重測定は行わない。日常の試験で多重測定を実施している施設においては多重測定を行っても良い。その場合には、すべての測定値を報告書に記入すること。

試料：測定ごとに新しいS（小分け）と試料Jを使用する。

試料の希釈：各施設において定量性が確認されている範囲で試料Sと試料Jをそれぞれ10倍段階希釈した3濃度（可能であれば、原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ ）を測定する。検体の希釈には添付の希釈用人血漿を使用する。

例1) コバス TaqMan® HBV 「オート」 v2.0 :  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$

例2) アキュジーン *m*-HBV :  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$

例3) 1回の測定に血漿 0.1mL を使用する場合：原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$

#### 5. 結果の報告

1) 添付の結果報告書（別紙）に記入したエクセルファイルをメールで提出する

2) 結果報告書のプリントアウトに可能な限り生データを添付して郵送する。

3) 期日：平成27年3月10日火曜日

4) 提出先：文末の連絡先

【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて測定した値を希釈した試料mL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、"IU"）を用いる。参加施設において試料Jの試料Sに対する相対力価を計算する必要は無い（「6. 結果の解析」参照）。

#### 6. 結果の解析

感染研において解析する。平行線定量法によって国際標準品に対する国内標準品の施設ごとの推定相対力価(IU/mL)を算出し、それに基づいて全体の平均を求める。全体の平均に反映させるのが困難なデータがある場合には別途検討する。

#### 7．候補品の力価の決定

施設名をコード化した結果報告書を参加施設に送付し、参加者の意見も参考にして国内標準品候補品の力価を決定する。共同研究の結果をNAT小委員会等に報告し、国内標準品としての承認を受ける。

#### 8．経費

測定に関わる費用は参加者負担とする。

#### 7．問い合わせ先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所

血液・安全性研究部 第2室 水澤 左衛子（みずさわ さえこ）

Tel: 042-561-0771(内線 3004), Tel: 042-848-7124(直通)

Fax: 042-565-3315(代表)

E-mail: [mizusawa@nih.go.jp](mailto:mizusawa@nih.go.jp)

以上

## 別紙

**HBV-DNA国内標準再評価のための共同研究  
国内標準品候補品測定結果報告書**

**参加者施設**            施設名  
                                 担当者氏名  
                                 電話  
                                 メール

## 核酸抽出法

|              |   |
|--------------|---|
| 施設コード        |   |
| 抽出試薬         | キット:<br>自家法(原理):  |
| 抽出装置(使用した場合) |   |
| 試料、核酸溶液の量    | 希釈した試料( ) $\mu$ lを使用し<br>核酸溶液( ) $\mu$ lを調製する。<br>体外診断薬キットについては記入不要。試薬メーカーが代表して記入して下さい。 |

## 核酸増幅法

|                 |  |
|-----------------|--|
| 試薬              | キット名:<br>又は<br>自家法(原理):                              |
| 装置              |  |
| 増幅する領域          | 体外診断薬キットについては記入不要。試薬メーカーが代表して記入して下さい。                |
| 1増幅反応当り使用する核酸の量 | ( ) $\mu$ l<br>体外診断薬キットについては記入不要。試薬メーカーが代表して記入して下さい。 |

**HBV-DNA国内標準品再評価のための共同研究  
国内標準品測定結果報告書**

**施設コード/参加施設名/担当者**

施設コードXX/国立感染症研究所/村山 花子

**測定結果(1回目)/測定日:**

| Sample   | Dilution<br>(neat, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> etc) | *HBV Result<br>(IU/mL) | Crossing point / Ct<br>value (if applicable) | Comments |
|----------|---|------------------------|--|----------|
| <b>S</b> | neat  |                        |  |          |
|          | 10 <sup>-1</sup>  |                        |  |          |
|          | 10 <sup>-2</sup>  |                        |  |          |
|          |   |                        |  |          |
|          |   |                        |  |          |
| <b>C</b> | neat  |                        |  |          |
|          | 10 <sup>-1</sup>  |                        |  |          |
|          | 10 <sup>-2</sup>  |                        |  |          |
|          |   |                        |  |          |
|          |   |                        |  |          |

記入上の注意参照

\*【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて得た値を希釈した試料mL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、"IU"）を選択して記入する。

HBV-DNA 国内標準品再評価のための共同研究  
国内標準品測定結果報告書

施設コード/参加施設名/担当者

測定結果(1回目)/測定日:

| Sample | Dilution<br>(neat, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> etc) | *HBV Result<br>(IU/mL or copy/mL) | Crossing point / Ct<br>value (if applicable) | Comments |
|--------|---|-----------------------------------|--|----------|
| S      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
| C      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |

\*【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて得た値を希釈した試料mL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、"IU"）を選択して記入する。

**HBV-DNA国内標準品再評価のための共同研究  
国内標準品測定結果報告書**

**施設コード/参加施設名/担当者**

**測定結果(2回目)/測定日:**

| Sample | Dilution<br>(neat, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> etc) | *HBV Result<br>(IU/mL or copy/mL) | Crossing point / Ct<br>value (if applicable) | Comments |
|--------|---|-----------------------------------|--|----------|
| S      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
| C      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |

\*【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて得た値を希釈した試料mL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、"IU"）を選択して記入する。

**HBV-DNA国内標準品再評価のための共同研究  
国内標準品測定結果報告書**

**施設コード/参加施設名/担当者**

**測定結果(3回目)/測定日:**

| Sample | Dilution<br>(neat, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> etc) | *HBV Result<br>(IU/mL or copy/mL) | Crossing point / Ct<br>value (if applicable) | Comments |
|--------|---|-----------------------------------|--|----------|
| S      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
| C      |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |
|        |   |                                   |  |          |

\*【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて得た値を希釈した試料mL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、"IU"）を選択して記入する。