

議 事 次 第

日時：平成24年5月16日(水)
15:00~17:00
場所：厚生労働省 専用第14会議室(22階)

議題：

1. 座長の選出について
2. 今後の審議事項とスケジュールについて
3. HEV 国内標準品について
4. パルボウイルス B19 国内標準品の作製について
5. genotype パネルの作製について
6. その他

配付資料：

座席表

委員名簿

- 資料 1 血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会運営要綱
- 資料 2 今後の審議事項とスケジュール
- 資料 3 HEV RNA 国内標準品候補品の評価
- 資料 4 パルボウイルス B19 国内標準品の作製に向けた特性解析の考え方及びスケジュール(案)

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

参考資料2 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(厚生労働科学研究費補助金)

参考資料3 HEV パネル関係資料

参考資料4 パルボウイルス B19 パネル関係資料

速記

座
長
席

内田委員

岡田委員

山口委員

脇田委員

井阪参考人

稲田参考人

下瀬参考人

平参考人

田中参考人

平原参考人

広尾参考人

水澤参考人

血液
対策
企画
官

血液
対策
課
長

血液
対策
課
補
佐
課

(事務局席)

傍聴席

血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会
委員名簿

氏名	ふりがな	現職
内田 恵理子	うちだ えりこ	国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長
岡田 義昭	おかだ よしあき	国立感染症研究所血液・安全性研究部第一室長
山口 照英	やまぐち てるひで	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員
脇田 隆宇	わきた たかじ	国立感染症研究所ウイルス第二部長

(計4名, 氏名五十音順)

平成24年度第1回 血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会
参考人名簿

氏名	ふりがな	現職
井阪 達也	いさか たつや	株式会社ベネシス京都工場 品質管理部長
稲田 耕一	いなだ こういち	日本製薬株式会社成田工場 品質管理部 品質管理グループマネージャー
下瀬 克郎	しもせ かつろう	一般財団法人化学及血清療法研究所 蛋白製剤研究部第2課
平 力造	たいら りきぞう	日本赤十字社血液事業本部参事
田中 利明	たなか としあき	バクスター株式会社 メディカルアフェアズ・開発本部マネージャー
平原 敬三	ひらはら けいぞう	CSLベーリング株式会社品質保証部長
広尾 彰彦	ひろお あきひこ	日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部検査課長
水澤 左衛子	みずさわ さえこ	国立感染症研究所血液・安全性研究部第二室研究員

(計8名, 氏名五十音順)

血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会 設置要綱

薬事・食品衛生審議会薬事分科会 血液事業部会安全技術調査会 設置要綱

1. 目的

血液事業部会安全技術調査会設置要綱第6条に基づき、血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会（以下「小委員会」という。）を設置する。小委員会は、血液製剤の核酸増幅検査に用いる国内標準品に関する検討、核酸増幅検査の精度管理及び核酸増幅検査のガイドラインに関する検討等を通じて、血液製剤の安全性の確保を図ることを目的とする。

2. 検討課題

- (1) 血液製剤の核酸増幅検査に用いる国内標準品の作製、選定に関する検討
- (2) 国内標準品の保管、配布方法等に関する検討
- (3) 核酸増幅検査の精度管理に関する検討
- (4) 核酸増幅検査のガイドラインに関する検討
- (5) その他、血液製剤の安全性確保対策に関する検討

3. 委員構成

- (1) 小委員会の委員は、血液事業部会安全技術調査会の委員の中から、血液事業部会安全技術調査会座長が指名する。
- (2) 小委員会は、互選により、委員のうち1名を座長として選出する。

4. 小委員会の運営

- (1) 小委員会は、必要に応じ、検討に必要な参考人の参加を求めることができる。
- (2) 小委員会は、知的財産・個人情報等に係る事項を除き、原則公開で開催するものとする。

5. 小委員会の庶務

小委員会の庶務は、医薬食品局血液対策課が行う。

(目的)

第1条 安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律(昭和31年法律第160号)において、国は、血液製剤の安全性の向上に関する基本的かつ総合的な施策を策定・実施が求められていることを踏まえ、血液製剤に関する安全性の確保対策に関する諸事項を調査・審議することを目的として、薬事分科会規程第4条に基づき、血液事業部会の下に「安全技術調査会」（以下「調査会」という。）を設置する。

(調査会の審議事項)

第2条 調査会は、以下に掲げる事項を検討する。

- 一 血液製剤に混入する可能性のあるウイルス等の感染性因子の検討
- 二 ウイルス等の感染性因子の不活化技術等に関する検討
- 三 血液製剤の安全性に関するガイドライン等の検討
- 四 その他、血液製剤の安全性の確保に関する重要事項の検討

(調査会の組織)

第3条 調査会に所属すべき委員は、部会に所属する委員、臨時委員及び専門委員（以下「委員等」という。）の中から、部会長が指名する。

- 2 調査審議にあたっては、議題の内容等に応じて、部会長の判断により他の委員または参考人に出席を求めることができる。
- 3 部会長は、第一項の規定により調査会に属すべき委員等を指名した場合は、部会においてその旨を報告しなければならない。

(座長の選任)

第4条 調査会に座長を置き、調査会に属する委員等の互選により選任する。

- 2 座長は、調査会の事務を掌理する。
- 3 座長に事故があるときは、調査会に属する委員等のうちから座長があらかじめ指名する者が、その職務を代理する。

(調査会の開催)

第5条 調査会は、年1回の開催とする。

- 2 前項に規定する場合のほか、委員等が必要と認めるときは調査会を開催す

NAT 小委員会における今後の審議事項とスケジュール

ることができる。

(小委員会の設置)

第6条 座長は、必要に応じて、調査会の下に小委員会を設置することができる。

2 小委員会は、当該調査会の審議事項のうち、特に重点的な検討を要する事項の審議にあたる。

3 小委員会の委員は、調査会の委員のうちから座長が指名する。

(議決)

第7条 部会への報告の要否等、議決を行う必要がある調査会の議事は、調査会に属する委員等で会議に出席したものの過半数で決し、可否同数のときは、座長の決するところによる。

(議事の公開)

第8条 調査会は原則として公開する。ただし、公開することにより、委員の自由な発言が制限され公正かつ中立な審議に著しい支障をおよぼすおそれがある場合、又は、個人の秘密、企業の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益又は不利益をもたらすおそれがある場合については、座長は、これを非公開とすることができる。

(雑則)

第9条 この規程に定めるもののほか、調査会の運営に関し必要な事項は、部会長が部会に諮り決定するものとする。

1. 今後の審議事項 (優先順)

○HEV 国内標準品について

- ・感染研が WHO と作製した標準品を国内標準品とすることについての可否について審議。
- ・上記、国内標準品が認められた場合に、その配布方法。

○パルボウイルス B19 国内標準品の作製について

- ・パルボウイルス B19 国内標準品の作製に向けて具体的な方向性<力価測定法：定性 or 定量法等>を議論した上で、感染研が標準品を作製し、その可否について審議。
- ・国内標準品が作製された場合に、その配布方法。

○HBV、HCV、HIV 等の genotype パネルの作製について

- ・HBV、HCV、HIV 等 genotype パネルの市販パネルや参照パネルの利用。
- ・HEV genotype パネルの作製。
- ・パルボウイルス B19 genotype パネルの作製。

○その他

- ・HEV、パルボウイルス B19 以外に、国内標準品を作製する必要性があるものについて。
- ・NAT ガイドラインや遡及調査ガイドラインを改正する必要性について議論するためのデータ収集。

2. 今後のスケジュール (目途)

【平成 24 年度第 1 回 NAT 小委員会 (今回)】

- ・今後の審議事項及び具体的なスケジュールの説明。
- ・感染研が作製した HEV の標準品を国内標準品とすることの可否、国内標準品と認められた場合にその配布方法を審議。
- ・パルボウイルス B19 国内標準品、HBV、HCV、HIV 等の genotype パネルの作製に関して方向性を審議 (作製スケジュール)。

【平成 24 年度第 2 回 NAT 小委員会 (平成 24 年 9 月)】

- ・感染研が作製したパルボウイルス B19 国内標準品の審議。
- ・了承された場合には、その配布方法を審議。
- ・作製した genotype パネルの報告。

【平成 24 年度第 1 回安全技術調査会 (平成 24 年 9 月～10 月)】

- ・HEV 国内標準品とパルボウイルス B19 国内標準品の報告
- ・NAT ガイドラインや遡及調査ガイドラインを改正する必要性について

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

平成24年5月16日

国立感染症研究所

血液・安全性研究部

第一室

HEV RNA 国内標準品候補品の評価

1. 経緯

E型肝炎はHEVが糞口経路で伝播することによって衛生状態の悪い地域において発生する疾患と考えられてきた。しかし、近年、先進国においてブタ等の食肉を介した感染が明らかになり、更に、輸血感染例が報告された。WHOは2009年に核酸増幅試験法のためのHEV RNA WHO国際標準品を作製することを決定し、Paul-Ehrlich-Institut (PEI)が共同研究を実施することになった。一方、我国においても国内標準品作製を計画していたので、本共同研究においてPEIと国立感染症研究所が共同でWHO国際標準品候補品と日本国内標準品候補品の力価を決定した。

2. 参加施設

10カ国、24施設* (ヨーロッパ13、USA 2、中国2、日本6**)

*: 24施設中23施設が測定結果を報告。

** : 日本赤十字社 血液事業部中央血液研究所 鈴木 光

北海道赤十字血液センター 松林 圭二

一般財団法人 化学及血清療法研究所 亀井 慎太郎

日本製薬株式会社 成田工場 赤石 暁弘

株式会社 ベネシス 京都工場 皆木 隆男

国立感染症研究所 血液・安全性研究部 岡田 義昭、水澤 左衛子

3. 候補品の製造

北海道赤十字血液センターから供与された、日本の献血由来の二つのHEV陽性血漿、HRC-HE104株(Genotype 3a)及びJRC-HE3株(Genotype 3b)から、国際標準品候補品と日本の国内標準品候補品をそれぞれ製造した。陽性血漿をHEV RNA陰性、抗HEV抗体(IgG, IgM)陰性の血漿で希釈して、濃度約 $5.5 \log_{10}$ HEV RNA copies/mLのバルクを調製し、これをISO13485:2003を取得したスイスの企業に委託して、0.5mL/4mLねじ口ガラス瓶に分注・凍結乾燥した。

国際標準品候補品(6329/10)、Genotype 3a

日本国内標準品候補品(コード無し)、Genotype 3b

4. 試料

次の通り暗号化した4本の検体を1セットとした。

(サンプル1, 2) 国際標準品候補品

(サンプル3, 4) 日本国内標準品候補品

5. 力価の測定

各参加施設は4セットの検体を受取り、日を替えて4回測定を行った。

定量法: 定量範囲内で測定し、結果をcopies/mL表示で報告した。

定性法: 1回目の測定で、各検体を \log_{10} 段階希釈して測定することにより予備的なエンドポイントを決めた。続く3回の測定ではエンドポイントを挟んで少なくとも5段階の $0.5 \log_{10}$ 希釈検体を測定して結果(陽性or陰性)を報告した。

結果の解析はPEIが行った。

6. 結果 (別紙1)

試験法は全て自家法で、大多数がReal-time PCR法であった。

①定量法

14組の測定結果が得られた。ほとんどの施設で希釈倍率 $0.0 \log_{10}$ から $-2.5 \log_{10}$ の範囲で再現性が良かったので、解析にはその範囲のデータを用いた。

国際標準品候補品の推定力価の全体の平均値: $5.59 \log_{10}$ copies/mL (SD 0.30)

国内標準品候補品の推定力価の全体の平均値: $5.66 \log_{10}$ copies/mL (SD 0.20)

②定性法

20組の測定結果が得られた。但し、定量法のデータのうち9組は更に希釈した範囲の測定結果からエンドポイントを求めることが可能であったので、その結果も含めた。計算には“NAT detectable unit”を用いた。

国際標準品候補品の推定力価の全体の平均値: $5.26 \log_{10}$ NAT detectable units/mL (SD 0.56)

国内標準品候補品の推定力価の全体の平均値: $5.29 \log_{10}$ NAT detectable units/mL (SD 0.71)

③候補品の力価

定量法と定性法の両方の測定結果に基づいた国際標準品候補品の推定力価は $5.39 \log_{10}$ units/mL (95%信頼限界 $5.51-5.63$)であった。本候補品は力価250,000 IU/mLの第一次HEV RNA国際標準品(コード6329/10)として2011年ECBSに提案され、制定された。

日本国内標準品候補品と国際標準品候補品の力価の差は無視できるほど僅かであった。
よって、日本国内標準品の力価を 250,000 IU/mL と決定した。

7. 結論

本共同研究によって次の通り、国内標準品候補品を作製した。本候補品を HEV RNA 国内標準品として制定することを提案する。

原料と性状	HEV Genotype 3b. HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV 抗体陰性、HEV RNA 陰性、HEV 抗体 (IgG, IgM) 陰性のプール血漿で希釈、0.5ml/4ml ガラス瓶に分注、凍結乾燥
表示力価	250,000 IU/mL
用法	注射用水 0.5ml で再溶解
貯法	- 80°C
制定	2012(平成 24) 年
製造本数	2154 本
保管・交付	国立感染症研究所

8. 表示ラベル

**The 1st National Standard
for HEV-RNA**
NOT FOR ADMINISTRATION TO HUMANS
INFECTIOUS MATERIAL
NIID, Japan

9. 添付資料

- 1) WHO/BS/2011.2175 : Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays.
- 2) WHO HEV Collaborative Study Protocol Q4 201012

以上

別紙1

Combined mean estimates of WHO-IS and Japanese NS

Combined mean estimates from quantitative assays (log₁₀ copies/ml)

Candidate	N	Mean	Sd	Lowercl	Uppercl	Median	Min	Max	cv_geo
WHO	248	5.59	0.30	5.33	5.86	5.46	4.36	6.85	99%
NIID	249	5.66	0.20	5.40	5.93	5.48	4.49	6.77	76%

Combined mean estimates from qualitative assays (log₁₀ NAT detectable units/ml)

Candidate	N	Mean	Sd	Lowercl	Uppercl	Median	Min	Max	cv_geo
WHO	39	5.26	0.56	5.08	5.44	5.32	4.00	6.37	163%
NIID	40	5.29	0.71	5.07	5.52	5.30	3.72	7.42	202%

WHO/BS2011.2179 より抜粋、改変



World Health
Organization

WHO/BS/2011.2175
ENGLISH ONLY

EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION
Geneva, 17-21 October 2011

**Collaborative Study to Establish a World Health Organization
International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid
Amplification Technology (NAT)-Based Assays**

Sally A. Baylis¹, Saeko Mizusawa², Yoshiaki Okada², Kay-Martin O. Hanschmann¹

¹Paul-Ehrlich-Institut,
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D 63225 Langen, Germany

²National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1, Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

© World Health Organization 2011

All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int) or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int).

Requests for permission to reproduce or translate WHO publications – whether for sale or for noncommercial distribution – should be addressed to WHO Press through the WHO web site: (http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use. The named authors alone are responsible for the views expressed in this publication.

WHO/BS/2011.2175

Page 2

Summary

The aim of the collaborative study was to evaluate candidate standards for hepatitis E virus (HEV) RNA for use in nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. The candidate standards consisted of lyophilized preparations of genotype 3a and genotype 3b HEV strains, obtained from blood donors, diluted in human plasma. The genotype 3a HEV strain has been developed as the candidate World Health Organization International Standard and the genotype 3b strain has been developed as the candidate Japanese National Standard. Coded duplicate samples of the two virus strains were distributed to the participating laboratories; genotype 3a HEV (Sample 1 and Sample 2) and genotype 3b HEV (Sample 3 and Sample 4). Each laboratory assayed the samples on 4 separate occasions and the data were collated and analyzed at the Paul-Ehrlich-Institut. Twenty-four laboratories from 10 countries participated in the study. Data were returned by twenty-three laboratories using both qualitative and quantitative assays. All assays were able to detect both candidate standards. It is proposed that the genotype 3a strain be established as the 1st International Standard for HEV RNA with a unitage of 250,000 International Units per ml. *On-going real-time and accelerated stability studies of the proposed International Standard are in progress.*

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped single stranded RNA virus belonging to the *Hepeviridae* family (Purcell and Emerson, 2008; Meng, 2010). In developing countries HEV is a major cause of acute hepatitis, transmitted by the faecal-oral route and associated with contamination of drinking water. In industrialized countries, HEV infection is being more frequently reported and whilst some cases are imported after travel to endemic areas, autochthonous cases are also increasing and infection with HEV appears more prevalent than originally believed (Ijaz *et al.*, 2009). Prospects for control of HEV infection are encouraged by recent efforts in vaccine development (Shrestha *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010). Four main genotypes, representing a single serotype, of HEV infect humans. Genotype 1 viruses are found mainly in Africa and Asia and genotype 2 in Africa and Central America. Genotype 3 and 4 viruses are generally less pathogenic, although some exceptions have been reported, particularly for genotype 4; these genotypes infect not only humans, but also animals including swine, wild boar and deer. While genotype 4 strains are restricted to parts of Asia, genotype 3 viruses are found throughout the world. Zoonotic transmission of HEV occurs, either by consumption of contaminated meat and meat products, or by contact with infected animals (Purcell and Emerson, 2010). An alternative route of transmission is by transfusion of blood components with reports from several different countries including, for example, the UK, France and Japan (Boxall *et al.*, 2006; Colson *et al.*, 2007; Matsubayashi *et al.*, 2004; Matsubayashi *et al.*, 2008). Studies in Japan and China have identified acute HEV infections in blood donors confirmed by the detection of HEV RNA (Guo *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2008).

It is now recognized that, in some countries at least, HEV infection is underreported, and where other causes of acute hepatitis have been excluded, HEV infection should be considered (Waar *et al.*, 2005). The diagnosis of HEV infection is based upon the detection of specific antibodies (IgM and IgG), however there are issues concerning the sensitivity and specificity of these assays (Bendall *et al.*, 2010; Drobeniuc *et al.*, 2010). Analysis of HEV RNA using nucleic acid amplification techniques (NAT) is also used for diagnosis and can identify active infection and help to confirm serological results (Huang *et al.*, 2010).

Infection with HEV may be particularly severe during pregnancy and in individuals with existing liver disease. Chronic HEV infection is an emerging problem amongst solid organ transplant recipients (Kamar *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2010). In chronically infected patients, viral loads are monitored to investigate the efficacy of antiviral treatment (Haagsma *et al.*, 2010;

Kamar *et al.*, 2010a; Kamar *et al.*, 2010b) and effects of reduction of immunosuppressive therapy (Kamar *et al.*, 2010c).

Several NAT assays have been reported for the detection of HEV RNA in serum and plasma or faecal samples, including conventional reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) as well as real-time RT-PCR, and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (Lan *et al.*, 2009). The NAT tests include generic assays developed for the detection of HEV genotypes 1-4 (Jothikumar *et al.*, 2006; Gyarmati *et al.*, 2007). A recent study organized by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI) on behalf of the World Health Organization (WHO), investigated the performance of HEV NAT assays in an international study (Baylis *et al.*, 2011). Dilution panels of different HEV strains were blinded and tested by laboratories with experience in detection of HEV RNA. The results of the study demonstrated wide variations in assay sensitivity (100-1000 fold, for the majority of assays). The proposal by the PEI to prepare a standard for HEV RNA for use in NAT-based assays was endorsed by the WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) in 2009 (WHO/BS/09.2126) and following the initial study, two virus strains were selected for further development as a candidate International Standard for the WHO and a candidate Japanese National Standard in collaboration with the National Institute of Infectious Diseases (NIID) in Japan. The viral strains being developed as standards are genotype 3a and 3b HEV strains, which were equally well detected in the initial study and belong to genotype 3 which is widely distributed. The strains are both derived from blood donors with sufficient titres of HEV RNA to prepare standards of good potency. The aim of the present study is to establish the respective standards and demonstrate their suitability for use, evaluate the potency and assign an internationally agreed unitage.

Preparation of bulk materials

After the initial proficiency/strain evaluation study (Baylis *et al.*, 2011), two HEV strains were selected for the preparation of the candidate WHO International Standard and the candidate Japanese National Standard. The samples were kindly provided by Keiji Matsubayashi from the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center. The genotype 3a HEV strain HRC-HE104 was used to prepare the candidate WHO standard. The genotype 3b HEV strain JRC-HE3 was used to prepare the candidate Japanese National Standard. Characterization of the virus strains is shown in Table 1. The target concentration for the two bulk preparations was approximately $5.5 \log_{10}$ HEV RNA copies/ml based upon the concentrations reported in the initial study (Baylis *et al.*, 2011) and the concentrations determined by the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Centre. The two virus strains tested negative for HIV-1/2 RNA, HBV DNA and HCV RNA using the Cobas TaqScreen MPX test (Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, USA).

For the preparation of the candidate WHO standard bulk, 131 ml of the HEV strain HRC-HE104 were mixed with 2015 ml of plasma. For the preparation of the candidate Japanese National Standard bulk, 30 ml of the HEV strain JRC-HE3 were mixed with 1070 ml of plasma. The bulk preparations were cooled (4-8°C) until processing (~18 hours later). The respective preparations were diluted using pooled citrated plasma which had been used in the initial HEV collaborative study (Baylis *et al.*, 2011). The plasma was centrifuged and filtered twice before use. The plasma diluent tested negative for anti-HEV IgG and IgM (Ulrich Mohn, Mikrogen GmbH, Neuried, Germany, personal communication) and tested negative for HEV RNA (data not shown) and HIV-1/2 RNA, HBV DNA and HCV RNA, testing was performed as described above. In addition, the plasma was negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HBc and anti-HIV-1/2. The filling and lyophilization was performed by an ISO 13485:2003 accredited Swiss company. For processing, 0.5 ml volumes were dispensed into 4 ml screw-cap glass vials. Rubber seals were then placed on top of the filled vials before loading into the freeze drier (CHRIST Epsilon 2-25 D) for lyophilization. After freeze-drying the vials were sealed with screw caps and vials stored at -20°C.

For the candidate WHO standard, 4256 vials were lyophilized; the coefficient of variation of the fill volume was 1.1%. In the case of the candidate Japanese National Standard, 2154 vials were lyophilized; the coefficient of variation of the fill volume was 1.0%. In both cases, measurements were made for a total of 26 vials. For analysis of residual moisture, vials filled with 0.5 ml volumes of plasma diluent were distributed throughout the freeze-drier. Residual moisture was 0.73%, as determined by testing of 12 vials (Karl Fischer analysis). The freeze-drying process did not affect the HEV RNA titre of the lyophilized samples when compared to aliquots of the respective bulk preparations which were stored at -80°C (data not shown).

Vials of the candidate WHO standard are held at the Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Straße 51-59, D-63225 Langen, Germany. The vials are kept at -20°C with continuous temperature monitoring.

All manufacturing records are held by PEI and are available on request by the ECBS.

Collaborative study

The collaborative study comprised 24 laboratories from 10 countries. The participants in the collaborative study who returned data are listed in Appendix 1. The samples analysed in the study were labelled as Sample 1, Sample 2, Sample 3 and Sample 4. Sample 1 and Sample 2 were replicates of the candidate WHO standard; and Sample 3 and Sample 4 were replicates of the candidate Japanese National Standard. The collaborative study materials were shipped to participants at ambient temperature. Participants were asked to test the panel using their routine assay for HEV RNA, testing the samples in four separate assay runs, using fresh vials of each sample for each run. Where laboratories performed quantitative tests, they were requested to report results in copies/ml, testing samples in the linear range of the assay. In the case of qualitative assays, participants were requested to assay each sample by a series of one \log_{10} dilution steps, to obtain an initial estimate of an end-point. For the three subsequent assays, they were requested to assay half- \log_{10} dilutions around the end-point estimated in their first assay. Participants reported diluting the materials using plasma, water or phosphate buffered saline. Data sheets and a method form were provided so that all relevant information could be recorded.

Statistical Methods

Quantitative Assays

Evaluation of quantitative assays was restricted to dilutions in the range between 0.0 \log_{10} and -2.5 \log_{10} where the assays of most participants seem to produce comparable data. For comparison of laboratories, the replicate results of each laboratory, corrected for the dilution factor, were combined as arithmetic mean of \log_{10} copies/ml. Furthermore these estimates were combined to obtain an overall estimation for each sample by means of a mixed linear model with laboratory and (log) dilution as random factors.

Qualitative Assays

The data from all assays were pooled to give series of number positive out of number tested at each dilution. For each participant, these pooled results were evaluated by means of probit analysis to estimate the EC50 i.e. the concentration at which 50% of the samples tested were positive (for assays where the change from complete negative to complete positive results occurred in two or fewer dilution steps, the Spearman-Kaerber method was applied for EC50 estimation). The calculated end-point was used to give estimates expressed in \log_{10} NAT-detectable units/ml after correcting for the equivalent volume of the test sample.

Relative potencies

Potencies of Samples 2, 3 and 4, for the quantitative assays, were estimated relative to Sample 1 using parallel line analysis of log transformed data. In the case of the qualitative assays, the relative potencies were determined using parallel line analysis of probit transformed data.

The statistical analysis was performed with SAS®/STAT software, version 9.2, SAS System for Windows. Estimation of end-point dilution and relative potencies were done with CombiStats Software, version 4.0, from EDQM/Council of Europe.

Stability studies

Stability of the candidate WHO standard is under continuous assessment, through both real-time and accelerated thermal degradation stability studies. Vials of the candidate WHO standard have been stored at -20°C (the normal storage temperature) and -80°C (to provide a baseline if there is any suggestion of instability at higher temperatures). For the accelerated thermal degradation, vials have been incubated at +4°C, +20°C, +37°C and +45°C for up to 4 months. After incubation at the respective temperatures, the contents of the vials were reconstituted in 0.5 ml of nuclease free water and analysed by real-time PCR (Jothikumar *et al.*, 2006).

Data Received

Data were received from a total of 23 participating laboratories; one laboratory failed to complete the study within the specified time frame. Data from 20 qualitative and 14 quantitative assays were reported. The types of assays used by participants are listed in Table 2; all assays were developed in-house. The assays used by participants were mainly based upon real-time PCR, although some conventional PCR methods were also used.

For the purposes of data analysis, each laboratory has been referred to by a code number allocated at random and not representing the order of listing in Appendix 1. Where a laboratory performed more than one assay method, the results from the different methods were analyzed independently, as if from separate laboratories, and coded, for example, laboratory 16a and laboratory 16b. In the case of 9 assays, quantitative values were reported covering the linear range of the respective assays; in addition, further dilutions have been performed allowing end-point determination. These data have been analysed separately and the number of estimates therefore exceeds the number of assay sets returned by the participants.

Results

Quantitative Assay Results

Initially evaluation of quantitative assays was performed without removing any outlying data; subsequently the data was restricted to a range between 0.0 log₁₀ and -2.5 log₁₀ where reproducible results were obtained across dilutions. The laboratory mean estimates in copies/ml (log₁₀) are shown in histogram form in Figure 1. Each box represents the mean estimate from an individual laboratory, and is labelled with the laboratory code number. The individual laboratory means are given in Table 3. The relative variation of the individual laboratory estimates is illustrated by the box-and-whisker plots in Figure 2.

Qualitative Assay Results

The NAT-detectable units/ml (log₁₀) for the qualitative assays are shown in histogram form in Figure 3. Each box represents the mean estimate from an individual laboratory and is labelled with the laboratory code number. The individual laboratory means are given in Table 4. From Figure 3, it can be seen that the estimates of NAT detectable units/ml (log₁₀) from the qualitative

assays are more variable than the quantitative assays, reflecting the different sensitivities of the various assays. This observation is not unexpected and is in line with other studies.

Determination of Overall Laboratory Means

The overall means for the laboratories performing quantitative assays are shown in Table 5a. The means for both Sample 1 and Sample 2, replicates for the candidate WHO standard, are 5.58 log₁₀ and 5.60 log₁₀ copies/ml HEV RNA respectively, which demonstrates excellent agreement between the replicate samples. The candidate Japanese National Standard showed identical mean results of 5.66 log₁₀ copies/ml HEV RNA for replicate Samples 3 and 4. The combined mean values for the replicate samples are shown in Table 5b.

The overall means for the qualitative assays are shown in Table 6a; there is good agreement between the duplicate samples as seen previously for the quantitative assays. The combined mean values for the replicate samples are shown in Table 6b. The qualitative assays show 0.3 log₁₀ lower mean estimates than the quantitative assays.

Relative Potencies

Based upon the data from both qualitative and quantitative assays, the candidate WHO standard was estimated to have a potency of 5.39 log₁₀ units/ml (95% confidence limits 5.15 – 5.63). This value was estimated with a combined end-point evaluation of qualitative and quantitative (restricted to dilutions in the range of 0.0 log₁₀ to - 2.5 log₁₀) data by means of a mixed linear model.

The potencies of Samples 2, 3 and 4 were calculated relative to Sample 1, taking the value of Sample 1 as 5.39 log₁₀ units/ml. The relative potencies are shown in Tables 7 and 8 for the quantitative and qualitative assays, respectively. For the quantitative data from laboratory 9, no potency was estimable since there was only one dilution tested for each sample. The data is plotted in histogram form (Figures 4-6). The data demonstrate that expressing the results as potencies relative to Sample 1, as a standard with an assumed unitage of 5.39 log₁₀ units/ml gives a marked improvement in the agreement between the majority of methods and laboratories. These data provide some evidence for commutability of the candidate standard for evaluation of HEV from infected individuals, since Samples 1 and 2 represent a different strain of HEV compared to Samples 3 and 4.

Results of Stability Studies

Vials of the candidate WHO standard were incubated at +4°C, +20°C, +37°C and +45°C for up to four months and tested by real-time PCR for HEV RNA. The heat-treated vials were assayed concurrently with vials that had been stored at -20°C and at -80°C. All samples were tested in duplicate and were compared to a standard curve prepared using vials of the candidate WHO standard stored at -80°C.

There was no evidence of instability of the samples stored at -20°C when compared to samples stored at -80°C. After 4 months incubation at +20°C a small loss of titre was observed. The observed drop in titre at higher temperatures (+37°C and +45°C) may be related to problems with reconstitution of the samples rather than actual degradation and has previously been observed for some other preparations, particularly for RNA viruses formulated in pooled plasma. The potency of the reconstituted material, after freezing and thawing, has not been investigated. Further stability studies (both real-time and accelerated) are on-going and will be communicated to the WHO.

All raw data for the collaborative study and stability analysis are held by PEI and are available on request by the ECBS.

Conclusions

In this study, a wide range of quantitative and qualitative assays were used to determine the suitability and evaluate the HEV RNA content of the candidate standards. Although the methods used by the study participants were all developed in-house, the majority of assays were able to detect the two HEV strains consistently. Based upon the data from the qualitative and the quantitative assays, the candidate WHO standard was estimated to have a potency of 5.39 log₁₀ units/ml. Since the unitage assigned to the 1st WHO standard of a preparation is essentially arbitrary, for practical purposes, the candidate International Standard has been assigned a unitage of 250,000 International Units/ml. Since there was only a negligible difference in the overall means for the candidate Japanese National Standard compared to the WHO preparation, the two materials have therefore been assigned the same value i.e. 250,000 International Units/ml. In the case of the quantitative assays, laboratories reported values in HEV RNA copies/ml. The participants used plasmid DNA containing HEV sequences, synthetic oligonucleotides and *in vitro* transcribed HEV RNA to control for copy number. In some cases laboratories used HEV-containing plasma which had been calibrated against *in vitro* transcribed HEV RNA. Another laboratory prepared standard using stool-derived virus, the titre of which was determined by end-point dilution and analysis by Poisson distribution. No standard method or common quantitation standard material was used, and this is reflected in the variation observed for the quantitative results, with a variation in the order of 2 log₁₀, which were improved by expressing the results against Sample 1 as a common standard. In the case of the qualitative assays, the variation in NAT-detectable units was at least 3 log₁₀, and again expressing potencies relative to Sample 1 improved the agreement between the different laboratories and methods.

The collaborative study materials have been dispatched at ambient temperature, replicating the intended shipping conditions. Initial accelerated thermal degradation analysis indicates a reduction in the levels of HEV RNA at higher incubation temperatures. On-going studies on the real-time stability under normal storage conditions as well as studies concerning thermal degradation are in progress.

The standard will be of value for comparison of results between laboratories, determination of assay sensitivities and for validation. It is anticipated that the standard will find application in clinical laboratories, particularly hepatitis reference laboratories performing diagnosis and monitoring HEV viral loads in chronically infected transplant patients, research laboratories, blood and plasma centres which implement HEV NAT screening, regulatory agencies and organizations developing HEV vaccines as well as manufacturers of diagnostic kits.

Each vial of the HEV RNA standard contains the lyophilized residue of 0.5 ml of HEV RNA positive plasma. Predictions of stability indicate that the standard is stable and suitable for long-term use when stored as directed in the accompanying proposed "Instructions For Use" data sheets for the panel (Appendix 2).

Recommendations

Based upon the results of the collaborative study, it is proposed that the genotype 3a HEV strain (Samples 1 and 2, in this study) should be established as the 1st International Standard for hepatitis E virus RNA and be assigned a unitage of 250,000 International Units/ml. The standard has been given the code number 6329/10; 3800 vials are available to the WHO and custodian laboratory is the Paul-Ehrlich-Institut.

Comments from participants

After circulation of the draft report for comment, replies were received from all participants. The majority of the comments were editorial in nature and the report has been amended accordingly. All participants were in agreement with the conclusions of the report.

One participant commented on the possible incorrect estimation of the viral load by the participants who used DNA standards (synthetic oligonucleotides or plasmid DNA) due to lack of control for reverse transcription of virus RNA into cDNA. This might be better controlled using *in vitro* transcribed RNA or a virion-based preparation.

Another participant remarked that many laboratories have used the same method, showing quite different sensitivities, possibly due to differences in extraction and amplification/detection reagents and instrumentation and its set up.

Acknowledgements

The viraemic HEV donations used to prepare the candidate standards were generously provided by Keiji Matsubayashi of the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center. We thank all the laboratories who took part in the study and Roswitha Kleiber and Christine Hanker-Dusel for assistance.

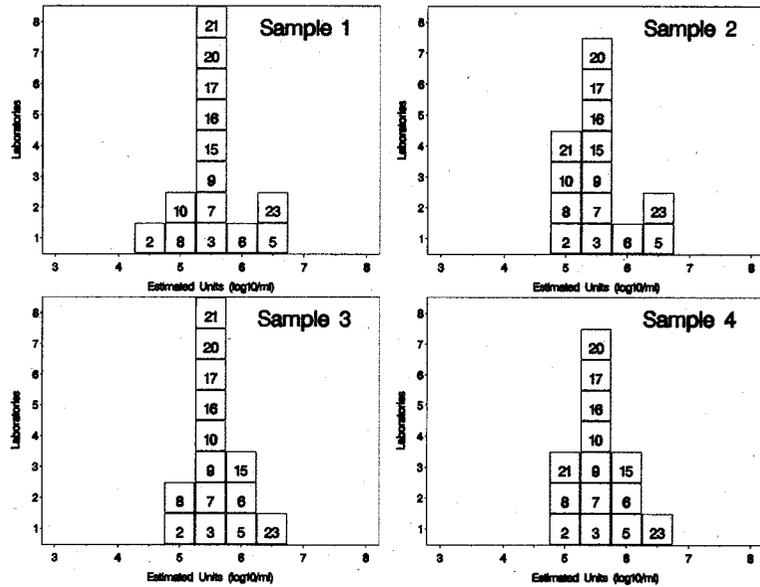
References

- Adlhoch, C., M. Kaiser, G. Pauli, J. Koch, and H. Meisel. 2009. Indigenous hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sang.* 97:303-308.
- Baylis, S. A., K. M. Hanschmann, J. Blümel, and C. M. Nübling; on behalf of the HEV Collaborative Study Group. 2011. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J. Clin. Microbiol.* 49:1234-1239.
- Bendall, R., V. Ellis, S. Ijaz, R. Ali, and H. Dalton. 2010. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol.* 82:799-805.
- Boxall, E., A. Herborn, G. Kochethu, G. Pratt, D. Adams, S. Ijaz, and C. G. Teo. 2006. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus. Med.* 16:79-83.
- Colson, P., C. Coze, P. Gallian, M. Henry, P. De Micco, and C. Tamalet. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13:648-649.
- Drobeniuc, J., J. Meng, G. Reuter, T. Greene-Montfort, N. Khudyakova, Z. Dimitrova, S. Kamili, and C. G. Teo. 2010. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 51:e24-27.
- Guo, Q. S., Q. Yan, J. H. Xiong, S. X. Ge, J. W. Shih, M. H. Ng, J. Zhang, and N. S. Xia. 2010. Prevalence of hepatitis E virus in Chinese blood donors. *J. Clin. Microbiol.* 48:317-318.

- Gyarmati, P., N. Mohammed, H. Norder, J. Blomberg, S. Belák, and F. Widén. 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J. Virol. Methods*. 146:226-235.
- Haagsma, E. B., A. Riezebos-Brilman, A. P. van den Berg, R. J. Porte, and H. G. Niesters. 2010. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl.* 16:474-477.
- Huang, S., X. Zhang, H. Jiang, Q. Yan, X. Ai, Y. Wang, J. Cai, L. Jiang, T. Wu, Z. Wang, L. Guan, J. W. Shih, M. H. Ng, F. Zhu, J. Zhang, and N. Xia. 2010. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One*. 5(10):e13560.
- Ijaz, S., A. J. Vyse, D. Morgan, R. G. Pebody, R. S. Tedder, and D. Brown. 2009. Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J. Clin. Virol.* 44:272-276.
- Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng, and V. R. Hill. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131:65-71.
- Kamar, N., J. Selves, J. M. Mansuy, L. Ouezzani, J. M. Péron, J. Guitard, O. Cointault, L. Esposito, F. Abravanel, M. Danjoux, D. Durand, J. P. Vinel, J. Izopet, and L. Rostaing. 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 358:811-817.
- Kamar, N., L. Rostaing, F. Abravanel, C. Garrouste, L. Esposito, I. Cardeau-Desangles, J. M. Mansuy, J. Selves, J. M. Peron, P. Otal, F. Muscari, and J. Izopet. 2010a. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 50:e30-33.
- Kamar, N., L. Rostaing, F. Abravanel, C. Garrouste, S. Lhomme, L. Esposito, G. Basse, O. Cointault, D. Ribes, M. B. Nogier, L. Alric, J. M. Peron, and J. Izopet. 2010b. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 139:1612-1618.
- Kamar, N., F. Abravanel, J. Selves, C. Garrouste, L. Esposito, L. Lavayssière, O. Cointault, D. Ribes, I. Cardeau, M. B. Nogier, J. M. Mansuy, F. Muscari, J. M. Peron, J. Izopet, and L. Rostaing. 2010c. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 89:353-360.
- Lan X., B. Yang, B. Y. Li, X. P. Yin, X. R. Li, and J. X. Liu. 2009. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 47:2304-2306.
- Legrand-Abravanel, F., N. Kamar, K. Sandres-Saune, C. Garrouste, M. Dubois, J. M. Mansuy, F. Muscari, F. Sallusto, L. Rostaing, J. Izopet. 2010. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J. Infect. Dis.* 202:835-844.
- Mallet, V., E. Nicand, P. Sultanik, C. Chakvetadze, S. Tessé, E. Thervet, L. Mouthon, P. Sogni, and S. Pol. 2010. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann. Intern. Med.* 153:85-89.

- Matsubayashi, K., Y. Nagaoka, H. Sakata, S. Sato, K. Fukai, T. Kato, K. Takahashi, S. Mishiro, M. Imai, N. Takeda, and H. Ikeda. 2004. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44:934-940.
- Matsubayashi, K., J. H. Kang, H. Sakata, K. Takahashi, M. Shindo, M. Kato, S. Sato, T. Kato, H. Nishimori, K. Tsuji, H. Maguchi, J. Yoshida, H. Maekubo, S. Mishiro, and H. Ikeda. 2008. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48:1368-1375.
- Meng, J., X. Dai, J. C. Chang, E. Lopareva, J. Pillot, H. A. Fields, and Y. E. Khudiyakov. 2001. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288:203-211.
- Meng, X. J. 2010. Recent advances in Hepatitis E virus. *J. Viral. Hepat.* 17:153-161.
- Purcell, R. H., and S. U. Emerson. 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 48:494-503.
- Purcell, R. H., and S. U. Emerson. 2010. Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 202:819-821.
- Sakata, H., K. Matsubayashi, H. Takeda, S. Sato, T. Kato, S. Hino, K. Tadokoro, and H. Ikeda. 2008. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion* 48:2568-2576.
- Shrestha, M. P., R. M. Scott, D. M. Joshi, M. P. Mammen, G. B. Thapa, N. Thapa, K. S. Myint, M. Fournau, R. A. Kushner, S. K. Shrestha, M. P. David, J. Seriwatana, D. W. Vaughn, A. Safary, T. P. Endy, and B. L. Innis. 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* 356:895-903.
- Tanaka, T., T. Masaharu, E. Kusano, and H. Okamoto. 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 88:903-911.
- Waar, K., M. M. Herremans, H. Vennema, M. P. Koopmans, and C. A. Benne. 2005. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J. Clin. Virol.* 33:145-149.
- Wenzel, J. J., J. Preiss, M. Schemmerer, B. Huber, A. Plentz, and W. Jilg. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J. Clin. Virol.* in press; DOI number 10.1016/j.jcv.2011.06.006
- Zhu, F. C., J. Zhang, X. F. Zhang, C. Zhou, Z. Z. Wang, S. J. Huang, H. Wang, C. L. Yang, H. M. Jiang, J. P. Cai, Y. J. Wang, X. Ai, Y. M. Hu, Q. Tang, X. Yao, Q. Yan, Y. L. Xian, T. Wu, Y. M. Li, J. Miao, M. H. Ng, J. W. Shih, and N. S. Xia. 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376:895-902.

Figure 1 Estimates for quantitative assays



Histograms of the quantitative results for participating laboratories for Sample 1, Sample 2, Sample 3 and Sample 4. Estimates of log₁₀ copies/ml are indicated on the x-axis. Data are shown for laboratory 16a.

Figure 2 Box and whisker plots of the quantitative data (log₁₀ copies/ml)

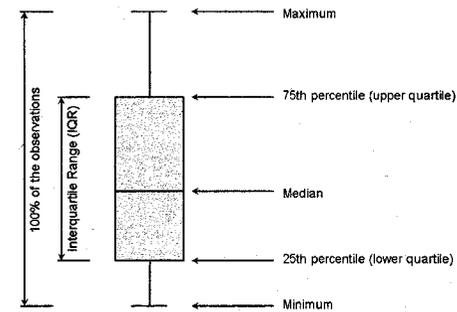
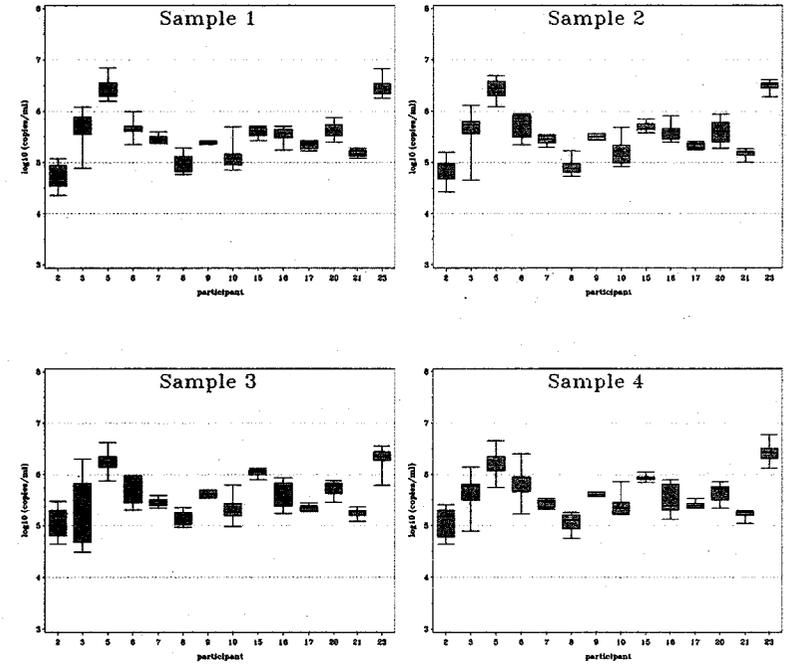
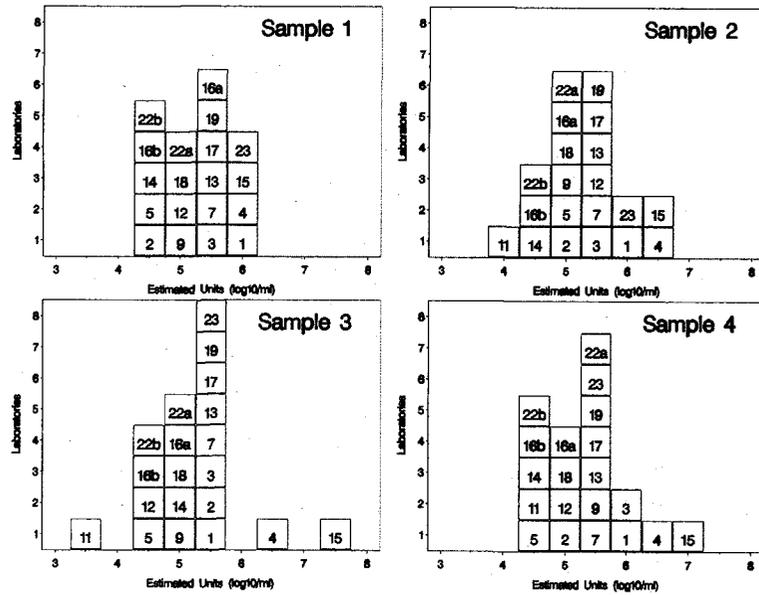
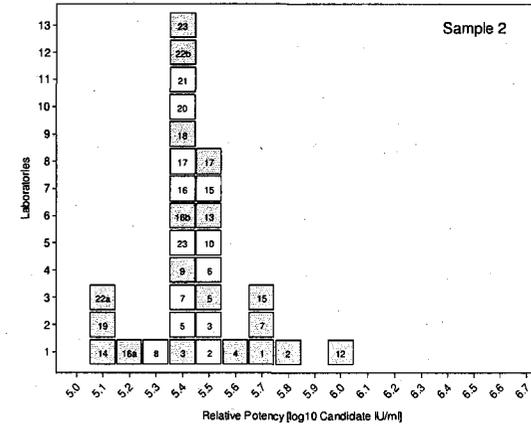


Figure 3 Estimates for qualitative assays



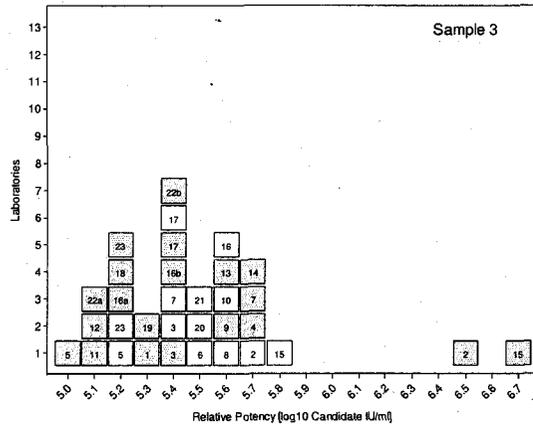
Histograms of the qualitative results for participating laboratories for Sample 1, Sample 2, Sample 3 and Sample 4. Estimates of \log_{10} NAT-detectable units/ml are indicated on the x-axis. In the case of laboratory 11, data for Sample 1 have been omitted due to a $2 \log_{10}$ higher cut-off.

Figure 4 Potency of Sample 2 relative to Sample 1



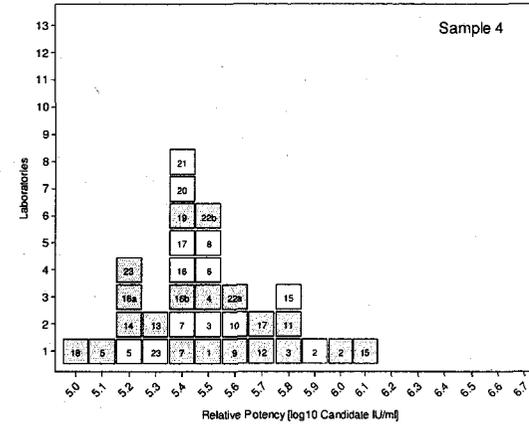
Histogram of the potency of Sample 2 relative to Sample 1 ($\approx 5.39 \log_{10}$ units/ml); qualitative data (grey boxes) and quantitative data (white boxes). No relative potency is shown for laboratory 11 for sample 2, since no value had been determined for Sample 1 (i.e. the data were outlying and did not perform as the replicate i.e. Sample 2).

Figure 5 Potency of Sample 3 relative to Sample 1



Histogram of the potency of Sample 3 relative to Sample 1 ($=5.39 \log_{10}$ units/ml); qualitative data (grey boxes) and quantitative data (white boxes). In the case of Laboratory 11, the data have been calculated relative to Sample 2.

Figure 6 Potency of Sample 4 relative to Sample 1



Histogram of the potency of Sample 4 relative to Sample 1 ($=5.39 \log_{10}$ units/ml); qualitative data (grey boxes) and quantitative data (white boxes). In the case of Laboratory 11, the data have been calculated relative to Sample 2.

Table 1 Details of HEV strains lyophilized as candidate standards

Virus strain	HEV RNA (copies/ml)*	Genotype	Accession No.**	Anti-HEV IgM/IgG	ALT (IU/L)
HRC-HE104	1.6 x 10 ⁷	3a	AB630970	-/-	36
JRC-HE3	2.5 x 10 ⁷	3b	AB630971	+/-	398

*Concentrations determined by the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center

**Full length sequence

Table 2 Assay protocols used by participants

Laboratory code	Assay type (qualitative or quantitative)	Extraction method	NAT method	Assay target	Reference
1	Qual.	QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
2	Qual./Quant.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2	Adlhoch <i>et al.</i> 2009
3	Qual./Quant.	High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
4	Qual.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	
5	Qual./Quant.	QIAamp DNA Mini Blood kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	
6	Quant.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	
7	Qual./Quant.	QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Matsubayashi <i>et al.</i> 2008
8	Quant.	SMI-TEST EX-R&D (Medical Biological Laboratories Co., Ltd.)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Tanaka <i>et al.</i> 2007
9	Qual./Quant.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	
10	Quant.	COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation kit (Roche)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
11	Qual.	COBAS AmpliScreen Multiprep Specimen Preparation and Control kit (Roche)	Conventional one step RT-PCR; analysis by agarose gel electrophoresis	ORF1	
12	Qual.	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
13	Qual.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
14	Qual.	Viral DNA/RNA Isolation kit (GenMag Biotechnology)	Nested RT-PCR; analysis by agarose gel electrophoresis	ORF2	
15	Qual./Quant.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006 (modified)
16a	Qual./Quant.	MagNA Pure LC (Roche)	Real-time PCR (SYBR Green)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006

					(modified)
16b	Qual.	MagNA Pure LC (Roche)	Nested RT-PCR; analysis by agarose gel electrophoresis	ORF2	Meng <i>et al.</i> 2001
17	Qual./Quant.	QIAamp Virus BioRobot MDx kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Matsubayashi <i>et al.</i> 2008
18	Qual.	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit (Roche)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
19	Qual.	easyMag (bioMérieux)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2	
20	Quant.	QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	
21	Quant.	BioRobot Universal (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
22a	Qual.	QIAamp RNA Mini kit (Qiagen)	Nested RT-PCR; analysis by agarose gel electrophoresis	ORF2	Gyarmati <i>et al.</i> 2007
22b	Qual.	QIAamp RNA Mini kit	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Jothikumar <i>et al.</i> 2006
23	Qual./Quant.	QIAamp DNA Mini Blood kit (Qiagen)	Real-time RT-PCR (TaqMan)	ORF2/3	Wenzel <i>et al.</i> , in press

Qualitative (Qual.) and quantitative (Quant.) assays

Table 3 Mean estimates from quantitative assays (log₁₀ copies/ml)

Laboratory code	Sample			
	1	2	3	4
2	4.69	4.82	5.09	5.08
3	5.69	5.62	5.43	5.65
5	6.51	6.48	6.24	6.20
6	5.75	5.80	5.77	5.83
7	5.50	5.46	5.45	5.44
8	5.07	4.97	5.14	5.06
9	5.43	5.52	5.62	5.61
10	5.18	5.22	5.30	5.39
15	5.66	5.73	6.02	5.93
16a	5.59	5.62	5.64	5.51
17	5.40	5.34	5.35	5.41
20	5.70	5.65	5.74	5.65
21	5.25	5.23	5.25	5.23
23	6.54	6.53	6.31	6.41

Table 4 Mean estimates from qualitative assays (log₁₀ NAT detectable units/ml)

Laboratory code	Sample			
	1	2	3	4
1	5.76	6.05	5.62	5.91
2	4.42	4.85	5.49	5.02
3	5.35	5.40	5.35	5.76
4	6.20	6.37	6.47	6.33
5	4.70	4.84	4.27	4.42
7	5.34	5.62	5.62	5.34
9	5.02	5.03	5.18	5.26
11		4.00	3.72	4.42
12	4.91	5.48	4.61	5.18
13	5.51	5.66	5.71	5.44
14	4.71	4.43	5.00	4.57
15	6.11	6.36	7.42	6.87
16a	5.32	5.17	5.17	5.17
16b	4.74	4.74	4.74	4.74
17	5.39	5.52	5.42	5.67
18	5.13	5.13	4.98	4.76
19	5.68	5.42	5.56	5.71
22a	5.21	4.92	4.91	5.44
22b	4.53	4.53	4.52	4.68
23	5.76	5.76	5.60	5.60

Laboratory 11, sample 1, omitted due to 2 log₁₀ higher cut-off

Table 5a Overall mean estimates from quantitative assays (log₁₀ copies/ml)

Sample	n	mean	sd	lowercl	uppercl	median	min	max	cv_geo
1	123	5.58	0.29	5.32	5.85	5.46	4.36	6.85	98%
2	125	5.60	0.28	5.33	5.87	5.46	4.43	6.69	94%
3	124	5.66	0.20	5.40	5.93	5.50	4.49	6.63	77%
4	125	5.66	0.20	5.40	5.93	5.48	4.64	6.77	76%

n – number of dilutions analysed (in linear range), sd – standard deviation, lowercl/uppercl – 95% confidence limits for the mean, cv_geo – geometric coefficient of variation [%]

Table 5b Combined mean estimates from quantitative assays (log₁₀ copies/ml)

Candidate	n	mean	sd	lowercl	uppercl	median	min	max	cv_geo
WHO	248	5.59	0.30	5.33	5.86	5.46	4.36	6.85	99%
NIID	249	5.66	0.20	5.40	5.93	5.48	4.49	6.77	76%

Combined data for Samples 1 and 2, replicate samples of the candidate IS (WHO); combined data for Samples 3 and 4, replicate samples of the candidate Japanese National Standard (NIID)

Table 6a Overall means of estimates from qualitative assays (log₁₀ NAT detectable units/ml)

Sample	n	mean	sd	Lower cl	Upper cl	median	min	max	cv_geo
1	19	5.25	0.51	5.01	5.50	5.32	4.42	6.20	150%
2	20	5.26	0.62	4.97	5.56	5.29	4.00	6.37	179%
3	20	5.27	0.79	4.90	5.64	5.27	3.72	7.42	226%
4	20	5.31	0.64	5.02	5.61	5.30	4.42	6.87	183%

n – number of tests, lowercl/uppercl – 95% confidence limits for the mean, cv_geo – geometric coefficient of variation [%]

Table 6b Combined means of estimates from qualitative assays (log₁₀ NAT detectable units/ml)

Candidate	n	mean	sd	lowercl	uppercl	median	min	max	cv_geo
WHO	39	5.26	0.56	5.08	5.44	5.32	4.00	6.37	163%
NIID	40	5.29	0.71	5.07	5.52	5.30	3.72	7.42	202%

Combined data for Samples 1 and 2, replicate samples of the candidate IS (WHO); combined data for Samples 3 and 4, replicate samples of the candidate Japanese National Standard (NIID)

Table 7 Potency relative to Sample 1 (quantitative assays)

Sample	Laboratory code	Relative potency (log ₁₀ copies/ml)	95% Confidence Interval	
2	2	5.54	5.29	5.78
	3	5.45	5.15	5.74
	5	5.39	5.15	5.63
	6	5.45	5.20	5.71
	7	5.38	5.28	5.47
	8	5.31	5.17	5.45
	9			
	10	5.47	5.34	5.59
	15	5.53	5.46	5.60
	16a	5.40	5.22	5.59
	17	5.36	5.29	5.43
	20	5.36	5.26	5.46
	21	5.39	5.35	5.44
23	5.41	5.29	5.53	
3	2	5.74	5.50	5.97
	3	5.36	5.07	5.65
	5	5.21	4.97	5.46
	6	5.48	5.21	5.75
	7	5.38	5.29	5.47
	8	5.55	5.41	5.69
	9			
	10	5.55	5.43	5.68
	15	5.83	5.76	5.90
	16a	5.55	5.36	5.73
	17	5.39	5.31	5.46
	20	5.52	5.42	5.62
	21	5.46	5.41	5.50
23	5.20	5.09	5.32	
4	2	5.90	5.66	6.15
	3	5.45	5.17	5.74
	5	5.17	4.93	5.42
	6	5.54	5.29	5.80
	7	5.37	5.28	5.46
	8	5.46	5.32	5.60
	9			
	10	5.63	5.50	5.76
	15	5.75	5.68	5.83
	16a	5.35	5.17	5.53
	17	5.44	5.37	5.52
	20	5.43	5.33	5.52
	21	5.44	5.39	5.48
23	5.27	5.16	5.39	

It was not possible to estimate the relative potency for laboratory 9 since there were only two assay runs performed, each at a different dilution

Table 8 Potency relative to Sample 1 (qualitative assays)

Sample	Laboratory code	Relative potency (log ₁₀ NAT detectable units/ml)	95% Confidence Interval		
2	1	5.68	5.10	6.27	
	2	5.82	5.26	6.38	
	3	5.44	4.81	6.08	
	4	5.56	4.90	6.22	
	5	5.53	5.09	5.97	
	7	5.68	5.16	6.23	
	9	5.40	5.15	5.66	
	12	5.96	5.35	6.51	
	13	5.54	5.14	5.91	
	14	5.11	4.71	5.50	
	15	5.65	4.90	6.40	
	16a	5.24	4.85	5.64	
	16b	5.39	4.77	6.01	
	17	5.52	4.96	6.08	
	18	5.39	4.88	5.90	
	19	5.13	4.71	5.56	
	22a	5.10	4.57	5.63	
	22b	5.39	4.79	5.99	
	23	5.39	4.74	6.04	
	3	1	5.25	4.67	5.81
		2	6.46	5.90	7.14
		3	5.39	4.76	6.02
		4	5.66	5.00	6.32
5		4.96	4.53	5.39	
7		5.68	5.16	6.23	
9		5.55	5.30	5.80	
11		5.11	4.52	5.69	
12		5.09	4.51	5.64	
13		5.59	5.19	5.96	
14		5.67	5.27	6.08	
15		6.67	5.90	7.44	
16a		5.24	4.85	5.64	
16b		5.39	4.77	6.01	
17		5.43	4.87	5.98	
18		5.24	4.73	5.75	
19		5.28	4.85	5.70	
22a		5.10	4.56	5.63	
22b		5.38	4.78	5.97	
23		5.24	4.59	5.89	
4		1	5.54	4.96	6.12
		2	5.99	5.43	6.55
		3	5.80	5.15	6.48
	4	5.52	4.86	6.18	
	5	5.11	4.70	5.51	
	7	5.39	4.87	5.92	
9	5.64	5.38	5.90		

11	5.81	5.23	6.40
12	5.65	5.07	6.20
13	5.32	4.93	5.71
14	5.24	4.85	5.64
15	6.13	5.39	6.88
16a	5.24	4.85	5.64
16b	5.39	4.77	6.01
17	5.68	5.12	6.23
18	5.02	4.51	5.52
19	5.43	5.00	5.87
22a	5.62	5.08	6.18
22b	5.54	4.94	6.17
23	5.24	4.59	5.89

N.B. The relative potency for laboratory 11 was estimated relative to Sample 2 (Sample 1 had a cut-off 2 log₁₀ dilutions higher)

Table 9 Stability testing

Incubation time	Incubation temperature				
	-20°C	+4°C	+20°C	+37°C	+45°C
1 month	ND	ND	ND	ND	5.03
2 months	ND	ND	ND	4.98	4.55*
4 months	5.56	5.52	5.33	ND	ND

ND Not determined

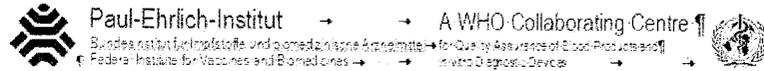
*Material could not be completely reconstituted

Titres expressed as log₁₀ candidate International Units/ml

Appendix 1 List of participants

Scientist	Affiliation
Akihiro Akaishi	Nihon Pharmaceuticals Co., Ltd. Chiba, Japan
Martijn Bouwknegt/Saskia Rutjes	National Institute for Public Health and the Environment Bilthoven, The Netherlands
Silvia Dorn	Mikrogen GmbH Neuried, Germany
Thomas Gärtner	Octapharma Frankfurt am Main, Germany
Samreen Ijaz/Renata Szypulska	Health Protection Agency London, UK
Jacques Izopet	Institut Fédératif de Biologie Purpan Toulouse, France
Shintaro Kamei/Katsuro Shimose	Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute Kumamoto, Japan
Li Ma/Mei-ying Yu	Center for Biologics Evaluation and Research/Food and Drug Administration Bethesda, USA
Thomas Laue	Astra Diagnostics Hamburg, Germany
Keiji Matsubayashi/Hidekatsu Sakata	Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center Sapporo, Japan
Birgit Meldal/Daniel Candotti	Cambridge University and NHS Blood and Transplant Cambridge, UK
Takao Minagi	Benesis Corporation Kyoto, Japan
Saeko Mizusawa/Yoshiaki Okada	National Institute of Infectious Diseases Tokyo, Japan
Elisa Moretti/Francesca Bonci	BioSC-Kedrion S.p.A. Bolognana-Lucca, Italy
Tonya Mixson/Saleem Kamili	Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, USA
Andreas Nitsche/Marco Kaiser	Robert Koch-Institut Berlin, Germany
Mats Olsson/Anders Olofsson	Octapharma Stockholm, Sweden
Giulio Pisani/Francesco Marino	CRIVIB, Istituto Superiore di Sanità Rome, Italy
James Wai Kuo Shih	Xiamen University Fujian, China
Ko Suzuki	Central Blood Institute, Japanese Red Cross Society Tokyo, Japan
Isabelle Thomas	Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium
Youchun Wang/Yansheng Geng	National Institutes for Food and Drug Control Beijing, China
Jürgen Wenzel/Wolfgang Jilg	University of Regensburg Regensburg, Germany

Appendix 2 Draft Instructions For Use for 6329/10



1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays

PEI code: 6329/10

(Version 1.0, 7th July 2011)

1. INTENDED USE

The 1st World Health Organization International Standard for hepatitis E virus (HEV) is intended to be used in the standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for HEV. The need to develop a standard was demonstrated in an initial study investigating performance of HEV/NAT assays (Baylis et al., J. Clin. Microbiol. 2011). The standard has been prepared using a genotype 3a strain of HEV derived from the plasma of a blood donor and further diluted in human plasma. The material has been lyophilized in 0.5 ml aliquots and stored at -20°C. The material has been evaluated in an international collaborative study involving 23 laboratories performing a wide range of HEV NAT assays. Further details of the collaborative study are available in the report WHO/BS/11.XXXX.

2. UNITAGE

This reagent has been assigned a unitage of 250,000 International Units/ml.

3. CONTENTS

Each vial contains 0.5 ml of lyophilized plasma containing infectious HEV.

4. CAUTION

THIS PREPARATION IS NOT FOR ADMINISTRATION TO HUMANS

The preparation contains material of human origin and contains infectious HEV. The reference materials has been diluted in human plasma negative for HIV-1 RNA, HIV RNA, HEV DNA, HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, anti-HIV-1/2, anti-HCV and anti-HEV (IgM and IgG). As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures probably will include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

5. USE OF MATERIAL

No attempt should be made to weigh out any portion of the freeze-dried material prior to reconstitution. The material is supplied lyophilized and should be stored at or below -20°C. Each vial should be reconstituted in 0.5 ml of sterile nuclease-free water. The product should be reconstituted just prior to use, once reconstituted, freeze thawing of the product is not recommended.

6. STABILITY

It is the policy of WHO not to assign an expiry date to their international reference materials. They remain valid with the assigned potency and status until withdrawn or amended.

The reference materials are held at PEI within assured, temperature-controlled, storage facilities. Reference materials should be stored on receipt as indicated on the label. Once diluted or aliquoted, users should determine the stability of the material according to their own method of preparation, storage and use.

Users who have data supporting any deterioration in the characteristics of any reference preparation are encouraged to contact PEI.

7. REFERENCES

Baylis, S.A., K.M. Hanschmann, J. Büchel and C.M. Budding, on behalf of the HEV Collaborative Study Group. 2011. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. J. Clin. Microbiol. 49:1234-1239.

S. A. Baylis, K. M. Hanschmann. Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays. WHO Report 2011, WHO/BS/11.XXXX.

8. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center for supplying the candidate materials, the National Institute of Infectious Diseases, Japan for their collaboration and to the study participants.

9. FURTHER INFORMATION

This material: whoccivd@pei.de
WHO Biological Reference Preparations:
<http://www.who.int/biologicals/en/>

10. CUSTOMER FEEDBACK

Customers are encouraged to provide feedback on the suitability or use of the material provided or other aspects of our service. Please send any comments to whoccivd@pei.de

11. CITATION

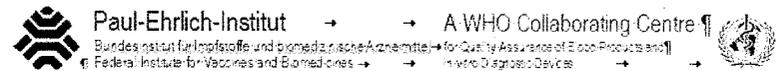
In any circumstance where the recipient publishes a reference to PEI materials, it is important that the title of the preparation and the PEI code number, and the name and address of PEI are cited correctly.

12. MATERIAL SAFETY SHEET

Physical properties (at room temperature)	
Physical appearance	Lyophilized powder
Fire hazard	None
Chemical properties	
Stable	Yes
Corrosive	No
Hygroscopic	No
Oxidising	No
Flammable	No
Irritant	No
Other (specify) CONTAINS HUMAN PLASMA & INFECTIOUS HEPATITIS E VIRUS (HEV)	
Handling	See caution, section 4
Toxicological properties	

Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen, Germany

Tel: +49 (0) 6103 77-0
Fax: +49 (0) 6103 77-1234
Email: whoccivd@pei.de
Web: <http://www.pei.de/>



Effects of inhalation	Avoid
contains infectious HEV	
Effects of ingestion	Avoid
contains infectious HEV	
Effects of skin absorption	Avoid
contains infectious HEV	
Suggested First Aid	
Inhalation	Seek medical advice - contains infectious HEV
Ingestion	Seek medical advice - contains infectious HEV
Contact with eyes	Wash thoroughly with water. Seek medical advice - contains infectious HEV
Contact with skin	Wash thoroughly with water. Seek medical advice - contains infectious HEV
Action on Spillage and Method of Disposal	
Spillage of vial contents should be taken up with absorbent material wetted with an appropriate disinfectant. Rinse area with an appropriate disinfectant followed by water. Absorbent materials used to treat spillage should be treated as biological waste.	

constitute an entire discharge of the Institute's liability under this Condition.

13. LIABILITY AND LOSS

Information provided by the Institute is given after the exercise of all reasonable care and skill in its compilation, preparation and issue, but it is provided without liability to the Recipient in its application and use.

It is the responsibility of the Recipient to determine the appropriateness of the materials supplied by the Institute to the Recipient ("the Goods") for the proposed application and ensure that it has the necessary technical skills to determine that they are appropriate. Results obtained from the Goods are likely to be dependent on conditions of use by the Recipient and the variability of materials beyond the control of the Institute.

All warranties are excluded to the fullest extent permitted by law, including without limitation that the Goods are free from infectious agents or that the supply of Goods will not infringe any rights of any third party.

The Institute shall not be liable to the Recipient for any economic loss whether direct or indirect, which arise in connection with this agreement.

The total liability of the Institute in connection with this agreement, whether for negligence or breach of agreement or otherwise, shall in no event exceed 120% of any price paid or payable by the Recipient for the supply of the Goods.

If any of the Goods supplied by the Institute should prove not to meet their specification when stored and used correctly (and provided that the Recipient has returned the Goods to the Institute together with written notification of such alleged defect within seven days of the time when the Recipient discovers or ought to have discovered the defect), the Institute shall either replace the Goods or, at its sole option, refund the handling charge provided that performance of either one of the above options shall

Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen, Germany

Tel: +49 (0) 6103 77-0
Fax: +49 (0) 6103 77-1234
Email: whoccivd@pei.de
Web: <http://www.pei.de/>

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO International Standard for Hepatitis E Virus RNA for NAT-Based Assays

Background

Currently there is no standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for the detection of HEV RNA. A proposal drafted by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI) to develop an IS for HEV RNA for use in nucleic acid amplification (NAT)-based assays was endorsed by the World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) at their meeting in Geneva in October 2009 (WHO/BS/09.2126). An initial study of laboratory performance organised by the PEI highlighted the lack of standardization with wide differences observed in assay sensitivities. The practical part of the initial study was completed in January 2010 and a report was drafted and distributed to participants for comment. The report, incorporating the comments of the participants, was sent to the WHO in April 2010 and the progress has been noted by the chair of the ECBS sub-committee dealing with blood products and *in vitro* diagnostics.

In this second stage of the study, selected strains have now been lyophilised for further evaluation. The study will evaluate candidate WHO International Standard for HEV RNA. The study will also evaluate a candidate National Standard in collaboration with the National Institute for Infectious Disease in Japan.

Objective

In the present collaborative study the potency of the candidate standard preparations will be determined using a range of NAT-based assays for HEV RNA with the aim of assigning an internationally agreed unitage.

Materials

The study materials comprise lyophilised HEV positive plasma samples. Participants will be sent four vials of each reagent coded Sample 1 (labelled HEV S1), Sample 2 (labelled HEV S2), Sample 3 (labelled HEV S3), and Sample 4 (labelled HEV S4). Participants will receive differing numbers of vials, depending upon the extraction volume which has

Participants should assay ten-fold dilutions of each preparation in order to determine the HEV RNA end-point. The dilutions should be prepared in the normal diluent used in the laboratory (ideally this will represent the matrix of the normal test specimens).

We suggest using the neat material and seven ten-fold (neat to 10^{-6}) to determine the end points of the preparations. If, in the second assay, all dilutions are positive, or all negative, then the dilution series should be adjusted accordingly for subsequent assays.

Replicate extractions and replicate amplification/detection steps may be performed; however analysis of any replicates should be indicated in the accompanying results forms. The results should be reported in a qualitative way as either positive i.e. HEV RNA detected or negative on the attached reporting sheets. A separate sheet is attached to record the methods used by each laboratory (additional sheets may be used as necessary).

In the three remaining assays, samples should be treated as follows:

Participants are requested to assay a minimum of two half \log_{10} dilutions either side of the pre-determined end-point. It is therefore not necessary to carry out more than five half \log_{10} dilutions (centred around the estimated end-point) unless individual labs wish to do so.

Where real-time PCR assays are used, we ask that C_T values be recorded as well. Please use additional reporting forms as required.

For quantitative assays:

Where participants have access to quantitative HEV RNA assays, we suggest testing dilutions that are expected to fall within the linear range of the assay. The material may be tested without dilution, but this is dependent upon the linear range of the assay and the sample volume required for the assay. It is preferable if at least two further 10-fold dilutions are performed. Once again, replicate extractions and replicate amplification/detection steps may be performed; however analysis of any replicates

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Method Reporting Sheet

Laboratory:

Date:

Operator:

Analyst:

Contact person's email address:

Short description of in-house NAT / Test Kit

Extraction platform:

Amplification/detection system:

Assay reference (if available):

Region of genome amplified:

Primer sequences:

Probe sequence(s):

Qualitative

Quantitative

Plasma volume used for RNA extraction:

Elution volume of RNA:

Volume of eluted RNA used for amplification:

(Please use additional sheets as necessary)

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 2 (Qualitative)

Name of Participant:

Assay 2	Date of Assay:	Results					
		(pos or neg)					
	Dilution (10 ^{-x})						
	Sample 1						
	Dilution (10 ^{-x})						
	Sample 2						
	Dilution (10 ^{-x})						
	Sample 3						
	Dilution (10 ^{-x})						
	Sample 4						

Please record C_T values as well as "pos or neg" for real-time methods

Please record "-" instead of C_T values in case of negative results

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 4 (Qualitative)

Name of Participant: _____

Assay 2	Date of Assay:	Results					
		(pos or neg)					
	Dilution (10 ^x)						
	Sample 1						
	Dilution (10 ^x)						
	Sample 2						
	Dilution (10 ^x)						
	Sample 3						
	Dilution (10 ^x)						
	Sample 4						

Please record C_T values as well as "pos or neg" for real-time methods

Please record "-" instead of C_T values in case of negative results

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 2 (Quantitative)

Name of Participant: _____

Assay 2	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	Dilution(10 ^x)			
	Sample 1			
	Dilution(10 ^x)			
	Sample 2			
	Dilution(10 ^x)			
	Sample 3			
	Dilution(10 ^x)			
	Sample 4			

Please record C_T values as well as the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

Collaborative Study to Evaluate a Candidate WHO IS for HEV RNA

Data Reporting Sheet 4 (Quantitative)

Name of Participant:

Assay 4	Date of Assay:	Results (copies/ml)		
	Dilution(10^x)			
	Sample 1			
	Dilution(10^x)			
	Sample 2			
	Dilution(10^x)			
	Sample 3			
	Dilution(10^x)			
	Sample 4			

Please record C_T values as well as the concentration of HEV RNA in copies/ml for real-time methods

Please attach copy of raw data

第一次パルボウイルス B19-DNA 国内標準品の作製 (案)

平成 24 年 5 月 16 日

(目的)

血漿分画製剤の原血漿等で実施しているパルボウイルス B19-NAT 検査の精度管理のための第一次国内標準品を作製する。

(製法)

B19-DNA 陽性血漿を B19-DNA 陰性の脱クリオ血漿又はそれと同等の血漿で希釈し、分注する。

(陽性血漿の性状)

B19-DNA 陽性、B19-IgM 陰性、B19-IgG 陰性
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

(希釈用血漿)

B19-DNA 陰性 (B19-IgM 及び IgG の有無は問わない)
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
脱クリオ血漿が望ましいが、それに準じた性状の血漿であれば良い。

(B19 の遺伝子型)

genotype 1

(力価と測定法)

 10^6 IU/mL

力価の測定は、国際標準品を用いた定量法で実施する。各施設において定量性が確認されている範囲内で検体を 3 点以上希釈し、それぞれの値を測定する。測定回数は、独立して計 4 回測定する。

最終的な力価は、各施設からの測定値を統計処理し、国際標準品との相対力価として決定する。

(製造本数)

1500本 (0.5mL/vial に分注)

(バイアルの形状)

容量: 3mL ゴム栓、アルミキャップ(フリップ付)、マキ締め

(ラベル)

・貼付してから凍結

記載事項:

名称 parvovirus B19-DNA 国内標準品 (第一世代)

ロット番号 1/2012

容量 0.5mL

貯法 -80℃

作製 国立感染症研究所

感染性物質. 研究用の使用に限る. 人体に投与しないこと.

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

スケジュール

平成24年6月 分注と検体の発送

7~8月 力価測定

9月 結果の取りまとめ

10月 力価決定

12月 標準品として提案・承認予定

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、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、数コピーから数十コピー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や最終製品の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、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) とするが、その他のウ

イルスについても準用可能な点については参照することができる。

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の 2 点である。特に、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、特異性と検出感度の確保はより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と、試験する方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。

具体的に頑健性を示すためには、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を持たないが目的とするウイルス遺伝子について陽性を認める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。

2-1) 施設・設備の整備等に関する事項

NAT は、数コピーから数十コピー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 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。
- ② 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。
- 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。

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及び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。

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ができる。(*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ができる。
- 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）型（ジェノタイプ）等（*5）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
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。
- 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、ロット間の一定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 (*3)。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。

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、目的とする核酸を確実に検出する能力をいう。NAT の特異性は、プライマー等の選択、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のみを検出できるとする根拠を示せること。

さらに、検出しようとする核酸の配列については、遺伝的によく保存されている配列が用いられる。検出しようとする核酸の配列、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。(*4)

② 交差反応性 (非特異的反応) の除去

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、通常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 増幅産物が特異的である確認

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、シーケ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。これは適当な参照パネルを使用することによって証明すること。

分析法の特異性をバリデートするために目的とするウイルスについて陰性の血漿又はミニプール血漿を少なくとも 100 検体を試験し、陰性であることを確認し、記録を保存しておくこと。

・ ウイルス遺伝子 (亜) 型 (ジェノタイプ) 等 (*5) 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。(*4)

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のような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（例えば指数段階的に希釈を作製するなど）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。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。

NATにおいては、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の開発過程における、ウイルス濃縮、遺伝子の抽出、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の標準品又は参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

ランコントロールにおいては、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（~~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（~~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（~~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。

・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。

交叉汚染が防止できていることを示すために、陰性プール血漿と高い濃度で目的とするウイルスをスパイクした陰性プール血漿（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）を、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）

・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）
等のいずれかを使用すること。

2-7) 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

2-8) 従事者の技術の標準化と向上に関する事項

NATは、数コピーから数十コピー（*7）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は、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を、95%の確率で検出される3倍量の標準品あるいは標準物質等をスパイクした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のような試験は、分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の

要因の影響をうけ易いので、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。

2-9) 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。

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 (*8) 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。

(付 録)

【用語集】

○ 標準品

国際的ないしは国内の公機関によって策定された国際標準品あるいは国内標準品

○ 標準物質 (参照品)

標準品に対して校正された標準となる物質

注意事項*1

「原則として下記の条件を満たしていることが望まれる」とは、自動化された閉鎖系での抽出装置を用いるなど、交差汚染を防ぐ装置が用いられていたり、交差汚染を防ぐ適切な手段が採用されている場合などでは、そのような手段を用いることによって「下記の条件」を満たすことが可能な場合もあることを意味している。この場合、そうした対策の妥当性を説明するとともに、必要に応じて交差汚染防止が十分に成されていることを示すデータの提示が求められるであろう。言い換えれば下記の4条件を満たすような独自の対策とその妥当性を示すことによって、用いる施設や装置についてはケースバイケースで判断できるということである。

注意事項*2

2-3) 及び 2-4) 等で試薬製造メーカーのデータを提出することによって必要とされるデータに代えようとする場合にどの程度のデータが必要とされるかは採用しようとしている試験法等に依存するためにケースバイケースで判断する必要がある。しかし、少なくともガイドラインの趣旨に添ったデータが提出される必要があり、もし十分なデータが試薬製造メーカーによって提供されない場合には各申請者が必要なデータを作成しなくてはならないケースも想定される。また企業の知的財産等の関係で試薬製造メーカーから全てのデータが申請者に提出されない場合、診断薬等としてすでに承認を受けている場合には、その承認書に関するデータを試薬製造メーカーより直接規制当局へ提出するか、あるいはドラッグマスターファイルに準じた取り扱いが必要となると考えられる。但し、診断薬としての承認に必要とされるデータと血漿分画製剤の NAT において必要とされるデータは必ずしも同一ではない可能性があり、追加のデータが必要となることも考慮すべきである。

注意事項*3

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、最適濃度、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*4

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。

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)

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

(3年計画の3年目)

平成15年度 総括研究報告書

分担研究報告書

主任研究者 吉澤 浩司

注意事項*5

遺伝子型の分類として、HBV と HCV ではジェノタイプが、HIV については主としてサブタイプという表現が使用されている。

ここでの記載の目的は、NAT によるウイルスゲノム検出に当たって、ウイルスゲノムの塩基配列の差異によらずできる限り多くのジェノタイプやサブタイプを検出できることを示すことを求めているものである。従ってここでは、それらを全て包含することを目的として「等」としている。

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

ここで述べる数コピーから数十コピーのウイルスゲノムの検出は、一般的な NAT に関する情報を示すものであり、検出感度の設定に当たってコピー数での表示を求めるものではない。

注意事項*8

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 HCV についてはプール前の原血漿で 5000IU/mL とするとの結論を出している。HBV、HIV についても別途定める必要がある。これらの検出感度については、プールサイズの変更、NAT の技術進歩、周辺技術の改良等により適宜見直しをすることが必要と考えられる。従って、最新の科学技術の進歩に応じて柔軟に設定すべきものと考えられるので、指針本体ではなく別途定め通知するものとする。

平成16 (2004) 年 3月

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
平成15年度 班構成

主任研究者

吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授

分担研究者

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長
中澤 裕之 星薬科大学 分析化学教室 教授
山中 烈次 日本赤十字社 血液事業部 次長
宮崎 豊 愛知県衛生研究所 所長
竹森 利忠 国立感染症研究所 免疫部 部長
今井 光信 神奈川県衛生研究所 微生物部 部長

班長研究協力者

玉造 滋 (株) ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部 リーダー
矢萩 則夫 (株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発室 室長
皆川 英孝 (株) 富士レビオ 商品開発グループ グループ長
山田 徹 (株) ダイナボット 総合研究所 学術部シニア・クリニカルサイエンティスト
柚木 久雄 日赤中央血液センター NAT部 部長
飯田 俊二 日本赤十字社 血液事業部 課長
松倉 晴道 大阪赤十字血液センター 試薬製造部 課長
水井 正明 広島赤十字血液センター 技術部 副部長
田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 講師
片山 恵子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 助手
熊谷 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 助手
小宮 裕 広島大学大学院 疫学・疾病制御学
水落 利明 国立感染症研究所細菌 室長
近藤 真規子 神奈川県衛生研究所 ウイルス部 研究員
嶋 貴子 神奈川県衛生研究所 ウイルス部 研究員
岩田 明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
井之上浩一 星薬科大学 助教授
吉村 吉博 星薬科大学 講師
猪飼 蒼友 愛知県衛生研究所
近藤 文雄 愛知県衛生研究所
伊藤 裕子 愛知県衛生研究所
後藤 智美 愛知県衛生研究所
岡 尚男 愛知県衛生研究所
松本 浩 愛知県衛生研究所

目次

I. 総括研究報告

吉澤 浩司 ・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 1

II. 分担研究報告

吉澤 浩司 ・核酸増幅検査 (NAT) の技術の標準化のために資する
標準パネル血漿 (HCV、HIV) の作製 11
玉造 滋 ・HCV定性NAT検査のサーベイについて 25
今井 光信 ・血液製剤の安全性確保のための品質管理技術の開発に関する研
究 -HIV陽性献血血液のウイルス量およびHIVのタイプ、サ
ブタイプに関する研究- 30
竹森 利忠 ・B型肝炎ウイルス抗原新規WHO国際標準品の制定および国内標
準感度パネル整備の必要性について 40
山口 照英 ・血液製剤の精度管理法の開発に関する研究 42
中澤 裕之 ・血液保存バッグから溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキ
シル)のリスクアセスメント 56
宮崎 豊 ・採血基準に関するスクリーニング開発
-成分献血キットから溶出する化学物質の調査及び供血者 (ド
ナー) の暴露量評価- 63

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 75

IV. 研究成果の刊行物・別刷 79

1. 総括研究報告

研究要旨

3年計画の3年目にあたる平成15年度は、1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製、2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベいの試行、3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定、4. 本研究班の目的に関連する個別研究の4項目を柱とする研究を実施した。

1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製

1) HCVの標準パネル血漿

HCV感染の早期（HCV抗体が出現する前のウインドウ期）、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル血漿を完成した。なお、HCVの遺伝子型（ジエノタイプ）については、現在の日本の献血者から見出されるすべてを取りそろえた。

2) HIV標準パネル血漿

HIV感染の早期（HIV抗体が出現する前のウインドウ期）、キャリア期、および陰性対照血漿から成る計100本の標準候補血漿を取りそろえた。HIVの標準血漿については、ウインドウ期の血漿は1本入手できたにすぎず、HIV陽性血漿のほとんどはキャリア期の血漿から成ること、国内で使用可能な全ての測定系による最終測定については、現在も作業を継続中であること、HIVのサブタイプは国内の献血者由来のものに限られたこと、など必ずしも万全ではない。

2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベいの試行

核酸増幅検査（NAT）による、HCV RNA検査を日常検査として実施している計124施設の参加を得てHCV標準パネル血漿の中から陽性血漿3検体、陰性対照血漿1検体の計4検体を選択し、コントロールサーベいを実施した。

その結果、124施設中、内部標準（インターナルコントロール：IC）は104施設で実施されていた。配布した標準血漿、HCVのジエノタイプ1a、2a、2b、および陰性対照検体の正答率は、それぞれ、97.6%、93.5%、97.6%、100%であった。第1回目のサーベいで問題点が見出された15施設中11施設について問題点の洗い出しと改善のためのアドバイス（介入）を行なった後に、同一の検体を配布して再度サーベいを実施し

たところ、全ての施設から正答が得られ、かつ第1回目のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度（正しい測定値）が得られるなど、大幅な改善がみられた。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に利用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグ等に残留、溶出する化学物質の測定法を構築し、溶出挙動の解明を行った。また、成分採血キット6種類を対象として、溶出する化学物質の種類の同定、溶出量の測定を行った。その結果、フタル酸ジエノチルヘキシル、ノニフェノール、BHT、2-エチルヘキサノール等が同定確認された。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

- 1) 献血を契機発見された HIV 陽性の血液の特性をウイルス・血清学的手法により解析した。
- 2) NAT の検出感度向上をめざした、ウイルス濃縮法の基礎的検討を行った。

熊谷 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
小宮 裕	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
水落 利明	国立感染症研究所細菌
近藤 真規子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部
嶋 貴子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部
岩田 明子	国立医薬品食品衛生研究所
井之上浩一	星薬科大学
吉村 吉博	星薬科大学
猪飼 蒼友	愛知県衛生研究所
近藤 文雄	愛知県衛生研究所
伊藤 裕子	愛知県衛生研究所
後藤 智美	愛知県衛生研究所
岡 尚男	愛知県衛生研究所
松本 浩	愛知県衛生研究所

助手
室長
研究員
研究員
研究員
助教授
講師

分担研究者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部	部長
中澤 裕之	星薬科大学 分析化学教室	教授
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部	次長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所	所長
竹森 利志	国立感染症研究所 免疫部	部長
今井 光信	神奈川県衛生研究所 微生物部	部長

班長研究協力者（班友）

玉造 滋	(株) ロシユ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部	リーダー
矢萩 則夫	(株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発室	室長
皆川 英孝	(株) 富士レビオ 商品開発グループ	グループ長
山田 徹	(株) ダイナポット 総合研究所 学術部	シニア・クリニカルサイエンティスト
柚木 久雄	日赤中央血液センター NAT部	部長
飯田 俊二	日本赤十字社 血液事業部	課長
松倉 晴道	大阪赤十字血液センター 試薬製造部	課長
水井 正明	広島赤十字血液センター 技術部	副部長
田中 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	講師
片山 恵子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手

A. 研究目的

1. HCV、HIV の標準パネル血漿の作製

- 1) HCV の標準パネル血漿
HCV 感染のウインドウ期、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る、計 100 本の標準パネル血漿を作成する。
- 2) HIV の標準パネル血漿
HIV 感染のウインドウ期、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る、計 100 本の標準パネル血漿を作成する。

2. NAT 標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

作製した HCV の標準パネル血漿を用いて、NAT による HCV RNA 検査を日常検査として実施している施設の参加を得て、コントロールサーベイを試行する。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に使われているポリ塩化ビニル製の血液バ

ッグ等に残留、溶出する化学物質の測定法を構築する。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

献血を契機に発見された HIV 陽性の血液の特性をウイルス・血清学的手法により、解析する。
NAT の検出感度向上をめざした、ウイルス濃縮法の基礎的検討を実施する。

B. 研究方法

3年計画の3年目にあたる平成15年度は、分担研究者、班長協力者と協力して、研究目的に掲げた研究を実施した。また、これらと関連する分担研究者らによる個別研究を総括した。

1. HCV、HIV の標準パネル血漿の作製

- 1) HCV の標準パネル血漿
献血された新鮮凍結血漿（Fresh Frozen Plasma:FFP）の中から、
(1) ウインドウ期の血漿、(2) HCV キャリア期の血漿、(3) HCV の感染既往期の血漿、および
(4) 陰性対照血漿、を選択、分注

し、国内において使用可能な全ての血清学的測定系によるHCV関連抗原・抗体の検出・測定、およびHCV RNAの定量を、主として班長研究協力者(班友)らが分担して行い、その結果を集積、解析して標準パネル血漿を作成した。なお、標準パネル血漿の作製にあたっては、国内で見出される全てのHCVの遺伝子型(ジェノタイプ)を網羅すること、HCV RNA量が極小~極大にまで分布すること、に留意した。

2) HIVの標準パネル血漿

献血されたFFPの中から、(1) ウインドウ期の血漿、(2) HIVキャリア期の血漿、および(3) 陰性対照血漿を選択、分注し、HCVと同様の手順により標準パネル血漿を作製する途上にある。

2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

国内の124施設の参加を得て、HCV RNA検査に関するコントロールサーベイを実施した。

第1回のサーベイで「正答」が得られなかった施設については問題点を洗い出し、実習を含めたアドバイスをしない、同一のサンプルを用いて第2次のコントロールサーベイを実施し、その結果を検証した。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

1) 血液製剤の保存や輸血時に利用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグへの使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)の新規分析法を構築し、DEHPの溶出挙動の解明を試みた。

2) 製分献血時に使用されている6種類の

採血キットから溶出する化学物質の量を調査した。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

- 1) 献血時の検査でHIV陽性と判定された血液のHIV抗体価、HIV RNA量の測定、およびHIVのサブタイプングを行なった。
- 2) 血液の安全性向上に資することを目的として、ウイルス濃縮によるNATの高感度化のための基礎的検討を行なった。

C. 結果と考察

1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製

1) HCVの標準パネル血漿

完成したHCVの標準パネル血漿の構成は下記の通りである。

- (1) HCV感染のphase:ウインドウ期、キャリア期、感染既往期、陰性対照血漿を網羅する計100本より成る。
- (2) HCVのジェノタイプ:1a、1b、2a、2bの4種類を網羅した。
- (3) HCV RNA量:最少 10^2 コピー/ml未満から 10^7 コピー/mlまでの範囲をカバーした。
- (4) 核酸増幅検査(NAT)によるHCV RNAの定性、定量値、および血清学的測定系によるHCV関連の抗原、抗体の定性、および定量値を記載した。
- (5) NIBSCから分与を受けたWHOの標準品(HCV RNA1.0 \times 10^6 IU/ml)を陰性血漿により 10^6 倍づつ段階移釈し、パネル血漿の最終測定時にNATにより同時測定し、両者の測定値を対比、換算することが可能となるようにした。

2) HIVの標準パネル血漿

作製途上にある標準パネル血漿の構成は下記の通りである。

- (1) HIV感染のphase:HIV感染のウインドウ期(1検体のみ)、キャリア期、および陰性対照血漿、計100本より成る。
- (2) HIVのサブタイプ:A、B、Eの3種類。
- (3) HIV RNA量:最少 10^2 コピー/ml未満から 10^6 コピー/mlまでの範囲をカバー。

最終測定値を得る際には、国際標準品との同時測定を行ない、標準パネル血漿のHIV RNAの測定値(コピー/ml)と国際標準品の測定値(IU/ml)との対比、換算が可能となるようにする予定である。

2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

核酸増幅検査(NAT)によるHCV RNA検査を日常検査に取り入れている計124施設の参加を得て、コントロールサーベイを実施した。

コントロールサーベイには、作製したHCVの標準パネル血漿の中から、ジェノタイプ1a、1b、2bの3種、および陰性対照血漿を選び、参加施設に配布、測定結果を収集解析した後、問題点が見出された施設については、操作上の問題点の洗い出しと、改善のための介入による効果を評価した。なお、配布したHCV RNA陽性の3検体は、いずれも 10^2 コピー/ml~ 10^3 コピー/mlとなるように調整した。

コントロールサーベイに参加した124施設のうち104施設では内部標準(インターナルコントロール:IC)を用いていた。

配布したコントロールサーベイ用

の血漿、HCVのジェノタイプ1a、2a、2b、での正答率はそれぞれ97.6%、93.5%、97.6%であり計14件、3.8%に見落としが認められた。陰性対照血漿についての正答率は100%であり、偽陽性の答はゼロであった。

第1回目のサーベイで偽陰性の結果、もしくは定性的検査結果では正答であったものの極度に低い測定値の報告があった15施設中11施設のルチン検査に立ち合い、操作上の問題点等を抽出、整理して作成したチェックシートに従って問題点の改善のためのアドバイスをを行った後に、第1回目と同一のコントロールサーベイ用血漿4検体を用いてフォローアップサーベイを実施した。その結果、全ての施設から正答を得、また第1回目のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度が得られ、検査実施者の作業手技が改善されたことを確認した。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

1) ポリ塩化ビニル製の血液バッグに残留するDEHPの分析法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に使用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグに残留する化学物質のうち、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

(DEHP)の新規分析法を構築し、溶出挙動の解明を行った。新規に構築した分析法では、DEHP、及びその代謝物であるMEHPの同時分析が可能であることから、現在使用されている血液製剤78検体からの可塑剤の測定を行ない、残留量と暴露量の調査を行った、その結果、以下の事

項が明らかとなった。すなわち、(1) 血液製剤内での DEHP から MEHP への代謝率は 20% 以下であり、血液製剤を投与した場合、そのほとんどが DEHP として体内に取り込まれる。

(2) DEHP の溶出量は、ヒト全血で最も多く、次いで赤血球 MAP、及び血小板の順であった。(3) DEHP の溶出量は血液製剤の保存期間によって経時的に増加する傾向が見られた。

(4) 最も高濃度に検出された検体 (DEHP: 83.2 μ g/ml) をもとに、400ml 採血由来のヒト全血約 456ml (抗凝固剤添加量を考慮) 全量を投与したと仮定すると、1 回の投与で厚生労働省「医薬品・医療器具安全情報 No182 (2002)」で取り上げている TDI: 40 ~ 140 μ g/kg weight/day に達することが明らかとなった。このことは、今後血液製剤を利用するにあたり、リスクとベネフィットを十分に考慮する必要があることを示していると言える。

2) 成分採血用キットから溶出する化学物質の種類と溶出量の測定

成分献血時に使用される成分採血キット 6 種類を用いて、溶出する化学物質の種類、溶出量を測定した。その結果、(1) 溶出する主な化学物質は、DEHP、2-EH、シクロヘキサノン、酢酸エチル、THF、MEK であり、これらの溶出濃度は、両腕法キットの方が片腕法キットより高い傾向を示すこと、(2) ヒト血液を用いた溶出実験から、成分献血時のドナーへの暴露量は DEHP が 81 ~ 2,190 μ g、2-EH が 15 ~ 620 μ g、シクロヘキサノンが 198 ~ 9,780 μ g にのぼること、(3) これらの暴露量は、輸血を受ける患者の 1/3 以下であり、DEHP に関しては FDA の示した TI

値 (体重 60kg) の 1/16 以下であること、が明らかとなった。

4. 分担研究者による本研究班の目的に関連する研究

1) HIV 陽性献血血液中のウイルス量および HIV のサブタイプについて解析した結果、以下のことが明らかとなった。

(1) HIV 抗体陽性の 50 検体は全例 HIV-1 抗体が陽性であり、HIV-2 抗体は陰性である。

(2) HIV 陽性の 52 検体のウイルス量は 10^4 コピー/ml 以上の比較的ウイルス量の多い検体が 33 例 (66%) と多く占め、 10^6 コピー/ml 以上のウイルス量を示すものも 5 例 (10%) 認められた。

(3) HIV のサブタイプについてはサブタイプ B が 94% と大部分を占める一方、日本でも異性間性行為による感染例に多くみられるサブタイプ A/E が 2% に、また、アフリカなどで流行しているサブタイプ A と C が各 1 例に見出された。

なお、医療機関からの検査依頼検体の中から少数ではあるもののサブタイプ D、F、G、A/C も見出されており、今後、血液製剤の安全性確保をして行く上で、HIV-2 とともに、これからの多様なサブタイプが存在することにも留意しておくことが重要であると考えられた。

2) 核酸増幅検査 (NAT) の検出感度向上のための基礎的検討

ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズ、及びスルホン酸磁気ビーズを用いてウイルス濃縮に関する基礎的検討を行った。その結果、PEI 磁気ビーズは主としてエンベロープ型ウイル

スに対して優れた濃縮効果を発揮すること、また、スルホン酸磁気ビーズは PEI 磁気ビーズでは濃縮できなかった非エンベロープ型ウイルスにも濃縮効果を発揮することが明らかとなった。

これらの方法は、遠心操作が不要で、短時間のうちにウイルスを濃縮することができること、簡便性、迅速性にも優れていることから、100 μ l ~ 200 μ l を出発検体とする従来の NAT に比して、10 倍量以上の出発検体に、ウイルス濃縮の過程を加えて NAT を実施することにより実質的な検出感度の向上を図ることができる可能性を示すものであると言える。

D. 結論

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化、および血液製剤の精度管理に関する研究、およびこれと関連する個別研究を行ない、以下の結果を得た。

1. HCV の標準管理血清を完成させた。
2. HIV の標準管理血清については完成の目処が立った。
3. 血液製剤の保存、輸血時、献血者からの採血時に使用されるポリ塩化ビニル製のバッグ等から溶出する化学物質の同定法の確立、種類の同定および溶出量の測定を行ない、それぞれの意義について考察した。
4. HIV 陽性の献血血液をウイルス・血清学的手法により解析し、その特性について考察を加えた。
5. NAT の検出感度向上のための基礎としてのウイルス濃縮法の基礎を確立した。

E. 知的財産権の出願・登録 なし

F. 研究発表、文献

(今井光信)

- 1) Fuat Kurbanov, Makiko Konndo, Yasuhiro Tanaka, Mariam Zaliyeva, Masashi Mizokami, Mitsunobu Imai: Human Immunodeficiency Virus in Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res and Hum Retroviruses ;19: 731 - 738 (2003)
- 2) 市川正孝、三田村敬子、山崎雅彦、川上千春、清水英明、渡邊寿美、今井光信、他: イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しいインフルエンザ迅速診断キット (エスブライン) の検討。医学と薬学、49、467-478 (2003)

(山口照英)

- 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. Biochem. Pharmacol. 66:133-140, 2003
- 4) Iwata, A., Satoh, K., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. Biol. Pharm. Bull. 26, 1065-1069 (2003)
- 9) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. J Cell. Physiol. 195:119-129, 2003.
- 10) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T.,

- Kawanishi, T., Hayakawa, T.:
Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 300, 770-774 (2003)
- 11) Iwata, A., Satoh, K., Yamaguchi, T., Tomoda, A.;
Antiviral activity of 2-amino-4, 4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one on polyovirus.
Tohoku J. Exp. Med. 200, 161-165, 2003
- 12) Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., Yamamoto, Y., Hayakawa, T.;
Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase.
J. Biochem., in press
- 13) Sakurai, F., Mizuguchi, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.;
Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector.
Mol. Ther., in press.
- 14) Koizumi, N., Mizuguchi, H., Sakurai, F., Yamaguchi, T., Watanabe, Y., Hayakawa, T.;
Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α 5 β 1 integrin-binding ablation.
J. Virol. in press
- 15) Satoh, K., Iwata, A., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.;
Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests.
J. Virol. Methods, 114, 11-19, 2003
- 16) Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Iwata, A., Nagata, R., Satoh, K., Fan, K., Murata, M., Mizuguchi, H., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.;
Detection of Replication-Competent Adenovirus Vectors Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction.
Mol. Therapy, 8, 1009-1016 (2003)
- 17) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Urie, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami;
In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association.
J Steroid. Biochem. Molec. Biol. In press
- (竹森利忠)
- 23) Inoue, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C. and Nohara, K.;
Suppressive effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice.
Toxicological Sci. 74: 315-324, 2003
- 24) Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu - Yokota, Y;
Studies on the generation and maintenance of mucosal Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice.
Aids Res. Hum. Retro. 19: 469-479, 2003
- 25) Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., Nakayama, T. and Koseki, H.;
Mesenchymal expression of Foxd1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs.
Dev. Biol. 255: 278-289, 2003
- 26) Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., Nakayama, T. Taniguchi, M.;
Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's patch.
Int. Immunol., 15: 393-402, 2003
- 27) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Hirahara, K., Shiraiishi, A., Nigi, H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M.;
Analysis of sequential immunoglobulin E-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in human, monkeys and mice.
Clin. Exp. Allergy 33: 211-217, 2003
- (中澤裕之)
- 38) K. Kato, S. Shoda, M. Takahashi, N. Doi, Y. Yoshimura and H. Nakazawa:
Determination of three phthalate metabolites in human urine using on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
J. Chromatogr. B, 788, 407-411 (2003)
- 39) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura and H. Nakazawa:
Column-switching high-performance liquid chromatography \cap electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples.
Anal. Bioanal. Chem. 375, 527-533 (2003)
- 40) K. Kato, T. Yamauchi, K. Higashiyama and H. Nakazawa:
High throughput analysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites in urine for exposure assessment.
J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26, 2151-2160 (2003)
- 41) K. Inoue, T. Higuchi, F. Okada, H. Iguchi, Y. Yoshimura, A. Sato and H. Nakazawa:
The validation of column-switching LC/MS as a high-throughput approach for direct analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate released from PVC medical devices in intravenous solution.
J. Pharm. Biomed. Anal. 31, 1145-1152 (2003)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
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
分担研究報告書

核酸増幅検査（NAT）の技術の標準化のために資する
標準パネル血漿（HCV、HIV）の作製

分担研究者 吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学

II. 分担研究報告

研究協力者（班友：作業部会メンバー）

玉造 滋	(株) ロシュ・ダイアグノスティックス	遺伝子診断開発グループ
山田 徹	(株) ダイナボット総合研究所	学術部
矢萩 則夫	(株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス	開発部
皆川 英孝	(株) 富士レビオ	商品開発支援グループ
柚木 久雄	日本赤十字社	中央血液センター NAT部
山中 烈次	日本赤十字社	血液事業部
飯田 俊二	日本赤十字社	血液事業部
松倉 晴道	大阪府赤十字血液センター	試薬製造部
水井 正明	広島県赤十字血液センター	技術部
今井 光信	神奈川県衛生研究所	ウイルス部
田中 純子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
片山 恵子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
熊谷 純子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
小宮 裕	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部
竹森 利忠	国立感染症研究所	免疫部

研究要旨

3年計画の3年目にあたる本年度は、1年目、2年目に引き続き核酸増幅検査（NAT）の標準化に資することを目的とした標準パネル血漿作製のための作業を行なった。

B型肝炎ウイルス（HBV）検査の標準化に資するパネル血漿は昨年度に完成をみたことから、本年度はC型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）検査の標準化に資するパネル血漿作製の作業を行なった。

1. HCVについては、1) HCV感染のウィンドウ期、2) キャリア期、3) 感染既往期、および（4）陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル血漿を完成した。また、WHOの標準品（HCV RNA 1.0×10^6 IU/ml）と完成した標準化パネル血漿に表示したHCV RNA量（コピー/ml）との換算を可能にする表を添付した。

2. HIVについては、1) HIV感染のウィンドウ期、2) キャリア期、3) 陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル候補血漿を収集し、最終測定、

WHOの標準品との換算表を作製する途上にあり、完成の目処が立った状態にある。

A. 研究目的

核酸増幅検査 (NAT) の技術標準化のために用いる標準パネル血漿を作製することを目的とする。

HBVについては、すでに完成したことから、今年度はHCVとHIVを対象ウイルスとする。また、HBV、HCV、HIVの3種類のウイルスに関連する全てのマーカーが陰性である陰性対照および稀釈用血漿を確保することを目的とする。

標準パネル血漿が完成した段階で、NIBSCより分与を受けたWHOの標準品と同時測定を行ない、それぞれのウイルスの測定値と世界標準品に表示されている測定値との整合 (calibration) を可能にするための同時測定により得られた測定値を付した換算表を添付した。

B. 研究方法

1. 標準パネル候補血漿の第1次の選択

日本赤十字社血液事業部との協力の下に、新鮮凍結血漿 (FFP、200 ml 又は 400 ml) を下記の要領で選択した。

1) HCV用標準パネル候補血漿

HCV感染のウィンドウ期、キャリア期、感染既往期の血漿が適切な数ずつ含まれるように全体のバランスを考慮して (100 + α) 本選択した。HCVのジェノタイプは国内に存在する代表的なもの (1b、2a、2bおよび1a) の計4種類を網羅するように、またHCV RNA量は最少 10^2 コピー/mlから 10^7 コピー/mlまでの範囲をカバーするように選択した。

2) HIV用標準パネル候補血漿

HIV感染のウィンドウ期の血漿1本およびHIV感染のキャリア期の血漿99本、計100本を選択した。HIVのサブタイプは、これまでに国内の献血者から見出された全て (サブタイプA、B、E) を網羅するように選択した。

3) 陰性対照及び稀釈用陰性血漿

S-ALT値がスクリーニングレベル (60IU/l) を越えることからヒトに使用できなかった新鮮凍結血漿のうち、400 ml献血由来のもの、成分献血由来のもの (血漿量の多いもの) を優先して選択した。

2. 標準パネル血漿の選別、作製手順

1) 第1次の測定と候補血漿の第1次の選別

標記の研究協力者が、分担して測定した結果を収集、解析し、分担研究者全員の参加の下に、ウイルス感染の各期 (ウィンドウ期、キャリア期、感染既往期など)、ウイルスのジェノタイプ (サブタイプ)、ウイルス核酸量、血清学的マーカー等が全体の中でバランスよく分散することを考慮して候補血漿の第1次の選別を行なった。

2) 標準パネル血漿選択のための第2次の測定

第1次の選別を終えた各候補血漿をそれぞれバッグから遠心管に移して、均質になるようによく攪拌後、遠心してフィブリンを除去。それぞれの血漿を 1.2×100 本ずつに分注、残量は「バルク」として -80°C のフリーザー中に保存した。

以上のようにフィブリンを除去、均質化した後に分注した血漿をセットとして (100本 + α / 1セット) 各分担当測定者に送付し、最終測定を行なった。最終測定時にWHOの標準品を、HBV、HCV、HIVに関連する全てのマーカーが陰性の新鮮凍結血漿を用いて 10^N 倍段階稀釈して同時測定した。

3) 標準パネル血漿の抽出とWHOの標準品の測定値との整合

最終測定の結果を収集、整理し、分担当測定者全員の参加の下に、それぞれの測定系による測定値が可能な限り近似する検体を抽出して最終的な標準パネル血漿 (陽性血漿) として選別し、これに陰性対照血漿を適宜追加して計100本の「標準パネル血漿」とした。また末尾に、WHOの標準品の測定値 (IU/ml) と各分担当測定者による同時測定値 (コピー/ml) とを一覧として表示し、相互に対比して換算できるようにした。

C. 結果と考察

1. HCV用標準パネル血漿

完成したHCVの標準パネル血漿一覧を表1に示す。末尾には、WHOの標準品の同時測定値を添付した。

2. HIV用標準候補パネル血漿

完成途上にある (第1次の測定を終了した) HIV用標準候補パネル血漿一覧を表2に示す。WHOの標準品は、最終測定時に同時測定する予定である。

なお、完成した標準パネル血漿は、それぞれの検体ごとに各100本ずつ分注し (HIVについては量的に不足する検体も生ずる見込みである) 残

余の血漿は消費による不足が生じた場合の補充用「バルク」として別途 -80°C にて保存した。また、HBV、HCV、HIVに関連する全てのマーカーが陰性の新鮮凍結血漿も十分量確保した。

なお、本研究班が標準パネル血漿を作製するにあたって用いた新鮮凍結血漿は、元来、日本赤十字社においてヒトへの輸注用製剤として、献血された血液をもとに調製されたものであるが、HBV、HCV、HIVのいずれかのマーカーが陽性、あるいはS-ALT値がスクリーニングレベルを越えていたことからヒトへの使用ができなかったものである。

本研究班は、正規の手続を経た上で、日本赤十字社血液事業部から、これらの血漿の譲渡を受けて、標準パネル血漿を作製した。

D. 知的財産権の出願・登録
なし

E. 研究発表、文献

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 1/6

Table with columns: HCV RNA, HCV Core Ag, HCV Ab, 日誌, ロシュ, オート, HCV Antibody, HCV core Ab, HCV core Ag, HCV genotype. Rows include sample IDs like P2-001 to P2-020 with various numerical and categorical data.

厚生労働省 医薬安全総合研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班
2003年11月

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 2/6

Table with columns: HCV RNA, HCV Core Ag, HCV Ab, 日誌, ロシュ, オート, HCV Antibody, HCV core Ab, HCV core Ag, HCV genotype. Rows include sample IDs like P2-021 to P2-040 with various numerical and categorical data.

厚生労働省 医薬安全総合研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班
2003年11月

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 3/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab			HCV PA (2°)	ロシュ			オーソ							富士レピオ			HCV genotype	
	IU/ml	copies/ml	Genotype	オーソ			アボット				AMP/INAT HBV/HCV/HV-1	HCV Antibody			HCV Ab			HCV core Ag							
				HCV RNA ELISA (NS4) 検出: S/C 1.0	HCV RNA ELISA (NS3) 検出: S/C 1.0	HCV RNA ELISA (NS5) 検出: S/C 1.0	HCV PA (2°)	S/CO (検出値 1.0)	HCV PA (2°)			c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NS5	SOD	判定	C.O.I. (1以上を陽性)	判定	C.O.I.	判定	fmu/L	判定		
																									DrRo HCV Ab ELISA 3 (S/C) 検出: S/C 1.0
P2-041	検出せず			1	1	4	5	3.85	7	5.5	-242.3	1378.6	-	4.1	±	±	-	-	陽性	1.9	+	6.5	+	0	
P2-042	検出せず			2	9	3	5	3.77	7	5.5	-220.1	1047.2	-	4.5	1+	±	-	-	陽性	1.4	+	4.7	+	8.3	
P2-043	検出せず			5	5	4	6	2.23	6	5.5	-200.0	2094.5	-	1.2	±	±	1+	-	陽性	1.3	+	0.9	+	8.3	
P2-044	検出せず			5	6	2	4	4.51	7	5.5	-228.7	2127.0	-	4.6	±	±	-	-	陽性	2.2	+	7.3	+	0	
P2-045	検出せず			6	1	1	5	2.68	6	5.5	-233.0	1830.1	-	1.8	±	±	-	-	陽性	1.4	+	2.7	+	2	
P2-046	検出せず			3	6	3	6	2.69	7	5.5	-238.8	2404.0	-	1.6	-	±	±	-	陽性	1.3	+	2.2	+	12.3	
P2-047	検出せず			4	12	3	6	6.27	8	6	-149.9	2081.3	-	4.6	1+	1+	-	-	陽性	2.8	+	6.0	+	0	
P2-048	検出せず			0	8	1	5	5.55	7	6	-231.4	2250.2	-	4.3	-	1+	2+	-	陽性	2.2	+	4.7	+	5.9	
P2-049	検出せず			0	9	1	5	3.25	7	6	-227.3	2783.7	-	2.3	±	1+	2+	-	陽性	1.5	+	0.9	+	1.2	
P2-050	検出せず			3	1	2	6	3.73	8	6	-216.8	2350.8	-	3.9	-	±	-	-	陽性	1.7	+	5.4	+	4.4	
P2-051	3.1×10 ⁶	2.5×10 ⁷	II (2b)	14414	20082	12792	14	104.34	15	12.1	-	na	6.3	-	-	-	-	陽性	68.6	+	65.1	+	16471.4	-	2b
P2-052	検出せず			2	11	4	6	1.61	6	6.5	-150.8	788.8	-	1.2	±	1+	±	-	陽性	1.1	+	0.1	+	9.1	
P2-053	検出せず			8	4	3	7	5.37	9	6.5	-280.1	2885.4	-	5.0	±	1+	1+	-	陽性	2.9	+	9.0	+	8.3	
P2-054	検出せず			7	9	2	6	3.30	6	6.5	-153.4	2000.7	-	2.6	-	±	1+	-	陽性	2	+	0.9	+	7.5	
P2-055	検出せず			2	4	2	6	3.98	7	6.5	-249.8	2597.4	-	3.0	-	±	-	-	陽性	1.5	+	2.8	+	0	
P2-056	検出せず			0	0	2	6	5.62	8	7	-157.8	1910.4	-	1.7	1+	1+	-	-	陽性	2.1	+	4.6	+	0	
P2-057	検出せず			0	0	4	6	7.78	7	7	-228.4	2031.3	-	3.4	-	1+	±	-	陽性	3.8	+	2.3	+	2.8	
P2-058	検出せず			2	4	4	7	10.86	9	7	-152.8	1410.0	-	6.0	-	1+	1+	-	陽性	7.1	+	16.9	+	0	
P2-059	検出せず			10	0	4	6	3.79	7	7	-238.2	2731.8	-	1.4	1+	1+	±	-	陽性	2	+	3.2	+	6.7	
P2-060	検出せず			4	5	2	7	20.87	12	7	-225.1	826.7	-	6.3	1+	1+	-	-	陽性	8.4	+	67.8	+	2.8	

厚生労働省 医薬安全総合研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班
2003年11月

- 16 -

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 4/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab			HCV PA (2°)	ロシュ			オーソ							富士レピオ			HCV genotype	
	IU/ml	copies/ml	Genotype	オーソ			アボット				AMP/INAT HBV/HCV/HV-1	HCV Antibody			HCV Ab			HCV core Ag							
				HCV RNA ELISA (NS4) 検出: S/C 1.0	HCV RNA ELISA (NS3) 検出: S/C 1.0	HCV RNA ELISA (NS5) 検出: S/C 1.0	HCV PA (2°)	S/CO (検出値 1.0)	HCV PA (2°)			c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NS5	SOD	判定	C.O.I. (1以上を陽性)	判定	C.O.I.	判定	fmu/L	判定		
																									DrRo HCV Ab ELISA 3 (S/C) 検出: S/C 1.0
P2-061	検出せず			7	3	5	7	4.03	8	7	-270.7	2817.5	-	3.9	±	1+	-	-	陽性	2.4	+	5.3	+	0	
P2-062	検出せず			2	0	4	7	2.41	6	7	-199.4	2389.4	-	1.2	-	1+	-	-	陽性	1.9	+	0.2	+	0	
P2-063	検出せず			8	0	1	7	4.41	8	7	-274.4	2648.3	-	3.5	±	1+	-	-	陽性	2.9	+	2.3	+	0	
P2-064	検出せず			0	2	1	7	8.35	8	7	-112.4	2406.8	-	4.4	±	3+	-	-	陽性	5.7	+	3.9	+	0	
P2-065	4.9×10 ⁵	2.5×10 ⁷	III (2a)	11880	10546	8054	13	85.13	13	12.1	-	na	6.3	-	-	-	-	陽性	32	+	84.2	+	11546.7	+	2a
P2-066	検出せず			0	6	3	7	13.33	9	7.5	-233.8	2548.3	-	6.3	±	1+	-	-	陽性	4.9	+	20.9	+	1.2	
P2-067	検出せず			6	0	2	7	6.00	8	7.5	-214.2	712.4	-	4.0	±	1+	-	-	陽性	4.8	+	4.5	+	2.8	
P2-068	検出せず			2	7	6	7	35.48	9	7.5	-236.5	2773.0	-	6.3	±	2+	-	-	陽性	14.8	+	55.0	+	0	
P2-069	検出せず			7	7	2	7	14.01	9	7.5	-113.0	1645.1	-	6.3	1+	2+	-	-	陽性	9.4	+	13.4	+	0	
P2-070	6.0×10 ⁵	3.8×10 ⁶	III (2a)	3140	2050	2746	7	61.24	11	7.5	-	na	6.3	-	-	-	-	陽性	21	+	151.0	+	5232.6	+	2a
P2-071	検出せず			7	4	4	7	4.28	9	8	-84.5	1522.5	-	4.2	±	±	-	-	陽性	2.6	+	4.4	+	0	
P2-072	検出せず			0	3	8	8	10.83	9	8	-262.5	1120.8	-	5.5	2+	2+	-	-	陽性	5.5	+	12.6	+	0.4	
P2-073	検出せず			0	0	1	9	17.09	9	9	-184.8	1534.8	-	6.3	-	1+	-	-	陽性	6.2	+	18.9	+	13.1	
P2-074	検出せず			0	0	1	9	17.90	9	9	-246.1	457.3	-	5.4	2+	2+	-	-	陽性	10	+	6.4	+	1.2	
P2-075	検出せず			3	1	2	9	21.77	10	9	-230.8	1991.6	-	6.3	-	1+	-	-	陽性	9.7	+	21.1	+	3.6	
P2-076	検出せず			4	0	2	8	26.33	8	9	-205.7	952.5	-	6.3	-	3+	-	-	陽性	9.9	+	6.0	+	0	
P2-077	検出せず			6	6	1	10	20.41	11	9.5	-129.2	1429.0	-	6.3	±	3+	-	-	陽性	11.7	+	26.2	+	0	
P2-078	検出せず			5	0	3	10	36.43	11	10.5	-114.9	1435.7	-	6.4	2+	2+	-	-	陽性	19	+	50.3	+	0	
P2-079	検出せず			3	3	4	12	70.52	13	11	-112.9	1589.3	-	6.4	-	-	-	-	陽性	39.4	+	16.7	+	0	
P2-080	2.0×10 ⁶	1.3×10 ⁷	II (1b)	15825	14459	12440	11	45.25	12	11	-	na	6.2	±	±	-	-	陽性	19.9	+	84.3	+	11838.8	+	1b

厚生労働省 医薬安全総合研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班
2003年11月

- 17 -

核酸増幅検査(NAT)標準化のための
標準パネル血漿(HIV用) -5/5
作成中-

1/19 検査番号	検査種別 (検査機)	検査日時	HIV-1 NAT (Roche)		HIV-2 NAT (Roche)		HIV-1/2 NAT (Roche)		HIV-1 NAT (Abbott)		HIV-2 NAT (Abbott)		HIV-1/2 NAT (Abbott)		検査結果
			検出	検出濃度	検出	検出濃度	検出	検出濃度	検出	検出濃度	検出	検出濃度	検出	検出濃度	
P3-061	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-062	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-063	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-064	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-065	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-066	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-067	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-068	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-069	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-070	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-071	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-072	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-073	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-074	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-075	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-076	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-077	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-078	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-079	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性
P3-080	B	10/21/07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	+	2.4E+07	陽性

厚生労働省 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
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（H13-医薬-037）
分担研究報告書

HCV 定性 NAT 検査のサーベイについて

- 研究協力者 玉造 滋 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
林 邦彦 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
佐々木政人 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
田口直子 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
平井鉄三 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
松山和弘 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)

研究要旨

ヒト C 型肝炎ウイルス RNA 検出検査をルチン検査として実施している施設を対象に、「2002 年肝炎ウイルス核酸増幅検査 (NAT) コントロールサーベイ (以下、サーベイ)」を実施した。

NAT 検査は、血漿検体中の HCV-RNA を定量・検出する目的で広く用いられている。特に定性的 HCV-RNA 検出検査は、薬物治療効果判定に重要である。そこで今回我々は、コバアンプリコア HCV v2.0 (自動 PCR 測定法) およびアンプリコア HCV v2.0 (マイクロプレート手法) をルチン検査に採用している施設を対象に、検査の精度を調べる目的で全国的なサーベイを実施した。

検体として、日本で主に見られるウイルス型 3 種類 (Genotype 1b, 2a, 2b) の希釈検体 (およそ 200-400 IU/mL) と陰性検体の 4 本をセットとして用意し、配布した。コバアンプリコアで検査を実施した施設が 9 2 施設、アンプリコアで検査を実施したのが 3 2 施設、合計 1 2 4 施設の参加を得た。核酸の抽出方法は 6 通りであり、内部標準 (インターナルコントロール、IC) は 1 0 4 施設 (全体の 84%) で実施されていた。正答率は、Genotype 1b, 2a, 2b, 陰性それぞれで、97.6%, 93.5%, 97.6%, 100% であった。偽陽性は 1 例もなかったが、見落としが若干 (14 件、3.8%) あったことになる。

NAT 検査において、高感度で安定した HCV-RNA の検出を行うためには、検査実施者のスキルも精度を決める因子のひとつとなりうる。そこで我々は、フォローアップとして用手操作部分のチェックシートを作成した。さらに今回のサーベイで偽陰性報告があったり、極度に吸光度が低い報告があった 15 施設中 11 施設を実際に訪問し、ルチン検査に立ち会って問題点の抽出と改善のためのアドバイスをを行った。その後、最初のサーベイと同じ 4 検体セットで 11 施設に対してフォローアップサーベイを実施したところ、全ての施設から正しい解答が報告された。HCV、IC ともに最初のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度が観察され、実施者の作業手技が改善されたことが確認できた。

A. 研究目的

コバサンプリコア HCV v2.0 (自動PCR測定法、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) およびアンプリコア HCV v2.0 (マイクロプレート手法、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) をルチン検査に採用している施設を対象に、NAT検査の精度を調べる目的で全国的なサーベイを実施した。

これらの検査はキット化され、自動化も進んでいるが、血漿検体からの HCV-RNA の抽出など、用手操作が必要な部分もあり、検査作業従事者のスキルが検査結果に与える影響も小さくない。今回、124施設の参加を得て、検査現場で実地に行われている HCV-RNA の NAT検査の精度を調べるサーベイを実施した。また、測定結果に問題がある施設については、共通のチェックシートで作業工程や検査室環境を確認し、操作上の問題点を抽出して改善を促すこととした。改善の効果については、フォローアップサーベイを実施し、それを確認することとした。

B. 対象と方法

Fig: 参加施設の内訳と抽出法一覧
(添付資料 No 3)

日本全国の124施設(検査センター、病院検査室、保健所、衛生研究所など)の参加を得た。コバサンプリコア実施施設が92、アンプリコア実施施設が32施設であった。抽出方法は6種類に渡り、アンプリテックス法が84施設(68%)を占めた。

検体は、厚生労働省研究班(班長:吉澤浩司、広島大学大学院教授)のNAT精度管理パネル(2002年)から選択したHCV Genotype 1b, 2a, 2bの3種類を元に、同パネルから選択した肝炎マーカー陰性血漿のプール血漿で希釈し、作成した。パネルに記載されているHCVタイターを元に、10E5 IU/mL程度に一次希釈し、これをアンプリコア HCV モニター-v2.0 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)にて精密に定量し

なおした。得られたHCVタイターを元に3x10E2 IU/mLを目標に最終希釈を行い、400 μLずつ微小試験管に分注して-80℃で凍結保存した。希釈に用いた陰性プール血漿は、陰性検体として、これも400 μLずつ微小試験管に分注して-80℃で凍結保存した。最終検体は、HCV定量キット(アンプリコア HCV モニター)の定量限界以下の濃度であるため、正確なHCVタイターを確認していないが、HCV定性検出キットでは陽性と判定されることを確認した。検体の施設への配布においては温度管理を厳密にし、ロシュ社担当者がドライアイス上で凍結保存したものを運び、検査担当者に直接手渡した。検体は一度融解したものは直ちに抽出に供するものとして徹底し、再凍結は行わないこととした。

C. 結果と考察

サーベイの成績まとめ

Fig: Genotype別成績一覧
(添付資料 No 4)

試料4, 5, 6, 7がそれぞれHCV Genotype 1b, 2a, 2bおよび陰性血漿検体である。陽性検体において12施設で合計14件(3.8%)の偽陰性、つまり見落としが見られ、3施設で極端に低い吸光度の報告があった。陰性検体においては、偽陽性は全く発生しなかった。ルチンのPCR検査室において偽陽性が皆無であったのは、アンプリコアキットが採用している「AmpErase(ウラシル-N-グリコシラーゼ、UNG)とdUTP」のキャリアオーバー防止機能が働いていることによると思われる。

偽陰性や低い吸光度を報告したうちの11施設(コバサンプリコア9施設、アンプリコア2施設)を調べたところ、全ての施設で抽出にアンプリテックス法を用いていることが判明した。同法は使用するディスプレイが少なく、手順も少なく、手軽に高感度なHCV-RNA検出を実施することが出来るが、

操作上若干のキープポイントがあり、これらを見逃したことで偽陰性を招いた可能性が考えられた。そこで我々は、特にアンプリテックス法の操作に重点を置き、検査実施環境と手順についてのチェックシートを作成してこれら11施設全てを訪問し、実際のルチンに立ち会って操作上の問題点の発見と改善を試みた。

1. チェックシートの作成

検査環境、抽出工程の手法を中心に、52項目に上るチェックリストを作成した。各項目には、その操作が検査結果に及ぼす影響の大きさを考慮したリスクファクター(1~4)を設定し、チェック結果にファクターを掛けた数値の総和でその度合いに応じた改善提案を行えるようにした。また、全てのチェック項目に「チェックをする理由」を明記して、検査実施者が理解・納得して操作を見直せるよう配慮した。いくつかの例を提示する。斜字が実際のチェック項目、>>マーク以降がその理由である。また例1~6、43はいずれもリスクファクター1点であるが、41、42は4点である。全項目を記したチェックシートは、紙面の関係で割愛するが、著者にメール(shigeru.tamatsukuri@roche.com)でご請求いただければ別途お届けしたい。

(チェックリストの例)

A) 手袋・マスクの使用について

1. パウダーフリーの手袋を使っていますか?

パウダー(粉)の混入はRT-PCRを阻害しますので使用を避けてください。

2. 手に合うサイズの手袋を使っていますか?

指先が余っているなどフィットしない手袋は、操作性を損なうばかりでなく、気付かぬうちに他の検体などに触れてコンタミネーションの原

因となってしまう事があります。

3. マスクは使用していますか?

唾液にはHCV RNAを分解する酵素(RNase)が大量に含まれています。くしゃみや咳はもちろん、おしゃべりなどでも唾液は飛散しますので十分ご注意ください。

B) 次亜塩素酸水を使用しているの清浄作業について

4. 洗瓶に小分けして使用していますか?

次亜塩素酸は経時的にその効力が落ちてきます。洗瓶(飛散が少ない)を用いて、少量ずつコマめに準備する事をお勧めします。推奨濃度は0.5~0.6%です。

5. 作業台にスプレー(噴射)していませんか?

スプレーは厳禁です。飛散した次亜塩素酸が、検体、試薬、および未使用のチップなどに付着し、偽陰性を引き起こす原因となりかねません。

6. ティッシュを使っていますか?

吸水性・拡散性に優れ、器具や作業台の拭取りにおいても必要以上に次亜塩素酸を残しません。

M) 測定開始直前の検体の取扱い

41. 凍結保存した検体を測定する場合、よく溶かしてから使用していますか?

42. 抽出を開始する前に、十分な攪拌およびスピンドダウンをしていますか?

特に凍結融解した検体は濃度勾配が生じています。十分に攪拌してからサンプリングしてください。また、攪拌したら、必ずスピンドダウンを行ってください。蓋の周辺に付着した検体を遠心力で振るい落としますので、開栓時の飛散による感染やクロスコンタミの危険性を防ぎます。

43. 検体の状態を確認していますか?(フィブリンの有無など)

フィブリンや強溶血の有無などの検体情報は、測定結果の確認に際し

有用な情報となります。また、透析患者検体、ヘパリン投与患者検体などをチェックする上で、依頼元である診療科の確認も必要に応じて行いましょう。

2. 問題点の抽出

チェックリストを用いた立会い作業の結果、以下の項目が問題点として抽出された。

- ・試料（凍結保存）融解後の攪拌不足
- ・アンプリテックス抽出における洗浄液残留
- ・アンプリテックス抽出におけるラテックス分散不備
- ・初心者による実施&報告

最後に除いて、いずれもリスクファクター4点が設定されていた項目であった。そこでこれらの改善指示と、初心者のトレーニングを行ったのち、11施設において最初のサーベイと同じ検体セットを用いて、フォローアップサーベイを実施した。

フォローアップサーベイの成績まとめ

Fig: フォローアップサーベイ成績一覧
(添付資料No 18)

フォローアップサーベイに参加した全11施設すべてが正しい結果を得た。また陽性試料（試料4~6.）における吸光度（OD）の平均値は、前回（本サーベイ）の全体の平均値と比較し、ほぼ同等か高めに測定され、改善が確認された。

D. 結論

コバスアンプリコアHCV v2.0（自動PCR測定法）およびアンプリコアHCV v2.0（マイクロプレート手法）をルチン検査に採用している施設を対象に、臨床の場で行われているNAT検査の精度を調べる目的で、124施設の参加を得て全国的なサーベイを実施

した。検体として、日本で主に見られるウイルス型3種類（Genotype 1b, 2a, 2b）の希釈検体（およそ200-400 IU/mL）と陰性検体の4本をセットとして用意し、内容が判らないようコード化して配布した。測定においては、この検体のみを特別に測定することがないように、ルチンの検体と合わせて通常の検査状態で測定をすることを参加の条件として要求した。

参加施設の内訳は、コバスアンプリコアで検査を実施した施設が92施設、アンプリコアで検査を実施したのが32施設、合計124施設である。核酸の抽出方法は6通りであり、内訳はアンプリテックス84施設（67.7%）、セバジーンRVR23施設（18.5%）、アンプリキャップGT8施設（6.5%）、アンプリコア原法4施設（3.2%）、ExRD2施設（1.6%）、その他3施設、であった。施設数ではアンプリテックスが多いが、大規模検査センターはアンプリキャップGTを用いた自動抽出法を用いており、検体数では8施設で全体の70%程度に上ると思われる。内部標準（IC）は104施設（全体の84%）で実施されていた。

正答率は、Genotype 1b, 2a, 2b, 陰性それぞれで、97.6%, 93.5%, 97.6%, 100%であった。従来PCR法において問題となってきた「偽陽性」については一例も発生しなかった。通常、同じPCRを繰り返すルチン検査の場合では、以前に増幅したPCR産物のDNA（amplicon）による環境汚染とそれに起因する偽陽性の発生は、検査の精度を維持する上で大きな問題となるが、アンプリコアキットには「UNG-dUTP」キャリアオーバー防止システムが組み込まれており、これが奏功しているものと考えられた。偽陽性の報告は、不要な精密検査や患者の不安につながるため、確定診断とみなされがちなNAT検査においては絶対に避けたい事象であるが、今回のサーベイで偽陽性報告が全くなかったことは特筆に値する成績であると考えられる。

一方、偽陽性は見られなかったものの、見

落としが若干（14件、3.8%）あった。サーベイの対象とした検査用試薬はキット化され、ある程度自動化も進んでいるが、血漿検体からのHCV-RNAの抽出など、用手操作が必要な部分もあり、検査作業従事者のスキルが検査結果に与える影響も小さくない。偽陰性の結果を出した施設を精査したところ、全ての施設において抽出方法としてアンプリテックスHCVを採用していることが判明した。同方法は全施設中最も多くの84施設が採用している。そこで、これら偽陽性を出した施設におけるいは、共通のチェックシートで作業工程や検査室環境を確認し、操作上の問題点を抽出して、さらにそれらの改善を促すこととした。偽陽性を報告したり、極端に低い吸光度を報告した15施設中11施設の協力が得られ、メンバーが実地に検査現場を訪問して検査に立ち会うことを許された。その結果、凍結検体を融解した後の攪拌不足や抽出工程における洗浄溶液の除去不十分などが確認された。一部の施設ではNAT検査の初心者が十分なトレーニングを受けずに検査に従事していたことも判明した。我々はこれらの改善を施設に提案し、11施設全てで改善の効果をみるためのフォローアップサーベイを実施した。

フォローアップサーベイの結果は、11施設全てで期待された結果が得られた。実際の検査結果についても、HCV、ICともに全国サーベイ時の平均と同等以上ものが得られ、手技が改善されたことが示された。

PCRを中心とするNAT検査は、非常に高感度で特異性が高いことから、確定試験として、また治療効果を知るためのモニタリング試験として急速に普及した。その反面、抽出された検体DNA/RNAの質や、操作手技の巧拙が結果に影響する面も見られる。試薬のキット化や自動化も進められているが、ルチン検査の現場での検査精度は不明であった。今回の全国サーベイでは124施設もの多施設の参加を得、非常に高い精度で検査が実施

されていることが証明された。また、一部成績に不具合のあった施設においても、問題点を発見し改善する試みが成功したことで、この種のサーベイを定期的に実施する意義が見出された。

血液製剤の安全性確保のための品質管理技術の開発に関する研究
—HIV 陽性献血血液のウイルス量および HIV のタイプ、サブタイプに関する研究—

分担研究者 今井光信（神奈川県衛生研究所）
協力研究者 近藤真規子、嶋貴子（神奈川県衛生研究所）
山中烈次（日本赤十字社）

研究概要

2003年1年間のHIV検査陽性献血血液87例の内、入手できた52例のHIV抗体、血中ウイルス量、サブタイプ等について解析した。

HIV抗体陽性献血血液50例のHIV-1PA抗体価は34例（68%）が 10^4 倍以上の高力価であったが、抗体価が 10^2 倍と低い例も3例存在した。

血中HIV-1-RNA量は、 10^4 コピー/ml以上の比較的血中ウイルス量の高い例が33例（63%）と多く、 10^5 コピー/ml以上の高い例も5例（10%）あった。

サブタイプ解析の結果、サブタイプBが94%とその大部分を占めており、東南アジアで大流行し、日本でも異性間性行為による感染例に多く見られるサブタイプA/Eは2%と少なかった。しかし、サブタイプBとA/E以外にもアフリカなどで流行しているサブタイプAとCが1例ずつ検出された。サブタイプAやCは日本のHIV感染者にも少数ながら検出されているが、HIV陽性の献血血液の解析ではサブタイプAは6例目、サブタイプCは初めての検出であった。今後、血液製剤の安全性確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2とともに多様なHIV-1サブタイプの存在も考慮していくことが重要である。

A. 研究目的

現在、日赤の献血血液のHIV検査では、PA法により抗体スクリーニング検査を行い、陰性検体についてはさらに核酸増幅検査を行いより安全な血液製剤の供給に努めている。1999年のNAT検査導入以来2003年末までにHIV抗体スクリーニング検査陰性の23,498,013検体について500本プール（1999年7月～2000年1月）および50本プール（2000年2月以降）の

NAT検査が行われ、8例が陽性であった。また、2003年の1年間のHIV検査陽性例は87例（NATのみ陽性の2件を含む）であった。

これらHIV検査陽性の献血血液についてHIV抗体価やウイルス量、HIVのタイプおよびサブタイプを解析し、その分布や動向を把握しておくことは、今後の献血血液のHIV検査技術の標準化や精度管理を考える上で重要である。

このため、2003年に新たに入手できたHIV検査陽性の献血血液52例（NAT

2例を含む）についてHIV抗体価、血中ウイルス量、HIVのタイプ、サブタイプの解析を行った。

B. 研究方法

1. 検体

2003年1月から12月にHIV抗体検査で陽性と確認された献血血液50例、NAT検査のみ陽性となった献血血液2例、計52例について以下の解析を行った。

2. HIV検査陽性献血検体のHIV抗体価の測定

HIV検査陽性献血血液52例について、HIV-1/2PA試薬（ジェネディア HIV-1/2ミックスPA：富士レリオ）およびHIV-1PA試薬、HIV-2PA試薬（セロディア・HIV-1/2：富士レリオ）を用いて、HIV-1抗体とHIV-2抗体を測定した。

3. 血中ウイルス量の定量（HIV-1-RNA定量）

血中ウイルスの定量はHIV-1-RNA定量用キット、アンプリコア HIV-1モニターver.1.5（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用いた。

4. HIVサブタイプの解析

HIV検査陽性献血血液52例の血漿、あるいは末梢血単核球（PBMC）からHIV遺伝子を抽出し、nested PCR法でenv C2V3領域を増幅した。PCR産物をカラム精製後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定し、サブタイプを解析した。

1) 血漿からのHIV-1-RNAの抽出と逆転写反応

各血漿100ulからグアニジンチオシアネート法でHIV-1RNAを抽出後、逆転写酵素（スーパースクリプトII：インビトロジェン）を用いてcDNAを作

製した。

2) PBMCからプロウイルスの抽出
PBMCをプロテアーゼEで消化後、フェノール/クロロフォルム法によりプロウイルスDNAを抽出した。

3) nested PCR法

cDNA、あるいは抽出DNAを鋳型とし、HIV-1env V3領域をnested PCR法により増幅した。

1st PCRプライマー：

ICMK650(forward); 5'-GCCCATAGT GCTTCCTGCTGCT-3'

IC462M(reverse); 5'-AATGTCAGC ACAGTACAATGTACAC-3'

2nd PCRプライマー：

KH41(forward); 5'-TCAACTCAAC TGCAGTTAAAT-3'

C3E(reverse); 5'-AGAAAAATTCC CCTCTACAATTA-3'

4) シークエンス反応とサブタイプ解析

Big Dyeターミネーターサイクルシーケンシングキット（アプライドバイオシステムズ）を用いてシーケンシング反応を行い、オートシーケンサーPrism 310（アプライドバイオシステムズ）を用いて塩基配列を決定した。

塩基配列をもとにneighbor-joining法による系統樹をClustal Xにより作成し、サブタイプを決定した。

C. 研究結果

1. HIV検査陽性献血血液のHIV抗体の解析（表1、表2、表3）

HIV抗体陽性献血血液50例についてHIV-1抗体とHIV-2抗体の測定を行った結果、HIV-1PA価は 10^2 倍が3例、 10^3 倍が13例、 10^4 倍以上が34例であった。一方、HIV-2抗体価が32倍以上の検体が5例あり、その力価は

32倍が4例、4096倍が1例であった。

これら5例のHIV-1抗体価が 10^4 倍以上と非常に高いこと、およびPCRの結果から、これら5例のHIV-2PA試薬との反応はHIV-1感染による交差反応であると考えられた。

2. HIV検査陽性献血血液のHIV-1-RNA量の測定(表1, 表4)

HIV検査陽性献血血液52例の血中ウイルスの測定値を表1に示した。

HIV-1-RNAが400コピー/ml以下が1例、400コピー/mlから 10^4 コピー/ml未満が18例、 10^4 から 10^5 コピー/mlが28例、 10^5 コピー/ml以上が5例であった。

3. HIV-1検査陽性検体のサブタイプの解析(表5, 図1)

PCRでHIV-1 env V3領域が増幅され塩基配列が決定できた52例についての系統樹解析の結果を図1に示した。

これら系統樹解析の結果から今回解析した52例は欧米に多く見られるサブタイプB、タイ等の東南アジアに多いA/E、アフリカ等に多いA、Cの4種類に分類された。

また、表5に示したように、サブタイプBが49例(94%)と最も多く、サブタイプA/E、A、Cがそれぞれ1例ずつであった。

D. 考察および結語

HIV抗体陽性の献血血液50例についてHIV-1抗体とHIV-2抗体のPA抗体価の測定を行った結果、全検体がHIV-1抗体陽性で、HIV-1感染例であることが確認された。

HIV検査陽性献血血液52例について血中ウイルス量は、 10^4 コピー/ml以上の比較的血中ウイルス量の高い例が33例(63%)と多く、 10^5 コピー/ml

以上はかなり高い例も5例(10%)あった。

サブタイプ解析の結果、サブタイプBが94%とその大部分を占めており、東南アジアで大流行し、日本でも異性間性行為による感染例に多く見られるサブタイプA/Eは2%と少なかった。

しかし、サブタイプBとA/E以外にもアフリカなどで流行しているサブタイプAとCが1例ずつ検出された。

我々は1992年からHIV陽性の献血血液についてサブタイプ解析を行っているが、サブタイプAの検出は6例目、サブタイプCは初めての検出であった。サブタイプAやC、その他にも少数ではあるがサブタイプD、F、G、A/C等が病院等の医療機関の依頼検体からも検出されている。今後、血液製剤の安全確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2とともにこれら多様なHIV-1サブタイプの存在も考慮していくことが重要である。

E. 研究発表

論文発表

1. Kurbanov F., Kondo M., Mizogami M., Imai M. et al: Human Immunodeficiency Virus In Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res Hum Retroviruses, 19, 731-738 (2003)

学会発表

1. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信: 長期にわたりHIV-1抗体価が低レベルで推移した感染者における血漿中のHIV-1 nef/LTR領域の経時的解析、第17回日本エイズ学会(2003年11月27~29日)

2. 足立拓也、相楽裕子、宇宿秀三、野口有三、近藤真規子、今井光信: 当院における急性HIV感染4症例の臨床的検討、第17回日本エイズ学会(2003年11月27~29日)
3. 嶋貴子、近藤真規子、一色ミユキ、塚田三夫、潮見重毅、今井光信: HIV検査の普及のための試みー保健所検査への即日検査への導入ー、第17回日本エイズ学会(2003年11月27~29日)
4. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信: HIV感染後長期間抗体価が低レベルで推移した感染者におけるHIV-1遺伝子解析、第18回関東甲信静支部ウイルス研究部会(2003年9月25~26日)

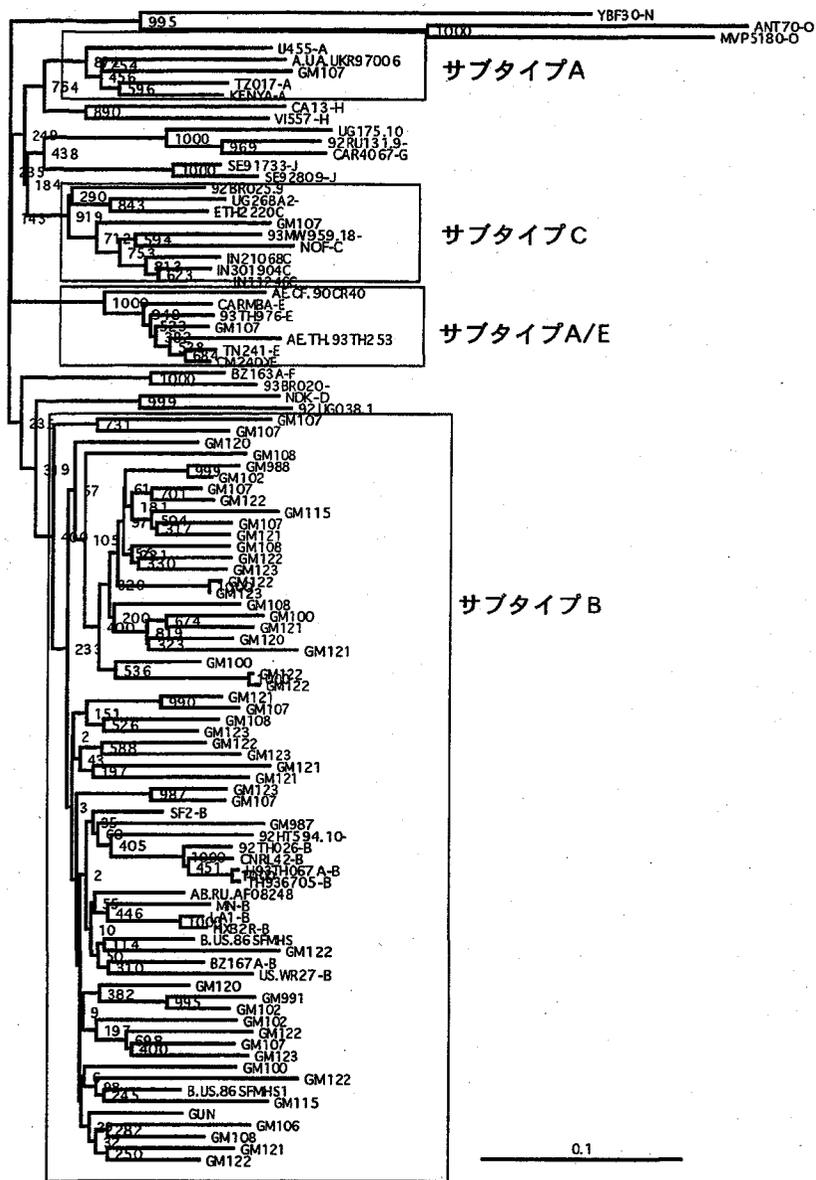


図1 HIV-1 env V3領域系統樹 (neighbour-joining法)
 - 2003年のHIV検査陽性献血血液52例の系統樹 -

表1 日赤HIV検査陽性検体 PA値および血中ウイルス量

検体種別	No.	検査No.	寄附No.	HIV抗体検査 (PA法)			HIV-1RNA (copies/ml)
				ジェネディア HIV1/2 (Titer) ¹⁾	セロディア HIV-1 (Titer) ¹⁾	セロディア HIV-2 (Titer) ²⁾	
HIV抗体陽性 検体	1	Y3-1	GM987	10 ⁴	10 ³	2	16,000
	2	Y3-2	GM988	10 ⁴	10 ⁴	-	4,600
	3	Y3-3	GM991	10 ³	10 ³	-	130,000
	4	Y3-4	GM1006	10 ⁵	10 ⁴	-	12,000
	5	Y3-5	GM1007	10 ²	10 ²	-	17,000
	6	Y3-6	GM1008	10 ³	10 ²	-	1,500
	7	Y3-7	GM1020	10 ⁵	10 ⁵	16	6,100
	8	Y3-8	GM1021	10 ⁴	10 ⁴	32	17,000
	9	Y3-9	GM1022	10 ⁴	10 ⁴	8	6,500
	10	Y3-10	GM1069	10 ⁴	10 ⁴	-	4,700
	11	Y3-11	GM1070	10 ⁵	10 ⁴	-	16,000
	12	Y3-12	GM1071	10 ⁴	10 ⁴	2	1,700
	13	Y3-13	GM1072	≥10 ⁵	≥10 ⁵	2	53,000
	14	Y3-14	GM1073	≥10 ⁵	≥10 ⁵	-	6,700
	15	Y3-15	GM1074	10 ⁵	10 ⁵	16	14,000
	16	Y3-16	GM1075	10 ⁵	10 ⁵	-	18,000
	17	Y3-17	GM1076	10 ⁴	10 ⁴	2	61,000
	18	Y3-18	GM1077	10 ⁵	10 ⁵	32	110
	19	Y3-19	GM1078	10 ⁴	10 ⁴	-	790
	20	Y3-20	GM1079	10 ⁴	10 ⁴	-	80,000
	21	Y3-21	GM1080	10 ⁵	10 ⁴	8	30,000
	22	Y3-22	GM1081	10 ⁴	10 ³	2	160,000
	23	Y3-23	GM1082	10 ⁵	10 ⁵	-	120,000
	24	Y3-24	GM1083	10 ⁴	10 ⁴	32	13,000
	25	Y3-25	GM1084	10 ⁵	10 ⁵	2	10,000
	26	Y3-26	GM1207	10 ⁴	10 ⁴	8	22,000
	27	Y3-27	GM1208	10 ⁵	10 ⁵	2	8,800
	28	Y3-28	GM1209	≥10 ⁵	≥10 ⁵	4	73,000
	29	Y3-30	GM1211	10 ⁴	10 ³	-	2,700
	30	Y3-31	GM1212	≥10 ⁵	≥10 ⁵	16	17,000
	31	Y3-33	GM1215	≥10 ⁵	≥10 ⁵	2	18,000
	32	Y3-34	GM1216	10 ⁵	10 ⁵	32	27,000
	33	Y3-35	GM1217	10 ³	10 ³	2	36,000
	34	Y3-36	GM1218	10 ⁵	10 ⁵	-	32,000
	35	Y3-37	GM1219	≥10 ⁵	≥10 ⁵	4096	4,100
	36	Y3-38	GM1220	10 ³	10 ³	-	42,000
	37	Y3-39	GM1221	10 ³	10 ³	-	1,200
	38	Y3-40	GM1222	10 ³	10 ³	-	29,000
	39	Y3-41	GM1223	10 ⁴	10 ⁵	8	29,000
	40	Y3-42	GM1224	10 ⁴	10 ³	2	42,000
	41	Y3-43	GM1225	10 ⁴	10 ⁴	-	63,000
	42	Y3-44	GM1226	10 ⁴	10 ⁴	16	27,000
	43	Y3-45	GM1227	10 ³	10 ³	-	9,800
	44	Y3-46	GM1228	10 ³	10 ²	-	1,300
	45	Y3-47	GM1229	10 ⁴	10 ³	2	4,600
	46	Y3-48	GM1230	10 ⁴	10 ⁴	2	880
	47	Y3-49	GM1232	10 ⁴	10 ³	-	5,600
	48	Y3-50	GM1233	10 ⁵	≥10 ⁵	8	120,000
	49	Y3-53	GM1236	10 ⁴	10 ⁴	2	33,000
	50	Y3-54	GM1237	10 ⁴	10 ³	2	15,000
HIV-1 NAT 陽性検体	51	Y3-55	GM1155	4	-	-	150,000
	52	Y3-56	GM1156	8	-	-	8,700

* PA値は検体希釈倍数で表示

1) 検体希釈倍数16倍以上を陽性と判定 2) 検体希釈倍数32倍以上を陽性と判定

表2 HIV検査陽性検体50例のPA値の分布

A. ジェネディア HIV-1/2 ミックス PA

PA値	検体数
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	1
$\times 10^3$	8
$\times 10^4$	22
$\geq 10^5$	19
合計	50

B. セロディア HIV-1

PA値	検体数
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	3
$\times 10^3$	13
$\times 10^4$	17
$\geq 10^5$	17
合計	50

表3 セロディア HIV-2 が陽性であった検体のHIV-1/2、HIV-1 PA値

日赤No.	セロディア HIV-2	ジェネディア HIV-1/2	セロディア HIV-1
Y3-8	$\times 32$	$\times 10^4$	$\times 10^4$
Y3-18	$\times 32$	$\times 10^5$	$\times 10^5$
Y3-24	$\times 32$	$\times 10^4$	$\times 10^4$
Y3-34	$\times 32$	$\times 10^5$	$\times 10^5$
Y3-37	$\times 4096$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$

表4 HIV検査陽性検体52例の血中ウイルス量

RNA量 (copies/ml)	検体数
400以下 (標準法、検出限界以下)	1
400~10000未満	18
10000~100000未満	28
100000以上	5
合計	52

表5 献血血液におけるHIV-1検査陽性

検体のサブタイプ(2003年)				
HIV-1サブタイプ (env C2V3)				
合計	B	E	A	C
52	49	1	1	1

要旨

【目的】E型肝炎ウイルス(HEV)はヒトの肝炎の原因ウイルスのひとつで、HEVに感染した動物の加熱不十分な内臓肉等の摂取により感染する人獣共通感染症である。HEVはここ数年、輸血による感染事例が報告されるようになり、血液製剤やヒト由来成分を原料とする医薬品の安全対策としてPCRなどの核酸増幅検査(NAT)によるHEVの高感度検出が重要となっている。NATの実施にはウイルスの標準品や参照パネルを用いた感度と精度の評価が不可欠であるが、HEVは国内外で標準品も参照パネルも作製されていない(現在、標準品は作製中)。そこで、本研究では国内6施設の共同検定により、HEV-NAT試験用国内標準パネルの作製を検討した。

【方法及び成績】HEVは4つの遺伝子型に分類されているが、国内で見られるのは3型又は4型で、4種類のクラスター(G3jp, G3us, G3sp, G4jp)に分類される。HEVパネル候補品として、国内のブタから分離された日本固有の4クラスター株について、実験感染ブタで増幅した4株とその中の1株を培養細胞で増幅したもの計5株からなるパネルを用いた。パネル候補品は分注の均一性と凍結での保存安定性、ウイルスの分散の均一性を確認した後、参加6施設で可能な限り統一した方法でのウイルスゲノム抽出とリアルタイムPCR定量を実施して各パネルのコピー数を求めた。参加施設から得られたデータのうち、ばらつき大きい1施設のデータを除いてパネルのコピー数を以下のように決定した: swJB-P5(G3jp): 5.07 ± 0.35 , swJB-M8(G3us): 5.27 ± 0.39 , swJB-E10(G3sp): 4.80 ± 0.33 , swJB-H7(G4jp): 4.91 ± 0.42 , wJB-E10cul(G3sp): 4.43 ± 0.31 (単位: log copies/ml)。

【結論】HEV-NAT試験用国内標準パネルを樹立した。本パネルは公的パネルとして、今後の公開によりHEVの検査やウイルス安全対策において幅広い活用が期待される。

E型肝炎ウイルス(HEV)について

- ヒトの肝炎の原因ウイルスの一つ
- 非エンベロープRNAウイルス
- 主な感染経路は汚染した水の摂取による経口感染で、日本では発展途上国からの輸入感染症と考えられてきた
- 最近ではブタ、イノシシ、シカ等に感染する人獣共通感染症であることが明らかになってきた
- 国内でもブタなどの生または加熱不十分な内臓肉(レバー等)の摂取により感染し、肝炎を発症する場合がある
- HEVに感染すると急性肝炎を起こし、劇症肝炎で死亡する例もあるが、感染しても発症しない不顕性感染も多いと考えられている
- 輸血によって発症するケースも報告されている
- 血清学的検査ではHEV感染の履歴は分かるがキャリアであるかの判断はできない→NAT法の有用性

HEV参照パネル作成のための共同検定

目的

■ 血液製剤やヒト由来成分を原料とする医薬品の安全対策としてPCRなどの核酸増幅検査(NAT)によるHEVの高感度検出が重要

■ NATの感度・精度・特異性の評価に必要となるHEVの標準品は現在作製中、HEV参照パネルは作製されていないので、共同検定により参照パネルを樹立

共同検定参加施設

- 国立医薬品食品衛生研究所
- 国立感染症研究所
- ㈱ベネシス
- 日本製薬㈱
- 日本赤十字社
- (財)化学及血清療法研究所

共同検定の方法

- 参照パネル候補品
国内のHEVの遺伝子型は3型又は4型で、4種類のクラスター(G3jp, G3us, G3sp, G4jp)に分類される。候補品は㈱ベネシスが国内のブタ糞便よりハンティングした日本固有の4クラスター株¹⁾について、実験感染ブタで増幅した4株とその中の1株を培養細胞で増幅したもの計5株からなる (Table 1, Fig.1-5)。
- 試薬類
 - ・ qRT-PCR用プライマー、プローブ: Fig.6
 - ・ 感度検定用標準RNA: HEVの合成RNA断片 HEV PC RNA(G3jp, G3sp, G4jp用)及びHEV G3us PC RNA (G3us用)
 - ・ ウイルスゲノム抽出: QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)
 - ・ qRT-PCR: QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen)
- 参照パネル候補品について、分注の均一性試験と保存安定性試験を1施設で、ウイルスの分散の均一性試験を2施設で実施 (Table 2-3, Fig.7)
- 参照パネル候補品のコピー数を設定するため、参加6施設で統一プロトコールによりウイルスゲノムを抽出し、qRT-PCR定量を実施してパネルのコピー数を算出。6施設のデータの平均値(ばらつきが多い1施設のデータを除く)よりパネルのコピー数を決定 (Table 4)

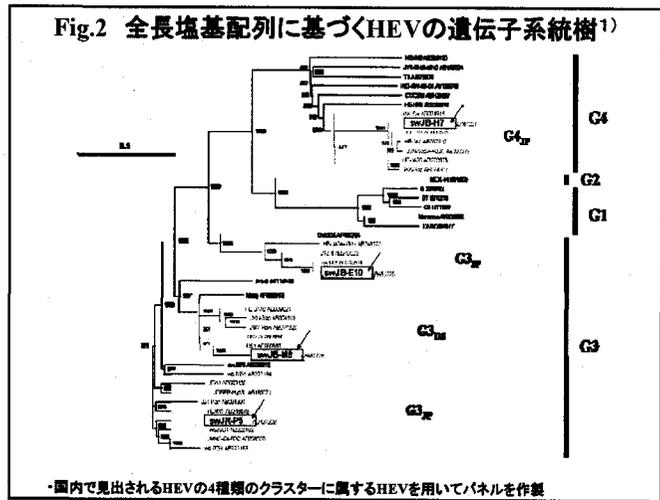
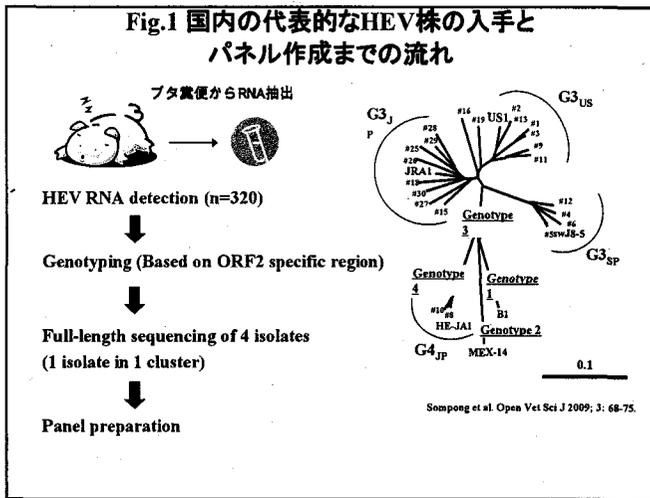
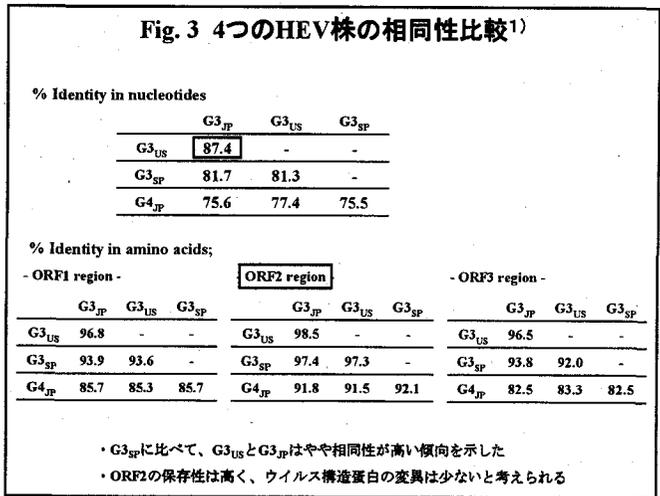


Table 1 HEV参照パネル候補品の内容

パネル名	クラスター	由来	Accession 番号 (塩基配列)	容量
1 HEV swJR-P5	G3jp	実験感染ブタ糞便より精製	AB481229	0.5ml/tube
2 HEV swJB-E10	G3sp	実験感染ブタ糞便より精製	AB481226	0.5ml/tube
3 HEV swJB-E10cui	G3sp	E10感染A549細胞の培養上清	-	0.5ml/tube
4 HEV swJB-M8	G3us	実験感染ブタ糞便より精製	AB481228	0.5ml/tube
5 HEV swJB-H7	G4jp	実験感染ブタ糞便より精製	AB481227	0.5ml/tube
6 Negative control	-	希釈用ヒト血清	-	0.5ml/tube



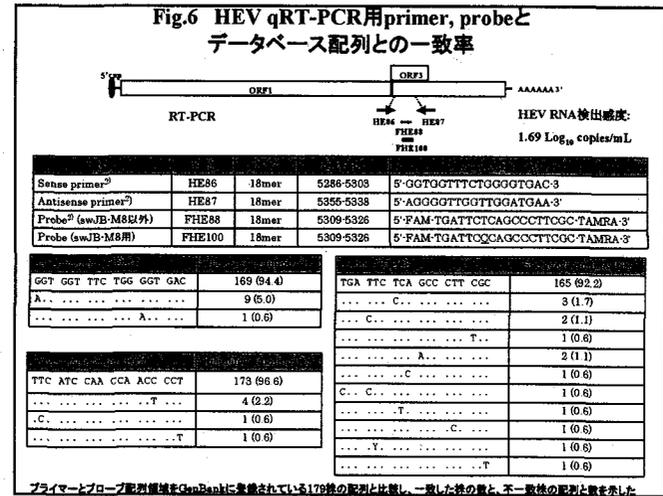
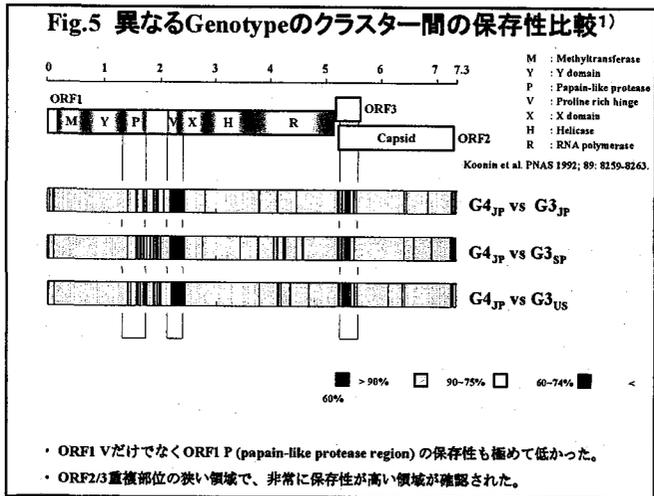
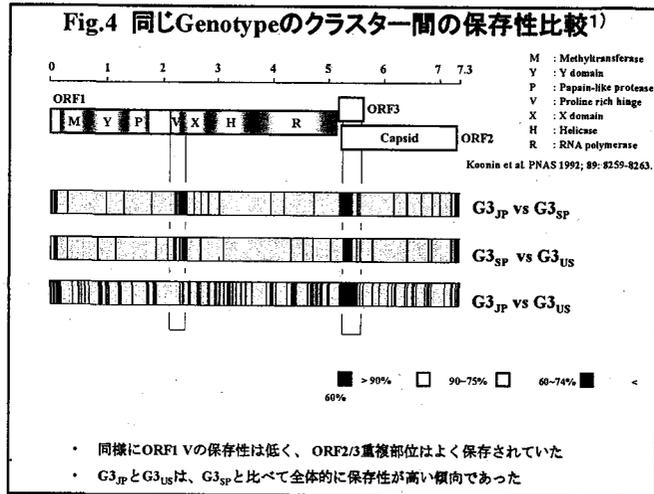


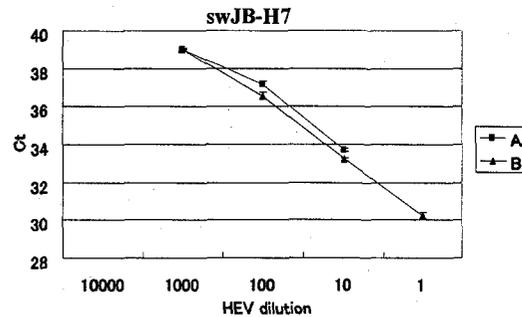
Table 2 HEVパネル候補品の分注の均一性試験

単位: Log₁₀ copies/mL

パネル名	平均±SD (n=5)	最大値	最小値
swJR-P5	5.27±0.16	5.40	5.00
swJB-E10	4.83±0.09	4.97	4.76
swJB-E10cul	4.37±0.04	4.41	4.31
swJB-M8	5.39±0.06	5.47	5.33
swJB-H7	4.83±0.13	4.97	4.62

• パネル候補品が均一に分注されていることを確認

Fig. 7 HEVパネル候補品の分散の均一性試験



A: HEV原液よりRNAを抽出後に10倍希釈液を調製し、qRT-PCRを実施
 B: HEVの10倍希釈液からHEV RNAを抽出し、qRT-PCRを実施

・パネル候補品はウイルスが凝集せず均一に分散していることを確認

Table 4 HEV参照パネルのコピー数の決定

単位: Log₁₀ copies/mL

	パネル名	クラスター	パネルのコピー数*
1	HEV swJR-P5	G3jp	5.07 ± 0.35
2	HEV swJB-E10	G3sp	4.80 ± 0.33
3	HEV swJB-E10cul	G3sp	4.43 ± 0.31
4	HEV swJB-M8	G3us	5.27 ± 0.39
5	HEV swJB-H7	G4jp	4.91 ± 0.42
6	Negative control	-	-

*: 6施設のデータからばらつきが多い1施設のデータを除いた平均値より算出

Table 3 HEVパネル候補品の安定性

パネル名	HEVゲノム濃度 HEV-RNA (Log ₁₀ copies/mL)							
	0ヶ月目 (n=5)	1ヶ月目 (n=2)	8ヶ月目 (n=2)	13ヶ月目 (n=2)	19ヶ月目 (n=2)	25ヶ月目 (n=2)	凍結 融解2回	凍結 融解3回
swJR-P5	5.27±0.16	5.19	5.04	4.86	4.96	4.91	5.23	5.35
swJB-E10	4.83±0.09	4.83	4.62	4.58	4.41	4.31	4.85	4.82
swJB-E10cul	4.37±0.04	4.52	4.22	4.21	4.16	4.41	4.39	4.54
swJB-M8	5.39±0.06	5.40	5.23	5.16	5.09	5.06	5.37	5.33
swJB-H7	4.83±0.13	5.06	4.65	4.63	4.55	4.55	4.88	5.03
Neg.Con	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

保存温度: -80°C

ND: Not detected

・何れのパネルも0ヶ月目の測定値の±1.0 Log₁₀以内であり、-80°Cでの保存安定性及び凍結融解での安定性を確認

結論

- HEVのNAT試験評価用国内参照パネルを樹立した
- 本パネルは公的パネルとして、今後の公開によりHEVの検査やウイルス安全対策において幅広い活用が期待される

参考文献:

1. Urayama T. et al.: Full-length sequences of one genotype 4 and three genotype 3 hepatitis E virus in fecal samples from domestic swine in Japan, *The open veterinary science Journal*, 4, 11 (2010)
2. Jothikumar N. et al.: A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus, *J. Virol. Methods*, 131, 65 (2006)

* HEV参照パネルの分与をご希望の方はご連絡ください*
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
 内田 恵理子 (uchida@nihs.go.jp)

参考資料 4

パルボウイルス B19 コントロールサーベイ関係資料

1. パネルに使用したウイルスの情報

弊社の海外関連会社より、米国で採血されたパルボウイルス B19 (以下 B19) ゲノム陽性のヒト血漿を入手した。入手した血漿の B19 ゲノム濃度を LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit (Roche Diagnostics) により調べ、高レベルの血漿を選択した (F15)。一方 本 Kit で B19 ゲノムが陰性であった血漿が見つかり詳しく調べたところ、genotype 2 の陽性血漿であることが判明した (F27)。Genotype 1 の F15 と genotype 2 の F27 を血清化し、ゲノム濃度を両 genotype の定量が可能な artus parvo B19 TM PCR Kit (QIAGEN) で測定した。F15 は 11.2 Log IU/mL、F27 は 11.0 Log IU/mL であった。本血清を希釈用ヒト血清で 10^5 IU/mL になるよう希釈し、0.5mL ずつ分注して -80°C で保存した。F15 の塩基配列は決定していないが、F27 の塩基配列は決定済みで DDJB/EMBL/GenBank へ登録予定である。B19 陽性血漿は HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA、anti-B19 IgG が陰性で、希釈用ヒト血清は Anti-HIV、Anti-HCV、HBsAg、HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA が陰性で、B19-DNA、Anti-B19 が陰性であることを確認している。本希釈用血清を陰性コントロール検体としてもちいる。

2. プライマー情報

ベネシスでは両 genotype の B19 ゲノム定量を artus parvo B19 TM PCR Kit で行なっている。増幅領域、プライマー配列、プローブ配列は不明で増幅サイズは 76bp である。なお Roche 社の LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit では 2 型株 (F27) をまったく検出できなかった。

3. 感度検定用標品

artus parvo B19 TM PCR Kit に添付されている Quantitation standard ($10 \sim 10^5$ IU/ μL) を用いている。Quantitation standard の領域やサイズは不明である。

4. ベネシス法の感度

2 の方法で 3 の検定用標品を用いた検出感度は 1 IU/reaction である。

5. その他の情報

(1) パネル分注品の均一性試験

各パネル 5 本の B19 ゲノム濃度を調べた (表 1)。最大値と最小値の差は 0.5 Log 未満であった。

表 1. B19 パネル分注品の均一性試験

パネル名	平均±SD	最大値	最小値
F15	4.44±0.16	4.58	4.24
F27	4.19±0.15	4.42	4.06

各パネル分注品 5 本の B19 ゲノム濃度を artus parvo B19 TM PCR Kit により測定した。単位は Log IU/mL で示した。

(2) パネルの保存安定性と凍結融解の影響

-80°C 保存後 2 ヶ月目の B19 ゲノム濃度を N=2 で調べた。同時に凍結融解を 2 回及び 3 回行った場合のゲノム濃度への影響を調べた (表 2)。その結果保存 2 ヶ月目では、F27 でやや高い数値を示した。凍結融解 2 回、3 回処理は B19 ゲノム濃度に著しい影響は及ぼさないものと思われる。

表 2. B19 パネルの保存安定性と凍結融解の影響

パネル名	0 ヶ月	2 ヶ月	凍結融解 2 回	凍結融解 3 回
F15	4.44	4.67	4.54	4.62
F27	4.19	4.70	4.62	4.38

-80°C に保存後、2 ヶ月後のゲノム濃度を N=2 で測定した。同時に凍結融解を 2 回及び 3 回繰り返したサンプルのゲノム濃度を N=2 で測定した。数値は平均値で単位は Log IU/mL で示した。

以上

(ベネシス社より提供されたパルボウイルスパネル)