

NATコントロールサーベイ事業 2019年度 実績報告

事業代表者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

1. 事業の目的

最近の NAT 技術の進歩は目覚ましく、我が国においても 2013-14 年に血漿分画製剤の原料プールと輸血用血液の NAT スクリーニングの試験法がそれぞれ新しいマルチプレックス法に更新された。それを踏まえて、2014 年の薬食発 0730 第 1 号により「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 (以下、NAT ガイドライン)」の改正が行われ、薬食血発 0730 第 2 号により輸血用血液スクリーニングへの個別 NAT 導入に伴う NAT に必要とされる検出限界値の改正が行われた。以降、2016 年度に新しいマルチプレックス法を用いた HBV NAT の検出感度と特異性の実情把握を目的として WHO HBV ジェノタイプ国際参照パネルを用いた第 8 回 NAT コントロールサーベイを、2017-18 年度に HIV-1 NAT の検出感度と特異性の実情把握を目的として WHO HIV-1 サブタイプ国際参照パネルを用いた第 9 回 NAT コントロールサーベイを実施した。

2019 年度は新しいマルチプレックス法を用いた HCV NAT の検出感度と特異性の実情把握を目的として HCV サブタイプ国内参照パネルを用いた第 10 回 NAT コントロールサーベイを、輸血用血液の NAT スクリーニング試験及び HCV 確認試験並びに血漿分画製剤の原料血漿プールの NAT 試験を対象として実施した。

2. 実施内容

1) 参加施設 (表 1)

輸血用血液製剤の NAT 実施施設 8 施設と国内外の血漿分画製剤製造所等の全 5 施設。オブザーバーとして、試薬メーカー 1 施設、研究施設 1 施設。

2) パネルの調製 (表 2)

HCV NAT の検出感度や特異性の評価のための HCV ジェノタイプ国際参照パネルは現在 WHO にて未だ制定されていないため、国内献血を用いて HCV ジェノタイプ国内参照パネル候補品を国立感染症研究所にて作製し、多施設共同研究を実施し候補品の力価を国際標準品に基づいて制定した(別添 1)。

材料として、この新規に制定した HCV ジェノタイプ国内参照パネル、HCV-RNA 国内標準品、市販の HCV ジェノタイプ血漿パネルを用いて評価用のパネルを作製した。陽性検体の希釈には国内献血由来の陰性血漿 (HCV 抗体, HBs 抗原, HIV-1/2 抗体, 3 ウイルスの NAT 全てが陰性) を用いた。原料血漿プールおよび輸血用血液の HCV NAT で必要とされ

る検出限界値の3倍濃度にあたる300 IU/mLに検体を希釈調整した。計15検体をブラインド化したパネルを参加者に送付した。

3) 測定

(1) 輸血用血液製剤のNAT実施施設と研究施設はProcleix Ultrio Elite ABD Assay(グリフォルス株式会社)を用いて測定した。この試験法は個別検体のスクリーニング試験(HBV、HCV、HIV-1の3ウイルスを識別せず検出する)とスクリーニング陽性検体のウイルスを識別するための識別試験とからなっている。参加施設はスクリーニング試験とHCV識別試験の両方の試験法を用いて検体No. 01-15について日を変えて2回測定した。

(2) 血漿分画製剤の原料血漿プールNAT実施施設と試薬メーカーは、コバスTaqScreen MPX v2.0(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用いて測定した。この試験法はHBV、HCV、HIV-1の3ウイルスを検出すると同時に種類を同定する。参加施設は検体No. 01-15について日を変えて2回測定した。

4) 結果

(1) 輸血用血液製剤のNAT(表3)

日本赤十字社ブロック血液センター全8施設において改正後のNATガイドラインに基づいて実施しているNAT試験は、スクリーニング試験法とHCV確認試験法の両方においてHCVに関する精度管理が適切に実施されていた。全施設においてHCV genotype 1a, 1b, 2a, 2a/c, 2b, 3, 4, 5, 6のHCVを検出できることを確認した。陰性対照はすべて陰性と判定された。

(2) 血漿分画製剤の原料血漿プールNAT(表4)

血漿分画製剤の原料血漿プールNAT実施施設全5施設において改正後のNATガイドラインに基づいて実施しているNAT試験は、HCVに関する精度管理が適切に実施されていた。全施設においてHCV genotype 1a, 1b, 2a, 2a/c, 2b, 3, 4, 5, 6のHCVを検出できることを確認した。陰性対照はすべて陰性と判定された。

(3) 研究施設および試薬メーカーにおけるNAT

参加した研究施設および試薬メーカーにて実施されているNAT試験は、HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2a/c, 2b, 3, 4, 5, 6のHCVを全て検出できることを確認した。陰性対照はすべて陰性と判定された。

3. 考察

2019年度に実施したHCVジェノタイプ国内参照パネルを用いた第10回NATコントロールサーベイにて、輸血用血液のNATスクリーニング試験とHCV確認試験、血漿分画製剤の原料血漿プールのNAT試験において、国内献血由来HCV陽性検体(1b, 2a, 2b)を検出できることを確認できた。また市販のパネルを用いて作製したHCV陽性検体(1a, 1b,

2a/c, 2b, 3, 4, 5, 6)も問題なく検出できることを確認した。陰性対照はすべて陰性と判定された。

試験対象施設全 13 施設において、HCV NAT 試験に関する精度管理が適切に実施されていることを確認した。

4. 2020 年度の実施計画

HIV-1 はサブタイプ間の組換え体が存在し、ある地域における流行に重要な役割を果たしている組換え型流行株 [circulating recombinant forms (CRFs)] が複数報告されている。そこで 2020 年度は WHO HIV-1 CRF 国際参照パネルを用いて HIV-1 の新しいマルチプレックス法における HIV NAT の検出感度と特異性の実情把握を目的とした第 11 回 NAT コントロールサーベイの実施を計画している (表 5)。

5. 輸血用血液の NAT スクリーニングの試験法の変更について

輸血用血液の NAT スクリーニングの試験法が 2020 年 8 月より HEV の検出を加えたクワドロプレックス法に更新される予定である。2021 年度は、輸血用血液の NAT スクリーニング実施施設を対象に、新しい試験法におけるウイルス NAT の検出感度と特異性の実情把握を目的とした NAT コントロールサーベイの実施を計画している。

表1 参加施設一覧

日本赤十字社	
北海道ブロック血液センター	
東北ブロック血液センター	
関東甲信越ブロック血液センター	
関東甲信越ブロック血液センター	埼玉製造所
東海北陸ブロック血液センター	
近畿ブロック血液センター	
中四国ブロック血液センター	
九州ブロック血液センター	
	以上 8施設

血漿分画製剤製造所	
一般社団法人	日本血液製剤機構
	KMバイオリジクス株式会社
	日本製薬株式会社
	シャイアー・ジャパン株式会社
	CSLベーリング株式会社
	以上5施設

オブザーバー参加施設	
日本赤十字社	中央血液研究所
	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

表2 HCV genotypeパネル

検体番号	試料	HCV genotype	表示力価 (IU/mL)	濃度 (IU/mL)
01	HCV RNA 国内参照パネル	2a	5.13x10 ⁴	300
02		2b	3.31x10 ⁴	300
03		1b	5.13x10 ⁴	300
04		2b	2.34x10 ⁴	300
05		1b	4.68x10 ⁴	300
06		陰性	-	-
07	SeraCare HCV RNA Genotype Accutrak Qualification Panel (01-08)	1a	1.28x10 ⁵	300
08		1b	1.07x10 ⁵	300
09		2a/c	1.85x10 ⁵	300
10		2b	5.14x10 ⁴	300
11		3	5.73x10 ⁴	300
12		4	1.62x10 ⁴	300
13		5	7.06x10 ⁴	300
14		6	1.79x10 ⁵	300
15	第一次HCV 国内標準品	1b	2.60x10 ⁵	300

日を変えて2回測定

表3 日本赤十字社ブロック血液センターのHCV検出・同定結果

検体番号	試料	HCV genotype	濃度 (IU/mL)	検出施設
01	HCV RNA 国内参照パネル	2a	300	8/8
02		2b	300	8/8
03		1b	300	8/8
04		2b	300	8/8
05		1b	300	8/8
06		陰性	-	0/8
07	SeraCare HCV RNA Genotype Accutrak Qualification Panel (01-08)	1a	300	8/8
08		1b	300	8/8
09		2a/c	300	8/8
10		2b	300	8/8
11		3	300	8/8
12		4	300	8/8
13		5	300	8/8
14		6	300	8/8
15	第一次HCV 国内標準品	1b	300	8/8

表4 血漿分画製剤会社のHCV検出・同定結果

検体番号	試料	HCV genotype	濃度 (IU/mL)	検出施設
01	HCV RNA 国内参照パネル	2a	300	5/5
02		2b	300	5/5
03		1b	300	5/5
04		2b	300	5/5
05		1b	300	5/5
06		陰性	-	0/5
07	SeraCare HCV RNA Genotype Accutrak Qualification Panel (01-08)	1a	300	5/5
08		1b	300	5/5
09		2a/c	300	5/5
10		2b	300	5/5
11		3	300	5/5
12		4	300	5/5
13		5	300	5/5
14		6	300	5/5
15	第一次HCV 国内標準品	1b	300	5/5

表5 HIV-1 CRFパネル (案)

検体番号	試料	Subtype/Group	Estimated IU/ml(log10)	検体濃度 (IU/mL)
01 ~ 11	HIV-1 CRF 第1次国際参照パネル 01-10	Group O	3.37	300
		CRF 11 GJ	3.54	300
		CRF 02 AG	3.43	300
		CRF 01 AE	3.71	300
		CRF01, A, G, J, U	3.74	300
		CRF BG 24	3.74	300
		Subtype J	4.45	300
		Subtype C	3.66	300
		Subtype G	3.78	300
		CDF ADG	3.18	300
	陰性血漿	-	-	-

血液製剤のウイルス核酸増幅検査 (NAT) 用 HCV-RNA 国内参照パネル候補品
力価制定のための多施設共同研究結果

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

池辺 詠美

松岡 佐保子

浜口 功

金沢工業大学 加齢医工学先端技術研究所 山口照英

平素より格別のご高配を賜り、厚く御礼申し上げます。

血液製剤の安全対策として核酸増幅検査 (NAT) によるウイルスの高感度検出は極めて重要ですが、HCV-NAT の感度・精度・特異性の評価のための HCV-RNA 国際参照パネルは現在 WHO にて制定されていないため、この度、国内献血を用いて HCV-RNA 国内参照パネル候補品を作成し、多施設共同研究にてこの候補品の力価を制定する共同研究を実施いたしました。共同測定の結果、下記の通り国際標準品の力価に基づいた国内参照パネルの力価が算出されましたので、表示力価として制定したく、ご参加いただいた各施設にご報告いたします。本結果につきましては、今後、血液事業部会安全技術調査会にて報告し、HCV-RNA 国内参照パネルとしての承認および今後予定される HCV-NAT コントロールサーベイの検体としての使用の承認をいただく予定です。

1. 共同研究参加施設 (6施設)

- ・国立感染症研究所戸山庁舎 (ウイルス二部)
- ・国立感染症研究所村山庁舎 (血液・安全性研究部)
- ・国立医薬品食品衛生研究所
- ・埼玉医科大学病院
- ・アボットジャパン株式会社
- ・ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

参加施設の記載順と報告書の施設 No. とは無関係である。

2. 評価方法

力価の測定については、国立感染症研究所より参加施設に国内参照パネル候補品と HCV-NAT 第 5 次国際標準品 (NIBSC code:14/510, 表示力価 100,000 IU/mL) 及び希釈用 HCV 陰性血漿を送付した。参加施設は直線性の成立する用量範囲で 3 段階の希釈系列を作成し、日常実施している定量 HCV-NAT 法にて日を変えて 3 回測定した。その結果を国立感染症研究所が解析した。

別添 1

HCV サブタイプ系統解析(RT-PCR/ダイレクトシーケンス)、HCV 抗体(CLIA: アーキテクト・HCV)、HCV コア抗原(CLIA: HCV Ag・アボット)については、国立感染症研究所が国内参照パネル候補品を検査会社(LSI メディエンス)に測定依頼した。

3. 結果

国内の6施設が力価測定に参加し、6組の結果が報告された。2施設がコバスTaqMan HCV「オート」v2.0を、2施設がアキュジーンm-HCVを、2施設が In-houseのTaqMan PCR法を用いて測定した。国立感染症研究所が統計解析を行い、測定力価および国際標準品に対する相対力価を算出した(次ページ [HCV国内参照パネル候補品測定解析結果参照](#))。国際標準品に対する相対力価として算出した全施設の国内参照パネルの力価の幾何平均値を表示力価とすることとした(表1)。検体名HCV_06の陰性検体は、全ての施設で力価陰性であった。

表 1 : HCV-RNA 国内参照パネル候補品評価結果

検体名	HCV サブタイプ	HCV抗体		HCVコア抗原 (fmol/L)	表示力価 (Log ₁₀ IU/mL)	95%信頼区間 (Log ₁₀ IU/mL)
		判定	S/CO			
HCV_01	2A	陽性	2.3	47.3	4.71	4.56-4.86
HCV_02	2B	陽性	7.16	31.7	4.52	4.37-4.68
HCV_03	1B	陽性	8.31	57.6	4.71	4.51-4.92
HCV_04	2B	陰性	0.41	20.7	4.37	4.24-4.51
HCV_05	1B	陽性	2.75	59.6	4.67	4.47-4.88
HCV_06	-	-	-	-	-	-

HCV 国内参照パネル候補品測定解析結果

測定法 CT--コバス TaqMan HCV 「オート」 v2.0

AG--アキュジーン m-HCV

LD--In-house TaqMan PCR

HCV 国際標準品および国内参照パネル候補品測定力価

国際標準品測定力価

GCV% 7.3%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.78	4.82	4.80	5.34	4.32	5.18	4.87
95% CI LL	4.74	4.58	4.61	5.11	3.97	4.74	4.60
95% CI UL	4.80	4.92	4.88	5.43	4.47	5.37	5.15

HCV_01 測定力価

GCV% 7.7%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.58	4.39	4.52	5.28	4.29	4.32	4.56
95% CI LL	4.43	4.33	4.39	5.12	4.15	3.62	4.29
95% CI UL	4.64	4.41	4.58	5.34	4.34	4.63	4.83

HCV_02 測定力価

GCV% 7.1%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.33	4.19	4.30	5.09	4.51	4.31	4.46
95% CI LL	4.16	4.08	4.13	4.85	4.36	4.02	4.21
95% CI UL	4.40	4.23	4.37	5.19	4.58	4.44	4.69

HCV_03 測定力価

GCV% 8.1%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.54	4.37	4.49	5.42	4.32	4.57	4.62
95% CI LL	4.49	4.25	4.39	5.20	4.17	4.45	4.32
95% CI UL	4.56	4.42	4.53	5.51	4.38	4.62	4.91

別添 1

HCV_04 測定力価

GCV% 8.8%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.15	4.07	4.13	4.98	3.91	4.00	4.20
95% CI LL	4.06	3.98	3.83	4.87	3.81	3.57	3.92
95% CI UL	4.18	4.10	4.25	5.03	3.94	4.18	4.48

HCV_05 測定力価

GCV% 8.4%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	4.55	4.35	4.52	5.39	4.27	4.51	4.60
95% CI LL	4.38	4.30	4.36	5.35	4.18	4.37	4.30
95% CI UL	4.62	4.36	4.59	5.41	4.30	4.57	4.89

HCV_06 測定力価

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
測定力価	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
95% CI LL	-	-	-	-	-	-	-
95% CI UL	-	-	-	-	-	-	-

別添 1

HCV 国際標準品に対する国内参照パネル候補品相対力価

HCV_01 相対力価

GCV% 4.1%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
相対力価	4.75	4.51	4.76	4.92	4.89	4.45	4.71
95% CI LL	4.51	4.41	3.51	4.68	4.65	3.28	4.56
95% CI UL	4.85	4.55	4.93	5.01	4.99	5.04	4.86

HCV_02 相対力価

GCV% 4.5%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
相対力価	4.46	4.29	4.54	4.75	4.77	4.33	4.52
95% CI LL	4.35	3.99	3.14	4.42	4.40	3.55	4.37
95% CI UL	4.51	4.42	4.73	4.89	4.92	4.69	4.68

HCV_03 相対力価

GCV% 5.7%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
相対力価	4.68	4.46	4.74	5.10	4.92	4.39	4.71
95% CI LL	4.49	4.41	3.45	4.78	4.68	3.78	4.51
95% CI UL	4.76	4.48	4.90	5.24	5.02	4.66	4.92

HCV_04 相対力価

GCV% 4.0%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
相対力価	4.40	4.24	4.30	4.63	4.50	4.16	4.37
95% CI LL	4.19	4.01	2.55	4.28	4.20	3.21	4.24
95% CI UL	4.49	4.33	4.56	4.78	4.63	4.61	4.51

HCV_05 相対力価

GCV% 5.7%

施設 No.	1	2	3	4	5	6	Ave
測定法	CT	AG	CT	LD	AG	LD	
相対力価	4.71	4.44	4.74	5.08	4.77	4.32	4.67
95% CI LL	4.34	4.25	3.20	4.80	4.40	3.93	4.47
95% CI UL	4.87	4.53	4.95	5.19	4.93	4.49	4.88

HCV 国際標準品に対する国内参照パネル候補品相対力価のヒストグラム

