

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 Q&A（案）

Q1. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策)

マルチプレックス NAT を用いる場合の条件設定はどのような留意点がありますか。

A1.

マルチプレックス NAT を用いる場合の条件設定については、例えば、以下の点について留意してください。

- ① マルチプレックス PCR のバリデーションにおいては、複数のプライマーセットを用いるためプライマーダイマーが形成されないように、各プライマーセットの間で 3' -側の相補性を持たないようにするとともに、アニーリング温度の設定や反応温度のコントロール等注意が必要です。特にわずかな温度の差異が反応に大きく影響をすることもであるとされることから、事前に十分な評価を行っておく必要があります。例えば、2種類のターゲットウイルスが共存している場合において、一方のウイルスが非常に高濃度であっても他方のウイルスが十分に検出可能であることを確認しておくことが有用です。
- ② マルチプレックス NAT によるスクリーニングで陽性反応が見られた場合には、どのウイルスが陽性なのか特定をしておくことが必要と考えられます。その場合には、マルチプレックス NAT と同じ各プライマーセットを使用することが望ましいと考えられます。異なるプライマーセットを用いる場合には、同等以上の感度が得られることを示す必要があります。但し、スクリーニング検査で HBV、HCV 及び HIV の 3 種のウイルスを識別して検出することが可能なマルチプレックス NAT においてはその結果をもってウイルスを特定したといえます。

(パブリックコメント番号 1)

Q2. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-1) 適応範囲)

NAT 試験に適合する試験室の交差汚染対策に必要なレイアウトの例示をお願いします。

A2.

実験室の配置については、基本的には、増幅産物を取り扱う施設を下流に、試薬製造等目的遺伝子や増幅産物を取り扱わない部屋を上流に配置することが適当であると考えます。また、空調や廃液等についても同様の考え方に従って配置することが適当です。

閉鎖系の自動抽出装置・自動反応装置を利用する場合においては、試薬と消耗品をセットする（機器の）部分を陽性検体や増幅産物で汚染しないよう必要な対策を講じておく必要があります。また、抽出装置からの排水、使用済み消耗品や増幅装置からの廃棄物がど

の程度交差汚染の原因となりうるのかを十分考慮し、試薬・消耗品及びそれらを装置にセットするために使用するラック等と当該廃棄物とを明確に区別して取り扱うことが求められます。例えば、作業スペースの区別、手袋の交換等の対応が求められます。

(パブリックコメント番号4)

Q3. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-4) 核酸の抽出及び増副産物の検出に関する事項 ①抽出に関わる事項)

「キット内容が変更された場合に変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる」とあるが、具体的には、どのような対策が必要か。

A8.

キットの検出感度や精度に影響を及ぼすようなキット内容の変更がある場合に、キット製造元から使用者にあらかじめ通知を頂くような対応（契約や取り決め）が必要だと考えています。

(パブリックコメント番号6)

Q4. (1. ガイドラインの目的と適用範囲、1-2) 適応範囲)

Dual target PCR とは何か。

A4.

Dual target PCR は、1つのウイルスゲノム中、2つのゲノムの変異が少ない領域に対するプライマー／プローブを設定することにより、片方の領域に変異が起きても、他方の領域をターゲットとしたプライマー／プローブで検出することで、検出漏れをなくすことを目指した方法です。EU で CE 認証を受けた HIV 測定キットで HIV の変異タイプを検出できないことが報告されたことを受け（*）、ドイツのポールエーリッヒ研究所から変異を起こしやすい HIV の NAT による検出では、HIV の遺伝子配列の中の2つの異なる配列をターゲットとした2セットのプライマー／プローブを採用することを提唱しています。

（*）Müller, B, C. Nübling CM, Kress J, et.al, How safe is safe: new human immunodeficiency virus Type 1 variants missed by nucleic acid testing (2013 Transfusion 53, p2422-2430)

(パブリックコメント番号7)

Q5. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-4) 核酸の抽出及び増副産物の検出に関する事項)

「ウイルスゲノムの変異を検出した場合」のプライマー/プローブによる検出能の再評価及びプライマー/プローブの再設計は、キットの製造元に実施する責任があるでしょうか。

A5.

バリデーションで実施する場合には、キット製造元の責務で実施される場合もあると思われませんが、最新のウイルス疫学等の情報についてはキットの使用者（製造販売業者）も十分に情報を収集する必要があり、そのために感染症定期報告を求めているところです。場合によっては、キットの使用者が最新の情報に基づいてキットの改良を要請することも必要と考えます。それはキットの使用者という観点のみならず、安全な血液製剤を供給するという製造販売業者の義務と言えます。

(パブリックコメント番号 8)

Q6. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-6) 検出感度に関する事項)

「例えば、HBV、HCV 及び HIV を対象とした NAT で検出感度が極めて高いウイルスに関しては原則的に 100IU/mL 以下で、かつ再現性良く試験が成立する最小のウイルス標準検体をランコントロールとして設定することも可能である。」とありますが、原則的に 100IU/mL 以下とは、国際標準品が設定されている場合と思われるが、国際標準品が設定されていない場合は、100 分子/mL と同義との理解で正しいか確認したい。

A6.

「原則的に 100IU/mL 以下」は HBV、HCV、HIV に対する検出感度の値を示しています。それ以外のウイルスについては現時点では明確な検出感度の設定はされていないため、今後の課題とさせていただきますが、標準品が設定されているウイルスを対象とする場合には、確立した NAT の性能（検出感度や精度）を恒常的に担保できるように標準品に基づいたランコントロールの設定が必要と考えます。

また、標準品が設定されていない場合は自社で適切な内部標準を確立し、それに基づいてランコントロールを設定した上で、確立した NAT の性能（検出感度や精度）を恒常的に担保できるようことが必要と考えます。なお、IU 単位は National Institute for Biological Standards and Control により国際共同検定の上で規定された単位であり、必ずしも「100IU/mL=100 分子/mL」として扱うことは適切ではありません。

(パブリックコメント番号 12)

Q7. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-6) 検出感度に関する事項)

検出感度の求め方において、100 IU/mL 以下で、かつ再現性良く試験が成立する最少のウイルス標準検体をランコントロールとする場合においても必ず陽性にならなければならないでしょうか。

A7.

原則的に、ランコントロールには、95%検出限界の 3 倍量又は定量限界の試料を用います。もし高感度の検出が可能な場合、ランコントロールの設定も基本的にはこの考え方を適用すべきですが、非常に低濃度のウイルス試料をサンプリングする場合、量が少なければ少ないほどその採取量はばらつきが大きくなると考えられます。そのような点も考慮して、ランコントロールの設定を行う必要があります。

(パブリックコメント番号 13)

Q8. (2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策、2-7) 交差汚染がないことの評価)

交差汚染の評価において、「少なくとも 20 検体をランダムに配置するなど」と記載されているが、この「20 検体」の根拠を説明してほしい。

A9.

血液製剤の NAT ガイドラインとして最初に出された EU の CPMP ガイドラインに記載されていた考え方であり、一定数の陰性血漿と陽性血漿を混合してサンプリングしたときに交差汚染が起きないことを示すためのものであり、統計的な意味はないと考えております。

【参考】 CONTROL AUTHORITY BATCH RELEASE OF BLOOD PRODUCTS 2001 Validation Of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) For The Detection Of Hepatitis C Virus (HCV) RNA In Plasma Pools. Council Directive 89/381/EEC

(平成 25 年度第 1 回 NAT 小委員会での質問)