

## 資料5

血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン(コメント)		
コメント ガイドライン全体へのコメント	理由、根拠、修正案	
改正案はEP、及びICHのガイドラインから逸脱しない内容であることを希望	当社ではNATはEP、及びICHのガイドラインに準拠して行われているため	FDAやEMAのガイドラインとの整合性は取れていると理解していますが、EPやUSPのガイドラインについてはこれまで十分な比較検討を行ってきておりません。
技術の進歩に合わせて内容を見直すことは大切だが、minimum requirementであること		規制的要件については安全技術調査会等での議論に基づいて整備をする必要があると思います。本ガイドラインは技術的要件を中心に記載されるものと理解しております。
海外のNATに関するガイダンスとの整合性を図っておく必要があること。		NATガイドライン作成時にはFDA及びEMEAガイドラインとの整合性は取れていたと考えられます。最新のガイドラインとの比較では、制度の違いに基づくと思われる差異も見られるようですが、本ガイドラインの目的を超えているかどうかの判断をしたいと思います。
注意事項(Q&A)の整備		必要に応じて見直します
個別項目へのコメント		
1. ガイドラインの目的及び適用範囲		
1-1) 目的		
現在は、代表的なウイルスについて国際標準品が設定されていることから、コピー数表記ではなくIUに変更するほうがよい。		全体を通して見直して、IU標記に統一すべき個所はそのようにしたいと思いますが、単にNATの高感度性を説明している個所ではIUと書いても意味が伝わらないと思いますので、その点はご了解ください。
1-2) 適用範囲		
最終製品のウイルス検査は、安全技術調査会で実施しないこととされたことから削除するほうがよい		ご提案のとおり削除します。
HCV, HBV, HIV以外のウイルス検出への適用をどう考えるか：パルボウイルスB19はFDAでもその要件が示されており、検討が必要となるであろう。(FDAの10^4IU/mlに準じるのがよい。) HEVは北海道で限定して試行されており、また各社で受け入れ試験として行われている実態もある。WNVなど将来的に必要かもしれない。		NATガイドラインにHIV、HCV、HBV以外のウイルスについて規制的要件を挿入するには、上の委員会での結論を待つ必要がある。他のウイルスへの適用については、表現を分かりやすくするように変更します。

2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化の方策			
	NATガイドライン中に「試験・検査」という言葉ができてきますが((項目2-1)の最後)、試験と検査の違いがあれば教えてください。		検査はルーチンワークとしてのNATによる「ウイルス試験」を検査していると理解しております。十分に書き分けられているか検討します
	HBVへの適用では、血清学的試験により高タイマーの血漿を排除したうえでNATを適用しないと汚染が起きやすいが、その点についての記載がない。		交差汚染に可能性の言及については、実態に関する調査を含めて判断したい。
	Multiplex PCRに関する記載がないが、記載の必要性も含めて議論が必要。		FDAのガイドラインよりMultiplex PCRに関する記載も整備されており、Multiplex PCRを導入するときの注意点やバリデーションのあり方について記載する方向で検討します
(1)個別NATの実施に当たっての記載が必要か。あまり具体的に書き過ぎても困る可能性あり。 (2)他の方法(TMA法等)の必要性 (3)Taq polymeraseの化学修飾(Hot startなど)への言及		①ミニプールNATにより陽性になった場合、個別NATによりどの検体が陽性であったかを明らかにする必要がある。その場合同一のプライマープローブを用いる必要がある。また個別NATで陰性となった場合の判断を書く必要がある。	MultiPlex PCRで陽性になった場合に個別NATで陽性となったウイルスの同定についても記載したいと思います。他のNATや新たな技術について個別に触れるのは難しいかもしれませんのでQ&A等での対応を検討いたします
2-1)施設・設備の整備等に関する事項			
	2-1)の修正(追記)を希望	NATは数ダース(+)コピーのウイルス遺伝子を検出できることから、増幅産物による汚染などが起きないように十分な配慮をする必要がある。留意事項には作業者の導線や更衣、材料の流れ、エアフローや給気、除染法などが含まれる。最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。開放系では、マスターミックスの調製、資料の処理や抽出、NATによる増幅、及び増幅産物の検出といったNAT試験の各ステップを開放系で行う場合には、原則通りに、試験はそれぞれ異なるエリアや区画で実施する必要がある。(*)1)	自動化機器やキットの使用について言及するようにします。
	2-1)で引用されているようにNATのこの部分の記載について時間も経過しており、最近の市販NATキット等は調整済みで、閉鎖系かつ分注済みのものが利用可能である。試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられており、最近の市販システムを用いる場合には本記載はもはや不要である。この記載は変更する必要がある。	最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。種々の試薬やテストキットを用いるNAT試験をインハウスのシステムを用いて開放系で実施する場合には、ANTが数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できることから、NATによる増幅産物の汚染が起きないように最善の注意を払う必要がある。従って開放系で実施するNATの試験設備はガイドラインに示された条件に適合する必要がある。(*)1)	自動化機器やキットの使用について言及するようにします。
	自動化機器が普及している中で、本文の(*)1)の内容について、例えば「交差汚染の防止等がなされている場合はこの限りではない。」など、本文中に記載し、条件設定した方がよいのではないでしょうか		自動化機器やキットの使用について言及するようにします。
2-2)機器、器具の保全、管理に関する事項			
	NAT検査におけるシステム適合性試験とは、具体的にどうすることをすればよいのでしょうか。		検出の確認(ランコントロール)、検出系の性能(特異性)、再現性が挙げられますが、試験ごとに実施するということではなくバリデーションも含めてのことです。説明を追記するようにします。
2-3)(被験)検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事			
	抽出法やプライマー、プローブ等の市販キットの使用:バリデーション、キットの受け入れ試験、キット変更の場合などの記載が必要ではないか。(USPにはキットの要件が記載されています。)		USPの市販キットの使用に関するGeneral Chapterを参考に案文を作成してみます。

2-4)核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項			
	ウイルスゲノムの変異により検出が出来なくなる可能性について、適切な評価を行うことを記載するべき(HIVのゲノム変異)。	EMAがHIVのゲノム変異により検出が出来ないキットがあることについて注意喚起を行った(シングルターゲットに代えてデュアルターゲットPCRの推奨)	ゲノムの変異が起きている可能性を日ごろから検討することとして、血清試験で陽性になった検体のゲノム解析を行う必要性について言及する案文を提案。また、デュアルターゲットPCRを行う場合に考慮すべき事項についての記載についても案文を提案します。
	Realtime PCR/RT-PCRでの検出の確認に関してカットオフ値の設定に関する記載がない。		用手法での記載と比較して適切に整備したいと思います。カットオフ値の設定など
2-5)試験の最適化と特異性の確認、非特異的反応の除去に関する事項			
	(3) 増幅産物の特異性の確認 「増幅産物が目的としたものであることを2段PCR、制限酵素マッピング、配列解析、増幅産物の分子サイズ、特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションなどにより確認する必要がある」と記載すべきである。		そのように修正します。
	①特異性の確認 ○核酸→ウイルス遺伝子		ウイルス遺伝子に修正します
	③増幅産物が特異的である確認 キットの使用者で、様々なジェノタイプのウイルス入手する場合が困難な場合もあることから、次の文を記載する。 ・ウイルス遺伝子型等に対する検出感度 ○最終行に、「市販キットを使用する場合は、試薬製造メーカーのデータをもって代えることができる。」を追記する。		市販キットの使用に関する考慮事項と共に、どのように記載するかを検討する。
	・NAT検査におけるばらつきは、一般的にどれくらいまでを許容すると考えればよいでしょうか。		一概には言えないのではないかでしょうか。検出限界近くの低濃度のウイルス溶液では、採取サンプル中に含まれるウイルス量は非常にばらつくことが想定されています。一方で、FDAのパルボウイルスの検出限界のように、 $10^4$ IU/mlであればこのような希釈液でのサンプリングによる誤差はそれほど大きいとは考へない
	・定量NAT試験系は、分析法バリデーションに従った方がよいのでしょうか。		ICH Q2A及びICH Q2Bが参考になると考えられるが、全てが適用可能か検討させていただきます。
	陰性パネル:陰性血漿の調達法、現行の記載は十分か?「100検体を試験し、陰性であることを確認」の妥当性(従来の打率の考え方に基づいたものであり、現行のリアルタイムPCRとは考え方方が異なる。)		リアルタイムPCRでの陰性血漿の評価法については再検討させていただきます。上記参照
	凍結乾燥されていないRNAウイルス標準品(社内標準品を含め)の安定性についてどのように考えられるか説明してほしい。	標準品の安定性について、DNAウイルスでは問題が少ないと思われますが、RNAウイルスでは長期保存によりコピー数が低下する傾向があるように思われます。	本文中に記載することが難しい場合にはQ&Aに記載するよう検討します。
2-6)検出感度に関する事項			
	②検出感度の求め方 ・3回以上の独立した試験の実施 ○最終行に、「自動化機器の場合は、製造メーカーのデータをもって代えることができる。」		追記するようにします。
	NATガイドラインに記載されている、n数に関する制定当時の考え方(根拠)を明示してほしい(例:頑健性のn=20、95%感度の3倍など)。		n数の根拠を明確に答えることは難しいと思いますが、海外の規制当局のガイドラインも参考にした値です。

	検出限界の解析のための標準品の希釈法：希釈には陰性血漿を用いるべき。		PBS等で希釈系列を作製すると、実サンプルとの抽出効率等の齟齬が出来る可能性を記載したいと思います。
	バリデーションのための標準品や参照パネル；標準品、自社標準物質の記載について ①国際標準品、②国際標準品で校正された国内標準品 ③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質等(参照品)		国内標準品は、IU単位で表示されている場合には国際標準品に対して校正されています。自社標準物質の作製について追記する必要があるか議論を行いたいと思います。ご指摘部分は修正するようにします。
	ランコントロールについて、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスが必ず陽性になることを求めているが、HBVの検出感度はすでに数IUと非常に高感度であり、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスを設定することが困難である。ランコントロールの設定について適切な記載にしていただきたい。	NAT法の技術革新が進み、高感度になつたために非常に低濃度のランコントロールの調製が難しくなっている。	低濃度のランコントロールが必要な場合の設定について言及するようになります。

2-7)判定基準の設定に関する事項			
	再試験の基準に関する記載が必要。		FDAガイドラインの記載を参考に記載案を提案させていただきます。
2-8)従事者の技術の標準化と向上に関する事項			
2-9)汚染防止に関する事項			
	汚染防止対策は、最新の市販されている閉鎖系システムを用いないで、インハウスの開放系を用いる場合に適用すべきである。		上記のコスツド同様、廻り込み排気系での対応をとる場合には、ここで書かれているような部屋の区別は不要とする記載を追記したいと思います。
3. 試験、検出結果の意義づけ			
3-1)「陽性」と判定した結果の意			
3-2)「陰性」と判定した結果の意			
3-3)必要とされる検出限界値(*8)について			
4. 新技術の導入に関する事項			
【用語集】			
注意事項			
その他	本活動のスケジュール(3年間)を教えていただけますでしょうか (大まかなものでかまいません)。		具体的なスケジュールについてはNAT小委員会のスケジュールもあり、見通しについては少し待っていただきたい。