

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の改正案に関する意見募集に寄せられたご意見とそれに対する考え方(案)

○ 意見募集期間 平成26年1月22日～平成26年2月19日

○ 提出意見者数 4名

番号	ご意見の分類	ご意見	ご意見に対する考え方(案)
1 (QA1)	2 前文 (p2) 最後の段落	<p>「一方、一のNATの反応系で複数のプライマー/プローブを同時に使用することにより、複数のウイルスや遺伝子構造の大きく異なる複数のジェノタイプを同時に検出するマルチプレックスNATが実施されることも多い。マルチプレックスNATでは、複数のプライマー/プローブを使用することから温度やプライマー濃度などの増幅条件の最適化や非特異反応防止のための条件設定が煩雑とされている。この場合、個々のウイルスやジェノタイプごとに検出感度等のバリデーションが十分になされている必要がある。また、対象とする検体に複数のウイルスが存在する場合、NATの増幅反応でdNTPの取り込みの競合が起きる可能性があり、目的とするウイルス全てに対して十分な検出力を持つかについても検討を行うこと。</p> <p>また、マルチプレックスNATで陽性反応が出た場合のウイルス種確認のための試験法を規定しておく必要がある。」に関するご意見。</p> <p>新規に追記されたものであり、最近の技術を考慮した改訂とされている。一方で、記載内容が広範であり、汎用表記であるため、具体的な事例の例示を補足として追加することを検討願いたい。</p>	<p>マルチプレックスNATを用いる場合の条件設定に関する留意点として、例えば以下があります。</p> <p>① マルチプレックスPCRのバリデーション: 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形成への配慮として各プライマーセットのあいだで3'-側の相補性を持たないようにすること、アニーリング温度の設定や、反応温度のコントロールなどに対して注意が必要です。特に温度の微妙な差異が反応に大きく影響をすることもあるとされるため、十分な評価を行う必要があります。例えば、2種類のターゲットウイルスが共存する場合において、一方のウイルスが非常に高濃度であっても、他方のウイルスの検出能力が十分であることを確認しておくことが有用です。</p> <p>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HIV、HBV及びHCV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。</p>
2	2 前文 (p2) 最後の段落、 下から4行目	<p>マルチプレックスNATについて、「個々のウイルスやジェノタイプごとに検出感度等のバリデーションが十分になされている必要がある。」と記載されていますが、キットの製造元により実施されたバリデーションでも差支えないでしょうか。</p>	<p>バリデーションデータはキット製造元で得られたデータの利用が可能と考えられますが、使用者は使用する機器等も含めてその性能が担保されていることを確認しておく必要があります。</p> <p>ただし、上記の説明の通り、マルチプレックスNATでは温度の微妙な差異により検出感度が影響を受けることがあり、使用者は感度を試験により確認しておく必要があります。</p>
3	2 2-1) 「施設設備の整備等に関する事項」(p3) 第2段落の3～5行目	<p>「このようなキット製品と閉鎖系のウイルス遺伝子の自動抽出装置や自動反応装置を利用してNATを行う場合には、上記のような独立した施設・設備を必ずしも使用する必要はない。」に対するご意見。</p> <p>技術の標準化のために、公的機関で採用されている装置の例示をお願いしたい。</p>	<p>公的機関での装置等は多くの場合市販品であり、特別な要件を求めているわけではありません。公的機関は特定のウイルス検査を目的とした機関ではありませんので、必ずしも自動抽出装置や自動反応装置を利用しているわけではありません。</p>
4 (QA2)	2 2-1) 「施設設備の整備等に関する事項」(p3) 第2段落の6～8行目	<p>「但し、このような自動反応装置を使う場合であっても機器からの廃液等による汚染についても十分考慮すること。特に複数の機器を同時に使用している場合、機器間の交差汚染に対して十分な対策をとっておくことが求められる。」に対するご意見。</p> <p>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たい。</p>	<p>基本的には増幅産物を取り扱う施設を下流に置いた流れになり、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持つことになると考えます。また、空調や廃液等についても同様の考え方となると考えます。</p> <p>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も、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や使用済み消耗品、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上述の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。</p>
5	2 2-1) 「施設設備の整備等に関する事項」(p3) 第2段落	<p>「一方、NATに用いる緩衝液、酵素、プライマー/プローブ等をあらかじめ混合した調製済み試液を使用されることや、さらにその試液を反応容器に充填してキット化した製品が利用されることが多くなっている。このようなキット製品と閉鎖系のウイルス遺伝子の自動抽出装置や自動反応装置を利用してNATを行う場合には、上記のような独立した施設・設備を必ずしも使用する必要はない。但し、このような自動反応装置を使う場合であっても機器からの廃液等による汚染についても十分考慮すること。特に複数の機器を同時に使用している場合、機器間の交差汚染に対して十分な対策をとっておくことが求められる。」に対するご意見。</p> <p>新規に追記されたものであり、最近の技術を考慮した改訂とされている。一方で、記載内容が広範であり、汎用表記であるため、具体的な事例の例示を補足として追加することを検討願いたい。</p> <p>「独立した施設・設備」がどのようなものを指すか、不明瞭であるため、具体的な例示をお願いしたい。たとえば、空調を含む独立した設備であるのか、動線や気流方向まで考慮したものであるか、例示をお願いしたい。</p>	<p>使用する目的に応じて動線や気流方向等も考慮する必要がありますが、基本的には試薬調製、ゲノム抽出や反応液の調製、増幅反応、解析によって区別されます。キット化された製品を用いる場合には、試薬調製の施設は不要となると想定され、またリアルタイムPCRでは解析のための施設は不要となると想定される。</p>

番号	ご意見の分類	ご意見	ご意見に対する考え方(案)
6	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(p4)	「また、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。」に対するご意見。  どのような対策が必要となるか、具体的な事例の例示を補足として追加することを検討願いたい。メーカーとの契約を想定しているとの理解で正しいか確認したい。	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、使用者にあらかじめ通知をいただくような対応(契約や取り決め)を想定しております。
7	2 2-4) (QA3) 「核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項」 ②プライマー及びプローブに関する事項(p5)  第2段落 4行目	「また、必要に応じてプライマー/プローブの再設計を考慮すること。例えば複数の遺伝子配列をターゲットとするDual target PCRなども考慮すること。」に対するご意見。  Dual target PCRは、ハウスキーピング遺伝子と測定対象遺伝子を指すとの理解で正しいか確認したい。また、ハウスキーピング遺伝子をどのように設定するか、例示をお願いしたい。	Dual target PCRは、1つのウイルスゲノム中、2箇所によく保存された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、1つの領域に変異が起きても、もうひとつ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。 ご指摘のハウスキーピング遺伝子は、通常、目的検体の反応が成立していることを示すために添加されているインターナルコントロールの遺伝子を指しています。 ハウスキーピング遺伝子の意味が単にウイルスサブタイプやジェノタイプで共通して保存されている配列という意味で使われているのであればその通りです。 (* ) Müller,B, C. Nübling CM, Kress J, et.al. How safe is safe: new human immunodeficiency virus Type 1variants missed by nucleic acid testing (2013 Transfusion 53, p2422-2430)
8	2 2-4) (QA4) 「核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項」 ②プライマー及びプローブに関する事項(p5)  第2段落 2行目	「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。	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として実施す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血液製剤製造販売業者としての使用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、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。
9	2 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(p6)	「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、塩基配列解析、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等により確認する必要がある。」に対するご意見。  複数の手法が提示されているが、いずれか1つ以上の方法で示すことで十分であるか、あるいは2つ以上の異なる手法を用いて示すことが必要となるか、具体例の提示をお願いしたい。	からならずも複数の手法と用いて実証する必要はないと思われるが、目的の分子サイズだけでは不十分な場合も想定され、必要に応じて複数の手法を組み合わせたことが求められる。
10	2 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(p6)	「増幅産物が目的としたものであること」を確認する責任は、キットの製造元にあるでしょうか。	バリデーションで実施する場合には、キット製造元がその責務として実施されている場合もあると思われませんが、そのキットを使用して検出されるシグナルが目的のシグナルであることを確認することは、適宜製造販売業者も実施すべきものと考えられます。
11	2 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(p7)	市販のキットを使用する場合、「プライマー等が非特異的な反応を示さないこと」を評価し、「カットオフ値の妥当性」を示すのは、キットの製造元と使用者のどちらでしょうか。	キット製造元が示すデータを利用することも可能ですが、キットの性能は適宜使用者が確認する必要はあると考えます。
12	2 2-6) (QA5) 「検出感度に関する事項」 ②検出感度の求め方(p8)	「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。」に対するご意見。 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。	「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の設定した上で、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。
13	2 2-6) (QA6) 「検出感度に関する事項」 ②検出感度の求め方(p8)	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いといけないでしょうか。	原則的に、ランコントロールは95%検出限界の3倍量ないしは定量限界の試料をもちいます。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るべきですが、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。

番号	ご意見の分類	ご意見	ご意見に対する考え方(案)
14	2 2-8) 「判定基準の設定に関する事項」 ②再試験を行う時の基準及び判定基準の文書化(p9) 1行目	「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。例えばミニプールで陽性反応を検出したにもかかわらず個別検体では全て陰性であった場合の対応について明確にしておくこと。」に対するご意見。  試験中の交叉汚染などを含むフォールスポジティブの場合を想定した例示との理解で正しいか確認したい。	その理解で結構です。 例えばミニプールと異なり個別NATで陰性となった場合に、フォールスポジティブとの判定をする際の基準をあらかじめ決めておくことを指しております。例えばミニプールについて再試験を行うのか、その必要はないのか等について明確にしておく必要があるということです。
15	2 2-8) 「判定基準の設定に関する事項」 ②再試験を行う時の基準及び判定基準の文書化(p9) 2行目	「ミニプールで陽性反応を検出したにもかかわらず個別検体では全て陰性となった場合の対応」について、事例があればお示し頂けますでしょうか。	事例としてお示しするのは困難ですが、FDAのガイドライン(*)にも類似の記載がされております。 * Guidance for Industry Nucleic Acid Testing (NAT) for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Hepatitis C Virus (HCV): Testing, Product Disposition, and Donor Deferral and Reentry. FDA, 2010
16	注意事項 * 2 (p13)	本ガイドラインは、初版において自家開発したアッセイ系の使用をイメージして作られていたものを、市販のNATスクリーニング用キットが普及した現状に合わせて一部を改訂しており、評価されるべきものと思いますが、以下の点で課題が残ると考えられます。 市販のNATスクリーニング専用キットの場合、知的財産等の関係で開発データやプライマー配列、アッセイ系のデザイン等についての詳細情報については開示されない場合が多いため、キットユーザーは知ることができない状況にあります。一方で、NATスクリーニング専用試薬は、病態の診断に使用されるものでないといった背景から、国内では診断薬として承認されることはありません。また、診断薬として承認がなされた試薬であっても、プライマー配列やアッセイデザイン等の情報については国内の承認書に記載されることはありません。したがって、NATスクリーニング専用試薬のユーザーは本ガイドラインで求められているアッセイに関する種々の情報について、直接的あるいは間接的に提示することができない状況にあります。 上記のような背景から、注意事項 * 2にある「ドラッグマスターファイルに準じた取り扱い」が実施できるような体制の整備が、本ガイドラインに実効性を持たせるためには急務であると考えます。	市販キット製造業者とのあいだでキットの変更や性能についての重要な情報について製造販売業者と共有できるような契約等は必要と考えられますが、ご提示いただいた内容については、今後の検討課題とさせていただきます。
17	注意事項 ※7 (p14)	文中前段における記載(プール前原料血漿での各ウイルスの検出感度は、血漿分画製剤に用いる原料血漿には適用対象外という理解で良いか。	その理解で結構です。本記載は平成23年2月1日付け薬食血発第0201第1号「輸血用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)に必要とされる検出限界値について」の内容を反映したものになります。
18	注意事項 ※7 (p14)	血漿分画製剤についても、プール前の原料血漿の検出感度は有効でしょうか。(血漿分画製剤では、プール後の原料血漿に対してもNATの検出限界が規定されているため。)	その理解で結構です。本記載は平成23年2月1日付け薬食血発第0201第1号「輸血用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)に必要とされる検出限界値について」の内容を反映したものになります。