

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関する留意点として、例えば以下があります。

- 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。
- 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 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。

(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.

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ってくることになると思います。また、空調や廃液等についても同様の考え方となると思います。

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。

(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)

Dual target PCR の対象遺伝子とは何でしょうか。

A3.

Dual target PCR は、1つのウイルスゲノム中、2箇所が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。

（*）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)

Q4. (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。

A4.

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される場合もあると思われていますが、最新のウイルス疫学等の情報については製造販売業者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。

(パブリックコメント番号 8)

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、2-6) 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ませんが、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でしょうか。

A5.

「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。

(パブリックコメント番号 12)

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)

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いでしょうか。

A6.

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。

(パブリックコメント番号 13)

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、2-7) 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」と記載されていますが、この「20 本検体」の根拠を説明してください。

A7.

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す。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)