

血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会

平成 26 年 3 月 19 日
国立感染症研究所
血液・安全性研究部

パルボウイルスB19 DNA 国内標準品候補品の評価

1. 経緯

パルボウイルスB19感染症は通常は軽微な自然治癒傾向の強い疾患であり、成人の約半数が抗体陽性である。しかし、妊婦の感染では自然流産や胎児水腫の発生率が高く、貧血や免疫不全症等の基礎疾患のある患者では重症化する傾向にあることが知られている。輸血による感染のリスクを減らすために、日本赤十字社は献血血液の抗原スクリーニングを実施して抗原量の多い血液を排除している。また、パルボウイルスB19-DNA国際標準品の制定後（2000年）、欧米諸国やわが国において血漿分画製剤の原料血漿のNATを実施してウイルスDNA量の多い血漿を排除し、血漿分画製剤による感染のリスクを減らす努力がなされている。平成 24 年度第 1 回血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会において、血漿分画製剤の原血漿等で実施しているパルボウイルスB19-NAT検査の精度管理のための国内標準品を作成することが決まった。この決定に基づいて国立感染症研究所は、パルボウイルスB19-DNA国内標準品候補品を製造し、国際標準品に基づいて候補品の力価を決定するとともに国内標準品としての適性を検討することを目的として国内外10施設が参加する共同研究を実施した。

2. 参加施設

3 カ国、10 施設（国内 8、ヨーロッパ 2）*が参加し、全施設が結果を報告した。

- *：一般財団法人化学及血清療法研究所
- 一般社団法人日本血液製剤機構 千歳工場
- 一般社団法人日本血液製剤機構 中央研究所
- 日本製薬株式会社 成田工場
- 日本赤十字社 血液事業本部中央血液研究所
- バクスター株式会社
- ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

CSL ベーリング株式会社
国立医薬品食品衛生研究所
国立感染症研究所

上記の参加者の記載順と報告書及び関連資料中の施設コード番号とは無関係である。

3. 候補品の製造

献血由来の3つのパルボウイルス B19（以下、B19V）陽性血漿（IgG 抗体陰性、IgM 抗体陰性、遺伝子型 1）の B19V-DNA 量を国際標準品に基づいて定量し、高濃度の血漿 No.458 を候補品の原料血漿とした。原料血漿の希釈には B19V-DNA 陰性、IgG 抗体陽性、IgM 抗体陰性の脱クリオプール血漿を使用した。血漿 No.458 を希釈用血漿で約 10^6 IU/mL に希釈、0.5mL/3mL-ガラスバイアルに分注、 -80°C で凍結し、候補品 1,363 本を製造した。B19V 陽性血漿と希釈用血漿（全て HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性、HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性）は輸血に適さない献血血液として日本赤十字社から譲渡を受けた。

4. 試料

（サンプル S）パルボウイルス B19 DNA 第二次国際標準品（99/802）、力価 10^6 IU/mL
（サンプル C）国内標準品候補品

5. 力価の測定

参加施設は4回測定分（予備1回分を含む）の試料を受け取り、日を替えて3回測定を行った。試験毎に新たに試料を融解、陰性血漿を用いて3段階の10倍希釈列を調製し、各参加施設が日常実施している定量試験法で測定した。国立感染症研究所が結果の統計解析を行った。

6. 結果

10施設から10組の結果が得られた。4種類の定量試験法が測定に使用された。8施設が Real-time PCR 法に基づく市販の試験法で、2施設が Candotti *et al.* (2004)のプライマーとプローブを用いた TaqMan PCR 法で測定した（表1）。国際標準品（サンプル S）及び候補品（サンプル C）の力価はほとんどの施設でよく一致していたが、施設7ではいずれの試料においても他施設とのあいだに乖離が認められた（図 1-A、1-B）。一方、候補品の力価を国際標準品に対する相対力価として平行性定量法により算出すると、施設7を含む全施設で非常

によく一致した結果が得られた (図 1-C)。候補品の力価測定における施設間変動は、共通の標準品を用いない算出 (GCV=68.5%) と比較し、国際標準品に対する相対力価として算出 (GCV=11.9%) することによって明らかに小さくなった。また、特定の測定法による偏りは見られなかった。国際標準品に対する相対力価として算出した全施設の候補品の力価の幾何平均から、候補品の力価は $6.04 \log_{10}\text{IU/mL}$ (95%信頼区間 $6.01\text{-}6.08 \log_{10}\text{IU/mL}$)、すなわち、 $1,100,000 \text{ IU/mL}$ (95%信頼区間 $1,010,000\sim 1,200,000 \text{ IU/mL}$) と評価された (表 2)。

7. 考察

共通の標準品を用いない場合、施設 7 の結果はいずれの試料においても他施設に比較して有意に低い結果を示したが、候補品の力価を国際標準品に対する相対力価として算出すると施設 7 の力価は他の施設と同様に非常によく一致した。この原因として施設 7 が測定に用いたキット添付の定量用標準品の力価設定が考えられる。本研究の結果は、パルボウイルス B19-NAT 検査の精度管理における国際標準品や国内標準品の有用性を示している。また、それらの二次標準品等を作製する際の力価決定には平行線定量法が有用である。

8. 結論

本共同研究によって次の通り、国内標準品候補品を作製した。本候補品をパルボウイルス B19 DNA 国内標準品として制定することを提案する。

原料と性状	Parvovirus B19 (Genotype 1) Parvovirus B19 DNA 陰性、IgG 抗体陽性、IgM 抗体陰性、HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性、HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性の脱クリオプール血漿で希釈、0.5mL/3mL-ガラス瓶に分注した-80°C 凍結品
表示力価	1,100,000 IU/mL
用法	用時融解
貯法	-80°C
制定	2014(平成 26) 年
製造本数	1,363 本
保管・交付	国立感染症研究所

9. 表示ラベル

Parvovirus B19 DNA国内標準品(第一世代)

ロット番号 1/2012

容量 0.5mL、貯法 -80℃

感染性物質. 研究用の使用に限る.

人体に投与しないこと.

国立感染症研究所

10. 添付資料

「パルボウイルス B19-DNA 国内標準品作製のための共同研究の実施要綱」

11.

本共同研究は厚生労働科学研究費補助金レギュラトリーサイエンス総合研究事業「赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の開発と不活化評価法の開発」研究班(研究代表者 岡田 義昭)の助成によって行った。

表 1

Assay methods and codes (Quantitative methods)

Sample extraction methods	NAT methods	Quantification standards	Assay codes	No. of data sets
Cobas TaqScreen DPX test (cobas s 201 system)	Cobas TaqScreen DPX test	B19 QS (lambda bacteriophage)	CTS	5
QIASymphony virus/Pathogen Mini Kit or QIAamp Viral RNA Mini Kit	Artus Parvo B19 LC/RG PCR kit	DNA extracted from B19 positive plasma or standard included in the kit	ART	2
SMI-TEST EX-R&D	Laboratory-developed real-time PCR (TaqMan)	DNA extracted from B19 positive plasma or PCR fragment	LD	2
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	LighCycler Parvovirus B19 Quantification Kit	Plasmid DNA	LC	1

表 2

**Overall mean estimate and inter-laboratory variation
for potency of sample C relative to the 2nd
International standard for B19V, 09/802 (sample S)**

Sample	No. of data sets	Mean*	Max	Min	SD	GCV%
C	10	6.04	6.13	5.97	0.05	11.9

Potency of the candidate for national standard is 6.04 Log₁₀ IU/mL.

1,100,000 IU/mL (95% CI: 1,010,000~1,200,000 IU/mL)

図 1

Results of participants-quantitative data and relative potencies

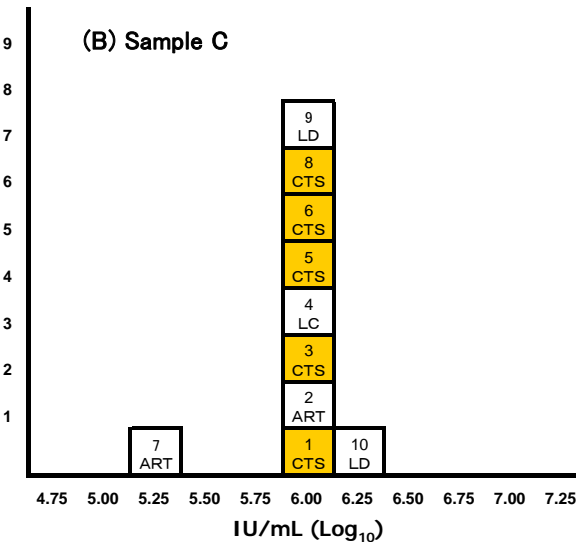
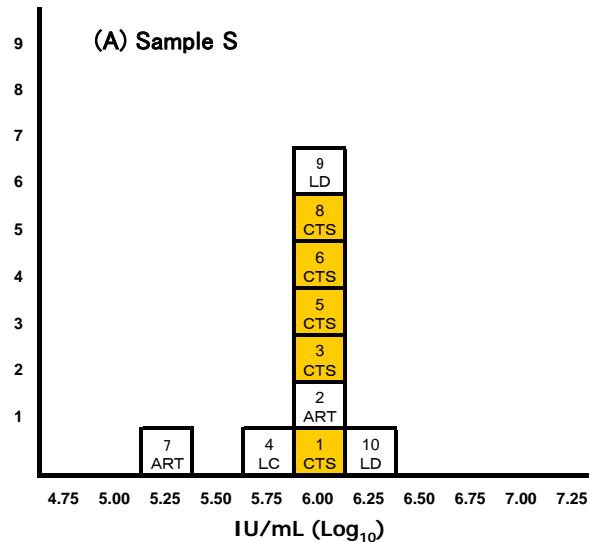
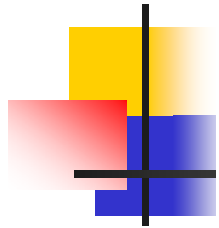
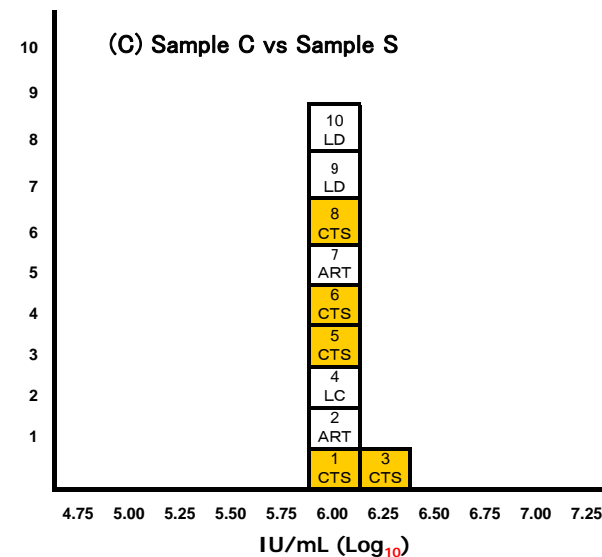


図 1 (A)サンプルS（国際標準品）、(B)サンプルC（候補品）の各施設の力価。各施設の力価は、測定毎の力価を3段階希釈の各測定値に希釈倍率を乗じて得た3用量の値の幾何平均値として算出した後に、3回分の幾何平均値として求めた。(C)各施設のサンプルC（候補品）の国際標準品に対する力価。各施設の力価は、測定毎の国際標準品に対する相対力価を平行線定量法によって算出し、3回分の幾何平均値として求めた。試験法コードは表1参照。■: CTS



平成25年9月10日

共同研究参加者 各位

厚生労働科学研究費補助金

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化
法の開発と不活化評価法の開発」研究班

研究代表者 岡田 義昭

パルボウイルス B19-DNA 国内標準品作製のための共同研究の実施要綱

1. 目的

力価を国際単位で表示した第1次パルボウイルス B19-DNA 国内標準品の作製を目指して、国内標準品候補品の力価を第2次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品 (99/802) に基づいて測定し、国際単位表示の力価を決定する。

2. 参加施設

国立感染症研究所 (担当: 血液・安全性研究部) と国内で販売している血漿分画製剤を製造している国内外の製造業者等及び B19-NAT の標準化に関する専門家。

3. 試料

試料を受け取ったら直ちに -80°C に保管する。

試料 S: 第2次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品 (99/802)、力価 1,000,000 IU/mL、分注量 0.5mL/vial の凍結乾燥品 (2本)。

【事前調製】国際標準品 2本を室温に戻し、内容物が全てバイアルの下半分にあることを確認してから開封する。注射用水 0.5mL に溶解し、室温で混和しながら 20分以上置く。溶解した国際標準品 2本をプールした後、エッペンドルフ試験管等に4等分に小分けし、 -80°C で凍結保存する。小分けした国際標準品は用時融解する。

試料 C: パルボウイルス B19-DNA 国内候補品。パルボウイルス B19 genotype 1 陽性血漿*を B19V-DNA 陰性の脱クリオ又はそれと同等のプール血漿**で力価約 1,000,000 IU/mL に希釈、0.5mL/vial に分注、 -80°C で凍結したもの (5本: 本試験用3本、予備2本)。室温で融解、混和する。

陽性血漿*: B19-DNA 陽性、B19-IgM 陰性、B19-IgG 陰性、

HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性

HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性

陰性プール血漿**: B19-DNA 陰性、B19-IgM 陰性、B19-IgG 陽性、

HBV-DNA 陰性、HCV-RNA 陰性、HIV-1-RNA 陰性

HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/2 抗体陰性

4. 力価の測定

試験法：力価の測定は、各施設が日常実施している定量法で行う。測定は日を替えて3回実施する。原則として多重測定は行わない。日常の試験で多重測定を実施している施設においては多重測定を行っても良い。その場合には、全ての測定値を報告書に記入すること。

検体：測定毎に新たに融解した試料S（小分け）と試料Cを使用する。

試料の希釈：各施設において定量性が確認されている範囲内で試料Sと試料Cをそれぞれ10倍段階希釈した3濃度（可能であれば原液、 10^{-1} 、 10^{-2} ）を測定する。検体の希釈に使用するB19V-DNA陰性人血漿は各参加施設が用意する。

希釈率は各施設の抽出に必要な容量を考慮して変更してよいが、試料Sと試料Cの希釈率を揃えること。

例1) コバス TaqScreen DPX： 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}

例2) 1回の抽出に血漿0.1mLが必要な場合：原液、 10^{-1} 、 10^{-2}

例3) 1回の抽出に血漿0.3mLが必要な場合： 0.5 、 0.5×10^{-1} 、 0.5×10^{-2}

5. 結果の報告

1) 添付の結果報告書（別紙）に記入したエクセルファイルをメールで提出する

2) 結果報告書のプリントアウトに可能な限り生データを添付して郵送する。

3) 期日：平成25年10月31日木曜日

4) 提出先：文末の連絡先

*【記入上の注意】各測定系のキャリブレーター（プラスミド、合成核酸等）を用いて測定した値をmL当りに換算して記入する。表示単位には各測定系で使用している単位（コピー、”IU”）を用いる。参加施設において試料Cの試料Sに対する相対力価を計算する必要は無い（「6. 結果の解析」参照）。

6. 結果の解析

感染研において解析する。平行線定量法によって国際標準品に対する国内標準品候補品の施設ごとの推定相対力価(IU/mL)を算出し、それに基づいて全体の平均を求める。全体の平均に反映させるのが困難なデータがある場合には別途検討する。

7. 候補品の力価の決定

施設名をコード化した結果報告書を参加施設に送付し、参加者の意見を聴取した上で国内標準品候補品の力価を決定する。共同研究の結果をNAT小委員会等に報告し、国内標準品としての承認を受ける。

8. 経費

測定に関わる費用は参加者負担とする。

9. その他

候補品2本を余分に送付するので1本を予備測定に、もう1本を本試験の予備に使用してよい。国際標準品は数に限りがあるため本番の測定分のみを送付する。予備は無いので慎重に取り扱うこと。

国際標準品と国内標準品候補品は感染性のパルボウイルス B19 を含むので各施設の安全基準に従って保管、使用、廃棄すること。万一、感染事故が起きた場合には参加施設の使用責任者の責務とする。

以上

連絡先：〒208-0011東京都武蔵村山市学園4-7-1
国立感染症研究所 血液・安全性研究部
水澤 左衛子
Tel: 042-848-7124, Fax: 042-562-7875
E-mail: mizusawa@nih.go.jp