

資料 3-5

(第1回安全技術調査会資料)

血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会 資料

平成26年3月19日

国立医薬品食品衛生研究所

内田 恵理子

パルボウイルスB19 DNA参照パネル候補品の力価の評価

1. 経緯

パルボウイルス B19 (以下 B19) は血液製剤での検査は必須とはされていないが、輸血による感染事例が認められていることから、血液製剤関連各社により自主的に NAT 検査が実施されている。しかし、市販の B19 NAT 測定キットのうち、**Genotype 1** を検出するが **Genotype 2** を検出できないものがあると報告され、キットの幅広い検出能を評価するために参照パネルを用いた NAT の検出確認の必要性が指摘されている。これまで、国内では B19 ジェノタイプパネルは整備されていなかったが、B19 参照パネル候補品が国立医薬品食品衛生研究所に供与されたことから、厚生労働科学研究班によりパネルの樹立を行うこととした。平成 24 年度第 1 回の「血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会」では、B19 参照パネル候補品の調製と均一性試験及び保存安定性について報告するとともに、今後、共同検定によりパネルの力価を測定することを報告した。今回、国内外 11 施設による共同研究を実施し、国際標準品の力価に基づいて参照パネル候補品の力価を決定した。

2. 参加施設

以下の 3 カ国、11 施設（国内 9、ヨーロッパ 2）が共同検定に参加し、全施設が結果を報告した。内訳は血漿分画製剤製造所及び原料血漿検査所 9 施設、公的機関 2 施設である。

国立医薬品食品衛生研究所

国立感染症研究所

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 京都工場

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

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

日本赤十字社 北海道ブロック血液センター

バクスター株式会社

CSL ベーリング株式会社

なお、参加施設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. 参照パネル候補品の製造

B19 参照パネル候補品は、株式会社ベネシス(現・一般社団法人日本血液製剤機構)が調製し、国立医薬品食品衛生研究所に供与されたものを用いた。候補品の調製は以下のように行われた。まず、米国で採血された B19 ゲノム陽性のヒト血漿を原料血漿として入手し、高濃度サンプルとして Genotype 1 の F15 と genotype2 の F27 を選択して血清化した。これらの未希釈血清のゲノム濃度は artus parvo B19 TM PCR Kit (QIAGEN) を用いた測定により、Genotype 1 (F15)は 11.2 Log₁₀ IU/mL、Genotype2 (F27)は 11.0 Log₁₀ IU/mL であった。これらの未希釈サンプルを希釈用ヒト血清 (Anti-HIV、Anti-HCV、HBsAg、HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、B19-DNA、Anti-B19 陰性) を用いて約 10¹⁰ 及び 10⁵ IU/mL となるように希釈してそれぞれ高濃度及び低濃度サンプルとした。Genotype 1 と 2 の高濃度サンプル及び低濃度サンプルをそれぞれ 0.5mL ずつ分注したもの、及び陰性コントロール血清(希釈用血清)をパネルの 1 セットとして -80℃ で保存した。調製時の F15 と F27 の高濃度及び低濃度サンプルのゲノム量は F15 高濃度 : 10.0 Log₁₀ IU/mL、F15 低濃度 : 4.4 Log₁₀ IU/mL、F27 高濃度 : 10.1 Log₁₀ IU/mL、F27 低濃度 : 4.2 Log₁₀ IU/mL であった。また、F15 と F27 は HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、HEV-RNA、HBsAg、Anti-HIV、Anti-HCV、Anti-HEV、anti-B19 IgG がいずれも陰性であることが確認されている。これらのサンプルが国立医薬品食品衛生研究所に 305 セット供与された。なお、パネル候補品は、分注の均一性と -80℃ での保存安定性が確認されている (平成 24 年度第 1 回 NAT 小委員会で報告済)。

4. 配付試料

参加各施設に以下の試料を配付した。

- ・ パルボウイルス B19 参照パネル候補品 4 セット

1 セットの内容 (1)Genotype 1 高濃度サンプル(ラベル : B19-G1 F15conc)

(2)Genotype 1 低濃度サンプル(B19-G1 F15)

(3)Genotype 2 高濃度サンプル(B19-G2 F27conc)

(4)Genotype 2 低濃度サンプル(B19-G2 F27)

(5)陰性コントロール (B19 Negative control)

- ・ パルボウイルス B19 DNA 第二次国際標準品 (99/802) (力価 10⁶ IU/mL) 1 本
- ・ 希釈用陰性血漿 (日本赤十字社より供与)

5. 力価の測定

参加各施設は、定量 NAT または定性 NAT(エンドポイント法)によりパネル候補品の力価測定を行った。試験毎に新たに候補品を融解し、日を変えて 3 回測定した。

定量 NAT : 高濃度サンプルは希釈用陰性血漿を用いて 10,000 倍程度に希釈後、さらに 3 段階以上の 10 倍希釈列を調製した。低濃度サンプルは原液または測定可能な濃度に希釈し

て使用した。B19 DNA 第二次国際標準品は 3 段階の 10 倍希釈列を調製し、定量のスタンダードとした。各サンプルについて定量 PCR を実施し、国際標準品の力価で換算して力価を IU/mL で算出した。測定は 1 回につき 3 重測定を行った。

定性 NAT：希釈用陰性血漿を用いて検出限界付近の 0.5 Log 希釈段階系列を作成し、連続して陽性となった最高希釈倍数から力価を IU/mL で算出した。国際標準品も同様に希釈列を作成して力価を算出し、得られた力価を 6.0Log_{10} IU/mL と置いて候補品の力価を換算した。

6. 測定値の分析

参加各施設から返送された結果を基に、国立医薬品食品衛生研究所が統計解析を行い、各パネルの力価を算出した。パネル候補品について、施設毎に測定値を対数力価で算出し、3 回の試験より得られた力価の平均値と標準偏差を算出した。また、各施設から得られた対数力価の平均値を基に、全施設及び定量 NAT を実施した施設全体の平均値と標準偏差及び 95%信頼区間を算出した。

7. 結果

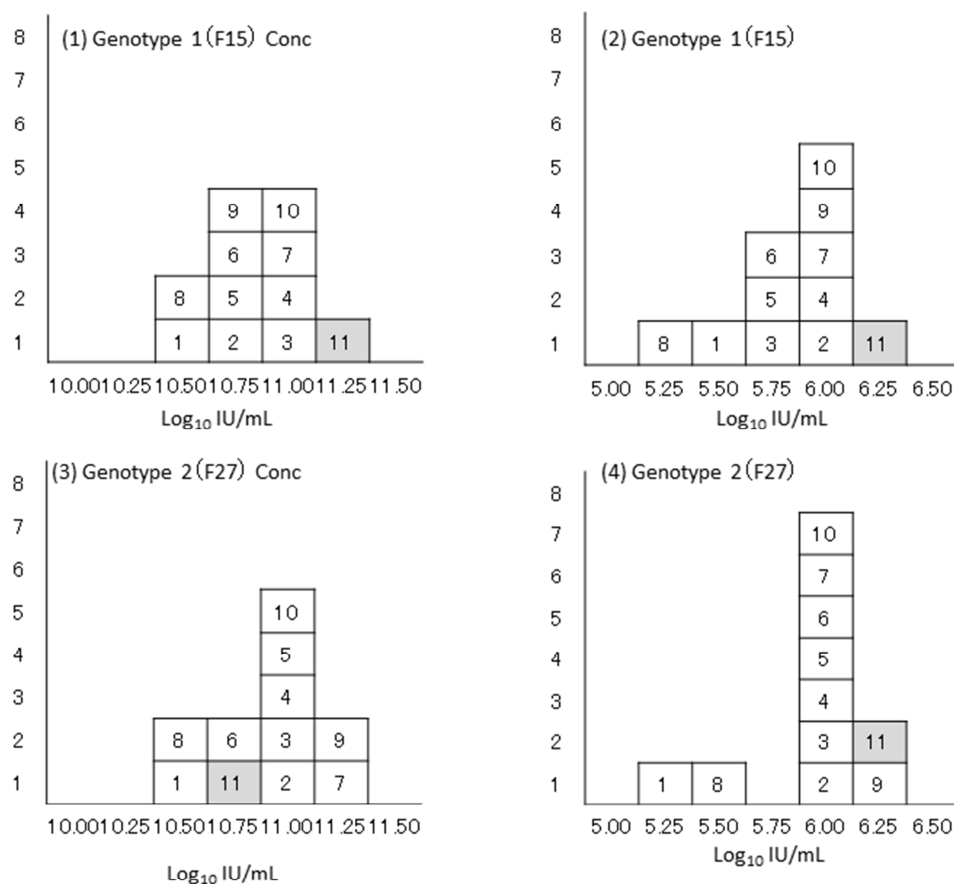
11 施設から 11 組の結果が得られた。10 施設が定量 NAT、1 施設が定性 NAT を実施した。定量 NAT では、6 施設が Real-time PCR 法に基づく市販の試験法で測定し、残りの 4 施設はそれぞれ異なるプライマーとプローブを用いた TaqMan PCR 法で測定した (Table 1)。

各パネルの施設毎の推定対数力価を Fig.1 に示す。施設間で測定値にはややばらつきが認められた。定量 NAT では特定の測定法による偏りは認められなかったが、定性 NAT は定量 NAT よりもやや高めの値を示した。各パネルの力価を求めるため、定量 NAT のみの対数力価の平均と、定性 NAT の値も加えた全体の平均を算出したところ、両者の差は最大で 0.05Log_{10} (1.1 倍)であり、また各施設の測定値のばらつきはいずれも 2SD の範囲で一致した (Table 2)。この結果より、全体の平均値を各パネルの力価として決定することとした。なお、パネル(5)の陰性コントロール血清はどの施設も陰性であった。

Table 1 実施された試験法と施設数

NAT の方法	定量 NAT : 10 施設 定性 NAT : 1 施設
核酸抽出法	Cobas s201 NAT system 4 施設 QIA Symphony Virus/Pathogen mini kit 2 施設 SMI-TEST EX R&D 3 施設 MagNA Pure 96 system 1 施設 QIAamp MinElute virus spin 1 施設
核酸増幅法	Cobas TaqScreen DPX test 4 施設 Artus parvo B19 1 施設 RealStar ParvoB19 PCR kit 1 施設 スマイテストパルボウイルス B19 遺伝子定性キット Ver2 1 施設 In house 4 施設

Fig.1 Histograms of the potencies of each panel member relative to the 2nd International Standard (99/802)



(Results from qualitative assay is shown as gray box.)

Table 2 Overall means and inter-laboratory variation for potencies of panel members relative to 2nd International Standard (09/802)

samples	Assay Type	N	Overall Mean log ₁₀ IU/mL	Std. Dev.	Min.	Max.	Range	95% Confidence Interval log ₁₀ IU/mL	
(1)B19-G1 F15conc	Quant.	10	10.77	0.16	10.44	10.92	0.48	10.67	10.87
	All	11	10.82	0.22	10.44	11.30	0.86	10.69	10.95
(2)B19-G1 F15	Quant.	10	5.78	0.20	5.35	5.96	0.61	5.66	5.91
	All	11	5.82	0.23	5.35	6.22	0.87	5.69	5.96
(3)B19-G2 F27conc	Quant.	10	10.86	0.27	10.40	11.15	0.75	10.69	11.03
	All	11	10.85	0.26	10.40	11.15	0.75	10.69	11.00
(4)B19-G2 F27	Quant.	10	5.89	0.28	5.32	6.20	0.88	5.72	6.06
	All	11	5.92	0.29	5.32	6.25	0.93	5.74	6.10

8. 結論

本共同研究によって、次の通り B19 参照パネルを樹立し力価を決定した。なお、参照パネルの表示力価及び 95%信頼区間は測定の際の参考情報として提示するものである。WHO 国際標準品に基づいて力価を定めた国内標準品は別に制定されており、本パネルをもって国内標準品に代えるものではない。

パルボウイルス B19 参照パネル (ラベル表記)	容量 (mL)	表示力価 (IU/mL)	95%信頼区間 (IU/mL)
Genotype 1 高濃度サンプル (B19-G1 F15conc)	0.5	6.6×10^{10}	$4.9 \sim 8.9 \times 10^{10}$
Genotype 1 低濃度サンプル (B19-G1 F15)	0.5	6.6×10^5	$4.9 \sim 9.1 \times 10^5$
Genotype 2 高濃度サンプル (B19-G2 F27conc)	0.5	7.1×10^{10}	$4.9 \sim 10.0 \times 10^{10}$
Genotype 2 低濃度サンプル (B19-G2 F27)	0.5	8.3×10^5	$5.5 \sim 12.6 \times 10^5$
陰性コントロール血清 (B19 Negative control)	0.5	-	-
原料：ヒト血漿 HIV-RNA, HAV-RNA, HBV-DNA, HCV-RNA, HEV-RNA, HbsAg, Anti-HIV, Anti-HCV, Anti-HEV, Anti B19 IgG のいずれも陰性 保存温度：-80℃ BSL2 注：参照パネルの表示力価及び 95%信頼区間は測定の際の参考情報として示すものであり、本パネルをもって国内標準品に代えるものではない。			

謝辞：参照パネル候補品は、株式会社ベネシス（現・般社団法人日本血液製剤機構）の協力により、厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「血液製剤への核酸増幅検査（NAT）の実施及びその精度管理に関する研究」班に供与されたものである。本共同研究は、厚生労働省科学研究費補助金により実施された。