

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）

過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による
HCV 遺伝子検査に関する研究

報告書(案)

研究代表者 岡田 義昭

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

(研究の概要)

これまでに、フィブリノゲン製剤等によるC型肝炎ウイルス (HCV) の感染については、「特定フィブリノゲン製剤及び特定血液凝固第IX因子製剤によるC型肝炎感染被害者を救済するための給付金の支給に関する特別措置法」が制定されているところである。フィブリノゲン製剤以外の過去の血漿分画製剤に対しては、製造販売業者に対し、ウイルス性肝炎又はその可能性のあった症例の提出を求めるなど、平成19年11月から厚生労働省により調査が行われた。この調査の結果については、平成22年6月23日に薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会と同医薬品等安全対策部会安全対策調査会の合同開催において、過去の血漿分画製剤の製造方法や症例報告の情報に基づいて評価された。

この際、企業から提出されたウイルス安全性のデータを評価するのみならず、別途現存する過去の血漿分画製剤に対し、核酸増幅検査 (NAT) により、C型肝炎ウイルス遺伝子の検査を行う必要性について検討された。

その結果、

客観的にリスクの高いもの (血液凝固因子製剤、生体接着剤等)

少なくとも製造方法の種類ごと

過去のもので、原料血漿のNAT検査が行われていない時期のもの

について、調査を行う必要性が指摘された。

本研究班では、原料血漿のNATが実施されていない時期の製剤ではあるが、製造工程でHCVは除去・不活化されており製品に混入するHCVは、混入していても極めて微量な量であると推定された。そのため、通常血漿からのHCV検出法を用いての検出は感度的に困難であると考え、下記のような大容量からの核酸抽出法と組み合わせることで「超高感度検出法」を考案し、最終製剤からのHCV遺伝子の検出を行った。

(血漿分画製剤からのHCV検出法の概要)

1. 抽出法

HCV検出感度を向上させるために、QIAamp Circulating Nucleic Acidキット (QIAGEN社) を使用した。このキットは、試料をグアニジンによるタンパク変性とタンパク分解酵素 (proteinase K) を組み合わせてタンパクを除き、これを核酸と親和性のある膜に吸着させ、洗浄液で洗浄することによって核酸以外の夾雑物を取り除くことができ、さらにDNaseを作用させることによってDNAを除去し、高純度のRNAを得ることができる。

このキットは最大5mLの血漿から核酸抽出できる性能があるため、検査対象の血漿分画製剤を用法通りに溶解し、5mLを検査に用いた。なお、2mLの製剤は、PBSを添加して5mLとして抽出を行った。それぞれの製剤から55 μ LのRNAを抽出し、その50 μ Lを下記の増幅・検出に用いた。抽出に際しては、抽出の工程とその後の増幅・検出工程をモニターするために、コバスアンプリスクリーン HCV v2.0 キット (Roche社) に添付されている internal control (IC) を QIAGEN社の抽出バッファーに添加して一連の操作を行った。

2. 増幅・検出法

HCV-RNAの増幅・検出には、血液のHCVスクリーニング検査に用いられているコバスアンプリスクリーン HCV v2.0 キットを使用した。核酸を増幅するためのバッファーに上記で抽出

した 50 μ L の RNA 溶液を添加し、増幅・検出を行った。

原理：抽出した HCV-RNA と IC はビオチン標識された HCV 増幅用のプライマー（IC を増幅するためのプライマーを含む）により増幅される。増幅された産物は、変性後にそれぞれ自動的に HCV の検出系と IC 検出系とに分けられ、それぞれの検出系で、磁気ビーズが付いたプローブと hybridization することによって増幅産物のみトラップされる。これに酵素を結合させたアビジンを添加すると増幅産物のプライマー部分と結合する。洗浄後に基質を加え、増幅産物と酵素と基質の反応によって発色するため、その吸光度を測定することによって HCV-RNA と IC の増幅産物の有無をそれぞれ定性するものである。

(判定)

判定は、下記のようにコバスアンプリスクリーン HCV v2.0 キットに準じる。

HCV 陽性 : HCV-RNA 陽性、

HCV 陰性 : HCV-RNA 陰性、 IC 陽性

判定保留 : HCV-RNA 陰性、 IC 陰性

結果

検査を実施した 65 ロットのうち、試験が成立した 58 ロットからは HCV 遺伝子は検出できなかった。

| 製剤 | 製造所 | HCV 陽性ロット/ 検査成立ロット数 | 感度 (IU/5ml) | 備考 |
|-----------------|------|------------------------|----------------|-------|
| ティシール (フィブリノゲン) | 日本臓器 | 0/7 | 3 | 7 ロット |
| (トロンビン) | | 0/14 | 3 | 判定保留 |
| クリスマシン-M | ベネシス | 0/12 | 3 | |
| コンコエイト-HT | ベネシス | 0/6 | 10 | |
| トロンビン | ベネシス | 0/33 | 3 | |

- 1) 5mL の血漿及びフィブリノゲンに HCV 国内標準品を添加し、検出感度を評価した。その結果、検出感度は 3 IU/5mL とし、その 3 倍の 10IU/5mL を試験成立の条件とした。
- 2) 予備検査として、現在市販されている製品を指定されている容量に溶解後、5mL に 3 IU と 10IU の HCV をそれぞれ添加し、感度を評価した。その後、古い製剤の検査を実施した。
- 3) ティシールは、日本での販売が中止されているため感度評価のための製品が入手できなかった。そのため、日本で市販されている静注用フィブリノゲンをティシールと同濃度 (90mg/mL) に溶解して感度評価を実施した。7 ロットで判定保留となったのは、ティシールのフィブリノゲンには界面活性剤が添加されており、これが添加した IC の核酸 (短い RNA) の回収を抑制したため IC が陰性となったと推定している。
- 4) コンコエイトの検査では、ランコントロールの 3 IU が陰性のため感度は 10IU とした。

1 販売名：ティシール（ロット各1検体ずつ）

日本臓器製薬株式会社

| | | |
|-------------|-------|----------------------------------|
| (1) フィブリノゲン | 試験実施日 | 平成23年2月16日（抽出） 平成23年2月17日（検出） |
| (2) トロンビン | 試験実施日 | 平成23年2月2日（抽出） 平成23年2月10日（検出） |

コントロール

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|-------------------------|------------------|----------|----------|
| 1 | 陰性コントロール | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 |
| 2 | ランコントロール 3 IU/5 mL | フィブリノゲン トロンビン | 陽性 陽性 | 陽性 陽性 |
| 3 | 陽性コントロール 10 IU/5 mL | フィブリノゲン トロンビン | 陽性 陽性 | 陽性 陽性 |
| 4 | システムコントロール (フィブリノゲン) | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |
| 5 | システムコントロール (トロンビン) | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

ティシール

| No. | 規格 | ロット番号 (製造日) | 製剤成分 | HCV | IC | 判定 |
|-----|-------|-------------------|------------------|----------|----------|------------|
| 1 | 5.0mL | D001 (1994.11) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 2 | 5.0mL | D002 (1995.1) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |

| | | | | | | |
|----|-------|-------------------|------------------|----------|----------|------------|
| 3 | 2.0mL | C042 (1994.5) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 4 | 2.0mL | C043 (1994.6) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |
| 5 | 2.0mL | C044 (1994.7) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 6 | 2.0mL | C045 (1994.8) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |
| 7 | 2.0mL | C046 (1994.11) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |
| 8 | 2.0mL | C047 (1994.12) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 9 | 2.0mL | C048 (1995.2) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 10 | 2.0mL | C049 (1995.4) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |
| 11 | 2.0mL | C050 (1995.4) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 12 | 2.0mL | C051 (1995.6) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陰性 陽性 | 判定保留 陰性 |
| 13 | 2.0mL | C052 (1995.10) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |
| 14 | 2.0mL | C053 (1995.10) | フィブリノゲン トロンビン | 陰性 陰性 | 陽性 陽性 | 陰性 陰性 |

2 販売名：クリスマシン-M (献血由来)
株式会社ベネシス

試験実施日 平成23年2月14日 (抽出)
平成23年2月15日 (検出)

コントロール

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------------------|---------------|----------|--------|
| 1 | 陰性コントロール | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 |
| 2 | ランコントロール 3 IU/5 mL | 血液凝固 第IX因子 | 陽性 | 陽性 |
| 3 | 陽性コントロール 10 IU/5 mL | 血液凝固 第IX因子 | 陽性 | 陽性 |
| 4 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

| No. | 規格 | ロット番号 (製造日) | 製剤成分 | HCV | IC | 判定 |
|-----|-------|----------------------|---------------|-----|----|----|
| 1 | 1000U | B006MXB (1997.10) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 2 | 1000U | B007MXB (1998.1) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 3 | 1000U | C008MXB (1998.3) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 4 | 1000U | C010MXB (1998.12) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 5 | 1000U | D011MXB (1999.3) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 6 | 1000U | D012MXB (1999.10) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 7 | 1000U | E013MXB (2000.5) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 8 | 1000U | E014MXB (2000.10) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 9 | 1000U | E015MXB (2001.1) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 10 | 1000U | F016MXB (2001.4) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 11 | 1000U | F017MXB (2001.8) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |

| | | | | | | |
|-----|-------|----------------------|---------------|----|----|----|
| 1 2 | 1000U | F018MXB (2001.12) | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
|-----|-------|----------------------|---------------|----|----|----|

3 販売名：コンコエイト・HT（献血由来）
株式会社ベネシス

試験実施日 平成23年2月25日（抽出）
平成23年2月25日（検出）

コントロール

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------------------|---------------|----------|--------|
| 1 | 陰性コントロール | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 |
| 2 | ランコントロール 3 IU/5 mL | 血液凝固 第IX因子 | 陰性 | 陽性 |
| 3 | 陽性コントロール 10 IU/5 mL | 血液凝固 第IX因子 | 陽性 | 陽性 |
| 4 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

| No. | 規格 | ロット番号 (製造日) | 製剤成分 | HCV | IC | 判定 |
|-----|------|----------------------|-----------------|-----|----|----|
| 1 | 500U | B001SXB (1997.11) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 2 | 500U | C002SXB (1998.10) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 3 | 500U | D003SXB (2000.2) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 4 | 500U | F004SXB (2001.8) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 5 | 500U | G005SX (2002.7) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 6 | 500U | G006SX (2002.7) | 血液凝固 第VIII因子 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |

4 販売名：トロンビン-ミドリ (献血由来)
株式会社ベネシス

試験実施日： 平成23年1月26日 (抽出)：ロット B005VX～F021VX (17ロット)
平成23年1月27日 (抽出)：ロット F022VX～J019HX (16ロット)
平成23年1月27日 (検出)：ロット B005VX～F021VX (17ロット)
平成23年1月28日 (検出)：ロット F022VX～D008HX (9ロット)
平成23年2月 3日 (検出)：ロット D009HX～G014HX (5ロット)
平成23年2月10日 (検出)：ロット G015HX～J019HX (2ロット)

コントロール (第1回目：平成23年1月27日 (検出)：ロット B005VX～F021VX)

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------------------|--------------|----------|--------|
| 1 | 陰性コントロール | トロンビン | 陰性 | 陽性 |
| 2 | ランコントロール 3 IU/5 mL | トロンビン | 陽性 | 陽性 |
| 3 | 陽性コントロール 10 IU/5 mL | トロンビン | 陽性 | 陽性 |
| 4 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

コントロール (第2回目：平成23年1月28日 (検出)：ロット F022VX～D008HX)

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------------------|--------------|----------|--------|
| 1 | 陰性コントロール | トロンビン | 陰性 | 陽性 |
| 2 | ランコントロール 3 IU/5 mL | トロンビン | 陽性 | 陽性 |
| 3 | 陽性コントロール 10 IU/5 mL | トロンビン | 陽性 | 陽性 |
| 4 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

コントロール (第3回目：平成23年2月 3日 (検出)：ロット D009HX～G014HX)

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------|--------------|----------|--------|
| 1 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

コントロール (第4回目：平成23年2月10日 (検出)：ロットG015HX～J019HX)

| No. | 規格 | 製剤成分 | HCV | IC |
|-----|------------|--------------|----------|--------|
| 1 | システムコントロール | -ACH +ACH | 陰性 陽性 | - - |

| No. | 規格 | ロット番号 (製造日) | 製剤成分 | HCV | IC | 判定 |
|-----|-----|---------------------|-------|-----|----|----|
| 1 | 1万U | B005VX (1998.9) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 2 | 1万U | C006VXA (1999.2) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 3 | 1万U | C007VX (1999.3) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 4 | 1万U | C008VX (1999.4) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 5 | 1万U | C009VX (1999.5) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 6 | 1万U | C010VX (1999.8) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 7 | 1万U | C011VX (1999.10) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 8 | 1万U | D012VX (1999.12) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 9 | 1万U | D013VX (2000.3) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 10 | 1万U | D014VX (2000.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 11 | 1万U | D015VX (2000.8) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 12 | 1万U | D016VX (2000.9) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 13 | 1万U | E017VX (2001.2) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 14 | 1万U | E018VX (2001.5) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 15 | 1万U | E019VX (2001.8) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 16 | 1万U | E020VX (2001.10) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |

| | | | | | | |
|----|-----|---------------------|-------|----|----|----|
| 17 | 1万U | F021VX (2002.1) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 18 | 1万U | F022VX (2002.2) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 19 | 1万U | F023VX (2002.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 20 | 1万U | F024VX (2002.9) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 21 | 1万U | F025VX (2002.11) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 22 | 1万U | G026VX (2003.1) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 23 | 1万U | H029VX (2004.1) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 24 | 1万U | C006HX (1999.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 25 | 1万U | C007HX (1999.11) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 26 | 1万U | D008HX (2000.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 27 | 1万U | D009HX (2000.9) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 28 | 1万U | E011HX (2001.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 29 | 1万U | E012HX (2001.11) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 30 | 1万U | F013HX (2002.6) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 31 | 1万U | G014HX (2003.1) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 32 | 1万U | G015HX (2003.8) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 33 | 1万U | J019HX (2005.4) | トロンビン | 陰性 | 陽性 | 陰性 |