

原 著

## C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための 第一次国内標準品の作製

水沢左衛子<sup>1) a)</sup> 岡田 義昭<sup>1) a) b)</sup> 堀内 善信<sup>2) b)</sup> 田中 建志<sup>3) b)</sup>  
佐藤 功栄<sup>3) b)</sup> 金子 健二<sup>4) a) b)</sup> 佐々木祐子<sup>5) b)</sup> 田中 利明<sup>6) a)</sup>  
伴野 丞計<sup>7) a)</sup> 友水 健雄<sup>4) b)</sup> 速水 照一<sup>5) a) b)</sup> 土方美奈子<sup>8) b) c)</sup>  
平子 一郎<sup>9) a) b) d)</sup> 真弓 忠<sup>10) a)</sup> 三上 貢一<sup>11) a) b) e)</sup> 三代 俊治<sup>8) a) b)</sup>  
宮本 誠二<sup>12) a) b)</sup> 牟田 健吾<sup>12) b)</sup> Thomas Weimer<sup>13) b)</sup>  
Todd Gierman<sup>14) b)</sup> 小室 勝利<sup>1) a)</sup> 山口 照英<sup>15) a)</sup>

- <sup>1)</sup>国立感染症研究所血液・安全性研究部, <sup>2)</sup>国立感染症研究所細菌第二部, <sup>3)</sup>埼玉県赤十字血液センター,  
<sup>4)</sup>日本製薬株式会社, <sup>5)</sup>株式会社ベネシス, <sup>6)</sup>バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,  
<sup>7)</sup>日本赤十字社血漿分画センター, <sup>8)</sup>東芝病院研究部, <sup>9)</sup>バイエル薬品株式会社, <sup>10)</sup>自治医科大学,  
<sup>11)</sup>アベンティス ファーマ株式会社, <sup>12)</sup>財団法人化学及血清療法研究所, <sup>13)</sup>アベンティス ベーリング,  
<sup>14)</sup>バイエルヘルスケア, <sup>15)</sup>国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,  
<sup>a)</sup>血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会  
(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),  
<sup>b)</sup>NAT 国内標準品作製のための共同研究グループ  
<sup>c)</sup>現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,  
<sup>d)</sup>現シェリング・プラウ株式会社, <sup>e)</sup>現バイエル薬品株式会社

(平成 17 年 1 月 5 日受付)

(平成 17 年 5 月 6 日受理)

## ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa<sup>1) b)</sup>, Yoshiaki Okada<sup>1) a) b)</sup>, Yoshinobu Horiuchi<sup>2) b)</sup>, Takeshi Tanaka<sup>3) b)</sup>,  
Koei Sato<sup>3) b)</sup>, Kenji Kaneko<sup>4) a) b)</sup>, Yuko Sasaki<sup>5) b)</sup>, Toshiaki Tanaka<sup>6) a)</sup>,  
Tsugikazu Tomono<sup>7) a)</sup>, Takeo Tomomizu<sup>4) b)</sup>, Shouichi Hayami<sup>5) a) b)</sup>, Minako Hijikata<sup>8) b) c)</sup>,  
Ichiro Hirako<sup>9) a) b) d)</sup>, Makoto Mayumi<sup>10) a)</sup>, Koichi Mikami<sup>11) a) b) e)</sup>, Shunji Mishiro<sup>8) a) b)</sup>,  
Seiji Miyamoto<sup>12) a) b)</sup>, Kengo Muta<sup>12) b)</sup>, Thomas Weimer<sup>13) b)</sup>, Todd Gierman<sup>14) b)</sup>,  
Katsutoshi Komuro<sup>1) a)</sup> and Teruhide Yamaguchi<sup>15) a)</sup>

- <sup>1)</sup>Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,  
<sup>2)</sup>Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,  
<sup>3)</sup>Japanese Red Cross Saitama Blood Center, <sup>4)</sup>Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,  
<sup>5)</sup>Benesis Corporation, <sup>6)</sup>Baxter Limited BioScience, <sup>7)</sup>Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,  
<sup>8)</sup>Department of Medical Science, Toshiba General Hospital, <sup>9)</sup>Bayer Yakuin Ltd.,  
<sup>10)</sup>Jichi Medical School, <sup>11)</sup>Aventis Pharma Co. Ltd.,  
<sup>12)</sup>The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, <sup>13)</sup>Aventis Behring Ltd., <sup>14)</sup>Bayer Healthcare,  
<sup>15)</sup>Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science,

<sup>a)</sup>Subcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman : Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences )

<sup>b)</sup>Working Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,  
Present address ; <sup>c)</sup>Department of Respiratory Diseases, Research Institute,  
International Medical Center of Japan., <sup>d)</sup>Schering-Plough K.K., <sup>e)</sup>Bayer Yakuhin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology ( NAT ) Assay ( 96/790 ) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma ( 119 and 122 ) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately  $10^5$  international units ( IU ) / ml in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay ( Version 1 ) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was  $10^{5.00}$  (  $10^{4.80} \sim 10^{5.20}$  ) IU / ml. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU / ml. Each vial of the National Standard contains 0.5 ml of HCV plasma ( genotype 1b ) diluted in cryosupernatant and should be stored at - 80 .

**Key words** : HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology ( NAT ) assay, Blood safety

## 1. はじめに

供血者の C 型肝炎ウイルス ( HCV ) に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤による HCV の感染が報告された . これは , HCV に感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた<sup>1)2)</sup> . そこで , 血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは 1999 年 7 月 1 日から原料血漿プールで HCV-RNA の核酸増幅検査 ( NAT ) を実施することになった . すでにイギリスをはじめオランダ , ドイツ , イタリア , アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており , NAT を実施する施設で使用されていたが , HCV-RNA 量がコピー数や genome equivalent 等まちまちの単位で表示されていたので , 標準品の HCV-RNA 量や NAT 法の感度を相互に比較することが出来なかった . イギリスの NIBSC によって HCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され , 1997 年 10 月に WHO 国際標準品 ( 96/790 ) が制定され , 国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった<sup>3)4)</sup> . わが国においては厚生省告示第 427 号によって , 平成 13 年 3 月 1 日から製造され , 又は輸入される血液製剤の原料血漿について B 型肝炎ウイルス DNA , C 型肝炎ウイルス RNA 及びヒト免疫不全ウイルス RNA に対する NAT を実施しなければならないことに改められた . 実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについて HCV-RNA の NAT が実施された . しかし , 施設ごとに NAT 法が異なり , 自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため , それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった . 国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより , 施設間の比較や評価が可能になると考えられた . 一方 , 国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）は HCV-RNA 量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次 HCV-RNA 国内標準品を作製したので報告する。国際標準品は genotype 1 であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高い genotype 1b とした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場で NAT が実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスの NAT のための国内標準品でもある。

## 2. 材料および方法

### 1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与された HBs 抗原、抗 HIV-1/2 抗体、HBV-DNA、HIV-RNA のすべてが陰性で、HCV 陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られる genotype 1b の 2 つの血漿（119 と 122）を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約  $10^5$  国際単位（IU）/ml に希釈して -80 で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA 国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいパイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して 10 倍希釈系列（ $10^{-1}$  から  $10^{-7}$ ）を調製することとし、日を替えて 2 回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した（第 1 回測定）。このとき使用した国際標準品は小分けして -80 に凍結保存して第 2 回測定に用いた。

### 2) HCV-RNA 国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿 122（PHA 力価  $2^{14}$ 、RNA 量  $2 \sim 3 \times 10^6$  IU/ml、容量 185ml）をあらためて約  $10^6$  IU/ml に脱クリオ血漿で希釈、0.5ml ずつガラス瓶に分注し -80 で凍結して、HCV-RNA 国内参照品候補 122（候補品）とし、参加施設に送付した。各施設は初回は 10 倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために 2 回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで 7 段階の  $10^{0.5}$  希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて 4 回測定を実施した（第 2 回測定）。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA 国内標準品候補の WHO 国際標準品に対する力価を推定した。

### 3) 参加施設と測定方法

日常的に HCV-NAT を実施している 9 施設（国内 6 施設、米国 2 施設、ヨーロッパ 1 施設）に候補品を配布し、7 施設（国内 5 施設、米国 1 施設、ヨーロッパ 1 施設）から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

### 4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその 95% 信頼区間を推定した。7 施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

## 3. 結果

### 1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所 5 施設（国内 3、海外 2）、公的機関 1 施設、その他 1 施設の合計 7 施設から結果が返送された。Table 1 に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4 施設がアンプリコア HCV（Ver. 1）変法、2 施設が自家法の nested PCR 法、1 施設が自家法の single PCR 法を用いて測定した。反应当たりの試料の量は 40～400 $\mu$ l の血漿に相当した。

### 2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々な NAT 法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では 2 つの HCV 陽性血漿 119 と 122 を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能ないように容量の大きい血漿 122 を候補品の原料として選択した。血漿 122 の HCV コア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction <sup>a</sup>	Eq. Vol. Amplified <sup>b</sup>
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house NaI	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D : Smi-test EX-R&D ( Nippon Genetics Co. Ltd. )

Amplicor : Amplicor HCV version 1 ( Roche )

QIAamp : QIAamp DNA Blood Mini Kit ( QIAGEN )

b) Eq. Vol. Amplified: the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

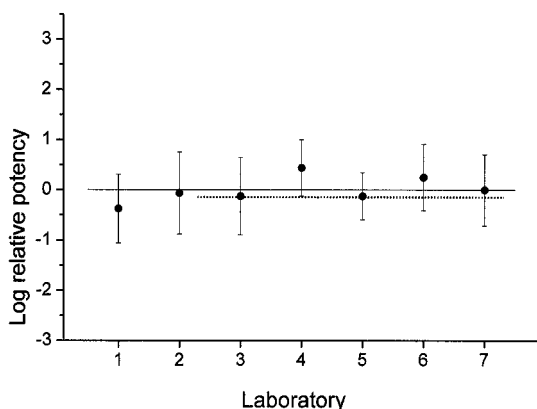


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard ( 96/790 ) The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data,  $-0.001$  (  $-0.204$  -  $+0.201$  ) The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2,  $+0.066$  (  $-0.161$  -  $+0.292$  )

配列を決定して genotype 1b であることを確認した。

### 3) 候補品 122 の国際標準品 ( 96/790 ) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し, 7 施設において  $10^{0.5}$  稀釈系列で測定した ( 第 2 回測定 ) 。 5 施設で独立の 4 回の測定, 2 施設で各 2 回繰り返し測定を独立に 4 回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard ( 96/790 ) Overall ( a ) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall ( b ) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	$\log_{10} \text{IU/ml}$		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall ( a )	5.00	4.80	5.20
Overall ( b )	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその 95% 信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1 に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は  $\log_{10}^{-0.001}$  であった。WHO 国際標準品 ( 96/790 ) の力価は  $10^6 \text{IU/ml}$  であるから、候補品の力価は  $10^{5.00}$  (  $10^{4.80-5.20}$  )  $\text{IU/ml}$ 、即ち  $100,000 \text{IU/ml}$

と推定された (Table 2)。

参加7施設中、施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった。また施設2では不連続な陽性結果が多く、測定結果のばらつきが大きかった。そこで、この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果5施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は  $\log 10^{0.066}$  (Fig. 1) によって、候補品の力価は  $10^{5.07}$  ( $10^{4.84-5.29}$ ) IU/ml, 即ち 116,300 IU/ml と推定され、全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2)。最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は  $10^{5.07}$  ( $10^{4.86-5.30}$ ) IU/ml となり、2つの分析法による推定値はよく一致した。

以上の結果から、候補品122の国際標準品に対する力価は  $10^{5.00}$  IU/ml と推定され、力価 100,000 IU/ml の国内標準品として1999年12月に小委員会承認された。

#### 4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので、異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である。HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である。本共同研究によってわが国で初めて、国際単位表示されたHCV-RNAの国内標準品が制定された。候補品の95%信頼区間は力価  $10^{5.00}$  IU/ml に対して  $10^{4.80-5.20}$  IU/ml であった。また参加施設のなかの力価の最大は  $10^{5.44}$  IU/ml (施設4)、最小は  $10^{4.63}$  IU/ml (施設1) で  $10^{0.81}$  倍の相違であった (Table 2)。これらの値はエンドポイントの測定を  $10^{0.5}$  倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる。これは本共同研究の参加施設を日常的にHCV-NATを実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる。国内標準品は分与される予定であるので、血液製剤の安全性確保のためのNAT試験法や診断薬の評価、臨床

検査センターにおけるHCV-RNA検査の評価に広く用いられるようになれば、相互の性能を容易に比較することが可能になり、試験法・検査技術の向上が期待できる。各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である。こうして得られた有効検出限界をもとに、たとえば95%陽性反応を得られる濃度と50%陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し、継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる。

#### 5. 結 論

血漿のHCV-RNAのNATのための国内標準品を作製した。国内標準品はHCV抗体陽性のHCV genotype 1b陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し、0.5mlずつバイアルに分注し、-80℃で凍結保存したもので、その力価は100,000 IU/mlである。

謝辞：本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された。本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業、血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた。

#### 文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*, 345: 1173-1174, 1995.
- 2) Vrielink H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*, 68: 55-56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*, 76: 149-158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*, 78: 217-224, 2000.