

医薬品のウイルス安全性確保：核酸増幅検査（NAT）による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発

内田恵理子,^{*,a} 山口照英^b

Viral Safety of Biologicals: Evaluation of Hepatitis C Virus (HCV) Nucleic Acid Amplification Test (NAT) Assay and Development of Concentration Method of HCV for Sensitive Detection by NAT

Eriko UCHIDA^{*,a} and Teruhide YAMAGUCHI^b

^aDivision of Cellular and Gene Therapy Products, and ^bDivision of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received August 28, 2009)

The most important issue for the safety of biological products and blood products derived from human sources is how to prevent transmission of infectious agents. The hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem due to its high prevalence. HCV is mainly transmitted by exposure to blood and highly infectious during the early window period with extremely low viral loads. Therefore it is important to develop more sensitive detection methods for HCV. In the case of blood products, both serological test and nucleic acid amplification test (NAT) are required to detect HCV. Since NAT is highly sensitive, establishment of a new standard is required for validation of NAT assay. NAT guideline and establishment of the standard for HCV RNA and HCV genotype panel is introduced in this review. On the other hand, to enhance the sensitivity of virus detection by NAT, a novel viral concentration method using polyethyleneimine (PEI)-conjugated magnetic beads (PEI beads) was developed. PEI beads concentration method is applicable to a wide range of viruses including HCV. Studies using the national standard for HCV RNA, HCV genotype panel and seroconversion panel, suggest that virus concentration method using PEI-beads is useful for improvement of the sensitivity of HCV detection by NAT and applicable to donor screening for HCV.

Key words—hepatitis C virus (HCV); viral safety; nucleic acid amplification test (NAT); standard; polyethyleneimine (PEI); virus concentration

1. はじめに

ヒト由来成分を原料とする医薬品の安全性確保における最重要課題はウイルス等の感染症の伝播をいかに防止するかである。C型肝炎ウイルス（HCV）はわが国では約200万人が感染していると推定されている感染頻度の極めて高いウイルスで、主として血液を介して感染する。輸血によるHCV感染リスクは、1990年初頭に導入された血清学的検査に加えて1999年に核酸増幅検査（NAT）が導入されたことによって極めて低減化された。しかしながら、感染初期のウィンドウ期のHCVは極めて低濃度の

ウイルス量で感染が成立し、チンパンジーを用いた感染実験では50 mlの血漿中に含まれるわずか1-5コピーのHCVウイルスゲノムで感染が認められるとの報告もあり、¹⁾ ウィンドウ期によるHCV感染を防ぐには、より高感度・高精度なウイルス検出手法の開発が求められている。PCRを始めとするNAT法は数コピーから数十コピーという微量のウイルスゲノムを検出できる高感度検出法であり、「生物由来原料基準」（平成15年厚生労働省告示第210号2003年5月20日制定、平成17年厚生労働省告示第177号2005年3月31日改正）及び「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」（平成11年8月30日医薬発第1047号厚生省医薬安全局長通知）により、血液製剤（輸血用血液製剤、血漿分画製剤）では血清学的検査に加えてNATによるHCV検査が義務付け

^a国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部、^b同生物薬品部（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1）

*e-mail: uchida@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS33で発表したものを中心に記述したものである。

られている。一方で、NATは極めて高感度であるため、その分析法の評価にはこれまでにない基準が必要とされる。

本総説では、医薬品のウイルス安全性確保という観点から、NATによるHCV検出を評価するためのNATガイドラインとNATの評価に必要な標準品やパネル血漿の作製について紹介するとともに、NATの高感度化のためのウイルス濃縮法の開発とHCVの高感度検出への応用に関する筆者らの研究について紹介する。

2. ヒト由来成分を原料とする医薬品の安全性確保とNATによるHCV検出

2-1. 医薬品のウイルス安全性確保に関する基準・指針

ヒト由来成分を原料とする医薬品のウイルス安全性確保に関連する基準や指針としては、前述の「生物由来原料基準」や「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品または医療機器の品質及び安全性の確保について」（平成20年9月12日薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知）などが策定されている。これらの基準や指針により、ヒト由来成分を原料とするヒト尿由来製品、ヒト（同種）由来細胞組織加工医薬品等においてもHCVはB型肝炎ウイルス（HBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）等と同様、NATによる検査が義務化あるいは強く推奨されている（Table 1）。

2-2. NATの検出感度とウィンドウ期 NATとはNucleic acid Amplification Test（核酸増幅検査）のことで、ウイルスなどの微量の遺伝子（核酸）を人工的に増幅して高感度に検出する方法の総称である。DNAポリメラーゼを用いたサーマルサイクル

反応によりDNAを増幅するPCR法（Polymerase Chain Reaction：ポリメラーゼ連鎖反応）が一般によく知られているが、ほかにも恒温で核酸を増幅するTMA法（Transcription-mediated Amplification：転写媒介増幅法）、LAMP法（Loop-mediated Isothermal Amplification：鎖置換反応法）、ICAN法（Isothermal and Chimeric Primer-initiated Amplification of Nucleic Acid：等温遺伝子増幅法）、NAS-BA法（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification：核酸配列増幅法）やDNAリガーゼを用いたサーマルサイクル反応により核酸を増幅するLCR法（Ligase Chain Reaction：リガーゼ連鎖反応法）などの様々な方法が開発され、ウイルス検査に利用されている。各増幅法の原理や特徴については他著に譲る。²⁾

NATはウイルス核酸を増幅して検出するため、抗体を検出する血清学的検査に比べて極めて高感度であり、ウィンドウ期を短縮することが可能である。HCVの場合、抗体検査のウィンドウ期は約82日とされるが、日本赤十字社（日赤）ではNATの実施によりウィンドウ期が約25日と大幅に短縮された³⁾（ただし、これは検査法に依存した数値でありすべてに当てはまるわけではない）。日赤におけるHCVのNATによる検出感度は74 IU/mlとされる。⁴⁾ 一方、「四課長通知」（血漿分画製剤のウイルス安全対策について：平成15年11月7日薬食審査発第1107001号、薬食安発第1107001号、薬食監発第1107001号、薬食血発第1107001号、厚生労働省医薬食品局審査管理課長、安全対策課長、監視指導・麻薬対策課長、血液対策課長通知）によると、HCVのNATによる検出感度としてはHBV、HIVとともに100 IU/mlが求められている。昨年、日赤では新しい検査試薬を導入するとともに、検査に用いる検体の容量を現在の4倍以上に増やすことでNATの検出感度は一段と向上したという。さらに今後、ウイルス濃縮法を含む様々な手法により検出感度を上げることができれば、ウィンドウ期のさらなる短縮が可能と考えられる。

2-3. NATガイドライン 上述の通り、血液製剤やヒト尿由来製品では、数コピーから数十コピーという微量のウイルス遺伝子の検出が要求されるNATがスクリーニング検査として義務付けられているが、この場合、検出感度等の適切な精度管理

Table 1. Requirements for Virus Test in Biological Products

• Blood Products for Transfusion
—NAT for HBV-DNA, HCV-RNA, and HIV-RNA with individual or mixed blood
• Plasma Derived Medicines
—NAT for HBV-DNA, HCV-RNA and HIV-RNA with original plasma
• Human Urine Derived Products
—NAT for HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-RNA with pooled urine at appropriate timing
• Cell or Tissue Derived Products
—Interview or screening for HBV, HCV, HIV, HTLV and parvovirus B19

が極めて重要である。そこで、血液製剤の安全性確保を目的として NAT を行う場合に適切な精度管理が実施されるよう、検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策を示したものが「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」(平成 16 年 8 月 3 日薬食発第 0803002 号厚生労働省医薬食品局長通知) である。本ガイドラインは「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」を補完するものであり、血液製剤のドナースクリーニング検査、原料血漿の製造工程への受入れ時の試験、血漿分画製剤の製造過程における工程内管理試験や最終製品の検査として NAT を行う場合に適用される。HCV, HBV, HIV 及びその他の準用可能なウイルスが対象となる。

ウイルス遺伝子の検出を目的とする定性検出法としての NAT の検証で重要な項目は、①特異性、②検出感度、③頑健性である。NAT における特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で目的とするウイルス遺伝子のみを確実に検出できる能力であり、類似のウイルスに対する交差反応性(非特異的反応)がないこと、目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できることを適当な参照パネル(ジェノタイプパネル)を用いて証明することが求められる。

検出感度とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量のことを指し、NAT では 95% の確率で検出される検体一定量当たりのウイルス遺伝子の最低量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。検出感度は一般に標準品の希釈系列を作製して求める必要がある。ランコントロールには、95% の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含む標準検体を用いることが推奨されている。

頑健性とは、分析条件の小さな変動が結果に影響しないという信頼性を表すものであり、陰性試料及び陽性試料(95% の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスをスパイクしたものを、それぞれ少なくとも 20 検体を用いて試験を実施し、すべての陰性試料が陰性となり、すべての陽性試料が陽性となることによって示すことができる。

NAT ガイドラインでは、検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策として、上記の要件の

ほかに、核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出の最適化、従事者の技術の標準化、汚染防止のための施設・設備の整備等に関する要件等も示されている。

2-4. NAT 試験用標準品、参照品について

NAT ガイドラインに従って NAT の検出感度や精度を比較・評価するには、基準となる標準品あるいは標準物質(参照品)が必要となる。標準品としては、①国際標準品、②国際標準品とのデータの互換性が保証された国内標準品、③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質(参照品)等のいずれかを使用することが求められる。WHO (World Health Organization) や国内において NAT 試験用のウイルス標準品の作製が行われている (Table 2)。WHO の国際標準品は NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) により HCV, HBV, HIV, HAV 及びパルボウイルス B19 について作製されている。国内標準品は厚生労働省薬事分科会血液事業部会安全技術調査会小委員会により HCV, HBV 及び HIV について策定されている。HCV RNA の国際標準品としては、1997 年にジェノタイプ 1a を用いて第一次国際標準品 (96/790) が樹立され、現在は第三次国際標準品 (00/560) が NIBSC より入手可能である。一方、HCV RNA の第一次国内標準品 (JCV-1b No122) は国内に多いジェノタイプ 1b を

Table 2. International and National Standards for Virus DNA/RNA NAT Assays

	WHO International Standard (NIBSC)	National Standard
HCV	06/100 Genotype 1a 154881 IU/ml	JCV-1b No122 Genotype 1b 100000 IU/ml
HBV	97/746 Genotype A, HBsAg subtype adw 5 × 10 ⁵ IU/vial	HBV-129 Genotype C, HBsAg subtype adr 4.4 × 10 ⁵ IU/ml
HIV	97/650 HIV-1, Genotype B 5.56 log ₁₀ IU/vial	HIV-00047 HIV-1, Genotype B 1.4 × 10 ⁵ IU/ml
HAV	00/560 5 × 10 ⁴ IU/vial	—
Parvovirus B19	99/800 5 × 10 ⁵ IU/vial	—

用いて 1999 年に作製された。HCV RNA 国内標準品の作製には、日常的に HCV-NAT を実施している国内外の 7 施設が参加し、各施設が任意の核酸抽出・増幅法を用いて第一次 WHO 国際標準品 (96/790) を基準に国内標準品候補品の力価を算出することにより、その平均値から国内標準品の力価が 100 000 IU/ml と決定された。⁵⁾ 現在、HCV RNA 国内標準品は感染症研究所から入手可能である。

一方、NAT の特異性の評価、ジェノタイプ毎の検出感度の評価に用いる参照パネルの作製状況を Table 3 に示す。国際参照パネルは HCV と HIV について用意されている。国内参照パネルは HCV, HIV, HBV の標準パネル血漿がいずれも厚生労働科学研究費補助金「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」(主任研究者吉澤浩司)⁶⁾により作製されており、今後公開予定とされる。HCV 国内標準パネル血漿の詳細を Table 4 に示す。この標準パネル血漿は献血された新鮮凍結血漿をもとに作製されたもので、HCV 抗体が出現する前のウィンドウ期の血漿とキャリア期の血漿に、感染既往期の血漿及び陰性対照血漿を加えた計 100 本が選定されている。HCV パネルには国内に存在する代表的なジェノタイプである 1a, 1b, 2a, 2b の 4 種類が網羅されている。標準パネル血漿の HCV RNA 量 (copies/ml) は、報告書⁶⁾にある換算表により WHO の力価 (IU/ml) との相互換算が可能である。

Table 3. International and National Reference Panels

	International Reference Panel (NIBSC)	National Reference Panel ⁶⁾
HCV	02/202 6 samples (6 major genotypes) non WHO reference material	100 samples (5 genotypes and negative controls)
HIV	01/466 11 samples (10 different genotypes and a negative control) WHO international standard	100 samples (subtype A, B, E, negative control)
HBV	—	100 samples (genotype A, B, C, D, F; subtype adw, adr, adr mutant, ayr, negative)

2-5. 血液製剤等の HCV 安全対策 血液製剤等のウイルス安全対策として、製造メーカーには、①国内標準品や適当な参照パネルを用いて、各社で採用している NAT のバリデーションを実施し、当該 NAT の検出限界が 100 IU/ml の精度となるよう精度管理を行うこと、②血漿分画製剤の製造工程には、ウイルスが十分に除去・不活化されていることを確認できる、少なくとも 10⁹ 以上のウイルスクリアランスを示す製造工程を導入することが前述の「四課長通知」により求められている。また、輸血用血液製剤については、医療機関は患者に対して輸血前後の HCV, HBV, HIV の検査を実施することが「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」(平成 17 年 3 月 10 日薬食発第 0310012 号厚生労働省医薬食品局長通知, 平成 20 年 12 月 26 日一部改正)により求められている。

一方、国は血漿分画製剤メーカーや輸血前後のウイルス検査を実施する機関に対して、NAT の品質管理に係るコントロールサーベイを実施している。コントロールサーベイとは、HCV, HBV, HIV それぞれの国内標準品を血漿で希釈した検体を参加各施設にブラインドで配布して試験を実施することにより、各施設で実施している NAT の感度・精度等の状況を把握し、必要な対策を取るための調査試験の性格を持ち、これにより NAT の検出感度の向上及び標準化に努めている。

Table 4. HCV RNA National Genotype Panel for Standardization of NAT Assay

Genotype	Classification*	Panel Number	HCV RNA (copies/ml)
1a	carrier period	2	8.1 × 10 ⁵ ~ 1.0 × 10 ⁶
	window period	12	9.0 × 10 ² ~ 6.9 × 10 ⁷
1b	carrier period	5	4.5 × 10 ³ ~ 2.9 × 10 ⁷
	window period	1	4.5 × 10 ⁷
2a	carrier period	10	3.2 × 10 ⁵ ~ 5.2 × 10 ⁷
	window period	11	1.9 × 10 ⁵ ~ 6.7 × 10 ⁷
2b	carrier period	3	3.2 × 10 ⁶ ~ 2.3 × 10 ⁷
	window period	8	4.8 × 10 ⁵ ~ 8.5 × 10 ⁷
—	anamnestic infection	46	Not detected
	negative control	2	Not detected

* window period: HCVAb < 1.0; carrier, anamnestic infection: HCVAb ≥ 1.0. Data were collected from the original report.⁶⁾

3. NATによるHCV検出の高感度化のためのウイルス濃縮法の開発

NATは目的とする遺伝子を数コピーから数十コピーという高感度で検出できる方法であるが、検出限界よりさらに低い濃度のウイルスが存在する場合には検出不可能である。最初に述べたように、感染初期のウィンドウ期のHCVは極めて低濃度のウイルス量でも感染が成立すること、また細胞組織加工医薬品のような製品ではウイルスの不活化・除去が行えないことから、可能な限り高感度なウイルス否定試験の開発が望まれている。

NATによるウイルス検出をより高感度化する方法の1つの方法として、ウイルスを濃縮後に検出することで検査にかかる検体の用量を増加させる方法がある。われわれは新規ウイルス濃縮法として、ポリエチレンイミン結合磁気ビーズ(PEI磁気ビーズ)を用いた手法を開発し、HCVを始め多くのウイルスがPEI磁気ビーズに吸着して濃縮可能であり、NATによるウイルス検出を高感度化できることを報告した(Table 5)^{7,8)}ウイルス濃縮法の原理としては、主としてPEIの陽性荷電とウイルス表面分子の陰性荷電との静電的相互作用によりウイルスがPEIに吸着して濃縮されると考えている(Fig. 1)。

HCVの濃縮については、細胞組織加工医薬品の試験への適用を想定した培養上清中のHCV、及びドナースクリーニングへの適用を想定した血漿中のHCVのいずれの場合も、PEI磁気ビーズによりほぼ定量的に濃縮されることが確認された(Fig. 2)。HCVの検出感度をHCV RNA国内標準品を用いて検討した結果、1mlのウイルス液からPEI磁気ビーズで10倍濃縮を行うことにより検出感度が向上し、1IU/mlがほぼ確実に検出可能となった。ま

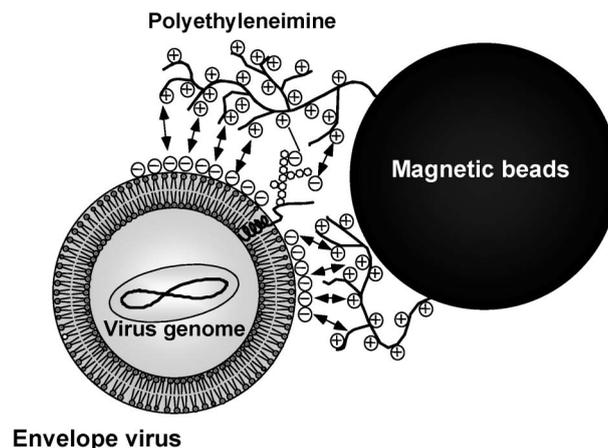


Fig. 1. Mechanism of Virus Concentration by PEI Beads

Table 5. Summary of Concentration of Viruses by PEI beads

Viruses	Natural host	Virus genome	Envelope	Size (nm)	PEI-beads concentration
Model Viruses					
Cytomegalovirus (CMV)	Simian	DNA	+	180–200	+
Herpes Simplex Virus Type-I (HSV-1)	Human	DNA	+	150–200	+
Vesicular Stomatitis Virus (VSV)	Bovine	RNA	+	70–150	+
Amphotropic Murine Leukemia Virus	Murine	RNA	+	80–110	+
Sindbis Virus	Human	RNA	+	60–70	+
Adenovirus Type 5	Human	DNA	–	70–90	+
Simian Virus 40 (SV40)	Simian	DNA	–	40–50	+
Porcine Parvovirus (PPV)	Porcine	DNA	–	18–24	+
Poliovirus Sabin 1	Human	RNA	–	25–30	+*
Human Hepatitis Viruses					
Hepatitis B Virus (HBV)	Human	DNA	+	40–45	+*
Hepatitis C Virus (HCV)	Human	RNA	+	40–50	+
Hepatitis A Virus (HAV)	Human	RNA	–	25–30	+

* Concentrated by the addition of antibodies.

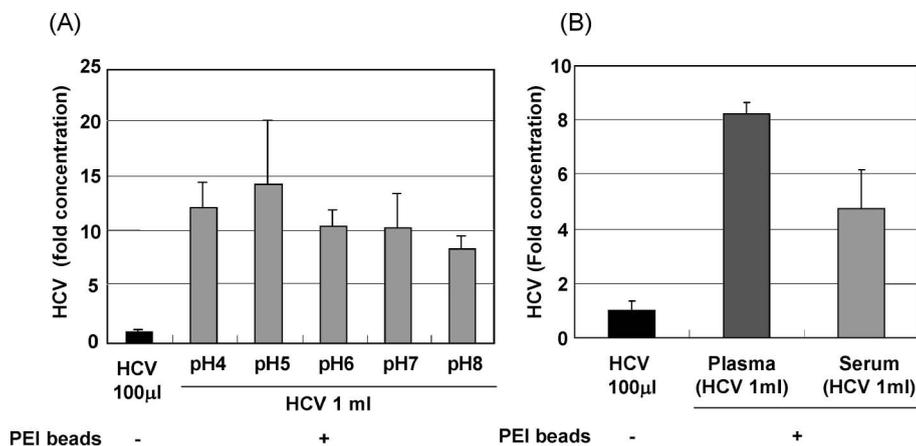


Fig. 2. HCV concentration by PEI beads

(A) HCV was spiked in cell culture medium containing 2% fetal bovine serum. (B) HCV was spiked in human plasma or human serum.

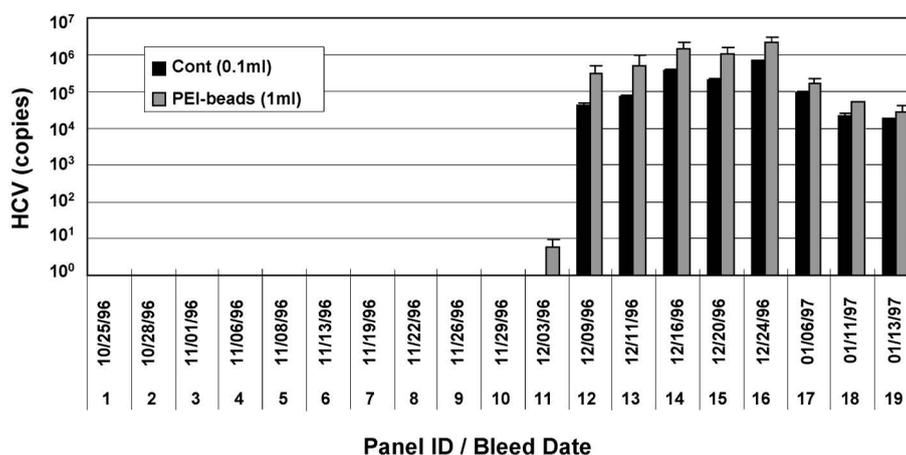


Fig. 3. Application of PEI Beads Concentration Method to HCV Seroconversion Panel

た、HCV濃縮の特異性を検討するため、市販のHCVジェノタイプパネルからジェノタイプや由来する国の異なる10種類のパネル血漿を選んで10倍濃縮を行ったところ、すべて5倍以上の濃縮が得られ、ジェノタイプが異なるものでも適用可能であることが示された。さらに、HCVのセロコンバージョンパネル（HCV感染後のウィンドウ期の初期に短期集中して採血されたシングルドナー血漿）を用いて検出の有効性を検討した結果、PEI磁気ビーズ濃縮を行うことにより、濃縮せずに直接検出した時と比べて6日早く採血された検体についてもHCVが検出可能となり、ウィンドウ期が短縮された（Fig. 3）。これらの結果から、PEI磁気ビーズ濃縮法はNATによるHCV検出の高感度化に有用であり、医薬品のウイルス安全性確保に重要なドナーのスクリーニングにも適用可能と考えられる。

4. おわりに

血液製剤等のウイルス安全性確保を目的としてHCVの検査にNATが導入されたことにより、HCVの検出は高感度化されウィンドウ期は短縮された。しかしなおNATには検出限界があり、ウィンドウ期をなくすことはできないため安全性確保はいまだ十分とは言えない。より一層の安全性を確保するには、現在よりさらに高感度・高精度なウイルス検出手法の開発が望まれる。NATによるウイルス検出技術やその周辺技術は急速に進展しており、ウイルス濃縮法を含め様々な手法の開発が進められている。最新の技術を取り入れ、技術の進歩に即応した医薬品のウイルス安全対策が進められることが望まれる。

謝辞 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の

開発は、日本赤十字中央研究所の佐藤巧栄博士、岩田明子氏及び JSR ㈱ の日方幹雄博士、村田充宏博士との共同研究の成果であり、この場を借りて感謝申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究費及びヒューマンサイエンス振興財団政策創薬総合研究事業の支援を受けて行われたものです。

REFERENCES

- 1) Busch M. P., Hirschhorn D. F., Herring B. L., Delwart E. L., McAuley J., Murthy K. K., Alter H. J., *Transfusion*, **43** (9s), 32A (2003).
- 2) Hayakawa T., Yamaguchi T., Oshizawa T., Ishii-Watabe A., *Iyakuin Kenkyu*, **33**, 275–284, (2002).
- 3) http://www.tokyo.bc.jrc.or.jp/tmpfile/yougo/yousetsu_aa-oo.htm#uu-3, cited 04 December, 2009.
- 4) Yokoyama S., *Jpn. J. Transfusion Med.*, **48**, 279–285 (2002).
- 5) Mizusawa S., Okada Y., Horiuchi Y., Tanaka T., Sato K., Kaneko K., Sasaki Y., Tanaka T., Tomono T., Tomomizu T., Hayami S., Hijikata M., Hirako I., Mayumi M., Mikami K., Mishiro S., Miyamoto S., Muta K., Weimer T., Gierman T., Komuro K., Yamaguchi T., *Jpn. J. Transfusion Med.*, **51**, 515–519 (2005).
- 6) Yoshizawa K.: <http://mhlw-grants.niph.go.jp/index.html>, MHLW grants system database No. 200301268A., cited 04 December, 2009.
- 7) Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Hayakawa T., Yamaguchi T., *J. Virol. Methods*, **114**, 11–19 (2003).
- 8) Uchida E., Kogi M., Oshizawa T., Furuta B., Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Yamaguchi T., *J. Virol. Methods*, **143**, 95–103 (2007).