

薬事・食品衛生審議会  
平成22年度 第1回 血液事業部会安全技術調査会

議事次第

日時：平成22年6月23日（水）

13：30～14：30

場所：航空会館 701+702会議室

東京都港区新橋1-18-1

議題：

1. NAT ガイドラインについて
2. その他

配付資料：

座席表

委員名簿

- 資料 1 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について（平成16年8月3日付薬食発第0803002号厚生労働省医薬食品局長通知）
- 資料 2 諸外国における NAT 検出感度について
- 資料 3 日本赤十字社で使用している NAT の感度について（日本赤十字社提出資料）

薬食発第0803002号

平成16年8月3日

日本赤十字社社長 殿

厚生労働省医薬食品局長

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について

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）の実施については、これまで「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日付け医薬発第1047号貴職あて厚生省医薬安全局長通知）の別添「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」の「3. 1 工程前検査」において、ミニプール血漿及び原料プール血漿におけるHCV、HBV及びHIVに対するNATの実施について規定するとともに、「生物学的製剤基準の一部を改正する件」（平成12年厚生省告示第427号）及び「生物由来原料基準」（平成15年厚生労働省告示第210号）第2 血液製剤総則において、血液製剤の原材料として用いる血液について、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を行うことを義務付けてきたところである。

今般、血液製剤の安全性確保を目的としてNATを行う場合において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等に関する基本事項を示すため、平成16年7月7日（水）に開催された平成16年度第1回薬事・食品衛生審議会血液事業部会において、標記ガイドライン（別添）が取りまとめられた。

については、今後、生物由来原料基準に規定されるNAT並びに「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則」（平成11年厚生省令第16号）第7条及び「医薬品及び医薬部外品の輸入販売管理及び品質管理規則」（平成11年厚生省令第62号）第4条に規定する品質管理基準書におけるNATの実施に関する手順は、本ガイドラインに規定された方法を遵守するよう、貴職におかれても御了知の上、貴管下製造所に対し周知徹底願いたい。

なお、標準品の所有者は国立感染症研究所であるが、その配付については現在保管している埼玉県赤十字血液センターから必要量を送付することとしたので、別紙申請書に必要事項を記入し、当局血液対策課あて必要量を提示願いたい。また、上記部会においては、今後定期的にNATの品質管理に係るコントロールサーベイを実施することとされており、具体的な方法については、同課を中心として今後検討を行う予定であるため、当該サーベイの実施に当たっては協力方願いたい。

**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**

## 1. ガイドラインの目的及び適用範囲

### 1-1) 目的

ウイルス遺伝子の検出法として用いられる核酸増幅検査 (Nucleic Acid Amplification Test、以下「NAT」という。) は、目的とするウイルス遺伝子の有無を陽性又は陰性として判定する定性的な検査手法であり、数コピーから数十コピーのウイルス遺伝子の検出が可能とされている。特に、このような微量のウイルス遺伝子の検出が要求される NAT をスクリーニング検査として用いる場合、検出感度等に係る精度管理が適切に行われていることが極めて重要である。

本ガイドラインは、血液製剤の安全性確保を目的として NAT を行う場合において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等に関する基本事項を示すことを目的とするものであり、「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 (平成 11 年 8 月 30 日付け医薬発第 1047 号)」を補完するものとして位置付けられるものである。

なお、血漿分画製剤の製造工程におけるウイルスクリアランスを評価する場合や国際あるいは国内ウイルス標準品から自社の標準品を作製する場合など、ウイルス遺伝子の定量的な検出にも NAT は利用されることがある。このため、本ガイドラインにおいては、NAT は原則的に定性的な検査法として用いられるものとして記載しているが、必要に応じ定量的に用いる際に考慮すべき必要事項についても言及することとしている。

### 1-2) 適用範囲

本ガイドラインは、国内で使用されるすべての輸血用血液製剤及び血漿分画製剤に係る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、さらには必要に応じて行われる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ウイルス検査として NAT を行う場合に適用されるものであるが、他のヒトあるいは動物から抽出した生物由来の医薬品についても参照することができる。また、対象となるウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、C 型肝炎ウイルス (HCV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) とするが、その他のウ

ウイルスについても準用可能な点については参照することができる。

## 2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策

ウイルス遺伝子の検出を目的として定性試験である NAT を採用する場合、その分析法を検証するための重要な項目は特異性と検出感度の 2 点である。特に、プール血漿のスクリーニング検査に NAT を採用する場合には、特異性と検出感度の確保はより一層重要なものとなる。特に、検査機関等において、NAT を恒常的に実施し検査法として確立するには、ウイルス遺伝子の抽出、目的塩基配列の増幅、検出、定量、及びこれらを行うための機器の設定と試験に関する最適化した規格・基準を定めておく必要がある。

さらに、NAT の場合、分析条件の小さな変動が結果に大きな影響を与えることもあるため、分析法の頑健性についても、分析条件を小さい範囲で変化させても測定値が影響されないという信頼性を示すことで評価する必要がある。具体的には、塩化マグネシウム、プライマー、dNTP のような試薬の濃度を小さい範囲で変動させて最適な条件を求めるなど、試験する方法を確立していく過程で示すことができる。市販キットを用いる場合には、これらのデータについては、試薬製造メーカーのデータをもって代えることができる。

具体的に頑健性を示すためには、陰性試料（目的とするウイルスが陰性のプール血漿、あるいは試験を行うのと同様の組成の試料）及び陽性試料（目的ウイルスが陰性の血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の試料に検出感度（95%の確率で検出されるウイルス量）の 3 倍量のウイルスをスパイク（添加したもの）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。ウイルス遺伝子の抽出前に超遠心を使用する方法などでは頑健性に関して特に注意を払う必要がある。この場合、可能であれば目的とするウイルスに対する特異的抗体を持たないが目的とするウイルス遺伝子について陽性を認める複数の血漿を使用して試験することにより示すことができる。

### 2-1) 施設・設備の整備等に関する事項

NAT は、数コピーから数十コピーのウイルス遺伝子を検出できるため、増幅産物による汚染等に細心の注意を払う必要がある。このため、NAT に用いる施

設については、原則として下記の条件を満たしていることが望まれる。(\*1)

- ① 核酸抽出を行う場所  
可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと。
- ② 試薬の保管場所及び試薬の調製場所  
可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと。
- ③ 核酸増幅を行う場所  
可能な限り独立した施設ないしは設備を用いて行うこと。
- ④ 増幅産物の検出を行う場所  
増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋とを区別すること。

また、NAT では、感染性のある標準品や陽性試料を取り扱うことから、試験・検査は、製造区域とは明確に区別された場所で行うことが必要である。

## 2-2) 機器、器具の保全、管理に関する事項

ピペット、サーマルサイクラーの校正等、機器操作による検査結果の変動に関して評価を行うこと。この評価に加え、分析法全体の有効性と信頼性について評価を行うこと（システム適合性試験）。また、重要な装置（例えば自動抽出機やサーマルサイクラーなど）を何台か使用する場合、検査精度の確保及び試験方法の標準化に準じ各装置のバリデーションを行っておくこと。

## 2-3) (被験) 検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事項

### ① 検体の移送・保管に関する事項

検体の移送あるいは保管中の温度等が NAT の結果に与える影響についてあらかじめ評価をしておくこと。また得られた結果に基づいて、移送や保存中の温度等について条件設定をしておくこと。

また凍結保存を行う場合には、凍結融解が NAT の結果に及ぼす影響について評価しておくこと。

### ② 試薬の保管・管理に関する事項

核酸の抽出や NAT に用いる試薬について、後述する品質確保の他、保存期間中の安定性について評価を行いその実測値に基づいて保存条件を決めておくこと。

市販キットを使用する場合は、試薬製造メーカーのデータをもって代えることができる。(\*2)

#### 2-4) 核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項

##### ① 抽出に関する事項

スパイク実験等により、用いる抽出法について評価を行うこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

##### ② プライマー及びプローブに関する事項

プライマー及びプローブ（以下「プライマー等」という。）は核酸検出系の中心的役割を果たしており、その品質が NAT の重要な要素となっている。このため、選択したプライマー等の科学的合理性を説明できることが必要であり、プライマー等の大きさ、GC 含量、 $T_m$  値、想定されるヘアピン構造や 2 次構造についての情報を明らかにしておくとともに、次のような情報も明らかにしておくこと。

- ・ 目的とするウイルス遺伝子（亜）型（ジェノタイプ）等 (\*5) への対処として、採用しようとしている NAT が目的とするウイルスについてできる限り多くのサブタイプ／バリエーションを検出できるようにデザインされていることを示す情報。
- ・ 検出しようとするウイルス遺伝子の最も共通する配列の選択等、どのように複数のサブタイプ／バリエーションを検出できるようにしているのかを説明する情報。
- ・ 使用濃度等の条件設定に関する情報  
市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

##### ③ プライマー等の純度、ロット間差等の品質の確保に関する事項

プライマー等の純度について適切な測定法を用いて解析し、解析結果を示すとともに、必要に応じてその規格値を定めておくこと。さらに、プライマー等の最適濃度について、段階的希釈法での検出能を指標とするなどして解析するとともに、ロット間の一定性についての情報や、複数のロットの合成プライマー等の特性解析結果やイールド等についての詳細な情報を明らかにし

ておくこと (\*3)。なお、プライマー等の化学修飾を行う場合には、その詳細に係るデータを含む説明資料を作成しておくこと。

市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

#### ④ 使用する酵素の品質の確保に関する事項

NAT に用いるすべての酵素について、その由来と機能を明らかにしておくこと。酵素の純度、力価、比活性について受入れ規格を定めておくこと。調製した酵素について、エクソヌクレアーゼ活性、DNA 及び RNA 依存性のポリメラーゼ活性等を明らかにしておくこと。市販の試薬を用いる場合には、試薬メーカーによる解析結果をもって代えることができる。

#### ⑤ 受入れ基準の設定

試薬や反応液の受入れ規格を、適切な評価に基づいて作成しておくこと。

### 2-5) 試験の最適化と特異性の確認、非特異的反応の除去に関する事項

#### ① 特異性の確認 (目的とする遺伝子の検出)

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、目的とする核酸を確実に検出する能力をいう。NAT の特異性は、プライマー等の選択、プローブの選択 (最終産物の検出に関する)、試験条件の厳密さ (増幅及び検出工程の両方) に依存している。プライマー等をデザインする際には、用いるプライマー等が目的とするウイルス遺伝子のみを検出できるとする根拠を示せること。

さらに、検出しようとする核酸の配列については、遺伝的によく保存されている配列が用いられる。検出しようとする核酸の配列、GC 含量の程度、さらには長さなどについて科学的合理性を説明できる必要がある。また、複数種のジェノタイプを検出できる根拠を、説明できること。定量的なアッセイを行う場合には、プライマー等のデザインと定量のための標準品の性質について説明できること。(\*4)

#### ② 交差反応性 (非特異的反応) の除去

類似ウイルスへの交差反応性の可能性についても特に注意すること。この場

合、公開されているデータバンクにより、選んだ全ての配列をデータ検索する方法が有効である。さらに、解析に用いたソフト、解析条件についても説明できること。なお、多くの場合、通常プライマー等を設計する際には、遺伝的によく保存されているウイルス遺伝子の領域が用いられる。(\*4)

### ③ 増幅産物が特異的である確認

増幅した産物は、ネステッド・プライマーによる増幅、制限酵素による解析、シーケンシングあるいは特異的なプローブによるハイブリダイゼーション等の方法によって確実に同定できることを示すこと。

NAT により目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できる能力はプライマー等、反応条件に依存する。これは適当な参照パネルを使用することによって証明すること。

分析法の特異性をバリデートするために目的とするウイルスについて陰性の血漿又はミニプール血漿を少なくとも 100 検体を試験し、陰性であることを確認し、記録を保存しておくこと。

・ ウイルス遺伝子 (亜) 型 (ジェノタイプ) 等 (\*5) に対する検出感度  
複数のジェノタイプ等のウイルスパネルを用いて試験を行い、各ジェノタイプ等に対してどれほどの検出能があるか評価しておくべきである。ウイルスパネルの選択にあたってはウイルスの分布と流行に関する地理的な疫学データ等を参照すること。(\*4)

## 2-6) 検出感度に関する事項

### ① 検出感度

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で、定量できるとは限らない量のことをいう。NAT によるウイルス否定試験は通常定性試験であって、結果は陰性が陽性のいずれかである。NAT では 95% の確率で検出される検体一定量あ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、検体中のウイルス遺伝子の分布や酵素の効率のような因子により影響され、個々のウイルス NAT でそれぞれの検出感度が存在する。

## ② 検出感度の求め方

### ・希釈系列の作製

標準品の希釈系列を作製すること。希釈液の数を処理しやすい数にするためには、予備試験（例えば指数段階的に希釈を作製するなど）を行い予備的な陽性検出感度値（すなわち陽性シグナルが得られる最大希釈倍率）を決定する。希釈範囲は、予備的な検出感度値付近を選択する（希釈液として陰性血漿を用い、希釈率として 0.5log またはそれ以下を使用する。）。あるいはバリデートされた定量的 NAT を用いることも可能である。95%の確率で検出されるウイルス遺伝子の量は適切な統計学的手法等により算出し、その妥当性について説明できること。

NAT においては、各試験の精度や感度を管理するためには標準品あるいは標準物質（参照品）が必須である。通常、NAT の開発過程における、ウイルス濃縮、遺伝子の抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、定量、汚染をモニターするための標準品又は参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

ランコントロールにおいては、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陽性コントロール (strikethrough:標準検体) を用いることが推奨される。試験では、この陽性コントロール (strikethrough:標準検体) は必ず陽性にならなければならない。このように陽性コントロール (strikethrough:標準検体) を用いることにより、各試験の成立をモニターすることが可能となる。

### ・3 回以上の独立した試験の実施

少なくとも 3 つの独立した希釈系列を用い、十分な回数の試験を繰り返し、各希釈段階での総試験回数が 24 になるように試験を実施する。例えば、3 つの希釈系列を別々の日に 8 回行う、4 つの希釈系列を別々の日に 6 回行う、6 つの希釈系列を別々の日に 4 回行うなどである。これらの結果は試験法の日差変動を示す役目も果たしている。

交叉汚染が防止できていることを示すために、陰性プール血漿と高い濃度で目的とするウイルスをスパイクした陰性プール血漿（濃度としては 95%の確率で検出されるウイルス量の 100 倍量以上）を、少なくとも 20 検体をラン

ダムに配置するなどして、試験することにより確認しておくこと。(\*6)

・使用する標準品

- 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等（参照品）

等のいずれかを使用すること。

**2-7) 判定基準の設定に関する事項**

- ① 陽性及び陰性の判定基準の文書化

陽性及び陰性の判定基準を文書化しておく必要がある。

- ② 再試験を行う時の基準及び判定基準の文書化

再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておく必要がある

**2-8) 従事者の技術の標準化と向上に関する事項**

NAT は、数コピーから数十コピー (\*7) のウイルス遺伝子の検出が可能とされる高感度検査であるため、操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。市販のキットを試験法の一部または全てに使用する場合で、キットの製造元で実施されたバリデーション資料がある場合はユーザーによるバリデーションデータに加えることができる。しかし、その目的に応じたキットの性能を示す必要がある。

例えば、二人以上の者が試験を実施する場合、試験者ごとに、目的とするウイルスを、95%の確率で検出される3倍量の標準品あるいは標準物質等をスパイクした陰性プール血漿あるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料について試験を実施すること。この試験（8本の試験検体）を別々の日に3回繰り返すこと（すなわちのべ3日の試験により計24試験が実施されることになる）。その結果が全て陽性になることを確認し、結果を保存しておくこと。

- ① 作業手順の標準化と作業手順書の作成

NATのような試験は、分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の

要因の影響をうけ易いので、試験操作法を標準化し、正確な作業手順書を作成すること。作業手順書は以下の項目を含むものとする。

- ・ サンプリングの方法（容器の種類等）
- ・ ミニプールの調製方法
- ・ 試験までの保存条件
- ・ 交叉汚染やウイルス遺伝子・試薬・標準検体の劣化を防止するための試験条件の正確な記述
- ・ 使用する装置の正確な記述
- ・ 統計解析を含む結果の詳細な計算式

## ② 検査従事者を対象とした教育・訓練、技能検査の実施

NAT の恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT 従事者に対して教育・訓練を行うとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

## ③ 作業記録の作成、保管・管理

作業記録を作成し、必要に応じ照会できるよう必要な期間にわたって適切に保管・管理を行うこと。

### 2-9) 汚染防止に関する事項

#### ① 試験操作中の器具などを介した汚染の防止策

試験操作中において器具などを介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ② 着衣、履物等を介した汚染拡大の防止策

着衣、履物等を介した汚染の防止策を講じておく必要がある。

#### ③ 増幅産物の飛散等による汚染の防止策

増幅産物の飛散による汚染の防止策を講じておく必要がある。

## 3. 試験、検出結果の意義づけ

### 3-1) 「陽性」と判定した結果の意義

NAT で「陽性」と判定した際に、取るべき手順を文書化しておくこと。

### 3-2) 「陰性」と判定した結果の意義

NAT で「陰性」と判定した結果について、検出限界を考慮したその意義を考察しておくこと。また、他の事由から結果が偽陰性の可能性がでてきた場合、取るべき手順を文書化しておくこと。

### **3-3) 必要とされる検出限界値 (\*8) について**

必要とされる検出限界値については、対象となるウイルス毎に別途に示す。

## **4. 新技術の導入に関する事項**

NAT 及び NAT 関連技術の進歩は急速であるため、可能な限り最新の科学的水準に基づいた技術導入を図ること。なお、その際には、導入される新技術について適切な評価を行っておくこと。

**【用語集】**

○ 標準品

国際的ないしは国内の公機関によって策定された国際標準品あるいは国内標準品

○ 標準物質 (参照品)

標準品に対して校正された標準となる物質

#### 注意事項\*1

「原則として下記の条件を満たしていることが望まれる」とは、自動化された閉鎖系での抽出装置を用いるなど、交差汚染を防ぐ装置が用いられていたり、交差汚染を防ぐ適切な手段が採用されている場合などでは、そのような手段を用いることによって「下記の条件」を満たすことが可能な場合もあることを意味している。この場合、そうした対策の妥当性を説明するとともに、必要に応じて交差汚染防止が十分に成されていることを示すデータの提示が求められるであろう。言い換えれば下記の4条件を満たすようななどのような独自の対策とその妥当性を示すことによって、用いる施設や装置についてはケースバイケースで判断できるということである。

#### 注意事項\*2

2-3) 及び2-4) 等で試薬製造メーカーのデータを提出することによって必要とされるデータに代えようとする場合にどの程度のデータが必要とされるかは採用しようとしている試験法等に依存するためにケースバイケースで判断する必要がある。しかし、少なくともガイドラインの趣旨に添ったデータが提出される必要があり、もし十分なデータが試薬製造メーカーによって提供されない場合には各申請者が必要なデータを作成しなくてはならないケースも想定される。また企業の知的財産等の関係で試薬製造メーカーから全てのデータが申請者に提出されない場合、診断薬等としてすでに承認を受けている場合には、その承認書に関するデータを試薬製造メーカーより直接規制当局へ提出するか、あるいはドラッグマスターファイルに準じた取り扱いが必要となると考えられる。但し、診断薬としての承認に必要とされるデータと血漿分画製剤のNATにおいて必要とされるデータは必ずしも同一ではない可能性があり、追加のデータが必要となることも考慮すべきである。

#### 注意事項\*3

ここで述べられている詳細な情報とは、プライマー等の特性解析結果としての純度、最適濃度、ロット間の一定性等を含めた情報であり、さらにロット間のイールド等のデータも含めて情報を明らかにしておくことにより、イールド等がその基準に達しないときには製造されたプライマーの品質が何らかの問題がないか検討する必要性を指摘したものである。

#### 注意事項\*4

2-5) 試験の最適化と特異性の確認や2-6) 検出感度はNATによるウイルス検出の根幹であり、市販試薬等でその製造メーカーからの情報ではその妥当性が立証されない場合が想定され、必要に応じて複数のウイルスジェノタイプ等の検出能や国内あるいは国際標準品を用いた検出感度の評価が必要になることもあると思われる。この点に関して、試薬製造メーカーからガイドラインで求められている程度に必要なデータが提供される場合には、それで代えることも可能である。

#### 注意事項\*5

遺伝子型の分類として、HBV と HCV ではジェノタイプが、HIV については主としてサブタイプという表現が使用されている。

ここでの記載の目的は、NAT によるウイルスゲノム検出に当たって、ウイルスゲノムの塩基配列の差異によらずできる限り多くのジェノタイプやサブタイプを検出できることを示すことを求めているものである。従ってここでは、それらを全て包含することを目的として「等」としている。

#### 注意事項\*6

陰性血漿とウイルスをスパイクした血漿を合わせて 20 本以上を適切な比率でならべて試験を行う。具体的な比率については自動化された機器をもちいるのか、用手法によるのか等によって異なると考えられる。

#### 注意事項\*7

ここで述べる数コピーから数十コピーのウイルスゲノムの検出は、一般的な NAT に関する情報を示すものであり、検出感度の設定に当たってコピー数での表示を求めるものではない。

#### 注意事項\*8

NAT による検出感度について、安全技術調査会で議論を行い HCV についてはプール前の原血漿で 5000IU/mL とするとの結論を出している。HBV、HIV についても別途定める必要がある。これらの検出感度については、プールサイズの変更、NAT の技術進歩、周辺技術の改良等により適宜見直しをすることが必要と考えられる。従って、最新の科学技術の進歩に応じて柔軟に設定すべきものと考えられるので、指針本体ではなく別途定め通知するものとする。

薬事・食品衛生審議会  
血液事業部会 安全技術調査会

平成 22 年 6 月 23 日  
国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
主任研究官 水澤 左衛子

諸外国における NAT 検出感度について

厚生労働省「血液製剤の安全性向上のために実施される肝炎ウイルス等検査法の精度管理評価に関する研究班」（代表者：水澤左衛子 国立感染症研究所）平成 20 - 21 年度報告より

<概要>

血液製剤を介した肝炎等ウイルス感染にかかわる安全性確保対策は社会的に重要な課題である。国の基準に基づいて採血した献血血液を複数の病源体について抗原・抗体検査を実施し、さらに、「NAT ガイドライン」に基づいて、C 型肝炎ウイルス (HCV)、B 型肝炎ウイルス (HBV) ヒト免疫不全ウイルス (HIV) について核酸増幅試験 (NAT) を実施して、抗原・抗体検査のウィンドウ期の血液を排除している。血漿分画製剤は数千～数万人分の血漿をプールしたものを原料としている。製造所は原料血漿プールの HCV、HBV 及び HIV についての NAT を実施しているが、4 課長通知で検出感度の目標を 100 国際単位 (IU) /mL としている。一方、輸血を受けた患者さんが万一これらのウイルスに感染した場合の早期発見と原因究明のために、輸血後にウイルス検査をすることになっており、HBV 検査として NAT を実施している（遡及調査のガイドライン）。薬事・食品衛生審議会血液事業部会の指示に基づいて、平成 17 年度から厚生労働科学研究費補助金によって、これらの施設で実施されている NAT の精度管理の実情を把握する目的でコントロールサーベイを実施してきた。すでに、HCV と HBV については全ての施設において NAT の感度が適切であることを確認した。

本研究において、平成 20 年度には HIV-NAT の感度パネルを用いたコントロールサーベイによって血漿分画製剤製造所と輸血用血液の NAT スクリーニング施設において 100IU/mL を 95% 検出すべく NAT の精度管理が実施されていることを確認した。平成 21 年度には次の段階として HBV の遺伝子型パネルを用いたコントロールサーベイを実施し、対象施設である血漿分画製剤製造所と輸血用血液の NAT スクリーニング施設及び衛生検査所のいずれの施設が実施した測定によっても遺伝子型にかかわらず HBV-DNA を検出あるいは定量できることを確認した。以上の結果は既に平成 21 年度第一回及び第三回血液事業部会運営委員会に報告した。

ところで、上述の通り、4 課長通知では血漿分画製剤製造販売業者等が原料血漿プールで実施する 3 つのウイルスの NAT の検出感度を 100IU/mL としている。一方、輸血用血液のスクリーニング検査の HCV-NAT の検出感度については、NAT ガイドラインにより 5000IU/mL の個別の陽性血漿を検出できる試験法で行うこととされ、HBV-NAT と HIV-NAT については別途定めることとして実質上 HCV-NAT の感度を準用してきた。EU と日本において

HCV-NAT の感度を個別の陽性血漿で 5000IU/mL としたのは、NAT 導入当時において 50 人ミニプールを検出感度 100IU/ml の試験法で検査するのが現実的な方法との実情を反映させたものである。

今般、本研究班の活動の一環として、輸血用血液の HIV-NAT スクリーニング検査の感度についてドイツ PEI と米国 FDA の関係者から資料を入手して比較検討した（表 1）。ドイツでは 2003 年の通告—核酸増幅法による HIV-1-RNA 定量検査に関する命令—において「使用する検査方法は個別の供血について HIV-1-RNA 量 10,000IU/mL 以上を確実に判定できるものでなければならない」と定め、自社の試験の適格性を実証するために PEI が年一回実施するラウンドロビン試験に参加することを義務付けている（「連邦官報第 103 号 12269 頁」）。FDA は公式の文書はないものの、FDA が個別の供血の検査のために作製した HIV-1-RNA 標準品は 10,000IU/mL である（第 17 回 SoGAT 会議、2004 年パリ、発表資料）。英国においては HCV-NAT のみ実施が定められている。HBV-NAT は NAT ガイドラインと遡及調査ガイドラインに基づいてわが国独自に実施している NAT であり、諸外国においては事業者の自主的な実施に委ねられている。

表 1 日本及び諸外国における血液製剤のウイルス安全性確保を目的とした NAT 試験に求められる検出感度の比較

国名	血漿分画製剤の原料血漿プール			輸血用血液（個別）		
	HCV-RNA	HIV-RNA	HBV-DNA	HCV-RNA	HIV-RNA	HBV-DNA
日本	100	100	100	5000	実施	実施
アメリカ	100	100	NM	5000	10000	NM
ドイツ				5000	10000	NM
イギリス	100	NM	NM	5000	NM	NM

(国際単位/mL)

NM: 法的に求められていない

厚生労働省「血液製剤の安全性向上のために実施される肝炎ウイルス等検査法の精度管理評価に関する研究班」（代表者：水澤左衛子 国立感染症研究所）平成20-21年度報告書より

---

2003年5月6日に Paul-Ehrlich-Institut が発した通告「核酸増幅法によるHIV-1-RNA定量検査に関する命令」を邦訳したので紹介する。原文は後ろに添付した文書を参考にされたい。この邦訳について無断転載・複製を禁じる。

---

連邦官報

第103号 12269頁

2003年5月6日

血清・予防接種庁

Paul-Ehrlich-Institut (パウル・エーリッヒ研究所)

医薬品の認可・登録に関する通告

(細胞成分含有血液製剤ならびに新鮮凍結血漿を介した HIV-1 感染のリスク低減)

—核酸増幅法による HIV-1-RNA 定量検査に関する命令—

2003年5月6日

2001年4月23日に Paul-Ehrlich-Institut が実施した書面による意見聴取の結果(「連邦官報」9506頁)を受け、措置に関する命令を取り下げたうえで、製造業者に対して自家試験法の能力をラウンドロビン試験で実証できる機会を与えることとする(2001年8月27日付「連邦官報」19365頁「通告」を参照)。これに伴い、細胞成分含有血液製剤ならびに新鮮凍結血漿を上市する製造業者を対象に、下記の決定事項の遵守を求める。

#### 決定事項

1. 2004年4月30日以降に上市される細胞成分含有血液製剤ならびに新鮮凍結血漿には、ポリメラーゼ鎖反応(以下 PCR)等の適切な核酸増幅法(以下 NAT)でヒト免疫不全ウイルス1型(以下 HIV-1)ゲノムが検出されなかった供血者の血液を使用する。なお、凍結成分製剤については、当該製剤の製造に使用された血液の代わりに、同一供血者から続いて採取された血液(検体)を検査対象としてもよい。使用する検査方法は、個別の供血について HIV-1-RNA 量 10,000 IU/mL 以上を確実に判定できるものでなければならない(標準品: HIV-1-RNA 量に関する WHO 標準品 [97/656] で  $10^5$  IU/mL)。

2. プラズマフェレーシスにより調製され貯留保管された新鮮凍結血漿に関する事項として、血液検体はその供血者から遅くとも3ヵ月後に採取され、かつ上記の標準品に従って HIV-1 の NAT で陰性が確認されている限り、HIV-1 の NAT 以外の方法で検査した供血も使用可とする。

3. 自家試験法については、下記の諸条件を充足しているものとする。

a) CPMP (欧州医薬品委員会) 指針「分析手順のバリデーションに関するガイダンス文書『手法』」(CPMP/ICH/281/95) ならびに「分析方法のバリデーションに関するガイダンス文書『定義と専門用語』」(CPMP/ICH/381/95) に従って標準品でバリデーションされていること。この場合、HIV-1 の NAT に関するバリデーションは、HCV の NAT に関する勧告事項 (<http://www.pei.de/downloads/loadlink.htm>) に従って実施されていなければならない。当該勧告事項から逸脱する場合には、検査の手順が実質的に同等であり適格性に問題ない旨明示しておく。NAT のバリデーションに関する資料は、2003 年 12 月 1 日までに検査開始に先立ち Paul-Ehrlich-Institut に提出する。

b) 自家試験法の適格性については、Paul-Ehrlich-Institut が指定するラウンドロビン試験のうち1法で実証し、さらに Paul-Ehrlich-Institut が指定する別のラウンドロビン試験 (1年毎の予定) で確認されなければならない。

4. 本要件に関する命令にかかる費用については定めない。

## I

上掲の諸要件に関する命令は、輸血を介した HIV 感染リスクの低減を目的として、薬事法第 28 条第 3 項 c に従って実施する。HIV 感染者は AIDS に移行することが多く、高度の治療方法が実践可能であるにもかかわらず、その致死率は今なお高い。したがって、輸血を介した HIV 感染リスクを低減できる方法があれば、技術的な問題がない限り、速やかに導入することが原則となる。細胞成分含有血液製剤の場合、不活化が未実施なので、供血者の感染が抗体検査で抗体産生を検出できるレベルに到達していない (すなわちウィンドウピリオド) のであれば、HIV 感染が伝播するリスクは否定できない。現在、供血スクリーニングに NAT を導入することで、供血 1 単位あたりの HIV-1 量として 10,000 IU/mL 以上を検出することが技術的に可能となっており、HIV 感染の点からみた供血の安全性を向上させるうえで有用である。

「感染初期におけるウイルス血症の経過」「HIV-RNA の検出によってウィンドウピリオドを短縮できる可能性」について Paul-Ehrlich-Institut が公表した調査結果は、他の研究グルー

プによって裏づけられている (M. P. Busch 「HIV、HBV および HCV : 輸血の安全性に関する新たな展開」 Vox Sang 2000; 78 (suppl. 2)) 253-256)。その後、HIV-1 の NAT により、血清学的検査法で診断されるウィンドウペリオドを平均 15 日間まで短縮することが可能となった。HIV の増殖速度が HCV に比べて低いため、感染初期のウイルス量は低い、ウィンドウペリオド終了時には  $10^7$  コピー/mL の RNA が検出される。

1997 年、Paul-Ehrlich-Institut では、濃厚赤血球液を製造する製造業者を対象に、HBV、HCV、HIV-1 ゲノムの供血者スクリーニング方法として NAT を導入することについての意見聴取を行った。当時は HIV-1-RNA の検出に適した市販の検査系がなく、また HIV-1-RNA 国際標準品も確立されていなかったことから、HIV-1-RNA の NAT の実施はされなかった。

その後、Paul-Ehrlich-Institut には「供血が血清学的検査で陰性を示していたにもかかわらず、これを原料とする細胞成分含有血液製剤から HIV 感染が発生した事例」として 4 件の報告が寄せられた。しかし、保存検体中の HIV-1 を NAT で定量化したところ、そのウイルス量はいずれの事例でも相対的に高かった (HIV-1-RNA 量は 17,000 コピー/mL、25,000 コピー/mL、さらに 2 件は 75,000 コピー/mL 以上。HIV-1-RNA 量の 1 コピーは約 2 IU に相当)。

現在、ドイツ国内で上市されている血液製剤の約 70%については、製造した製造業者が自主的に HIV の NAT を実施している。1997 年以降、供血が本法で HIV-1 陽性を示して不合格となった事例は 5 件以上にのぼる。

## II

現時点では、個別供血検体あたりの HIV-1-RNA 量として 10,000 IU/mL (RNA 量 約 5,000 コピー/mL に相当) 以上の検出感度をもつ NAT を導入すれば、Paul-Ehrlich-Institut に報告される HIV 感染を阻止するうえでも、また HCV-RNA 試験で用いているプール血漿を共用することが可能となるうえでも現時点では十分かつ適切といえる。しかしながら、検出感度を実質的に高めるためには、新たなリスクファクターを初期段階で経験的に検出できるような画期的なプロセスが不可欠であろう。この点からみて、特定されているウィンドウペリオドを短縮できる可能性は未だ最大域に達していないものと考えられる。

HIV-1 の NAT の導入を必須とするもうひとつの理由は、血液製剤を介した HIV 感染リスクをさらに低減させることである。製造業者によっては、コストパフォーマンスの良さから、NAT ではなく p24 抗原検査を代用するよう勧めている社も存在する。しかし、Paul-Ehrlich-Institut の調査によれば、4 件の HIV 感染事例のうち p24 抗原検査で証明されたのは 1 件にすぎなかった。検出感度 10,000 IU/mL 以上をもつ NAT がウィンドウピリオドで供血から HIV-1 を検出できる確率は p24 抗原検査よりも大幅に高く、この点についてはセロコンバージョンの経過に関する比較分析法によって裏づけられている。したがって、HIV-1 の抗原検査は NAT の代用にはならないものと考えられる。感度不十分な検査法の使用が指示されていたために、互いに異なる検査を経た血液製剤がドイツ国内で上市されていたこと、また既存の NAT から低感度の検査法に切り換えた製造業者が若干存在していた可能性があることは認めざるを得ない。

自家試験法の方法ならびに手順に関するバリデーションの実施は、1995 年 5 月 5 日付「医薬品の試験に関するガイドライン」（1995 年 5 月 20 日付「連邦官報」第 96a 号第 1 章 C「一般要件」）で規定されている。このため、自家試験法を対象としたバリデーションに関する資料は、薬事法第 28 条第 3 項 c 第 2 号に従って Paul-Ehrlich-Institut に提出しなければならない。バリデーションの実施に際しては、その実施や手順に関する公認ガイドラインとして CPMP 指針「分析手順のバリデーションに関するガイダンス文書『方法』（CPMP/ICH/281/95）ならびに「分析方法のバリデーションに関するガイダンス文書『定義と専門用語』（CPMP/ICH/281/95）を使用する（<http://www.emea.eu.int/index/indexh1.htm>「品質に関する ICH 公認ガイドライン、テーマ Q2A ならびに Q2B」を参照）。バリデーションに関する資料は、Paul-Ehrlich-Institut で規定に基づいた審査を行えるよう適時に提出すること。審査期間については 3 ヶ月と考えたい。なお、提出する資料については、供血に関する原資料、供血由来の各血液製剤の原料に関する資料のいずれでも可とする。

HIV-1-RNA 検査の実施に際しては、HIV-1 の NAT について 1999 年 11 月より適用されている WHO 標準品 (No. 97/656、NIBSC [国立生物学的製剤研究所、英国]) を用いる。なお、本標準品は HIV-1 サブタイプ B を用いて製造されている。アンプル 1 本あたりの HIV-1-RNA 量は  $10^5$  IU/mL とする (HIV-1-RNA 量の 1 コピーは約 2 IU に相当)。HIV-1 の NAT については、HIV-1 M 群の各サブタイプをほぼ同一の感度で検出できることが確認されている。なお、定量した HIV-1 M 群のサブタイプの検体は、レトロウイルスに関する国内リファレンスセンター (Erlangen 大学) から入手できる。

血液製剤による重大な感染症のリスクを低減するための多大な努力が製造業者に求めら

れているのであれば、製造業者は公益の擁護を鑑み、これに対する必要かつ適切な措置をしかるべき形で講じなければならない。検出感度の範囲を適切に定め、これによって各供血の検体を集約できる可能性を勘案し、NAT の分野における開発の現状を顧慮する。

Paul-Ehrlich-Institut では、製造業者が自社で使用する検査方法の質ならびに適格性を継続的に確認する目的で、Paul-Ehrlich-Institut が定める年 1 回のラウンドロビン試験への参加を義務づける必要があるものと考えている。既に実践されているラウンドロビン試験の評価からは、若干の製造業者で自社開発された NAT 法（自家試験法）について、HIV-1-RNA を所期の感度で検出するうえで有用であることが明らかにされた。総じて、HIV-1 の NAT から得られたデータの質は、ラウンドロビン試験として同時に実施された HCV の NAT（自家試験法）に関するデータの質と大きく異なっていた。HIV-1 のサブタイプ A～E の量が 10,000 IU/mL 以上の場合には、ほとんどの検査法では検出可能であったが、中には必ずしも検出できない方法も存在した。自家試験法を使用しない企業に限っては、2001 年 12 月以降、Paul-Ehrlich-Institut が承認した NAT のうち 2 種類（供血 24 単位のプール検体用）を HIV-1-RNA の検出目的で使用できる。この NAT に即した調査では、ラウンドロビン試験におけるすべての陽性検体は NAT 陽性、またすべての陰性検体は NAT 陰性と判定された。こうした点を勘案すれば、「市販の検査法を組み合わせ使用している場合でも、命令に従って HIV-1 の NAT を優先すべきなのか」という製造業者の抗弁を受け入れることはできない。

NAT の導入費用（場合によってはライセンス費用を含む）については、受血者の生命や健康を守るための安全面から酌量しなければならない。各製造業者の財政状況が厳しい場合であっても、血液製剤による HIV 感染リスクを低減して公益を擁護するための措置を回避することは許されない。

感染リスクの低減に向けた本命令は、貯留保管されている新鮮凍結血漿にも適用される。確かに、学術文献あるいは Paul-Ehrlich-Institut への事例報告に「貯留保管後の HIV 感染を血清学的検査で証明することは不可能である」という文言は見当たらない。しかし、抗 HIV-1 抗体検査や抗 HIV-2 抗体検査で陰性を示した供血者であっても、NAT で陽性を示す所見が認められる可能性は否定できない。よって、ここでは感染リスクの低減という観点から NAT の実施を求める。また、このような供血者から続いて採取された血液もやはり陰性を示すであろうが、HIV-1-RNA の NAT で感染が証明される可能性はある。したがって、貯留保管されている新鮮凍結血漿で過去に陽性を示した事例がない場合であっても、HIV-1 の NAT に費用がかかるということを理由に感染リスクを容認してはならない。供血者に対する HIV-1-RNA 検査は、プラスマフェレーシスを用いて調製した新鮮血漿に対しても行う必要がある。というのは、HIV に感染しているながら抗体検査で陰性を示す供血者が存在するリスク、すなわち HIV に感染している供血者の検査で抗体が検出できないというリスクは、

検査を何度繰り返しても決して変わらないからである。現段階では、供血 1 単位あたりの検査費用を適切に判断することはできない。プラスマフェレーシスの対象となる供血者については、月あたり多数回の供血を許可する。また、当該供血者を対象とした HIV-1-RNA 検査については、少なくとも 3 ヶ月毎に行えば十分であるものとする。抗体検査が陰性の場合には、貯留保管期間における供血者の遡及調査が実施されず、感染リスクを有する多数の供血者由来血漿が在庫されてしまうおそれがある。したがって、追加検査の実施によってこうした事態を阻止することは必須である。この場合、貯留保管される血漿の提供者を対象とした HIV-1-RNA の検査については、3 ヶ月毎に行えば十分であるものとする。

本決定事項第 1 号に明示した期日については、「上記血液製剤の供給状況の確保」「製造業者で新規検査法への変更に伴い必要となる入れ換え作業」といった点を配慮した。凍結処理が施された血液製剤については、規定により、同一供血者から続いて採取された血液（検体）も HIV-1 の NAT の対象となる。しかし、既に貯留保管されている血液製剤のうち、2004 年 5 月 1 日以降でも品質が保持されるもの、あるいはその原料の提供者に対する HIV-1 の NAT が未実施となっているものを不合格品として扱うことは絶対に避けなければならない。

本命令は、薬事法第 28 条第 3 項 c に従って直ちに施行してよい。よって、異議や撤回の申し立ては速やかに行うこと。

本決定事項に定める要件の履行については、薬事法第 29 条第 1 項第 1 段および第 2 項第 1 段第 4 号に従い、同封の書式に記載したうえで「変更通知」という形で Paul-Ehrlich-Institut に申告する。www.pei.de の電子書式を使用しても差し支えない。供血に関する原資料が存在する場合には（2001 年 9 月 19 日付「連邦官報」21361 頁を参照）、それぞれ該当する原資料を提出してもよい。また、各書式の写しを提出することも可とする。

自家試験法（HIV-1-RNA）を対象とした次のラウンドロビン試験の申込期限は、2003 年 6 月 1 日とする（Fax：06103/771265）。なお、その実施時期については 2003 年 9 月を予定している。

今回の要件を履行するうえで必要となる変更通知は、この履行要件に関する決定通知と同一の案件（手続き）として処理する。したがって、これにかかる業務手数料については、当該処理業務のうちいずれか一方のみに適用することが妥当であるものとする。これに加え、本件では検査方法の変更が公益の擁護を意図していることから、これにかかる手数料については「Paul-Ehrlich-Institut の業務手数料に関する規定」に従って適宜引き下げる事が可能である。よって、当該手数料については、第 4 条第 1 項第 4 号 a「Paul-Ehrlich-Institut

の手数料に関する規定」および第4条第8項「Paul-Ehrlich-Institut の手数料に関する規定」の「引き下げの内容」に従って、この履行要件に関する決定通知に対してではなく、今回の要件を履行するうえで必要となる変更通知の処理時をもって初めて生じるものとする。

#### 法的救済に関する指示事項

本行政行為の有効期間は、連邦官報での公示後2週間とする。

現時点より1ヵ月以内に限り、当該行為に対する異議の申し立てを許可する。この場合、申し立てに関する内容を書面（文書）に記載し、血清・予防接種庁 Paul-Ehrlich-Institut（Paul-Ehrlich Str. 51-59 63225 ランゲン）に提出すること。

2003年5月6日、ランゲン

血清・予防接種庁  
Paul-Ehrlich-Institut

所長  
教授／医学博士 J Löwer

**Paul-Ehrlich-Institut**  
**Bundesamt für Sera und Impfstoffe**

**Bekanntmachung**  
**über die Zulassung und Registrierung**  
**von Arzneimitteln**  
**(Verminderung des Risikos von HIV-1-Infektionen**  
**durch zelluläre Blutprodukte**  
**und gefrorenes Frischplasma)**  
**— Anordnung der Testung auf HIV-1-RNA**  
**mit Nukleinsäure-Amplifikationstechniken —**

Vom 6. Mai 2003

Nach schriftlicher Anhörung des Paul-Ehrlich-Instituts vom 23. April 2001 (BAnz. S. 9506) wurde die Anordnung einer Maßnahme zurückgestellt, da zunächst mittels Ringversuch den pharmazeutischen Unternehmern die Gelegenheit gegeben werden sollte, die Leistungsfähigkeit ihrer Inhouse-Methoden zu belegen (vgl. Bekanntmachung vom 27. August 2001, BAnz. S. 19 365). Es ergeht nun an die pharmazeutischen Unternehmer, die zelluläre Blutprodukte und gefrorenes Frischplasma in den Verkehr bringen, folgender

**Bescheid:**

1. Zelluläre Blutkomponenten und gefrorenes Frischplasma, die nach dem 30. April 2004 in den Verkehr gebracht werden, müssen aus Spenden hergestellt sein, die mittels einer geeigneten Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT), z. B. der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), untersucht worden sind, ohne dass Genome des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) nachgewiesen wurden. Bei tiefgekühlten Blutkomponenten kann diese Untersuchung anstatt an der zur Herstellung verwendeten Spende auch an einer nachfolgenden Spende oder Blutprobe desselben Spenders vorgenommen werden. Die verwendete Methode muss so ausgelegt sein, dass mindestens eine Konzentration von HIV-1-RNA von 10 000 IU/ml, bezogen auf die Einzelspende, verlässlich erkannt wird (Referenzpräparat: WHO-Standard für HIV-1-RNA (97/656); 105 IU/ml).
2. Für mittels Plasmapherese hergestelltes quarantänegelagertes gefrorenes Frischplasma dürfen auch insoweit nicht mittels HIV-1 NAT getestete Spenden verwendet werden, wenn eine spätestens drei Monate nach der Spende entnommene Blutprobe des Spenders mittels einer den obigen Kriterien entsprechenden HIV-1 NAT negativ getestet worden ist.
3. Inhouse-Testmethoden müssen folgende Voraussetzungen erfüllen:
  - a) Die Methode ist nach den CPMP-Leitfäden „Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology“ (CPMP/ICH/281/95) und „Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology“ (CPMP/ICH/381/95) mit Hilfe von Referenzpräparaten validiert worden, wobei die Validierung der HIV-1 NAT entsprechend der Empfehlung zur HCV NAT (<http://www.pei.de/downloads/loadlink.htm>) durchgeführt worden sein muss. Bei Abweichungen ist darzulegen, dass die tatsächliche Vorgehensweise gleichermaßen geeignet ist. Die Unterlagen über die Validierung der NAT müssen dem Paul-Ehrlich-Institut vor der Einführung des Prüfverfahrens, spätestens zum 1. Dezember 2003 vorgelegt worden sein.
  - b) Die Eignung der Inhouse-Methode muss in einem vom Paul-Ehrlich-Institut angebotenen Ringversuch belegt worden sein und in weiteren vom Paul-Ehrlich-Institut festgelegten Ringversuchen — beabsichtigt ist ein jährlicher Rhythmus — bestätigt werden.

4. Kosten für die Anordnung dieser Auflage werden nicht festgesetzt.

I.

Die Anordnung der o. g. Auflagen erfolgt nach § 28 Abs. 3c AMG und ist geboten, um das Risiko der HIV-Übertragung durch Transfusionen weiter zu vermindern. Eine HIV-Infektion führt in der Regel zur AIDS-Erkrankung, die trotz der fortgeschrittenen Therapiemöglichkeiten auch heute noch zumeist tödlich verläuft. Maßnahmen, die das Risiko einer Übertragung von HIV durch Bluttransfusionen vermindern können, sind daher grundsätzlich geboten, sobald sie technisch möglich sind. Bei zellulären Blutprodukten, die bislang keiner Inaktivierung unterzogen werden können, besteht die Gefahr der Übertragung einer HIV-Infektion, wenn die Infektion bei dem Blutspender noch nicht zu einer mit Antikörpertests erkennbaren Antikörperbildung geführt hat (diagnostisches Fenster). Zum heutigen Zeitpunkt ist die Einführung einer HIV-1 NAT für das Blutspendescreeing mit einer auf die Einzelspende bezogenen Mindestempfindlichkeit von 10 000 IU/ml technisch möglich und geeignet, die Sicherheit der Blutspenden bezüglich HIV noch weiter zu erhöhen.

Die Ergebnisse von Untersuchungen des Paul-Ehrlich-Instituts zum Verlauf der Virämie in der frühen Infektionsphase und zur möglichen Verkleinerung des diagnostischen Fensters durch den Nachweis von HIV-RNA wurden durch andere Gruppen bestätigt (M. P. Busch „HIV, HBV and HCV: New developments related to transfusion safety“ Vox Sang 2000; 78 (suppl. 2): 253-256). Mit HIV-1-NAT-Verfahren kann danach das durch serologische Testverfahren definierte diagnostische Fenster um durchschnittlich bis zu 15 Tage verkleinert werden. Entsprechend der im Vergleich zu HCV niedrigeren Verdopplungsrate der HI-Viren werden zu Beginn der Infektion zunächst niedrige Virustiter nachgewiesen, die dann zum Ende der Fensterphase auf bis zu  $10^7$  RNA-Kopien/ml ansteigen können.

Bereits im Jahr 1997 hat das Paul-Ehrlich-Institut die pharmazeutischen Unternehmer von Erythrozytenkonzentraten zu der beabsichtigten Maßnahme auf Einführung der NAT-Testung auf Hepatitis-B-Virus-, Hepatitis-C-Virus- und HIV-1-Genome im Spenderscreening angehört. Da damals weder geeignete kommerzielle Testsysteme noch ein internationaler Standard für HIV-1-RNA zur Verfügung standen, wurde die NAT-Testung auf HIV-1-RNA nicht angedacht.

Zwischenzeitlich sind dem Paul-Ehrlich-Institut vier HIV-Übertragungen durch zelluläre Blutprodukte gemeldet worden, die aus Spenden hergestellt wurden, die in den eingesetzten serologischen Tests nicht reaktiv waren. Die mittels quantitativer HIV-1 NAT in den Rückstellproben bestimmten Virustiter waren aber in allen vier Fällen relativ hoch (17 000, 25 000 bzw. in zwei Fällen  $> 75 000$  RNA-Kopien pro ml; 1 Kopie HIV-1-RNA entspricht etwa 2 IU).

Etwa 70% der in Deutschland in Verkehr gebrachten Blutkomponenten werden bereits heute eigenverantwortlich durch die pharmazeutischen Unternehmen mit HIV NAT getestet. Auf diese Weise konnten seit 1997 bis heute mindestens fünf weitere HIV-1-positive Spenden erkannt und ausgesondert werden.

II.

Die Einführung der HIV-1-NAT-Testung mit einer Mindestsensitivität, bezogen auf die Einzelspende, von 10 000 IU HIV-1-RNA/ml (dies entspricht etwa 5000 RNA-Kopien/ml) ist gegenwärtig ausreichend und angemessen. Zum einen wären damit die dem Paul-Ehrlich-Institut berichteten Übertragungen verhindert worden; zum anderen kann eine Pooltestung mit den Untersuchungen auf HCV-RNA kombiniert werden. Eine wesentlich höhere Sensitivität würde demgegenüber eine neue Logistik erfordern, die erfahrungsgemäß in der Anlaufphase mit neuen Risiken verbunden ist. Daher ist auch hinzunehmen, dass damit die Verkleinerung des diagnostischen Fensters nicht in dem maximal möglichen Umfang erreicht wird.

Die Einführung der HIV-1 NAT ist auch erforderlich, um das Risiko der HIV-Übertragung durch Blutkomponenten weiter zu vermindern. Der von einigen pharmazeutischen Unternehmen als kostengünstigere Alternative vorgeschlagene p24 Antigentest hätte nach den Untersuchungen des Paul-Ehrlich-Instituts lediglich eine der vier HIV-Infektionen verhindert. Die vergleichende Analyse von Serokonversions-Verläufen bestätigt, dass eine HIV-1 NAT mit einer Mindestempfindlichkeit von 10 000 IU/ml deutlich mehr Fensterphase-Spenden erkennt als der p24 Antigentest. Daher würde eine Einführung des Antigentests keine vergleichbare Alternative zur HIV-1 NAT darstellen. Mit der Anordnung eines weniger sensitiven Tests würde geduldet werden, dass in Deutschland unterschiedlich getestetes Blut in den Verkehr gebracht bzw. möglicherweise von einigen pharmazeutischen Unternehmen die bereits durchgeführte NAT-Testung zu Gunsten eines weniger sensitiven Tests wieder aufgegeben würde.

Die Validierungsunterlagen für Inhouse-Verfahren sind dem Paul-Ehrlich-Institut nach § 28 Abs. 3c Nr. 2 AMG vorzulegen. Dies ist erforderlich, da nach den Arzneimittelprüfrichtlinien vom 5. Mai 1995 (BAnz. Nr. 96a vom 20. Mai 1995, 1. Abschnitt C, Allgemeine Anforderungen) die angewandten Methoden und Verfahren validiert sein müssen. Anerkannte Richtlinien für die Durchführung und Verfahren wie die CPMP-Leitfäden „Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology“ (CPMP/ICH/281/95) und „Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology“ (CPMP/ICH/381/95) müssen dabei berücksichtigt werden (abrufbar unter <http://www.emea.eu.int/index/indcxh1.htm>, approved ICH Quality Guidelines, Topic Q2A bzw. Q2B). Die Unterlagen sind dem Paul-Ehrlich-Institut so rechtzeitig vorzulegen, dass eine ordnungsgemäße Überprüfung durch das Paul-Ehrlich-Institut erfolgen kann, wobei hierfür ein Zeitraum von drei Monaten als angemessen erachtet wird. Die Unterlagen können entweder zu der Spenden-Stammdokumentation eingereicht werden oder einzeln für jedes betroffene Arzneimittel.

Die Quantifizierung der HIV-1-RNA-Konzentration nimmt Bezug auf den seit November 1999 verfügbaren WHO-Standard für HIV-1 NAT (Nr. 97/656, NIBSC [UK]), der auf dem HIV-1 Subtyp B basiert. Eine Ampulle enthält definitionsgemäß  $10^5$  IU/ml, wobei etwa 2 IU einer Kopie HIV-1-RNA entsprechen. Es ist sicherzustellen, dass die HIV-1 NAT die verschiedenen Subtypen der HIV-1-M-Gruppe mit ähnlicher Effizienz erkennt. Proben mit quantifizierten HIV-1-Subtypen der M-Gruppe können vom nationalen Referenzzentrum für Retroviren an der Universität Erlangen bezogen werden.

Im Hinblick auf das öffentliche Interesse, das Risiko der Übertragung von schweren Infektionskrankheiten mit Blutprodukten zu vermindern, ist eine dazu geeignete und erforderliche Maßnahme auch dann gerechtfertigt, wenn sie seitens der pharmazeutischen

Unternehmer erhebliche Anstrengungen verlangt. Durch die getroffene Festlegung der Empfindlichkeitsgrenze und die dadurch eingeräumte Möglichkeit, Proben von Einzelspenden zusammenzuführen, wird dem gegenwärtigen Stand der Entwicklung im Bereich der NAT-Verfahren Rechnung getragen.

Zur kontinuierlichen Überprüfung der Qualität und Eignung der Inhouse-Methoden hält es das Paul-Ehrlich-Institut für erforderlich, die erfolgreiche Teilnahme an einem jährlich vom Paul-Ehrlich-Institut angebotenen Ringversuch verpflichtend zu machen. Die Auswertung eines bereits durchgeführten Ringversuchs hat nämlich ergeben, dass einige pharmazeutische Unternehmer in der Lage sind, mit selbst entwickelten NAT-Methoden (Inhouse-Verfahren) HIV-1-RNA mit der geforderten Empfindlichkeit nachzuweisen. Generell ergab sich für die HIV-1 NAT im Vergleich zu den Ergebnissen des parallel durchgeführten Ringversuchs zu HCV NAT (Inhouse-Methoden) ein weniger homogenes Bild. Mehrheitlich wurde zwar die Konzentration von 10 000 IU/ml für die HIV-1-Subtypen A bis E erkannt, mit einigen Methoden konnte dieses Ergebnis jedoch nicht konsistent gewährleistet werden. Soweit keine Inhouse-Methoden verwendet werden, stehen seit Dezember 2001 zwei vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassene NAT-Testsysteme zum Nachweis von HIV-1-RNA, die für Poolgrößen von 24 Spenden geeignet sind, zur Verfügung. Entsprechende Untersuchungen mit diesen Tests ergaben, dass alle positiven Proben des Ringversuchs als reaktiv und die Negativproben entsprechend nicht reaktiv bewertet wurden. Einwendungen der pharmazeutischen Unternehmer, dass die Anordnung der HIV-1-NAT-Testung erst erfolgen dürfe, wenn Testkombination(en) auf dem Markt verfügbar seien, sind damit hinfällig geworden.

Die Kosten dieser Testung einschließlich etwaiger Lizenzgebühren müssen im Hinblick auf den hohen Rang des Schutzes von Leben und Gesundheit betroffenen Patienten in Kauf genommen werden. Die schwierige wirtschaftliche Situation einzelner pharmazeutischer Unternehmer kann nicht zur Abwendung einer Maßnahme führen, die zu einer Verminderung von HIV-Übertragungen durch Blutkomponenten geeignet ist und hiernach im öffentlichen Interesse steht.

Auch für in Quarantäne gelagertes Frischplasma ist diese Anordnung zur Risikovorsorge geboten. Zwar ist weder aus der wissenschaftlichen Literatur noch aus den dem Paul-Ehrlich-Institut vorliegenden Verdachtsmeldungen abzuleiten, dass eine HIV-Infektion nach Quarantänelagerung nicht durch serologische Tests erkannt werden kann. Dennoch ist hier im Rahmen der Risikovorsorge die Maßnahme geboten, da die Möglichkeit besteht, dass ein Spender eine Antikörperkonstellation aufweist, der durch den eingesetzten antiHIV1/2-Test nicht erkannt wird. Diese Infektion würde dann auch bei der Folgespende möglicherweise unerkannt bleiben, wohl aber durch eine NAT-Testung auf HIV-1-RNA in Erscheinung treten. Auch unter Abwägung des erforderlichen Aufwandes der HIV-1-NAT-Testung für in Quarantäne gelagertes Frischplasma kann deshalb das mögliche Risiko nicht in Kauf genommen werden, auch wenn sich dieses bislang noch nicht realisiert hat. Die Testung der Spender auf HIV-1-RNA muss auch für die Herstellung von mittels Plasmapherese gewonnenem Frischplasma durchgeführt werden, da die Häufigkeit der Testung nichts an dem möglichen Risiko, dass ein infizierter Spender keine Antikörper bildet oder dass der Test die Antikörper nicht erkennt, ändert. Allerdings ist hier der Aufwand der Testung von jeder Spende nicht gerechtfertigt. Plasmapheresespender können mehrmals im Monat zur Spende zugelassen werden. Es wird als ausreichend angesehen, dass diese Spender im Abstand von mindestens drei Monaten auf HIV-1-RNA untersucht werden. Durch die zusätzliche Testung soll ausgeschlossen werden, dass im Falle des Nichterkennens eines Antikörpertests ein vom Spender ausgehendes Rückverfolgungsverfahren über den Quarantänezeitraum nicht durchgeführt wird und damit mehrere möglicherweise infektiöse Plasmaspenden freigegeben werden. Eine Spendertestung auf HIV-1-RNA in einem Abstand von drei Monaten wird somit für quarantänegelagertes Plasma als ausreichend angesehen.

Der im Tenor zu Nummer 1 genannte Zeitpunkt berücksichtigt die Sicherstellung der Versorgungslage mit o. g. Blutprodukten und die bei den pharmazeutischen Unternehmern für die Umsetzung der neuen Testmethode erforderlichen Umstellungen. Durch die Regelung, dass bei tiefgekühlten Blutkomponenten die HIV-1 NAT auch an einer nachfolgend entnommenen Spende oder Blutprobe vorgenommen werden kann, soll vermieden werden, dass bereits eingelagerte Blutkomponenten verworfen werden müssen, die auch nach dem 1. Mai 2004 noch haltbar sind und bei denen die zur Herstellung verwendete Spende noch nicht mittels HIV-1 NAT getestet wurde.

Diese Anordnung ist gemäß § 28 Abs. 3c AMG sofort vollziehbar, so dass Widerspruch und Anfechtungsklage keine aufschiebende Wirkung haben.

Die Erfüllung der Auflagen aus diesem Bescheid ist dem Paul-Ehrlich-Institut im Wege einer Änderungsanzeige gemäß § 29 Abs. 1 Satz in Verbindung mit Abs. 2a Satz 1 Nr. 4 AMG auf dem als Anlage beigefügten Formblatt anzuzeigen, das auch in elektronischer Form unter [www.pei.de](http://www.pei.de) erhältlich ist. Sofern eine Spendenstammdokumentation vorliegt (vgl. Bekanntmachung vom 19. September 2001, BAnz. S. 21 361), kann die Anzeige auf die entsprechende Stammdokumentation bezogen werden. Andernfalls ist eine Kopie des Formblatts zu jeder Zulassung einzureichen.

Um Anmeldung für den nächsten Ringversuch zu Inhouse-NAT-Methoden (HIV-1-RNA) wird bis 1. Juni 2003 (Telefax: 0 61 03/77 12 65) gebeten. Es ist geplant, den Ringversuch im Verlaufe des September 2003 durchzuführen.

Da der Bearbeitung der zur Erfüllung der Auflage erforderlichen Änderungsanzeigen derselbe Sachverhalt bzw. Verfahrensgegenstand zugrunde liegt wie diesem Auflagenbescheid, erscheint es sachgerecht und angemessen, die Gebührenerhebung auf eine der beiden Amtshandlungen zu beschränken. Zudem besteht bei der Gebührenerhebung für die Bearbeitung von Anzeigen zur Änderung des Prüfverfahrens, die – wie hier – im öffentlichen Interesse liegen, nach der Kostenverordnung für Amtshandlungen des Paul-Ehrlich-Instituts die Möglichkeit, die Gebühren entsprechend zu ermäßigen. Dementsprechend werden Kosten nicht für diesen Auflagenbescheid, sondern erst für die Bearbeitung der zur Erfüllung der Auflage erforderlichen Änderungsanzeigen gemäß § 4 Abs. 1 Nr. 4 Buchstabe a PEI-KostVO in Verbindung mit dem Ermäßigungstatbestand des § 4 Abs. 8 PEI-KostVO erhoben werden.

#### **Rechtsbehelfsbelehrung**

Dieser Verwaltungsakt gilt zwei Wochen nach Veröffentlichung im Bundesanzeiger als bekannt gegeben.

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach diesem Zeitpunkt Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist beim Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Paul-Ehrlich-Str. 51–59, 63225 Langen, schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Langen, den 6. Mai 2003

Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Der Präsident  
Prof. Dr. J. Löw er



## **An Overall View of Standardization**

**May 26, 2004  
Indira Hewlett, Ph.D.  
CBER/FDA**

### **CBER HIV-1 RNA Panel**

**HIV-1 subtype B panel has 10 members**

- Cultured patient isolate, heat inactivated and diluted with defibrinated Ab-ve plasma**
- Gag, pol and env regions sequenced**
- Virus dilutions tested by 15 labs in collaborative study**
- 8 positives: 10, 50, 100, 500, 2500, 5000,  $2.5 \times 10^4$ , and  $2.5 \times 10^5$  copies/mL and 2 negatives**
- Current HIV-1 standard is 100 IU/ml for the pool test and 10,000 IU/ml for the original donation**



日本赤十字社で使用している NAT の感度について

機器名 : cobas s 401  
 試薬名 : コバス TaqScreen MPX

1. 感度 (ロシュ・ダイアグノスティックス社 添付文書より)

病原体	95%平均実効検出感度
HBV 国際標準品 genotype A	3.2 IU/mL (18.6 copies/mL)
HCV 国際標準品 genotype 1a	12.4 IU/mL (33.5 copies/mL)
HIV-1 Group M 国際標準品 subtype B	41.8 IU/mL (25.1 copies/mL)

2. 日赤 NAT 実施施設配備の全機台における平均検出感度 (LOD)

HBV (国内標準品 genotype C)	IU/mL	検査数	陽性数	陽性率 (%)
	10	408	408	100.0
	5	408	408	100.0
95%LOD 0.79	2.5	408	408	100.0
95%下側信頼限界 0.71	1.25	408	403	98.8
95%上側信頼限界 0.91	0.625	406	371	91.4
	0.313	407	291	71.5
	0.156	408	199	48.8

HCV (国内標準品 genotype 1b)	IU/mL	検査数	陽性数	陽性率 (%)
	20	360	360	100.0
	10	360	359	99.7
95%LOD 5.87	5	360	348	96.7
95%下側信頼限界 3.95	2.5	360	263	73.1
95%上側信頼限界 11.00	1.25	360	197	54.7
	0.625	360	93	25.8
	0.313	360	68	18.9

HIV-1 (国内標準品 subtype B)	IU/mL	検査数	陽性数	陽性率 (%)
	400	360	360	100.0
	200	359	359	100.0
95%LOD 69.67	100	360	359	99.7
95%下側信頼限界 54.35	50	360	321	89.2
95%上側信頼限界 97.65	25	360	245	68.1
	12.5	359	155	43.2
	6.25	360	86	23.9