

血漿分画製剤のHCV核酸増幅検査結果について

○試験検体

販売名：ベリプラスPコンビセット

製造年月：2006年7月

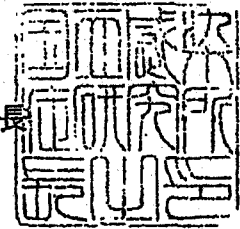
主なHCV安全対策：原料血漿へのHCV-NAT検査及び液状加熱処理（60℃、10時間）

感染研行第07068号

平成23年2月-3日

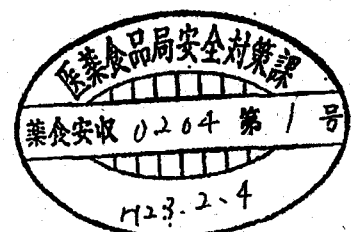
厚生労働省医薬食品局安全対策課長 殿

国立感染症研究所長



血漿分画製剤に係るC型肝炎ウイルスの核酸増幅検査の実施について (回答)

平成22年7月14日付薬食安発0714第3号をもって依頼のありました
標記について、別添のとおり報告いたします。



試験検査成績書

1. 依頼者：厚生労働省医薬食品局安全対策課
2. 試験検査の名称
「ベリプラス P コンビセット」製造番号 6 K018C6 F0 1
上記血漿分画製剤からの核酸増幅法を用いた C 型肝炎ウイルス遺伝子の
検出
3. 検体の種類と数量
「ベリプラス P コンビセット」製造番号 6 K018C6 F0 1
3mL 製剤（フィブリノゲンとトロンビン各 1 本から構成）計 4 キット
4. 試験法
3mL 製剤 2 キットを溶解し、フィブリノゲン 5mL、及びトロンビン 5mL
から C 型肝炎ウイルス遺伝子の検出を行なった。
試験法の概要は別紙 2 参照。
5. 試験検査成績
1 回目：陰性（3IU/5mL を検出できる測定系において感度未満）
2 回目：陰性（3IU/5mL を検出できる測定系において感度未満）
詳細は別紙 1 参照。

別紙1 試験結果

1. 1回目(平成23年1月21日実施)

製剤		HCV 遺伝子	IC
陰性コントロール	フィブリノゲン	陰性	陽性
	トロンビン	陰性	陽性
ランコントロール (3IU/5mL)	フィブリノゲン	陽性	陽性
	トロンビン	陽性	陽性
陽性コントロール (10IU/5mL)	フィブリノゲン	陽性	陽性
	トロンビン	陽性	陽性
検体 (6K018C6F01)	フィブリノゲン	陰性	陽性
	トロンビン	陰性	陽性

IC: インターナルコントロール

2. 2回目(平成23年1月24日実施)

製剤		HCV 遺伝子	IC
陰性コントロール	フィブリノゲン	陰性	陽性
	トロンビン	陰性	陽性
ランコントロール (3IU/5mL)	フィブリノゲン	陽性	陽性
	トロンビン	陽性	陽性
陽性コントロール (10IU/5mL)	フィブリノゲン	陽性	陽性
	トロンビン	陽性	陽性
検体 (6K018C6F01)	フィブリノゲン	陰性	陽性
	トロンビン	陰性	陽性

IC: インターナルコントロール

別紙 2

ベリプラスト P コンビセットに関する HCV 検出法の概要

(始めに)

本試験法は、ベリプラスト P コンビセット (以下「ベリプラスト」という。) の最終製品から RT-PCR 法により高感度に HCV-RNA を検出するために構築し、ベリプラストを構成するフィブリノゲン末とトロンビン末にそれぞれ希釈した HCV 国内標準品 (日本輸血学会雑誌、第 51 巻.515-519.2005) を添加して検出感度を評価した方法である。試験法は、RNA の抽出法と遺伝子の増幅・検出法の 2 つから構成され、製品中の HCV-RNA の検出を行うものである。

(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、ベリプラスト製剤のフィブリノゲン末とトロンビン末をそれぞれ用法通りに溶解した 5mL の検体から、それぞれ 55 μ L の RNA 溶液を抽出し、その 50 μ L を下記の増幅・検出に用いる。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)を添加した抽出バッファーを用いて行なう。

(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、装置にセットすると自動的に増幅・検出が行なわれる。

原理は、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する。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 の有無をそれぞれ定性する。

(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

判定保留の場合は、試験不成立のため再試験とする。

(試験)

1) 1回の試験に必要な検体及びコントロールの本数

陰性コントロール-1 (陰性フィブリノゲン末 1本)

陰性コントロール-2 (陰性トロンビン末 1本)

ランコントロール-1 (陰性フィブリノゲン末に 3 IU の HCV を添加した物 1本)

ランコントロール-2 (陰性トロンビン末に 3 IU の HCV を添加した物 1本)

陽性コントロール-1 (陰性フィブリノゲン末に 10 IU の HCV を添加した物 1本)

陽性コントロール-2 (陰性トロンビン末に 10 IU の HCV を添加した物 1本)

HCV 検査を行う製剤-1 (フィブリノゲン末 2本) *

HCV 検査を行う製剤-2 (トロンビン末 2本) *

陰性コントロールは、本検出法で陰性を確認したベリプラストと同一ロットを使用し、ランコントロールと陽性コントロールは陰性を確認したベリプラストと同一ロットに希釈した HCV 国内標準品を添加したもの。

* : 検査検体は 3mL 製剤であるため、1回実施のために各 2本使用した。

2) 抽出および増幅・検出

抽出 : QIAamp Circulating Nucleic Acid キット (QIAGEN 社)

増幅・検出：HCV コバスアンプリスクリーン HCV v2.0 キット (Roche 社)

3) 判定

陽性：HCV が陽性

陰性：HCV が陰性、IC が陽性、陽性コントロールが陽性

判定保留：HCV が陰性、IC が陰性

又は、IC が陽性であっても陽性コントロール陰性

判定保留の場合は、試験不成立のため再試験を実施する。

以上の試験を日を変えて2回実施し、それぞれの結果を報告した。

(参考資料)

上記検査法の実施にあたり、血漿とベリプラストでは組成が異なることから、ベリプラスト及び静注用フィブリノゲン 5mL にそれぞれ 1~30IU に希釈した HCV 国内標準品を添加し、検出感度を求めた。

1) フィブリノゲンにおける感度評価

市販されている静注用フィブリノゲン (ベリプラストのフィブリノゲンと同じ 80mg/mL に溶解したもの) に希釈した HCV 国内標準品を添加し、検出感度を求めた。

静注用フィブリノゲン：3 IU 100%陽性

(IC 4 μ L と HCV3 IU を添加した場合：10回の試験で10回陽性)

IC 6 μ L と HCV3 IU を添加した場合：10回の試験で10回陽性)

2) ベリプラストにおける感度評価

市販されているベリプラスト (5mL 規格) のフィブリノゲンとトロンビンを 5mL に溶解し、HCV 国内標準品を添加して検出感度を求めた。(各濃度1回ずつ測定した)

フィブリノゲン：0 IU	陰性	トロンビン：0 IU	陰性
1 IU	陰性	1IU	陽性
3 IU	陽性	3IU	陽性
10 IU	陽性	10IU	陽性
30 IU	陽性	30IU	陽性