

参考資料2

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)

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

(3年計画の3年目)

平成15年度 総括研究報告書
分担研究報告書

主任研究者 吉澤 浩司

平成16(2004)年 3月

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
平成15年度 班構成

主任研究者

吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授

分担研究者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部	部長
中澤 裕之	星薬科大学 分析化学教室	教授
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部	次長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所	所長
竹森 利忠	国立感染症研究所 免疫部	部長
今井 光信	神奈川県衛生研究所 微生物部	部長

班長研究協力者

玉造 滋	(株) ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部 リーダー	
矢萩 則夫	(株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発室 室長	
皆川 英孝	(株) 富士レビオ 商品開発グループ	グループ長
山田 徹	(株) ダイナボット 総合研究所 学術部シニア・クリニカルサイエンティスト	
柚木 久雄	日赤中央血液センター NAT部	部長
飯田 俊二	日本赤十字社 血液事業部	課長
松倉 晴道	大阪赤十字血液センター 試薬製造部	課長
水井 正明	広島赤十字血液センター 技術部	副部長
田中 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	講師
片山 恵子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手
熊谷 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手
小宮 裕	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	
水落 利明	国立感染症研究所細菌	室長
近藤 真規子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	研究員
鳴 貴子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	研究員
岩田 明子	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
井之上浩一	星薬科大学	助教授
吉村 吉博	星薬科大学	講師
猪飼 育友	愛知県衛生研究所	
近藤 文雄	愛知県衛生研究所	
伊藤 裕子	愛知県衛生研究所	
後藤 智美	愛知県衛生研究所	
岡 尚男	愛知県衛生研究所	
松本 浩	愛知県衛生研究所	

目 次

I. 総括研究報告

吉澤 浩司	・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	-----	1
-------	---	-------	---

II. 分担研究報告

吉澤 浩司	・核酸増幅検査 (NAT) の技術の標準化のために資する 標準パネル血漿 (HCV、HIV) の作製	-----	11
玉造 滋	・HCV定性NAT検査のサーベイについて	-----	25
今井 光信	・血液製剤の安全性確保のための品質管理技術の開発に関する研 究 -HIV陽性献血血液のウイルス量およびHIVのタイプ、サ ブタイプに関する研究-	-----	30
竹森 利忠	・B型肝炎ウイルス抗原新規WHO国際標準品の制定および国内標 準感度パネル整備の必要性について	-----	40
山口 照英	・血液製剤の精度管理法の開発に関する研究	-----	42
中澤 裕之	・血液保存バッグから溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキ シル)のリスクアセスメント	-----	56
宮崎 豊	・採血基準に関するスクリーニング開発 -成分献血キットから溶出する化学物質の調査及び供血者 (ド ナー) の暴露量評価-	-----	63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	75
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----	79

1. 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
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

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学

研究要旨

3年計画の3年目にあたる平成15年度は、1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製、2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行、3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定、4. 本研究班の目的に関連する個別研究 の4項目を柱とする研究を実施した。

1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製

1) HCVの標準パネル血漿

HCV感染の早期（HCV抗体が出現する前のウインドウ期）、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル血漿を完成した。なお、HCVの遺伝子型（ジエノタイプ）については、現在の日本の献血者から見出されるすべてを取りそろえた。

2) HIV標準パネル血漿

HIV感染の早期（HIV抗体が出現する前のウインドウ期）、キャリア期、および陰性対照血漿から成る計100本の標準候補血漿を取りそろえた。HIVの標準血漿については、ウインドウ期の血漿は1本入手できただにすぎず、HIV陽性血漿のほとんどはキャリア期の血漿から成ること、国内で使用可能な全ての測定系による最終測定については、現在も作業を継続中であること、HIVのサブタイプは国内の献血者由来のものに限られたこと、など必ずしも万全ではない。

2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

核酸増幅検査（NAT）による、HCV RNA検査を日常検査として実施している計124施設の参加を得てHCV標準パネル血漿の中から陽性血漿3検体、陰性対照血漿1検体の計4検体を選択し、コントロールサーベイを実施した。

その結果、124施設中、内部標準（インターナルコントロール：IC）は104施設で実施されていた。配布した標準血漿、HCVのジエノタイプ1a、2a、2b、および陰性対照検体の正答率は、それぞれ、97.6%、93.5%、97.6%、100%であった。第1回目のサーベイで問題点が見出された15施設中11施設について問題点の洗い出しと改善のためのアドバイス（介入）を行なった後に、同一の検体を配布して再度サーベイを実施し

たところ、全ての施設から正答が得られ、かつ第1回目のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度（正しい測定値）が得られるなど、大幅な改善がみられた。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に利用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグ等に残留、溶出する化学物質の測定法を構築し、溶出挙動の解明を行った。また、成分採血キット6種類を対象として、溶出する化学物質の種類の同定、溶出量の測定を行った。その結果、フタル酸ジエノチルヘキシル、ノニフェノール、BHT、2-エチルヘキサノール等が同定確認された。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

- 1) 献血を契機発見されたHIV陽性の血液の特性をウイルス・血清学的手法により解析した。
- 2) NATの検出感度向上をめざした、ウイルス濃縮法の基礎的検討を行なった。

分担研究者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部	部長
中澤 裕之	星薬科大学 分析化学教室	教授
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部	次長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所	所長
竹森 利忠	国立感染症研究所 免疫部	部長
今井 光信	神奈川県衛生研究所 微生物部	部長

班長研究協力者（班友）

玉造 滋	(株) ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部 リーダー	
矢萩 則夫	(株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発室 室長	
皆川 英孝	(株) 富士レビオ 商品開発グループ グループ長	
山田 徹	(株) ダイナボット 総合研究所 学術部 シニア・クリニカルサイエンティスト	
袖木 久雄	日赤中央血液センター NAT部 部長	
飯田 俊二	日本赤十字社 血液事業部 課長	
松倉 晴道	大阪赤十字血液センター 試薬製造部 課長	
水井 正明	広島赤十字血液センター 技術部 副部長	
田中 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学 講師	
片山 恵子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学 助手	

熊谷 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手
小宮 裕	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	
水落 利明	国立感染症研究所細菌	室長
近藤 真規子	神奈川県衛生研究所 ウィルス部	研究員
嶋 貴子	神奈川県衛生研究所 ウィルス部	研究員
岩田 明子	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
井之上浩一	星葉科大学	助教授
吉村 吉博	星葉科大学	講師
猪飼 誠友	愛知県衛生研究所	
近藤 文雄	愛知県衛生研究所	
伊藤 裕子	愛知県衛生研究所	
後藤 智美	愛知県衛生研究所	
岡 尚男	愛知県衛生研究所	
松本 浩	愛知県衛生研究所	

A. 研究目的

1. HCV、HIV の標準パネル血漿の作製

1) HCV の標準パネル血漿

HCV 感染のウインドウ期、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る、計 100 本の標準パネル血漿を作成する。

2) HIV の標準パネル血漿

HIV 感染のウインドウ期、キャリア期、感染既往期および陰性対照血漿から成る、計 100 本の標準パネル血漿を作成する。

2. NAT 標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

作製した HCV の標準パネル血漿を用いて、NAT による HCV RNA 検査を日常検査として実施している施設の参加を得て、コントロールサーベイを試行する。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に使われているポリ塩化ビニル製の血液バッ

グ等に残留、溶出する化学物質の測定法を構築する。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

献血を契機に発見された HIV 陽性の血液の特性をウイルス・血清学的手法により、解析する。

NAT の検出感度向上をめざした、ウイルス濃縮法の基礎的検討を実施する。

B. 研究方法

3 年計画の 3 年目にあたる平成 15 年度は、分担研究者、班長協力者と協力して、研究目的に掲げた研究を実施した。また、これらと関連する分担研究者による個別研究を総括した。

1. HCV、HIV の標準パネル血漿の作製

1) HCV の標準パネル血漿

献血された新鮮凍結血漿 (Fresh Frozen Plasma:FFP) の中から、

- (1) ウィンドウ期の血漿、(2) HCV キャリア期の血漿、(3) HCV の感染既往期の血漿、および(4) 陰性対照血漿、を選択、分注

し、国内において使用可能な全ての血清学的測定系によるHCV関連抗原・抗体の検出・測定、およびHCV RNAの定量を、主として班長研究協力者（班友）らが分担して行い、その結果を集積、解析して標準パネル血漿を作成した。なお、標準パネル血漿の作製にあたっては、国内で見出される全てのHCVの遺伝子型（ジエノタイプ）を網羅すること、HCV RNA量が極小～極大にまで分布すること、に留意した。

2) HIVの標準パネル血漿

献血されたFFPの中から、(1)ウインドウ期の血漿、(2)HIVキャリア期の血漿、および(3)陰性対照血漿を選択、分注し、HCVと同様の手順により標準パネル血漿を作製する途上にある。

2. NAT標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

国内の124施設の参加を得て、HCV RNA検査に関するコントロールサーベイを実施した。

第1回のサーベイで「正答」が得られなかった施設については問題点を洗い出し、実習を含めたアドバイスを行ない、同一のサンプルを用いて第2次のコントロールサーベイを実施し、その結果を検証した。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

1) 血液製剤の保存や輸血時に利用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグへの使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）の新規分析法を構築し、DEHPの溶出挙動の解明を試みた。

2) 製分献血時に使用されている6種類の

採血キットから溶出する化学物質の量を調査した。

4. 本研究班の目的に関連する個別研究

- 1) 献血時の検査でHIV陽性と判定された血液のHIV抗体価、HIV RNA量の測定、およびHIVのサブタイプングを行なった。
- 2) 血液の安全性向上に資することを目的として、ウイルス濃縮によるNATの高感度化のための基礎的検討を行なった。

C. 結果と考察

1. HCV、HIVの標準パネル血漿の作製

1) HCVの標準パネル血漿

完成したHCVの標準パネル血漿の構成は下記の通りである。

- (1) HCV感染のphase:ウインドウ期、キャリア期、感染既往期、陰性対照血漿を網羅する計100本より成る。
- (2) HCVのジエノタイプ：1a、1b、2a、2bの4種類を網羅した。
- (3) HCV RNA量：最少 10^2 コピー/ml未満から 10^7 コピー/mlまでの範囲をカバーした。
- (4) 核酸増幅検査（NAT）によるHCV RNAの定性、定量値、および血清学的測定系によるHCV関連の抗原、抗体の定性、および定量値を記載した。

- (5) NIBSCから分与を受けたWHOの標準品（HCV RNA 1.0×10^6 IU/ml）を陰性血漿により 10^N 倍づつ段階移釀し、パネル血漿の最終測定時にNATにより同時測定し、両者の測定値を対比、換算することが可能となるようにした。

2) HIVの標準パネル血漿

作製途上にある標準パネル血漿の構成は下記の通りである。

- (1) HIV 感染の phase:HIV 感染のウインドウ期（1 検体のみ）、キャリア期、および陰性対照血漿、計 100 本より成る。
- (2) HIV のサブタイプ：A、B、E の 3 種類。
- (3) HIV RNA 量：最少 10^2 コピー /ml 未満から 10^6 コピー /ml までの範囲をカバー。

最終測定値を得る際には、国際標準品との同時測定を行ない、標準パネル血漿の HIV RNA の測定値（コピー /ml）と国際標準品の測定値 (IU/ml) との対比、換算が可能となるようにする予定である。

2. NAT 標準化のための多施設間でのコントロールサーベイの試行

核酸増幅検査 (NAT) による HCV RNA 検査を日常検査に取り入れている計 124 施設の参加を得て、コントロールサーベイを実施した。

コントロールサーベイには、作製した HCV の標準パネル血漿の中から、ジエノタイプ 1a、1b、2b の 3 種、および陰性対照血漿を選び、参加施設に配布、測定結果を収集解析した後、問題点が見出された施設については、操作上の問題点の洗い出しと、改善のための介入による効果を評価した。なお、配布した HCV RNA 陽性の 3 検体は、いずれも 10^2 コピー /ml ~ 10^3 コピー /ml となるように調整した。

コントロールサーベイに参加した 124 施設のうち 104 施設では内部標準（インターナルコントロール：IC）を用いていた。

配布したコントロールサーベイ用

の血漿、HCV のジエノタイプ 1a、2a、2b、での正答率はそれぞれ 97.6 %、93.5%、97.6% であり計 14 件、3.8% に見落しが認められた。陰性対照血漿についての正答率は 100% であり、偽陽性の答はゼロであった。

第 1 回目のサーベイで偽陰性の結果、もしくは定性的検査結果では正答であったものの極度に低い測定値の報告があった 15 施設中 11 施設のルチン検査に立ち合い、操作上の問題点等を抽出、整理して作成したチェックシートに従って問題点の改善のためのアドバイスを行った後に、第 1 回目と同一のコントロールサーベイ用血漿 4 検体を用いてフォローアップサーベイを実施した。その結果、全ての施設から正答を得、また第 1 回目のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度が得られ、検査実施者の作業手技が改善されたことを確認した。

3. 血液バッグに残存する化学物質の同定法の確立と溶出量の測定

1) ポリ塩化ビニル製の血液バッグに残留する DEHP の分析法の確立と溶出量の測定

血液製剤の保存や輸血時に使用されているポリ塩化ビニル製の血液バッグに残留する化学物質のうち、最も使用頻度が高く、残留量も多いタル酸ジ (2-エチルヘキシル)

(DEHP) の新規分析法を構築し、溶出挙動の解明を行った。新規に構築した分析法では、DEHP、及びその代謝物である MEHP の同時分析が可能であることから、現在使用されている血液製剤 78 検体からの可塑剤の測定を行ない、残留量と暴露量の調査を行った、その結果、以下の事

項が明らかとなった。すなわち、(1) 血液製剤内でのDEHPからMEHPへの代謝率は20%以下であり、血液製剤を投与した場合、そのほとんどがDEHPとして体内に取り込まれる。

(2) DEHPの溶出量は、ヒト全血で最も多く、次いで赤血球MAP、及び血小板の順であった。(3) DEHPの溶出量は血液製剤の保存期間によつて経時的に増加する傾向が見られた。

(4) 最も高濃度に検出された検体(DEHP: 83.2 μg/ml)をもとに、400ml採血由来のヒト全血約456ml(抗凝固剤添加量を考慮)全量を投与したと仮定すると、1回の投与で厚生労働省「医薬品・医療器具安全情報No182(2002)」で取り上げているTDI: 40 ~ 140 μg/kg weight/dayに達することが明らかとなった。このことは、今後血液製剤を利用するにあたり、リスクとベネフィットを十分に考慮する必要があることを示していると言える。

2) 成分採血用キットから溶出する化学物質の種類と溶出量の測定

成分献血時に使用される成分採血キット6種類を用いて、溶出する化学物質の種類、溶出量を測定した。その結果、(1) 溶出する主な化学物質は、DEHP、2-EH、シクロヘキサン、酢酸エチル、THF、MEKであり、これらの溶出濃度は、両腕法キットの方が片腕法キットより高い傾向を示すこと、(2) ヒト血液を用いた溶出実験から、成分献血時のドナーへの暴露量はDEHPが81~2,190 μg、2-EHが15~620 μg、シクロヘキサンが198~9,780 μgにのぼること、(3) これらの暴露量は、輸血を受ける患者の1/3以下であり、DEHPに関してはFDAの示したTI

値(体重60kg)の1/16以下であること、が明らかとなった。

4. 分担研究者による本研究班の目的に関連する研究

1) HIV陽性献血血液中のウイルス量およびHIVのサブタイプについて解析した結果、以下のことが明らかとなった。

(1) HIV抗体陽性の50検体は全例HIV-1抗体が陽性であり、HIV-2抗体は陰性である。

(2) HIV陽性の52検体のウイルス量は 10^4 コピー/ml以上の比較的ウイルス量の多い検体が33例(66%)と多く占め、 10^5 コピー/ml以上のウイルス量を示すものも5例(10%)認められた。

(3) HIVのサブタイプについてはサブタイプBが94%と大部分を占める一方、日本でも異性間性行為による感染例に多くみられるサブタイプA/Eが2%に、また、アフリカなどで流行しているサブタイプAとCが各1例に見出された。

なお、医療機関からの検査依頼検体の中から少数ではあるもののサブタイプD、F、G、A/Cも見出されており、今後、血液製剤の安全性確保をして行く上で、HIV-2とともに、これから多様なサブタイプが存在することにも留意しておくことが重要であると考えられた。

2) 核酸增幅検査(NAT)の検出感度向上のための基礎的検討

ポリエチレンイミン(PEI)磁気ビーズ、及びスルホン酸磁気ビーズを用いてウイルス濃縮に関する基礎的検討を行った。その結果、PEI磁気ビーズは主としてエンベロープ型ウイル

スに対して優れた濃縮効果を発揮すること、また、スルホン酸磁気ビーズはPEI磁気ビーズでは濃縮できなかった非エンベロープ型ウイルスにも濃縮効果を発揮することが明らかとなった。

これらの方法は、遠心操作が不要で、短時間のうちにウイルスを濃縮することができること、簡便性、迅速性にも優れていることから、 $100 \mu l$ ~ $200 \mu l$ を出発検体とする従来のNATに比して、10倍量以上の出発検体に、ウイルス濃縮の過程を加えてNATを実施することにより実質的な検出感度の向上を図ることができる可能性を示すものであると言える。

D. 結論

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化、および血液製剤の精度管理に関する研究、およびこれと関連する個別研究を行ない、以下の結果を得た。

1. HCVの標準管理血清を完成させた。
2. HIVの標準管理血清については完成の目処が立った。
3. 血液製剤の保存、輸血時、献血者からの採血時に使用されるポリ塩化ビニル製のバッグ等から溶出する化学物質の同定法の確立、種類の同定および溶出量の測定を行ない、それぞれの意義について考察した。
4. HIV陽性の献血血液をウイルス・血清学的手法により解析し、その特性について考察を加えた。
5. NATの検出感度向上のための基礎としてのウイルス濃縮法の基礎を確立した。

E. 知的財産権の出願・登録なし

F. 研究発表、文献

(今井光信)

- 1) Fuat Kurbanov, Makiko Konndo, Yasuhiro Tanaka, Mariam Zalalieva, Masashi Mizokami, Mitsunobu Imai: Human Immunodeficiency Virus in Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res and Hum Retroviruses ;19: 731 - 738 (2003)
- 2) 市川正孝、三田村敬子、山崎雅彦、川上千春、清水英明、渡邊寿美、今井光信、他：イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しいインフルエンザ迅速診断キット（エスプライン）の検討。医学と薬学、49, 467-478 (2003)
- 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. Biochem. Pharmacol. 66:133-140, 2003
- 4) Iwata,A., Satoh,K.,Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi T; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. Biol. Pharm. Bull. 26, 1065-1069 (2003)
- 5) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. J Cell. Physiol. 195:119-129, 2003.
- 10) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T.,

- Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 300, 770-774 (2003)
- 11) Iwata,A., Satoh,K., Yamaguchi,T., Tomoda, A.; Antiviral activity of 2-amino-4, 4a-dihydro -4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one on polyiovirus. Tohoku J. Exp. Med. 200, 161-165, 2003
- 12) Oshizawa,T., Yamaguchi,T., Suzuki,K., Yamamoto,Y., Hayakawa,T.; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. J. Biochem., in press
- 13) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T.; Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. Mol. Ther., in press.
- 14) Koizumi,N., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Yamaguchi,T., Watanabe,Y., Hayakawa,T.; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and v integrin-binding ablation. J Virol. in press
- 15) Satoh,K., Iwata,A., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. J Virol. Methods, 114, 11-19, 2003
- 16) Ishii-Watabe1,A., Uchida,E., Iwata,A., Nagata,R., Satoh,K., Fan,K., Murata,M., Mizuguchi,H., Kawasaki,N., Kawanishi,T., Yamaguchi,T., Hayakawa,T.; Detection of Replication-Competent Adeno - viruses Spiked into Recombinant Adeno-virus Vector Products by Infectivity- PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. Mol. Therapy, 8, 1009-1016 (2003)
- 17) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. J Steroid. Biochem. Molec. Biol. In press
- (竹森利忠)
- 23) Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahahsi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C. and Nohara, K.; Suppressive effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. Toxicological Sci. 74: 315-324, 2003
- 24) Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu - Yokota, Y.; Studies on the generation and maintenance of mucosal Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. Aids Res. Hum. Retro. 19: 469-479, 2003
- 25) Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., Nakayama, T. and Koseki, H.; Mesenchymal expression of Foxl1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs. Dev. Biol. 255: 278-289, 2003
- 26) Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito,

- T., Nakayama, T. Taniguchi, M.;
Expression of recombination-activating
gene in mature peripheral T cells in Peyer's
patch.
Int. Immunol., 15: 393-402, 2003
- 27) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizwa, N.,
Hirahara, K., Shiraishi, A., Nigi, H.,
Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S.,
Takemori, T. and Sakaguchi, M.;
Analysis of sequential immunoglobulin
E-binding epitope of Japanese cedar pollen
allergen (Cry j 2) in human, monkeys and
mice.
Clin. Exp. Allergy, 33: 211-217, 2003
- (中澤裕之)
- 38) K. Kato, S. Shoda, M. Takahashi, N. Doi, Y.
Yoshimura and H. Nakazawa:
Determination of three phthalate
metabolites in human urine using on-line
solid-phase extraction-liquid
chromatography-tandem mass
spectrometry.
J. Chromatogr. B, 788, 407-411 (2003)
- 39) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y.
Yoshimura and H. Nakazawa:
Column-switching high-performance liquid
chromatography : electrospray mass
spectrometry coupled with on-line of
extraction for the determination of mono-
and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood
samples.
Anal. Bioanal. Chem. 375, 527-533 (2003)
- 40) K. Kato, T. Yamauchi, K. Higashiyama and
H. Nakazawa:
High throughput analysis of di-
(2-ethylhexyl) phthalate metabolites in
urine for exposure assessment.
J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26,
2151-2160 (2003)
- 41) K. Inoue, T. Higuchi, F. Okada, H. Iguchi, Y.
Yoshimura, A. Sato and H. Nakazawa:
The validation of column-switching LC/MS
as a high-throughput approach for direct
analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate
released from PVC medical devices in
intravenous solution.
J. Pharm. Biomed. Anal. 31, 1145-1152
(2003)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
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
分担研究報告書

核酸増幅検査（NAT）の技術の標準化のために資する
標準パネル血漿（HCV、HIV）の作製

分担研究者 吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学

研究協力者（班友：作業部会メンバー）

玉造 滋	(株) ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断開発グループ
山田 徹	(株) ダイナボット総合研究所 学術部
矢萩 則夫	(株) オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発部
皆川 英孝	(株) 富士レビオ 商品開発支援グループ
柚木 久雄	日本赤十字社 中央血液センター NAT部
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部
飯田 俊二	日本赤十字社 血液事業部
松倉 晴道	大阪府赤十字血液センター 試薬製造部
水井 正明	広島県赤十字血液センター 技術部
今井 光信	神奈川県衛生研究所 ウィルス部
田中 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
片山 恵子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
熊谷 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
小宮 裕	広島大学大学院 疫学・疾病制御学
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
竹森 利忠	国立感染症研究所 免疫部

研究要旨

3年計画の3年目にあたる本年度は、1年目、2年目に引き続き核酸増幅検査（NAT）の標準化に資することを目的とした標準パネル血漿作製のための作業を行なった。

B型肝炎ウイルス（HBV）検査の標準化に資するパネル血漿は昨年度に完成をみたことから、本年度はC型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）検査の標準化に資するパネル血漿作製の作業を行なった。

1. HCVについては、1) HCV感染のウインドウ期、2) キャリア期、3) 感染既往期、および(4)陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル血漿を完成した。また、WHOの標準品（HCV RNA 1.0×10^9 IU/ml）と完成した標準化パネル血漿に表示したHCV RNA量（コピー/ml）との換算を可能にする表を添付した。

2. HIVについては、1) HIV感染のウインドウ期、2) キャリア期、3) 陰性対照血漿から成る計100本の標準パネル候補血漿を収集し、最終測定、

WHO の標準品との換算表を作製する途上にあり、完成の目処が立った状態にある。

A. 研究目的

核酸増幅検査（NAT）の技術標準化のために用いる標準パネル血漿を作製することを目的とする。

HBV については、すでに完成したことから、今年度は HCV と HIV を対象ウイルスとする。また、HBV、HCV、HIV の 3 種類のウイルスに関連する全てのマーカーが陰性である陰性対照および稀釀用血漿を確保することを目的とする。

標準パネル血漿が完成した段階で、NIBSC より分与を受けた WHO の標準品と同時測定を行ない、それぞれのウイルスの測定値と世界標準品に表示されている測定値との整合（calibration）を可能にするための同時測定により得られた測定値を付した換算表を添付した。

B. 研究方法

1. 標準パネル候補血漿の第 1 次の選択

日本赤十字社血液事業部との協力の下に、新鮮凍結血漿（FFP、200 ml 又は 400 ml）を下記の要領で選択した。

1) HCV 用標準パネル候補血漿

HCV 感染のウインドウ期、キャリア期、感染既往期の血漿が適切な数ずつ含まれるように全体のバランスを考慮して $(100 + \alpha)$ 本を選択した。

HCV のジェノタイプは国内に存在する代表的なもの（1b、2a、2b および 1a）の計 4 種類を網羅するように、また HCV RNA 量は最少 10^2 コピー / ml から 10^7 コピー / ml までの範囲をカバーするように選択した。

2) HIV 用標準パネル候補血漿

HIV 感染のウインドウ期の血漿 1 本および HIV 感染のキャリア期の血漿 99 本、計 100 本を選択した。HIV のサブタイプは、これまでに国内の献血者から見出された全て（サブタイプ A、B、E）を網羅するように選択した。

3) 陰性対照及び稀釀用陰性血漿

S-ALT 値がスクリーニングレベル ($60\text{IU}/\ell$) を越えることからヒトに使用できなかった新鮮凍結血漿のうち、400 ml 献血由来のもの、成分献血由来のもの（血漿量の多いもの）を優先して選択した。

2. 標準パネル血漿の選別、作製手順

1) 第 1 次の測定と候補血漿の第 1 次の選別

標記の研究協力者が、分担して測定した結果を収集、解析し、分担研究者全員の参加の下に、ウイルス感染の各期（ウインドウ期、キャリア期、感染既往期など）、ウイルスのジェノタイプ（サブタイプ）、ウイルス核酸量、血清学的マーカー等が全体の中でバランスよく分散することを考慮して候補血漿の第 1 次の選別を行なった。

2) 標準パネル血漿選択のための第 2 次の測定

第 1 次の選別を終えた各候補血漿をそれぞれバッグから遠心管に移して、均質になるようによく攪拌後、遠心してフィブリンを除去。それぞれの血漿を 1.2×100 本ずつに分注、残余は「バルク」として -80°C のフリーザー中に保存した。

以上のようにフィブリンを除去、均質化した後に分注した血漿をセットとして（100本+α／1セット）各分担測定者に送付し、最終測定を行なった。最終測定時にWHOの標準品を、HBV、HCV、HIVに関連する全てのマーカーが陰性の新鮮凍結血漿を用いて10^N倍段階稀釀して同時測定した。

3) 標準パネル血漿の抽出とWHOの標準品の測定値との整合

最終測定の結果を収集、整理し、分担測定者全員の参加の下に、それぞれの測定系による測定値が可能な限り近似する検体を抽出して最終的な標準パネル血漿（陽性血漿）として選別し、これに陰性対照血漿を適宜追加して計100本の「標準パネル血漿」とした。また末尾に、WHOの標準品の測定値（IU/ml）と各分担測定者による同時測定値（コピー/ml）とを一覧として表示し、相互に対比して換算できるようにした。

C. 結果と考察

1. HCV用標準パネル血漿

完成したHCVの標準パネル血漿一覧を表1に示す。末尾には、WHOの標準品の同時測定値を添付した。

2. HIV用標準候補パネル血漿

完成途上にある（第1次の測定を終了した）HIV用標準候補パネル血漿一覧を表2に示す。WHOの標準品は、最終測定時に同時測定する予定である。

なお、完成した標準パネル血漿は、それぞれの検体ごとに各100本ずつ分注し（HIVについては量的に不足する検体も生ずる見込みである）残

余の血漿は消費による不足分が生じた場合の補充用「バルク」として別途-80℃にて保存した。また、HBV、HCV、HIVに関連する全てのマーカーが陰性の新鮮凍結血漿も十分量確保した。

なお、本研究班が標準パネル血漿を作製するにあたって用いた新鮮凍結血漿は、元来、日本赤十字社においてヒトへの輸注用製剤として、献血された血液をもとに調製されたものであるが、HBV、HCV、HIVのいずれかのマーカーが陽性、あるいはS-ALT値がスクリーニングレベルを越えていたことからヒトへの使用ができなかつたものである。

本研究班は、正規の手続を経た上で、日本赤十字社血液事業部から、これらの血漿の譲渡を受けて、標準パネル血漿を作製した。

D. 知的財産権の出願・登録なし

E. 研究発表、文献

表 1

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 1/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab		日本	ロシュ	オーソ						高士レビズ				HCV genotype					
	ロシュ		日本		オーソ		高士レビズ				HCV Antibody						HCVAb		HCV core Ab		HCV core Ag		SRL genotype			
	IU/ml	copies/ml	Genotype				AxSYM HCV II	HCV PHA	HCV PA (2")	(2")	AMPLINAT HBV/HCV/HIV-1			c100p (NS4)	c33c (NS5)	c22p (core)	NSS	SOD	判定	C.O.I.:						
				オープン HCV RNA ELISA テスト 44.4IU/ml 1.0E6	ルミパルス オープン HCV RNA ELISA テスト 50IU/ml 以上陽性	オープン HCV RNA ELISA テスト 20 IU/ml 以上陽性					dRn	IC-dRn	判定													
P2-001	4.2×10 ⁴	5.6×10 ⁴	II(1b)	80	81	60	陰性	0.42	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.2	0.1	67.8	not detected		
P2-002	2.1×10 ⁶	1.7×10 ⁷	III(2a)	21038	6860	13254	陰性	0.29	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	3987.1	2a		
P2-003	4.0×10 ⁶	6.1×10 ⁷	IV(2a)	51884	44001	41247	阳性	0.28	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	55854.5	2b		
P2-004	4.9×10 ⁶	8.5×10 ⁷	IV(2a)	47246	49025	34391	陰性	0.64	<3		-	-	na	0.07	-	-	Z+	-	-	保留	0.2	3.1	+	57472.5	2b	
P2-005	2.9×10 ⁶	5.8×10 ⁷	III(2a)	37581	29663	17413	陰性	0.30	<3		-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	32005.3	2a		
P2-006	2.9×10 ⁶	3.6×10 ⁷	III(2a)	25625	19597	15545	陰性	0.32	<3		-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	25699.2	2a		
P2-007	3.5×10 ⁶	7.4×10 ⁶	IV(2a)	25590	22892	19202	陰性	0.28	<3		-	-	na	0.05	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	24216.0	2b		
P2-008	3.2×10 ⁶	1.6×10 ⁶	IV(2b)	21658	23313	12821	陰性	0.33	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	39843.1	2b		
P2-009	2.4×10 ⁶	8.4×10 ⁶	II(1b)	6192	4406	2585	陰性	0.32	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	5391.7	1b		
P2-010	3.7×10 ⁶	5.3×10 ⁷	III(2a)	40465	23850	22443	陰性	0.27	<3		-	-	na	0.06	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	26557.8	not determined		
P2-011	6.0×10 ⁴	1.9×10 ⁵	III(2a)	169	64	83	陰性	0.80	<3		-	-	na	0.06	-	-	-	-	-	陰性	0.2	0.1	77.4	2a		
P2-012	1.3×10 ⁷	6.7×10 ⁷	III(2a)	49568	16536	21721	陰性	0.75	<3		-	-	na	0.05	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	20854.7	2a		
P2-013	4.6×10 ⁶	4.9×10 ⁷	III(2a)	34542	12407	15229	陰性	0.66	<3		-	-	na	0.05	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	14301.2	2a		
P2-014	7.2×10 ⁴	5.1×10 ⁵	II(1b)	362	178	225	陰性	0.30	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	170.8	1b		
P2-015	1.4×10 ³	4.8×10 ³	IV(2b)	400	419	321	陰性	0.35	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	443.3	not detected		
P2-016	1.9×10 ⁵	8.9×10 ⁵	II(1b)	1293	1122	896	陰性	0.31	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	1028.8	1b		
P2-017	2.4×10 ⁶	1.3×10 ⁷	IV(2b)	10460	8524	6942	陰性	0.21	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	10346.2	2b		
P2-018	8.1×10 ⁴	1.8×10 ⁴	II(1b)	198	135	125	陰性	0.28	<3		-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	陰性	0.1	0.1	216.8	1b		
P2-019	3.6×10 ³	4.5×10 ³	II(1b)	11	5	4	7	62.97	4		-	-	na	4.46	-	±	-	-	-	陰性	13.9	+	0.1	11.2	- not detected	
P2-020	3.5×10 ⁶	1.2×10 ⁷	III(2a)	15154	8932	7967	陰性	23.74	6		-	-	na	6.29	-	±	陰性	-	-	保留	2.5	+	51.7	+	10579.6	2a

厚生労働省 医療安全総合研究事業

「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

2003年11月

核酸増幅検査(NAT)標準化のための
標準パネル血漿(HCV用) - 2/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab		日本	ロシュ	オーソ		オーソ						富士レビオ				HCVAb				HCV core Ab		HCV core Ag		HCV genotype	
	ロシュ		日本	オーソ		富士レビオ	アボット				HCV PA		AMPLINAT HBV/HCV/HIV-1				Dithio HCV Ab ELISA 3 (S/C) 閾 値:S/C≥ 1.0	c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NSS	SOD	判定	C.O.I. 1以上を 陽性	判定	C.O.I.	判定	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	SR genotype	
	IU/ml	copies/ml	Genotype	ELISA 44 kDa 二重検出 ELISA 二重検出 ELISA 二重検出 ELISA 二重検出	ELISA 二重検出 ELISA 二重検出 ELISA 二重検出 ELISA 二重検出	HCV PA(2 ⁷)	Anti-HCV IgM HCV PA S/CO(陽性≥ 1.0)	Titer (2 ⁿ)	S/CO(陽性≥ 1.0)	dRn	IC-dRn	判定	Dithio HCV Ab ELISA 3 (S/C) 閾 値:S/C≥ 1.0	c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NSS	SOD	判定	C.O.I. 1以上を 陽性	判定	C.O.I.	判定	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	SR genotype					
P2-021	6.5×10 ²	8.3×10 ³	II(1b)	14	5	9	陰性	0.22	<3	-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	15.1	-	not detected							
P2-022	2.7×10 ⁶	4.5×10 ⁷	II(1b)+II(2a)	22755	24477	16006	陰性	0.22	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	30189.1	2a								
P2-023	1.7×10 ⁶	2.6×10 ⁷	II(1b)	16007	11049	9134	陰性	9.43	<3	-	-	na	3.96	-	-	-	-	-	-	保留	0.4	9.0	+	13089.5	1b							
P2-024	6.1×10 ³	3.0×10 ⁶	II(1b)	4402	3728	2361	陰性	0.38	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	3673.7	1b								
P2-025	4.7×10 ⁶	5.2×10 ⁷	III(2a)	34599	10368	16565	陰性	0.26	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	19533.1	2a								
P2-026	5.7×10 ⁶	6.9×10 ⁷	IV(3b)	49444	37185	31858	陰性	0.43	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	147058.0	2b								
P2-027	4.9×10 ⁶	1.2×10 ⁸	III(2a)	46793	21256	22265	陰性	0.30	<3	-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.3	18129.8	2a								
P2-028	3.5×10 ⁶	5.4×10 ⁷	III(2a)	23189	21455	13408	陰性	0.36	<3	-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	17929.6	2a								
P2-029	4.9×10 ⁶	2.4×10 ⁸	III(2a)	50423	42428	27736	陰性	0.29	<3	-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	66685.0	2a								
P2-030	5.3×10 ⁶	1.2×10 ⁸	II(1b)	79057	52105	36173	陰性	0.36	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	79869.5	1b								
P2-031	7.1×10 ²	9.0×10 ²	II(1b)	9	4	5	陰性	0.20	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	2.8	-	not detected							
P2-032	7.7×10 ⁶	6.9×10 ⁷	II(1b)	63618	42915	34067	陰性	0.22	<3	-	-	na	0.04	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	82322.0	1b								
P2-033	3.0×10 ⁶	2.9×10 ⁷	II(1b)	20813	20544	7771	陰性	0.32	<3	-	-	na	0.05	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	25451.5	1b								
P2-034	4.1×10 ³	9.0×10 ³	IV(2a)	1075	1216	924	陰性	0.34	<3	-	-	na	0.05	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	1978.3	2b								
P2-035	3.6×10 ⁵	1.9×10 ⁶	II(1b)	5953	5940	4508	陰性	0.22	<3	-	-	na	0.03	-	-	-	-	-	-	活性	0.1	0.1	9339.4	1b								
P2-036	検出せず			0	1	2	5	2.01	6	5	-171.8	2432.5	-	1.6	±	±	3+	-	-	保留	1.6	+	1.2	+	2							
P2-037	検出せず			7	3	1	5	2.23	6	5	-209.6	1965.6	-	2.2	-	1+	3+	-	-	活性	1.8	+	2.5	+	4.4							
P2-038	検出せず			8	9	2	5	3.17	7	5	-194.3	1670.0	-	3.8	±	±	3+	-	-	保留	1.6	+	5.3	+	0							
P2-039	検出せず			4	1	3	5	2.06	5	5	-222.9	2084.4	-	1.4	±	±	2+	-	-	保留	1	+	0.6		12.3							
P2-040	検出せず			0	4	3	5	5.37	7	5.5	-221.3	1749.2	-	3.6	3+	1+	3+	-	-	活性	3.2	+	4.3	+	7.5							

厚生労働省 医薬安全総合研究事業

「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

2003年11月

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 3/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab			日本	ロシュ	オーソ			HCV Antibody						HCV Ab			HCV core Ab			HCV core Ag			HCV genotype
	ロシュ		日本	オーソ		富士レビオ	アボット		Ortho HCV Ab ELISA 3 (S/C) 隅性: S/C ≥ 1.0	Chiron RIBA HCV3.0 SIA	HCV Antibody			HCV Ab		HCV core Ab		HCV core Ag		HCV Ab			HCV core Ab			HCV core Ag				
	IU/ml	copies/ml	Genotype	オーソ HCV 感染性 ELISA 隅性 44.4%以上	ルミパルス ELISA 隅性 44.4%以上	アーン HCV 抗 原 ELISA 隅性 30.3%以上	HCV PA (2 nd)	HCV PA (2 nd)			dRn	IC-dRn	判定	c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NS5	SOD	判定	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス			
	P2-041	検出せず		1	1	4	5	3.85	7	5.5	-242.3	1378.6	-	4.1	+	+	-	-	-	保留	1.9	+	6.5	+	0					
P2-042	検出せず			2	9	3	5	3.77	7	5.5	-220.1	1047.2	-	4.5	+	+	-	-	-	陽性	1.4	+	4.7	+	8.3					
P2-043	検出せず			5	5	4	6	2.23	6	5.5	-200.0	2084.9	-	1.2	+	+	1+	-	-	保留	1.3	+	0.9	+	8.3					
P2-044	検出せず			5	6	2	4	4.51	7	5.5	-228.7	2127.0	-	4.6	+	+	-	-	-	保留	2.2	+	7.3	+	0					
P2-045	検出せず			6	1	1	5	2.68	6	5.5	-233.0	1890.1	-	1.8	+	+	-	-	-	保留	1.4	+	2.7	+	2					
P2-046	検出せず			3	6	3	6	2.69	7	5.5	-238.8	2404.0	-	1.6	-	+	3+	+	-	保留	1.3	+	2.2	+	12.3					
P2-047	検出せず			4	12	3	6	6.27	8	6	-149.9	2081.3	-	4.6	+	+	1+	-	-	陽性	2.8	+	6.0	+	0					
P2-048	検出せず			0	8	1	5	5.55	7	6	-231.4	2250.2	-	4.3	-	+	1+	2+	-	陽性	2.2	+	4.7	+	5.9					
P2-049	検出せず			0	9	1	5	3.25	7	6	-227.3	2783.7	-	2.3	+	1+	2+	-	-	陽性	1.5	+	0.9	+	1.2					
P2-050	検出せず			3	1	2	6	3.73	8	6	-216.8	2350.8	-	3.9	-	+	1+	-	-	保留	1.7	+	5.4	+	4.4					
P2-051	3.1×10^6	2.3×10^7	N(2b)	14414	20082	12792	14	104.34	15	12.1	-	-	na	5.3	-	-	-	-	-	陽性	68.6	+	65.1	+	16471.4	-	2b			
P2-052	検出せず			2	11	4	6	1.61	6	6.5	-150.8	788.8	-	1.2	+	+	土	-	-	保留	1.1	+	0.1	+	9.1					
P2-053	検出せず			8	4	3	7	5.37	9	6.5	-280.1	2685.4	-	5.0	+	+	1+	1+	-	陽性	2.9	+	9.0	+	8.3					
P2-054	検出せず			7	9	2	6	3.30	6	6.5	-153.4	2000.7	-	2.6	-	+	1+	-	-	保留	2	+	0.9	+	7.5					
P2-055	検出せず			2	4	2	6	3.98	7	6.5	-269.8	2597.4	-	3.0	-	+	1+	土	-	保留	1.5	+	2.8	+	0					
P2-056	検出せず			0	0	2	6	5.62	8	7	-157.8	1510.4	-	1.7	+	1+	1+	-	-	陽性	2.1	+	4.6	+	0					
P2-057	検出せず			0	0	4	6	7.78	7	7	-228.4	2031.3	-	3.4	-	1+	3+	-	-	陽性	3.8	+	2.3	+	2.8					
P2-058	検出せず			2	4	4	7	10.86	9	7	-152.8	1410.0	-	6.0	-	1+	1+	1+	-	陽性	7.1	+	16.9	+	0					
P2-059	検出せず			10	0	4	6	3.79	7	7	-238.2	2731.8	-	1.4	+	1+	3+	-	-	陽性	2	+	3.2	+	6.7					
P2-060	検出せず			4	5	2	7	20.87	12	7	-225.1	820.7	-	6.3	1+	1+	1+	-	-	陽性	8.4	+	67.8	+	2.6					

厚生労働省 医薬安全総合研究事業

「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

2003年11月

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための
標準パネル血漿 (HCV用) - 4/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab		日本	ロシュ	オーソ			HCV Antibody						富士レビオ						
	ロシュ		日本	オーソ			富士レビオ	アボット			AMPLINAT HBV/HCV/HIV-1			Chiron RIBA HCV3.0 SIA						HCVAAb	HCV core Ab	HCV core Ag	HCV genotype			
	IU/ml	copies/ml	Genotype	オーソ HCV RNA ELISA テスト 44.4%HCV positive	ルミパルス ELISA テスト 50.0%HCV positive	オーソ HCV 抗原 ELISA テスト 50.0%HCV positive	HCV PA PA(2 ⁷)	A&SYM HCV II S/CO(陽性≥ 1.0)	HCV PHA Titre (2 ⁿ) 陽性≥5	dRn	IC-dRn	判定	Ortho HCV Ab ELISA 3 (S/C) 階 段: S/C ≥ 1.0	c100p (NS4)	c3c (NS3)	c22p (core)	NSS	SOD	判定	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス			
													C.O.I.: 1以上を 陽性	判定	C.O.I.	判定	C.O.I.	判定	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス	ルミパルス				
P2-061	陰性			7	3	5	7	4.03	8	7	-270.7	2817.5	-	3.9	±	1+	-	-	陽性	2.4	+	5.3	+	0		
P2-062	陰性			2	0	4	7	2.41	6	7	-199.4	2889.4	-	1.2	-	1+	-	-	保留	1.9	+	0.2		0		
P2-063	陰性			8	0	1	7	4.41	8	7	-274.4	2648.3	-	3.9	±	1+	-	-	陽性	2.9	+	2.3	+	0		
P2-064	陰性			0	2	1	7	8.35	8	7	-112.4	2406.8	-	4.4	±	3+	-	-	陽性	5.7	+	3.9	+	0		
P2-065	4.9×10 ³	2.5×10 ⁷	III (2a)	11880	10546	8054	13	85.13	13	12↑	-	-	na	5.9	-	1+	-	-	陽性	32	+	84.2	+	11546.7	+	2a
P2-066	陰性			0	5	3	7	13.33	9	7.5	-233.8	2548.3	-	6.3	±	1+	-	-	陽性	4.9	+	20.9	+	1.2		
P2-067	陰性			6	0	2	7	6.00	8	7.5	-214.2	712.4	-	4.0	±	1+	-	-	陽性	4.8	+	4.5	+	2.8		
P2-068	陰性			2	7	6	7	35.48	9	7.5	-236.5	2773.0	-	6.3	±	2+	3+	-	陽性	14.8	+	55.0	+	0		
P2-069	陰性			7	7	2	7	14.01	9	7.5	-113.3	1643.1	-	6.3	±	2+	3+	-	陽性	9.4	+	13.4	+	0		
P2-070	6.0×10 ⁵	3.8×10 ⁶	II (2a)	3140	2650	2746	7	61.24	11	7.5	-	-	na	6.3	-	2+	3+	-	陽性	21	+	151.0	+	5232.6	+	2a
P2-071	陰性			7	4	4	7	4.26	9	8	-84.5	1522.5	-	4.2	±	1+	-	-	保留	2.6	+	4.4	+	0		
P2-072	陰性			0	3	8	8	10.83	9	8	-252.5	1120.8	-	5.3	±	2+	3+	±	陽性	5.5	+	12.6	+	0.4		
P2-073	陰性			0	0	1	9	17.09	9	9	-134.8	1534.8	-	6.3	-	1+	2+	-	陽性	6.2	+	18.9	+	13.1		
P2-074	陰性			0	0	1	9	17.90	9	9	-246.1	457.8	-	5.4	±	2+	3+	1+	陽性	10	+	6.4	+	1.2		
P2-075	陰性			3	1	2	9	21.77	10	8	-230.8	1991.6	-	6.3	-	1+	3+	-	陽性	9.7	+	21.1	+	3.6		
P2-076	陰性			4	0	2	8	26.33	8	9	-205.7	952.5	-	6.3	-	3+	1+	-	陽性	9.9	+	6.0	+	0		
P2-077	陰性			6	6	1	10	20.41	11	9.5	-129.2	1429.0	-	6.3	±	3+	1+	-	陽性	11.7	+	26.2	+	0		
P2-078	陰性			5	0	3	10	36.43	11	10.5	-114.9	1435.7	-	6.4	±	2+	3+	-	陽性	19	+	50.9	+	0		
P2-079	陰性			3	3	4	12	70.52	13	11	-112.9	1589.3	-	6.4	±	2+	3+	-	陽性	39.4	+	16.7	+	0		
P2-080	2.0×10 ⁶	1.3×10 ⁷	II (1b)	15825	14459	12440	11	45.25	12	11	-	-	na	6.2	±	2+	3+	-	陽性	19.9	+	84.3	+	11838.8	+	1b

厚生労働省 医療安全総合研究事業

「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

2003年11月

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための

標準パネル血漿 (HCV用) - 5/6

パネル番号	HCV RNA			HCV Core Ag			HCV Ab		日本	ロシュ	オーソ			オーソ			HCV Antibody			高士レビオ			HCV genotype			
	ロシュ		日本	オーソ		高士レビオ	アボット				HCV PA (2 ⁷)	S/CO(陽性比 1.0)	Titer (2 ⁿ)	AMPLINAT HBV/HCV/HIV-1			Ortho HCV Ab ELISA 3 (S/C) 比 値: S/C ≥ 1.0			Chiron RIBA HCVR3.0 SIA			HCVAb	HCV core Ab	HCV core Ag	
	IU/ml	copies/ml	Genotype	オーソ HCV抗原 ELISA(+) / 上限値 44.4IU/ml以上陽性	ルミパルス HCV抗原 ELISA(+) / 上限値 50.0IU/ml以上陽性	オーソ HCV ELISA(+) / 上限値 20.1IU/ml以上陽性	HCV PA(2 ⁷)	S/CO(陽性比 1.0)	Titer (2 ⁿ)	判定	dRn	IC-dRn	判定	c100p (NS4)	c33c (NS3)	c22p (core)	NS5	SOD	判定	C.O.I.: 1以上を 陽性	判定	C.O.I.	判定	fmol/L	判定	SRL genotype
	検出せず			9	0	2	11	56.34	12	11	-45.6	1838.0	-	6.1	-	-	3+	-	-	陽性	40.3	+	104.9	+	0	
P2-081	検出せず			2	3	3	12	12.87	7	11.5	-197.7	1665.3	-	4.1	±	1+	3+	-	-	陽性	6.8	+	3.1	+	0.4	
P2-082	検出せず			1.6×10 ⁶	2.9×10 ⁷	II (1b)	16482	14054	9850	12	88.19	13	11.5	-	-	na	6.2	±	-	-	陽性	51.9	+	123.2	+	14006.8 + 1b
P2-083	-			II (1b)	0	0	1	11	83.75	11	11.5	-	-	na	6.3	3+	-	-	-	陽性	41.1	+	54.9	+	5.1	
P2-084	-			II (1b)	5	1	1	11	35.26	13	11.5	-	-	na	6.2	-	-	3+	-	陽性	17.6	+	13.2	+	0	
P2-085	-			II (1b)	5	1	1	11	35.26	13	11.5	-	-	na	6.2	-	-	3+	-	陽性	17.6	+	13.2	+	0	
P2-086	2.2×10 ⁶	4.0×10 ⁷	II (2a)	24794	20646	17710	11	53.70	12	11.5	-	-	na	6.3	-	94	-	-	-	陽性	18.3	+	74.5	+	20708.9 + 2a	
P2-087	2.6×10 ⁶	2.0×10 ⁷	II (2a)	12077	13823	7132	14	109.65	14	12↑	-	-	na	6.1	±	-	-	-	-	陽性	60.4	+	37.7	+	13098.6 + 2a	
P2-088	1.7×10 ⁶	5.2×10 ⁷	II (2a)	18600	9307	11729	14	120.68	12	12↑	-	-	na	6.1	-	-	-	-	-	陽性	71	+	131.9	+	11490.4 + 2a	
P2-089	7.0×10 ⁶	3.2×10 ⁶	II (2a)	549	396	254	16	151.46	17	121	-	-	na	6.2	-	-	-	-	-	陽性	98	+	211.3	+	1167.4 + 2a	
P2-090	3.9×10 ⁶	1.6×10 ⁷	IV (2b)	10855	12772	9072	16	152.05	15	12↑	-	-	na	6.2	-	-	-	-	-	陽性	100	+	90.5	+	15511.4 + 2b	
P2-091	4.6×10 ⁶	1.3×10 ⁷	II (1b)	13443	13965	8038	17	156.91	17	12↑	-	-	na	6.2	-	-	-	-	-	陽性	99	+	85.9	+	18136 + 1b	
P2-092	1.1×10 ⁶	3.2×10 ⁶	IV (2b)	3073	2623	2146	16	146.43	16	12↑	-	-	na	6.4	-	-	-	-	-	陽性	98.1	+	300.0	+	3423.9 + 2b	
P2-093	4.3×10 ⁶	2.4×10 ⁷	II (2a)	14318	7634	9076	12	110.40	14	12↑	-	-	na	6.4	±	-	-	-	-	陽性	40.1	+	223.9	+	11335.7 + 2a	
P2-094	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	I (1a)	809	961	474	15	137.39	15	12↑	-	-	na	6.4	-	-	-	-	-	陽性	100	+	131.0	+	961 + 1a	
P2-095	1.5×10 ⁶	6.6×10 ⁶	II (2a)	4940	4583	3486	11	86.54	14	12↑	-	-	na	6.4	±	-	1+	-	-	陽性	34.6	+	122.7	+	5712.4 + 2a	
P2-096	3.4×10 ⁶	2.6×10 ⁷	II (2a)	17980	15769	10252	14	107.32	15	12↑	-	-	na	6.4	2+	-	3+	-	-	陽性	42.9	+	273.0	+	15851.9 + 2a	
P2-097	検出せず			2	4	2	12	73.07	11	12↑	-211.7	1725.2	-	6.4	3+	-	-	-	-	陽性	51.7	+	146.1	+	0	
P2-098	2.5×10 ⁶	8.1×10 ⁵	I (1a)	1268	1443	1031	13	118.40	14	-	-	-	na	6.4	-	-	-	-	-	陽性	63.1	+	58.3	+	1907.2 + 1a	
P2-099	検出せず							陰性																		
P2-100	検出せず							陰性																		

厚生労働省 医薬安全総合研究事業

「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

2003年11月

NIBSCから分与を受けたWHO標準品 (1.0×10^5 IU/ml)
の本研究班作業部会による測定値 6/6

—HCV用標準パネル血漿の最終測定値を得た際の同時測定による —

稀釀調整	HCV RNA	
	ロシュ	日赤
	(最終成績)	(最終成績)
	IU/ml	Copies/mL
$\times 10$	4.8×10^3	1.3×10^4
$\times 100$	4.4×10^2	2.5×10^3
$\times 1,000$	9.9×10^1	1.1×10^2
$\times 10,000$	-	<100
$\times 100,000$	-	<100

(有効定量下限：
50IU/ml)

厚生労働省 医薬安全総合研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班
2003年11月

表2

核酸増幅検査(NAT)標準化のための
標準パネル血漿(HIV用) -1/5
-作成中-

パネル番号	日付マーク	ロジック		ELISA HIV-1/2 Ab Normal Assay	ELISA HIV-1/2 Ab Ultrasensitive	ELISAT HIV/HCV/HIV	最終結果	アボット												高出レピガ		HIV WB											
		HIV copies/mL	HIV copies/mL	HIV-1/2 Ab				HIV-1/HIV-2 Antibody profile				HIV-1/HIV-2 Antibody profile				HIV-1/2 Ab				HIV-1 p24 Ag													
				ELISA HIV-1/2 Ab Normal Assay Cut-off: 15.5 pM 15.5 pM 15.5 pM	ELISA HIV-1/2 Ab Ultrasensitive Cut-off: 3.0 pM	ELISA HIV/HCV/HIV Cut-off: 3.0 pM		ELISA HIV-1 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antigen Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-1 Antibody Cut-off: 2.0 pM	ELISA HIV-2 Antibody Cut-off: 2.0 pM										
P3-001	4.1×10 ³	B	224378	1.2×10 ⁴	16160.5	1.8×10 ³	-	-	-	-	rs	1.5×10 ⁴	7.2	-	=	-	-	-	-	22.2	2.95	2.85	3.51	0.65	1.5	+	6	+	5	14.5	55.9	no band	陽性
P3-002	4.2×10 ³	B	-80454	1.8×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	4.8×10 ⁴	0.0	-	=	-	-	-	-	2.1	0.34	0.32	0.31	0.31	0.1	-	4	-	4	1.2	4.5	no band	陽性
P3-003	B	4979	1.5×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	5.0×10 ⁴	29.1	-	-	-	HIV-1+	0.5	31.48	29.51	0.18	0.15	30.0	+	16	+	16	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs3,gs25,p16	陽性			
P3-004	B	60727	6.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	6.1×10 ⁴	29.3	=	-	14	HIV-1+	1.1	16.54	18.64	0.29	0.20	30.0	+	14	+	15	0.5	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-005	B	26166	2.6×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	2.5×10 ⁴	29.1	-	-	-	HIV-1+	0.2	35.18	30.41	0.18	0.20	30.0	+	17	+	17	0.5	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-006	B	5050	5.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	5.1×10 ⁴	20.9	-	-	-	HIV-1+	0.4	28.42	27.95	0.24	0.24	30.0	+	16	+	16	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-007	B	11782	1.2×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	1.2×10 ⁴	29.0	-	-	-	HIV-1+	0.3	29.52	29.46	0.22	0.22	30.0	+	17	+	17	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-008	B	2476	1.5×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	2.3×10 ⁴	29.0	-	-	-	HIV-1+	0.3	27.97	25.57	0.20	0.22	30.0	+	15	+	14	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-009	B	17000	1.7×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	1.7×10 ⁴	28.7	=	-	16	HIV-1+	2.4	35.44	35.99	1.73	1.68	30.0	+	16	+	16	3.6	13.5	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-010	B	10714	1.1×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	1.1×10 ⁴	26.5	-	-	-	Z+	1.3	HIV-1+	0.4	16.45	16.55	0.16	0.20	25.5	+	11	+	11	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性	
P3-011	E	98023	9.8×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	9.3×10 ³	25.8	-	-	-	HIV-1+	0.3	10.27	10.26	0.20	0.24	25.6	+	11	+	11	0.5	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-012	B	12257	2×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	1.2×10 ⁴	29.2	-	-	-	HIV-1+	0.3	28.54	29.05	0.20	0.22	30.0	+	17	+	17	0.5	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-013	B	211839	5.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	3.1×10 ⁴	29.2	-	-	-	HIV-1+	28.4	28.69	37.73	9.34	8.25	30.0	+	17	+	17	21.1	79.1	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-014	B	22991	2.3×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	2.3×10 ⁴	16.5	=	-	4	Z+	HIV-1+	2.1	3.54	3.46	0.55	0.55	25.1	+	12	+	12	3.5	13.1	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性		
P3-015	B	270350	2.7×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	2.2×10 ⁴	29.3	2*	-	-	HIV-1+	0.3	24.87	29.36	0.76	0.85	30.0	+	14	+	12	3.2	14.2	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-016	B	3411	3.3×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	3.3×10 ³	29.0	3*	-	-	HIV-1+	0.2	24.97	29.61	0.20	0.20	30.0	+	14	+	14	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-017	E	262527	2.5×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	rs	2.3×10 ⁴	26.0	-	-	-	HIV-1+	0.3	22.45	21.01	0.20	0.24	30.0	+	15	+	15	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-018	E	2798	2.8×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	2.3×10 ³	26.8	2*	-	-	HIV-1+	0.3	23.14	22.39	0.22	0.22	30.0	+	13	+	13	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-019	B	4857	4.9×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	4.7×10 ³	26.9	2*	-	-	HIV-1+	0.4	26.22	25.65	0.16	0.20	30.0	+	16	+	15	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			
P3-020	A	330	3.3×10 ³	-	-	-	-	-	-	rs	3.3×10 ³	29.2	3*	-	-	HIV-1+	0.3	34.69	35.53	0.20	0.20	30.0	+	13	+	13	0.4	-	pol160,gs12L,gs6L,gs5,gs2,gs1,gs4,gs25,p16	陽性			

厚生労働省 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

核酸増幅検査(NAT)標準化のための 標準パネル血漿(HIV用) -2/5

- 作成中 -

パネル番号	日付マーク		ロジック										ゲノム		アプロット										直ヒーリ		HIV WB						
			Amplicor HIV Monitor v1.5					iPNAAT HIV/HCV/HB					最終結果		HIV-1/2 Ab		HIV-1/HIV-2 Antibody profile		iMAGEplus2		HIV-1/HIV-2 RT- ELISA (p24)		HIV-1/2 Ab		HIV-1 p24 Ag		直ヒーリ		WBプロット				
	定性検査 Copositive/ Negative		HIV タップ		Normal assay			Ultra-sensitive		iPNAAT		HIV/HCV/HB		最終結果		Oncel HIV- 1/HIV-2 Ab		Chiron PBA HIV-1/HIV-2 SA		HIV-1/2 RT- ELISA System (SVA) 16 test System (SVA) 16 SVA-16		HIV-1/HIV-2 RT- ELISA System (SVA) 16		HIV-1/HIV-2 RT- ELISA (p24)		HIV-1/2 Ab		HIV-1 p24 Ag		直ヒーリ		WBプロット	
	copies/mL		>10 DN assay		copies/mL		dn	KCdn	HIV	dn		dn				HIV-1/2 Ab		dn		dn		dn		dn		dn		dn					
P3-021	B	302917	1.9×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	2.0×10 ³	29.2	-	-	-	HIV-1	9.1	22.45	25.51	2.39	2.35	30.0	+	16	+	16	3.6	14.8	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-022	B	9998	9.9×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	9.9×10 ³	29.2	-	-	-	HIV-1	0.3	27.04	24.92	0.18	0.20	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-023	E	118330	1.3×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	1.3×10 ³	29.3	2+	-	-	HIV-1	0.2	21.65	21.76	0.22	0.20	30.0	+	14	+	14	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-024	B	812	8.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	8.1×10 ³	28.9	-	-	-	HIV-1	0.3	29.10	30.00	0.18	0.18	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-025	B	1050	1.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	1.1×10 ³	28.6	-	-	-	HIV-1	0.2	33.57	35.25	0.22	0.23	30.0	+	17	+	16	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-026	B	559	5.6×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	5.6×10 ³	28.9	-	-	-	HIV-1	0.3	35.15	32.34	0.32	0.22	30.0	+	17	+	16	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-027	B	145556	1.5×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	1.5×10 ⁴	29.1	3+	-	-	HIV-1	40.5	36.83	38.48	32.76	30.59	30.0	+	19	+	18	5.8	317.5	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-028	B	55048	6.5×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	5.5×10 ³	29.0	-	-	-	HIV-1	0.3	27.34	27.08	0.24	0.29	30.0	+	15	+	15	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-029	B	9840	9.8×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	9.8×10 ³	29.0	-	-	-	HIV-1	0.5	31.98	32.98	0.20	0.20	30.0	+	17	+	16	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-030	B	9017	3.0×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	9.0×10 ³	29.2	-	-	-	HIV-1	1.0	26.52	27.86	0.47	0.51	30.0	+	15	+	15	0.8	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-031	B	110769	1.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	1.1×10 ³	25.6	1+	-	-	HIV-1	0.7	12.55	13.90	0.37	0.53	30.0	+	14	+	14	0.7	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-032	B	19172	1.9×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	1.9×10 ⁴	29.2	-	-	-	HIV-1	0.5	25.25	25.00	0.22	0.27	30.0	+	15	+	15	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-033	B	4431	4.9×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	4.9×10 ³	29.2	3+	-	-	HIV-1	0.4	31.15	33.40	0.18	0.22	30.0	+	14	+	14	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-034	A	1020	1.0×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	1.0×10 ³	28.2	3+	-	-	HIV-1	0.3	36.76	32.99	0.16	0.20	30.0	+	11	+	14	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-035	B	6755	6.6×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	6.6×10 ³	28.6	3+	-	-	HIV-1	0.3	24.87	25.61	0.18	0.20	30.0	+	15	+	15	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-036	B	41607	4.2×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	4.2×10 ³	29.3	3+	-	-	HIV-1	0.6	26.53	25.98	0.22	0.25	30.0	+	17	+	16	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-037	B	3126	3.1×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	3.1×10 ³	29.0	-	-	-	HIV-1	0.3	22.16	32.98	0.20	0.22	30.0	+	18	+	19	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-038	B	2887	2.4×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	2.4×10 ³	29.2	-	-	-	HIV-1	0.3	25.41	26.93	0.20	0.29	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-039	B	68790	3.2×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	3.7×10 ⁴	29.3	-	-	-	HIV-1	0.3	33.64	35.78	0.22	0.24	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		
P3-040	B	75457	7.5×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	7.5×10 ³	29.1	2+	-	-	HIV-1	11.5	34.77	35.56	3.72	3.80	30.0	+	17	+	16	7.3	29.6	gp160(gp120,p68,p55,p52,p41,p34,p25,p18)	判定	判定		

厚生労働省 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

核酸増幅検査(NAT)標準化のための
標準パネル血漿(HIV用) -3/5

-作成中-

バトル番号	日付	ロジック										サブレシピ									
		AMP/ICOR HSV Monitor v1.5					HIV-1/2 AB					HIV-1/2 AB					HIV-1/2 AB		HIV-1/2 AB		
		正常検査		ウツラル検査			ELISA HSV/HCV/HLV		直接検査			HIV-1/2 AB		HIV-1/2 AB			HIV-1/2 AB		HIV-1/2 AB		
		copies/ml	HSV タイプ	copies/ml	copies/ml	copies/ml	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	HIV-1	HIV-2	HIV-1	HIV-2	HIV-1	HIV-2	HIV-1	HIV-2	HIV-1	HIV-2
P3-041	B	15629	1.6×10^4	-	-	-	-	-	-	1.5×10^4	28.9	3+	-	-	-	-	HIV-1/2 AB				
P3-042	B	45632	4.4×10^4	-	-	-	-	-	-	4.4×10^4	20.2	2+	-	-	-	-	HIV-1/2 AB				
P3-043	B	129	1.3×10^4	-	-	117	117	-	-	1.3×10^4	29.0	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-044	B	8655	6.9×10^2	-	-	-	-	-	-	6.5×10^2	29.2	2+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-045	B	1611	1.6×10^4	-	-	-	-	-	-	1.6×10^4	20.3	2+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-046	NAT(+) D	0	-	-	-	0	0	-154	1351	-	29.1	3+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-047	B	12931	1.3×10^4	-	-	-	-	-	-	1.3×10^4	17.8	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-048	E	39707	4.0×10^4	-	-	-	-	-	-	4.0×10^4	29.4	2+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-049	B	4562338	1.5×10^6	-	-	-	-	-	-	4.5×10^6	16.4	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-050	B	3273	1.3×10^4	-	-	295	295	-	-	3.3×10^4	28.6	2+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-051	B	331519	3.5×10^3	-	-	-	-	-	-	3.3×10^3	29.1	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-052	B	1211	2×10^4	-	-	-	-	-	-	1.2×10^4	29.1	1.3+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-053	B	152711	1.5×10^4	-	-	-	-	-	-	1.5×10^4	29.0	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-054	E	2749	2.2×10^4	-	-	-	-	-	-	2.2×10^4	29.3	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-055	B	nh	-	-	-	inh	inh	2020	748	+	(+)	25.9	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-056	E	25305	3.5×10^4	-	-	-	-	-	-	3.5×10^4	29.3	3+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-057	B	0	-	-	-	inh	inh	335	1239	+	(+)	25.5	±	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-058	B	15742	1.9×10^4	-	-	-	-	-	-	1.9×10^4	29.2	2+	-	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-059	B	0	-	-	-	inh	inh	1335	1378	+	(+)	26.8	2+	-	-	HIV-1/2 AB					
P3-060	A	2500	2.6×10^3	-	-	-	-	-	-	2.6×10^3	29.1	-	-	-	-	HIV-1/2 AB					

核酸増幅検査(NAT)標準化のための 標準パネル血漿(HIV用) -4/5

-作成中-

厚生労働省 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

核酸増幅検査(NAT)標準化のための
標準パネル血漿(HIV用) -5/5

-作成中-

パネル番号	日付	ロジック				ゲート				ターゲット				富士ヒューリック														
		ANPLICOR HIV Monitor v1.5		MPLNAT HIV/HCV/HBV		HIV-1/2 Ab		HIV-1/HIV-2 Antibody profile		HIV-1/HIV-2 抗原		HIV-1/HIV-2 抗原 EIA II (P24 Ag)		HIV-1 Ab		HIV-1 p24 Ag		HIV WB										
		採取部位 コンディション	HIV タイプ	Normal/susy	Ultrasep positive	copies/mL	copies/mL	RNA	IC-RNA	IC-RNA	IC-RNA	IC-RNA	IC-RNA	C.O.I.	pp/ml	bund	性別	年齢										
P3-061	9	54459	5.4x10 ⁴	-	-	-	-	na	5.4x10 ⁴	28.9	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	41.64	39.84	0.23	0.22	30.0	+	10	+	18	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-062	8	8688	6.7x10 ⁷	-	-	-	-	na	8.7x10 ⁷	29.1	gp120	gp41	HIV-1+	0.2	53.91	35.42	0.23	0.26	30.0	+	10	+	17	0.6	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-063	8	9145	19.1x10 ³	-	-	-	-	na	9.1x10 ³	28.9	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	34.66	33.00	0.24	0.23	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-064	9	112869	1.1x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.1x10 ⁵	28.7	gp120	gp41	HIV-1+	0.2	32.26	20.27	1.17	1.19	30.0	+	14	+	15	2.6	9.2	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-065	8	45901	4.6x10 ⁴	-	-	-	-	na	4.6x10 ⁴	28.5	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	22.62	21.97	0.22	0.24	30.0	+	15	+	14	0.5	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-066	8	5169	8.1x10 ³	-	-	-	-	na	8.1x10 ³	29.0	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	39.63	40.04	0.18	0.22	30.0	+	16	+	17	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-067	8	107382	1.1x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.1x10 ⁵	28.8	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	31.25	29.33	0.20	0.32	30.0	+	17	+	16	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-068	8	1256102	1.3x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.3x10 ⁵	29.2	gp120	gp41	HIV-1+	0.2	37.46	37.20	12.75	15.21	30.0	+	19	+	19	46.3	101.1	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-069	8	10456	1.0x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.0x10 ⁵	29.3	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	37.89	39.75	0.22	0.28	30.0	+	16	+	17	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-070	8	37991	5.8x10 ⁴	-	-	-	-	na	3.8x10 ⁴	29.4	gp120	gp41	HIV-1+	0.2	25.49	24.96	0.72	0.85	30.0	+	17	+	16	1.5	5.6	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-071	8	1947	1.9x10 ²	-	-	-	-	na	1.9x10 ²	29.5	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	12.45	14.17	0.18	0.22	30.0	+	11	+	11	0.5	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-072	E	130554	1.3x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.3x10 ⁵	29.4	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	23.59	22.92	0.28	0.30	30.0	+	16	+	16	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-073	8	92462	9.2x10 ⁴	-	-	-	-	na	9.2x10 ⁴	16.5	gp120	gp41	HIV-1+	1.2	7.89	8.02	0.36	0.40	16.5	+	8	+	8	1.0	3.8	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-074	8	52030	5.2x10 ⁴	-	-	-	-	na	5.2x10 ⁴	29.1	gp120	gp41	HIV-1+	0.2	30.95	30.90	0.20	0.24	30.0	+	17	+	17	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-075	8	115421	1.1x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.1x10 ⁵	25.1	gp120	gp41	HIV-1+	1.3	10.92	11.01	0.38	0.32	26.8	+	11	+	10	1.0	3.5	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-076	t	55025	5.6x10 ⁴	-	-	-	-	na	5.6x10 ⁴	25.4	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	11.22	11.36	0.20	0.22	25.3	+	11	+	11	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-077	NAT(0)	0	0	-	-	0	0	-135	12.75	19.3	gp120	gp41	HIV-1+	0.4	35.92	37.76	0.20	0.24	30.0	+	15	+	15	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-078	5	1243	1.2x10 ³	-	-	-	-	na	1.2x10 ³	29.2	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	24.31	22.44	0.24	0.28	30.0	+	15	+	15	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-079	8	130247	1.3x10 ⁵	-	-	-	-	na	1.3x10 ⁵	29.3	gp120	gp41	HIV-1+	0.9	25.53	23.13	0.77	0.85	30.0	+	18	+	17	0.9	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46
P3-080	NAT(1)	317	3.2x10 ³	-	-	-	-	na	3.2x10 ³	29.1	gp120	gp41	HIV-1+	0.3	12.44	12.46	0.16	0.30	22.9	+	10	+	10	0.4	-	gp160, gp120, gp64, gp55, gp2, gp41, gp40, gp34, gp25, gp18	女性	46

厚生労働省 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
「安全な血液製剤を確保するための技術および血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」班

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
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（H13-医薬-037）
分担研究報告書

HCV 定性 NAT 検査のサーベイについて

研究協力者 玉造 澄 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
林 邦彦 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
佐々木政人 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
田口直子 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
平井鉄三 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
松山和弘 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

研究要旨

ヒト C 型肝炎ウイルス RNA 検出検査をルチン検査として実施している施設を対象に、「2002 年肝炎ウイルス核酸増幅検査（NAT）コントロールサーベイ（以下、サーベイ）」を実施した。

NAT 検査は、血漿検体中の HCV-RNA を定量・検出する目的で広く用いられている。特に定性的 HCV-RNA 検出検査は、薬物治療効果判定に重要である。そこで今回我々は、コバスアンプリコア HCV v2.0（自動 PCR 測定法）およびアンプリコア HCV v2.0（マイクロプレート用手法）をルチン検査に採用している施設を対象に、検査の精度を調べる目的で全国的なサーベイを実施した。

検体として、日本で主に見られるウイルス型 3 種類 (Genotype 1b, 2a, 2b) の希釈検体（およそ 200-400 IU/mL）と陰性検体の 4 本をセットとして用意し、配布した。コバスアンプリコアで検査を実施した施設が 92 施設、アンプリコアで検査を実施したのが 32 施設、合計 124 施設の参加を得た。核酸の抽出方法は 6 通りであり、内部標準（インターナルコントロール、IC）は 104 施設（全体の 84%）で実施されていた。正答率は、Genotype 1b, 2a, 2b、陰性それぞれで、97.6%, 93.5%, 97.6%, 100% であった。偽陽性は 1 例もなかったが、見落としが若干（14 件、3.8%）あったことになる。

NAT 検査において、高感度で安定した HCV-RNA の検出を行うためには、検査実施者のスキルも精度を決める因子のひとつとなりうる。そこで我々は、フォローアップとして用手操作部分のチェックシートを作成した。さらに今回のサーベイで偽陰性報告があったり、極度に吸光度が低い報告があった 15 施設中 11 施設を実際に訪問し、ルチン検査に立ち会って問題点の抽出と改善のためのアドバイスを行った。その後、最初のサーベイと同じ 4 検体セットで 11 施設に対してフォローアップサーベイを実施したところ、全ての施設から正しい解答が報告された。HCV、IC ともに最初のサーベイの全施設平均を上回るシグナル強度が観察され、実施者の作業手技が改善されたことが確認できた。

A. 研究目的

コバスアンプリコア HCV v2.0（自動PCR測定法、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）およびアンプリコア HCV v2.0（マイクロプレート用手法、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）をルチン検査に採用している施設を対象に、NAT検査の精度を調べる目的で全国的なサーベイを実施した。

これらの検査はキット化され、自動化も進んでいるが、血漿検体からのHCV-RNAの抽出など、用手操作が必要な部分もあり、検査作業従事者のスキルが検査結果に与える影響も小さくない。今回、124施設の参加を得て、検査現場で実地に行われているHCV-RNAのNAT検査の精度を調べるサーベイを実施した。また、測定結果に問題がある施設については、共通のチェックシートで作業工程や検査室環境を確認し、操作上の問題点を抽出して改善を促すこととした。改善の効果については、フォローアップサーベイを実施し、それを確認することとした。

B. 対象と方法

Fig : 参加施設の内訳と抽出法一覧
(添付資料 No 3)

日本全国の124施設（検査センター、病院検査室、保健所、衛生研究所など）の参加を得た。コバスアンプリコア実施施設が92、アンプリコア実施施設が32施設であった。抽出方法は6種類に渡り、アンプリテックス法が84施設（68%）を占めた。

検体は、厚生労働省研究班（班長：吉澤浩司、広島大学大学院教授）のNAT精度管理パネル（2002年）から選択したHCV Genotype 1b, 2a, 2b の3種類を元に、同パネルから選択した肝炎マーカー陰性血漿のプール血漿で希釈し、作成した。パネルに記載されているHCV タイターを元に、10E5 IU/mL程度に一次希釈し、これをアンプリコア HCV モニターv2.0（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）にて精密に定量し

なおした。得られたHCV タイターを元に3x10E2 IU/mLを目標に最終希釈を行い、400 μLずつ微小試験管に分注して-80°Cで凍結保存した。希釈に用いた陰性プール血漿は、陰性検体として、これも400 μLずつ微小試験管に分注して-80°Cで凍結保存した。最終検体は、HCV 定量キット（アンプリコア HCV モニター）の定量限界以下の濃度であるため、正確なHCV タイターを確認していないが、HCV 定性検出キットでは陽性と判定されることを確認した。検体の施設への配布においては温度管理を厳密にし、ロシュ社担当者がドライアイス上で凍結保存したものをお運び、検査担当者に直接手渡した。検体は一度融解したものは直ちに抽出に供するものとして徹底し、再凍結は行わないこととした。

C. 結果と考察

サーベイの成績まとめ

Fig : Genotype 別成績一覧
(添付資料 No 4)

試料4, 5, 6, 7がそれぞれHCV Genotype 1b, 2a, 2b および陰性血漿検体である。陽性検体において12施設で合計14件（3.8%）の偽陰性、つまり見落としが見られ、3施設で極端に低い吸光度の報告があった。陰性検体においては、偽陽性は全く発生しなかった。ルチンのPCR検査室において偽陽性が皆無であったのは、アンプリコアキットが採用している「AmpErase（ウラシル-N-グリコシラーゼ、UNG）とdUTP」のキャリーオーバー防止機能が働いていることによると思われる。

偽陰性や低い吸光度を報告したうちの11施設（コバスアンプリコア9施設、アンプリコア2施設）を調べたところ、全ての施設で抽出にアンプリテックス法を用いていることが判明した。同法は使用するディスポーザブルが少なく、手順も少なく、手軽に高感度なHCV-RNA 検出を実施することが出来るが、

操作上若干のキーポイントがあり、これらを見逃したことで偽陰性を招いた可能性が考えられた。そこで我々は、特にアンプリテックス法の操作に重点を置き、検査実施環境と手順についてのチェックシートを作成してこれら 11 施設全てを訪問し、実際のルチンに立ち会って操作上の問題点の発見と改善を試みた。

1. チェックシートの作成

検査環境、抽出工程の手技を中心に、52 項目に上るチェックリストを作成した。各項目には、その操作が検査結果に及ぼす影響の大きさを考慮したリスクファクター（1～4）を設定し、チェック結果にファクターを掛けた数値の総和でその度合いに応じた改善提案を行えるようにした。また、全てのチェック項目に「チェックをする理由」を明記して、検査実施者が理解・納得して操作を見直せるよう配慮した。いくつかの例を提示する。斜字が実際のチェック項目、>>マーク以降がその理由である。また例 1～6、43 はいずれもリスクファクター 1 点であるが、41、42 は 4 点である。全項目を記したチェックシートは、紙面の関係で割愛するが、著者にメール (shigeru.tamatsukuri@roche.com) でご請求いただければ別途お届けしたい。

(チェックリストの例)

A) 手袋・マスクの使用について

1. パウダーフリーの手袋を使っていますか？

パウダー（粉）の混入は RT-PCR を阻害しますので使用を避けてください。

2. 手に合うサイズの手袋を使っていますか？

指先が余っているなどフィットしない手袋は、操作性を損なうばかりでなく、気付かぬうちに他の検体などに触れてコンタミネーションの原

因となってしまう事があります。

3. マスクは使用していますか？

唾液には HCV RNA を分解する酵素 (RNase) が大量に含まれています。くしゃみや咳はもちろん、おしゃべりなどでも唾液は飛散しますので十分ご注意ください。

B) 次亜塩素酸水を使用しての清浄作業について

4. 洗瓶に小分けして使用していますか？

次亜塩素酸は経時的にその効力が落ちてきます。洗瓶（飛散が少ない）を用いて、少量ずつコマメに準備する事をお勧めします。推奨濃度は 0.5～0.6% です。

5. 作業台にスプレー（噴射）していませんか？

スプレーは厳禁です。飛散した次亜塩素酸が、検体、試薬、および未使用のチップなどに付着し、偽陰性を引起する原因となりかねません。

6. ティッシュを使っていますか？

吸水性・拡散性に優れ、器具や作業台の拭取りにおいても必要以上に次亜塩素酸を残しません。

M) 測定開始直前の検体の取扱い

41. 凍結保存した検体を測定する場合、よく溶かしてから使用していますか？

42. 抽出を開始する前に、十分な攪拌およびスピンドダウンをしていますか？

特に凍結融解した検体は濃度勾配が生じています。十分に攪拌してからサンプリングしてください。また、攪拌したら、必ずスピンドダウンを行ってください。蓋の周辺に付着した検体を遠心力で振るい落としますので、開栓時の飛散による感染やクロスコンタミの危険性を防ぎます。

43. 検体の状態を確認していますか？（フィブリンの有無など）

フィブリンや強溶血の有無などの検体情報は、測定結果の確認に際し

有用な情報となります。また、透析患者検体、ヘパリン投与患者検体などをチェックする上で、依頼元である診療科の確認も必要に応じて行いましょう。

2. 問題点の抽出

チェックリストを用いた立会い作業の結果、以下の項目が問題点として抽出された。

- ・試料（凍結保存）融解後の攪拌不足
- ・アンプリテックス抽出における洗浄液残留
- ・アンプリテックス抽出におけるラテックス分散不備
- ・初心者による実施＆報告

最後を除いて、いずれもリスクファクター4点が設定されていた項目であった。そこでこれらの改善指示と、初心者のトレーニングを行ったのち、11施設において最初のサーベイと同じ検体セットを用いて、フォローアップサーベイを実施した。

フォローアップサーベイの成績まとめ

Fig : フォローアップサーベイ成績一覧
(添付資料 No 18)

フォローアップサーベイに参加した全11施設すべてが正しい結果を得た。また陽性試料（試料4～6.）における吸光度（OD）の平均値は、前回（本サーベイ）の全体の平均値と比較し、ほぼ同等か高めに測定され、改善が確認された。

D. 結論

コバスアンプリコアHCV v2.0（自動PCR測定法）およびアンプリコアHCV v2.0（マイクロプレート用手法）をルチン検査に採用している施設を対象に、臨床の場で行われているNAT検査の精度を調べる目的で、124施設の参加を得て全国的なサーベイを実施

した。検体として、日本で主に見られるウイルス型3種類（Genotype 1b, 2a, 2b）の希釈検体（およそ200-400 IU/mL）と陰性検体の4本をセットとして用意し、内容が判らないようコード化して配布した。測定においては、この検体のみを特別に測定することがないよう、ルチンの検体と合わせて通常の検査状態で測定することを参加の条件として要求した。

参加施設の内訳は、コバスアンプリコアで検査を実施した施設が92施設、アンプリコアで検査を実施したのが32施設、合計124施設である。核酸の抽出方法は6通りであり、内訳はアンプリテックス84施設（67.7%）、セバジーンRVR 23施設（18.5%）、アンプリキャップGT 8施設（6.5%）、アンプリコア原法4施設（3.2%）、ExRD 2施設（1.6%）、その他3施設、であった。施設数ではアンプリテックスが多いが、大規模検査センターはアンプリキャップGTを用いた自動抽出法を用いており、検体数では8施設で全体の70%程度に上ると思われる。内部標準（IC）は104施設（全体の84%）で実施されていた。

正答率は、Genotype 1b, 2a, 2b, 陰性それぞれで、97.6%, 93.5%, 97.6%, 100%であった。従来PCR法において問題となるとされてきた「偽陽性」については一例も発生しなかった。通常、同じPCRを繰り返すルチン検査の場では、以前に増幅したPCR産物のDNA（amplicon）による環境汚染とそれに起因する偽陽性の発生は、検査の精度を維持する上で大きな問題となるが、アンプリコアキットには「UNG-dUTP」キャリーオーバー防止システムが組み込まれており、これが奏功しているものと考えられた。偽陽性の報告は、不要な精密検査や患者の不安につながるため、確定診断とみなされがちなNAT検査においては絶対に避けたい事象であるが、今回のサーベイで偽陽性報告が全くなかったことは特筆に倣する成績であると考える。

一方、偽陽性は見られなかったものの、見

落としが若干（14件、3.8%）あった。サーベイの対象とした検査用試薬はキット化され、ある程度自動化も進んでいるが、血漿検体からのHCV-RNAの抽出など、用手操作が必要な部分もあり、検査作業従事者のスキルが検査結果に与える影響も小さくない。偽陰性の結果を出した施設を精査したところ、全ての施設において抽出方法としてアンプリテックス HCVを採用していることが判明した。同方法は全施設中最も多くの84施設が採用している。そこで、これら偽陽性を出した施設におけるいは、共通のチェックシートで作業工程や検査室環境を確認し、操作上の問題点を抽出して、さらにそれらの改善を促すこととした。偽陽性を報告したり、極端に低い吸光度を報告した15施設中11施設の協力が得られ、メンバーが実地に検査現場を訪問して検査に立ち会うことを許された。その結果、凍結検体を融解した後の攪拌不足や抽出工程における洗浄溶液の除去不十分などが確認された。一部の施設ではNAT検査の初心者が十分なトレーニングを受けずに検査に従事していたことも判明した。我々はこれらの改善を施設に提案し、11施設全てで改善の効果をみるためのフォローアップサーベイを実施した。

フォローアップサーベイの結果は、11施設全てで期待された結果が得られた。実際の検査結果についても、HCV、ICともに全国サーベイ時の平均と同等以上ものが得られ、手技が改善されたことが示された。

PCRを中心とするNAT検査は、非常に高感度で特異性が高いことから、確定試験として、また治療効果を知るためのモニタリング試験として急速に普及した。その反面、抽出された検体DNA/RNAの質や、操作手技の巧拙が結果に影響する面も見られる。試薬のキット化や自動化も進められているが、ルチン検査の現場での検査精度は不明であった。今回の全国サーベイでは124施設もの多施設の参加を得、非常に高い精度で検査が実施

されていることが証明された。また、一部成績に不具合のあった施設においても、問題点を見出し改善する試みが成功したことで、この種のサーベイを定期的に実施する意義が見出された。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

血液製剤の安全性確保のための品質管理技術の開発に関する研究
—HIV陽性献血血液のウイルス量およびHIVのタイプ、サブタイプに関する研究—

分担研究者 今井光信（神奈川県衛生研究所）

協力研究者 近藤真規子、嶋貴子（神奈川県衛生研究所）

中山烈次（日本赤十字社）

研究概要

2003年1年間のHIV検査陽性献血血液87例の内、入手できた52例のHIV抗体、血中ウイルス量、サブタイプ等について解析した。

HIV抗体陽性献血血液50例のHIV-1 PA抗体価は34例（68%）が 10^4 倍以上の高力価であったが、抗体価が 10^2 倍と低い例も3例存在した。

血中HIV-1・RNA量は、 10^4 コピー/ml以上の比較的血中ウイルス量の高い例が33例（63%）と多く、 10^5 コピー/ml以上の高い例も5例（10%）あった。

サブタイプ解析の結果、サブタイプBが94%とその大部分を占めており、東南アジアで大流行し、日本でも異性間性行為による感染例に多く見られるサブタイプA/Eは2%と少なかった。しかし、サブタイプBとA/E以外にもアフリカなどで流行しているサブタイプAとCが1例ずつ検出された。サブタイプAやCは日本のHIV感染者にも少数ながら検出されているが、HIV陽性の献血血液の解析ではサブタイプAは6例目、サブタイプCは初めての検出であった。今後、血液製剤の安全確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2とともに多様なHIV-1サブタイプの存在も考慮していくことが重要である。

A. 研究目的

現在、日赤の献血血液のHIV検査では、PA法により抗体スクリーニング検査を行い、陰性検体についてはさらに核酸增幅検査を行いより安全な血液製剤の供給に努めている。1999年のNAT検査導入以来2003年末までにHIV抗体スクリーニング検査陰性の23,498,013検体について500本プール（1999年7月～2000年1月）および50本プール（2000年2月以降）の

NAT検査が行われ、8例が陽性であった。また、2003年の1年間のHIV検査陽性例は87例（NATのみ陽性の2件を含む）であった。

これらHIV検査陽性の献血血液についてHIV抗体価やウイルス量、HIVのタイプおよびサブタイプを解析し、その分布や動向を把握しておくことは、今後の献血血液のHIV検査技術の標準化や精度管理を考える上で重要である。

このため、2003年に新たに入手できたHIV検査陽性の献血血液52例（NAT

2例を含む)についてHIV抗体価、血中ウイルス量、HIVのタイプ、サブタイプの解析を行った。

B. 研究方法

1. 検体

2003年1月から12月にHIV抗体検査で陽性と確認された献血血液50例、NAT検査のみ陽性となった献血血液2例、計52例について以下の解析を行った。

2. HIV検査陽性献血検体のHIV抗体価の測定

HIV検査陽性献血血液52例について、HIV-1/2 PA試薬(ジェネディアHIV-1/2ミックスPA:富士レビオ)およびHIV-1PA試薬、HIV-2PA試薬(セロディア・HIV-1/2:富士レビオ)を用いて、HIV-1抗体とHIV-2抗体を測定した。

3. 血中ウイルス量の定量(HIV-1・RNA定量)

血中ウイルスの定量はHIV-1・RNA定量用キット、アンプリコアHIV-1モニターver.1.5(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いた。

4. HIVサブタイプの解析

HIV検査陽性献血血液52例の血漿、あるいは末梢血単核球(PBMC)からHIV遺伝子を抽出し、nested PCR法でenv C2V3領域を増幅した。PCR産物をカラム精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、サブタイプを解析した。

1) 血漿からのHIV-1・RNAの抽出と逆転写反応

各血漿100ulからグアニジンチオシアネート法でHIV-1RNAを抽出後、逆転写酵素(スーパースクリプトII:インビトロジェン)を用いてcDNAを作

製した。

2) PBMCからプロウイルスの抽出

PBMCをプロテアーゼEで消化後、フェノール/クロロフォルム法によりプロウイルスDNAを抽出した。

3) nested PCR法

cDNA、あるいは抽出DNAを錆型とし、HIV-1 env V3領域をnested PCR法により増幅した。

1st PCRプライマー:

ICMK650(forward); 5'-GCCCATAGT GCTTCCTGCTGCT-3'

IC462M(reverse); 5'-AATGTCAGC ACAGTACAATGTACAC-3'

2nd PCRプライマー:

KH41(forward); 5'-TCAACTCAAC TGCAGTTAAAT-3'

C3E(reverse); 5'-AGAAAAATTCC CCTCTACAATTAA-3'

4) シークエンス反応とサブタイプ解析

Big Dyeターミネーターサイクルシークエンシングキット(アプライドバイオシステムズ)を用いてシークエンス反応を行い、オートシークエンサーPrism 310(アプライドバイオシステムズ)を用いて塩基配列を決定した。

塩基配列とともにneighbor-joining法による系統樹をClustal Xにより作成し、サブタイプを決定した。

C. 研究結果

1. HIV検査陽性献血血液のHIV抗体の解析(表1, 表2, 表3)

HIV抗体陽性献血血液50例についてHIV-1抗体とHIV-2抗体の測定を行った結果、HIV-1PA価は 10^2 倍が3例、 10^3 倍が13例、 10^4 倍以上が34例であった。一方、HIV-2抗体価が32倍以上の検体が5例あり、その力価は

32倍が4例、4096倍が1例であった。

これら5例のHIV-1抗体価が 10^4 倍以上と非常に高いこと、およびPCRの結果から、これら5例のHIV-2 PA試薬との反応はHIV-1感染による交差反応であると考えられた。

2. HIV検査陽性献血血液のHIV-1・RNA量の測定（表1、表4）

HIV検査陽性献血血液52例の血中ウイルスの測定値を表1に示した。

HIV-1・RNAが400コピー/ml以下が1例、400コピー/mlから 10^4 コピー/ml未満が18例、 10^4 から 10^5 コピー/mlが28例、 10^5 コピー/ml以上が5例であった。

3. HIV-1検査陽性検体のサブタイプの解析（表5、図1）

PCRでHIV-1 env V3領域が増幅され塩基配列が決定できた52例についての系統樹解析の結果を図1に示した。

これら系統樹解析の結果から今回解析した52例は欧米に多く見られるサブタイプB、タイ等の東南アジアに多いA/E、アフリカ等に多いA、Cの4種類に分類された。

また、表5に示したように、サブタイプBが49例(94%)と最も多く、サブタイプA/E、A、Cがそれぞれ1例ずつであった。

D. 考察および結語

HIV抗体陽性の献血血液50例についてHIV-1抗体とHIV-2抗体のPA抗体価の測定を行った結果、全検体がHIV-1抗体陽性で、HIV-1感染例であることが確認された。

HIV検査陽性献血血液52例について血中ウイルス量は、 10^4 コピー/ml以上の比較的血中ウイルス量の高い例が33例(63%)と多く、 10^5 コピー/ml

以上のかなり高い例も5例(10%)あった。

サブタイプ解析の結果、サブタイプBが94%とその大部分を占めており、東南アジアで大流行し、日本でも異性間性行為による感染例に多く見られるサブタイプA/Eは2%と少なかった。

しかし、サブタイプBとA/E以外にもアフリカなどで流行しているサブタイプAとCが1例ずつ検出された。

我々は1992年からHIV陽性の献血血液についてサブタイプ解析を行っているが、サブタイプAの検出は6例目、サブタイプCは初めての検出であった。サブタイプAやC、その他にも少数ではあるがサブタイプD、F、G、A/C等が病院等の医療機関の依頼検体からも検出されている。今後、血液製剤の安全確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2とともにこれら多様なHIV-1サブタイプの存在も考慮していくことが重要である。

E. 研究発表

論文発表

- Kurbanov F., Kondo M., Mizogami M., Imai M. et al: Human Immunodeficiency Virus In Uzbekistan:Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res Hum Retroviruses, 19, 731-738 (2003)

学会発表

- 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信：長期にわたりHIV-1抗体価が低レベルで推移した感染者における血漿中のHIV-1 nef/LTR領域の経時的解析、第17回日本エイズ学会（2003年11月27～29日）

2. 足立拓也、相楽裕子、宇宿秀三
野口有三、近藤真規子、今井光信：
当院における急性 HIV 感染 4 症例の
臨床的検討、第 17 回日本エイズ学
会（2003 年 11 月 27～29 日）
3. 嶋貴子、近藤真規子、一色ミユ
キ、塚田三夫、潮見重毅、今井光信：
HIV 検査の普及のための試み－保健
所検査への即日検査への導入－、第
17 回日本エイズ学会（2003 年 11 月
27～29 日）
4. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、
岩室紳也、岡部武史、今井光信：HIV
感染後長期間抗体価が低レベルで推
移した感染者における HIV-1 遺伝
子解析、第 18 回関東甲信静支部ウ
イルス研究部会（2003 年 9 月 25～26
日）

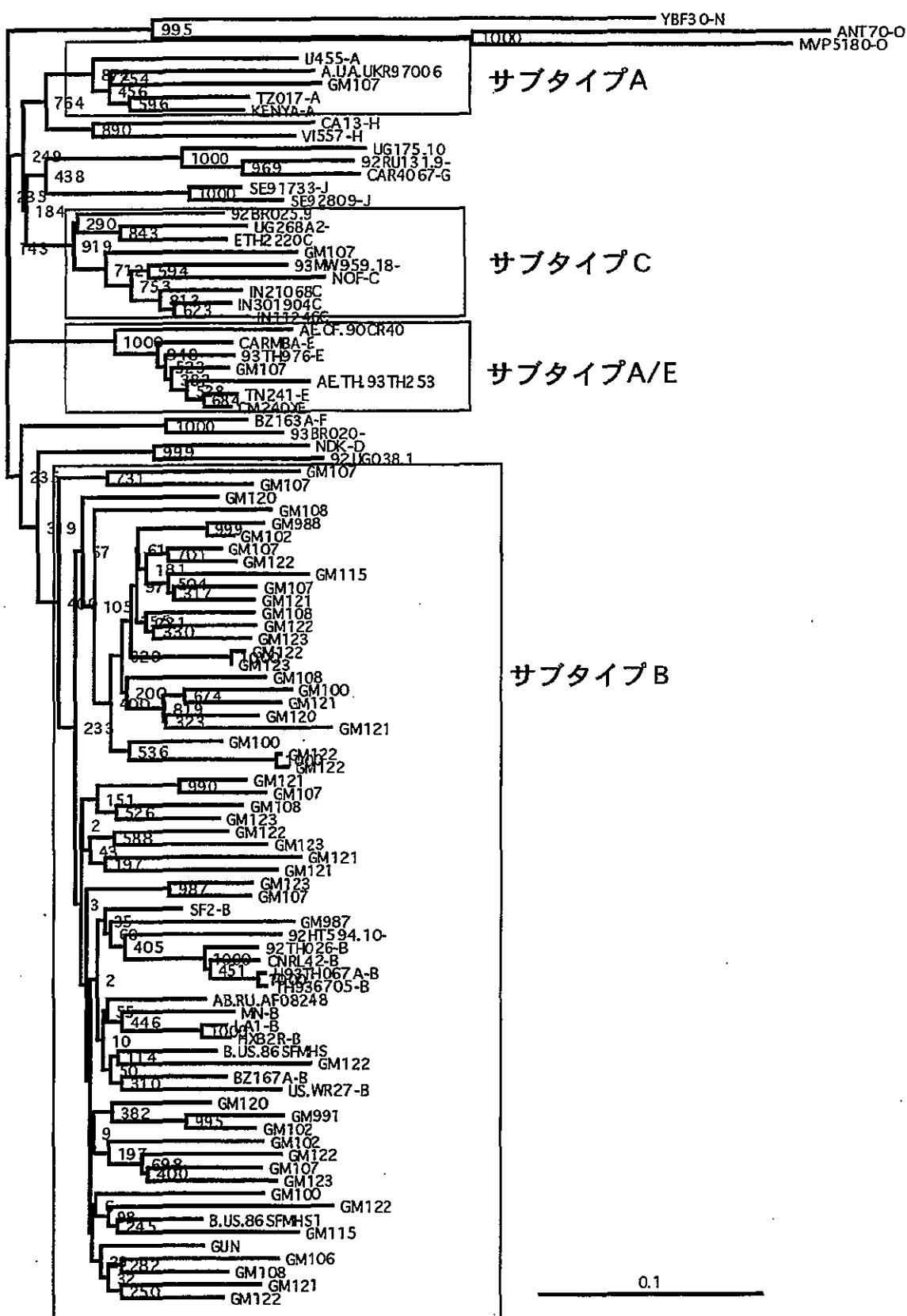


図1 HIV-1 env V3領域系統樹 (neighbour-joining法)
—2003年のHIV検査陽性献血血液52例の系統樹—

表1 日赤HIV検査陽性検体 PA値および血中ウイルス量

検体種別	No.	検査No.	衛研No.	HIV抗体検査 (PA法)			HIV-1RNA (copies/ml)
				ジェネディア HIV1/2 (Titer) ¹⁾	セロディア HIV-1 (Titer) ¹⁾	セロディア HIV-2 (Titer) ²⁾	
HIV抗体陽性 検体	1	Y3-1	GM987	10 ⁴	10 ³	2	16,000
	2	Y3-2	GM988	10 ⁴	10 ⁴	-	4,600
	3	Y3-3	GM991	10 ³	10 ³	-	130,000
	4	Y3-4	GM1006	10 ⁵	10 ⁴	-	12,000
	5	Y3-5	GM1007	10 ²	10 ²	-	17,000
	6	Y3-6	GM1008	10 ³	10 ²	-	1,500
	7	Y3-7	GM1020	10 ⁵	10 ⁵	16	6,100
	8	Y3-8	GM1021	10 ⁴	10 ⁴	32	17,000
	9	Y3-9	GM1022	10 ⁴	10 ⁴	8	6,500
	10	Y3-10	GM1069	10 ⁴	10 ⁴	-	4,700
	11	Y3-11	GM1070	10 ⁵	10 ⁴	-	16,000
	12	Y3-12	GM1071	10 ⁴	10 ⁴	2	1,700
	13	Y3-13	GM1072	≥10 ⁵	≥10 ⁵	2	53,000
	14	Y3-14	GM1073	≥10 ⁵	≥10 ⁵	-	6,700
	15	Y3-15	GM1074	10 ⁵	10 ⁵	16	14,000
	16	Y3-16	GM1075	10 ⁵	10 ⁵	-	18,000
	17	Y3-17	GM1076	10 ⁴	10 ⁴	2	61,000
	18	Y3-18	GM1077	10 ⁵	10 ⁵	32	110
	19	Y3-19	GM1078	10 ⁴	10 ⁴	-	790
	20	Y3-20	GM1079	10 ⁴	10 ⁴	-	80,000
	21	Y3-21	GM1080	10 ⁵	10 ⁴	8	30,000
	22	Y3-22	GM1081	10 ⁴	10 ³	2	160,000
	23	Y3-23	GM1082	10 ⁵	10 ⁵	-	120,000
	24	Y3-24	GM1083	10 ⁴	10 ⁴	32	13,000
	25	Y3-25	GM1084	10 ⁵	10 ⁵	2	10,000
	26	Y3-26	GM1207	10 ⁴	10 ⁴	8	22,000
	27	Y3-27	GM1208	10 ⁵	10 ⁵	2	8,800
	28	Y3-28	GM1209	≥10 ⁵	≥10 ⁵	4	73,000
	29	Y3-30	GM1211	10 ⁴	10 ³	-	2,700
	30	Y3-31	GM1212	≥10 ⁵	≥10 ⁵	16	17,000
	31	Y3-33	GM1215	≥10 ⁵	≥10 ⁵	2	18,000
	32	Y3-34	GM1216	10 ⁵	10 ⁵	32	27,000
	33	Y3-35	GM1217	10 ³	10 ³	2	36,000
	34	Y3-36	GM1218	10 ⁵	10 ⁵	-	32,000
	35	Y3-37	GM1219	≥10 ⁵	≥10 ⁵	4096	4,100
	36	Y3-38	GM1220	10 ³	10 ³	-	42,000
	37	Y3-39	GM1221	10 ³	10 ³	-	1,200
	38	Y3-40	GM1222	10 ³	10 ³	-	29,000
	39	Y3-41	GM1223	10 ⁴	10 ⁵	8	29,000
	40	Y3-42	GM1224	10 ⁴	10 ³	2	42,000
	41	Y3-43	GM1225	10 ⁴	10 ⁴	-	63,000
	42	Y3-44	GM1226	10 ⁴	10 ⁴	16	27,000
	43	Y3-45	GM1227	10 ³	10 ³	-	9,800
	44	Y3-46	GM1228	10 ³	10 ²	-	1,300
	45	Y3-47	GM1229	10 ⁴	10 ³	2	4,600
	46	Y3-48	GM1230	10 ⁴	10 ⁴	2	880
	47	Y3-49	GM1232	10 ⁴	10 ³	-	5,600
	48	Y3-50	GM1233	10 ⁵	≥10 ⁵	8	120,000
	49	Y3-53	GM1236	10 ⁴	10 ⁴	2	33,000
	50	Y3-54	GM1237	10 ⁴	10 ³	2	15,000
HIV-1NAT 陽性検体	51	Y3-55	GM1155	4	-	-	150,000
	52	Y3-56	GM1156	8	-	-	8,700

*PA値は検体希釈倍数で表示

1) 検体希釈倍数16倍以上を陽性と判定 2) 検体希釈倍数32倍以上を陽性と判定

表2 HIV検査陽性検体50例のPA値の分布

A.. ジェネディア HIV-1/2 ミックス PA

PA値	検体数
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	1
$\times 10^3$	8
$\times 10^4$	22
$\geq 10^5$	19
合計	50

B. セロディア HIV-1

PA値	検体数
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	3
$\times 10^3$	13
$\times 10^4$	17
$\geq 10^5$	17
合計	50

表3 セロディア HIV-2 が陽性であった検体のHIV-1/2、HIV-1 PA値

日赤No.	セロディア HIV-2	ジェネディア HIV-1/2	セロディア HIV-1
Y3-8	× 32	× 10 ⁴	× 10 ⁴
Y3-18	× 32	× 10 ⁵	× 10 ⁵
Y3-24	× 32	× 10 ⁴	× 10 ⁴
Y3-34	× 32	× 10 ⁵	× 10 ⁵
Y3-37	× 4096	≥ 10 ⁵	≥ 10 ⁵

表4 HIV検査陽性検体52例の血中ウイルス量

RNA量 (copies/ml)	検体数
400以下 (標準法、検出限界以下)	1
400～10000未満	18
10000～100000未満	28
100000以上	5
合 計	52

表5 献血血液におけるHIV-1検査陽性

検体のサブタイプ(2003年)

HIV-1サブタイプ (envelope C2V3)				
合計	B	E	A	C
52	49	1	1	1