

6.0) 約3 ml で1回遠心遠心洗浄する
179xg(1,000rpm)10分間。

5) PCをPBSで約30,000コ/μlに調整し、マイクロプレートU型：メンク社モジュールタイプ（高結合）のプレートに、50μlずつ滴下する。

6) 血小板浮遊液を滴下後、直ちにプレート遠心用アダプターを用いて、プレートを5分間遠心する。

7) プレート各穴のPBSを捨てずに2000倍希釈グルタール-PBS溶液(pH 6.0に調整)を各穴に100μlずつ加え20分間放置して固定する。

以上のステップの中で血小板の活性化に影響する以下2点について検討した。

1. 凝固阻止剤と血小板洗浄液についての検討：凝固阻止剤としてACD-A、EDTA、EGTA、血小板機能抑制剤としてアスピリン、インドメサシンの薬剤につき各種の濃度で検討した。

1.1. 血小板にかかる遠心負荷（荷重）についての検討：上記のステップ（2）と6）の遠心の条件を回転数を限界まで下げて荷重（g）を軽減した。

2. 血小板膜の活性化の評価法

1) 抗CD62（P-SELECTIN）抗体と抗CD63（gp53）抗体との反応

2) BK8（献血者血清で活性化血小板と反応する）抗体との反応

3) HPA（Human Platelet Antigen）-1, 2, 3, 4, 5, 6, の抗体との反応

以上1), 2), 3) を検討した。

C. 研究結果

1. 血小板の活性化防止の薬剤についての検討では、以前に試みたPGE1と同じように、遠心によるストレスでの活性化は防止できなかった。抗CD62抗体

抗CD63抗体が陽性になることと、インドメサシンでは血小板膜の溶解がおこりHPA抗原が減弱した。

2. 血小板のプレート遠心については、従来は2,000rpm、5分間であったが、遠心時間の5分間は固定したままに、回転数を段階的に低下して検討した。

2,000rpm (716xg), 1,600rpm (458xg)

1,500rpm (402xg), 1,400rpm (350xg)

1,200rpm (258xg), 1,000rpm (179xg)

500rpm (45xg), 300rpm (16xg)

200rpm (7.2xg), 100rpm (1.8xg)

この結果、500rpm (45xg) が血小板を固相するのに最低必要な荷重と判明した。これより軽い遠心では血小板は底部に沈降せず固相は不十分であった。

3. 上記の最適条件（500rpm）で作成した血小板固相プレートについて各種の抗体で検討した。

1) 抗CD62抗体、抗CD63抗体との反応は従来の2,000rpm (716xg) と比較して有意に活性化の程度は減弱し、抗CD62抗体および抗CD63抗体は1:100希釈ではほぼ陰性となった。

2) BK8抗体は2,000rpm (716xg) から1,200rpm (258xg) までのプレート遠心では血小板膜の活性化が強いため、陽性になった。しかし、1,000rpm (179xg) 以下の回転数では反応陰性であった。

3) 抗HPA1から6までの抗体との反応は、血小板膜の活性化の影響は抗HPA-2b (Sib⁺) 以外ほどの遠心条件で分離しても反応の差はなかった。

抗HPA-2b (Sib⁺) 抗体は2,000rpm (719xg) から1,200rpm (258xg) までは血小板膜の活性化にともない抗原が減弱し陽性反応が有意に弱かった。

1,000rpm (179xg) 以下の回転数では本

抗体の陽性反応の減弱は認められなかった。

D. 考察

血小板はそもそも遠心分離による機械的なストレスにより血小板膜の活性化が起こる。血小板膜が活性化すると、生体内にある血小板と異なった膜構造になる。

血小板抗体を検出する際には、この点が大きな問題になるが、国際的にもこの点は未知の領域であった。しかし、血小板膜が活性化した場合に生理的な血小板膜と差を生じるマーカーとなる抗体、例えば抗CD62抗体、抗CD63抗体などのモノクローナル抗体などが利用できるようになり、研究可能になった。

我々はこれらの抗体に加えて、血小板膜の活性化で反応するBK8抗体を献血者に見いだしていたので使用した。これらの抗体を用い評価すると、血小板機能を抑制する薬剤では、今のところ遠心分離操作（プレート遠心2,000rpm）による血小板の活性化を防止しえなかった。

しかし、PRPの分離とPBSの遠心洗浄を限界までの低速回転数に落とし、500rpm（45xg）のプレート遠心で固相を実施すれば従来の2,000rpm（716xg）に比較して約1/16の荷重であり血小板活性化を著しく軽度にして血小板抗体の検出が可能となることが判明した。

今回の研究で、抗HPA抗体の内、抗HPA-2b（Sib*）抗体が活性化した血小板では著しく抗原が減弱することを見いだした。このことは、血小板抗体検査や血小板クロスマッチ検査を行うに当たって、抗HPA-2b（Sib*）抗体は輸血患者ではHLA抗体に次いで臨床的に重要な抗体であるので検査の際に血小

板の分離条件は大切と思われる。

国際輸血学会の血小板ワークショップで同一検体で抗HPA-2b（Sib*）抗体の同定検査での一致率が低いのは、標的血小板の遠心分離による活性化が原因と推定される。

MPHAの従来法では2,000rpm（716xg）のプレート遠心を採用してきたのは、一つには血小板は活性化（粘着）させなければ付着しないとの考えがあったこと、また上記のような血小板活性化を評価する抗体が無かったことによる。今回の研究で血小板はその膜表面の接着因子などの存在により、活性化によらずにマイクロプレートに固相可能であることが分かった。

E. 結論

1. 血小板膜を活性化させることなくマイクロプレートに固相するための、遠心条件が分かった。この結果は今後の血小板抗体検査において偽陽性、偽陰性を減じ、生体内の反応をより忠実に再現するのに重要と思われた。

2. 血小板の活性化が起こるとHPA-1から6の内、HPA-2b（Sib*）抗原のみが有意に減弱することが分かった。

厚生省血液研究事業
血液製剤の試験法・評価法に関する研究班

平成10年度 分担研究報告

分担研究計画
ウイルス不活化製剤の有効性、安全性の評価に関する研究

分担研究者 関口定美 北海道赤十字血液センター所長
研究協力者 池淵研二 北海道赤十字血液センター副所長
阿部英樹 北海道赤十字血液センター研究部
菅原浩行 北海道赤十字血液センター研究部
テルモ (株) 研究開発センター

研究要旨

輸血用血液製剤および血漿分画製剤の安全性向上に関心が高まるなか、様々な不活化処理に耐性を示すバルボウイルス B19 (B19)が注目されてきている。この B19 の不活化・除去処理の検討に必須である感染価測定法は、CFU-E 細胞傷害性を利用した colony assay (CFU-E 細胞傷害性試験)を使用している。しかし CFU-E 細胞傷害性試験は顕微鏡観察が煩雑であり結果にばらつきが生じやすい問題があった。そこで今回われわれは CFU-E を用いた間接蛍光抗体法による簡便な感染価測定法の検討を行った。CD34 陽性細胞を SCF, Epo, IL-3 添加 IMDM 培地で7日間培養し、CFU-E 分化誘導した。この CFU-E に系列希釈した B19 を感染させ5日間の培養後、間接蛍光抗体法により感染価を測定した。感染価の検出感度は約 10^6 TCID₅₀ ($10^{5.6}$ virus copies / 10μ l)であり、また末梢血由来である CFU-E の lot や感染時における plasma の感染価測定への影響はみられなかった。

A. 研究目的

B19 は、輸血用血液製剤や血漿分画製剤を介して感染することが知られている。当センターでは B19 の感染価測定法として末梢血造血未熟細胞を分化誘導して得られた CFU-E を用いて細胞傷害性試験を行い、colony 形成阻害率を指標として感染価を測定している。しかし CFU-E 細胞傷害性試験は、顕微鏡観察が煩雑であり結果にばらつきが生じやすい問題があった。そこで今回われわれは、CFU-E を用いた間接蛍光抗体法による B19 の簡便な感染価測定法の検討を行った。

B. 実験方法

CD34 陽性細胞の分離と CFU-E への分化誘導

末梢血より Ficoll-Paque で単核球を回収し、ナイロン

ウールにより単球を除去後、CD34 陽性細胞分離キット (DYNAL)を用い CD34 陽性細胞を分離した。この CD34 陽性細胞を SCF, Epo, IL-3 添加 IMDM 培地で培養し CFU-E を分化誘導した。

B19 の感染と間接蛍光抗体法による感染価測定

CFU-E に系列希釈した B19 をスパイクし、4℃で2時間インキュベート後、Epo 添加 IMDM を加え5日間液体培養した。すべての細胞を使用して塗沫標本を作成し、1次抗体(anti-B19 mouse IgG), 2次抗体(anti-mouse IgG Goat IgG-FITC)を用いた間接蛍光抗体検出法を行い、FITC 陽性細胞を蛍光顕微鏡にて検出した。Reed-Muench 法により感染価 (TCID₅₀)を測定した。

C. 実験結果

分化誘導期間による感染価測定への影響

B19 が感染する CFU-E は、CD34 陽性細胞を SCF, Epo, IL-3 存在下で 5~7 日間培養することより分化誘導することができる。この培養期間による感染価測定への影響を検討するため、5~7 日間培養した各 CFU-E に PBS で系列希釈した B19 をスパイクし、感染価を測定した（表-1）。5~7 日間の分化誘導期間による感染価測定への影響はみられないため、以後の実験は最も多くの細胞数が得られる 7 日間分化誘導した CFU-E を使用することとした。

CFU-E の lot による感染価測定への影響

CFU-E は末梢血由来のため lot により感染価測定に影響を及ぼす可能性が推察された。そこで lot の異なる CFU-E に PBS で系列希釈した B19 をスパイクし、感染価を測定した（表-2）。3 lot (Su-02, 03, 06) の CFU-E において感染価にほとんど相違がみられないことから、lot による感染価測定への影響はないことが判明した。

B19 感染時における plasma の影響

前述までの実験においては、スパイクする B19 は PBS で系列希釈していたが、本方法の応用を考慮した場合、血漿に混入している B19 の感染価を測定することは重要である。そこで B19 抗体陰性 plasma で系列希釈した B19 をスパイクし感染価を測定した（表-3）。B19 感染時にお

いて Plasma が存在しても感染価測定には影響を与えないことが判明した。

D. 考察

今回検討した CFU-E を用いた間接蛍光抗体法による B19 感染価測定の検出感度は約 10^6 TCID₅₀ ($10^{5.6}$ virus copies / $10 \mu\text{l}$) であった。加えて CFU-E の lot に影響されず、plasma 存在下であっても感染価測定が可能であることから、本方法は簡便に感染価を測定できることが判明した。また B19 の不活化・除去処理の検討を行う場合、約 $6 \log_{10}$ までの感染価の低下が測定可能であり、その有効性が示唆される。

E. 研究発表

該当なし

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

表-1 各分化誘導期間による感染価の測定

分化誘導期間	Virus 濃度 (copies/10 μl)					N.C.	感染価
	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4		\log_{10} TCID ₅₀
day=5	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/6	5.60
day=6	6/6	6/6	6/6	5/6	1/6	0/6	6.50
day=7	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/6	6.00

間接蛍光抗体法で陽性と検出された well 数 / 感染させた総 well 数

表2 CFU-Eの各lotによる感染価の測定

CFU-E Lot	Virus 濃度 (copies/10 μ l)						N.C.	感染価 \log_{10} TCID ₅₀
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴			
Su-02	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/6	0/6	6.00
Su-03	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/6	0/6	5.60
Su-06	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4	5.67

間接蛍光抗体法で陽性と検出されたwell数 / 感染させた総well数

表3 B19感染時におけるplasmaの影響

CFU-E Lot	plasma	Virus 濃度 (copies/10 μ l)						N.C.	感染価 \log_{10} TCID ₅₀
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴			
Su-05	(+)	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	6.00
Su-05	(-)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4	6.33

間接蛍光抗体法で陽性と検出されたwell数 / 感染させた総well数

血漿分画製剤用原料血漿の HCV、HIV、HBV に対する 500 検体ミニプール核酸増幅検査(NAT)の実施状況とその効果に関する研究

分担研究者 日本赤十字社血漿分画センター 脇坂 明美
研究協力者 日本赤十字社血漿分画センター 古谷 健志 室塚 剛志

研究要旨

我々は血漿分画製剤の安全性向上を目的として、製剤用原料血漿について、1997 年 11 月より 500 検体ミニプールによる核酸増幅検査 (以下 500NAT と省略) を実施している。1998 年 10 月までに検査総数約 250 万から HCV が 5、HIV が 0、HBV が 37 の陽性献血者を特定した。500NAT 実施により、原料へ混入する危険性のあったウインドウ期血漿は、約 40%減少した。又、500NAT 実施に先立ち Boston Biomedica, Inc. が提供する、感染後の血液を経時的に採取したセロコンバージョンキットを使用して、500NAT の効果を検討した結果、残余危険率は HCV、HIV、HBV でそれぞれ 20.1、39.1、11.4%減少すると推定された。

これら結果より 500NAT は、血漿分画製剤の安全性をより一層高めると考えられた。

A. 研究目的

血漿分画製剤の製造工程には種々のウイルス不活化/除去工程が導入されており、少なくとも HCV、HIV、HBV については実質的に除去されていると考えられている¹⁾。しかし、このウイルス不活化/除去の効力をより一層高めるには、現在のスクリーニング方法では排除できないウインドウ期血漿を、血漿分画製剤の原料から可能な限り取り除くことが有効であると考えられる。そこで我々は、現在のスクリーニング方法より感度が高い NAT 導入を検討した。

本研究は、この 500NAT の実施状況を報告すると同時に、その効果を原料に混入する危険性のあったウインドウ期血漿の減少と、残余危険率の減少から評価することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 検体

1997 年 11 月から 1998 年 10 月までに血漿分画センターに送付された献血血漿約 250 万検体を本研究の対象とした。検体の調製方法は、まず 50 検体を 1

つにプールし、更に 50 検体プール 10 本からの試料を一つにプールし 500 検体プールを調製した。但し、検体調製の都合上、500 検体に満たない場合も 1 検体として扱った。NAT で 500プールが陽性となった場合、この 500プールを構成する 10 本の 50プール、さらに 50プール (すなわち 50 検体分) を 5×10 のマトリクスを構成し個別検体を特定した。

B-2 核酸増幅検査 (NAT)

HCV-NAT は、抽出にマインストEX-R&D、増幅・検出にはアンプリアHCV を使用した。HIV-NAT は抽出・増幅にアンプリアHIV-1エンターの変法²⁾、検出にはアンプリアHIV-1 を使用した。HBV-NAT は抽出にマインストEX-R&D、増幅・検出にマインストHBV 遺伝子定性キットを使用した。

B-3 500NAT 実施前後におけるウインドウ期血漿の発生率の比較

献血後に該当する血液が血液センターの現行のスクリーニング法のウインドウ期であることが疑われる場合がある (例えば、複数回献血者のウイルスマーカーが陽転した場合の前回献血や、輸血により患者にウイルス感染が疑われ

た場合など)。これらの情報は献血後情報として報告され、遡及調査が行われる。日本赤十字社では1996年9月から献血時の血液の一部を保管しているが、この様な時、保管検体を使用してNAT等を行いウィンドウ期の確認をしている。500NATにより陽性検体を排除した場合、献血後情報中の陽性率は低下することが予想される。そこで、500NAT導入前後において、献血後情報の中で保管検体のNATが陽性となる割合を比較し評価を行った。

B-4 ウィンドウ期短縮効果の検討

Boston Biomedica, Inc. (以下 BBI と省略) が提供する、感染後の血液を経時的に採取したセロコンバージョンキットを使用し、ウィンドウ期血漿の検出率とウィンドウ期短縮日数を検討した。短縮日数の算出方法は、現在行っているスクリーニング法—HCV抗体検査はPHA法、HIV抗体検査はPA法、HBs抗原検査はRPHA法—で陽性となった日数から、500倍希釈NAT陽性となった日数を引いて算出した。この際、感染後の日数はBBIキット添付文書のデータを使用し、ウィンドウ期間はHCV、HIV、HBVでそれぞれ82³⁾、22³⁾、79⁴⁾日とした。又、残余危険率(R.R.)は、G.B.Schreiberら³⁾の方法に従い次式により計算した。

$$R.R. = \text{年間陽転率} \times \text{ウィンドウ期間(日)} / 365(\text{日})$$

C. 研究結果

C-1 500NATの陽性率

HCVについては、検査総数2,521,498から5検体を、HIV、HBVについては検査総数2,429,063から0、37の陽性検体を特定した。この結果、陽性発生率はHCV、HIV、HBVでそれぞれ約1/500,000、0、1/66,000であった(Table 1)。

総検体数約6,000のうち、初回検査で陽性と判定されたのは、HCVが9、HIVが0、HBVが132検体であった。一方、最終的に陽性が確認されたのはそれぞれ5、0、37検体であるため初回検査での偽陽性の発生は4(0.067%)、0(0%)、95(1.58%)例であった。

一方、500NAT陰性であったが、遡及調査による保管検体がNAT陽性となった事例がHCVで2例、HBVで9例あった。このうちHBVの3例についてのTaqMan PCR法⁵⁾によるHBV-DNAコピー数の測定では、1例が定量限界以下、他の2例については1,000コピー/ml程度であった。

C-2 500NAT実施における遡及調査でのウィンドウ期血漿の発生率の比較

献血後情報による遡及調査により、献血者保管検体がNAT陽性となる割合をNAT導入前後一年間で比較することにより、500NATの効果を検討した。その結果、500NAT開始以前の1年間は、献血後情報中に占める保管検体でのウイルス陽性献血の割合は2.4%であった。500NAT開始後の1年間では、陽性率は1.5%であり(この中には、500NAT開始前のケースも含まれるため、それらはセロコンバージョンキットでの陽性率で補正した)、献血後情報のうち保管検体で陽性となる血液の割合について38%の減少が認められた(Table 2)。

C-3 500NATによるウィンドウ期短縮効果

BBIキットを用いて500NATにおける、ウィンドウ期血漿の検出率とウィンドウ期短縮日数を検討した。この結果、Table 3、Fig.1-3に示したようにBBIキットの原液でNAT陽性となった検体の500倍希釈における検出率は、HCV、HIV、HBVでそれぞれ100、60、46%であり、ウィンドウ期短縮日数は少なくともそれぞれ16.5、8.6、9.0日であった(ここで少なくともと表現したのは、ウィンドウ期の終了(抗体産生)まで追跡していないシリーズが幾つかあり、実際にはもっと短縮日数が大きかったと考えられるからである)。ウィンドウ期の短縮に伴い、残余危険率はHCV、HIV、HBVでそれぞれ20.1、39.1、11.4%減少すると推定された。ただし、BBIキットに添付された採血日データは初回採血日を起点としているため、感染後の日数ではない。

D. 考察

NAT導入についての世界的な動向を見ると、ヨーロッパ

諸国では1998年3月24日にCPMP(committee for proprietary medicinal products)の最終ガイドライン⁶⁾が承認された。この最終ガイドラインでは、1999年7月1日より、メーカー(販売承認所有者)は適切な感度と特異性のあるバリデートされた方法を用いて検査したとき、HCV-RNAが検出されない血漿 7° ル由来のバッチのみを市場に出すこと、検出感度を100IU (international unit)/mlとすること等が勧告されており、欧州でのNATの導入が義務付けられた。又、ドイツにおいてはPaul Ehrlich Institute (PEI)が、1999年4月1日から供給する赤血球製剤と血小板製剤についても、NATを要求している^{7, 8)}。

個々の献血者のNATの実施は、現段階では作業面、経済面から難しく、実際には幾つかの検体を 7° ルした 3° ルでの実施が有効であると考えられる。CPMPの勧告の中でも、この 3° ルでのNAT実施は推奨されており、 3° ルでのNATの評価が世界的に行われている。

例えば、R.B.Zotsら⁹⁾は、 $20-30^{\circ}$ ルでのHCV、HIV-NATで、20,441人の献血者からHCVについて5人の陽性を特定し、HCVに関しては 3° ルでのNATは極めて有効であると述べている。又、K.-B.Henneberg-Questerら¹⁰⁾は、 $10-20^{\circ}$ ルでのHCV-NATはsingle donorでのHCV-NATと同程度の検出感度を持ち、陽性献血者の特定に適しているとの結果を得ている。

NAT そのものの有効性を示した文献も数多く報告されている。G.B.Schreiberら³⁾によれば、現在のスクリーニング方法では排除出来ないウィンドウ期の血液を、NATの導入によりHCVが72%、HIVが50%、HBVが42.4%減少させることが可能であると述べている。又、G.Zerlauthら¹¹⁾は、1,786,250人の献血者のHCV、HIV、HBV-NAT検査を行いHCVが36、HBVが2の陽性献血者を特定している。

血液製剤のスクリーニング法として、NATの導入に肯定的な見解を示しているこれら文献とは異なり、C.Rouziouxら¹²⁾、J.J.Lefrèreら¹³⁾は、NATの有効性を認めてはいるが、 3° ルでのNATの実施

には経済的な検討や、検査方法のバリデーション等が必要であるとの慎重な見解を示している。又、M.S. Cardoso¹⁴⁾らが、331,783人の献血者のHCV、HIV、HBV-NATを行った結果(7° ル数は最大で 96° ル)、全てのウイルスにおいて陽性者は特定されず、NATが血液製剤の安定性を向上させるかについては、現在検討中であるとの見解を示している。

我々の結果は、 3° ルNATの有効性を示唆している。すなわち、500NAT導入により約250万の献血者から、現行の血液センターのスクリーニング法のウィンドウ期と考えられる血液をHBVで37、HCVで5検出できた。さらに、500NATの効果を、献血後情報中に占める現行のスクリーニング法のウィンドウ期でNAT陽性の献血者数で見ると、約40%の減少が認められた。加えて、セロコンバージョン $^{\circ}$ 初を用いた500NAT導入による、ウィンドウ期の短縮効果の検討結果から、残余危険率の減少率は、HCV、HIV、HBVでそれぞれ20.1、39.1、11.4%と推定された。ただし、ウィンドウ期 $^{\circ}$ 初の検出率に関しては、感染後の日数を初回採血日として計算しているため、本研究結果よりも実際は低いものと推定される。つまり、実際には初回採血日は感染後日数が経っているために、それに伴いウイルス $^{\circ}$ 数も増加し検出しやすくなったと考えられるからである。

以上のように500NATの効果は十分に認められた。血漿分画製剤の安全性は、従来から行っているウイルス不活化/除去工程に加え、500NATの導入により一層向上することが期待できる。このことは、血漿分画製剤の安定供給にも貢献すると考えられる。今後の課題は500NATの感度の向上である。具体的には、 7° ル数の減少、ウイルス濃縮、検体量の増加等の方法により、 3° ルNAT法の感度向上を図る必要性があると考えられる。

E. 結論

500検体 3° ルNATは、血漿分画製剤の安全性をより一層高めると同時に、血漿分画製剤の安定供給にも貢献すると考えられた。

- 1) Letter Report, 09/09/98, GAO/HEHS-98-205
- 2) Rita Sun et al. :J. Clin. Microbiol. 1998;36: 2964-2969
- 3) George B. Schreiber et al. :N. Engl. J. Med. 1996;334:1685-1690
- 4) 佐藤進一郎 :第7回赤十字血液シンポジウム 1999
- 5) Holland PM et al. :Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;81:7276-7280
- 6) CPMP / BWP / 390 / 97 , final
- 7) Proclamation the Paul Ehrlich Institute of 25.2. 1998 .
- 8) Proclamation the Paul Ehrlich Institute of 05.06. 1998 .
- 9) R. B. Zotz et al. :Infusionsther Transfusionsmed 1998;25:121-125
- 10)K. -B. Henneberg-Quester et al. :Infusionsther Transfusionsmed 1998;25:126-127
- 11) G. Zerlauth et al. :Infusionsther Transfusionsmed 1998;25:136-138
- 12) C. Rouzioux et al. :Trnsfusion 1998;38: 989-990
- 13) J. -J. Lefrère et al. :Trnsfusion 1998;38: 915-923
- 14) M. S. Cardoso et al. :Tranfusion 1998; 38:905-907

Table 1 Results of 500NAT on donated plasma during Nov.1997-Oct.1998

virus	number of donations	number of 500NAT samples	number of NAT positive		positive rate
			first screening	final	
HCV	2,521,498	5,992	9	5	1/500,000
HIV	2,429,063	5,866	0	0	0
HBV	2,429,063	5,866	132	37	1/66,000

Because HCV-NAT has been carried out before beginning of HIV and HBV-NAT , number of donations and 500NAT samples of HCV-NAT were larger than those of HIV and HBV-NAT . Each 500NAT sample contained 500 or less of donations, and number of 500NAT samples described in this table was larger than expected number of 500NAT samples .

Table 2 Incidence rate of window periods donations in the post donation informations before and after 500NAT introduction

	incidence rate			
	HCV	HIV	HBV	total
before 500NAT	0.96%(2/208)	0%(0/71)	4.1%(12/293)	2.4%(14/572)
after 500NAT	0.90%(2/223)	0%(0/43)	1.9%(10/515)	1.5%(12/781)

Table 3 Reduction effect of window period on BBI-seroconversion panels by 500NAT

virus	positive rate	reduction of window period (days)
HCV	100% (18/18)	16.5
HIV	60% (12/20)	8.6
HBV	46% (17/37)	>9.0

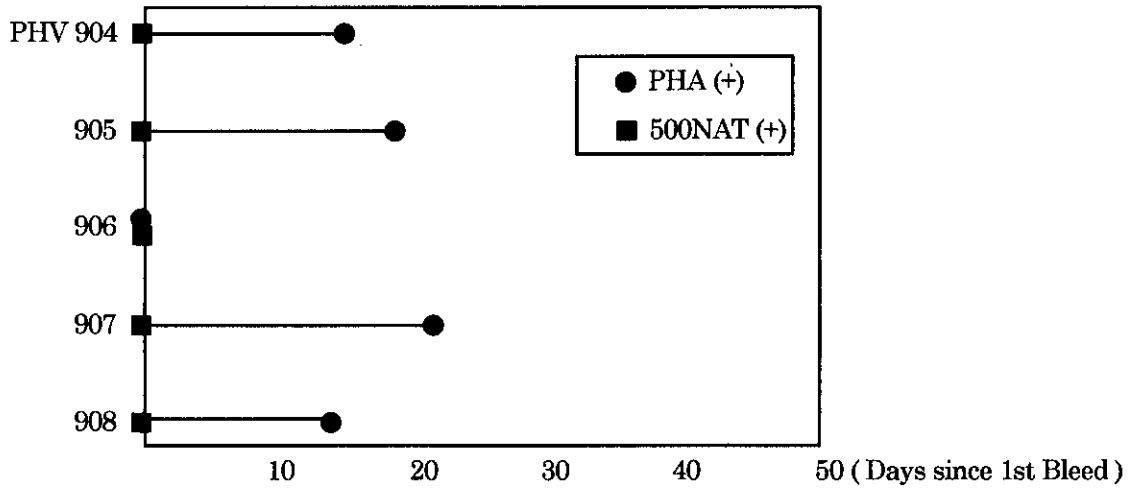


Fig. 1 Results of PHA and 500NAT on HCV seroconversion panels

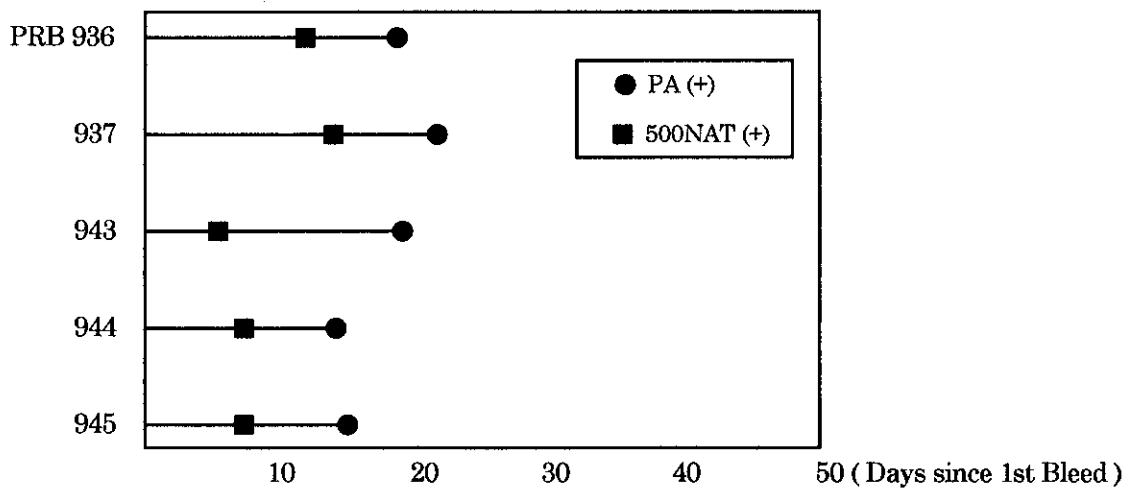


Fig. 2 Results of PA and 500NAT on HIV seroconversion panels

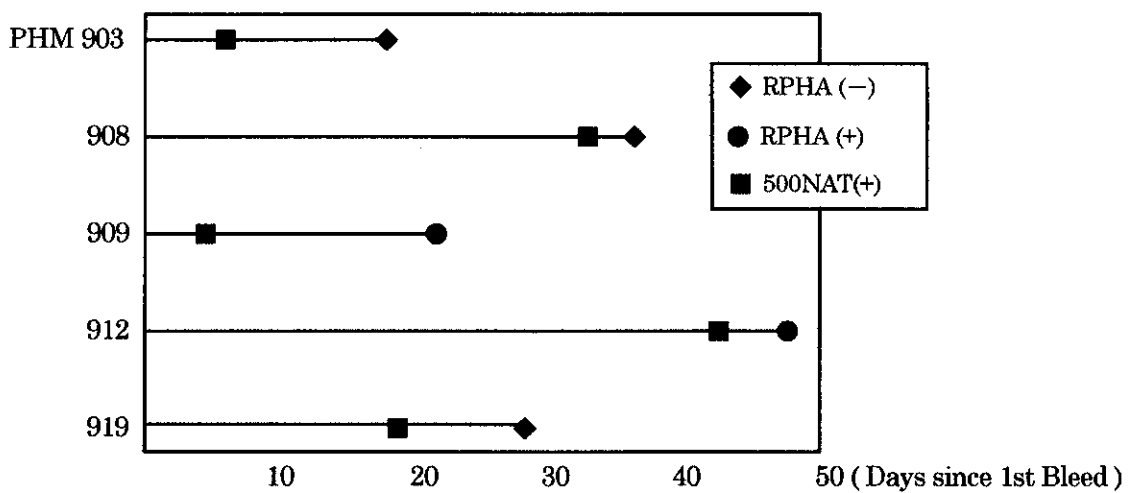


Fig. 3 Results of RPHA and 500NAT on HBV seroconversion panels