

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

安全な血液を確保するためのウイルス  
標準品の確立とその応用に関する研究

平成13年度総括研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成13(2002)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告書

安全な血液を確保するためのウイルス標準品の確立とその応用 主任研究者 岡田 義昭	P1 - P2
---	---------

### II. 分担研究報告

1.核酸増幅法のためのウイルス国内参照品の確立と パネル血漿の整備に関する研究	P3 - P19
--	----------

岡田 義昭

2.国内で市販されている B 型肝炎ウイルス外被抗原 ( HBs 抗原) 検出用体外診断用医薬品の再点検	P20 - P29
---	-----------

水落 利明

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	P30
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	P31 - P51
-----------------	-----------

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

安全な血液を確保するためのウイルス標準品の確立とその応用

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

研究要旨 安全な血液を確保するために、適切な血清学的検査を用いたスクリーニングを行い、さらに window 期の血液を核酸増幅法（以下 NAT）で除外することが必要である。前者に対して HBs 抗原検出用体外診断用医薬品の再評価を行った。測定原理によって感度や特異性に差が認められ、さらに同一原理の診断用試薬によっても感度に差が認められることが明らかとなった。後者に対しては、NAT の適切な精度管理の基本となる標準品を作成した。HBV,HBV,HIV の国際標準品が既につくられているので、日本の genotype 合った HBV と HIV の国内参照品を作成し、多施設参加の共同研究によって、国際標準品との相対力価を算出した。調査会での審議と承認が得られた後には国内参照品として供与できる。

分担研究者

水落利明 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

安全な血液を確保するために HBV,HCV,HIV の3つのウイルスに対して従来から血清学的検査が行われていたが、window 期が存在することが明らかとなり、これらの検査をすり抜けて感染が成立することが報告されている。さらなる血液の安全性確保を目指して NAT が日本や欧米で導入され、window 期の血液の除外に貢献している。NAT は種々の条件によって感度や特異性に影響があるので、精度管理のための国際標準品が上記3つのウイルスでは既に作られている。国際標準品は欧米に存在する genotype に合わせてあるので、日本に存在する genotype とは異なる。そのため国内のウイルスに合った genotype で国内参照品を整備する必要がある。

一方、NAT は高感度であるが、血清学的検査に全て置き換わるものではない。NAT の擬陽性や偽陰性（ウイルスゲノムに変異があり増幅されない

可能性もある）を防止する上からも血清学的検査はこれまでと同等に重要である。特に、日本では欧米に比べて肝炎ウイルス感染者が多いと言われており、国内には多くの（約40種）HBs 抗原検出用試薬が市販されている。約20年前に開発された診断試薬と最近開発されたものとの間には特異性や感度に差があることが懸念されていた。今回、測定原理の違いによる格差や同一原理での製造所間の感度等の格差について再評価を行った。

B. 研究方法

詳細は分担研究報告書を参照していただきたいが、要約すると、これまで、HBV,HCV,HIV の国際標準品が多施設参加の国際共同研究によって作られた。その際に用いられた方法に従って、HBV と HIV の国内参照を作成した。ウイルスの力価は国際標準品との相対力価とした。

HBs 抗原は凝集法（用手法、全自動）、イムノクロマト法、EIA 法／化学発光法などの原理や手技の違いによって分類し、同一検体を測定することで再評価を行った。

NAT 用のパネル血漿の整備は HCV に関しては window 期の血漿と genotype 毎の血漿をできるだけ集めることにし、可能な限り検体当たりの容量が多いものを選んだ。HBV では genotype A と D を整備した。

#### C. 研究結果

HBV と HIV の国内参照品を作り（正確には国内参照品の候補品）、国際標準品との相対力価を統計処理によって決定した。

また、HBs 抗原検出用試薬の再評価では測定原理によって特異性や感度に差が認められた。また、同じ測定原理の試薬においても感度の差を認めた。

#### D. 考察

NAT の導入は血清学的 window 期にある血液を除外することを可能にし、血液の安全性向上に大いに貢献した。しかし、国や地域によってウイルスの genotype が異なることや用いているプライマーの位置に変異が存在した場合に検出感度が低下又は偽陰性を呈する可能性がある。また、国際間のハーモナイゼーションによって共通の標準品を用いた精度管理が求められ、今までに HBV, HCV, HIV の国際標準品が作られ、最近 B19 も新しく加えられた。今回の国内参照品は国際標準品との相対力価を算出することによって、国際間で比較しやすいように作成されている。さらに、genotype の差や抗体の存在がどの程度感度に影響を与えるのか評価するためにパネル血漿を整備している。詳細な検討は来年度に予定している。

また、HBs 抗原検出用試薬の再評価は血清学的検査がこれまでと同様に重要であり、これまで実施されなかったもので意義がある。ただし、診断薬は感度だけでなく、結果が出るまでの時間や検査法の簡便性など、利用する側の必要性も考慮しな

ければならない。その意味でも臨床サイドに使用している試薬の感度や特異性を知らせ、適切な HBs 抗原検出試薬を選択することに貢献したと考えている。

#### E. 結論

HBV と HIV の国内参照品を作り、国際標準品との相対力価を決定した。HBs 抗原検出用試薬の再評価を行い、検出原理によって、又は同一原理であっても感度等に差が認められた。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saldanha, J., Lelie, N., Yu, M. W., Heath, A., and the B19 collaborative study group. Establishment of the first World Health Organization International standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. 2002. Vox Sanguinis. Vol. 82:24-31.

2. 水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利. 血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向. 2001. Biomedical perspectives. vol 10:227-232.

##### 2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：マウスレトロウイルスを用いた異性間感染の解析。  
第49回日本ウイルス学会。2001年。

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

核酸増幅法のためのウイルス国内参照品の確立とパネル血漿の整備に関する研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

協力研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 主任研究官

研究要旨 安全な血液を確保するために核酸増幅検査（以下 NAT）用の HBV と HIV の国内参照品を作成し、多施設参加の共同研究によって、国際標準品との相対力価を決定した。血液安全調査会の承認の後に供与可能になる予定である。NAT の精度管理に貢献すると期待される。

A. 研究目的

これまで血液の安全性を確保するために、血清学的検査が HBV, HCV, HIV の 3 つのウイルスに導入されて来た。しかし、感染初期には血清学的検査が陰性の、所謂 window 期が存在することが明らかとなった。そこで window 期の血液を除外する検査法として日本をはじめ欧米諸国において、3 つのウイルスに対して核酸増幅検査（以下 NAT）が導入され、血液の安全性確保に大いに貢献している。しかし、NAT 法は高感度であることはだれしも認めるところだが、用いるプライマーや核酸の抽出法によって、または検出するウイルスの genotype によって感度が異なることがこれまでに知られている。そのため、NAT 検査の感度を含めた精度管理が重要な課題となっている。そのためには良く評価されたウイルスの国際標準品を作ることが必要になった。一方、ウイルス間に genotype が存在し、国や地域によって存在しているウイルス遺伝子が部分的に異なることも分子疫学的解析によって明らかにされた。よって、確立された国際標準品をもとに、各国において自国に流行している genotype にあった国内参照品を作ることが NAT の精度管理にとって必要である。

HBV, HCV, HIV の 3 つのウイルス各々の国際標準品と HCV の国内参照はすでに確立されているので、本研究ではそれを用いて HBV と HIV の国内参照品を製作し、その力価を多施設参加の共同研究によって決定することを目的にした。また、国際間の交流が頻繁になっている現在において、海外（主に米国）から原料血漿を輸入する場合や人的交流によって異なる genotype のウイルスが国内に侵入してくる可能性や同じ genotype 間において同等に NAT の感度が得られるのか、また、抗体の存在が感度に及ぼす影響等を解析する必要がある。そのために日本の国内外に存在する HBV と HCV の各種 genotype の血漿を収集してパネルを作成した。

B. 研究方法

1. HBV の国内参照品作成について

日本赤十字社から提供された、ウイルス濃度が高く、血漿量が充分にある 3 検体の HBV 陽性の血漿を国内参照品の候補とした。血液安全調査会の小委員会の構成メンバーを中心とした多施設参加による共同研究によって、10 倍希釈系列による NAT 検査によって検出できるエンドポイントを求めた。なお、希釈に用いた血漿は HBs 抗

原陰性、HCV 抗体陰性、HIV 抗体陰性のものを使用した。また、各候補品のゲノムの塩基配列を決め、最終的に1つの候補品 HBV-129 を選択した。次に、前の検査のエンドポイントを挟む様に7つの $10^{0.5}$ 倍希釈系列を作り NAT が陽性にできるエンドポイントを日を変えて独立に4回測定した。同様の測定を国際標準品( $10^6$  IU/ml)にも行い、国際標準品に対する相対力価を統計処理によって算出した(別紙 3-1 から 5-6)。

## 2. HIV の国内参照品について

国内参照品は1つの候補品を用いて、国際標準品 (Code97/656)  $10^6$  IU/ml との相対力価を HBV と同様な方法で計算した(別紙 3-1 から 5-5)。1回目の測定は10倍希釈系列、以後は1回目を得られたエンドポイントを挟む様に $10^{0.5}$ 倍希釈系列で日を変えて4回測定した。

## 3. パネル血漿について

今年度は HBV と HCV (window 期の血漿) を集め、ウイルス力価と genotype を検索した。

## C. 研究結果

HBV と HIV の国内参照品を作成し、国際標準品との相対力価を測定した。

また、window 期の HCV 血漿を得ることができた。検索できた範囲では異なる測定法を用いてもウイルス力価に著明な差は認められなかった。

HBV に関しては国内に genotype B と C が存在しているので国内では得難い genotype A と D を得ることができた。

## D. 考察

HBV、HCV、HIV の3つのウイルスの NAT が導入され、国内でこれまで数十例の所謂 window 期のドナーを発見し、除外できたことは

輸血を含めた血液製剤の安全性確保に大きな貢献をしていることを示している。さらなる安全性確保のためには国際的に“共通な物差”を用いた精度管理が必要になってくる。これまでに3つのウイルスの他、パルボウイルス B19 の国際標準品が作られ、希望すれば供与される体制が出来上がっている。しかし、これらの標準品は米国やヨーロッパに主に分布している genotype が用いられており、我が国を含めたアジアに分布している genotype と異なっていることに注意しなければならない。また、国際標準品は数が限られている上に世界中の国からリクエストが有り、十分な量の供与を受けることはできない。よって、各国、あるいは地域で国際標準品にそった参照品を作ることが必要になる。今回、2つのウイルスの候補品は評価が終わった段階であり、今後、血液安全技術調査会で議論されたのち希望者に供与される予定である。これを用いれば日本国内の NAT の精度管理は飛躍的に向上すると考えられる。

また、HCV の window 期の血漿が得られたことで、来年度の仕事になってしまうが、抗体の有無が検出感度に及ぼす影響の解析や塩基配列の変化等の解析を実施する予定にしている。HBV では各 genotype 間での感度の評価を今後実施する予定でいる。

## E. 結論

HBV と HIV の国内参照品を作成し、多施設参加の共同研究によって国際標準品との相対力価を測定した。今後、血液安全技術調査会によって承認された後に供与が可能となる。

## F. 健康危機情報

なし。

## G. 研究発表

## 1.論文発表

1. Saldanha,J.,Lelie,N.,Yu,M.W.,Heath,A., and the B19 collaborative study group. Establishment of the first World Health Organization International standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. 2002.Vox Sanguinis. Vol.82.24-31.

2. 水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利.血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向.2001.Biomedical perspectives.vol 10:227-232.

## 2.学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：マウスレトロウイルスを用いた異性間感染の解析。  
第49回日本ウイルス学会。2001年。

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## 実験計画

## HBV-DNA 国内標準品作製の手順

## 1. HBV-DNA 国内標準品候補の選択

3 つの国内標準品候補 (HBV-48, HBV-129, HBV-162) の一部を稀釈用脱クリオ血漿で約  $1 \times 10^6$  IU/ml に稀釈したものを試料として送付する (第一回送付)。10 倍稀釈系列で測定した結果を集計して end-point を求める。その結果に基づいて候補品を 1 つに決定する。

## 2. HBV-DNA 国内標準品候補の作製

候補に決定された血漿を稀釈用脱クリオ血漿を用いて約  $1 \times 10^6$  IU/ml に稀釈する。これをガラス瓶に 0.5ml ずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存する。

## 3. HBV-DNA 国内標準品候補の評価

2 で作製した候補品を送付する (第二回送付)。 $10^{-0.5}$  倍稀釈系列で測定した結果を集計して WHO 国際標準品に対する相対力価を決定し、日本の HBV-DNA 国内標準品とする。

## 試料

(第一回送付) 参加研究室には次の試料等を配布する。受領後直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。

1.	稀釈用脱クリオ血漿 (HBV-DNA 陰性, HCV-RNA 陰性, HIV-RNA 陰性, HBV 抗体陰性、HBV 抗原陰性、HIV 抗体陰性)	40ml / 遠心管 4 本
2.	HBV-DNA WHO 国際標準品 (Code97/746), 50 万国 単位/バイアル, 凍結乾燥品	1 本
3.	HBV-DNA 国内標準品候補 (HBV-48): HBV-DNA 陽性血 漿 (subtype adr) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結品、 約 100 万国単位/ml	0.5 ml/バイアル 4 本
4.	HBV-DNA 国内標準品候補 (HBV-129): HBV-DNA 陽性 血漿 (subtype adr) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結 品、 約 100 万国単位/ml	0.5 ml/バイアル 4 本
5.	HBV-DNA 国内標準品候補 (HBV-162): HBV-DNA 陽性 血漿 (subtype adr) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結 品、 約 100 万国単位/ml	0.5 ml/バイアル 4 本

(第二回送付)

6.	HBV-DNA 国内標準品候補 (HBV-**), HBV-DNA 陽性血 漿 (subtype adr) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結品、 約 100 万国単位/ml	0.5 ml/バイアル 6 本
----	--	-----------------

○WHO 国際標準品は DNase を含まない脱イオン水 0.5ml に溶かして約 20 分間静かに振とうし、完全に溶解する。溶解後、直ちに  $75 \mu\text{l}$  ずつ 6 本に小分けして $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存する。(本数に限りがあり、補充不可能の状況なので使用は慎重に願います。)

○候補品は余分に入っているもので、予備的な実験に使用してよい。

○標準品と候補品は感染性が有るので取り扱いには参加研究機関の安全基準に従うこと。

○DNA 抽出に 0.5ml 以上試料を用いる研究室は連絡のこと。



## 別紙 3-2

### HBV-NAT 試験

HBV-DNA WHO 国際標準品制定のための共同研究のプロトコルに準じて、本研究では日を変えて独立に繰り返し試験を行う。具体的には次の手順で試験を行う。

#### I) HBV-DNA 国内標準品候補選定のための試験

第一回送付試料を 10 倍希釈系列で測定し、end-point を決定する。(2 回実施)

国内標準品候補及び小分けした WHO 国際標準品は試験毎に新しいバイアルを 30℃の水浴上で速やかに融解し、直ちに使用する。候補品と WHO 国際標準品を添付の希釈用脱クリオ血漿（以下血漿と呼ぶ）で 10 倍ずつ 6 段階希釈 ( $10^{-2}$  から  $10^{-7}$ ) して試験を実施し、end-point（即ち陽性を示す最大の希釈率）を求める。試料 1ml 以上から抽出する場合又は感度があまり高くないアッセイ法を用いる場合には end-point を決定できるような適当な希釈領域で測定すること。アッセイは各希釈毎に 1 本とするが、参加研究室で通常行っている本数（たとえば duplicate, triplicate, それ以上）でもよい。その場合、試験毎の結果をすべて別紙 5 に記入して提出すること（triplicate で行った場合、+++、++-, +- -あるいは - - -と記入）。試験毎に陰性コントロール（血漿）を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。日をかえて 2 回試験を実施する。

注意：小分けした WHO 国際標準品の残り 4 本は次に行う試験 II) で使用するのので、保管しておく。

希釈法：血漿 450  $\mu$ l に試料 50  $\mu$ l を加え、液をピペットで 1 回吸い上げてピペット内に残った試料を洗い出し、よく混合する。この操作を繰り返して 10 倍希釈系列を作る。ピペットチップは 1 段階希釈毎に新しいものに交換する。

#### II) HBV-DNA 国内標準品候補品 (HBV-\*\*) の評価

第二回送付試料を  $10^{0.5}$  倍希釈系列で測定し、end-point を決定する。(4 回実施)

I) で求めた end-point を挟んで  $10^{0.5}$  倍ずつ 7 段階希釈で実施する。候補品(第二回送付試料)と小分けした国際標準品は試験毎に新しいものを使用する。アッセイは各希釈毎に 1 本とするが、各参加研究室で通常行っている本数（たとえば duplicate, triplicate, それ以上）でもよい。その場合、試験毎の結果をすべて別紙 5 に記入して提出すること（triplicate で行った場合、+++、++-, +- -あるいは - - -と記入）。試験毎に陰性コントロール（血漿）を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。日をかえて 4 回試験を実施する。各回の測定には 1 週間の間隔を置くことが望ましい。

希釈法：[例] I) の end-point が  $10^{-5}$  の場合、II) では  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6.5}$  倍希釈で試験を行う。

まず、 $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  の 10 倍希釈試料を調製する。

次に血漿 216  $\mu$ l に  $10^{-3}$  希釈試料 100  $\mu$ l を加え  $10^{-3.5}$  希釈試料を調製する(1:3.16)。同様に  $10^{-4}$  から  $10^{-4.5}$  を,  $10^{-5}$  から  $10^{-5.5}$  を,  $10^{-6}$  から  $10^{-6.5}$  をそれぞれ調製する。

第二回送付試料を製造する際に HBV 陽性原血漿の希釈倍率が第一回送付試料と異なる場合には送付状にその旨明記するので、それを考慮した上で end-point を決定できるような適当な希釈領域で測定すること。

[例] I) の end-point が  $10^{-5}$  であったが、第二回送付試料が約 3 倍濃い場合には II) では  $10^{-4}$ ,  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6.5}$ ,  $10^{-7}$  倍希釈の 7 段階で測定する。あるいは  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6.5}$ ,  $10^{-7}$  倍希釈の 8 段階で測定してもよい。

別紙 3-3

○結果報告書（別紙 5）の記入について： 1 枚の結果報告書に 1 回の試験結果を記入する。統計的には end-point よりも濃い試料で陰性となる場合もありうるので、その場合も結果を破棄しないで記入する。

別紙 4-1

HBV-DNA 国内標準品の評価試験法

測定責任者名:

機関名:

連絡先;

住所

TEL

FAX

1. HBV-DNA 検出法

自家開発の方法

A 欄に記入

市販のキット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

2. 血漿からの HBV-DNA 抽出法

抽出に用いた血漿の容量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l

1 核酸増幅反応当たりの血漿相当量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l

方法の分類

カオトロピック剤による変性とフェノール/クロロホルム抽出。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

プロテイナーゼ K 処理とフェノール/クロロホルム抽出。

プロテイナーゼ K 処理とカオトロピック剤による変性。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

その他 ( \_\_\_\_\_ )

方法

市販キット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

(使用説明書のコピーを添付)

自家開発の方法

方法が公表されているときはその文献 (別刷りまたはコピーを添付)

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ ページ  
(簡単に説明)

HBV-DNA の分離に先立つウイルス粒子の濃縮の有無

無  有 (方法: \_\_\_\_\_ )

別紙4-2

3. 精度管理

内部コントロールとして識別可能な核酸又はウイルス粒子を使用しましたか？	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ
内部コントロールは核酸ですか、ウイルスですか？	<input type="checkbox"/> 核酸	<input type="checkbox"/> ウイルス
内部コントロールを使用した場合はどの段階で添加しましたか？	<input type="checkbox"/> 抽出	<input type="checkbox"/> 増幅
各試験に感度管理のための弱い陽性コントロールを使用しましたか？ 陽性コントロール： _____ ，  HBV-DNA 濃度： _____ /ml	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ

A. 核酸増幅検出法について

- 1. で市販キットと答えた研究室は使用説明書のコピーを添付して下さい。
- 1. で自家開発法と答えた研究室は以下の欄に記入してください。  
方法が公表されているときはその文献（別刷りまたはコピーを添付）

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ ページ

増幅法（single PCR, nested PCR, その他 \_\_\_\_\_）

増幅領域（S 又は preS, pX, その他 \_\_\_\_\_ 領域）  
（増幅法・検出法を簡単に説明）

平成 年 月 日

署名捺印

## HBV-DNA 国内標準品候補選定試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

## I) 第 1 回目試験

試料	稀釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品 (Code97/746)	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
国内標準品候補 (HBV-48,)	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
国内標準品候補 (HBV-129,)	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
国内標準品候補 (HBV-162)	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

## HBV-DNA 国内標準品候補選定試験結果

機関名  
測定責任者名  
試験実施日

## I) 第 2 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品 (Code97/746)	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>		
	10 <sup>-4</sup>		
	10 <sup>-5</sup>		
	10 <sup>-6</sup>		
	10 <sup>-7</sup>		
国内標準品候補 (HBV-48,)	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>		
	10 <sup>-4</sup>		
	10 <sup>-5</sup>		
	10 <sup>-6</sup>		
	10 <sup>-7</sup>		
国内標準品候補 (HBV-129,)	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>		
	10 <sup>-4</sup>		
	10 <sup>-5</sup>		
	10 <sup>-6</sup>		
	10 <sup>-7</sup>		
国内標準品候補 (HBV-162)	10 <sup>-2</sup>		
	10 <sup>-3</sup>		
	10 <sup>-4</sup>		
	10 <sup>-5</sup>		
	10 <sup>-6</sup>		
	10 <sup>-7</sup>		
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

HBV-DNA 国内標準品評価試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

II) 第 \_\_\_\_\_ 回目試験

試料	稀釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品 (Code97/746)			
候補品			
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

## 実験計画

## HIV-RNA 国内標準品作製の手順

## 1. HIV-RNA 国内標準品候補の作製

HIV-RNA 陽性血漿（HIV-00047C）の一部を稀釈用脱クリオ血漿で約  $1 \times 10^5$  IU/ml に稀釈してガラス瓶に 0.5ml ずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結したものを候補品とする。

## 2. HIV-RNA 国内標準品候補の評価

1 で作製した候補品を送付する。日を変えて 5 回測定を行う。1 回目は 10 倍稀釈系列で測定して end-point を求める。2 回目以降はそのエンドポイントを挟んで  $10^{-0.5}$  倍稀釈系列で 4 回測定する。その結果を集計して WHO 国際標準品に対する相対力価を決定し、日本の HIV-RNA 国内標準品とする。

## 試料

参加研究室には次の試料等を配布する。受領後直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

1.	稀釈用脱クリオ血漿 (HBV-DNA 陰性, HCV-RNA 陰性, HIV-RNA 陰性, HIV 抗体陰性、HBV 抗原陰性、HCV 抗体陰性)	40ml / 遠心管 4 本
2.	HIV-RNA WHO 国際標準品 (Code97/656) 凍結乾燥品, 10 万国際単位/バイアル	1.0ml/バイアル 1 本
3.	HIV-RNA 国内標準品候補 (HIV-00047C) : HIV-RNA 陽性血漿(subtype B) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結品。約 10 万国際単位/ml	0.5 ml/バイアル 7 本

○WHO 国際標準品は RNase を含まない脱イオン水 1.0ml に溶かして約 20 分間静かに振とうし、完全に溶解する。溶解後、直ちに  $100 \mu\text{l}$  ずつ小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存する。（本数に限りが有り、補充不可能の状況なので使用は慎重に願います。）

○候補品は余分に入っているのので、予備的な実験に使用してよい。

○標準品と候補品は感染性が有るので取り扱い参加研究機関の安全基準に従うこと。

○RNA 抽出に 0.5ml 以上試料を用いる研究室は連絡のこと。



## 別紙 3-2

### HIV-NAT 試験

HIV-RNA WHO 国際標準品制定のための共同研究のプロトコルに準じて、本研究では日を変えて独立に繰り返し試験を行う。具体的には次の手順で試験を行う。

#### I) 第1回目の測定

送付試料を 10 倍希釈系列で測定し、end-point を決定する。(1 回実施)

国内標準品候補及び小分けした WHO 国際標準品は試験毎に新しいバイアルを 30℃の水浴上で速やかに融解し、直ちに使用する。候補品と WHO 国際標準品を添付の希釈用脱クリオ血漿（以下血漿と呼ぶ）で 10 倍ずつ 6 段階希釈（ $10^{-2}$  から  $10^{-7}$ ）して試験を実施し、end-point（即ち陽性を示す最大の希釈率）を求める。試料 1ml 以上から抽出する場合又は感度があまり高くないアッセイ法を用いる場合には end-point を決定できるよう適当な希釈領域で測定すること。アッセイは各希釈毎に 1 本とするが、参加研究室で通常行っている本数（たとえば duplicate, triplicate, それ以上）でもよい。その場合、試験毎の結果をすべて別紙 5 に記入して提出すること（triplicate で行った場合、+++、++-, +- -あるいは - - -と記入）。試験毎に陰性コントロール（血漿）を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。

注意：残りの小分け WHO 国際標準品は 2 回目以降の測定で使用するので、保管しておく。

稀釈法：血漿 450  $\mu$ l に試料 50  $\mu$ l を加え、液をピペットで 1 回吸い上げてピペット内に残った試料を洗い出し、よく混合する。この操作を繰り返して 10 倍希釈系列を作る。ピペットチップは 1 段階希釈毎に新しいものに交換する。

#### II) 第2回目～第5回目の測定

試料を  $10^{0.5}$  倍希釈系列で測定し、end-point を決定する。(4 回実施)

I) で求めた end-point を挟んで  $10^{0.5}$  倍ずつ 7 段階希釈で実施する。候補品と小分けした国際標準品は試験毎に新しいものを使用する。アッセイは各希釈毎に 1 本とするが、各参加研究室で通常行っている本数（たとえば duplicate, triplicate, それ以上）でもよい。その場合、試験毎の結果をすべて別紙 5 に記入して提出すること（triplicate で行った場合、+++、++-, +- -あるいは - - -と記入）。試験毎に陰性コントロール（血漿）を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。日をかえて 4 回試験を実施する。各回の測定には 1 週間の間隔を置くことが望ましい。

稀釈法：[例] I) の end-point が  $10^{-4}$  の場合、II) では  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5.5}$  倍希釈で試験を行う。確実に end-point を決定できるように、 $10^{-6}$  倍希釈を加えて測定してもよい。

まず、 $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  の 10 倍希釈試料を調製する。次に血漿 216  $\mu$ l に  $10^{-2}$  希釈試料 100  $\mu$ l を加え  $10^{-2.5}$  希釈試料を調製する (1:3.16)。同様に  $10^{-3}$  から  $10^{-3.5}$  を、 $10^{-4}$  から  $10^{-4.5}$  を、 $10^{-5}$  から  $10^{-5.5}$  をそれぞれ調製する。

- 結果報告書（別紙 5）の記入について：1 枚の結果報告書に 1 回の試験結果を記入する。統計的には end-point よりも濃い試料で陰性となる場合もありうるので、その場合も結果を破棄しないで記入する。

別紙 4-1

HIV-RNA 国内標準品の評価試験法

測定責任者名:

機関名:

連絡先;

住所

TEL

FAX

1. HIV-RNA 検出法

自家開発の方法

A 欄に記入

市販のキット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

2. 血漿からの HIV-RNA 抽出法

抽出に用いた血漿の容量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l

1 核酸増幅反応当たりの血漿相当量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l

方法の分類

カオトロピック剤による変性とフェノール/クロロホルム抽出。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

プロテイナーゼ K 処理とフェノール/クロロホルム抽出。

プロテイナーゼ K 処理とカオトロピック剤による変性。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

その他 ( )

方法

市販キット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

(使用説明書のコピーを添付)

自家開発の方法

方法が公表されているときはその文献 (別刷りまたはコピーを添付)

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ ページ

(簡単に説明)

HIV-RNA の分離に先立つウイルス粒子の濃縮の有無

無  有 (方法: \_\_\_\_\_ )

別紙 4-2

3. 精度管理

内部コントロールとして識別可能な核酸又はウイルス粒子を使用しましたか？	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ
内部コントロールは核酸ですか、ウイルスですか？	<input type="checkbox"/> 核酸	<input type="checkbox"/> ウイルス
内部コントロールを使用した場合はどの段階で添加しましたか？	<input type="checkbox"/> 抽出	<input type="checkbox"/> 増幅
各試験に感度管理のための弱い陽性コントロールを使用しましたか？ 陽性コントロール： _____ ，  HIV-RNA 濃度： _____ /ml	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ

A. 核酸増幅検出法について

- 1. で市販キットと答えた研究室は使用説明書のコピーを添付して下さい。
- 1. で自家開発法と答えた研究室は以下の欄に記入してください。  
方法が公表されているときはその文献（別刷りまたはコピーを添付）

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年  
ページ \_\_\_\_\_

増幅法（ single PCR,  nested PCR、 その他 \_\_\_\_\_）

増幅領域（ core  env,  その他 \_\_\_\_\_ 領域）  
（増幅法・検出法を簡単に説明）

平成 年 月 日

署名捺印

## 別紙 5-1

## HIV-RNA 国内標準品評価試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

## 第 1 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品 ( Code97/656 )	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
国内標準品候補 ( HIV-00047C )	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考