

200/0992

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13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 吉澤浩司

平成14(2002)年 4月

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13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 吉澤浩司

平成14(2002)年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 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  
究 . . . . . 1  
吉澤浩司

### II. 分担研究報告

1. 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 -IV 陽性献血液の  
HIV サブタイプにする研究- . . . . . 25  
今井光信
2. 国内公的機関での B 型肝炎ウイルス抗原および抗 C 抗肝炎ウイルス関連抗体陽性  
血清(血漿)検体パネル整備の必要性について . . . . . 32  
竹森利忠
3. ウイルス検出の精度管理等に用いる標準パネル血漿の選択 . . . . . 34  
山中烈次
4. 血液製剤のウイルス核酸増幅法試験法 (NAT) に関するガイドライン策定において考慮すべ  
き基本的事項についての検討 . . . . . 36  
山口照英  
(資料) ①In the Manufacture and Clinical Evaluation of In Vitro Tests to Detect  
Nucleic Acid Sequences of Human Immunodeficiency Viruses Types 1  
and 2 (FDA 1999)  
②Validation Of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) For The  
Detection Of Hepatitis C Virus (HCV) RNA In Plasma Pools (OCML  
2001)  
③Use of Nucleic Acid Tests on Pooled Samples from Source Plasma  
Donors to Adequately and Appropriately Reduce the Risk of  
Transmission of HIV-1 and HCV DRAFT GUIDANCE (FDA 2001)
5. 医療用ポリ塩化ビニル製品に残留する化学物質の同定 . . . . . 81  
中澤裕之
6. 採血基準に関するスクリーニング開発 - 血液バッグ保存血液中のテトラヒドロフラン及び  
2-エチル-1-ヘキサノールの分析 . . . . . 89  
宮崎 豊

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 98

### IV. 研究成果の刊行物・別刷り

厚生科学研究補助金(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

主任研究者 吉澤 浩司 広島大学医学部衛生学 教授

研究要旨

3年計画の1年目にあたる平成13年度は、血液製剤の安全性、品質の確保に寄与することを目的とした研究として以下のような検討を行った。

1. ウイルススクリーニングによる血液製剤の安全性確保の向上を旨とした研究

1-1. 標準血清(血漿)の作製

B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、エイズウイルス(HIV)の核酸増幅検査(NAT)および血清学的検出系の精度管理に資する標準血清(血漿)作製のため、候補血清(血漿)を選定し、ウイルスの遺伝子型(genotype)、ウイルス量(核酸量、ウイルス構造タンパクのペプチド量)、血清学的マーカー等を測定し、標準血清(血漿)を選定、作製する作業をすすめている。

1-2. HIV陽性の献血血液100例についての解析より、サブタイプBが81%と最も多くみられたが、東南アジアに多くまた日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプA/Eが12%みられ、またアフリカに多くみられ日本では比較的まれなサブタイプAも4%存在した。日本のHIV感染者には、この他にサブタイプC,D,F,G,A/C等が見出されており今後、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、これら多種のサブタイプの存在を考慮しておくことが重要であることが明らかになった。

1-3. 血液製剤のウイルスNATガイドライン策定にあたって考慮すべき事項や要素について、関連する種々の文献に加えてEUや米国のガイドラインを参考に調査研究を行った。その結果、ウイルスNATの精度や特異性、検出感度をどのように評価すべきかについての基本的考え方を明らかにした。

2. 血液バッグより溶出する化学物質の高感度・高精度検出系の確立に関する研究

血液製剤の保存や輸血に利用されているポリ塩化ビニル製血液バッグ等に残留する化学物質の同定を目的に、測定法を構築した。可塑剤、酸化防止剤等のGC/MSオリジナルライブラリを作成し、保持時間、マススペクトル、ピーク形状の情報をもとに正確な同定法を確立し、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノール、BHT、2-エチルヘキサノール等が同定確認された。また、また、ヘッドスペース-GC/MS法による血液中のTHFおよび2-EHの分析法を確立した。

分担研究者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所	室長
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 ウイルス部	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 PCR テクニカルセンター	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	シニア・クリニカル サイエンティスト
柚木 久雄	日本赤十字社 東京 NAT センター	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	技術副部長
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
嶋 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
吉村吉博	星薬科大学	講師
猪飼 誉友	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

ウイルススクリーニングによる血液の安全性の向上、確保のための研究

我が国では、1999年より世界に先駆けてHBV、HCV、HIVの遺伝子を一括して増幅、一括して検出する方式による核酸増幅検査(nucleic acid amplification test:NAT)が導入され、血清学的検査によっては検出不能なウイルス核酸陽性の献血血液を発見、排除するスクリーニングシステムが導入され、輸血用血液および血液製剤原料血漿の安全性の確保が図られている。

本研究では、血液の安全性確保、向上のためにNAT、および血清学的検出系の精度の管理、向上のための標準血清を作製し、これを広く普及、活用してNAT、および血清学的検査法の標準化を図り、血液製剤の安全性の更なる向上に寄与することを目的とする。

また、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の重要課題であるHIV検査陽性の献血血液におけ

るHIVのタイプ及びサブタイプの動向を把握することを目指した。

さらに、血液製剤のウイルスNATガイドラインの策定にあたって考慮すべき事項を抽出し、現時点での科学的水準からガイドラインに取り入れるべき要素を明らかにすることを目指した。

一方、採血された輸血用血液あるいは成分輸血製剤用原料血漿は、プラスチック製の血液バッグに保存されるが、保存中にこれらのバッグより種々の化学物質が溶出することが知られている。また、これらの溶出物質の中には、内分泌かく乱物質をはじめ、生体に様々な影響を及ぼすものもあることが指摘されている。本研究では、可塑剤等の血液バッグ等より溶出される化学物質の高感度・高精度検出系を確立し、採血、保存の場でのこれらの物質の動態、解析を行ない、また、未知の化学物質の新規同定法、及び定量法の確立を目指し、血液製剤の品質の向上に寄与することを目的とする。

#### B. 研究方法

3年計画の1年目にあたる本年度は、分担研究者、班長研究協力者(班友)を組織し、研究目的に掲げた研究を開始した。

## 1. ウイルススクリーニングによる血液製剤の安全性確保の向上を旨とした研究

### - 標準血清(血漿)の作製-

核酸増幅検査(NAT)、血清学的検出系の精度管理に資することを目的とした候補血清(血漿)を選定し、それぞれのマーカーの検出・測定分担者を決定し、作業を開始した。

#### 1-1. 候補血清(血漿)の選定

- ①B型肝炎ウイルス(HBV)検出系のために  
ウインドウ期の血清(血漿) 88 検体  
キャリア期の血清(血漿) 72 検体
- ②C型肝炎ウイルス(HCV)検出系のために  
ウインドウ期の血清(血漿) 36 検体  
キャリア期又は感染既往期(HCV抗体陽性)の血清(血漿) 115 検体
- ③エイズウイルス(HIV)検出系のために  
ウインドウ期の血清(血漿) 1 検体  
キャリア期の血清(血漿) 150 検体
- ④陰性コントロール、稀釈用陰性血清(血漿) 150 検体

以上の検体は、あらかじめ第1次のスクリーニング検査として、ウイルス核酸の有無、抗原、抗体価、それぞれのウイルスの遺伝子型(genotype)を決定し、特に genotype に片寄りがおこらないように配慮してそれぞれ150検体を目安に候補血清(血漿)として選定した。

#### 1-2. 分担測定者による各ウイルスマーカーの検出・測定

- ①候補血清(血漿)を分注し、各分担測定者に送付し、解析を依頼した。各分担測定者には第1次のスクリーニング検査結果はマスクし、また、同一のマーカーを複数の分担測定者がそれぞれの施設で測定した。得られた結果はその都度主任研究者の施設に集積し、現在解析の途上にある。
- ②国立医薬品食品衛生研究所を通じて、WHOの標準品(HBV、HCV、HIV)を入手、本研究班が作製する標準品との整合を図ることとした。

## 2. HIV-1 サブタイプの解析

### 2-1. HIV-1-RNAの抽出とRT-PCRによるHIV-1 遺伝子の増幅

各血漿100u1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を用いてcDNAを作成した。逆転写酵素の反応後nested PCR法によりHIV-1のenv V3領域を増幅し、PCR産物をカラム精製した。

cDNA作製プライマー：IC462M：

5-GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCT-3

1st PCRプライマー：ICMK650：

5-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3

及びIC462M：5-GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCT-3

2nd PCRプライマー：KH41：

5-TCAACTCAACTGCAGTTAAAT-3 及び C3E：

5-AGAAAAATTCCCCTCTACAATTAA-3

### 2-2. シークエンス反応

Big Dye ターミネーターサイクルシークエンスキット(ABI)、オートシークエンサーPrism 310(ABI)を用いて塩基配列を決定し、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。

#### 検体

献血においてHIV-1陽性がWB等の確認検査で確認された100検体(血漿)

## 3. 血液製剤のウイルスNATガイドライン策定を目指した検討

血液製剤のウイルスNATガイドラインに取り込むべき要素の抽出にあたっては、EUや米国の関連するウイルスNATガイドライン等を調査研究した。

## 4. 血液バッグにより溶出する化学物質の高感度・高精度検出系の確立に関する研究

### 4-1. 試薬・試料

今回使用したPVC製医療用器具4社6製品16種類の部位を用いた。

#### 【添加剤の標準品】

以下に記した資料を参考に、可塑剤、酸化防止剤を主とする添加剤を標準化学物質として用いた(和光純薬社製、関東化学社製、東京化成社製、ALDORICH社製)。

#### 【溶媒】

アセトン：溶解液及び洗浄液として、関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

ヘキサン：洗浄液として、関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

シクロヘキサン：試験溶解液として、和光純薬社製（残留農薬試験用）を使用した。

2-プロパノール：試験溶液として、和光純薬社製（高速液体クロマトグラフ用）を使用した。

#### 4-2. 分析装置・条件

##### 【GC/MS 装置】

HEWLETT PACKARD HP 6890 Series GC System  
HEWLETT PACKARD 5973 Mass Selective  
Detector

##### 【測定条件】

カラム：J&W Scientific, DB-1 capillary  
column (30 m×250 μm I.D., film  
thickness: 0.1 μm) (Folsom, CA, USA).

カラム温度：50 °C—20 °C/min—300 °C  
(12.5 min)

注入口温度：250 °C

キャリアーガス：He, 0.9 mL/min

注入量：1 μL

測定モード：SCAN(M/Z 40-700)

ランタイム：22.5 min

#### 4-3. ライブラリ作成方法

各添加剤標準品 0.05 mg を秤量し、アセトンで溶解して 1000 ppm の溶液を調製した。本標準溶液をアセトンで希釈して、1 ppm 又は 10 ppm とした。本試験溶液を GC/MS-SCAN により分析し、GC/MS のデータ解析機能を利用して、測定したクロマトグラムとマススペクトルから、測定添加剤の標準品として登録した。登録項目は、保持時間、マススペクトル、ピーク形状等である。

同定方法は、添加剤専用オリジナルライブラリ及び NIST 98 を利用した。

#### 4-4. 試験溶液の調製

試料(PVC 製医療用具)0.25 g に、シクロヘキサン/2-プロパノール(1:1, V/V)混液 5 mL を加え、常温で一晩静置後、これらを抽出液とした。抽出液 2 mL を 40 °C の水浴上で窒素気流下約 0.2 mL まで濃縮し、アセトンを加えて 2 mL に定容して、これを試験溶液として使用した。

#### 4-5. 定量分析

絶対検量線法により、ピーク面積を利用して、濃度範囲 0.1-50 ppm において、各同定された化学物質の検量線を作成し、定量分析に用いた。

#### 5. THF および 2-EH の測定

##### 5-1. 試薬および材料

THF および 2-EH の標準品には和光純薬製を、また、内部標準物質として使用したテトラヒドロフラン-d8 (THF-d8) および 2-エチル-1-ヘキサノール-d17 (2-EH-d17) には CDN Isotopes 社製 (ケベック, カナダ) を、メタノールには和光純薬製残留農薬分析用を、その他の試薬については和光純薬製の特級試薬を使用した。血液バッグについては、JMS 社製 S-200 (CPD 液 28mL 入) および川澄製 カーミ C 液 (CPD 液 28mL 入) の 2 種類を用いた。

##### 5-2. 試料の調製

赤十字名古屋血液センターにて 2 種類の血液バッグ各 1 個に被験者 (1 名) の血液約 200mL を採取し、愛知県衛生研究所の冷蔵庫 (4°C) に保存した。採取直後、1、2 および 4 日後に、各バッグから血液 10mL を採取し、3000rpm で 10 分間遠心分離して得られた上層 (血漿) および下層 (赤血球液) をそれぞれ分析用試料とした。

##### 5-3. 分析条件

ヘッドスペース条件 装置：Tekmer 7000 (Tekmer)、バイアル容量：22mL

(Chromacol, CV-22)、バイアル加熱条件：85°C (20 分)、バイアル振とう機能：使用 (Power 5 : 3 分)、サンプルループ容量：1mL、サンプルループ温度：150°C、トランスファーライン温度：160°C。

GC/MS 条件 装置：AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム：Vocol (0.25 mm i. d. x 60 m、膜厚：1.5  $\mu$ m、Sperco) カラム温度：40°Cで4分間保持し、230°Cまで毎分10°Cで昇温後、230°Cで5分間保持。イオン源温度：210°C イオン化：EI、イオン化電圧：70 eV、検出方法：スキャン法 (m/z 41-260) またはSIM法、モニターイオン：THF (m/z 71)、2-EH (m/z 112)、THF-d8 (m/z 80)、2-EH-d17 (m/z 128)

#### 5-4 分析操作

測定 希釈水 14.5mLが入ったヘッドスペースバイアルに、試料 0.5mL および内部標準溶液 (THF-d8 および 2-EH-d17 の 250ppm メタノール溶液) 1 $\mu$ Lを加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-GC/MSにより測定を行なった。

検量線および定量 ヘッドスペースバイアルに希釈水 15mL、混合標準溶液 (THF および 2-EH のメタノール溶液、濃度：50 または 1000ppm) 1-10 $\mu$ L、および内部標準溶液 1 $\mu$ Lを加え、試料と同様に測定した。そこで得られた測定対象物質とその安定同位体内部標準の面積比により検量線を作成し、それを用いて試料中の測定対象物質濃度を算出した。

希釈水 300°Cで5時間加熱処理した食塩と MilliQ 水とで調製した飽和食塩水に対し、高純度ヘリウムを 60°Cで加温しながら5分間ばっ気 (約 1L/分) した後、超音波水槽中でアスピレーターにより脱気するという処理を3回繰り返すことにより揮発性の溶質を除去した溶液を使用した。

#### 6. 倫理

実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試

料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

#### C. 結果と考察

##### 1. ウイルスクリーニングによる血液製剤の安全性確保の向上を旨とした研究 - 標準血清 (血漿) の作製 -

選定した候補血清 (血漿) を分注して、各分担測定者に送付した。各分担者から返送された成績はその都度収集し、解析中である。現在、既に、当初予定した検出、測定項目の90%以上の測定を終了し、そのデータが集積されているため、各検体の由来、第1次のスクリーニング検査の結果とともに一覧表を作成し、各分担測定者に対して、必要に応じた再測定の依頼および、それぞれの立場での標準血清 (血漿) の仮選定を依頼しているところである。

標準血清 (血漿) の選定にあたっては、最終的には、HBV、HCV、HIV とともに、陰性コントロールを含めて、それぞれ 100 検体を目安に選定する予定である。また、標準血清 (血漿) 選定後に、WHO から入手した標準品との calibration を、複数の分担測定者の参加によって行なう予定である。標準血清 (血漿) は、WHO の標準品との calibration 終了後に分注、保管し、本研究班の次の目的である、NAT、血清学的検出系の標準化に供する予定である。

##### 2. HIV-1 サブタイプの解析

RT-PCR で env 領域が増幅され塩基配列が決定できた 97 検体について行った系統樹解析の結果を図 1A、図 1B、図 1C に示した。これら系統樹解析の結果から今回解析した 97 検体は欧米に多くみられるサブタイプ B とタイ等の東南アジアに多いサブタイプ A/E そしてアフリカに多いサブタイプ A の 3 種類のサブタイプに分類された。

また表 1 に示したように、サブタイプ B が 81 例 (81%) と最も多く、サブタイプ A/E は 12 例 (12%)、サブタイプ A は 4 例 (4%) であった。



HIV陽性の献血血液100例の解析を行った結果、サブタイプBが81%と最も多くみられたが、東南アジアに多くまた日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプA/Eが12%みられ、またアフリカに多くみられ日本では比較的まれなサブタイプAも4%存在した。日本のHIV感染者には、この他にサブタイプC, D, F, G, A/C等が見出されており今後、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、これら多種のサブタイプの存在を考慮しておくことが重要である。

### 3. 血液製剤のウイルス核酸増幅法試験法(NAT)に関するガイドライン策定において考慮すべき基本的事項についての検討

血液製剤のウイルス核酸増幅法(NAT)についてのガイドラインは、血液製剤のウイルス安全性確保を目的としてウイルス遺伝子の検出のためにNATを適用する際の分析法バリデーション及び試験法設定のための基本事項について示すものであり、厚生省通知「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」を補完するものでもあるべきである。ウイルス検出法としてのNATは、基本的には陽性と陰性を判定する定性的手法である。特に、NATでは数コピーから数十コピーのウイルスゲノム検出が可能とされ、このような微量のウイルス検出においては定量的取り扱いがきわめて困難である。ウイルススクリーニングにおいては、どの程度の確実性でウイルスゲノムが検出できるのかが最も重要なファクターといえる。一方、医薬品の製造工程におけるウイルスクリアランスの評価やウイルス検出試験に用いる試料の抽出、精製、保存等の効率を評価する場合にはウイルスを定量的に検出する必要がある。ウイルスクリアランスの評価はモデルウイルスを使用することが可能であるが、特定のウイルス検出のための、試料の抽出、精製、保存等の評価においては目的とするウイルスを実際に使用することが求められる場合もある。しかし、HCVやHBV等では感染力によりこのようなウイルスクリアランスを評価することが困

難であり、定量的なNATが有効である。ガイドラインでは、ウイルス検出法としてNATは基本的に定性的なものとしてとらえられるが、定量的に用いる際に考慮すべき必要事項についても言及されるべきである。

#### 3-1. 適応の範囲

ガイドラインで扱うウイルスNATとしては、ドナースクリーニング試験、原料血漿の製造工程への受け入れ試験、さらには必要に応じて行われる血漿分画製剤や血液製剤の製造過程における工程管理試験や最終製品試験を対象としている。

ウイルスNAT試験法は主として目的ウイルスゲノムの存在の有無を調べる定性試験と考えられるが、国際あるいは国内標準品からの自社標準品の作製などの定量試験として用いる場合もある。血漿プールのウイルススクリーニング試験としてのNATは、定性試験として行われる。従って、ウイルスゲノム検出を目的としてNATを採用する場合に、その分析法バリデーションの重要な項目は特異性と検出限界の2点である。分析法バリデーションを行う場合には、分析法の頑健性についても評価することが必要である。ウイルスNATにおける、特異性、検出限界、分析法の頑健性は以下のように定義される。

NATにおける特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、目的とする核酸を確実に検出する能力と定義される。

検出限界とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量で、定量できるとは限らない量と定義される。

分析法の頑健性とは、分析条件を小さい範囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力と定義され、通常の試験における信頼性の指標になる。

#### 3-2. 特異性

NATの特異性は、プライマーの選択、プローブの選択(最終産物の検出に関する)、試験条件の厳密さ(増幅及び検出工程の両方)に依存している。プライマーとプローブをデザインした際には、用いるプライマ

ーとプローブが目的ウイルスゲノムのみを検出できるとする根拠を示す必要がある。類似ウイルスへの交差反応性の可能性についても特に注意する必要がある。この場合、公開されているデータバンクにより、選んだ全ての配列をデータ検索する方法が有効である。さらに、解析に用いたソフト、解析条件についても説明する必要がある。多くの場合、通常プライマー（およびプローブ）を設計する際には、遺伝的に非常によく保存されているウイルスゲノムの領域が用いられる。増幅した産物は、Nested Primer による増幅、制限酵素による解析、シーケンスあるいは特異的なプローブによるハイブリダイゼーションのいずれかの方法によって確実に同定すべきである。

検出しようとする配列がどの程度保存されているものであるか、GC含量の程度、さらには配列の長さなどについて科学的合理性について説明する必要がある。一種類以上のサブタイプあるいは複数種のウイルスを検出しようとする場合にはその妥当性も含めて説明をするべきである。プライマーやプローブの選択の合理性についても説明するべきである。定量的なアッセイを行う場合には、そのデザインと定量的のための標準品の性質について説明することが必要であろう。

分析法の特異性をバリデートするために少なくとも 100 個の目的ウイルス陰性血漿あるいは陰性血漿ミニプールを試験し、陰性であることを示すことが望ましい。

NAT 検査により目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できる能力はプライマー、プローブ、反応条件に依存する。これは適切な reference panel を使用することによって証明することが必要である。

### 3-3. 試験の最適化

ウイルスの検出に NAT を確立していく場合には、ウイルスゲノムの抽出、目的配列の増幅、検出、定量、及びこれらを行うための機器の設定と試験に関する最適化した規格を定めておく必要がある。NAT に

用いる以下の情報について明らかにしておくべきである。

#### 3-3-1. 目的とするウイルスゲノムの増幅しようとする領域、長さ、特異性、

#### 3-3-2. プライマーとプローブに関して

プライマーとプローブは核酸検出系の中心的役割を果たしており、その品質が NAT の重要な要素となっている。プライマーやプローブについて次のような情報を明らかにしておくことが必要である。

(1) 選択したプライマーとプローブの科学的合理性を説明すること。

(2) 検出しようとするウイルスゲノムの最も共通する配列の選択等、どのように複数のサブストレインを検出できるようにしているのかを説明すること。

(3) プライマーの大きさ、GC含量、 $T_m$  値、想定されるヘアピン構造や 2 次構造についての情報を明らかにしておくこと。

さらに、採用しようとしている NAT ができる限り多くの目的ウイルスのサブタイプ、バリエーションを検出できるようにデザインされている必要がある。

用いる合成プライマーやプローブの品質に関して以下のような情報を明らかにしておくべきである。

(4) 複数のロットの合成プライマーやプローブの特性解析結果やイールド等についての詳細なデータを示すことが望まれる。

(5) プライマーやプローブの化学修飾を行う場合には、その詳細についてデータを含めて説明するべきである。

(6) プライマーやプローブの純度について最新の測定法を用いて解析し、解析結果を示すとともに、必要に応じてその規格値を定めておくことが必要である。

(7) プライマーやプローブの力価について、段階的希釈法での検出能を指標とするなどして解析するとともにロット間の一定性についてのデータを示すことが必要である。

#### 3-3-3. 反応に用いる緩衝液について

NAT の増幅反応、ハイブリダイゼーション、検出に用いる反応液の試薬の品質や純

度について解析する必要がある。また、その試薬や反応液の安定性等について解析しておくとともに有効期限を定めておくことが必要である。これらの試薬や反応液の受け入れ規格を適正な評価に基づいて作成すべきである。

#### 3-3-4. 酵素

NATに用いるすべての酵素は由来と機能を明らかにしておくこと。酵素の純度、力価、比活性について受け入れ規格を定めておくこと。

調製した酵素について、エクソヌクレアーゼ活性、DNA及びRNA依存性のポリメラーゼ活性等を明らかにしておくことが必要である。

以上の試薬について市販のものを用いる場合には、メーカーによる解析結果を入手し保存しておくことが必要である。

#### 3-4. 標準検体 (標準品、参照品、ランコントロール)

NATにおいては、各試験の精度や感度のコントロールには標準品あるいは参照品が必須である。通常NAT試験法の開発過程における、ウイルス濃縮、ゲノムの抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、定量、汚染をモニターするために標準品、参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

検出限界の設定やランコントロールにおいては、95%の確率で検出される検出限界をモニターできる量の標準検体と、その3倍量のウイルスを含む標準検体(あるいは定量性のある下限量の標準検体)を用いることが推奨される。試験では、この3倍量の標準検体をスパイクした標準検体は必ず陽性にならなければならない。このような2種類の標準検体を用いることにより、各試験の成立をモニターすることが望ましい。

また、複数のサブタイプのウイルスパネルに対して上記のような2種類の標準検体を作製して試験を行い、各サブタイプに対してどれほどの検出能があるか評価しておくべきである。ウイルスパネルの選択にあたってはウイルス流行についての地

理的な疫学データ等を参考するべきである。

#### 3-5. 検出限界

NATによる血漿あるいは血漿ミニプールのウイルス否定試験は通常定性試験である。結果は陰性か陽性のいずれかである。NAT検査では95%の確率で検出される検体一定量あたりの標的分子の最低量である陽性カットオフ値を検出限界値として設定する。陽性カットオフ値は、検体中のウイルスゲノムの分布や酵素の効率のような因子により影響され、個々のウイルスNAT検査でそれぞれの95%カットオフ値が存在する。

陽性検出限界を測定する際は、国際標準品あるいは今後策定されていくであろう国内標準品を用いるか、国際標準品あるいは国内標準品に対して較正された参照品や自社標準品の希釈系列を用い、別々の日に試験を実施すること。少なくとも3つの独立した希釈系列を用い、十分な回数試験を繰り返し、各希釈段階での総試験回数が24になるように試験を実施する。例えば、3つの希釈系列を別々の日に8回行う、4つの希釈系列を別々の日に6回行う、6つの希釈系列を別々の日に4回行うなどである。希釈液の数を処理しやすい数にするために、予備試験(例えば指数段階的に希釈を作製するなど)を行い予備的な陽性検出限界値(すなわち陽性シグナルが得られる高い希釈倍率)を決定する。希釈範囲は、予備的な陽性検出限界値付近を選択する(希釈液として陰性血漿を用い、希釈率として0.5logまたはそれ以下を使用する)。あるいはバリデートされた定量的NATを用いることも可能である。95%の確率で検出されるウイルスゲノム量は適切な統計学的手法によって算出すること。また、これらの結果は試験法の日内変動と日差変動を示す役目も果たすことになる。

#### 3-6. 分析法の性能確認

もし二人以上の者が試験を実施する場合、試験者ごとに少なくとも8本の、95%の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性

血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料について試験を実施すべきである。この試験（8本の試験検体）を別々の日に3回繰り返すこと（すなわちのべ3日の試験により計24試験が実施されることになる）。その結果が全て陽性になること。また同様に、重要な装置（例えば自動抽出機やサーマルサイクラーなど）を何台かを使用する場合も、95%の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料8本を試験し、結果が全て陽性になることを確認すべきである。

### 3-7. 頑健性

NAT試験法を確立する過程で頑健性を評価すべきである。分析条件を小さい範囲で変化させても測定値が影響されないという信頼性を示すことが必要である。NATの場合、分析条件の小さな変動が重要になる。しかしNATの頑健性は、塩化マグネシウム、プライマー、dNTPのような試薬の濃度を小さい範囲で変動させて試験することにより、方法を確立していく過程で示すことができる。頑健性を示すためには、少なくとも20個の目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料（ランダムに選択する）と95%の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料を用いて試験を実施し、すべての陰性血漿プールが陰性を示し、全ての陽性試料が陽性を認めることにより示すことができる。ウイルスゲノムの抽出前に超遠心を使用する方法などでは頑健性に関して特に注意を払う必要がある。この場合、可能であれば目的ウイルスに対する特異的抗体を持たないが目的ウイルスゲノム陽性である複数の血漿を使用して試験することにより示すことができる。クロスコンタミネーションが防止できていることを示すために、陰性血漿プールと高い濃度の目的ウイルスをスパイクした陰性血漿プール（濃度としては95%の確

率で検出されるウイルス量の100倍量以上）の少なくとも20検体をランダムに配置し、試験することが望ましい。

### 3-8. 判定

陽性及び陰性の判定基準を明確にし、文書化しておくこと。再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておくべきである。

### 3-9. 輸送・保管

検体の保管、輸送条件の妥当性について、それを裏付けるデータを示して明らかにすることが必要である。保管、輸送等において定められた条件を逸脱していないかモニターするとともに、モニター結果を記録に残すことが必要である。

### 3-10. 施設・設備

ウイルスNAT試験は、数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できるため、増幅産物による汚染等に細心の注意を払う必要がある。このため、NAT検査に用いる施設について、増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋とを区別することが望まれる。この場合に、それぞれの施設は独立した空調等を備えていることが望まれる。また、可能な限り試験検体のミニプール化等の前処理、核酸抽出、試薬調製を独立した施設ないしは設備を用いて行うことが望ましい。さらに、増幅産物を取り出して試験を行う必要がある場合には、独立した施設ないしは設備にて行うことが必要である。

### 3-11. 品質管理

NAT検査においては、数コピーから数十コピーのウイルスゲノム検出が可能とされ高感度であるために操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。NAT検査の恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT検査従事者に対して教育・訓練をおこなうとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

ピペット、サーマルサイクラーの校正等、機器操作による変動に関しても評価する

ことが必要である。この評価に加え、分析法全体の有効性と信頼性を評価すべきである（システム適合性試験）。市販のキットを試験法の一部または全てに使用する場合で、キットの製造元で実施されたバリデーション資料がある場合はユーザーによるバリデーションデータに加えることができる。しかし、その目的に応じたキットの性能を示す必要がある。NATのような生物学的試験は、分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の要因の影響を受け易いので、試験操作法は標準操作手順書などに正確に記述することが必要である。

#### 4. 血液バッグにより溶出する化学物質の高感度・高精度検出系の確立に関する研究

GC/MS オリジナルライブラリの登録標準溶液を使用して作成した添加剤専用オリジナルライブラリの結果を表 2 に示す。フタル酸系として 22 種類、アジピン酸系として 11 種類、その他 6 種類、合計 39 種類を登録した。

実試料の SCAN 測定結果を図 1 に示す。同定結果は表 2 に示すようになり、◎は添加剤専用オリジナルライブラリ、○は NIST 98 による同定となる。このライブラリを使用することにより合計 7 種の化学物質を同定することができた。

同定された化学物質の内、特に検出量の高かった Di-2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP), Butylated Hydroxytoluene (BHT), 2-Ethylhexanol, 4-Nonylphenol の 4 物質について検量線を作成した。いずれの検量線においても相関係数 0.999 と良好な直線性を得る事ができ、この検量線を用いて、各化合物を定量した (図 3)。

未知物質の同定を行う際、GC/MS『NIST 98』のライブラリを使用するのが、一般的である。しかし、マススペクトルのみから同定することはしばしば困難を伴う。そこでマススペクトル(フラグメントイオン)と保持時間を兼ね備えた添加剤専用オリジナルライブラリを作成することで、同定能力及び効率を高めることができた。本法を

利用することにより、プラスチック可塑剤、酸化防止剤の同定が可能となった。

実試料について SCAN 測定した結果、7 種の物質を同定することができた。このうち、DEHP 及び 2-Ethylhexanol は全ての製品から検出された。DEHP は、生殖系への影響が懸念されており、IARC の発癌性評価でグループ C に属す化合物である。

2-Ethylhexanol は、DEHP の主要な代謝物の一つとして項報告されているため、PVC 製品に添加された DEHP の分解物である可能性が高い。Cyclohexanone は、ゴムの耐薬品として利用され、毒性として長期反復投与により皮膚炎が生じるが、発癌性、生殖毒性は認められていない。

Cyclohexanol もゴムの耐薬品として利用されているが、特に毒性に関する報告はない。BHT は、酸化防止剤として、汎用されている化合物である。4-Nonylphenol は、界面活性剤や酸化防止剤の主原料として利用されているが、昨年、環境省で、内分泌攪乱化学物質として発表されている。

#### 5. THF および 2-EH の分析

今回、分析の対象とした THF および 2-EH は揮発性化合物であるため、これらの物質を精度良く且つ高感度分析するためには、ヘッドスペース-GC/MS 法が適当であると考えられた。ヘッドスペース法は、試料溶液を入れて密封したバイアルを加熱、振とうし、試料に含まれる揮発性の化合物をバイアル上部のヘッドスペースと呼ばれる気相に気化、濃縮した後に、その気相の一部を GC に導入するという方法である。この方法を用いれば、試料溶液中の揮発性化合物を選択的に、しかも効率的に分析することが可能であるが、この方法を用いて血液や血清の分析を試みたところ、以下に述べるような問題点が明らかとなり、それらを解決するための検討を行なった。血液や血清をバイアルに入れて加熱、振とうすると、それらは激しく発泡し、ヘッドスペース部分の空間が狭くなるため、オートサンプラーを用いての自動分析が困難であった。そこで、我々は試料を希釈する方法を種々検討した結果、試料を飽和食塩

水で15倍以上に希釈することにより試料の発泡が効果的に抑制され、ヘッドスペースオートサンプラーを用いたGC/MS自動分析が可能となった。

一方、血液や血清には脂質など極性の低いマトリックスが多く含まれており、これらのマトリックスはバイアル内での目的物質の気化を抑制するため、表4に示したように十分な回収率が得られないだけでなく、ばらつきも大きくなるなどの問題があり、精度の高い分析が困難であった。このような場合には、分析対象物質と揮発性などの物理的性質が類似している安定同位体を内部標準に用いて測定を行ない、回収率を補正する方法が一般的に用いられる。そこで、THFおよび2-EHそれぞれの内部標準としてTHF-d8および2-EH-d17を用いて人血清からの回収率を測定したところ、表5に示したように、満足すべき回収率および再現性を得ることができた。

次いで、GC/MSによるTHFおよび2-EHの分離、検出条件の検討を行なった。その結果、GC固定相に揮発性物質分離用のキャピラリーカラムであるVoco1を用い、質量検出をSIMモードで行なうことにより、試料中の濃度で1ppbのTHFおよび2-EHを検出することが可能となった。定量に用いるイオンとしては図4のマススペクトル上に示したように、THFに $m/z$  71 (内部標準THF-d8:  $m/z$  80)を、2-EHには $m/z$  112 (内部標準2-EH-d17:  $m/z$  128)を選択した。図5に、スキャンモードで測定した標準品のトータルイオンクロマトグラム

(TIC)を示した。この条件を用いれば約30分で両物質を分離、検出できるだけでなく、トルエンやキシレンなどの有機溶剤類やパラジクロロベンゼンなど他の揮発性化合物の同時分析も可能であった。

以上の検討により確立した分析法を図6に示した。この方法で分析者が行う操作は、試料、希釈液および内部標準液をバイアルに入れてキャップを付し、ヘッドスペースオートサンプラーにセットすることのみである。その後のバイアルの加熱、振とう、GCへのインジェクションなどの操

作は全て自動化されているため、50試料の処理に要する時間は1時間足らずであり、GC/MS分析等の時間を含めても2日程度で50試料の全分析を終えることが可能である。以上のことより、この方法は迅速性および簡便性を兼ね備えているだけでなく、精度管理の面からも優れた方法であると評価できる。

## 2. 血液バッグに保存された人血液の分析

本研究で確立された分析法の評価、および、来年度以降に予定している溶出挙動調査等の予備段階として、血液バッグに採取し、冷蔵保存した人血液の分析を実施した。赤十字血液センターにおいて2種類の血液バッグに約200mLずつ採取された同一被験者の血液を、採血直後、1、2および4日後に10mLずつ分取し、遠心分離によって血漿と赤血球液に分けた後、血漿及び赤血球液のいずれをも試料として用い、THFおよび2-EHの分析を行なった。その際得られた人血液のTICとマスクロマトグラムを図7に示した。それぞれのクロマトグラム上には、定量の妨害となるようなピークは認められなかったことから、本法を用いれば血液試料中の両化合物の高精度な定量が可能であることが示唆された。

表6には、2種類のバッグに採取し冷蔵保存された人血液を経時的に血漿および赤血球液に分離した後、それぞれに含まれるTHFおよび2-EHの濃度を測定した結果を、バッグに封入されていた抗凝固剤水溶液(CPD液)の分析結果とともに示した。

THFに関しては、川澄製バッグに保存された血液の濃度(最高26.8ppm、血漿)がJMS製に保存されたもの(最高0.85ppm、血漿)よりも30倍以上高く、メーカーにより溶出量が大きく異なることが明らかとなった。濃度の経時変化は、いずれのバッグも非常に緩慢であり、採取直後の濃度が維持されるか、僅かに増加する傾向が認められた程度であった。これは、バッグに封入されていたCPD溶液中のTHFが非常に高濃度(川澄製109ppm、JMS製8.5ppm)であった可能性が高いことから判断すると、

試料から検出された THF のほとんどが CPD 液に溶け込んでいたものであり、バッグの樹脂から溶出した THF の量は少なかったことを示唆するものと考えられた。また、血漿と赤血球液中の濃度がほぼ同レベルにあったことから、保存する内容物が異なっても、検出される THF 濃度にはそれほど差が生じないことが示唆された。

2-EH に関しては、JMS 製のバックに保存された血液中の濃度（最高 1.85ppm、血漿）が川澄製のバックに保存されたもの（最高 1.48ppm、血漿）よりも幾分高い程度であり、メーカー間の違いは小さかった。しかしながら、採血直後の濃度が保存 4 日後にはバックのメーカー、保存血液の成分を問わず、いずれにおいても約 5 倍に上昇していたこと、血漿中の濃度が赤血球液中濃度よりも全期間を通じて 6-11 倍も高いなど、THF とは異なった挙動が認められた。さらに注目すべきことは、保存期間が増すと共に保存血漿中の 2-EH 濃度が CPD 液の濃度より高くなったことから、2-EH の血液バックからの溶出が確認されたことである。このバックからの溶出により、試料中の 2-EH 濃度は保存期間と共に増大して行ったものと考えられた。また、2-EH は、血液バッグに使用されている可塑剤である DEHP が血液に含まれるリパーゼなど酵素の作用で加水分解される際に生成される分解物でもあることから、DEHP の分解も経時的な 2-EH 濃度増加の要因の一つとも考えられる。一方、血漿および赤血球液の濃度に約 10 倍という大きな差があったことから、事例を増して検討を加えるとともに、その他血小板等の血液成分の保存に際しての 2-EH の溶出についても検討を加える必要があるものと考えられた。

#### D. 結論

1. 核酸増幅検査 (NAT)、血清学的検出系、標準化のための候補血清 (血漿) を選定し、ウイルス (HBV、HCV、HIV) の遺伝子型 (genotype)、ウイルス量 (ウイルスの核酸量、ウイルスの構造タンパクのペプチド量)、抗原価、抗体価、エピトープごとの

抗体価等を測定し、標準血清選定のためのデータの集積、解析を行なっている。

2. WHO の標準品 (HBV、HCV、HIV) を入手し、日本国内の標準品を選定した後に WHO の標準品との calibration を行う準備を整えた。
3. 日本の HIV 感染者には、この他にサブタイプ C、D、F、G、A/C 等が見出されており今後、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、これら多種のサブタイプの存在を考慮しておくことが重要である。
4. 血液製剤のウイルス NAT ガイドライン策定にあたって考慮すべき事項や要素について、関連する種々の文献に加えて EU や米国のガイドラインを参考に調査研究を行った。その結果、ウイルス NAT の精度や特異性、検出感度をどのように評価すべきかについての基本的考え方を明らかにすることができた。
5. 血液保存や輸血行為等に多く利用されている PVC 製医療用具について、モニタリングや生体影響評価を実施する必要性を有する化学物質を以下のように選択できた。①フタル酸ジエチルヘキシル、②2-エチルヘキサノール、③ノニルフェノール、④BHT。本化合物に関しては、安全な血液製剤を供給するうえで、早急にモニタリングや生体影響評価等を実施する必要性が認められた。

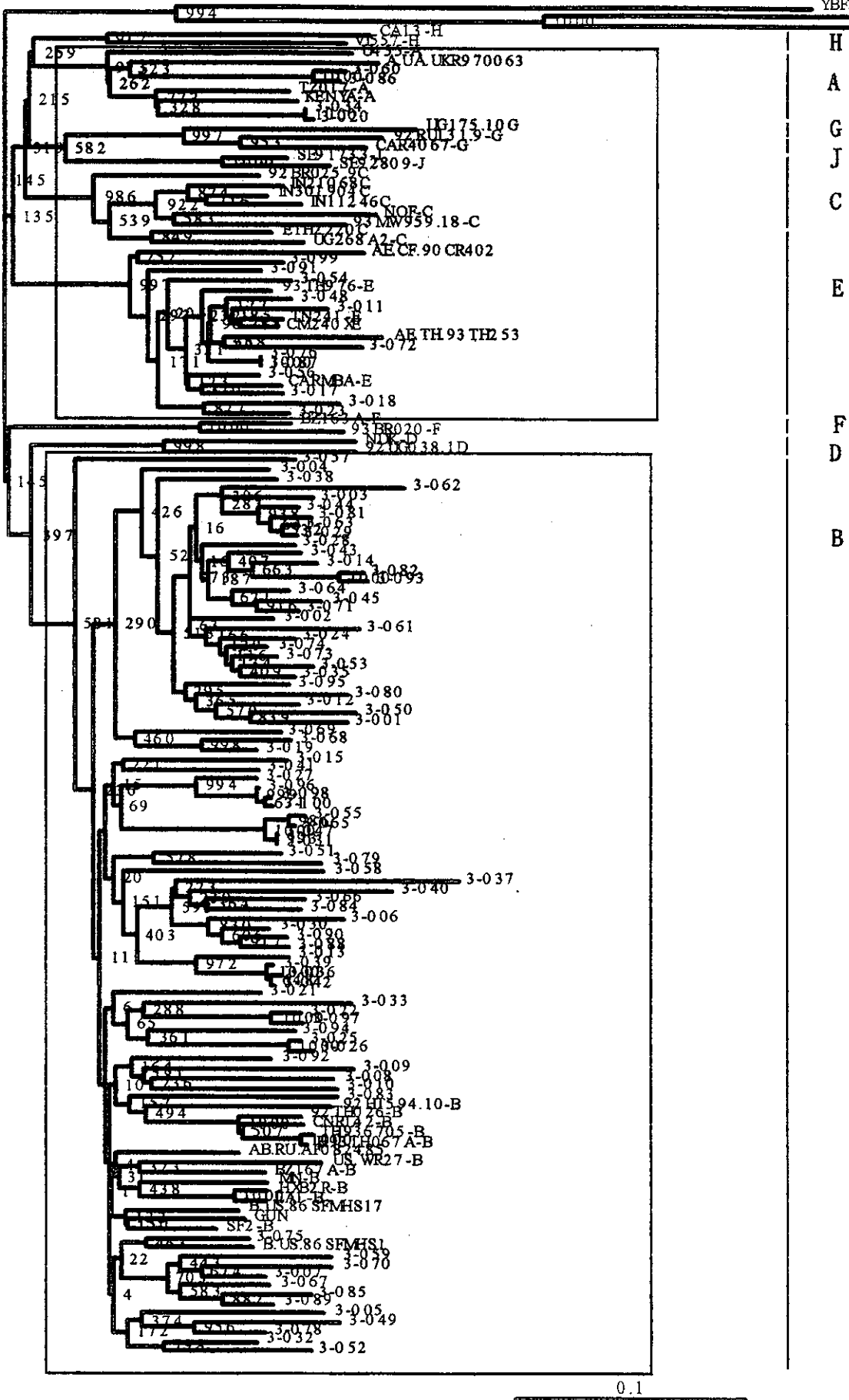
#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. GILBERT R. KAUFMANN, KAZUO SUZUKI, PHILIP CUNNINGHAM, MOTOKAZU MUKAIDE, MAKIKO KONDO, MITSUNOBO IMAI, JOHN ZAUNDERS, and DAVID A. COOPER: Impact of HIV Type 1 Protease, Reverse Transcriptase, Cleavage Site, and p6 Mutations on the Virological Response to Quadruple Therapy with Saquinavir, Ritonavir, and Two Nucleoside Analogs. "AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES" 17(6), 487-497, 2001

2. 嶋 貴子、近藤真規子、斎藤隆行、川田かおる、藤 章、坂本光男、相楽裕子、今井光信：マイクロプレート法による HIV-1 抗体、HIV-2 抗体および HIVp24 抗原検出用キット（HIV 抗原抗体同時検出キット）の検討. 感染症誌、75(12)：1014-1024、2001
3. 今井光信：HIV 感染症のウイルス診断（HIV 検査）総合臨床、50(10)、2698-2703、2001
4. 早川堯夫、真弓忠範、黒澤 努、豊島 聰、山口照英、川西 徹：トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討 医薬品研究（印刷中）
5. 早川堯夫、豊島 聰、山口照英、川西 徹：トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討：国立医薬品食品衛生研究所報告第 119 号、2001
6. 早川堯夫、谷本 剛、山口照英、川西 徹、酒井喜代志：医薬品各条の改正点－生物薬品、薬局、52、77-83、2001
7. 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子：平成 12 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」－ 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ. 医薬品研究印刷中
8. 早川 堯夫、山口 照英、押澤 正：日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 － ウイルス安全性確保の基本要件一、医薬品研究印刷中
9. T.Mizuochi: Re-evaluation of HbsAg Detection Kits approved for marketing in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases vol.54 pp.201-207 (2001)





H  
A  
G  
J  
C  
  
E  
  
F  
D  
  
B

図 1 A. HIV-1 env V3 領域の系統樹解析 (neighbor-joining法)

サブタイプB

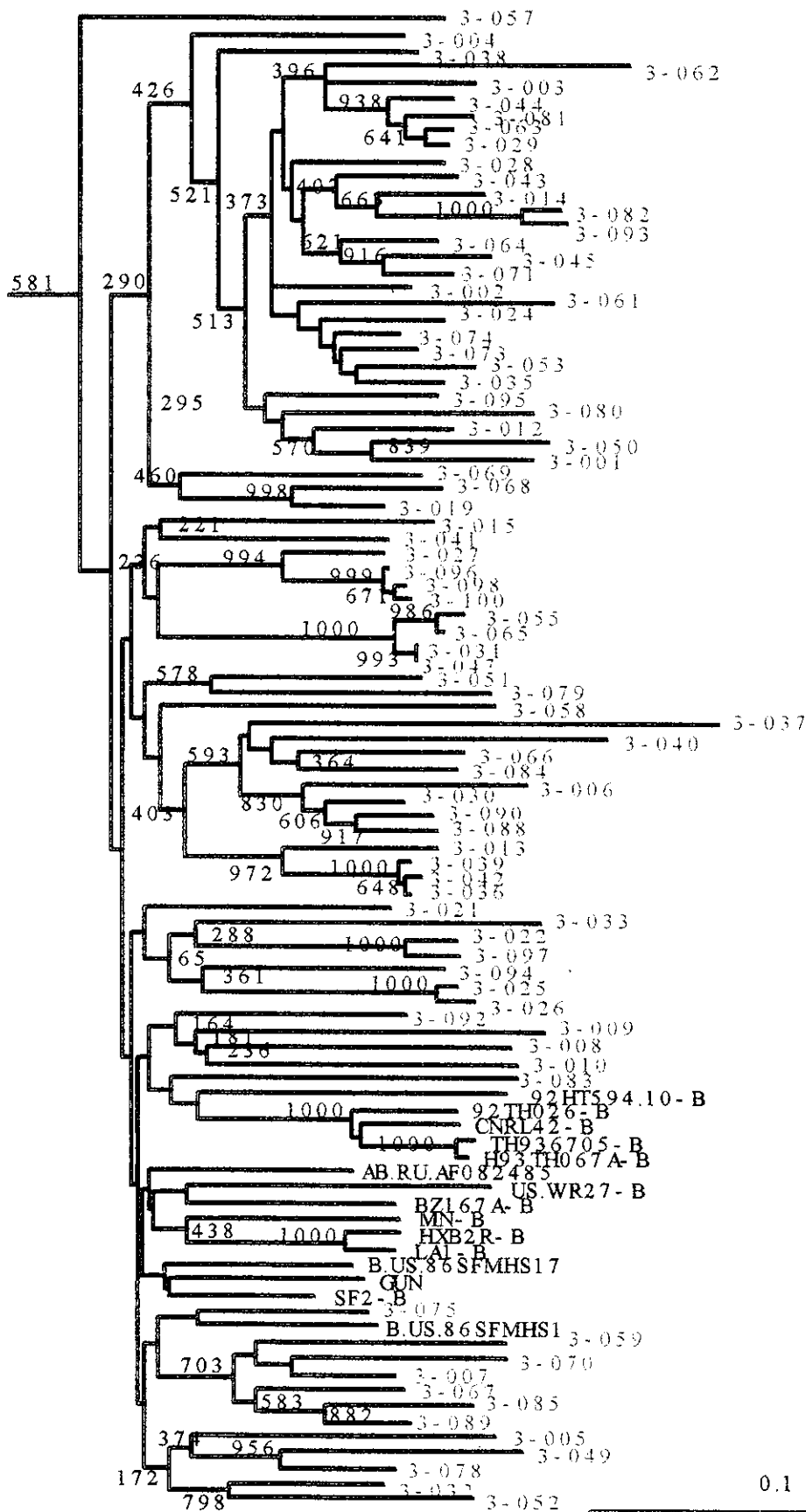


図1B. HIV-1 env V3領域の系統樹解析 (neighbor-joining法)  
サブタイプB拡大

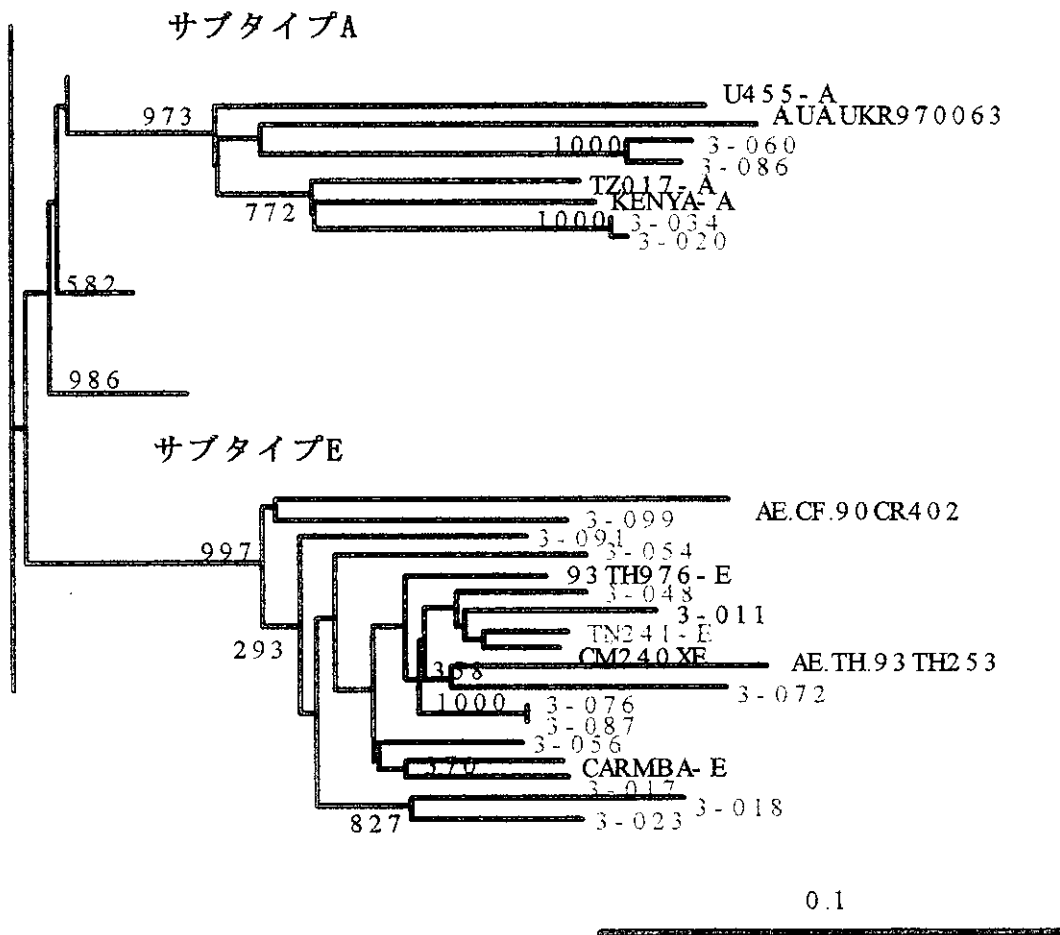


図 1 C. HIV-1 env V3 領域の系統樹解析 (neighbor-joining 法)  
サブタイプ A, E 拡大

表1 献血者におけるHIV-1陽性者100例のHIV-1サブタイプと血中ウイルス量

検体番号	genotype env C2V3	RNA (copies/ml)	検体番号	genotype C2V3	RNA (copies/ml)
3-001	B	470000	3-051	B	230000
3-002	B	35000	3-052	B	<400(270)
3-003	B	2800	3-053	B	3600
3-004	B	61000	3-054	E	1200
3-005	B	8300	3-055	B	7100
3-006	B	3600	3-056	E	15000
3-007	B	4000	3-057	B	660
3-008	B	1500	3-058	B	580
3-009	B	11000	3-059	B	<400(180)
3-010	B	11000	3-060	A	730
3-011	E	4500	3-061	B	24000
3-012	B	7200	3-062	B	5800
3-013	B	220000	3-063	B	5400
3-014	B	8800	3-064	B	72000
3-015	B	170000	3-065	B	28000
3-016	B(typingPCR)*	<400	3-066	B	2100
3-017	E	250000	3-067	B	120000
3-018	E	1100	3-068	B	69000
3-019	B	1800	3-069	B	12000
3-020	A	<400	3-070	B	39000
3-021	B	130000	3-071	B	2200
3-022	B	7100	3-072	E	99000
3-023	E	61000	3-073	B	53000
3-024	B	1300	3-074	B	20000
3-025	B	<400	3-075	B	47000
3-026	B	<400(270)	3-076	E	37000
3-027	B	100000	3-077	PCR-	<400
3-028	B	20000	3-078	B	<400(160)
3-029	B	7300	3-079	B	130000
3-030	B	9500	3-080	B	2800
3-031	B	62000	3-081	B	11000
3-032	B	9000	3-082	B	2700
3-033	B	4000	3-083	B	1300
3-034	A	<400(360)	3-084	B	1900
3-035	B	4000	3-085	B	45000
3-036	B	26000	3-086	A	7600
3-037	B	1700	3-087	E	110000
3-038	B	2900	3-088	B	57000
3-039	B	21000	3-089	B	120000
3-040	B	73000	3-090	B	1600
3-041	B	3900	3-091	E	54000
3-042	B	42000	3-092	B	43000
3-043	B	<400	3-093	B	4900
3-044	B	10000	3-094	B	44000
3-045	B	720	3-095	B	1300
3-046	PCR-	<400	3-096	B	17000
3-047	B	17000	3-097	B	190000
3-048	E	36000	3-098	B	26000
3-049	B	280000	3-099	E	1200
3-050	B	<400(200)	3-100	B	5100

\*env C2V3領域はPCR陰性のため、gag領域タイピングPCRで決定した。

その他はenv C2V3領域の塩基配列

を決定後、neighbor-joining法による系統樹解析でサブタイプを決定した。