

核酸増幅検査 (NAT)標準化のための

標準パネル血漿 (HBV用) - 3/6

パネル血漿番号	HBV DNA		HBsAg				HBV-DNA		HBcAb		HBsAg		HBcAb		HBsAb		HBcAb		HBsAb		HBcAb		HBcIgM Ab		
	コピー/ml	コピー/mL	Orbis Antibody to HBsAg ELISA (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	HBsAg (S/C : 1以上未満)	
P1-041	1.2x10 ⁵	5.0x10 ⁴	24.1	37.2	69.07	3.07	3.07	3.07	0.1	46.19	41.95	POS	10.36	13.11	0	0	0.00	12.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P1-042	6.9x10 ³	6.3x10 ³	0.6	0.8	1.96	0.04	0.04	0.04	0.2	1.47	1.48	N.T.	19.21	22.56	0	0	0.70	19.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-043	2.7x10 ²	(*)	0.2	0.1	0.54	0.00	0.00	0.00	0.2	1.02	1.01	N.T.	-3.82	3.48	0	0	0.50	23.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-044	2.3x10 ³	2.0x10 ³	0.49	1.4	3.78	0.15	0.15	0.15	0.2	2.88	3.24	POS	16.48	13.52	0	0	0.50	11.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-045	3.2x10 ⁵	2.5x10 ⁵	44.8	14.16	71.98	3.23	3.23	3.23	0.2	48.56	48.89	POS	11	15.65	0	0	0.00	29.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-046	1.8x10 ⁵	1.5x10 ⁵	12.9	19.0	48.06	1.84	1.84	1.84	0.1	27.58	28.58	POS	14.5	9.24	0	0	0.00	7.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-047	1.3x10 ⁴	1.0x10 ⁴	3.62	1.0	3.32	0.11	0.11	0.11	0.9	2.27	2.21	POS	16.76	15.46	0	0	0.30	49.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-048	7.1x10 ⁵	6.3x10 ⁵	1.4	2.1	3.45	0.14	0.14	0.14	0.1	2.92	2.74	POS	5.42	-2.94	0	0	0.20	15.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-049	1.4x10 ⁵	2.0x10 ⁵	0.1	0.1	0.44	0.01	0.01	0.01	0.1	0.76	0.95	N.T.	9	4.31	0	0	0.30	21.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-050	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
P1-051	3.4x10 ³	2.5x10 ³	0.0	0.1	0.39	0.01	0.01	0.01	0.2	1.03	0.97	N.T.	5.53	3.84	0.3	0.5	2.30	29.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-052	7.8x10 ⁴	1.0x10 ⁵	3.7	4.7	5.16	0.17	0.17	0.17	0.2	2.69	2.8	POS	17.29	21.94	0	0	0.00	10.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-053	2.2x10 ⁴	6.3x10 ³	0.2	0.1	0.93	0.00	0.00	0.00	0.2	0.95	0.97	N.T.	6.15	7.77	0	0	0.00	14.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-054	2.7x10 ⁵	2.0x10 ⁵	25.5	32.1	34.57	0.90	0.90	0.90	0.0	13.02	14.6	POS	7.4	16.02	0	0	0.00	3.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-055	7.0x10 ⁴	5.0x10 ⁴	12.1	12.2	27.31	0.73	0.73	0.73	0.1	15.39	14.7	POS	7.94	12.15	0	0	0.20	16.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-056	3.5x10 ⁵	2.0x10 ⁵	12.1	0.3	1.00	0.01	0.01	0.01	0.1	1.13	1.11	N.T.	20.75	10.45	1.4	1.9	4.20	17.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-057	6.2x10 ⁴	1.6x10 ⁴	10.4	14.6	22.98	0.59	0.59	0.59	0.3	12.63	12.75	POS	5.66	4.46	0	0	0.50	11.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-058	1.1x10 ⁴	2.9x10 ⁴	0.7	0.7	2.77	0.05	0.05	0.05	0.4	2.24	2.07	POS	3.02	2.91	0	0	0.00	12.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-059	1.1x10 ⁵	6.9x10 ⁴	14.0	20.1	16.54	0.86	0.86	0.86	0.2	13.88	12.69	POS	22.23	16.35	0	0	0.00	13.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
P1-060	4.7x10 ³	4.0x10 ³	0.7	0.9	2.18	0.07	0.07	0.07	0.0	2.01	1.72	POS	9.04	4.25	0	0	0.00	5.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

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製管理法の開発に関する研究」班
2003年3月

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

—HBV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 —

希釈調整	HBV DNA		
	ロシユ 最終成績	日赤 最終成績	
	copies/ml	IU/ml	copies/ml
x10	1.0×10^6	1.0×10^5	5.6×10^5
x100	4.7×10^4	1.0×10^4	4.1×10^4
x1,000	2.6×10^3	1.0×10^3	5.3×10^3
x10,000	<500	1.0×10^2	4.5×10^2
x100,000	<500	1.0×10^1	<100
x1,000,000	<500	1.0×10^0	<100

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3月

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

頻回の凍結～融解操作が標準血漿中に存在する HCV RNA の安定性に及ぼす影響

- 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 柚木 久雄（日赤中央血液センター NAT部）
岸本 眞哉（埼玉県赤十字血液センター 研究部）
山中 烈次（日本赤十字社 血液事業部）
玉造 滋（㈱ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部）
片山 恵子（広島大学大学院 疫学・疾病制御学）
田中 純子（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）

研究要旨

核酸増幅検査（NAT）の精度管理を行うためには、まず、標準パネル血漿の作製と作製したパネル血漿中の HCV RNA の安定性の検証を行っておくことが基本となる。

そこで、本研究班により作製途上にある HCV 感染のウィンドウ期にあたる新鮮凍結血漿由来の HCV の標準パネル候補血漿（HCV 抗体陰性、HCV RNA 7.0×10^6 copy/ml : Taqman PCR, 2.10×10^6 copy/ml : Amplicore monitor : V.2.0[®], genotype 1b+2a）を $-80^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 温浴及び $-20^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 温浴の条件下で各 10 回凍結融解をくり返した後、Taqman PCR と Amplicore monitor V.2.0[®]により同時測定してそれぞれの検体中の HCV RNA の定量を行い、血漿中の HCV RNA の安定性が保たれているか否かを検証した。

その結果、両者とも上記の条件下では同一の定量結果が得られ、検体中の HCV RNA は、少なくとも核酸増幅検査（NAT）の目的のためにはその安定性が保たれていることが確認された。

この結果は、HCV RNA の検出、測定を目的とした NAT の標準化のための標準パネル血漿の保存、管理、活用を考える上で有用な意義をもつと考えられた。

A. 研究目的

HCV用標準パネル候補血漿に凍結～融解の操作を加えることにより、NATの標準血漿として利用可能なHCV RNAの安定性が保たれるか否かを検証する。

B. 対象と方法

検体：本研究班が作製途上にあるHCV用標準パネル候補血漿を用いた。検体はウィンドウ期の献血者由来の新鮮凍結血漿（HCV抗体陰性、HCV RNA量 7.0×10^6 copy/ml：Taqman PCR, 2.10×10^6 copy/ml：Amplicore monitor：V.2.0[®], genotype 1b+2a）を用いた。

凍結～融解操作：①-80℃凍結～37℃温浴融解及び②-20℃凍結～37℃温浴融解の2つの条件で各10回の操作をくり返し、その都度各2本ずつサンプリングし、全ての操作終了後に同時測定により検体中のHCV RNA量を定量した（図-1）。

HCV RNA 定量は Taqman PCR Amplicore monitor：V.2.0[®]により行なった。

C. 結果と考察

①-80℃凍結～37℃温浴融解及び②-20℃凍結～37℃温浴融解をくり返しても、HCV RNAの定量値に変動は認められなかった（表1, 2）。

これまでに、様々な検体の採取条件、採集後の保存条件下でのNATによるウイルス核酸検出用の血清または血漿中のウイルス核酸の安定性に関する試験結果が報告されている^{1)~13)}。また、ヒトへの使用有効期限内の新鮮凍結血漿に37℃温浴融解～-80℃凍結の操作を1回加えただけで、チンパンジーへの感染価は少なくとも 10^2 CID/ml以上減弱するとのデータも得られている¹⁴⁾。

しかし、本研究班が準備中の標準パネル候補血漿を対象とした場合、①-80℃凍結～37℃温浴融解または②-20℃凍結～37℃温浴

融解の操作を各10回まで加えても、核酸増幅検査によるHCV RNAの定量値には変動が全く認められないことが明らかとなった。

この結果は、HCVの標準パネル血漿作製後の保存、活用を考える上で有用な意義をもつものであると考えられた。

本研究を実施するにあたり、実験に用いた新鮮凍結血漿（FFP）は、日本赤十字社においてヒトへの輸注用製剤として調整されたものの、NATによりHCV RNAが検出されたことからヒトへの使用ができなかった製剤であり、ヒトへの有効期限内のものを正規の手続を経た上で、日本赤十字社血液事業部より本研究班あてに譲渡されたものであることを付記する。

D. 引用文献

- 1) Krajden M, Comanor L, Rifkin O, Grigoriev A, Minor JM, Kapke GF. Assessment of hepatitis B virus DNA stability in serum by the Chiron Quantiplex branched-DNA assay. J Clin Microbiol. 36 (2), 382-386, 1998
- 2) Philippe Halfon, Hacène Khiri, Victoria Gerolami, Marc Bourliere, Jean M. Feryn, Pascal Reynier, André Gauthier and Guy Cartouzou. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. J Hepatol, 25 (3), 307-311, 1996
- 3) M. Damen, P. Sillekens, M. Sjerps, R. Melsert, I. Frantzen, H. W. Reesink, P. N. Lelie, H. T. M. Cuypers. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. J Virol Methods, 72(2), 175-184, 1998
- 4) M. Willems, H. Moshage, F. Nevens, J. Fevery and S. H. Yap. Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV - RNA detection by conventional RT-PCR assay. J Virol Methods, 42(1), 127-130, 1993
- 5) MP Busch; JC Wilber; P Johnson; L Tobler; CS Evans. Impact of specimen handling and storage on

- detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion*, 32(5), 420-425, 1992
- 6) Miskovsky EP, Carrella AV, Gutekunst K, Sun CA, Quinn TC, Thomas DL.
Clinical characterization of a competitive PCR assay for quantitative testing of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol*, 34(8), 1975-1979, 1996
- 7) S. M. Bruisten, P. Oudshoorn, P. van Swieten, B. Boeser-Nunnink, P. van Aarle, S. P. Tondreau and H. T. M. Cuypers.
Stability of HIV-1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA-QT. *J Virol Methods*, 67 (2), 199-207, 1997
- 8) Mole L, Margolis D, Carroll R, Todd J, Holodniy M.
Stabilities of quantitative plasma culture for human immunodeficiency virus, RNA, and p24 antigen from samples collected in VACUTAINER CPT and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol*, 32(9), 2212-2215, 1994
- 9) Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, Margolis D, Starkey C, Carroll R, Spahlinger T, Todd J, Jackson JB.
Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol*, 33(6), 1562-1566, 1995
- 10) Griffith BP, Rigsby MO, Garner RB, Gordon MM, Chacko TM.
Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum and plasma subjected to freeze-thaw cycles. *J Clin Microbiol*, 35(12), 3288-3291, 1997
- 11) Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C.
Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol*, 36(2), 493-498, 1998
- 12) Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, Mulligan G, Witt D, Romano JW, Cronin M, Carroll R.
Effects of specimen collection, processing , and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol*, 35(11), 2886-2893, 1997
- 13) Dickover RE, Herman SA, Saddiq K, Wafer D, Dillon M, Bryson YJ.
Optimization of specimen- handling procedures for accurate quantitation of levels of human immunodeficiency virus RNA in plasma by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 36 (4), 1070-1073, 1998
- 14) 吉澤浩司 他.
in - vitro で定量されるC型肝炎ウイルス量 (HCV RNA 量 copy/ml) とチンパンジー感染価 (CID/ml) との関係確定のための実験的研究。厚生科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) C型肝炎の自然経過および介入による影響等の評価を含む疫学的研究 平成 14 年度報告書. 81-89, 2003.

表-1 -80℃凍結～37℃温浴融解操作後の血漿中の HCV RNA の定量結果

凍結融解数	HCV RNA 量 copies/ml (Taqman PCR)	HCV RNA 量 copies/ml (AMPLICOR HCV MONITOR V.2.0)
1回	7.0×10^6	2.10×10^6
2回	7.3×10^6	1.84×10^6
3回	5.1×10^6	2.17×10^6
4回	7.9×10^6	1.41×10^6
5回	5.6×10^6	1.40×10^6
6回	3.9×10^6	1.71×10^6
7回	3.1×10^6	2.23×10^6
8回	5.1×10^6	1.70×10^6
9回	6.6×10^6	1.35×10^6
10回	6.2×10^6	2.03×10^6

表-2 -20℃凍結～37℃温浴融解操作後の血漿中の HCV RNA の定量結果

凍結融解数	HCV RNA 量 copies/ml (Taqman PCR)	HCV RNA 量 copies/ml (AMPLICOR HCV MONITOR V.2.0)
1回	6.4×10^6	1.53×10^6
2回	3.7×10^6	1.54×10^6
3回	5.8×10^6	N.T.
4回	8.3×10^6	1.25×10^6
5回	6.1×10^6	1.45×10^6
6回	4.5×10^6	1.48×10^6
7回	4.9×10^6	1.72×10^6
8回	4.8×10^6	1.78×10^6
9回	4.1×10^6	1.07×10^6
10回	6.9×10^6	1.37×10^6

N.T.検体量不足のため、測定せず。

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 ウイルス部）
協力研究者 近藤真規子 嶋 貴子（神奈川県衛生研究所 ウイルス部）
山中烈次（日本赤十字社）

HIV 検査陽性献血液 44 例についてウイルス量(HIV-1RNA 量)を、PCR 法により測定した結果、10,000 以上と比較的血中ウイルス量の高い例が 33 例(75%)と多く、100,000 以上とかなり高い例も 10 例 (23%) あった。また、サブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 91% とその大部分を占めており、東南アジアに多く日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプ A/E は 9% と少なかった。今回の結果では、HIV 検査陽性献血液者検体の中にはサブタイプ B と A/E 以外のサブタイプは見られなかったが、日本の HIV 感染者にも数は少ないながらサブタイプ C,D,E,G,A/C 等の HIV も見出されていることから、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おくことが重要である。

A.目的 現在、日赤の献血液の 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増幅検査(NAT 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 2002 年末までに HIV 抗体検査陰性の 18,152,384 検体について 500 本プール (1997 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、6 検体が陽性であった。また 2002 年の 1 年間の HIV 検査陽性例は 82 例(NAT のみ陽性の 3 例を含む)であった。これら HIV 検査陽性の献血液におけるウイルス量および HIV のタイプと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、2002 年に新たに入手できた HIV 検査陽性の献血液 44 例について HIV 抗体、血中ウイルス量および HIV のタイプ、サブタイプの解析を行った。

B.方法

1. ウイルス量の定量(HIV-RNA 定量)

HIV 検査陽性検体 44 例の血中ウイルス量の定量は、HIV-RNA 定量用キット (アンプリコア HIV-1 モニター) Ver.1.5 を用いた PCR 法で行った。

2. HIV 検査陽性献血液検体の HIV 抗体の解析

HIV 抗体検査陽性献血液について、

HIV-1PA 試薬と HIV-2PA 試薬および WB 試薬とを用いて、HIV-1 抗体と HIV-2 抗体の解析を行った。

3. HIV 検査陽性献血検体のサブタイプの解析

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

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を用いて cDNA を作製した。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

IC462M :

5-GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCT-3

2nd PCR プライマー

KH41 :

5-TCAACTCAACTGCAGTTAAAT-3

C3E :

5-AGAAAAATTCCTCTACAATTAA-3

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)、オートシークエンスー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

HIV 抗体検査で陽性と確認された献血血液 42 例と抗体検査で陰性、NAT 検査で陽性となった献血血液 2 例について解析した。

C. 結果

1. HIV 検査陽性献血血液の HIV 量の測定 (表 1、表 4)

HIV 検査陽性検体 44 例の血中ウイルス量の PCR 法による定量結果を表 1 に示した。

HIV-RNA が検出限界以下であったものが 1 例で、400 コピー/ml から 10,000 コピー/ml が 10 例、10,000 コピー/ml から 100,000/ml が 23 例で、100,000/ml 以上が 10 例で、最高は 370,000 コピー/ml であった。

2. HIV 抗体陽性献血血液の HIV 抗体の解析 (表 1、表 2、表 3、図 1)

HIV 抗体陽性献血血液 42 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 1 例を除いて 100 倍以上であった。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 1 例、64 倍が 3 例、2048 倍が 1 例であった。

これら 5 例の HIV-1 抗体価は 10000 倍以上と非常に高く、また WB-1 と WB-2 のパターンの比較および PCR の結果から、これら 5 例における HIV-2PA 試薬との反応は HIV-1 感染による交差反応であることが確認できた。

2. HIV-1 検査陽性検体のサブタイプの解析 (図 2 A, 図 2 B, 表 5)

RT-PCR で HIV-1env 領域が増幅され塩基配列が決定できた 43 検体につ

いて行った系統樹解析の結果を図2A、図2Bに示した。これら系統樹解析の結果から今回解析した43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の2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40例(93%)と最も多く、サブタイプA/Eは3例(7%)であった。

D. 考察

HIV検査陽性献血血液44例についてウイルス量(HIV-1RNA量)を、PCR法により測定した結果、10,000以上と比較的血中ウイルス量の高い例が33例(75%)と多く、100,000以上とかなり高い例も10例(23%)あった。

HIV抗体陽性の献血血液42例について、HIV-1抗体とHIV-2抗体のPA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-2PA価が32倍以上の検体が5例あり、その1例は2048倍と高力価のHIV-2抗体が検出されたが、WBやPCRの結果からHIV-1感染例であることが確認され、HIV-2PAの反応は交差反応によることが分かった。また、サブタイプ解析の結果、サブタイプBが91%とその大部分を占めており、東南アジアに多く日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプA/Eは9%と少なかった。今回の結果では、HIV検査陽性献血者検体の中にはサブタイプBとA/E以外のサブタイプは見られなかったが、日本のHIV感染者にも数は少ないながらサブタイプC,D,E,G,A/C等のHIVも見出されている。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おくことが重要である。

表1 日赤 HIV 検査陽性検体 PA 価および血中ウイルス量

検体種別	検査 No.	衛研 No.	HIV 検査			
			ジェネティク HIV-1/2 ミックス (Titer) ¹⁾	セロティク HIV-1 (Titer) ¹⁾	セロティク HIV-2 (Titer) ²⁾	HIV-1 RNA (copies/ml)
HIV 抗体 陽性検体	YH 1	GM796	10 ⁴	10 ⁴	—	11,000
	YH 2	GM797	10 ⁴	10 ⁴	64	47,000
	YH 3	GM808	10 ⁴	≧10 ⁵	—	7,400
	YH 4	GM809	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	120,000
	YH 5	GM810	10 ⁴	10 ⁴	—	110,000
	YH 6	GM873	≧10 ⁵	10 ⁴	—	16,000
	YH 7	GM874	10 ⁴	10 ⁴	—	8,200
	YH 8	GM875	≧10 ⁵	10 ⁴	2	180,000
	YH 9	GM876	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	110,000
	YH 10	GM877	10 ⁴	10 ⁴	—	230,000
	YH 11	GM878	10 ⁴	10 ⁴	2048	20,000
	YH 12	GM879	10 ⁴	10 ⁴	—	26,000
	YH 13	GM891	10 ⁴	10 ⁴	—	7,500
	YH 14	GM892	10 ⁴	10 ⁴	—	26,000
	YH 15	GM893	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	7,300
	YH 16	GM894	10 ⁴	10 ⁴	—	3,700
	YH 17	GM895	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	2,900
	YH 18	GM896	≧10 ⁵	≧10 ⁵	64	130,000
	YH 19	GM897	10 ³	10 ³	—	<400
	YH 20	GM898	≧10 ⁵	≧10 ⁵	16	4,500
	YH 21	GM899	10 ⁴	10 ⁴	—	10,000
	YH 22	GM900	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	77,000
	YH 23	GM901	10 ³	10 ³	—	27,000
	YH 24	GM902	≧10 ⁵	≧10 ⁵	—	33,000
	YH 25	GM903	10 ⁴	10 ³	—	130,000
	YH 26	GM904	10 ⁴	≧10 ⁵	—	29,000

	YH 27	GM905	10^3	10^3	—	87,000
	YH 28	GM906	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	—	42,000
	YH 29	GM907	10^4	10^4	—	1,500
	YH 30	GM908	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	8	54,000
	YH 31	GM912	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	—	16,000
	YH 32	GM913	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	32	370,000
	YH 33	GM914	10^3	10^3	—	10,000
	YH 34	GM915	10^4	$\geq 10^5$	—	20,000
	YH 35	GM916	10^4	10^4	—	69,000
	YH 36	GM917	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	64	12,000
	YH 37	GM918	10^4	10^3	—	48,000
	YH 38	GM938	10^4	10^2	—	50,000
	YH 39	GM939	10^3	10^3	—	26,000
	YH 40	GM940	10^4	10^4	—	32,000
	YH 41	GM941	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	—	160,000
	YH 42	GM881-2	128	2	—	3,200
HIV-1 NAT	YH 43	GM787	2	—	—	120,000
陽性検体	YH 44	GM821	2	—	—	2,900

* PA 価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抗体陽性検体42例のPA価分布

A. ジェネディア HIV-1/2 ミックス PA

PA 価	検体数
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	1
$\times 10^3$	5
$\times 10^4$	20
$\geq 10^5$	16
合 計	42

B. セロディア HIV-1

PA 価	検体数
$< 10^1$	1
$\times 10^1$	0
$\times 10^2$	1
$\times 10^3$	7
$\times 10^4$	16
$\geq 10^5$	17
合 計	42

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 価

検査 No.	HIV-2 PA 価	HIV-1/2 PA 価	HIV-1 PA 価
YH 2	$\times 64$	$\times 10^4$	$\times 10^4$
YH 11	$\times 2048$	$\times 10^4$	$\times 10^4$
YH 18	$\times 64$	$>10^5$	$>10^5$
YH 32	$\times 32$	$>10^5$	$>10^5$
YH 36	$\times 64$	$>10^5$	$>10^5$

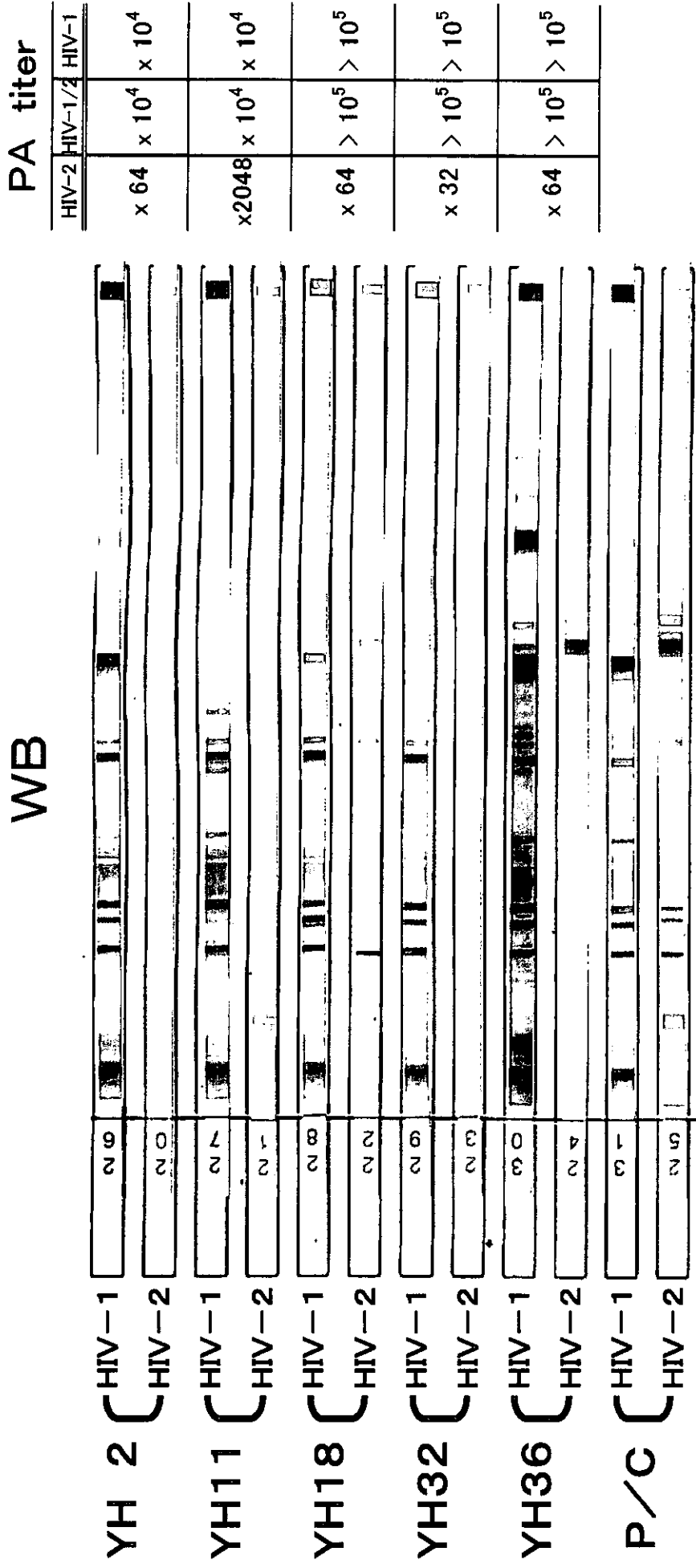
表 4 HIV 検査陽性検体 44 例の血中ウイルス量

RNA 量 (copies/ml)	検体数
400 以下 (標準法、検出限界以下)	1
400~10,000 未満	10
10,000~100,000 未満	23
100,000 以上	10
合 計	44

表 5 献 血 血 液 に お け る HIV - 1 検 査 陽 性
検 体 の サ ブ タ イ プ (2 0 0 2 年)

合 計	HIV-1 サブタイプ (env V3)		
	B	E	PCR陰性
44	40	3	1

図1 HIV-2抗体(HIV-2PA)陽性検体のWBの結果



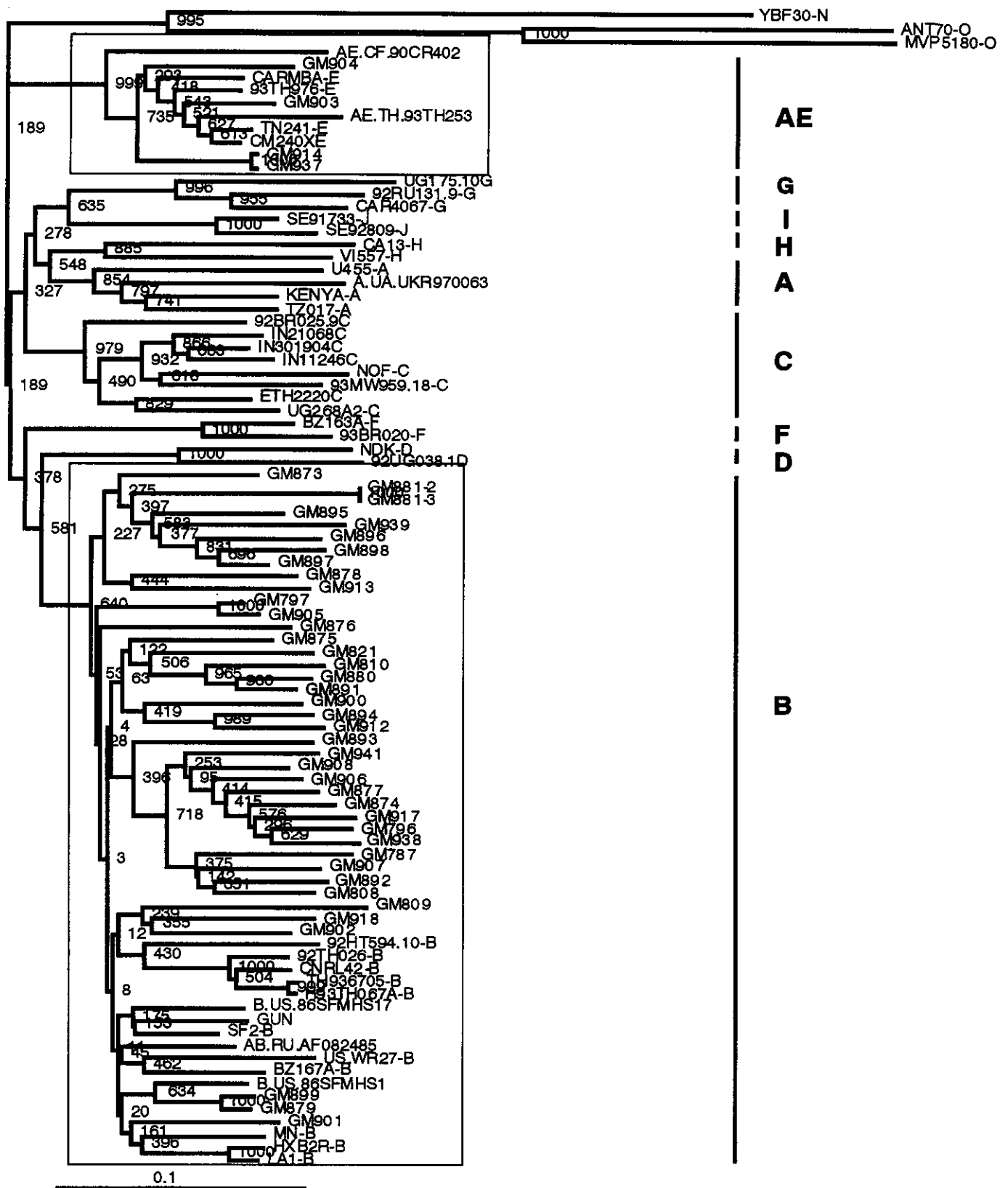
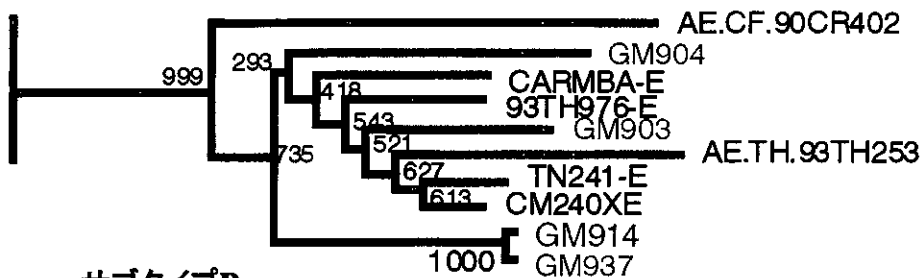


図 2A HIV-1陽性献血血液のサブタイプ
env V3領域の系統樹解析(neighbour-joining法)

サブタイプAE



サブタイプB

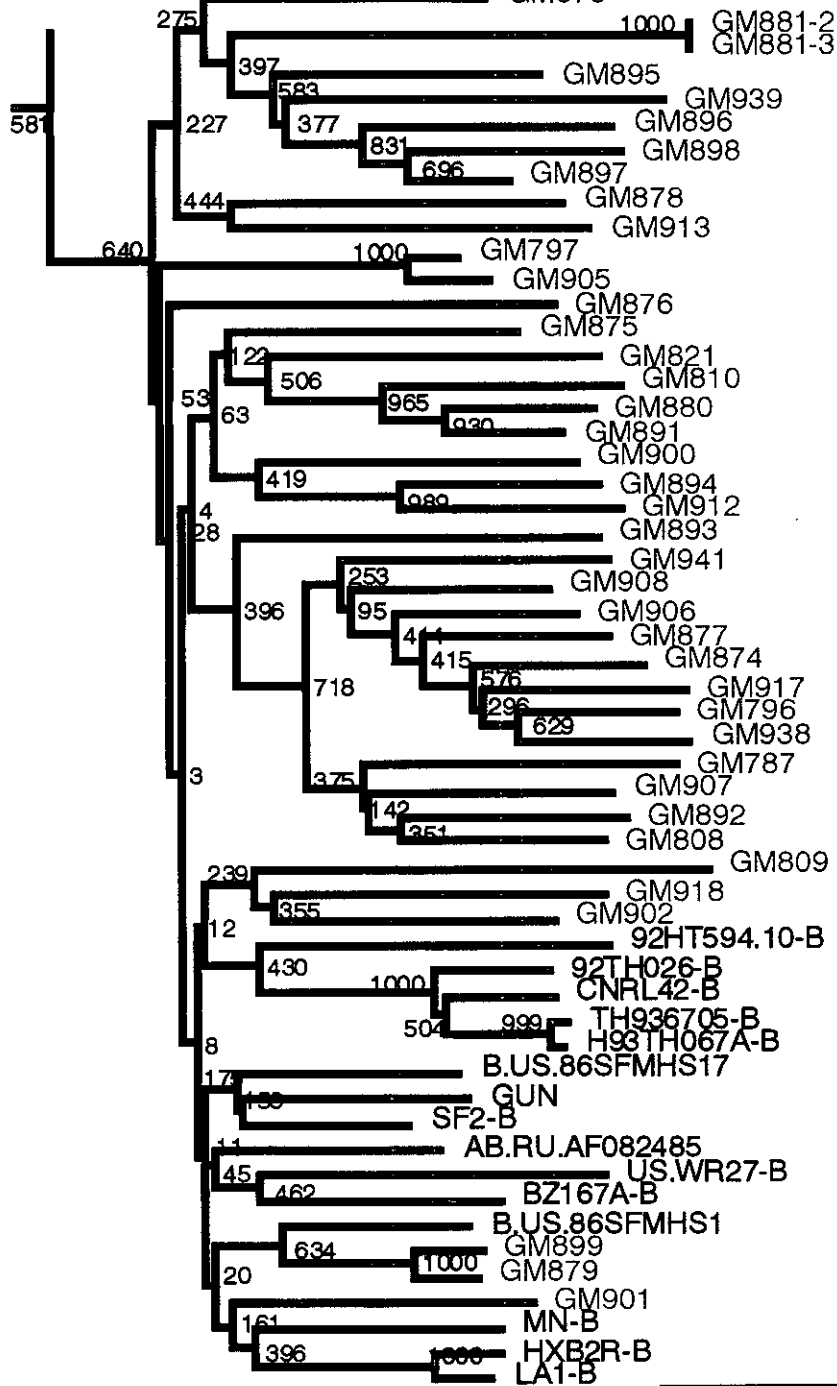


図 2B HIV-1陽性献血血液のサブタイプ

env V3領域の系統樹解析(neighbour-joining法)

サブタイプAE, B拡大

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

血液製剤のウイルス安全性の確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の国際動向に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 岩田明子

要旨

血液製剤のウイルス NAT ガイドライン策定に当たって考慮すべき事項や要素について、関連する文献や EU 及び米国の NAT ガイドラインについて調査研究を行った。その結果、特異性、感度、再現性等をどの様に担保するか、プライマーやプローブをはじめとする用いる試薬・試液の選択基準等、NAT を導入に際して求められる基本的要件は共通していることが明らかになった。

A.研究目的

輸血用血液製剤や血漿分画血液製剤は国民の医療において重要な柱を占めており、その安全性や品質の確保に対する国民の強い要請があるとともに、そのリソースが限られていることから安定供給を計ることも求められている。血液製剤の安全性、特に感染性因子に関する最も大きな関心事は、HBV、HCV、HIV をはじめとするウイルス汚染をいかに検出し、その伝播を防ぐことにある。血液製剤のウイルス安全性確保を目的として、平成 11 年に「血漿血液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」が策定され、また平成 14 年の薬事法改正に基づいて、血液製剤原料基準が策定されようとしている。この血液製剤原料基準において、HBV、HCV、HIV 等のウイルス血清学検査に加えて、HBV、

HCV、HIV の NAT 導入を薬事法で求めることになる。また、安全性技術調査会においても、HBV、HCV、HIV の NAT ガイドラインが検討中である。

そこで本研究では、昨年度に引き続いて血液製剤のウイルス安全性確保を目的とする NAT ガイドラインの策定にあたって各国の動向を調査し、現時点での科学的水準から NAT ガイドラインに取り入れるべき基本的要件を明らかにすることを目的として、欧米の NAT ガイドラインの調査研究を行った。

B.研究方法

主として EU 及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインを調査の対象とし、さらに各国局方等に定められている NAT ガイドライン等も参考にしながら比較検討した。