

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

平成 18-19 年度 総合研究報告書

主任研究者 水落 利明

平成 20 年 3 月

# 目 次

## I. 総合研究報告

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究----- 1

主任研究者：水落 利明

(国立感染症研究所 血液・安全性研究部)

## II. 資料 (NAT コントロールサーベイ組織図および実施要項)

----- 7

## III 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 3 8

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋) ----- 4 2

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
総合研究報告書

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

主任研究者： 水落利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室長

**研究要旨：** 肝炎ウイルスおよび HIV 感染の迅速、高感度、かつ正確な診断は、輸血用血液製剤の安全性を確保するための最重要課題である。本研究班は、そのようなウイルス混入に対する血清学的検査法および遺伝子検出法の性能評価および最適化を検討する目的で構成された。肝炎ウイルスおよび HIV には様々な遺伝子型(genotype, subtype)が存在することから、現在国内で承認を受け販売されている血清学的診断キットがそのような遺伝子型の異なった抗原 (HBsAg, HCV core Ag, HIV gag p24 Ag) を遺漏なく検出できるかについて検討した。その結果 (1) HBs 抗原検出キットにおいては、HBV genotype (A-H の 8 種類)のの違いによって各測定キットの測定値に大きく影響することはなかった。(2) HCV コア抗原検出キットにおいては、ある特定の genotype を持つ HCV に由来するコア抗原の検出感度が低いキットが見つかり、その原因が 1 カ所のアミノ酸残基の違いに起因することが明らかになった。(3) HIV 抗原/抗体同時測定キットに関しては、様々な subtype の感染性分子クローン由来 HIV-1 p24 抗原が、HIV-1 抗原検出キットの性能検査および品質管理において極めて有用な標準品となることを示した。

遺伝子検出法に関しては、その精度管理の観点から、NAT (遺伝子増幅法) 検査のコントロールサーベイを実施することが薬事・食品衛生審議会血液特別部会安全性調査会の指示により決定したことを受けて、HBV-NAT および HCV-NAT を対象としたコントロールサーベイを血漿分画製剤の国内製造販売業者及び輸入販売業者の海外製造元、さらには HCV-NAT を実施している国内民間衛生検査所を対象にして実施した。その結果、HBV-NAT および HCV-NAT については、全ての施設の全ての試験法において、ガイドラインで定められた目標検出感度 (100IU/mL) を満たしていることが明らかになった。

[分担研究者]

平成18年度および平成19年度

水沢左衛子（感染研・血液・安全性研究部・主任研究官）

鈴木 哲朗（感染研・ウイルス第2部・室長）

巽 正志（感染研・エイズ研究センター・室長）

## A. 研究目的

輸血用血液製剤における肝炎ウイルスおよび HIV 混入のリスクを出来る限り少なくするためには、感度・特異性に優れた血清学的（抗原検出）および遺伝子検出（NAT）検査法が必須である。現在承認を受け使用されている各キットの性能を比較検討することは、特にウイルスの遺伝子多型（genotype や subtype）を考慮した場合に非常に重要である。本研究では、リコンビナント抗原を含め、性状の明らかなパネル検体を作成し、それらを用いてのウイルス抗原（HBsAg, HCV core Ag, HIV gag p24 Ag）検出用体外診断キットの性能評価を行なうことを目的とした。また遺伝子検出法については、血漿分画製剤の国内製造業者および輸入販売業者の製造元と、民間の衛生検査所で実施しているウイルス遺伝子（HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA）検出を対象とした NAT（遺伝子増幅法）検査のコントロールサーベイ実施を目的とした。

## B. 研究方法

1) HCV コア抗原検出用キットの評価：HCV 遺伝子型 1a (H77c)、1b (NIHJ1)、2a (JFH-1) 株の全長遺伝子を組み込んだプラスミドを鋳型として、コア蛋白領域の PCR を行い、動物細胞発現ベクター pCAGGS ヘサブクローン化した。PCR プライマーに FLAG エピトープタグ配列を

デザインし、コア蛋白の N 末端に FLAG タグが付加した FLAG-コア融合蛋白発現ベクターを構築した。一方、HCV 遺伝子型 2b また 3a を持つ肝炎患者血清からトータル RNA を抽出し RT-PCR によりコア蛋白遺伝子を増幅した。クローン化し HCV 遺伝子配列を確認した後、上記と同様に、FLAG タグ配列を含む PCR プライマーを使って増幅し、pCAGGS ヘサブクローン化し、FLAG-コア融合蛋白発現ベクターを作製した。

各発現ベクターをヒト胎児性腎臓細胞株 293T へトランスフェクションし、48 時間後に NP40 含バッファーにより細胞ライセートを調製した。融合蛋白の発現は抗 FLAG 抗体及び抗コア抗体による western blot 法にて解析した。そして細胞ライセート中のコア蛋白抗原量をラジオイムノアッセイ (RIA) 法及び蛍光酵素抗体 (FEIA) 法を用いて定量的に測定した。

以上のようにして作成した様々な genotype 由来 HCV コア抗原を用いてコア抗原検出用体外診断薬の評価を行った。その結果、2a 型コア蛋白は、FEIA 法では RIA 法と比較した場合、他の遺伝子型コア蛋白に比べ 1/4~1/14 の低値しか示さなかったことから、コア抗原検出キットによっては遺伝子型間/株間で検出感度が異なる可能性が示唆された。そこでこれら genotype に起因するアミノ酸残基

の多様性がコア蛋白検出の感度に影響するかどうかを明らかにするため、2a 型 (JFH-1 株) の T48A 変異体、1b 型 (NIHJ1 株) の N110T 変異体を作製し各野生型コア蛋白と比較解析を行った。

2) 種々の HIV-1 感染性分子クローン由来 HIV-1 p24 抗原を用いた抗原検出キットの性能評価: HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は HIV 感染価測定系 Indicator 細胞である MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系により行った。末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルスを直接感染させた MAGIC-5A 細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。完全長 DNA クローン作製の戦略は患者ウイルスの RT-PCR 法によって得られていた pol 領域における Rare cutter の制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で HIV-1 genome pol 下流領域を増幅し pMT1 に組込み、pol 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組込み全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に transfection しその培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。

現在までに樹立した HIV 感染性分子クローンのうち世界での流行状況と国内感

染者での subtype 分布を踏まえて subtype A, B, C, D 及び G と、流行組換え体 CRF01\_AE、CRF02\_AG 及び BF 組換え体から合計 32 クローンを選定した。各感染性分子クローンを transfection し 2 日間培養して回収し、TritonX-100 で可溶化した HIV-1 virion 全体の抗原液中における p24 gag 抗原量を「ルミパルス HIV-1 p24」キット (富士レビオ) で測定し抗原原液とした。現在国内で市販されている HIV-1 抗原・抗体同時測定キットのメーカーの協力を得てさまざまな subtype 由来の抗原を測定した。さらには欧州で事実上 HIV-1 p24 gag 抗原測定 のデフォルトアッセイとされる「HIV-1 p24 INNOTEST Assay」による測定も、ドイツ Dade-Behring 社研究所の協力を得て同じパネルを送付して測定を依頼した。データを回収後、各キットの抗原検出感度を比較した。

3) NAT コントロールサーベイ: WHO 国際標準品に準拠して作製された HBV-DNA 国内標準品 (genotype C)、および HCV-RNA 国内標準品 (genotype 1 b) を用いて 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 IU/ml の各希釈検体 (分注量 0.7ml) をそれぞれ作製した。そして陰性 (0 IU/ml) 検体を加えた 8 種類の検体によるパネルを作製した。これらのパネル検体 (HBV-DNA, HCV-RNA) を、血漿分画製剤の国内製造販売業者及び輸入販売業者の海外製造元、さらには

HBV-NAT および HCV-NAT を実施している国内民間衛生検査所に配布し、日を変えて3回測定を依頼した。同じ検体の測定は一回に限り、原則として再測定および多重測定は行わないこととした。測定結果を回収後、国立感染症研究所において解析を行なった。

なお、検体の配布は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従った。

### C. 結果

1) HCV 遺伝子型 1a、1b、2a、2b、3a の各コア蛋白発現細胞からなる HCV 抗原パネルを作製した。それらを用いて HCV コア抗原検出キットの性能比較をした結果、HCV コア蛋白抗原アミノ酸配列において、genotype に起因する第48番目のアミノ酸残基の違いにより、キット間での測定感度に相違が見られた。

2) MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」による効率的感染性分子クローン樹立法を様々な subtype/CRF HIV-1 ウイルスに適用して、感染性分子クローン由来の HIV-1 p24 抗原パネルを作成した。このパネルを用いて第4世代 HIV 抗原/抗体同時検出キットの性能を比較したところ、各キット間で HIV-1 p24 抗原検出感度に相違があることが明らかになった。

3) HBV-DNA および HCV-RNA NAT コントロールサーベイの結果から、全ての施設の全ての試験法において、ガイドラ

インで定められた目標検出感度（100IU/mL）を満たしていることが明らかになった。

### D. 考察

1) HCV コア抗原検出キットにおける抗原検出感度の相違について、FEIA 法ではコア蛋白のアミノ酸 48 番が検出感度に影響し、同残基がスレオニンの場合はアラニンの場合に比べて検出感度が有意に低下することが明らかとなった。またアミノ酸 110 番の多様性は検出感度に大きな影響を与えないことが示唆された。より精度を高め、多様性の高い種々の HCV クローンに対応するためには、検出キットにおいて使用する抗コアペプチド抗体を見直すなど改良の余地があるものと思われる。

2) HIV 抗原/抗体同時測定キットの性能比較において明らかになった検出感度の違い、特にある特定の subtype を持つ HIV 抗原検出感度の違いは重要であり、今後は全ての市販キットについて本研究で樹立した感染性分子クローン由来の抗原パネルを用いてコントロールサーベイを実施する必要性が示唆された。

3) NAT 検査のコントロールサーベイ：国内外の血漿分画製剤製造販売業者等と国内の衛生検査所においては、HBV-NAT および HCV-NAT の感度精度管理が適正に行われていることが示された。今後は genotype パネル(HBV,HCV)や subtype

パネル (HIV) を用いたコントロールサーベイを実施して、genotype, subtype 等の相違があっても見逃し無くウイルスを検出できているかについて実情を把握することが必要である。本研究で実施された NAT コントロールサーベイの結果は薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会に報告された。

#### E. 結論

遺伝子多型を網羅するリコンビナント抗原 (HBsAg, HCV core Ag, HIV gag Ag) は抗原検出キットの性能検査に非常に有用であることが示された。またこれらの抗原を用いてキット間で測定感度に違いがあることが明らかになり、今後の抗原検出キット作成において有用な情報を与えることができた。

HBV-NAT および HCV-NAT のコントロールサーベイの結果、全ての施設における全てのキットにおいて目標検出感度 (100IU/mL) を達成していることが示された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

「研究成果の刊行に関する一覧表」参照

##### (2) 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

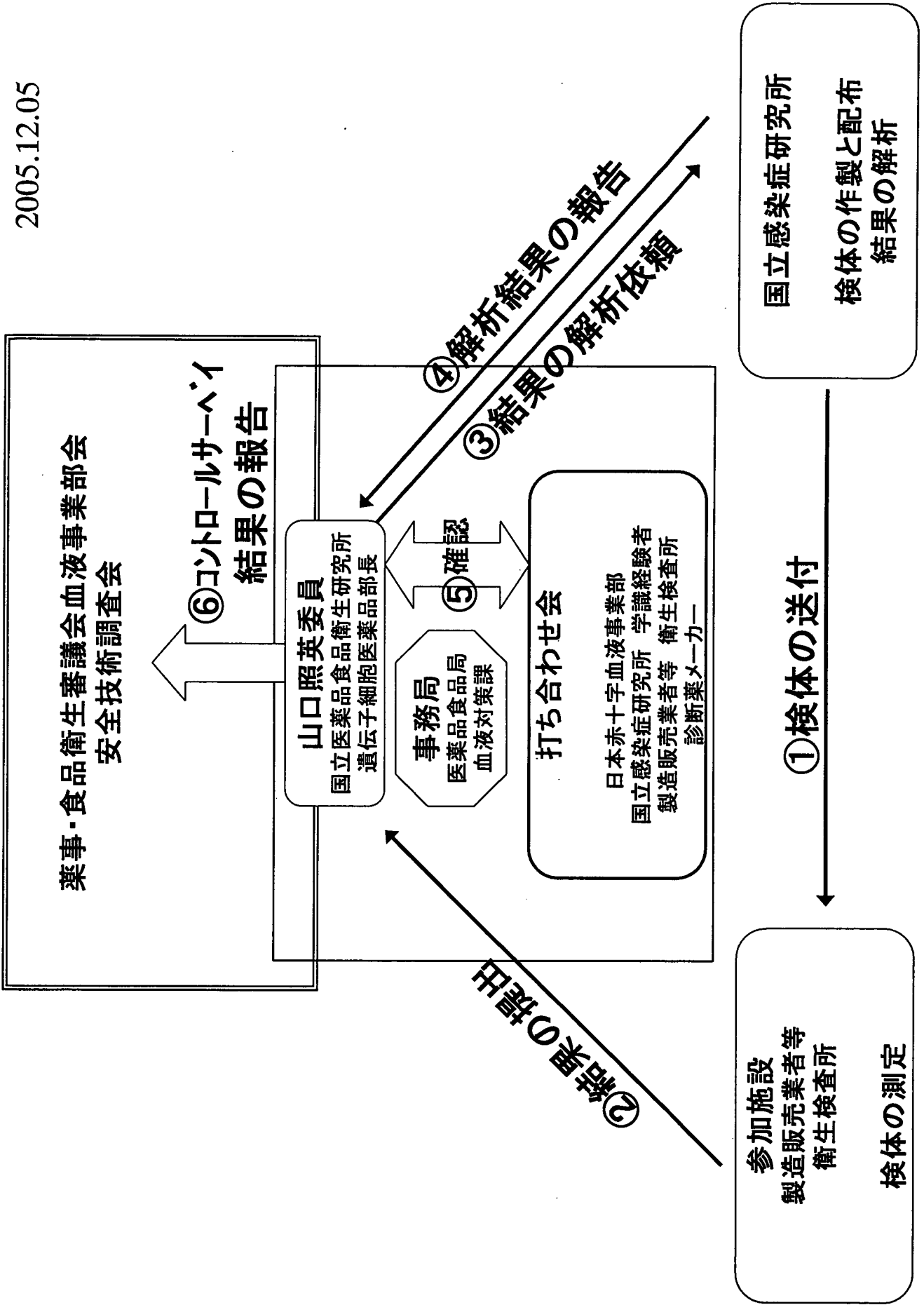
1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし



# 血液製剤の核酸増幅検査(NAT)のコントロールサーベイのフロー(案)

2005.12.05



HBV-NAT 等感染症検査に係るコントロールサーベイ実施打合せ実施要綱（案）

1 参加施設

血漿分画製剤の原料のプールにおける NAT を実施している国内製造業者4社及び輸入販売業者5社の製造元(以下、製造販売業者等という。)並びに HBV-NAT を実施している民間の衛生検査所7社

2 対象とする検査

第1回目は HBV-NAT とし、その後、製造販売業者等は HCV-NAT 及び HIV-NAT を順次対象とする。また、genotype 等のパネル血漿を用いたサーベイに関してもこれらの結果を踏まえて順次実施していく。

3 目的

製造販売業者等においては、HBV 検出感度の目標を4課長通知に基づき100IU/mLとし、各施設が実施している試験が目標を達成していることの確認と実状を明らかにする。

衛生検査所においては、輸血用血液製剤等の安全性を確認する上で各社の感度の現状を把握することは不可欠であり、また、更なる安全性の向上を図るために感度の向上及び統一化を図ることを目的とする。

4 濃度

(1) 検体

HBV-DNA 国内標準品(Genotype C)用いて作製した希釈系列パネルで、次の通り濃度の異なる7検体と陰性血漿1本の8検体からなる。

10000、3000、1000、300、100、30、10 (IU/mL)及び陰性血漿

(2)分注量: 各 0.55mL。

(3)配布

国立感染症研究所から参加施設にブラインド化された検体3セットを送付する。

一回の測定に必要な検体の容量を事前に調査し、0.5mL よりも多量の検体が必要な施設には対応する。

5 測定方法

(1)測定回数

日をかえて3回測定する。検体は測定日ごとに新しいセットを融解し、泡立てぬよう注意しながらピペティングによって攪拌してそのまま測定に用いる。同じ検体の測定は1回限りとし、再測定及び多重測定は行わない。

## (2) 試験法

製造販売業者等は、NATガイドラインに基づいてバリデートされ現に実施している試験法により測定する。

衛生検査所は、輸血前後の検査で現に実施している試験法により測定する。

## (3) 結果の記載方法

ア 試験法が定性試験の場合：陽性/陰性を記載する。

イ 試験法が定量試験の場合：ウイルス濃度を記載する。また、定量性が成立しない範囲であってもシステムコントロールと比較して陽性/陰性の判定が可能な場合は陽性/陰性を記載する。

## 6 結果の提出

各参加機関は、試料を受け取り後50日以内に測定結果を厚生労働省医薬食品局血液対策課に提出する。

※ 測定結果の送付先：〒100-8916 東京都千代田区霞が関1-2-2

厚生労働省医薬食品局血液対策課 課長補佐 中山

## 7 結果の解析

国立感染症研究所において解析する。コントロールサーベイ参加施設のウイルス検出感度を推定することを目的としているので国内標準品作製と同様な統計処理をして各施設の感度を推定する。

## 8 コントロールサーベイ結果の報告

解析結果を本打合会で確認したのち、薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会に報告する。結果を公表する際にはキット名、抽出量、抽出の方法等は参加施設が特定されない範囲内で公開する。参加施設には自身の結果の評価を通知する。

## 9 費用負担

参加費用は徴収しないが、検査試薬等測定に係る費用は参加施設が各自負担する。検体の国内搬送料は第1回目は既存の研究費等で対応する。

なお、海外施設への輸送費用は参加施設の負担とし、方法については別途相談して決定する。

## 10 病原体の取扱い

検体の配布は国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い、バイオセーフティーレベル2実験室又はそれに準じた施設での取扱いが求められる。検体送付に先立ち、参加施設は病原体移動

に必要な書類を国立感染症研究所に提出する(問い合わせ先:国立感染症研究所 血液・安全性研究部 水沢左衛子、メールアドレス mizusawa@nih.go.jp, 電話 042-561-0771)。

#### 11 座長及び事務局

コントロールサーベイの実施は、NAT ガイドライン及び遡及調査ガイドラインに基づき、薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会の指示に基づくものであり、その実施が付託された同調査会委員である山口委員(国立医薬品食品衛生研究所部長)を座長とし、同調査会の事務局である厚生労働省血液対策課を引き続き事務局とする。



## 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 万国際単位/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 万国際単位/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 万国際単位/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 万国際単位/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 万国際単位/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。

○DNA 抽出に 0.5ml 以上試料を用いる研究室は連絡のこと。

連絡先：移動責任者 山口照英 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 電話 03-3700-1141、FAX 03-3707-6950

## 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, 別紙-5 のワープロファイル（MS Word2000）希望者は E-mail で [mizusawa@nih.go.jp](mailto:mizusawa@nih.go.jp)に請求。

○試験法についての問合せ先：岡田義昭、水沢左衛子

～ 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

TEL 042-561-0771、FAX 042-567-7173

E-mail: [okada@nih.go.jp](mailto:okada@nih.go.jp), [mizusawa@nih.go.jp](mailto:mizusawa@nih.go.jp)



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/クロロフォルム抽出。

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/クロロフォルム抽出。

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

試験報告書、結果報告書の返送先：小室勝利

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1,  
国立感染症研究所 安全性研究部  
TEL 042-561-0771、FAX 042-567-2790

## 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	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	稀釈率	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