

図3. BSE感染牛脳乳剤を培養に添加したCMK85-Lの培養上清によるヒトグリオーマ細胞株T98G へのPrP<sup>res</sup>生成能の伝達。ヒトグリオーマ細胞株T98G に感染15日と46日のCMK85-L培養の上清を添加して培養後、毎週2回継代し、図に示す日に細胞を回収してPK80  $\mu$ g/mlで処理した。N1; 非感染T98G細胞を平行して26日間継代培養してPK処理。-PK; 非感染T98GのPK無処理 (PK処理試料の1/50相当の試料を使用)。N2; 異なるバッチの非感染T98GをPK処理。M; ビオチン標識サイズマーカー。(a)SAF70とSAF84を一次抗体として用いた。(b)3F4を一次抗体として用いた。

厚生労働省食品安全確保研究事業（牛海綿状脳症対策研究分野）

「血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からのプリオン除去の研究」

分担研究報告書

異常プリオン発現培養細胞のプリオンタンパク存在様式についての病理学的解析

分担研究者名 永田典代 国立感染症研究所、感染病理部

協力研究者名 岡田義昭 同所、血液・安全性研究部

### 研究要旨

今年度は異常プリオン発現細胞における異常プリオン蛋白の局在について免疫組織学的解析を行った。和歌山で平成 15 年に発生した牛海綿状脳症の牛由来の脳乳剤上清を添加し、培養したヒトグリオーマ細胞 (T98g 細胞)を用いて、まずストレプトアビジン-ビオチン複合 (sABC) 法で検出を試みたところ、非特異反応が高く判断が困難であったため、蛍光抗体法を用いた。抗体は 5 種用いたが、3F4 モノクローナル抗体のみが有用であり、細胞質に顆粒状に抗原が検出された。

### A. 研究目的

本研究班では特に血液へのプリオンの移行を調べることを目的としており、通常の方法よりも高感度な異常プリオンの検出方法が必要である。今年度は岡田らが作製した異常プリオン発現細胞におけるこの蛋白の発現を免疫組織学的に検索し、局在を調べた。

### B. 研究方法

牛海綿状脳症の牛由来の脳乳剤 (BSE 脳乳剤)を添加し培養したヒトグリオーマ細胞 (T98g 細胞)を用い、異常プリオン蛋白抗原の検出を行った。BSE 脳乳剤は平成 15 年 1 月に確認された 6 例目の BSE 牛から作製したもので、国立感染症研究所細胞化学部山河先生から分与された。

感染細胞は BSE 脳乳剤を T98g 細胞培

養液中に添加することで感染させ、8 ヶ月以上継代し、ウエスタンブロットによって持続感染が成立していることが確認されているものを用いた。

ラプテックチャンバースライドに  $1 \times 10^4$  個の細胞を播き、2 日間培養後培養上清を捨て、リン酸緩衝液 PBS(-)で洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド固定を室温 30 分あるいは 4℃一晩行った。1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS で中和後、0.1% Triton X-100 in PBS に 5 分間浸漬した。正常プリオンを除去するために 3M guanidinium thiocyanate in PBS で 5 分間処理し PBS で洗浄した。非特異反応のブロッキングとして 5% 牛血清アルブミン (BSA) in PBS で 30 分間処理後、500 倍希釈した一次抗体と室温 60 分間反応させた。一次抗体として抗プリオン抗体の SAF32, SAF61,

SAF70, PRI308, 3F4 モノクローナル抗体を用いた。0.1% Triton X-100 で洗浄後、抗マウス IgG ウサギ血清を二次抗体として引き続きストレプトアビジンビオチン複合 (sABC) 法を行った(LSAB キット、DAKO, Japan)。あるいは蛍光標識抗体 Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular probes, Netherland) を二次抗体として用い蛍光免疫染色を行った。

### C. 研究結果

sABC 法で検出を試みたところ、非特異反応が高かった。蛍光免疫染色の結果、3F4 モノクローナル抗体で異常プリオン抗原が細胞質に顆粒状に検出された(図)。その検出率は 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。その他の抗体では抗原は検出されなかった。

### D. 考察

用いた細胞からは Western blot 法で異常プリオン陽性であったが、量は少ないと推測されていた。今回の免疫組織化学の結果からも発現量は乏しいことが明らかとなった。今回の方法は Western blot 法の検出結果の再確認として用いることができる。

### E. 結論

培養細胞における BSE 検出の免疫組織化学法を確立した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol.* 2005. 79:4460-9.

2. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol.* 2005. 150:21-36.

3. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol.* 2004. 85:2981-9.

#### 2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS コロナウイルス感染動物モデルの作製。第 93 回日本病理学会総会 (2004 年 6 月札幌)。

2. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、原嶋綾子、佐藤由子、佐多徹太郎。マウス、ラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月横浜)。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

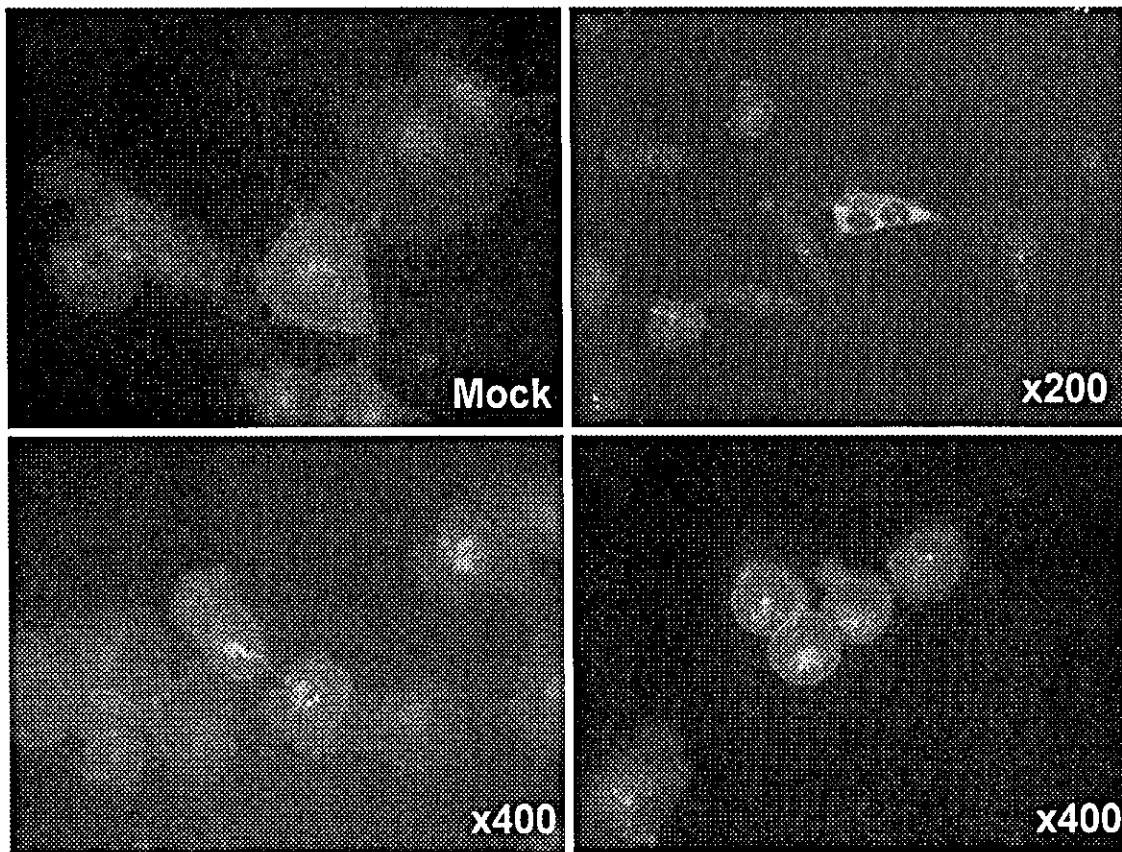


図 BSE 添加後の T98g 細胞における異常プリオン蛋白の発現。細胞質に大小の顆粒状に抗原が検出された（右上、左下）。丸く変性した細胞の細胞質では比較的強く抗原が検出された（右下）。

## 別紙5

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他	血液製剤の安全性確保のための核酸増幅検査（NAT）	臨床検査	第48巻	1125-1130	2004年
岡田義昭	血液と血液製剤の安全性	サークル	第6巻	4-7	2004年

特殊検査

# 血液製剤の安全性確保のための 核酸増幅検査(NAT)

岡田義昭<sup>1)</sup>/水沢左衛子<sup>2)</sup>/種市麻衣子<sup>2)</sup>/  
梅森清子<sup>2)</sup>/斉賀菊江<sup>2)</sup>/小室勝利<sup>3)</sup>

**(SUMMARY)** 血液製剤の安全性確保のために核酸増幅検査が導入され、これまでの血清学的検査では検出できなかった window 期の血液を排除することが可能になった。一方、核酸増幅検査は高感度であるが種々の条件によって感度が影響を受けるため、精度管理のための国際標準品が整備された。〔臨床検査 48:1125-1130, 2004〕

**(KEYWORDS)** 核酸増幅検査, window 期, ミニプール, 残存リスク

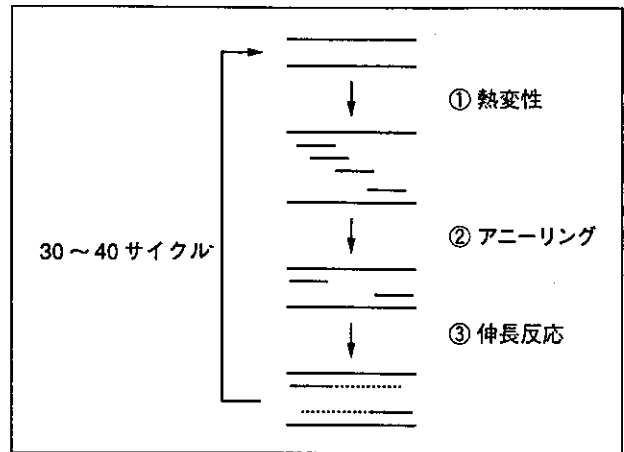


図1 PCR法の原理

## はじめに

核酸増幅検査(nucleic acid amplification testing; NAT)は1980年代の代表的発明と呼ぶに相応しく、生物学ならびに医学分野の発展に大いに貢献し、また今後も貢献は続くものと考えられている。本稿では、特に輸血および血液製剤の安全性確保のために核酸増幅検査は必須なものになっているが、どのように応用され、貢献をしているのか、また感度や特異性などの核酸増幅検査の精度管理について解説したい。

## 核酸増幅検査の原理

核酸増幅検査はPCR法と同一だと思われているが、正確には核酸増幅検査の1つがPCR(polymerase chain reaction)法である。最初は核酸増幅検査といえばPCR法しかなかったが、

最近ではDNAを増幅するLAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)やRNAを増やすTMA法(Transcription-Mediated Amplification)などが新たに開発されたので、方法は問わず核酸を増幅する検査は一括して核酸増幅検査(NAT)と呼ばれている。そうはいつても基本的原理はPCR法であるので、その原理を説明する。図1に示すように、ステップ①熱変性：93～95℃に加熱して2本鎖DNAを一本鎖にする。ステップ②アニーリング反応：1本鎖になった鋳型DNAとプライマーが結合する。本来鋳型DNAは1本鎖に変性しても穏やかな温度下降によって相補的な配列同士が結合することで元の2本鎖DNAに戻る性質があるが、急激な温度の下降では塩基配列の短いプライマーが先に結合する。しかも鋳型DNAに比してプライマーは多量の分子数が存在するので、相補的な塩基配列によ

1) OKADA Yoshiaki 国立感染症研究所 血液・安全性研究部・室長

2) MIZUSAWA Saeko, TANEICHI Maiko, UMEMORI Kiyoko, SAIGA Kikue 同

3) KOMURO Katsutoshi 同・部長

り結合しやすくなる。プライマーの50%が相補的なDNAと水素結合対を形成し、残りのプライマーが遊離している状態の温度をT<sub>m</sub>値と呼び、通常T<sub>m</sub>値の5°C前後低い温度でアニーリング反応は行われている。アニーリングの温度を高く変えることによって非特異的なシグナルを抑えたり、逆に温度を下げることで鋳型DNAといくつかの塩基配列が異なるプライマーを用いることによって目的の遺伝子を増幅することが可能であったりする。ステップ③伸長反応：Taqポリメラーゼによって鋳型DNAの相補的配列に結合したプライマーがdATP, dGTP, dCTP, dTTPを基質にして5'から3'方向へDNAの合成が行われる。反応温度は通常72°Cである。伸長反応の時間は増幅する核酸の長さによって変わるが、通常の1k以下の場合には1分で行われることが多い。以上のステップ①～③を1サイクルとして30～40サイクル繰り返すことで、目的の遺伝子を約100万倍にまで増幅するといわれている。詳細な条件は用いるキットの添付文書を参照するとよい。

## 血液への核酸増幅検査の導入

通常、ウイルスに感染するとウイルスが増殖し発症するが(なかには感染しても発症しないですむヒトもいる。これを不顕性感染という)、やがてウイルスの感染力を中和してしまう抗体や感染細胞を破壊するCTL(cytotoxic T cell)が体内で作られるとウイルスは体から排除される。しかし、HIVやHCVではウイルスと抗体(この場合の抗体にはウイルス成分に結合できても感染を中和する能力はない)が共存する状態が維持され、持続感染となっている。逆に、これらのウイルスに対する抗体を検査すれば、ウイルスそのものを検出しなくても感染の有無をスクリーニングできることになる。日本においては、HIV-1の抗体スクリーニング検査は1986年から、HCVの抗体検査は1989年から献血のスクリーニング検査に導入された。すでに1972年より導入されていたHBs抗原スクリーニング検査と併せてHBV、HCV、HIVの3つのウイルスに対する血清学的検査が1989年より実施されている<sup>1)</sup>。血清学的

検査法の改良による検出感度向上などによって、日本の輸血後肝炎の発生率は売血時代の50.9%から1995年前後には0.48%までに劇的に減少した<sup>1)</sup>。一方、欧米諸国でも同様な血清学的検査が実施されているが、HIV抗体陰性の血液を輸血された患者がHIVに感染した症例<sup>2)</sup>やHCV抗体陰性の血液によってHCV感染が生じた症例<sup>3)</sup>が報告された。日本においても輸血によるHBVの感染例が報告されている。さらに1994年、米国の某企業がHCV抗体のスクリーニング検査が実施されているHCV抗体陰性の血漿を用いて製造した静注用ヒト免疫グロブリンによって、世界中で約200例のHCV感染者が発生する感染事故が報告された<sup>4)</sup>。最終製品を調査してみると、第2世代のHCV抗体測定キット(第1世代はNS4からNS5にかけてのHCV非構造蛋白を認識する抗体を検出し、第2世代はさらにコア領域に対する抗体を検出できる)を用いたにもかかわらず、25ロット中20ロットから核酸増幅検査によってHCV-RNAが検出された。また、ドイツのPaul-Ehrlich研究所から、第1世代のHCV抗体測定キットを用いてのスクリーニング検査に合格した85件の原料血漿から65件(76%)、第2世代のHCV抗体測定キットでは88件中46件(52%)でHCV-RNAが検出されたとの報告がなされた<sup>5)</sup>。これらの報告が意味することは、感染初期においては抗体出現までに時間を要するため、抗体検出が可能になる時期までウイルス陽性の血液を排除できないことであった。なお、感染してから血清学的検査が陽性になるまでの期間をwindow期という(後ほど解説するが、最近では感染初期において感染を検出できない期間をwindow期と呼ぶので、“血清学的window期”と呼んだほうが適切かもしれない)。このwindow期にある血液からウイルスを見つけだして排除することは、血液製剤の安全性確保の点から重要な問題である。どうしたら検出できるだろうか? 図2に模式的に示すように、HCVやHIVのwindow期のウイルス量は抗体陽性になる前のほうが多く、表1に示すように10<sup>7</sup> gEq/mlに達する場合もある。これを可能にしたのが核酸増幅検査である。少量の検体からでもウイルス遺伝子を増幅できるため、微量なウイルスの混入を検

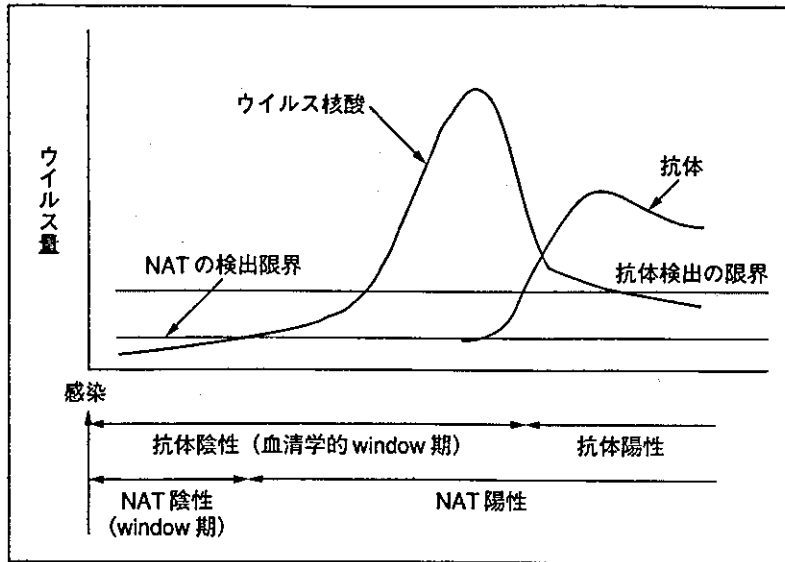


図2 HCV と HIV 感染の window 期

表1 核酸増幅法による window 期の短縮効果

	HIV	HCV	HBV
window 期の期間(日)	22(6~38)	82(54~192)	59(37~87)
核酸増幅法による window 期の短縮(日)	11	59	25
window 期のウイルス量(gEq/ml)	$10^2 \sim 10^7$	$10^5 \sim 10^7$	$10^2 \sim 10^4$
ウイルスの doubling time	10~20 時間	5.8~21 時間	2.56~3.7 日

[文献 6~11) より引用して改変]

出することが可能である。しかし、核酸増幅検査は①血液からの核酸の抽出、②増幅反応、③増幅した目的遺伝子の検出、の3つのステップから成り立っている。どのステップも核酸増幅検査の感度や特異性を確保するために重要である。これらのステップを献血などの一検体ごとに実施することは、時間的にも経済的にも困難であった。しかし、window 期のウイルス量が多いこと、および核酸増幅検査が高感度であることなどから、数十から100前後の検体を混ぜ合わせて検査用検体(ミニプールと呼ばれている)を作り、核酸増幅検査を実施することは可能である。日本をはじめ欧米の国では、この方法が輸血用血液や血漿分画用の原料血漿のスクリーニングに導入されている。ミニプールが陽性に出た場合にはさらに少数の検体でミニプールを作り検査を行い、最終的には陽性血漿を特定し排除している。こうすることで他のウイルスが混入していない血液を破棄することなく使用できる。

## 核酸増幅検査の有効性と限界

核酸増幅検査の導入によって、血清学的検査に比べてどのくらい安全性が向上するのだろうか？ Schreiber らは、表1に示すように核酸増幅検査によってもウイルスを検出できない window 期は、HIV において血清学的検査では平均22日が11日間短縮され、HCV では平均82日が59日間短縮、HBV では平均59日が25日間短縮されることが理論上期待できる、と報告している<sup>9)</sup>。また、この window 期の短縮によってどれくらい血清学的検査をすり抜けたウイルス陽性血を排除可能なのかを検討し、HIV では50%、HCV では72%、HBV では42.4%排除できると報告した<sup>9)</sup>。簡単にいえば、HCV では核酸増幅検査の導入によって輸血(正確には成分製剤)によるHCV 感染は4分の1に減らすことができ、HBV や HIV でも約半分に減少させることが期待できることになる。核酸増幅検査の検出感度が異なる可能性があるため、この報告がそのまま日本に当てはまるとは限らないが、日本赤十字社の



表2 核酸増幅検査のための国際標準品の性状

	HBV	HCV	HIV	B 19	HAV
genotype	A	1	B	—	—
Potency (IU/ml)	1×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>5</sup>
Physical property	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried

[文献13~16)より引用して改変]

報告では2000年2月から2002年5月末までの間に核酸増幅検査によってHBV 247検体、HCV 39検体、HIV 6検体の計292検体からおのおののウイルス遺伝子を検出した<sup>1)</sup>。核酸増幅検査が導入されていなかったら、最悪の場合292人の患者さんが輸血後に感染した可能性があった。

一方、核酸増幅検査の導入によっても図2および表1に示すようにwindow期が存在する。先ほど挙げたwindow期の短縮は個別に核酸増幅検査を実施した場合の短縮可能な期間であって、現在行われている数十人の血液を集めた核酸増幅検査では、ウイルス陽性者の血液が数十倍に希釈されてしまうためwindow期は長くなってしまふ。どれくらい長くなるかはウイルスのdoubling time(ウイルスが2倍に増殖するのに要する時間)に関係し、HCVは5.8~21時間<sup>7)</sup>、HIVは10~20時間<sup>8,9)</sup>と非常に速く増殖するため数日間の延長ですむ。一方、HBVでは2.56~3.7日<sup>10,11)</sup>と増殖が遅いためミニプールを構成する人数の影響を受けやすい。そのため、日本では人口での感染率が欧米に比べて高いこともあって核酸増幅検査によって発見される件数も多いが、検査をすり抜ける可能性の血液もあり、現在でも輸血後のHBV感染が問題となっている。時間と費用の関係で今の時点では個別での核酸増幅検査は困難であるが、個別に実施しても、また、ウイルスの濃縮などによって感度を向上させることは可能だが、window期は短縮されても必ず存在すること、つまり残存リスク(residual risk)が存在することを忘れてはならない。

## 核酸増幅検査のための国際標準品の確立と精度管理

核酸増幅検査は、先ほど述べたように3つのステップから構成されおのおののステップが検出感度に重大な影響を与える。そのため、ウイルス検

出力はこれまでの検査法よりも優れているが、一般の臨床検査として、また、スクリーニング検査として確立するためには感度や特異性などの精度管理が重要な課題である。核酸増幅検査に関して検討され始めたころの1996年に実施されたA型肝炎ウイルス(HAV)の国際共同研究による感度測定を例とすると、この感度試験はHAV陽性血漿を10<sup>-3</sup>から10<sup>-8</sup>まで希釈した7つの検体と陰性コントロール3検体の計10検体から構成されるパネルを12の参加研究機関に送付し、ブラインドで試験を実施した。国際共同研究の特徴として、先ほど述べた核酸増幅検査の3つのステップは各研究機関に任されている。結果は感度の高い研究機関と低いところの間で約100倍の感度の差が認められたが、その一方で、ある濃度の前後に結果が集中することがわかった<sup>12)</sup>。この研究を実施したのはWHO International Working Group on the Standardisation of Gene Amplification Techniques for the Virological Safety Testing of Blood and Blood products(SoGAT)というWHOのワーキンググループである。また、血漿分画製剤は主に米国で採血された血漿を原料に製造され、世界に輸出されている。同様に、核酸増幅検査キットもいくつかの診断薬メーカーが製造し世界に供給されていることから、核酸増幅検査の精度管理のためにはすべての基本となる国際標準品の作成が必要になった。このワーキンググループはHAVでの共同研究と同様の方法を用いて、1997年に核酸増幅検査のためのHCV-RNA国際標準品を確立した<sup>13)</sup>。さらに続いてHBV-DNA<sup>14)</sup>、HIV-1-RNA<sup>15)</sup>、パルボウイルスB 19-DNA<sup>16)</sup>、HAV-RNAなどの国際標準品を確立していった。これらの国際標準品は英国のNIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)が管理し、有料だが購入することができる(www.nibsc.ac.uk)。国際標準品の性状を表2に示す。力価はIU(international

unit)になっている。これまではコピーや gene Equivalent が用いられていたが IU で統一された。核酸増幅検査では国際標準品の候補を  $10^{0.5}$  ずつ希釈して検出可能な最大希釈を統計処理し力価とした(つまり、 $100 \mu\text{l}$  の血漿を  $10^5$  倍まで希釈してもウイルス遺伝子が検出された場合、 $10^6$  IU/ml となる)からである。合成した核酸を用いれば質量からモル数を計算することが可能であるが、血漿中に存在するウイルス核酸はウイルスの構造蛋白内に存在するので抽出効率も考慮する必要性や血漿中に存在するウイルスが単一である保証はないこと、さらに核酸増幅検査は定性試験であることなどから IU は適切な単位と考えられている。また、表 2 をよく見ると genotype の記載がある。HBV, HCV, HIV の 3 つのウイルス (HAV や B 19 においても詳細に解析すれば存在する) は同じウイルスであっても地域や国によって塩基配列が異なるウイルス株が存在し、genotype や subtype と呼ばれている。表 3 に HBV の genotype の分布を示すが、国際標準品は主に欧米から分離される genotype A である。HIV-1 や HCV の国際標準品も同様に欧米に分布している genotype である。また、国際標準品は数千本作成されるが、世界の多くの研究機関や企業などからのリクエストがあるため感度の評価などに十分な量を得ることはできない。そこで、自国に分布する genotype を用いて国内参照品を作る必要がある。その場合、力価は国際標準品と国内標準品の候補とを同時に測定し、相対力価として決定される。日本においても HBV は genotype C, HCV は genotype 1b, HIV は genotype B の国内標準品が作られ、当局の国内標準品としての承認等が得られれば供与を受けることができる。国際標準品や国内標準品を用いることによって、世界の国々がほぼ同じ「ものさし」をもって核酸増幅検査の感度を評価できることになる。なお、核酸増幅検査の感度は、異なる日に独立した希釈でもって核酸増幅検査を実施し評価されるもので、通常 95% の確率で検出できる値が感度になる。つまり、最低でも 20 回の独立した検査で 19 回以上陽性が出るウイルス量が核酸増幅検査の感度となる。診断薬として承認された核酸増幅検査キットには感度が記載されてい

表 3 B 型肝炎ウイルスの genotype と主に検出される地域

genotype	Geographic distribution
A	Northern Europe, USA
B	Eastern Asia, Far East
C	Eastern Asia, Far East
D	Mediterranean area~South Asia
E	Western sub Saharan areas
F	USA, Africa
G	Recently isolated in France and USA

ることが多いが、この値は企業が最高に熟練したスタッフを用いて最適な条件下で実施した場合の感度であると考えべきである。キットを導入した企業等は自分の施設での感度を評価しておく必要がある。すでに EU などでは核酸増幅検査のガイドラインが定められており、品質管理などで核酸増幅検査を用いている場合にはそれに沿った試験の実施が求められている。日本においても同様の核酸増幅検査のガイドラインの整備が進められているので、制定された後には日本のガイドラインに従わなければならない。感度で注意しなければならないことは、genotype や変異株に対しての感度評価である。現在においては航空機の発達によってヒトの移動が活発であり、これまで存在しないタイプの genotype が進入してくる可能性がある。また、HCV や HIV では変異が多いことがすでに知られているが HBV でも血清学的検査に反応しない株も報告されている。診断薬として承認されているキットでは genotype や実際の検体を用いた臨床トライアルを実施し、この点を評価してあることが多い。自分で核酸増幅検査のシステムを作る場合、プライマーはデータベースなどを利用して良く保存されている塩基配列の部分を選択することや、市販されている陽性血漿などを用いて感度を検討することが重要である。

## おわりに

血液製剤のスクリーニング検査として核酸増幅検査が導入され、血清学的検査では検出できなかった感染初期の血液を排除できるようになった。しかし、今の技術をもってしても残存リスクは 0 ではない。また、核酸増幅検査は万能ではなく、血清学的検査を併行して実施することでお互いの

弱点を補い合っこそ安全性が確保されることを忘れてはならない。その証拠に血清学的検査を止めて核酸増幅検査だけにした国はない。

#### 文 献

- 1) 西岡久壽彌：B型肝炎・C型肝炎。病原微生物検出情報 23：163-164, 2002
- 2) Ward JW, Holmberg, SD, Allen JR：Transmission of immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusion screened as negative for HIV antibody. *N Engl J Med* 318：473-478, 1988
- 3) Vrieling H, van der Poel CL, Reesink HW, et al：Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV negative blood transfusion. *Vox Sang* 68：55-56, 1995
- 4) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, et al：Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345：1173-1174, 1995
- 5) Nubling CM, Willkommen H, Lower J：Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345：1174, 1995
- 6) Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, et al：The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 334：1685-1690, 1996
- 7) Nubling CM, Unger G, Chudy M, et al：Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion* 42：1037-1045, 2002
- 8) Little SJ, Mclean AR, Spine CA, et al：Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 190：841-850, 1999
- 9) Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al：Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors：implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17：1871-1879, 2003
- 10) Whalley SA, Murray JM, Brown D, et al：Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* 193：847-854, 2001
- 11) Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al：Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 43：788-798, 2003
- 12) Saldanha J, the HAV Collaborative Study Group：Sensitivity of PCR assay for the determination of hepatitis A virus RNA in plasma pools. *Vox Sang* 76：163-165, 1999
- 13) Saldanha J, Lelie N, Heath A：Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HCV RNA. WHO collaborative study group. *Vox Sang* 76：149-158, 1999
- 14) Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al：An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 80：63-71, 2001
- 15) Holmes H, Davis C, Heath A, et al：An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* 92：141-150, 2001
- 16) Saldanha J, Lelie N, Yu MW, et al：Establishment of the first World Health Organization international standard for human parvovirus B19 nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 82：24-31, 2002

# 血液と血液製剤の安全性

国立感染症研究所血液・安全性研究部室長

おかだ よしあき  
岡田 義昭

## はじめに

1980年代前半の凝固因子製剤によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染によって、血液製剤の危険性が注目され社会問題にまで発展した。この悲惨な事件が起こった当時に比べ、現代の輸血用血液を含めた血液製剤の安全性は比較にならないくらい向上した。これを支えたのは、ウイルス学の進歩による診断法の開発とスクリーニング法への応用、さらに血漿分画製剤におけるウイルス不活化法の開発などがあげられる。今回、医療現場で実際に使用されている血液及び血液製剤の安全性確保について感染症対策を中心に解説する。

## 成分製剤の感染対策

### —ウイルス感染した献血の排除方法

血液製剤というと一般的には血漿分画製剤を意味することが多いが、輸血に用いられる赤血球濃厚液、濃厚血小板製剤、新鮮凍結血漿などの成分製剤と、血漿から作られる血漿分画製剤を総称して、血液製剤と定義される。これらの製剤が製造されるまでのフローを図1に示す。

最初に、問診によって肝炎や輸血等の既往歴、海外への渡航歴、脳外科手術の既往、伝染性紅斑の既往、入れ墨やピアスの有無、不特定多数との性的接触の有無、同性愛の有無等がチェックされる。これによって感染症のリスクを持つ供血者や HIV感染の検査を目的とする供血者からの採血を防止している。

採血された血液は、図1に示すように血清学的検査によ

って各種ウイルス感染の有無が検査される。1999年6月まで日本の輸血用血液は、これらの血清学的検査で陰性の血液が医療機関に供給されていた。しかし、欧米などで、HIV抗体やC型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陰性の血液によってHIVやHCV感染が起こった症例が報告され<sup>1,2)</sup>、血清学的検査だけでは安全性は確保できないことが明らかとなった。

なぜ抗体陰性の血液によってHIVやHCV感染が起こったのだろうか？これは、図2に示すように感染初期においては、ウイルスに感染していてもウイルスに対する抗体が検出されないため、抗体が検出可能になるまではウイルス陽性の血液を見つけだすことができないからである。感染してから抗体陽性になるまでの期間はウインドー期 (window period) と呼ばれている。なお、HIVやHCV感染では、ウイルスに対する抗体にはウイルスの感染性をなくすような中和活性はなく、ウイルスと抗体が共存している。B型肝炎ウイルス (HBV) ではHBs抗原を測定するので、HBVが肝臓で増殖し検出試薬の検出感度を越えなければ陽性とならない。この期間は同様にウインドー期と呼ばれている。

これらの血清学的検査で検出されないウイルス陽性の血液を排除する方法としては、1980年代後半に発明されたPCR (polymerase chain reaction) 法が有効であった。PCR法は分子生物学をはじめ、生命科学の分野に一大貢献をなした (現在もその貢献は続いている) もので、少量の遺伝子断片を一連の反応で約100万倍に増幅することができる方法である。この方法によって抗体陰性の血液からでもウイルスが検出できるようになった。表1に示すように、血清学的ウインドー期はNAT (nucleic acid amplification testing) によって、HBVでは6～15日間、HCVでは41～60

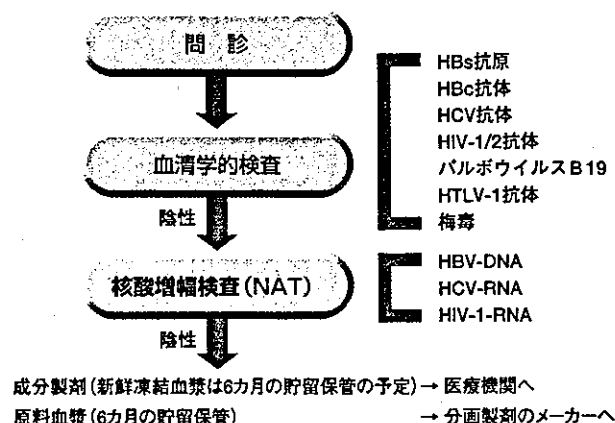


図1 血液の安全性確保のための検査フロー

日間、HIVでは10～15日間、各々短縮できるようになった<sup>4)</sup>。

PCR法は血漿からのウイルス核酸の抽出、遺伝子の増幅、増幅した遺伝子の検出という3つのプロセスによって成り立っているため、多くの検体を短時間で処理することは、技術面だけでなく経済的な面からしても困難であったが、高感度であることを利用して数十から数百の検査用の血液をミックス(これをミニプールと呼んでいる)しウイルス遺伝子の検出を行っている。ミニプールが陽性になった場合はさらに小さい数のプールを作り、最終的には陽性検体を特定する。特定された血液は血液製剤に使用されないように排除される。

なお、PCR法はDNAを増幅するが、その後RNAを増やす方法など、核酸を増幅させる方法が幾つか開発されたので、最近ではNATと呼ばれるようになった(NATは、日本ではナット、欧米ではエヌエイテスティングと発音されている)。

NATは日本を含め欧米では数年前より実施されているが、ミニプールを構成する供血者の数や対象とするウイルスは国によって異なっている(国によっては地域によって異なることもある)。日本においては日本赤十字社がHBV、HCV、HIV-1の3つのウイルスを対象にして、1999年7月からは東京都内で採血された血液、同年10月からは全献血を対象にNATをスクリーニング検査として導入した。1999年7月から2000年1月までは500人のプー

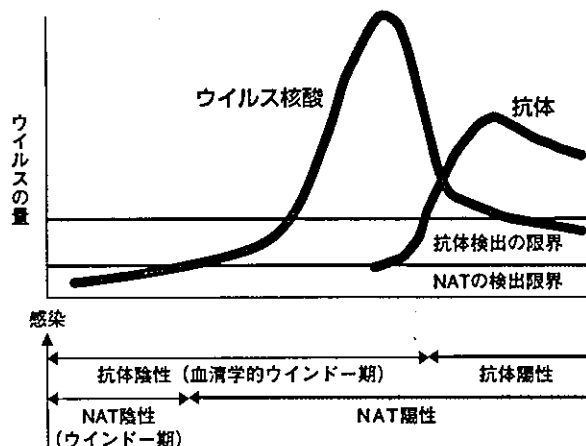


図2 HCVとHIV感染のウインドー期

表1 核酸増幅法によるウインドー期の短縮効果

	HIV	HCV	HBV
ウインドー期の期間(日)	22 (6~38)	82 (54~192)	59 (37~87)
核酸増幅法によるウインドー期の短縮(日)	10~15	41~60	6~15
ウインドー期のウイルス量(gEq/mL)	$10^2 \sim 10^7$	$10^5 \sim 10^7$	$10^2 \sim 10^4$

(文献3、4)より引用改変)

ル、2000年2月から現在までは50人のプールでNATを実施している<sup>5)</sup>。2004年度中にはさらに安全性を向上させるために、50人プールから20人プールへの変更を予定している。2002年5月までに血清学的検査陰性・NAT陽性の検体数は、HBV247件、HCV39件、HIV-1 6件に達し、これらを除外することで感染を未然に防止している<sup>5)</sup>。

一方、50人のプールを作ることによってウイルスの濃度が50倍に希釈され、プールでは陰性だが個別のNATでは陽性を示す例も報告されている。また、受血者が輸血後にB型肝炎になった症例において、個別でのNATでは陰性を示したが、供血者がその後B型肝炎を発症したことから、この供血者から感染したことが判明した例などもある。これらはNATでもウイルス量が少なすぎて検出不可能な期間、NATのウインドー期(最近では、単にウインドー期と呼ばれている)においても感染が成立する量のウイルスが存在することが明らかとなった。現状ではNATを用いても輸血後のウイルス感染を完全には防ぐことができないことを示している(図2)。

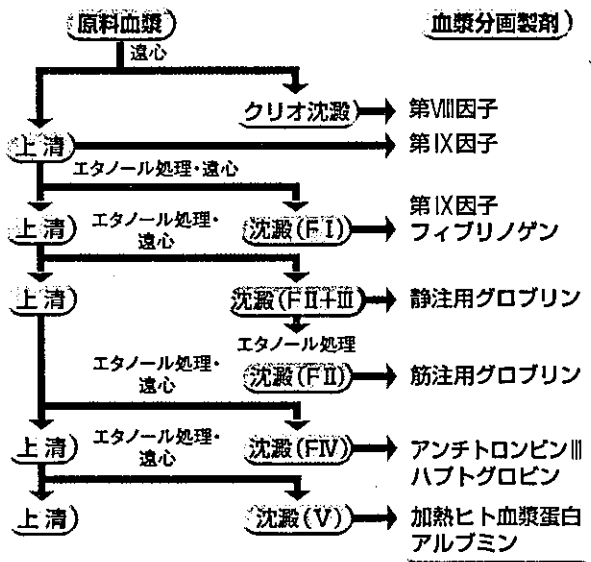


図3 Cohn\*のエタノール分画法と血漿分画製剤  
\*：Edwin J. Cohn.低温エタノール分画法による血漿たんぱくの分画法を開発。

そこで、輸血による感染を早期に発見し、さらなる感染拡大を予防するために、これまで陰性であった献血者が今回の献血でウイルスに感染していること (HBV、HCV、HIV-1、梅毒) が判明した場合や、受血者に感染症が生じた場合、前回を含めて採血された血液で製造された新鮮凍結血漿や原料血漿など、使用されていない血液製剤の回収や、前回の血液製剤を投与された患者の感染の有無等を、過去にさかのぼって調べることも行われ(これを遡及調査という)、そのためのガイドラインが整備された。遡及調査のために、血液製剤に使用された全ての献血の各々の一部が、検査用として10年間保存されている。

## 血漿分画製剤の安全性 —ウイルス除去・不活化法の導入

血漿分画製剤は、抗破傷風人免疫グロブリンや抗HBs人免疫グロブリンなどの特殊免疫グロブリン等を除くと、2,500L前後の原料血漿から図3に示すような工程において、アルコール濃度やpHの違いによって血漿タンパクの溶解度が異なることを利用して、血漿タンパクは分離・粗精製される<sup>6)</sup>。2,500Lの血漿は数万人分の血液に相当(全てが

200mL採血とすると約2万5千人分に相当)するので(成分製剤では10単位輸血しても最大10人の供血者からであるが)、種々のスクリーニング検査をすり抜けたウイルスや、スクリーニング検査を実施していないウイルス、さらには未知のウイルスが原料血漿に混入する可能性は否定できない。

そのため、血漿分画製剤の安全性を確保するために、種々のウイルス除去・不活化法が製造工程に導入されている。代表的な方法として、加熱処理(①乾燥加熱：最終製品としてバイアルに充填し、凍結乾燥後加熱する。65℃で96時間の加熱をしている製剤が多い。②液状加熱：製剤が液体の状態加熱処理する。パストリゼーションとも呼ばれている。60℃で10時間加熱することが多い)、有機溶媒/界面活性剤処理(solvent/detergent処理：S/D処理と呼ばれる。トリ-n-ブチルフォスフェートなどの有機溶媒とTween 80などの界面活性剤を添加してウイルスを不活化する)、ウイルス除去膜処理(国内で製造されるアルブミンを除いた分画製品の大部分)などがある。

ウイルスは、エンベロープと呼ばれる細胞膜に近い組成の脂質の膜を有するウイルス(HBV、HCV、HIVなど)と持たないウイルス(A型肝炎ウイルス、パルボウイルスB19など)に分けられる。アルコール(分画に用いるアルコール処理工程)やS/D処理はエンベロープを持つウイルスの不活化に極めて有効であるが、持たないウイルスに対しては無効である。熱に対してもエンベロープを持たないウイルスは抵抗性を示すことが多い。一般的に、製造所では原理が異なる2つ以上の除去・不活化工程が組み込まれ、工程によってどの程度のウイルスの除去・不活化能力があるのか評価されている(この試験をウイルス・プロセスバリデーション試験という)。工程によって除去・不活化されるウイルスの値をウイルスリダクションファクター(virus reduction factor)といい、エンベロープを持つウイルスではlog<sub>9</sub>(10億分の1)減少させることが求められている。

## 将来への展望

赤血球濃厚液は6週間の保存が可能であるが、エルシニア菌によるエンドトキシンショックを予防するために

3週間の有効期間になっている。また、欧米では血小板製剤の有効期間は5日のため細菌感染が問題になっている。赤血球濃厚液は2~6℃で保存されるために、エルシニア菌などの特殊な菌が増殖するだけだが、血小板製剤は20~24℃で保存されることにより細菌が増殖しやすいためである。日本においては、現行の有効期間は72時間であるために欧米ほどの深刻さはない。しかし、将来的に献血人口の減少などで有効期間の延長が検討されると思われるが、その実現は細菌感染をどうクリアするかにかかっているだろう。これらのことに加えて、NATを用いても輸血後のウイルス感染を完全には防ぐことができないことから、成分製剤においても細菌・ウイルスの不活化法開発は重要な課題である。既にソラーレンやメチレンブルーなどの薬剤が開発され、一部では血小板製剤の細菌やウイルスの不活化に導入している国もある。

また、血漿分画製剤では、エンベロープを持つウイルスに対しては有効な除去・不活化法が開発されているが、エンベロープを持たないウイルスに対しては十分とはいえないので、異常プリオンを含めたさらなる除去・不活化法の開発が期待されている。

#### ◆引用・参考文献

- 1) Ward JW, et al. : Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions screened as negative for HIV antibody. *N Eng J Med* 318 : 473-478, 1988.
- 2) Vrieling H, et al. : Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang* 68 : 55-56, 1995.
- 3) 岡田義昭他：血漿分画製剤の安全性。山本保博監修，アルブミン臨床マニュアル—適正使用の実際。メディカルレビュー社，大阪，2003，191-196.
- 4) Busch MP, et al. : Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious disease. *Transfusion* 40 : 143-159, 2000.
- 5) 西岡他：B型肝炎・C型肝炎。病原微生物検出情報 23(7):163-164, 2002.
- 6) Cohn EJ, et al. : Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 68 : 459-475, 1946.