

Table 2. Overall mean estimates from quantitative and qualitative assays of HEV samples in study to establish a WHO International Standard for HEV RNA NAT-based assays*

Assay type and sample	No.	Mean (95% CI)†	SD	% CV
Quantitative				
1	123	5.58 (5.32–5.85)	0.54	98
2	125	5.60 (5.33–5.87)	0.53	94
1 + 2	248	5.59 (5.33–5.86)	0.55	99
3	124	5.66 (5.40–5.93)	0.45	77
4	125	5.66 (5.40–5.93)	0.44	76
3 + 4	249	5.66 (5.40–5.93)	0.44	76
Qualitative				
1	19	5.25 (5.01–5.50)	0.51	150
2	20	5.26 (4.97–5.56)	0.62	179
1 + 2	39	5.26 (5.08–5.44)	0.56	163
3	20	5.27 (4.90–5.64)	0.79	226
4	20	5.31 (5.02–5.61)	0.64	183
3 + 4	40	5.29 (5.07–5.52)	0.71	202

*Samples 1 and 2, replicate samples of the candidate WHO International Standard; samples 3 and 4, replicate samples of the candidate Japanese national standard. HEV, hepatitis E virus; WHO, World Health Organization; NAT, nucleic acid amplification technique; no., no. dilutions analyzed (in linear range for quantitative assays); % CV, geometric coefficient of variation.

†Values are \log_{10} copies/mL for quantitative and \log_{10} NAT-detectable units/mL for qualitative assays.

dilution was tested for each sample. The data are plotted in histogram form in Figure 3.

The data demonstrate that expressing the results as potencies relative to sample 1 (set as a standard with an assumed unitage of $5.39 \log_{10}$ units/mL) results in a marked improvement in the agreement between the majority of methods and laboratories, as evidenced by the reduction in SDs. Furthermore, these data provide some evidence for commutability of the candidate standard for evaluation of HEV from infected persons, because samples 1 and 2 represent a different strain of HEV compared with samples 3 and 4.

Discussion

In this study, a wide range of quantitative and qualitative assays were used to determine the suitability and evaluate the HEV RNA content of the candidate standards. Although the methods used by the study participants were all developed in-house, most assays consistently detected the 2 HEV strains. On the basis of data from the qualitative and quantitative assays, the candidate WHO IS was estimated to have a potency of $5.39 \log_{10}$ units/mL. For practical purposes, the candidate IS was assigned a unitage of 250,000 International Units (IU)/mL, because the difference in the overall mean for the candidate Japanese national standard was negligible compared with the WHO preparation, the 2 materials were assigned the same value. In the case of the quantitative assays, laboratories reported values in HEV RNA copies/mL. The participating laboratories used plasmid DNA containing HEV sequences, synthetic oligonucleotides, and in vitro-transcribed HEV RNA to control for copy number. In some cases, laboratories used HEV-containing plasma that

had been calibrated against in vitro-transcribed HEV RNA. One laboratory prepared a standard by using stool-derived virus, the titer of which was determined by endpoint dilution and analysis by Poisson distribution. No standard method or common quantitation standard material was used; this fact is reflected in the variation observed for the quantitative results (in the order of $2 \log_{10}$), which were improved by expressing the results against sample 1 as a common standard. For qualitative assays, the variation in NAT-detectable units was $\geq 3 \log_{10}$, and as with quantitative assays, expressing potencies relative to sample 1 improved the agreement among the different laboratories and methods.

Many of the laboratories participating in the study used a real time RT-PCR developed in 2006 (34) that was designed to detect the 4 main genotypes of HEV. However, a recent study in the United Kingdom found a polymorphism in the probe-binding site in several HEV-infected patients who initially had negative test results using this assay (40). A modification of the probe, increasing the melting temperature, restored detection of the polymorphic virus strains. We identified a further polymorphism in an HEV strain (GenBank accession no. JN995566) from a plasma donor (18), located in the probe-binding site of the same assay; use of the modified probe improved the amplification curve for this virus strain (S. Baylis and T. Gärtner, unpub. data). Genetic variation and its potential effects on HEV RNA detection highlight the importance of confirmatory tests of different design, rather than reliance on single methods.

The WHO IS will be valuable for development of secondary standards traceable to the IU, which will facilitate comparison of results between laboratories and

Table 3. Overall mean potencies of samples 2, 3, and 4 relative to sample 1 from quantitative and qualitative analysis of HEV samples in study to establish a WHO International Standard for HEV RNA NAT-based assays*

Sample and assay type	No.	Mean (95% CI)†	SD	% CV
Sample 2				
Quantitative	19	5.46 (5.35–5.58)	0.23	3
Qualitative	13	5.42 (5.38–5.46)	0.07	1
Combined	32	5.45 (5.38–5.51)	0.18	2
Sample 3				
Quantitative	20	5.45 (5.27–5.65)	0.43	5
Qualitative	13	5.48 (5.37–5.59)	0.18	2
Combined	33	5.46 (5.35–5.58)	0.35	4
Sample 4				
Quantitative	20	5.51 (5.38–5.64)	0.29	3
Qualitative	13	5.47 (5.36–5.59)	0.19	2
Combined	33	5.49 (5.41–5.58)	0.25	3

*Mean potency values were determined by assigning a value of $5.39 \log_{10}$ units/mL for sample 1. Samples 1 and 2, replicate samples of the candidate WHO International Standard; samples 3 and 4, replicate samples of the candidate Japanese national standard. HEV, hepatitis E virus; WHO, World Health Organization; NAT, nucleic acid amplification technique; no., no. dilutions analyzed (in linear range for quantitative assays); % CV, geometric coefficient of variation.

†Values are \log_{10} copies/mL for quantitative and \log_{10} NAT technique-detectable units/mL for qualitative assays.

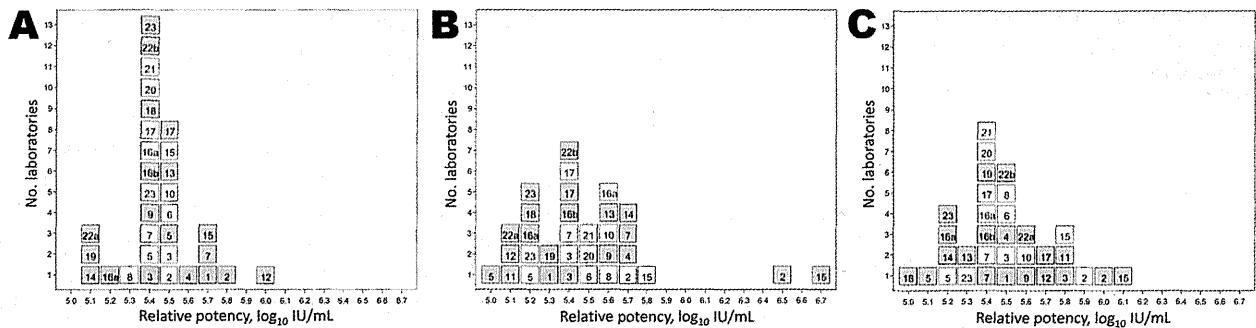


Figure 3. Histograms showing potencies of sample 2 (A), sample 3 (B), and sample 4 (C) compared with sample 1, the candidate World Health Organization International Standard for hepatitis E virus RNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. White indicates quantitative assays (log₁₀ copies/mL); gray indicates qualitative assays (log₁₀ NAT-detectable units/mL). Number of laboratories is indicated on the vertical axis. Laboratory code numbers are indicated in the respective boxes.

determination of assay sensitivities and be helpful for validation purposes. We anticipate that the IS will find application in clinical laboratories, particularly in hepatitis reference laboratories that perform diagnosis and monitor HEV viral loads in chronically infected patients. The IS will also be helpful for research laboratories and blood and plasma centers that implement HEV NAT screening, regulatory agencies and organizations that are working to develop HEV vaccines, and manufacturers of HEV diagnostic kits.

The established WHO IS has been prepared by using a genotype 3a HEV strain. WHO has further endorsed a proposal by the PEI to prepare a genotype panel for HEV for NAT-based assays to continue standardization efforts for detection of this emerging infection. It is intended that the panel will contain representative strains of the 4 main genotypes of HEV that infect humans and notable subgenotypes. A new collaborative study will evaluate the IS against other genotypes and subgenotypes of HEV and investigate the commutability of the IS for standardization of assays for different genotypes of HEV. Laboratories that are able to provide high-titer HEV samples to aid in development of the proposed panel are requested to contact the authors.

In summary, WHO has established a genotype 3a HEV strain as the IS for HEV RNA (code number 6329/10), with an assigned a unitage of 250,000 IU/mL. The WHO IS for HEV RNA is available from PEI (www.pei.de).

Members of the HEV Collaborative Study Group: Akihiro Akaishi, Francesca Bonci, Martijn Bouwknegt, Daniel Candotti, Silvia Dorn, Thomas Gärtner, Yansheng Geng, Samreen Ijaz, Jacques Izopet, Wolfgang Jilg, Marco Kaiser, Shintaro Kamei, Saleem Kamili, Thomas Laue, Li Ma, Francesco Marino, Birgit Meldal, Takao Minagi, Tonya Mixson-Hayden, Elisa Moretti, Andreas Nitsche, Mats Olsson, Anders Olofsson, Giulio Pisani, Saskia Rutjes, James Wai Kuo Shih, Katsuro Shimose, Ko Suzuki, Renata Szypulska, Isabelle Thomas, Youchun Wang, Jürgen Wenzel, and Mei-ying Yu.

Acknowledgments

We thank all the laboratories who took part in the study and Roswitha Kleiber and Christine Hanker-Dusel for technical assistance.

Dr Baylis is a scientist at the Paul-Ehrlich-Institut. Her work focuses on adventitious viruses in biological medicines, particularly with respect to blood and plasma-derived products.

References

- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012;379:2477–88. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7)
- Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med*. 2012;367:1237–44. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1204512>
- Ijaz S, Vyse AJ, Morgan D, Pebody RG, Tedder RS, Brown D. Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J Clin Virol*. 2009;44:272–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.01.005>
- Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP Jr, Thapa GB, Thapa N, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*. 2007;356:895–903. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa061847>
- Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:895–902. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61030-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61030-6)
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*. 2010;202:825–34. <http://dx.doi.org/10.1086/655898>
- Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in south-eastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*. 2011;52:50–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.006>
- Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Identification of hepatitis E virus genotype 3 in shellfish in the United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:2085–7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120924>

9. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*. 2004;44:934–40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03300.x>
10. Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, et al. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*. 2008;48:1368–75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x>
11. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a “nonhyperendemic” country. *Transfus Med*. 2006;16:79–83. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00652.x>
12. Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:648–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1304.061387>
13. Haïm-Boukoba S, Ferey MP, Vétillard AL, Jeblaoui A, Pélissier E, Pelletier G, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a misleading context of autoimmunity and drug-induced toxicity. *J Hepatol*. 2012;57:1374–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.001>
14. Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, et al. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion*. 2008;48:2568–76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01910.x>
15. Guo QS, Yan Q, Xiong JH, Ge SX, Shih JW, Ng MH, et al. Prevalence of hepatitis E virus in Chinese blood donors. *J Clin Microbiol*. 2010;48:317–8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01466-09>
16. Adlhoch C, Kaiser M, Pauli G, Koch J, Meisel H. Indigenous hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sang*. 2009;97:303–8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01211.x>
17. Baylis SA, Koc O, Nick S, Blümel J. Widespread distribution of hepatitis E virus in plasma fractionation pools. *Vox Sang*. 2012;102:182–3. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01527.x>
18. Baylis SA, Gärtner T, Nick S, Ovemyr J, Blümel J. Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States. *Vox Sang*. 2012;103:89–90. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01583.x>
19. Vollmer T, Diekmann J, John R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. A novel approach for the detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2708–13. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01119-12>
20. Corman VM, Drexler JF, Eckerle I, Roth WK, Drosten C, Eis-Hübinger AM. Zoonotic hepatitis E virus strains in German blood donors. *Vox Sang*. 2013;104:179–80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2012.01638.x>
21. Ijaz S, Szyplulka R, Tettmar KI, Kitchen A, Tedder RS. Detection of hepatitis E virus RNA in plasma mini-pools from blood donors in England. *Vox Sang*. 2012;102:272. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01554.x>
22. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger DH, et al. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol*. 2012;56:500–2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.06.021>
23. Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, et al.; Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology*. 2011;141:1665–72. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.051>
24. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzi L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358:811–7. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0706992>
25. Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HG. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl*. 2010;16:474–7.
26. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L, et al. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*. 2010;139:1612–8. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.002>
27. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssière L, et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis E virus infection after organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89:353–60. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c4096c>
28. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol*. 2010;82:799–805. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21656>
29. Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, et al. Serological assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis*. 2010;51:e24–7. <http://dx.doi.org/10.1086/654801>
30. Rossi-Tamisier M, Moal V, Gerolami R, Colson P. Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2013;56:62–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.09.010>
31. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, et al. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE*. 2010;5:e13560. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013560>
32. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology*. 2001;288:203–11. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1093>
33. Lan X, Yang B, Li BY, Yin XP, Li XR, Liu JX. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2304–6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00498-09>
34. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006;131:65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>
35. Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belák S, Widén F. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods*. 2007;146:226–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.014>
36. Baylis SA, Hanschmann KM, Blümel J, Nübling CM; HEV Collaborative Study Group. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1234–9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02578-10>
37. Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, et al. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology*. 2001;287:9–12. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1017>
38. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2731–9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
39. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*. 2006;16:5–36. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.482>
40. Garson JA, Ferns RB, Grant PR, Ijaz S, Nastouli E, Szyplulka R, et al. Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *J Virol Methods*. 2012;186:157–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.027>

Address for correspondence: Sally A. Baylis, Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, 63225 Langen, Germany; email: sally.baylis@pei.de

トピックス

輸血用血液における病原体不活化技術の 現状と新規技術の開発

岡田義昭

検査と技術

第42巻 第1号 別刷
2014年1月1日 発行

医学書院

輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発

国立感染症研究所血液・安全性研究部

おこなよしあき
岡田義昭

はじめに

輸血用血液は、問診に加えて、病原体の血清学検査法とウイルス遺伝子を高感度に検出できる核酸増幅法の導入によって感染症の発生頻度は急激に低下したものの、スクリーニング法の限界や検査が実施されていない病原体などの感染リスクが存在する。そのため、輸血の安全性を確保するための対策として、病原体の不活化法が検討されるようになった。現在のところ、血漿製剤と血小板製剤の病原体不活化法が実用

化され、欧州の一部の国や地域で導入されている。しかし、輸血用血液で最も使用量が多い赤血球製剤では、実用化された方法はない。

本稿では、輸血用血液の不活化法の現状と問題点について述べる。

病原体不活化法の評価法と効果について

不活化法を実施すれば、混入している病原体が全て不活化(感染力を失うこと)できるわけではない。不活化法にはそれぞれ不活化できる限界が存在する。不活化の能力を超えた量の病原体が混入していれば、感染価は減少するものの感染性を有した病原体が存在することになり、受血者の感染につながる。

日本では「不活化」という表現を使用するが、欧米では「低減化：リダクション」という言葉もよく使用されている。不活化効率を、図1に示すように、血液バッグに評価用の病原体を添加し、血液バッグに含まれる感染性を有する総病原体量($T1 \times V1$)を計算する。次に不活化処理後の総病原体量($T2 \times V2$)を計算し、リダクション値 $R = \log(V1 \times T1 / V2 \times T2)$ として求められる¹⁾。

ウイルスの場合、少量でも感染性ウイルスが

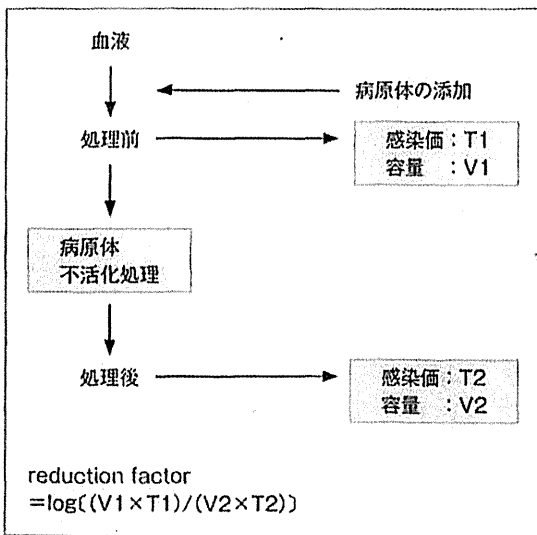


図1 病原体の不活化法の評価

現 埼玉医科大学病院輸血・細胞移植部
〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

表 1 血漿および血小板製剤の不活化法

方法	S/D処理法	メチレンブルー法	アモトサレン法	リボフラビン法	(参考)検査
対象製剤	血漿	血漿	血漿 血小板	血漿 血小板	血漿
製剤を構成する供血者数	多数	単	単	単	単
添加薬剤	界面活性剤	メチレンブルー	アモトサレン	リボフラビン	不要
照射	不要	可視光	紫外線 A 320~400 nm	紫外線 B 265~370 nm	不要
添加薬剤の除去	+	+	+	不要	不要
使用実績	◎	◎	○	△	◎

残存していれば感染する可能性があるため、血液中のウイルス量が少ないウイルスに対しては効果的であるが、ウイルス量が多い感染症に対しては、処理能力の範囲までスクリーニング法などを併用して混入するウイルス量を減らさないと、不活化法単独で完全に病原体の感染を防ぐことは困難である。実際に不活化法を導入している血液センターにおいては、HBV (hepatitis B virus)、HCV (hepatitis C virus)、HIV (human immunodeficiency virus) の3つの血清学的に加えて核酸増幅法も併用している。不活化法の導入でこれら3つのウイルスのスクリーニング検査を止めた施設はない。

以上の記載だけでは、不活化法単独では利用価値がない技術と誤解されるかもしれないが、血小板の細菌感染予防では大いに効果を発揮している。これについては、「血小板の病原体不活化法」の項で後述する。

血漿の病原体不活化法

現在、実用化されている血漿の病原体不活化法には、S/D (solvent/detergent) 処理法、メチレンブルー法、アモトサレン法、リボフラビン法の4つがある²⁾。

S/D 処理法は欧州で主に導入され、数十L~

数百Lの血漿を混ぜ合わせてから、界面活性剤と変性剤を加えて病原体を処理する方法である(一般的にS/Dプラズマと呼ばれている)。S/D 処理法は、エンベロープを有するウイルス(HIV・HBV・HCVなど)に対しては極めて有用な病原体不活化法である。その一方で、エンベロープをもたないウイルス(A型肝炎ウイルス・E型肝炎ウイルス・パルボウイルスB19など)に対しては全く効果はない。

メチレンブルー法やアモトサレン法、リボフラビン法は、個々のバッグに化学物質を添加し、それぞれ可視光、紫外線A、紫外線Bを照射することによって病原体を不活化する方法である。S/D 処理法と異なり、混ぜ合わせることなく個々のバッグで不活化処理できる大きなメリットがある。しかも、エンベロープを有するウイルスだけでなく、エンベロープをもたないウイルスに対しても不活化することができる(ウイルスによって、抵抗性を有して全く不活化できないものや、不活化効率が低いものもある)³⁾。問題点には、添加する化学物質の毒性に懸念があることや、凝固因子などの活性がある程度失活し、低下することであることが挙げられる²⁾。各不活化法の特徴を表1に示す。

参考までに、不活化法のほかに検疫(quarantine)を紹介する。これは、製剤を一定期間保管(わが国では6カ月)し、供血者が次の献血時の検査や問診で問題がないことが確認された場合や、同じ血液から製造された赤血球製剤を投与された受血者から異常の報告がなかった場合に、医療機関に凍結保存されていた血漿を供給する方法である。採血から供給まで長時間を要するが、不活化処理のための化学物質の毒性を考慮する必要はない。

血小体の病原体不活化法

現在、実用化されている方法にはアモトサレン法とリボフラビン法がある(表1)。方法は血漿と同様である。血小板は室温(20~24℃)で震とうしながら保存されるため、その間に細菌が増殖し、致死的な量まで増殖する可能性がある。細菌の混入する原因として、採血時に毛穴に存在する細菌が皮膚の断片と一緒に血液バックに入ることや無症候性の菌血症(健康人であっても口腔内などの菌が血液中に入ることがある)が挙げられる。対策として、最初の血液30 mLを検査用の検体として別のバックに取り、その後の血液を製剤用バックに取る(初流血除去)方法や細菌培養法が実施されている。しかし、初流血除去では、混入頻度は減らせても完全に予防はできない。さらに、無症候性の菌血症には無効である。

一方、細菌培養法では、混入する細菌数が少ないため[1バック当たり10~100 CFU(colony-forming unit)], 偽陰性となることがある。さらに、試験結果が出る前に使用せざるを得ないなど、無菌検査を導入しても細菌の混入を完全には検出することはできない。欧米では、採血日を入れないで有効期間が5~7日間と長い。

さらに、5人前後の供血者の全血からの血小板を1つに集めて血小板製剤を製造しているため、細菌の混入する率が高くなる。一方、日本では採血日を入れて有効期間は4日なので、血小板への細菌感染は欧米に比べて少なく、初流血除去の導入後死亡例は報告されていない。

病原体の不活化が血小板の機能に与える影響は、臨床的に血小板輸血後の血小板増加数(corrected count increment, CCI:1時間後の補正血小板増加数 CCI_{1時間}と24時間後の CCI_{24時間})、血小板輸血回数、赤血球輸血回数・間隔、出血症状などから評価される。血小板の投与は、臨床的には予防的な投与もあることから不活化による機能低下の評価は難しいが、無処理と差はないという報告が多い。また、不活化された血小板輸血によって細菌感染が生じたという報告もない。

赤血球製剤の病原体不活化法

赤血球は輸血のなかで特に使用頻度・量とも多い製剤であるが、実用化された不活化法はない。血漿や血小板に用いられている方法は、化学物質に可視光、または紫外線を照射して病原体の核酸を破壊する方法であるため、赤血球製剤では、赤血球に照射された光が吸収されてしまい、病原体を不活化できる十分な光が病原体に到達しないためである。

近年、光を必要としない新しい不活化法が開発され、本年度フェイズⅢの治験が予定されるころまでになった⁴⁾。この方法は、S-303と呼ばれる quinacrine mustard 類似のアルキル化剤を使用し、アンカー、リンカー、エフェクターの3つの部分から構成されている。アンカーで核酸内に挿入されエフェクターが核酸に結合し核酸の複製を阻害する。添加された薬剤

はリンカー部分で加水分解される。ヘマトクリット 60%でも幅広い病原体を不活化することが可能であるといわれている。この不活化法が実用化されると、3つの輸血用製剤にそれぞれ不活化法が実用化されたことになる。

おわりに

1. 輸血を介する感染症の頻度は急激に低下したが、リスクは0ではない。
2. 病原体(ウイルス)の不活化法には不活化可能な限界があるため、不活化法の導入によってウイルスのスクリーニング検査が全て廃止できるわけではない。
3. 病原体の不活化法によって血漿や血小板の機能は低下する。臨床的に容認できる範囲であることが必要である。
4. 血小板の細菌感染が輸血後感染症の大きな

リスクとなっている国(地域)では、細菌感染予防のために不活化法は有用である。

文献

- 1) 厚生労働省：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について(医薬発第1047号)。1999(<http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/51.html>)
- 2) 厚生労働省：平成20年度薬事・食品衛生審議会血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会資料(平成20年7月23日開催)。(http://www.wam.go.jp/wamappl/bbl1GS20.nsf/vAdmPBigcategory10/DF2636155EEEC8B34925749000295351?OpenDocument)
- 3) Prowse CV : Component pathogen inactivation : a critical review. Vox Sang 104 : 183-199, 2013
- 4) Henschler R, Seifried E, Mufti N : Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates. Transfus Med Hemother 38 : 33-42, 2011

参考文献

- 1) 阿部英樹, 東寛, 池田久實: 輸血用血液製剤のウイルス不活化の現状と課題. 日輸血会誌 51 : 491-506, 2005

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

ここからはじめる研究入門

医療をこころざすあなたへ

First Steps in Research; A Pocketbook for Healthcare Students (Physiotherapy Pocketbooks)

著 Stuart Porter
訳 武田裕子

●B6 頁256 2011年
定価：本体2,500円+税
[ISBN978-4-260-01181-5]

医学・保健医療系学生のレポート/卒論執筆、コ・メディカルのはじめての病棟研究をサポートするやさしい入門書。テーマ設定から文献検索/執筆/発表まで、心の負担を軽く、研究の質を高めます。指導教員との面会の仕方や心構えにはじまり、文献検索や倫理、「サンプルとは何か」「妥当性とは何か」といった基礎事項をカバー。コミカルな図/読みもの調の文体/手ごろな分量で手にとりやすい。ネット世代の学生の参考図書にも。

