

献血血液について日本赤十字社が実施する病原微生物検査に関する技術的情報

核酸増幅検査 (NAT)

	スクリーニング検査	個別検査		
	HBV-DNA・HCV-RNA・HIV-RNA 検査	HBV-DNA 検査	HCV-RNA 検査	HIV-RNA 検査
原理	ウイルス核酸を抽出し TaqManPCR 法にて増幅・検出する。	ウイルス核酸を抽出し TaqManPCR 法にて増幅・検出する。	ウイルス核酸を抽出し TMA 法にて増幅し、HSA 法にて検出する。	ウイルス核酸を抽出し TMA 法にて増幅し、HSA 法にて検出する。
製造元	ロシュダイアグノスティックス	ロシュダイアグノスティックス	カイロン	カイロン
試薬名	TaqScreen MPX	TaqScreen HBV	TMA assay HCV	Procleix Ultrio アッセイ HIV
承認番号			21200AMY00149000	
特異性試験	陰性検体、特異性パネル血漿 (核酸増幅検査 HBV 陽性 (3 例)、HCV 陽性 (3 例)、HIV-1 陽性 (3 例)) について、cobas s401 を用いて核酸抽出・増幅・検出を行うとき、陰性検体は 22 重測定で 22 検体が陰性、特異性パネル各 3 例はすべて陽性と判定される。	陰性検体、特異性パネル血漿 (核酸増幅検査 HBV 陽性 (3 例)) について、cobas s401 を用いて核酸抽出・増幅・検出を行うとき、陰性検体は 22 重測定で 22 検体が陰性、特異性パネル各 3 例はすべて陽性と判定される。	特異性パネル血漿 (HCV-RNA 陽性かつ HCV 抗体陽性、HCV-RNA 陰性かつ HCV 抗体陽性、HCV-RNA 陰性かつ HCV 抗体陰性 各 3 例) について TMA を行うとき、HCV-RNA 陰性検体 (3 例) は陰性、HCV-RNA 陽性検体 (6 例) は陽性と判定される。	特異性パネル血漿 (HIV-1RNA 陽性かつ HIV-1/2 抗体陽性、HIV-1RNA 陰性かつ HIV-1/2 抗体陽性、HIV-1RNA 陰性かつ HIV-1/2 抗体陰性 各 3 例) について TMA を行うとき、HIV-1RNA 陰性検体 (3 例) は陰性、HIV-1RNA 陽性検体 (6 例) は陽性と判定される。
感度試験	感度パネル血漿 (HBV 日赤標準品 (55 IU/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、18 重測定で 18 検体が陽性と判定される。	感度パネル血漿 (HBV 日赤標準品 (55 IU/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、18 重測定で 18 検体が陽性と判定される。	感度パネル血漿 (HCV 日赤標準品 (4620copies/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、24 重測定で 23 検体 (95%) 以上が陽性と判定される。	感度パネル血漿 (HIV 日赤標準品 (1672copies/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、24 重測定で 23 検体 (95%) 以上が陽性と判定される。
	感度パネル血漿 (HCV 日赤標準品 (220 IU/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、18 重測定で 18 検体が陽性と判定される。			
	感度パネル血漿 (HIV 日赤標準品 (2200 IU/mL) を 11 倍希釈した検体) について NAT を行うとき、18 重測定で 18 検体が陽性と判定される。			
同時再現性試験			陰性コントロール、HCV 陽性コントロールについて NAT を 3 重測定で行うとき、同一検体内では全て同一の判定 (陰性および陽性) を示す。	陰性コントロール、HIV-1 陽性コントロールについて TMA を 3 重測定で行うとき、陰性コントロールは全て陰性に、HIV-1 陽性コントロールは全て陽性に判定される。
検出限界	HBV-DNA: 3.2 IU/mL*	2.4 IU/mL*	9.6 IU/mL以下*	19.62 IU/mL*
	HCV-RNA: 12.4 IU/mL*			
	HIV-1 RNA: 41.8 IU/mL* (Group M)			
ウインドウ期間		34日*	23日*	11日*

平成 20 年 11 月現在

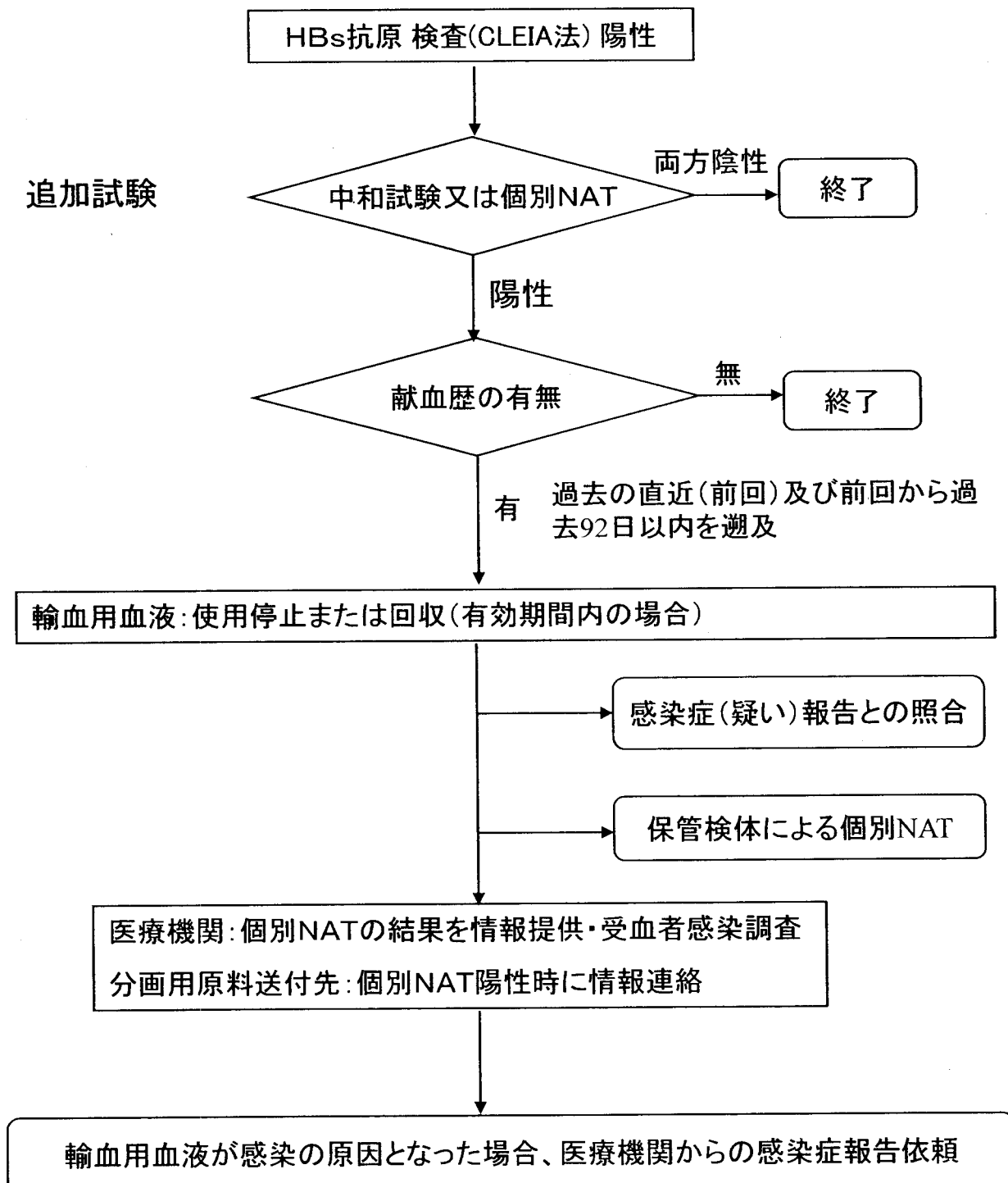
注) 本表の試薬は、輸血用血液製剤のための検査を目的として使用しているものであり、診断を目的としているものではありません。
 ※ Schreiber GB et al. The risk of transfusion-transmitted viral infection. N Engl J Med. 1996; 334: 1685-90.
 * : 個別 NAT におけるデータ

感染症検査の推定ウインドウ期間及び遡及期間

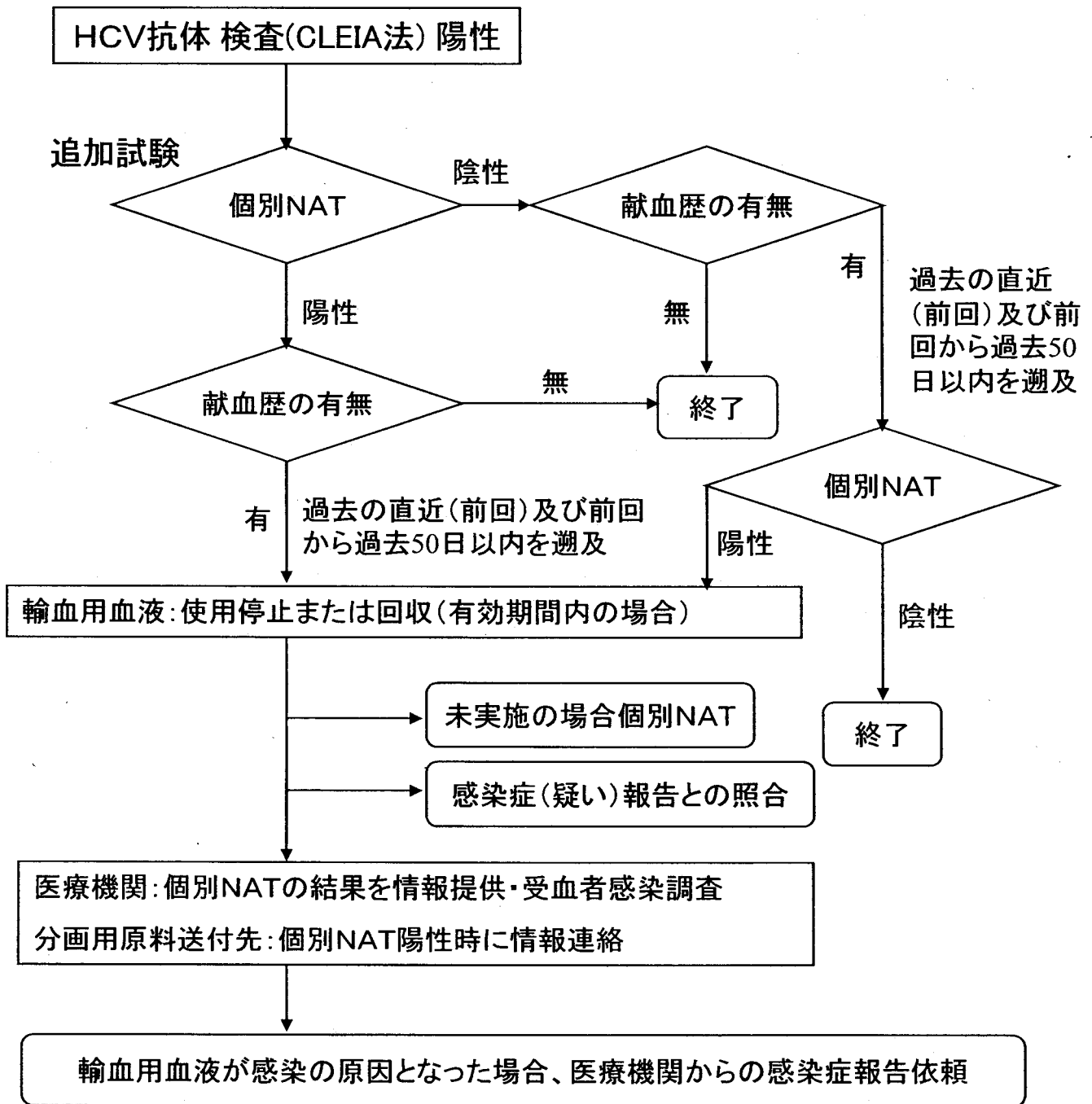
病原体	倍加時間	50(20)倍 増殖時間	個別NAT(+)	50(20)プー ルNAT WP
HBV	2.0日	12(10)日	34日	46(44)日
HCV	0.3日	1.8(1.5)日	23日	24.8(24.5)日
HIV-1	0.5日	3(2.5)日	11日	14(13.5)日

個別NAT(+)時点の日数にウイルスが50倍以上に増殖する日数を加算したものが、50プールNATの検出時期に相当する。その期間未満が50プールNAT WPと推定される。

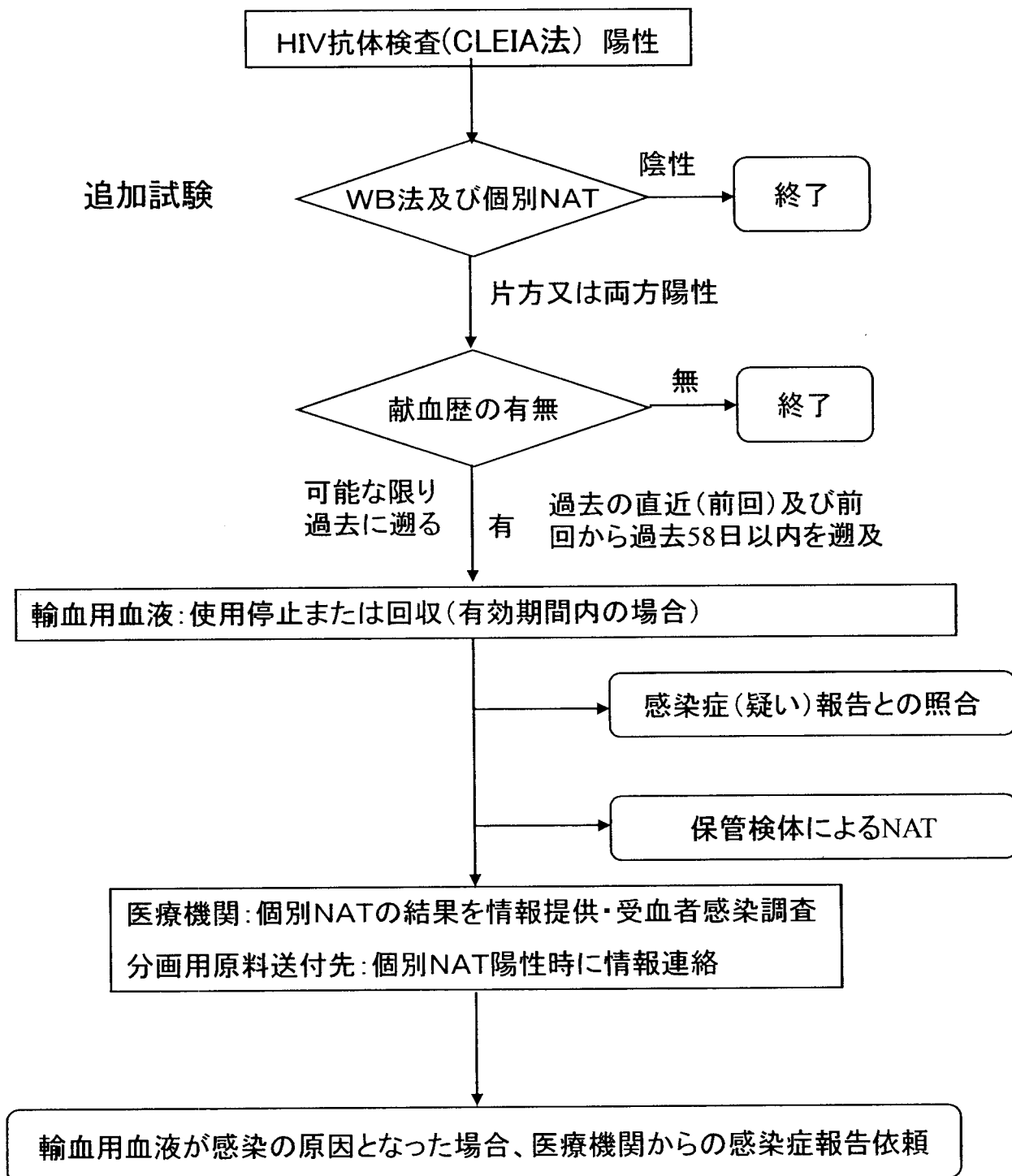
献血者から始まる遡及調査
(HBs抗原陽性〔HBc抗体との重複陽性例を含む〕)



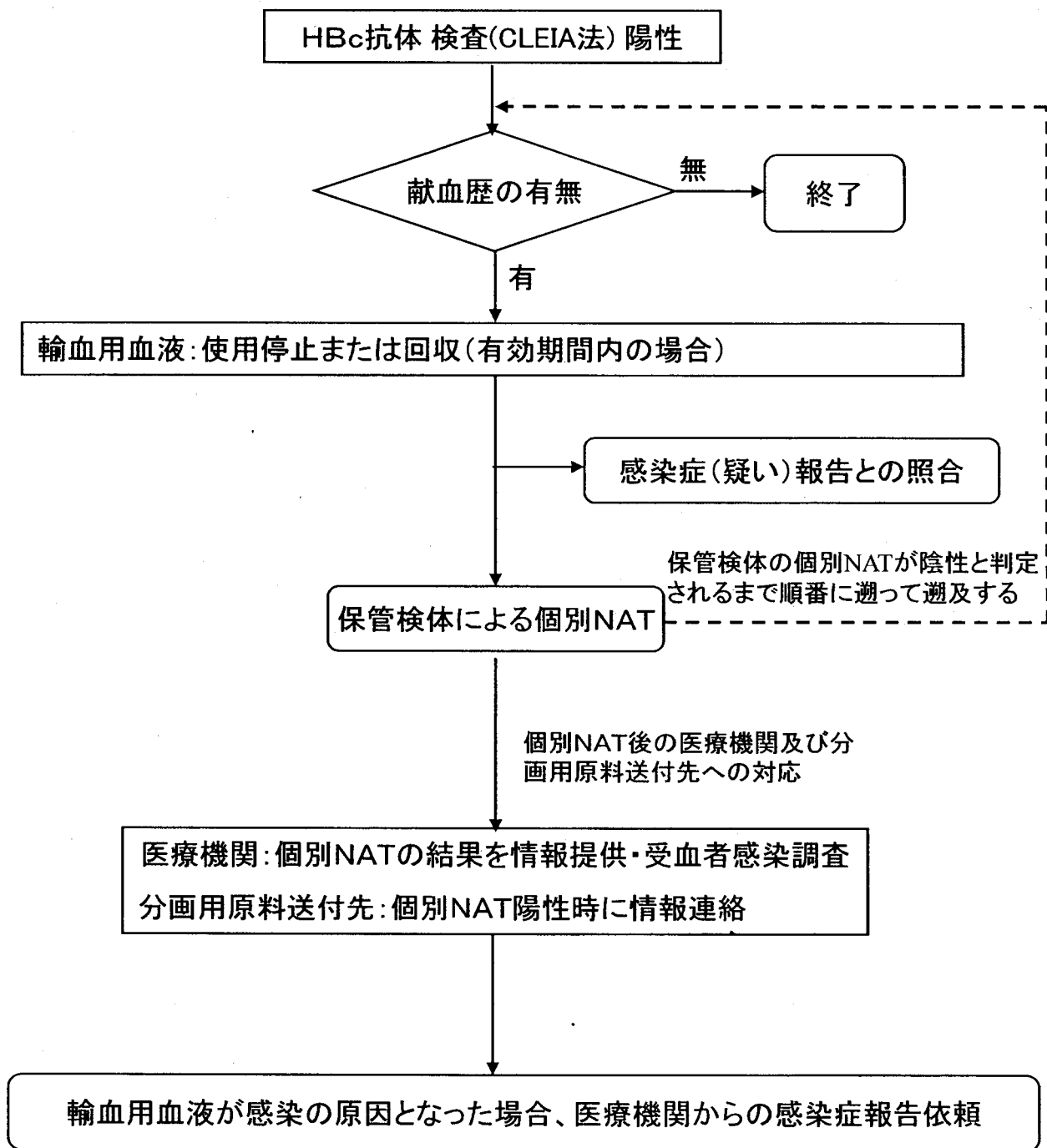
献血者から始まる遡及調査 (HCV抗体陽性)



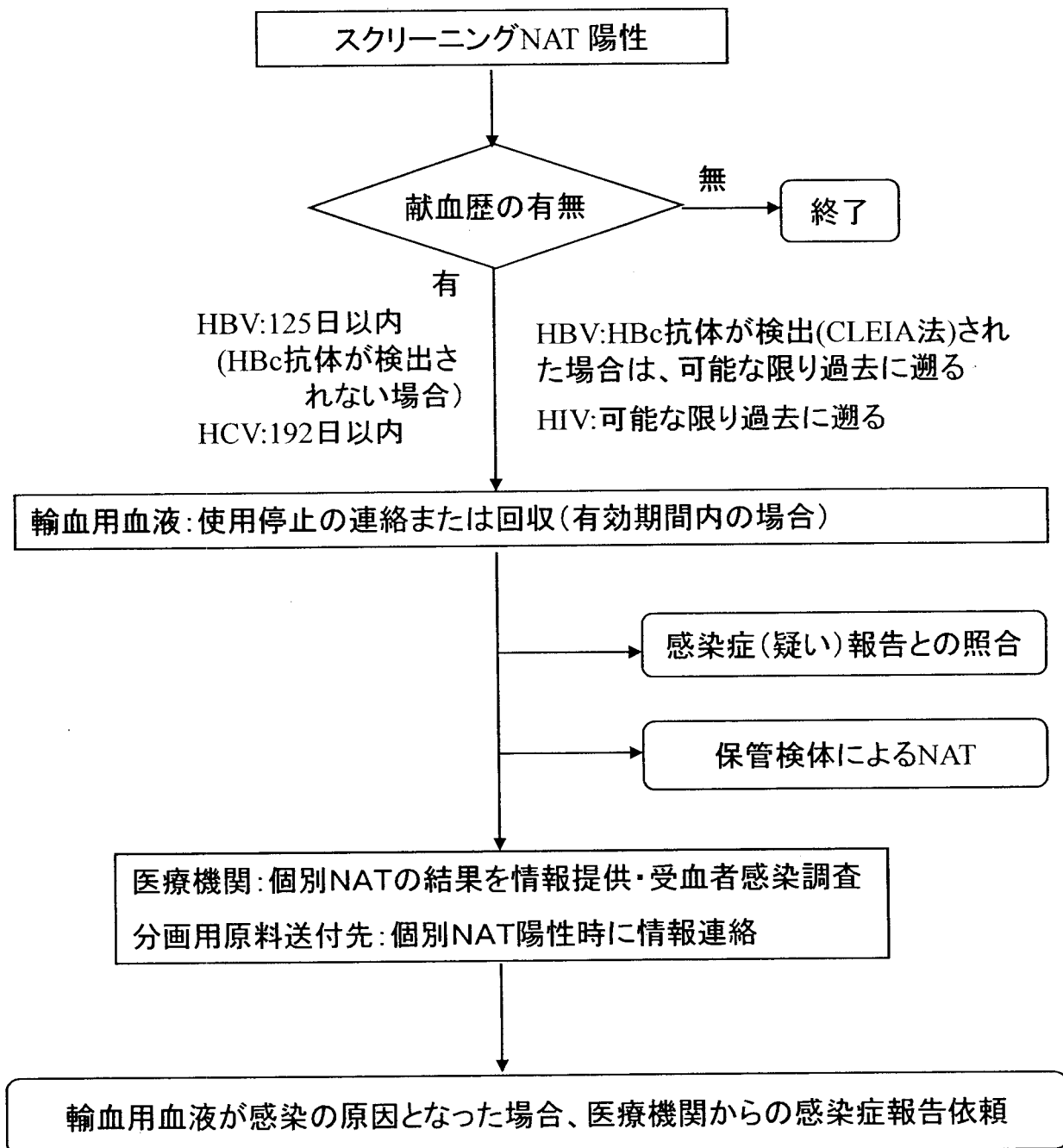
献血者から始まる遡及調査 (HIV抗体 検査陽性)



献血者から始まる遡及調査 (HBc抗体検査 陽性)

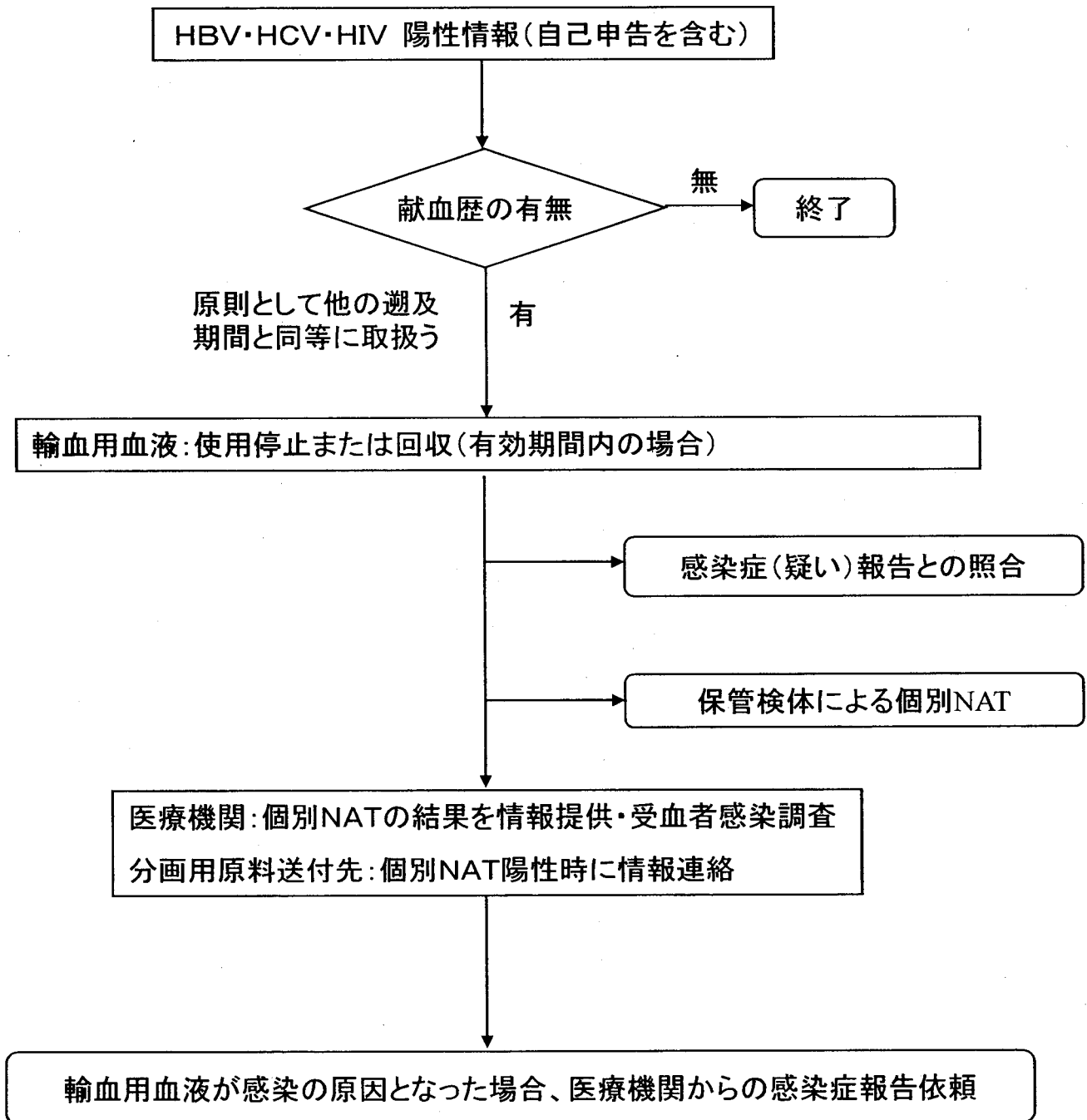


献血者から始まる遡及調査 (スクリーニングNAT陽性)

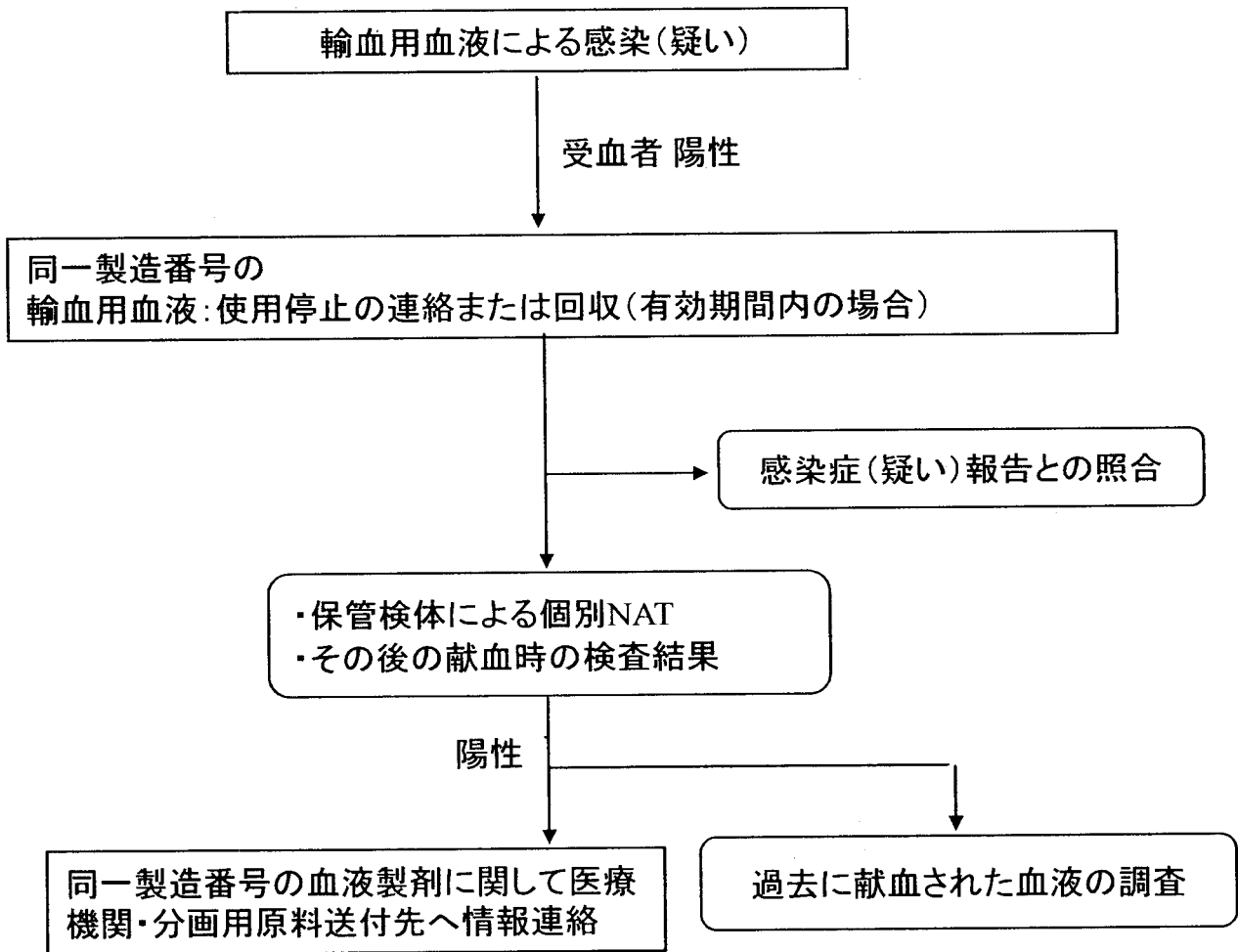


献血者から始まる遡及調査

(献血者等から感染症情報が得られた場合)



医療機関からの感染情報(輸血用血液の使用)
に基づく遡及調査 (HBV・HCV・HIV)



血液製剤等に係る遡及調査ガイドラインQ&A

「基礎知識」編

I B型肝炎ウイルス(HBV)とHBs抗原、HBs抗体、HBc抗体との関係及び核酸増幅検査(NAT)により検出されるHBV DNAとの関係

II C型肝炎ウイルス(HCV)とHCV抗体、HCV抗原との関係及び核酸増幅検査(NAT)により検出されるHCV RNAとの関係

「実施関連の解説」編

III 輸血前後の検査と保管検体について

IV 輸血前後に実施する検査項目とその意義及び血清検体を医療機関が保存しておくべき期間など(B型肝炎ウイルス:HBV)

V 輸血前後に実施する検査項目とその意義及び血清検体を医療機関が保存しておくべき期間など(C型肝炎ウイルス:HCV)

VI 輸血前後に実施する検査項目とその意義及び血清検体を医療機関が保存しておくべき期間など(ヒト免疫不全ウイルス:HIV)

VII 輸血前に実施するそれぞれの検査結果の意義と受血者への対応

VIII 感染の因果関係を解析する手順、結果の判定(診断)など

IX HBV、HCV、HIV関連検査の標準化のためのコントロールサーベイ、その必要性と実施方法など

<予備知識>

1 抗原・抗体

生体には、ウイルスや細菌など、もともと生体の中にはなかったもの(「異物」)が侵入すると、これらの異物に対していろいろな反応を起こす「免疫」という仕組みがあります。生体の中に異物が侵入すると、その仕組みが働いて異物に反応する特殊なタンパク質(免疫グロブリン)が作り出されます

異物に反応する免疫グロブリンを「抗体」といい、生体に侵入した異物を「抗原」といいます。

B型肝炎ウイルス(HBV)について言えば、HBVを構成するタンパク質(HBs抗原、

HBc抗原、HBe抗原)が異物、すなわち「抗原」で、HBVを構成するタンパク質と反応する免疫グロブリンが抗体(HBs抗体、HBc抗体、HBe抗体)にあたります。

2 急性感染・持続感染

病原体が生体の中に侵入し、増殖を始めることを「感染」と呼びます。

生体は感染した病原体に対して免疫反応を起こして、生体から駆逐し、一定期間の後に感染は終了します。このような感染の様式を一過性の感染(急性感染)と呼びます。急性感染のうち、症状が出現する(発病する)場合を「顕性感染」、全く気付かないうちに病原体を駆逐して治ってしまう場合を「不顕性感染」と呼びます。

一方、感染した病原体が駆逐されずに長期間にわたって生体の中に存在し続ける感染様式があり、この様な状態を「持続感染」と呼び、持続感染状態に陥っている人を、その病原体の「持続感染者:キャリア」と呼びます。

キャリアのうち、年余の長期症状が認められない場合を「無症候性キャリア」と呼んでいます。

HBVとHCVの感染には、急性感染と持続感染の2つの感染様式があります。

3 急性B型肝炎の「臨床的治癒」と「ウイルス学的持続感染」

一般に成人が初めてB型肝炎ウイルス(HBV)に感染すると、急性感染の経過をたどって、完全に治癒し、生体は免疫を獲得して再びHBVに感染することはありません。この状態をこのQ&Aでは(急性B型肝炎の)「臨床的治癒」と表現しています。

一般に、HBVの急性感染を経過した人では血中のHBs抗原は消失し、代わってHBs抗体(感染防御抗体)とHBc抗体(感染既往の指標となる抗体)とがほぼ生涯にわたって検出されます。

以上のように、HBVの急性感染を「肝炎という病気の側面」から見た場合、これまでの概念を変更する必要は全くないことは明らかとなっています。

しかし、近年、HBs抗原陰性、HBc抗体陽性のドナー(これまでの概念ではHBVの感染既往と考えられる人)の肝臓を移植された患者(レシピエント)では、HBVの感染が起こることが明らかとなりました。

これを契機に研究が進められた結果、ほとんどのHBc抗体陽性(HBs抗原陰性)の人の肝細胞内にはごく微量のHBVが持続感染しており、これが肝移植後の免疫抑制療法に伴って活性化し、レシピエントがB型肝炎を発症することがわかりました。

また、HBs抗原陰性、HBc抗体陽性の人の血中にはまれにごく微量のHBVが核酸増幅検査(NAT)により検出される場合があり、このような血液の輸血を受けるとHBVに感染することがあることもわかってきました。言い換えると、HBVの急性感染を経過した人のほとんどでは、本人の健康上何ら問題はない(臨床上肝炎は治癒している)ものの肝臓内には、ごく微量のHBVが感染し続けている(ウイルス学的には持続感染状態にある)ことがわかってきました。

4 核酸増幅検査(NAT)によるウイルス濃度の表示

核酸増幅検査(Nucleic acid Amplification Test : NAT(詳しくは I の4を御覧ください。))

により測定した1mL中のウイルスの(核酸)濃度を表示する単位として、国際的にはIU/mL(国際単位)で表示するようになっていきます。

近い将来、日本でもコピー/mLからIU/mLの表示に移行するものと考えられます。

コピー/mLとIU/mLの両者の間及び検体中のウイルス濃度との間には一定の相関関係があります。しかし、これらはいずれもウイルス粒子の実数を数えているのではなく、検体1mL中のNATにより測定したウイルスの核酸の定量値を表示する「単位」として用いられているものです。

5 感染価

「感染力」を定量的に表す単位として用いられています。

チンパンジーを用いたHCVの感染実験を例に挙げると(詳しくはIの5、IIの8を御覧ください)、NATにより検出、表示されるHCV RNA量に換算した「絶対量」として、10コピー相当の接種材料を経静脈的に投与するとHCVの感染は成立するのに対して、1コピー相当の接種材料を接種してもHCVの感染は成立しないことが明らかとなっています。

この結果からHCVのチンパンジーへの感染価(Chimpanzee infectious dose: CID)は、下記のように表示されることになります。

1 CID = 10コピー相当

I B型肝炎ウイルス(HBV)とHBs抗原、HBs抗体、HBc抗体との関係及び核酸増幅検査(NAT)により検出されるHBV DNAとの関係

1 B型肝炎ウイルス(HBV)粒子とHBs抗原、HBc抗原との関係は？

B型肝炎ウイルス(HBV)は、直径が約42nmのDNA型ウイルスです。

HBV粒子は、内部にHBVの遺伝子(HBV DNA)を持つ、直径27nmのコア粒子と、これを包む外殻(エンベロープ)から成る(二重構造の)球形をしています。

HBVの外殻を構成するタンパクが「HBs抗原」(Hepatitis B surface抗原)であり、コア粒子の表面を構成するタンパクが「HBc抗原」(Hepatitis B core抗原)です。

HBVが肝細胞に感染すると、HBVの増殖に伴って肝細胞内でHBVの外殻タンパク(HBs抗原: 小型球形粒子、桿状粒子)が過剰に作られて、多量に血液中に放出されます。これらが日常検査で検出されるHBs抗原です。一般にHBVに感染している人の血液中には、HBV粒子1個に対して、500~1,000個の小型球形粒子及び50~100個の桿状粒子が存在します。

なお、HBc抗原は外殻に包まれてHBV粒子の内部に存在することから、そのままでは検出できません(詳しくは3をご覧ください)。

2 「HBs抗原陽性」の意義は？ また、「HBs抗体陽性」の意義は？

(1)HBs抗原陽性の意義は？

HBs抗原陽性ということは、その人がB型肝炎ウイルス(HBV)に感染しているということの意味します。

HBVに感染している人の血液中には、HBV粒子の他に多量の小型球形粒子及び桿状粒子(いずれも「HBs抗原」タンパク)が存在します。

日常検査で検出している「HBs抗原」は、これらの小型球形粒子や桿状粒子(いずれもHBs抗原タンパク)であり、HBV粒子それ自体を検出している訳ではありません。

言い換えれば、HBs抗原タンパク(HBVの外殻タンパクと同じ抗原性を有する小型球形粒子や桿状粒子)を検出することにより、HBVそれ自体が肝臓内や血液中に存在することを間接的に知る方法がHBs抗原検査です。

(2) HBs抗体陽性の意義は？

HBs抗体はHBVの感染を防御する働きをもつ抗体です。

HBs抗体はHBs抗原に対応する抗体で、B型肝炎ウイルス(HBV)の外殻タンパク(HBs抗原)のみならず、小型球形粒子及び桿状粒子(いずれもHBs抗原)とも反応します。

HBs抗体がHBV粒子の外殻タンパクと反応すると、そのHBV粒子は肝細胞内へ侵入することができなくなり、その結果感染が阻止されます。言い換えれば、HBs抗体はHBVの感染を防御する働きを持つ(中和抗体としての働きをもつ)と言えます。

また、HBVに感染し、(臨床的に)治癒した(HBVの一過性の感染を経過した)後に血中に出現することから、HBs抗体陽性ということは、過去にHBVに感染して(臨床的に)治癒した後の状態(既往感染)であることも意味します(ただし、感染既往以外にもHBワクチンを接種し、HBs抗体が陽性となっている例もあります。)

3 HBc抗原とは？ HBc抗体陽性の意義は？

(1)HBc抗原とは？

HBc抗原はB型肝炎ウイルス(HBV)の内部粒子(コア粒子)の表面を構成するタンパクです。

HBc抗原は、外殻(エンベロープ)に包まれてHBV粒子の内部に存在することから、そのままでは検出できません。検体(血清)に特殊な処理を施して、HBVのコア粒子をタンパクの最小単位(ペプチド)にまで分解してHBc抗原を、コア粒子の内部に存在するHBe抗原とともに感度よく検出する試みが行われています。

(2)HBc抗体陽性の意義は？

HBc抗体にはHBVの感染を防御する働き(中和抗体としての働き)はありません。

HBc抗体はB型肝炎ウイルス(HBV)のコア抗原(HBc抗原)に対する抗体です。

HBVに一過性に感染し(臨床的に)治癒する経過をたどった人では、HBc抗体はHBs抗原が血液中から消える前の早い段階から出現し、ほぼ生涯にわたって血中に持続して検出されます。

言い換えれば、HBs抗原が陰性でHBc抗体が陽性の人は、過去にHBVに感染し、(臨床的には)治癒したことを意味します(臨床的既往感染)が、極微量のHBVが血液中に検出される持続感染者も存在します。

HBVの既往感染例では、HBc抗原による免疫刺激が途絶えた時点から年単位の時間をかけて血液中のHBc抗体の量は徐々に低下します。その結果、HBc抗体は「中力価」～「低力価」陽性を示します。

一方、HBVの持続感染者(HBVキャリア)では、血液中にHBs抗原とともに高力価のHBc抗体が検出されます(HBc抗体「高力価」陽性)。

これは、HBVキャリアでは、①血液中に放出され続けるHBV粒子の中のHBc抗原による免疫刺激に身体がさらされ続けていることからHBc抗体が沢山作られ血液中に大量に存在すること、②HBc抗原がHBV粒子の外殻に包まれた形で存在するために、血液中のHBc抗体が抗原・抗体反応によって消費されないこと、によるものと解釈されています。

なお、ほとんどのHBc抗体陽性の人ではその人自身の健康に影響を及ぼすことはないものの、血液中にHBs抗原が検出されない場合(HBs抗原陰性)でも、肝臓の中にごく微量のHBVが存在し続け、核酸増幅検査(NAT)によりHBV DNAが検出される程度のHBVが血液中に放出されている場合があることがわかってきました。

4 核酸増幅検査とは？

核酸増幅検査(Nucleic acid Amplification Test : NAT)は、標的とする遺伝子の一部を試験管内で約1億倍に増やして検出する方法です。この方法をB型肝炎ウイルスの遺伝子(HBV DNA)の検出に応用することにより、最近では血液(検体)中のごく微量(18.6コピー/mL、3.2IU/mL程度まで)のHBVを検出することができるようになりました。このことから、20人分の血清をプールして1検体としたNATによるHBV DNA検出(20プールNAT)を実施してHBs抗原がまだ検出されないHBV感染のごく初期(HBs抗原のウインドウ期)にあるHBV陽性の献血者の血液を見つけ出したり、HBs抗原が陰性でHBc抗体だけが陽性である人の中から、ごく微量のHBVを血液中に放出している献血者の血液を見つけ出すことにより、輸血用血液製剤の安全性を向上させるために役立てられています。

しかし、特にHBV感染のごく初期(HBs抗原のウインドウ期)に献血された血液の一部については、NATによるHBV DNAの検出によるだけでは輸血によるHBV感染をなくすことは困難であることがわかっています(詳しくは7を御覧下さい)。

5 感染してからHBs抗原検査で「陽性」と判定できるまでの期間は？

HBs抗原検査法の感度にもよりますが、ヒトでの解析結果をもとにした外国からの報告によれば、感染後約59日経てばHBs抗原検査でHBVに感染したことがわかるとされています(Schreiber GB他、N.Engl.J.Med.1996)。

我が国で過去に行われたチンパンジーによる感染実験の結果をみると、10⁷感染価の血清(HBV量の多い血清)を1mL接種した場合、約1か月後にHBs抗原が検出できたのに対して、同じ血清を最小感染価近くにまで希釈した血清(HBV量が極めて少ない

血清:1感染価相当)を1mL接種した場合、HBs抗原が検出できるようになるまでに接種後約3か月かかったと記録されています(志方、他厚生省研究班昭和51年度報告書)。

感染時に生体に侵入したHBVの量や、経過観察時に選択したHBs抗原検査法の感度などによりHBs抗原が陽性となるまでの期間に多少の差はみられますが、ごく最近になって、チンパンジーにごく少量のHBV(感染成立に必要な最少ウイルス量:10コピー相当のジェノタイプCのHBV)を感染させた場合には、50~64日、増殖速度の遅いジェノタイプAのHBVを同様に感染させた場合でも、69~97日で血中のHBs抗原が検出できるようになることがわかりました。(Komiya Y他、Transfusion.2008)

6 感染してから核酸増幅検査でHBV DNAが検出できるまでの期間は?

ヒトでの解析結果をもとにした外国からの報告によれば、感染後、約34日経てばHBV DNA検査でウイルスに感染したことがわかるとされています(Schreiber GB他、N.Engl.J.Med.1996)。

感染してからHBs抗原が検出されるまでの期間に差がみられることと同様に、感染時に生体に侵入したHBV量によってHBV DNAが検出されるまでの期間が異なることは容易に想定されます。ごく最近になって、チンパンジーにごく微量のHBV(感染に必要な最少HBV量:HBV DNA量に換算した「絶対量」として10コピー相当のジェノタイプCのHBV)を感染させた場合には、35~50日、増殖速度が遅いジェノタイプAのHBVを同様に感染させた場合でも、55~76日で血中のHBV DNAが検出できるようになることがわかりました。(Komiya Y他、Transfusion.2008)

7 核酸増幅検査(NAT)によるスクリーニング導入後も輸血後B型肝炎がごく稀に発生するのは何故? その対処方法は?

現在、スクリーニングに用いられている核酸増幅検査(NAT)による1検体あたりのHBV DNAの検出感度はごく最近では18.6コピー/mL;3.2 IU/mL程度とされています。2004年7月までは、50人分の血清をプールして1検体としたNATによるHBV DNAの検査(50プールNAT)が行われていました。2004年8月からは20人分の血清をプールして1検体としたNATによるHBV DNAの検査(20プールNAT)に切り換えられています。このことは、50人又は20人の供(献)血者の血液の中に少なくとも400 コピー/mL程度のHBVが含まれている血液が混在している場合にのみ、「HBV DNA陽性」と判定されることを意味しています。

一方、ごく最近、チンパンジーを用いた感染実験により、感染ごく初期のHBV DNA陽性の血清を用いた場合、「絶対量」として10コピー相当のHBVを経静脈的に接種するとHBVの感染が成立することがわかりました。ただし、(臨床的に)治癒した人(既往感染)の血液、すなわちHBs抗原が陰性で、NATによりHBV DNAが検出され、同時にHBc抗体も検出される血液では、その約100倍のウイルスを接種することにより、ようやく感染が成立することがわかっています。

この結果と、現行の1人分の血清を1検体としたNAT(個別NAT)を行ってもその検出感度が18.6コピー/mLであること、輸血には血漿量として少なくとも20mL(200mL全血由来1単位の赤血球濃厚液中の血漿量)以上が投与されることからして、NATを含め