

第39回日本血液事業学会総会

シンポジウム 1

輸血感染症とその安全対策

シンポジウム1 司会のことば

輸血感染症とその対策

清水 博(日本赤十字社東北ブロック血液センター)

高松純樹(日本赤十字東海北陸ブロック血液センター)

輸血感染症は輸血による副作用の中でも最も重大な一つであり、近代輸血医療の開始直後からその対策が求められてきている。我が国では、しかしながらHBV、HCV及びHIVについては関係者の絶え間ない努力により克服可能な輸血感染症となりつつある。一方、相対的に従来はあまり顧みられなかった新興・再興感染症、細菌感染症及び原虫感染症が問題となっており、本シンポジウムではこの点に焦点を当てて議論をした。

高崎智彦先生から新興・再興感染症のデング熱、チクングニアウイルス感染症及びエボラ出血熱の概説並びに輸血感染症の可能性について報告があった。とくに前2者では輸血感染症の可能性のあるものの、ウイルスが血中に存在するウイルス血症は急性期のみ(発熱などの臨床症状が明らかな時)であって、回復期には存在しないことが明らかにされた。エボラ出血熱は重篤な出血性ウイルス感染症ではあるが、感染経路が直接的な接触感染であり、またその発生が局地的であることから輸血による感染の可能性は非常に少ないと考えられた。

古居保美先生から国内における献血者でのシャーガス病感染の現況が報告された。

我が国では平成24年10月から問診の強化を図り、該当者の血液は輸血用血液には用いず、原料血漿とすること、さらに平成25年4月から前述の問診該当者の協力を得て疫学調査を全国的に行い、現在までに3名のトリパノソーマ・クルージ抗体陽性者が発見された。うち1名に献血歴があり、複数の受血者に輸血されていたが、感染は認められなかった。現在では問診項目のさらなる強化及び保管検体を用いた遡及調査が行われている。

坂本賢一先生から個別NAT導入後のHBV、HCV及びHIV感染症、なかでも平成24年に導入されたHBc抗体に関する基準変更と合わせたHBV感染状況についての報告があった。1999年に導入

されたNAT検査は当初の500プールから2014年8月に個別NAT検査が導入されるまでより感度のいい方法への数回の変更が行われてきた。個別NATの導入以降HBV感染についてはHBc抗体の採血基準変更も相まって新規のHBV感染は見られていない。HBc抗体による採血基準変更はHBV既感染者を排除することができ、また個別NATによりウィンドウ期の感染者(HBs抗原及びHBc抗体陰性)を可能な限り排除した結果であった。HCV及びHIVについて、NAT陽性者はすべて血清学的検査において陽性であった。このことから現時点では絶対とは言えないが、従来最も頻度の高かったHBV感染はほぼ排除の道が開けたと考えられる。

南雲英人先生から従来は上述したウイルス感染症に隠れて注目されていなかった細菌感染症についての報告があった。その対策は問診の強化や、消毒法の改良など種々の方策がなされてきたが、室温で保管される血小板製剤を中心に年間数例の報告が続いている。なかでもstreptococcus属の血小板製剤による感染は引き続きみられている。その対策としてBacT/ALERTの導入を図り、一層、細菌感染対策を進めることが報告された。

佐竹正博先生からALTの基準変更の提案及び行政との交渉状況の報告があった。ALT値が61IU/L以上の献血血液は、仮にほかの感染症を含む諸検査が基準範囲にあったとしても輸血用血液製剤及び原料血漿には使用されないというのは、日本赤十字社の自主基準である。導入当初は肝炎などの代用マーカーとして用いられてきたが、NAT検査をはじめとする種々の高感度かつ特異性の高い検査法の導入によりその意義が問われている。現在HEV検査は北海道地区でのみルチン検査として行われており、他の地域では行われていないが、HEV検出マーカーとしてのALTには意味がないことが既に報告されている。

一方、血液事業の観点からみると、ALT基準のために、年間12～15万人の献血が廃棄されている。ALT基準を撤廃すればこの分の献血血は輸血用又は原料血漿としても有効利用が可能である。仮に

ALT基準を現状値から100IU/Lに引き上げた場合でも約10万人分の献血が有効利用される。早急な国及び日本赤十字社の対応が求められる。

シンポジウム1

細菌汚染と BacT/ALERT

名雲英人(日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター)

1. はじめに

わが国では、輸血用血液製剤の細菌汚染防止策として採血時の問診から医療機関へ出荷するまで種々の段階で細菌汚染の防止策を講じている。しかし、わずかな細菌が血液製剤中に残っていると保存中に増殖することがあり、リスクは依然として残っている。今回、輸血用血液製剤から検出されている細菌種の状況と製品規格試験として行っている無菌試験を日本薬局方の無菌試験法(日局法)に加え、新たな無菌試験方法として承認された全自動微生物培養検出装置[BacT/ALERT 3D: バクテアラート/シスメックス・ピオメリュー(株)]を用いた無菌試験法(バクテアラート法)について概説する。

2. 輸血用血液製剤からの検出菌

1) 【輸血用血液製剤との関連性が高いと考えられた細菌感染症例からの検出菌】2006年に赤血球製剤から *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) が検出されているが、2007年1月に全血製剤の保存前白血球除去導入後は *Y. enterocolitica* の検出事例の報告はない。2007年から2014年の間に報告された事例は7件、その内5例が *Streptococcus* 属菌で、検出された *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) や *Streptococcus pyogenes* 等全て、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の原因菌としても知られている。2) 【輸血には使用されていない苦情品製剤からの検出菌】2005年から2014年の検出事例は、すべて血小板製剤である。血小板製剤に初流血除去を導入した2006年10月以降2010年までは、*Bacillus cereus* の1件であったが、2011年から2014年の間に17件の検出事例があり、その内12件が *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) であった。*S. aureus* は、皮膚通過菌で健康人の肘窩部位からはあまり検出されない。我々が検証した健康人37人の皮膚から採取した211菌株の同定結果も *S. aureus* は1%未満の検出率であった。また *S. aureus* は、

消毒薬に対し感受性が高く、 10^6 CFU/cm² の菌を皮膚に塗布しても10%ポピドンヨードエタノールでほぼ殺菌される¹⁾。しかし、アトピー皮膚炎患者は、健康人と比較して *S. aureus* の検出率、検出菌数が有意に高いと報告されており²⁾、アトピー性皮膚炎症状があるドナーからの採血は、注意が必要である。また、苦情品製剤から検出された *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (*E. coli*) は増殖も速く、凝集・凝固物の析出やスワーリングの消失など外観変化がわかりやすい菌である。3) 【抜取りの無菌試験からの検出菌】赤血球製剤の初流血除去導入後の検出菌は、*Bacillus* 属菌、*CO* (-) *Staphylococcus*, *S. aureus* 等複数の菌種が検出されている。いずれも低温で増殖しない。血小板製剤は、初流血除去導入後の2007年度から2014年度で試験数約14,700、陽性数5、すべて *Propionibacterium acnes* である。感染症例や苦情品製剤から検出されている細菌は検出されていない。しかし、初流血除去導入後に全国の血液センターで有効期限切れになった血小板製剤を各基幹センターでバクテアラートを用いて7日間培養した結果、感染症例や苦情品製剤から検出されている *S. aureus*, SDSE および *E. coli* が検出されている³⁾。日局法は、菌の有無を目視で判定しているが、血小板製剤は培地ボトル底部に血小板が沈降するため、菌が増殖してできる菌層と分かりにくい場合があり、判定に影響しているかもしれない。

3. バクテアラートによる無菌試験法

輸血用血液製剤の無菌試験は、日局法により実施してきた。この無菌試験法をバクテアラートを用いた試験も可能にするため、製造販売承認の一部承認変更を申請し、本年3月に承認され、7月には関東甲信越BBC、8月に近畿BBCで導入を開始した。平成28年度には、この2施設で全国の輸血用血液製剤の無菌試験をバクテアラート法により実施する予定である。バクテアラートは、ポ

トル情報処理機能、温度校正機能、陽性陰性の判定機能を有するコントロールモジュールと培養機能、測定機能を有するインキュベータモジュールで構成されている。検出原理は、1) 細菌が培地中の基質を代謝することにより産生する二酸化炭素(CO₂)を検知することにより細菌を検出する。2) 培地ボトル底部にはpHの変化により色調が変化するCO₂センサーが封入されており、細菌の増殖によってボトル中に発生したCO₂がセンサー部分を透過(水素イオンに対し不透過性)して下記反応が起きる。



3) CO₂センサー内の水素イオンがCO₂センサーのpH指示薬(キシレノールブルー)と反応して灰緑色から黄色へと色調変化する。4) ボトル底部には、赤色LEDが10分ごとに照射され、その反射散乱光を光検出器で捉えその情報をコントロールモジュールに伝送する。5) 伝送された情報は、ボトル内のCO₂初期値と比較、分析しその結果から細菌の有無を判定する。6) 判定は、細菌の増殖曲線と密接に関連したアルゴリズムにより検出している。細菌の増殖が誘導期から対数増殖時にかけは、CO₂の産生量が加速度的に増加した場合、対数増殖期はCO₂の生成率が規定値以上の場合、静止期

はすでに規定値以上に達しているCO₂量を検出し陽性と判定される(図1)。培養開始後10日間(240時間)が経過してもCO₂が有意に変化しない場合、陰性と判定される。日局法とバクテアラート法の違いは、判定方法だけでなく培地の組成、培養温度、培養期間等に違いがある(表1)。培地は、細菌の増殖抑制要因の排除や増殖促進するための物質が添加されている。世界的な使用状況は、40カ国以上で血小板の出荷に係るスクリーニングや血漿製剤、赤血球製剤、血小板製剤のQCとして用いられている。

4. まとめ

細菌汚染を防止するさまざまな方策を講じているが、輸血による感染例や出庫時、輸血直前の外観検査で汚染製剤が検出されている現状がある。細菌に汚染された血液製剤がすべて外観に変化をきたすわけではないが、外観変化がおこる菌がいるので出庫時や医療機関で輸血前に製剤の外観を確認することは重要である。

無菌試験は、無菌性が検証されている工程で製造された医薬品が当該検体に由来すると判断される細菌が検出されるか調査することであるが、試験に使用される検体量は限られており、培地や試

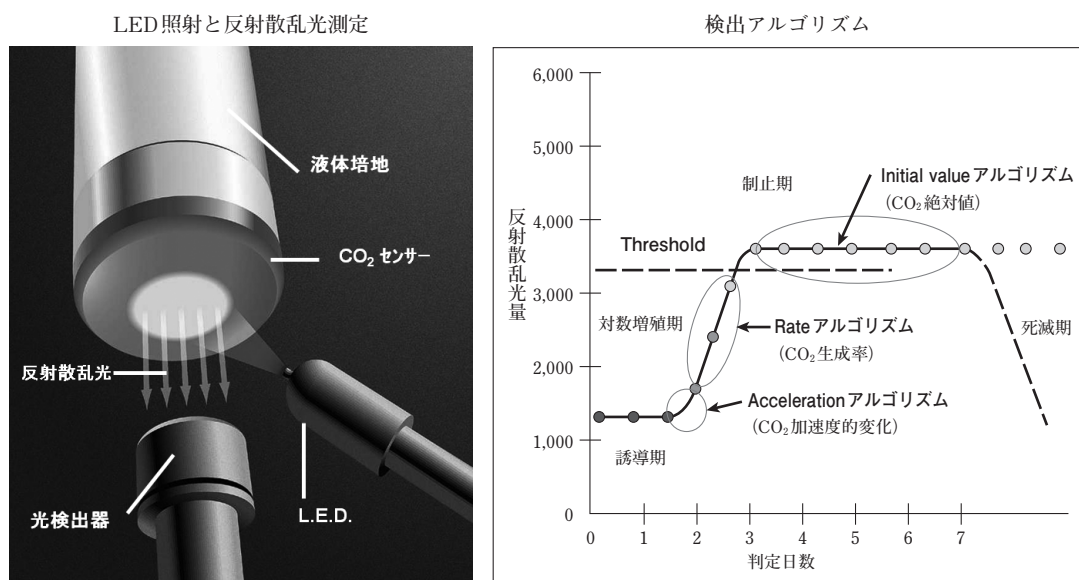


図1 測定と検出

表 1 日本薬局方無菌試験法とバクテアラート法の比較

	日本薬局方無菌試験法		バクテアラート法	
	好気培養	嫌気培養	好気培養	嫌気培養
培地の組成	【SCD 培地】 50mL (単位：g/1000mL)	【変法TG 培地】 50mL (単位：g/1000mL)	【BPA 培地】 40mL (単位 g/1000mL)	【BPN 培地】 40mL (単位 g/1000mL)
	・ カゼイン製ペプトン 17.0	・ カゼイン製ペプトン 15.0	・ カゼイン製ペプトン 17.0	・ カゼイン製ペプトン 13.6
	・ ダイズ製ペプトン 3.0	・ L-シスチン 0.5	・ ダイズ製ペプトン 3.0	・ ダイズ製ペプトン 2.4
	・ 塩化ナトリウム 5.0	・ 塩化ナトリウム 2.5	・ ポリアニソール硫酸 ナトリウム 0.35	・ ポリアニソール硫酸 ナトリウム 0.35
	・ リン酸水素二カリウム 2.5	・ 酵母エキス 5.0	・ 塩酸ピリドキシン (ビタミン B ₆) 0.01	・ メナジオン (ビタミン K) 0.0005
	・ ブドウ糖 2.3	・ ブドウ糖 5.0	・ アミノ酸混合物 適量	・ ヘミン 0.005
		・ チオグリコール酸 ナトリウム 0.5	・ 炭水化物基質 適量	・ 酵母エキス 3.76
				・ 塩酸ピリドキシン (ビタミン B ₆) 0.008
				・ ビルビン酸ナトリウム 0.8
				・ 還元剤 適量
				・ アミノ酸混合物 適量
				・ 炭水化物基質 適量
培養温度	22.5℃ (20～25℃)	32.5℃ (30～35℃)	36.0℃ (35.0～37.0℃)	
培養期間	14 日間以上		10 日間以上	
検体接種量	各培地 2 本に 5 mL ずつ合計 20mL		各培地 1 本に 10mL ずつ合計 20mL	
判定	培養開始後、3～6 日目、7～13 日目および 14 日目以降の計 3 回、目視判定。		培養開始後、バクテアラートにより 10 分ごとに自動判定。陰性の場合は 240 時間時に陰性判定。	

験方法を変えれば検出されるかもしれない。今後バクテアラートによる無菌試験を実施することに

より、製品抜取試験(無菌試験)から検出される菌種等に変化があるかもしれない。

文 献

- 1) 松本真実, 他: カップスクラブ法による皮膚消毒効果の評価. 日本血液事業学会誌, 35 (2): 453, 2012.
- 2) 遠藤薫, 他: 簡易スクラブ法によるアトピー性皮膚炎における細菌数の検討. 皮膚, 40 (1): 9-14, 1998.
- 3) Satake M, *et al.*: Frequency of bacterial contamination of platelet concentrates Before and after introduction of diversion method in japan. Japan.Transfusion, 49: 2152-2157. 2009

シンポジウム 1

ALT検査による製品除外の見直しについて

佐竹正博(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

日本赤十字社血液センターで行っているALT検査は、non-A non-B型肝炎の代用マーカーとして1981年より開始され、当初は36カルメン単位を上回る血液を製品から除外していたが、その後単位の同等性から61IU/L以上を除外基準とし現在に至っている。現在、ALT61IU/L以上の献血血液は、他の病原体検査が陰性であっても製品検査「不適」として輸血用血液製剤や原料血漿に使用していない。これにより、年間約500万献血中11万～15万献血が不合格となっている。

我が国の病原体スクリーニング検査体制は、1989年にHCV抗体検査とHBc抗体検査を開始し、1999年にプール検体によるHBV、HCVおよびHIVの核酸増幅検査(NAT)を導入した。その後、プールサイズの縮小を経て、2014年8月より個別検体によるスクリーニングNAT(以下、「個別NAT」という)を導入した。また、2012年より、HBs抗体価200mIU/mL以下のHBc抗体陽性血液をすべて排除した。これらの施策により、確定された輸血後肝炎は、HCVが2004年以来5例で、2010年からは1例も起きていない。HBVによるものは2014年以降現在まで確認されていない。

以上のごとくALT検査は、少なくともHBVとHCVの代用マーカーとしての機能は全く失っており、その製品検査としての必要性について検討する必要がある。

1. ALT値と血液の安全性について

1) HEV

北海道血液センターにおける20本プールNATの結果では、2005年1月から2006年2月までの間の献血341,174本中、HEV陽性件数は45件(0.013%)であった。このうちALT61IU/L以上は6件(HEV陽性例45件中の13%)で、ALT61以上6,829件の中で0.088%と低い頻度であった。ALT60以下では39件で334,389件中0.012%である。ALT60以下の群に比してALT61以上の群で

HEV陽性を検出するオッズ比は、7.7である。2014年8月の個別NAT導入により、ALTが61IU/L以上のHEV陽性血の比率はさらに低くなり、それに伴って上記オッズ比は2.5まで低くなる。

一方、ALT60以下の群でのHEV検出率(0.013%)は、全献血の中での検出率(0.012%)と比べて差は認められない。

スクリーニング検査法としてのALT検査を他の検査法と比較評価するには、同様にリスク評価と効率性が検討の対象となった、HBc抗体によるオカルトHBVキャリアのスクリーニングを対照とするのが適切であろう。ALT基準(61IU/L以上)によるHEV捕捉率は、HBc抗体陽性全排除によるHBV捕捉率をはるかに下回る。すなわち、HBc抗体スクリーニングのALTスクリーニングに対する陽性率のオッズ比、リスク比はともに8.2(95%CI; 3.6～18.7)で、ALTによるHEV検出効率率はHBc抗体によるオカルトHBV検出の8分の1以下である。また、検査法としての的中率(positive predictive value)を比較すると、ALTによるHEV的中率(0.00088)はHBc抗体による個別NAT陽性的中率(0.0194)の20分の1以下である。いずれも、非効率さが問題となって導入の是非が繰り返し検討されたHBc抗体検査よりもさらに非効率であることを示している。

一方、食品衛生法に基づく規格基準の改正により、2015年6月12日よりHEV感染の主たる原因である豚の食肉を生食用として販売することが禁止されたことから、HEV陽性者の献血は少なくなることが予想される。

2) CMV・EBV

CMV・EBVともに、その初回感染時にはしばしば肝機能障害を伴うことがある。したがって、異常ALT値からCMV・EBVウイルス陽性の献血を除外できる可能性がある。しかしながら、輸血によるCMV感染を回避したい場合には、要請があればCMV抗体陰性血を供給する体制がすでにでき

ている。また、輸血によるEBVの感染が問題となった例はこれまで世界でも報告されておらず、血液センターがそのような血液の供給要請を受けたこともない。一方、日本の輸血用血液製剤はすべて保存前白血球除去が施されている。CMV・EBVは、血中では通常白血球に結合しており、保存前白血球除去によってほとんどが除去される。白血球除去後の血液によるCMVの感染性が極めて低いことは既に多くのスタディによって示されており、またEBVも白血球除去フィルターによって効率的に除去されることが実験的に示されている。

3) ウイルスの網羅的解析

ALT値60IU/L以下、61～79IU/L、80以上の3群それぞれ100本ずつの献血検体について、次世代シーケンサーを用いて核酸塩基配列を網羅的に解析した。検体は不規則抗体陽性検体の検査残余を用いた。ヒト由来配列を除いた後、ウイルス塩基配列が検出されたのは、それぞれ56、31、36検体で有意差はなく、高頻度に見つかるウイルス配列はTTV、SEN virus、Human adenovirusで、そのほかHHV-6とGBV-Cがともに約1%の頻度で検出された。いずれも病原性はないとされるも

のばかりである。ALT高値群献血者から病原性ウイルスが多く検出される傾向は、検体数は少ないが全く認められない。なお、すべての検体において細菌由来の塩基配列が認められたが、ALT高値群において1検体中の細菌のリード数が多い傾向があった。

4) 献血者におけるALT上昇の原因について

それではALTの高値をもたらす原因は何であろうかという視点で、2011年から2013年に採血された血液15,909,375本を対象に、クラスタリング手法と決定木手法によりデータマイニングを行った。ALTが60IU/L以下または61IU/L以上であることと強い正の相関を示したのはBMI、 γ -GPT、および年齢であり、肝炎関連検査項目はまったく関連性を示さなかった。したがって、献血者に見られるALTの上昇は、ほとんどが非アルコール性脂肪肝疾患によるものと推定される。

2. ALT値による献血血液の排除の状況 (図1)

2014年8月から2015年1月までの250万3千人のALT値を見ると、ALT60以下が244万人97.6%、61以上が6万1千人2.4%であった。1年に換算

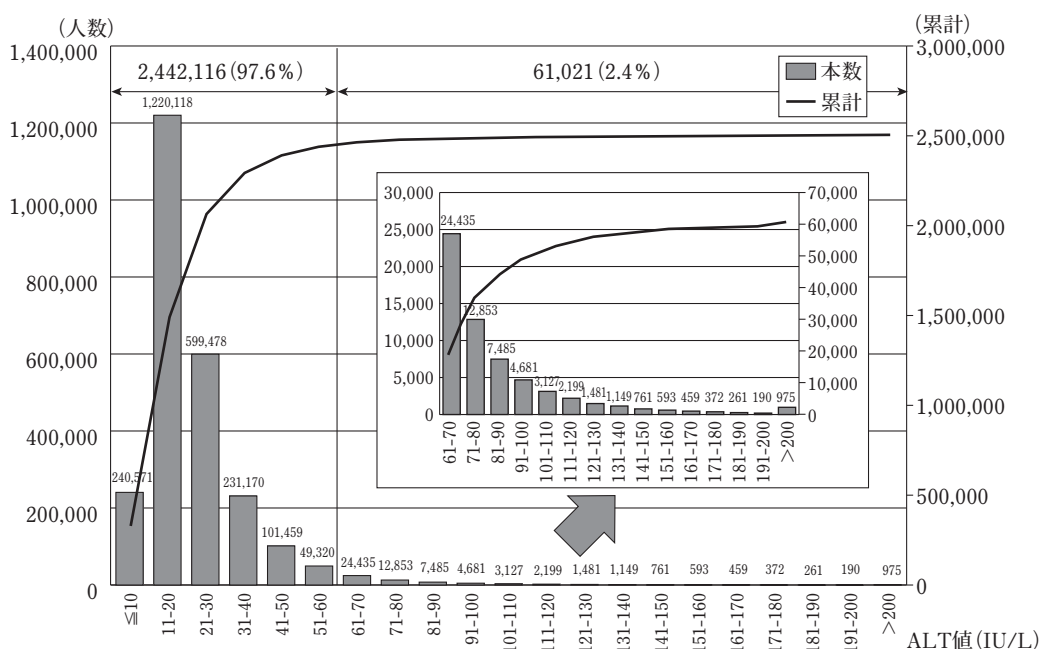


図1 献血者のALT分布 2014年8月～2015年1月(250万3千人)

すると12万2千人がALTの製品検査により不適とされたことになる。全国のかかなりの数の献血現場では、受付時の事前検査で簡易ALT検査(レフトロン)を実施し、ALT高値の採血をあらかじめ回避している。前記の結果はこの状況下でのものであり、実際にALT高値により排除されている血液はさらに多いものと思われる。

3. 海外の状況

世界保健機関WHOは、ALT検査を血液の安全性を高める意義はないと結論付け、その検査への導入を推奨していない。米国FDAは、精度の高いHCV検査が導入されたことにより、1995年にALT検査を廃止した。欧州46カ国中、ALT検査を施行していると記載されているのは、ロシアとルーマニアのみである。ただしこれは、ALT検査の有無を問うた調査ではなく自由記載での回答なので、正確なところは不明である。アジアでは台湾がALT検査を継続している。

4. 献血者の確保対策

わが国には本格的な少子高齢化社会が到来している。65歳以上の人口は1990年から2010年までの20年間にちょうど2倍増えた一方、15歳から30歳までの人口は26%減少した。かように向後の血液製剤の需要増加と献血可能人口の減少が予想されている。種々の計算から、2027年には545万

の献血数(延べ数)が必要となるいっぽう、期待される献血数は459万と試算され、献血数が約85万不足することが予想されている。

献血可能人口が減少するばかりの今後、85万の献血を新たに得ることは極めて困難である。現在の採血状況はすでに、何らかのより効果的で直接的な戦略の導入が必要な段階にある。現在、ALT値により製品から除外している12万の献血血液を有効に活用することは、将来予想される不足分を相当の割合まで充足させるとともに、献血者の善意に応えることともなる。

5. 結 論

特異的な高感度検査法が導入された今日、HBV、HCVの代用マーカーとしてのALT検査の意義はすでにない。またHEVをはじめとする肝障害を起こしうるその他のウイルスを検出するマーカーとしてのALT検査の意義もほとんどなくかつ非効率的であり、ALT検査は献血血液の安全性向上には寄与していない。献血者に見られるALT高値のほとんどは非アルコール性脂肪肝疾患によると思われる。これらのことから、日本赤十字社は、製品検査からALT検査を除外することとしたい。

なおこれは製品検査としてのALT検査の除外であり、献血者への生化学検査サービスとしてのALT検査はこれまでどおり継続するのはいうまでもない。