

## ワークショップ1

### 個別NAT導入による現状と課題

坂田秀勝(日本赤十字社北海道ブロック血液センター)

#### 1. はじめに

血液センターでは、1999年に輸血用血液の安全対策として、HBV, HCVおよびHIVの3ウイルスを同時に検出するMPX (Multiplex) 核酸増幅検査(NAT)を導入した。当初は500検体プールで開始し、段階的に50プール、20プール(20P)と縮小して高感度化を図った。2014年8月から、個別検体を用いたMPX NATスクリーニング(個別NAT)を導入している。

#### 2. 個別NAT導入による効果

HBc抗体陽性でHBs抗体値200mIU/mL以下の血液を排除した2012年8月以降の20P-NATでは、輸血後HBV感染症の報告は2.6例／年であった。個別NATの検出感度は20P-NATに比べ、HBV, HCVおよびHIV-1でそれぞれ、15, 83および46倍に上昇した。とくに比較的増殖が遅いHBVについては、ウインドウピリオドが10日短縮し34日となった。その結果、個別NAT導入後2年を過ぎたが、HBVによる輸血後感染症は2016年9月現在1例しか報告されていない。HCVとHIVについても個別NAT導入後に報告例はない。したがって、個別NATは輸血用血液の安全性のさらなる向上に大きく寄与していると考えられる。

#### 3. NAT同定陰性献血者の増加

しかし一方で、高感度検出系であるが故の問題点も少なくない。北海道では2016年8月までの549,034例中、120例が個別NATのみ陽性となつたが、そのうち102例(0.019%)は同定NAT陰性であった。このうち約6割は血清学的マーカーがすべて陰性であったため、個別NAT偽陽性と考えられた。現状ではこれらの献血者にはNAT陽性通知がされず、その後何度も献血に来られても血液は使用できない。全国的にこの数は増加し続けると考えられるため、当該献血者への対応(リエンタリー等)を含め、陽性および偽陽性の通知の在り方

等について今後検討する必要がある。

#### 4. コンタミネーションリスク

一般にNATによってウイルス核酸は、約 $10^9$ (10億)倍に増幅される。ウイルス高濃度検体では、1mL中に $10^9 \sim 10^{10}$ のウイルス量を含むものも存在することから、あくまでも理論値だが、NATにより $10^{18}$ 以上にも達する計算になる。この増幅効率は、ウイルスを砂粒にたとえた場合、図1のようになる。

病院など医療機関では、患者やその血液、組織については感染リスクがあるものとして扱う、標準予防策(スタンダードプリコーション)の考え方方が重要となっている。血液センターの検査室においても、同様の考え方方に基づき、感染リスクからヒトを守ることが重要である。さらに検査室では、検査結果を守ることも重要で、このリスクとなるのがコンタミネーションである。高濃度の病原体の他に、核酸増幅産物もNAT検査結果の大きなりスクとなる。また、20P-NATでは除外されてきた高濃度のウイルスを含む血液も個別NAT対象となっているため、これまで以上にコンタミネーションリスクが存在しているという認識が必要である。とくに検査担当者はそのリスクを十分に理解し、スタンダードプリコーションに沿った適切な作業をすることが重要であり、そのためには継続的なトレーニングの実施が必須といえる。また、トラブル時の対応についても同様で、適切なマニュアルの整備とトレーニングが併せて重要となる。

#### 5. 変異株・競合反応への対応

通常、HIVゲノムの5'LTR領域は変異が少ないため、多くの試薬メーカーはここにプライマープローブを設定しているが、ここにギャップ(欠失)がみられ、NATで検出できなかった変異株が報告された<sup>1)</sup>(図2)。このため、こうしたリスクを最小限に抑えるため、ゲノムの2カ所以上を検出す

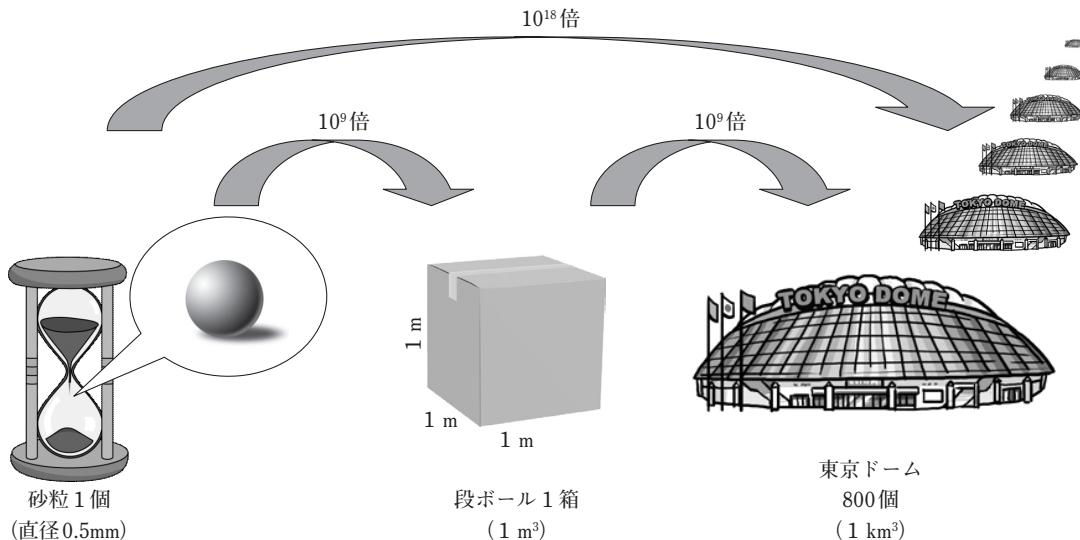


図1 増幅効率のイメージ

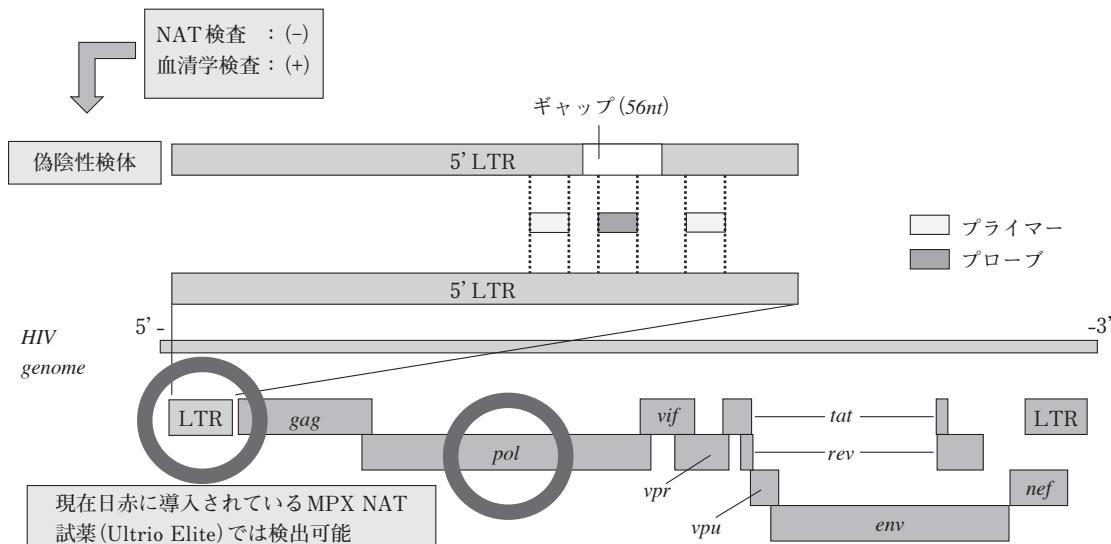


図2 HIV変異株の詳細とデュアルターゲットアッセイ

るデュアルターゲットアッセイが提唱されている<sup>2)</sup>。現在日赤の個別NATで使用している試薬はデュアルターゲットアッセイであるため、このHIV変異株に対しては検出可能である。

しかしMPX NATでは、1つの反応系にすでに

ウイルス3種類分のプライマープローブセットが含まれているため、さらに他のウイルスについても同様に対応する場合、温度やプライマー濃度等の増幅条件の最適化、および検出感度における個々のウイルスやジェノタイプごとのバリデーション

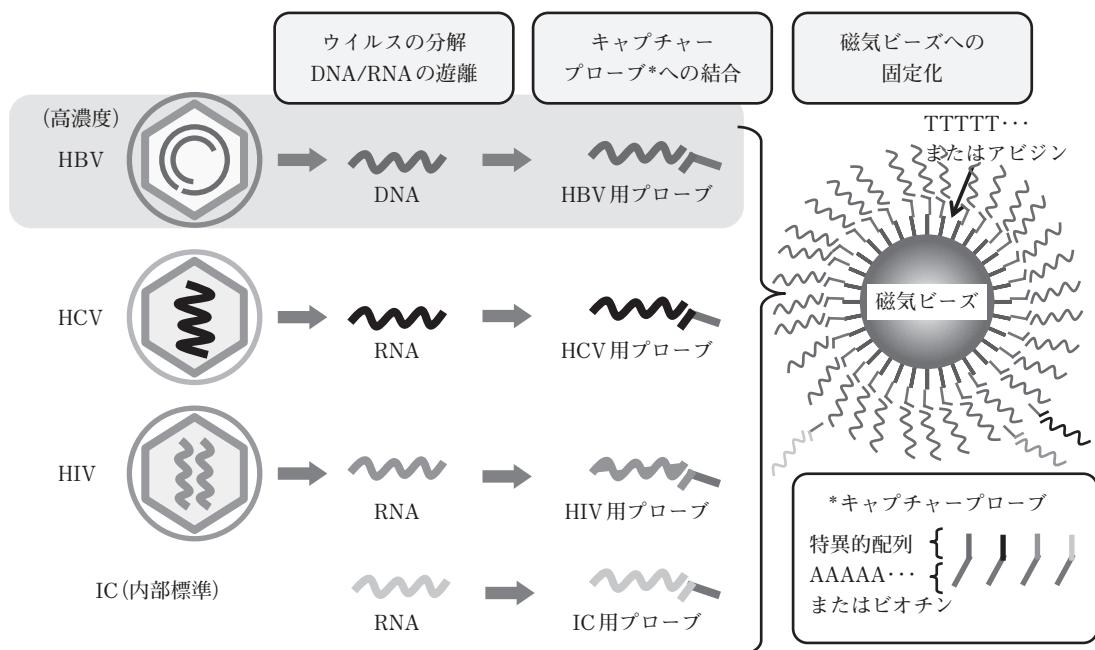


図3 ウィルス高濃度共存例での競合反応

等が非常に煩雑となる。こうした変異株については、今後データを蓄積していくことが求められる。

また、MPX NATでは、競合反応が起きる可能性がある。図3のように、核酸抽出の反応系で、ターゲット配列が存在すると、ウイルス核酸が磁気ビーズに捕獲される。しかしながら、HBV高濃度の検体で、他のウイルスが微量に共存する場合、大量のHBVキャプチャープローブが、他のウイルス用のプローブの結合を阻害し、結果としてHBV以外は陽性とならない場合が想定される。

## 6.まとめ

個別NATの高感度化により、輸血後感染症報告数が減少し、血液の安全性はさらに高まった。一方、偽陽性と考えられる献血者が増加したため、今後、当該献血者への対応(リエントリー等)を含め、陽性および偽陽性の通知のあり方等について検討する必要がある。また、コンタミネーションリスクや変異株のリスク、そして競合反応等、個別NATでは、このような現象や課題が存在するということを検査担当者がしっかりと認識できているかどうかが、今後安全な検査を実施していく上で最も重要な点である。

## 参考文献

- 1) Müller B, et al. How safe is safe: new human immunodeficiency virus Type 1 variants missed by nucleic acid testing. *Transfusion*. 2013; 53: 2422-2430.
- 2) Chudy M, et al. Risk Minimization Measures for Blood Screening HIV-1 Nucleic Acid Amplification Technique Assays in Germany. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41: 45-51.