

薬事・食品衛生審議会
平成20年度 第4回 血液事業部会運営委員会

議事次第

日時：平成21年2月10日（火）
15：00～17：00
場所：財団法人日本教育会館（9F）
喜山倶楽部「平安の間」
東京都千代田区一ツ橋2-6-2

議題：

1. 議事要旨の確認
2. 感染症定期報告について
3. 血液製剤に関する報告事項について
4. 日本赤十字社からの報告事項について
5. その他

配付資料：

- 資料 1 平成20年度第3回血液事業部会運営委員会議事要旨（案）
- 資料 2 感染症定期報告について
- 資料3-1 供血者からの遡及調査の進捗状況について
- 資料3-2 血液製剤に関する報告事項について
- 資料3-3 献血件数及びHIV抗体・核酸増幅検査陽性件数
- 資料 4 血液凝固第Ⅷ因子製剤及び第Ⅸ因子製剤におけるインヒビターに係る対応について
- 資料5-1 輸血療法の実施に関する指針の一部改正（案）について
- 資料5-2 血液製剤の使用指針の一部改正（案）について
- 資料6-1 車検満了日を経過した移動採血車を運行した事例について
（日本赤十字社提出資料）
- 資料6-2 献血者健康被害救済制度の運用状況について
（日本赤十字社提出資料）
- 資料6-3 問診票改訂（案）について（日本赤十字社提出資料）

- 資料6-4 CLEIA法の評価について（日本赤十字社提出資料）
- 資料7 注射用ノボセブン1.2mg及び同4.8mgの不採算品再算定について
- 資料8-1 フィブリノゲン製剤納入先医療機関の追加調査について（平成21年1月30日公表）
- 資料8-2 フィブリノゲン製剤等に関する相談窓口について（平成21年1月30日公表）
- 資料8-3 C型肝炎訴訟の和解について（平成21年2月5日公表）
- 資料8-4 田辺三菱製薬株式会社等における個人情報の開示請求への対応等について（平成21年1月28日公表）
- 資料8-5 田辺三菱製薬株式会社におけるフィブリノゲン製剤に係る418症例報告調査プロジェクトチームの活動状況等の報告について（平成21年1月27日公表）
- 資料8-6 国立病院訪問調査について（平成20年12月26日公表）
- 資料8-7 血液凝固因子製剤の納入先医療機関の調査について（平成20年1月28日公表）
- 参考資料 「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」（平成20年12月26日付け一部改正）

平成20年度第3回血液事業部会運営委員会議事要旨

日時：平成20年10月29日(水) 10:00～12:15

場所：財団法人日本教育会館(9F)喜山倶楽部「平安の間」

出席者：高松委員長、

大平、岡田、高橋、花井、山口各委員

(事務局)

新村血液対策課長、林血液対策企画官、齋藤課長補佐、秋野課長補佐他

(採血事業者)

日本赤十字社血液事業本部 田所経営会議委員、日野副本部長

- 議 題：
1. 議事要旨の確認
 2. 感染症定期報告について
 3. 血液製剤に関する報告事項について
 4. 日本赤十字社からの報告事項について
 5. その他

(審議概要)

議題1について

議事要旨に関する意見等については、事務局まで連絡することとされた。

議題2について

感染症定期報告について、事務局から説明後、質疑応答がなされた。

議題3について

事務局及び日赤から、供血者からの遡及調査の進捗状況及び新しい感染症検査法の判定と陽性血液にかかる当面の取り扱い、血液製剤に関する報告事項、献血件数及びHIV抗体・核酸増幅検査陽性件数について説明後、下記のような意見が出された。

- 新しい感染症試験法については、従来法と新法の十分な比較評価をせずにスタートしている印象を受ける。評価を行っているのであれば、きちんとデータを提示いただきたい。また、検査法の変更といった大がかりなシステムの変更は、全部のセンターで一斉に導入すると、何か問題が発生した場合に元に戻すのが大変なので段階的に導入すべき、という意見に対し、日本赤十字社より、できる範囲内で評価を

しており、データを提示することは可能である。またシステムの変更は一挙に導入したわけではなく、九州センターから段階的に行ってきた、との回答がなされた。

- 大阪府において、献血者におけるHIV陽性率が減少してきたのは良い傾向である。

議題4について

日赤から、ヘモグロビン値が採血基準に満たない献血者から採血した事例について報告後、下記のような意見が出された。

- 初歩的なミスである。危機管理意識が希薄であり、日本赤十字社内部での報告体制をきちんと整えることが重要である。

議題5について

事務局から、議題その他として血液凝固第Ⅷ因子製剤におけるインヒビターに係る対応について、白血球除去処理によると思われる血漿分画製剤の収量低下について、フィブリノゲン製剤及び血液凝固因子製剤に関する公表等についてそれぞれ説明後、下記のような意見が出された。

- 第Ⅷ因子の添付文書の改訂に関連して、第Ⅸ因子についても同様の対応をすべきではないか。

以上

感染症定期報告に関する今後の対応について

平成16年度第5回
運営委員会確認事項
(平成16年9月17日)

1 基本的な方針

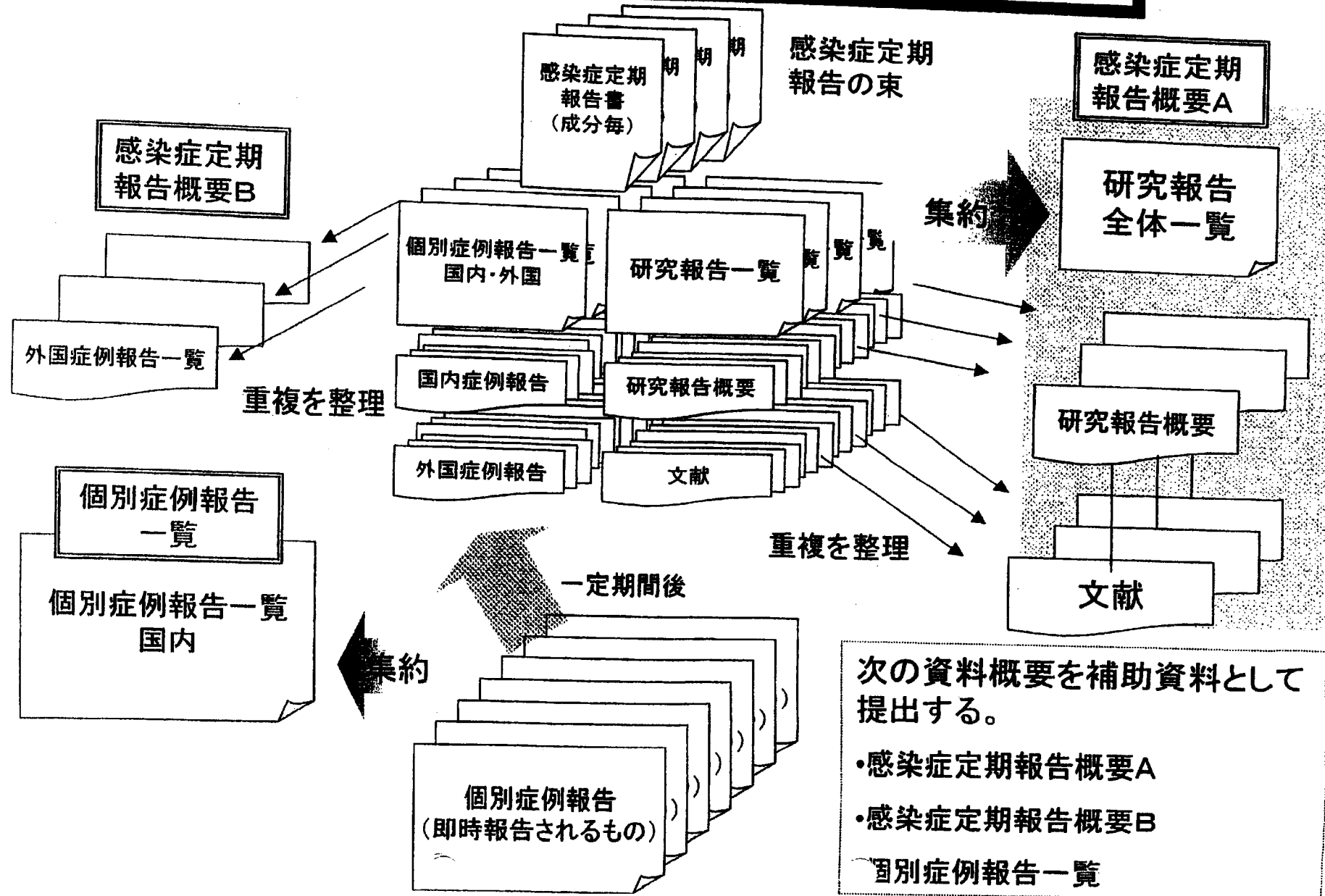
運営委員会に報告する資料においては、

- (1) 文献報告は、同一報告に由来するものの重複を廃した一覧表を作成すること。
- (2) 8月の運営委員会において、国内の輸血及び血漿分画製剤の使用した個別症例の感染症発生報告は、定期的にまとめた「感染症報告事例のまとめ」を運営委員会に提出する取り扱いとされた。これにより、感染症定期報告に添付される過去の感染症発生症例報告よりも、直近の「感染症報告事例のまとめ」を主として利用することとする。

2 具体的な方法

- (1) 感染症定期報告の内容は、原則、すべて運営委員会委員に送付することとするが、次の資料概要を作成し、委員の資料の確認を効率的かつ効果的に行うことができるようにする。
 - ① 研究報告は、同一文献による重複を廃した別紙のような形式の一覧表を作成し、当該一覧表に代表的なものの報告様式(別紙様式第2)及び該当文献を添付した「**資料概要A**」を事務局が作成し、送付する。
 - ② 感染症発生症例報告のうち、発現国が「外国」の血漿分画製剤の使用による症例は、同一製品毎に報告期間を代表する感染症発生症例一覧(別紙様式第4)をまとめた「**資料概要B**」を事務局が作成し、送付する。
 - ③ 感染症発生症例報告のうち、発現国が「国内」の輸血による症例及び血漿分画製剤の使用による感染症症例については、「感染症報告事例のまとめ」を提出することから、当該症例にかかる「資料概要」は作成しないこととする。ただし、運営委員会委員から特段の議論が必要との指摘がなされたものについては、別途事務局が資料を作成する。
- (2) 発現国が「外国」の感染症発生症例報告については、国内で使用しているロットと関係がないもの、使用時期が相当程度古いもの、因果関係についての詳細情報の入手が困難であるものが多く、必ずしも緊急性が高くないと考えられるものも少なくない。また、国内症例に比べて個別症例を分析・評価することが難しいものが多いため、緊急性があると考えられるものを除き、その安全対策への利用については、引き続き、検討を行う。
- (3) 資料概要A及びBについては、平成16年9月の運営委員会から試験的に作成し、以後「感染症的報告について(目次)」資料は廃止することとする。

感染症定期報告・感染症個別症例報告の取り扱い



感染症定期報告概要

(平成21年2月10日)

平成20年9月1日受理分以降

- A 研究報告概要
- B 個別症例報告概要

A 研究報告概要

- 一覧表（感染症種類毎）
- 感染症毎の主要研究報告概要
- 研究報告写

研究報告のまとめ方について

1 平成20年9月1日以降に報告された感染症定期報告に含まれる研究報告（論文等）について、重複している分を除いた報告概要一覧表を作成した。

2 一覧表においては、前回の運営委員会において報告したものの以降の研究報告について、一覧表の後に当該感染症の主要研究報告の内容を添付した。

感染症定期報告の報告状況(2008/9/1~2008/11/30)

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90013	2008/09/29	80516	BSE	OIE/World animal health situation 2008 年3月31日	1989年から2008年3月までに、英国以外の世界各国から国際獣疫事務局(OIE)に報告された畜牛におけるBSE症例数である。2006年は、スペイン68頭、アイルランド41頭、ポルトガル33頭、ドイツ16頭、日本およびポーランド10頭、フランス8頭、イタリア7頭、スイスおよびカナダ5頭、チェコ3頭、オーストリア、ベルギーおよびオランダ2頭、スロベニア、スウェーデンおよび米国1頭である。2008年には、これまでにカナダ1頭、アイルランド6頭が報告されている。	
90013	2008/09/29	80516	BSE	OIE/World animal health situation 2008 年4月17日	2008年3月までに、英国から国際獣疫事務局(OIE)に報告されたBSE症例数である。1987年以前は英国全体で446頭であったが、1992年には37280頭となった。その後、減少し、2007年には67頭となった。2008年は3月31までに10頭報告されている。	
90030	2008/10/23	80632	B型肝炎	Clin Infect Dis 2008; 47: e52-56	2000年1月から2004年12月に日本で新たにB型肝炎表面抗原陽性となった患者を調査したところ、552名中23名(4%)がHBV再活性化で、529名が急性B型肝炎であった。再活性化群は急性B型肝炎群に比べ、年齢およびHBV DNA値が有意に高く、ALTおよびアルブミンピーク値は低かった。また再活性化群の4分の1の患者が劇症肝不全となり、死亡した。肝臓関連死亡率は再活性化群の方が有意に高かった。	1
90013	2008/09/29	80516	B型肝炎	FDA/CBER 2008年5月 業界向けガイダンス(案)	FDAはB型肝炎コア抗原に対する抗体(抗HBc抗体)が陽性となったために供血延期となった供血者のリエントリー・アルゴリズムを提案するガイダンス案を発表した。これまで、抗HBc抗体が2回以上陽性となった供血者は無期限に供血延期とされていたが、本ガイダンスでは2回目に陽性となった後、8週間以上経ってからHBs抗原、抗HBc抗体および高感度HBV NATによってHBV感染が否定された場合は供血可能となる。	2
90060	2008/11/25	80719	B型肝炎	J Hepatol 2008; 48: 1022-1025	スロヴェニアで、HBs抗原陰性で抗HBc抗体陽性、抗HBs抗体低力価陽性、HBV DNA陽性の濃厚赤血球と新鮮凍結血漿を輸血された59歳の患者が4ヶ月後に急性B型肝炎を発症した。また同じ供血血液由来のRCCの輸血を受けた71歳の患者も7ヶ月後にHBV感染を認めた。2例ともドナーと同じ配列を有するジェノタイプDが感染していた。潜在性B型肝炎ウイルス感染者の血液は抗HBs抗体が陽性にもかかわらず、感染性を有した。	3
90007	2008/09/26	80498	B型肝炎	Transfusion 2008; 48: 286-294	最小感染量を求めるために、遺伝子型Aまたは遺伝子型CのHBVを含む急性期前の接種株をチンパンジーに接種したところ、最小50%チンパンジー感染量(CID50)は各々約10コピーと推定された。最低感染量を接種したチンパンジーにおけるHBV DNA ウィンドウ期は遺伝子型Aでは55-76日、遺伝子型Cでは35-50日、HBs Ag ウィンドウ期は遺伝子型Aでは69-97日、遺伝子型Cでは50-64日であった。またHBV DNAダブリングタイムは遺伝子型Cの方が遺伝子型Aに比べ有意に短かった。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90013	2008/09/29	80516	B型肝炎	第37回 日本肝臓学会西部会 2007年12月7-8日、肝臓 2007; 48(Suppl 3): A522	輸血によりHBs抗体エスケープ変異株に感染し、肝炎を発症した40歳代女性の症例報告である。献血者、受血者の塩基配列の解析を行って感染が証明された。核酸増幅検査を含む献血者のスクリーニングを行っているにもかかわらず、本邦では年間10-20例のHBV感染が報告されている。その原因の一つがHBs抗体エスケープミュータントであるが、本症例のように献血者、受血者ともに塩基配列の解析を行い感染が証明された例はきわめて稀である。	
90006	2008/09/26	80497	B型肝炎、E型肝炎	Veterinary Science in China 2007; 37: 921-925	中国の畜殺場から集めたブタの肝臓と血清からDNAを抽出し、PCRを使ってs遺伝子を増幅し配列決定を行った結果、ブタとヒトのHBVのS遺伝子の配列は98-100%の相同性を示した。また、RT-PCRによるHEV RNA検出を行った結果、HEV RNAがブタの肝臓に存在することが示された。	4
90013	2008/09/29	80516	B型肝炎C型肝炎	第56回日本輸血・細胞治療学会総会 2008年4月25-27日 P-033	2007年に医療機関から日本赤十字社に報告された輸血関連感染症の報告数は124例(10月末現在)であり、一昨年及び昨年の同期間に比べ減少傾向にある。内訳はHBVが61例、HCV32例、細菌24例、その他のウイルスが7例であった。ウイルス感染(疑)症例の調査結果により病原体を確認した症例は、HBVの12例とHCVの1例であった。HCVの1例は20プールNAT開始後(2004年8月開始)初めての検出限界以下の献血血液による感染症例であった。	
90030	2008/10/23	80632	C型肝炎	Clin Infect Dis 2008; 47: 627-633	フランスの大学病院の血液透析ユニットでのHCV伝播リスクにおける環境汚染および標準的注意の非遵守の役割を評価した。試験期間中にHCV陽性となった2名のうち1名は、同ユニットで治療中の慢性感染患者と同じウイルス株に感染していることが系統遺伝学的解析により明らかとなった。環境表面検体740例中82例がヘモグロビンを含み、その内6例がHCV RNAを含んでいた。手の衛生に関する遵守率は37%、患者ケアの直後に手袋をはずしていたのは33%であった。	5
90013	2008/09/29	80516	E型肝炎	Am J Trop Med Hyg 2008; 78: 1012-1015	スペインでブタに曝露しているヒト101名と曝露していないヒト97名におけるHEV感染の有無を調べた。抗HEV IgG保有率は曝露群では18.8%、非曝露群では4.1%であった。ブタに接するヒトの抗HEV IgG保有リスクは5.4倍(P=0.03)であった。HEV感染は養豚作業員の職業病として扱うべきである。	6
90007	2008/09/26	80498	E型肝炎	N Engl J Med 2008; 358: 811-817	2004年1月1日~2006年12月31日に腎移植(241名)または肝移植(86名)を受けた患者の移植時の抗HEV IgG保有率は、各々14.5%または10.4%であった。この内、肝移植を受けた3名、腎移植を受けた9名、腎臓と脾臓の移植を受けた2名の計14名で急性HEV感染を同定したが、全員血清HEV RNA陽性であり、内8名が慢性肝炎となった。移植から診断までの時間は短く、慢性肝炎に進展した患者ではリンパ球数並びにCD2、CD3およびCD4 T細胞数が有意に低かった。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90060	2008/11/25	80719	E型肝炎	Transfusion 2008; 48: 1368-1375	2004年9月20日に39歳日本人男性から献血された血液はALT高値のため不適当とされ、HEV陽性であった。当該ドナーの遡及調査の結果、9月6日にも献血を行い、HEV RNAを含有する血小板が輸血されていた。当該ドナーと親戚は8月14日にブタの焼肉を食べており、父親は9月14日に急性肝炎を発症し、E型劇症肝炎で死亡した。他に7名がHEV陽性であった。レシipientは輸血22日目にALTが上昇し、HEVが検出された。	7
90040	2008/10/24	80645	E型肝炎	Vox Sanguinis 2008; 95(Suppl.1): 282-283	2005年の中国の4都市(Beijing、Urmuchi、KunmingおよびGuangzhou)における供血検体のHEV感染率を調べた。その結果、ルーチン検査(抗HCV、抗HIV1/2、HBsAg、梅毒およびALT)陰性供血者の約1%は抗HEV IgMまたはHEV Ag陽性で、HEV感染の可能性があった。また、ALTスクリーニングは中国のHEV感染血排除に役立つ可能性があった。	8
90013	2008/09/29	80516	E型肝炎	第56回日本輸血・細胞治療学会総会 2008年4月25-27日 0-026	北海道地区において現行プールNATスクリーニングの残量を用いてTaqMan RT-PCR法によるHEV NATスクリーニングを行った。陽性献血者85例について追跡調査および遡及調査などを行なった。陽性献血者の多くは動物内臓肉を食してHEVに感染したと考えられる新規感染者で、GenotypeはG3が多かった。多くは症状が現れないまま抗体が陽転化し、典型的な無症候性一過性感染の経過をたどった。	
90014	2008/09/29	80517	HIV	ABC Newsletter 2008; No.26 2008年7月4日	米国医師会(AMA)は、男性同性愛行為を行った男性(MSM)の供血延期期間を生涯としている連邦の方針を5年間に変更することを支持するという声明を採択した。AMAはこの新方針をFDAに通告し、この方針を推し進めるグループと協力していく。FDAは1977年以降、MSMの供血を生涯延期することを血液事業者に要求しているが、アメリカ血液センターなどからは反対意見が出されている。	9
90013	2008/09/29	80516	HIV	AIDS 2007; 21: 2351-2353	フランスの新規HIV診断例におけるHIV-2およびHIV-1グループO型の感染率を調べた。2003年1月から2006年6月に10184例のHIV新規診断症例が報告されたが、HIV-2およびHIV-1グループO型感染の割合は、各々、1.8%および0.1%であった。これらの症例のほとんどは、異性との接触により感染した流行地域出身の患者であった。HIV-2感染のうち3例は男性と性的関係を持つ非アフリカ系男性であった。	
90014	2008/09/29	80517	アメリカトリパノソマ症	Clin Infect Dis 2008; 46: e44-47	血液製剤の輸血によりシャーガス病に感染し、死亡したスペイン人患者の寄生虫学的、血清学的疾患経過、ならびに供血者の調査の報告である。患者は白血病の既往があり、176名以上の供血者由来の輸血を受けていた。臍帯血移植のための免疫抑制状態で、寄生虫が血液脳関門を通過して神経系に感染したことが確認された。特定された供血者は無症候であった。複数回輸血患者は、免疫抑制剤治療実施前に、抗Trypanosoma cruzi抗体のスクリーニングを受けるべきである。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90014	2008/09/29	80517	アメリカ・トリパノソーマ症	Vox Sanguinis 2008; 95(Suppl.1): 39	米国で全供血者を対象にしたTripanosoma Cruzi検査が導入された2007年1月30日以降、最初の10ヶ月間、供血者の調査を行った。適合供血のうちELISA法で反復陽性(RR)となったのは0.013%(90/651471)で、そのうちRIPA陽性は34%(28/82)で、陽性確認率は0.0043%であった。全供血のスクリーニングは費用対効果が低く、出生地と初回供血者に絞った対策の検討が示唆された。	10
90013	2008/09/29	80516	インフルエンザ	AABB Weekly Report 2008年2月29日	インフルエンザパンデミックと血液供給に関するAABBの作業部会は、パンデミック時に供血間隔の例外的な取り扱いを認めるよう2月14日にFDAに対し要望書を送付した。パンデミック時には適格な供血者数が制限されることが予想されるため、全血および赤血球採取の間隔を短くすることが最も有効であるとしている。	
90013	2008/09/29	80516	インフルエンザ	Emerg Infect Dis 2007; 13: 1865-1870	カナダの共同農場で生活していた7ヶ月齢の乳児から、A/Canada/1158/2006と名づけられたブタインフルエンザAウイルス(H3N2)が単離された。この農場のメンバー90名の内54名で同ウイルスに対する血清学的検査を行ったところ、54名中9名が陽性であった。また、ブタ10頭のうち1頭で血清陽性が明らかになった。ブタインフルエンザウイルス株は効率的にヒトからヒトへ伝染する形に適応または交雑することから、インフルエンザ流行への備えの一環として養豚者の定期的サーベイランスを検討すべきである。	
90013	2008/09/29	80516	インフルエンザ	Vox Sanguinis 2008; 95(Suppl.1): 40	米国におけるパンデミックインフルエンザの血液供給に対する影響をシミュレーションした。3ヶ月間の血液供血量が50%減少した場合、血液需要に制限がない場合は在庫のほとんどを使い尽くしたが、血液の使用を必要最低限に制限した場合は在庫がなくなることはなかった。	11
90018	2008/09/29	80523	ウイルス感染	AIDS Res Hum Retroviruses 2007; 23: 1330-1337	Simian Foamy Virus (SFV)感染した男性7名を長期間追跡調査した。男性は非ヒト霊長類と接触する職業であった。男性の全ての末梢血単核球(PBMC)からプロウイルスDNAが検出され、口腔や尿生殖検体から検出されることもあった。長期間(中央値20年)の性的曝露にかかわらず妻たちは陰性であった。特異的な臨床症状は報告されなかった。限定的な追跡調査であるためSFV関連疾患やヒト-ヒト感染を特定できなかった。	
90007	2008/09/26	80498	ウイルス感染	Emerg Infect Dis 2008; 14: 834-836	カナダにおいて、Saffoldウイルスに関連するカルジオウイルス分離株が呼吸器症状を有する3名の小児の鼻咽頭吸引物から検出された。Can112051-06分離株のポリプロテイン配列は、Saffoldウイルスと91.2%のアミノ酸同一性を有した。しかし、ウイルス表面のEF及びCDのループは、かなり異なっていた。	
90045	2008/10/29	80668	ウイルス感染	Lancet Infect Dis 2008; 8: 355	ボリビア、ペルーおよび米国CDCのチームはボリビアの出血熱の致死症例から新規のアレナウイルスを発見し、Chapare virusと名付けられた。また、ウガンダでは赤オナガザルで新型ポックスウイルスの可能性のあるウイルスが発見された。これら野生動物のウイルスがヒトへの感染能を獲得し、重篤な疾患を引き起こす可能性がある。	12

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90003	2008/09/26	80493	ウイルス感染	PLoS Pathogens 2008; 4: e1000047	出血熱症例の小さな流行が、2003年12月と2004年1月にボリビアのCochabamba付近で発生した。1死亡例から検体入手し、患者血清検体から非細胞障害性ウイルスを単離し、アレナウイルスと同定した。RT-PCR分析、並びにS及びL RNAセグメント配列の解析の結果、このウイルスはサビアウイルスに最も近縁であるが、新規のウイルスであることが示された。我々はこのウイルスをChapareウイルスと命名することを提案する。	
90052	2008/11/14	80708	ウイルス感染	Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 14124-14129	インフルエンザ様疾患の小児の呼吸分泌物中から、汎ウイルスマイクロアレイ法を用いて、初めてヒトカルディオウイルスを同定した。系統遺伝学的分析から、このウイルスはTheilerのネズミ脳脊髄炎ウイルス亜型に属し、Saffoldウイルスと最も近縁であった。また、胃腸疾患患者群498名から得た751例の糞便検体中6検体からカルディオウイルスが検出された。	13
90013	2008/09/29	80516	ウイルス感染	ProMED-mail20080218.0645	2008年1月21日、Braziliaで32歳の男性が黄熱のため死亡した。これは、ブラジルにおける15人目の黄熱死亡患者である。Mato Grossoでも1名の感染と死亡が確認された。パラグアイ保健当局は首都Asuncionの病院で集中治療を受けていた39歳の女性が2008年2月16日に死亡したと発表した。同国ではこれまでに、少なくとも6名が黄熱によって死亡した。多くの市民がワクチン投与を求めて病院に殺到している。	
90013	2008/09/29	80516	ウイルス感染	ProMED-mail20080720.2201	オーストラリアBrisbaneの動物病院のスタッフが致死性のヘンドラウイルスに感染した。看護師1名と獣医1名が、感染したウマ数頭を治療後、感染した。前回のアウトブレイクは1994年で調教師1名とウマ14頭が死亡した。同ウイルスがヒト-ヒト感染するとのエビデンスはなく、拡大する危険性はない。	14
90007	2008/09/26	80498	ウイルス感染	Transfusion 2008; 48: 1180-1187	米国テキサス南東部の健康な成人ドナー100名の血液中のヒトヘルペスウイルス(HHV)陽性率とウイルスDNA量をRT-PCRにより調べた。その結果、HSV-1、HSV-2、VZV及びHHV-8 DNAはどの検体からも検出されなかった。一方、EBVは72%、HHV-7は65%、HHV-6は30%、CMVは1%に検出された。また、1名の血液から 6.1×10^7 geq/mlを超えるHHV-6 Type Bが検出されたが、健常者における異常な高値は活動性感染や免疫不全とは関連が無いと思われる。	15

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90054	2008/11/14	80710	ウイルス感染	WHO/EPR 2008年10月13日	南アフリカとザンビア出身者の最近の死亡例3例はアレナウイルス科のウイルスが原因あることが、NICDおよびCDCで行われた検査の結果明らかとなった。このウイルスに関する詳細な分析が継続されている。一方、南アフリカでは患者と密接に接触した看護師が感染し、入院中である。	16
90036	2008/10/24	80638	ウイルス性脳炎	ProMED-mail20080828.2697	インド東部のウツタルプラデシ州で小児を死亡させている原因不明のウイルスは、インド保健省の専門家らにより急性脳炎症候群と診断された。同州の13の地区では、数週間におよそ800人の患者が発生し150人が死亡したと報告され、その数は増加すると見られている。血液検査で日本脳炎陽性となった患者は5%以下であった。日本脳炎とエンテロウイルスとの混合感染の可能性について調査中である。	17
90018	2008/09/29	80523	ウエストナイルウイルス	J Med Virol 2008; 80: 557-563	中央ヨーロッパにおけるウエストナイルウイルス(WNV)の潜在的脅威を調べた。ドイツ人供血者14437名由来の検体中0.03%が抗WNV陽性であった。ドイツ人9976名由来の検体をWNV NAT法を用いてWNV-RNAの有無を調べた結果、全て陰性であった。米国由来血漿プールではWNV-RNAがしばしば検出されたが、ヨーロッパやアジア由来のプールからは検出されなかった。また、血漿製剤製造過程のウイルス不活化によりWNVに関する安全性は保証されることが明らかとなった。	
90013	2008/09/29	80516	ウエストナイルウイルス	Rev Panam Salud Publica 2006; 19: 112-117	文献および未発表データから、ラテンアメリカやカリブ海地域のウエストナイルウイルス(WNV)感染の現状をまとめた。WNV感染は2001年にCayman諸島とFlorida Keysの住民で見られ、2002～2004年にジャマイカ、メキシコなど周辺地域で動物や鳥類での感染が確認されている。しかし、疾患報告数は少ない。この不可解な熱帯生態系でのウイルス減弱または他の可能性を検討するためには分離株が必要である。	18
90013	2008/09/29	80516	コンゴ・クリミア出血熱	ProMED-mail20080709.2092	2008年7月7日、トルコのBursa、CanakkaleおよびSamsunの病院でダニ媒介性疾患であるクリミア・コンゴ出血熱により3名が死亡し、この2ヶ月での死者数は37名となった。保健省はダニに注意するよう呼びかけ、咬まれた場合は決して手でつぶさず、医師にピンセットで注意深く取り除いてもらい、ヨードで消毒することを推奨している。	19
90014	2008/09/29	80517	サルモネラ	CDC 2008年7月8日	CDCは関係機関と協力して複数の州で発生したサルモネラ血清型セントポールのアウトブレイクを調査している。生のトマトの摂取が原因と考えられている。2008年4月以降2008年7月7日までに、米国の41の州、ワシントンD.C.およびカナダで991名の患者が同じ遺伝子パターンのサルモネラ血清型セントポールに感染したことが確認された。	20

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90040	2008/10/24	80645	チクングニヤウイルス感染	Transfusion 2008; 48: 1333-1341	2005年から2007年に、チクングニヤウイルス(CHIKV)はレユニオン島で大流行し、供血は2006年1月に中断された。大流行中のウイルス血症血供の平均リスクは、10万供血あたり132と推定された。2006年2月の最流行時におけるリスクは、10万供血あたり1500と最高であった。この期間中、757000人の住民のうち推定312500人が感染した。2006年1月から5月の平均推定リスク(0.7%)は、CHIKV NAT検査による血小板供血のリスク(0.4%)と同じオーダーであった。	21
90007	2008/09/26	80498	手足口病	WHO Representative Office in China 2008年5月19日	2008年3月下旬、中国安徽省Fuyang市で未就学児3名が重症の肺炎と急激な悪化により死亡し、4月中旬までに15名の小児が同様の疾患で死亡した。調査の結果、エンテロウイルス71による手足口病と確定された。同市では、3月1日から5月9日の間に、6,049例報告され、353例が重篤で、22例が死亡した(致死率0.4%)。患者数は、4月の初めに増加し始めて、4月28日にピークに達し、5月5日以後減少した。	
90013	2008/09/29	80516	デング熱	Hong Kong Med J 2008; 14: 170-177	1998~2005年に香港の公立病院に入院したデング確定患者全員の医療記録をレトロスペクティブに検討した。126例中123例(98%)がデング熱、3例(2%)がデング出血熱であった。1例が輸血により感染したデング熱であった。116例が輸入症例、10例が地域症例であった。デングウイルス1型が最も多く、次に2型、3型、4型の順であった。死亡例はなかった。発熱、皮疹を呈し、血小板減少などを示す渡航歴のある患者には鑑別診断にデング熱を含めるべきである。	22
90020	2008/09/29	80525	デング熱	Transfusion 2008; 48: 1342-1347	高力価の培養デングウイルス セロタイプ2をアルブミンおよび免疫グロブリンの各種製造工程(低温エタノール分画、陽イオン交換クロマトグラフィー、低温殺菌、S/D処理およびウイルスろ過)前の検体に加え、各工程での同ウイルスのクリアランスをVero E6細胞培養におけるTCID50アッセイおよびRT-PCRで測定した。その結果、全ての工程が不活化・除去に有効であることが示された。	23
90040	2008/10/24	80645	デング熱	Transfusion 2008; 48: 1348-1354	2005年9月20日~12月4日のプエルトリコの米国赤十字におけるすべての供血16521検体中のデングウイルス(DENV) RNAをTMA(transcription-mediated amplification)法で測定したところ、12検体(0.07%)がTMA陽性であった。4検体は、RT-PCR(DENVセロタイプ2および3)陽性であった。RT-PCR陽性4検体中3検体でウイルスを培養することができた。TMA陽性12検体中1検体がIgM陽性であった。1:16に希釈した場合は5検体のみTMA陽性であった	24

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90045	2008/10/29	80668	鳥インフルエンザ	N Engl J Med 2008; 358: 2573-2584	細胞培養で製造したH5N1鳥インフルエンザワクチンのPhase 1および2試験を行った。その結果、大多数の被験者においてアジュバントなしの7.5 μgまたは15 μgのヘマグルチニン抗原を含有するワクチンの2回接種が、様々なH5N1ウイルス株に対する中和抗体の合成を誘発することが示された。注射部位での軽度の痛みと頭痛が主な有害反応であった。このワクチンが有用であることが示唆された。	25
90018	2008/09/29	80523	鳥インフルエンザ	Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 7558-7563	ユーラシアおよび北米系統のH7型トリインフルエンザウイルスの受容体結合能およびフェレットモデルにおける感染性を調べた。その結果、2004年にカナダで分離されたH7N3型、2002-2003年に米国北東部で分離されたH7N2型はα2-6結合シアル酸に対する親和性を高めたHAを保有していた。また2003年にニューヨークの男性から分離された低病原性H7N2型はフェレットの上気道で効率的に増殖し、直接接​​触で感染できることが確認された。	
90014	2008/09/29	80517	バベシア症	American Society for Microbiology 108th General Meeting 2008年6月1-5日、Boston	米国中南部では稀な輸血によると考えられるBabesia microti感染症例の報告である。61歳の女性患者で、赤血球輸血後、吐き気と発熱を訴え、敗血症の症状を呈し、死亡した。血液塗抹標本で赤血球の5~15%にトロフォゾイト(栄養体)があった。患者血液検体中でBabesiaは形態学的に確認され、PCRでB. microti陽性であった。輸血された製剤の供血者のうち1名がB. microti陽性であった。	
90018	2008/09/29	80523	バベシア症	Blood 2007; 110(11, Part 1): 853	米国コネチカット州での輸血によるBabesia microti感染の危険性を評価するため、2004-2007年に収集されたドナーとレシipientの保存検体を検査した。その結果、45回の赤血球輸血を受けていた患者1例でBabesia microti感染が確認されたが、血清検体陽性のドナーを特定することはできなかった。危険性は1920回の赤血球輸血で0例または1例と計算された。	
90045	2008/10/29	80668	パルボウイルス	Biotechnol Prog 2008; 24: 554-560	レジン上に3量体ペプチドを結合し、PBSまたは血漿溶液に添加したブタパルボウイルス(PPV)への選択的な結合能を有するペプチドをスクリーニングした。その結果、WRW(トリプトファン-アルギニン-トリプトファン)結合レジンでは7.5%ヒト血漿中のPPVを検出限界以下に除去することができた。	26
90003	2008/09/26	80493	パルボウイルス	FDA/CBER 2008年7月 業界向けガイダンス(案)	血漿由来製品によるパルボウイルスB19伝播リスクを低減するための核酸増幅検査(NAT)についてのガイダンス案が示された。全ての血漿由来製剤について、製造プール中のパルボウイルスB19 DNAのウイルス負荷を確実に10000 IU/ml未満とするため、製造過程の品質管理検査としてNATを実施すべきである。ミニプール中でのNATの感度は少なくとも1000000 IU/mlとすべきである。これらの基準を超えるものは使用してはならない。	27

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90013	2008/09/29	80516	バルボウイルス	Transfusion 2008; 48: 1036-1037	大阪における1997-1999年の献血者979052名中102名がヒトバルボウイルスB19感染者であった。B19感染者のうち20名のB19 DNA、IgGおよびIgMを長期間フォローアップしたところ、B19持続感染が観察されたが、B19感染の症状を報告した者はいなかった。B19急性感染後の血漿ウイルス力価は約1年で 10^4 IU/mL未満、約2年で 10^1 IU/mL未満まで下がるが示された。	
90045	2008/10/29	80668	バルボウイルス	Transfusion in press	3つの血液凝固因子製剤(第VIII因子インヒター-バイパス活性、第IX因子複合体および第VII因子)の製造工程においてSTIM-4蒸気加熱処理を用いた不活性化処理を行い、ヒトバルボウイルスB19(B19V)とマウス微小ウイルス(MMV)間で不活性化効果の比較を行った。その結果、血液凝固因子製剤の中間体の種類に関わらず、試験に用いたB19V(遺伝子型1型、2型)はいずれもMMVと比較して効果的に不活性化された。	
90013	2008/09/29	80516	ハンタウイルス	Emerg Infect Dis 2008; 14: 808-810	スウェーデンにおけるPuumalaウイルスの予期せぬ大規模アウトブレイクにより、2007年のVästerbotten地方の流行性腎症患者の数は100,000人当り313人に至った。齧歯類の増加の他、気候温暖化および地表を覆う積雪の減少により、ウイルスを媒介するハタネズミの活動が活発だったことが、当該アウトブレイクの一因であろうと考えられる。	
90007	2008/09/26	80498	ヒトポリオウイルス感染	Science 2008; 319: 1096-1100	メルケル細胞癌(MCC)検体をdigital transcriptome subtraction法を用いて検査し、新種のポリオーマウイルスを同定し、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCVまたはMCPyV)と命名した。このウイルスはMCC腫瘍10検体中8例(80%)で検出されたが、対照組織検体では59例中5例(8%)、対照皮膚組織検体では25例中4例(16%)でしか検出されなかった。MCVがMCCの病原因子である可能性が示唆された。	
90014	2008/09/29	80517	ブルセラ症	Clin Infect Dis 2008; 46: e131-136	急性ブルセラ症患者39名の血液検体中のBrucella DNAの存在をRT-PCR法により調べた。その結果、治療終了時では87%、治療完了後6ヶ月では77%、治療後2年を過ぎても70%の患者で、無症候性であるにもかかわらず、Brucella DNAが検出された。適切な治療を行い、回復したように見えても、Brucella DNAは存続する。ブルセラ菌は除去不可能な持続性の病原体である。	28
90014	2008/09/29	80517	ペスト	Emerg Infect Dis 2007; 13: 1459-1462	2003年6月から7月にアルジェリアOran地区においてペストの集団感染が発生した。同国では、この疾患は50年以上報告されていなかった。腺ペスト症例18名が特定され、Yersinia pestisが6名から分離された。初発患者を除き、全員が回復した。標的予防的化学療法、衛生、ベクターコントロールが、感染制御上重要な役割を果たした。疫学的、分子生物学的な知見から、当該期間中、現地の保菌動物の存在が強く示唆されたが、その起源については特定できなかった。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90014	2008/09/29	80517	リケツチア症	Emerg Infect Dis 2008; 14: 1019-1023	ネコノミが媒介するRickettsia felis感染症のヒト症例は世界中で報告されている。症状は発疹熱やデング熱などに類似しており、実際よりも少なく推定されている可能性が高い。ヒトの健康を脅かす感染症として今後調査が必要である。	29
90010	2008/09/26	80501	リケツチア症	ProMED-mail20080728.2306	オランダ・ブラバント州の公衆衛生局が行った調査でQ熱の症例報告数が急激に増加し、2008年7月21日付けで491症例が報告されている。感染症管理センター長によると、実際の感染者数は報告された症例数の10倍であると思われる。2007年まではQ熱はオランダではほとんど存在しなかった。	30
90003	2008/09/26	80493	リンパ性脈絡髄膜炎	boston.com 2008年5月13日	2008年5月12日の保健当局発表によると、ボストンの病院で検出が難しいウイルスに感染したドナーから腎臓を移植された70歳女性が死亡し、57歳男性が危篤である。ドナーと患者2名の検体をCDCが検査したところ、全員、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)陽性であり、ドナーからの伝播であったことが確認された。移植前にはエイズウイルス、肝炎ウイルスなどの検査は行ったが、LCMVの検査は行っていなかった。	
90003	2008/09/26	80493	リンパ性脈絡髄膜炎	N Engl J Med 2008; 358: 10.1056/NEJMo a073785	オーストラリアで一人のドナーから臓器移植を受けた3例が移植後4-6週後に死亡した。他のいかなる方法でも原因不明であったが、2例のレシピエントの移植肝および腎から得られたRNAを偏りのない迅速シーケンシングで解析することにより、リンパ性脈絡髄膜炎に関係する新規のアレナウイルスが原因であることが明らかとなった。レシピエントの腎、肝、血液および脳脊髄液からこのウイルスが検出され、また免疫組織学的および血清学的に確認された。この方法は病原体発見の強力な手段である。	
90007	2008/09/26	80498	リンパ性脈絡髄膜炎	N Engl J Med 2008; 358: 991-998	オーストラリアで一人のドナーから臓器移植を受けた3例が移植後4-6週後に死亡した。他のいかなる方法でも原因不明であったが、2例のレシピエントの移植肝および腎から得られたRNAを偏りのない迅速シーケンシングで解析することにより、リンパ性脈絡髄膜炎に関係する新規のアレナウイルスが原因であることが明らかとなった。レシピエントの腎、肝、血液および脳脊髄液からこのウイルスが検出され、また免疫組織学的および血清学的に確認された。この方法は病原体発見の強力な手段である。	
90010	2008/09/26	80501	レプトスピラ症	Infect Genet Evol 2008, doi:10.1016	コスタリカにおいて、レプトスピラ症の入院患者から分離されたレプトスピラは、Javanica血清群型に分類される新しい血清型で、Arenalと命名された。同じ地区の重症患者から分離された株も同じ血清型であったことから、この株は、この地域に流行する新規の高病原性の血清型であると考えられた。	

血対ID	受理日	番号	感染症 (PT)	出典	概要	新出文献 No.
90036	2008/10/24	80638	レプトスピラ症	Infect Genet Evol 2008; 8: 529-533	コスタリカにおいて、レプトスピラ症の入院患者から分離されたレプトスピラは、Javanica血清群型に分類される新しい血清型で、Arenalと命名された。同じ地区の重症患者から分離された株も同じ血清型であったことから、この株は、この地域に流行する新規の高病原性の血清型であると考えられた。	
90029	2008/10/21	80614	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	American Society of Hematology/Press Releases 2008年8月28日	Blood誌のprepublished onlineに掲載されたヒツジにおける研究によると、輸血によるBSE伝播のリスクは驚くほど高い。エジンバラ大学で行われた9年間の研究は、BSEまたはスクレイピーに感染したヒツジからの輸血による疾病伝播率を比較した。その結果、BSEおよびスクレイピーとも輸血によりヒツジに効率よく伝播された。症状を呈する前のドナーから採取された血液によっても伝播することが示された。	31
90007	2008/09/26	80498	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Ann Neurol 2008; 63: 697-708	米国の国立プリオン病病因調査センターに2002年5月から2006年1月に紹介された患者11名(平均発症年齢62歳)を調べたところ、海綿状変性の型、PrP免疫染色パターンおよびマイクロプラークの存在が、既知のプリオン病とは異なり、通常の方法では典型的なプロテアーゼ抵抗性PrPは検出されなかった。我々はこれらをプロテアーゼ感受性プリオン病(PSP _{Pr})と名付けた。PSP _{Pr} は、プリオン病の中では稀ではなく、我々のデータが示すよりもさらに多い可能性がある。	32
90055	2008/11/19	80714	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Cell 2008; 134: 757-768	マウスPrP ^{Sc} と混合させることによって折り畳み異常が起こったハムスターPrP ^C は、野生型ハムスターに対して感染性を起こす新規なプリオンを生成した。同様の結果は、反対方向でも得られた。PMCA増幅を繰り返すとin vitro産生プリオンの順応が起こる。このプロセスは、in vivoでの連続継代に観察される株の安定化を暗示させる。種の壁と株の生成がPrP折り畳み異常の伝播によって決定されることが示唆される。	33
90045	2008/10/29	80668	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	dailypress.com 2008年4月11日	米国Portsmouthで、脳変性疾患を呈し死亡した女性の死因を、vCJD疑いのため調査中である。MRIまたは脳スキャンの結果がアトランタの疾病対策センターに送付され、バージニア大学および国立プリオン病病因サーベイランスセンターで更に検査される。結果が出るまでには数ヶ月を要すると思われる。	
90030	2008/10/23	80632	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Emerg Infect Dis 2008; 14: 1406-1412	263Kスクレイピーの臨床症状を呈するハムスター22匹の尿にTSE感染性があることが示された。これらの動物の腎臓と膀胱のホモジネートは20000倍以上希釈してもTSE感染性があった。組織学的、免疫組織化学的分析では、腎臓における疾患関連PrPの散発的な沈着以外、炎症や病変は見られなかった。尿中のTSE感染性が、自然のTSEの水平感染に何らかの役割を果たす可能性がある。	34

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90013	2008/09/29	80516	異型ク ロイツ フェルト ト・ヤコ ブ病	J Virol 2008; 82: 3697-3701	非典型的BSE株の1つであるBASE(またはBSE-L)の感染性およびヒトでの表現型を調べた。BASEウシ由来の脳ホモジネートを、ヒトプリオン蛋白を発現するトランスジェニック(Tg)マウスに接種したところ、60%が20-22ヶ月後に感染し、古典的BSEに関する報告より高い感染率であった。BASE感染ヒト化Tgマウス脳における病因性プリオンのアイソフォームは、元のウシBASEまたは孤発性ヒトプリオン病のものとは異なっていた。またBASEプリオンはリンパ向性であった。	
90045	2008/10/29	80668	異型ク ロイツ フェルト ト・ヤコ ブ病	Medgadget.com 2008年4月9日	カナダ QuebecのProMetic Life Science社は血液中のvCJDプリオンを除去する使い捨てフィルターを開発した。何百万ものペプチドをスクリーニングし、プリオンに最も親和性のあるものを探し、市販の樹脂に固定し、膜状にし、何層にも重ねた。本フィルターは汚染血液からのプリオン除去が可能であった。また、フィルターで処理したプリオン感染ハムスターの血液をプリオン非感染ハムスターに投与しても疾患は発現しなかった。	
90013	2008/09/29	80516	異型ク ロイツ フェルト ト・ヤコ ブ病	Microbiol Immunol 2007; 51: 1221-1231	感染動物モデルにおいても、血中のPrPresは白血球を除きめつたに検出されない。新規の酸性SDS沈殿法と高感度化学発光法とを組み合わせるにより、プロテイナーゼK耐性3F4反応性タンパクが、スクレイピー感染ハムスターの血漿中からは検出されるが、疑似感染ハムスターでは検出されないことが示された。血漿中においてPrPresは他の血漿タンパクと糖鎖を通じて凝集しており、スクレイピー感染ハムスター血漿において検出可能となったことが示唆された。	
90030	2008/10/23	80632	異型ク ロイツ フェルト ト・ヤコ ブ病	PLoS ONE 2008; 3: e2878	野生型マウスおよびヒトPrPを発現しているトランスジェニックマウスに、輸血関連vCJD感染第1号症例由来の脳材料を接種し、輸血によるヒト-ヒト間の2次感染後のvCJD病原体の性質について調べた。その結果、潜伏期間、臨床症状、神経病理学的特徴およびPrP型について、vCJD(輸血)接種群はvCJD(BSE)接種群と類似していた。vCJD病原体は、ヒトにおける2次感染により、有意な変化が起こらないことが明らかとなった。	35
90055	2008/11/19	80714	異型ク ロイツ フェルト ト・ヤコ ブ病	PLoS ONE 2008; 3: e3017	非定型BSE(BASE)に感染した無症候のイタリアの乳牛の脳ホモジネートをカニクイザルに脳内接種した。BASE接種サルは生存期間が短く、古典的BSEまたはvCJD接種サルとは異なる臨床的展開、組織変化、PrPresパターンを示した。感染牛と同じ国の孤発性CJD患者でPrPが異常なウエスタンブロットを示す4例のうち3例のPrPresに同じ生化学的特徴を認めた。BASEの霊長類における高い病原性および見かけ上孤発性CJDである症例との関連の可能性が示唆された。	36

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90007	2008/09/26	80498	異型ク ロイツ フェル ト・ヤコ ブ病	Transfusion 2008; 48: 609- 619	ヒツジのリコンビナントPrP(rPrP)のヒツジにおける血 液クリアランスならびにスクレイパー関連フィブリル(SAF)静注後のPrPresへの曝露について調べた。rPrPのARR変異型は、VRQ変異型よりもより早く除去された。また、PrPcのARR変異型のクリアランスがVRQ変異型のクリアランスよりも大きいことが示された。rPrPの血漿クリアランスは、両腎臓摘出後は52%減少し、rPrP除去に腎臓が重要であることが示された。PrPresはSAF静注後は緩やかに除去された。	
90007	2008/09/26	80498	感染	56th Annual Meeting of the American- Society-of- Tropical- Medicine-and- Hygiene 1044	ヒト顆粒球アナプラズマ症(HGA)の発生率は、1999年以来2倍となった。原因病原体のAnaplasma phagocytophilumによる血液の安全リスクを調査するため、間接免疫蛍光法を用いてコネチカット州及びマサチューセッツ州の血液ドナーのA. phagocytophilumに対するヒトIgG抗体を測定した。その結果、2001年から2006年に採取された15,828ドナー血清中432例(2.7%)が抗体陽性であった。比較的高い陽性率が持続していることから、更なる調査が必要である。	
90045	2008/10/29	80668	感染	Transfusion 2008; 48: 1739- 1753	最近米国で承認された2つのフィブリノゲンおよびトロンピンについて、HIV、HCV、HBV、HAV、パルボウイルスB19およびvCJDに関する病原体感染リスクを評価した。これら血液製剤の製造過程では2つの異なった不活化および除去工程が使われている。全製剤とも1バイアル当たりの残存する病原体感染リスクは極めて低いことが示された。	37
90014	2008/09/29	80517	感染	Transfusion 2008; 48: 304- 313	血小板濃厚液におけるUVC照射の病原体不活化能を検討した。UVC照射は、血小板の品質に影響を及ぼさず、細菌(表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌および大腸菌)ならびに伝播性胃腸炎ウイルスなど広範なウイルス(HIVおよびシミアンウイルス40を除く)を不活化することができた。しかし、HIVのような血液感染性ウイルスに対応するには、UVC法をさらに最適化することが必要である。	
90014	2008/09/29	80517	感染	Transfusion 2008; 48: 697- 705	欧州の3つの血液センターにおけるアモトサレンおよびUVAによるフォトケミカル処理(PCT)過程のプロセスバリデーション試験を行った。フィブリノーゲンおよび第VIII因子はPCTにより平均26%減少したが、治療用血漿として十分なレベルを保持していた。他の凝固因子は対照FFPのレベルの81-97%であった。PCT処理済FFP中の凝固因子が治療用血漿に関する欧州規制および国内基準の範囲内に保持されることが示された。	
90014	2008/09/29	80517	感染	Vox Sanguinis 2008; 94: 315- 323	アモトサレンと紫外線A波で光化学処理した血小板(PCT-PLT)の輸血に関連する有害事象を調べるために能動的血液安全監視プログラムを実施した。患者1400名に7437件のPCT-PLTが輸血され、その内、68件が有害事象と関連付けられた。PCT-PLT輸血に関連した急性輸血反応は発現頻度が低く、ほとんどが軽度であった。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90014	2008/09/29	80517	感染	Vox Sanguinis 2008; 95(Suppl. 1), 2A-S01-02	化学的または光化学的遺伝子修飾に基づいた血液製剤中の病原体不活化(PI)は広範囲のスペクトルの予防的アプローチである。溶媒界面活性剤(SD)およびメチレンブルー法は欧州の多くの国で使われている。アモトサレン(Intercept)、リポフラビンを用いた新しい方法が導入されている。リポフラビン、UVおよび可視光線を用いる血小板(PC)、血漿および赤血球のためのPI法が開発中である。	38
90040	2008/10/24	80645	狂犬病	ProMED-mail20080826.2660	1990年から2007年の中国における狂犬病発生傾向を調べた研究によると、最近8年間でヒト狂犬病症例数が急激に増加したことが明らかとなった。ヒト狂犬病は1990年から1996年の間は全国的な狂犬病ワクチン接種プログラムにより抑制され、わずか159症例が報告されただけであるが、2006年は3279症例と激増した。	39
90014	2008/09/29	80517	原虫感染	Emerg Infect Dis 2008; 14: 1013-1018	リーシュマニア症は生物媒介性疾患で、南ヨーロッパに定着しており、毎年700例近く、トルコを含めると3950例のヒトでの感染が報告されている。無症候症例は臨床症例の30~100倍とみられ、また飼犬の血清陽性率は25%と推定される。薬剤耐性Leishmania infantumがイヌを介して拡大するおそれもある。全ヨーロッパレベルでの研究が必要である。	40
90013	2008/09/29	80516	細菌感染	American Society for Microbiology 108th General Meeting 2008年6月1-5日	マサチューセッツの医療センターで品質管理のため使用された廃棄製剤、使用期限切れロット、アフエーシスの残りの人血清アルブミン製剤を入手し、クラミジアの有無を調べた。その結果、PCR及びウエスタンブロットにより、4社の20製剤全てにおいてクラミジアの存在が確認された。また、in vitro培養を行ったところ11検体(55%)でクラミジア生菌が生育した。	41
90030	2008/10/23	80632	細菌感染	Transfusion 2008; 48: 1520-1521	骨髓異形成症候群と汎血球減少症の79歳男性が、血小板輸血と続いて赤血球1単位の輸血を受けた。40分後に39.6°Cの発熱、硬直、背部痛、低血圧および低酸素症を呈し、輸血は中止された。患者は抗菌剤による治療で回復した。患者の血液および赤血球バッグの残存物からStreptococcus pneumoniae血清型4が検出された。赤血球輸血によるS pneumoniae感染の初めての症例である。	42
90014	2008/09/29	80517	細菌感染	Vox Sanguinis 2008; 94: 193-201	ルックバック調査でPropionibacterium acnes汚染が推定される血小板濃縮製剤(PC)の保存から輸血までを追跡したところ、輸血後の有害事象は見られなかった。In vitro試験でプロピオン酸菌属の臨床分離菌をPCに接種し、好氣的に22°Cで10日間保存という条件下での生育を調べたところ、細菌の生育は緩慢か生育を認めなかった。プロピオン酸菌属はPC保存条件下では増殖しないため、検出されないか、輸血後に検出されると考えられた。	

血対ID	受理日	番号	感染症(PT)	出典	概要	新出文献No.
90014	2008/09/29	80517	細菌感染	第56回 日本輸血・細胞治療学会総会 2008年4月25-27日 WS-3-3	血小板濃厚液の輸血後に、TRALI様の急性呼吸不全と髄膜炎を併発し、血小板残液からBacillus cereusが検出された症例の報告である。TRALI様の急性呼吸不全を呈した際は、輸血後感染症も視野に入れた対応が必要である。髄膜炎併発例の報告はこれまでに無いが、輸血後感染症治療では髄液移行性も考慮した抗生剤選択が求められる。培養検査だけでなく、遺伝子検査まで施行することが、診断及び同一菌株の証明に重要である。	
90040	2008/10/24	80645	手足口病	WHO Representative Office in China 2008年5月19日	2008年3月下旬、中国Anhui省Fuyang市で未就学児3名が重症の肺炎と急激な悪化により死亡し、4月中旬までに15名の小児が同様の疾患で死亡した。調査の結果、エンテロウイルス71による手足口病と確定された。同市では、3月1日から5月9日の間に、6,049例報告され、353例が重篤で、22例が死亡した(致死率0.4%)。患者数は、4月の初めに増加し始めて、4月28日にピークに達し、5月5日以後減少した。	
90014	2008/09/29	80517	梅毒	SignOnSanDiego.com 2008年3月26日	カリフォルニア州サンディエゴ郡の年間梅毒症例数は、最低となった2000年の28例から昨年(2007年)は340例まで急増した。州の他の大都市の郡と比べて非常に急激な増加である。増加率は州全体の2倍以上、全国の3倍以上になる。州から派遣された5名の専門家チームは、梅毒と診断された人々と連絡をとって、性的パートナーを探し、検査を受けるよう勧めている。	

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数			報告日	第一報入手日 2008. 8. 18	新医薬品等の区分 該当なし	機構処理欄
一般的名称	新鮮凍結人血漿		研究報告の公表状況	Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Kumada H; Japan de novo Hepatitis B Research Group. Clin Infect Dis. 2008 Sep 1;47(5):e52-6.	公表国 日本	
販売名(企業名)	新鮮凍結血漿「日赤」(日本赤十字社) 新鮮凍結血漿-LR「日赤」(日本赤十字社)					
21 研究報告の概要	○日本においてB型肝炎の治癒後再燃した患者の劇症肝不全による死亡率 本邦において、新たにB型肝炎表面抗原が陽性化した552名のうち、B型肝炎の治癒後に再燃した患者は23名(4%)であることが判明した。このうち5名が劇症肝不全を発症し、死亡率は100%だった。B型肝炎再燃患者の転帰は、6名(26%)が肝臓関連死、11名(48%)が感染消失、6名(26%)が慢性化した。急性感染の患者(529名)では490名(93%)が自然治癒、16名(3%)が慢性化、21名(4%)が死亡となり、B型肝炎再燃患者の死亡率が急性感染患者と比較して有意に高いことが示された。B型肝炎再燃で劇症肝不全を発症した患者(5名)は、発症しなかった患者(18名)と比べて悪性リンパ腫の罹患率が高く、全員がリツキシマブを含む化学療法を受けていた。劇症肝不全を発症しなかった患者18名中16名がラミブジンの投与を受けていた。					使用上の注意記載状況・ その他参考事項等 新鮮凍結血漿「日赤」 新鮮凍結血漿-LR「日赤」 血液を介するウイルス、 細菌、原虫等の感染 vCJD等の伝播のリスク
	報告企業の意見			今後の対応		
日本において、新たにB型肝炎表面抗原が陽性化した552名のうち、B型肝炎の治癒後に再燃した患者は23名(4%)で、急性感染患者と比較して劇症肝不全、慢性化、肝臓関連死に至る割合が高いことが判明したとの報告である。輸血後HBV感染症の調査では、化学療法などに伴うB型肝炎の再燃について考慮する必要がある。			日本赤十字社では、HBs抗原検査及びHBc抗体検査を実施することに加えて、HBVについて20プールでスクリーニングNATを行い、陽性血液を排除している。また、これまでの凝集法と比べて、より感度の高い化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)及び精度を向上させた新NATシステムを導入した。HBV感染に関する新たな知見等について今後も情報の収集に努める。			

BRIEF REPORT

Mortality Secondary to Fulminant Hepatic Failure in Patients with Prior Resolution of Hepatitis B Virus Infection in Japan

Takeji Umemura,¹ Eiji Tanaka,¹ Kendo Kiyosawa,^{1*} Hiromitsu Kumada,² and the Japan de novo Hepatitis B Research Group[†]

¹Department of Internal Medicine, Hepatology, and ²Gastroenterology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, and [†]Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

Hepatitis B virus (HBV) reactivation in patients with resolved HBV infection was found in 23 (4%) of 552 newly hepatitis B surface antigen–positive patients in Japan. Because one-fourth of cases develop into fulminant hepatic failure and mortality is 100%, management of HBV reactivation in patients with resolved HBV infection should be discussed.

Reactivation of hepatitis B virus (HBV) is becoming a well-recognized complication in patients with chronic HBV infection who are undergoing cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy [1–5]. HBV reactivation has a variety of manifestations, ranging from subclinical increases in transaminase activity to severe and potentially fatal fulminant hepatic failure (FHF). Because clinical studies have demonstrated that lamivudine therapy reduces the rate of HBV reactivation and mortality [6–9], prophylactic antiviral therapy is advised for HBV carriers at the onset of chemotherapy [10].

The clearance of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and the appearance of antibody to HBsAg, with normalization of liver function, is generally accepted as evidence of clinical and serologic recovery from acute hepatitis B. However, HBV replication has been shown to persist at low levels in the liver for decades [11–13], which may explain the recent increase in the rate of HBV reactivation in patients with resolved infection during or after chemotherapy and transplantation [1, 5, 14–

16]. Although reactivation led to FHF and even death in some cases [17–22], the incidence of and mortality associated with HBV reactivation have not been fully clarified in this context. Recently, a prospective study [23] from Hong Kong revealed that 3.3% of HBsAg-negative patients developed HBV reactivation after chemotherapy. In Japan, because ~20% of individuals are positive for at least 1 HBV marker [24], HBV reactivation during or after immunosuppressive treatment may become a critical issue in the near future. Thus, we investigated the mortality associated with and prevalence and clinical significance of HBV reactivation in Japanese patients with resolved HBV infection in a multicenter, cross-sectional study.

Methods. In 2005, we sent a questionnaire to 230 hospitals certified by the Japan Society of Hepatology; this included questions about patients who had become newly positive for serum HBsAg from January 2000 through December 2004 [25]. A total of 1239 patients were registered by 93 hospitals (40%). Of those patients, 55 were recorded as having experienced HBV reactivation after having resolved HBV infection, and the remaining 1184 patients were classified as having acute hepatitis B. Sixty-three (68%) of 93 hospitals responded to a second survey and provided information on 552 patients enrolled in this study; 23 of these patients developed HBV reactivation, and 529 had acute hepatitis B.

HBV reactivation was defined (according to a slight modification of the report by Hui et al. [23]) as a decrease in the level of antibody to HBsAg that was associated with the reappearance of HBsAg, a 3-fold elevation of serum alanine aminotransferase (ALT) level above normal, and detection of HBV DNA in serum during or after chemotherapy. The diagnoses of acute hepatitis B and FHF were defined as reported elsewhere [26]. Patients with other liver diseases were excluded. Serum HBV markers were determined as reported elsewhere [26]. Serum levels of HBV DNA were determined with use of Amplicor HBV Monitor kits (Roche Diagnostics) at each hospital when the patients were admitted. HBV genotypes were determined with use of the PCR-invader method, with genotype-specific probes [27]. This study was approved by the ethics committees of appropriate institutional review boards. Informed consent was obtained from each patient in accordance with the Helsinki Declaration.

The Mann-Whitney *U* test was used to analyze continuous variables. The χ^2 test with Yate's correction was used for analysis of categorical data. In cases in which the number of patients was <5, Fisher's exact test was used. *P* ≤ .05 was considered to

Received 25 March 2008; accepted 16 May 2008; electronically published 21 July 2008.

* Present affiliation: Nagano Red Cross Hospital, Nagano, Japan.

† Members of the study group are listed at the end of the text.

Reprints or correspondence: Dr. Takeji Umemura, Dept. of Internal Medicine, Gastroenterology, and Hepatology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan (tmemura@shinshu-u.ac.jp).

Clinical Infectious Diseases 2008; 47:e52–6

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2008/4705-00E2\$15.00

DOI: 10.1086/590968

be statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS, version 15.0J (SPSS).

Results. We first compared the demographic, clinical, and virologic features of the 23 patients who experienced HBV reactivation with those of the 529 patients with acute hepatitis B (table 1). The reactivation group had a significantly higher median age and median serum HBV DNA level ($P < .001$) and significantly lower peak ALT and albumin levels ($P < .001$). Although HBV genotype was not determined for one-half of the patients with acute hepatitis B, marked differences in the distribution of genotypes were seen; HBV type A occurred less frequently ($P = .003$) among patients with HBV reactivation than among those with acute hepatitis. However, HBV type B occurred more frequently among patients with HBV reactivation ($P < .001$).

FHF was more common among patients with HBV reactivation than among those with acute hepatitis ($P = .048$). Of the 23 cases of HBV reactivation, 6 (26%) resulted in liver-related death, 11 (48%) resolved, and 6 (26%) led to chronic hepatitis B. In contrast, of the 529 cases of acute hepatitis B, 490 (93%) were self-limited, 16 (3%) became chronic, and 21 (4%) resulted in death. These results revealed that liver-related mortality was significantly higher in the group with HBV reactivation than in the group with acute hepatitis ($P < .001$).

We then compared the clinical features of FHF between the groups (table 2). Patients with HBV reactivation had a higher median age, significantly lower peak ALT levels ($P = .006$),

higher HBV DNA levels ($P = .035$), and higher mortality ($P = .031$) than did patients with acute hepatitis B.

Malignant lymphoma-associated morbidity was significantly higher among patients with HBV reactivation who developed FHF than among those who did not develop FHF (table 3). A rituximab-containing treatment regimen was administered to all patients who experienced FHF, compared with only 4 (22%) of 18 patients who did not experience FHF ($P = .004$). Lamivudine was administered to 16 (89%) of 18 patients who did not experience FHF and to all patients who experienced FHF at 7 and 20 days after hospital admission, respectively; this suggests that lamivudine treatment could not prevent FHF after HBV reactivation. Eventually, liver-related mortality occurred exclusively in patients who experienced FHF. There were no statistically significant differences between the 2 subgroups regarding HBV markers.

Discussion. Although a prospective study by Hui et al. [23] revealed that the incidence of HBV reactivation among HBsAg-negative patients after chemotherapy was 3.3%, there are no data available on HBV reactivation in Japan. In our nationwide cross-sectional study, a total of 552 newly HBsAg-positive patients were registered from 63 tertiary care hospitals. Overall, HBV reactivation was found in 4% of patients with resolved infection after chemotherapy. Serum and liver samples were not available before chemotherapy for most of these patients; therefore, we were unable to prove specifically whether reactivation was a result of occult or acute HBV infection. However,

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with hepatitis B virus (HBV) reactivation, compared with those of patients with acute hepatitis B.

Characteristic	Patients with HBV reactivation	Patients with acute hepatitis B	P
Age, median years (95% CI)	63 (39–83)	33 (19–64)	<.001
Male sex	14/23 (61)	374/529 (71)	NS
Peak ALT level, median IU/L (95% CI)	929 (137–2441)	2300 (299–6626)	<.001
Peak bilirubin level, median mg/dL (95% CI)	10.3 (0.3–58.6)	6.4 (1.0–23.7)	NS
Lowest albumin level, median g/dL (95% CI)	3.2 (2.1–3.7)	3.6 (2.7–4.2)	<.001
Most prolonged PT%, median % (95% CI)	65.0 (10.2–121.4)	75.0 (11.0–103.1)	NS
HBV DNA level, median log copies/mL (95% CI)	7.5 (4.0 to >7.6)	5.5 (2.6 to >7.6)	<.001
Genotype			
A	0/19 (0)	57/232 (25)	.003
B	8/19 (42)	27/232 (12)	<.001
C	11/19 (58)	141/232 (61)	NS
Other	0/19 (0)	7/232 (3)	
Treatment			
Lamivudine	20/23 (87)	118/529 (22)	<.001
IFN	5/23 (22)	12/529 (2)	<.001
Fulminant hepatic failure	5/23 (22)	45/529 (9)	.048
Liver-related death	6/23 (26)	21/529 (4)	<.001

NOTE. Data no. (%) of patients, unless otherwise indicated. ALT, alanine aminotransferase; NS, not statistically significant; PT, prothrombin time.

Table 2. Demographic and clinical characteristics of patients with hepatitis B virus (HBV) reactivation who experienced fulminant hepatic failure (FHF), compared with those of patients with acute hepatitis B who experienced FHF.

Characteristic	Patients with FHF		P
	With HBV reactivation	With acute hepatitis B	
Age, median years (95% CI)	63 (47-64)	48 (18-72)	.029
Male sex	3/5 (60)	26/45 (58)	NS
Peak ALT level, median IU/L (95% CI)	907 (359-1823)	5995 (589-11,858)	.006
Peak bilirubin level, median mg/dL (95% CI)	20.8 (10.2-45.7)	9.9 (4.9-30.5)	.099
Lowest albumin level, median g/dL (95% CI)	2.6 (2.1-3.0)	2.9 (1.9-3.9)	NS
Most prolonged PT%, median % (95% CI)	22.0 (8.7-32.3)	16.0 (0.2-37.0)	NS
HBV DNA level, median log copies/mL (95% CI)	7.6 (5.6 to >7.6)	5.7 (2.6 to >7.6)	.035
Genotype			
A	0/5 (0)	2/16 (13)	NS
B	1/5 (20)	3/16 (19)	NS
C	4/5 (80)	11/16 (69)	NS
Received lamivudine treatment	5/5 (100)	29/45 (81)	NS
Liver-related death	5/5 (100)	21/45 (47)	.031

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. ALT, alanine aminotransferase; NS, not statistically significant; PT, prothrombin time.

because all patients were negative for HBsAg and positive for antibody to hepatitis B core antigen before treatment, we presumed that reactivation was occult in nature.

In our study, patients who experienced HBV reactivation were significantly older and had lower serum albumin levels, compared with patients with acute hepatitis B. The immune status of many patients may have been further decreased by cytotoxic chemotherapy. Approximately 20% of the patients who experienced HBV reactivation developed FHF. Surprisingly, mortality was 100%, implying that FHF in these cases is severe. Both the prevalence of and mortality associated with FHF were significantly higher among patients who experienced HBV reactivation than among those with acute HBV infection. Although the group with HBV reactivation also had lower albumin levels at the onset of lamivudine therapy, the development of FHF could not be predicted from this study. Thus, it is crucial to prevent FHF in patients with HBV reactivation with use of agents other than—or complimentary to—lamivudine. Unfortunately, preemptive therapy is not recommended because of the difficulties in detecting reactivation. Hui et al. [23] recommended monthly testing of HBV DNA levels and immediate antiviral therapy when levels are 100-fold the levels before chemotherapy. However, this strategy is still controversial [28, 29] and needs testing in a randomized study.

A recent study revealed that HBV type Bj and G1896A mutations were independently associated with a fulminant outcome in patients with acute HBV infection [30]. However, HBV genotype, serum HBV DNA level, or mutations in G1896A or A1762T/G1764A did not influence the development of FHF in patients who experienced HBV reactivation in this study. HBV

reactivation in patients infected with HBV genotype A was also not found in this study, which may be explained by the fact that this genotype occurs in only 1.7% of patients with chronic hepatitis B in Japan [31].

Because our study and other studies [23] have confirmed that HBV reactivation can be fatal, we need to emphasize greater testing of HBV markers, including antibody to hepatitis B core antigen, antibody to HBsAg, and HBV DNA levels before administration of chemotherapy, especially therapy containing rituximab. Patients with resolved HBV infection should be routinely monitored for liver function and HBV DNA levels, and antiviral therapy should be administered immediately when evidence of HBV reactivation is found.

In conclusion, HBV reactivation is found in 4% of newly HBsAg-positive patients with resolved HBV infection in Japan. One-fourth of cases of HBV reactivation develop into FHF, and mortality is extremely high. Because our study was unable to distinguish HBV reactivation from occult HBV infection and could not clarify whether antiviral therapy was effective, a prospective study is being planned to clarify the mechanism of HBV reactivation and the benefits of antiviral therapy.

Japan de novo Hepatitis B Research Group. Tetsuya Ishikawa (Aichi Medical University), Takaaki Otake (Asahikawa Medical University), Kunihide Ishii (Asakura Hospital), Ken-ichi Fukai (Chiba University), Yoichi Hiasa and Morikazu Onji (Ehime University), Yuichi Tanabe (Fukuoka City Hospital), Kozou Fujio (Fukuyama City Hospital), Tatsuro Sakata (Fukuyama Medical Center), Eiichi Tomita (Gifu Municipal Hospital), Hideki Hagiwara (Higashiosaka City General Hospital), Mikiya Kitamoto (Hiroshima Prefectural Hospital), Shoichi

Table 3. Demographic and clinical characteristics of patients with hepatitis B virus (HBV) reactivation who did and did not experience fulminant hepatic failure (FHF).

Characteristic	Patients with HBV reactivation		P
	Experienced FHF (n = 5)	Did not experience FHF (n = 18)	
Age, median years (95% CI)	63 (47–64)	63 (39–78)	NS
Male sex	3 (60)	11 (61)	NS
Peak ALT level, median IU/L (95% CI)	907 (359–1823)	1016 (124–2524)	NS
Peak bilirubin level, median mg/dL (95% CI)	20.8 (10.2–45.7)	7.6 (0.3–24.9)	.094
Lowest albumin level, median g/dL (95% CI)	2.6 (2.1–3.0)	3.3 (2.2–3.6)	.015
Most prolonged PT%, median % (95% CI)	22.0 (8.7–32.3)	77.5 (18.0–101.8)	<.001
ALT level, ^a median IU/L (95% CI)	176 (83–1035)	266 (58–1690)	NS
Bilirubin level, ^a median mg/dL (95% CI)	0.7 (0.4–7.2)	0.7 (0.3–13.6)	NS
Albumin level, ^a median g/dL (95% CI)	3.4 (2.5–3.5)	3.9 (2.8–4.5)	.035
PT%, ^a median % (95% CI)	42.2 (16.4–46.4)	83.7 (38.7–123.5)	NS
HBV DNA level, median log copies/mL (95% CI)	7.6 (5.6 to >7.6)	7.5 (4.0 to >7.6)	NS
Genotype			
Bj	1 (20)	7/14 (50)	NS
C	4 (80)	7/14 (50)	NS
Mutation			
G1896A	4 (80)	5/12 (42)	NS
A1762T/G1764A	2 (40)	2/12 (17)	NS
Non-Hodgkin lymphoma	5 (100)	8 (44)	.046
Received a rituximab-containing treatment regimen	5 (100)	4 (22)	.004
Treatment			
Lamivudine	5 (100)	16 (89)	NS
IFN	1 (20)	4 (22)	NS
Liver-related death	5 (100)	1 (6)	<.001

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. ALT, alanine aminotransferase; NS, not statistically significant; PT, prothrombin time.

^a Laboratory data are from the start of lamivudine therapy.

Takahashi (Hiroshima University), Yuji Oka (Hitachi General Hospital), Koichi Abe (Iwate Medical University), Makoto Oke-tani and Hirohito Tsubouchi (Kagoshima University), Akito Sakai (Kanazawa University), Mutsumi Tsuchishima (Kana-zawa Medical University), Gotaro Yamada (Kawasaki Medical University), Yoshihiro Akahane (Kofu Municipal Hospital), Akihide Masumoto (Kokura National Hospital), Hiroyuki Shi-momura (Kurashiki Central Hospital), Tatsuya Ide (Kurume University), Masahito Minami (Kyoto Prefectural University), Sawako Inoue (Kyushu University), Michimori Kono (Matsue City Hospital), Motoo Iwasa (Mie University), Naoya Murash-ima (Mishuku Hospital), Shigehiko Sainokami (Mizusawa Hos-pital), Masayuki Kurosaki Musashino Red Cross Hospital), Toru Ishikawa (Nagaoka Red Cross Hospital), Hiroshi Yatsuhashi (Nagasaki Medical Center), Shogo Okoshi (Niigata Uni-versity), Kenji Soga (Nippon Dental University Niigata), Shi-getoshi Fujiyama (NTT West Japan Kyushu Hospital), Yuji Kato (Oita Prefectural Hospital), Tetsuo Takehara and Morikazu Seki (Osaka University), Hiromasa Yoshihara (Osaka Rosai Hospi-tal), Tadakazu Sekine (Saiseikai Kawaguchi General Hospital),

Shuichi Miyase (Saiseikai Kumamoto Hospital), Tomoteru Ka-mimura (Saiseikai Niigata Daini Hospital), Shuichi Kubo (Sais-eikai Yokohama Nanbu Hospital), Yoshiyasu Karino (Sapporo-Kosei General Hospital), Masamichi Nagasawa (Seirei Hamamatsu General Hospital), Takayoshi Ito (Showa Univer-sity), Chiaki Okuse (St. Marianna University), Akira Sato (St. Marianna University Yokohama City Seibu Hospital), Atsushi Tanaka (Teikyo University), Jong-Hon Kang (Teine Keijinkai Hospital), Yoshiyuki Ueno (Tohoku University), Yusei Ikeda (Tokyo Kosei Nenkin Hospital), Naoaki Hashimoto (Tokyo Teishin Hospital), Takuji Yamada (Tomei Atsugi Hospital), Kenji Ikeda (Toranomom Hospital), Mari Kawakami (Tottori University), Terumi Takahara (Toyama University), Sumio Ka-wata (Yamagata University), Takahiro Kodama (Yamaguchi Grand Center), and Takaaki Ikeda (Yokosuka Kyou-sai Hospital).

Acknowledgments

Financial support. Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (to K.K.) and Viral Hepatitis Research Foundation of Japan (to T.U.).

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

1. Wands JR, Chura CM, Roll FJ, Maddrey WC. Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology* 1975; 68:105-12.
2. Galbraith RM, Eddleston AL, Williams R, Zuckerman AJ. Fulminant hepatic failure in leukaemia and choriocarcinoma related to withdrawal of cytotoxic drug therapy. *Lancet* 1975; 2:528-30.
3. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JG, Bales ZB. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981; 94:744-8.
4. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DF, et al. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med* 1982; 96:447-9.
5. Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy: report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100:182-8.
6. Lau GK, Yiu HH, Fong DY, et al. Early is superior to deferred pre-emptive lamivudine therapy for hepatitis B patients undergoing chemotherapy. *Gastroenterology* 2003; 125:1742-9.
7. Leaw SJ, Yen CJ, Huang WT, Chen TY, Su WC, Tsao CJ. Preemptive use of interferon or lamivudine for hepatitis B reactivation in patients with aggressive lymphoma receiving chemotherapy. *Ann Hematol* 2004; 83:270-5.
8. Yeo W, Chan PK, Ho WM, et al. Lamivudine for the prevention of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B s-antigen seropositive cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 927-34.
9. Yeo W, Ho WM, Hui P, et al. Use of lamivudine to prevent hepatitis B virus reactivation during chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88:209-15.
10. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-39.
11. Kuhns M, McNamara A, Mason A, Campbell C, Perrillo R. Serum and liver hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B after sustained loss of surface antigen. *Gastroenterology* 1992; 103:1649-56.
12. Fong TL, Di Bisceglie AM, Gerber MA, Waggoner JG, Hoofnagle JH. Persistence of hepatitis B virus DNA in the liver after loss of HBsAg in chronic hepatitis B. *Hepatology* 1993; 18:1313-8.
13. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994; 93:230-9.
14. Dhedin N, Douvin C, Kuentz M, et al. Reverse seroconversion of hepatitis B after allogeneic bone marrow transplantation: a retrospective study of 37 patients with pretransplant anti-HBs and anti-HBc. *Transplantation* 1998; 66:616-9.
15. Seth P, Alrajhi AA, Kagevi I, et al. Hepatitis B virus reactivation with clinical flare in allogeneic stem cell transplants with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30:189-94.
16. Kempinska A, Kwak EJ, Angel JB. Reactivation of hepatitis B infection following allogeneic bone marrow transplantation in a hepatitis B-immune patient: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1277-82.
17. Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 2001; 344:68-9.
18. Westhoff TH, Jochimsen F, Schmittl A, et al. Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood* 2003; 102:1930.
19. Sarrecchia C, Cappelli A, Aiello P. HBV reactivation with fatal fulminating hepatitis during rituximab treatment in a subject negative for HBsAg and positive for HBsAb and HBcAb. *J Infect Chemother* 2005; 11:189-91.
20. Law JK, Ho JK, Hoskins PJ, Erb SR, Steinbrecher UP, Yoshida EM. Fatal reactivation of hepatitis B post-chemotherapy for lymphoma in a hepatitis B surface antigen-negative, hepatitis B core antibody-positive patient: potential implications for future prophylaxis recommendations. *Leuk Lymphoma* 2005; 46:1085-9.
21. Sera T, Hiasa Y, Michitaka K, et al. Anti-HBs-positive liver failure due to hepatitis B virus reactivation induced by rituximab. *Intern Med* 2006; 45:721-4.
22. Kitano K, Kobayashi H, Hanamura M, et al. Fulminant hepatitis after allogeneic bone marrow transplantation caused by reactivation of hepatitis B virus with gene mutations in the core promoter region. *Eur J Haematol* 2006; 77:255-8.
23. Hui CK, Cheung WW, Zhang HY, et al. Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology* 2006; 131:59-68.
24. Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, et al. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community-acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. *Gastroenterology* 1994; 106:1596-602.
25. Umemura T, Kiyosawa K. Fatal HBV reactivation in a subject with anti-HBs and anti-HBc. *Intern Med* 2006; 45:747-8.
26. Umemura T, Tanaka E, Ostapowicz G, et al. Investigation of SEN virus infection in patients with cryptogenic acute liver failure, hepatitis-associated aplastic anemia, or acute and chronic non-A-E hepatitis. *J Infect Dis* 2003; 188:1545-52.
27. Tadokoro K, Kobayashi M, Yamaguchi T, et al. Classification of hepatitis B virus genotypes by the PCR-invader method with genotype-specific probes. *J Virol Methods* 2006; 138:30-9.
28. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:936-62.
29. Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Kinetics of hepatitis B virus reactivation after chemotherapy: more questions than answers. *Gastroenterology* 2006; 131:1656 (author reply: *Gastroenterology* 2006; 131:1657).
30. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 44:326-34.
31. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33:218-23.

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2008. 6. 23	新医薬品等の区分 該当なし	機構処理欄
一般的名称	(製造販売承認書に記載なし)	研究報告の公表状況	FDA, CBER. 2008 May 20; Available from: URL: http://www.fda.gov/cber/gdlns/reentrybld.htm	公表国 米国	
販売名(企業名)	合成血-LR「日赤」(日本赤十字社) 照射合成血-LR「日赤」(日本赤十字社)				
研究報告の概要	<p>○業界向けガイダンス案:B型肝炎コア抗体(抗HBc抗体)検査陽性により供血延期となった供血者の供血再開(リエントリー)についての適格性確認方法</p> <p>米国食品医薬品局(FDA)は、B型肝炎コア抗体が陽性となったために供血延期となった供血者のリエントリー・アルゴリズムを提案するガイダンス案を発表した。これまで、HBc抗体が2回以上陽性となった供血者は無期限に供血延期とされていた。FDAの試算では、1980年代後半から90年代にかけて、HBc抗体が偽陽性だったために供血延期となった人は毎年約21,500名にのぼり、これまでに20万人以上の供血適格者が供血できなくなっている。</p> <p>本ガイダンスでは、HBc抗体検査が2回目に陽性となった後、8週間以上経ってから高感度のHBV NATによってHBV感染が否定された場合は供血可能となる。フォローアップの際に、HBV NAT陽性、HBs抗原繰り返し陽性、HBc抗体繰り返し陽性のいずれかに該当する場合は無期限供血延期となる。</p>				使用上の注意記載状況・ その他参考事項等
					合成血-LR「日赤」 照射合成血-LR「日赤」
報告企業の意見		今後の対応			
米国食品医薬品局(FDA)は、B型肝炎コア抗体が陽性となったために供血延期となった供血者のリエントリー・アルゴリズムを提案するガイダンス案を発表したとの報告である。米国ではもともとHBV感染者が少なくワクチンも普及していることから、日本と状況は異なるが、偽陽性者のリエントリーの方法としては参考になると考えられる。		日本赤十字社では、HBs抗原検査及びHBc抗体検査を実施することに加えて、HBVについて20プールでスクリーニングNATを行い、陽性血液を排除している。HBV感染に関する新たな知見等について今後も情報の収集に努める。また、これまでの凝集法と比べて、より感度の高い化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)及び精度を向上させた次世代NATを導入した。			

Guidance for Industry

Requalification Method for Reentry of Blood Donors Deferred Because of Reactive Test Results for Antibody to Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc)

DRAFT GUIDANCE

This guidance document is for comment purposes only.

Submit comments on this draft guidance by the date provided in the *Federal Register* notice announcing the availability of the draft guidance. Submit written comments to the Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, Rm. 1061, Rockville, MD 20852. Submit electronic comments to <http://www.regulations.gov>. You should identify all comments with the docket number listed in the notice of availability that publishes in the *Federal Register*.

Additional copies of this draft guidance are available from the Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite 200N, Rockville, MD 20852-1448, or by calling 1-800-835-4709 or 301-827-1800, or from the Internet at <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

For questions on the content of this guidance, contact Robin Biswas, M.D., at 301-827-3011.

**U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Biologics Evaluation and Research
May 2008**

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

Table of Contents

I.	INTRODUCTION.....	1
II.	BACKGROUND	2
III.	RECOMMENDATIONS.....	4
IV.	IMPLEMENTATION	5
V.	REFERENCES.....	6
	APPENDIX.....	8

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

Guidance for Industry

Requalification Method for Reentry of Blood Donors Deferred Because of Reactive Test Results for Antibody to Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc)

This draft guidance, when finalized, will represent the Food and Drug Administration's (FDA's) current thinking on this topic. It does not create or confer any rights for or on any person and does not operate to bind FDA or the public. You can use an alternate approach if the approach satisfies the requirements of the applicable statutes or regulations. If you want to discuss an alternate approach, contact the appropriate FDA staff. If you cannot identify the appropriate FDA staff, call the appropriate number listed on the title page of this guidance.

I. INTRODUCTION

We, FDA, are providing recommendations to you, establishments that collect human blood or blood components, for a requalification method or process for the reentry of deferred donors into the donor pool based on a determination that previous tests that were repeatedly reactive for antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) were falsely positive and that there is no evidence of infection with hepatitis B virus (HBV). Currently, donors who are repeatedly reactive on more than one occasion for anti-HBc (samples from more than one collection from the donor are repeatedly reactive for anti-HBc), must be indefinitely deferred, in accordance with Title 21 Code of Federal Regulations, section 610.41(a) (21 CFR 610.41(a)). Although it may seem unlikely that two anti-HBc tests would be false positives, such situations have occurred with some frequency because of the relative non-specificity of these tests. The result is that many otherwise suitable donors are indefinitely deferred because of their anti-HBc test results even though medical follow-up of such donors indicates that they are not infected with HBV.

The availability of an FDA-licensed hepatitis B virus nucleic acid test (HBV NAT), which is particularly sensitive when single samples are tested, provides an additional, powerful method of determining whether a donor who has been deferred because of anti-HBc reactivity is truly infected by HBV. Due to the availability of this licensed HBV NAT and the improved specificity of anti-HBc assays, we are recommending in this guidance a reentry algorithm for donors deferred due to falsely positive repeatedly reactive tests for anti-HBc.

FDA's guidance documents, including this guidance, do not establish legally enforceable responsibilities. Instead, guidances describe the FDA's current thinking on a topic and should be viewed only as recommendations, unless specific regulatory or statutory requirements are cited. The use of the word *should* in FDA's guidances means that something is suggested or recommended, but not required.

Contains Nonbinding Recommendations

Draft – Not For Implementation

II. BACKGROUND

A. Clinical Significance of Donor Screening for Hepatitis B Virus Infection

HBV is a major human pathogen that causes acute and chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Ref. 1). HBV is an enveloped virus with a partially duplex circular deoxyribonucleic acid (DNA) genome of approximately 3,200 bases. Most primary infections in adults are self-limited; the virus is cleared from the blood and liver, and individuals develop a lasting immunity. Fewer than 5% of infected adults develop chronic infections that can be asymptomatic (i.e., a carrier state). About 20% of chronically infected individuals develop cirrhosis. Chronically infected subjects have 100 times higher risk of developing hepatocellular carcinoma than non-carriers. The mortality of acute HBV infection is about 1%. In the United States, deaths from chronic HBV infection are estimated to range from 3,000 to 5,000 individuals per year (Ref. 2).

Currently, HBV is transmitted by blood transfusions more frequently than hepatitis C virus or human immunodeficiency virus (HIV). The residual risk of post-transfusion HBV infection from donations screened for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBc have been estimated as 1 in 63,000 donations (Ref. 3) to 1 in 180,000 donations (Ref. 4). The major cause of HBV transmission by blood is attributable to donations from asymptomatic donors with acute HBV infections who have not yet developed HBsAg (i.e., donors in the seronegative window period), and from donors with chronic infections in which serological markers are not detected (occult hepatitis B).

Seronegative blood donations from infected individuals can transmit hepatitis B. In such cases, lookback studies using polymerase chain reaction have shown that HBV DNA can be detected at low levels in the donor's blood (Ref. 5).

HBsAg becomes detectable in blood 30 to 60 days after infection followed by emergence of anti-HBc. Viremia develops by the time HBsAg is detected, and can reach 10^9 - 10^{10} virions/ml in acute infections (Ref. 1). Upon clearance of the HBV infection by the immune response, the HBsAg antigen disappears from the circulation and detectable anti-HBc and antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) usually persists indefinitely. There is evidence that anti-HBc can decrease and even disappear over a period of decades in resolved infections (Ref. 6). In chronically infected individuals, tests for HBsAg and anti-HBc usually remain positive for life and lower viral titers can be detected in blood for a long period but tend to decline over time.

HBV NAT assays for detection of HBV DNA have been developed. So far, one test has been licensed for screening blood donations using a minipool sample format. This assay is also indicated for testing samples from individual donations, thus increasing test sensitivity. In a BPAC meeting on October 21, 2004 (Ref. 15), we proposed a revised reentry algorithm in which subsequent testing of the donor for HBsAg and anti-HBc is

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

retained, but sensitive HBV DNA testing using a licensed NAT would replace anti-HBs testing. While the Committee did not take a formal vote on FDA's proposed algorithm, the Committee did not raise any objections to FDA's proposal. We are not proposing additional testing for anti-HBs as part of donor reentry because extensive hepatitis B vaccination programs have been in place for a number of years, resulting in many individuals having anti-HBs from vaccination. As a result, anti-HBs now has questionable value as a marker of hepatitis B infection.

Since October 21, 2004, we have licensed a qualitative test for the direct detection of HBV DNA in human plasma from donations of Whole Blood and blood components for transfusion, and Source Plasma. The availability of a sensitive, FDA-licensed HBV NAT assay, particularly when single samples are tested, provides an additional, powerful method of determining whether a donor who has been deferred because of anti-HBc reactivity is truly infected by HBV. Due to the availability of a licensed HBV NAT and the improved specificity of anti-HBc assays, we are proposing a reentry algorithm for anti-HBc in this guidance.

B. Rationale for the Requalification Method for Reentry

Under 21 CFR 610.40(a), you must test each donation of human blood or blood component intended for use in preparing a product, including donations intended as a component of, or used to prepare, a medical device, for evidence of infection due to HBV. Testing for evidence of infection includes testing for the presence of HBsAg and anti-HBc. In addition, some blood establishments also test blood donations for HBV DNA by NAT.

Under 21 CFR 610.41(a), blood establishments must defer donors who test reactive¹ by a screening test for evidence of infection due to a communicable disease agent(s) listed in 21 CFR 610.40(a). However, donors who test repeatedly reactive for anti-HBc on only one occasion need not be deferred (21 CFR 610.41(a)(1)), although the donation collected would be unsuitable (Ref. 11). Donors who test reactive on more than one occasion do not fall within this provision and must be deferred under 21 CFR 610.41(a).

Under 21 CFR 610.41(b), we provided for reentry of a deferred donor who is subsequently "found to be suitable as a donor of blood or blood components by a requalification method or process found acceptable for such purposes by FDA."

Until now, we have not recommended a requalification method for reentry of donors deferred due to repeatedly reactive test results for anti-HBc because there was no

¹ In 21 CFR 610.41(a), FDA requires that blood establishments defer donors who test reactive by a screening test for evidence of infection due to a communicable disease agent listed in section 610.40(a). In section 610.41(a)(1), however, a donor who tests reactive for anti-HBc on only one occasion is not required to be deferred. In this guidance, we refer to reactive test results for HBsAg and anti-HBc as "repeatedly reactive" to accurately describe the testing algorithm for anti-HBc.

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

supplemental (additional, more specific) test available. Although donor screening for anti-HBc has contributed to blood safety, a large proportion of donors with anti-HBc reactivity who fulfill all other donor suitability criteria have been indefinitely deferred on the basis of potentially false positive anti-HBc test results (Refs. 7, 16). It is estimated that as many as 21,500 potentially eligible donors were deferred annually in the late 1980s and 1990s because of false positive anti-HBc results, and that over 200,000 donors could be eligible for reentry (Ref. 7).

III. RECOMMENDATIONS

For purposes of reentering into the donor pool a donor who has been indefinitely deferred because of having tested repeatedly reactive for anti-HBc on more than one occasion, we recommend that, after a minimum of 8 weeks following the last repeatedly reactive anti-HBc test, you obtain a pre-donation blood sample (i.e., a blood sample which is obtained prior to any next donation) from the donor for follow-up testing, using licensed tests for HBsAg, anti-HBc and HBV DNA by NAT. Provided that the blood sample test results are negative for HBsAg, anti-HBc and HBV NAT, the donor may, at a later date, return to donate blood. When the donor returns to donate, subsequent to the negative tests for HBsAg, anti-HBc, and HBV NAT on the pre-donation sample, we recommend that you reenter the donor as eligible to donate Whole Blood and blood components, provided that all other suitability criteria are met.

For donor retesting, we recommend that a minimum 8-week (56 days) period elapse following the last repeatedly reactive anti-HBc test, because this time period provides sufficient confidence that at least one of the three HBV markers (HBsAg, anti-HBc, and HBV DNA) will be detectable if the donor had been truly infected with HBV at the time of that last anti-HBc reactive donation (Ref. 1). In addition, 56 days is the minimum time period permitted between donations of Whole Blood (21 CFR 640.3(b)).

For purposes of reentry, we recommend that you use a licensed HBV NAT labeled as having a sensitivity of ≤ 10 copies /mL (at 95 % detection rate). This sensitivity reflects the current technological capabilities regarding sensitivity of HBV NAT assays. Depending upon the assay and the platform used, this sensitivity may only be achieved when testing individual donor samples.

Donor reentry following deferral for repeatedly reactive tests for anti-HBc on more than one occasion:

- A. You may reenter into the donor pool a donor who has been indefinitely deferred solely because of repeatedly reactive tests for anti-HBc on more than one occasion if (see flow chart in the Appendix):
 1. After a minimum of 8 weeks following the last repeatedly reactive anti-HBc test, you collect a follow up sample from the donor, and this sample tests

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

negative on licensed tests for HBsAg, anti-HBc, and HBV DNA by NAT (sensitivity at 95% detection rate of ≤ 10 copies/mL)

and

2. When the donor presents to donate, subsequent to the negative tests for HBsAg, anti-HBc, and HBV NAT, you determine that the donor meets all eligibility criteria for donors of Whole Blood and blood components
- B.** You should continue to indefinitely defer a donor who was deferred for anti-HBc reactivity on more than one occasion and whose sample or donation tests repeatedly reactive on the: 1) HBsAg test (whether or not the neutralization test is positive), 2) anti-HBc test, or 3) HBV NAT. Positive results on tests for HBsAg, anti-HBc or HBV NAT may be useful in donor counseling.
- C.** If you wish to perform follow-up testing on a donor who is deferred because of anti-HBc test results, you may do so before the end of the 8-week waiting period for donor notification purposes or for medical reasons. Negative test results on follow-up for HBsAg, anti-HBc, and HBV NAT (sensitivity at 95% detection rate of ≤ 10 copies/mL), may be useful in donor counseling. However, only negative results for all three tests, obtained at least 8 weeks after the last repeatedly reactive anti-HBc result, would qualify the donor for reentry. If you obtain a reactive HBV NAT, or repeatedly reactive HBsAg or anti-HBc, or positive HBsAg result on any of these tests during this 8-week waiting period, the donor would not be eligible for reentry, and we recommend that you defer the donor indefinitely.

IV. IMPLEMENTATION

This guidance is being distributed for comment purposes only.

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

V. REFERENCES

1. Ganem, D., Prince, A.M. (2004). "Hepatitis B Virus Infection – Natural History and Clinical Consequences." *N. Engl. J. Med.*, 350, 1118-1129.
2. Alter, M.J. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology of HBV Infection and Prevention Programs. Presentation to the Advisory Committee on Blood Safety and Availability, August 27, 2004.
3. Schreiber, G.B., Busch, M.P., Kleinman, S.H., Korelitz, J.J. (1996). "The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections." *N. Engl. J. Med.*, 334(26), 1685-1690.
4. Busch MP. Overview of NAT and Reduction of Residual Risk in Infectious Disease Transmission. Presentation at the FDA Workshop on Application of Nucleic Acid Testing to Blood Pathogens and Emerging Technologies. December 4 – 5, 2001. <http://www.fda.gov/cber/minutes/workshop-min.htm#01>
5. Roth, W.K., Weber, M., Petersen, D., Drosten, C., Buhr, S., Sireis, W., Weichert, W., Hedges, D., Seifried, E. (2002). "NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety." *Transfusion*, 42, 869-875.
6. Seeff, L.B., Beebe, G.W., Hoofnagle, J.H., et al. (1987). "A Serologic Follow-Up of The 1942 Epidemic of Post-Vaccination Hepatitis in the United States Army." *N. Eng. J. Med.*, 316(16), 965-970.
7. Kleinman, S.H., Kuhns, M.C., Todd, D.S., Glynn, S.A. McNamara, A., DiMarco, A., Busch, M.P. for the Retrovirus Epidemiology Donor Study. (2003). "Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening." *Transfusion*, 43, 696-704.
8. Allain, J-P. (2004). "Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion." *Vox Sang*, 86, 83-91.
9. Busch, M.P. (2004). "Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors?" *Transfusion Clinique et Biologique*, 11, 26-32.
10. Hoofnagle, J.H. (1990). "Posttransfusion Hepatitis B" (Editorial). *Transfusion*, 30, 384-386.
11. FDA Memorandum to All Registered Blood Establishments: "FDA Recommendations Concerning Testing for Antibody to Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc)," September 10, 1991. <http://www.fda.gov/cber/memo.htm>.

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

12. NIH Consensus Statement: "Infectious Disease Testing for Blood Transfusions." Volume 13, Number 1, January 9-11, 1995.
13. FDA Memorandum to All Registered Blood and Plasma Establishments: "Recommendations for the Quarantine and Disposition of Units from Prior Collections from Donors with Repeatedly Reactive Screening Tests for Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV) and Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)," July 19, 1996.
<http://www.fda.gov/cber/memo.htm>.
14. Hepatitis B Anti-Core Reentry (Anti-HBc). Blood Products Advisory Committee 61st Meeting; Transcript, December 10, 1998.
www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/98/transcpt/3479t1.pdf
15. FDA's Current Thinking on Reentry of Donors Deferred for Repeated Detection of Antibody to Hepatitis B Core Antigen: Blood Products Advisory Committee 81st Meeting; Transcript, October 21, 2004. www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cber04.html#BloodProducts
16. Tegtmeier, G, Henderson, S, McNamara, A, Kuhns, M. (1997). Contribution of Anti-HBc Screening to Blood Safety at a Regional Blood Center in the United States *Transfusion*, 37, 110S (Abstr. S439).

Contains Nonbinding Recommendations

Draft –Not For Implementation

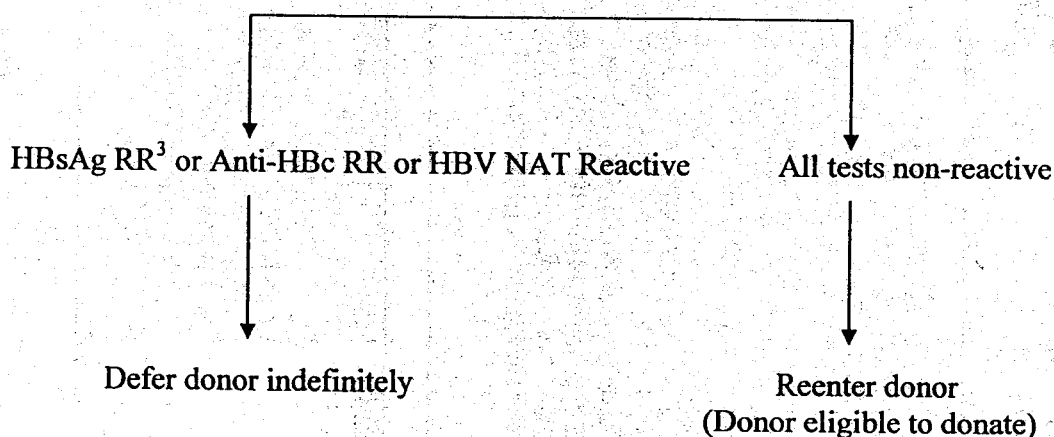
APPENDIX

REENTRY FOR DONORS DEFERRED BECAUSE OF REPEATEDLY REACTIVE TEST RESULTS FOR ANTI-HBc

Donors previously deferred solely because of repeatedly reactive anti-HBc test on more than one occasion



After a minimum of 8 weeks¹ following the last repeatedly reactive anti-HBc test results on more than one occasion, test a follow-up sample using licensed HBsAg and anti-HBc tests, and HBV NAT²



¹ If the donor sample is tested before 8 weeks following the last repeatedly reactive anti-HBc test results on more than one occasion, a) if the sample tests HBsAg RR or anti-HBc RR or HBV NAT reactive, the donor is indefinitely deferred, and b) if the sample tests negative on all three of these tests, the donor should be retested after a minimum of 8 weeks following the last repeatedly reactive anti-HBc test result on more than one occasion using licensed HBsAg and anti-HBc tests, and HBV NAT.

² The sensitivity of the HBV NAT used should be ≤ 10 copies/mL, at 95% detection rate.

³ Regardless of the neutralization test result.

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数			報告日	第一報入手日	新医薬品等の区分	総合機構処理欄
一般的名称	新鮮凍結血漿、濃厚赤血球		研究報告の 公表状況	Journal of hepatology (England) Jun2008, 48 (6) p1022-5.	公表国	
販売名(企業名)	-				英国	
研究報告の概要	<p>潜在性 B 型肝炎ウイルス感染者 (OBI) の血液は抗 HBs 抗体が陽性であれば感染性がないと考えられているが、スロヴェニアにおいて、冠動脈バイパス術で濃厚赤血球と新鮮凍結血漿 (HBs 抗原陰性で抗 HBe 抗体陽性、抗 HBs 抗体低力価陽性、HBV DNA 陽性) が輸血された 59 歳の患者が、その 4 ヶ月後に急性 B 型肝炎を発症した。</p> <p>また、もう一例、先の例の感染源と同じ供血血液から得られた濃厚赤血球 (RCC) の輸血を受けた 71 歳の患者が、受血の 7 ヶ月後に HBV 感染を認めた (HBV に感染した 2 例はドナーと同じ配列を有するジェノタイプ D 型が感染していた)。</p> <p>原因となった供血血液は、抗 HBe 抗体及び抗 HBs 抗体 (12IU/L) が陽性であったが、HBV DNA も陽性であり、この供血者のこれまで及びそれ以後のサンプルには低量のウイルスと抗 HBs 抗体が含まれていたが、過去 2 回分の供血血液では HBV 感染は起きていなかった。</p> <p>今回の 2 例の受血者は手術の外傷に加え、加齢により免疫が低下していたことがウイルスに対する感受性を増大させたとも考えられる。</p> <p>OBI は感染性を持つが HBV DNA スクリーニングで検出可能であるので、抗 HBe 抗体も HBV NAT も実施されていない国の保健当局は慎重に考慮すべきである。</p>					<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</p> <p>重要な基本的注意</p> <p>(1) 本剤の原材料となる (献血者の) 血液については、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、・・・陰性で、かつ ALT (GPT) 値でスクリーニングを実施している。さらに、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査 (NAT) を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。</p>
	報告企業の意見	今後の対応				
<p>HBs 抗原陰性で抗 HBs 抗体低力価陽性、HBV DNA 陽性の血液による B 型肝炎感染の報告である。</p> <p>血漿分画製剤の原料血漿はミニプール血漿における NAT 検査で HBV DNA 陰性を確認しており、最終製品においても HBV DNA 陰性を確認している。</p>	今後ともに潜在性 B 型肝炎ウイルス感染に関する安全性情報に留意していく。					

39



Case Report

**Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious
in two transfusion recipients[☆]**

Snezna Levicnik-Stežinar^{1,*}, Urska Rahne-Potokar¹, Daniel Candotti², Nico Lelie³,
Jean-Pierre Allain⁴

¹Blood Transfusion Center of Slovenia, Ljubljana, Slovenia

²National Health Service Blood and Transplant, Cambridge, UK

³Chiron/Novartis Europe, Suresnes, France

⁴Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, UK

Background/Aims: Occult hepatitis B infection (OBI) in blood donations is not considered infectious when anti-HBs is present.

Methods: Four months after transfusion of eight blood components during coronary arterial bypass surgery, a 59-year-old patient developed acute hepatitis B. A second 71-year-old patient transfused with a red cell concentrate (RCC) from one of these donations had early HBV infection 7 months post-transfusion. Samples were tested for HBV serological markers and HBV DNA was quantified and sequenced.

Results: One implicated donation contained anti-HBc, anti-HBs (12 IU/L) and 180 IU/ml of HBV DNA. Previous and subsequent samples contained 3–10 times lower viral load and slightly variable anti-HBs. Two previous donations did not cause HBV infection. Recipients of the FFP and RCC from the index donation were both HBV infected and carried genotype D strains with sequences identical to the donor strain.

Conclusions: Despite anti-HBs, an OBI carrier transmitted HBV to two immunocompetent transfusion recipients.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HBV; Occult HBV; Infectivity; Blood transfusion

Received 14 January 2008; received in revised form 14 February 2008;
accepted 19 February 2008

Associate Editor: M. Colombo

* The work reported has in part been presented in abstract form at the European congress of the International Society of Blood Transfusion in Madrid, Spain, June 2007. Dr. Nico Lelie is an employee of Chiron/Novartis but was not involved in the writing of the drafts of the manuscript except for specific comments. Prof J.P. Allain has been an occasional speaker at meetings organised by Chiron/Novartis but does not otherwise have a conflict of interest. The other co-authors do not have any declared conflict of interest.

Corresponding author. Tel.: +386 1 5438 150; fax: +386 1 430 27 84.

E-mail address: snezna.levicnik@ztm.si (S. Levicnik-Stežinar).

Abbreviations: OBI, occult HBV infection; HBV, hepatitis B virus; RCC, red cell concentrate; FFP, fresh frozen plasma; anti-HBc, antibody to hepatitis B virus core antigen; anti-HBs, antibody to hepatitis B virus surface antigen; QPCR, real-time PCR; BCP/PC, basic core promoter/pre-core.

1. Introduction

In Slovenia, approximately 100,000 donations per year are collected. However, in 2005–2007, six cases of HBV transmission by transfusion were reported. Incidence was probably underestimated due to a high frequency of subclinical infection. Since HBsAg serological screening with a sensitive assay is systematically performed, transfusion transmission of HBV can originate from either recent infections in the pre-HBsAg seroconversion window period or occult HBV infection (OBI). OBI is defined as an atypical carrier state characterized by the presence of HBV DNA in plasma without detectable hepatitis B surface antigen (HBsAg) with or without antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) and hepatitis B surface antigen (anti-HBs) [1].

It is generally accepted that HBV DNA in blood may carry the risk of transmission, particularly in the pre-HBsAg window phase [2]. However, the transmission risk of OBIs is not well defined, although some cases of OBIs with anti-HBc only infectious by transfusion were described [2,3].

HBV transmission by blood components from a single anti-HBs positive OBI donation to two recipients is presented.

2. Case report

A patient who had been transfused 4 months previously with five units of fresh frozen plasma (FFP) and three units of RCC was suspected of acute hepatitis B. Stored samples from each implicated donation were tested for HBV markers. Seven samples were HBV marker negative. One sample was anti-HBc reactive and contained HBV DNA. The implicated donor was identified and stored samples from eight previous donations and one donation subsequent to the index donation as well as three follow-up samples were tested for HBV markers.

The first recipient of an FFP unit from the index donation was a 59-year-old male who was screened negative for HBV markers 3 days prior to cardiac arterial bypass. He was transfused on 23rd June, 2005. Four months later, clinical and laboratory evidence of acute Hepatitis B was obtained. ALT level was 1821 IU/L, HBsAg and anti-HBc IgM became reactive. No sample was available for HBV DNA testing. In a sample collected 4 months later, HBsAg was undetectable, IgM anti-HBc remained present and HBV DNA was at low level (Table 1).

The second recipient of the index donation was a 71-year-old female who received two units of RCC following orthopedic surgery. No pre-surgical HBV screening was performed and no post-surgical evidence of HBV infection was noted. A blood sample obtained 7 months after transfusion was anti-HBc negative but HBsAg positive and contained a high level of HBV DNA (Table 1). Nine months post-transfusion, ALT level was 566 IU/L. At 14 months post-transfusion the patient had recovered.

2.1. Methods

Routine blood donation screening for HBsAg was performed using Abbott PRISM (Abbott laboratories, Delkenheim, Germany). HBsAg repeat testing, anti-HBc and anti-HBs assays were performed with Abbott AxSYM. Cobas Amplicor HBV Monitor (Roche, Basel, Switzerland) and in-house real-time PCR (QPCR) as previously described were used to detect and quantify HBV DNA [4]. Basic core promoter/pre-core region (BCP/PC), Pre-S/S regions and full HBV genome were amplified, sequenced and phylogenetically analyzed as described [5].

3. Results and discussion

The index donation met the criteria defining 'occult' hepatitis B virus carriage since the plasma contained no detectable HBsAg but HBV DNA, anti-HBc and low titer of anti-HBs. This pattern was consistent 7 and 16 months after the index donation. Seven prior donations carried anti-HBc and anti-HBs although HBV DNA ranged between 7 and 63 IU/ml when tested

Table 1
Hepatitis B virus markers in the OBI donor and two HBV infected recipients

	Time from Index donation (m)	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	Anti-HBs (IU/L)	HBV DNA (IU/ml)		HBV genotype
						Amplicor	QPCR	
Donor	-45	-	+	ND	29	Neg	63	
	-37	-	+	ND	15	Neg	Neg	
	-31	-	+	ND	16	Neg	35	
	-23	-	+	ND	16	Neg	45	
	-19	-	+	ND	19	Neg	7	
	-13	-	+	ND	15	Neg	ND	
	-6	-	+	ND	15	Neg	ND	
	Index	-	+	ND	12	<60	180	D
	+3	-	+	ND	53	Neg	ND	
	+7	-	+	ND	31	Neg	16	
+12	-	ND	ND	ND	ND	Neg		
+16	-	+	ND	25	Neg	40		
Recipient 1	-3 days	-	-	ND	-	ND	ND	
	+4	+	+	+	-	ND	ND	
	+8	-	+	+	-	12	185	D
Recipient 2	+7	+	-	-	-	1.1×10^6	1.7×10^8	D
	+14	-	+	+	-	Neg	ND	

-, non-reactive; ND, not done; Neg, negative.

with a sensitive in-house assay but was consistently undetectable by a commercial assay except in the Index sample. This pattern indicates recovery from >5 years past HBV infection (Table 1). Despite being tested with the high sensitivity assay, two of the nine donor samples tested remained HBV DNA negative, suggesting fluctuations of viremia. Prior to the index donation, anti-HBs levels were essentially stable (15–29 IU/L) but increased from 12 to 53 IU/L 3 months later suggesting minimal immune response. There was no clinical evidence that 14 previous donations and one subsequent donation were infectious to recipients. Pre- and post-transfusion samples from recipients of –71 and –13 month-donations showed no serological evidence of HBV infection. The –71 recipient was negative for HBsAg, anti-HBc and anti-HBs pre-transfusion, and 4 months post-transfusion, HBsAg was negative but anti-HBc was not tested. The –13 month recipient did not carry HBsAg, anti-HBc or anti-HBs 42 months after transfusion.

In contrast, there is strong evidence that both recipients of the index donation were HBV infected since acute hepatitis B occurred in recipient 1, 4 months after transfusion. In recipient 2, the 7-month post-transfusion sample containing HBsAg and high HBV DNA load without anti-HBc strongly suggested recent acute HBV infection and was followed by serological evidence of recovery (Table 1). A high ALT level 9 months post-transfusion that normalized after 14 months further supported this conclusion. The 4-month and probably 7-month long incubation time observed in recipients 1 and 2, respectively, could be explained by a relatively low infectious dose further decreased by partial anti-HBs neutralization (calculated on the basis of 180 IU/ml of HBV DNA and 200 ml of FFP for recipient 1 at 200,000 copies and 20,000 copies in 20 ml of RCC plasma for recipient 2). Published data indicated that lower infectious dose prolonged HBV incubation time and milder symptoms [6]. Transfusion transmission was further demonstrated by the Pre-S/S sequence identity between the index donation, recipient 1 and recipient 2 strains from follow-up samples. The whole genome sequences of recipient 2 and index donation were identical. Strains were of genotype D. Of note, the deduced amino acid sequence of the S protein was wild-type when compared to the genotype D consensus sequence except for A117T and S133Y, neither of these substitutions being recognized as escape mutants. An escape mutant mechanism explaining the infectivity of the index donation but not of the other donations from the donor was thus excluded. Similar cases of breakthrough HBV infection with wild-type strains have been described [7]. Although suppression of the HBV replication and gene expression is a reported cause of occult HBV [8], no mutation in the parts of the genome implicated in replication was found. Imperfect containment

of viral replication by the donor immune system is the most likely cause of low levels of HBV DNA.

The stability of HBV DNA load and anti-HBs in multiple samples preceding the index donation and tested simultaneously contained 6–10 times less viral DNA than the index donation (Table 1). It is therefore speculated that the main factor singling out the index donation was a temporarily higher viral load sufficient to overcome the relatively weak neutralizing capacity of a low anti-HBs level (Table 1). This interpretation is supported by the subsequent increase in anti-HBs level suggesting a weak immune response.

Published data reporting the infectivity of OBIs by transfusion are rare. One case of transmission by a donation carrying anti-HBc without anti-HBs was reported in Japan [2]. Another study reported five donors (4 genotype D, one genotype A2) with OBI also carrying only anti-HBc transmitting to recipients. Of 51 traced recipients, 28 (54.9%) either developed fulminant, fatal, hepatitis B (3 cases) or carried anti-HBc post-transfusion although no pre-transfusion testing was performed [3]. In the Japanese study, 16 donations contained both anti-HBc and anti-HBs and no evidence of HBV transmission was found [2] confirming previous results [9]. The two cases reported here appear to be the first related to an OBI donor with anti-HBs. Data collected in Poland indicated that approximately 50% of OBIs in asymptomatic, apparently healthy, blood donors carry anti-HBs [10] and that levels of DNA and anti-HBs are variable as reported here.

Considering that the recipients at age 59 and 71, respectively, might have presented a mild, age-related, immunodeficiency added to the trauma of major surgery might have played a role in increasing susceptibility to viral infection [11]. The fact that approximately 50% of recipients of blood components in Western Europe present some degree of immunodeficiency related to age, chemotherapy or therapeutic immunosuppression suggests an increased susceptibility to HBV infection [12]. Limited but convincing evidence that OBIs can be infectious and can be detected by HBV DNA screening should be carefully considered by the health authorities of countries where neither anti-HBc nor HBV NAT are implemented.

Despite their apparent uniqueness, our two cases of HBV transmission need to be factored in discussions regarding HBV blood safety policy. They clearly illustrate that the neutralizing capacity of low-level anti-HBs is limited and reinforce the validity of considering anti-HBs below 100 IU/L to be poorly protective from infectivity when HBV DNA is present. However, even in the presence of higher levels of anti-HBs, in a severely immunodeficient recipient, HBV DNA-containing blood might be infectious and the clinical expression severe.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the International Society of Blood Transfusion (2007-01) and Chiron/Novartis Corporation.

We gratefully acknowledge Drs. Irena Kramar and Slavica Maver for their contribution in tracing the recipients of previous donations.

References

- [1] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83–91.
- [2] Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with lower hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007;47:1197–1205.
- [3] Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harrishoj LH, Lattermenn A, Wienzek S, et al. HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: transmission and pathogenicity. *J Med Virol* 2007;79:S32–S36.
- [4] Allain JP, Candotti D, Soldan K, Sarkodie F, Phelps B, Giachetti C, et al. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. *Blood* 2003;101:2419–2425.
- [5] Candotti D, Opare-Sem O, Rezvan H, Sarkodie F, Allain JP. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus in deferred Ghanaian blood donors with and without elevated alanine amino transferase. *J Viral Hepat* 2006;13:715–724.
- [6] Barker LF, Murray R. Relationship of virus dose to incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen. *Am J Med Sci* 1972;263:27–33.
- [7] Gerlich WH. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *J Clin Virol* 2006;36:S18–S22.
- [8] Zahn A, Li C, Danso K, Candotti D, Owusu-Ofori S, Temple J, et al. Molecular characterization of occult hepatitis B in genotype E-infected subjects. *J Gen Virol* 2008;89:409–418.
- [9] Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, Hollinger FB, Mimms LT, Solomon LR, et al. Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion* 1995;35:5–12.
- [10] Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain J-P, Letowska M. Characterization of HBV DNA positive/HBsAg negative blood donors identified in the Polish NAT screening program. *Hepatology* 2006;44:1666–1674.
- [11] Reed W, Lee TH, Norris PJ, Utter GH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism: a new complication of blood transfusions in severely injured patients. *Semin Hematol* 2007;44:24–31.
- [12] Llewelyn C, Williamson L. Immunodeficiency and recipients of blood transfusion. *EuroSat* 2004; Paris, France [Abstract].

医薬品
医薬部外品 研究報告 調査報告書
化粧品

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2008年3月13日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
一般的名称	①献血アルブミン-Wf ②献血アルブミン(5%)-Wf ③ノイアート ④ノイアート静注用 1500 単位 ⑤ハプトグロビン注・ヨシトミ ⑥コンコエイト-HT	研究報告の 公表状況	Veterinary Science in China 2007; 37 (11): 921-925	公表国 中国	
販売名 (企業名)	①②人血清アルブミン ③④乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ ⑤人ハプトグロビン ⑥乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子				
研究報告の概要	<p>文献中のヒト HBV の S 遺伝子の配列に従って、ブタ HBV の S 遺伝子のための 2 つのプライマーを設計し合成した。ブタの肝臓と血清のサンプルを中国の畜殺場から集めた。次いで、RT-PCR を使って S 遺伝子を増幅し配列決定を行った。その結果、ブタとヒトの HBV の S 遺伝子の配列は 98-100% の相同性を示した。HBV 陽性血漿の発光透過型電子顕微鏡による測定の結果、ウイルス粒子は直径 20 および 40nm であることが分かった。それら粒子は、ヒトの HBV 粒子と直径と形状が類似していた。陽性血清は、ELISA 法による HBV の表面抗原の存在によって確認した。ORF2/ORF3 のオーバーラップ領域から設計された 1 対の degenerated primers に対する nested RT-PCR アッセイから、HEV の遺伝子配列はブタの肝臓には存在するが、血清には存在しないことが示唆された。</p>				<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</p> <p>代表としてノイアート（献血）の記載を示す。 2. 重要な基本的注意 (1) 本剤の原材料となる献血者の血液については、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、抗 HIV-1 抗体、抗 HIV-2 抗体、抗 HTLV-1 抗体陰性で、かつ ALT (GPT) 値でスクリーニングを実施している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査 (NAT) を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分から人アンチトロンビン III を濃縮・精製した製剤であり、ウイルス不活化・除去を目的として、製造工程において 60℃、10 時間の液状加熱処理及びウイルス除去膜によるろ過処理を施しているが、投与に際しては、次の点に十分注意すること。</p>
	報告企業の意見			今後の対応	
<p>中国の畜殺場から集めたブタの肝臓および血清からブタ B 型肝炎ウイルス、ブタ肝臓から E 型肝炎ウイルスを検出したとの報告である。 万一、ヘパリンの原料であるブタ小腸粘膜に HBV または HEV が混入したとしてもそれぞれ PRV および PPV をモデルウイルスとしたウイルスバリデーション試験成績から、ヘパリンの製造工程において十分に不活化・除去されると考えている。</p>			<p>本報告は本剤の安全性に影響を与えないと考えるので、特段の措置はとらない。</p>		

45



屠宰猪肝和血清中乙型肝炎病毒及戊型肝炎病毒的检测

李文贵^{1,3}, 余锐萍¹, 韦海涛², 赵景义², 刘利强¹, 李秀敏², 王英华¹, 王德成¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107;

3. 云南农业大学 动物科学学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 应用 1 对乙型肝炎病毒(HBV)S 基因保守区的引物, 采用 PCR 方法从屠宰猪肝、血清中检测到了 HBV, 序列分析表明, 扩增片段与已发表的 HBV S 基因的同源性高达 98%~100%。电镜负染色样品观察结果表明, 在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dane 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。针对戊型肝炎病毒(HEV) ORF2/ORF3 重叠区设计了简并引物, 采用巢式 RT-PCR 对屠宰猪肝和血清样品进行了检测。结果表明, 部分屠宰猪肝中存在 HEV。

关键词: 猪; 乙型肝炎病毒; 戊型肝炎病毒; 电镜观察

Detection of swine hepatitis B virus and E viruses in the liver and serum in pigs in China

LI Wen-gui^{1,3}, SHE Rui-ping¹, WEI Hai-tao², ZHAO Jing-yi², LIU Li-qiang¹,
LI Xiu-min², WANG Ying-hua¹, WANG De-cheng¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Institute of Beijing Animal Husbandry and Veterinary, Beijing 100107, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The study reported the presence of swine hepatitis B(HBV) and E(HEV) viruses in the liver and serum in pigs in China. Two primers for S gene of swine HBV were designed and synthesized according to sequences of the S genes of human HBV in the literature. Swine liver and serum samples were collected from a slaughter house. Swine S genes were amplified with RT-PCR and sequenced. Results showed that sequences of S genes of swine and human HBV viruses shared 98%—100% homology. Emission transmission electron microscopy examination of HBV-positive serum revealed presence of virus particles 40—20 nm in diameter. These particles were similar to human HBV particles in terms of both diameters and shapes. A positive serum was defined by the presence of the HBV surface antigen using the ELISA method. Responses in a nested RT-PCR assay to a pair of degenerated primers designed from ORF2/ORF3 overlapping region indicated presence of gene sequence of HEV in the liver, but not serum, in some pigs.

Key words: swine; hepatitis B virus; hepatitis E virus; electron microscopy

嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae)有正嗜肝 DNA 病毒属(Orthohepadnavirus)及禽类嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus) 2 个属。正嗜肝 DNA 病毒属包括人乙型肝炎病毒(HBV)、灵长类嗜肝病毒和啮齿动物嗜肝病毒, 禽类嗜肝 DNA 病

毒属包括鸭乙型肝炎病毒、苍鹭乙型肝炎病毒、雪雁乙型肝炎病毒等。这些病毒的共同特点为: 基因组长 3.0~3.3 kb, 具有部分双链的环状 DNA, 外有包膜, 核心内有基因组及病毒所编码的特异 DNA 聚合酶。除病毒颗粒外, 产生大量的病毒包膜脂蛋白

收稿日期: 2007-06-11; 修回日期: 2007-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771588)

作者简介: 李文贵(1973-), 男, 云南昆明人, 讲师, 博士生。余锐萍为通讯作者, E-mail: sheruiping@126.com

颗粒不仅有很窄的宿主谱,一般可致持续病毒感染,而具有较明确的嗜肝性^[1]。资料表明,畜禽中也存在一个嗜肝病毒群。自 20 世纪 80 年代以来,国内有猪、鸡、牛、羊、犬等动物检出乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的报道屡见不鲜,并有分离到类乙肝病毒的手稿^[2-9]。2006 年余锐萍等^[10-11]应用免疫组织化学方法对北京、河南等地肉联厂屠宰猪肝的人乙型肝炎病毒抗原进行检测,结果发现人乙型肝炎病毒抗原检出率高达 73%~100%。

戊型肝炎(Hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)感染引起的经肠道传播的急性病毒性肝炎,主要通过粪口传播。我国是 HE 高发区,被列为戊肝发病和死亡所致经济负担最严重的国家之一。有学者认为,猪是 HEV 主要宿主,日本已有因食用 HEV 污染的猪肝导致人感染的报道。对戊肝非流行区从事与猪相关职业人群和对照人群的研究表明,从事与猪相关职业者可增加 HEV 感染的风险。最近又发现了一些猪 HEV 感染人的证据^[12-13]。总之,HB 和 HE 严重地威胁人类的健康,而人类病毒性肝炎的发病率还在不断上升。动物,尤其是与人类关系十分密切的猪体内的 HBV 和 HEV 带毒情况如何,它们与人的 HBV 和 HEV 的同源性怎样,都还不十分清楚。本试验应用 PCR 技术,在原有研究的基础上,进一步对屠宰猪血清和肝的 HBV S 基因、HEV RNA 进行了检测,并应用免疫电镜负染色技术观察了屠宰猪血清中的 HBV。

1 材料与与方法

1.1 样品

屠宰猪肝、血液采自北京市某肉联厂。

1.2 酶与试剂

Trizol 购自北京普博欣生物科技公司;Taq 酶、dNTP 购自北京博大泰克公司;Oligo(dT)、引物购自上海生工生物工程技术有限公司;MMLV Reverse Ace 和 RNA 酶抑制剂为 TOYOBO 公司产品;NCR quick 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒购自新长江生物科技有限公司;各种限制性内切酶、pMD18-T 载体为大连宝生物工程有限公司产品。

1.3 SHBV 的 PCR 检测

1.3.1 DNA 提取 血清中 DNA 的提取:取猪血清 100 μ L 加入 300 μ L TES 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 5 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS, 200 mg/L 蛋白酶 K), 55 $^{\circ}$ C 消化 5 h, 用酚-氯仿-异戊醇提取 2~3 次, 取上清加 1/10 体积 3 mol/L

NaAc, 再加入 2.5 倍体积无水乙醇进行沉淀, 用 700 mL/L 乙醇洗沉淀 1 次, 干燥后溶于 20 μ L 灭菌水中备用。

肝中 DNA 的提取:取新鲜肝组织标本称重约 1~2 g, 加液氮研成粉末, 取约 20 mg 加入 DNA 提取液(0.5 mmol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 10 g/L SDS, 0.01 mol/L NaCl, 500 μ g/mL 蛋白酶 K), 42~48 $^{\circ}$ C 过夜, 用酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA。
1.3.2 PCR 扩增 采用针对 HBV S 基因保守区设计的引物(见表 1)进行 PCR 扩增。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 引物 HBV-FP、HBV-RP 各 0.5 μ L, 200 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L(2.5 U), 加灭菌水补足至 25 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像仪观察、照相。

表 1 用于检测猪体内 HBV 和 HEV 的引物

Table 1 Primers used in detection of swine hepatitis B virus and hepatitis E virus

编号 No.	核苷酸序列 Nucleotide sequence	产物大小/bp Amplicon size
HBV-FP	5'-GATGTGTCTGCGCGCTTTTA-3'	281
HBV-RP	5'-CTGAGGCCACTCCCATAGG-3'	
HE164F1	5'-GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	164
HE164R1	5'-CTGGMYTGGTDCDCGCCAAG-3'	
HE137F2	5'-GYTGATTCTCAGCCCTTCGC-3'	137
HE137R2	5'-GMYTGGTDCDCGCCAAGHGGA-3'	

1.3.3 PCR 产物的克隆和测序 采用 NCR quick 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒回收扩增片段, 将其克隆至 pMD18-T 载体, 鉴定后送北京奥科生物公司测序, 用 DNAMAN(version 5.2.2, Lynnon biosoft) 分析测序结果。2 份送测片段编号分别为 SHBV_bj1、SHBV_bj2。

1.4 免疫电镜负染色样品的制备

取 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性和 HBV PCR 检测阳性反应的血清样品, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 加入适度稀释的抗 HBV 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 低温 15 000 r/min 离心 1 h, 弃上清液; 用少量 PBS 稀释沉淀; 吸取少量悬液于铜网上, 用 10 g/L 醋酸铀负染后, 电镜观察。

1.5 HEV RNA 的巢式 PCR 检测

按 Trizol 法提取总 RNA。用 Inoue 等^[14]设计的巢式 PCR 引物(见表 1)进行 RT-PCR。逆转录体系: 5 \times 逆转录缓冲液 6 μ L, 20 mmol/L Oligo(dT) 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, MMLV(100

U/ μ L) 1 μ L, DEPC 水 6 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L; RNA 经 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速置于冰上 10 min, 取 14 μ L 作为模板。混匀后 42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 取 4 μ L 产物作为模板进行 PCR。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 20 mmol/L 引物 HE164F1、HE164R1 各 0.5 μ L, 200 μ mol/L dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L (2.5 U), 加灭菌水补足至 25 μ L。按文献[14]进行扩增, 第 1 轮扩增结束后, 取 2 μ L 作为模板进行第 2 轮扩增。最后于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像仪观察、照相。

2 结果

2.1 SHBV 检测

2.1.1 PCR 检测 从屠宰猪肝、血清中提取 DNA, 应用 HBV S 基因区引物进行 PCR 扩增, 获得的产物大小约为 300 bp, 与预期的片段大小相符 (见图 1)。

2.1.2 PCR 产物的测序结果 对 SHBV_bj1、SHBV_bj2 片段进行测序, 结果发现, 所扩增区域与 GenBank 中 HBV 毒株的同源性达 100%。两片段序列仅在第 519、520 位碱基存在差异 (见图 2)。

HBV (x04615)	GATGTGTCTGCGGCGTTTATCATATTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTGCCCCGTTTGT
SHBV_bj1
SHBV_bj2
HBV (x04615)	CCTCTACTCCAGGAACATCAACTACCAGCAGGGACCATGCAGAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCTTGTGCTGTACAA
SHBV_bj1AG.....
SHBV_bj2GA.....
HBV (x04615)	AACCTTCGGACGGAACTGCACTTGATTTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGATTCTATGGGAGTGGGCCTCAG
SHBV_bj1
SHBV_bj2

图 2 扩增片段与 HBV X04615 株序列的同源性比较

Fig. 2 Homologous comparison of the amplified S gene of HBV with the published S gene of HBV X04615 strain

2.2 HEV 的 RT-PCR 扩增

经 2 轮扩增后, 从部分猪肝组织中扩增到 1 条约 137 bp 的产物带, 与预期片段大小相符 (见图 4)。

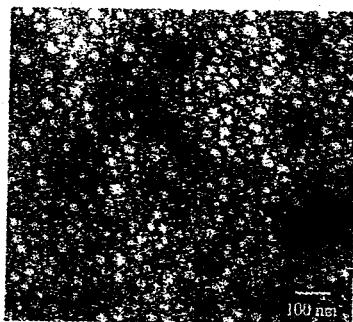


图 3 电镜下观察到的猪乙肝病毒颗粒

Fig. 3 Porcine HBV particles observed by TEM

2.1.3 电镜观察 在血清负染色样品中, 见到大量的密集排列的病毒样粒子, 病毒粒子表面可见明显的表面蛋白颗粒, 但未观察到管状颗粒。根据大小不同, 这些病毒样粒子主要可分为 2 种类型, 一种直径为 40 nm 左右 (图 3 细箭头所示), 与人类 HBV 的 Dane 颗粒相类似; 另一种直径为 20 nm 左右 (图 3 粗箭头所示), 类似于人类 HBV 的小球状粒子。

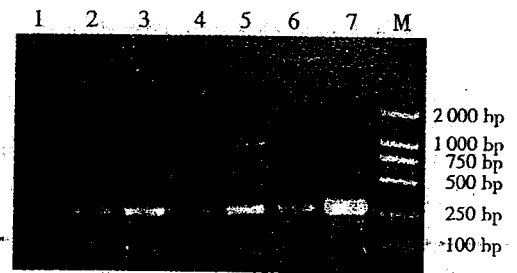


图 1 猪血清和肝中 HBV S 基因 PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR-amplified S gene of HBV from porcine livers and sera

M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2-4: 血清样品; 5-7: 肝样品
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2-4: Serum samples; 5-7: Liver samples

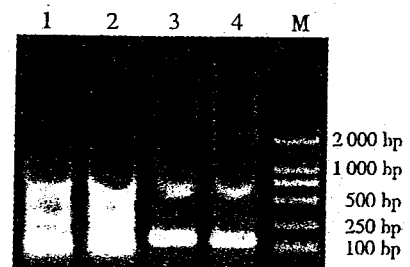


图 4 屠宰猪肝 HEV 的巢式 RT-PCR 电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of the nested RT-PCR-amplified fragment of HEV from porcine livers

M: DNA 分子质量标准; 1, 2: 第 1 轮扩增结果; 3, 4: 第 2 轮扩增结果
M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Products of the first PCR; 3, 4: Products of the second PCR

3 讨论

3.1 关于猪乙肝病毒

关于动物乙肝病毒的检测,国内已有一些报道,但有关屠宰猪体内乙肝病毒的检测鲜有报道^[15]。本试验在过去观察研究的基础上,应用 PCR 技术和透射电镜技术对屠宰猪血清和肝中 HBV 抗原进行了检测。电镜负染色样品观察结果表明,在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dnae 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。在人 HBV 携带者血清中一般以小球状颗粒为主,Dnae 颗粒较少,从本试验观察结果来看,在电镜观察的负染色样品中 Dnae 颗粒并不少(见图 3)。

目前,国外尚未见畜禽 HBV 的相关报道,国内现有的研究多采用 HBV 检测试剂进行血清标志物和相关抗原的检测,也有人对其形态和 S 区基因等进行了研究,但对于动物的 HBV 分子病毒学及其致病性、与人 HBV 之间的关系等的研究还很少。本试验应用 HBV S 区引物从屠宰猪血清、肝中检测出了预期片段,序列分析结果表明,与 HBV 同源性高达 98%~100%。虽然本试验所测片段仅占 HBV 全基因组的 9%左右,但这至少在一定程度上说明了猪 HBV 与人 HBV 有较高的同源性。

一般认为,畜禽乙肝病毒对人没有致病性,但对动物是否有致病性,经肉类食品进入人体后是否可以引起相应的免疫应答,现在尚未可知。我国约有 1.2 亿人为乙肝病毒携带者,这么高的感染率是否与畜禽乙肝病毒有某种联系,这个问题值得进一步研究。

由于 HBV 至今无法体外培养,且宿主范围非常狭窄,尚没有合适的小型动物作为动物模型供病原、发病机理、疫苗和治疗性药物的研究,加之道德等原因,非人灵长类动物模型的使用受到了限制^[1]。畜禽乙肝病毒的发现不仅将为嗜肝病毒科增加新的成员,也必将为嗜肝病毒的起源、进化、持续性感染、发病机理、慢性病毒性肝细胞癌起源等方面的研究提供研究对象。

3.2 关于戊肝病毒

很多研究结果表明,HE 是一种人畜共患病,经口感染,猪是重要的储存宿主。日本、印度等国家已发生多起因食用未煮熟的猪肝和猪肉而引起人感染 HEV 的报道,日本、美国的研究表明,与猪接触的职业人群的血清抗 HEV 抗体高于非职业人群,在

猪场周围的污水中能检测到 HEV 的存在^[16-18]。曹海俊等^[19]对浙江地区从事生猪屠宰和销售的职业人群的 HEV 感染情况进行了调查,结果显示,浙江省从事生猪屠宰和销售人群的阳性率为 77.25%,远远高于 1992 年全国 13 个省市 HE 血清流行病学调查的 1~59 岁人口 HEV 阳性率(17.2%)。还有报道表明,我国 4 月龄以上的猪血清抗体阳性率平均为 40%,而猪饲养员的血清抗体阳性率高达 100%;泰国 3 月龄以上的猪阳性率为 9%~20%,其饲养员的阳性率为 71%。上述研究结果说明,人的 HE 阳性检出率与从事和猪接触的相关职业有一定的关系,也说明 HE 是一种人兽互传病。

Meng^[20]曾在不同月龄的猪血清中检测出了 HEV RNA,国内外还未见有屠宰猪肝 HEV RNA 的检出报道。本试验应用 RT-PCR 方法从屠宰猪肝中扩增出了 HEV RNA,说明屠宰猪肝中也存在 HEV RNA。本实验室过去的研究结果表明,在屠宰猪肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率高达 95%~100%,这是很值得注意的问题,因为从公共卫生的角度来看,屠宰猪已经进入到了猪肉品生产链的末端。虽然还没有从猪胴体肉中检测到 HEV 的报道,但肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率如此之高,无疑会对人类健康构成潜在的威胁。因此,笔者建议在屠宰猪检疫中将 HEV 列入检测项目。

参考文献 (References)

- [1] 陈欣如,燕顺生,张勇. 野生动物嗜肝病毒的研究进展[J]. 地方病通报, 2006, 21(1): 89-94.
CHEN Xin-ru, YAN Shun-sheng, ZHANG Yong. Advance in hepadnaviruses in wild life [J]. *Endemic Diseases Bulletin*, 2006, 21(1): 89-94. (in Chinese)
- [2] 徐宜为,初秀. 动物的类乙型肝炎研究进展[J]. 中国兽医科技, 1993, 23(7): 16-20.
XU Yi-wei, CHU Xiu. Study progress on HBV-like virus in animals [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1993, 23(7): 16-20. (in Chinese)
- [3] 沈柏青,任政华. 猪源乙型肝炎病毒样病毒的提纯与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1993(7): 7-9.
SHEN Bai-qing, REN Zheng-hua. Purification and identification of pig HBV-like virus [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 1993(7): 7-9. (in Chinese)
- [4] 律祥君,侯安祖. 黄牛感染人乙型肝炎病毒的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(4): 3-4.
LÜ Xiang-jun, HOU An-zu. Studies on human hepatitis B virus infection in farm cattle [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1992, 22(4): 3-4. (in Chinese)
- [5] 李决,李红,张鹏举,等. PCR 和 ELISA 法检测畜禽类乙型肝炎病毒的研究[J]. 郑州牧专学报, 1997, 17(1): 21-23.

- LI Jue, LI Hong, ZHANG Peng-ju, *et al.* Detection of hepatitis B like virus in chicken by PCR and ELISA [J]. *Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering*, 1997, 17(1): 21-23. (in Chinese)
- [6] 杜念兴, 黄吉凤. 从猪和牛检出类乙肝病毒抗原和抗体 [J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(1): 3-5.
DU Nian-xing, HUANG Ji-feng. Detection of hepatitis type B virus-like antigen and antibody from pigs and cattle [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2002, 34(1): 3-5. (in Chinese)
- [7] 丁壮, 金宁一, 陈创夫, 等. 羊源乙肝病毒与人乙肝病毒 S 基因序列同源性研究 [J]. 动物医学进展, 2001, 22(4): 54-58.
DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Chuang-fu, *et al.* Study on S gene sequence homologous analysis between the hepatitis B virus from sheep and human [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2001, 22(4): 54-58. (in Chinese)
- [8] 丁壮, 金宁一, 陈振文, 等. 鸡源类人乙肝病毒与人乙肝病毒 S 基因序列分析 [J]. 中国兽医学报, 1999, 19(1): 18-21.
DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Zhen-wen, *et al.* S gene sequence comparison between the HBV like virus from chicken and human HBV [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(1): 18-21. (in Chinese)
- [9] 丁壮, 王承宇, 金宁一, 等. 犬乙肝病毒 S 基因遗传变异研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(1): 24-28.
DING Zhuang, WANG Cheng-yu, JIN Ning-yi, *et al.* Hereditary variation in S gene sequence of hepatitis B virus from canine [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25(1): 24-28. (in Chinese)
- [10] 许江城, 余锐萍, 林剑波, 等. 应用免疫组织化学方法检测屠宰猪肝中的人乙型肝炎病毒抗原 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(4): 46-47.
XU Jiang-cheng, SHE Rui-ping, LIN Jian-bo, *et al.* Immunohistochemistry detection of human hepatitis B virus antigen in slaughtered swine livers [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(4): 46-47. (in Chinese)
- [11] 余锐萍, 李文贵, 王英华, 等. 病毒性肝炎: 值得警惕的重要人兽互传病 [J]. 科技导报, 2007, 25(4): 44-52.
SHE Rui-ping, LI Wen-gui, WANG Ying-hua, *et al.* Viral hepatitis: a dangerous zoonosis [J]. *Science and Technology Review*, 2007, 25(4): 44-52. (in Chinese)
- [12] RENOUC J, CADRANEL J F, BOURLIERE M, *et al.* Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7): 1094-1096.
- [13] COLSON P, KABA M, BERNIT E, *et al.* Hepatitis E associated with surgical training on pigs [J]. *The Lancet*, 2007, 370(9591): 935.
- [14] INOUE J, TAKAHASHI M, YAZAKI Y, *et al.* Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence [J]. *J Virol Methods*, 2006, 137(2): 325-333.
- [15] 余锐萍, 郑志伟, 江维文, 等. 屠宰猪血清及肝脏中人乙型肝炎表面抗原的检测 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(增刊): 160-161.
SHE Rui-ping, ZHENG Zhi-wei, JIANG Wei-wen, *et al.* Detection of human hepatitis B surface antigen in serum and liver of slaughtered pigs [J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1998, 20(Suppl): 160-161. (in Chinese)
- [16] DROBENIUC J, FAVOROV M O, SHAPIRO C N, *et al.* Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(12): 1594-1597.
- [17] MENG X J, WISEMAN B, ELVINGER F, *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1): 117-122.
- [18] WU J, CHEN C, CHIANG T, *et al.* Potential subclinical spread of hepatitis E virus among swine, swine handlers and different countries: a longitudinal study [J]. *J Hepatol*, 2001, 34(1): 190.
- [19] 曹海俊, 王法弟, 高眉扬, 等. 生猪屠宰销售职业人群戊型肝炎病毒感染的危险因素研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(7): 607-609.
CAO Hai-jun, WANG Fa-di, GAO Mei-yang, *et al.* Risk of contract with hepatitis E virus in occupational populations [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(7): 607-609. (in Chinese)
- [20] MENG X J. Hepatitis E virus: cross-species infection and zoonotic risk [J]. *Clin Microbiol New*, 2005, 27(6): 43-48.

(责任编辑 胡弘博)

食肉処理したブタの肝臓および血清中における B 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルス検査

ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) はオルトヘパドナウイルス属 (Orthohepadnavirus) とトリヘパドナウイルス属 (Avihepadnavirus) の 2 属に分類される。オルトヘパドナウイルス属にはヒト B 型肝炎ウイルス (HBV)、霊長類ヘパドナウイルス、げっ歯類ヘパドナウイルスがあり、トリヘパドナウイルスにはアヒル B 型肝炎ウイルス、アオサギ B 型肝炎ウイルス、ハクガン B 型肝炎ウイルスなどがある。これらのウイルスは、ゲノム全長が 3.0~3.3kb であること、一部に環状二重鎖 DNA 構造をとること、外側にエンベロープを有すること、またコア内部にゲノムおよびウイルスにコードされた特殊な DNA ポリメラーゼを有することを共通の特徴とする。ウイルス粒子以外にも大量のウイルス外皮タンパク粒子を生成し、宿主域は極めて狭く、通常、ウイルスの持続感染を引き起こし明らかな肝向性を有する⁽¹⁾。データによれば禽獣においても肝向性ウイルス群の存在が確認されている。1980 年代以降、中国においてブタ、ニワトリ、ウシ、ヒツジ、イヌなどの動物の B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) 検出に関する報告が多くなり、各種 B 型肝炎ウイルスの分離が報告されるようになった^(2~9)。2006 年、余鋭萍^(10~11)らは免疫組織化学法を応用し、北京、河南などの食肉生産連合において豚の食肉処理およびその肝臓の解体に従事する人員の B 型肝炎ウイルス抗原検査を実施した結果、B 型肝炎ウイルス抗原の検出率は実に 73~100% という高率に達することが明らかになった。

E 型肝炎 (Hepatitis E, HE) は E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus, HEV) 感染により引き起こされ、腸を経由して伝播される急性ウイルス性肝炎であり、主要な伝播経路は排泄物を介した経口感染である。中国は HE 高発症地域であり、E 型肝炎の発症および E 型肝炎での死亡により引き起こされる経済的負担が最も深刻な国の 1 つに数えられている。ブタが HEV の主要な宿主であると提唱する学者も存在し、日本においては HEV に汚染された食用ブタの肝臓からヒトへの感染が報告されている。E 型肝炎非流行地域におけるブタに関連する職業の従事者群と対照群の研究では、ブタに関連する職業の従事者に HEV 感染リスクの上昇が認められた。さらに、近年ではブタ HEV のヒトへの感染を示す複数の証拠が発見されている^(12, 13)。つまり、HB および HE はヒトの健康に深刻な脅威を与える疾患であり、ヒトのウイルス性肝炎の発症率は今なお上昇し続けている。動物、とりわけヒトとの関係が緊密なブタ体内の HBV および HEV 保有状況、ブタ HBV、HEV とヒト HBV、HEV の相同性などについては未だ明らかにされていない部分が多い。本試験では既存の研究を基礎とし、PCR 技術を応用し、食肉処理したブタの血清および肝臓の HBV S 遺伝子、HEV RNA に対しさらなる検査を行うとともに、免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法にて食肉処理したブタ血清中の HBV の観察を行った。

1 材料および方法

1.1 サンプル

食肉処理したブタの肝臓および血液は、北京の某食肉生産連合にて採集を行った。

1.2 酵素および試薬

Trizol は北京普博欣生物科学技術公司より購入した。*Taq* 酵素、dNTP は北京博大泰克公司より購入した。Oligo(dT)、プライマーは上海生工生物工程科学技術サービス有限公司より購入した。MMLV Reverta Ace および RNA 酵素阻害剤は TOYOBO 社(東洋紡)の製品とした。NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットは新長江生物科技有限公司より購入した。各種制限酵素、pMD18-T キャリヤーは大連宝生物工程有限公司の製品とした。

1.3 SHBV の PCR 検査

1.3.1 DNA 抽出 血清中の DNA 抽出：ブタの血液 100 μ L を採取し、TES 分解液 300 μ L(10mmol/L Tris-HCl、pH8.0、5mmol/L EDTA、SDS 5g/L、プロテイナーゼ K 200mg/L)中に加え、55 $^{\circ}$ C 下にて 5 時間消化を行い、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて 2~3 回抽出を行った。その後、上澄みを採取し 1/10 体積の 3mol/L NaAc および 2.5 倍体積の無水エチルアルコールを順次加えて沈殿を行い、エチルアルコール 700mL/L を用いて沈殿を 1 回洗浄し、乾燥後に滅菌水 20 μ L 中に溶解し保存した。

肝臓中の DNA 抽出：新鮮な肝臓組織標本約 1~2g を秤量し、液体窒素を加えて粉末状にしたものを、約 20mg 採取して DNA 抽出液(0.5mmol/L Tris-HCl、0.02mol/L EDTA、SDS 10g/L、0.01mol/L NaCl、プロテイナーゼ K 500 μ g/mL)中に加え、42~48 $^{\circ}$ C 下にて一晩静置した。その後、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて DNA の抽出を行った。

1.3.2 PCR による増幅 HBV S 遺伝子保存領域をターゲットとして設計されたプライマー(表 1 を参照のこと)を用いて PCR による増幅を行った。PCR システム：10 \times PCR 緩衝液 2.5 μ L、プライマー-HBV-FP、HBV-RP 各 0.5 μ L、200 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L、*Taq* 酵素 0.5 μ L(2.5U)に滅菌水を加え 25 μ L とした。増幅条件：94 $^{\circ}$ C 下にて 4 分間予備変性を行った後、94 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、58 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、72 $^{\circ}$ C 下にて 40 秒の変性を 30 サイクル行った。さらに 72 $^{\circ}$ C 下にて 5 分間伸張を行い、アガロースゲル 10g/L 中にて電気泳動を行い、ゲルイメージングシステムを用いて観察および画像の記録を行った。

1.3.3 PCR 生成物のクローンおよびシークエンシング NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットを用いて回収した増幅断片のクローンを pMD 18-T キャリヤーに吸着させ、評定を行った後、北京奥科生物公司に送付してシークエンシングを行い、DNAMAN(version 5.2.2、Lynnon biosoft)を用いてシークエンシング結果に対する分析を行った。増幅断片 2 サンプルの番号はそれぞれ SHBV_bj1、SHBV_bj2 とした。

1.4 免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色サンプルの調製

ELISA 法にて HBV の表現抗原に強陽性を示す血清サンプルおよび HBV PCR 検査にて陽性反応を示す血清サンプルを採取し、4000r/分にて 30 分間遠心分離を行い、上

澄みを採取した後、適切に希釈を行った抗 HBV 単クローン抗体中に加え、4℃下にて一晩静置した。その後、低温下において 15000r/min にて 1 時間遠心分離を行い、上澄みを廃棄し、少量の PBS を用いて沈殿の希釈を行った。少量の懸濁液を銅メッシュに吸着させ、ウラニルアセテート 10g/L を用いてネガティブ染色を行った後、電子顕微鏡による観察を行った。

1.5 ネステッド PCR 法を用いた HEV RNA の検出

Trizol 法に照らして総 RNA を抽出した。Inoue ら⁽¹¹⁾の設計によるネステッド PCR プライマー(表 1 を参照のこと)を用いて RT-PCR を行った。逆転写システム: 5×逆転写緩衝液 6 μ L、20mmol/L Oligo(dT)0.5 μ L、10mmol/L dNTP 2 μ L、MMLV(100U/ μ L)1 μ L、DEPC 水 6 μ L、RNA 酵素阻害剤 1 μ L とした。70℃下にて 5 分間変性を行った RNA を採取し、速やかに氷上に 10 分間静置した後、採取した生成物 14 μ L をテンプレートとした。さらに 42℃下にて 1 時間、95℃下にて 5 分間混合し、得られた生成物 4 μ L をテンプレートとして PCR を行った。PCR システム: 10×PCR 緩衝液 2.5 μ L、20mmol/L プライマー HE164F1、HE164R1 各 0.5 μ L、200 μ mol/L dNTP 0.5 μ L、Taq 酵素 0.5 μ L(2.5U) に滅菌水を加え、25 μ L とした。文献[14]に照らして増幅を行い、第 1 サイクルの増幅終了後に 2 μ L を採取し、これを第 2 サイクルの増幅におけるテンプレートとした。最後にアガロースゲル 20g/L 中にて電気泳動を行い、ゲルイメージングシステムを用いて観察および画像の記録を行った。

2 結果

2.1. SHBV 検査

2.1.1 PCR 検査 食肉処理したブタの肝臓、血清中より DNA を抽出し、HBV S 遺伝子領域のプライマーを用いて PCR による増幅を行った結果、獲得された生成物のサイズは 300bp であり、予測断片のサイズと近似するものであった(図 1 を参照のこと)。

2.1.2 PCR 生成物のシーケンシング結果 SHBV_bj1、SHBV_bj2 の各断片に対するシーケンシングを行った結果、すべての増幅領域および GenBank 中における HBV ウイルス株の相同性は 100%に達することが明らかになった。両断片の序列はわずかに 519、520 位の塩基に差異が認められるのみであった(図 2 を参照のこと)。

2.1.3 電子顕微鏡による観察 血清のネガティブ染色サンプルに大量かつ密集した配列のウイルス様粒子が観察され、ウイルス粒子表面には鮮明な表面タンパク粒子が認められたものの、管状粒子は認められなかった。これらウイルスはそのサイズに基づき 2 種類に分けることができ、うち一方は、直径が約 40nm(図 3 中、細矢印にて表示)であり、ヒト HBV の Dane 粒子と類似する。もう一方は直径約 20nm(図 3 中、太矢印にて表示)であり、ヒト HBV の小球状粒子と類似する。

2.2 HEV の RT-PCR による増幅

2 サイクルの増幅を行い、ブタの一部肝臓組織中より増幅された約 137bp の帯状生成物のサイズは予測断片サイズと一致するものであった(図 4 を参照のこと)。