HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒトパルボウイルスB19およびE型肝炎ウイルスによる輸血感染のリスク低減化および献血者における感染実態の解明に関する研究
Author(s)	坂田, 秀勝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第7022号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7022
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65280
Type	doctoral thesis
File Information	Hidekatsu_Sakata.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

ヒトパルボウイルス B19 および E 型肝炎ウイルスによる輸血感染のリスク低減化および献血者における感染実態の解明に関する研究

北海道大学大学院生命科学院

坂田秀勝

2017 年 3 月

目次

略語一覧 III

序論 1

第 1 章 ヒトパルボウイルス B19 による輸血感染のリスク低減化対策とその評価および献血者における感染実態の解明 9

第 1 節 背景 9

第 2 節 実験方法 12

第 1 項 献血血液の使用 12

第 2 項 凝集法（RHA）試薬の作製と B19V 抗原スクリーニング 12

第 3 項 Nested PCR 13

第 4 項 分画血漿プール中の B19V DNA 混入量調査（RHA 評価） 13

第 5 項 RHA と CLEIA-B19 による B19V 抗原検出感度比較 13

第 6 項 CLEIA-B19 による B19V 抗原スクリーニング 14

第 7 項 B19V 抗体検査 15

第 8 項 分画血漿プール中の B19V 混入量調査（CLEIA-B19 評価） 15

第 9 項 WHO B19V パネル 15

第 10 項 U-PCR の設定 16

第 11 項 U-PCR による各 B19V 遺伝子型の検出感度測定 16

第 12 項 CLEIA-B19 による B19V 遺伝子型の検出 17

第 13 項 シーケンス用プライマーの設定 17

第 14 項 北海道内献血者の B19V 遺伝子型調査 18

第 15 項 統計解析 18

第 3 節 結果 19

第 1 項 RHA による北海道献血者 B19V 抗原スクリーニングとその評価 19

第 2 項 B19V DNA 陽性パネルを用いた CLEIA-B19 検出感度試験 21

第 3 項 CLEIA による北海道献血者 B19V 抗原スクリーニング 22

第 4 項　CLEIA-B19 と B19V DNA 量との相関 26

第 5 項 分画血漿プール B19V 混入量調査 27

第 6 項 U-PCR における各 B19V 遺伝子型の検出感度 28
第 7 項 CLEIA-B19 における B19V 遺伝子型の検出 29
第 8 項 北海道内献血者における B19V 遺伝子型分布 31
第 4 節 考察 33
第 5 節 まとめ 40

第 2 章 献血者における E 型肝炎ウイルス感染実態の解明 41

第 1 節 背景 41
第 2 節 実験方法 43
第 1 項 献血血液の使用 43
第 2 項 北海道の ALT 高値献血者検体 43
第 3 項 HAV,HBV および HCV の核酸検出 44
第 4 項 HEV RNA 検出および定量 44
第 5 項 HEV 抗体の検出 46
第 6 項 全国の ALT 高値献血者検体 46
第 7 項 HEV 株の塩基配列解析 46
第 8 項 統計解析 47
第 3 節 結果 48
第 1 項 北海道の ALT 高値献血者検体の肝炎ウイルス検査（予備検討） 48
第 2 項 全国の ALT 高値献血者検体の HEV RNA 陽性率 49
第 3 項 ALT 高値献血者検体の抗 HEV 抗体検査 51
第 4 項 HEV RNA 陽性献血者検体の解析 52
第 4 節 考察 54
第 5 節 まとめ 59

総括 61

謝辞 63

参考文献 66

略語一覧

本論文において用いた略語を以下に示す（アルファベット順）。

ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AML	acute myelogenous leukemia
AMPPD	3(-2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4(-3"-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane
B19V	human parvovirus B19
BLAST	GenBank Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair(s)
BSA	bovine serum albumin
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research
CI	confidence interval
CLEIA	chemiluminescent enzyme immunoassay
CMV	cytomegalovirus
COI	cutoff index
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
EBV	Epstein-Barr virus
EIA	enzyme immune assay
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAM	6-carboxyfluorescein
FDA	US Food and Drug Administration
GPT	glutamic pyruvic transaminase
HAV	hepatitis A virus
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HEV	hepatitis E virus
HIV	human immunodeficiency virus
HRP	horseradish peroxidase
HTLV	human T-lymphotropic virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M

IU	international unit
JB	Japan Blood Products Organization
LNA	locked nucleic acid
MGB	minor groove binder
NAT	nucleic acid amplification test
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NJ	neighbor-joining method
NS	nonstructural protein
nt	nucleotide(s)
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PC	platelet concentrate
PCR	polymerase chain reaction
PHA	passive hemmaglutination
PPP	platelet poor plasma
RBC	red blood cell
RHA	receptor-mediated hemagglutination assay
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SARS	severe acute respiratory syndrome
S/D	solvent/detergent
SD	standard deviation
SFTSV	severe fever with thrombocytopenia syndrome virus
SPC	sharpness of boundary between the peripheral area and central area
TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamine
Tm	melting temperature
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TP	*Treponema pallidum*
U-PCR	universal real-time polymerase chain reaction
UTR	untranslated region
VLP	virus-like particle
VP	viral structural protein
VP1u	viral structural protein 1 unique region
WHO	World Health Organization

序論

血液製剤は大別して、赤血球製剤、血小板製剤や新鮮凍結血漿を主とする「輸血用血液製剤」とアルブミン、グロブリン及び各種凝固因子製剤を主とする「血漿分画製剤」から構成されている（図 1.）。日本で輸血が必要な患者は年間約 100 万人、1 日に約 3,000 人存在する。輸血の対象となる主な疾患は、がん、白血病、再生不良性貧血等、多岐にわたり、事故や移植手術等による大量出血時にも必要となる。「血液事業」は、1）血液の提供者（献血者）を募集する。2）その血液を採取する。3）血液製剤を製造する。4）治療を必要とする患者（医療機関）に供給する。という一連の事業を指し、日本において、日本赤十字社（日赤）は血液事業を行う唯一の組織である。また、日赤は「血漿分画製剤」製造用の原料血漿を国内の血漿分画製剤製造 3 社（日本血液製剤機構、日本製薬、および化学及血清療法研究所）へ供給している。「血漿分画製剤」は、血漿蛋白を精製･分画する製造工程中にウイルス除去膜によるフィルトレーションや加熱処理、有機溶剤／界面活性剤（S/D）処理などのウイルス不活化・除去工程が含まれるが、「輸血用血液製剤」は分離･調整の製造工程のみのため、献血血液に対する事前の安全対策が最も重要となる（図 1.）。

日赤では、献血者から採血する際には、身分証明書等による本人確認の後、献血者が法令で定められた採血基準に適合していることを、医師による問診により確認している。問診では献血者の健康を保護するための項目の他、血液製剤の安全性・有効性に影響を与える可能性のある医薬品の服用歴や、血液を介して感染する恐れのある疾患の既往歴、輸入感染症対策として海外渡航歴等、血液製剤の安全性向上のための項目も含まれている [1]。

その後、献血されたすべての血液は、血液の安全性確保のため感染症関連検査が行われるが、有効期限の短い血液を多数検査する必要があるため、1）迅速（装置の処理能力・自動判定含む）、2）感度・特異性が高い、3）費用対効果に見合う、方法が求められる。図 2. に日赤における献血血液の感染症スクリーニング検査フローを示す [1]。まず、費用対効果の観点から主に抗原抗体反応を利用した血清学的検査を行う。これには梅毒トレポネーマ（TP）抗体検査、B 型肝炎ウイルス（HBV）関連（HBs 抗原、HBs 抗体および HBc 抗体）検査、C 型肝炎ウイルス（HCV）抗体検査、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1 および HIV-2）抗体検査、ヒト T リンパ球向性ウイルス 1 型（HTLV-1）抗体検査、およびヒトパルボ

ウイルス B19（B19V）抗原検査の 6 種類の病原体に対する検査が含まれている。一方、血清学的検査とは別に、未知の肝炎ウイルスの代用検査として肝機能の指標となるアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT [GPT]）検査を実施している。血清学的検査はウィンドウ期（感染直後で病原体がごく微量、あるいは抗体が産生される前で、検査で検出できない期間）が長いが、核酸増幅検査（NAT）は、感度と特異性が非常に高く、ウィンドウ期を大幅に短縮できるため、日赤は 1999 年から血液の安全性向上を図るうえで重要度の高い HBV、HCV、および HIV について特に有効な NAT を、世界に先駆けて導入した。NAT の導入当初は検査用血液を 500 本プールして実施していたが、2004 年からは 20 本プールで検査を行っている。また、プール作業時のクロスコンタミネーション防止のため、血清学的検査および ALT 検査で不合格となったものについては NAT から除外している。スクリーニング検査をすべて合格したものが「輸血用血液製剤」もしくは「血漿分画製剤」の原料血漿として使用される。日赤血漿分画センター（現 日本血液製剤機構）における「血漿分画製剤」は、原料血漿約 5,000～10,000 バッグをまとめた血漿プールから製造され、前述のウイルス不活化・除去工程を含む製造工程を経てアルブミン、グロブリンおよび各種凝固因子製剤などの最終製品となる（図 2.)。また、2008 年には上記 6 種類の病原体に対する血清学的検査を従来の凝集法からより感度の高い化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA）へ変更し、輸血後感染症のリスク低減化を図っている。このように、各種感染症に対する検査法の開発や検査精度の向上がこれまで血液の安全性に大きく貢献してきた。とくに 1960 年代後期に献血制度が施行された後も輸血後肝炎は依然として高い発症率（16.2%）を示していたが、その後の安全対策により発症率は大幅に減少した（図 3.)。しかしいずれの検査にも検出限界があり、ウィンドウ期が存在する。検査法の進歩によりウィンドウ期の短縮は可能なものの、感染症の発症率をゼロにすることは難しく、引き続き感染リスクの低減化、安全性の向上に努める必要がある。

感染症スクリーニング検査項目以外にも、輸血による感染リスクを有する病原体は数多く存在することがわかっている。血液中に高濃度の病原体が存在しているにもかかわらず自覚症状が無い献血者の血液は、輸血による感染リスクを増大させる。そうしたリスクを有する可能性がある病原体の主なものは、蚊媒介性のデングウイルス、ウエストナイルウ

イルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、およびマラリア原虫等、ダニ媒介性の重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）およびバベシア原虫等、飛沫感染により伝播する重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス等、および経口感染により伝播するA 型肝炎ウイルス（HAV）および E 型肝炎ウイルス（HEV）等である。輸入感染症に対しては、前述の通り、問診による海外渡航歴調査が効果的であるが、それ以外の病原体に対する安全対策として、スクリーニング検査導入の必要性を検討しなければならない。そのためには地域性、季節性、流行性を考慮した病原体の陽性率や、性別、年齢別および特定の疾患等の集団に感染した場合の影響度（重症度）等をあらかじめ評価する必要がある。



www.mhlw.go.jp/jigyo_shiwake/dl/h24_rv05b_day2.pdf

図 1.　血液製剤の種類

「輸血用血液製剤」は日赤のみで製造され、それらの有効期限は短いものが多い。「血漿分画製剤」は日赤で集められた献血者血液を原料とし、日本血液製剤機構、日本製薬、および化学及血清療法研究所で製造される。血漿分画製剤の製造工程中には、液状加熱処理（60℃/10 時間、凝固因子製剤以外）、乾燥加熱処理（60℃/72 時間、凝固因子製剤）、S/D 処理（エンベロープ破壊）、フィルトレーション（15, 19, 35 nm）、低 pH 液状インキュベーション（pH 4, 20-30℃）等のウイルス除去・不活化工程がある。

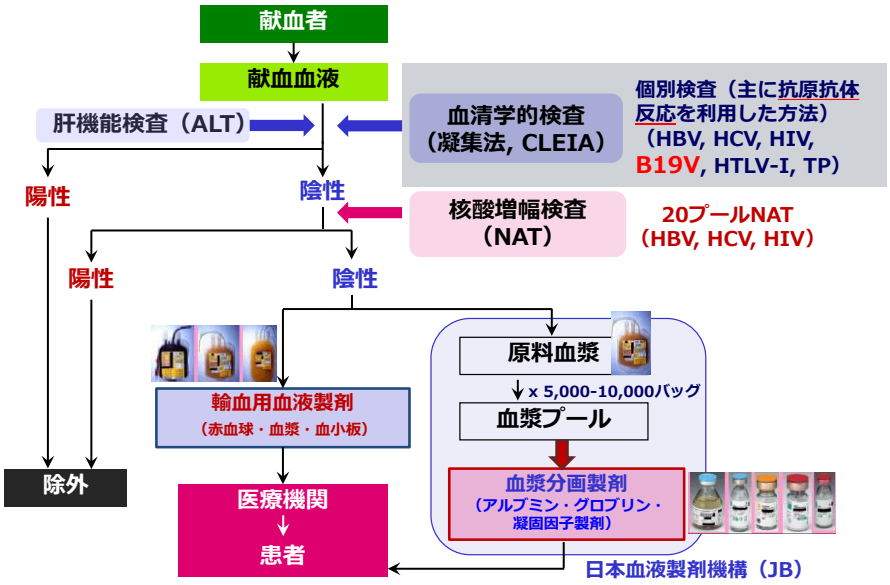


図 2. 献血者における感染症スクリーニング（日赤、2013 年現在）

すべての献血者血液について、血清学的検査によるスクリーニング検査（HBs 抗原、B19V 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-I 抗体および TP 抗体）を実施した。同時に肝機能検査（ALT）を実施し、ALT 値が 60 IU/L 以下となった検体、および血清学的検査陰性となった検体について、20 本プール NAT（HBV DNA, HCV RNA および HIV RNA）によるスクリーニング検査を実施した。血清学的検査陽性および ALT 値 61 IU/L 以上を示した検体は、クロスコンタミネーション防止のため、20 本プール NAT からは除外された。

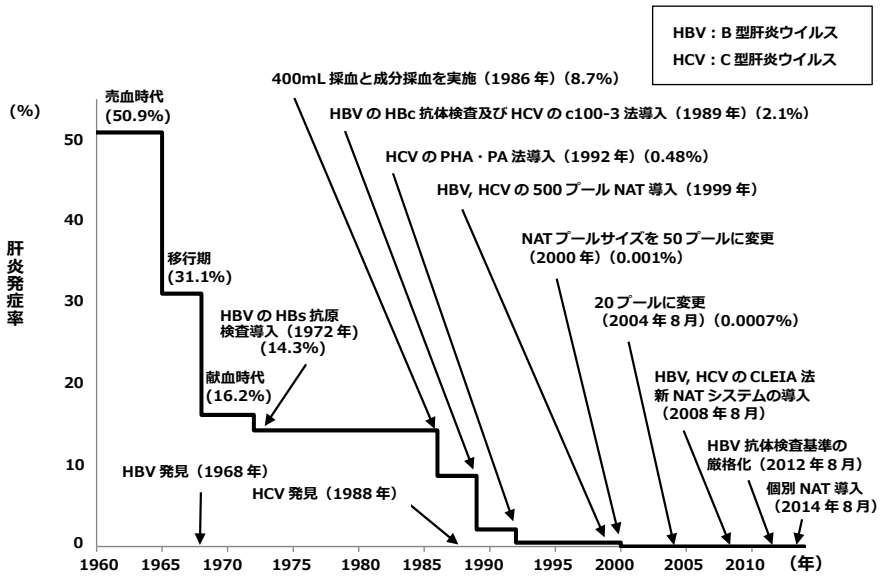


図 3. 検査法の変遷と輸血後肝炎発症率の推移

B19V は飛沫感染により伝播し、小児における伝染性紅斑（リンゴ病）の原因ウイルスである。学校や幼稚園等の施設内感染、家庭内感染、院内感染、および実験室内感染が報告されており、飛沫により容易に二次感染を起こし、日本ではほぼ 4～6 年ごとに大流行がみられる[2]。さらに、B19V 感染者ではウイルス血症（viremia）を呈するため、献血によって輸血用血液製剤や血漿分画製剤原料に B19V が混入する可能性がある。また B19V はノンエンベロープウイルスで S/D 処理等の不活化技術に抵抗性を示すため、分画製剤原料血漿プールに大量に混入すると除去や不活化が困難であり、感染リスクが増加する。実際に血漿分画製剤、とくに凝固因子製剤による B19V 感染伝播に関して、数多く報告されている[3-10]。また、B19V のレセプターは P 式血液型 P 抗原（グロボシド）である[11]。B19V はグロボシドを発現している赤芽球前駆細胞等に感染し、アポトーシスを引き起こす[12]。結果、溶血性貧血患者での赤芽球癆、他に妊婦での胎児水腫、免疫不全患者での慢性貧血、関節炎等、さまざまな B19V 感染による重症例が報告されている[13-26]。

約 5,600 塩基からなる B19V ゲノムの塩基配列は非常に安定しており、変異率は 1～2%程度と考えられていた[27,28]。しかし 1998 年、フランスで重症貧血小児の血液から B19V 様の新型株が発見され、遺伝子解析により、この新型株（V9）には、従来の B19V の塩基配列と比べて 10%以上の非類似性が認められた[29]。その後米国で、HIV 陽性患者の滑膜組織から A6 株が分離されるなど、相次いで新型株の存在が報告された。2005 年、国際ウイルス分類委員会（ICTV）は B19V の遺伝子型を、新たに 2 型と 3 型を加えた 3 種類とした[30]（図 4.）。2 型は北および中央ヨーロッパを中心に、高齢患者由来の皮膚や固形組織から検出された。しかし最近の疫学調査では、ヨーロッパで感染循環していた 2 型の多くが、時間の経過とともに 1 型に取って代わられたと報告されており[31]、現在は 1 型が最も一般的な遺伝子型とされる[32,33]。一方、3 型のサブタイプである 3a 型は、主に西アフリカのガーナ等で流行している株で[34]、最近では米国等でも検出されている[35,36]。もうひとつの 3b 型はブラジル、フランス、英国などで分離されており[37]、近年徐々にその拡がりをみせている[33]。さらに最近、ベトナムで 1 型のサブタイプである 1b 型が報告されている[38]。アミノ酸レベルでの変化は少ないとされているものの、これら遺伝子型の疫学的な価値については、今なお不明な点が多い[33]。

E 型肝炎は、HEV によって引き起こされる肝炎で、経口感染が主な伝播経路である。かつて E 型肝炎は上下水道が整備されていない発展途上地域の風土病的疾患だと考えられており[40]、国内で患者が発症したとしてもいわゆる「輸入感染症」とされてきた。しかし海外渡航歴のない患者から日本固有の HEV 株が分離され、これを機に HEV 国内感染例が相次いで報告されるようになった[41-44]。ヒトに感染性を有する HEV には 1 型から 4 型まで、4 種類の遺伝子型があり、1 型や 2 型は、前述の衛生状態の悪い発展途上国における主要な遺伝子型である。水を介した感染や垂直感染、接触感染もあり、発展途上国の妊婦の死亡率は 10～25%と高い状況が報告されている[45]。3 型は先進国を中心に世界的に分布している。一方 4 型は、主に東アジアと南アジアに限定される。3 型と 4 型については、散発性の肝炎を引き起こす。1 型と 2 型はヒトでのみ発見されているが、3 型と 4 型はヒト以外にも多くの哺乳動物に見出される。したがって、3 型、4 型は人獣共通感染症を引き起こす特徴があり、最も重要なウイルス保有動物は、ブタ、イノシシ、およびシカである[46,47]（図 5.）。複数の動物が HEV 保有動物であることが、他の肝炎ウイルスには存在しない HEV 特有の性質である。動物肉を媒介した食物感染が、主な HEV の感染経路であると考えられている。

最近、先進国において HEV 土着株の存在が報告されるようになり[48-51]、日本においても、HEV に感染したシカの生肉を摂取したことにより E 型急性肝炎を発症した事例が報告された[52]。これ以外にもイノシシやブタの生肉を食べたことによる感染例も報告されており[53,54]、現在では「食物感染」は国内の E 型肝炎発症例の主要な伝播経路と考えられている[55-57]。一方で、2002 年と 2004 年には輸血後 E 型肝炎発症例を確認し[58,59]、その後も英国、フランス等で複数例発生している[60-62]が、HEV の疫学的背景や感染経路等、未だ不明な部分が多い。

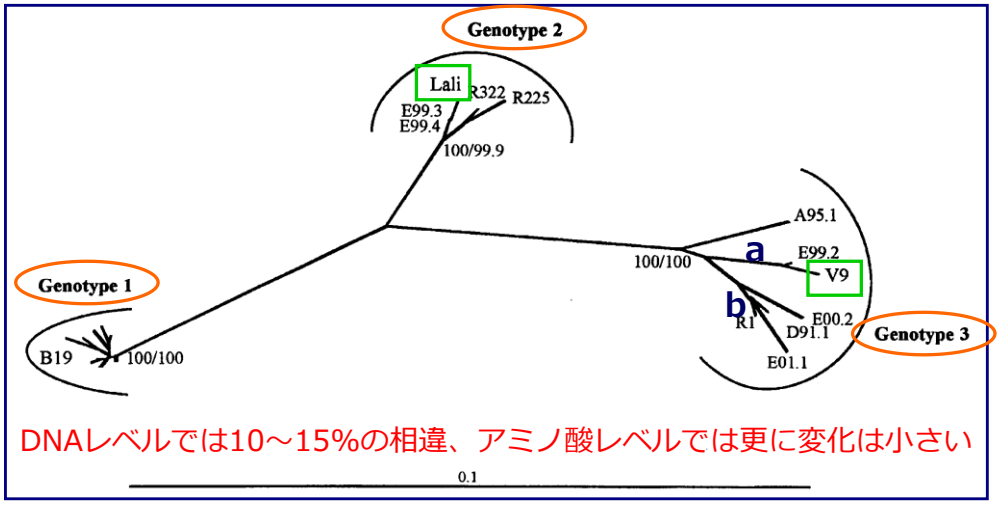


図 4. B19V の塩基配列による多様性

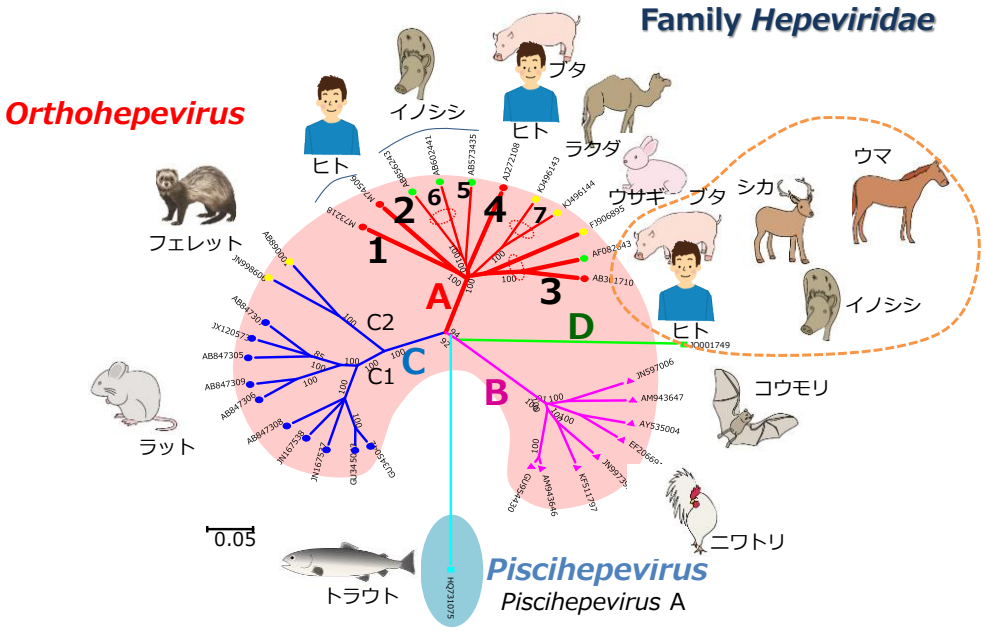


図 5. HEV は人獣共通感染症ウイルス

HEV は *Hepeviridae* に属しており、*Orthohepevirus* と *Piscihepevirus* で構成されている。*Orthohepevirus* の遺伝子型 1～4 は、ヒトに感染性があり、1 型および 2 型はヒトでのみ発見され、3 型および 4 型はヒト以外にも複数の哺乳動物に見出される。

本研究において、私は輸血による感染リスクを有するこれら 2 種類のウイルス、B19V および HEV に着目し、輸血感染リスクの低減化対策とその効果、および献血者におけるウイルス感染実態について検討した。第 1 章では、献血者における B19V 抗原検査の必要性が高まったため、1）赤血球上のグロボシドとの結合を利用した凝集法による B19V 抗原の新規検出系を構築し、試薬を作製した。2）多数検体スクリーニング検査を実施し、その効果を検証した。3）さらに高感度な化学発光酵素免疫測定法試薬を開発し、多数検体スクリーニング検査を実施した。4）遺伝子型検出性能を含めた輸血感染リスクの低減化効果について検証した。5）B19V 陽性献血者由来の B19V 株を分子系統樹解析により複数のグループに分類し、時系列ごとに比較した。第 2 章では、全国の肝機能高値献血者を対象に各種 HEV マーカーと、献血者における HEV 感染実態の相関性を解明した。さらに HEV 感染献血者のウイルス株とブタ由来 HEV 株との類似性を比較し、感染源の可能性を検討した。

第 1 章　ヒトパルボウイルス B19 による輸血感染リスクの低減化対策とその評価および献血者における感染実態の解明

第 1 節　背景

B19V は直径約 23nm の 1 本鎖 DNA ウイルスで、*Parvoviridae* 科 *Erythroparvovirus* 属に分類される [30]。感染レセプターは赤血球の P 式血液型 P 抗原（グロボシド）[11] のため、P 抗原保有細胞（赤芽球前駆細胞、血管内皮細胞、滑膜細胞、胎児組織および心筋細胞等）に感染し、感染細胞のアポトーシスを起こす [12]。B19V の感染によって重篤な病態を引き起こす可能性があるのは、慢性貧血性患者、化学療法などにより免疫能の低下した患者および妊婦である [24-26]。一方、成人（健常人）での感染は、関節炎などの症状がみられることもあるが、概ね経過は良好である。

本研究では B19V レセプター（グロボシド）を介して B19V と赤血球が凝集する性質を利用した簡便で安価な Receptor-mediated Hemagglutination assay（RHA）試薬を作製した [63]（図 6.）。グルタルアルデヒド固定した赤血球と希釈した血清（血漿）を、弱酸性の条件下（pH 5.2～5.8）で反応させると、B19V が存在すれば、赤血球膜表面に存在する糖脂質であるグロボシドと B19V が結合し、凝集反応が観察される [64]（図 6.）。

本研究ではさらに、RHA 導入後の凝固因子製剤使用による B19V 感染症例が報告 [65] され、より高感度の B19V 検出法が必須と考えられたことから、輸血用血液および分画原料血漿への B19V DNA 混入量の更なる低減化を図るため、富士レビオ社と共同開発で Chemiluminescence Enzyme Immune Assay（CLEIA）を用いた高感度 B19V 抗原検査法（CLEIA-B19）を確立し、献血者における B19V 抗原スクリーニングとしての有用性を検討した（図 7.）。

輸血用血液製剤による B19V 感染はまれだが、欧米において血漿分画製剤（とくに凝固因子製剤）使用による B19V 感染例 [9,10] や、凝固因子製剤中に高頻度で B19V が検出されること [66,67] が報告され、米国 FDA は、血漿分画製剤原料用血漿プールの混入 B19V DNA 量を 10^4 (4 log) IU/mL 以下にすべきとの勧告を発表し [68]、欧州薬局方（European Pharmacopoeia）においても一部の製剤に対して同様の基準が採用された [69-71]。加えて、

血漿分画製剤製造工程中の B19V 検査基準として、現在報告されている 3 種類の異なる B19V 遺伝子型を検出できる NAT の導入も同時に勧告された[68,72]。市販の B19V NAT 試薬の中には、B19V の 2 型および 3 型の検出感度や特異性に問題があったものも報告されている[73,74]。本研究で検討した CLEIA-B19 は、FDA の勧告で指定された NAT ではないが、勧告の中で「本ガイダンスに記載されたもの以外の代替的アプローチでも、適用される要件を充足するものであれば用いることができる」としている。したがって、CLEIA-B19 が FDA の基準を満たす代替法となり得るのかを検証するため、CLEIA-B19 の遺伝子型検出能の確認、および分画血漿プール中の B19V DNA 量の測定が必要であった。さらに、これまで日本の献血者に検出された B19V を遺伝子型別に分類した報告はなかった。これらの検討を行うことは、B19V スクリーニングの安全性・妥当性を検証し、今後の B19V 感染防止対策を講じるために極めて重要である。

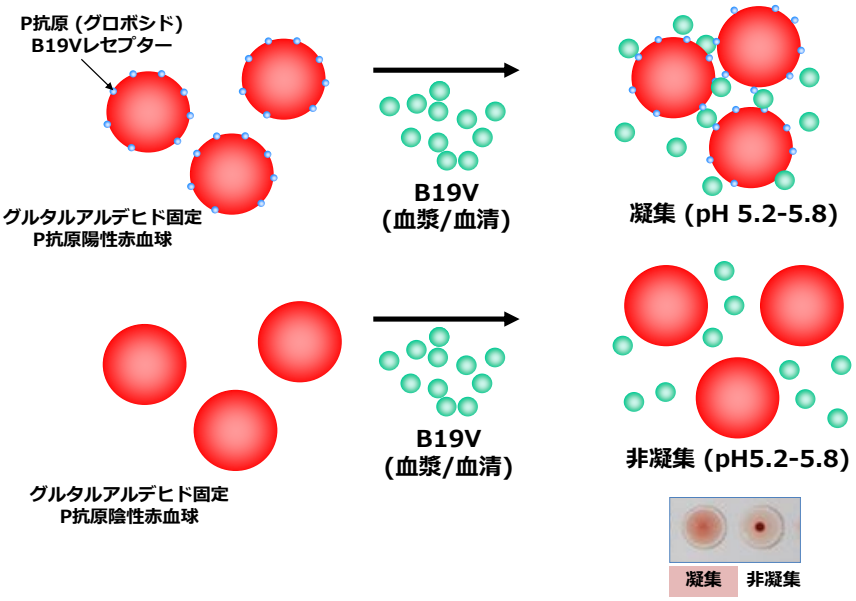


図 6. 凝集法（Receptor-mediated Hemagglutination, RHA）の原理

グルタルアルデヒド固定した赤血球の表面上にある B19V のレセプターである P 式血液型 P 抗原（グロボシド）と B19V が、pH 5.2～5.8 の条件下で結合することで血球の凝集が認められた（上段）。一方、グロボシドが発現していないまれな血液型の血球（下段）では凝集は認められなかった。用手法による確認試験ではこの 2 種類の血球を用いて、凝集価に 4 倍以上差が見られた検体を陽性と判定した。

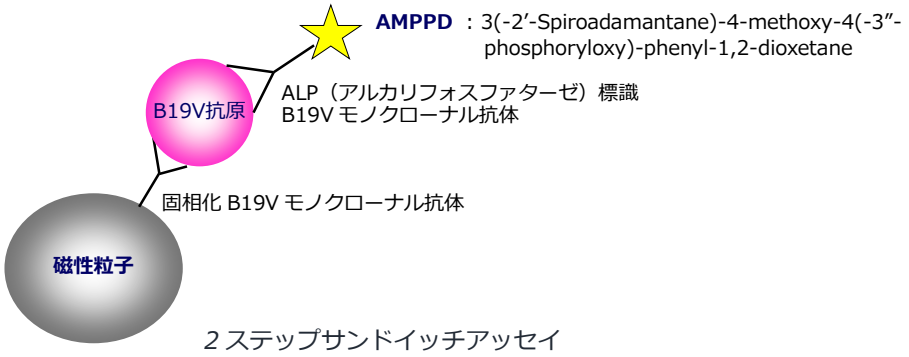


図 7. 化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescence Enzyme Immunoassay, CLEIA）を用いた B19V 抗原検出系（CLEIA-B19V）の原理

最初に検体を酸性溶液で処理した後、検体中の B19V 抗原と、磁性粒子に固相化した B19V モノクローナル抗体、次に ALP（アルカリフォスファターゼ）標識 B19V モノクローナル抗体を結合させ、B19V 抗原を介したサンドイッチ複合体を形成させた。最後に基質として AMPPD を添加し、ALP により加水分解されて生じた化学発光を、化学発光酵素免疫測定装置ルミパルス Presto または全自動化学発光酵素免疫測定装置 CL4800（富士レビオ）で測定した。

第２節　実験方法

第１項　献血血液の使用

本研究において用いた献血者検体の取り扱いは匿名化し、個人情報が外部に流出しないように厳格に管理し実施した。なお、献血血液の使用は、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」の第 4 の 1 に基づき、「血液製剤の有効性・安全性又は献血の安全性の向上を目的とした使用」として、日赤において血液事業研究計画書（研究課題番号：ウイルス-31、39、P 感染-89）により承認を得た。

第２項　凝集法（RHA）試薬の作製と B19V 抗原スクリーニング

グルタルアルデヒド固定したヒト O 型赤血球（P 抗原陽性および陰性）を 0.625%となるように 0.1M クエン酸リン酸緩衝液（pH 5.5、1%スクロース、0.25%塩化ナトリウム、0.05%アラビアゴム、0.04%ポリビニルピロリドン[K30]、および 0.1%アジ化ナトリウムを含む）で浮遊し、RHA 試薬とした。多数検体スクリーニング検査には、自動輸血検査装置 PK7200（Olympus）を用いた。V 底マイクロプレート（P6 プレート、Olympus）のウェルに 23.7 倍希釈した献血者血清 20 μL と RHA 試薬 40 μL を混和し、30℃で 1 時間インキュベーション後、凝集像を自動判定した。凝集像は、SPC（sharpness of boundary between the peripheral area and central area）値が 20 以下を陽性とし、PK7200 陽性検体については用手法による確認検査を実施した。確認試験はマイクロプレート上で陽性血清 25 μL を 2 倍段階希釈（12 ウェル×2 列）し、1 列に P 抗原陽性 RHA 試薬、もう 1 列に P 抗原陰性 RHA 試薬を各 50 μL 添加混和し、P 抗原の有無で RHA 価が 4 倍以上の差を示した検体を RHA 陽性と判定した。

北海道献血者 733,306 検体について、RHA によるスクリーニングを実施し、確認試験陽性となった血液は出庫不可とした。B19V DNA を確認するために、この検体を使用し nested PCR（後述）を実施した。

第３項　Nested PCR

検体（血清または血漿）100 µL から SMITEST EX-R&D Kit （Medical & Biological Laboratories）を用いて、プロトコールに従い核酸を抽出した。B19V ゲノムの VP1 領域をターゲットとして、増幅領域を 1st PCR では、Sense primer：5’-CAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTG-3’（1956-1978, M13178 基準）、Antisense primer：5’-GGGATTAGAAGCTCCCACATGGC-3’（2360-2382）で設定し、2nd PCR では、Sense primer ：5’-ACTGAAACCCCGCGCTCTAG-3’（2041-2060）、Antisense primer：5’-CAGGTAAACCCCTTACACCGT-3’（2210-2230）で設定し、各 427bp、190bp の増幅産物を得た。増幅条件は、94℃/1 分、55℃/1.5 分、72℃/2 分を 1st PCR は 35 サイクル、2nd PCR は 28 サイクルで実施した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色しバンドを確認した。B19V DNA の定量は限界希釈法を用い、抽出物の再溶解液を 10 倍段階希釈して増幅し、陽性となる最大希釈倍数を求めた。

第４項　分画血漿プール中の B19V DNA 混入量調査（RHA 評価）

北海道献血者約 5,000～10,000 人分由来の原料血漿を混合して血漿プールとした。RHA スクリーニング導入以前の献血血液で製造した血漿プール 112 バッチおよび RHA スクリーニング検査済み献血血液で製造した 47 バッチについて、検体 100 µL から nested PCR により B19V DNA を定量して比較した。

第５項　RHA と CLEIA-B19 による B19V 抗原検出感度比較

RHA および PCR によって B19V DNA 陽性が確認された血漿検体（n＝152）を B19V DNA 陽性パネルとした。RHA よりさらに高感度な方法として、化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）による B19V 抗原検査試薬（CLEIA-B19）を開発した。CLEIA-B19 は、特異性の異なる B19V マウスモノクローナル抗体を用いた 2 ステップサンドイッチアッセイである。測定ステップを図 8.に示す。最初に検体を酸性溶液で処理した後、検体中の B19V 抗原をフェライト（磁性）粒子に固相化した B19V モノクローナル抗体と結合させた。洗浄操作後、アルカリフォスファターゼ（ALP）標識 B19V モノクローナル抗体を結合させ、

B19V 抗原を介したサンドイッチ複合体を形成させた。再び洗浄後、3(-2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4(-3"-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane (AMPPD) を基質として添加し、ALP により加水分解されて生じた化学発光を、化学発光酵素免疫測定装置ルミパルス Presto（富士レビオ）で測定した。カットオフ値は B19V NAT 陰性献血者血清（n = 671）のカウント値の平均＋6 SD より 4,000 カウントとし、これ以上を陽性と判定した。

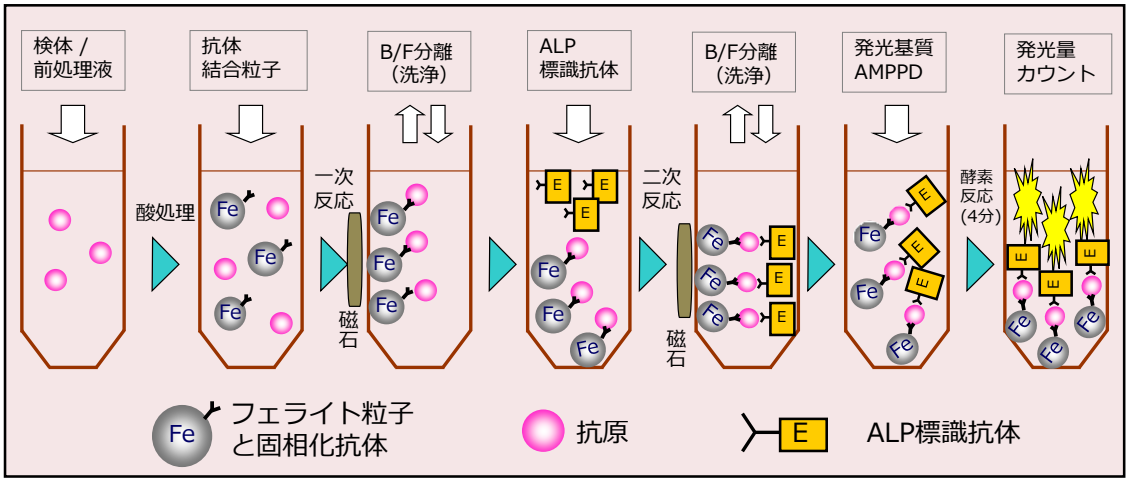


図 8. CLEIA-B19V による B19V 抗原量の測定

第 6 項　CLEIA-B19 による B19V 抗原スクリーニング

全自動化学発光酵素免疫測定装置 CL4800 システム（富士レビオ）による CLEIA-B19 を用いた B19V 抗原検査を 2008 年 2 月に導入し、北海道献血者検体（血清）1,035,560 例についてスクリーニング検査を実施した。1.0 カットオフインデックス（COI）以上を陽性とし、陽性となった検体はさらに 2 重測定し 1 回以上陽性が再現されたものは、CLEIA-

B19 陽性と最終判定され、その血液は製品用血液から除外された。製品から除外された北海道献血者由来の検体は後述する Universal real-time PCR 法（U-PCR）により B19V DNA を測定した。一方、2008 年 8 月から 2009 年 5 月の間に、CLEIA-B19 陰性となった北海道献血者検体のうち、無作為に抽出した 682 検体について、U-PCR により B19V DNA を測定した。

第 7 項　B19V 抗体検査

B19V DNA 陽性となった献血者由来検体について、B19V 抗体を測定した。B19V 抗体は、ウイルス抗体 EIA「生研」パルボ IgM およびウイルス抗体 EIA「生研」パルボ IgG（デンカ生研）を用いて、プロトコールに従い IgM 抗体および IgG 抗体を測定した。

第 8 項　分画血漿プール中の B19V 混入量調査（CLEIA-B19 評価）

2003 年から 2011 年 6 月までに全国で献血された献血者血漿を使用し、血漿約 5,000～10,000 バッグ由来の分画原料血漿プールを 1 バッチとして、3,072 バッチ作製した。これらについて、B19V DNA を MagNA Pure LC システム（Roche Diagnostics）を用いて血漿 0.2 mL から抽出した。DNA 量は LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit（Roche Diagnostics）を用いて測定した。合計 3,072 バッチのうち、772 バッチは CLEIA-B19 スクリーニング導入後の血漿で作製された。

第 9 項　WHO B19V パネル

WHO B19V パネル（NIBSC 09/110; CBER Parvovirus B19 Genotype Panel 1）を後述する U-PCR の評価に使用した。これを構成する 3 種類のパネル Member 1（M1）、Member 2（M2）および Member3（M3）の遺伝子型（B19V DNA 量）は各々1 型（5.98 log IU/mL）、2 型（5.94 log IU/mL）および 3a 型（5.97 log IU/mL）であった[75]。さらに、これらの WHO B19V パネルと同一血漿由来の、より高濃度の B19V パネル（M1S、M2S および M3S）も併せて使用した。このパネルの B19V DNA 量は後述の定量法により、各 8.28、8.82 および 8.48 log IU/mL と算出された。

第 10 項　U-PCR の設定

U-PCR に用いたプライマー・プローブは Koppelman らの方法[76,77]に準じて設定した。プライマーは、Sense primer：5'-AATGCAGATGCCCTCCAC-3'と Antisense primer：5'-ATGATTCTCCTGAACTGGTCC -3'を用いた。TaqMan プローブは、核酸融解温度（Tm）を増大させ、特異性を高めるために使用していた locked nucleic acid（LNA）の代わりに、Minor Groove Binder（MGB）を導入し、配列は 5'（FAM）-AACCCCGCGCTCTAGTAC-（MGB）3'とした。実際の測定は、QIAamp MinElute Virus Spin（QIAGEN）を用いて検体 200 µL から溶出量 22 µL でウイルス核酸を抽出し、増幅検出反応にはその 20 µL（検体 182 µL 相当）を用いた。前述のプライマー・プローブセットと増幅試薬（FastStart Universal Probe Master[Rox], Roche Diagnostics）および増幅検出装置 AB7500（Applied Biosystems）を使用し、50℃/2 分、95℃/10 分の後、95℃/15 秒、56℃/15 秒、72℃/1 分を 50 サイクルで実施し特異蛍光を検出した。予備的検討として、3a 型の末梢血由来パネル（M1655）と臍帯血由来パネル（C2005）の 2 種類[78]を希釈した検体（B19V DNA 量：約 5 log IU/mL）を使用し、U-PCR の検出感度と特異性をを確認した（データ未提示）。濃度の高い B19V パネル（M1S、M2S および M3S）の定量は、LightCycler Parvovirus B19 quantification Kit（Roche）によりあらかじめ測定した B19V DNA 陽性検体（11.9 log IU/mL）の 10 倍段階希釈液を定量用スタンダードとして、その検量線から定量値を算出した。

第 11 項　U-PCR による各 B19V 遺伝子型の検出感度測定

WHO B19V パネル（M1、M2 および M3）は 5%ウシ血清アルブミン（BSA）含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて B19V DNA 量が 1.5、1.0、0.5、および 0.0 log IU/mL となるように希釈調製し、各パネルに対して U-PCR により B19V DNA を測定した。検出感度（検出率が 95%となる濃度）は、各希釈パネルの総試験回数（24 回）において陽性となった回数からプロビット分析法を用いて算出した。

第 12 項　CLEIA-B19 による B19V 遺伝子型の検出

高濃度 B19V パネル（M1S、M2S および M3S）を 5%BSA 含有 PBS で 10 倍段階希釈し、3 濃度（M1S：7.28、6.28 および 5.28 log IU/mL、M2S：7.82、6.82 および 5.82 log IU/mL および M3S：7.48、6.48 および 5.48 log IU/mL）の希釈パネルを作製した。各パネルを CLEIA-B19 で 3 重測定し、平均値を算出した。

第 13 項　シーケンス用プライマーの設定

B19V ゲノムの可変領域である NS1-VP1u junction 部分[79]の約 700 塩基をターゲットとして、遺伝子解析用に既知のすべての B19V 遺伝子型に対応したユニバーサルなプライマーセットをデザインした。B19V ゲノムの全長の大部分が登録されている B19V 株を比較し、可変領域を含む共通配列からプライマーを設定した（図 9.）。プライマーは Sense primer：5’-GGACCAGTTCAGGAGAATCAT-3’、Antisense primer：5’-GAAGACTTACACAAGCCTGG-3’とした。

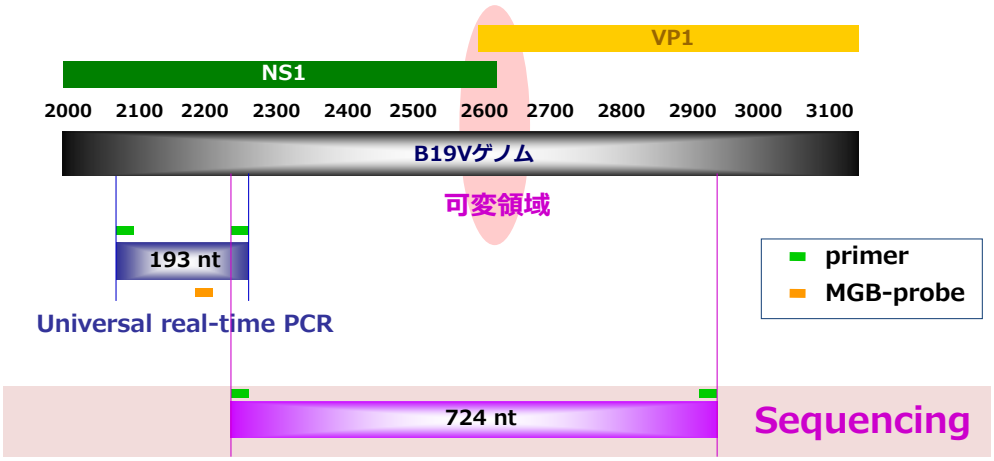


図 9.　遺伝子解析用プライマーの設定

B19V ゲノム（約 5.6 kbp）上の可変領域である NS1-VP1u junction 部分を含む、724 塩基をターゲットとして、プライマーを設定した。

第 14 項　北海道内献血者の B19V 遺伝子型調査

北海道献血者において、1996 年 4 月から 2011 年 9 月までの 15 年半に B19V 抗原スクリーニング（RHA または CLEIA-B19）で検出された B19V 陽性検体のうち、採血日順に無作為に抽出した 198 例（HP001～HP198）について、U-PCR を用いて B19V DNA を確認した。次に B19V 陽性献血者検体 198 例を QIAamp MinElute Virus Spin（QIAGEN）を用いて検体 200 µL から抽出し、TaKaRa Ex Taq® HS（Takara Bio）を用いて、98℃/10 秒、55℃/30 秒、72℃/1 分を 40 サイクルで PCR を実施した。増幅産物は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI 3700 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて遺伝子配列を決定した。次に各遺伝子型のプロトタイプである Au 株（1 型）、A6 株（2 型）および V9 株（3a 型）、D91.1 株（3b 型）とともに NS1/VP1u 領域（1709-2392 nt in AF162273）の配列に基づき、コンピュータープログラム（CLUSTAL W, Version 1.83）により遺伝子解析を行い[80]、Neighbor-joining method による分子系統樹を作成ソフト（MEGA, Version 5.05）により作成し、遺伝子型を決定した。本研究で報告した HP001～HP198 の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank の塩基配列データベース上で、各アクセッション番号 AB691331～AB691528 で利用できる。

第 15 項　統計解析

データは各群の平均値±標準誤差として表した。U-PCR の感度および 95%信頼区間、標準偏差および近似曲線は表計算ソフト（Excel 2007、マイクロソフト社）により算出した。陽性率の比較には、Fisher's exact test を用いて統計的有意性を検定し、有意水準は $P < 0.05$ とした。

第３節　結果

第１項　RHA による北海道献血者 B19V 抗原スクリーニングとその評価

RHA を用いて多数検体スクリーニングを実施し、開始後 2 年分の結果を表 1.に示した。北海道内 5 カ所（札幌、旭川、釧路、室蘭および函館）で検査し、北海道献血者 733,306 例中、RHA 確認試験陽性は 438（0.06%）であった。この陽性例には RHA の偽陽性も含まれることから、さらに B19V 本体の確認のため、B19V DNA を nested PCR により検出したところ、106 例（0.014%）が陽性となった。

RHA によるスクリーニング検査の効果を評価するために、分画血漿プール中の B19V DNA を測定した。その結果、RHA スクリーニング導入前の血液を使用した血漿プールにおいて、高濃度の B19V DNA 混入が認められたが、RHA 導入後の血漿プールでは、明らかに混入量が減少しており、RHA スクリーニングの B19V 低減化効果が明らかとなった（図 10.）。

その後、2009 年に米国 FDA より、分画血漿プール中の B19V DNA 混入量が 10^4 IU/mL を超えないこと、超えたプールバッチは使用しないこと。という勧告が出された[68]。すなわち RHA では、10/47（21%）バッチの血漿プールがこの基準を満たせていないことが後に明らかとなった。

表 1. RHA による B19V 抗原スクリーニング結果

Apr 1996~Mar 1998

血液センター	献血者検体数	RHA 陽性 (%)	B19V DNA 陽性 (%)
札幌	368,165	204 (0.055)	50 (0.014)
旭川	152,233	77 (0.051)	11 (0.007)
釧路	86,056	51 (0.059)	12 (0.014)
室蘭	58,658	44 (0.057)	15 (0.026)
函館	68,194	62 (0.091)	18 (0.026)
合計	733,306	438 (0.060)	106 (0.014)

RHA による多数検体スクリーニングにより陽性となった検体については、用手法による確認検査を実施した。確認試験はマイクロプレート上で陽性血清を 2 倍段階希釈（12 ウェル×2 列）し、1 列に P 抗原陽性 RHA 試薬、もう 1 列に P 抗原陰性 RHA 試薬を添加混和し、P 抗原の有無で RHA 価が 4 倍以上の差を示した検体を RHA 陽性と判定し、出庫不可とした（0.060%）。不可となった血液（血漿）を使用し、nested PCR により B19V DNA を検出した（0.014%）。

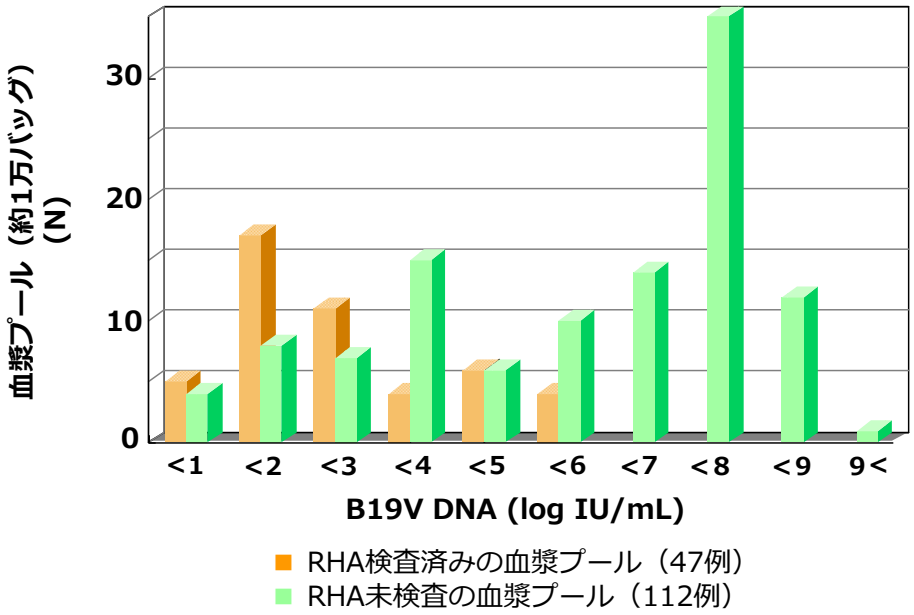


図 10. 分画血漿プール中の B19V DNA 混入量の測定

血漿 5,000-10,000 バッグから成る分画血漿プール中の B19V DNA 量を測定した。RHA 導入後の血漿を用いた血漿プールでは混入量の低減化が認められた。しかし FDA の基準である 4 log IU/mL を超えたバッチが 10 例（21%）存在した。

第 2 項　B19V DNA 陽性パネルを用いた CLEIA-B19 検出感度試験

より高感度な方法として開発した CLEIA-B19 を用いた B19V DNA 陽性パネル（n = 152）の測定結果を図 11.に示した。B19V DNA 陽性パネルにおける CLEIA-B19 Ag count（B19 抗原量）と B19V DNA 量は B19V DNA 量が 10^6 IU/mL 以上において正の相関傾向を示した。また、RHA は高濃度（> 10^{10} IU/mL）パネル以外を、安定的に検出できないことから、CLEIA-B19 は RHA より 10^3～10^4 倍高感度であることが明らかとなった（図 11.）。

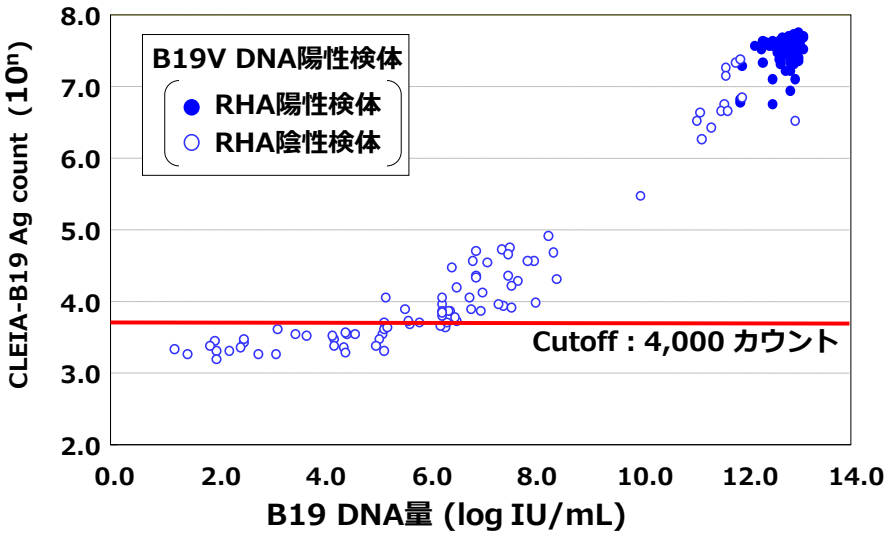


図 11.　B19V DNA 陽性パネルを用いた CLEIA-B19 検出感度試験

RHA または PCR によって B19V DNA 陽性が確認された血漿検体（n=152）を B19V DNA 陽性パネルとし、CLEIA-B19 により化学発光酵素免疫測定装置ルミパルス Presto（富士レビオ）で測定した。カットオフ値は B19V NAT 陰性献血者検体（n = 671）のカウント値の平均＋6 SD より、4,000 カウントとし、これ以上を陽性と判定した。B19V DNA 陽性パネルのうち、RHA で安定的に陽性となるパネルを（●）、それ以外を（○）で示した。

第３項　CLEIA による北海道献血者 B19V 抗原スクリーニング

2008 年 2 月から 2011 年 9 月までの 1,035,560 例の北海道献血者検体を CLEIA-B19 によりスクリーニングした結果、417 例（0.04%）が繰り返し陽性（製品用血液から除外）となった。CLEIA-B19 陽性の中には偽陽性が含まれるため、陽性となった血液製剤（血漿）を用いて、U-PCR 法により B19V DNA を検出したところ、約 4 分の 1 に当たる 101 例（0.01%）が B19V DNA 陽性となった（図 12.）。この陽性率は、B19V の流行により大きく変動した。図 13.に伝染性紅斑患者報告数と B19V DNA 陽性献血者の推移を示した。折れ線グラフは伝染性紅斑報告数の全国と北海道の推移を示しているが、この母集団は主に小児であり、全国と北海道でほぼ同様の推移を示した。最近では 2007 年と 2011 年の上半期に大きな流行が見られ、2007 年の流行時は RHA によるスクリーニングであったが、献血者からも多くの B19V DNA 陽性例が検出された。この流行が収まった後に CLEIA が導入され、その後 2010 年 12 月から伝染性紅斑の流行が始まり、それに伴い同じく献血者での B19V DNA 陽性例も増加した。その後 2011 年の 6 月で流行が収まったが、CLEIA 陽性 101 例中の 67 例（66%）がこの流行期に検出された（図 13.）。また、CLEIA-B19 陽性で B19V DNA 陰性であった 316 例（0.03%）は、61 人の再来者を含む 171 人の献血者で構成されていた。

101 例の B19V DNA 陽性例を感染ステージ毎の 4 つのグループに分類した。詳細は、グループ I : 感染初期（B19V IgM 抗体陰性かつ B19V IgG 抗体陰性）55 例、グループ II : 感染中期（B19V IgM 抗体陽性かつ B19V IgG 抗体陰性）8 例、グループ III : 感染後期（B19V IgM 抗体陽性かつ B19V IgG 抗体陽性）29 例、およびグループ IV : 感染終期（B19V IgM 抗体陰性かつ B19V IgG 抗体陽性）9 例であった（表 2.）。グループ I と II の 63 例は 6 log IU/mL 以上の B19V DNA 量を示したが、グループ III の 29 例は IgM および IgG 抗体陽性で、グループ I および II より B19V DNA 量は低かった。B19V DNA 量が低濃度（< 4 log IU/mL）であったグループ IV の 8 例は、5 人の献血者で構成されており、8 例中 4 例は 1 人の献血による検体であった。

CLEIA-B19 陰性の 682 例を U-PCR により測定した結果、B19V DNA 陽性は 21 例（3.1%）で、すべて B19V IgG 抗体陽性、B19V DNA は低濃度（< 4 log IU/mL）であった。

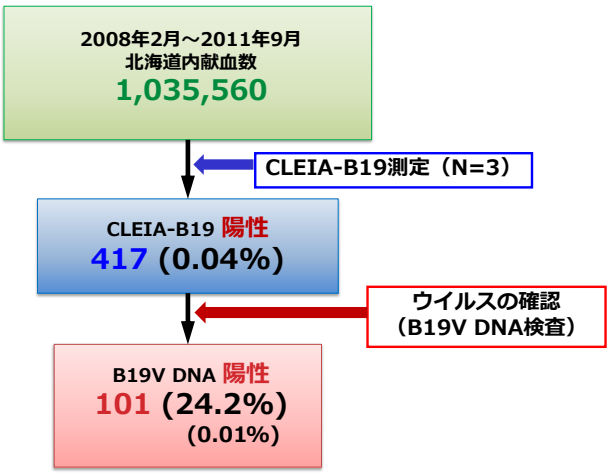


図 12. CLEIA-B19 による B19V 抗原スクリーニング結果

献血者検体（血清）を全自動化学発光酵素免疫測定装置 CL4800（富士レビオ）で測定し、CLEIA-B19 陽性（n = 1）となった検体は、さらに 2 重測定を実施し、合計 3 測定中 2 回以上陽性となった場合に陽性と判定し、出庫不可とした（0.04%）。不可となった血液（血漿）を用いて、U-PCR により B19V DNA を検出した（0.01%）。

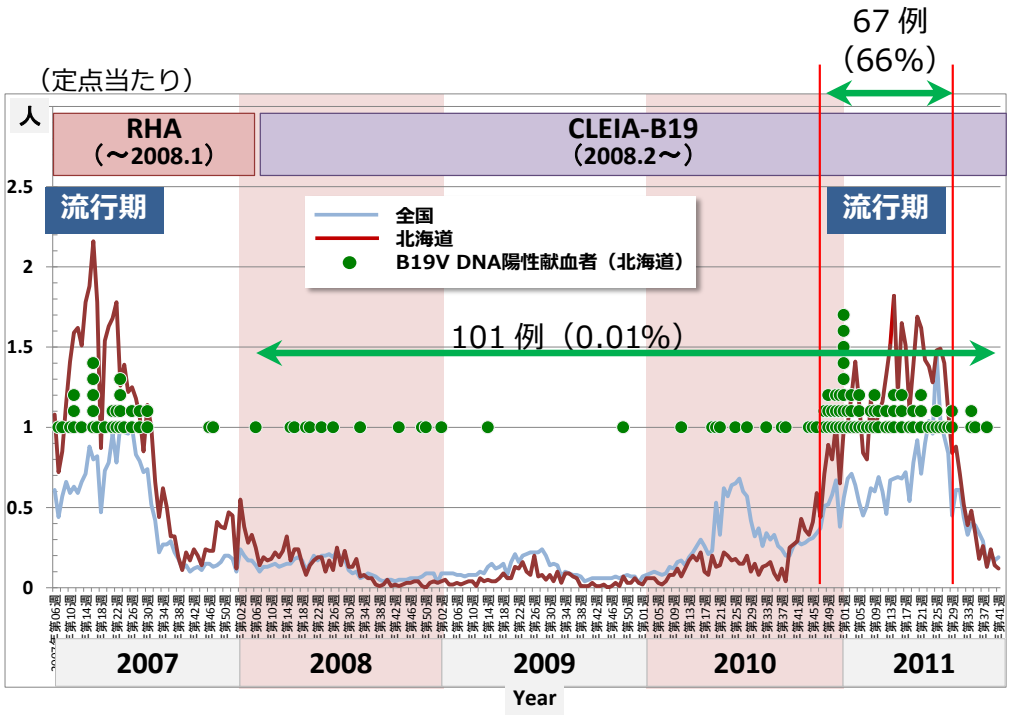


図 13. 伝染性紅斑患者報告数と B19V DNA 陽性献血者の推移
（感染症サーベイランス情報、週報）

全国（青線）と北海道（赤線）の伝染性紅斑報告数および北海道献血者における B19V DNA 陽性例（●）を週別にプロットした。2007 年と 2011 年の上半期に流行が認められ、陽性献血者も流行に伴い増加した。

表 2. B19V DNA 陽性献血者における B19V 特異抗体別の B19V DNA 量

B19V DNA量 [log IU/mL]	B19V DNA陽性 献血者検体数	検体数 グループ I*	検体数 グループ II*	検体数 グループ III*	検体数 グループ IV*
12以上	20	19	1	0	0
11以上12未満	19	13	6	0	0
10以上11未満	7	5	0	2	0
9以上10未満	6	6	0	0	0
8以上9未満	8	4	0	3	1
7以上8未満	18	7	1	10	0
6以上7未満	14	1	0	13	0
5以上6未満	1	0	0	1	0
4以上5未満	0	0	0	0	0
3以上4未満	1	0	0	0	1
2以上3未満	2	0	0	0	2
2未満	5	0	0	0	5
合計（%）	101	55 (54.5)	8 (7.9)	29 (28.7)	9† (8.9)
平均B19V DNA量± SD [log IU/mL] （最小－最大）	9.0 ± 2.9 (1.5-12.3)	10.6 ± 1.8 (6.5-12.3)	11.1 ± 1.4 (7.6-12.1)	7.3 ± 1.1 (5.6-10.3)	2.8 ± 2.2 (1.5-8.4)

* グループ I：感染初期（B19V IgM 抗体陰性かつ B19V IgG 抗体陰性）、グループ II：感染中期（B19V IgM 抗体陽性かつ B19V IgG 抗体陰性）、 グループ III：感染後期（B19V IgM 抗体陽性かつ B19V IgG 抗体陽性）、グループ IV：感染終期（B19V IgM 抗体陰性かつ B19V IgG 抗体陽性）とした。

† B19V DNA 量が 4 log IU/mL 未満の 8 検体は 5 人の献血者で構成されており、8 検体中 4 検体は 1 人の献血によるものであった。

SD: 標準偏差、IU: 国際単位

第４項　CLEIA-B19 と B19V DNA 量との相関

献血者由来の B19V DNA 陽性検体について、B19V DNA 量と CLEIA-B19 の測定値との相関をみた（図 14.）。CLEIA-B19 の上限値が 2000 COI であるため、2000 COI を示した 40 例と、B19V DNA 量が低濃度（< 4 log IU/mL）のグループ IV の 8 例を除いた 53 例を使用し、近似直線を作成した。CLEIA-B19 値と B19V DNA 量との間には相関が認められ（$R^2 = 0.87$）、CLEIA-B19 のカットオフ値（1.0 COI）と交差する B19V DNA 量から、検出感度は約 6.4 log IU/mL と算出された。

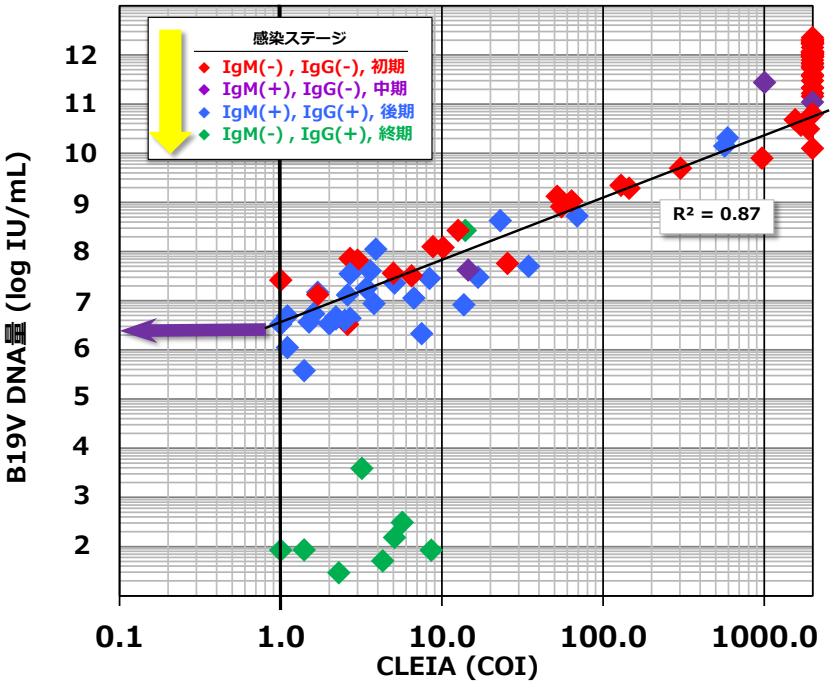


図 14.　B19V DNA 陽性献血者における CLEIA-B19 と B19V DNA 量との相関
（2008 年 2 月～2011 年 9 月、B19V DNA 陽性 101 例、北海道）

各プロットは表 2 に示したグループ I、II、III および IV 別に色分けした（各赤、紫、青および緑）。検量線は、グループ IV の 8 例と CLEIA-B19 の測定範囲の 2000 COI を超えた 40 例を除く、53 例に基づき作成した。

第５項　分画血漿プール B19V 混入量調査

図 15.に全国の献血者血漿から作製された血漿プール中の B19V DNA 量を示した。RHA でスクリーニングされた血漿由来である 2,118 バッチのうち 365 （17.2%）バッチが B19V DNA の混入量 4 log IU/mL 以上であった。一方 CLEIA-B19 スクリーニングに完全に切り替わった後の 772 バッチは、直近の B19V 流行期（2011 年上半期）に得られたほぼすべての原料血漿を含んでいた。これら 772 バッチは、すべて FDA での推奨基準値である 4 log IU/mL 未満であった。

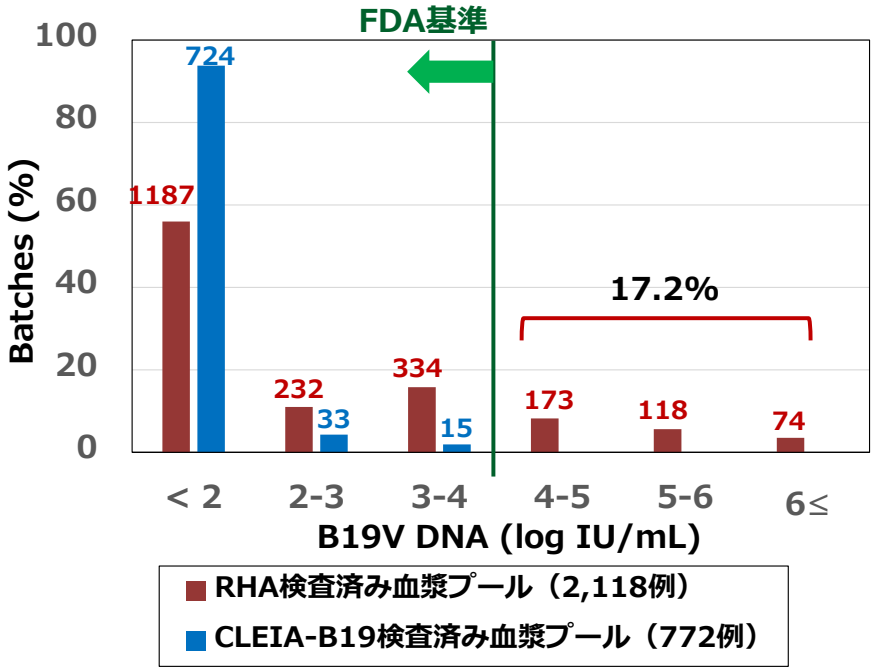


図 15.　分画血漿プール中の B19V DNA 混入量の測定
（2003 年～2011 年 6 月）

第 6 項　U-PCR における各 B19V 遺伝子型の検出感度

樹立した U-PCR により、調製した WHO B19V パネルの各遺伝子型 DNA を 24 回測定することで、測定系の安定性と感度を調べた（表 3.）。各遺伝子型について、プロビット分析により算出された検出感度は、1 型が 15.2 IU/mL（95%信頼区間 [CI], 7.8～83.9 IU/mL）、2 型が 9.9 IU/mL（95% CI, 5.7～36.9 IU/mL）、および 3 型が 16.5 IU/mL（95% CI, 8.6～81.4 IU/mL）以上であった。したがって、U-PCR は、すべての遺伝子型について検出可能であり、さらに各遺伝子型間での感度に大きな差は認められなかった。

表 3.　各遺伝子型に対する Universal PCR の感度算出
（プロビット分析による）

	WHO B19V genotypeパネル		
B19V DNA量 log IU/mL (IU/mL)	**M1 (1型)**	**M2 (2型)**	**M3 (3型)**
1.5 (31.6)	**24/24***	**24/24**	**24/24**
1 (10.0)	**21/24**	**23/24**	**21/24**
0.5 (3.2)	**18/24**	**17/24**	**16/24**
0 (1.0)	**7/24**	**8/24**	**6/24**
95%検出限界 (IU/mL)	**15.2**	**9.9**	**16.5**

*** 陽性数／試験回数**

WHO B19V パネルを PBS で希釈調整し、0 log IU/mL（1.0 IU/mL）から 1.5 log IU/mL（31.6 IU/mL）の濃度となるように希釈系列を作製した。各パネルに対して 24 回測定し、その検出頻度から各遺伝子型の 95%検出限界を算出した。

第 7 項　CLEIA-B19 における B19V 遺伝子型の検出

CLEIA-B19 を評価するためにはその感度から、少なくとも B19V DNA 量が約 6 log IU/mL を超える検体が必要であるため、WHO B19V パネル（M1、M2、および M3）では CLEIA-B19 の評価はできない。そこで、高濃度 B19V パネル（M1S、M2S および M3S）を使用し、これらを希釈調製した各パネルを CLEIA-B19 で測定した。B19V DNA 量に対する CLEIA-B19 測定値（3 重測定の平均値）を図 16.に示した。各遺伝子型について CLEIA-B19 の値と B19V DNA 量との相関を調べた結果、累乗近似により希釈直線性が認められた（$R^2 > 0.99$）。また、1 型、2 型および 3a 型の測定により得られた近似直線は、ほぼ一定の範囲内に収束していた。したがって、CLEIA-B19 における各パネルの検出感度および特異性に大きな差は認められなかった。また、各近似直線が CLEIA-B19 のカットオフ値（1.0 COI）と交差する B19V DNA 量から、その検出感度は約 6.3 log IU/mL 以上（1 型：6.23 log IU/mL、2 型：6.11 log IU/mL、および 3a 型：6.23 log IU/mL）と推定され、献血者検体を使用した検出感度（図 14.）とほぼ同等であった。したがって CLEIA-B19 を用いたスクリーニング検査は、分画製剤における FDA の基準のひとつである既知の 3 種類の遺伝子型を検出できる有用な代替法となり得ることが明らかとなった。

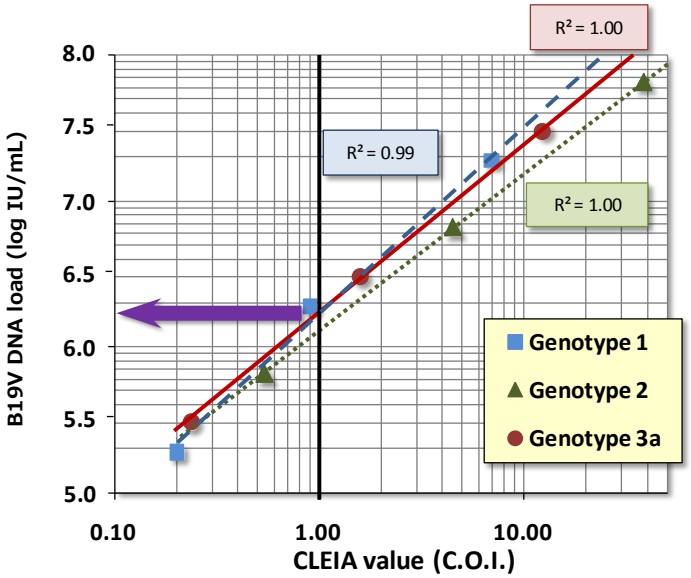
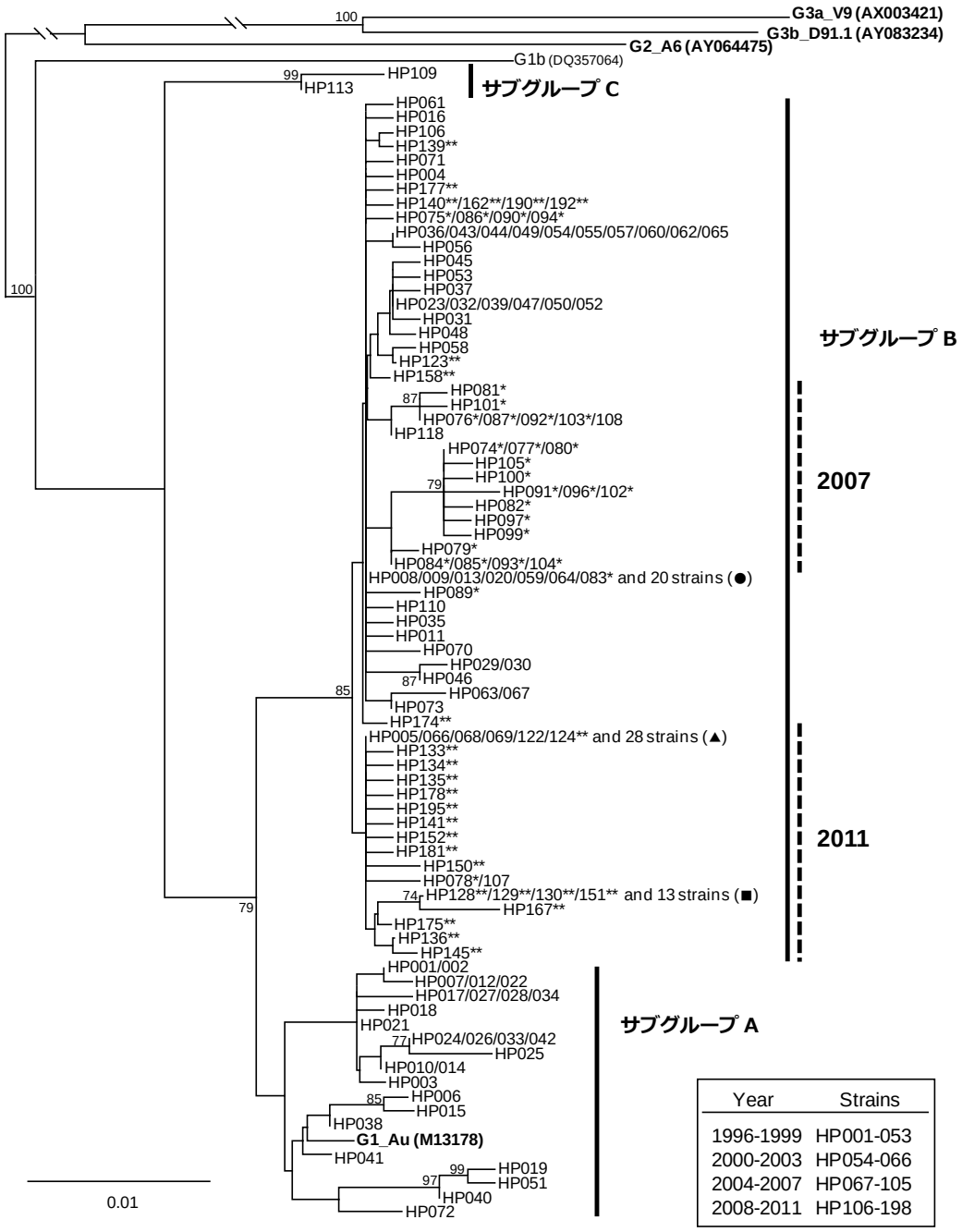


図 16. 各 B19V 遺伝子型における CLEIA と B19V DNA 量との相関

高濃度 WHO B19V パネル（1 型、2 型および 3a 型）の DNA 量は濃度既知の B19V 陽性血漿（1 型）を用いたスタンダード系列から U-PCR により決定した。各パネルは 3 濃度に 10 倍段階希釈し、CLEIA-B19 で 3 重測定した。

第８項　北海道内献血者における B19V 遺伝子型分布

北海道内献血者由来の B19V 陽性 198 例（HP001～HP198）について、B19V ゲノムの NS1-VP1u 領域の塩基配列（約 700 塩基）に基づく Neighbor-joining method による分子系統樹解析で得られた系統樹を図 17.に示した。解析の結果、198 例の遺伝子型はすべて 1 型で、2 型および 3 型はいずれも検出されなかった。したがって、1996 年から 2011 年の 15 年半では、北海道内の献血者において 1 型のみが流行していたと考えられた。またこの系統樹から、1 型の各株はさらに大きく 3 つのグループに分類され（サブグループ A、B および C とした）、採血日（年）を考慮すると、サブグループ A は 1990 年代の終わり以降はほぼ検出されなかった。また 2007 年と 2011 年の上半期における伝染性紅斑の大流行期に献血者から得られた株は、どちらもサブグループ B に属していたが、異なるクラスター（集団）を形成していた。伝染性紅斑の各流行期に検出された B19V 株の多くは塩基配列に 100%の類似性がみられた。



● : HP/088*/095*/098*/111/112/114/115/116/117/119/120/121/125**/126**/131**/138**/160**/182**/184**/186**

▲ : HP127**/132**/137**/142**/143**/144**/146**/147**/148**/149**/153**/154**/159**/161**/163**/164**/165**/166**/169**/172**/176**/183**/185**/187**/191**/194**/196**/197**

■ : HP155**/156**/157**/168**/170**/171**/173**/179**/180**/188**/189**/193**/198**

図 17. 北海道献血者由来 B19V 株の分子系統樹解析（1996 年 4 月～2011 年 9 月）

NS1-VP1u 領域（684nt）の塩基配列に基づき NJ 法により作成した。1 型はプロトタイプ Au 株（アクセション No. M13178）で示した。同様に 2 型、A6（AY064475）; 3a 型、V9（AX003421）; 3b 型、D91.1（AY083234）で示した。198 株（HP001-198）すべてが 1 型に分類され、さらに少なくとも 3 つのサブグループ（A、B および C）に分けられた。2007 年と 2011 年の上半期における伝染性紅斑の大流行期に献血者から得られた株は、どちらもサブグループ B に属していた。流行株の検出年は 2007 年（*）、2011 年（**）で示した。

第４節　考察

本研究において、RHA を作製し、献血血液の B19V 抗原スクリーニングに導入し、その効果をみた。RHA による B19V 抗原検査により、約 0.06%のスクリーニング陽性例を検出し、結果として 0.014%の B19V DNA 陽性血液を除外した。しかし、血漿分画製剤の製造に供される血漿分画プール中の B19V DNA 量は低減化したものの、分画血漿製剤の安全性を担保するには不十分であった [65,81,82]。更なる高感度化を目指し、CLEIA-B19 を導入し、評価を行った。まず、CLEIA-B19 の感度について算出した。WHO パネル（1 型、2 型、および 3a 型）を用いた結果では、約 6.3 log IU/mL、B19V DNA 陽性献血者検体 53 例を用いた結果では、約 6.4 log IU/mL であった。さらに全国の献血者由来血漿分画プールの B19V DNA 量を測定した。CLEIA-B19 で陽性となった血液を除外することにより、血漿プール中の B19V DNA 混入量は著しく減少した（< 4 log IU/mL）。

CLEIA-B19 により検出された B19V DNA 陽性献血者検体を感染ステージ別に 4 つのグループに分類した。グループ I と II は高ウイルス量であり、CLEIA-B19 により安定的に検出可能と考えられる感染初期から中期に相当した。グループ III は CLEIA-B19 の検出感度限界に近いものを含む感染中期から後期に相当した。またグループ IV は CLEIA-B19 の非特異反応によって検出した感染後期から終期の検体と考えられた。CLEIA-B19 で陽性を示した献血者は 417 例（0.04%）で、そのうち 101 例（0.01%）が PCR で B19V DNA 陽性と確認された。さらに北海道内献血者由来の B19V DNA 陽性 198 例を解析し、得られた系統樹から、198 例の遺伝子型はすべて 1 型であることが確認され、さらに大きく 3 種類のグループに分類した（サブグループ A、 B および C とした）。これらを採血年からみると、サブグループ A は 1990 年代の終わり以降ほぼ検出されなくなり、現在はサブグループ B が感染循環していることが明らかとなった。

米国 FDA は分画製剤製造各社に対して、分画製剤製造工程中の B19V 検出用の検査に関して以下のように勧告した [68]。1）血漿分画原料プール中の B19V DNA 量は 4 log IU/mL を超えないこと。2）すべての血漿由来製品に対する B19V NAT は、既知のすべての遺伝子型が検出できること。日赤血漿分画センター（現 日本血液製剤機構）の血漿分画製剤は、日赤の献血血液から製造していることから、B19V 抗原スクリーニング検査（RHA または CLEIA-B19）は分画製剤の安全性に寄与していると言える。しかし、RHA スクリー

ニングでは FDA の基準を超える血漿プールバッチが 21%存在したため、感度は不十分と考えられた。FDA の勧告[68]では、「本ガイダンスに記載されたもの以外の代替的アプローチでも、適用される要件を充足するものであれば用いることができる。」としている。しかしながら、高感度化された CLEIA-B19 によるスクリーニングが B19V に関する FDA のこれら 2 つの基準を満たすための代替法となり得るかどうかは不明であった。FDA の最初の基準に関して、CLEIA-B19 で陽性となった血液を除外することにより、血漿プール中の B19V DNA 混入量は本研究において検討した 772 バッチすべてで基準を満たしていた。2 つ目の基準に関して、B19V の各遺伝子型間における DNA レベルでの差は約 10～15%と言われているが、in vitro での細胞感染性、p6 プロモーター活性、および血清学的交差反応性はほぼ同等で、血清型としては 1 種類であると報告されている[83]。CLEIA-B19 は抗原抗体反応に基づく検出系であるため、3 種類のすべての遺伝子型がほぼ同等の感度で検出できたのは妥当な結果と言える。CLEIA-B19 はスクリーニング法として、FDA の 2 つの基準を満たす代替法となり得ることが明らかとなった。

グループ I および II のウイルスを高濃度に含む検体は、そのウイルスに対するプール NAT スクリーニングにおけるクロスコンタミネーションリスクとなる。仮に今後 B19V NAT スクリーニングが導入されるとしたら、CLEIA-B19 はプール NAT 前にグループ I や II のような B19V 高濃度検体を除外できるという点で有用である。また、本研究におけるグループ IV を除く高濃度のウイルスを含む B19V 陽性例（グループ I～III）は 93 例（0.009%）であった。オランダでは、2003 年から 2009 年の献血者を対象に 480 本プール NAT を実施し、6 log IU/mL 以上の B19V 陽性例が 0.006%（411/650 万人）検出されたと報告されている[84]。同様に 2000 年から 2003 年の米国の献血者では、0.016%（2/12,529）と報告された[85]。スクリーニング感度が CLEIA-B19 とほぼ同等で、比較的多数の献血者検体によるこれらの陽性率は、北海道のデータとかなり類似していた。しかし、陽性率は伝染性紅斑の流行によって大きく変動するため、調査期間により差が出るものと思われる。本研究では、日本における 4～6 年ごとの伝染性紅斑の流行に伴い、献血者での B19V 陽性者数の増加を確認したが、その流行の間隔はオランダも同様であった[2,84]。感染症発生動向調査によると、日本の患者分布では 5～9 歳での発生がもっとも多く、ついで 0～4 歳

が多いとされる[86]。学校や幼稚園等の施設内感染を考慮すると、同施設内での学童・園児の入れ替わりによる影響がこうした流行間隔の一因となっている可能性がある。

グループ I や II と比べると、グループ III の検体には、より高濃度の B19V 抗体が共存するため、CLEIA-B19 による B19V 抗原検出にとっては不安定な要因となりうる。実際、とくに B19V DNA 量が 7 log IU/mL 付近の検体において、CLEIA-B19 の測定値にばらつきが認められた。したがって、CLEIA-B19 の感度は約 6.3～6.4 log IU/mL と算出されるものの、B19V DNA 量が 7 log IU/mL 付近の検体をすべて検出できるとは限らない。日本の献血者約 10,000 バッグから成る血漿プールバッチに、B19V DNA が 8 log IU/mL 以上含まれる検体（血液バッグ）が 1 本でも混入すると、計算上血漿プールでの基準（4 log IU/mL 未満）を超える。しかしながら、今のところ B19V DNA 混入量が、FDA 基準を超えるバッチは認められなかった。B19V 混入量が基準未満であった血漿プールバッチは、直近の B19V 大流行期（2011 年上半期）に献血されたすべての血液を含んでおり、厳しい条件でのデータであることを考慮すると、今後、基準を超えるバッチが検出される可能性は低いと推測される。

算出された CLEIA-B19 の感度（6.3～6.4 log IU/mL）を考えると、グループ IV の 8 検体（8 log IU/mL の 1 本を除く）は CLEIA-B19 の偽陽性と示唆された。中和抗体（抗 B19V IgG 抗体）が産生され治癒した後も、低濃度の B19V DNA が数年にわたり、継続的に血中から検出されることが報告されている[87,88]。Matsukura らは日本の無症候の B19V 感染献血者において、B19V DNA が 2～4 年の間血中から検出されたと報告した[87]。これらは B19V IgG 抗体が高レベルで存在し、CLEIA-B19 においても反応性を示さない B19V DNA 低濃度の検体であった。本研究では CLEIA-B19 陰性例の 3.1%（21/682）が B19V DNA 陽性（低濃度）かつ B19V IgG 陽性（感染終期）であることを示した。また CLEIA-B19 陽性 417 例中 B19V DNA 陰性の 316 例（献血者 171 名）は CLEIA-B19 の偽陽性と考えられた。グループ IV の 8 例（献血者 5 名）も偽陽性と仮定すると、偽陽性集団 176 人中 5 人（2.8%）が B19V DNA 陽性であったことになる。したがって、CLEIA-B19 陰性集団に 3.1%存在する感染終期の B19V DNA 陽性者が、CLEIA-B19 の偽陽性集団にもほぼ同等の割合で存在しているとするならば、2.8%は妥当な結果と言える（P = 0.8694）。血液の安全性を高めることは重要だが、血液事業上、スクリーニング検査での偽

陽性率は血液の安定供給に支障をきたす恐れがあるため、可能な限り少ないことが望ましい。CLEIA-B19 に使用しているモノクローナル抗体が、交差反応性を有する未知の血液成分を検出している可能性が考えられるため、その詳細は今後検討されるべき課題である。

北海道献血者から検出された 1 型のサブグループ C は流行期とは別の 2008 年に検出された 2 例のみであったことから、単発的な発生と考えられた。2007 年と 2011 年の上半期における伝染性紅斑の大流行期に献血者から得られた株は、どちらもサブグループ B に属していたが、異なるクラスター（集団）を形成していた。したがって過去の北海道内における B19V の流行は 1 型によるものであるが、その感染株はわずかに変異しながら感染循環していると推測された。本研究と同地域である札幌市の医療機関のレトロスペクティブな研究によると、過去 28 年間（1980 年～2008 年）に集められた入院・外来を含む様々な患者血清約 18,000 本から 104 例の B19V DNA 陽性例が検出されたが、いずれも 1 型であったと報告されている [89]。さらに、伝染性紅斑の流行期とは関連しない塩基配列の大きな変化が 1980 年代後半と 1990 年代後半にみられ、このうち後者は、本研究でのサブグループ A から B への変遷の時期と一致していた。前述のオランダのグループの続報 [90] では、2003 年から 2009 年において 1 型は 1a1 と 1a2 のグループに分けられ、流行の周期やサブグループの分類等、本研究と類似した特徴が示された。しかし、本研究でのサブグループ A に対応するオランダの 1a1 は、2009 年においても全体の 50%を占めており、北海道との地域性の差が認められた（図 18.）。各遺伝子型の罹患率は、地理的起源、および母集団によって異なる。フィンランドの血漿プールでは、1 型のみが検出され [74]、ガーナの献血者で検出された株の 100%が 3 型であった [34] と報告されている。ヨーロッパ、アジア、西アフリカの 11 カ国からの B19V 配列の系統発生解析に基づく最近の研究では、1 型の世界的優位性が確認され、3b 型の拡大が示唆されている [38]。こうした状況で、北海道とオランダで、1 型のサブグループ（サブグループ A : 1a1、サブグループ B : 1a2）が共に検出されたことは、今後系統学的な解明を進める上で興味深い事象である。

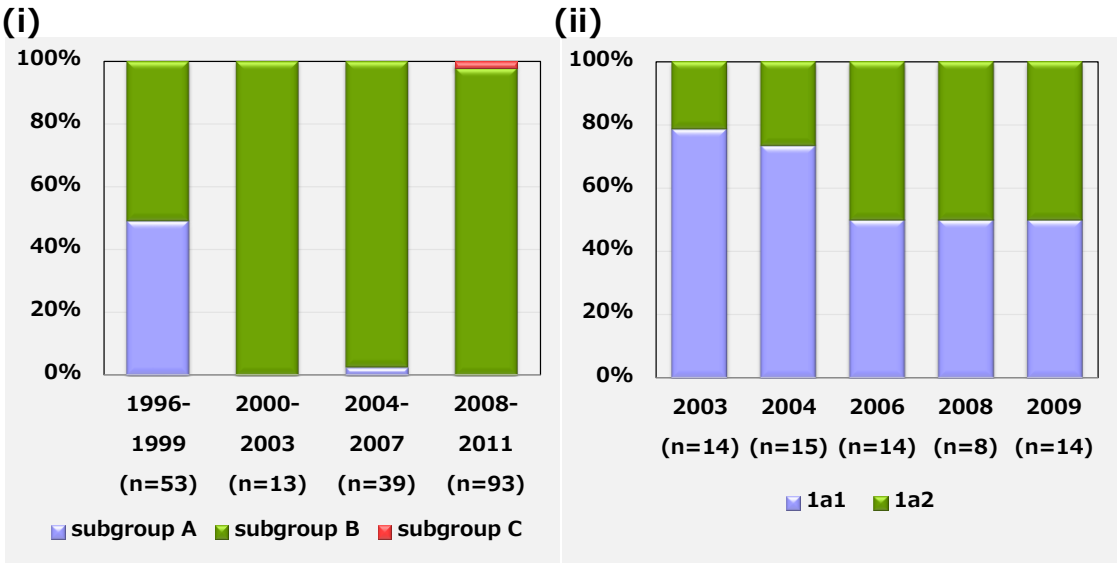


図 18. 各 B19V 遺伝子型サブグループの割合の変化
本研究（i）、オランダ（ii）

北海道献血者由来 B19V 株 198 例はすべて 1 型であったが、1 型をさらにサブグループ A、B、および C と分類したところ、A は 1999 年以降ほぼ検出されなくなった（左グラフ(i)、青）。一方、オランダの献血者由来 B19V 株の 1 型のうち、1a1 型、1a2 型はそれぞれ北海道のサブグループ A、B に相当するが、1a1 型の割合は低下したものの、2009 年においても 50%の割合で検出された（右グラフ(ii)、青）。

B19V DNA 量が 5～6 log IU/mL 未満のグループ III と IV の検体の大部分は、一般的に B19V 中和抗体である IgG 抗体を高レベルに含んでいるため、5 log IU/mL が輸血後 B19V 感染の最少感染用量と考えられている[85,92]。Hourfar らは B19V DNA 量 5 log IU/mL 未満の献血者由来血液を輸血された 16 人の患者には B19V DNA は検出されなかったのに対し、5 log IU/mL 以上を輸血された患者の半数（9/18）に B19V DNA が確認されたと報告した[92]。しかしながら、B19V 感染例がまれであるという理由から、世界的には輸血用血液製剤に対する対策はされていない。RHA スクリーニング検査を実施していた期間に日本で発生した B19V 輸血後感染確定事例を表 4.に示した。例数は少ないものの、感染源となった血液（原因血）の大部分は 5 log IU/mL 以上であるが、1 例については 3 log

IU/mL で感染が確認された[93]。原因血の 1 例はグループ II で、残りすべてはグループ III であった。CLEIA-B19 導入により、その検出感度（6.3～6.4 log IU/mL）以上の B19V が混入した血液が原因となる B19V 感染リスクは減ったものの、CLEIA-B19 の感度は輸血後感染を完全に防止するには不十分である。実際、CLEIA-B19 導入後にグループ III が原因となる輸血後 B19V 感染事例が 1 例発生している（データ未提示）。費用対効果を考慮すると、現状では輸血後 B19V 感染防止のためにすべての輸血用血液製剤に対する NAT を導入することは難しい。したがって輸血用血液の安全性向上には、今後 CLEIA-B19 の高感度化のための改良、新規高感度検出系の開発が必要である。もしくは、B19V 感染におけるハイリスク患者（溶血性貧血患者、免疫不全患者、および妊婦等）に対しての選択的 NAT スクリーニングを導入するか、あるいはグループ II と III を排除するための B19V IgM 抗体スクリーニング検査を CLEIA-B19 と併用するのも戦略のひとつとなる。

CLEIA-B19 は血漿プール中の混入 B19V DNA 量の低減化のみならず、日本以外ではほぼ実施されていない輸血用血液による感染リスクの低減化に対しても大きく貢献した。さらに本研究によって、CLEIA-B19 によるスクリーニング検査が、米国 FDA における B19V の基準（勧告）を満たす代替法となり得ることが示された。NAT 試薬の弱点は変異株であり、B19V を NAT 検査試薬で検出できない、あるいは感度低下となるような問題も報告されている[94,95]。B19V 輸血感染防止のためには、更なる高感度化への検討は必要だが、新たな B19V 変異株が今後出現したとしても、B19V の抗原性自体が大きく変化しない限り、CLEIA-B19 は、現状最も有効な血清学的スクリーニング検査法であることが証明されたと言える。

北海道内の献血者に検出された B19V の遺伝子型は 1 型のみで、2 型および 3 型は検出されなかった。今のところ、国内において北海道以外の地域から 2 型および 3 型が検出されたという報告もない。しかし B19V の感染経路は飛沫感染が主体であることから、今後、日本でも輸入株による B19V 感染例がみられる可能性はある。将来的に日本で輸入感染症として、2 型、3 型が蔓延する可能性は否定できない。したがって、これら既知のすべての遺伝子型のモニタリングは引き続き必要である。しかし、いまだ病態と遺伝子型（変異株を含む）との関連性については不明な点も多く、今後、臨床症状を含めた詳細な分析も併せて必要と思われる。

表 4. 輸血による B19V 感染例（参考）
（日赤、輸血後感染確定例、2000-2008）

受血者	輸血前	輸血後	症状	原因血	発生年
41 M Hairly cell 白血病		B19V DNA+ IgM+, IgG+	赤血球無形成症(3m) 網状赤血球減少症(1m)	RBC $1.8x10^5$ IU/mL IgM+, IgG+	2005
57 M AML	B19V DNA- IgM-, IgG-	B19V DNA+ IgM+, IgG+	赤芽球ろう(2m)	PC $9.7x10^8$ IU/mL IgM+, IgG-	2005
35 F 切迫流産 (前置胎盤)	B19V DNA- IgM-, IgG-	B19V DNA+ IgM+, IgG+	発熱 全身性発疹(3w)	RBC $3.0x10^5$ IU/mL IgM+, IgG+	2005
59 M 直腸癌	B19V DNA- IgM-, IgG-	B19V DNA+ IgM+, IgG+	発熱(5d)	RBC $5.1x10^3$ IU/mL IgM+, IgG+	2006
61 M AML	B19V DNA-	B19V DNA+	発熱、播種性紅斑 赤芽球ろう(7w) 網状赤血球減少症	PC B19 DNA+ IgM+, IgG+	2002

M: 男性、F: 女性、m: ヶ月間、w: 週間、d: 日間、
AML: 急性骨髄性白血病、RBC: 赤血球、PC: 血小板

第５節　まとめ

- 新規に B19V 抗原検出系を構築、改良し、献血血液スクリーニング検査に導入した。
- RHA および CLEIA-B19 により、北海道献血者から約 0.01%の B19V 陽性例を検出した。
- CLEIA-B19 導入後、すべての分画血漿プール中の B19V DNA 量は 4 log IU/mL 未満であった。
- CLEIA-B19 はすべての遺伝子型の WHO genotype パネルについて同等の感度で検出できた。
- CLEIA-B19 は FDA の基準を満たす代替法となり得ることを明らかにした。
- 北海道内の献血者においては、これまで 1 型のみが流行していた。

第 2 章　献血者における E 型肝炎ウイルスの感染実態の解明

第 1 節　背景

肝炎ウイルスには A 型、B 型、C 型、D 型、および E 型が知られている。HBV および HCV は主に血液感染だが、HAV および HEV は経口感染が主な感染経路である。HEV は、これまで輸入感染症と考えられてきたが、近年、先進国においても土着株が確認されている[48-51]。途上国では、一般に汚染された水から大規模な集団発生が認められ、妊婦での高い致死率も報告されている[45]。一方、先進国では、動物肉を摂取したことによる食物感染の報告がある。HEV は *Hepeviridae* に属しており、*Orthohepevirus* と *Piscihepevirus* で構成されている[46,47]。*Orthohepevirus* の遺伝子型の 1～4 型は、ヒトに感染性があることが知られている。1 型および 2 型はヒトでのみ発見され、3 型および 4 型はヒト以外にも多くの哺乳動物に見出される。したがって、3 型と 4 型は人獣共通感染症で、とくに HEV の最も重要なウイルス保有動物は、ブタ、イノシシおよびシカである[46,47]（図 5.）。

日赤（血液センター）では HCV が発見される前、非 A 非 B 型肝炎対策として、肝細胞の破壊とともに血中濃度が上昇することから肝機能の指標となる ALT（GPT）の検査を導入した。しかし HCV 抗体検査が導入された後も、献血者の健康管理の一助として、併せて、未知の肝炎ウイルスの代用検査として現在も ALT 検査を実施している。2002 年に北海道で本邦初の輸血後 E 型肝炎発症例を確認[58]し、その後 2004 年には再び北海道で輸血後 E 型肝炎が発生した[59]（図 19.）。この原因となった献血者の血液（9/20 採血）は ALT 値が 236 IU/L となって検査不合格となり、その後、高濃度の HEV RNA が含まれていることが判明した。遡及調査の結果、この献血者は 2 週間前（9/6）にも献血歴があり、この保管検体（日赤では輸血後感染症を含めた輸血副作用の原因究明のために、1996 年 9 月より全献血者の検体を 11 年間凍結保管している）からは、約 10^3 IU/mL の HEV RNA が検出された。この前回献血（9/6 採血）の血小板製剤は、ALT 値正常であったためすでに非ホジキンリンパ腫の 60 代男性患者に輸血されており、輸血後 22 日目には受血者血液から HEV RNA が検出された。原因となった献血者は親類縁者 12 名とブタレバーやホルモンを食べて HEV に感染したとみられ、父親は E 型劇症肝炎で死亡、他の 11 名中 5 名か

らも HEV 抗体（IgM: 4 人、IgG: 5 人）が検出された。しかし食材が残っていなかったため感染源を特定するには至らなかった。献血者とその父親、および受血者からは同一の HEV 株が検出され、動物肉を媒介した食物感染経路（zoonotic food-borne route）で HEV に感染した献血者から二次的に HEV の輸血感染が起こることを初めて示した [59]。

しかしながら、HEV については、その疫学的背景や感染経路等、未だ不明な部分が多い。したがって、献血者における感染実態を解明し、血液製剤による HEV 感染のリスク評価を行うとともに、さらに適切な対策を講じることが重要である。

本研究では、全国の献血者を対象に、ALT 値が 200 IU/L 以上（高レベル）の検体および 61 IU/L 以上 200 IU/L 未満（中レベル）の検体について、各 HEV マーカー（HEV RNA、HEV IgM 抗体、および HEV IgG 抗体）を測定し、ALT 高値の献血者集団における HEV 感染実態の解明を試みるとともに、感染源の可能性について検討した。

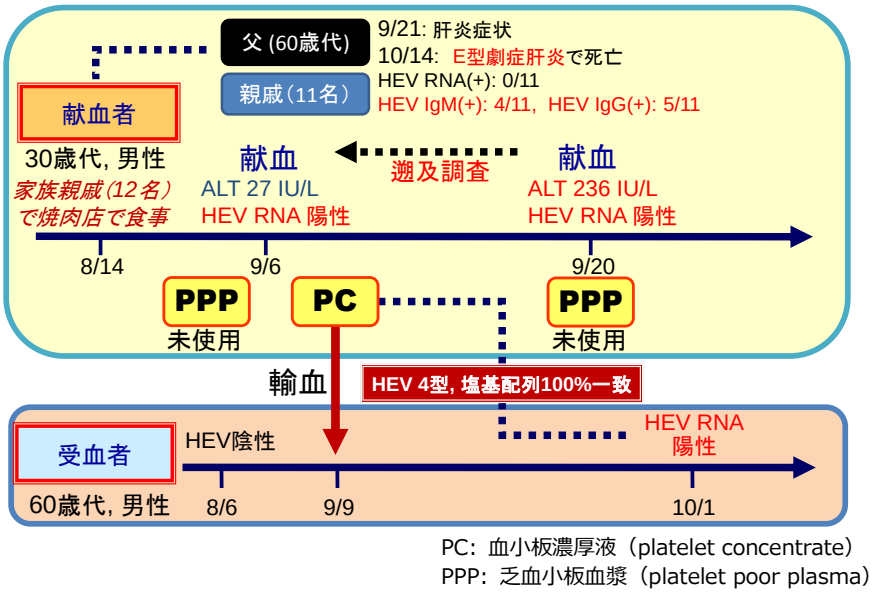


図 19.　動物肉を媒介した食物感染と輸血後感染が関連した症例

第２節　実験方法

第１項　献血血液の使用

本研究において用いた献血者検体の取り扱いは匿名化し、個人情報が外部に流出しないように厳格に管理し実施した。なお、献血血液は、厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」（三代班）の下、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」の第 4 の 1 に基づき、「血液製剤の有効性・安全性又は献血の安全性の向上を目的とした使用」として全国の血液センターを通じて収集された。

第２項　北海道の ALT 高値献血者検体

2000 年 4 月から 2003 年 9 月までの北海道の 1,213,998 例の献血者検体のうち、ALT 基準値の 61 IU/L 以上を示した 26,580（2.2%）例は製品として不適となった（図 20.）。このうち、ALT 500 IU/L 以上を示した 64 例について、予備検討として、各種肝炎ウイルス核酸（HAV RNA、HBV DNA、HCV RNA および HEV RNA）について調査した。

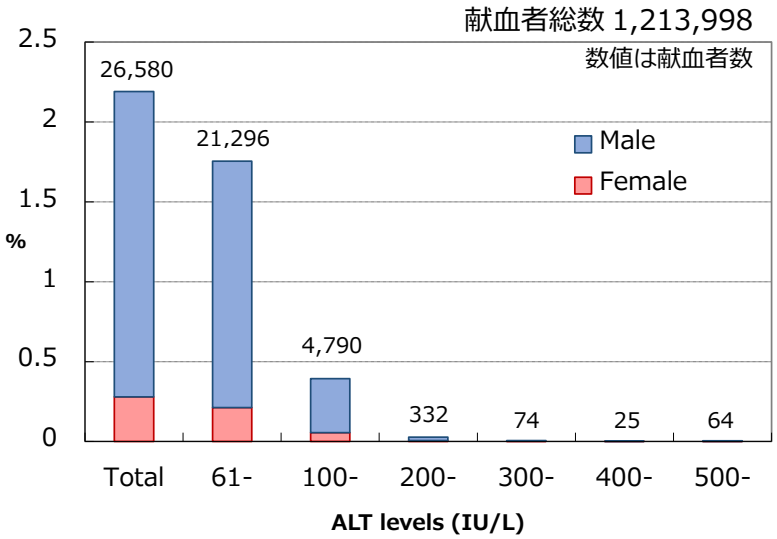


図 20.　ALT 高値により不適となった北海道献血者の分布
（2000 年 4 月～2003 年 9 月）

第３項　HAV、HBV および HCV の核酸検出

各種ウイルス核酸は、血漿 200 µL から QIAamp MinElute Virus Spin Kit（QIAGEN）を用いて、プロトコールに従って抽出した。抽出液全量（20 µL）から、DNA ウイルスは、FastStart Universal Probe Master（Rox）Kit（Roche Diagnostics）、RNA ウイルスは QuantiTect Probe RT-PCR Kit（QIAGEN）を使用し、自動増幅検出装置 AB7500（Applied Biosystems）により各ウイルス核酸を検出した。HBV DNA は S 領域をターゲットとし、Sense primer：5’-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3’、Antisense primer：5’-TGAGGCATAGCAGCAGGATG-3’、および TaqMan probe：5’-FAM-TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTT-TAMRA-3’を使用した[96]。増幅は 50℃/2 分、95℃/10 分の後、95℃/15 秒、60℃/1 分を 50 サイクルで実施し特異蛍光を検出した。また、HAV RNA は、5’-UTR 領域をターゲットとし、Sense primer：5’-ATAKGGTAACASCGGCGGATAT-3’、Antisense primer：5’-CTCAATGCATCCACTGGATGAG-3’、および TaqMan probe：5’-FAM-AGACAAAAACCATTCAACGCCGRAGG-TAMRA-3’を使用した[97]。HCV RNA は、Sense primer：5’-CGGGAGAGCCATAGTGG-3’、Antisense primer：5’-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3’、および TaqMan probe：5’-FAM-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-TAMRA-3’とした[98]。HAV RNA および HCV RNA の増幅検出条件は 50°C/30 分、95°C/15 分の後、94°C/15 秒、60°C/1 分を 50 サイクル実施し特異蛍光を検出した。

第４項　HEV RNA 検出および定量

HEV RNA 検出系である、real-time 逆転写（reverse transcription, RT）PCR を構築した。ターゲットとなる領域は各種 HEV 遺伝子型間で最も保存性が高い 75 塩基長の ORF2/3 の一領域とした（図 21.）。増幅検出用に Sense primer：5’-CGGCGGTGGTTTCTGG-3’、Antisense primer：5’-AAGGGGTTGGTTGGATGAATA-3’、および混合 TaqMan プローブ：FAM-5’-TGACAGGGTTGATTCTCAGCCCTTCG-3’-TAMRA、FAM-5’-TGACCGGGTTGATTCTCAGCCCTTC-3’-TAMRA、および FAM-5’-TGACCGGGCTGATTCTCAGCCCTT-3’-TAMRA（Sigma-Aldrich）を設定した。前述の RNA ウイルスの方法と同様に、血漿検体 200 µL から HEV RNA を抽出し、増幅検出した。HEV NAT の検出感度はロジスティック解析により 25（13～166）IU/mL（95% CI）と算出された。HEV RNA 量

は、10^1～10^7 IU/mL の HEV RNA 定量用標準品を用いて得られた検量線から決定した。この標準品は、in vitro 転写試薬の MAXIscript T7 high-yield transcription Kit（Ambion）を用いて、プラスミド（pCRII-TOPO, Invitrogen）にクローニングした HEV ORF2 領域の cDNA を転写することにより作製した。精製したプラスミド DNA を HindIII 制限エンドヌクレアーゼで線状化し、転写して 75nt の標的配列を含む 717nt の RNA 転写物を得た [59]。

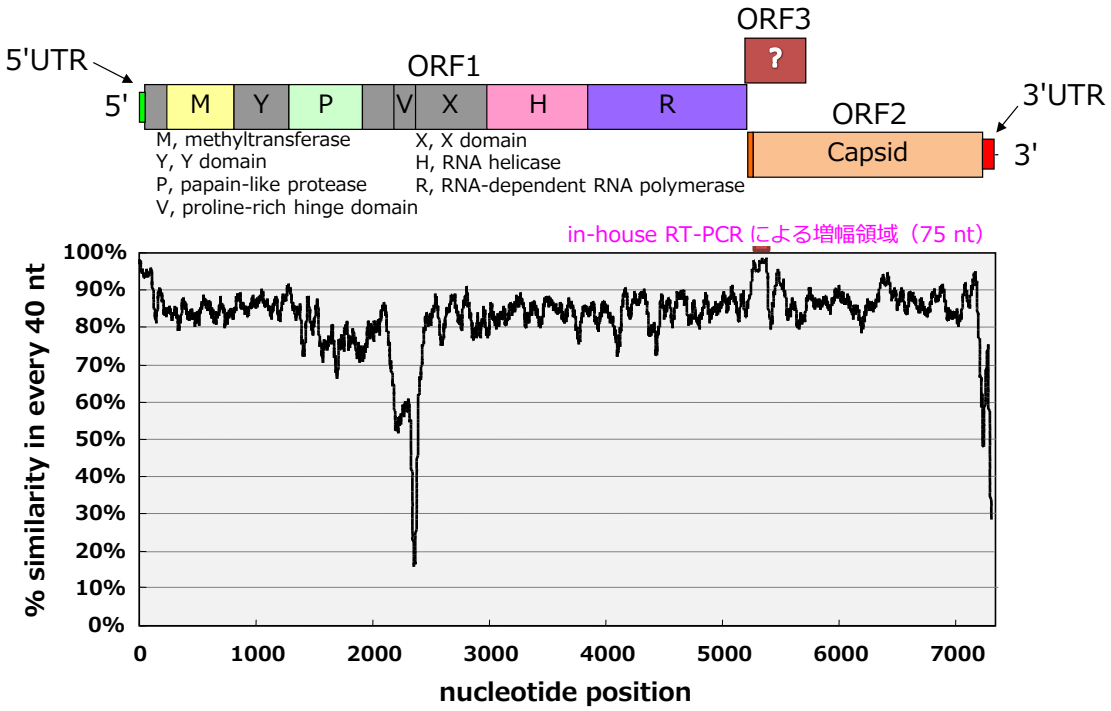


図 21. HEV のゲノム構造と類似性

全塩基配列が登録されている HEV 株について、シーケンスアライメントを行い、40 塩基毎の各株の類似性を算出しプロットした。ORF2/3 領域の最も類似性の高い配列に、プライマー･プローブを設定した。

第５項　HEV 抗体の検出

バキュロウイルス発現 HEV 様中空粒子[99]（VLP, genotype 1）を固相抗原に用いた in-house ELISA キットを作製し、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体を測定した。100 倍希釈した検体 50 µL を ELISA プレートに加え、室温 1 時間放置し、洗浄 Buffer にて 5 回洗浄した。次に希釈調製した HRP 標識マウス抗ヒト IgM モノクローナル抗体（1:500）あるいは HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体（1:2000）50 µL を加えて、室温 1 時間放置した後、5 回洗浄した。これに TMB 基質 50 µL を添加して 10 分間反応させた後、1N 硫酸 50 µL を加えて反応を停止させ、OD450nm の吸光度を測定した。in-house ELISA のカットオフ値は、IgM 抗体は吸光度 0.19（mean [0.022] + 6×SD [0.028]）、IgG 抗体は吸光度 0.18（mean [0.019] + 7×SD [0.024]）とし、陽性となった検体については市販の HEV 抗体キット（Cosmic Corporation）で確認検査を行い、双方で陽性となったものを最終的に HEV 抗体陽性と判定した。

第６項　全国の ALT 高値献血者検体

2003 年 4 月から 2004 年 3 月までの 1 年間に、全国の各血液センターにおいて ALT 検査のみで不合格となった献血者を対象に、ALT 値が 200 IU/L 以上（高レベル）の全 1,389 例（男性：女性 ＝5.5：1、平均年齢 ＝32±11）と、北海道と、広島、福岡、佐賀の 3 県において ALT 値が 61 IU/L 以上 200 IU/L 未満（中レベル）となった血液のうち、1,062 例を無作為に抽出し、合計 2,451 例を調査対象とした。

第７項　HEV 株の塩基配列解析

HEV RNA 陽性となった検体については、遡及調査（HEV RNA 検査）を実施した。また、陽性献血者由来 HEV 株は、HEV ORF2（412 塩基）領域の増幅産物を用いて CLUSTAL W により遺伝子解析を行い、Neighbor-joining 法により系統樹を作成し、遺伝子型を同定した。また、国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information, NCBI）の BLAST（GenBank Basic Local Alignment Search Tool）相同性検索を使用し、ブタあるいはブタレバーから分離された登録済みの HEV 株の塩基配列と比較した。本研

究で報告した献血者由来HEV株(献血者No.1～23)の塩基配列はDDBJ/EMBL/GenBankの塩基配列データベース上で、下記のアクセッション番号（株名）で利用できる。No.1：AB434132 (HRC-HE1)、No.2 : AB434133 (HRC-HE2)、No.3 : AB434134 (HRC-HE3)、No.4：AB434135 (HRC-HE4)、No.5：AB434140 (HRC-HE9)、No.6：AB434136 (HRC-HE5)、No.7 : AB434137 (HRC-HE6)、No.8 : AB434138 (HRC-HE7)、No.9 : AB434139 (HRC-HE8)、No.10 : AB434141 (HRC-HE10)、No.11 : AB434142 (HRC-HE11)、No.12 : AB434143 (HRC-HE12)、No.13 : AB434147 (JRC-HE4)、No.14 : AB434149 (JRC-HE6)、No.15 ： AB434150 (JRC-HE7)、No.16 ： AB434152 (JRC-HE9)、No.17 ： AB434148 (JRCHE5)、No.18：AB434144 (JRC-HE1)、No.19：AB434153 (JRC-HE10)、No.20：AB434154 (JRC-HE11)、No.21 : AB434151 (JRC-HE8)、No.22 : AB434145 (JRC-HE2)、および No.23：AB434146 (JRC-HE3)。

第８項　統計解析

2 群（東日本 vs. 西日本、10-30 代 vs. 40-60 代、および性別）における HEV マーカー（HEV RNA、 HEV IgM 抗体、および HEV IgG 抗体）陽性率の比較には、Fisher's exact test を用いて統計的有意性を検定し、有意水準は $P < 0.05$ とした。

第３節　結果

第１項　北海道の ALT 高値献血者検体の肝炎ウイルス検査（予備検討）

予備検討として、ALT 500 IU/L 以上の高値を示した北海道献血者 64 例における各種肝炎ウイルスについて調査した。ALT 検査により 61 IU/L 以上で不適となる血液のうち、98%以上は 200 IU/L 未満で、87%は男性であった（図 20.）。ALT 値 500 IU/L 以上を示したのは 64 例（0.2%）で、そのうち HAV RNA は 1 例のみだったが、HEV RNA は HBV DNA に次いで 9 例（14%）検出された（図 22.）。また、HBV と HCV の 18 例はスクリーニング検査（血清学的検査）でも陽性と判定され、輸血用血液から除外されたが、HAV と HEV の 10 例の陽性例については ALT 検査のみによって検出できた例であった。この北海道での調査結果に基づき、対象を全国に拡大し、HEV の調査を実施した。

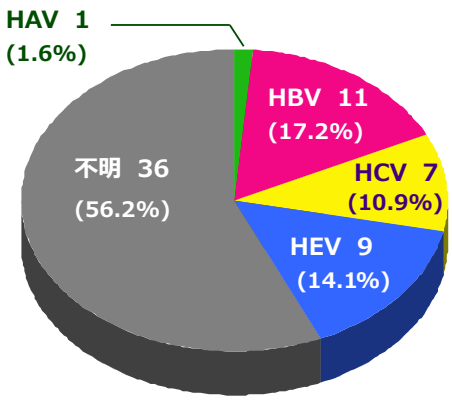


図 22.　ALT 高値献血者における肝炎ウイルス調査結果
（予備検討、北海道）

2000 年 4 月～2003 年 9 月で ALT 500 IU/L 以上を示したすべての献血者（64 例）について肝炎ウイルス核酸を検査した。HBV および HCV 陽性例（計 18 例）は、血清学的検査でも陽性であった。

第 2 項　全国の ALT 高値献血者検体の HEV RNA 陽性率

全国の ALT 高値献血者の各 HEV マーカー（HEV RNA、HEV IgM 抗体、および HEV IgG 抗体）を測定した。ALT 中レベル（61 IU/L 以上 200 IU/L 未満）のグループ 1,062 例からは HEV RNA は検出されなかった（表 5.）。一方、ALT 高レベル（200 IU/L 以上、平均 314±249 IU/L）の全献血者（1,389 名）は男性が女性より 5.5 倍多く、200 IU/L 以上 300 IU/L 未満が 73%を占めた。また、20 代が最も多く、次に 30 代が多かった（図 23.）。この ALT 高レベル群からは、HEV RNA を 15 例検出した（表 5.）。全国を 7 つのブロックに分けて地域別にみると、HEV RNA 陽性率（陽性数）は、北海道 4.6%（4）、東北 2.1%（3）、関東甲信越 1.2%（4）、中部北陸 0.5%（1）、近畿 0.4%（1）、中国四国 0.5%（1）、九州 0.6%（1）と北海道、東北および関東で全国平均 1.1%（15）を上回った。北海道は他地域に比べ最も高い陽性率を示した。（表 5.、図 24.）。HEV RNA 陽性率は、北海道、東北、関東の東日本が、その他の西日本より有意に高く（P = 0.0148）、「東高西低」の傾向が認められた（図 24.）。

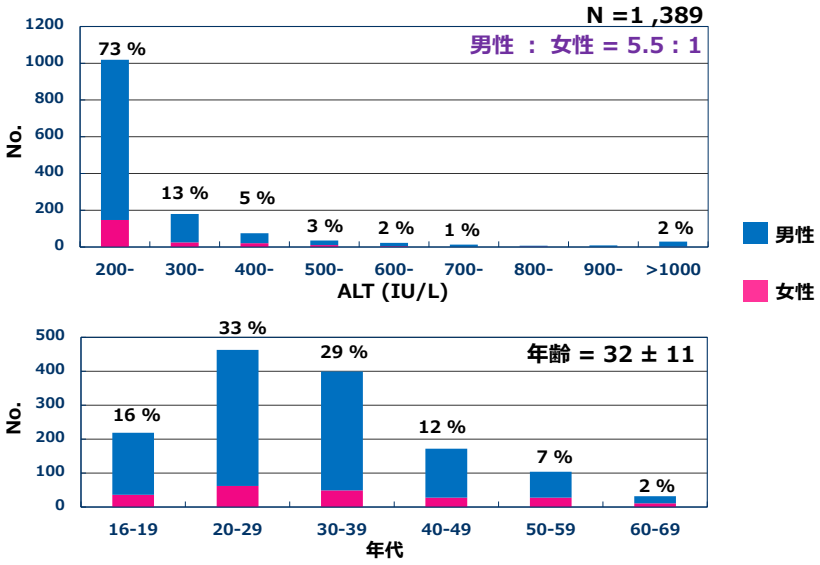


図 23.　全国の ALT 値 200 IU/L 以上（高レベル）の献血者の分布
（2003 年 4 月～2004 年 3 月）

表 5. 全国の ALT 高値献血者における HEV マーカー検査

2003年4月～2004年3月（1年間）

地域	61-199 IU/L				200- IU/L			
	検査数	RNA 陽性数(%)	IgM 陽性数(%)	IgG 陽性数(%)	検査数	RNA 陽性数(%)	IgM 陽性数(%)	IgG 陽性数(%)
北海道	364	0 (0.0)	1 (0.3)	21 (5.8)	87	4 (4.6)	3 (3.4)	6 (6.9)
東北	0	0 –	0 –	0 –	143	3 (2.1)	3 (2.1)	3 (2.1)
関東・甲信越	0	0 –	0 –	0 –	335	4 (1.2)	3 (0.9)	19 (5.7)
中部・北陸	0	0 –	0 –	0 –	223	1 (0.4)	2 (0.9)	6 (2.7)
近畿	0	0 –	0 –	0 –	234	1 (0.4)	1 (0.4)	3 (1.3)
中国・四国	345 *	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (2.0)	188	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
九州	353 **	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	179	1 (0.6)	1 (0.6)	7 (3.9)
全国	1062	0 (0.0)	1 (0.1)	29 (2.7)	1389	15 (1.1)	14 (1.0)	45 (3.2)

*広島　**福岡，佐賀

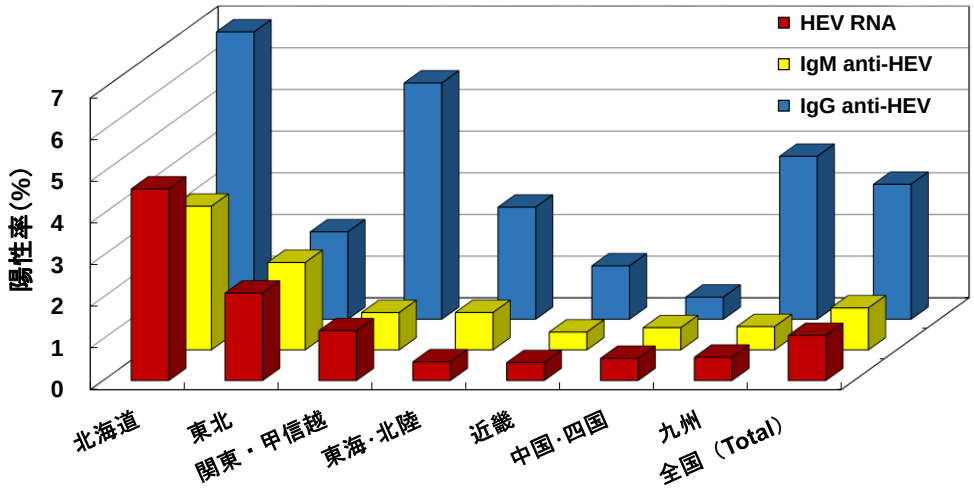


図 24. ALT 高レベル（200 IU/L 以上）献血者の HEV 陽性率（地域別）

ALT 高値献血者 1,389 名について、全国を 7 地域に分けて、地域ごとに HEV RNA（■）、 HEV IgM 抗体（■）、および HEV IgG 抗体（■）の陽性率を示した。

第 3 項　ALT 高値献血者検体の抗 HEV 抗体検査

抗 HEV IgM 抗体は ALT 高レベル（200 IU/L 以上）の献血者から 14 例（1.0%）、ALT 中レベル（61 IU/L 以上 200 IU/L 未満）の献血者から 1 例（0.3%）検出された（表 5.）。これらは HEV RNA とほぼ同様の傾向を示した。

ALT 高レベルの献血者における地域別の IgG 抗体陽性率は、北海道 6.9%、関東甲信越 5.7%、九州 3.9%で、全国平均（3.2%）を上回ったが、HEV RNA、IgM 抗体陽性率が高かった東北地区では全国平均を下回った（表 5.、図 24.）。また年代別では、IgG 抗体陽性率は加齢とともに増加する傾向にあり、10 代では陽性者はなく、20 代 1.5%、30 代 3.0%、40 代 7.6%、50 代 8.7%、そして 60 代では 12.5%と最も高かった（図 25.）。10-30 代と 40-60 代で有意差が認められた（$P < 0.001$）。陽性者の性別は他のマーカーと同様に男性が多かった（男性：女性 = 42 名：3 名）。ALT 中レベル（61 IU/L 以上 200 IU/L 未満）献血者における IgG 陽性率は、北海道で 5.8%、広島県で 2.0%、福岡県＋佐賀県 0.3%で、平均 2.7%であった。北海道においては ALT 値高レベルの献血者集団と中レベルの献血者集団とでは IgG 抗体陽性率に有意差はなかった（$P = 0.6905$）。

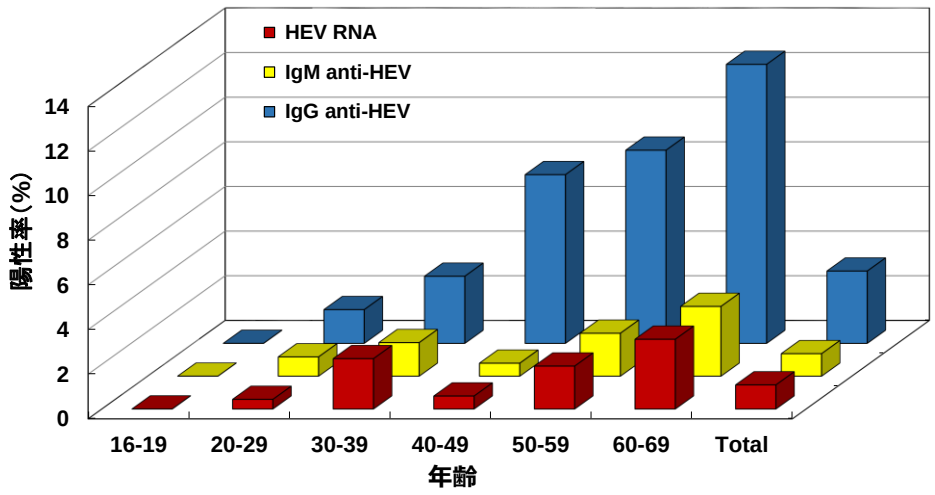


図 25.　ALT 高レベル（200 IU/L 以上）献血者の HEV 陽性率（年齢別）

ALT 高値献血者 1,389 名について、年齢を 6 年代に分けて、年代ごとに HEV RNA（■）、 HEV IgM 抗体（■）、および HEV IgG 抗体（■）の陽性率を示した。

第４項　HEV RNA 陽性献血者検体の解析

北海道の ALT 値 500 IU/L 以上の検体から検出された HEV RNA 陽性 9 例（全国調査分 1 例含む）と、全国の ALT 値 200 IU/L 以上から検出された同じく 15 例について解析した（表 6.)。23 例すべての陽性例は HEV 流行地域への最近の渡航歴はなかった。HEV RNA 量は 8.4×10^{1}～3.3×10^{7} IU/mL（1.9～7.5 log IU/mL）と広範囲に分布していた。HEV RNA 陽性の 23 名については、1 例は IgG のみ陽性、17 例は IgM、IgG 共に陽性、2 例は IgM のみ陽性、3 例はいずれも検出されなかった。遺伝子型は 3 型が 19 例、残りは 4 型ですべて北海道であった。2 例を除きすべて男性で、25 歳から 62 歳で構成されていたが、30 代が多かった。また遡及調査の結果、IgM 抗体のみ検出された北海道の陽性献血者 1 名（献血者 No.12）については、その 21 日前の検査合格献血検体からも HEV RNA が検出されたが（IgM、IgG 抗体は陰性)、この血液は容量規格外により出庫されていなかった。その他の陽性例の過去の献血検体は全て HEV RNA 陰性であった。

HEV 陽性献血者由来 HEV 株の ORF2 領域の 412 塩基の配列を、ブタあるいはブタレバー由来の HEV 株の配列と比較した結果、献血者由来のすべての株は既知のブタ由来 HEV 株の少なくとも 1 種に対して 92.2%以上の高い類似性を示した。とくに献血者 No.9 と swJ11-4、および、献血者 No.17 と swJ19-1 は 99.8%の最も高い類似性を示した。他には､献血者 No.18 と swJ18-3､献血者 No.12 と swJ13-1､および献血者 No.3 と swJL145 はそれぞれ、99.3%、99.3%、および 98.8%の高い類似性を示した。また、北海道の献血者由来 HEV 株で最も類似性が高かったブタ由来 HEV 株は、12 例中 10 例が、北海道のブタ由来株であった（表 6.)。

表 6. HEV RNA 陽性献血者の詳細（2000 年 4 月～2004 年 3 月）

献血者*	地域（ブロック）	献血日	年齢	性別	ALT (IU/L)	HEV RNA (log IU/mL)	HEV抗体		HEV 遺伝子型	最も類似性の高いブタ由来登録HEV株と類似性 (%)†	
							IgM	IgG			
1	北海道	2000年12月	29	M	767	5.6	+	+	4	swJL145‡	(98.5) §
2	北海道	2001年3月	30	M	506	5.0	+	+	3	swJHR1-1	(93.9)
3	北海道	2001年4月	40	M	1,470	6.9	+	+	4	swJL145‡	(98.8) §
4	北海道	2001年7月	47	M	713	5.1	+	+	3	swJTT1-1	(93.4)
5	北海道	2001年10月	62	M	2,080	6.3	+	+	3	swJL234‡	(98.5) §
6	北海道	2001年10月	39	M	641	5.1	+	+	3	swJL234‡	(98.5) §
7	北海道	2001年11月	48	M	740	3.6	+	+	4	swJL145‡	(98.5) §
8	北海道	2003年2月	39	F	578	6.2	−	+	3	swJL234‡	(96.1)
9	北海道	2003年7月	35	M	575	5.0	+	+	3	swJ11-4‡	(99.8) §
10	北海道	2003年10月	38	M	244	3.4	−	−	3	swJHK5-1‡	(95.4)
11	北海道	2003年11月	52	M	576	3.9	+	+	3	swJL234‡	(96.1)
12	北海道	2004年1月	38	M	793	5.9	+	+	4	swJ13-1‡	(99.3) §
13	東北	2003年12月	39	M	470	5.4	+	+	3	swJ24-1	(92.5)
14	東北	2003年5月	25	M	222	4.2	+	+	3	swJL234‡	(95.1)
15	東北	2004年1月	34	M	273	3.8	+	+	3	swJ2-1‡	(92.7)
16	関東	2004年3月	41	M	216	1.9	+	+	3	swJAK6-2	(93.7)
17	関東	2003年6月	34	M	211	3.1	+	+	3	swJ19-1	(99.8) §
18	関東	2003年11月	34	M	447	6.8	−	−	3	swJ18-3	(99.3) §
19	関東	2004年2月	36	M	328	5.2	+	−	3	swJC1990	(92.7)
20	東海	2004年2月	62	M	281	3.9	+	+	3	swJSZ1-1	(92.2)
21	近畿	2004年3月	37	M	793	5.9	−	−	3	swJHR1-1	(95.9)
22	中国四国	2003年5月	29	M	554	5.3	+	+	3	swJIW4-1	(92.7)
23	九州	2003年8月	57	M	398	7.5	+	−	3	swJHR1-1	(93.4)

* HEV RNA 陽性献血者：No. 1～9 は北海道における予備検討（ALT 値 500 IU/L 以上）、No. 9～23 は全国調査（ALT 値 200 IU/L 以上）により得られた。

† 塩基配列は GenBank databases utilizing the BLAST program により比較した。

‡ 北海道由来 HEV 株

§ ORF2 領域 412 塩基の配列で、類似性が 98.5%以上を示した。

第４節　考察

本研究では、北海道献血者の ALT 値 500 IU/L 以上を示した 64 例中 9 例（14.1%）に HEV RNA が検出された。さらに ALT 値 200 IU/L 以上 500 IU/L 未満の北海道献血者検体 124 例（ALT 検査のみで不適）について同様に調査した結果、１例（0.8%）に HEV RNA が検出された（データ未提示）。この結果から、調査範囲を広げ、ALT 高値（200 IU/L 以上）献血者全数を対象とした全国規模の調査を行った。その結果、15 例（1.1%）の HEV RNA 陽性例が検出されたが、地域、年齢によって分布が偏っていることが明らかとなった。HEV RNA は東日本、すなわち北海道（4/15）、東北（3/15）、および関東甲信越（4/15）に多く検出された。また ALT 値が中レベル（61 IU/L 以上 200 IU/L 未満）と高レベル（200 IU/L 以上）の 2 群において、IgG 抗体陽性数がどちらも加齢とともに増加していた。さらに HEV 陽性献血者由来 HEV 株の ORF2 領域の 412 塩基の配列を、ブタあるいはブタレバー由来の既知の HEV 株の配列と比較した結果、献血者由来のすべての株はブタ由来 HEV 株と高い類似性を示した。北海道の予備検討を含めた HEV RNA 陽性 23 例の遺伝子型は、3 型が 19 例、残りは 4 型ですべて北海道であった。

本研究では、HEV RNA と同様に HEV IgM 抗体もまた東日本に多く検出された。IgM 抗体は感染初期のセロコンバージョン期（抗原が陰性化し、抗体が陽性化する時期）に見られるマーカーであることが知られている。また、ALT 値の上昇は感染の初期／中期に見られる、すなわち、ALT 値の上昇はウイルス血症の後でセロコンバージョンと同時あるいは先行するものと考えられる。HEV RNA 陽性献血者の多く（12/15）は、HEV IgM 抗体陽性であった。15 例のうち 14 例は ALT 値 200 IU/L 以上を示した。ALT 中レベル群では、HEV RNA 陽性例は検出されず、また、HEV IgM 抗体陽性例は 1 例のみであった。HEV IgG 抗体は 2.7%が陽性であったが、ALT 高レベルの 3.2%と同等であった。また ALT 正常で、国内の一部地域における HEV RNA 陰性献血者での HEV IgG 抗体陽性率にはいくつか報告があり、その範囲は 1.9%～14.1%となっている [99-101]。

Ijaz らは、英国における輸入感染ではない HEV 感染患者は、年齢が高く、男性である傾向があると報告している [102]。さらに性別が男性であることが HEV 感染の危険因子であると推定した。本研究において ALT 高値集団は男性が多かったため、HEV RNA 陽性献血者の大部分（14/15）も男性であったが、性別に有意差は認められなかった。また本研究

では、IgG 抗体陽性数が加齢とともに増加していた。これは加齢とともに HEV への暴露機会が増加することの結果を示唆している。

HEV RNA 陽性者 23 名の HEV 感染源は特定できなかった。また、すべての陽性例は HEV 流行地域への最近の渡航歴はなかった。Yazaki らは、北海道の食料品店で食用として売られていた 363 個のブタレバーのうち、7 例（1.9%）から HEV RNA が検出されたと報告した [53]。本研究で、HEV RNA 陽性献血者由来の HEV 株は日本のブタ由来 HEV 株と塩基配列の類似性が高かったことから HEV 感染は未調理、あるいは不完全な調理のブタ肉の喫食と関連していることが示唆された。Emerson らは、生焼けの肉の内部温度では、HEV は生存している可能性が高いと報告している [103]。本研究において 23 例の HEV RNA 陽性献血者由来 HEV 株の ORF2 領域の 412 塩基配列と、日本のブタあるいはブタレバー由来の HEV 株の同配列とを比較した結果、少なくとも 9 例（39%）は 98.5%～99.8%の高い類似性を示した。注目すべきは、北海道の 12 例の HEV RNA 陽性献血者のうち、10 例（83%）は、北海道のブタあるいはブタレバー由来の HEV 株と 95%以上の類似性を示したことである。北海道の畜産副生物流通に関する報告によれば、北海道のブタ内臓肉はほぼ北海道内に流通されている [104]。この結果により、HEV RNA 陽性献血者が動物肉を媒介した食物感染経路により感染した可能性を説明できるかもしれない。米国において同様に、Feagins らは食料品店で売られている 127 個のブタレバーのうち、14 例（11.0%）に HEV RNA を検出したと報告した [105]。日本以外の先進国においても、水系感染や輸入感染で説明できない HEV 感染リスクの広がりが徐々に明らかになってきている [106,107]。総務省統計局の家計調査によれば、北海道、東北、関東甲信越、および東海北陸の東日本ではブタ肉の消費量が牛肉の消費量より高く、その他の西日本（沖縄を除く）は逆の傾向を示していた [108]（図 26.）。本研究での HEV 陽性率調査との相関が認められたこと、および HEV の感染経路として経口感染が疑わしいことを考えると、食肉の流通や東日本の豚肉文化と西日本の牛肉文化が、HEV 陽性率における東日本と西日本での地域差の要因のひとつであることが強く示唆された。

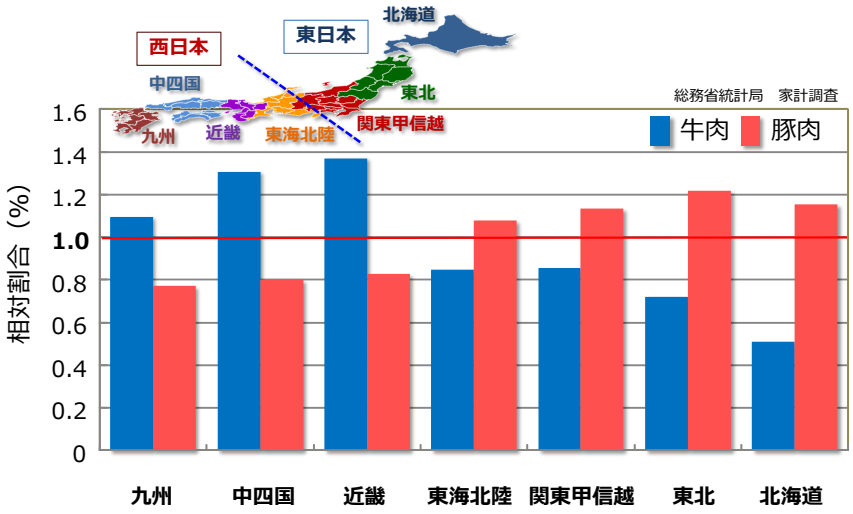


図 26.　日本における牛肉と豚肉の地域的消費傾向（参考）

データは総務省統計局の日本における家計調査年次報告（2002 年～2005 年）から参照した。各地域の食肉の消費率は、消費量の全国平均に対する比率とした。

本研究での予備検討では、HEV の他に、HAV、HBV、および HCV について検査した。HBV と HCV はすでに NAT スクリーニング検査を導入しているため、ALT 検査は、HEV および HAV を排除する有効な方法である可能性がある。時期や調査数は異なるが、北海道の ALT 高値献血者（ALT 検査のみで不適となったもの）のうち、500 IU/L 以上は 46 例中 9 例（19.6%）、200～499 IU/L は 124 例中 1 例（0.8%）で HEV RNA が検出された。しかし、61～199 IU/L の範囲の 364 例では HEV RNA は検出されなかった。したがって、ALT 正常献血者集団（61 IU/L 未満）では HEV RNA 陽性率がさらに低いことが予想され、ALT 高レベル血液の排除は HEV による感染リスクの低減化に効果的であると考えられる。ただし、この目的において、現在の ALT のカットオフ値（61 IU/L 以上不適）では、輸血に適していると思われる献血者血液の多く（約 2%）を失っているのが現状であり、今後、費用対効果のバランス等を考慮し、カットオフの再評価が必要である（2016 年 4 月よりカットオフを 100 IU/L とした）。ALT 検査の他に、HEV IgM 抗体スクリーニ

ング（血清学的検査）は、感染中期の無症候性 HEV RNA 陽性献血者を排除するのに有効かもしれないが、抗体産生前の HEV RNA 陽性検体は検出できない。したがって、現状では NAT スクリーニングが HEV を排除するための最も有効な手段であると考えられる。しかし、日本において動物肉を媒介した食物感染経路が HEV 感染の主要原因である可能性を考慮すると、食肉の潜在的リスクの情報普及やウイルス保有動物への HEV ワクチン接種等の対策を講じることが最も重要である。ただし、食肉を扱う養豚業、販売店等への風評被害には十分留意する必要がある。

HEV 遺伝子型の 3 型と 4 型では、4 型に感染した患者に、重症急性肝炎がより頻繁に発症することが従来から報告され [109,110]、肝疾患の重篤度は、患者が感染した HEV 遺伝子型ならびに年齢、性別および妊娠状態などの宿主因子によって影響され得る。全国の HEV 感染例 254 例についてデータを集積し解析した報告 [111] によると、遺伝子型および病型診断の両方の情報が得られた 220 例について、4 型の頻度が、不顕性感染群から急性肝炎群へ、更には重症肝炎群（急性肝炎重症型＋劇症肝炎）へ上昇（12%→37%→74%）しており、4 型に関連する肝炎が 3 型に関連するものより重症であることを有意差（$P < 0.001$）を以って示した [111]。本研究で HEV RNA 陽性となった献血者は、献血時に医師による問診を受けていることから、少なくとも献血時には自覚症状がなかったと考えられ、不顕性感染であった可能性が考えられた。これまで北海道内の肝炎患者からは 3 型よりも 4 型が多く分離されているが [111]（図 27.）、本研究では北海道内の献血者由来の HEV 遺伝子型は 3 型のほうが多い結果となり、上記報告を支持した。4 型は重症化しやすく自覚症状があるため発見されやすい。一方、3 型は不顕性感染が多く自覚症状がないため、本研究のように肝機能検査等で二次的に発見されるものと考えられる。

全国規模の HEV 頻度調査によって、HEV 感染は全国に蔓延していることが確認され、さらに陽性率は年齢、性別、地域によって大きく異なることが明らかとなった。性差については男性のほうが女性よりも高く、また地理的間差は東日本と西日本では顕著であった。この地域差の理由については、東西日本の食文化の違い、つまり東日本の豚肉文化と西日本の牛肉文化が背景にある可能性が高い。さらに抗体陽性率は加齢とともに増加していることから、数十年以上前から HEV は国内に定着していたと推測された。これらの知見は、

今後、HEV 感染リスクを評価し、適切な HEV 輸血感染予防策を検討する上で有用である。

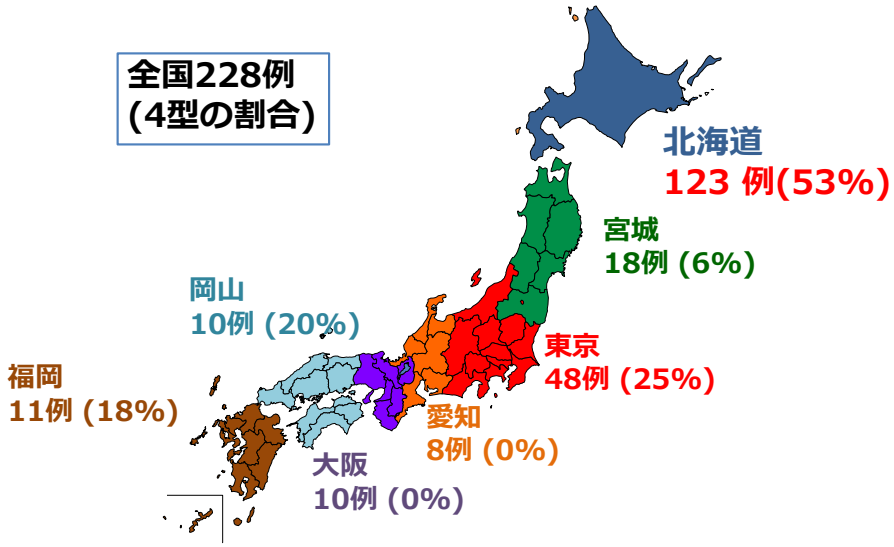


図 27. 全国の HEV 報告数（参考）

全国の HEV 感染例についてデータを集積し、地域別に遺伝子型を集計した。感染例は北海道が最も多く、その半数以上は 4 型であり、他地域と比べて有意に高かった（P<0.001）。

第５節　まとめ

- ALT 値が高い献血者集団に HEV 陽性例が存在した。
- 東日本は西日本より HEV 陽性率が高く、中でも北海道は全国で最も高かった。
- 献血者の HEV RNA 陽性例は、性別は男性、遺伝子型は 3 型が多かった。
- HEV IgG 抗体の陽性率は加齢とともに上昇していた。
- 献血者由来 HEV 株とブタ由来の HEV 株は、塩基配列の比較で高い類似性を示した。

総括

本研究において、新規な B19V 抗原検出系を構築、製造し、献血血液スクリーニング検査に導入した。その結果、献血者集団に含まれる B19V 陽性例を約 0.01%の頻度で検出し、輸血用血液製剤および血漿分画製剤の安全性を高めた。さらに、高感度 B19V 抗原検出系である CLEIA-B19 導入後の分画製剤原料血漿が、米国 FDA の B19V に関する品質基準を満たしていることを示しただけでなく、ほとんどの欧米諸外国は輸血用血液製剤に対しては B19V スクリーニングを実施していないことから、日本の輸血用血液製剤が、B19V に関して高度な安全性を有していることを国際的に広く認知させることができた。また、北海道における B19V の流行は 1 型によるものであるが、将来的に 2 型、3 型が輸入感染症として侵入してくる可能性があるため、すべての遺伝子型に対する CLEIA-B19 の特異性が確認された意義は大きい。

また、献血者における HEV の感染実態を調査し、国内での HEV 感染が、過去においても発生しており、3 型を中心に全国的に「東高西低」で蔓延していることを明らかにした。一部はブタの内臓肉が感染源となっている可能性を示した。今後、食品・畜産等の関連分野とも連携し、風評被害等の影響も考慮しながら、未知の HEV 感染経路の解明や感染動向に注目していくことが必要である。さらに HEV の臨床病態等の情報を精査するとともに本研究での知見を生かし、輸血における HEV のリスク評価をしていく必要がある。

謝辞

本論文の発表ならびに執筆にあたり、多大なるご指導、ご高配を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 衛生化学研究室 松田正 教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、的確なご助言とご指導を賜りました北海道薬科大学 生命科学分野 前田伸司 教授、北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室 菅原満 教授、衛生化学研究室 室本竜太 講師、および柏倉淳一 講師に謹んで感謝申し上げます。

学位取得に向けてご助言とご激励を賜りました北海道大学 長澤滋治 名誉教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、貴重なご助言とご支援をいただくとともに学位取得に向けてご激励をいただきました日本赤十字社北海道ブロック血液センター 髙本滋 所長、北海道赤十字血液センター 池田久實 名誉所長、および日本赤十字社血液事業本部 加藤俊明 本社統括調整監兼経営会議委員に心より深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧な実験指導とご討議、また、多大なご支援をいただくとともに学位取得に向けてご激励をいただきました日本赤十字社北海道ブロック血液センター 品質部 佐藤進一郎 部長、および日本赤十字社中央血液研究所 感染症解析部 松林圭二 部長に心から深謝申し上げます。

本研究における全国献血者 HEV 調査に際しご尽力いただきました日本赤十字社血液事業本部 田所憲治 本部長、日野学 経営会議委員、血漿分画製剤の評価にご協力いただきました日本血液製剤機構中央研究所 脇坂明美 所長、論文作成に際しご討議いただきました日本赤十字社中央血液研究所 佐竹正博 所長、および凝集法試薬作製に際しご指導いただきました長野県赤十字血液センター 佐藤博行 所長に厚く御礼申し上げます。

本研究用に貴重な高濃度 WHO B19V genotype パネルを分与していただくとともに、実験結果に対しご討議いただきました Paul Ehrlich 研究所 Sally A. Baylis 博士、および FDA 生物医薬品局（CBER）Mei-ying W. Yu 博士に深謝申し上げます。

本研究用に B19V パネルを分与していただきましたケンブリッジ大学 Jean-Pierre Allain 教授、および HEV 抗原を分与していただきました国立感染症研究所 武田直和先生、李天成先生に感謝申し上げます。

本研究での実験にご協力いただくとともに、夜遅くまでご討議いただきました日本赤十字社北海道ブロック血液センター 品質部 伊原弘美 課長、岸本信一 課長、宮崎孔 課長、事業部 葛間一裕 課長、品質部 武田尋美 氏、および徳島恵里奈 氏に心から感謝致します。

本研究に終始多大なご協力と温かいご支援をいただきました日本赤十字社北海道ブロック血液センター、日本赤十字社血液事業本部、日本血液製剤機構および全国の血液センターの皆様に深く感謝致します。

最後に、学位取得に向けて応援してくれた家族、そして長きに渡った本研究の遂行を理解し、心身ともに陰ながら支えてくれた最愛の妻に心から感謝致します。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業の助成を受けたものである。

2017 年 3 月

本論文の内容は、学術雑誌に掲載された下記の原著論文を基礎とするものである。

1. Sakata H, Matsubayashi K, Ihara H, Sato S, Kato T, Wakisaka A, Tadokoro K, Yu MY, Baylis SA, Ikeda H, Takamoto S. Impact of chemiluminescent enzyme immunoassay screening for human parvovirus B19 antigen in Japanese blood donors. *Transfusion*. 2013;53:2556-66.

2. Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, Ikeda H. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion.* 2008;48:2568-76.

3. Sakata H, Ihara H, Sato S, Kato T, Ikeda H, Sekiguchi S. Efficiency of donor screening for human parvovirus B19 by the receptor-mediated hemagglutination assay method. *Vox Sang*. 1999;77:197-203.

参考文献

1 Japanese Red Cross Society. Haemovigilance by JRCS. 2008. [*cited 2016 Dec 30*]. Available from: URL: http://jrc.or.jp/vcms_lf/anzen_HVreport2008_en.pdf

2 Infectious Disease Surveillance Center. Erythema infectiosum reported per sentinel weekly. 2012. [*cited 2016 Dec 30*]. Available from: URL: http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/weeklygraph/07parvo-e.html

3 Williams MD, Cohen BJ, Beddall AC, Pasi KJ, Mortimer PP, Hill FG. Transmission of human parvovirus B19 by coagulation factor concentrates. *Vox Sang*. 1990;58:177-81.

4 Laurian Y, Dussaix E, Parquet A, Chalvon-Demersay A, d'Oiron R, Tchernia G.: Transmission of human parvovirus B19 by plasma derived factor VIII concentrates. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1994;36:449-53.

5 Mortimer PP, Luban NL, Kelleher JF, Cohen BJ. Transmission of serum parvovirus-like virus by clotting-factor concentrates. *Lancet*. 1983;2:482-4.

6 Ragni MV, Koch WC, Jordan JA. Parvovirus B19 infection in patients with hemophilia. *Transfusion*. 1996;36:238-41.

7 Rollag H, Patou G, Pattison JR, Degré M, Evensen SA, Fröland SS, Glomstein A. Prevalence of antibodies against parvovirus B19 in Norwegians with congenital coagulation factor defects treated with plasma products from small donor pools. *Scand J Infect Dis*. 1991;23:675-9.

8 Azzi A, Ciappi S, Zakvrzewska K, Morfini M, Mariani G, Mannucci PM. Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *Am J Hematol*. 1992;39:228-30.

9 Blümel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH, Löwer J, Eis-Hübinger AM. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion*. 2002;42:1473-81.

10 Wu CG, Mason B, Jong J, Erdman D, McKernan L, Oakley M, Soucie M, Evatt B, Yu MY. Parvovirus B19 transmission by a high-purity factor VIII concentrate. *Transfusion*. 2005;45:1003-10.

11 Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*. 1993;262:114-7.

12 Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*. 1994;330:1192-6.

13 Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Montag-Lessing T, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H, von König CH. Parvovirus B19 - Revised. *Transfus Med Hemother*. 2010;37:339-50.

14 Brown T, Anand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TM. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet*. 1984;2:1033-4.

15 Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins DW, Nienhuis AW, Young NS. Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med*. 1989;321:519-23.

16 Porter HJ, Khong TY, Evans MF, Chan VT, Fleming KA. Parvovirus as a cause of hydrops fetalis: detection by in situ DNA hybridisation. *J Clin Pathol*. 1988;41:381-3.

17 Anand A, Gray ES, Brown T, Clewley JP, Cohen BJ. Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N Engl J Med*. 1987;316:183-6.

18 Gray ES, Davidson RJ, Anand A. Human parvovirus and fetal anaemia. *Lancet*. 1987;1:1144.

19 Burton PA. Intranuclear inclusions in marrow of hydropic fetus due to parvovirus infection. *Lancet*. 1986;2:1155.

20 Brown KE, Green SW, Antunez de Mayolo J, Bellanti JA, Smith SD, Smith TJ, Young NS. Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet*. 1994;343:895-6.

21 Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet*. 1985;1:422-5.

22 Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8227-32.

23 Murai C, Munakata Y, Takahashi Y, Ishii T, Shibata S, Muryoi T, Funato T, Nakamura M, Sugamura K, Sasaki T. Rheumatoid arthritis after human parvovirus B19 infection. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:130-2.

24 Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion*. 2001;41:130-5.

25 Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med*. 2004;350:586-97.

26 Kurtzman GJ, Ozawa K, Cohen B, Hanson G, Oseas R, Young NS. Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med*. 1987;317:287-94.

27 Erdman DD, Durigon EL, Wang QY, Anderson LJ. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J Gen Virol*. 1996;77:2767-74.

28 Hemauer A, von Poblotzki A, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H, Modrow S. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol*. 1996;77:1781-5.

29 Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Allaume X, Servant A, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-Chenon A. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2483-7.

30 Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*. 2002;76:9124-34.

31 Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7450-3.

32 Servant-Delmas A, Lefrère JJ, Morinet F, Pillet S. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J Virol*. 2010;84:9658-65.

33 Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, Rudich H, Kasymbekova K, Sarv I, Nedeljkovic J, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Gerasimova AG, Moskaleva TN, Tikhonova NT, Chitadze N, Forbi JC, Faneye AO, Otegbayo JA, Charpentier E, Muller CP. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3735-8.

34 Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol*. 2004;78:12169-78.

35 Rinckel LA, Buno BR, Gierman TM, Lee DC. Discovery and analysis of a novel parvovirus B19 Genotype 3 isolate in the United States. *Transfusion*. 2009;49:1488-92.

36 Sanabani S, Neto WK, Pereira J, Sabino EC. Sequence vari- ability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J Clin Microbiol*. 2006;44:604-6.

37 Parsyan A, Szmaragd C, Allain JP, Candotti D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol*. 2007;88:428-31.

38 Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, Song le H, Ebinger M, Aberle S, Binh VQ, Duy DN, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol*. 2006;87:2941-9.

39 Baylis SA. Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19: a meeting summary. *Vox Sang*. 2008;94:74-80.

40 Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In: Knipe GM, Howley PM, editors. Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, *Williams & Wilkins*; 2001:3051-61.

41 Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology*. 2001;287:9-12.

42 Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis*. 2002;185:1342-5.

43 Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3209-18.

44 Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Takahashi K, Mishiro S. A case report: two patients with fulminant hepatitis E in Hokkaido. *Jpn Hepatol Res*. 2003;25:213-8.

45 Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15:9-20.

46 Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, Johne R, Koenig M, Jameel S, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*. 2016;97:537-42.

47 Smith DB, Simmonds P; International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group; Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014;95:2223-32.

48 Widén F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, Metreveli G, Belák S, Hallgren G, Norder H. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol Infect*. 2011;139:361-71.

49 Wiratsudakul A, Sariya L, Prompiram P, Tantawet S, Suraruangchai D, Sedwisai P, Sangkachai N, Suksai P, Ratanakorn P. Detection and phylogenetic characterization of hepatitis E virus genotype 3 in a captive wild boar in Thailand. *J Zoo Wildl Med*. 2012;43:640-4.

50 Dalton HR, Thurairajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R, Banks M, Ijaz S, Teo CG, Levine DF. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat*. 2007;14:304-9.

51 Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*. 2012;142:1388-97.

52 Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362:371-3.

53 Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*. 2003;84:2351-7.

54 Tamada Y, Yano K, Yatsuhashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*. 2004;40:869-70.

55 Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable

with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol*. 2003;84:851-62.

56 Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*. 2004;330:501-5.

57 Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5371-4.

58 Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*. 2004;44:934-40.

59 Matsubayashi K, Kang J, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*. 2008;48:1368-75.

60 Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, Teo CG. Transfusion-transmitted hepatitis E in a “nonhyperendemic” country. *Transfus Med*. 2006;16:79-83.

61 Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro M, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res*. 2007;37:113-20.

62 Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:648-9.

63 Sakata H, Ihara H, Sato S, Kato T, Ikeda H, Sekiguchi S. Efficiency of donor screening for human parvovirus B19 by the receptor-mediated hemagglutination assay method. *Vox Sang*. 1999;77:197-203.

64 Sato H, Takakura F, Kojima E, Fukada K, Okochi K, Maeda Y. Screening of blood donors for human parvovirus B19. *Lancet*. 1995;346:1237-8.

65 Matsui H, Sugimoto M, Tsuji S, Shima M, Giddings J, Yoshioka A. Transient hypoplastic anemia caused by primary human parvovirus B19 infection in a

previously untreated patient with hemophilia transfused with a plasma-derived, monoclonal antibody-purified factor VIII concentrate. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999;21:74-6.

66 Saldanha J, Minor P. Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implications for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture. Br *J Haematol*. 1996;93:714-9.

67 Schmidt I, Blümel J, Seitz H, Willkommen H, Löwer J. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. *Vox Sang*. 2001;81:228-35.

68 U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry. 15. Nucleic acid testing (NAT) to reduce the possible risk of human parvovirus B19 transmission by plasma-derived products. 2009. [*cited 2016 Dec 29*]. Available from: URL: http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm078510.pdf

69 Council of Europe. Human anti-D immunoglobulin, monograph 0557. In: European Pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg, France: *Council of Europe*; 2008.

70 Council of Europe. Human anti-D immunoglobulin for intravenous administration, monograph 1527. In: European Pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg, France: *Council of Europe*; 2008.

71 Council of Europe. Human plasma (pooled and treated for virus inactivation), monograph 1646. In: European Pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg, France: *Council of Europe*; 2008.

72 Council of Europe. Nucleic acid amplification techniques. 07/2010:20621. In: European Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg, France: *Council of Europe*; 2011.

73 Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*. 2006;36:152-5.

74 Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2013-9.

75 Baylis SA, Ma L, Padley DJ, Heath AB, Yu MW; the Collaborative Study Group. Collaborative study to establish a World Health Organization International Genotype Panel for parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. *Vox Sang*. 2012;102:204-11.

76 Koppelman MH, Rood IG, Fryer JF, Baylis SA, Cuypers HT. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang*. 2007;93:208-15.

77 Baylis SA, Shah N, Minor PD. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J Virol Methods*. 2004;121:7-16.

78 Candotti D, Danso K, Parsyan A, Dompreh A, Allain JP. Maternal-fetal transmission of human parvovirus B19 genotype 3. *J Infect Dis*. 2006;194:608-11.

79 Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young NS, Field A, Warrener P, Bansal G, Collett MS. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest*. 1992;89:2023-9.

80 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-80.

81 Sekiguchi S, Sato S, Kato T. Human parvovirus B19 DNA detected by receptor-mediated hemagglutination assay of pooled plasma for fractionation. *Transfusion*. 1998;38:108-9.

82 Takeda Y, Wakisaka A, Noguchi K, Murozuka T, Katsubayashi Y, Matsumoto S, Tomono T, Nishioka K. Receptor- mediated haemagglutination screening and reduction in the viral load of parvovirus B19 DNA in immunopurified Factor VIII concentrate (Cross Eight M). *Vox Sang*. 2001;81:266-8.

83 Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, Bondén H, Gessner M, Aberham C, Norja P, Miettinen S, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol*. 2007;81:6927-35.

84 Kooistra K, Mesman HJ, de Waal M, Koppelman MH, Zaaijer HL. Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003-2009. *Vox Sang*. 2011;100:261-6.

85 Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, Tobler LH, Schlumpf KS, Todd DS, Qiao H, Yu MW, Busch MP; National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (NHLBI REDS-II). A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion. *Blood*. 2009;114:3677-83.

86 Infectious Diseases Weekly Report (IDWR), 感染症の話.2004 年第 23 週号 [*cited 2016 Dec 30*]. Available from: URL: http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k04/k04_23/k04_23.Html

87 Matsukura H, Shibata S, Tani Y, Shibata H, Furuta RA. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion*. 2008;48:1036-7.

88 Grabarczyk P, Korzeniowska J, Liszewski G, Kalińska A, Sulkowska E, Krug-Janiak M, Kopacz A, Łetowska M, Brojer E. Parvovirus B19 DNA testing in Polish blood donors, 2004-2010. *Przegl Epidemiol*. 2012;66:7-12.

89 Suzuki M, Yoto Y, Ishikawa A, Tsutsumi H. Analysis of nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome reveals two different modes of evolution, a gradual alteration and a sudden replacement: a retrospective study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008. *J Virol*. 2009;83:10975- 80.

90 Molenaar-de Backer MW, Lukashov VV, van Binnendijk RS, Boot HJ, Zaaijer HL. Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions. *PLoS One*. 2012;7:e43206.

91 Yu MW, Alter HJ, Virata-Theimer ML, Geng Y, Ma L, Schechterly CA, Colvin CA, Luban NL. Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples. *Transfusion*. 2010;50:1712-21.

92 Hourfar MK, Mayr-Wohlfart U, Themann A, Sireis W, Seifried E, Schrezenmeier H, Schmidt M. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products. *Transfusion*. 2011;51:129-36.

93 Satake M, Hoshi Y, Taira R, Momose SY, Hino S, Tadokoro K. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion*. 2011;51:1887-95.

94 Modi SL, Firnhaber C, Kana V, Skhosana L, Carmona S, Rossouw I. A serious parvovirus B19 genotype 2 infection not detected in a commercial PCR assay. *J Clin Virol*. 2014;60:70-2.

95 Pisani G, Cristiano K, Fabi S, Simeoni M, Marino F, Gaggioli A. A significantly lower potency observed for the 3rd WHO International Standard for Parvovirus B19V DNA with the cobas TaqScreen DPX test. *Vox Sang*. 2016;111:115-9.

96 Owada T, Matsubayashi K, Sakata H, Ihara H, Sato S, Ikebuchi K, Kato T, Azuma H, Ikeda H. Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein

receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat*. 2006;13:11-8.

97 Gardner SN, Kuczmarski TA, Vitalis EA, Slezak TR. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral pathogens illustrated by hepatitis A, B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2417-27.

98 Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*. 1999;116:636-42.

99 Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, Takeda N. Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol*. 2000;62:327-33.

100 Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol*. 2004;73:554-61.

101 Tanaka E, Takeda N, Tian-Chen L, Orii K, Ichijo T, Matsu- moto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Kiyosawa K. Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J Gastroenterol*. 2001;36:317-21.

102 Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis*. 2005;192:1166-72.

103 Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis*. 2005;192:930-3.

104 Ito R, You G, Iizawa R. A study of livestock by-product circulation in Hokkaido. *The Review of Agricultural Economics*. 2001;57:75-83.

105 Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*. 2007;88:912-7.

106 Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*. 2004;74:419-24.

107 Waar K, Herremans MM, Vennema H, Koopmans MP, Benne CA. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J Clin Virol*. 2005;33:145-9.

108 Takeda H, Matsubayashi K, Sakata H, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, Ikeda H. A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang*. 2010;99:307-13.

109 Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, Aikawa T, Mizuo H, Suzuki K, Shimosegawa T, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J Med Virol*. 2006;78:476-84.

110 Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res*. 2006;36:301-7.

111 Abe T, Aikawa T, Akahane Y, Arai M, Asahina Y, Atarashi Y, Chayama K, Harada H, Hashimoto N, Hori A, Ichida T, Ikeda H, Ishikawa A, Ito T, Kang JH, Karino Y, Kato H, Kato M, Kawakami M, Kitajima N, Kitamura T, Masaki N, Matsubayashi K, Matsuda H, Matsui A, Michitaka K, Mihara H, Miyaji K, Miyakawa H, Mizuo H, Mochida S, Moriyama M, Nishiguchi S, Okada K, Saito H, Sakugawa H, Shibata M, Suzuki K, Takahashi K, Yamada G, Yamamoto K, Yamanaka T, Yamato H, Yano K, Mishiro S. Demographic, epidemiological, and virological characteristics of hepatitis E virus infections in Japan based on 254 human cases collected nationwide. *Kanzo*. 2006;47:384-91.