

## 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
		2010. 7. 8	該当なし	
一般的名称	人血清アルブミン		公表国	
販売名(企業名)	赤十字アルブミン20(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注4g/20mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注10g/50mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25%静注12.5g/50mL(日本赤十字社)	研究報告の公表状況	日本	
研究報告の概要	<p>○小児B型肝炎キャリア187例の感染実態と現在のHBV感染予防対策の問題点 目的:小児B型肝炎ウイルス(HBV)キャリア患者の感染経路・感染要因を解析し、現在のHBV感染予防対策の問題点を明らかにする。 方法:大阪府立母子保健総合医療センター消化器・内分泌科(施設1)、大阪大学医学部小児科(施設2)、及び大阪府立急性期・総合医療センター小児科(施設3)に通院歴のあるHBVキャリア小児について後方視的に検討した。 結果:施設1では32例、施設2では133例、施設3では22例の合計187例のHBVキャリアが診療を受けていた。男女比は1.43:1、診断時年齢は中央値2歳(0ヶ月~15歳)であった。母児感染予防処置が行われるようになった1986年以前の出生児と、以後の出生児に分けて検討した。1985年までに出生していた症例は102例で、母児感染59例(57.8%)、父子感染6例(5.9%)、輸血5例(4.9%)、水平感染31例(30.4%)、不明1例で母児感染が過半数を占めていた。一方、1986年以降に出生した症例は85例で、母児感染51例(60%)、父子感染13例(15.3%)、輸血2例(2.4%)、水平感染19例(22.4%)であった。母児感染の割合は1985年までに出生していた症例と変化なく、父子感染は増加した。母児感染のうち胎内感染が16例、予防処置実施中あるいは実施後にHBV感染が判明した症例が22例で、現在の予防法で防ぐことができなかった症例が合計38例(74.5%)であったが、予防処置の不完全施行や未施行によるものが8例(15.7%)存在した。父子感染や水平感染の症例でHBワクチンの投与を受けていたものはいなかった。 結論:HBV母児感染予防処置導入後も小児のHBVキャリアは発生している。母児感染のうち約15%は予防処置の不完全施行や未施行が原因であり、医療者の啓発を行うとともに、予防処置プロトコルを簡略な国際方式にすることにより完遂率が高まると思われる。また、父子感染・輸血を含めた水平感染例も4割を占めており、諸外国のように日本でも出生後早期にHBユニバーサルワクチンが導入されることが望まれる。胎内感染例については出生後の予防処置では防ぐことができず、HBVキャリア妊婦へのHBIGや抗ウイルス剤投与などを行うべきか、今後検討していく必要がある。</p>			使用上の注意記載状況・ その他参考事項等 赤十字アルブミン20 赤十字アルブミン25 赤十字アルブミン20%静注 4g/20mL 赤十字アルブミン20%静注 10g/50mL 赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL 血液を原料とすること由来する 感染症伝播等
報告企業の意見	今後の対応			
B型肝炎ウイルス(HBV)母児感染予防措置導入以前と以後の小児HBVキャリア患者の感染経路・感染要因を比較・解析し、ユニバーサルワクチン導入の必要性を述べた報告である。 これまで、本剤によるHBV感染の報告はない。また本剤の製造工程には、平成11年8月30日付医薬発第1047号に沿ったウイルス・プロセスバリデーションによって検証された2つの異なるウイルス除去・不活化工程が含まれている。さらに最終製品についてHBV-NAT陰性であることを確認しており、安全性は確保されていると考える。	これまでの使用実績やバリデーション成績に鑑み本製剤の安全性は確保されており、特別の対応を必要としないが、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。なお、日本赤十字社では献血時のスクリーニング法としてより感度の高い化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)および新NATシステムを導入した。			

④

WS4-5 B型肝炎母子感染防止事業開始後に誕生した若年者におけるB型肝炎ウイルス感染についての検討

林 和彦, 片野義明, 後藤秀実

名古屋大学医学部消化器内科

【目的】1985年に厚生省B型肝炎母子感染防止事業による感染予防策が開始され, HBV感染者の新規発生が大幅に抑制された。しかしながら, 1985年以降に生まれた若年者にB型慢性肝炎(CHB)は存在しているが, その詳細は不明である。そこで1985年以降に誕生した若年者のCHBを対象に, その臨床的, ウイルス学的な解析を行った。

【方法】当院に通院中のCHB372例, 男220例, 女152例, 平均年齢 $43.9 \pm 1.4$ 歳(3-86歳)である。1985年以降(Young: Y群)と1960-1985(Middle: M群), 1960年以前(Old: O群)誕生の3群に分類して比較した。HBV subgenotypeは, preS領域のダイレクトシーケンス法で判定した。S領域のダイレクトシーケンスでワクチンエスケープ変異(VEM)を検索した。

【成績】Y群12例, M群259例, O群101例とY群は全体の32%であった。Y群の感染経路は, 母子感染例が9例, 水平感染が, 3例。母子感染では, ワクチン未接種例が2名で海外からの移民であった。他の7例はすべて出産後に標準的な母子感染予防を施行したが, 感染が予防できなかった無効例であった。水平感染例は, それぞれ手術, 鍼灸, 性行為が感染経路と推定された。Y群のHBV subgenotypeは10例Ceで, BaとAeがそれぞれ1例であった。Baはフィリピンからの移民で, Aeは性行為感染後の慢性化例であった。M群, O群のgenotype Ceの分布は78.4%, 80.2%と同様であったが, genotype Aeの分布は6.9%, 1.9%とM群に広く感染していた。Y群のHBe抗原は11例陽性であり, すべてBCP/PC変異は野生型であった。Y群のG145Aなど既報のVEMはなかった。y群4例の全塩基配列を解析したが, 有意な変異は確認できなかった。

【考案】母子感染予防無効例にVEMを有するCHBはなくウイルス因子以外に, ホスト側の要因も重要であることが示唆された。また移民のHBV感染を認めており, 今後さらに海外交流が盛んになると推測するのでわが国も地球規模でのHBV予防対策が望まれる。母子感染が75%を占めていたが, 水平感染例もあり, これら症例に対してはユニバーサルワクチンが有効と考える。また19歳での感染後の慢性化したgenotype Aeも存在し, M群のCHBにおいてgenotype Aeは増加しており, このhigh risk groupに対してもワクチンなどの対策が必要と思われる。

【結語】母子感染防止事業開始後に発症したCHBの多くは母子感染予防無効例で, 一部に移民や慢性化したgenotype Aeも存在した。

WS4-6 小児B型肝炎キャリア187例の感染実態と現在のHBV感染予防対策の問題点

恵谷ゆり<sup>1</sup>, 清原由起<sup>2</sup>, 高野智子<sup>3</sup>, 三善陽子<sup>3</sup>, 位田 忍<sup>1</sup>, 田尻 仁<sup>3</sup>

大阪府立母子保健総合医療センター消化器・内分泌科<sup>1</sup>, 大阪大学大学院医学系研究科医学部小児科学<sup>2</sup>, 大阪府立急性期・総合医療センター小児科<sup>3</sup>

【目的】小児B型肝炎ウイルス(HBV)キャリア患者の感染経路・感染要因を解析し, 現在のHBV感染予防対策の問題点を明らかにする。

【方法】大阪府立母子保健総合医療センター消化器・内分泌科(施設1), 大阪大学医学部小児科(施設2), および大阪府立急性期・総合医療センター小児科(施設3)に通院歴のあるHBVキャリア小児について後方視的に検討した。

【成績】施設1では32例, 施設2では133例, 施設3では22例の合計187例のHBVキャリアが診療を受けていた。男児110例, 女児77例で男女比1.43:1と男児が多かった。診断時年齢は中央値2歳(0ヶ月~15歳)であった。これらの症例の感染経路について, 母児感染予防処置が行われるようになった1986年以前の出生児と, 以後の出生児に分けて検討した。1985年までに出生していた症例は102例で, 母児感染59例(57.8%) 父子感染6例(5.9%) 輸血5例(4.9%) 水平感染31例(30.4%) 不明1例で母児感染が過半数を占めていた。母親のHBV感染の詳細が判明したものは8例だけで, うち5例がHBeAg陽性, 3例がHBeAb陽性であった。父親については3例の情報があり, 全例HBeAg陽性であった。一方1986年以降に出生した症例は85例で, 母児感染51例(60%), 父子感染13例(15.3%), 輸血2例(2.4%), 水平感染19例(22.4%)であった。母児感染の割合は1985年までに出生していた症例と変化なく, 父子感染は増加していた。母親のHBV感染の詳細が判明したものは29例あり, 全例HBeAg陽性であった。父親については3例がHBeAg陽性, 1例がHBeAb陽性であった。母児感染のうち胎内感染が16例, 予防処置実施中あるいは実施後にHBV感染が判明した症例が22例で, 現在の予防法では感染を防ぐことができなかった症例が合計38例(74.5%)であったが, 予防処置の不完全施行や未施行によるものが8例(15.7%)存在した。父子感染や水平感染の症例で, HBワクチンの投与を受けていたものはいなかった。

【結論】HBV母児感染予防処置導入後も小児のHBVキャリアは発生している。母児感染のうち約15%は予防処置の不完全施行や未施行が原因であり, 医療者の啓発を行うとともに, 予防処置プロトコルを簡略な国際方式にすることによって完遂率が高まると思われる。また父子感染・輸血を含めた水平感染症例も4割を占めており, 諸外国のように日本でも出生後早期にHBユニバーサルワクチンが導入されることが望まれる。胎内感染例については, 出生後の予防処置では防ぐことができず, HBVキャリア妊婦へのHBIGや抗ウイルス剤投与などを行うべきか, 今後検討していく必要がある。

## 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 2010. 6. 22	新医薬品等の区分 該当なし	総合機構処理欄
一般的名称	人血清アルブミン	研究報告の公表状況	大塚裕司, 平力造, 百瀬俊也, 日野学, 第58回日本輸血・細胞治療学会総会; 2010 May 28-30; 愛知	公表国	
販売名(企業名)	赤十字アルブミン20(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注4g/20mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注10g/50mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25%静注12.5g/50mL(日本赤十字社)			日本	
研究報告の概要	<p>○2009年輸血関連感染症報告症例の解析と傾向</p> <p>はじめに:2009年に全国の医療機関から報告された輸血関連感染症例(疑い例を含む)の解析結果と医療機関における「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」(以下GL)に基づいた輸血前後の患者検体の検査実施状況等について報告する。</p> <p>対象と方法:2009年に医療機関より報告された症例を対象とし、献血者検体(献血者の保管検体等の個別NAT、当該製剤(使用済みバッグ)等の無菌試験等)と患者検体の調査により輸血との因果関係を評価した。また、医療機関における患者の輸血前後の検査の実施項目等を2007、2008年時と比較した。</p> <p>結果と考察:10月末現在の報告数は82例(HBV 37例、HCV 21例、細菌 20例、パルボB19 2例、HEV 1例、CMV 1例)であり、輸血との因果関係が高いと評価した症例は、HBV 5例、HEV 1例、及び細菌 1例であった。医療機関でのGLに基づく輸血前後の患者検体の検査実施数(輸血前:HBs抗原/HBs抗体/HBc抗体、輸血後:HBV-DNA)はHBV症例で2007年6例(8%)、2008年12例(20%)、2009年9例(24%)であった。またHCV症例では(輸血前:HCV-RNA or HCVコア抗原/HCV抗体、輸血後:HCV-RNA or HCVコア抗原)2007年12例(29%)、2008年5例(12%)、2009年5例(24%)であった。細菌症例での医療機関における患者血培の実施数は、2007年27例(90%)、2008年43例(94%)、2009年20例(100%)であった。また、医療機関からの使用済みバッグの提供が2007年17例(57%)、2008年35例(76%)、2009年17例(85%)であった。これらのことによりGLが医療機関に浸透していることが推察された。</p>			使用上の注意記載状況・ その他参考事項等	
報告企業の意見	<p>2009年に全国の医療機関から報告された輸血関連感染症例(疑い例を含む)の解析結果と医療機関における「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」(以下GL)に基づいた輸血前後の患者検体の検査実施状況等についての報告である。なお、2009年12月末現在までの報告数は98件(HBV 45例、HCV 26例、細菌 23例、パルボB19 2例、HEV 1例、CMV 1例)、報告中、輸血との因果関係が高いと評価した症例はHBV 7例、HEV 1例、細菌 2例となっている。医療機関でのGLに基づく輸血前後の患者検体の2009年の検査実施数は、HBV症例 9例(20%)、HCV症例 9例(35%)、細菌症例の血培実施数23例(100%)、また医療機関からの使用済みバッグの提供は20例(87%)となっている。</p>			今後の対応	<p>赤十字アルブミン20 赤十字アルブミン25 赤十字アルブミン20%静注 4g/20mL 赤十字アルブミン20%静注 10g/50mL 赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL</p> <p>血液を原料とすることに由来する感染症伝播等</p>

## WS-1-2 2009年輸血関連感染症報告症例の解析と傾向

日本赤十字社血液事業本部  
大塚裕司, 平 力造, 百瀬俊也, 日野 学

【はじめに】2009年に全国の医療機関から報告された輸血関連感染症例(疑い例を含む)の解析結果と医療機関における「血液製剤等に係る週及調査ガイドライン(以下GL)」に基づいた輸血前後の患者検体の検査実施状況等について報告する。

【対象と方法】2009年に医療機関より報告された症例を対象とし、献血者検体(献血者の保管検体等の個別-NAT、当該製剤(使用済みバッグ)等の無菌試験等)と患者検体の調査により輸血との因果関係を評価した。また、医療機関における患者の輸血前後の検査の実施項目等を2007、2008年時と比較した。

【結果と考察】10月末現在の報告数は82例(HBV 37例、HCV 21例、細菌 20例、パルボB19 2例、HEV 1例、CMV 1例)であり、輸血との因果関係が高いと評価した症例は、HBV 5例、HEV 1例及び細菌の1例であった。

医療機関でのGLに基づく輸血前後の患者検体の検査実施数(輸血前:HBsAg/HBsAb/HBcAb、輸血後:HBV-DNA)はHBV症例で2007年6例(8%)、2008年12例(20%)、2009年9例(24%)であった。またHCV症例では(輸血前:HCV-RNA or HCVコア抗原/HCV-Ab、輸血後:HCV-RNA or HCVコア抗原)2007年12例(29%)、2008年5例(12%)、2009年5例(24%)であった。細菌症例では医療機関における患者血培の実施数は、2007年27例(90%)、2008年43例(94%)、2009年20例(100%)であった。また医療機関からの使用済みバッグの提供が2007年17例(57%)、2008年35例(76%)、2009年17例(85%)であった。これらのことによりGLが医療機関に浸透していることが推察された。今後、患者検体の日赤への提供状況等を併せて調査し、報告する予定である。

## WS-1-3 献血由来の血漿分画製剤製造メーカーで実施したHEV-NAT検査と、週及調査により判明した輸血後E型急性肝炎の1症例

武蔵野赤十字病院輸血部<sup>1)</sup>、東京都赤十字血液センター学術二課<sup>2)</sup>、中央血液研究所感染症解析部<sup>3)</sup>、森 威典<sup>1)</sup>、清水隆弘<sup>1)</sup>、中村圭太<sup>2)</sup>、鈴木 光<sup>3)</sup>、内田茂治<sup>3)</sup>、長田 薫<sup>1)</sup>

【はじめに】日本国内で輸血によるE型肝炎ウイルス(HEV)感染が2002年に初めて報告され、現在まで数例の報告がある。今回我々は、献血由来の血漿分画製剤製造メーカーより、原料血漿の受け入れ試験として実施したHEV核酸増幅検査(NAT)によってHEV-RNAが検出されたとの報告があり、当該血液から製造された赤血球製剤の週及調査により、輸血後E型急性肝炎が判明した事例を経験したので報告する。

【症例】患者は74歳男性、2008年5月に敗血症、脊髄硬膜外膿瘍、ARDS、急性腎不全などの重篤な病態にて当院救命救急科に入院。6月~10月までにRCC-LR計40単位の輸血を必要とした。8月下旬に一過性の急激なAST/ALTの上昇を認めたが、重篤な病態にて種々の薬剤が投与されていることもあり、原因の特定には至らなかった。肝機能は11月には正常化し、2009年1月に原疾患の回復により退院した。2009年5月、赤十字血液センターに血漿分画製剤製造メーカーより、献血由来の血液からHEV-NATにてHEV-RNAが検出されたとの報告があった。そして、当該血液由来のRCC-LRが当院に供給されたと週及調査の依頼があり、2008年8月22日に前記患者に輸血されていたことが判明した。輸血前後の患者保管血漿によるHEV抗体、HEV-RNAが輸血前は陰性、輸血後は陽性、さらに献血者および患者のウイルス塩基配列も完全に一致したため、輸血によるHEV感染であることが証明された。よって、患者は輸血によるHEV感染から急性肝炎を発症したものと考えられた。

【考察】本症例は血漿分画製剤製造メーカーによるHEV-NATと、輸血前検体の保管により判明した輸血後E型急性肝炎であり、検体保管の重要性を再認識した。また、輸血後AST/ALTの急激な上昇が見られ、HBV、HCVの感染を認めないケースでは、HEV感染も要因の一つとして疑う必要があると思われた。

## 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 2010. 6. 22	新医薬品等の区分 該当なし	総合機構処理欄
一般的名称	人血清アルブミン			公表国	
販売名(企業名)	赤十字アルブミン20(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注4g/20mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注10g/50mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25%静注12.5g/50mL(日本赤十字社)		研究報告の公表状況	日本	
研究報告の概要	○スクリーニングNATのプール数の縮小効果について はじめに: 日本赤十字社では血液製剤等のHBV、HCV、HIVへの安全対策として1999年7月にプール検体(500本)によるスクリーニングNAT(試薬:AMPLINAT MPX(AMP-NAT))を開始した。その後、プール検体数を50本、20本へと縮小し、2008年8月から検出感度向上を目的に新NATシステム(試薬:TaqScreen MPX(Taq-NAT))を導入した。これらのプール数の縮小効果を医療機関から報告された感染症報告症例より検証した。 対象と方法: 2000年1月から2009年10月までに医療機関より報告された感染症報告症例の内、輸血による感染を直接証明できた症例はHBV 91件、HCV 3件、HIV 1件であった。この原因となった輸血用血液の献血血液それぞれ 87献血、3献血、1献血を対象にし、当該献血時のスクリーニングNATをプール検体数別・試薬別に分類した。 結果: 献血血液の分類結果はHBV・HCV・HIV別に、50本プール前:8・0・0、50本プール/AMP-NAT(2000年2月-2004年7月:4.5年間):46・2・1、20本プール/AMP-NAT(2004年8月-2008年7月:4年間):30・1・0、20本プール/Taq-NAT(2008年8月-2009年10月:1.25年間):3・0・0 であった。 考察: ウイルス増殖スピードの遅いHBVについて、プール検体数の縮小・試薬の検出感度向上により、輸血感染HBVの減少傾向が認められた。一方、ウイルス増殖スピードの速いHCV、HIVはスクリーニングNAT導入後約10年が経過した中で輸血感染HCVが3件、輸血感染HIVが1件と、NATの導入自体に効果があったことが推測された。2008年8月から導入された新NATシステムにより、更なる安全性向上に努めているところである。				使用上の注意記載状況・その他参考事項等
					赤十字アルブミン20 赤十字アルブミン25 赤十字アルブミン20%静注 4g/20mL 赤十字アルブミン20%静注 10g/50mL 赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL  血液を原料とすることに由来する感染症伝播等
報告企業の意見			今後の対応		
日本赤十字社で実施した、スクリーニングNATにおける段階的なプール検体数の縮小と、2008年8月からの試薬の検出感度向上による効果の検証である。日本赤十字社では、血清学的検査に加え、HBV、HCV、HIV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、「血液製剤に係る適及調査ガイドライン」(平成20年12月26日付薬食発第1226011号)に基づき、輸血感染症の調査を行っている。			日本赤十字社では、従来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NATシステムを導入している。これらの措置によって原料血漿への病原微生物の負荷が減少し、本製剤の安全性はより高まっている。今後も輸血感染症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。		

### WS-1-6 スクリーニング NAT のプール数の縮小効果について

日本赤十字社血液事業本部

平 方造, 大塚裕司, 鈴木 光, 百瀬俊也, 内田茂治, 日野 学

【はじめに】日本赤十字社では血液製剤等の HBV, HCV, HIV への安全対策として 1999 年 7 月にプール検体 (500 本) によるスクリーニング NAT (試薬: AMPLINAT MPX (AMP-NAT)) を開始した。その後, プール検体数を 50 本, 20 本へと縮小し, 2008 年 8 月から検出感度向上を目的に新 NAT システム (試薬: TaqScreen MPX (Taq-NAT)) を導入した。これらのプール数の縮小効果を医療機関から報告された感染症報告症例より検証した。

【対象と方法】2000 年 1 月から 2009 年 10 月までに医療機関より報告された感染症報告症例の内, 輸血による感染を直接証明できた症例は HBV (TT-HBV) 91 件, HCV (TT-HCV) 3 件, HIV (TT-HIV) 1 件であった。この原因となった輸血用血液の献血血液 87 献血, 3 献血, 1 献血を対象とし当該献血時のスクリーニング NAT をプール検体数別・試薬別に分類した。

【結果】献血血液の分類結果は HBV・HCV・HIV 別に, 50 本プール前: 8・0・0.50 本プール/AMP-NAT (2000 年 2 月-2004 年 7 月: 4.5 年間) : 46・2・1.20 本プール/AMP-NAT (2004 年 8 月-2008 年 7 月: 4 年間) : 30・1・0.20 本プール/Taq-NAT (2008 年 8 月-2009 年 10 月: 1.25 年) : 3・0・0 であった。

【考察】ウイルス増殖スピードの遅い HBV について, プール検体数の縮小・試薬の検出感度向上により TT-HBV の減少傾向が認められた。一方, ウイルス増殖スピードの速い HCV・HIV は, スクリーニング NAT 導入後約 10 年が経過した中で TT-HCV が 3 件, TT-HIV が 1 件と NAT の導入自体に効果があったことが推測された。2008 年 8 月から導入された新 NAT システムにより, 更なる安全性向上に努めているところである。今後も, 安全対策の導入に際して, そのリスク評価を検討し, 輸血医療の安全性向上に資することとしたい。

### WS-2-1 当院における貯血式自己血輸血の現状と問題点

安城更生病院血液輸血センター<sup>1)</sup>, 安城更生病院血液・腫瘍内科<sup>2)</sup>  
原田康夫<sup>1)</sup>, 山本喜之<sup>1)</sup>, 山本敦子<sup>1)</sup>, 伊藤達也<sup>2)</sup>

【はじめに】自己血輸血は同種血輸血の副作用を回避し得る最も安全な輸血療法とされ, 近年, 積極的に導入されつつあるが, 返血実施のガイドラインは未だ確立されていない。そこで, 今回, 適正化に向けて当院における貯血式自己血の現状と問題点を検討したので報告する。

【対象と方法】2003 年 1 月-2008 年 12 月の貯血式自己血輸血の推移を診療科別に貯血数, 実施数, 同種血回避率, 廃棄率等の実施状況について科別解析を行った。

【結果】6 年間の貯血式自己血採血総数は 1204 症例, 特に産科, 婦人科, 整形外科, 泌尿器科において年次増加が顕著であった。自己血実施総数は 1104 症例で実施率は 91.7% であった。同種血併用総数は 52 件 (うち 30 件は心臓血管外科), 同種血輸血回避率は 95.3% で年間の変化は認められなかった。科別廃棄率は 0~35% に分布していた。術後に実施された自己血輸血時の総平均 Hb 値は 10.0g/dl (6.3 g/dl~14.7g/dl) であったが, 中には Hb 値未測定症例や, 比較的術後貧血が軽度な症例も含まれていた。科別では産科 9.5g/dl, 婦人科 9.9g/dl, 整形外科 9.9g/dl, 外科 10.1g/dl, 血液内科 10.4 g/dl, 泌尿器科 10.7g/dl, 心臓血管外科 11.3g/dl であった。使用時期別解析では, 術中使用率は 74.5%, 術後使用では, 術後当日, 翌日で大半を占めたが最長は 7 日までであった。科別術後実施率は, 心臓血管外科の 0.5%~整形外科の 75.5% の分布を示した。

【結語】当院の貯血式自己血輸血総数は年々増加傾向にある。しかしながら, その実施基準は未だ不統一であり, 廃棄状況にもばらつきが大きい。術式や患者の状況によっても大きく左右されるが, 少なくとも, 各科では Hb 値と実施時期に関して一定の基準策定が望まれる。近年, 自己血輸血による副作用も注目されており, リスク, バネフィットをより厳密に考慮した更に適正な自己血輸血の体制整備を進める必要がある。

## 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 2010. 5. 11	新医薬品等の区分 該当なし	総合機構処理欄
一般的名称	人血清アルブミン	研究報告の公表状況	47News. Available from: <a href="http://www.47news.jp/CN/201004/CN2010042901000540.html">http://www.47news.jp/CN/201004/CN2010042901000540.html</a>	公表国 日本	
販売名(企業名)	赤十字アルブミン20(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注4g/20mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン20%静注10g/50mL(日本赤十字社) 赤十字アルブミン25%静注12.5g/50mL(日本赤十字社)				
研究報告の概要	<p>○A型肝炎が増加、死亡例も 魚介類や水、注意呼び掛け A型肝炎の患者が3月以降増加し、既に昨年1年間の患者数を超えたことが、国立感染症研究所の集計で分かった。劇症化し死亡したケースもあった。A型肝炎ウイルスに汚染された水や食材の摂取によって感染する。同研究所は「広い範囲で散発的な集団発生が起きている可能性がある。55歳未満はほとんどが抗体を持たず、高齢者は重症化しやすい」として、魚介類の十分な加熱など、注意を呼び掛けている。同研究所によると、今年の患者の報告数は3月上旬から増加、4月4日までの1週間では18人と、2007年以降では1週間当たりの人数が最多で、その後も多い状態が続いている。4月18日までの合計(速報値)は121人で昨年の報告数(115人)を超えた。4月11日までの5週間の患者81人をみると、年齢は20~88歳、2例が劇症化し、うち1人が死亡した。福岡県、広島県などが多く、報告した医師が推定した原因食材は「カキ」が45%と最も多かった。</p>				<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</p> <p>赤十字アルブミン20 赤十字アルブミン25 赤十字アルブミン20%静注 4g/20mL 赤十字アルブミン20%静注 10g/50mL 赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL</p> <p>血液を原料とすることに由来する感染症伝播等</p>
	報告企業の意見	今後の対応			
<p>A型肝炎の患者が3月以降増加し、既に昨年1年間の患者数を超えたことが、国立感染症研究所の集計で分かったとの報告である。これまで、本剤によるHAV感染の報告はない。また本剤の製造工程には、平成11年8月30日付医薬発第1047号に沿ったウイルス・プロセスバリデーションによって検証された2つの異なるウイルス除去・不活化工程が含まれている。さらに最終製品についてHAV-NAT陰性であることを確認しており、安全性は確保されていると考える。</p>	<p>本製剤の安全性は確保されていると考えるが、今後もウイルスの検出や不活化する方策について情報の収集に努める。なお、日本赤十字社は、輸血後A型肝炎に対する対応として、問診で肝炎の既往があった場合、A型肝炎については治癒後6ヶ月間、家族に発症した人がいる場合は1ヶ月間献血不適としている。</p>				

別紙2

2010年(平成22年)6月8日(火曜日)大安



Web限定クーポン  
今だけの  
スペシャル  
プライズ

人気コンタクトが  
**衝撃値下げ!**

トップ 地域ニュース 共同ニュース トピックス コラム スポーツ エンタメ マネー 動画 学び 特集 言葉ランキン

47NEWS > 共同ニュース > 記事詳細

ニュース詳細

| 特集:菅政権へ | 日本の実力 | ランキング

## A型肝炎が増加、死亡例も 魚介類や水、注意呼び掛け

A型肝炎の患者が3月以降増加し、既に昨年1年間の患者数を超えたことが、国立感染症研究所の集計で29日分かった。劇症化し死亡したケースもあった。

A型肝炎ウイルスに汚染された水や食材の摂取によって感染する。同研究所は「広い範囲で散発的な集団発生が起きている可能性がある。55歳未満はほとんどが抗体を持たず、高齢者は重症化しやすい」として、魚介類の十分な加熱など、注意を呼び掛けている。

同研究所によると、今年の患者の報告数は3月上旬から増加、4月4日までの1週間は18人と2007年以降では1週間当たり最多で、その後も多い状態が続く。4月18日までの合計(速報値)は121人で昨年の報告数(115人)を超えた。

11日までの5週間の81人をみると、患者の年齢は20~88歳、2例が劇症化し、うち1人が死亡した。福岡県、広島県などが多く、報告した医師が推定した原因食材は「カキ」が45%と最も多かった。

2010/04/29 17:26 【共同通信】

つぶやく

トップページへ

### Ads by Google

- C型肝炎情報サイト [www.kanenzero.jp](http://www.kanenzero.jp)  
都道府県別の治療費助成制度紹介や 検査から治療まで
- ワキの汗や臭いが気になる [www.shinagawa.com](http://www.shinagawa.com)  
ワキガや多汗症のお悩みご相談下さい あなたに最適な施術を品川美容外科で
- "ゴミ屋敷解決"は片付け隊 [kataduke.net](http://kataduke.net)  
近隣住民に内密作業可。情報漏洩ゼロ 女性の方も安心してご相談下さい!
- ウイルスにはサラファイン [www.tacmina.co.jp](http://www.tacmina.co.jp)

インテル Co

lenov



THERE'S  
IN A TH

59,8

47NEWS  
花



47NEWS

全国52新

異国で

女子中

山田

共同通信

京都、

大阪府

肝移植

注目コ



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 2010年2月4日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
一般的名称	①②③④人血清アルブミン ⑤⑥乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ ⑦人ハプトグロビン ⑧乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子			公表国 日本	
販売名 (企業名)	①献血アルブミン 25%静注 5g/20mL「ベネシス」 (ベネシス) ②献血アルブミン 25%静注 12.5g/50mL「ベネシス」 (ベネシス) ③献血アルブミン 5%静注 5g/100mL「ベネシス」 (ベネシス) ④献血アルブミン 5%静注 12.5g/250mL「ベネシス」 (ベネシス) ⑤ノイアート静注用 500 単位 (ベネシス) ⑥ノイアート静注用 1500 単位 (ベネシス) ⑦ノイアート (ベネシス) ⑧ハプトグロビン静注 2000 単位「ベネシス」 (ベネシス) ⑨コンコエイト-HT (ベネシス)	研究報告の公表状況	Journal of Medical Virology 2010; 82(1): 69-76		
研究報告の概要	<p>ブタはヒトへ E 型肝炎ウイルス (HEV) を伝播するリザーバーと考えられる。感染動態を調査するために、HEV に自然感染した国産ブタ 2 つの同産仔 (A と B、10 匹の子豚を含む) を生後 6 箇月になるまで研究した。母子移行 IgG および IgA 抗体は同産 A 群の子豚からは検出されたが、B 群からは検出されなかった。生後 30-110 日のとき、全てのブタは糞便の中に HEV を排出し、17 匹は生後 40-100 日のときにウイルス血症を現した。系統発生分析では、全てのブタで HEV 遺伝子型 3 に非常に近い配列を示した。特異的な IgG と IgA の血清レベルは IgA は糞便では検出されなかったが、全てのブタで同様だった。興味あることに、ウイルス血症と抗体陽転の開始は、同産仔 A 群のブタで有意に遅れた。糞便に排出されたウイルスの動態は、両方の同産仔群で同様であった。感染動態の違いは、母性抗体がウイルス血症と抗体陽転開始を遅延させることを示唆した。定量的リアルタイム逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法分析において、糞便中の HEV RNA は約 10<sup>6</sup>copies/g で最初の排泄から 10 日後にピークに達することが明らかになった。生後 200 日で、HEV RNA は、13 匹のブタの 3 つの内臓で見つかった。この研究の発見は、ブタにおける HEV 自然感染の動態、ブタから人へのウイルス伝播の管理に役立つことができる。</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静注用 500 単位の記載を示す。</p> <p>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-I 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>ブタにおける HEV 自然感染の動態についての報告である。 万一、ヘパリンの原料であるブタ小腸粘膜に HEV が混入したとしても、HPV1 及び 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>		





# Long-Term Shedding of Hepatitis E Virus in the Feces of Pigs Infected Naturally, Born to Sows With and Without Maternal Antibodies

Yuta Kanai,<sup>1</sup> Muneo Tsujikawa,<sup>3</sup> Mikihiro Yunoki,<sup>3</sup> Shoko Nishiyama,<sup>1</sup> Kazuyoshi Ikuta,<sup>2</sup> and Katsuro Hagiwara<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Hokkaido, Japan

<sup>2</sup>Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Infectious Pathogen Research Group, Osaka Research Laboratory, Research & Development Division, Benesis Corporation, Osaka, Japan

Pigs are presumed reservoirs for hepatitis E virus (HEV) transmission to humans. To examine infection kinetics, two litters of domestic pigs (A and B, each containing 10 piglets) infected naturally with HEV were studied until pigs were 6 months old. Maternal IgG and IgA antibodies were detected in litter A piglets, but not in litter B ones. All pigs shed HEV in feces when they were 30–110 days old, and 17 developed viremia at 40–100 days of age. Phylogenetic analysis revealed a highly close sequence of HEV genotype 3 in all pigs. The serum levels of specific IgG and IgA were similar in all pigs, although IgA was not detected in the feces. Interestingly, the onset of both viremia and seroconversion was delayed significantly in litter A pigs. The kinetics of fecal virus shedding was similar in both litters; shedding was not detected after the pigs were 120 days old. The differences in the infection kinetics between litters A and B suggested that maternal antibodies delayed the onset of viremia and seroconversion. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction revealed that HEV RNA in feces peaked 10 days after initial shedding of approximately  $10^{6.0}$  copies/g. The viral load was much lower in the serum than in the feces. At 200 days of age, HEV RNA was found in the internal organs of 3 out of 13 pigs. These study findings improve the understanding of the dynamics of natural HEV transmission in pigs, which could help in controlling virus transmission from pigs to humans. *J. Med. Virol.* 82:69–76, 2010.

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** swine; transmission; time course; epidemiology

## INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a causative agent of acute hepatitis in humans. HEV is a small non-enveloped single-stranded positive-sense RNA virus. Recently, HEV was classified as the sole member of the genus *Hepevirus* in the family *Hepeviridae* [Emerson and Purcell, 2003]. HEV isolates from mammals can be divided into at least four genotypes on the basis of complete sequence analysis [Lu et al., 2006]. Genotype 1 is distributed in Asia and Africa [Escriva et al., 2008; Sugitani et al., 2008], whereas genotype 2 is found in Mexico and Africa [Lu et al., 2006]. These two genotypes are transmitted to the human population via the fecal–oral route, and large human outbreaks have occurred in non-industrialized countries as a result of drinking water contaminated with feces [Jameel, 1999]. Genotype 3 has been detected in humans, domestic pigs, and several wild animals, and is distributed worldwide [Lu et al., 2006; Lewis et al., 2008; Lam et al., 2009]. Genotype 4 has been detected in humans and domestic pigs in Asian countries and Germany [Lu et al., 2006;

This study was performed at the Laboratory of Microbiology and Pathology, High Technological Research Center, Rakuno Gakuen University.

Grant sponsor: High Technological Research Center (Rakuno Gakuen University; partial support); Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; Grant number: S0891002; Grant sponsor: Benesis Corporation.

Yuta Kanai's present address is Section of Viral Infections, Thailand-Japan Research Collaboration Center on Emerging and Re-emerging Infections (RCC-ERI), Nonthaburi 11000, Thailand.

\*Correspondence to: Katsuro Hagiwara, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan. E-mail: k-hagi@rakuno.ac.jp

Accepted 3 August 2009

DOI 10.1002/jmv.21647

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

Wichmann et al., 2008]. The genotypes 3 and 4 strains are considered to be zoonoses [Meng, 2005]. An HEV-related agent, the so-called avian HEV, has been detected in poultry but it does not seem to cause human infection [Huang et al., 2004].

Since the initial discovery of swine HEV in the USA [Meng et al., 1997], cases of HEV infection in pigs have been documented worldwide [Meng, 2005; Dalton et al., 2008]. Previous studies have shown the genetic similarity of swine and human HEV [Wang et al., 2000; Kabrane-Lazizi et al., 2001; Huang et al., 2002; Nishizawa et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Yazaki et al., 2003; Ijaz et al., 2005], and have reported experimental cross-species infections from humans to pigs or from pigs to non-human primates [Meng et al., 1998; Halbur et al., 2001; Feagins et al., 2008; Ji et al., 2008]. All of these findings suggest that pigs are reservoirs of human HEV.

Epidemiological studies have revealed that HEV infections in pigs are ubiquitous, and that pigs over the age of 3 months have a high seroprevalence [Meng et al., 1999; Huang et al., 2002; Banks et al., 2004]. HEV shedding in feces has been observed in pigs of all ages, but is more frequently observed in 2–4 months old pigs as compared to slaughter-age (6-month old) or adult pigs [Meng et al., 1997; Yazaki et al., 2003; Cooper et al., 2005; Fernandez-Barredo et al., 2006; Seminati et al., 2008]. These results indicate that domestic pigs are infected easily with HEV at an early age, but that the majority of pigs stop shedding HEV RNA before they are 6 months old. Although many epidemiological studies have been conducted on this subject, longitudinal studies following individual pigs are limited [Meng et al., 1997; de Deus et al., 2008]. Of particular importance is the fact there have been no long-term quantitative analyses of virus shedding and serum antibody levels in individual piglets infected naturally with HEV.

In the present study, long-term follow-up characterization was performed until slaughter age of two litters of pigs infected naturally with HEV—one with HEV-specific maternal antibodies and the other without these antibodies—to investigate the dynamics of HEV RNA shedding in feces, as well as assess viremia, antibody levels, and the effect of maternal antibodies on HEV infection.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Sample Collection

Twenty mixed-breed pigs, 10 born to sow A (litter A) and 10 to sow B (litter B), from a swine herd in Japan were followed up until they were 200 days old (day 200). The two litters were born on the same day in separate pens and raised together after day 30. They were separated again from day 83 till the end of the study.

The sera of sows A and B were collected before delivery and examined for HEV-specific IgG antibodies. During the study period, fecal and serum samples were collected every 10 days from each pig, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until

use. Thirteen pigs (five from litter A and eight from litter B) were euthanized on day 200, and tissue samples (liver, ileum, and colon), serum, bile, and intestinal contents (ileum, colon, and rectum) were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before testing. The tissues were treated with RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Euthanasia and tissue sampling were performed according to the Laboratory Animal Control Guidelines of Rakuno Gakuen University.

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Anti-HEV Antibodies

The anti-HEV IgG antibodies in the sera collected before the delivery of the sows, the anti-HEV IgG and IgA antibodies in the serum samples, and the anti-HEV IgA antibodies in individual feces samples were detected using a commercial ELISA kit for the detection of hepatitis E antibodies (Viragent HEV-Ab kit; Cosmic Corporation, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Serum samples from five pigs in litter A and eight in litter B were used for detecting HEV-specific serum IgA. For detection of antibodies in feces, suspensions of 10% fecal matter in phosphate-buffered saline were prepared. The kit used a truncated recombinant HEV ORF2 protein expressed in silkworm pupae [Mizuo et al., 2002]. Rabbit anti-pig IgG or IgA antibodies coupled with horseradish peroxidase (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) were used as secondary antibodies. Antibody titres were recorded as index values and calculated according to the following formula:

$$\text{Index value} = \frac{\text{Optical density of sample}}{\text{Optical density of positive control}} \times 100.$$

### RNA Extraction

Viral RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of serum, bile, 10% fecal suspension, and a 10% suspension of the intestinal contents by using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). The final elution was carried out using 50  $\mu\text{l}$  of elution buffer. Viral RNA was extracted from the tissue samples with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

### Semi-Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

To detect HEV RNA, semi-nested RT-PCR was performed. The 5'-terminal region of ORF1 was amplified using broadly reactive primers [Hagiwara et al., 2007]. For the first round of PCR, the sense primer HE61 (5'-CACRTATGTGGTCGAYGCCATGGAG-3'; R = A or G, Y = C or T) and the anti-sense primer HE51 (5'-GCCRACYACCACAGCATTTCG-3'; K = G or T) were used. This produced an expected fragment of 125 base pairs (bp). For the second round of PCR, the internal sense primer HE50 (5'-AAGGCTCCTGGCRTYAC-

WAC-3'; W = A or T) and the anti-sense primer HE51 were used, producing an expected fragment of 85 bp. Reverse transcription and first-round amplification were carried out using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). In each reaction, 5- $\mu$ l aliquots of viral RNA solution were used. The reactions were performed in an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following conditions: reverse transcription at 50°C for 30 min, denaturation at 95°C for 15 min, 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec each, annealing at 55°C for 30 sec, elongation at 72°C for 30 sec, and final elongation at 72°C for 7 min. After first-round PCR, 1  $\mu$ l of the PCR product was amplified under the following conditions: 20 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec each, annealing at 60°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 15 sec, followed by final incubation at 72°C for 7 min. The amplified second-round PCR products were characterized using 2% gel electrophoresis. A PCR amplicon of 85 bp was determined to be HEV-specific.

#### Quantitative Real-Time RT-PCR

The copy number of HEV RNA was measured by quantitative real-time RT-PCR according to the technique developed by Jothikumar et al. [2006] with a slight modification. TaqMan<sup>®</sup> probe (5'-FAM-TGATTCCCAGCCCTTCGC-TAMRA-3') was designed based on the sequence of the HEV ORF3 region (accession number AB481228) from litter A pig. Five microliters of extracted RNA (equivalent to 1.4 mg of feces or 14  $\mu$ l of sera) was used per reaction. A 5  $\mu$ l aliquot of RNA was amplified using the forward primer 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3' and the reverse primer 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3' in a LightCycler (Roche, Basel, Switzerland) under the following conditions: reverse transcription at 50°C for 30 min, denaturation at 95°C for 15 min, and 45 cycles of amplification, each consisting of 1 sec at 95°C followed by 1 min at 60°C. Viral RNA copy numbers were calculated on the basis of the calibration curve constructed using standard RNA as described below, using LightCycler Software 4.0.

To construct a calibration curve for quantification, *in vitro* transcribed RNA from the HEV ORF3 region was collected from a cloned plasmid. The copy number of standard RNA was calculated using a spectrophotometer. Preliminary examination using *in vitro* transcribed RNA showed that the detection limit of quantitative real-time RT-PCR was 10<sup>3.8</sup> copies/g of feces, 10<sup>2.8</sup> copies/ml of serum, and 10<sup>3.6</sup> copies/ml of tissue.

#### Sequence and Phylogenetic Analysis

Four fecal samples from four pigs in litter A and one fecal sample from sow A, all of which were found to be positive for HEV by nested RT-PCR, were subjected to sequence analysis. The ORF2 region of the viral RNA was amplified using the primers HE044 (5'-CAAGG-HTGGCGYTCKGTTGAGAC-3'; H = A, C, or T) and HE041 (5'-TTMACWGTCTRGCTCGCCATTGGC-3';

M = A or C), as described previously [Mizuo et al., 2002]. The PCR products were sequenced directly using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequence analysis was performed using Genetyx-Windows version 7 (Genetyx Corp., Tokyo, Japan). The sequence alignment was generated by CLUSTAL W [Thompson et al., 1994]. The four nucleotide sequences of swine HEV isolates, named swJB-M3, -M5, -M8, and -M10, have been deposited in the GenBank sequence database under the accession numbers AB471965-AB471968. A phylogenetic tree was constructed using prototype sequences of genotype 1, 2, 3, and 4 obtained from GenBank and the neighbor-joining method [Saitou and Nei, 1987], on the basis of a 412-nucleotide partial sequence of the ORF2 region; the tree was drawn using the TreeView program [Page, 1996].

#### Statistical Analysis

The number of pigs shedding virus in feces, the number with viremia, and the time to seroconversion were compared between litters A and B by using the Wilcoxon rank-sum test. Statistical analysis was performed using the JMP 5.1.2 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC).  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

#### Detection of Anti-HEV IgG and IgA in Serum and Feces

A total of 20 piglets were studied, 10 from litter A and 10 from litter B. Before delivery, sow A tested positive for IgG antibodies specific to the HEV ORF2 protein, but sow B did not. Figure 1 shows the levels of HEV-specific IgG and IgA in the sera of the piglets when they were 1-180 days old. The serum samples from litter A pigs tested positive for both IgA and IgG antibodies on day 1, with ELISA index values of 122.6 and 144.5, respectively; the levels of these antibodies in their sera decreased rapidly until day 50. In contrast, the serum levels of IgG and IgA in litter B pigs were significantly low on day 1, with ELISA index values of 17.4 and 27.5, respectively. The serum IgG levels in the litter B pigs remained low during days 1-50. Seroconversion began on day 60 in litter A pigs and on day 50 in litter B pigs, after the onset of viremia (Fig. 1). The Wilcoxon rank-sum test revealed that there was a significant difference between litters A and B pigs with respect to the time of IgG seroconversion ( $P < 0.001$ ) (data not shown), that is, seroconversion occurred significantly earlier in litter B pigs. The antibody titres peaked on days 90 and 70 in litters A and B, respectively, and then decreased gradually till the end of the study.

HEV-specific fecal IgA to HEV were not detected during the study period (data not shown).

#### Detection of HEV RNA in Feces and Serum

Pig feces were examined for HEV RNA during days 30-110 by using semi-nested RT-PCR (Fig. 1). On day

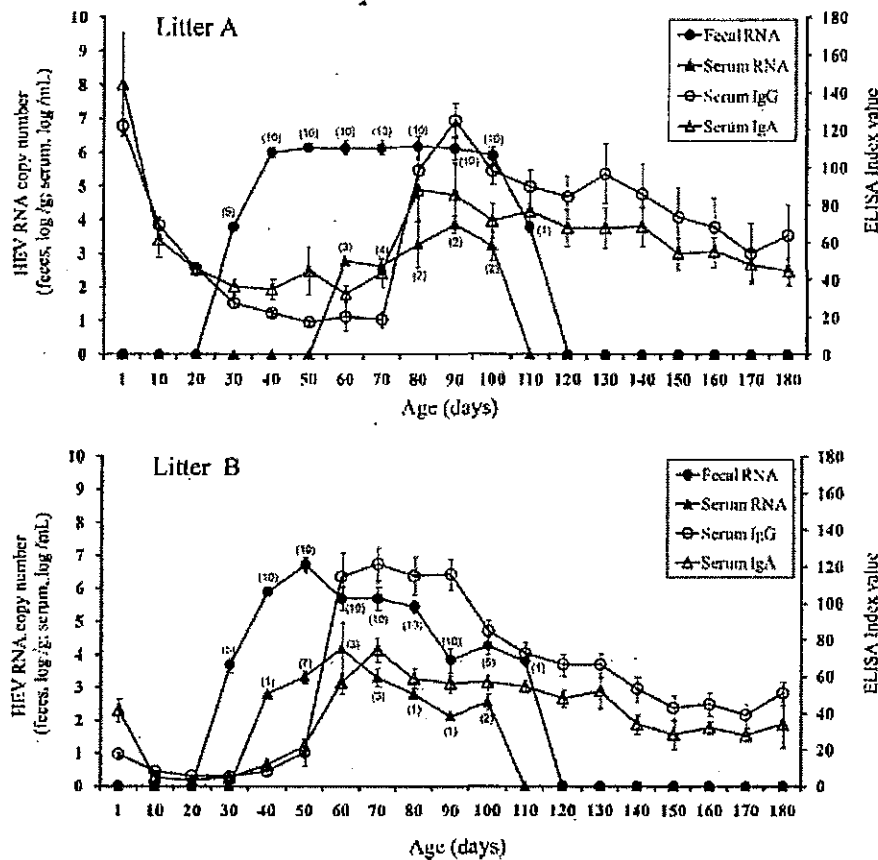


Fig. 1. Hepatitis E virus (HEV) shedding and seroconversion in two litters of pigs. The copy numbers of HEV RNA in feces and serum are shown, along with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) index values of anti-HEV IgG and IgA in the serum samples. HEV RNA copy numbers in feces and serum represent the average values among positive animals. The numbers of animals positive for fecal RNA and

serum RNA are indicated in parentheses. The levels that were undetectable by quantitative real-time RT-PCR were approximated using the estimated detection limit ( $10^{3.8}$  copies/g for fecal RNA,  $10^{2.8}$  copies/ml for serum RNA). ELISA index value = (OD of sample/OD of positive control)  $\times$  100. Error bars represent standard error.

30, HEV RNA was detected in the feces of five pigs from each litter. During days 40–90, HEV RNA was detected in the feces of all 20 pigs. On day 100, all 10 of the pigs in litter A shed HEV RNA in their feces, but only 5 pigs from litter B did. On day 110, only one pig from each litter was found to be shedding HEV RNA in the feces. No HEV RNA was detected in feces after day 120.

The modified TaqMan<sup>®</sup> probe, designed to be specific to the present HEV strain, reacted strongly to every sample tested, indicating that the HEV detected in all of the litter A and B pigs belongs to the same strain. The dynamics of fecal shedding of HEV were quantitatively characterized by real-time PCR (Fig. 1). On day 30, HEV RNA could be detected in feces by semi-nested RT-PCR but not by real-time RT-PCR, indicating that the RNA copy number was below the detection limit of quantitative real-time RT-PCR ( $10^{3.8}$  copies/g). On day 40, however, HEV RNA increased suddenly to  $10^{6.0}$  copies/g in the feces from both litters. The pigs in litter A continued to shed large amounts of HEV RNA (approximately  $10^{6.0}$  copies/g) until day 100, whereas the amounts of HEV RNA in the feces of litter B pigs decreased gradually. On day 110, the HEV RNA in the

feces from both litters decreased to amounts below the detection limit of real-time RT-PCR.

During the study period, viremia was detected in 7 pigs in litter A and 10 in litter B. The onset of viremia occurred on day 60 in litter A pigs and on day 40 in litter B pigs (Fig. 1). The Wilcoxon rank-sum test showed that this difference between the time of onset of viremia in litter A and B pigs was statistically significant ( $P=0.024$ ; Fig. 1). Throughout the study, the amounts of HEV RNA in the serum were lower than those in the feces (Fig. 1). The highest serum HEV RNA titre was found on day 90 in a pig from litter A ( $10^{4.2}$  copies/ml) and on day 60 in a pig from litter B ( $10^{5.6}$  copies/ml).

#### Time Courses of Changes in Virus Shedding, Viremia, and Serum Antibody Titres

Based on the data obtained on virus shedding and antibody reaction in individual pigs (data of individual pigs not shown), the general time course of HEV infection in domestic pigs can be described as follows (data are expressed as mean (SD; range)): pigs begin to shed HEV in feces on day 30 (27.4; 0–70) after birth and

viremia and seroconversion of serum IgG and IgA occur 33.5 (7.0; 10–60) and 32.3 (7.4; 20–50) days, respectively, after the onset of HEV shedding in feces. HEV shedding in feces continues for 63.5 (7.4; 50–80) days, whereas viremia can appear transiently for 11.8 (12.9; 10–40) days. In this study, virus shedding in feces was observed in all pigs with high antibody titres, whereas viremia was observed in a total of 17 pigs, all of which had relatively low antibody titres. Serum IgG and IgA antibody levels peaked 8.5 (12.0; 0–30) and 6.2 (7.1; 0–20) days, respectively, after seroconversion. After peaking, they decreased gradually but remained detectable during the entire study period, even after the end of viremia and after the pigs stopped shedding virus in feces.

**Sequence Analysis**

Genomic sequencing of the ORF2 region of virus isolates from four piglets in litter A and from sow A revealed that the virus strains were identical. Phylogenetic analysis of the HEV isolates indicated that they belonged to HEV genotype 3 and that they were clustered with genotype 3<sub>us</sub>, both of which are related to the strains of swine and human HEV found in the USA (Fig. 2) [Takahashi et al., 2003].

**HEV RNA Detection in Tissue Samples From 200 Days Old Pigs**

Of the 13 pigs (5 from litter A, 8 from litter B) euthanized on day 200, HEV RNA was detected in the

internal organs of 3 pigs by semi-nested RT-PCR: in the gall bladder of one litter A pig, in the mesenteric lymph nodes and liver of one litter B pig, and in the hepatic and mesenteric lymph nodes of another litter B pig. According to real-time RT-PCR, in contrast, none of these samples tested positive for HEV RNA, indicating that the amounts of HEV RNA present in these samples were below the detection limit of real-time RT-PCR, that is, 10<sup>3.6</sup> copies/g.

**DISCUSSION**

Although there a number of epidemiological surveys of HEV in pigs have been conducted, longitudinal studies of the time course of HEV infection in pigs infected naturally have been quite limited [Meng et al., 1997; de Deus et al., 2008]. The dynamic HEV life cycle in piglets infected naturally can only be evaluated through long-term follow-up studies with quantitative measurements of both HEV RNA and viral-specific antibodies in individual pigs from birth to slaughter. This is the first report on the quantitative dynamics of virus shedding in feces, viremia, and specific serum antibodies that were evaluated in a long-term follow-up study of pigs infected naturally with HEV.

Maternal antibodies, including IgG, IgA, and IgM, that are transmitted via the colostrum have been reported to protect piglets from infection by various pathogens [Andries et al., 1978]. Although maternal antibodies against HEV have been found in piglets born to HEV-positive sows, the protective role of these

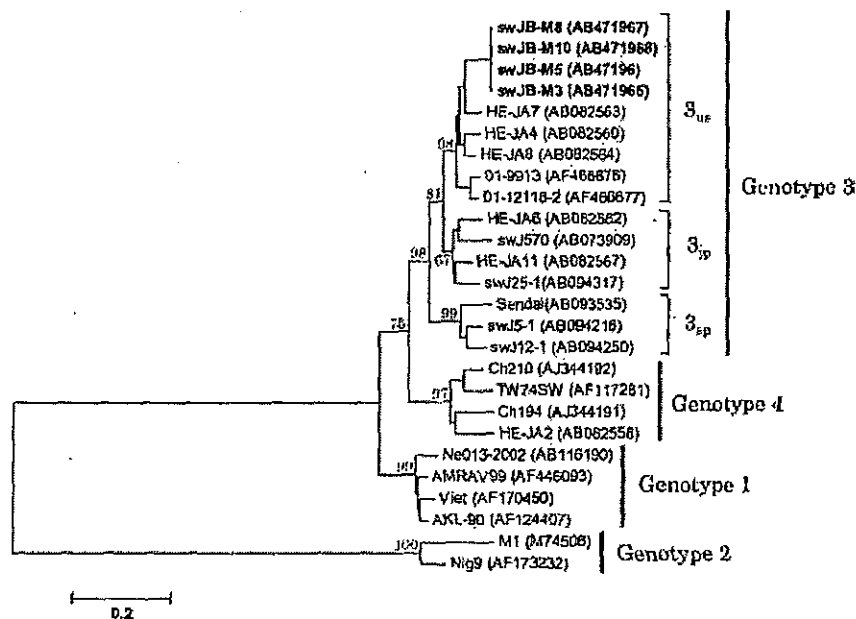


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of the ORF2 region of HEV (412 bp). Intra-genotypic classification of genotype 3 (3<sub>us</sub>, 3<sub>sp</sub>, and 3<sub>sp</sub>) was done according to a previous report [Takahashi et al., 2003]. HEV isolates obtained in this study (swJB-M3, -M5, -M8, and -M10) are indicated in bold letters. Prototype sequences of genotype 1, 2, 3, and 4 from GenBank are given with their accession numbers. Phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The bootstrap values (n = 1,000) are given for the major nodes.

maternal antibodies has not yet been determined [Meng et al., 1997; Kasorndorkbua et al., 2003]. In the present study, two litters of piglets—one with maternal antibodies and the other without—were studied to determine whether the presence of maternal antibodies affected HEV shedding. The results showed that virus shedding in feces occurred from days 30 to 110 in both litters, though a significant delay in the onset of both seroconversion and viremia was observed in the litter A piglets, which had maternal antibodies. Although serum IgG and IgA of litter B pigs were slightly reactive to the HEV antigen on day 1, as determined using ELISA, this reactivity was considered to be non-specific because of the presence of large quantities of maternal antibodies to various pathogens.

The similarity between the litters in terms of the kinetics of fecal virus shedding indicates that maternal antibodies do not protect piglets from primary HEV infections in the early days of their lives. Interestingly, another study has reported that maternal antibodies can have an immunosuppressive effect [Siegrist, 2003]. Although the immunological mechanisms responsible for such an adverse effect remain unclear, it is possible that in this study, maternal antibodies delayed the piglets' immune responses against HEV infection, causing the delay in seroconversion that was seen in the litter A piglets.

Since this study followed up domestic pigs raised under normal conditions, it was not obvious whether HEV infection in the two litters occurred under similar conditions. Therefore, it was difficult to determine the exact effect of maternal antibodies on the kinetics of HEV infection. Further studies are required to clarify the role of maternal antibodies.

In previous epidemiological studies, fecal and serum HEV RNA and serum antibodies have been used as markers of HEV infection [Meng et al., 1998; Cooper et al., 2005]. In the present study, fecal RT-PCR was far more sensitive than serum RNA testing in detecting HEV RNA. Indeed, all of the pigs shed high copy numbers of HEV RNA in feces for 70–80 days, whereas viremia appeared transiently the copy number of the RNA shed was low. In addition, viremia remained undetectable in three pigs. It is possible that the sampling schedule, particularly the 10-day intervals between sampling days, may have led to the low rate of serum RNA detection. Fecal RT-PCR, in contrast, does not appear to have the same limitations, and can be recommended as an indicator of current HEV infection based on early occurrence, high viral load, and long duration of HEV RNA in feces. It may prove especially useful in quarantine situations when pigs are introduced to another herd.

The reactivity of the modified TaqMan<sup>®</sup> probe used in this study, which was designed according to the sequence of HEV obtained from litter A pigs, to the present HEV suggested that all the pigs were infected with the same viral strain. The strain in question was found to belong to genotype 3<sub>us</sub>, which is related to the HEV strains found in humans and pigs in the USA. It is

one of the three clusters into which genotype 3 has been divided: the other two are 3<sub>sp</sub> and 3<sub>jp</sub> [Takahashi et al., 2003]. HEV genotypes 3 and 4, both of which have been reported in Japan [Takahashi et al., 2003], are considered to be zoonoses, causing hepatitis in humans; genotype 4 has been reported to cause a particularly severe form of hepatitis [Ohnishi et al., 2006]. Some phenotypic variations between genotypes 3 and 4 have been reported. Though the results of the present study contribute significantly to the understanding of the infection of HEV genotype 3 in pigs, further studies on genotype 4 and the other two sub-clusters of genotype 3 will be required to develop a conclusive strategy to control HEV infection in domestic pigs.

In this study, HEV RNA was detected in the liver, gall bladder, or lymph nodes of 3 of 13 pigs examined on day 200, that is, 3 months after the pigs had stopped shedding the virus. The prevalence of HEV RNA in pig livers at grocery stores in Japan and the USA has been reported as 2% and 11%, respectively [Yazaki et al., 2003; Feagins et al., 2007]. Furthermore, HEV isolated from pig livers at grocery stores in the USA was found to be infectious. This could create public health problems stemming from HEV contamination in slaughtered pigs, even if no HEV shedding is observed before slaughter. In addition, the long-term shedding of large amounts of virus, which was observed in this study, supports the idea that farm workers exposed to infected pigs could be infected directly because of a contaminated working environment [Zheng et al., 2006]. Controlling HEV infection on pig farms would therefore help decrease the likelihood of the disease being transmitted to people.

## CONCLUSIONS

To understand the time course of HEV infection in domestic pigs, pigs infected naturally with HEV genotype 3 were followed up from birth to slaughter age. These pigs shed HEV in feces when they were 30–110 days old, and developed viremia when they were 40–100 days old. Seroconversion of anti-HEV IgG and IgA antibodies occurred 20 days after the onset of viremia. HEV RNA in feces peaked at approximately 10<sup>6.0</sup> copies/g 10 days after the onset of fecal shedding. The kinetics of HEV infection seemed to be influenced by the presence of maternal antibodies. At day 200, 3 of 13 pigs (23%) still had detectable levels of HEV RNA in their livers, gall bladders, and/or lymph nodes, though they had stopped shedding the virus in feces. Although the amounts of HEV RNA in these tissues were low, the presence of HEV in the internal organs after the virus shedding has stopped could have important implications for the prevention of virus transmission to people through food. The time course of HEV infection revealed in this study will be very helpful in understanding the kinetics of HEV transmission from pigs to humans, and in developing a control strategy to prevent zoonotic HEV infection from pigs.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the swine handlers, Mitsutoshi Ueno and Takehiro Ueno, for their patient assistance with sampling. The technical assistance of Dr. Yuko Mori and Michiko Sato at Rakuno Gakuen University is also appreciated.

## REFERENCES

- Andries K, Pensaert MB, Vandeputte J. 1978. Effect of experimental infection with pseudorabies (Aujeszky's disease) virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows. *Am J Vet Res* 39:1282-1285.
- Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R, Widen F, Harrison TJ. 2004. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* 154:223-227.
- Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, Meng XJ. 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 43:1684-1688.
- Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. 2008. Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 8:698-709.
- de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarias M, Pina S, Martín M, Segalés J. 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 132:19-28.
- Emerson SU, Purcell RH. 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13:145-154.
- Escribà JM, Nakoune E, Recio C, Massamba PM, Matsika-Claquin MD, Gomba C, Rose AM, Nicand E, García E, Leklegban C, Koffi B. 2008. Hepatitis E, Central African Republic. *Emerg Infect Dis* 14:681-683.
- Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. 2007. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88:912-917.
- Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ. 2008. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J Med Virol* 80:1379-1386.
- Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Vega S, Gomez MT, Perez-Gracia MT. 2006. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 18:462-465.
- Hagiwara K, Iwabu Y, Kanai Y, Miyasho T, Daidoji T, Yunoki M, Tsujikawa M, Ohkubo Y, Yasue H, Ikuta K. 2007. Distribution and propagation of hepatitis E virus in experimentally infected swine. *Open Vet Sci J* 1:5-10.
- Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, Emerson SU, Toth TE, Meng XJ. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 39:918-923.
- Huang FF, Haqahenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 40:1326-1332.
- Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85:1609-1618.
- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shaif S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo CG. 2005. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: Demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 192:1166-1172.
- Jameel S. 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med* 1:1-16.
- Ji Y, Zhu Y, Liang J, Wei X, Yang X, Wang L, Li L, Chang Y, Tang R, Zhuang H. 2008. Swine hepatitis E virus in Rural Southern China: Genetic characterization and experimental infection in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Gastroenterol* 43:565-570.
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65-71.
- Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, Miller KD, Davey RT, Emerson SU. 2001. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J Gen Virol* 82:1687-1693.
- Kasorndorkbua C, Thacker BJ, Halbur PG, Guenette DK, Buitenwerf RM, Royer RL, Meng XJ. 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* 67:303-306.
- Lam WY, Chan RC, Sung JJ, Chan PK. 2009. Genotype distribution and sequence variation of hepatitis E virus, Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 15:792-794.
- Lewis HC, Boisson S, Ijaz S, Hewitt K, Ngui SL, Boxall E, Teo CG, Morgan D. 2008. Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis* 14:165-167.
- Lu L, Li C, Hagedorn CH. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16:5-36.
- Meng XJ. 2005. Hepatitis E virus: Cross-species infection and zoonotic risk. *Clin Microbiol Newslett* 27:43-48.
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9860-9865.
- Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72:9714-9721.
- Meng XJ, Dea S, Engle RE, Friendship R, Lyoo YS, Sirinarumit T, Urairong K, Wang D, Wong D, Zhang Y, Purcell RH, Emerson SU. 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 59:297-302.
- Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 40:3209-3218.
- Nishizawa T, Takahashi M, Mizuo H, Miyajima H, Gotanda Y, Okamoto H. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84:1245-1251.
- Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. 2006. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 36:301-307.
- Page RD. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357-358.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martín M. 2008. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 175:130-132.
- Siegrist CA. 2003. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: Review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine* 21:340-3412.
- Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M. 2008. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol* 24:599-604.
- Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. 2003. 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* 84:851-862.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.

- Wang Y, Zhang H, Ling R, Li H, Harrison TJ. 2000. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol* 81:1675-1686.
- Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, Jilg W, Stark K. 2008. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 198:1727-1728.
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. 2003. 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* 84:2351-2357.
- Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, Xia N, Jiang Q. 2006. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in Eastern China. *J Infect Dis* 193:1643-1649.