

Shuzo). A sequence spanning 821 nt in the RNA-dependent RNA polymerase region (corresponding to nt 3961–4781 of the prototype Burmese HEV strain; GenBank accession no. M73218), including the GDD motif, was amplified by PCR in three overlapping regions with 20-mer primers deduced from known HEV sequences. Reverse transcription was performed at 50 °C for 60 min with the Thermo-Script RT system (Invitrogen), and the first- and second-round PCRs were carried out in the presence of Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The final products were sequenced in an ABI 377 DNA sequencer (PE Biosystems) with an ABI Prism BigDye kit (Applied Biosystems). The sequences determined were utilized to confirm HEV genotypes and to construct phylogenetic trees. The reliability of the phylogenetic tree was assessed by bootstrap-resampling tests.

A reconstructed tree was built on the RNA polymerase region by using a heuristic maximum-likelihood (ML) topology search with stepwise addition and nearest neighbour-interchange algorithms. Tree likelihood scores were calculated by using the HKY85 model (Hasegawa *et al.*, 1985) with the molecular clock enforced, using PAUP version 4.0b8. Using the estimated topology, all possible root positions were evaluated under a single-rate dated-tips (SRDT) model with the computer software TipDate v1.2 and the root that yielded the highest likelihood was adopted (Rambaut, 2000). The program provided an ML estimate of the rate and also the associated date of the most recent common ancestor of the sequences, using a model that assumed a constant rate of nucleotide substitution. The molecular clock was tested by a likelihood-ratio test between the SRDT model and a general unconstrained branch-length model [different-rate (DR) model].

For estimates of demographic history, a non-parametric function $N(t)$, also known as a skyline plot, was obtained by transforming the coalescent intervals of an observed genealogy into a piecewise plot that represented an effective population size through time (Pybus *et al.*, 2001; Pybus & Rambaut, 2002). A parametric ML was estimated by several models with the computer software GENIE v3.5 to build a statistical framework for inferring the demographic history of a population on phylogenies reconstructed from sampled DNA sequences (Pybus & Rambaut, 2002). This model assumes a continuous epidemic process in which the viral transmission parameters remain constant through time. Model fitting was evaluated by likelihood-ratio tests of the parametric ML estimates (Lemey *et al.*, 2003; Pybus *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2005). Approximate 95% confidence intervals for the parameters were estimated by using the likelihood-ratio test statistics.

A phylogenetic tree in the partial RNA polymerase region of the HEV genome is represented in Fig. 1. A functional gene, such as the RNA polymerase gene, is suitable for molecular-evolutionary analyses based on the neutral theory, because the substitution of functional genes is based on the neutral theory. The 24 genotype 3 and 24 genotype 4 strains in Japan

showed a significant cluster with a high bootstrap value, which was the major Japanese cluster distinct from other strains found in foreign countries by molecular-evolutionary analyses. Such a significant cluster is suitable for the following coalescent analysis. Additionally, the tree topology based on the RNA polymerase region, including functional genes, was quite similar to that based on complete genomes (data not shown).

To determine the evolutionary rate of HEV, the 48 Japan-indigenous HEV strains (Fig. 1) were subjected to further molecular-evolutionary analyses. The molecular-evolutionary rate was estimated by two independent methods. In brief, linear-regression analyses using highly similar strains, i.e. six genotype 3 strains in Hyogo and four genotype 4 strains in Sapporo, indicated that a molecular-evolutionary rate was $(0.81–0.88) \times 10^{-3}$ nucleotide substitutions per site per year (Fig. 2). Second, TipDate (v1.2) was used to compare the DR model with the single-rate (SR) and SRDT models. The SRDT model provided an adequate fit to the data ($P > 0.05$; see Supplementary Table S1, available in JGV Online). Based on the SRDT model, the mean rate of nucleotide substitutions was estimated to be $(0.81–0.94) \times 10^{-3}$ nucleotide

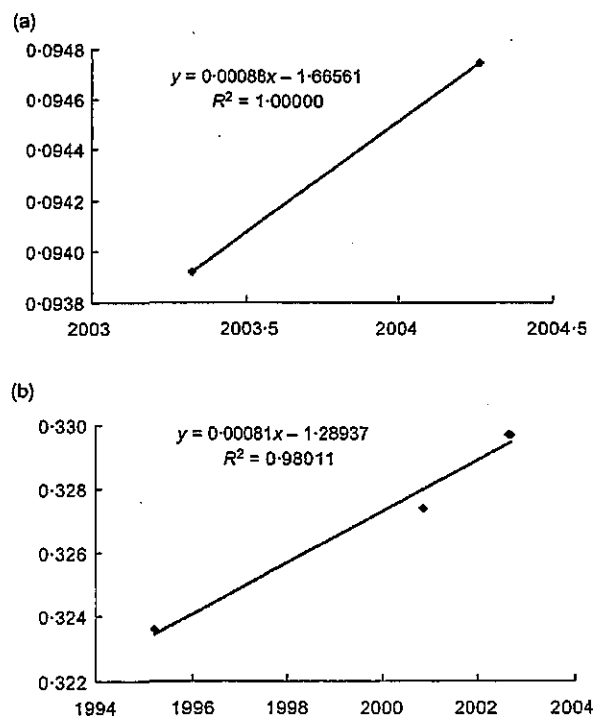


Fig. 2. Linear-regression analyses within the partial RNA polymerase region for evolutionary rate of HEV. (a) The evolutionary rate of genotype 3 in the Hyogo cluster is estimated to be 0.88×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year; (b) the evolutionary rate of genotype 4 in the Sapporo cluster is estimated to be 0.81×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year.

substitutions per site per year, which was similar to the rate for *Hepatitis C virus* (Ina *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2002). When we used 0.84×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year, which was based on all 48 sequences (24 genotype 3 and 24 genotype 4), the time of the most recent common ancestor of Japan-indigenous genotype 3 was estimated to be in the 1900s (95% confidence interval, 1902–1917) and that of genotype 4 was approximately in the 1880s (1881–1898) (Fig. 1).

Based on the phylogenetic tree, the effective number of HEV infections through time, $N(t)$, was analysed by using a skyline plot for the Japan-indigenous HEV strains. The parameters for several models in GENIE v3.5 were examined (see Supplementary Table S2, available in JGV Online). Time t was then transformed to year by using the constant rate (0.84×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year), assuming the collecting time to be the present. Fig. 3 shows the skyline plots and population growth for the HEV strains, according to a specific demographic model in GENIE v3.5 with three parameters and a piecewise-expansion growth model, which was evaluated by likelihood-ratio testing (Ina *et al.*, 1994; Lemey *et al.*, 2003; Pybus *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2005). Our estimates of the effective numbers of HEV infections showed a transition from constant size to exponential growth in the 1920s (95% confidence interval, 1916–1930) among the genotype 3 population (Fig. 3a), whereas the rapid exponential growth among the genotype 4 population was dated in the 1980s (1978–1990) (Fig. 3b).

Because the natural course of HEV infection in human beings and animals is usually transient, not persistent as in the cases of hepatitis B and C viruses, it is almost impossible to estimate the molecular-evolutionary rate of HEV by using serial samples from an individual host. However, even though HEV does not persist in individual hosts, it could persist in the community by hopping from host to host successively. The first study attempting to estimate the number of synonymous mutations per synonymous site (k_s) of *Hepatitis A virus* (HAV) was reported by Sánchez *et al.* (2003). The estimated k_s values from HAV strains isolated from a clam-associated outbreak varied from 0.038 for VP0 to 0.29 for VP1. Similarly, we estimated the evolutionary rate of HEV by using Japan-indigenous genotype 3 and genotype 4 strains isolated over time. The rate was estimated to be approximately 0.8×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year by two independent methods, which was around half of our previously estimated rate (Takahashi *et al.*, 2004b). One of the reasons is that the molecular-evolutionary rate would depend on estimated genes; the previous report (Takahashi *et al.*, 2004b) used complete sequences, whereas this study used only RNA polymerase sequences. Another reason is that the previous extrapolation of substitution rate on pairwise (direct) comparisons can give overestimates of the molecular clock and hence divergent times of HEV species, as reported previously (Ina *et al.*, 1994). Based on the molecular clock, we traced the demographic history of HEV in Japan and the indigenization time

was suggested to be similar (approx. 1900), but the spread time was quite different, between HEV genotypes 3 and 4 (1920s versus 1980s). Interestingly, in addition, the evolutionary growth of genotype 3 has been quite slow since the 1920s, whereas genotype 4 strains have spread rapidly in Sapporo since the 1980s.

Zoonosis has been implicated in HEV transmission. The first animal strain of HEV to be isolated and characterized was a swine HEV from a pig in the USA in 1997 (Meng *et al.*, 1997). Since then, many swine HEV strains, which exhibit extensive genetic heterogeneity, have been identified worldwide and shown to be genetically related closely to strains of human HEV (Chandler *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Recent findings suggested an interspecies HEV transmission between boar and deer in their wild life (Takahashi *et al.*, 2004a) and that both animals might serve as an infection source for human beings. More recently, wild mongoose was newly added to the list of HEV-reservoir animals in Japan

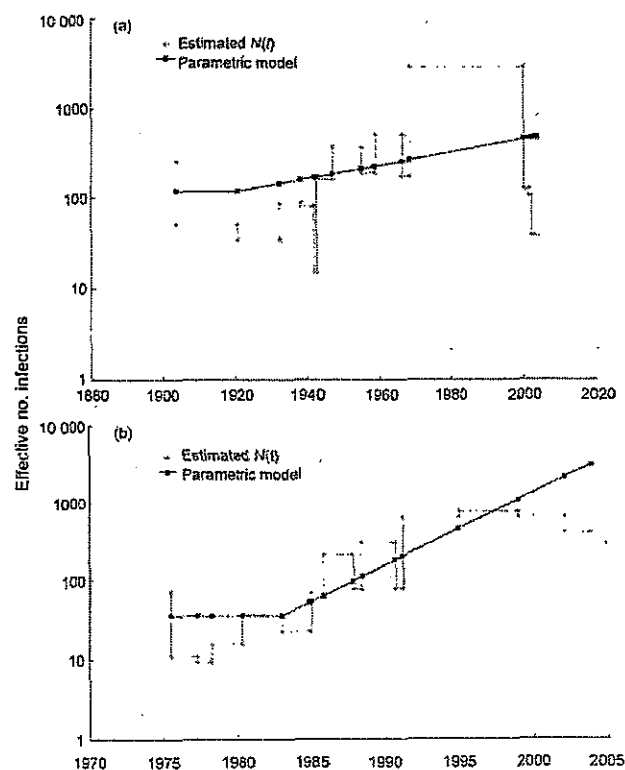


Fig. 3. ML estimates of $N(t)$ on the effective number of (a) HEV genotype 3 and (b) HEV genotype 4 infections in Japan. The parametric model is indicated by the black line and stepwise plots by the grey line, which represents corresponding non-parametric estimates of $N(t)$ (number as a function of time). Genetic distances have been transformed into a time scale of years by using estimates of the molecular clock in the partial RNA polymerase region of HEV.

(Nakamura *et al.*, 2006). Notwithstanding the importance of these wild animals, pigs for food must be the major reservoirs of HEV: a recent Japanese study indicated that anti-HEV antibodies were detected in 1448 (58%) of 2500 pigs from 2 to 6 months of age at 25 commercial swine farms in Japan (Takahashi *et al.*, 2003). The importance of transmission of HEV from pigs to humans was further supported by a recent field study in Indonesia: Muslim people, for whom it is a taboo to eat or contact pigs, were significantly less frequently positive for anti-HEV than Hindu people (2.0 vs 20%) (Surya *et al.*, 2005).

Our molecular-evolutionary analyses suggested that HEV entered Japan around 1900. If we have traced the origin of Japan-indigenous HEV correctly back to about 100 years ago, what happened at that time in relevance to HEV's indigenization? Several kinds of Yorkshire pig were imported for the first time in the history of Japan from the UK in 1900, by the Japanese government's policy to introduce excellent domestic animals for food in Western countries to Japan, as a measure to nutritionally strengthen the people (especially soldiers) of this formerly vegetarian country. Since then, the Yorkshire pigs have been propagated in Japan and, in the 1930s, thousands of pigs were reported all over Japan (<http://okayama.lin.go.jp/history/2-3-1-2.htm>), suggesting that the domestic spread of HEV might have been associated with the popularization of pigs for food in Japan. Indeed, a previous phylogenetic analysis of a 304 bp nucleotide sequence (ORF2) obtained from the two UK swine strains showed a close relationship with Japanese swine strains in genotype 3 (Banks *et al.*, 2004), indicating that Japanese genotype 3 may have been imported from the UK. On the other hand, Japanese genotype 4 strains were related phylogenetically to Asian strains in Taiwan and China. As the HEV found in wild boars living in the Iriomote Island, near Taiwan, was of genotype 4 (unpublished results), the source of Japanese genotype 4 might be from Taiwan or the mainland of China. Note that a phylogenetic analysis showed that the Japanese swine and human HEV strains segregated into four clusters [three genotype 3 clusters (one major Japanese and two minor clusters) and one genotype 4 cluster], with the highest nucleotide identity being 94.4–100% between swine and human strains in each cluster (Takahashi *et al.*, 2003), suggesting that swine have served as one of the most important reservoirs for HEV to be transmitted to humans. The possible risk factor for transmission of HEV was to have eaten uncooked or undercooked pig liver and/or intestine 1–2 months before the onset of hepatitis E in Hokkaido, Japan (Mizuo *et al.*, 2005). Such eating habits, which are particularly unique to those living in Hokkaido (Sapporo is one of the big cities there) in recent decades, might be one of the reasons that HEV has been widespread in this area since 1990, as supported by our molecular-evolutionary analyses in this study.

In conclusion, based on our present data, the indigenization and domestic spread of HEV in Japan are proposed to have been associated with the importation and popularization of

pigs for food in Japan. However, there still remains a possibility of different scenarios. Another animal(s) might have carried the virus to Japan: for example, mongoose was imported from India to Japan in 1910 (Nakamura *et al.*, 2006).

Acknowledgements

Contributions of authors are as follows: Y. T. performed molecular-clock analyses and wrote the manuscript; K. T. amplified and sequenced viral isolates; E. O. helped Y. T. with the molecular-clock analyses; Y. K., J.-H. K., K. S., A. M., A. H., H. M., H. S., Y. A. and T. K. provided HEV RNA-positive sera to K. T. for sequence determinations; M. M. supervised the molecular-clock analyses; and S. M. designed the study and helped Y. T. to write the manuscript. This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (200400676A) and from the United States–Japan Collaborative Medical Science Program (Hepatitis Panel). We greatly appreciate Dr Oliver G. Pybus (Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK) for his enlightening advice on molecular-evolutionary analyses using GENIE v3.5.

References

- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J. & Dalton, H. (2004). Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10, 953–955.
- Chandler, J. D., Riddell, M. A., Li, F., Love, R. J. & Anderson, D. A. (1999). Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 68, 95–105.
- Harrison, T. J. (1999). Hepatitis E virus – an update. *Liver* 19, 171–176.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22, 160–174.
- Hsieh, S.-Y., Meng, X.-J., Wu, Y.-H., Liu, S.-T., Tam, A. W., Lin, D.-Y. & Liaw, Y.-F. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37, 3828–3834.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (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.
- Ina, Y., Mizokami, M., Ohba, K. & Gojobori, T. (1994). Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38, 50–56.
- Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J. B., Elm, J. & 7 other authors (1999). Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 61, 331–335.
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M. & Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6588–6592.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. & Mishiro, S. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188, 944.
- Meng, X.-J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9860–9865.

- Meng, X.-J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714–9721.
- Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U. & Purcell, R. H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40, 117–122.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2005). Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76, 341–349.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M. & Mishiro, S. (2006). Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* (in press).
- 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.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U. & Yoshikawa, A. (2001). Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 929–936.
- Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2001). Hepatitis E virus. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 3051–3061. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pybus, O. G. & Rambaut, A. (2002). GENIE: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics* 18, 1404–1405.
- Pybus, O. G., Charleston, M. A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E. C. & Harvey, P. H. (2001). The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 292, 2323–2325.
- Pybus, O. G., Drummond, A. J., Nakano, T., Robertson, B. H. & Rambaut, A. (2003). The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 20, 381–387.
- Rambaut, A. (2000). Estimating the rate of molecular evolution: incorporating non-contemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. *Bioinformatics* 16, 395–399.
- Sánchez, G., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2003). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol* 77, 452–459.
- Surya, I. G. P., Kornia, K., Suwardewa, T. G. A., Mulyanto Tsuda, F. & Mishiro, S. (2005). Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 75, 499–503.
- 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.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N. & Mishiro, S. (2004a). 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* 330, 501–505.
- Takahashi, K., Toyota, J., Karino, Y., Kang, J.-H., Maekubo, H., Abe, N. & Mishiro, S. (2004b). Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 29, 212–215.
- Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., Inoue, O., Mawatari, F. & Ishibashi, H. (2004). Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40, 869–870.
- Tanaka, Y., Hanada, K., Mizokami, M., Yeo, A. E. T., Shih, J. W.-K., Gojobori, T. & Alter, H. J. (2002). A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15584–15589.
- Tanaka, Y., Hanada, K., Orito, E. & 8 other authors (2005). Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan. *J Hepatol* 42, 47–53.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Wang, Y.-C., Zhang, H.-Y., Xia, N.-S. & 11 other authors (2002). Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 67, 516–521.
- 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.

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 2006年5月8日	新医薬品等の区分 該当なし	厚生労働省処理欄
一般的名称	人ハプトグロビン		研究報告の 公表状況	肝臓 2006; 47 (Supplement 1):A168	公表国 日本	
販売名 (企業名)	ハプトグロビン注-ヨシトミ(ベネシス)					
研究報告の概要	<p><目的> E型肝炎ウイルス(HEV)は主として経口感染するが、最近 HEV の血液感染が問題となっている。今回われわれは血液感染のハイリスクグループである血友病患者における HEV 抗体の陽性頻度を検討した。</p> <p>【対象と方法】 名古屋大学病院に通院中の血友病患者 80 例(男性 79 例:女性 1 例、血友病 A61 例:血友病 B19 例、年齢 39.0±14.4 歳)について検討した。HEV 抗体は Li らの方法(JMedVirol2000;62:327-33)にて測定した。また全例において A 型肝炎ウイルス(HAV)抗体・HBs 抗原・HBs 抗体・HBc 抗体・HCV RNA・HIV RNA を、48 例において GBV-C RNA を測定し、これらのウイルス/抗体の陽性率を HEV 抗体陽性例と陰性例とで比較した。</p> <p><結果> HEV 抗体は 13 例(16.3%)で陽性であった。患者年齢は HEV 抗体陽性例で 46.9±17.9 歳、HEV 抗体陰性例で 37.4±13.1 歳であり、陽性例の方が高かった(p=0.0346)。HEV 抗体陽性例/陰性例とで他のウイルスの状況を比較すると、HAV 抗体陽性例は 6 例(46.2%)/22.4%、HBsAg 陽性例は 1 例(7.7%)/0、HBsAb 陽性例は 8 例(61.5%)/40 例(59.7%)、HBcAb 陽性例は 10 例(76.9%)/52 例(77.6%)、HCV RNA 陽性例は 13 例(100%)/63 例(94.2%)、HIV RNA は 5 例(38.5%)/27 例(40.3%)、GBV-C RNA は 4 例(44.4%)/12 例(30.8%)であり、これらはいずれも HEV 抗体陽性例と陰性例との間で差を認めなかった。</p> <p><考察> 過去の研究では日本人の供血者における HEV 抗体の陽性率は 3.7%、透析患者では 9.4%と報告されている。今回の検討ではこれらのグループよりも血液感染のリスクが高いと考えられる血友病患者において 16.3%とより高い陽性率が認められ、血友病患者における HEV の血液感染の可能性が示唆された。一方、HEV 抗体陽性例と陰性例他のウイルスマーカーの陽性率には差は見られなかったが、HEV 抗体陽性例で年齢が高く、血液製剤による HEV 伝播の時期を示唆する可能性が考えられた。</p>				<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</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-1 抗体陰性で、かつ ALT(GPT)値でスクリーニングを実施している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査(NAT)を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分から人ハプトグロビンを濃縮・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濾過膜処理(ナノフィルトレーション)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>供血者に比べて、血友病患者の HEV 抗体陽性率が高く、血友病患者における HEV の血液感染の可能性が示唆されたとする報告である。従来、血友病患者における HEV 感染状況については、弊社の知る限りにおいて、イタリアの血友病患者 60 人において抗 HEV 抗体陽性率はゼロであったとする報告 (Lancet, 1994, 343, 597-598) のみであった。本報告は、血漿分画製剤からの HEV 伝播を示唆する初めての報告と思われ、今後同様の情報に注視する必要があると考える。</p>				<p>今後、同様の情報入手に努める。</p>		

P-9 血友病患者における E 型肝炎ウイルス抗体の頻度

岩田浩史¹, 片野義明¹, 葛谷貞二¹, 石黒裕規¹, 村山 睦¹, 仲島さより¹, 竹田泰史¹, 西野正路¹, 森井正哉¹, 本多 隆¹, 林 和彦¹, 石上雅敏¹, 中野 功¹, 豊田秀徳², 熊田 卓², 高松純樹², 後藤秀実¹

名古屋大学付属病院消化器内科¹, 大垣市民病院消化器科², 名古屋大学付属病院輸血部³

【目的】E 型肝炎ウイルス (HEV) は主として経口感染するが, 最近 HEV の血液感染が問題となっている。今回われわれは血液感染のハイリスクグループである血友病患者における HEV 抗体の陽性頻度を検討した。

【対象と方法】名古屋大学病院に通院中の血友病患者 80 例 (男性 79 例: 女性 1 例, 血友病 A61 例: 血友病 B19 例, 年齢 39.0 ± 14.4 歳) について検討した。HEV 抗体は Li らの方法 (J Med Virol 2000; 62: 327-33) にて測定した。また全例において A 型肝炎ウイルス (HAV) 抗体・HBs 抗原・HBs 抗体・HBc 抗体・HCV RNA・HIV RNA を, 48 例において GBV-C RNA を測定し, これらのウイルス/抗体の陽性率を HEV 抗体陽性例と陰性例とで比較した。

【結果】HEV 抗体は 13 例 (16.3%) で陽性であった。患者年齢は HEV 抗体陽性例で 46.9 ± 17.9 歳, HEV 抗体陰性例で 37.4 ± 13.1 歳であり, 陽性例の方が高かった ($p = 0.0346$)。HEV 抗体陽性例/陰性例とで他のウイルスの状況を比較すると, HAV 抗体陽性例は 6 例 (46.2%) / 22.4%, HBsAg 陽性例は 1 例 (7.7%) / 0, HBsAb 陽性例は 8 例 (61.5%) / 40 例 (59.7%), HBcAb 陽性例は 10 例 (76.9%) / 52 例 (77.6%), HCV RNA 陽性例は 13 例 (100%) / 63 例 (94.2%), HIV RNA は 5 例 (38.5%) / 27 例 (40.3%), GBV-C RNA は 4 例 (44.4%) / 12 例 (30.8%) であり, これらはいずれも HEV 抗体陽性例と陰性例との間で差を認めなかった。

【考察】過去の研究では日本人の供血者における HEV 抗体の陽性率は 3.7%, 透析患者では 9.4% と報告されている。今回の検討ではこれらのグループよりも血液感染のリスクが高いと考えられる血友病患者において 16.3% とより高い陽性率が認められ, 血友病患者における HEV の血液感染の可能性が示唆された。一方, HEV 抗体陽性例と陰性例他のウイルスマーカーの陽性率には差は見られなかったが, HEV 抗体陽性例で年齢が高く, 血液製剤による HEV 伝播の時期を示唆する可能性が考えられた。

P-10 わが国の劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の現状

小池雅美¹, 稲生実枝¹, 松井 淳¹, 内木佳代子¹, 中山伸朗¹, 名越澄子¹, 三代俊治², 藤原研司², 持田 智¹

埼玉医科大学消化器内科・肝臓内科¹, 東芝病院研究部², 横浜労災病院³

【目的】国内固有の HEV 株による急性肝疾患が注目されている。厚生労働省「難治性の肝疾患に関する研究」班が実施している劇症肝炎の全国集計でも, 2001 年の発症例では E 型症例が登録された。今後, HEV-RNA の測定が普及すると, 成因不明例の中から E 型症例が抽出される可能性がある。そこで, 全国集計に登録された症例を対象に, 血清 HEV-RNA の測定に関する実態を明らかにする目的でアンケート調査を実施し, 未測定と回答のあった症例では保存血清を回収して HEV-RNA を測定した。

【方法と成績】(1) 劇症肝炎, LOHF でウイルス感染が明らかでない症例の比率は, 2001 年 50% (54/108), 2002 年 54% (69/127), 2003 年 50% (47/94) であった。これら症例の中で, 血清 HEV-RNA が測定されていたのは, 2001 年 2% (1/54), 2002 年 17% (12/69), 2003 年 28% (13/47) であり, 陽性であったのは 2001 年 1 例, 2002 年 2 例の計 3 例で, 何れも北海道からの登録例であった。IgM-HEV の測定も含めると, 2003 年はウイルス感染の明らかでない症例の 40% (19/47) で HEV に関する検索が実施されていたが, 陽性例は認められなかった。(2) 保存血清は 2001-2002 年の症例は計 47 例 (38%), 2003 年 29 例 (62%) で回収された。これらのうち, HEV-RNA は 2001 年に北海道から登録された劇症肝炎 1 例で陽性であった。単離した HEV 株は genotype IV で, 全長塩基配列を解析したところ, 約 6 ヶ月前に北海道で発症した急性肝炎重症型症例から検出された株と 99.6% の相同性が認められた。

【考察と結語】劇症肝炎, LOHF の成因診断では, HEV に関する検索が普及しつつあるが, E 型症例は北海道を除くと稀と考えられる。また, 保存血清から単離された HEV 株は劇症化に関わる株である可能性があり, その特徴について更なる検討が必要である。

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 2006年5月15日	新医薬品等の区分 該当なし	厚生労働省処理欄
一般の名称	人ハプトグロビン		研究報告の 公表状況	日本輸血学会誌 2006;52(2):231	公表国 日本	
販売名 (企業名)	ハプトグロビン注-ヨシトミ(ベネシス)					
研究報告の概要	<p><目的> 北海道地区は HEV 陽性率が高く、輸血感染例も 2 例発生しており、HEV 浸淫地区と考えられている。そこで、同地区において試験研究的に献血時に HEV 関連問診を追加するとともに、HEV NAT スクリーニングを実施し、問診の有効性と HEV 感染の実態を調査した。</p> <p><対象> 問診対象者：2004 年 11 月～2005 年 9 月に道内で献血した全献血者約 27 万人 スクリーニング対象者：2005 年 1～9 月に道内で献血した全献血者約 22 万人</p> <p><方法> 問診は、献血時に「3 ヶ月以内に豚、鹿、猪、あるいは動物種が不明の生肉、生レバーを食べたか」の HEV 問診を実施し、該当献血者に HEV NAT を実施した。 HEV NAT スクリーニングは、現行スクリーニング NAT 使用済み検体（20 本プール）を用いて行い、HEV NAT 陽性例については続いて HEV 抗体測定、HEV RNA 定量、遺伝子解析を行った。また、感染経路を調査する目的で喫食歴に関するアンケート調査を行った。</p> <p><結果> HEV 問診に該当したのは 765 名（0.3%）で、その内の 1 名（0.1%）に HEV RNA が認められた。 HEV NAT スクリーニング陽性者は 20 名（男性 13 名、女性 7 名、HEV 問診該当者 1 名を含む）で、陽性率は 1/11,090（男性 1/10,180、女性 1/12,778）であった。陽性者の多くは ALT 値が正常で HEV 抗体は陰性であった。 陽性血から分離された HEV の遺伝型は 3 型 19 例、4 型 1 例であった。HEV 問診に該当しなかった陽性者 19 例に再度問い合わせたところ、14 例中 13 例が献血前に動物内臓肉を食していた。陽性血 4 例は結果判明前に血小板製剤が輸血に使用され、1 名は輸血感染が成立して E 型肝炎を発症し、1 名は未感染、2 名は感染未確認のまま原疾患で死亡した。</p> <p><考察> 北海道内の献血者の HEV RNA 陽性率は予想以上に高く喫食歴問診や抗体スクリーニングは HEV RNA 陽性者の排除には有効ではないと考えられたことから、HEV NAT スクリーニングによる検査体制の構築が必要と考えられる。</p>					<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</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-1 抗体陰性で、かつ ALT(GPT)値でスクリーニングを実施している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査(NAT)を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分から人ハプトグロビンを濃縮・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濾過膜処理(ナノフィルトレーション)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>北海道内の献血者の HEV RNA 陽性率は予想以上に高く、喫食歴問診や抗体スクリーニングは HEV RNA 陽性者の排除には有効ではないと考えられたことから、HEV NAT スクリーニングによる検査体制の構築が必要と考えられるとの報告である。 万一原料血漿に HEV が混入したとしても、EMC 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、本剤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>	



0-9 Multiple hit model を用いた生体内血小板寿命の測定

福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部¹⁾, 川澄化学工業株式会社医薬品医療機器部²⁾
菅野隆浩¹⁾, 江月将史^{1,2)}, 川畑絹代¹⁾, 尾形 隆¹⁾, 池田和彦¹⁾, 大戸 斉¹⁾
TEL: 024-547-1536 FAX: 024-549-3126 E-mail: btkanno@fmu.ac.jp

【はじめに】血小板製剤の機能評価は、*in vitro* の状態だけでなく、生体内で血小板がどの程度生存するかという *in vivo* 試験が欠かせない。そのためには、血小板を放射性同位元素で標識したあと生体へ返血し、その生体内での消失度を評価する必要がある。今回はその第一ステップとして AuBuchon らが用いている (Transfusion, 2005, 45, 1143-1150) multiple hit model による血小板機能の評価をおこなった。

【方法】健康人ボランティア男性2名において、全血採血によって新鮮血小板を分離した。この血小板に¹¹¹In オキシシン液にて、室温で20分間 incubate することによって¹¹¹In をラベリングした後、20μCi を被験者へ直ちに返血した。採血後1日から7日までの毎日と、10日目に採血し、¹¹¹In の放射活性を測定した。得られたデータを COST とよばれるプログラムへ入力し、multiple hit mode で血小板の%recovery と survival time を計算した。

【結果】得られた%Recovery はそれぞれ61, 91%であった。また survival time は125, 179hourであった。

【まとめ】今回、multiple hit model による *in vivo* での血小板機能評価を行うことができた。今後、この手法を用いて、長期保存血小板の機能評価を行う。

0-10 北海道地区における試行的 HEV プール NAT スクリーニングの実施

北海道赤十字血液センター検査部¹⁾, 日本赤十字社血液事業本部²⁾
松林圭二¹⁾, 坂田秀勝¹⁾, 徳島恵里奈¹⁾, 田中聖子¹⁾, 佐藤進一郎¹⁾, 加藤俊明¹⁾, 池田久實¹⁾, 金光公浩¹⁾
TEL: 011-613-6634 FAX: 011-613-6221 E-mail: kmatsu@hokkaido.bc.jrc.or.jp

【目的】北海道は HEV 陽性率が高く、輸血感染例も2例発生しており、HEV 浸淫地区と考えられている。そこで、同地区において試験研究的に献血時に HEV 関連問診を追加するとともに、HEV NAT スクリーニングを実施し、問診の有効性と HEV 感染の実態を調査した。

【対象】問診対象者は2004年11月～2005年9月に道内で献血した全献血者(約27万名)で、スクリーニング対象者は2005年1月～9月に道内で献血した全献血者(約22万名)である。

【方法】問診は献血時に「3ヶ月以内に豚、鹿、猪、あるいは動物種が不明の生肉、生レバーを食べたか」(HEV 問診)を質問し、該当献血者については HEV NAT を実施した。HEV NAT スクリーニングは、現行スクリーニング NAT 使用済み検体(20本プール)を用いて、Qiagen BioRobot 9604 で核酸抽出を行い、リアルタイム RT-PCR 法により検査した。HEV RNA 陽性例については HEV 抗体測定、HEV RNA 定量、遺伝子解析を行った。また、感染経路を調査する目的で喫食歴に関するアンケート調査を行った。

【結果】HEV 問診には765名(0.3%)が該当し、そのうち1名(0.1%)に HEV RNA が認められた。HEV NAT スクリーニング陽性者は20名(男性13名、女性7名、HEV 問診該当1名も含む)で、陽性率は1/11,090(男性1/10,180、女性1/12,778)となった。陽性者の多くは ALT 値が正常で HEV 抗体は陰性であった。陽性血から分離された HEV の遺伝子型は3型19例、4型1例であった。HEV 問診に該当しなかった陽性者19例に再度問い合わせたところ、14名中13名が献血前に動物内臓肉を食していた。陽性血4例は結果判明前に血小板製剤が輸血に使用され、1名は輸血感染が成立して E 型肝炎を発症し、1名は未感染、2名は感染未確認のまま原疾患で死亡した。

【考察】北海道内における献血者の HEV RNA 陽性率は予想以上に高く、喫食歴問診や抗体スクリーニングは HEV RNA 陽性者の排除に有効ではないと考えられたことから、HEV NAT スクリーニングによる検査体制の構築が必要と考えられる。