

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

### 1.5 ネステッド PCR 法を用いた HEV RNA の検出

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

## 2 結果

### 2.1. SHBV 検査

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

2.1.2 PCR 生成物のシーケンシング結果 SHBV\_bj1、SHBV\_bj2 の各断片に対するシーケンシングを行った結果、すべての増幅領域および GenBank 中における HBV ウイルス株の相同性は 100%に達することが明らかになった。両断片の序列はわずかに 519、520 位の塩基に差異が認められるのみであった(図 2 を参照のこと)。

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

### 2.2 HEV の RT-PCR による増幅

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

### 3 考察

#### 3.1 ブタの B 型肝炎ウイルスについて

動物の B 型肝炎ウイルスの検出については中国においても複数の報告がされているが、食肉処理したブタ体内の B 型肝炎ウイルスの検出に関する報告は稀有なケースである<sup>(15)</sup>。本試験では既存の研究を基礎としつつ、PCR 技術および透過電子顕微鏡技術を応用し、食肉処理したブタの血清および肝臓中の HBV 抗原に対する検査を行った。電子顕微鏡を用いてネガティブ染色サンプルを観察した結果、ELISA 法にて HBV の表現抗原に強陽性を示す血清サンプルに、ヒト HBV の Dane 粒子および小球状粒子に形態およびサイズの類似するウイルス粒子の存在が認められた。ヒト HBV キャリアの血清中においては、通常、小球状粒子が多数を占め、Dane 粒子は少数であるが、本試験では電子顕微鏡による観察を行ったネガティブ染色サンプル中に数多くの Dane 粒子が存在する結果となった(図 3 を参照のこと)。

現在、海外において禽獣の HBV に関する報告はなく、中国においては HBV 検査試薬を用いた血清マーカーおよび関連抗原の検査、ならびにウイルスの形態および遺伝子の S 領域などに対する研究に従事する研究者は存在するものの、動物の HBV に対する分子ウイルス学およびその病原性に関する研究、ヒトの HBV との関連性に関する研究は非常に少ない。本試験において HBV S 領域のプライマーを用いてブタの血清および肝臓中より予測断片を検出し、シーケンシング分析を行った結果、HBV の相同性は実に 98~100%に達することが明らかになった。本試験において検出を行った断片の占める割合は HBV 全遺伝子の約 9%に過ぎないが、少なくとも一定レベルにおいてブタ HBV とヒト HBV が高い相同性を有することを証明した。

一般的には、禽獣の B 型肝炎ウイルスはヒトに対する病原性を持たないと認識されているが、動物に対する病原性の有無、ならびに食肉および食肉加工製品を介して人体に摂取された後にこれに対する免疫反応を引き起こす可能性の有無については、現在もなお不明である。中国には 1.2 億人の B 型肝炎キャリアが存在すると見られ、この高い感染率に禽獣の B 型肝炎ウイルスが何らかの関連を持つか否かについては、今後さらに研究を進める価値がある。

HBV は現在においても体外での培養が不可能であり、また宿主領域が極めて狭いことから、適切な小型動物を動物モデルとした病原、発症機序、ワクチンおよび治療薬に対する研究はなく、さらに倫理的な理由からヒトを除く霊長類動物モデルの使用は制限を受ける<sup>(1)</sup>。禽獣の B 型肝炎の発見は、肝向性ウイルス学に新たな研究対象を追加するのみならず、肝向性ウイルスの起源、進化、持続感染、発症機序、慢性ウイルス性肝細胞ガンの起源など各方面の研究に新たな研究対象を提供する。

#### 3.2 E 型肝炎について

多数の研究を通じ、HE は人畜共通感染症であること、経口感染すること、またブタが重要なウイルスキャリアであることが明らかになった。日本、インドなどでは加

熱不十分な食用ブタレバーおよびブタ肉の摂取による HEV 感染が報告されている。日本、米国の研究においてはブタと接触する職業に従事する人員群の血清抗 HEV 抗体はその他職業に従事する人員群よりも高く、また養豚場周辺の汚水中から HEV が検出されたことも明らかになった<sup>(16~18)</sup>。曹海俊<sup>(19)</sup>らが、浙江地域においてブタの食肉処理および販売に従事する人員群の HEV 感染状況について調査を行った結果、浙江省にてブタの食肉処理および販売に従事する人員群の 77.25% が HEV 陽性であり、1992 年に全国 13 省および市において実施された HE 血清流行病調査中の 1~59 歳人口に占める陽性率(17.2%)をはるかに上回ることが明らかになった。さらに別の報告では、中国の月齢 4 ヶ月以上のブタにおける血清抗体陽性率の平均が 40% にのぼり、ブタの飼育者の血清抗体陽性率に至っては 100% に達することも明らかになっている。その他タイでは、月齢 3 ヶ月以上のブタにおける陽性率が 9~20% に達し、ブタの飼育者の陽性率は 71% にのぼる。上記の研究結果は、ヒトの HE 陽性検出率とブタに接触する職業への従事者の間に一定の関連性があること、ならびに HE は人畜相互間の感染症であることを証明するものである。

かつて Meng<sup>(20)</sup>は異なる月齢のブタ血清から HEV RNA の検出を行ったが、中国内外において食肉処理したブタの肝臓から HEV RNA の検出を行ったという報告はない。本試験では RT-PCR 法を用いて食肉処理したブタ肝臓中の HEV RNA の増幅を行った結果、食肉処理したブタの肝臓中にも HEV RNA の存在が確認された。本試験室における過去の研究において食肉処理したブタ肝臓中の HEV に関連を有する抗原の陽性検出率が 95~100% と高率にのぼることが明らかになり、また食肉処理したブタが精肉製品生産網の末端に組み込まれていることを考慮すると、公衆衛生の見地からも、この問題は決して放置できない問題である。現在のところ、ブタの生肉中より HEV が検出されたという報告はなされていないものの、肝臓中の HEV に関連する抗原の陽性検出率が上記のように高いことが、人体の健康に対する潜在的な脅威となることは確実である。以上より、筆者は食肉処理したブタの検疫において HEV を検査項目として採用することを提案する。



## 医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2008. 8. 18	新医薬品等の区分 該当なし	機構処理欄
一般的名称	新鮮凍結人血漿	研究報告の公表状況	Girou E, Chevaliez S, Challine D, Thiessart M, Morice Y, Lesprit P, Tkoub-Scheirlinck L, Soing-Altrach S, Cizeau F, Cavin C, André M, Dahmanne D, Lang P, Pawlotsky JM. Clin Infect Dis. 2008 Sep 1;47(5):627-33.	公表国	
販売名(企業名)	新鮮凍結血漿「日赤」(日本赤十字社) 新鮮凍結血漿-LR「日赤」(日本赤十字社)			フランス	
研究報告の概要	<p>○環境汚染および標準的予防法の非遵守が血液透析装置のC型肝炎感染リスクに及ぼす影響</p> <p>背景:C型肝炎ウイルス(HCV)感染症の原因の第2位は院内感染である。環境汚染および血液透析装置のHCV交差感染を予防する標準的予防法の非遵守が院内感染に及ぼす影響を検討するため、前向き観察試験を実施した。</p> <p>方法:フランスの大学病院において長期血液透析を受けている患者を系統的にスクリーニングし、HCV散発感染症例2例が認められた。試験を行い、当該患者の感染が血液透析装置によるものかどうかを判定し、環境汚染と予防のための標準法非遵守が院内感染に影響する可能性を調べた。新規HCV感染症例と、血液およびHCV RNAによる環境汚染、手の衛生と手袋使用ガイドラインの非遵守との関連性を検討した。</p> <p>結果:患者2例が試験期間中にHCV抗体陽性となった。系統発生解析では、これらの患者の1例が、同一ユニット内で治療を受けている慢性感染患者と相同なウイルス株に感染していることが示された。環境表面検体740検体中82検体(11%)にヘモグロビンが含まれ、6検体(7%)にHCV RNAが含まれていた。手の衛生に関する遵守率は37%(95%信頼区間、35%~39%)であり、患者ケアの直後に手袋をはずしていたのは33%(95%信頼区間、29%~37%)だった。環境表面のヘモグロビンの存在を予測する独立因子は、患者に対する看護師数の少なさ、手の衛生の不良であった。</p> <p>結論:血液に汚染された表面は、血液透析装置がHCV交差感染の原因である可能性がある。血液透析患者間のHCV交差感染リスクを低減させるためには、手の衛生および手袋使用の厳重遵守と治療手順の徹底が必要である。</p>				使用上の注意記載状況・ その他参考事項等
		<p>新鮮凍結血漿「日赤」 新鮮凍結血漿-LR「日赤」</p> <p>血液を介するウイルス、 細菌、原虫等の感染 vCJD等の伝播のリスク</p>			
報告企業の意見		今後の対応			
<p>フランスの大学病院において長期血液透析を受けている患者2名がHCVに感染し、患者に対する看護師数の少なさと手の衛生の不良が、病院内の環境汚染の原因であることが示された。院内感染リスク低減のためには、手の衛生および手袋使用の厳重遵守と治療手順の徹底が必要であるとの報告である。輸血後HCV感染の調査では、院内感染など輸血以外の伝播ルートについて考慮する必要がある。</p>		<p>日本赤十字社では、HCV抗体検査を実施することに加えて、HCVについて20プールでスクリーニングNATを行い、陽性血液を排除している。また、これまでの凝集法と比べて、より感度の高い化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)及び精度を向上させた新NATシステムを導入した。HCV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。</p>			



# Determinant Roles of Environmental Contamination and Noncompliance with Standard Precautions in the Risk of Hepatitis C Virus Transmission in a Hemodialysis Unit

Emmanuelle Girou,<sup>1,2</sup> Stéphane Chevaliez,<sup>2</sup> Dominique Challine,<sup>2</sup> Michaël Thiessart,<sup>1</sup> Yoann Morice,<sup>2</sup> Philippe Lesprit,<sup>1</sup> Latifa Tkoub-Scheirlinck,<sup>1</sup> Sophan Soing-Altrach,<sup>1</sup> Florence Cizeau,<sup>1</sup> Celine Cavin,<sup>1</sup> Martine André,<sup>3</sup> Djamel Dahmanne,<sup>3</sup> Philippe Lang,<sup>3</sup> and Jean-Michel Pawlotsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Infection Control Unit, <sup>2</sup>French National Reference Center for Viral Hepatitis B, C, and delta, Department of Virology & INSERM U635, and <sup>3</sup>Nephrology Ward, Henri Mondor Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris 12, Créteil, France

**Background.** Nosocomial transmission is the second most frequent cause of hepatitis C virus (HCV) infection. A prospective observational study was conducted to assess the roles of environmental contamination and non-compliance with standard precautions in HCV cross-transmission in a hemodialysis unit.

**Methods.** Patients undergoing chronic hemodialysis in a French university hospital unit were systematically screened, revealing 2 sporadic cases of HCV transmission. An investigation was launched to determine whether the patients were infected in the hemodialysis unit and the possible roles of environmental contamination and noncompliance with standard precautions. We examined possible relationships among new cases of HCV infection, environmental contamination by blood and HCV RNA, and compliance with guidelines on hand hygiene and glove use.

**Results.** Two patients experienced seroconversion to HCV during the study period. Phylogenetic analyses showed that 1 of these patients was infected with the same strain as that affecting a chronically infected patient also treated in the unit. Of 740 environmental surface samples, 82 (11%) contained hemoglobin; 6 (7%) of those contained HCV RNA. The rate of compliance with hand hygiene was 37% (95% confidence interval, 35%-39%), and gloves were immediately removed after patient care in 33% (95% confidence interval, 29%-37%) of cases. A low ratio of nurses to patients and poor hand hygiene were independent predictors of the presence of hemoglobin on environmental surfaces.

**Conclusion.** Blood-contaminated surfaces may be a source of HCV cross-transmission in a hemodialysis unit. Strict compliance with hand hygiene and glove use and strict organization of care procedures are needed to reduce the risk of HCV cross-transmission among patients undergoing hemodialysis.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major health problem. Worldwide, >170 million individuals carry the virus, and the infection becomes chronic in ~80% of adult cases. Approximately 20% of patients with

chronic HCV infection develop cirrhosis, and the incidence of hepatocellular carcinoma is 4%-5% per year in cirrhotic patients [1].

HCV is principally, if not exclusively, transmitted by blood. Historically, the 2 main routes of transmission have been blood transfusion and injection drug use. Since the implementation, in the United States and Europe, of blood-donor screening with highly sensitive EIAs for anti-HCV antibodies and minipool testing for HCV RNA, the incidence of transfusion-transmitted hepatitis C has decreased to ~1 case per 2 million transfused blood units [2, 3]. In France, 3000-4000 new cases of HCV infection still occur every year [4]. Approximately two-thirds of these cases are related to injection drug use, but nosocomial transmission is the

Received 14 November 2007; accepted 7 May 2008; electronically published 28 July 2008.

Presented in part: 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., 2005 (abstract K-1113), and at the 2nd Society of Hospital Epidemiology of America Annual Meeting, Chicago, 2006.

Reprints or correspondence: Dr. Emmanuelle Girou, Unité de Contrôle, Épidémiologie et Prévention de l'Infection, Hôpital Henri Mondor, 51 Ave. du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France (emmanuelle.girou@hmn.aphp.fr).

Clinical Infectious Diseases 2008;47:627-33

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
1058-4838/2008/4705-0007\$15.00  
DOI: 10.1086/590564

second most common source of HCV infection. Most cases of HCV transmission in the hospital setting are attributable to patient-to-patient transmission through invasive procedures, such as insertion of an intravascular catheter, colonoscopy, sharing of dialysis equipment, surgery, and sharing of multidose vials [5–11].

The prevalence of HCV infection is high among patients who undergo hemodialysis, because of both contaminated transfusions before the early 1990s and nosocomial transmission. Several outbreaks and sporadic cases of nosocomial HCV or hepatitis B virus transmission in dialysis units have been linked to poor disinfection of dialysis equipment and to poor compliance with standard infection-control measures [9, 12–18]. However, the exact route and mechanism of transmission were unknown in most cases. Here, we examined the intricate roles of noncompliance with standard precautions, environmental contamination, and low nurse-to-patient ratio in cross-transmission of HCV within a dialysis unit.

## PATIENTS AND METHODS

**Setting and patients.** Henri Mondor University Hospital has a 9-bed hemodialysis unit that mainly treats patients with chronic renal failure. A case of HCV seroconversion was detected by systematic screening during the study period. The study period was defined as the interval between the probable date of infection and the discovery of the index case—that is, January–September 2004. Patients' medical files were exhaustively reviewed to eliminate a potential external source of HCV transmission. None of the health care personnel was known to be infected with HCV. No systematic screening of personnel was undertaken. No isolation policy was implemented in the unit. Multidose vials were not in use in the unit.

All patients who undergo regular hemodialysis are screened for anti-HCV antibodies every 3 months, in an effort to detect seroconversion. On 27 July 2004, a case of HCV seroconversion was detected through this screening. To determine whether this case was sporadic or part of an outbreak, all 52 patients with chronic renal failure who were undergoing regular hemodialysis in the unit were tested for anti-HCV antibodies and HCV RNA, as were all patients treated for acute renal failure in the unit during the at-risk period. Six (12%) of the 52 patients (patients 3–8) were known to be chronically infected with HCV, with HCV RNA levels ranging from 4.4 to  $>6.9 \log_{10}$  IU/mL at the time of the study. All but 1 of these patients were known to have been infected for several years (e.g., patient 3 has been infected since 2001). A second patient undergoing hemodialysis was found to be HCV RNA positive through culture of a blood sample obtained in July 2004 (tests for anti-HCV antibodies were negative), and an investigation was then launched.

**Virological studies and phylogenetic analyses.** Anti-HCV antibodies were detected with a third-generation ELA (Vitros

ECi; Ortho-Clinical Diagnostics). We tested for HCV RNA in all patients' blood and in hemoglobin-positive surface swab eluates through use of a sensitive RT-PCR assay (Amplicor HCV, version 2.0; Roche Molecular Systems), with a detection limit of 50 IU/mL.

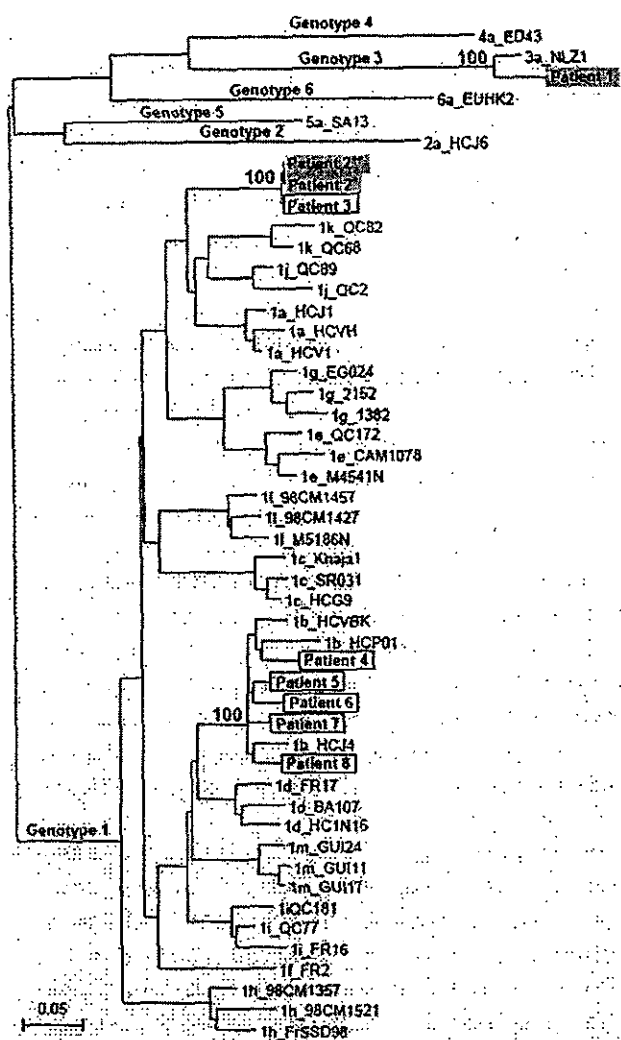
To estimate the genetic relatedness of HCV strains, 2 HCV genomic regions were PCR amplified and sequenced, including a 328-base pair portion of the nonstructural 5B (NS5B) coding region (nucleotide positions 8271–8597) and the 81-base pair region coding for hypervariable region 1 (HVR1) of the E2 envelope glycoprotein [19]. HCV genotyping was based on phylogenetic analysis of NS5B sequences, which included prototype sequences of various subtypes of HCV genotypes 1–6. The genetic relatedness of HCV strains was studied by phylogenetic analysis of both the NS5B and HVR1 regions. Sequences were aligned with ClustalW software [20]. Phylogenetic relationships were deduced with the DNADIST-NEIGHBOR module of the Phylogeny Interference Package, version 3.5 [21]. For neighbor-joining analysis, a distance matrix was calculated using a Kimura 2-parameter distance matrix with a transition/transversion ratio of 4.0. Trees were drawn with TREVIEW or NJ-Plot programs [22]. Their robustness was assessed by bootstrap analysis of 1000 replicates with the SEQBOOT module of the Phylogeny Interference Package program.

The index patient (patient 1) experienced HCV seroconversion in July 2004. The second case of HCV seroconversion during the study period (patient 2) was identified by systematic screening for HCV RNA. To determine whether chronically infected patients were the source of the new cases, the sequences of 2 HCV genomic regions, including a portion of the NS5B coding sequence and the sequence coding for HVR1, were compared among the 8 infected patients, relative to reference sequences. Phylogenetic analyses of the NS5B region (figure 1) and the HVR1 (figure 2) showed that newly infected patient 2 was infected with the same HCV genotype 1 strain as was chronically infected patient 3. In contrast, patient 1 was infected with an HCV genotype 3a strain that was unrelated to the strains infecting the other 6 chronically infected patients (all infected with genotype 1). Despite the proximity of the HCV strains from patients 4–8 in the NS5B phylogenetic tree (figure 1), HVR1 analysis showed that those patients were infected with unrelated strains (figure 2).

Thus, 2 patients were infected during the at-risk period, 1 of whom (patient 2) was infected with the same strain as was a chronically infected patient (patient 3). The other newly infected patient (patient 1) was infected with a genotype 3a strain, which could have been acquired either from a patient occasionally treated in the dialysis unit or from an external source.

**Risk factors of HCV transmission.** Potential risk factors of HCV transmission were hypothesized—namely, contamination of dialysis equipment (through machine sharing and inadequate





**Figure 1.** Phylogenetic tree plotted with nonstructural 5B sequences (nucleotide positions:8271–8597) from the 2 patients recently infected in our hemodialysis unit (patients 1 and 2; shaded boxes), the 6 patients known to be chronically infected with hepatitis C virus (HCV) and regularly treated in our hemodialysis unit (patients 3–8; unshaded boxes), and reference HCV strains of different genotypes (the type and subtype are indicated just before the strain identification letters and/or numbers). Two samples were available and were included in the analysis for patient 2, \*July 2004; \*\*September 2004. Nucleotide sequence of the nonstructural 5B gene of HCV-ED43 was used as an outgroup root.

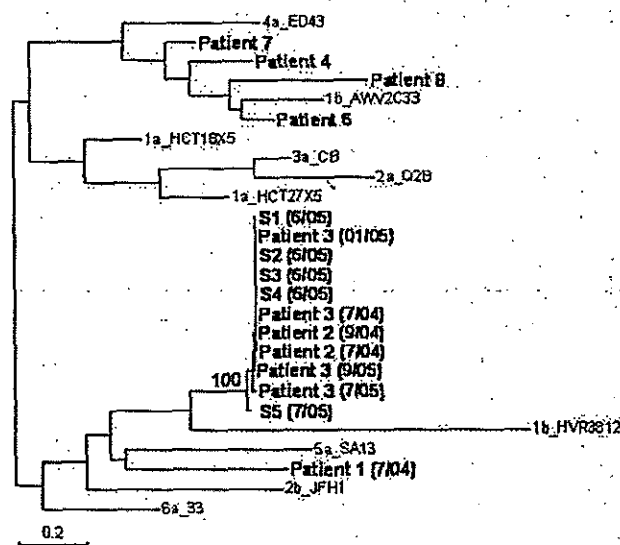
environmental disinfection), noncompliance with standard precautions, and variation of the nurse-to-patient ratio in the hemodialysis unit.

The use and maintenance of dialysis equipment was reviewed by the local infection control team according to the written local procedures that are based on published data and recommendations. Dialyzers were not being reused, and dialysis machines (AK100; Gambro) were disinfected after each session, according to a written protocol combining chemical (peroxy-

acetic acid [Dialox]) and sodium hypochlorite) and heat disinfection.

Surfaces at risk of contamination with infected blood were defined as the most frequently manipulated surfaces—including dialysis machines, shared waste carts, patients' removable tables, and work benches. At-risk surfaces were swabbed during dialysis sessions (30 swabs per day on 25 consecutive days) on a surface area of ~100 cm<sup>2</sup>, by using a cotton swab moistened with sterile distilled water that was then eluted in 1 mL of sterile distilled water. Hemoglobin was detected with reagent strips (Hemastix; Bayer HealthCare) with a detection limit of 150 µg Hb/L—that is, the equivalent of 5 erythrocytes per microliter. All hemoglobin-positive samples were tested for HCV RNA [23, 24].

Compliance with standard precautions (hand hygiene and glove use) was studied in the dialysis unit each day for three 30-min periods—during the morning, afternoon, and night shifts—for 7 weeks (2 weeks during September 2004 immediately after the first case alert and 5 weeks during June–July 2005). All staff categories were studied, in an open, unobtrusive manner, by 5 specially trained members of the infection control team, with use of a standardized questionnaire [25]. Hand hygiene opportunities tailored to the care activities in the hemodialysis unit were listed in the questionnaire (i.e., before and



**Figure 2.** Phylogenetic tree plotted with hypervariable region (HVR) 1 sequences from the 6 patients known to be chronically infected with hepatitis C virus (HCV) and regularly treated in our hemodialysis unit (patients 3–8), including the patient who transmitted HCV to patient 2 (i.e., patient 3), the 2 patients infected in our hemodialysis unit (patients 1 and 2), the 5 environment surfaces that tested positive for HCV RNA and that could be PCR amplified in that region (S1–S5), and reference HCV strains of different genotypes (the type and subtype are indicated just before the strain identification letters and/or numbers). Dates of sampling are shown in parentheses.