

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の
診断、除去・不活化法の研究

平成 16～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 19 (2007) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告書	
安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の 診断、除去・不活化法の研究	P 1-P 10
	主任研究者 岡田 義昭
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	P 11-P 12
III. 研究成果の刊行物・別冊	P 13-P 65

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総合研究報告書

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の診断、除去・不活化法の研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

1. 食品の滅菌技術として実用化されている高圧処理を血液製剤のウイルス不活化法として応用できるか検討した。3000 気圧の高圧処理によってパルボウイルス B19 (B19) や日本脳炎ウイルスは約 5 log (10 万分の一) 不活化したが、第 9 因子やアンチトロンビン III、フィブリノーゲンの活性は非加圧の血漿と同等であった。分画製剤等の新しいウイルス不活化法の 1 つになる可能性がある。
2. SARS ウイルス、ウエストナイルウイルス (WNV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、B 型肝炎ウイルス (HBV)、B19 の各ウイルスについて除去・不活化を検討した。SARS ウイルスと WNV は加熱処理、界面活性剤処理 (S/D)、ウイルス除去膜によって除去・不活化されることを明らかにした。HAV では、株によって不活化に対する抵抗性が異なることを明らかにした。
3. パルボウイルス B19 を迅速・簡易・感度良く検出する方法を開発した。
4. WNV の株間の多様性に対応できる核酸増幅法を開発した。さらに WNV やデングウイルスを含むどのフラビウイルスでも検出可能な PCR 法を開発した。
5. E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス様中空粒子を用いて HEV 除去を評価できる系を作製した。
6. 上皮性細胞株を用いた B19 の感染系を確立した。
7. HBV を酵素処理によって肝癌細胞に吸着させると細胞内で HBV の環状二重鎖 DNA が合成されることを見出し、HBV の不活化評価系を作製した。

分担研究者

池田久實 北海道赤十字血液センター 所長
佐藤博行 福岡赤十字血液センター 副所長
高崎智彦 国立感染症研究所 室長
武田直和 国立感染症研究所 室長
田代真人 国立感染症研究所 部長
米山徹夫 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

近年、海外においてウエストナイルウイルスや SARS ウイルスのアウトブレイクが起こり、国内では輸血によって E 型肝炎ウイルス感染が報告されるなど血液製剤の安全性にとって脅威となるような新興・再興感染症が報告されている。この研究班

はこれらのウイルスに加えて A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、さらにパルボウイルス B19 などの診断、除去・不活化法とその評価についての研究を行うことによって、血液製剤の安全性を確保することを目的としている。

診断においては、スクリーニングに応用できるような簡便で高感度な検出法、または遺伝子が多様性を有するウイルスを漏れなく検出できるような検出法、さらに同じウイルス属のウイルスを広範囲に検出できる方法の開発を目指した。

また、除去・不活化法の評価が、動物由来の類似したウイルスをモデルウイルスとして用いて実施されていることが多いことから、本研究班では可能な限り実際のウイルスを用いて評価を実施した。特に、P3 レベルのウエストナイルウイルスや SARS コロナウイルスの除去・不活化の評価はウイルスを取り扱える施設が制限されている関係でその報告は極めて少なく、貴重は情報が得られるものと考えた。

一方、これまで培養系がなかったウイルス（パルボウイルス B19 と B 型肝炎ウイルス）、又は培養系が一般的でないウイルス（A 型肝炎ウイルス）では細胞株の検索による感染系の確立と細胞に馴化したウイルス株を用いて除去・不活化の評価を行った。その一方で、最近問題となっている E 型肝炎ウイルスは、評価に十分な検体を得ることが難しく、培養系もないので遺伝子工学の手法等を用いた VLP (virus like

particle) を作製し、除去評価系の開発を行った。

さらに、今後も次々と新興・再興感染症が発生することが予想され、これらの全ての病原体をスクリーニングすることは不可能であることから、血液製剤の安全性確保のために非特異的にウイルスを不活化する新しいウイルス不活化法の開発も目指した。

B. 研究方法と結果

詳細は年度毎の総括報告書に記載されているので簡潔にまとめた。

(I) スクリーニング法に関する研究

1) LAMP 法によるヒトパルボウイルス B19 の検出法の開発と感度評価

パルボウイルス B19 は健常人に対する病原性は低いですが、妊婦、溶血性貧血、臓器の移植後等の免疫抑制患者にとっては重篤化な疾患を起こし、時に持続感染するウイルスである。スクリーニングとして B19 の検査は既に導入されているが、上記のリスクを持つ患者に輸血を実施する場合にはさらに高感度の検査法が必要と考えられる。その場合、簡便で高感度な方法が要求される。最近開発された LAMP 法は 63℃ の一定した温度によって短時間で反応が終了し、目的の遺伝子の増幅は濁度でモニターできる。通常、核酸増幅検査では検体から核酸を抽出することに時間と労力を要し、さらに多検体から抽出するためには大型の機器等が必要になる。そこで、血清から核酸を得るための適切な処理法の検討を実施した。

血清を 94℃2 分間の加熱処理だけで精製 DNA を用いたときと同等な感度が得られることがわかった。核酸の抽出が必要ないことから、コンタミネーションのリスクも軽減することができ、180 分間で多数の検体の結果を得ることができた。B19 の遺伝子が組み込まれたプラスミドを用いて感度を評価すると 1 アッセイ当たり 2.3 コピーの B19 の検出が可能であった。現在のスクリーニング法では B19 の抗体の存在によって感度が低下するが、加熱による前処理では抗体存在の影響は受けなかった。以上の方法はハイリスク患者への簡便なスクリーニング法として有用だと考える。

2) ウエストナイルウイルス及びフラビウイルス検出法の開発

ウエストナイルウイルス (WNV) は世界の広い地域に存在し、地域ごとにウイルスに多様性が存在する。特異性と高感度を維持し、さらにウイルス株の多様性に対応可能な検出法が必要であるが、単独の検出系では特異性と多様性を併せ持つ検出系を作ることに限界がある。そこで TaqMan RT-PCR と SYBR Green I Based RT-PCR とを組み合わせ、特異性と高感度を維持し、且つウイルス遺伝子の多様性に対応できる WNV の検出系を開発した。

また、同じフラビウイルス属であるデングウイルスは我が国においても毎年 60 例前後の輸入感染症例がある。また、日

本脳炎ウイルスや北海道にはダニ媒介性脳炎ウイルスが常在していることから、フラビウイルスを共通に検出できる PCR 用の共通プライマーを開発した。日本脳炎ウイルス、デングウイルス 1 型、WNV、セントルイス脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ネギシウイルス。ランガットウイルス、ヨコセウイルスの塩基配列を検討し、塩基番号 8695~9044 領域のプライマーが最も適していることを明らかにした。

(II)：新興・再興感染症原因ウイルスの除去・不活化の研究

1) 血液製剤における SARS コロナウイルスの除去・不活化に関する研究

血液製剤の除去・不活化のガイドラインに従って、静注用グロブリン製剤と 25%アルブミン製剤に各々容量の 10%の SARS コロナウイルス液を添加し、60℃にて 5 時間、及び 10 時間の加熱処理を行い VeroE6 細胞を用いて感染価を測定した。何れの製剤からも、感染性は検出限界以下となったことから 5 時間では 2.5×10^4 、10 時間では 1×10^5 以上不活化されたと考えられた。また、静注用グロブリン製剤にウイルスを添加し、35nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ感染性は検出限界以下となり、 1.1×10^4 以上除去されたと考えられた。また、界面活性剤処理 (S/D 処理) による SARS コロナウイルスの不活化を評価した。S/D 処理を室温で 4 時間行

い、感染価を測定したところ検出感度以下となり、約 5 log 以上の不活化効果が得られた。

ところで、SARS コロナウイルスを取り扱うには P3 レベルの実験室が必要なことから、除去・不活化法の評価を一般的な施設で実施することは困難である。同じコロナウイルスに属するマウス肝炎ウイルス (MHV) は P2 レベルの施設で取り扱えるのでモデルウイルスとして利用できるか検討した。S/D 処理、加熱処理、ウイルス除去膜による除去・不活化実験を行い、何れの方法によっても感染性は検出されなかった。以上からマウス肝炎ウイルス (MHV) は S/D 処理、加熱処理、ウイルス除去膜による除去・不活化に対して SARS コロナウイルスと同等であり、モデルウイルスとして利用できることが示された。

2) ウエストナイルウイルス (WNV) の除去・不活化法の研究

アルブミン製剤と静注用グロブリン製剤に各々容量の 10% の WNV ウイルス液を添加し、60℃ にて 10 時間加熱処理を行い Vero 細胞を用いて感染価を測定した。何れの製剤からも感染性は検出されず、 10^5 以上不活化された。また、静注用グロブリン製剤にウイルスを添加し、35 nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ感染性は検出されず、 10^4 以上除去された。

3) A 型肝炎ウイルスの除去・不活化

A 型肝炎ウイルスは野外株を培養することは困難であるが、培養細胞に馴化したウイルス株が報告され、それらを用いることで感染性を評価することができる。アルブミン製剤と静注用グロブリン製剤に各々容量の 10% の A 型肝炎ウイルス (KRM238 株) 液を添加し、60℃ にて 10 時間加熱後、GL 細胞を用いて感染価を測定した。アルブミン製剤では $10^{3.7}$ 不活化された。一方、グロブリン製剤では 60℃ 10 時間の加熱処理では検出限界以下になった (抗 A 型肝炎ウイルス抗体が存在しているため、抗体によって 2log 程度中和されたと考えられる) が、加熱による不活化はアルブミンと同程度であると考えられた。さらに、S/D 処理では non-envelope ウイルスであることより理論的に効果がないと予想されていたが、全く不活化効果は認められなかった。また、ガンマー線照射では 10 kGy で 2.7log、25 kGy で 6.7log のウイルス不活化効果が認められた。興味深いことに、3 つの異なる A 型肝炎ウイルス株を用いて加熱処理による不活化効果を検討したところ、株間で約 100 倍の抵抗性の差があった。また、遺伝子型が同じサブタイプであっても抵抗性に 1.5log の差が認められた。

4) パルボウイルス B19 の感染系の確立とそれを用いた不活化法の評価

最近まで B19 の適当な培養系がないため、不活化の評価は動物由来のバルボウ

ウイルスをモデルウイルスとして用いて実施されていた。睾丸由来の胎児性癌細胞株がB19 に対して感受性を持つことを明らかにし、これまでに報告されている血球系の細胞株と同程度の感受性があることを見出した。この細胞株を使って60℃、10 時間の液状加熱処理による不活化を評価したところ、血球系の細胞株と同等に4 log の不活化が確認された。さらに界面活性剤処理（S/D処理）による不活化を検討したところ全く不活化効果が認められなかった。

5) B型肝炎ウイルスの不活化評価系の開発

B型肝炎ウイルスは現在でも培養に成功していないウイルスの1つである。そのためHBVの除去・不活化はモデルウイルスを用いる以外に方法がなかった。本研究では、肝癌の細胞株にアシアロ糖蛋白受容体が発現していることに注目し、HBVをノイラミニダーゼ処理することで肝癌細胞に結合させることに成功した。しかも侵入したHBVは細胞内で環状2本鎖cccHBVになることを見いだした。この系は、細胞内にHBVが侵入した後の複製に関するHBVの不活化の評価に使用できると考えた。環状2本鎖はHBV複製時に存在するのでこれを指標に感染性の評価を検討した。HBVを60℃10時間加熱処理することによって3log感染価は低下した。また、Methylene Blue(MB) 処理では1-2logの感染価の

低下が認められた。細胞へのHBV吸着量は不活化処理によっても変わらないことから環状2本鎖形成に係わるウイルス側の変化を反映しているものと推定された。

6) E型肝炎ウイルスの除去評価系の開発

これまで輸入感染症と考えられていたが、日本に常在することが明らかとなった。現在のところ培養系がなく、またウイルス陽性血漿を充分量確保することは困難である。そこで、バキュウロウイルスの発現系を用いて、HEVのgenotype3の構造蛋白領域を発現させることによってネイティブなHEVに近い大きさのウイルス様中空粒子（以下VLP）を多量に得ることができた。ELISAによる抗原測定では測定可能な範囲が狭く有効な評価法とはならなかった。電顕像によってVLP内に核酸が存在することが示唆されたので、精製したVLPからRNAを抽出し解析したところHEV特異的な遺伝子が検出された。そこで、VLP内に存在するHEV特異的遺伝子を標的とした定量可能な測定系を用いてHEVの除去を評価した。既に血漿分画メーカーに導入されているウイルス除去膜によるVLP除去について効果を解析した。静注用免疫グロブリンに1/10容量のVLPを添加し、35nmのポアサイズの除去膜で濾過した結果、約5log除去された。また、20nmの除去膜では濾過前 1.09×10^7 の検体が除去後検出感度以下となった。

(III)：新しいウイルス不活化法の開発に関する研究

血漿中にウイルスが存在している場合、血漿タンパクは可溶性であり、ウイルスは形を有する構造物である。この物理学的な差を利用する新しいウイルス不活化法の開発を試みた。食品の無菌化法として実用化されている高圧処理技術を血液製剤のウイルス不活化法として応用できるか検討した。加圧法は水をチッソガスで圧すことによって加圧し、数十秒で4000気圧まで加圧、10秒以内に大気圧まで減圧することができ、この操作を3回繰り返した。エンベロープを有するウイルスとして日本脳炎ウイルス、ないウイルスとしてB19を用いた。アルブミン中にウイルスを添加し、高圧処理し不活化効果を評価した。3000気圧1分間の加圧処理を3回繰り返すことによって2つのウイルスは約5log感染価が減少した。この条件下で加圧処理による血漿蛋白質の活性について検討したところ、第9因子やアンチトロンビンIII、フィブリノーゲンの活性は非加圧の血漿と同等の活性があり、不活化されないことが確認された。しかし、第8因子活性は2300気圧処理まで保たれたが、3000気圧では非加圧時の活性の25%に減少した。

C. 考察

研究成果は図1に示したとおりだが、スクリーニング法への応用として、パルボウイルスB19検出では簡便な検体の

前処理法とLAMP法との組み合わせによって高感度且つ多検体を処理できる検出系を作ることができた。既にB19のスクリーニングは導入されているが、妊婦、溶血性貧血、臓器移植後等のハイリスク患者への輸血用血液の検査として有用であると考えられた。

また、WNVは遺伝子に多様性があり、全てのWNVを検出することは困難であったが、フラビウイルスに属するウイルスを含めた多種のウイルスを検出できるプライマーの開発ができたことはスクリーニング検査や診断のために極めて有用だと考えられた。

SARSウイルスとWNVはP3レベルの病原体のため取り扱える施設が限られている。日本においてこれらのウイルスの評価はなく、海外においても報告は少ない。本研究では、加熱、S/D処理、ウイルス除去膜など血液製剤の除去・不活化法として実際に導入されている方法による評価を行った。エンベロープを有していることから不活化され易いことは予測できたが、モデルウイルスでなく実際のウイルスを用いて、これらのウイルスが上記の方法で除去・不活化されることを確認した。これらのウイルスが原料血漿に混入しても現行の方法により除去・不活化できることを示した意義は大きい。貴重はデータなので論文として報告を予定している。さらに同じコロナウイルスに属するマウス肝炎ウイルスを

用いて上記の除去・不活化法を検討し、SARS ウイルスと同様な結果を得たことからモデルウイルスに成りうると考えられた。

また、B19 の不活化の評価系として、KU812 細胞株が数年前より用いられているが、浮遊系細胞であるため遠心操作が必要であり、実験室内の感染事故を起こす危険がある。本研究で我々が見出した細胞株は付着性のため遠心操作の必要性がなく安全である。さらに感度も KU812 と同等である。B19 の感染性の評価に有用であると考えられた。この感染系を用いて加熱処理と S/D 処理による不活化の評価をすることができた。その結果、これまで使われてきたモデルウイルスと異なり加熱処理に感受性があることが判明した。モデルウイルスは実際のウイルスと類似した性質を持つウイルスが選択されているが、全く同じではないことを示した。

B 型肝炎ウイルスの感染系は適当なものなかったが、酵素処理によって HBV と標的細胞とを結合させると環状二重鎖 DNA が合成される系を確立し、この系を用いて加熱処理やメチレンブルーによる不活化を評価することに成功した。完全な感染系ではないが、HBV を用いた系がないだけに重要な不活化評価系になると考えられる。

E 型肝炎ウイルスは、エンベロープを持たないウイルスであることから現行の

除去工程が有効であるか評価する必要がある。培養法が開発されていないが、ネイティブなウイルスとほぼ同じ大きさの VLP を用いた除去の評価系を開発した。VLP 内に HEV の特有な核酸が取り込まれる性質を利用した系である。VLP を多量に得ることができると同時に非感染であるため有用な評価系になると考えられる。

A 型肝炎ウイルスは培養細胞に馴化したいくつかのウイルス株があり、血液製剤の不活化法の評価に用いられてきている。不活化法に抵抗性を示すことは知られているが、ウイルス株間で 2log 程度差があることが判明したことから、除去・不活化の評価に用いるウイルス株の選択に関する検討が今後必要となると思われる。

血液製剤の安全性を確保するためには病原体が混入していない血液を得ることが重要であるが、診断法の進歩や国際間の交流の促進、更に温暖化等の影響によって新興・再興感染症が発生している。全ての病原体をスクリーニングすることは不可能であることから、ウイルスを非特異的に不活化できる不活化法の開発が必要である。本研究班で検討した加圧処理は、3000 気圧前後でウイルスの不活化効果（全てのウイルスではない）が認められた。一方、血液中の各因子の活性は第 9 因子やアンチトロンピン III では 4000 気圧まで活性に影響はなかったが、

第 8 因子は 3000 気圧処理によって非加圧時の活性の 25%まで低下した。新鮮凍結血漿に本法を導入するためには第 8 因子の失活を防ぐ方法の開発がさらに必要であるが、血漿分画製剤においては第 9 因子製剤やアンチトロンビン III 製剤に応用できる可能性がある。今後ウイルスの適応範囲や血漿に与える影響、さらに低圧で効果的なウイルス不活化を誘導する方法の開発、成分の失活防ぐ安定化剤の開発など必要がある。加圧による病原体の不活化法は簡便で安価で、化学物質を添加しないことから新しい機序のウイルス不活化法の 1 つになりうる方法と考えられた。

D. 結論

新興・再興感染症から血液製剤の安全性を確保するために、スクリーニングに有用な方法の開発、除去・不活化の新しい評価法の開発、除去・不活化の評価のためのウイルス株間の比較やモデルウイルスとの比較、さらに血液製剤の新しいウイルス不活化法の開発を行った。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他：血液製剤の安全性のための核酸増幅検査 (NAT)、臨床検査、第 48 巻、1125-1130、2004 年。
- 2) 岡田義昭：血液と血液製剤の安全性、

サークルズ、6 巻、4-7、2004

- 3) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆衛生、第 69 巻、781-785、2005 年。
- 4) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内喜信、他：C 型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製、日本輸血学会雑誌、51 巻、515-519、2005
- 5) 岡田義昭、梅森清子：血漿分画製剤の安全性確保の現状、医学の歩み第 218 巻、625-630、2006 年

2.学会発表

- 1) Y.Okada:B19 infectivity assay with an epithelial cell line, International Scientific Working group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for the Safety testing of Blood, tissues and organs with Regard to Blood Borne Pathogens. Paris May 2004
- 2) 岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の感染系の確立、第 52 回日本ウイルス学会、2004 年
- 3) Okada, Y. Umemori, K., and Yamaguchi, K.: B19 inactivation by heat treatment with epithelial cell lines. International Scientific Working group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for the Safety testing of Blood, tissues and organs with Regard to Blood Borne Pathogens. Washington .May 2005

4) 梅森清子、岡田義昭、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞を用いたヒトパルボウイルス B19 不活化の評価系の確立、第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 年

5) 岡田義昭：血漿分画製剤の感染症対策（シンポジウム）、第 54 回日本輸血学会、2006 年、大阪

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 知的所有権の取得状況

3年間の成果

① 除去・不活化の評価法の開発

HBVの不活化評価系

(北海道日赤：池田)

B19の不活化評価系

(感染研：岡田)

HEVの除去評価系

(感染研：武田)

③ スクリーニングへの応用

WNV株間の多様性に対応し得る検出法の開発 (感染研：高崎)

広範なフラビウスの検出法の開発 (感染研：高崎)

B19の高感度検出系の開発

(福岡日赤：佐藤)

② 除去・不活化の検討

S/D処理, ウイルス除去膜等による不活化評価 SARS, WNV, B19

(感染研：田代、武田、岡田)

HAV株間の感染性の差異の検討

(感染研：米山)

④ 新しい不活化法の開発

高圧処理による病原体不活化

(感染研：岡田)

(北海道日赤：池田)

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Usuku,S.,Noguchi,Y.,and Takasaki,T.	Newly developed TaqMan assay to detect West Nile viruses in a wide range of viral strains	Jpn.J.Infect.Dis	57	129-130	2004
Matsubayashi,K.,Nagaoka,Y.,Sakata,H.,et.al.	Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan	Transfusion	44	934-940	2004
米山徹夫、清原知子、下池貴志他	A型肝炎-我が国の最近の発生動向を中心に	臨床とウイルス	32	149-155	2004
Li,T.-C.,Chijiwa,K.,Sera,N., et.al.	Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat	Emerging Infectious Diseases	11	1958-1960	2005
Li,T.-C.,Takeda,N.,Miyamura,T.,et.al.	Essential elements of the Capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus	J.Virol.	79	12999-13006	2005

岡田義昭、水澤左衛子、種市麻衣子、他	輸血、血液製剤の安全性の現状	公衆衛生	69	781-785	2005
岡田義昭、梅森清子	血漿分画製剤の安全性確保の現状	医学の歩み	218	625-630	2006
Owada,T,Matsubayashi,K,Sakata,H, et.al.	Interaction between desialyated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry	J.viral Hepatitis	13	11-18	2006
Kiyohara,T,Sato,T, Tosuka,A., et.al.	Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan,1973-2003	Microbiol.Immunol.	51	185-191	2007

Laboratory and Epidemiology Communications

Newly Developed TaqMan Assay to Detect West Nile Viruses in a Wide Range of Viral Strains

Shuzo Usuku*, Yuzo Noguchi and Tomohiko Takasaki¹

Department of Testing and Research, Yokohama City Institute of Health, Kanagawa 235-0012 and

¹Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640

Communicated by Tatsuo Miyamura

(Accepted May 27, 2004)

In the United States during 2003, 9,862 people were reported to be infected with West Nile virus (WNV) to the Centers for Disease Control and Prevention, and 264 of these people died of related encephalitis and meningitis (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control/CaseCount03_detailed.htm). There is the possibility of WNV infection even in Japan in the near future.

Genetically, WNV can be divided into two lineages. NY99, prevalent in the United States in a 1999 survey of avian and mosquito samples, belongs to lineage 1 (1). Lanciotti et al. (2) developed a TaqMan Reverse Transcriptase (RT)-PCR assay based on the sequence of the NY99 strain. The 3'NC

primers and probe assay detects 0.1 PFU/5 μl of sample of NY99 strain and reacts with other six WNV strains. Two main WNV strains, g2266 (lineage 1) and FCG (lineage 2), are available in local public laboratories in Japan. However, they are genetically distinct from the NY99 strain. The 3'NC primers and probe assay cannot detect the FCG and g2266 strains used as respective control strains in real time polymerase chain reaction (real time PCR) in a Japanese local laboratory. It is thus necessary to develop new primers and probe sets to detect various WNV strains in order to screen avian and mosquito samples.

We developed a new TaqMan RT-PCR assay to detect both

Table 1. Newly developed oligonucleotide primers and probes used in the TaqMan assay

Primer	Genome position ¹⁾	Sequence (5'-3')
WNV cap-forward	110-127	CAGGAGGGCCCGGYAARA
WNV cap-reverse	179-162	ATCAAGGACAAYMCGCGG
WNV cap-probe	129-154	FAM-CCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCG-TAMRA

¹⁾: Genome position according to WNV NY99 complete sequence (GenBank accession number AF196835).

Table 2. Summary of sensitivity and specificity in West Nile viruses using cap primers and probe

Sample	Sensitivity limit ¹⁾	
	cap primers and probe (PFU/tube)	3'NC primers and probe
NY99	10~100	0.1
Eg101	5.4~54	Pos
WNV	200	Pos
FCG	2.8×10^4 ~ 2.8×10^5	Neg
g2266	Pos	Neg
JEV type 1	JEV/sw/Kagawa/24/2002	Neg
	JEV/sw/Mie/41/2002	Neg
	JEV/sw/Shizuoka/33/2002	Neg
JEV type 3	JaGAR01	Neg
	Nakayama	Neg
	Beijing	Neg
Dengue virus	type 1 (Hawaii)	Neg
Dengue virus	type 2 (New Guinea C)	Neg
Dengue virus	type 3 (H87)	Neg
Dengue virus	type 4 (H241)	Neg

¹⁾: Pos shows positivity of TaqMan RT-PCR by qualitative testing using seed virus.

*Corresponding author: Mailing address: Yokohama City Institute of Health, Takigashira 1-2-17, Isogo-ku, Yokohama City, Kanagawa 235-0012, Japan. Tel: +81-45-754-9804, Fax: +81-45-754-2210, E-mail: sh00-usuku@city.yokohama.jp

lineages 1 and 2 WNVs including strains of NY99, Eg101, Kunjin (OR393), g2266, and FCG. To develop the TaqMan primers and probe, we performed multiple alignments using 12 WNV complete sequences (NY99, IS-98 STD, RO97-50, Italy-98, FCG, etc.) submitted to GenBank and used the nucleocapside (cap) coding region, which is highly conserved. Primers and probe are shown in Table 1, and the length of these amplicons was 70 bp. We also confirmed the specificity of this assay by using negative controls of Japanese encephalitis virus and dengue virus, respectively (Table 2).

To estimate the sensitivity of this assay, we performed 10-fold serial dilution samples of NY99, Eg101, Kunjin, and FCG strains using the WNV cap probe and primers. Table 2 shows the sensitivity of our cap primers and probe set. Compared with that of the 3'NC primers and probe, our cap primers and probe has a lower sensitivity to the NY99 strain. Further, our cap primers and probe detected a wider range of strains than did the 3'NC primers and probe, and has sufficient sensitivity for use in WNV-screening of field collected avian and mosquito samples. Our cap primers and probe will be useful for WNV surveillance.

We thank Dr. David W. Smith, Arbovirus Research and Surveillance Group, Department of Microbiology, University of Western Australia for providing the initial stock of Kunjin virus (OR393 strain).

REFERENCES

1. Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D. and Roehrig, J. T. (2002): Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 298, 96-105.
2. Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komer, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S. and Roehrig, J. T. (2000): Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4066-4071.

Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan

Keiji Matsubayashi, Yasuhiro Nagaoka, Hidekatsu Sakata, Shinichiro Sato, Kanji Fukai, Toshiaki Kato, Kazuaki Takahashi, Shunji Mishiro, Mitsunobu Imai, Naokazu Takeda, and Hisami Ikeda

BACKGROUND: In industrialized countries, sporadic cases of hepatitis E have been reported in individuals who have never been in an endemic area. Hepatitis E virus (HEV) infection commonly occurs via the fecal-oral route but a potential risk of transfusion transmission route has been suggested.

STUDY DESIGN AND METHODS: A 67-year-old Japanese male patient who had never been abroad received a transfusion of blood from 23 voluntary donors and developed acute hepatitis with unknown etiology after transfusion. His blood samples were tested for viral markers of hepatitis viruses.

RESULTS: HAV, HBV, HCV, CMV, and EBV were ruled out as causative agents in this case. The patient's blood sample in the acute phase contained HEV RNA as well as IgM and IgG anti-HEV. HEV RNA was also detected in one of the FFP units transfused. The donor had no history of traveling abroad and had a normal ALT level at the time of donation. The PCR products from the patient and the donor showed complete identity for two distinct regions of HEV within open reading frame 1.

CONCLUSION: The patient was infected with HEV via transfused blood from a volunteer donor. A potential risk of posttransfusion hepatitis E should be considered even in nonendemic countries.

Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of epidemic hepatitis that is usually developed as acute hepatitis in endemic areas in Asia, Africa, Central and South America, and the Middle East.¹ Recent evidence indicates that, in industrialized countries, sporadic acute or fulminant hepatitis E occurs in individuals who have no history of traveling to HEV endemic areas²⁻¹⁰ and that hepatitis E is a zoonotic disease; pigs and other animals appear to be linked to human infection as reservoirs.¹¹⁻¹⁶ In Japan, HEV infection has been rarely reported and has been considered as an imported infection from endemic areas for a long time. An epidemiologic study with a sensitive ELISA system, however, revealed that 2 to 14 percent of the healthy population in Japan was seropositive for the presence of IgG anti-HEV.¹⁹ Approximately 13 percent of the non-A, -B, and -C acute hepatitis cases in Japan were caused by HEV.⁹ Moreover, after the initial discovery and the characterization of indigenous Japanese strain, JRA1, from a patient with non-A, -B, and -C acute hepatitis, who had never been abroad,⁷ several indigenous Japanese HEV strains were recovered from patients with acute or fulminant hepatitis of non-A, -B, and -C etiology.^{9-10,20} Although the question of when the first HEV strain made inroad remains unsettled, it is likely that heterogeneous strains of HEV

ABBREVIATIONS: HEV = hepatitis E virus; nt = nucleotide(s).

From the Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo; the Department of Internal Medicine, Nikko Memorial Hospital, Muroran; the Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital, Tokyo; the Department of Microbiology, Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory, Chigasaki; and the Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Address reprint requests to: Keiji Matsubayashi, MS, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku, Sapporo, Japan 063-0002; e-mail: kmatsu@hokkaido.bc.jrc.or.jp.

Received for publication September 9, 2003; revision received January 20, 2004, and accepted January 20, 2004.

TRANSFUSION 2004;44:934-940.

have already been circulating and HEV has recently been recognized as an important causative agent of sporadic hepatitis of non-A, non-B, non-C aetiology in Japan. In endemic countries where fecal-oral routes of HEV transmission are common, it is suggested that there is a potential risk of transfusion-transmitted hepatitis E, because HEV viremia is known to appear in the early stage of infection and a significantly higher seroprevalence was observed in transfused hemodialysis patients compared to blood donors.²¹ In India, where HEV is endemic, two cases of transfusion-transmitted hepatitis E were reported but they were not confirmed by molecular approaches.²² Here we report a probable case of transfusion-transmitted hepatitis E in Japan, where HEV had been believed not to be endemic. Sequence analysis showed the isolates of both donor and patient appeared to be identical.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the patient

In July 2002, a 67-year-old Japanese male patient (S.K.), who had never been abroad, received a transfusion of blood products from 23 voluntary donors during open-heart surgery. Although he was discharged 24 days after the operation, he was hospitalized again for acute hepatitis of unknown etiology with elevated levels of ALT and AST and bilirubinemia. He was followed-up for 134 days after the operation and his blood samples were collected periodically and stored below -20°C until testing.

Transfused blood samples

Twenty-three blood products from the 23 voluntary donors, 14 FFP units, 8 RBC units, and 1 PLT unit, were transfused to the patient during the operation and their stored blood samples were examined virologically including for HEV RNA.

The Japanese Red Cross Blood Centers have implemented a storing system of blood samples for every unit of donated blood since September 1996 to assess adverse effects of transfusion. All of the samples are stored below -20°C until testing.²³

Blood donor samples with elevated ALT levels

There were 559,545 blood donations in Hokkaido from October 2000 through April 2002. Of these, 15,285 (2.7%) were disqualified because of an elevated ALT of greater than 60 IU per L. Of these, 40 had an ALT level of greater than 500 IU per L and tested negative for the presence of HBV and HCV by NAT. Among them, the samples of 18 donors, 16 men and 2 women, were subjected to RT-PCR testing for the presence of HEV RNA. These samples were stored below -20°C until testing.

RT-PCR for HEV RNA detection

Detection of HEV RNA was performed by nested RT-PCR targeting two distinct regions within ORF1. For 365 nucleotides (nt) within the methyltransferase-coding region, corresponding to nt 105 to 469 of JRA1 strain,⁷ RT-PCR was carried out as described previously by Takahashi et al.⁸ and a template for direct sequencing was prepared by the second-round PCR with the sense degenerate primer M13/HE5-2 (5'-GTTTCCAGTCACGACGCCYT KGCGAATGCTGTGG-3') and a mixture of antisense degenerate primers M13/HE5-3 (5'-CAGGAAACAGCTAT GACTCRAARCAGTARGTGCGGTC-3') and HE5-6 (5'-CAGGAAACAGCTATGACTYAAAACAGTAGGTTTCGATC-3'). M13 sequences for direct sequencing are underlined.

To amplify sequences within the hypervariable and proline-rich hinge region, corresponding to nt 2127 to 2464 of JRA1 isolate, seminested RT-PCR was performed as described above with the sense primer HE-V1 (5'-ACCTGGGAGTCAGCCAAT-3') and the antisense primer HE-V2 (5'-AACCAAGTACACTCAGACTCAAAG-3') for the first-round PCR and internal sense primer HE-V3 (5'-TATACTCGCACCTGGTTCGG-3') and HE-V2 for the second-round PCR.

Sequence analyses of PCR products

The amplification products were sequenced on both strands with a cycle sequencing kit (PRISM BigDye Terminator, Version 2, Applied Biosystems Japan Ltd, Tokyo, Japan) and a genetic analyzer (Prism Model 3100 or 3700, Applied Biosystems Japan Ltd). The PCR product of a 326-nt region was sequenced with M13 primers, M13/RV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') and M13/M4 (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'). For the PCR product of the hypervariable region, the same primers for the second-round PCR were used for sequencing. The sequences determined were analyzed with computer software (GENETYX-Win, Version 5.2, Software Development, Tokyo, Japan). The sequences were aligned together with reported HEV strains with a computer program (CLUSTAL W, Version 1.8).²⁴ A phylogenetic tree based on the 326-nt region within ORF1 was constructed by the neighbor-joining method²⁵ and the final tree was obtained by a computer program (TreeView, Version 1.6.6).²⁶ Bootstrap values were determined by resampling 1000 of the data sets.

The nucleotide sequence data reported in this article will appear in DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession numbers AB113303 and AB113311 for HRC-SK, AB113304 and AB113312 for HRC-IM, AB113305 for HRC-HE1, AB113306 for HRC-HE2, AB113307 for HRC-HE3, AB113308 for HRC-HE4, AB113309 for HRC-HE5, and AB113310 for HRC-HE6.

ELISA for HEV antibodies

Samples were tested for IgM and IgG antibodies to HEV by ELISA that used virus-like particles as antigen that were produced in baculovirus-infected insect cells.¹⁹

Assays for viral markers other than HEV

Antibody assays to viruses other than HEV were performed with commercially available kits: anti-HAV IgM (AxSYM HA-M, Version 2.0, Abbott Laboratories, North Chicago, IL), anti-CMV IgM (Celltite SEIKEN Cytomegalo, Denka Seiken Co. Ltd, Tokyo, Japan), anti-EBV IgM and IgG (Diagnostics VCA-Test BML IgG and IgM test, BML, Inc., Tokyo, Japan), anti-HCV (AxSYM HCV, Abbott Laboratories), anti-HBc (AxSYM HBcAb, Abbott Laboratories), and anti-HBs (AxSYM AUSAB, Abbott Laboratories). HBsAg was assayed with AxSYM HBsAg (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). HBV DNA and HCV RNA were assayed with NAT probe assays (DNA Probe FR-HBV, REBIOGEN, Inc., Tokyo, Japan; and Amplicor GT HCV Monitor, Roche Diagnostics, Berkeley, CA, respectively), according to the instructions of each company.

RESULTS

Clinical course of the patient

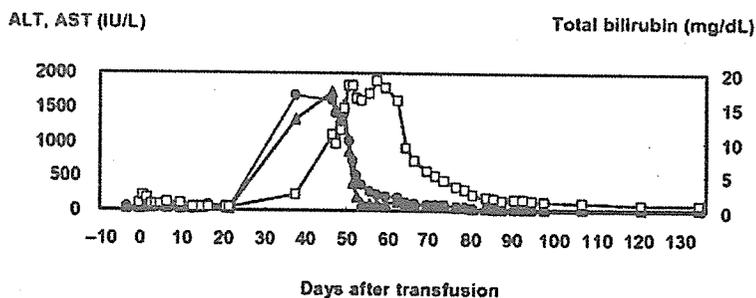
The clinical course of the patient (S.K.) is summarized in Fig. 1. When he was hospitalized again for acute hepatitis, he had an elevated ALT level of 1595 IU per L and an AST level of 1727 IU per L on Day 46 after transfusion; these normalized within 1 month, whereas the total bilirubin level rose to 11.0 mg per dL 2 weeks after the maximum ALT and AST elevation. His clinical state was improved 96 days after the transfusion. The retrospective testing of his blood sample from 4 days before the operation showed that he was negative for the presence of anti-HAV IgM, anti-CMV IgM, anti-EBV IgM, anti-HCV, HCV RNA, HBsAg, and HBV DNA.

In contrast, IgM and IgG class antibodies against HEV were detectable in his plasma sample on Day 37 after transfusion. HEV-RNA was detected from the serum sample of Day 37 and viremia lasted at least until Day 85 post-transfusion. HEV markers were not positive in his blood sample at 4 days before the operation. The IgG anti-HEV continued to be positive for 134 days after transfusion when last tested.

HEV testing of transfused blood

The 23 samples of transfused blood were tested for the presence of HEV RNA to determine whether the HEV was transfusion transmitted. HEV-RNA was detected in one of 23 samples of transfused blood to the patient. The donor I.M. a 24-year-old Japanese woman living in Hokkaido, had a normal ALT level of 10.0 IU per L at the time of donation and IgM- and IgG-class anti-HEV was not detectable (Table 1). FFP from this donor (I.M.) was transfused to the case patient (S.K.). The RBC product from the HEV-positive donation was transfused to another patient, Y.M. A following study revealed that patient Y.M., who had lymphoma showed no sign of hepatitis, clinically, virologically, or serologically of follow-up after transfusion. Neither HEV-RNA nor anti-HEV were detected in his blood 130 days after transfusion.

A blood sample from the HEV-positive donor's (I.M.) previous donation (15 months before the case donation) was available for testing. The sample was negative for the presence of HEV RNA or IgM- and IgG-class anti-HEV and had an ALT level of 8.0 IU per L. Five months after the case donation, the donor had seroconverted with IgM and IgG anti-HEV and HEV RNA was not detectable at that time (Table 1). On interview by telephone, donor I.M. had not been out of Japan during the incubation period and no



Day	-4	37	46	51	66	78	85	93	106	120	134
HEV RNA	-	+	+	+	+	+	+	-	NT	NT	NT
Anti-HEV IgM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anti-HEV IgG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 1. Clinical course of the patient with hepatitis E and the testing results for HEV. The ALT (●), AST (▲), and total bilirubin levels (□) are also shown.

	ALT (IU/L)	HEV RNA	Anti-HEV	
			IgM	IgG
Previous donation (-15 months)	11	-	-	-
Case donation	10	+	-	-
Follow-up exam (+5 months)	8	-	+	+

* += positive; - = negative.

clinical sign or symptoms of hepatitis during a follow-up of 5 months after the case donation.

HEV sequence study with PCR products from the donor and the patient

The PCR products of donor I.M. and patient S.K. were compared to each other for sequences corresponding to a 326-nt region encoding methyltransferase within the ORF1 of the HEV genome. The sequence (HRC-IM) of the PCR product from the transfused blood that was positive for the presence of HEV RNA showed complete identity with that (HRC-SK) from patient S.K.'s blood at 37 days after transfusion. According to Schlauder and Mushahwar's classification of HEV,²⁷ these isolates were segregated to genotype IV and were very similar to JKK-Sap and JSY-Sap,⁹ which were isolated from hepatitis E patients living in Hokkaido (Fig. 2). JKK-Sap was different by only 1 nt at position nt 261 and JSY-Sap by two nucleotides at the positions nt 261 and nt 330, based on the JKK-Sap sequence, respectively. The amino acid sequences were completely identical for these strains. Furthermore, for the 307-nt proline-rich hinge region of ORF1, the isolates from donor I.M. and patient S.K. showed complete identity.

Detection and analysis of HEV RNA in donors with elevated ALT

Six of the stored samples from 18 donors with elevated ALT levels higher than 500 IU per L, who were all men and aged 29 to 48 year, were positive for the presence of HEV RNA (Table 2). Phylogenetic analysis based on the 326-nt sequence of the ORF1 indicated that isolates of HRC-HE2, HRC-HE4, and HRC-HE5 were segregated to genotype III, and HRC-HE1, HRC-HE3, and HRC-HE6 as well as HRC-IM, to genotype IV (Fig. 2). All four strains of genotype IV were very closely related to each other with 99.4 to 100 percent identity in this region. HRC-HE1 and HRC-HE3 were completely identical with JKK-Sap. The addresses of HEV-positive donors were not concentrated in a particular area but widely distributed over Hokkaido.

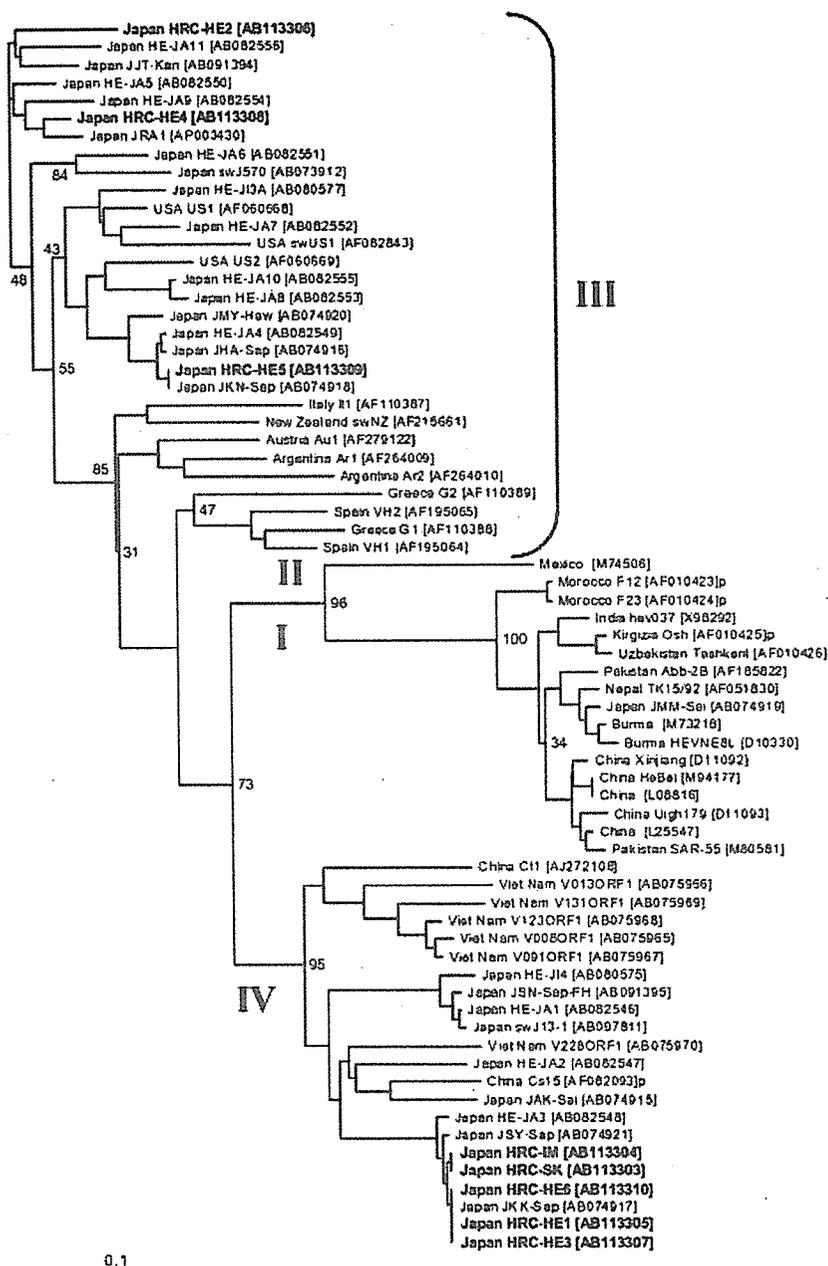


Fig. 2. Phylogenetic tree based on a 326-nt region of ORF1 for HEV strains derived from the case donor HRC-IM and patient HRC-SK and six donors with elevated ALT of greater than 500 IU per L. Accession numbers for the reference sequences are indicated parentheses. The isolated strains in this study are shown in boldface. Bootstrap values are indicated for the major nodes as a percentage of the data obtained from 1000 resamplings.

Although HRC-HE1 and HRC-HE3 showed identical sequences, the two donors lived in different cities, and there was a time lag of 6 months between their donation dates.

Because some of the donors with a high ALT level were repeat donors, samples from different donations could be