

報 告

Occult HBV carrier による感染事例から得られた知見について

梶本 昌子¹⁾ 藤井 基裕¹⁾ 松本 善行¹⁾ 石井 博之¹⁾
宮田 義久¹⁾ 稲葉 頌一¹⁾ 星 友二²⁾ 鈴木 光²⁾
柚木 久雄²⁾ 田中 正嗣³⁾ 丸田 壱郎³⁾

¹⁾神奈川県赤十字血液センター

²⁾日本赤十字社中央血液研究所

³⁾神奈川県立がんセンター

(平成 17 年 12 月 5 日受付)

(平成 18 年 4 月 3 日受理)

2004 年 10 月に医療機関から輸血後 HBV 感染が疑われる症例が報告された。この患者に輸血された 33 本全てについて個別核酸増幅検査(個別 NAT)を行ったところ、一人の献血者から得られた血液が陽性と確認され、患者と当該血液の HBV-DNA sequence はほぼ一致し、因果関係が認められた。この献血者は、54 歳男性で過去 11 年間に 78 回の献血歴があり、HBs 抗原陰性で個別 NAT が所々で陽性となる occult HBV carrier であった。同献血者の血液は、過去 3 回、輸血後 HBV 感染の疑いとして報告された患者に使用されていた。報告を受けた時点では、個別 NAT が全て陰性であったため、感染の因果関係が立証できなかった。今回、過去の 3 例のうち 2 例について、発病時の患者検体と献血者血液の HBN-DNA に相同性(99.8~99.9%)が認められ肝炎の原因血であったことをほぼ証明することができた。さらに献血者の過去 40 回分の保管検体について個別 NAT を行うことができた。輸血後 6 カ月以上の調査が可能であった 12 名の受血者は全て血液疾患患者で化学療法時に輸血をうけていた。うち 4 名は輸血後血清学的 HBV マーカーの陽転化が認められたが、他の 4 名に陽転化は認められなかった。本症例は、個別 NAT を実施してもすべての occult HBV carrier を検出するのは困難であることを証明した。また免疫機能低下患者においては、個別 NAT 陰性である occult HBV carrier の血液により感染するだけでなく、肝炎を発病することが明らかとなった。

キーワード：低濃度 HBV キャリア (occult HBV carrier)、個別 NAT、HBs 抗原、B 型肝炎

はじめに

今般、医療機関からの感染症・副作用報告によって急性 B 型肝炎症例が報告され、調査した複数の献血血液保管検体のうち 1 本が個別の核酸増幅検査(nucleic amplification testing : NAT)で B 型肝炎ウイルス(HBV)陽性と確認された。この血液と患者由来の HBV-DNA の塩基配列はほとんど一致していた。そこで、この献血者の献血歴を調査したところ、70 回を超える献血歴があり、HBs 抗原・ミニプール NAT は常に陰性で、個別 NAT が時々陽性となっていた。さらに過去の感染症報告に挙げられた 3 つの事例にこの献血者由

来血が使用されていたことが判明し、うち 2 例では患者血液と献血者血液の双方の HBV-DNA 塩基配列がほぼ一致した。これまで、HBV 感染のきわめて初期、HBs 抗原、HBV-DNA 両者陰性のウインドウ期献血から急性 B 型肝炎を発病したという感染報告が見られ^{1)~3)}、また、occult HBV carrier による感染が示唆されている⁴⁾⁵⁾。今回、一連の感染事例を遡ることによって、個別 NAT でも検出されない低濃度の HBV を保有する occult HBV carrier の血液が感染原因であることが明らかになった初めての症例なので報告する。

対象・方法

1. 発端事例

2004年10月医療機関から輸血後HBV感染症の疑い事例が神奈川県赤十字血液センターに報告された。患者は50歳代男性、原疾患は急性骨髄性白血病で、2003年10月に発症し、2004年1月15日、非血縁同種骨髄移植を施行された。骨髄ドナーのB型肝炎マーカーは、HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体すべて陰性であった。2004年9月30日、骨髄移植後の定期検診でHBs抗原の陽転化が判明した。HBe抗原陽性、ALT 317IU/L AST 258IU/Lであった。患者の輸血期間は2003年10月24日～2004年2月4日で、合計33本の輸血を受けていた。内訳は濃厚血小板(PC-10)18本、洗浄赤血球(WRC-2)6本、赤血球M・A・P(RC-M・A・P-2)9本であった。

これら被疑血の献血時保管検体について個別核酸増幅検査(個別NAT)を実施したところ、2004年1月21日に輸血されたPC-10単位がHBV-DNA陽性と判明した。当該血と患者のHBV genotypeはともにgenotype C, subtypeはadw, pre-core領域のコドン28がstop codonに変異したmutant virusであることが判明した。

2. 当該献血者の保管検体の調査

当該献血者は、50歳代男性で1994年4月～2004年4月までの10年間に78回の献血歴があり、すべての献血時の感染症検査において血清学的検査及びプールNATは陰性であった。また、当該発端事例献血(2004年1月19日)以降も5回の献血歴があり、同様に検査結果は陰性であった。

当該献血者の献血時保管検体が直近の献血40回分について保管されていたので、個別NATによる調査を実施した。

3. 遡及調査

78回の献血のうち、保管検体による調査が可能な40回分の献血血液から、70製品(血漿分画製剤用原料血漿も含む)が製造され、そのうち医療機関に供給されたものは31製品で、内訳は、PC 28本、RC-M・A・P 1本、FFP 2本であった。これらについて遡及調査を実施し、患者(以下「受血者」)の感染情報を収集した。

4. 検査方法

受血者のB型肝炎ウイルス関連マーカー検査として、HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体検査をEIA法と凝集法で行なった。さらに受血者と当該献血者の個別NATを実施した。HBV-DNA陽性となったものについては、HBV-DNA定量試験ならびに受血者と当該献血者のHBV塩基配列を決定し、相同性を比較した。解析領域は、 α 領域1,550 bp (PreS, S領域を含むP領域の前半部分: nt 2,333～3,215/1～667)を用い、塩基配列は、PCR direct sequencing法により決定した⁶⁾。

結果

1. 当該献血者保管検体の調査結果 (Table 1)

当該献血者の保管検体について個別NATを実施した。その結果、発端事例以降の献血は、すべて50プールNAT陰性、個別NAT陽性であり、発端事例以前のNo. 9, 13, 33を含めて40検体中9検体が個別NAT陽性であった。個別NAT陽性血の、HBc抗体検査では、EIA法陽性、HI法は低力価(2～2.5管)を示し、ウイルス量は100 copies/ml未満であった。このことから当該献血者は、低濃度のウイルスをもつoccult HBV carrierであることが示唆された。

2. 遡及調査

1) 既感染症報告事例

過去に発生した医療機関からの感染症報告事例の被疑血にNo. 10, 19, 40の製品が含まれていることが判明した。当時の調査では、各事例とも被疑血の個別NATはすべて陰性で、輸血との因果関係が認められなかった。

2) 供血血液および受血者情報

供給された31製品のうち同一患者に2製品が使用されていたため、受血者は30名であった。受血者の多くは血液疾患患者で、内訳は、血液疾患24名、その他3名、不明3名となっていた。受血者のうち、19名は原疾患のためすでに死亡していた。

3. 発端事例の献血時の各種HBVマーカーと対応する受血者感染情報 (Table 2, Table 3)

輸血後の検査が実施済みまたは可能であった15名のうち、輸血前HBs抗原陽性(1名)、HBc

Table 1 ID-NAT results of preserved blood samples of the propositus donor

Blood donation		Component	HBV assays		Blood donation		Component	HBV assays	
No.	Date		Screening	ID-NAT	No.	Date		Screening	ID-NAT
1	2004/04/12	PC + PPP	-	+	21	2002/01/21	PC + PPP	-	-
2	2004/03/25	PC + PPP	-	+	22	2001/12/28	PPP	-	-
3	2004/03/10	PC + PPP	-	+	23	2001/11/21	PC + PPP	-	-
4	2004/02/23	PPP	-	+	24	2001/10/29	PPP	-	-
5	2004/02/06	PC + PPP	-	+	25	2001/10/09	PC + PPP	-	-
6	2004/01/19	PC + PPP	-	+	26	2001/09/14	PC + PPP	-	-
7	2003/12/29	PC + PPP	-	-	27	2001/08/25	PC + PPP	-	-
8	2003/12/04	PC + PPP	-	-	28	2001/07/31	PPP	-	-
9	2003/10/22	PC + PPP	-	+	29	2001/07/17	PC + PPP	-	-
10	2003/09/22	PC + PPP	-	-	30	2001/06/26	PC + PPP	-	-
11	2003/07/28	PPP	-	-	31	2001/06/07	PC + PPP	-	-
12	2003/07/14	PC + PPP	-	-	32	2001/05/22	PC + PPP	-	-
13	2003/06/09	PC + PPP	-	+	33	1999/08/16	PPP	-	+
14	2003/01/13	PC + PPP	-	-	34	1999/07/29	PC + PPP	-	-
15	2002/12/12	PPP	-	-	35	1998/07/31	PPP	-	-
16	2002/08/28	200	-	-	36	1997/10/16	FFP	-	-
17	2002/06/15	PC + PPP	-	-	37	1997/08/17	PC + PPP	-	-
18	2002/05/22	PC + PPP	-	-	38	1997/07/05	PC + PPP	-	-
19	2002/04/22	PC + PPP	-	-	39	1997/06/08	PPP	-	-
20	2002/03/14	PPP	-	-	40	1997/05/17	PC + PPP	-	-

No. 6 : The propositus case

PC : Platelet concentrates, PPP : platelet poor plasma

Screening : Serological test (HBsAg, HBsAb, HBcAb) and pool NAT (pool size 50 or 500)

ID-NAT : individual Nucleic acid amplification test by the Japanese Red Cross standard method

■ : infection report from hospital

抗体・HBs抗体陽性(2名)と既往感染が明らかな3名を除いた, 12名について受血者の感染状況を調査した. 感染成立4名, 感染の疑いあり2名, 初回不顕性感染あるいは既往感染の疑い2名, 感染なし4名であった.

1) 感染成立(4名)

輸血後にHBV感染が認められ, ウイルスの塩基配列まで一致したものは, 発端事例を含め, No. 6, 7, 10, 19の4名であった. またNo.6以外は, 輸血製剤の個別NATは陰性であった.

①No.6 その後の調査では, 輸血後581日の検体で, HBV-DNA陽性(100copies/ml未満)と持続感染中であった.

②No.7 輸血後324日の検体でHBV-DNAのみ陽性(100copies/ml未満), 輸血後384日の検体では, HBV-DNAは陰性化し, HBc抗体EIA法陽性(Inh% 60%台)となった. その後もHBc抗体

EIA法陽性(Inh% 60%台), HBs抗体陰性のままであった. その間, 肝機能異常は認められなかった.

③No.19 受血者はその後, キャリア化した, 輸血後976日の検体では, HBVは陰性化し, HBs抗体は検出されなかった.

2) 感染の疑い(2名)

①No.40 過去の感染症報告事例で, 検体量少なくウイルスの塩基配列の確認はできなかった.

②No.17は輸血後954日の検査では, HBs抗体, HBc抗体陽性. 受血者は, 輸血1カ月後に肝炎を発症していたが, その時の患者検体が残っておらず, ウイルスの塩基配列の調査ができないため, 輸血によるものか, 輸血前からの既感染によるものかは不明であるが, 感染の疑いありの可能性も考えられた.

3) 初回不顕性感染あるいは既感染(2名)

Table 2 HBV markers of the occult HBV donor at each donation and response of transfused recipients

No.	Donor				Recipients																
	Date of Donation	Blood Component	anti-HBc (HI)	anti-HBs NAT	Date of Transfusion	Disease	Age	Sex	Pre-test			Post-test				subtype	genotype	Sequence homology	peak ALT (IU/L) (Week)	HBV infection	
	HBs Ag	anti-HBs	anti-HBc	Day					HBs Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBV-NAT									
1	2004.4.12	PC-10	× 4	-	2004.4.14	MDS	50s	M	ND	ND	ND	231	-	ND	-	-	-	-	No		
3	2004.3.10	Ir-PC-10	× 4-× 8	-	2004.3.12	MDS	70	M	ND	ND	ND	250	-	+	-	-	-	-	suspected SC		
6	2004.1.19	PC-10	× 4-× 8	-	2004.1.21	AML	51	M	-	ND	ND	253	+	-	+	adw	C	99.8%	1,165 (42)	+	
7	2003.12.29	Ir-PC-10	< × 32	ND	2003.12.31	AML	31	M	-	ND	-	324	-	-	+	adw	C	99.9%	-	+	
9	2003.10.22	PC-10	× 4	ND	2003.10.24	ML	10	M	-	ND	ND	379	-	+	-	-	-	-	-	suspected SC	
10	2003.09.22	PC-10	< × 32	ND	2003.9.24	ALL	72	F	-	-	-	73	+	-	+	adw	C	99.8%	-	+	
12	2003.7.14	Ir-PC-10	< × 32	ND	2003.7.16	ALL	50	M	-	ND	ND	561	-	-	-	-	-	-	-	-	No
17	2002.6.15	Ir-PC-10	< × 32	ND	2002.6.18	MDS Leukaemic change	65	M	-	-	-	954	-	+	+	-	-	-	-	suspected acute hepatitis	
19	2002.4.22	PC-10	< × 32	ND	2002.4.23	ALL	2	F	-	ND	ND	237	+	-	+	adw	C	99.8%	1,85 (8)	+	
21	2002.1.21	PC-10	< × 32	ND	2002.1.22	HM	7	M	ND	ND	ND	1,165	-	-	-	-	-	-	-	-	No
31	2001.6.7	Ir-PC-10	< × 32	ND	2001.6.8	HM	48	M	-	ND	ND	1,348	-	-	-	-	-	-	-	-	No
40	1997.05.17	PC-10	× 4	ND	1997.5.19	AML	48	M	-	-	ND	211	+	-	+	-	-	-	-	1,252 (26)	+

No. : Number of preserved samples
 HI, haemagglutination inhibition test : AML, acute myeloblastic leukemia : ML, malignant lymphoma : MDS, myelodysplasia syndrome : ALL, acute lymphoblastic leukemia : ND
 not done : SC, seroconversion : No, no evidence of transmission
 ■ : previous infection report

Table 3 Clinical course of recipients

	Number of cases	ID-NAT	
		Positive	Negative
transmit	4	1	3
seroconversion (SC)	2	0	2
suspected SC without previous sample	2	2	0
previously infected	3	1	2
not infected	4	1	3
Unknown	15	2	14 *
Total	30	7	24

* Two units was transfused for the same patient.

①No. 3, 9 輸血血液の個別 NAT は陽性。輸血前の検査結果は不明で、輸血後 HBs 抗体, HBc 抗体陽性であった。この輸血による感染によるものか、輸血前からの既感染によるものかは不明であった。

4) 感染なし (4名)

No. 1, 12, 21, 31 は輸血後の検査で HBV 関連マーカーは全て陰性で感染は認められなかった。

4. 核酸の塩基配列の比較 (Fig. 1)

発端事例の当該献血者と No. 6, 7, 10, 19 の受血者検体の HBV の塩基配列を解析したところ 2~3 カ所を除き一致した。No. 40 については、検体量が少なく塩基配列の確認はできなかった。

No. 6 は、両検体 (当該献血者: 受血者) において nt26 (C : A), nt44 (A/G : G 当該献血者検体では A と G の 2 種類の塩基が検出されたが、受血者では G のみが検出された), nt657 (C : T) の 3 カ所を除き一致 (homology 99.8%) した。また CP (core promoter) /PreC 領域 233bp (nt1,699~1,921) の塩基配列を決定した結果、両者とも pre core のコドン 28 がストップコドンとなった変異株であり、nt1,887 (G : A) に相違があった。

No. 7 は、nt44 (A/G : G), nt657 (C : T) の 2 カ所 (homology 99.9%), No. 10 は、nt44 (A/G : G), nt651 (C : CT), nt657 (C : T) の 3 カ所 (homology 99.8%) を除き一致した。

No. 19 は TA クローニング法を用いて塩基配列を決定した結果、2 種類の株 (Fig. 1 No. 19-1, 2)

が存在し、nt44 (A/G : G), nt651 (C : T), nt657 (C : T) しか相違のない株 (Fig. 1 No. 19-1) と、その 3 カ所に加えさらに 11 カ所の相違がある株 (Fig. 1 No. 19-2) が分離された。約 3 カ月半後に採血した検体では、No. 19-1 と同一の配列を持つ株 (Fig. 1 No. 19-3) のみ検出され、No. 19-2 が存在したかどうかの確認はできなかった。

考 察

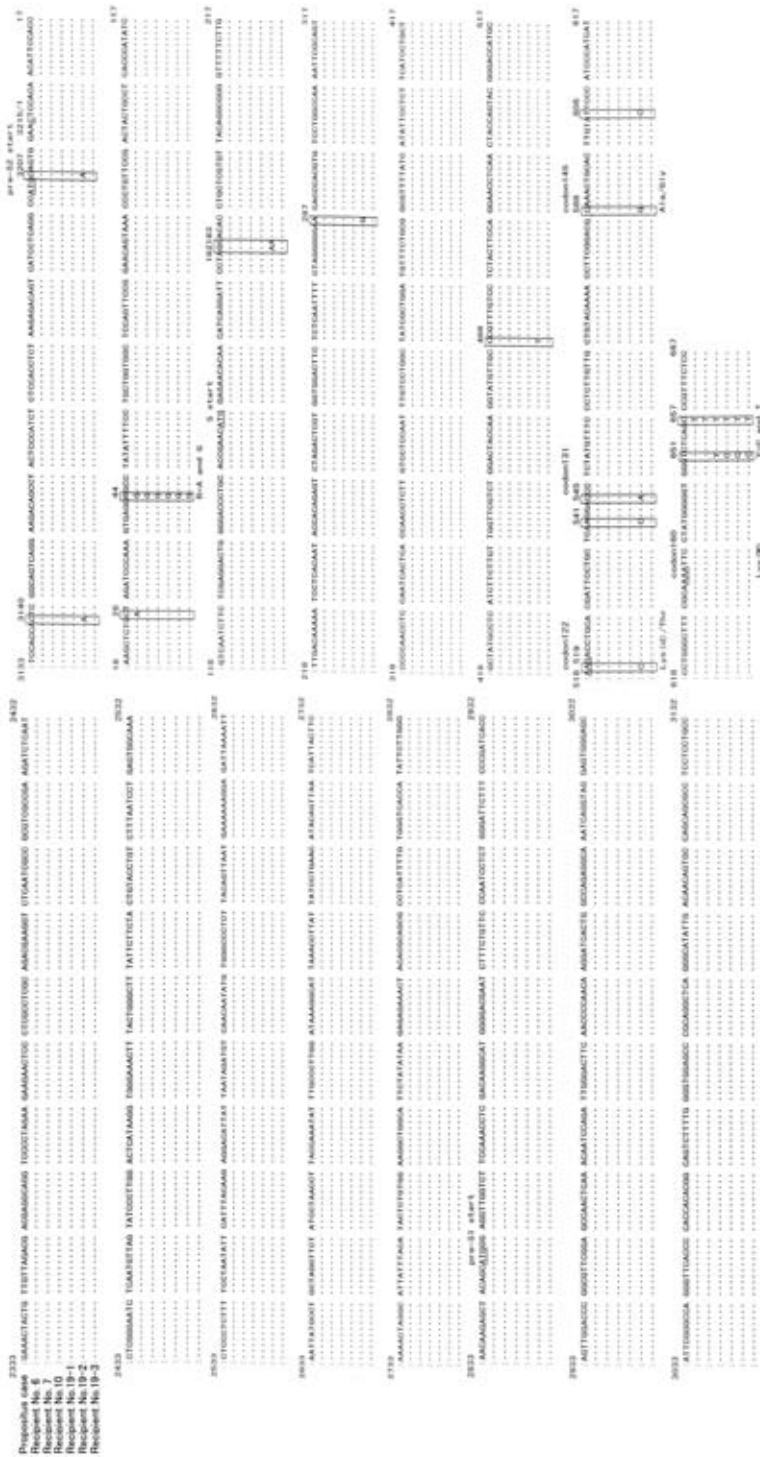
医療機関からの感染症報告を発端として、occult HBV carrier による輸血後 B 型肝炎発症例を経験した。

同じ献血者の血液が、過去 3 回、輸血後 HBV 感染症の疑いとして報告された患者に使用されていた被疑血に含まれていた。報告を受けた時点では、被疑血の個別 NAT が全て陰性であったため、感染の因果関係が立証できなかった。今回、過去 3 例のうち 2 例について、発生時の患者血液検体が保管されており、この血液と今回個別 NAT 陽性となった献血者血液の HBV-DNA 塩基配列が 99.8% の一致率であったところから、感染症伝播の原因血であったことを強く示唆していた。また、たとえ個別 NAT 陰性であっても、B 型肝炎ウイルスにより患者が感染するだけでなく発病することが明らかとなった。

同時に血液センターがどれほど検査精度向上に努めても完全には感染を阻止できないという検査限界を示すことになった^{7,8)}。唯一の可能性は高感度 HBc 抗体検査の導入⁹⁾であるが、例えば酵素免疫測定法では献血者の 20% が陽性となるというデータがあり、現時点で直ちに導入すると血液事業に支障をきたす可能性が高い (日赤内部資料)。

一方、受血者の側にも特徴があり⁴⁾、化学療法や骨髄移植で強く免疫抑制にさらされた時期の輸血が 30 例中 24 例を占め、健常者が外傷などで輸血を受けるケースでは occult HBV carrier からの感染が成立し得るのかデータは得られなかった。

今後、occult HBV carrier の輸血を受けた免疫機能が正常な患者症例の蓄積が必要である。いずれにせよ、血小板は頻回成分献血者に依存する割合が高く、輸血される患者も血液疾患など免疫不全状態である可能性が高い。今回の調査ではこの



The DNA sequences (from nt. 2333-3215/1-667) of the HBV of this donor and 4 patients showed were determined, and 99.8% homology. The phylogenetic analysis showed all HBV isolated were classified into genotype C.

Fig. 1 Sequence analysis of the early part of the P region, which includes the preS and S regions (nt2, 333-3, 215/1-667)

ようにHBVが低濃度であっても感染のリスクが高いことは明らかであった(感染成立割合4/12; 33%)。

したがって、頻回に血小板輸血を必要とする治療を受ける患者は、医療側の予防対策が重要である。すなわち、治療前のHBワクチン、高力価HBガンマグロブリン投与により、B型肝炎ウイルスに対する免疫力を高めておくか、定期的なNATを初めとする精密検査で感染の早期発見に努めることである。早期発見できれば、必要に応じてlamivudineやadefovir dipivoxilなどの投与によって発病前にウイルスを抑制できると思われる。

血液センター側の対策としては、感染症報告で調査対象となった被疑献血者を登録しておき、二回対象となった時点でoccult HBV carrierの可能性が高いとして排除することが考えられるが、実施についてはさらに検討する必要がある。輸血による感染症は輸血用血液がヒトを原料とする限り根絶できない問題であることを改めて教えられた症例であった。

まとめ

・医療機関からの感染症報告を発端として、occult HBV carrierによる複数の感染症例を確認した。

・プールNATスクリーニングで検出できないoccult HBV carrierを発見でき、感染症報告の重要性が立証された。

・遡及調査により個別NATでも核酸が検出されない陰性血によるケースで感染が実証された。

・血液疾患患者は、HBVが低濃度であっても感染のリスクが高いものと考えられた。

第53回総会推薦論文(本論文の要旨は平成17年5月28

日、第53回日本輸血学会総会(浦安)で発表した。)

謝辞：今回の調査にご協力いただいた各医療機関、各診療科の方々に深謝いたします。また情報収集に協力いただいた各地域の赤十字血液センターの担当者に感謝いたします。

文 献

- 1) Elghouzzi MH, Courouce AM, Magnius LO, et al : Transmission of hepatitis B virus by HBV-negative blood transfusion. *Lancet*, 346 : 964, 1995.
- 2) Momose S, Endo M, Yoshimatsu A, et al : Post-transfusion hepatitis type B transmitted by blood from a polymerase chain reaction (PCR) assay negative donor. *Vox Sanguinis*, 74 (Suppl. 1) : OS-1000, 1998.
- 3) http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3760b1_06_busch/ (2006年3月現在)
- 4) Allain JP : Occult hepatitis B virus infection : implication in transfusion. *Vox Sanguinis*, 86 : 83—91, 2004.
- 5) Michael Torbenson and David L Thomas : Occult hepatitis B. *Lancet*, *Infect Dis*, 2 : 479—486, 2002 (Review).
- 6) 大沼 均, 室川宏之, 日本赤十字社 NAT 研究グループ : NAT スクリーニングで見出された日本ではまれな B 型肝炎ウイルス genotype A のゲノム解析. *血液事業*, 25 : 563—573, 2003.
- 7) Satake M : Infectious risks associated with the transfusion of blood components and pathogen inactivation in Japan. *Int J Hematol*, 80 (4) : 306—310, 2004.
- 8) Coste J, Reesink HW, Engelfriet CP, et al : Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology : up to 2003. *Vox Sanguinis*, 88 : 289—303, 2005.
- 9) Mosley JW, Stevance CE, Aach RD, et al : Donor screening for anti-body to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion*, 35 : 5—12, 1995.

CASE REPORT OF INFECTION BY AN OCCULT HBV CARRIER

Shoko Kajimoto¹, Motohiro Fujii¹, Yoshiyuki Matsumoto¹, Hiroyuki Ishii¹, Yoshihisa Miyata¹,
Shoichi Inaba¹, Yuji Hoshi², Kou Suzuki², Hisao Yugi²,
Masatsugu Tanaka³ and Atsuo Maruta³

¹Kanagawa Red Cross Blood Center

²Japanese Red Cross Central Blood Laboratory

³Kanagawa Cancer Center

In October 2004, a case of Hepatitis B infection was reported to the Kanagawa Red Cross Blood Center. Individual nucleic amplification testing (ID-NAT) was performed to study 33 preserved blood samples of donors whose blood had been transfused to the patient. One donor, a 54-year-old male who had donated 78 times during the past 11 years, was found to be positive by ID-NAT. We had previously received reports from different hospitals of three patients with hepatitis. At that time, although a retrospective study was performed using ID-NAT, all the preserved blood samples were negative. Surprisingly, all three patients had received apheresis platelet concentrates derived from the propositus donor. DNA sequence analysis of the HBV of this donor and of three of the four patients revealed 99.8-9% homology and all were genotype C conclusively confirming that the hepatitis B was transmitted from this donor. We have succeeded in following-up the 12 patients for at least six months after transfusion. All had hematological malignancies and had been transfused during chemotherapy. Four patients did not show any change in serological markers where as four were positive, with transmission confirmed by changes in serological markers.

To our knowledge, this case is the first to demonstrate that it is not possible to detect all occult HBV carriers, even by the use of ID-NAT. Furthermore, this case demonstrates that even when a sample is ID-NAT-negative, blood from an occult HBV carrier is a possible source of HBV infection for immunocompromised patients.

Key words : hepatitis B transmission, occult HBV carrier, ID-NAT
