

3. Human Pathology. 32(7):757-62, 2001.

Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay.

Tanaka N, Kimura H, Iida K, Saito Y, Tsuge I, Yoshimi A, Matsuyama T and Morishima T.

Journal of Medical Virology. 60(4):455-62, 2000.

4. Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2.

Kimura H, Ito Y, Futamura M, Ando Y, Yabuta Y, Hoshino Y, Nishiyama Y and Morishima T.

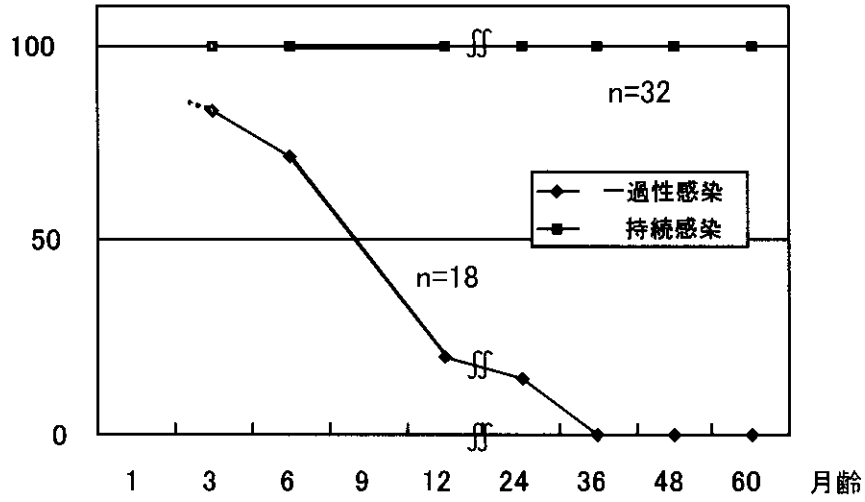
Journal of Medical Virology. 67:349-53, 2002

H. 知的所有権の取得状況

特になし

図1 持続感染児と一過性感染児の PCR の推移

PCR陽性率(%)



(sGPT)

図2 sGPT の推移

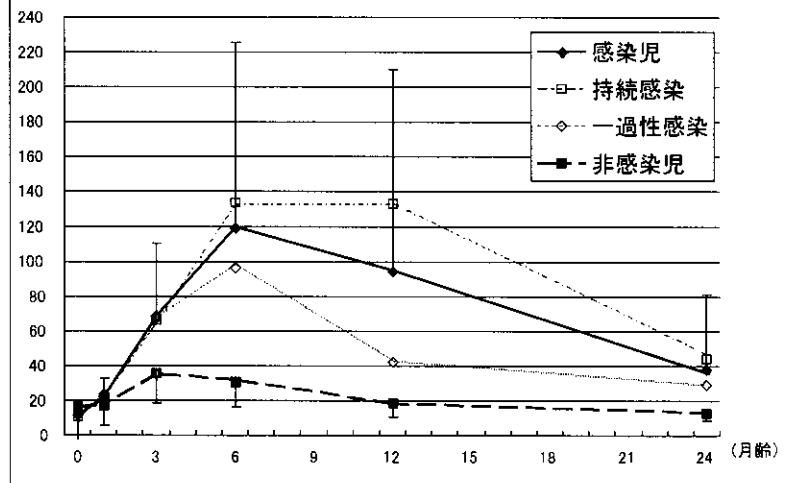


表 1 HCV 母子感染のリスクファクター(母親側)

各因子	感染群	非感染群	有意差検定	有意差
1 母親の年齢	31 歳	30歳	P=0.375	無
2 母親の肝炎歴 有	26.5 %	29.6 %	P= 0.749	無
3 母親の輸血歴 有	37.5%	29.7 %	P= 0.471	無
4 妊娠中毒症 有	0 %	11.5%	P=0.026	有
5 妊娠中の肝機能(ALT : IU/L)	19.5	44.8	P= 0.145	無
6 妊娠中 PCR(HCVRNA)陽性(%)	100%	76.9 %	P=0.001	有
7 妊娠中HCVRNA定量・ブランチ法(5meq $\leq$ )	80.0%	38.4%	P= 0.031	有
8 妊娠中 PCR(HCVRNA)定量(10 <sup>6</sup> copy $\leq$ )	47.0%	0 %	P= 0.018	有
9 分娩所要時間 全体	142分	320分	P=0.001	有
10 分娩所要時間初産婦	121分	309分	P=0.014	有
11 分娩所要時間経産婦	177分	349分	P= 0.010	有
12 破水から分娩までの所要時間	835分	300分	P=0.185	無
13 帝王切開の実施(%)	13.3%	22.7 %	P= 0.160	無

表 2 ゲノタイプと児への感染

	1b	2a	2b
感染群	20	5	4
非感染群	8	1	1

有意差なし (P=0.409)

表 3 帝王切開と母子感染率

	母子感染有	母子感染無	感染率
帝王切開有*	6	15	28.6%
帝王切開無	39	51	43.3%

有意差無し(P=0.160)

※ただし、緊急帝王切開が多かった。

表 4 母乳授乳の有無と児への感染

	母乳授乳有	母乳授乳無
感染群	40	5
非感染群	62	15

\* 母乳授乳有:1度でも母乳授乳したことがある症例

\* 有意差無し(P=0.171)

表 5 HCV 母子感染のリスクファクター

各因子	感染群	非感染群	有意差検定	有意差
1 児の在胎日数	274日	272日	P=0.443	無
2 出生時体重	2978g	2906g	P=0.470	無
3 アプガースコアー1分後	8.7	8.4	P=0.242	無
4 アプガースコアー5分後	9.5	9.1	P=0.080	無
5 生後6ヶ月時のALT	119IU/L	30.6IU/L	P<0.001	有

表 6

	第二子以降 感染率	第二子以降 非感染率	有意差検定	有意差
第一子の感染有	13.6%	19.2%	P=0.604	無

図1 感染群のPCRの推移

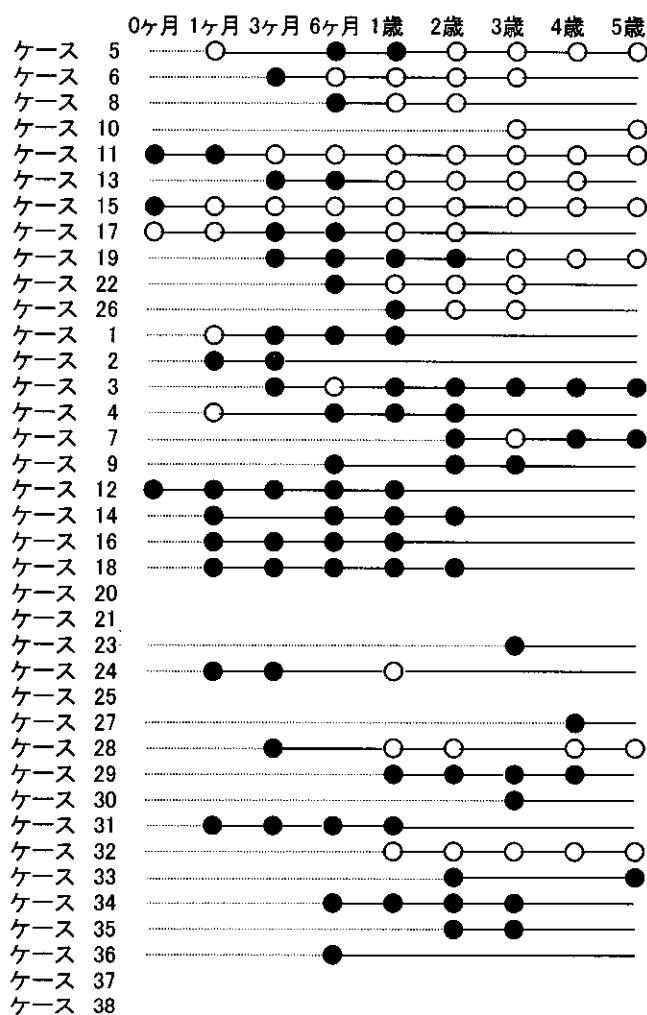
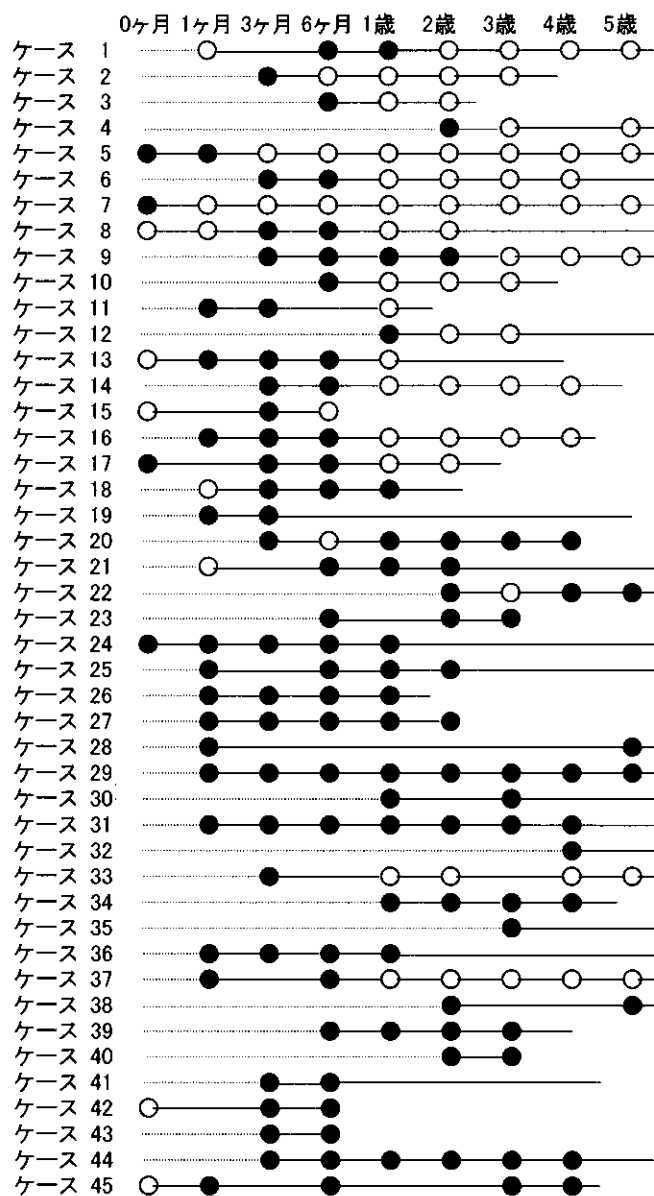


図3 感染群のPCRの推移



(ケース1~17:一過性感染、ケース18~45:持続感染)

C型肝炎ウイルス母子感染の疫学、要因、予後調査研究

鳥取大学周産期小児医学 白木和夫, 神崎 晋, 長田郁夫, 飯塚俊之, 岡本 学,

細田淑人, 村上 潤

鳥取大学ウイルス学 日野茂男

**研究要旨:** (目的) HCV 母子感染の危険因子を疫学的に調査検討した. また母子感染を成立させるクローンを明らかにするために, 高比重分画 (HDF) と低比重分画 (LDF) に存在する hypervariable region (HVR) を比較した. (対象と方法) 鳥取県内の HCV 陽性妊婦を HCV 抗体でスクリーニングし, HCV RNA 量, エピトープ特異的抗体, 周産期の因子を検討した. HCV 母子感染例 4 例について血清を LDF と HDF に分離し, 各々 HCV 15 クローンについて経時的に解析した. (結果) 21,791 例の妊婦のうち 84 例 (0.39%) が HCV RNA 陽性で, 7 例の母子感染例 (12%) を見出した. この 7 例は全例経膈分娩で出生し, 高ウイルス量群に限れば, 母子感染は帝王切開例よりも有意に高率で (44% vs 0%;  $p=0.023$ ), また感染例の NS4 抗体陽性率は非感染例の陽性率よりも有意に低かった ( $p=0.048$ ). 経膈分娩例において感染例の HCV RNA 量は非感染例よりも有意に高値であった. HVR の検討では, 生後 1-2 ヶ月時の HVR は単一ないし複数のクローンが存在し, 全て母親と同じ群に属していた. 児にみられたクローンの中には母親の 25-40% を占めたクローンも含まれ, また母親の HDF や, LDF, HDF 両方に存在するクローンが多くみられた. 抗体価が最も低くなる前に LDF クローンに変化がみられた. (結論) 母体の高ウイルス量が HCV 母子感染の重要な危険因子の一つであり, さらにこのような症例が経膈分娩した場合, 母子感染率が高くなることを明らかにした. 児に感染したクローンは必ずしも母親の LDF に存在するクローンや単一の少数のクローンのみではないと考えられた. また児のクローンの進化は児の免疫反応, おそらくは細胞性免疫, によって惹起されると考えられた.

**A. 研究目的**

C型肝炎ウイルス (HCV) は感染後長期にわたって持続感染することが知られており, また成人では長期持続感染後, 肝硬変, 肝癌を発生する. 成人の肝癌の過半数は HCV をその発生原因としているが, HCV の感染経路は主に血液製剤を介す

るものであった. しかし, 近年原料血液の HBV, HCV などのスクリーニング技術が進んできたため, これらのウイルスが混入する危険が減少してきているため, 今後は母子感染が主要な感染経路になるものと推察される. しかし HCV 母子感染の予防法は確立されていないため, 母子感染例は発生

しつづけている。将来的に、母子感染の危険因子や予防法が確立していけば、このようなHCV新規感染が更に減少してくると考えられる。私達はHCV母子感染の成立頻度、危険因子を明らかにするために、疫学的に調査検討した。

HCV のゲノム内にある超可変領域 (hypervariable region, HVR) は宿主免疫系の標的であり、宿主の免疫監視機構から逃れるため連続的な変異を生ずる。このためHCVには1つの個体の中で様々な clone が存在する状態 (quasispecies) が知られている。一方でHCVには比重の異なる粒子が存在することが知られており、これらは高比重分画 (high-density fraction, HDF) と低比重分画 (low-density fraction, LDF) に存在するとされる。このうちHDF粒子は抗体が結合している、あるいは抗体によりエンベロープが失われていると考えられており、intact とされるLDF粒子より感染性が低いと考えられている。母子感染例のHCV HVRの進化、感染するHCV粒子の種類を明らかにするため、母子感染例4組の母子間でHDF、LDFに存在するHCV HVRを比較検討した。

## B. 研究方法

1992年5月から1998年12月までに鳥取県内で出産した妊婦のうち、同意の得られたのべ21,791例を第2世代HCV抗体(PHA法)でスクリーニングし、コア抗体(Western blot法)でHCV抗体陽性を確認した。抗体陽性者においては、nested RT-PCR法によりHCV RNAを検出し、branched DNA assay (bDNA法)でHCV RNA量を定量した。またエピトープ特異的抗体

(core, NS3, NS4, NS5領域)を測定した (Sympep HCV-EIA II)。出生した児は県内の小児科において1, 3, 6, 9, 12ヶ月時と以後6ヶ月毎に3歳までHCV抗体、HCV RNAを測定した。その他、周産期の危険因子として輸血歴、肝機能障害歴、在胎週数、胎盤重量、分娩時出血量、母乳栄養の有無を検討した。

追跡調査を行った7例の母子感染児のうち4例(症例1-4)についてHVRの経時的変化を検討した。対象例は全てgenotype 1bであった。症例2, 3は同胞で、症例1-3は人工栄養哺育、症例4は混合栄養哺育であった。

症例1-4とその母親の血清を比重1.063 g/cm<sup>3</sup>のNaCl溶液で超速心を行い、LDFとHDFに分離し、各々からRNAを抽出した。HVRに対するnested PCR産物をp-BlueScriptのEcoRV切断部位に挿入後クローニングした。各時点で母子それぞれのLDF、HDFから得た15クローンについて塩基配列を決定し、その塩基配列を元にアミノ酸配列を決定した。アミノ酸の変異が3個未満のものは同じ群に分類した。

## C. 研究結果

### a. 妊婦HCVスクリーニングと感染頻度

スクリーニングを行った21,791例の妊婦のうち127例(0.58%)がHCV抗体陽性であり、このうち84例(0.39%)がHCV RNA陽性であった。今回の検討において、HCV抗体陽性者から出生した児のうちで、6ヶ月以上経過観察が可能であった症例は84例であった。これらの児の9組に同胞があり(同胞1人8組、同胞2人1組)、結果として検討に加わった母親は73例であった。このうちHCV RNA陽性であった母親は50例で、HCV



RNA 陽性の母親から出生した児は 59 例であった。この中で、5 例の母親から出生した児 7 例から 2 point 以上にわたって HCV RNA が検出され、HCV 母子感染例と考えられた。母子感染率は、HCV 抗体陽性例より出生した時の 8%、HCV RNA 陽性例より出生した児の 12%であった。他の 77 例の児から採取された検体からは HCV RNA は検出されなかった。

#### b. 母子感染の要因

感染例の母親と非感染例の母親の HCV RNA 量を比較し、感染例の母親の 0 パーセントイル値より HCV RNA 量  $2.5 \times 10^6$  copies/ml 以上を高ウイルス量群と定義し、以下の検討を行った (Figure 1)。

母子感染例 7 例は全例経膈分娩であり、帝王切開で生まれた児に感染例はなかった。HCV RNA 陽性妊婦より出生した児全例を対象とした場合、経膈分娩と帝王切開の間に感染率の有意差はなかったが、高ウイルス量群に限った場合、経膈分娩例の感染率は有意に高率であった (44% vs 0%;  $p=0.023$ ) (Table 1)。また、帝王切開例を除外し、経膈分娩例での母体の HCV RNA 量を検討したところ、感染例の HCV RNA 量は非感染例に比べ有意に高値であった (Table 2)。分娩時、経膈分娩では帝王切開に比べ母体血の児への移行量が多いことが報告されており、分娩様式による感染率の違いの原因となっている可能性が考えられる。

エピトープ特異的抗体については、高ウイルス群で比較して、感染例の NS4 抗体陽性率は非感染例の陽性率よりも有意に低かった ( $p=0.048$ ) (Table 4)。

その他の要因として輸血歴、肝機能障害歴、在胎週数、胎盤重量、分娩時出血量、栄養法を検討したが、感染例と非感染例との間に有意な差は認めなかった。

#### c. 感染した児の経過 (Table 4)

7 例中 6 例の臍帯血中の HCV RNA を検討したところ、3 例で検出されたが、全例 bDNA 法では陰性であった ( $10^5$  copies/ml 以下)。その後、全例生後 3 ヶ月以内に bDNA 法により  $10^6$  copies/ml 以上に増加していた。このことは、感染の時期は子宮内ではなく、分娩前後であることを示唆していると考えられる。1 例は肝障害が持続し慢性肝炎となり、3 例は HCV RNA は持続して陽性であったが、肝障害は軽度であった。3 例は HCV RNA 陽性であったが経過中に検出されなくなり、一過性の感染と考えられる経過であった。

#### d. 母子感染例における HVR の経時的変化

HCV 抗体価は最初の数ヶ月で減少し、生後 3-6 ヶ月で再び増加した。4 例中 3 例では抗体価再上昇の後にトランスアミナーゼ (ALT) の上昇を認めた。LDF に存在した HCV RNA の割合は、HCV RNA 量が増加した生後 2 ヶ月以内には 20%未満であったが、症例 1, 2, 4 では HCV RNA 量の増加した 2 ヶ月後、症例 3 では 8 ヶ月後に 50%前後にまで上昇した。LDF の割合がもっとも増加した時期は、HCV 抗体価が最も低下する時期に一致していた。LDF のクローンの変化は生後数ヶ月以内にみられ、HCV 抗体の最も低下する時期よりも早期であった (Figure 2)。

生後 2 ヶ月時以内には症例 1 では単一のクローンを認めるのみであったが、症例 2 では 3 種類、

症例3,4では5種類のクローンが存在した。症例1-3の2ヶ月以内のクローンは全て母親の血清中に存在するものと同じであったが、その多くはLDF, HDF両方に存在した。児の血清中に多数存在するクローンが母親の分娩時の血清中に占める割合は、症例1では7/30, 症例2では4/15, 症例3では12/30を占めていた(Table 5-8)。児にみられるHCV HVRが成人に比べ均一であることから単一のクローンのみが母子感染に関与するとした報告、母子感染に関与するクローンは母親に存在するクローンの中で希なクローンであるという報告があるが、本研究から母子感染に関与するクローンが単一のクローンのみ、あるいは希なクローンに限らないことが示された。

HDF HCVよりもLDF HCVの方が高い感染力をもつという従来の報告を考慮すると、母親のLDF HCVクローンが児に感染することが推察される。しかし本研究で示されたように、児に感染したクローンは母親のHDFや、LDF, HDF両方に存在するクローンが多く、母親のLDF HCVクローンが感染すると限らない。

LDF HCVの割合はHCV RNA量の上昇した数ヶ月後より増加し、そのピークは児の抗体価が最も低くなる時に一致していた。また、抗体価が最も低くなる前にLDFクローンに変化がみられた。このことよりLDFのHCVの増加とクローンの進化は母親からの移行免疫の消失と児のde novo免疫反応、おそらくは細胞性免疫の結果引き起こされると考えられた。

#### D. 結論

今回の検討において我々は母体の高ウイルス量がHCV母子感染の重要な危険因子の一つで

ある事を確認し、さらにこのような症例が経膈分娩した場合、母子感染率が高くなることを明らかにした。HCV母子感染に対する予防措置が確立していない現在、HCVに感染した妊婦の場合、ウイルス量を調べ、高ウイルス量の場合帝王切開を行うことも考慮されるべき選択であると考えられるが、その適応の決定については症例数を増やして検討していく必要がある。

母子感染例におけるHVRの解析より、児に感染したクローンは必ずしも母親のLDFに存在するクローンや単一の少数のクローンのみではないと考えられた。また児のクローンの進化は児の免疫反応、おそらくは細胞性免疫、によって惹起されると考えられた。

#### E. 研究発表

(論文発表)

1. 白木和夫, 長田郁夫: C型肝炎ウイルス(HCV)感染の疫学 HCVの母子感染. 臨床医28:19-21. 2002.
2. 白木和夫, 長田郁夫: 小児とC型肝炎—その疫学と治療—. 小児科臨床55:1725-1734. 2002.
3. 白木和夫, 長田郁夫: ウイルス性肝炎. 臨床と微生物29:515-517. 2002.
4. Shiraki K, Morishima T, Terasawa S, Koike M, Fujisawa T, Tajiri H, OPC-18 Study Group: Long-term virological response and growth rate of children with chronic hepatitis C who received natural interferon- $\alpha$ . Eur J Pediatr 161. 629-630. 2002.

(学会発表)

なし.

**F. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

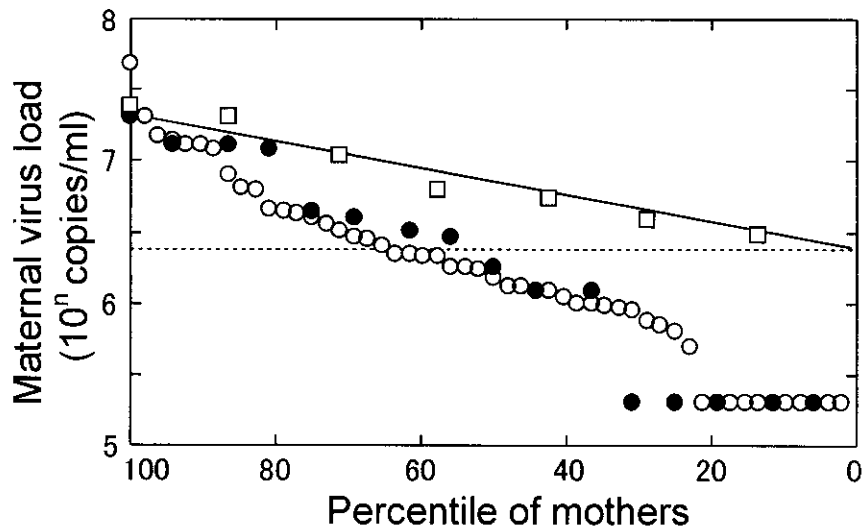
とくになし.

2. 実用新案登録

とくになし.

3. その他

とくになし.



**Figure 1.** Maternal virus load versus percentile of mothers positive for HCV RNA by RT-PCR (RNA+). Non-infectious mothers with vaginal delivery (open circles) and with cesarean section (closed circles), and infectious mothers (open squares). The virus load which was positive by the RT-PCR but negative by the bDNA assay was plotted at  $0.2 \times 10^6$  copies/mL. The dotted line indicates the virus load of  $2.5 \times 10^6$  copies/mL.

**Table 1.** HCV 母子感染と分娩様式

Based on	Delivery	No. enrolled*	No. positive	% positive	P <sup>†</sup>
<b>Ab+ mothers</b>					
Mothers	Vaginal	45	5	11	<i>0.159</i>
	Cesarean	23	0	0	
Children	Vaginal	50	7	14	<i>0.045</i>
	Cesarean	28	0	0	
<b>RNA+ mothers</b>					
Mothers	Vaginal	36	5	14	0.304
	Cesarean	14	0	0	
Children	Vaginal	41	7	17	0.089
	Cesarean	18	0	0	
<b>HVL mothers</b>					
Mothers	Vaginal	13	5	38	0.111
	Cesarean	8	0	0	
Children	Vaginal	16	7	44	<i>0.023</i>
	Cesarean	10	0	0	

Ab+ mothers, HCV 第2世代抗体陽性の母親; RNA+ mothers, HCV RNA 陽性の母親(RT-PCR 法,  $\geq 200$  copies/mL); HVL mothers, 高ウイルス量群の母親(bDNA 法,  $\geq 2.5 \times 10^6$  copies/mL). 母子感染した母親は全例高ウイルス量群であった.

\* 6 例の分娩様式不明例を除く.

<sup>†</sup> Fisher 直接確率法による.

Table 2. 経膈分娩した母親の HCV RNA 量の比較

Based on	No. tested	HCV RNA ( $\times 10^6$ copies/mL)		P*
		Average <sup>†</sup>	CI <sup>†</sup>	
Mothers <sup>‡</sup>				
Infectious	5	7.0	2.4 – 20.0	< .001
	31	1.5	0.9 – 2.3	
Noninfectious				
Children				
Infected	7	8.0	3.8 – 16.7	< .001
Uninfected	34	1.4	0.9 – 2.2	

Average, 平均値; CI, 95%信頼区間.

\* 対数変換後に Welch 補正した t 検定にて検討.

<sup>†</sup>bDNA 法で測定. bDNA 法で陰性の場合  $0.2 \times 10^6$  copies/mL で算出.

<sup>‡</sup> 複数の児を出生した 10 例の母親については第 1 子の時のウイルス量で算出.

Table 3. HCV RNA 陽性母における anti-core, NS3, NS4, NS5 抗体の陽性率

Mothers <sup>a</sup>	No. tested	anti-Core		anti-NS3		anti-NS4 <sup>c</sup>		anti-NS5		
		No. positive	%	No. positive	%	No. positive	%	No. positive	%	
Infectious <sup>b</sup>	5	5	100	3	60	1	20	2	40	
Noninfectious										
RNA+	43	43	100	29	67	24	56	17	40	
HVL	16	15	100	11	69	12	75	5	31	
HVL & VAG	7	7	100	5	71	5	71	1	14	

a. 母親の区分の仕方は Table 1.を参照.

b. 母子感染した母親は全例高ウイルス量群かつ経膈分娩.

c. フィッシャーの直接確率法により有意差あり(P = .048).

Table 4. HCV 母子感染児の HCV RNA 量の推移

ID of infected child		HCV RNA		Infantile age in months*		
Mother	Order	Maternal	Cord	1	3	6
29	1	11	+	58	58	34
29	2	20	-	50	65	nt
49	1	3.8	nt	11	37	1.3
53	1	3.0	-	9.0	8.7	5.1
53	2	6.2	-	nt	1.6	< 0.5
66	1	2.9	+	6.8	80	65
131	1	5.4	+	10	nt	2.2

+: HCV RNA 陽性, -: HCV RNA 陰性, nt: 未検査

\* HCV RNA 量(bDNA 法,  $\times 10^6$  copies/mL).

† 分娩前 1 週間以内の母親の HCV RNA 量.

‡ HCV RNA(RT-PCR 法, 感度 200 copies/mL).

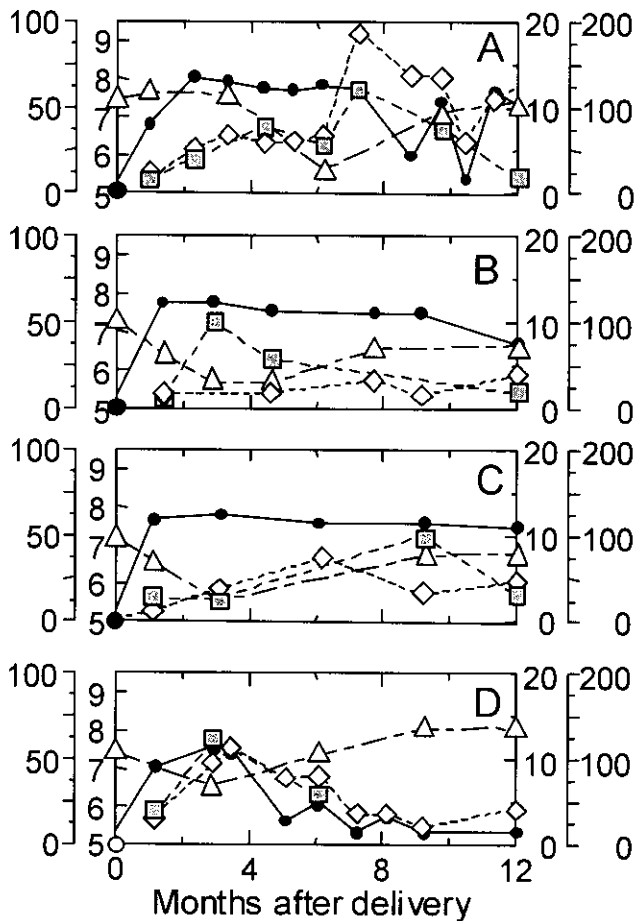


Figure 2. 症例 1-4 の臨床経過 (A - D). Proportion of HCV in LDF (%), HCV RNA 量 (bDNA 法, copies/mL), 第 3 世代 HCV 抗体 (COI: cut off index), 血清 ALT 値 (IU/L).

Table 5. 症例 1 の LDF と HDF における HVR の進化

Clone group*	AA sequence	Mother at delivery		Case 1 at			
		LDF	HDF	2 months		4 months	
				LDF	HDF	LDH	HDF
Gr101	ATRTIGGEAGRTTGSFTALFNAGSSQ K	2	9		15	4	11
Gr102	QS.....ASG. AG...P....		2				
Gr103	EAH. T..K.....A.....	2					
Gr104	.....A...R..VS..SP....	2					
Gr105	E. H. T....A...R..VG..SP....	9	4			11	4
Total		15	15	0	15	15	15

アミノ酸(aa)の 3 個未満異なるクローンは同じ群に分類.

Table 6. 症例 2 の LDF と HDF における HVR の進化

Clone group*	AA sequence	Mother at†				Case 2 at			
		- 6 months		+ 1 month		1 months		3 months	
		LDF	HDF	LDF	HDF	LDF	HDF	LDF	HDF
Gr201	ETHVTGGSAARTTMSFARFFAPGA SQK				1	11	5	15	14
Gr202	.....S. L. N...		4	3	2	4	10		1
Gr203	.....SSL. T...				3				
Gr204	.....Y..S....L. N...		4	12	9				
Gr205	.....Y..SG..GL. T...		6						
Gr206	...I..A..P..Y..SG..GL. T...		1						
Total		0	15	15	15	15	15	15	15

† -, 分娩前; +, 分娩後

Table 7. 症例 3 の LDF と HDF における HVR の進化

Clone group*	AA sequence	Mother at delivery		Case 3 at			
		LDF	HDF	1 month		9 months	
				LDF	HDF	LDF	HDF
Gr201	ETHVTGGSAARTTMSFARFFAPGASQK	2		5	1		1
Gr202	..... S. L. N. ....	3	2		6	6	6
Gr203	..... SSL. T. ....		4				
Gr304	..... H. . S. . . . L. K. ....	1	1				
Gr305	..... A. S. LT. L. .... H.	2					
Gr306	..... ASGLT. L. S. ....	1		4	2		
Gr307	... A. .... H. AS. LT. L. ... P. ...		1				
Gr308	..... HAASGLT. . L. . . P. . .	6	7	6	6	9	8
Total		15	15	15	15	15	15

\* イタリック体の群は症例 2 と共通.

Table 8. 症例 4 の LDF と HDF における HVR の進化

Clone group*	AA sequence	Mother at † + 3 months		Case 4 at			
		LDF	HDF	1 month		3 months	
				LDF	HDF	LDF	HDF
Gr401	TTRVSGGTAGHTTMGFTSLFSSGAQQK			4	5	10	13
Gr402	S. Y. .... A. N. K. . A. . . TL. SN. R			7	5	5	2
Gr403	S. Y. .... A. N. K. . A. . . . L. S. . .		1				
Gr404	S. Y. .... TAYN. R. L. .... L. S. . .	2	3	2			
Gr405	S. Y. .... A. A. N. R. L. .... L. S. . .		1				
Gr406	S. Y. .... ALN. R. L. .... PL. S. . .	8					
Gr407	N. Y. .... S. .... S. L. .... PL. S. . .	2					
Gr408	D. Y. .... S. .... S. LA. . . AP. QS. .	2	4				
Gr409	D. Y. .... S. . Y. . S. . A. . . P. QS. .	1		2	1		
Gr410	E. H. T. . S. AR. . SSLARFLAP. . S. .				4		
Gr411	..H. . . A. . . . . P. . . F. SR. N		5				
Gr412	D. Y. .... S. . Y. . S. . A. . . F. SR. N		1				
Total		15	15	15	15	15	15

† †, 分娩後



厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服緊急対策研究事業「C型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究」)  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究

分担研究者 藤澤知雄 防衛医科大学校 小児科 助教授  
乾あやの、小松陽樹 防衛医科大学校 小児科

研究要旨

HCVの母子感染の感染予測因子は母親のHCV RNA量が最も重要であった。HCVの母子感染の成立にはescape mutantは関与していないと考えられた。

A. 研究目的

- 1) C型肝炎ウイルス(以下、HCVと略)の母子感染の危険因子を解明する。
- 2) 感染例の経過ならびに予後を検討する。
- 3) 感染児と非感染児の免疫応答を検討して母子感染の感染機序を解明する。

年以上観察した。第2子はHCV持続感染が成立したが、第1子はHCV-RNAは持続陰性であった(図1)。母および児の血清よりRNAを抽出し、HLA A2のCTLエピトープを中心にウイルスの遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究について母親あるいは家族に口頭でインフォームド・コンセントをとり、その旨をカルテに記載した。

B. 研究方法

- 1) 1990年10月から2002年4月の間にHCV RNA陽性の母親から出生した児で6か月以上追跡可能であった症例を対象にして母子感染成立の危険因子として、a. 母親のHCV RNA量、b. 母親のserotype、c. 母親の妊娠中の肝炎歴、d. 分娩様式、e. 栄養法について検討した。ウイルス量の測定はcompetitive RT-PCR法により行った。
- 2) 前方視的にAST、ALT、HCV RNAを検査した。血液検査は、原則として月齢1、3、6、12、それ以降は1年毎検査し、感染児の長期予後について検討した。
- 3) C型慢性肝炎の母より出生した一卵性双子(母子ともにHLA A2陽性)を出生後4

C. 研究結果

- 1) 観察期間は6~108か月で平均35.5±25.2か月で、出生児は69例(男児41例、女児28例)、母親は53例で同胞は13組(2人:11組、3人:2組)で感染児は11例(15.9%)であった。

a. 母親のHCV RNA量(表1)

母親のHCV RNA量が判明したのは53例中42例(79%)であった。出生児は69例中55例(80%)であった。感染例11例と非感染例44例の母親のHCV

RNA 量は平均値で比較すると、感染例が  $10^{6.3 \pm 1.4}$  コピー/ml で、非感染例が  $10^{6.0 \pm 1.3}$  コピー/ml で両群間に有意差はなかったが、母親のウイルス量を  $10^{6.0}$  コピー/ml 以上とそれ未満で検討してみると、母親のウイルス量が  $10^{6.0}$  コピー/ml 以上が感染例では 11 例中 9 例 (82%)、非感染例では 44 例中 14 例 (32%) で有意に感染例の方が母親の HCV RNA 量が  $10^6$  コピー/ml 以上の症例が多かった ( $p=0.008$ )。

b. 母親の HCV serotype (表 2)

母親の HCV serotype が判明したのは HCV RNA 量が判明した 42 例中 30 例 (71%) で、その出生児は 55 例中 37 例 (67%) で判明した。37 例のうち、感染例は 10 例で非感染例 27 例で、serotype 1 は感染例では 5 例 (50%) で、非感染例では 16 例 (59%) であり両群間に有意差はなかった。

c. 母親の妊娠中の肝炎歴 (表 3)

母親の妊娠中の肝炎歴は、感染例 11 例中 3 例 (27%) に肝炎があったのに対し、非感染例では 58 例中 15 例 (26%) であり、両群間に差はなかった。

d. 分娩様式 (表 4)

経膈分娩が 52 例、帝王切開術例 (緊急帝王切開術を含む) は 17 例で、経膈分娩のうち感染例は 8 例 (15%)、帝王切開術例のうち感染例は 3 例 (18%) であり、分娩様式で感染率に差はなかった。

e. 栄養法 (表 5)

母乳栄養児 (1 回でも母乳を与えた児) は 50 例、完全人工栄養児は 19 例であり、母乳栄養児のうち感染例は 6 例

(12%)、完全人工栄養児のうち感染例は 5 例 (26%) で栄養法で感染率に差はなかった。

2) 11 例の感染児のうち、持続感染例が 5 例、自然寛解例 (無治療で HCV RNA が消失し、C 型慢性肝炎が治癒した症例) が 2 例、一過性感染例 (HCV RNA 陽性の期間が 6 か月以内で、HCV 抗体の一過性の上昇がみられた症例) が 4 例であった。

一過性感染例 4 例のうち、ALT 値が 70IU/l 以上を呈したのは 1 例のみであった。持続感染例と自然寛解例は全例でトランスアミナーゼ値の高値がみられ、自然寛解例は 4 歳までにトランスアミナーゼ値が正常化し (図 2)、かつ HCV RNA が陰性化した (図 3)。

3) Core - E2, NS3, NS4, NS5B 領域のサブクローニングおよびシーケンシングを行った。現在までに報告されている CTL エピトープの母子間のアミノ酸配列は、Hypervariable region (HVR) 以外はほとんど違いはなく、また、wild type のアミノ酸配列と比較して escape mutant の存在を示唆する配列はみられなかった。分子系統樹を用いた解析でも Core 領域と比較して HVR では著しい変異を認めた (図 4、5)。

#### D. 考察

HCV 母子感染率は 15.9% であり、今までの報告よりやや高いが、これは①当院に HCV RNA 陽性妊婦が紹介される頻度が高い可能性があること、②検査頻度を増やすことによって一過性感染例が発見される可能性があること、が推察された。

competitive RT-PCR 法で  $10^{6.0}$  コピー/ml 以上の母親から出生した児では有意に感染率が高く、海外の報告と同様にウイルス量の高い母親から出生した児は母子感染する危険性が高かった。母親の serotype や妊娠中の肝炎歴は関係なかった。我々の検討では分娩様式は、経膈分娩と帝王切開術では感染率に差はなかったが、これは緊急帝王切開術が含まれており、ヒ免疫不全ウイルスの母子感染のように予定帝王切開術が母子感染の危険性を減少させるかは今後の検討が必要である。母乳については完全人工栄養児であっても感染が 26%にみられ、母乳栄養児の 12%に比して多く、母親が血中 HCV RNA 陽性であることを理由に母乳を禁止する必要は見いだせなかった。

感染児では持続感染例あるいは自然寛解例では全例で肝機能異常がみられたが、トランスアミナーゼの推移からその予後を推察することは困難であった。しかし、一過性感染例ならびに自然寛解例は 4 歳までに全例 HCV RNA は消失していた。以上のことから、HCV 母子感染に対する治療は少なくとも 4 歳以降から考慮すべきである。

一過性感染例はその後第2世代 HCV 抗体も陰性化した。自然寛解例は最長 84 か月まで経過観察中であるが、第2世代 HCV 抗体は減少傾向にあるものの陰性化していない。

一方非感染例は 1 歳までに第2世代 HCV 抗体は全例で陰性化していた。その後、最長 108 か月まで経過観察しているが、この間に HCV RNA の再陽転化や第2世代 HCV 抗体の再陽転化はない。

母子感染成立には CTL に対する escape mutant の出現はなく、抗体に対する HVR の変異が持続感染に関与している可能性が示

唆された。今後、母および児の T 細胞機能を Tetramer および Elispot assay を用いて検討する予定である。

## E. 結論

1. HCV 母子感染は母親の HCV RNA 量が  $10^6$  コピー/ml 以上の高ウイルス量群で有意に感染率が高い。
2. 母乳から感染する危険性は低い。
3. HCV 母子感染には自然寛解例がみられ、4 歳までに寛解していた。従って、感染児に対する治療は 4 歳以降に考慮すべきである。
4. 非感染例はその後新たな水平感染をうける可能性は低い。
5. 母子感染成立には抗体に対する HVR の変異が関与している可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

藤澤知雄: C型肝炎とインターフェロン. 小児科別冊 (どのような時その薬を使うのか) :128-129, 2002

藤澤知雄, 乾あやの: HCV 母子感染の頻度と予後. 消化器科, 34: 345-352, 2002

藤澤知雄, 白木和夫. 肝臓疾患の診断と治療のガイドライン. 小児科臨床, 55: 1327-1334, 2002

Inui A, Fujisawa T, Sogo T, Komatsu H, Isozaki A, Sekine I :Different outcomes of vertical transmission of hepatitis C virus in a twin pregnancy.

J Gastroenterology and Hepatology,  
17: 617-619, 2002

乾あやの, 小松陽樹, 十河 剛, 藤澤知雄: 肝炎ウイルスとしてのTTV感染. 小児科, 43: 193-198, 2002

藤澤知雄, 小松陽樹, 十河 剛, 乾あやの: 小児期の肝炎ウイルスに対する治療. 小児科, 43: 1838-1848, 2002

Komatsu H, Fujisawa T, Sogo T, Isozaki A, Inui A, Sekine I, Kobata M, Ogawa Y: Acute self limiting hepatitis B after immunoprophylaxis failure in an infant. J Med Virology, 66: 28-33, 2002

H Komatsu, I Inui, T Fujisawa, O Pybus, E Holmes, P Klenerman. Evolution of hepatitis C virus after mother to child transmission – role of humoral and cellular immune responses. Immunology 107 supplement 1, 64, 2002

## 2. 学会発表

藤澤知雄, 乾あやの, 小松陽樹, 十河 剛, 磯崎 淳, 安國真理  
HCV母子感染の前方視的検討  
第37回日本肝臓学会総会 (2001, 5/17, 18, 横浜)

T Sogo, T Fujisawa, A Inui, N Shiki, H Komatsu, I Sekine

The risk factor of hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma in pediatric patients

6th International Symposium on Predictive Oncology & Intervention Strategies  
(2002, 2/9-12 Paris)

志岐紀子, 乾あやの, 石井茂樹, 十河 剛, 小松陽樹, 藤澤知雄, 関根勇夫  
B型肝炎ウイルス持続感染例における急性増悪の予後

第105回日本小児科学会  
(2002, 4/19-21 名古屋)

藤澤知雄, 乾あやの, 十河 剛, 小松陽樹, 志岐紀子, 藤塚 聡, 関根勇夫, 小杉武史\*

10歳になったHBV母子感染予防処置児のHBV感染状況  
第105回日本小児科学会  
(2002, 4/19-21 名古屋)

乾あやの, 志岐紀子, 石井茂樹, 十河 剛, 小松陽樹, 藤澤知雄, 関根勇夫  
インターフェロン療法非著効のC型慢性肝炎患児例

第105回日本小児科学会  
(2002, 4/19-21 名古屋)

藤澤知雄, 十河 剛, 小松陽樹, 乾あやの  
10歳以上になったHBV母子感染予防処置例のHBV感染状況  
第38回日本肝臓学会総会

(2002, 6/13, 14大阪)

乾あやの, 小松陽樹, 十河 剛, 小俣 真