

*、藤澤知雄

B型肝炎母子感染例におけるHBs抗原領域の分子生物学的検討
第38回日本新生児学会
(2002, 7/14-16, 神戸)

藤澤知雄、十河 剛、小松陽樹、乾あやの、
橋本卓史*、蜂矢正彦*
小児期におけるC型肝炎ウイルス(HCV)
持続感染例の解析
第19回日本小児肝臓研究会
(2002, 7/19, 20, 土浦)

藤澤知雄、十河剛、小松陽樹、乾あやの、
橋本卓史*、蜂矢正彦*
小児C型慢性肝炎に対する単独IFN治療
の効果と限界
第29回日本小児栄養消化器肝臓学会
(2002, 9/21, 22 高崎)

小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄
HCV母子感染でのウイルス遺伝子解析と
免疫応答の検討
第13回抗ウイルス化学療法研究会
(2003, 1/27-29 津田沼)

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 .
Joint Congress of the British Society for
Immunology and the British Society for
allergy and Clinical Immunology(2002,
12/3-6, Harrogate, UK)

表1. 母親のHCV RNA量と感染率の検討

感染	N	ウイルス量 ($\geq \log_{10} 6$)	
あり	11	9(82%)	p=0.008
なし	44	14(32%)	

感染	N	ウイルス量 ($\log_{10} N$)	
あり	11	6.3 \pm 1.4	NS
なし	44	6.0 \pm 1.3	

表2. 母親のHCV serotypeと感染率の検討

感染	N	Serotype(%)		
		1	2	
あり	10	5(50)	5(50)	NS
なし	27	16(59)	11(41)	

表3. 母親の妊娠中の肝炎歴と感染率の検討

感染 \ 肝炎 (%)		肝炎 (%)	
		あり	なし
あり	N=11	3(27)	8(73)
NS			
なし	N=58	15(26)	43(74)

表4. 分娩様式と感染率の検討

感染 (%)	分娩様式	
	経膣(N=52)	帝切(N=17)
あり	8(15)	3(18)
NS		
なし	26(85)	11(82)

表5. 栄養法と感染率の検討

感染 (%)	母乳(N=50)	人工(N=19)
あり	6(12)	5(26)
なし	44(88)	14(74)

NS

1st baby	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HCV RNA (copies/ml) 2nd baby	(-)	(-)	5.7×10^5	4.2×10^5	4.8×10^5	4.8×10^5	4.6×10^5	7.3×10^5

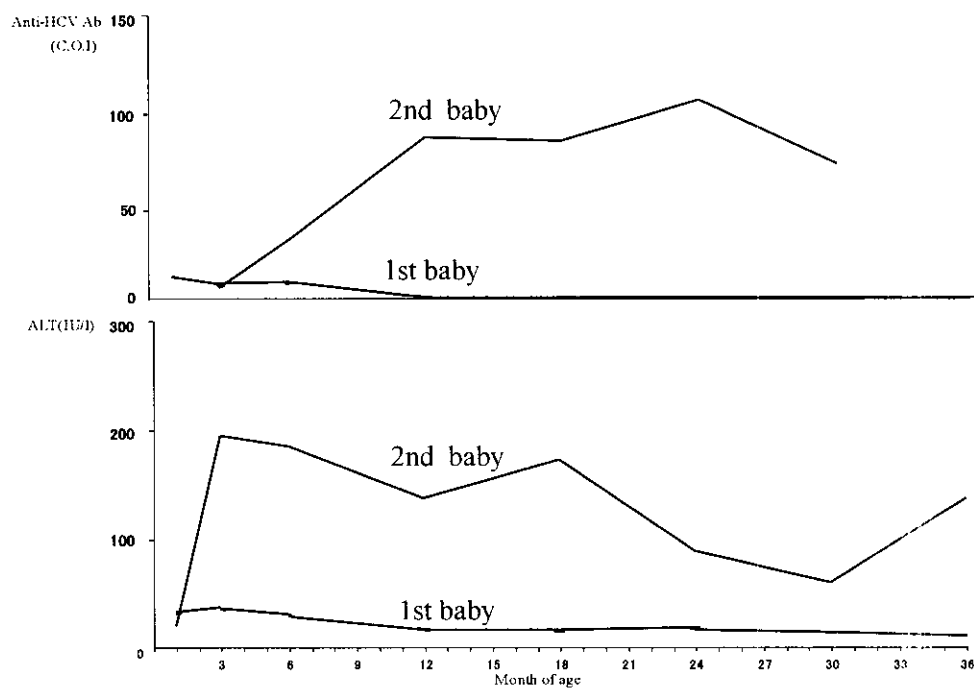


図1 一卵性双子のHCVマーカーおよび肝機能の推移

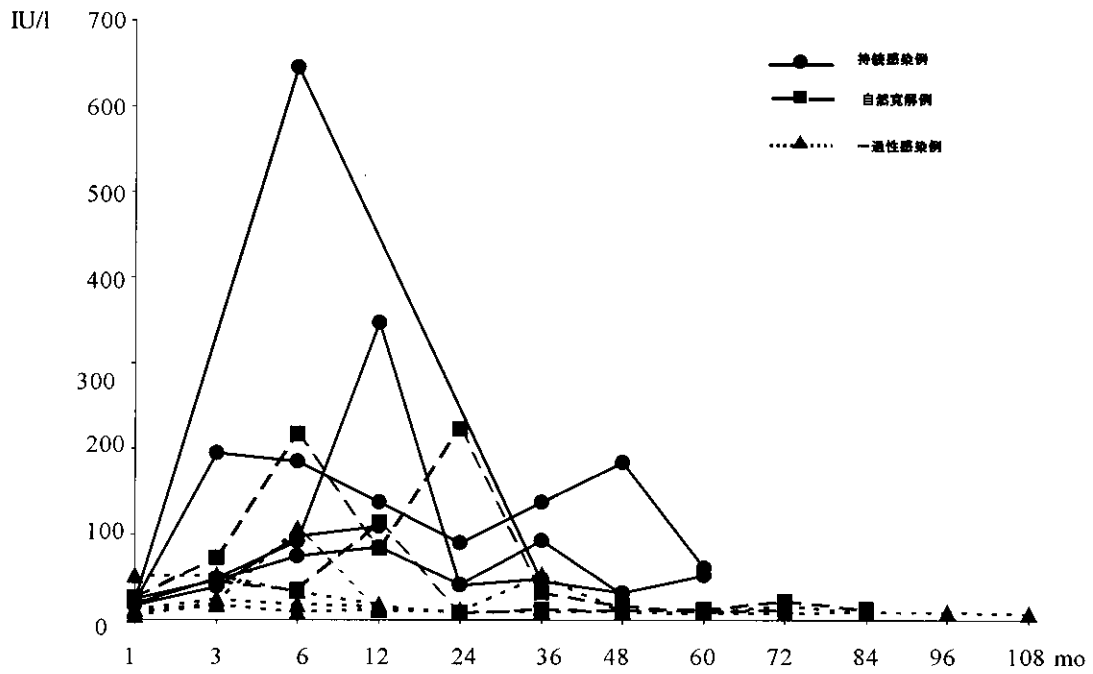
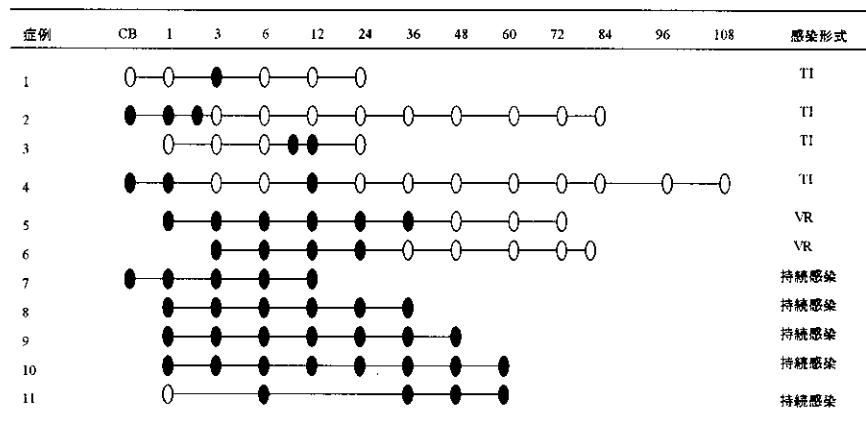


図2.感染例でのALT値の推移



Transient infection(TI):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るもの
 VR: virological remission

図3.感染児のHCV RNAの推移

図4 Core 領域(nt 278-581)の分子系統樹

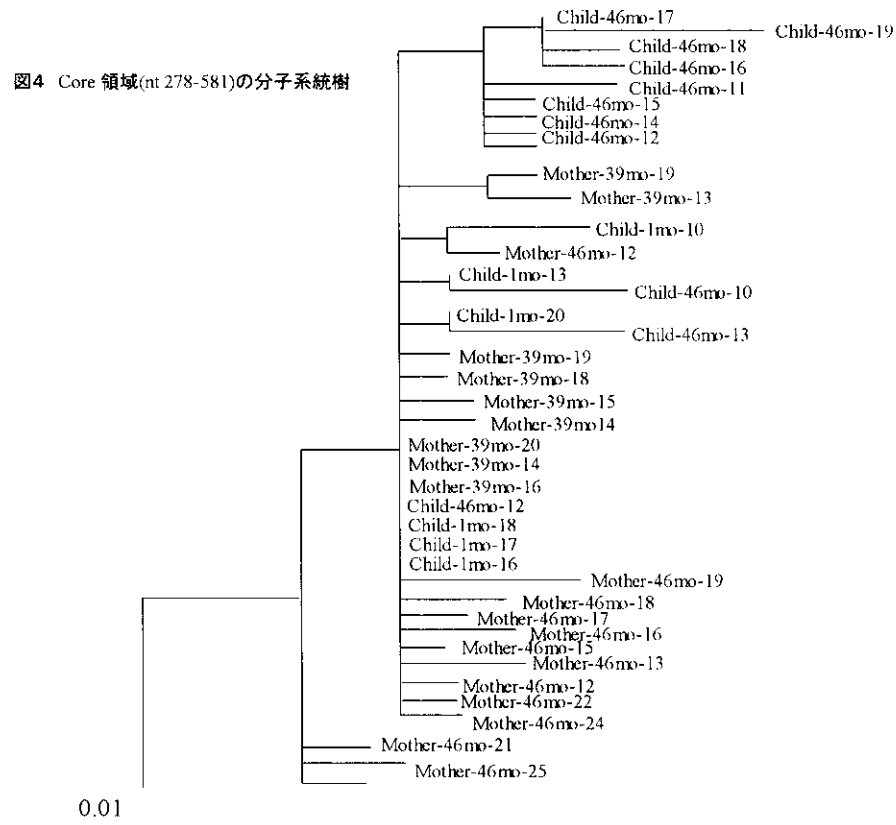
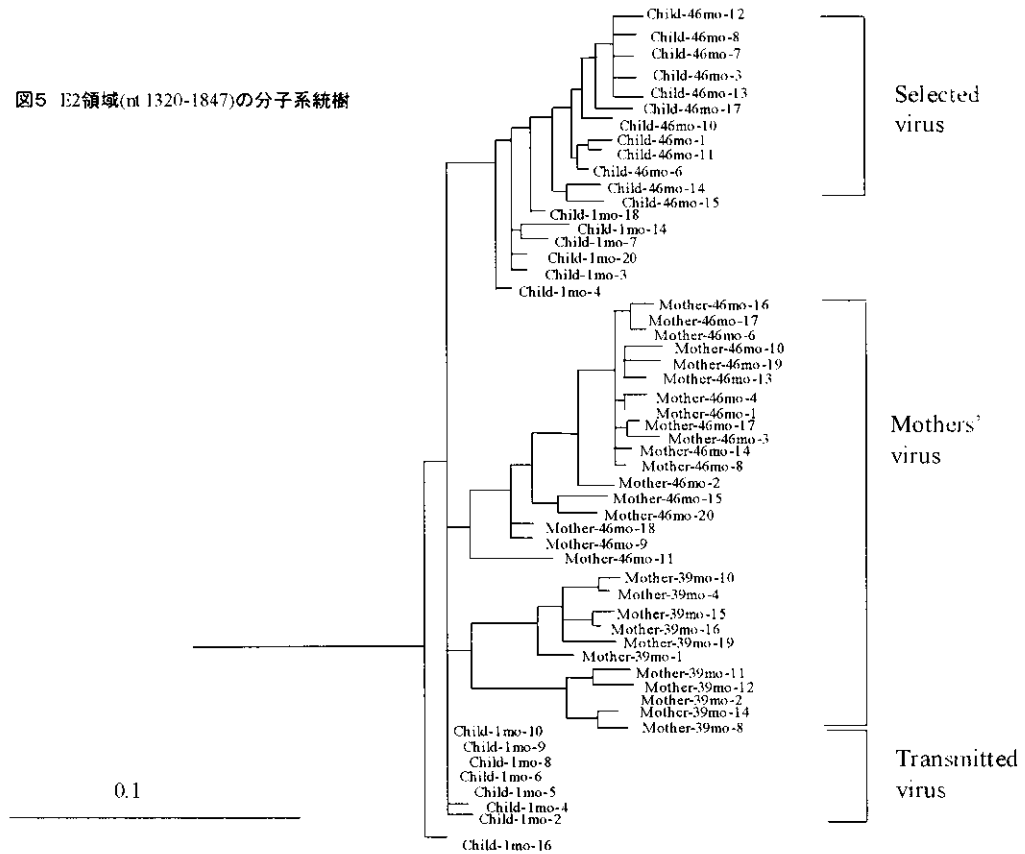


図5 E2領域(nt 1320-1847)の分子系統樹



大阪府におけるC型肝炎ウイルス母子感染に関する検討

分担研究者 田尻 仁 大阪府立病院・小児科部長

研究要旨 第1の研究として、C型肝炎ウイルスの母子感染の頻度と感染成立に関与する要因を検討した。108名の母親とその出生児114名を対象とした検討の結果、C型肝炎母子感染率は、HCV抗体陽性の母親からの出生児については7.8%であり、HCV-RNA陽性の母親からの出生児では11.1%であった。感染成立に関与する要因に関しては、本研究の結果では、母親のウイルス量が最も母子感染成立に関与する因子と考えられた。第2の研究として、母子感染による小児のC型慢性肝炎15例の自然経過を検討した。全例肝機能異常を軽度から中等度認めたが、臨床症状を示したものはなかった。prospective caseの2例において、経過観察中に血中よりHCV-RNAが消失し、自然治癒例と考えられた。6例に肝生検を施行し、肝機能異常は軽度だが組織学的に進行している症例が1例認められた。インターフェロン治療を3例に施行したが、ウイルス排除には無効であった。

A. 研究の背景と目的

今日、慢性肝炎の患者は約200万人にものぼり、その70~80%はC型肝炎ウイルス(以下HCV)によるものと考えられる。HCVによる慢性肝炎は治療に難渋することが多く、肝硬変、肝細胞癌に進展する症例も多い。HCVの主要な感染経路は輸血と考えられるが、それ以外にも薬物の常用、針刺し事故などが感染経路とされている。日本では献血者に対して1989年より第一世代、1992年より第二世代のHCV抗体を用いたスクリーニング検査が導入され、輸血による感染が防げるようになった。しかし薬物常用や針刺しの既往歴のないC型肝炎患者も決して少なくない。HCVには夫婦間感染や家

族内感染は少ないと考えられており、周産期の母子感染が現在もHCV感染者を生み続けていると考えられる。

一般的にはB型肝炎の場合、母子感染が成立したとしても大多数の患者は健康キャリアとして肝炎を発症せず、こうしたケースでは血中にB型肝炎ウイルスが存在しても、肝炎の所見は皆無か軽微とされる。またHBe抗原陽性の母親から子供への感染率は、HBe抗体陽性の場合に比べると非常に高いといわれている。しかしながらC型肝炎については母子感染の頻度はいまだ議論の多いところであり、それに寄与する危険因子および、母子感染成立例の小児の臨床経過などに関してはほとんど知られ

ていない。OhtaらはHCV抗体陽性の母親からのHCV母子感染の頻度は約5%で、血中にHCV-RNAが存在する例では約10%と報告している。

今回、第1の研究目的として、C型肝炎ウイルスの母子感染の頻度と感染成立に関与する要因を検討した。次に、第2の研究目的として、母子感染によるC型慢性肝炎の小児15例の自然経過に関して検討した。

B. 研究方法

第1の研究の対象としては、1993～1998年間に大阪大学医学部附属病院およびその関連6病院を受診した16800名の妊婦についてHCV-2又は-3抗体検査を施行し、抗体陽性の母親から出生した児を前方視的に追跡した。対象妊婦の中では、154名の母親(0.9%)がHCV抗体陽性であり、このうち調査開始時に本研究への参加に同意を得た141名の母親と、その出生児147名について調査した。追跡期間が6ヵ月未満の者および、ドロップアウトした者を除外して、108名の母親と、114名の出生児(男児58名、女児56名、同胞6組)を対象とした。出生児について、ALT、HCV抗体、HCV-RNAを出生時、生後3、6、9、12ヵ月及び1年毎に検査した。母親の分娩時のHCV-RNA検査を施行し、ウイルス量が1.0 mEq/ml以上(DNAプローブ法)または100 kcopy/ml以上(アンプリコア定量法)を高ウイルス群、それら未満の者を低ウイルス群とした。分娩前後のそれぞれ6ヵ月間に、2回以上肝機能検査を施行している母親に関しては、ALTの変動について検討した。統計学的にはFisher's exact testを用いて検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

第2の研究の対象は、上記のprospective studyにて母子感染と診断した9例と、肝機能異常などで発見されretrospectiveに母子感染と診断した6例の、計15例(男児7例、女児8例)であり、それらの症例のC型肝炎の自然経過について検討した。全例調査開始時および肝生検時に両親から同意を得た。C型肝炎の感染は第二世代または第三世代のHCV抗体陽性(ELISA, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA)、血中HCV-RNA陽性をもって診断した。血中HCV-RNAの定性検査は、HCVゲノムの5' non-coding regionにプライマーを設定したreverse transcription polymerase chain reaction法にて行った。HCV genotypeの診断は岡本らの既報に従った。HIV抗体検査はELISA(SERODIA-HIV, Fuji Rebio, Tokyo)を使用した。

prospective caseの3例とretrospective case全例については、HCV RNAの非構造領域のNS5B領域の252塩基配列(nt8295-8546)の母子間の相同性および、児と標準株HCV-JまたはHCV-J6との相同性を解析した。標準株との相同性93.4(92.5～94.4)%に比べて、母児間で平均98.6(96.4～99.6)%と高い相同性を示したことより母子感染例であると診断した。児の肝組織の検討はヨーロッパ分類およびKnodellらのhistology activity index(HAI score)を用いて行った。

C. 研究結果

第1のC型肝炎母子感染に関する前方視的研究の結果を述べる。まず母親の背景因子の検討では、141名のHCV抗体陽性母親の推定感染経路は、母子感染9名、輸血31名、針刺

し事故3名、家族内キャリア 11 名、不明 87 名 (内 10 名は看護婦)であった。141 名の対象母親の内、HCV-RNA を検査したものは 108 名であり、その結果は、陽性 76 名 (70%)、陰性 32 名 (30%)であった (表 1)。HCV-RNA 陽性の母親からの出生児 81 名において母子感染成立 9 名を認めたが、HCV-RNA 陰性の母親からの出生児 33 名の中には母子感染が成立した例を認めなかった。HIV 感染に関しては検査しえた母親 73 名の中に陽性例はなかった。母親の肝機能に関する検討では、ALT 上昇 (50 IU/l 以上)が分娩前 68 名中 4 例、分娩後 47 例中 22 名に認められた (図 1、2)。さらに母子感染成立例の母親についてのみ検討したところ、分娩前では 7 例中 7 例とも肝機能の上昇認めず、分娩後には 3 例中 3 例が上昇していた (それぞれの ALT の頂値は、85 IU/l、381 IU/l、400 IU/l)

対象小児については、児の追跡期間は 6～61 (平均 18.5) ヶ月であった。早期産児が 11 名、正期産児が 103 名であり、出生体重は平均 2968g (758～3970g)であった。対象小児の HCV 抗体は、生後 12 ヶ月の時になお陽性であったものが 20 名おり、そのうち 9 名が HCV-RNA 陽性であり、残りの 11 名は HCV-RNA 陰性であった。

本研究における C 型肝炎母子感染率は、HCV 抗体陽性の母親からの出生児については、114 名中 9 名 (7.8%)であり、HCV-RNA 陽性の母親からの出生児に限定すると 81 名中 9 名 (11.1%)であった。母子感染成立例 9 名は全例、肝機能異常を認めたが、黄疸などの肝炎に関連する臨床症状を認めたものはいなかった。母子感染成立例 9 名の中で、HCV-RNA が

経過中に陰性化したものが 2 名存在した。2 名とも生後 11 ヶ月時点で HCV-RNA が陰性していた (図 3)。母子感染成立例の母親は 9 例とも HCV-RNA 陽性であり、さらにウイルス量が検討できた母親 8 例全例が高ウイルス群であった。

prospective に追跡して母子感染と診断した 9 例 (症例 1～9)と、retrospective に母子感染と診断した 6 例 (症例 10～15)の、計 15 例の小児の C 型肝炎の臨床的背景を (表 2)に示す。患児の平均年齢は 10.6 (3.9～19.8) 歳であった。HCV RNA の genotype は 1b 型が 9 例、2a 型が 2 例、未検 4 例であった。家族内に母親以外にも HCV 抗体陽性者が存在するものが 6 例あった。母親に輸血歴のあるものが 5 例あり、輸血時年齢は平均 18.3 (5～27) 歳であった。母親の出産時年齢は平均 29 (24～36) 歳であり、肝機能異常を指摘されていたものが出産前に 3 例、出産後に 7 例あった。母親の HIV 抗体検査は prospective case の 6 例で施行されており、全例陰性であった。患児への栄養法は 15 例全例が母乳栄養であった。出産方法は経膈分娩 12 例、帝王切開 3 例であった。在胎週数は早期産 3 例、正期産 9 例、過期産 3 例であり、低出生体重児が 3 例あった。

肝機能については 15 例とも、経過観察中 ALT の最高値で平均 139 (46～355) IU/l と軽度から中等度の上昇を認めたが、臨床症状は特に認められなかった。2 例において経過観

察中血中HCV-RNAが消失し、ウイルスが排除されたと考えられた。いずれもprospectiveに追跡した母子感染例で、1例は1歳までは肝機能異常(ALT値最高237IU/1)が持続したが、1歳過ぎより肝機能は正常化し、1歳7か月時点から血中よりウイルスが検出されなくなった。もう1例は、生後6か月時点のみ肝機能異常(ALT値最高138IU/ml)を認めたが以後正常化し、11か月時点より血中HCV-RNAが検出されなくなった。

対象15例中、症例9と症例10～15の計6例に対し、経皮針肝生検を施行した。肝生検時の年齢、肝機能および肝組織像の結果を(表3)に示す。肝生検時の年齢は平均7.8(3.0～13.8)歳であり、肝機能はALT値の平均40(20～92)IU/1と正常から軽度上昇であった。肝組織像はヨーロッパ分類ではchronic persistent hepatitis 3例に対し、chronic active hepatitisが3例あり、このうち1例(症例14)は8歳10か月時点で既に一部の肝小葉構造に改築が認められた。HAI scoreの各カテゴリー別には、カテゴリー1(門脈域周囲の壊死)平均2.0(1～3)、カテゴリー2(小葉内変性および壊死)平均1.3(1～3)、カテゴリー3(門脈域の炎症)平均2.5(1～3)、カテゴリー4(線維化)平均1.2(0～1)であった。このうち症例11、13、14の3例に対しインターフェロン治療を6か月間施行した。治療開始時の年齢は平均6.9(3.0～8.8)歳、ALT値は平均31(21～48)IU/1であった。治療終了後6

か月の時点で肝機能が正常化(ALT 35<IU/1)したものは2例(症例13、14)あったが、血中HCV-RNAが消失したものは1例もなかった。肝病変の進行していた症例14は、3歳時に祖母が肝細胞癌に罹患したことより、母児共にHCVキャリアと判明したが、ALTは20～30IU/1台を推移していた。8歳10か月時に肝生検を施行、慢性活動性肝炎であることが判明したので、9歳1か月よりインターフェロン α を10万単位/kg、週3回、6か月間投与した。治療中ALT値は低下し、HCV-RNA量も減少していた。治療終了後より再度HCV-RNA量が増加したが、肝機能は現在まで正常を維持している。患児は血尿、蛋白尿を認めたため、8歳5か月時に腎生検を施行、IgA腎症と診断されジピリダモールの投与をうけていたが、インターフェロン治療後、血尿、蛋白尿ともに改善を示した。

D. 考案

本研究では第1の研究として、C型肝炎ウイルスの母子感染の頻度と感染成立に関与する要因を検討した。その結果、C型肝炎母子感染率は、HCV抗体陽性の母親からの出生児については7.8%であり、HCV-RNA陽性の母親からの出生児では11.1%であった。この成績はこれまでの他の臨床研究の結果と同じレベルであり、我が国のHCV母子感染の頻度は5%前後と考えられる。またHCV母子感染成立に関与する要因に関しては、本研究の結果では下記の因子が関与している可能性が示唆された。

即ち、母親のウイルス量が最も母子感染成立に関与する因子と考えられた。その他、分娩方法(経膈分娩、帝王切開)、あるいは出生児の栄養方法(母乳栄養の関与)が母子感染成立に関与している可能性も示唆される結果であり、今後もこれらの重要な点について検討を重ねる必要性が示唆された。最後に、母親の分娩前後の肝機能の変動も母子感染成立と関連していたが、この点については従来の報告では指摘されておらず、さらに検討を行うべき興味深い点と考えられた。

母子感染による小児のC型慢性肝炎15例の臨床的背景として、genotype について検討できた11例中9例を1b型が占め、全例母乳栄養児であった。家族内に母親以外にもHCV感染の高い集積性を認め、母親に輸血歴のあるものが5例あった。肝機能異常を軽度から中等度認めたが、臨床症状を認めた者はいなかった。prospectiveに追跡した2例において経過中血中HCV RNAが自然消失し、ウイルスが排除されたと考えられた。母子感染が成立したとしても一過性の感染で終わる症例も少なからず存在するようである。

文献的にHCV母子感染例の肝組織像についての報告数は少なく、肝組織変化の軽度なのがほとんどで、生検時の年齢が分かっている症例はいずれも若年での報告であった。しかし症例14のように肝機能異常が軽度でも、組織学的には進行している症例が認められたことは興味深い。フォローアップできなかった時期に肝炎の活動性が強い時期があり、肝病変が進行したものと考えられる。

一般的に成人のC型慢性肝炎ではALT値が100 IU/l前後を推移し、10~20年の経過を経

て肝硬変へと移行する。感染時期が高齢の場合急速に肝病変が進行するケースも知られているが、逆に若年期感染例では緩徐な進行を示すケースが多い。こうした予後を左右する因子として、感染ウイルス量以外に宿主の免疫能を含めた遺伝的な背景が存在すると考えられる。今回私達が示したように母子感染によるC型慢性肝炎の小児で早期より肝病変の進行した症例も存在したことから、定期的な経過観察とともに、どのような時期にいかにより治療することも念頭に置く必要がある。

B型肝炎では母子感染予防にワクチンおよびグロブリン投与が施行され劇的な効果をあげているが、C型肝炎に関しては現在のところワクチンを含めて母子感染の予防法は確立されていない。しかし今後B型肝炎治療に保険適用されたラミブジンのような直接ウイルス増殖を抑制する薬剤がC型肝炎に対しても開発された場合、小児の母子感染予防に対しどのように適用していくかが重要と思われる。すなわちHIVの母子感染予防でおこなわれているように、HCVの母子感染予防においても、ハイリスクの症例では出産前に母親が抗ウイルス剤を服用して血中ウイルス量を減らしておくことや、出産直後より母子ともに抗ウイルス剤を服用することなどが有用である可能性が考えられるが、今後の更なる検討が必要と考えられた。

E. 結論

C型肝炎ウイルスの母子感染の頻度と感染成立に関与する要因を検討した。108名の母親とその出生児114名を対象とした検討の結果、C型肝炎母子感染率は、HCV抗体陽性の母親からの出生児については7.8%であった。また母

親のウイルス量が最も母子感染成立に関与する因子と考えられた。さらに母子感染による小児のC型慢性肝炎15例の自然経過を検討した。全例肝機能異常を軽度から中等度認めたが、臨床症状を示したものはいなかった。2例において、経過観察中に血中よりHCV-RNAが消失した。6例に肝生検を施行し、肝機能異常は軽度だが組織学的に進行している症例が1例認められた。インターフェロン治療を3例に施行したが、ウイルス排除には無効であった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Etani Y, Tajiri H, Tada K, Sawada A, Kozaiwa K, Okada S, Hotta H. Molecular diagnosis and liver histology of children with mother-to-child-transmitted hepatitis C virus infection. *J Pediatr* 1998;133: 588.

(2) Katayama Y, Tajiri H, Tada K, Okada S, Tong WY, Ishido S, Hotta H. Follow-up study of hypervariable region sequences of the hepatitis C virus (HCV) genome in an infant with delayed anti-HCV antibody responses. *Microbiol Immunol.* 1998;42:75-79.

(3) 舟田俊平(近畿中央病院(共済)), 小川道子, 安部治郎, 田尻仁. C型肝炎母子感染の前方視的追跡. 兵庫県医師会医学雑誌 1999 ; 41 卷 3 号 : 92-93.

(4) Matsumoto S, Nakajima S, Nakamura K, Etani Y, Hirai H, Shimizu N, Yokoyama H, Kobayashi Y, Tajiri H, Shima M, Okada S.

Interferon treatment on glomerulonephritis associated with hepatitis C virus.

Pediatr Nephrol. 2000 ;15:271-273.

(5) 三善陽子. C型肝炎母子感染症例の自然経過に関する研究. 大阪大学医学雑誌 2000;第52巻(第5-12号):189-194.

(6) Tajiri H, Miyoshi Y, Funada S, Etani Y, Abe J, Onodera T, Goto M, Funato M, Ida S, Noda C, Nakayam M, Okada S, Osaka study group for perinatal HCV infection. A prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:10-14.

(7) 三善陽子、田尻仁. 小児HCV感染—C型肝炎母子感染および小児C型慢性肝炎について— 日本臨床 2001;第59巻(第7号): 1294-1298.

2. 学会発表

(1) 沢田敦, 田尻仁, 古座岩宏輔, 三善陽子, 多田香苗, 虫明聡太郎. インターフェロン治療を行った小児C型慢性肝炎患者の長期経過. 日本肝臓学会 2000年5月.

(2) 三善陽子, 田尻仁, 多田香苗, 虫明聡太郎, 沢田敦. C型肝炎母子感染の前方視的研究: 感染率及び関連因子の検討. 日本肝臓学会 2000年5月.

(3) 三善陽子, 沢田敦, 古座岩宏輔, 近藤宏樹, 虫明聡太郎, 田尻仁. C型肝炎母子感染の前方視的研究 感染率及び関連因子の検討. 第18回日本小児肝臓研究会 2001年7月.

(4) 森島恒雄, 前嶋七海, 藤沢知雄, 乾あやの, 田尻仁, 吉村文一, 位田忍, 河島尚志, 長田郁夫, 小林昌和, 他. 多施設共同

研究による C 型肝炎ウイルス母子感染の検討.

第 18 回日本小児肝臓研究会 2001 年 7 月.

h. 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。

Fig.1 ALT levels of HCV-RNA negative mothers

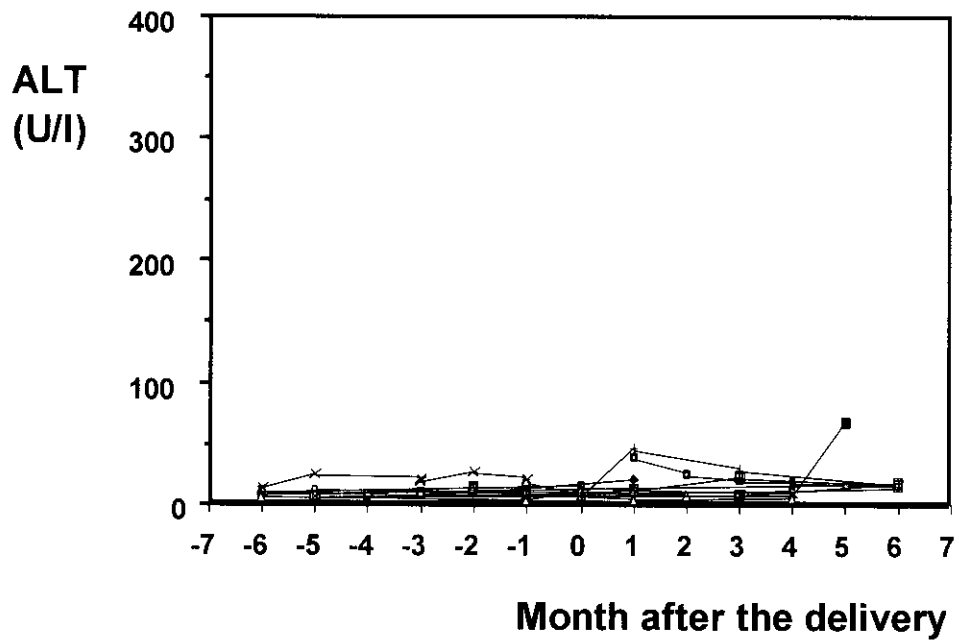


Fig.2 ALT levels of HCV-RNA positive mothers

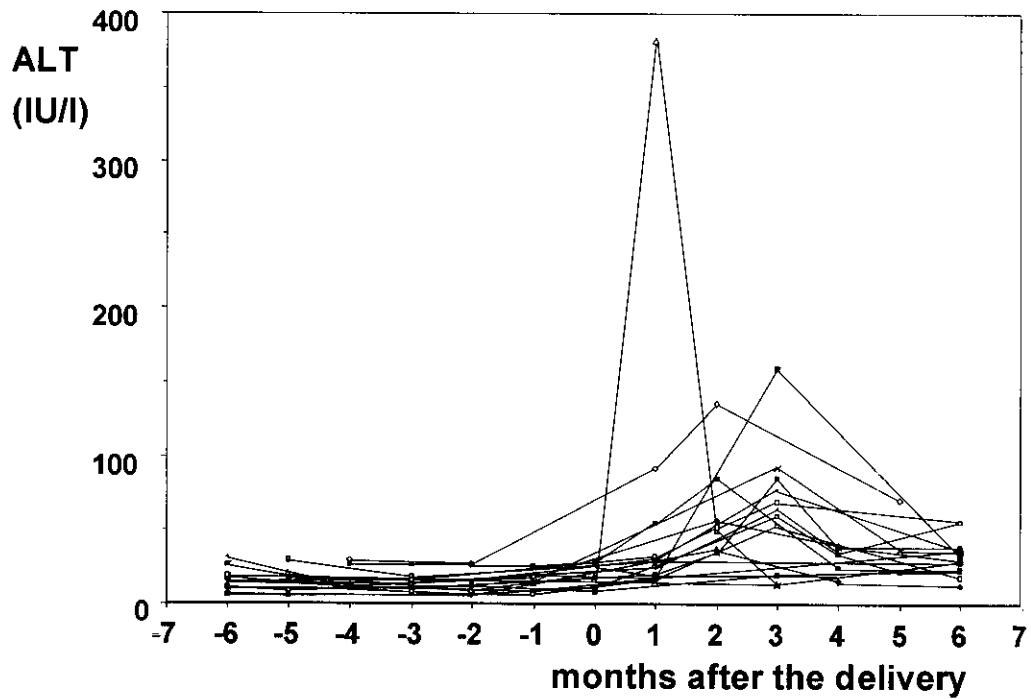


Fig.3 Typical course of serum ALT values for mother (dashed line) and her infant (dotted line) during the perinatal period

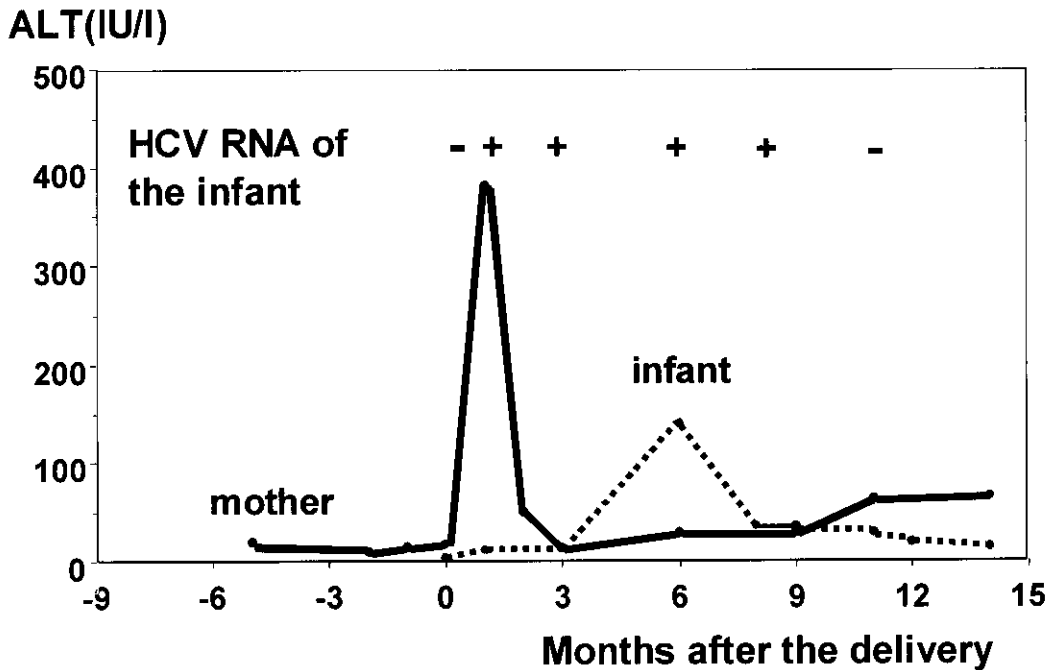


表1、HCV母子感染に関与する因子の検討

要因	症例	HCV 母子感染成立		p values
		なし	あり	
母親のHCV-RNA				
陽性	81	72	9	0.040
陰性	33	33	0	
母親のHCV-RNA量				
高ウイルス量	46	38	8	0.019
低ウイルス量	27	27	0	
分娩様式				
経膈分娩	90	82	8	0.396
帝王切開	24	23	1	
栄養方法				
母乳栄養	98	89	9	0.243
人工栄養	16	16	0	
母親の肝機能				
分娩前				
上昇	4*	4	0†	0.641
正常	64	57	7	
分娩時				
上昇	4	4	0	0.691
正常	43	39	4	
分娩後				
上昇	22*	19	3†	0.095
正常	25	25	0	

* p<0.001, † p=0.008

Table.2. Clinical background of 15 children transmitted with HCV from mothers.

case	sex	age	genotype	peak ALT (IU/l)
1	f	6y3m	ND	237
2	f	5y5m	ND	138
3	f	4y7m	2a	283
4	m	3y11m	1b	81
5	f	8y2m	2a	46
6	m	5y0m	ND	82
7	m	10y1m	1b	192
8	m	5y10m	1b	81
9	f	7y6m	ND	180
10	m	5y10m	1b	355
11	m	8y9m	1b	162
12	f	9y11m	1b	50
13	f	12y9m	1b	48
14	f	13y2m	1b	72
15	m	19y9m	1b	77

ND: not done

Table.3. Liver function and histology of 6 patients who underwent a liver biopsy

case	age	AST/ALT (IU/l)	histology	HAI score				
				I	II	III	IV	total
9	5y4m	59/92	CPH	1	1	1	0	3
11	3y1m	35/48	CPH	1	1	3	1	6
12	6y3m	28/25	CAH2A	3	1	4	2	10
13	8y10m	20/21	CAH2A	3	1	3	1	8
14	8y10m	18/20	CAH2B	3	3	3	2	11
15	13y10m	23/31	CPH	1	1	1	1	4

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型肝炎ウイルスの母児間感染危険因子の同定と感染追跡児における超可変領域の変異

分担研究者 大戸 齊 福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部門 教授

研究協力者 石井 勉 同 総合周産期母子医療センター 新生児部門 助手

研究要旨：

【目的と方法】C型肝炎ウイルス(HCV)の母子感染の頻度と感染危険因子が明らかになり、さらに感染した児の経過と予後についても判明しつつある。本研究では、低浸淫感染地区におけるHCV母児感染の現状を把握し、更なる危険因子を明らかにすること目的とし、母子間感染率および危険因子を検討した。さらに、持続感染した2例において超可変領域1(HVR1)の遺伝子配列を解析し、ウイルス学的な検討を行った。

【結果】妊婦のHCV抗体陽性率は0.4%(143/29,768名)で、母子感染はHCV-RNA陽性の母親でのみみられ、感染率は7.5%(6/80名)であった。母体血中ウイルス量は、感染群において多い傾向がみられた。また分娩様式、栄養法については有意な差はみられなかった。感染した児の50%が一過性感染で、18か月までにウイルスは検出されなくなった。一方残り50%は持続感染例で、その2症例に対するシーケンス解析の結果よりHVR1の持続的な変異が観察され、ウイルスの宿主免疫学的監視機構からの逃避が伺えた。

【考察】従来の報告と同様の頻度でHCVの母児感染はみられ、母体ウイルス量はその重要な危険因子であった。他のウイルスでの母子感染率の有意な母子感染率の低下の報告に鑑み、分娩様式については更に検討する必要があると思われた。また持続感染機序の解明のために宿主の免疫学的反応も含めた更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的：

C型肝炎ウイルス(HCV)の母子感染はHCV-RNA陽性の母親の5から10%に成

立し、感染した児の約30%は一過性感染で残りの児は持続感染と報告されており、輸血血液製剤に対するスクリーニング検

査によって輸血を介した感染対策が講じられた現在、母子感染は HCV の感染経路として疫学的に重要である。この母子感染の頻度とその危険因子に関し、HCV 抗体陽性妊婦とその児を対象として検討した。また、HCV は多くの RNA ウイルスと同様に遺伝子変異をきたしやすく、特に超可変領域 1 (HVR 1) ではその変異は著明である。本領域にはウイルス特異的中和抗体の抗原決定基が存在することが報告されており、その多様性は持続感染成立の一因と考えられている。そこで、長期経過観察期間における感染児の HCV の変異過程を明らかにすることを目的として、出生時から学童期まで経過観察し得た母子感染 2 例における HVR 1 を解析し検討した。

B. 研究方法

【対象】1990 年 6 月より 2002 年 3 月まで福島県の関連 15 病院を受診した 29768 名の妊婦に対し、同意を得て第 2 世代 HCV 抗体にてスクリーニング検査を施行した。抗体検査陽性妊婦 143 例 (0.4%) を対象とし、血中 ALT 値、nested RT-PCR 法により血中 HCV-RNA の検出、および希釈法によりウイルスの定量を行った。また、母子感染の危険因

子として、母親の輸血歴、母親の肝炎の有無、分娩様式、胎盤剥離現象 (流・早産徴候、腹緊の有無、妊娠中毒症など)、および栄養法について調査した。これらの母親から出生した児 169 例 (同胞例 11 組) については、臍帯血、生後 1、3、6、9、12 か月、および以後は 6 か月毎に経過を観察し、HCV 抗体、血中 HCV-RNA の定性と定量、および血中 ALT 値を検査した。

つぎに出生時から 7 歳 7 か月および 10 歳 3 か月まで経過を観察している持続感染をきたした 2 症例 (児 A、児 B) と、各々の母親についてウイルス学的検索を行った。母親 A は輸血歴や肝疾患の既往のない HCV 無症候性キャリアーで、血中 ALT 値は中等度 (9 - 207 IU/L) 上昇していた。母親 B は児 B の出産より 6 年前に輸血後 C 型肝炎の診断を受けているが、血中 ALT 値は正常範囲内で推移していた。

【研究方法】 対象の母子から 1 から 6 か月毎に採取した血清検体につき、ALT 値と第 2 世代 HCV 抗体、genotype、nested RT-PCR 法による HCV-RNA の検出、希釈法およびリアルタイム PCR 法によりウイルスの定量を行った。また、母親の 1 検体と児の 3 検体については、HVR1 における 5' 末端側の E1 領域および

3'末端側の E2 領域を含む塩基配列をクローニング法により決定した。得られた配列について相同性とアミノ酸の変異率を検討するとともに、近隣結合法により作成した分子系統樹にて系統解析を行い、更に Hopp and Woods 法により同領域の親水性・疎水性を予測した。

【統計方法】 統計学的処理には SPSS を用い、母親の血中 HCV-RNA 量の検定については対数変換後に Weich の t 検定を、危険因子の検定については Fisher の直接確立法にて検定を行った。

【倫理面への配慮】 本研究の実施には、福島県立医科大学倫理委員会での承認が得られており、また対象であるすべての児の親から本研究への参加に関してインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

(1) 母子感染の頻度とその危険因子の検討

HCV 抗体陽性の母親のうち 80 例 (55.9%) で血中 HCV-RNA が陽性であった。児の血中 HCV-RNA が陽性であったのは 6 名であり、全例とも血中 HCV-RNA 陽性の母親からの出生であった。以上より HCV 抗体陽性妊婦の 4.2% に母子感染がおこり、妊婦の血中 HCV-RNA が陽性で

ある場合には、感染率は 7.5% であった (表 1)。母親の血中 HCV-RNA 量が判明していたのは 20/80 (25%) であった。児への母子感染がみられた母親における血中 HCV-RNA 量は高い傾向があったが ($10^{4.7 \pm 1.1}$ vs $10^{6.5 \pm 0.7}$) 例数が少なく有意とはいえなかった (図 1)。分娩様式に関しては、満期経膈分娩と満期帝王切開では感染率に有意差を認めなかった (表 2)。栄養法に関しては、母乳授乳有と母乳授乳無とでは感染率に有意差を認めなかった (表 3)。母乳中の HCV-RNA は、血中 HCV-RNA 陽性の母親からのみ検出され、その頻度は 2% (2/31) であった。母乳中の HCV 抗体は、血中 RNA 陽性の母親および陰性の母親から検出され、おのおの 41.9% と 25.0% であり、母乳中の HCV-RNA は血中 RNA 陽性の母からのみ検出され、6.5% (2/31) であった (表 4)。感染した児 6 名のうち、3 名 (50%) が一過性感染であり、3 名 (50%) が持続感染であった。一過性感染例では血中 HCV-RNA は 9 か月から 18 か月で検出されなくなった (図 2)。

(2) 感染した児の長期臨床経過とウイルス学的検索結果

児 A の ALT 値は 6 歳まで著しく上下に

変動した(平均 169 IU/L, 10-626)の
に対し、児 B では 11 か月の時点(119
IU/L)を除き正常範囲内で推移した。希
釈法にて定量した血中 HCV-RNA のレベ
ルは、児 A においては 2 歳まで著明に変
動したのに対し、児 B では 1 か月時に
 $10^2/\text{ml}$ であり、以後の経過観察期間中
には経時的に徐々に上昇し高いウイルス量
で持続した。またリアルタイム PCR 法に
よるウイルス量の測定では、児 A では 2
か月時には $3.2 \times 10^6 \text{copies/ml}$ と高値
であったが、1 歳 4 か月時、2 歳 7 か月
時そして 3 歳 8 か月時には検出されず、
以降の 4 歳 11 か月時、6 歳 7 か月時およ
び 7 歳 7 か月時には再度検出されたがウ
イルス量は多くなかった。一方児 B にお
いては 1 か月時には検出されなかったが、
以後は高いウイルス量で推移した (2.2
 $\times 10^5$ から $5.6 \times 10^6 \text{copies/ml}$)。HCV
抗体は児 B において 11 か月と 1 歳時に
陰性であった以外は、両児ともに全ての
検体で検出された。また各々の母子組で
ウイルスの genotype は一致していた
(母子組 A : 1b、母子組 B : 2a)。(図
3)

HVR1 のシーケンス解析の結果から
は、母親から移行した相同性の高い乳児
期の配列が、幼児期から学童期へと経時

的に変異していた(図 4)。さらに 2 名
の児の配列を母親と比較してみると、児 A
(7 歳 7 か月時)における変異の方が児 B
(9 歳 4 か月時)よりも著明であった(核
酸の相同性 69.3-70.7% vs
85.3-90.7%、アミノ酸の相同性 48-52%
vs 68-72%)。各々の児におけるアミノ
酸の変異率の推移に関しても、児 A (5 歳
時 35.6%から 7 歳 7 か月時 51.6%)の方
が児 B (5 歳 7 か月時 5.2%から 9 歳 4 か
月時 28.8%)よりも大きく変異していた
(表 5)。また、これら HVR1 の大きな
変化の多くは、ALT 値の変動後に観察さ
れていた。系統樹解析では、児 A におい
ては大きく離れた均一な
quasispecies がみられたのに対し、児
B では近接した多様な quasispecies が
経時的に出現しており、各々の児におけ
る変異の相違を裏付ける所見が得られた。
親水性・疎水性の解析では、双方の児と
もに HVR-1 における著明な変異を反映し
て、アミノ酸の変化による疎水性と親水
性のプロファイルは同領域で大きく変化
していた(図 6-1)。また、児 A では疎
水性と親水性が逆転する変化が認められ
たのに対し、児 B においては親水性およ
び疎水性の程度が強まる変化が主体であ
った。