

表 1. 血液透析施設におけるHCV感染防止のための指針

(1) 透析室環境

- ①透析室の区域化（清潔区域、透析区域、廃棄区域）
- ②患者用ベッド間隔の確保
- ③廃棄区域の改善
 - ・廃棄物容器の増設→廃棄物の運搬距離（動線）の短縮
 - ・廃棄物容器のフタの撤去
- ④手洗い場の改善
 - ・手洗い場の増設
 - ・手押し式消毒薬の撤去 →写真 1
 - ・手動式カランから肘押し式、足踏み式、自動式へ変更 →写真 2
 - ・ペーパータオルの設置

(2) 器具・機材、薬剤

- ①使い捨て器具・器材
 - ・移動経路：清潔区域→透析区域→廃棄区域
 - ・清潔区域での器具のセット化（透析開始セット、終了セットなど） →写真 3
 - ・患者毎の廃棄物運搬用容器（終了セットの容器、バケツなど）の用意 →写真 4
- ②再利用器具（鉗子など）
 - ・移動経路：清潔区域→透析区域*→洗浄・滅菌消毒区域**
↑
*使用後は透析区域内の所定の置き場へ移動 →写真 5
 - **滅菌消毒の前に洗浄（除蛋白）
- ③薬剤
 - ・移動経路：清潔区域→透析区域→廃棄区域

(3) スタッフのトレーニング

—無菌操作の基本—

- ①手洗いのタイミング
 - ・処置の前（1 処置 1 手洗いの原則）
- ②正しい手袋の着脱 →写真 6
- ③手袋をはずすタイミング
 - ・透析装置操作、透析記録記入の前 →写真 7
 - （手指を介した汚染拡大の防止）

写真1. 手押し式消毒薬の撤去

1



2



3



写真は、手押し式消毒薬の問題点を示している。手を介して汚染（わかりやすくするため墨汁を使用）が広がるのがわかる。

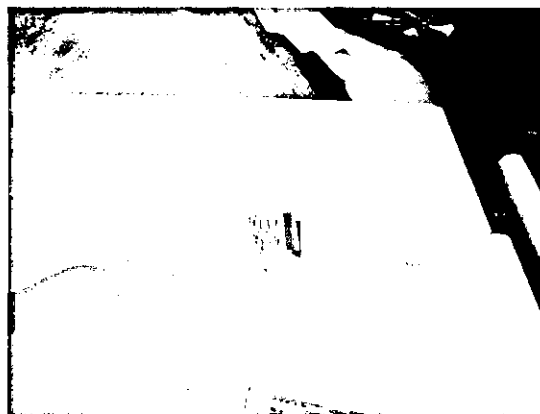
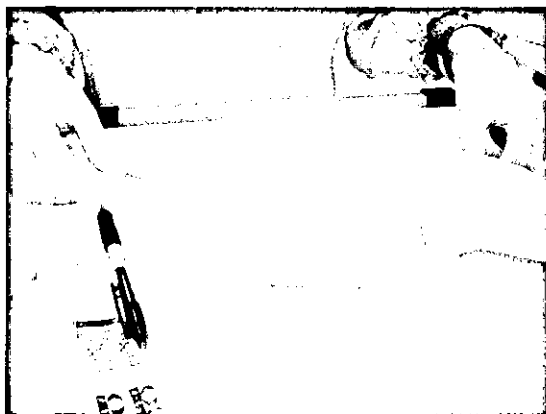
このタイプの消毒薬は撤去する。

写真2. 自動式カランの設置



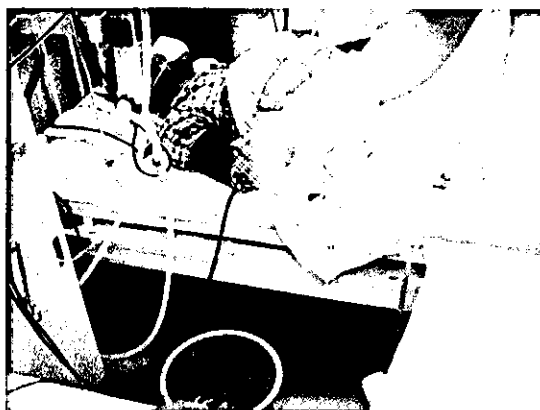
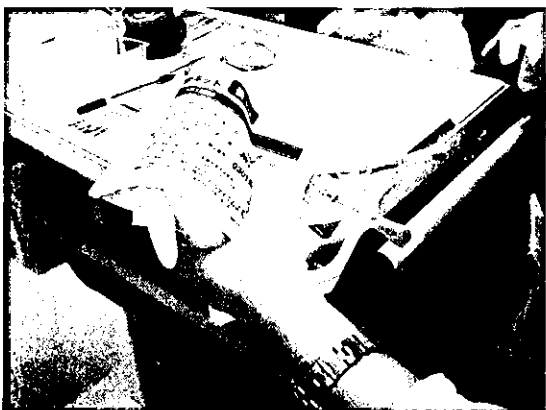
カランは手動式のものではなく、肘押し式、足踏み式、自動式のを設置する。写真はセンサーにより作動する自動式のもの。

写真3. 器具・器材



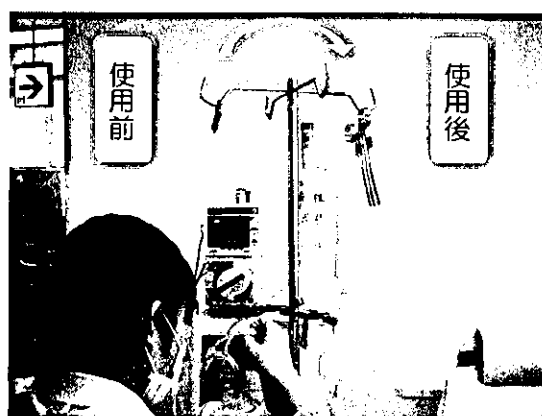
使い捨て器具・器材は清潔区域にてセット化する。
左は透析開始時のセット。右は透析終了時のセット。

写真4. 使い捨て器具・器材の廃棄



使い捨ての器具・器材の廃棄について。
それぞれの患者用ベッドごとに用意しておいた廃棄物入れを使用する。

写真5. 再利用器具（鉗子）



鉗子は使用前のものと使用後のものとを区別して扱う。

写真6. 正しい手袋の着脱

1



2



3



4



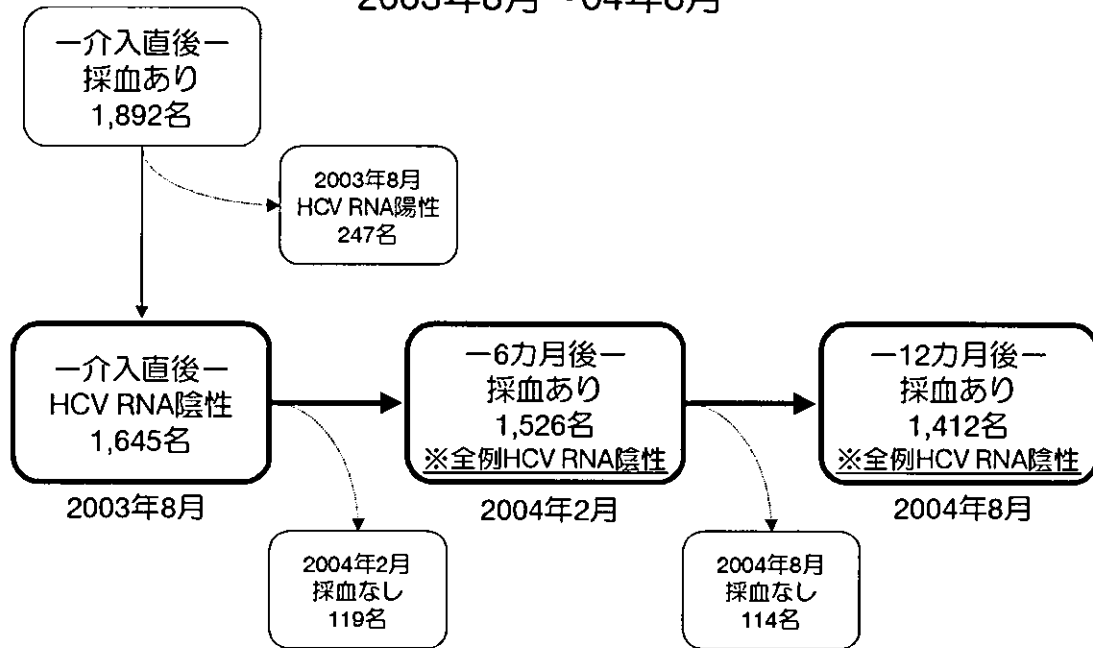
手袋を外すときは、表面を内側に封じ込めるようにして外す。

写真7. 手袋を外すタイミング



手袋を外してから透析装置を操作する。これにより手指を介した汚染の拡大を防止する。

図1. 介入後の追跡調査
—2003年8月～04年8月—



C. 結果と考察

追跡の結果を図1に示す。2003年8月に採血を行った者1,892人のうちHCV RNA陰性の者は1,645人であり、これらを追跡の対象とした。このうち6カ月後（2004年2月）まで追跡できた者は1,526例（うち全例が、この時点でHCV RNA陰性）、さらに12カ月後（2004年8月）まで追跡できたものは1,412例（うち全例が、この時点でHCV RNA陰性）であり、HCVの新規感染例は1例も認められなかった。

以上の結果から、介入により、HCV感染予防の効果があがっていることが立証された。

D. 結論

広島県内の9つの幹事透析施設において2003年4月～7月にかけて施設の改善、透析手順の見直し、スタッフの教育訓練などを行い、2003年8月を起点に6カ月後、12カ月後、当該9施設における全患者の採血を行い介入の効果を検証した。その結果、追跡対象者1,645例のうち6カ月後まで追跡できた者は1,526例（全例HCV RNA陰性）、さらに12カ月後まで追跡できたものは1,412例（全例HCV RNA陰性）であり、HCVの新規感染例は1例も認められず、介入により、HCV

感染予防の効果があがっていることが立証された。

E. 研究発表、文献

1) Kumagai J, Komiya Y, Tanaka J, Katayama K, Tatsukawa Y, Yorioka N, Miyakawa Y, and Yoshizawa H: Hepatitis C Virus Infection in 2,744 Hemodialysis Patients Followed Regularly at Nine Centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003, Journal of Medical Virology (in press) .

F. 知的財産権の出願・登録

なし。

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）
B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
平成16年度分担研究報告書

輸血感染症の実態調査

西口修平 大阪市立大学 肝胆膵病態内科 助教授

平成15年10月より、輸血後感染症の実態を明らかにするため感染症の全数調査を開始した。調査項目は、HBV, HCV, HIV, HTLV-1 である。現時点で、死亡例を除いた被輸血症例776例中405例が輸血後の感染症の検査を受け、輸血による感染が疑われた症例はHBV感染の2症例であった。1例は、輸血前のHBs抗原は陰性であったが、病歴上HBVキャリアであることが、明らかになった。他の一例は、日本赤十字社からも遡及調査の対象としてHBV感染が疑われた症例である。本例は、HBVの輸血した血液と患者血液内のHBVの遺伝子配列が1塩基を除いて一致し、輸血による感染であることが証明された。本例は、現病の増悪のため死亡したが、感染早期からlamivudineが投与されたことにより、全経過を通じてALT値は正常であり、HBV感染は病態を修飾していない。輸血後感染症検査においてウイルスマーカーが陽性化しても、新規感染かウイルスの再増殖かの鑑別を必要とするが、いずれの症例に対しても早期から臨床的に有効な対策を講じることが可能であった。

分担研究者の共同研究者：
氏名・所属機関名及び所属機関における職名
大阪市立大学 公衆衛生学 助教授 田中 隆
大阪市立大学 肝胆膵病態内科学 助教授 武田 正
大阪赤十字血液センター 所長 柴田弘俊

A. 研究目的

輸血によるウイルス感染症の発生頻度を輸血後3ヶ月目の血液検査によって検

索し、感染成立例に対してはその対応策の構築をめざす。

B. 研究方法

大阪市立大学付属病院において、輸血を受けた全患者に対し、交差試験実施時に輸血前の感染を調査するための血清を1ml以上採取し、冷凍保存する。さらに、輸血前検査として、HBs抗原、HBs抗体、HCV抗体、HIV抗体、HTLV-1抗体を測定する。

その後、実際に輸血が行われた患者に対し、輸血後感染症検査を指示し、輸血後3ヶ月の時点で採血を行う。検査項目は輸血前に行った検査に加え、拡散増幅法用に血

清を採取し、日本赤十字社にて HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA の測定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学付属病院輸血療法委員会において承認を受けた。患者へは、輸血前に輸血前後の検査の必要性を説明しこれらの検査に対する同意が得られた患者のみ検討対象とした。

C. 研究成果

大阪市立大学付属病院における平成 15 年 10 月より平成 16 年 9 月末日までの乳児例を除いた輸血症例数は、897 例であった。今回の検討では、輸血後 3 ヶ月以内に死亡した 121 例を除いた 776 例を対象とした。これらの症例のうち平成 16 年 12 月 22 日現在では、405 例(52%)が輸血後の感染症の検査を受けている。感染症検査の項目は、HIV 抗体、HTLV-1 抗体、HBs 抗原、HBs 抗体、HCV 抗体である。その内 379 例については、これらの抗体検査に加えて HBV, HCV, HIV の核酸増幅 (PCR) 検査を実施した。

HIV 抗体は輸血前検査で全例が陰性であり、輸血後陽転例はなかった。HTLV-1 抗体は輸血後 404 例中 7 例(1.7%)で陽性であったが、陽性例の内 5 例は輸血前検査でも陽性であり、他の 2 例は前検査が行えず輸血前からキャリアであったのか不明である。しかし、輸血された血液の追跡調査では HTLV-1 は確認できず、輸血による感染の可能性は低い。HCV 抗体は、輸血後 405 例中 63 例(16%)で陽性であったが、うち 2 例で輸血前は抗体が陰性であり輸血後抗体が疑陽性となっている。本例では、HCV RNA は陽性化しておらず、また輸血した血

液の追跡調査でも HCV は確認できないため、輸血による感染は否定された。輸血後検査では HCV RNA は 382 例中 37 例で陽性であったが、全例輸血前検査でも陽性を確認できた。

HBs 抗原は 405 例中 10 例(2.4%)で陽性であったが、全例輸血前の同抗原の陽性を確認できたため、HBV キャリアであると判断された。HBV DNA は 394 例中 10 例(2.5%)に陽性であった。これらの症例の内 2 例は、輸血前後とも HBs 抗原は陰性であったが、症例 1 では輸血前後で、症例 2 では輸血後のみ HBV DNA が陽性であった。症例 1 は、病歴の再聴取によって HBV キャリアであることが明らかになった。さらに、輸血前の HBV DNA が陽性であり、輸血後の検体と塩基配列も一致した。症例 2 は、日本赤十字社からも遡及調査の対象として HBV 感染が疑われた症例である。本例では、日本赤十字に保存されていた該当する献血血液と患者血液について HBV の遺伝子配列を解析したところ、全配列中 1 塩基を除いて一致し、輸血による感染であることが証明された(図 1)。本例は、現疾患の増悪のため死亡したが、感染早期から lamivudine が投与されたことにより、全経過を通じて HBV DNA はアンプリコアモニター法では陰性で ALT 値は正常であり、HBV 感染は病態を修飾していない(図 2)。

D. 考察

輸血後感染症検査を円滑に行うために、輸血同意書については HIV を含め感染症検査を実施することを明記した形式への改定、医師・患者への輸血後検査の意義に関する啓蒙活動、輸血前後で患者血清を採取・保存するシステムの構築などが必要であった。

とくに、輸血前検査を行っても全例が輸血されるとは限らず、また輸血による感染であることを特定するためには輸血前後で拡散増幅や遺伝子解析を行う必要が生じるため、多数の検体保管に備えて血清保存用の専用冷凍庫を設けた。今後、一般病院においても精度の高い感染症検査を実施するには、このような対応が必要であるが、これらの経費は病院がすべて負担することになり全ての病院で実施することは困難であろう。

今回の検討において、輸血による感染が確定した症例は HBV による 1 例のみであった。早期治療により病態を修飾しなかったことから、輸血後の感染症検査の臨床的な重要性が明らかとなった。しかし、当院における輸血後感染症検査の実施率は約半数に過ぎず、今後担当医師や患者への定期的な啓蒙活動が必要である。

本研究では、輸血後の検査を抗原・抗体反応でまず行ったが、輸血後 HCV 抗体が低力値で弱陽性化する非特異的な反応や、HBV 感染では HBs 抗原が偽陰性の症例が存在した。輸血後感染症をどのような検査体制で捉えるのが問題となる。第一の要因は、輸血後検査の時期である。ウイルスの増殖速度は HIV, HCV, HBV のそれぞれで異なり、ウイルス抗原や抗体の消長は感染時のウイルス量や患者の免疫力などに大きく左右される。完璧を期するためには輸血後 1 ヶ月から 6 ヶ月の間に複数回定期的に採取すべきであるが、現実的な対応策ではない。一方、感染成立例に対する治療を考えると可及的に感染早期の検査が望ましく、輸血後 3 ヶ月以内に 1 度の検査で確定しなければならない。これらのウイルスの

中では HBV の増殖速度がもっとも遅く、HBs 抗原が陰性でも感染が否定できない時期が存在することから、少なくとも HBV に関しては輸血後検査として抗原・抗体検査ではなく拡散増幅検査を採用すべきであろう。

今回の検討で明らかにされた問題は、輸血後感染症検査においてウイルスマーカーが陽性化しても、新規感染かウイルスの再増殖かの鑑別が必要である点である。とくに、HBV 感染例の場合は HBs 抗原が陰性の潜在性 HBV 感染者が存在し、入院後の抗がん剤治療などによって免疫力が低下し、ウイルスの再増殖をきたす症例が存在する。それゆえ、輸血による感染として生物由来製品感染等被害救済制度の適応を受けるためには、輸血前の保存血液の拡散増幅検査が必要条件となる可能性が高く、医療機関の早急の対応が必要である。

E. 結論

1. 輸血後感染症検査によって、輸血感染症の早期発見と治療が可能である。
2. 輸血による感染と同定するためには、輸血前後の血清と輸血された血液の遺伝子解析が必要である。
3. 輸血後感染症検査を円滑に行うためには、ハードとソフトの両面において病院側の対応が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

当院における輸血後感染症検査の実施状況
日本輸血学会学会誌 投稿中

2. 学会発表

第 52 回日本輸血学会総会

演題：当院における輸血後感染症検査体制
について

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

書籍

図1. 献血血液と患者検体との塩基配列の比較

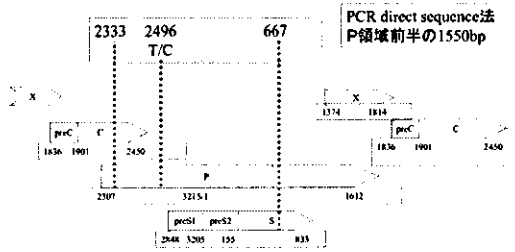
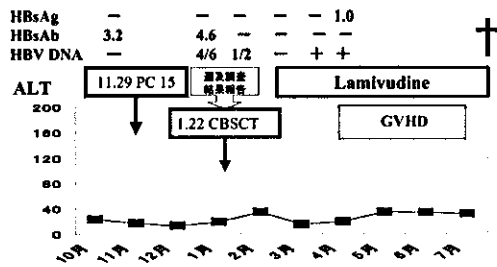


図2. 62歳 急性骨髄性白血病。輸血によるHBV感染例



厚生科学研究費補助金（肝炎等緊急克服対策研究事業）
 B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
 平成16年度分担研究報告書

輸血後3カ月の採血による受血者の全数調査

| | | |
|-------|-------|----------------------|
| 分担研究者 | 柚木 久雄 | 日赤中央血液研究所 核酸増幅検査部 部長 |
| 研究協力者 | 西口修平 | 大阪市立大学 肝胆膵内科学 助教授 |
| | 阿部 弘一 | 岩手医科大学 第1内科 |
| | 柴田 弘俊 | 大阪府赤十字血液センター 所長 |
| | 谷口 繁 | 岩手県赤十字血液センター 所長 |
| | 藤永 裕 | 愛媛県赤十字血液センター 前所長 |
| | 松阪 俊光 | 愛媛県赤十字血液センター 所長 |
| | 大野 尚文 | 大野消化器科医院 院長 |
| | 吉澤 浩司 | 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授 |

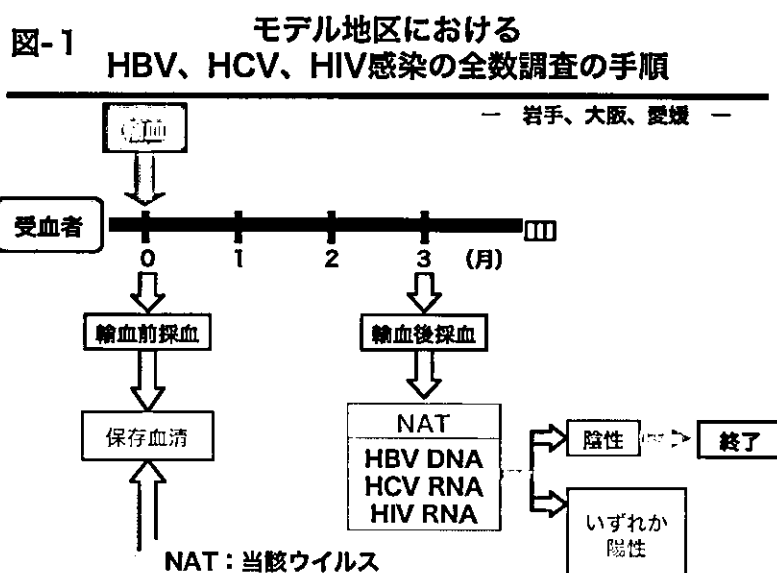
A. 研究目的

モデル地区（岩手県、大阪府、松山市）を設けて、輸血を受けた患者（受血者）の輸血前、後におけるHBV、HCV、HIVの感染と、その要因（感染源とその特性）を解明し、血液の更なる安全性の向上、のために役立つことを目的とする。

B. 研究方法

岩手県、大阪府、愛媛県各赤十字血液センターと、各地区における協力病院との協力の下に、あらかじめ十分な説明を行ない、了解を得た輸血予定者（患者）の輸血前の血清の保存と輸血後3カ月目の血清を採取する。採取した血清検体を用いて、HBV DNA、HCV RNA、HIV RNAの検査を行ない、輸血に伴う上記ウイルスの感染とその要因を必要に応じて献血者の献血時の保管検体に遡って調査、解析し、感染源の特定、原因の究明を行なう。

以上の手順をまとめると図1、図2のようになる。



C. 結果と考察

2004年11月までに、計689例の受血者の血清を収集し、解析をすすめている。

輸血後3カ月目の血清を対象としたHBV DNA、HCV RNA、HIV RNAの検査は、収集された689例のうち、それぞれ637例、627例、626例の検査が終了し、これまでにHBV DNAは21例(3.3%)、HCV RNAは59例(9.4%)に見出され、HIV RNA陽性例はゼロとの結果が得られている。

なお、輸血後3カ月目の血清中のHBV DNAが陽性であった21例中16例、HCV RNAが陽性であった59例中57例は輸血前の保存血清からもHBV DNA、HCV RNAがそれぞれ検出され、輸血前から持続感染状態にあったと考えられた。

輸血前、後の検査でHBV DNAが「陽転」した5例中の1例のみが、当該受血者への輸血に用いた献血者の保管検体中にHBV DNAが検出され、このHBV DNAは受血者の血中HBV DNAと塩基配列が一致したことから、輸血血液が感染源となった急性B型肝炎であることが確定した(本症例の詳細については厚生労働省に当該の血液センターを通して届出済み)。しかし、他の4例のHBV DNA「陽転」例、2例のHCV RNA「陽転」例については輸血血液が感染源となったとの証拠は得られてはいない。

本調査研究については今後も対象地域、対象症例を増やして調査、研究を継続していく予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図-2 輸血に伴う感染(疑い)例発生時の追跡調査スケジュール

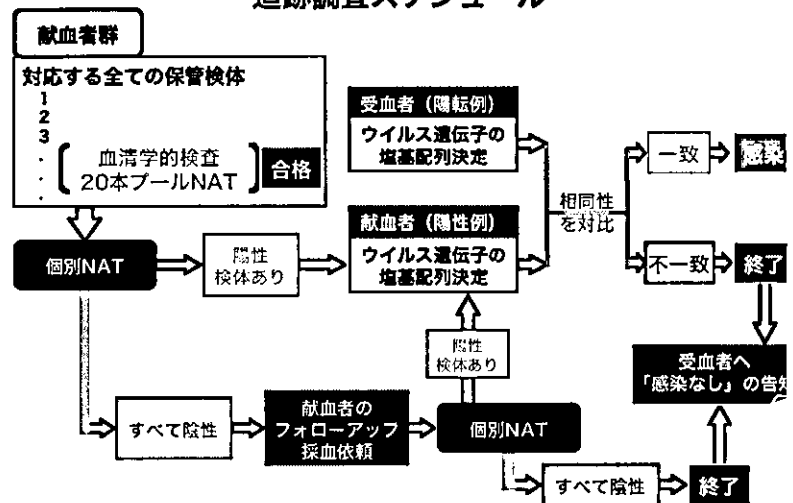


表-1 受血者の全数調査

— 2003.11~2004.11 —
岩手、大阪、愛媛

| 検査項目 (NAT) | 輸血後3ヶ月目の検査数 | 陽性数 (%) | うち、陽転数 (輸血前検査で陰性数) |
|------------|-------------|----------|--------------------|
| HBV DNA | 637 | 21 (3.3) | 5 (0.8) |
| HCV RNA | 627 | 59 (9.4) | 2 (0.3) |
| HIV RNA | 626 | 0 | 0 |

N=689、中間集計

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）
B型およびC型肝炎の疫学および検診を含む肝炎対策に関する研究班
平成16年度 分担研究報告書

e抗原陰性ALT正常のB型慢性肝炎の予後に関する研究

分担研究者 池田健次 虎の門病院消化器科
分担研究協力者 熊田博光 虎の門病院消化器科

研究要旨：

e抗原陰性ALT正常のB型慢性肝炎の長期予後に関する検討は少ない。肝生検を施行した116例のうち5年以上の経過観察と1年毎の保存血清が使用できる95例について検討した。肝生検はF0 9例、F1 53例、F2 21例、F3 6例、F4 6例で合った。ALTが2倍以上に上昇する肝炎活動化は低DNA群（観察開始時 10^4 コピー/ml未満、33例）の12.1%、中等度DNA群（ $10^4\sim 10^6$ 、53例）では43.4%、高DNA群（ 10^6 以上、9例）では66.7%で、初期DNA値は将来のALT上昇と有意に関連した（ $P<0.0001$ ）。肝癌発癌率を初期3年間のDNA量 10^6 未満群と 10^6 以上群で比較すると、5年発癌率はそれぞれ0%、6.9%、10年は1.8%、11.5%で後者に有意に高かった（ $P=0.021$ ）。e抗原陰性ALT正常例でも肝病変進行例が含まれ、HBV-DNAの経時的測定により、将来のALT上昇や発癌率の予測が可能であった。

A. 研究目的

e抗原陰性ALT正常のB型慢性肝炎は従来は「臨床的治癒」とされ、将来の予後が良好とされていたが、時に肝病変の進行も起こりうる事が知られている。これら症例の長期予後について血清HBV-DNAの経時的測定を含め検討した。

B. 研究方法

1974年より2002年までの間に当科に入院し肝生検により病理学的にも確定診断したe抗原陰性・ALT正常のB型慢性肝疾患症例は116例であった。このうち、5年以上の経過観察が行え、かつこの間の保存血清（ -80°C 冷凍）が使用可能であった95例（81.9%）についてレトロスペクティブなコホート研究を行った。対象症例は全例日本人、男性75例・女性20例で、年齢は21歳から67歳で中央値は39歳であった。経過観察は1~3ヶ月毎の通院により血液・生化学・ウイルス学的検討を行い、年1回の超音波検査による画像診断がなされた。5年以上の経過

観察以後の脱落は17例あったが、全体の観察期間の中央値は10.2年（5.1~24.7年）であった。

HBV-DNAの経時的測定はAmplacor HBV monitor kit (Roche Diagnostics Japan)を用いて行った。測定範囲は $10^{2.6}\sim 10^{7.6}$ コピー/mlであった。

C. 研究結果

1) e抗原陰性ALT正常症例の肝生検所見:Desmetらの分類での肝線維化では、F0症例が9例、F1が53例、F2が21例、F3が6例、F4（肝硬変）が6例に見られ、F3以上の進行例は全体の12.6%に見られた。また、肝炎活動性では、A0が18例、A1が72例と多数であったが、A2も5例（5.3%）に認められた。

2) 観察開始時HBV-DNA量とその後の経過:観察開始時DNA濃度は、中央値104.4コピー/mlで、25パーセントイル $10^{3.2}$ 、75パーセントイル $10^{5.2}$ 、最小 $10^{2.6}$ 未満、最大 $10^{7.6}$ 超であった。

観察開始時 10^6 未満であった34例では

25例(73.5%)がその後もDNA低値(10^6 未満)で経過、 $10^{5.0} \sim 10^{5.9}$ の18例では10例(55.5%)が低値で経過した。 $10^{6.0}$ 以上の10例ではその後DNAが低値化したのは1例のみで、初診時DNA量はその後のDNAの経過とよく相関した($P < 0.0001$)。

3)経過中の肝炎増悪とその予測：経過観察中に95例中52例(54.7%)で、正常値の2倍以上のALT上昇をきたした。累積ALT異常化率は、3年34.7%、5年45.4%、10年55.7%であった。

初期2年間のDNA量が 10^4 未満の低DNA群(N=24)と 10^4 以上に高値となった群(N=71)を比較すると、肝炎再燃率は3年がそれぞれ4.2%、45.1%、5年が4.2%、59.1%、10年が8.3%、72.1%であった。初期のDNA量は将来の肝炎活動化と強い相関を示した($P < 0.0001$)。

4)肝癌発癌率とその予測：観察期間の中央値10.2年の間に5例(5.3%)で肝癌発癌をみた。初期3年間にHBV DNAが持続的に 10^6 未満であった群(N=65)と 10^6 以上に上昇した群(N=30)で累積発癌率を比較すると、5年ではそれぞれ0%、6.9%、10年では1.8%、11.5%であり、DNA高値群での発癌率が有意に高かった($P=0.021$)。

D. 考察

当該施設が第三次病院であるという特殊性はあるものの、この検討ではe抗原陰性かつALT正常のB型肝炎キャリアのうち、肝生検では90%以上の症例で慢性肝炎もしくは肝硬変が存在することが明らかとなった。

これまでにも肝炎活動性を示すHBVDNA量のカットオフという視点での検討はいくつか行なわれているが、本研究

のように、e抗原陰性・ALT正常という対象に経時的にHBV DNAを測定した検討はこれまでにない。本研究では、長期の臨床経過との関連をみたが、初期2年間のHBV-DNAが 10^4 コピー/ml未満で経過する症例の肝炎再燃率が著明に低いことが示された。

e抗原陰性・ALT正常という「安定した」肝炎感染状態からでも発癌例があることが明らかになり、B型肝炎感染では「発癌を免れる安心な状態」というものがないことも明らかとなった。ここでの検討対象では、観察開始初期3年間のHBVDNAが一貫して 10^6 未満であると発癌リスクが十分低いことが示され、やはり経時的HBVDNA測定が重要であると結論づけられた。

E. 結論

e抗原陰性・ALT正常のB型肝炎感染でも、約13%はF3以上の進行肝疾患であった。観察開始後数年間のHBVDNAの経時的測定は、将来の肝炎再燃、肝癌発癌のよい予測因子となり、患者管理には必要不可欠な情報と考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 論文発表

1. 論文発表

投稿予定(Dig Dis Sci)

2. 学会発表

アメリカ肝臓学会(AASLD)

2004年10月30日(ボストン)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他

厚生科学研究費補助金 肝炎当克服緊急対策研究事業
B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
分担研究報告書 (平成16年度)

HBV genotype による HBV 増殖・HBe 抗原制御機構の違い

分担研究者 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 溝上雅史

研究要旨

HBV genotype には地域特異性や特異的遺伝子変異が存在する。今回我々はアジアやアフリカに広く分布する HBV/Aa のウイルス学的及び臨床的な特徴を明らかにするために、欧米に広く分布する HBV/Ae 及び HBV/D をコントロールとする各 78 例を世界各国から入手し、年齢、性別、病態をマッチさせた Case-control study を行った。HBV/Aa は HBV/Ae に比べて有意に HBe 抗原陽性率は低値で、HBV DNA 量も HBe 抗原の有無にかかわらず有意に低値であった。特徴的な遺伝子変異として、HBV/Aa では precore ATG 開始コドン直前の Kozak sequence の塩基置換、HBV/Ae は core promoter double mutation、HBV/D は precore stop mutation が HBe 抗原産生に寄与していた。また、HBV レプリコンを用いた in vitro での解析においても同様の結果が得られた。HBV genotypes により、HBe 抗原産生や HBV 複製の制御機構が異なることが示され、臨床像の違いを反映している可能性が示唆された。

共同研究者氏名

田中靖人、加藤孝宣、杉山真也、
折戸悦朗

A. 研究目的

最近までに我々は、HBV genotype には地域特異性や特異的遺伝子変異が存在するばかりでなく、ウイルス学的・臨床的な違いがあることを見出している。日本に多い genotype C と B_j 及び日本以外のアジアに分布する

subtype Ba の違いが代表例である。一方、南アフリカには欧米に広く認める genotype A がほとんどを占めるが、系統的に欧米型 (HBV/Ae) とは異なる subgroup (HBV/Aa) を形成し、臨床的にも大きな違いが報告されている。すなわち、Ae は一般に予後良好であるのに対し、Aa の多くは若年で HBe 抗原は消失するにもかかわらず発癌する症例が多い。ここでは、HBe 抗原産生や HBV-DNA 量に寄与する genotype 特有

の遺伝子変異の検索及び in vitro での変異に伴う影響をHBV レプリコンを用いて検討した。

B. 研究方法

アジアやアフリカに広く分布するHBV/Aa のウイルス学的及び臨床的な特徴を明らかにするために、欧米に広く分布するHBV/Ae 及びHBV/D をコントロールとする各78例を世界各国から入手し、年齢、性別、病態をマッチさせたCase-control studyを行った。肝機能、HBe 抗原、HBV DNA 量 (real-time detection PCR) を測定、X₁ core promoter から core 領域にかけて塩基配列を決定し、HBe 抗原やDNA 量に影響を及ぼす遺伝子変異を検討した。さらに、こうした変異の影響をHBV レプリコンを作成し、in vitro で検証した。

C. 研究結果

Table 1 に示すように、HBV/Aa はHBV/Ae に比べて有意にHBe 抗原陽性率は低値(31% vs. 49%, $P = .033$)で、30歳以下の若年層でその傾向は顕著であった(36% vs. 67%, $P = .026$)。HBV DNA 量はHBe 抗原の有無にかかわらずHBV/Aa において有意に低値であった (median, Aa [3.73] vs. Ae [6.09] or D [5.48], $P < .001$)。HBe 抗原を制御する遺伝子変異として、HBV/Aa では precore ATG 開始コドン直前のT1809(100%), T1811(95%)といったKozak sequence の塩基置換、HBV/Ae は basic core promoter double

mutation (BCP) (44%), HBV/D は precore stop mutation(48%)がHBe 抗原産生に関与していた。さらに、上述の変異体を含む4種類のHBV レプリコンを作成し、in vitro で検証した結果、Kozak sequence の変異はHBe 抗原を制御し、BCP 変異やε loop の変異はHBV 複製に寄与していることが示された。

Table 1. Demographic, Clinical and Virological Characteristics of Patients Infected with HBV of Genotype Aa, Ae or D

| Features | HBV genotypes | | | Differences P value |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| | Aa (n = 78) | Ae (n = 78) | D (n = 78) | |
| Men | 65 (83%) | 65 (83%) | 65 (83%) | Matched |
| Age (years) | 37.9 ± 14.0 | 39.1 ± 12.6 | 37.6 ± 12.6 | Matched |
| Clinical status | | | | |
| Asymptomatic | 22 (28%) | 22 (28%) | 22 (28%) | Matched |
| Liver disease | 56 (72%) | 56 (72%) | 56 (72%) | Matched |
| Cirrhosis (HCC) | 24 (5) | 25 (2) | 26 (8) | |
| ALT (IU/L) | 36 (26-43) | 36 (29-62) | 36 (32-46) | NS |
| HBeAg | 24 (31%) | 38 (49%) | 29 (37%) | .033* |
| HBV DNA (log copies/mL) | 3.46* (2.93-3.95) | 6.09 (4.24-7.64) | 5.48 (4.06-7.02) | < .001 |
| Mutations in the core promoter | | | | |
| T1762/A1764 | 27/54 (50%) | 25/57 (44%) | 15/61 (25%)* | < .01 |
| Mutations in the ATG initiator codon in the precore region | | | | |
| T1809 | 54/54 (100%)* | 0/50 (0%) | 0/61 (0%) | < .0001 |
| T1812 | 52/54 (96%)* | 0/57 (0%) | 0/61 (0%) | < .0001 |
| Mutations in the precore region | | | | |
| T1818 | 0/54 (0%) | 0/57 (0%) | 61/61 (100%)* | < .0001 |
| T1862 | 40/54 (74%)* | 0/57 (0%) | 0/61 (0%) | < .0001 |
| H1888 | 42/54 (78%)* | 0/57 (0%) | 0/61 (0%) | < .0001 |
| A1896 | 0/54 (0%) | 0/57 (0%) | 29/61 (48%)* | < .0001 |

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; ALT, alanine aminotransferase; NS, not significant. Median values and 95% Confidence Interval in parentheses are shown for ALT and HBV DNA. *Significantly different from the other genotypes. †Significantly different between Aa and Ae.

D. 考察

HBe 抗原を制御する遺伝子変異は genotype により異なっていた。特に、HBV/Aa で特異的に見られた precore ATG 開始コドン直前の、いわゆる Kozak 配列の塩基置換はHBe 抗原の産生に影響を及ぼし、若年でのHBe 抗原消失及びHBV 増殖低下の主要な役割を担っていると考えられた。また、この塩基置換はX領域のアミノ酸変異も惹起して

おり、アフリカにおける若年肝癌への関与も考え、現在 X 領域全体にわたって検討を進めている。

E. 結論

HBV genotype (subtype)により、HBe 抗原産生やHBV複製の制御機構が異なることが示され、臨床像の違いを反映している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa I. Tanaka Y. Kramvis A. Kato T. Sugauchi F. Acharya SK. Orito E. Ueda R. Kew MC. Mizokami M. Novel hepatitis B virus genotype A subtyping assay that distinguishes subtypes Aa from Ae and its application in epidemiological studies. *J. Virol* 78(14):7575-7581, 2004.

Tanaka Y. Hasegawa I. Kato T. Orito E. Hirashima N. Acharya SK. Gish RG. Kramvis A. Kew MC. Ueda R. Kew MC. Yoshihara N. Shrestha SM. Khan M. Miyakawa Y. Mizokami M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 40:747-755, 2004.

Kato H. Sugauchi F. Ozasa A. Kato T. Tanaka Y. Sakugawa H. Sata M. Hino K. Onji M. Okanoue T. Tanaka E. Kawata S. Suzuki K. Hige S. Ohno T. Orito E. Ueda R. Mizokami M. Hepatitis B virus

genotype G is an extremely rare genotype in Japan. *Hepatol Res.* 30(4):199-203, 2004.

2. 学会発表

Tanaka Y. Hasegawa I. Kato T. Orito E. Hirashima N. Acharya SK. Gish RG. Kramvis A. Kew MC. Ueda R. Kew MC. Shrestha SM. Khan M. Miyakawa Y. Mizokami M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, October 2004. (*Hepatology* 40; SUPPL.1:597A,2004)

田中靖人、折戸悦朗、溝上雅史。
シンポジウム 2 : 肝炎ウイルスの増殖機構の解明〔臨床〕HBV genotype の違いによる HBV 増殖、HBe 抗原陽性率、発がん率の違いの検討。第 40 回日本肝臓学会総会、平成 16 年 6 月 3-4 日、東京
(*肝臓* 45 Suppl. 2:A366, 2004)

田中靖人、加藤孝宣、溝上雅史。
シンポジウム 1 : Genotype からみた B 型肝炎臨床像の特徴と治療。HBV genotype によるウイルス学的・臨床的相違。第 35 回日本肝臓学会東部会、平成 16 年 12 月 10, 11 日、東京
(*肝臓* 45 Suppl. 3:A532, 2004)

長谷川泉、田中靖人、伊藤清頭、小笹貴士、藤原圭、桜井万弓、加藤孝宣、

杉原寛治、大野智義、折戸悦朗、上田龍三、溝上雅史.

B型肝炎ウイルス genotype A の subtype 分類法の開発とその有用性. 第40回日本肝臓学会総会、平成16年6月3-4日、東京

(肝臓 45 Suppl. 1:A129, 2004)

伊藤清顕、田中靖人、加藤道夫、小笹貴士、藤原圭、長谷川泉、杉原寛治、加藤孝宣、大野智義、折戸悦朗、上田龍三、溝上雅史.

B型肝炎細胞癌の発生を HBeAg seroconversion 前に予測することができるか? 第40回日本肝臓学会総会、平成16年6月3-4日、東京

(肝臓 45 Suppl. 1:A137, 2004)

厚生科学研究費補助金 肝炎当克服緊急対策研究事業
B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
分担研究報告書 (平成16年度)

HBV genotype E 慢性肝炎患者に認められた Core promoter
“replacement” 変異とその臨床的意義

分担研究者 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 溝上雅史

研究要旨

HBV genotype はその分布に地域特異性があるとともに、各々の genotype に特異的な遺伝子変異が存在し、ウイルス学的な差異、臨床的な違いに影響を及ぼしていると考えられる。今回、過去に検討されていない HBV genotype E (HBV/E) に感染した慢性肝炎患者に関する検討を行い、そのウイルス学的・臨床的特徴を検討した。英国で血清学的に HBV/E と診断された 6 例を対象とした。HBe 抗原陽性 3 例、HBe 抗体陽性 3 例の比較検討より、HBV/E 慢性肝炎の e 抗原のセロコンバージョンに BCP 変異、PC 変異、S 領域 deletion、C 領域 deletion が関与している可能性が示唆された。6 例のうち e 抗原陽性の 1 例に、コアプロモーター領域が他の例と大きく異なる配列を認めた。その配列を詳細に検討すると、S 領域のプロモーター配列に replacement されていた。この変異は、免疫組織化学の結果よりコア蛋白過剰蓄積に関与していると考えられ、さらに複製効率を増加させていることが推定される。今後 *in vitro* study を含めたより詳細な検討が必要である。

共同研究者氏名
藤原圭、田中靖人、折戸悦朗

A. 研究目的

HBV genotype はその分布に地域特異性があるとともに、各々の genotype に特異的な遺伝子変異が存在し、その臨床像の違いに影響を及ぼしていると考えられている。HBV genotype

E (HBV/E) は主に西アフリカに分布する type とされるが、そのウイルス学的・臨床的な特徴についてあまり知られていない。特に HBV/E 感染の慢性肝炎患者に関する検討は現在までにあまり行われていない状況であり、今回そのウイルス学的・臨床的特徴を検討した。

B. 研究方法

英国で血清学的に HBV/E と診断された慢性肝疾患患者 6 例を対象とした。ウイルス塩基配列は、PCR および直接塩基決定法で決定し、CLUSTAL X でアライメントを作成した。ウイルス量は TaqMan probe を用いた Real-time detection PCR 法で測定した。肝生検病理標本を用いた HBc 蛋白に対する免疫染色により肝細胞における HBc 抗原の分布を検討した。

C. 研究結果

6 例のうち 3 例は HBe 抗原陽性、残り 3 例は HBe 抗体陽性であった。Basic core promoter (BCP) は HBe 抗原陽性例で 2/3 で deletion を認めた。HBe 抗体陽性 3 例では、A1762T/G1764A 変異を認めた。Precore nt1896 は、e 抗原陽性 3 例では wild、e 抗体陽性 3 例では G1896A 変異を認めた。e 抗原陽性 3 例で Core ORF の deletion を認め、e 抗体陽性 3 例で preS deletion を認めた。6 例の塩基配列のアライメントを作成すると、e 抗原陽性の 1 例にコアプロモーター領域が他の 5 例と大きく異なる配列を認めた。その配列を詳細に検討すると、S 領域のプロモーター配列に replacement されていた。興味深いことに、その患者の肝生検組織の免疫染色を行ってみると、その 1 例のみ核および細胞質に HBc 蛋白の過剰な蓄積を認め、この replacement が免疫組織染色の結果に影響を及ぼしていると考えられた。

D. 考察

今回の検討より HBV/E 慢性肝炎の e 抗原のセロコンバージョンに BCP 変異、PC 変異、S 領域、C 領域の deletion が関与している可能性が示唆された。Pult らは、コアプロモーター領域に S プロモーターが insertion された症例で劇症肝炎を起こし、*in vitro* study においても複製効率が增加することを報告した。今回検討の症例においても replacement が複製効率を増加させていることが予想され、今後 *in vitro* での検討が必要である。

E. 結論

HBV/E 慢性肝炎における e 抗原セロコンバージョンに関与すると考えられるいくつかの遺伝子変異を明らかにした。1 例に特異的な replacement 変異を認め、今後シリーズ検体を用いてその発生機序及び病態への関与を明らかにしたい。

G. 研究発表

2005 年 DDW で発表予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。