

当院におけるC型肝炎ウイルス母子感染

分担研究者 松井 陽 (筑波大学臨床医学系小児内科教授)
共同研究者 須磨崎 亮(筑波大学臨床医学系小児内科助教授)
工藤 豊一郎(筑波大学臨床医学系小児内科講師)
長谷川 誠 (筑波大学附属病院小児内科医員)

研究要旨

C型肝炎ウイルスの母子感染の頻度と重症度を観察する目的で感染母体から出生した児について前方視的ならびに後方視的調査を行った。当施設における感染の頻度は HCV RNA 陽性母体から出生した場合に9.7%であった。感染例11例の長期観察では2例が自然治癒したものの残る9例のうち1例は既にインターフェロン抵抗性であった。感染例に対しては早期治療が奏功する可能性があり、成人となり難治化する前に治療すべきと思われた。

A. 研究目的

観察的な研究を行った。

C型肝炎は晩期に肝硬変・肝細胞癌を合併する点で社会に与える負担が大きな疾患である。この疾患はもともとウイルス感染症であり、感染を防ぐことができれば晩期合併症も減少させ得ることが可能になる。

C型肝炎ウイルスの感染経路のうち輸血など介入可能な部分は既にコントロールされており、新たな患者発生の母地は以前よりも狭まっている。未解決の母地の一つに母子感染が残されている。

新たなC型肝炎患者の発生を減少させることを視野に入れ、C型肝炎母子感染の発生要因を調査すると共に、感染児が発生した場合にどのような治療方針で臨むことが適切か、観

B. 研究方法

<前方視的調査>

1996年から2004年の9年間に当院産科で分娩を予定した母体について HCV 抗体を検索し、抗体陽性の場合には HCV RNA を検索した。母体血で HCV RNA 陽性の場合に、分娩時の状況、リスク因子をカルテで確認すると共に出生児は小児内科で感染の有無を定期的に追跡した。

HCV RNA の検査方法は以下のいずれかとした。

・分岐 DNA プローブ法 (bDNA 法) (カイロン社・クオンティプレックス) (1996年より)

・定性的 PCR 法(ロシュ社・コバスアンプリコア)(1997年より)

・定量的 PCR 法(ロシュ社・アンプリコアモニター法)(1998年より)

分娩時の母体および新生児因子としては、在胎週数・出生体重・今回妊娠中の切迫流産の有無・会陰裂傷の有無・前早期破水(PROM)の有無・臍帯血 pH・分娩歴の有無・今回の分娩法・分娩所要時間・出血量・アプガースコア・母体 HCV RNA 量・母体 HCV 血清型(serotype)・その他とした。

児は肝機能に応じて定期的に外来受診させ、ALT 値および HCV RNA を追跡した。

<後方視的調査>

他院で出生し、生後感染が確認された症例について、定期的に肝機能値および HCV RNA を追跡した。

<倫理的配慮>

C型肝炎ウイルスに関する情報が集積し、保険適応も認められるようになってきたため本調査は通常の診療の範囲を超えないが、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り親権者の選択を尊重すると共に個人情報の保護を図った。

C. 研究結果

C-1) 前方視的調査による感染率・危険因子の推定

1996年から2004年の9年間にHCV RNA陽性の母体から31例が出生した。

この間、当院の年間出生数は平均約500例であった。HIVとHCVに同時感染した母体はみられなかった。その後、児を3カ月以上追跡できた23例の母体の因子を表1に示す。

<表1の内容>

・児が感染した例は3例みられた。感染例は5年以上追跡されている。

・これ以外の20例(未感染例)は3カ月から3年11カ月(平均13カ月、再頻値12カ月)の追跡を行ったが感染を見出し得なかった。このうち6カ月以上追跡して感染を確認できなかった例は15例であった。

・母親のserotypeは10例で検索でき、7例がGroup 1、2例がGroup 2、1例が判定不能であった。

・予定帝王切開例は感染成立例3例中1例、感染不成立例20例中8例であった。

・このほか切迫早産の有無、初産か経産か、分娩時間の長短などが感染の危険因子かどうか判定することは本研究の規模では困難であった。

母集団を31例とすると、うち3例の児がHCV RNA陽性化をみた(9.7%)。感染例と未感染例を比較すると、未感染例には予定帝王切開例などが目立った。しかし予定帝王切開例でも1例感染例があり現時点で有意差はなかった。その他感染例と未感染例を区別できる因子は明らかでなかった。

＜児が感染した予定帝王切開例の経過＞

母体 ITP のために 38w4d 予定帝王切開が行われた。帝王切開適応判定のため胎児採血が 36w1d、37w3d に計 2 回行われていた。2 回とも結果は母体血小板数 11 万に対し臍帯血小板 4.7 万程度であった。帝王切開術前数日は軽度の下腹部の張った感じがたまにあったのみであり陣痛は発生せず娩出に至った。

C-2) 後方視的調査による長期予後および自然治癒に関係する因子の推定

他院で出生した感染児 8 例を含めると感染児 11 例(最終追跡時 9 カ月-17 歳、中央値 7 歳)中 9 例では HCV RNA の自然陰転は観察されず、肝病変の進行が懸念された。17 歳の 1 例は 13 歳時にインターフェロン治療に不応性であった。

＜母子感染した児がウイルスを自然排除する要因＞

感染例 11 例(当院出生 3 例、他院出生 8 例)のうち 2 例で HCV RNA が自然消失した。陰性化の時期は 4 歳 2 カ月および 1 歳 7 カ月であった(図 1, 2)。母体の HCV RNA 量、児の肝機能、HCV serotype などに特記すべき特徴は見いだせなかった。その後、新たな自然消失例は観察されていない。

＜症例 X(図 1)＞母親が心臓手術の際に輸血を受けた既往あり。HCV serogroup 1。HCV RNA は ALT が正常化した後も陽性であった。

最後の HCV RNA 陽性は 3 歳 7 カ月時であった。

＜症例 Y(図 2)＞母親に輸血歴なし。HCV serogroup 1。日齢 5 から HCV RNA は陽性で、最後に陽性が確認されたのは 7 カ月の時であった。1 歳 5 カ月で ALT 値が 25 と低下した際、bDNA 法では感度以下であり、以後再燃はみられなかった。

なお HCV RNA 陰性の母親から出生した児では HCV 感染例は全く見出されなかった。

D. 考察

HCV 母子感染例は HCV RNA 陽性母体の約 10%にみられることが確認された。そのうち一部では ALT 値が正常化すると共に HCV RNA が自然陰転し、治癒したと見られる例があった。

しかし後方視的に観察された感染児の大部分では慢性感染が持続し、長期的には成人に持ち越すことが懸念された。

成人の C 型慢性肝炎はインターフェロンとリバビリンを併用しても難治であり、高率に肝硬変・肝細胞癌に至ることが知られている。

小児の C 型慢性肝炎では、成人に比べて有効率が高いとの報告が目立つ。

一方、急性 C 型肝炎についてはインターフェロン治療の高い有効率が報告されている。

一過性感染例の存在や、比較的高いインターフェロン有効率の報告が見られることから、

HCV 母子感染例は急性感染に近い病態と推測される。

一般に HCV 感染は自覚症状に乏しく、感染児は一見健康である。そうした小児に対して長期的な不利益が今後発見される可能性のある薬物を使用することについては慎重さが求められる。ただし現時点では小児に対して投与を断念するほどの不利益はみられていない。

一方、現在の成人 C 型慢性肝炎に対する治療を見る限り初老期以後の予後は不良であり、場合によっては肝移植の対象となることが懸念される。

従って適切な時期にインターフェロン治療を行い成人期に感染を持ち越さない方針で臨むことは一定の合理性があると思われる。

適切な時期がいつであるかは難しい問題である。乳児期はインターフェロンの副反応として痙攣の頻度が目立つことが知られている。このことと自然治癒例があることを考慮して治療開始を遅らせる考え方もあるが、自然治癒率が年齢と共に低下することは容易に想像される。あるいは罹病期間の延長と共にインターフェロンの有効率が低下することは、インターフェロン無効であった自験例からも考えやすい。

治療時期は自験例からは 5 歳頃までが適当であるように思われるが、多施設で同様の追跡を行っている本研究全体の結果を待ちたい。

E. 結論

C 型肝炎ウイルスの母子感染は少数ながら

一定の割合で発生が続いており、根本的な予防策はない。

感染児には治療が必要であり、そのタイミングについての合意形成が望まれる。

F. 健康危険情報

該当せず。

(HCV RNA 陽性の母親から出生した新生児は約 90% が感染しないまま経過する。残る約 10% が一過性または持続性に C 型肝炎ウイルスに感染する。)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 須磨崎亮. 周産期医学 32 巻 7 号 891-893 (2002.07). 【周産期の感染防止対策】 B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルス 母子感染とその対策.

2) 長谷川誠、須磨崎亮. 小児科診療 65 巻 11 号 1924-1925 (2002.11). 【わかりやすい親への説明マニュアル】 疾患の説明 肝炎.

3) Kudo T, Kido A, Nishiyama Y, Koganeya H, Okuda T, Nabeshima M, Iinuma Y, Ichiyama S.

Whole-blood counting immunoassay as a short-turnaround test for detection of hepatitis B surface antigen, anti-hepatitis C virus antibodies, and anti-Treponema pallidum antibodies.

J Clin Microbiol. 2004 Sep;42(9):4250-2.

2. 学会発表

1) 小児における C 型慢性肝炎治療の新展開

松井陽、藤澤知雄. (2002.09)
第 29 回日本小児栄養消化器肝臓学会(群馬
県高崎市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

C型肝炎ウイルスの母子感染防止に関する研究(3年間の総括)

分担研究者 国際医療福祉大学附属熱海病院小児科 藤澤知雄
協力研究者 同上 乾あやの、十河剛

研究要旨:

C型肝炎ウイルス(HCV)の母子感染の実態を検討し、その結果を現時点で最も効果的な治療法を提案し、多施設合同治療研究を開始した。HCV 母子感染率は 15.9%であり、母子感染を成立因子は母胎の HCV 量と分娩時の母体血の児への移行量と推定した。HCV 母子感染例のうち 3 歳までに約 1/3 は脱キャリア化があるので、積極的な治療時期は 3 歳以降であり、現時点では利便性から PEG-IFN が 1st line の治療薬と考えられた。2004 年から多施設合同治療研究が開始された。

I. HCV 母子感染の実態調査

1990 年 10 月から 2002 年 4 月の間に HCV-RNA 陽性妊婦から生まれ 6 か月以上追跡可能例は 69 例(男児 41 例、女児 28 例)であり、感染児は 11 例(15.9%)であった。感染要因を母体の HCV-RNA 量、HCV-セロタイプ、分娩様式、栄養法を検討したが感染例で母体の HCV-RNA 量が多い以外には有意な差はなかった。

次に、母子間で HCV の Core-E2、NS3、NS4、NS5B 領域のサブクローニングおよび塩基配列を検討したが、母子間で HVR(hypervariable region)以外はほとんど差がなかった。母子感染例では短時間に HVR の変異がみられ、これが持続感染に関与している可能性があると考えられた。

II. 一卵性双生児の一方(第 2 子)のみに母子

感染がみられた例の解析

1 絨毛膜 2 羊膜の一卵性双生児(いずれも HLA-A2)の第 2 子のみに HCV 母子感染みられた例を経験した。いずれも自然経膈分娩であり、胎児間輸血はなく(Hb が一致)、体重差もなかった。この双生児では HCV の体内環境は同一であったと考えられる。3 分後に生まれた第 2 子のみに HCV 感染がみられた。この症例を通じて 3 分の違いはわずかであるが母体血の第 2 子への移行量が第 1 子より多かったと考えられた。この症例報告は J Gastroenterology and Hepatology (2002)17, 917-9 に掲載された。

III. HCV 母子感染でのウイルス遺伝子解析と免疫応答の検討

HCV 母子感染をした一卵性双生児を出生後 4 年以上経過を観察して。第 2 子のみ持続感

染が成立していた。母親および児から RNA を抽出し、報告されている HLA-A2 の CTL エピトープを中心に HCV 遺伝子解析をした。シーケンスが可能であった CTL エピトープの塩基配列は母子間では HVR 以外はほとんど差がなく、wild type の塩基配列と比較して escape mutant の存在を示唆する配列はみられなかった。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あるかと判断した。それを証明するために母児の T 細胞機能を Tetramer および Elispot assay を用いて検討した。母親および第 2 子は tetramer 陽性であったが、非感染の第 1 子は 3 種類の tetramer に対してすべて陰性であった。Elispot assay は 3 人とも弱い反応を示したが、有意な差でないと考えた。以上より感染しなかった第 1 子の T 細胞機能が感染した第 2 子や母親よりも優れているという結果は導き出せなかった。このことから一卵性双生児の第 2 子のみにもみられた HCV 感染は単純に総 HCV 量(母体の HCV 濃度×移行血液量)が多かったと判断した。

V. HCV 感染症小児に対する PEG-IFN 療法

1. 治療の対象

(1) ALT 値が 6 か月以上にわたり異常高値(各施設の基準値上限を越す)。(2) 投与前 6 か月以内に肝生検が施行され、慢性肝炎と診断されている。原則として肝硬変は除外する。(3) HCV-RNA は陽性である。(4) 原則として投与開始より 2 週間は入院が可能である。(5) 対象は 3 歳以上 19 歳未満の初回投与例である。

2. 除外の条件

(1) 脂肪肝、薬剤性肝障害、自己免疫性肝

炎、B 型慢性肝炎、EBV 感染、CMV 感染など C 型肝炎以外の肝機能異常を慎重に除外する。

(2) 好中球数減少($1,500/\mu\text{l}$ 未満)、血小板減少($90,000/\mu\text{l}$ 未満)、貧血

($\text{Hb}<10\text{g/dl}$) の場合。(3) 重篤な合併症を有する場合。(4) その他、担当医が対象として不適当と認めた場合。(5) 基礎疾患が血液・悪性腫瘍で完全寛解が得られていない場合。骨髄移植は同種骨髄移植であれば移植後 24 か月以内、自家骨髄移植後では 12 か月以内は PEG-IFN は投与しない。(6) 3 歳未満の乳幼児(本薬剤はベンジルアルコールを含有するため)。

(7) コントロールされない痙攣発作がある場合。

(8) 重度の心障害の既往歴がある場合。

3. 治療方法

使用薬剤: PEG-IFN $\alpha 2a$ 、

商品名 Pegasys (ペガシス) $90\mu\text{g}$, $180\mu\text{g}$

用法・用量: PEG-IFN を $100\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{回}$ (最大投与量 $180\mu\text{g}/\text{回}$) を 1 週間に 1 回皮下注、計 48 週間。投与量の端数は $10\mu\text{g}$ で切り上げる。

投与上の注意: 投与部位は、上腕、大腿、臀部など広範囲に求め、順序よく移動し同一部位に短期間に繰り返さない(従来の IFN 製剤より局所反応が強い)。初回投与前に必要であればブリック試験を行う。

従来の IFN 製剤よりインフルエンザ様症状は少ないが、症状がみられた場合はその時点でアセトアミノフェンを頓服しても良い。投与後 2 週までに血球系の減少がみられ、原則として 2 週間は入院とする。入院期間中は 2/週で末梢血液像を含む血算は最低限行う。その後 6-12 週までは減少が緩徐にみられることがある。3 週目からは外来投与が可能であり、遠方の患者は適切な医療施設に紹介して連携しながら投

与を続ける。外来で投与する場合は出来るだけ患者の都合にあわせる。

4. 投与中の検査と注意点

肝機能 (AST、ALT、T-Bil、D-Bil、LDH、 γ -GTP) 血算、腎機能 (BUN、Cre、場合によっては Ccr)、検尿を投与開始 2 週間までは 2-3 回/週行い、3 週以降は 1 回/週程度行う。血球系の減少は 2 週目までみられ、3 週目以降は下げ止まり、終了後に回復することが多い。投与直前に血算は必ず検査する。一応、白血球数 $2,000/\mu\text{l}$ (好中球数 $500/\mu\text{l}$) 未満、血小板数 $25,000/\mu\text{l}$ 未満、Hb 8.5g/dl 未満が投与中止の目安である。投与開始後にトランスアミナーゼ値が上昇する症例があるが、投与量の減量や中止する必要はない。また、好中球数 $750/\mu\text{l}$ 、血小板数 $50,000/\mu\text{l}$ 未満が半量へ減量する目安である。HCV-RNA と HCV コア抗体は 4 週目までは 1 回/週、それ以降は 1 回/月で検査する。HCV-RNA はアンプリコア法で行い、感度以下になった場合はアンプリコア定性で行う。HCV-RNA 量などの検査方法を統一する必要がある検査項目があるため、定期的に血清を保存しておく。

Base line (投与直前)、投与後 4 週目、投与後 12 週目、投与後 24 週目、投与終了時 (投与後 48 週)、投与終了後 4 週目 (投与後 52 週目)、投与終了後 24 週目 (投与後 72 週目)、投与終了後 48 週目 (投与後 96 週目)

長期投与で起こりうる副作用には、蛋白尿、好中球減少による感染、自己免疫性疾患の誘発や増悪、甲状腺機能異常、心筋障害、脱毛、皮膚炎、生理不順、うつ病などが知られており、監視が必要 (小児では副作用は少ない) である。やむを得ない理由で PEG-IFN を中止する

場合は、中断により急速に HCV が増殖 (リバウンド) する可能性はないので漸減中止する必要はない。テオフィリンの血中濃度を上昇させることが報告されているので、テオフィリン併用の患児では定期的にテオフィリン血中濃度を測定する。

5. 効果判定

48 週終了後に効果判定を行う。経過中に持続的に HCV-RNA が陰性化していても PEG-IFN は終了しない。判定は以下のように行う。

ウイルス学的基準

著効: PEG-IFN 終了後 6 か月後の HCV-RNA が陰性

再燃: PEG-IFN 終了時の HCV-RNA 定性が陰性で 6 か月以内に陽性化する

無効: PEG-IFN 終了時に CV-RNA 定性が陽性でそのまま持続

生化学的基準

著効: PEG-IFN 終了後 6 か月以上血清 ALT 値が持続的に正常。

注): HCV-RNA 持続陰性を完全著効 (CR: Complete Response)。HCV-RNA 陽性で血清 ALT 値が持続正常化を生化学的著効 (BR: Biochemical Response)。

再燃: PEG-IFN 終了時血清 ALT 値は正常で 6 か月以内に再燃。

無効: PEG-IFN 終了時から血清 ALT 値が異常。

V. PEG-IFN 投与例

5 歳男児。HCV 母子感染により C 型慢性肝炎。HCV-RNA 量は $3,500\text{KIU/ml}$ であり、Genotype は 2a。肝生検では A1F2 であった。PEG-IFN α 2a を $70\sim 90\mu\text{g}$ 皮下注。HCV-RNA は一旦減少したが、持続陽性のた

め家族の希望もあつて投与 31 週 (31 回目) で中断した。副作用は 1 回目の投与時に発熱がみられたが以降は全くなく、血小板数、白血球、Hb に変動はなかった。

7 歳男児。HCV 母子感染により C 型慢性肝炎。HCV-RNA 量は 11.0KIU/ml、Genotype は 2a。肝生検では A1F1。PEG-IFN α 2a 90 μ g 皮下注。投与 17 週 (17 回目) で HCV-RNA は陰性化した。投与開始後トランスアミナーゼは上昇、血小板の軽度の減少傾向がある。やはり PEG-IFN 初回投与時に発熱がみられたのみである。

結語

HCV 母子感染の実態がほぼ明らかになった。HCV ワクチンは未開発であり、今後も短期的にはその開発は困難である。従って B 型肝炎ウイルスの母子感染の予防のような HCV 母子感染の予防の目処はたたない。今後は多施設で私どもの作成した PEG-IFN 療法の共同治療研究を行い、HCV 母子感染例を対象として最適な治療法を確立したい。

文献リスト

1. 学会報告

- 1) Fujisawa T : Update on management of chronic hepatitis C in children. The 2003 Spring Symposium of the KSPGAN (Korea Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition), April 12, 2003, Korea
- 2) Fujisawa T.: Hepatitis C in children: Which children should be treated. The 11th Asian

Congress of Pediatrics. 2003, 11, 2-7, Bangkok, Thailand

- 3) Poovorawan Y, Chang MH, Fujisawa T.: Hepatitis A in Asia. The 11th Asian Congress of Pediatrics. 2003, 11, 2-7, Bangkok Thailand
 - 4) Chang MH, Fujisawa T, Poovorawan Y.: Hepatitis B in Asia. The 11th Asian Congress of Pediatrics. 2003. 11. 2-7, Bangkok, Thailand
 - 5) Fujisawa T, Poovorawan Y, Tse K, Seo JK, Quak SH, Chang MH. Working report on Hepatitis C. The 11th Asian Congress of Pediatrics, Bangkok, Thailand
 - 6) 乾あやの、藤澤知雄、阿部賢治 小児期における HBV 感染症と HBV genotype の検討. 第 35 回日本肝臓学会東部会 2004. 12.10-11. 東京
- ##### 2. 論文(著書)
- 1) 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 Gastroenterol and Hepatol 17: 717-19, 2002
 - 2) 乾あやの、十河剛、小松陽樹、藤澤知雄: C 型肝炎に対するインターフェロン、リハビリ併用療法. 小児科, 44:840-845, 2003
 - 3) 藤澤知雄、乾あやの、十河剛、小松陽樹: 小児期における B 型・C 型慢性肝炎の治療の進歩. 化学療法の領域, 19:1613-1623, 2003
 - 4) 藤澤知雄: 急性肝不全の栄養療法と食事療法. 小児科, 44:1731-1736, 2003

- 5) 藤澤知雄:肝炎ウイルス.日常診療に役立つ
小児感染症マニュアル 2003-2004,
267-275, 2003, 東京医学社
- 6) Komatsu H, Inui A, Sogo T, Kuroda
K, Tanaka T, Fujisawa T.: TTV
infection in children born to
mothers infected with TTV but
not with HBV, HCV, or HIV. J Med
Virol 74: 499-506, 2004
- 7) 乾あやの, 十河剛, 藤澤知雄, 小松陽樹.
B型・C型肝炎ウイルス感染症. 小児科診療.
67:421-427, 2004
- 8) 乾あやの, 十河 剛, 藤澤知雄. HBV,
HCV キャリアの母親からの母乳は感染源に
ならない. 小児内科, 35: 982-984,
2004
- 9) 藤澤知雄, 乾あやの, 十河 剛, 小松陽樹.
小児期におけるB型慢性肝炎の長期経過.
日本臨床.62.増刊号.ウイルス肝炎(下).
303-308, 2004
- 10) 乾あやの, 藤澤知雄, 十河 剛, 小
松陽樹. HBVの母子感染と予防対策. 日
本臨床. 62. 増刊号. ウイルス性肝炎(下).
190-194, 2004
- 11) 藤澤知雄, 十河 剛, 乾あやの. C
型慢性肝炎に対するPEG-IFN療法の適
応は? 小児内科.36. 1327-1329,
2004
- 12) 小松陽樹, 乾あやの, 十河 剛, 藤
澤知雄. 小児のTTV感染症はどこまでわ
かったか? 小児内科. 36. 1332-1334,
2004
- 13) 藤澤知雄. B型肝炎ワクチン. 小児看
護. 27. 1628-1632, 2004
- 14) 藤澤知雄, 乾あやの, 十河 剛.
HBV感染症の予防はできているか? 周産
期医学. 特集号. 周産期 ケア. 34.
530-532, 2004

3年間のまとめ

分担研究者	戸蒔 創	名古屋市立大学大学院	先天異常・新生児・小児医学	教授
共同研究者	後藤 健之	名古屋市立大学大学院	医学・医療情報管理学	助手
共同研究者	杉浦 時雄	名古屋市立大学大学院	先天異常・新生児・小児医学	研究医
共同研究者	伊藤 孝一	名古屋市立大学大学院	先天異常・新生児・小児医学	院生

研究要旨

C型肝炎ウイルス母子感染成立例の自然歴を明らかにするため、当院及び関連病院で自然経過を観察可能であった11症例について検討した。観察例では4歳頃までに一過性の肝障害を経験し、その後トランスアミナーゼが正常化する場合が多いことから、母子感染が成立し、一過性に肝障害を認めても、多くの場合は小児期に慢性化、重症化すること少ないと推定された。

C型肝炎ウイルス母子感染成立2家系については、連続して採取した血清より抽出したHCV RNAからE2遺伝子のRT-PCRを実施、サブクローニングの後、塩基配列の決定を行い、推定されるアミノ酸配列の経時的変化に関する検討した。その結果、母子間のウイルスのhyper variable region(HVR)の配列は、長期の経過により大きく変異していることが示された。

C型肝炎ウイルス母子感染のリスク因子を検討する目的で、当院及び関連病院にてHCV RNA陽性、あるいはHCV抗体高力価陽性の妊婦より出生し、その後の経過でC型肝炎ウイルス感染の有無を観察可能であった55例に対し、分娩様式(予定帝王切開、緊急帝王切開、自然分娩)、授乳法、在体週数、出生時体重、母体のHCV RNA量、出産後よりRNA測定時するまでの期間、検出されたC型肝炎ウイルスのgenotypeあるいはserotypeについて評価した。母子感染率を上昇させる明らかな要因は認められなかったが、帝王切開例では母体のウイルス量にかかわらず、1例も感染が成立した例はなかった。

A. 研究の目的

輸血や血液製剤からのC型肝炎ウイルス感染は、輸血や製剤用の血液に対するスクリーニング検査が始まって以来、急速に減少し、最近では、小児期に新たに発生するC型肝炎患者の感染ルートは、思春期以降に感染する経路を除き、母子感染によるものがほとんどである。しかし現在でもC型肝炎ウイルスの母子

感染については、明らかでない点も多く、そのリスク因子を調査し予防法を明らかにしていくこと、母子感染が成立してしまった場合の児の予後を明らかにし有効な治療法を開発することは重要な課題である。今回我々は、C型肝炎ウイルス母子感染例の自然歴を明らかにするため、当院及び関連病院で経過を観察可能であった11症例について検討した。長期観察

し得たC型肝炎ウイルス母子感染2家系については、連続して採取した血清より抽出したHCV RNA から E2 遺伝子の RT-PCR を実施、サブクローニングの後、塩基配列の決定を行い、推定されるアミノ酸配列の経時的変化に関する検討した。母子感染のリスク因子を検討する目的で、当院あるいは関連病院においてHCV RNA 陽性あるいはHCV 抗体高力価陽性妊婦より出生した児の分娩様式や母体のウイルス量、授乳法などを検討し、それぞれが母子感染成立に対して与える影響について調査した。

B. 「C型肝炎母子感染成立例の検討」

1) 対象

対象は当院及び関連病院で経験したC型肝炎ウイルス母子感染成立例 11 例(症例 1-11)。それぞれの臨床経過および全体のまとめにつき検討した。

2) C型肝炎母子感染成立例 11 例の背景

C型肝炎母子感染成立例 11 症例の背景を表1に示す。初診時年齢、最終観察年齢、観察期間、genotype (一部 serotype)、ALT 頂値妊娠中の母体の状態、妊娠歴、分娩様式、分娩時の異常、在胎週数、出生時体重、栄養法が示してある。分娩様式は全例、自然分娩であり、分娩時の異常は無かった。全例満期出産であり、出生時体重も正常範囲内であった。その他感染例の背景に特徴は認めなかった。ほとんどの症例が後方視的に検討した症例であり、出生直前直後の母体の血清中 C型肝炎ウイルス量は測定されていなかった。

3) 11症例の臨床経過

それぞれの臨床経過を図 1-11 に示す。

症例 1

6ヶ月～1歳に軽度のALT値の異常が認め

られたが、それ以降は落ち着いている。HCV RNA は 2 歳 1 ヶ月時より定性法でも陰性化した。その間も HCV 抗体価は持続して高値であり、4 歳 6 ヶ月時に再び陽転した。

症例 2

3 ヶ月～8 ヶ月に ALT 値の異常 (> 100 IU/l) が見られたが、その後は正常値が続いている。HCV RNA は現在まで持続して陽性である。

症例 3

9 ヶ月～10 ヶ月まで ALT 値の異常(最大 243 IU/l)を認めたが、その後は鎮静化した。HCV RNA は持続して陽性である。

症例 4

1 歳 7 ヶ月時～1 歳 8 ヶ月にかけて最大 ALT 値 206 IU/l となる異常を認めたが、その後は正常化し現在に至っている。HCV RNA は持続して陽性である。

症例 5

4 ヶ月～10 ヶ月にかけて、軽度 ALT 値の異常があったが、その後は現在まで正常値が続いている。HCV RNA は持続的に陽性である。

症例 6

現在までALT値の異常は認めていない。3ヶ月、8ヶ月、1歳1ヶ月、2歳9ヶ月のRT-PCR法(定性)ではHCV RNAは検出されなかったが、HCV抗体価は持続して高値が続いており、治癒に至っていないものと思われた。

症例 7

ALT 値の上昇と低下(最大 ALT 値 210 IU/l)を3度繰り返しており、ALT 値上昇時には HCV RNA は陽性となっていた。最終診察時には ALT 値は正常化し、HCV RNA は陰性化していた。

症例 8

ALT 値は 1 歳 3 ヶ月に 949 IU/l まで上昇

したが、現在ではほぼ正常化した。HCV RNA は検出されていないが、HCV コア抗体は 290 U と高値が続いており、治癒に至っていないものと考えられた。

症例 9

次子の出産の際、母親が HCV RNA 陽性であることが判明し、4 歳 7 ヶ月時の検査で、児も HCV RNA 陽性であることを確認した。4 歳時より ALT 値はほぼ正常値が続いている。8 歳時に一過性の肝機能障害を認めたが、HCV による肝炎か否かは明らかではなかった。

症例 10

1 歳 3 ヶ月児より ALT 値は軽度の上昇と下降を繰り返して来たが、最近では、ほぼ ALT 値は鎮静化してきている。1 歳 3 ヶ月時に肝障害を観察した際、ウイルス量は分岐 DNA プローブ法で検出感度以下だったが、現在徐々にウイルス量は増加してきている。抗体価は持続的に高値を示していた。

症例 11

1 歳 4 ヶ月までは HCV Ab 3.0 (+)、HCV RNA (RT-PCR 法) 0.5 KIU/ml 未満であった。1 歳 10 ヶ月時の検査で、ALT 値は正常であったが、HCV Ab 41.5 (+) と上昇を認めた。その後もトランスアミナーゼは落ち着いていたが、3 歳 9 ヶ月時の検査で ALT 154 U/l と上昇を認め、HCV RNA (ハイレンジ) 260 KIU/ml とウイルス量の増加を認めた。最近では ALT 29 U/l と肝炎の鎮静化を認め、750 KIU/ml (ハイレンジ) であったウイルス量は、1 ヶ月後に 5 KIU/ml 以下になるなど、大きな変動を認めている。

4) ALT 値とウイルス量の推移

全症例の ALT 値の変動を図 12 に示す。今回検討した母子感染成立例では、1 歳～3 歳

に ALT 値の上昇が認められても、ほとんどが一過性であり、4 歳頃までに ALT 値は正常化し、その後の観察期間では ALT 値の再上昇は確認していない。ウイルス量については、肝障害の有無にかかわらず、比較的高値が持続する例、比較的低値で持続する例、量の変動が激しい例など、多様であり、一定の傾向は認められなかった。またウイルス量の変動パターンと感染例の背景との間にも一定の傾向は認められなかった。全例、前回報告時から新たに肝障害が出現した例はなく、ウイルスが自然消失した例も認められなかった。

5) 考察

日常診療での C 型肝炎ウイルスに感染していない症例では、3 歳ぐらいまでに慢性的な肝障害を観察することは比較的良好に経験され、原因の一部としてサイトメガロウイルス (CMV) などのウイルス感染によるものが推定されている。C 型肝炎ウイルス母子感染成立例において、3 歳ぐらいまでに経験する肝障害が、C 型肝炎ウイルス感染によるものか、そのほかの原因によるものかについては、慎重な鑑別診断を必要とすると思われた。

当院で経験した母子感染成立例では 4 歳頃までに一過性の肝障害を経験しても、その後トランスアミナーゼが正常化する例が多いことから、C 型肝炎ウイルス母子感染が成立し、一過性に肝障害を認めても、多くの場合は小児期に慢性化、重症化すること少ないと思われた。最近の報告では、C 型肝炎ウイルスの母子感染が成立しても 1/3 程度は 3 歳頃までにウイルスが自然消失すると言われるが、我々の施設では、C 型肝炎ウイルスが自然消失した例は 11 例中 1 例も経験しなかった。理由として観察例のほとんどが、妊娠期から前方視的に観

察したものではなく、当院に紹介された後、後方視的に経過を観察しえた症例であることも一因であると考えられた。

c. 「HCV 母子感染後、長期観察例における HCV E2 領域 hyper variable region の変異と多様性に関する検討」

1) 研究方法

a) 対象

対象は HCV 母子感染が成立しウイルス血症が持続している2家系2母子。Family1(前述症例2)では4、9、12、30、114ヶ月、Family2(前述症例10)は162ヶ月時に母親及び児の血清中のHCVを調査した。(図2、図11)

b) 方法

RNA 抽出と cDNA 合成

患者より血液を採取後、遠心し-30℃で凍結保存してあった血清を、検査時溶解し、tRNA をキャリアに用い acid-guanidine-phenol-chloroform method(AGCP 法)で RNA を抽出した。cDNA はランダムプライマーと SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, USA)を用いて、抽出した RNA より逆転写反応で合成した。

PCR

PCR 法はプライマー 5'-CGC ATG GCA TGG GAC ATG AT-3'、5'-GGR GTG AAR CAA TAC ACY GG-3'、rTaq DNA polymerase (TAKARA、Otsu)、合成した cDNA を用い denature、annealing、extension をそれぞれ 30 秒、30 秒、60 秒の 35 cycle で 1st PCR を実施した。その

後、1st PCR 産物をテンプレートに使用して、プライマー 5'-GGG ACA TGA TGA TCA ACT GG-3'、5'-GTG AAR GAA TTC ACY GGG CCR CA-3' を用い 1st PCR と同条件、30cycle の nested PCR を実施した。PCR 産物はアガロースゲル上で電気泳動し UV 上で陽性バンドを確認した後、ゲルから切り出し QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN KK, Tokyo) にて DNA を抽出した。

PCR サブクローニング

切り出した直後の PCR 産物を TA cloning kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)を用い、添付のベクターに ligation し大腸菌に transformation した。LBプレート上にて培養後 Blue/White selection で選択した 5~10 コロニーを、液体培地で増幅し、増殖した大腸菌から Wizard Mini Column (Promega Corp., WI, USA)を用いベクターを抽出した。

シーケンス反応

抽出したベクターから BigDye Terminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて、シーケンス反応を実施し 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて塩基配列を決定後、HVR 1、2 のアミノ酸配列を推定し比較した。

3) 研究結果

2例における塩基配列の比較結果を表2、3に、分枝系統樹を図13、14に示す。

Family1では、出産後4ヶ月の時点で母親からのクローンの HVR 配列は大きく4タイプに分類されたが、児で優位であったクローンはいずれのタイプにも類似していなかった。母か

ら検出されたクローンは、その後の経過で1つのタイプに収束したり、拡散したりして114ヶ月の時点では大きく3タイプに分類された。この3タイプは4ヶ月の時点で観察された4タイプ中の3タイプと類似していたが、細かい所では異なっていた。一方、児から観察されたクローンは12ヶ月の時点までは、4ヶ月時に母親から観察されたクローンと類似していなかったが、30ヶ月時点では2/5クローンが母親のそれと類似しており、114ヶ月の時点では30ヶ月で初めて観察された2クローンが最も優位となっていた。このクローンは4ヶ月の時点で母親から検出された物と類似していた。

Famly2では出産後162ヶ月の1ポイントのみでの評価であるが、児から観察された2タイプのクローンは、162ヶ月で母親から観察されたクローンと全く異なっていた。

4) 考察

母子感染であるため、出生直後には母と児は同一クローンを有していたと思われるが、その後の経過でFamily1では出生時、母子感染が成立した際、マイナーなクローンであったものが、免疫の圧力等により選択され、徐々に優位となっていった事が推定された。一方、Family2では、母親と児ではそれぞれ異なったタイプのクローンが、13年以上の歳月の間に選択されて優位となった事が推定された。

D. 「HCV 抗体陽性母より出生した児における母子感染成立要因の検討」

1) 調査対象

当院及び関連病院にてHCV RNA 陽性、あるいはHCV 抗体高力価陽性の妊婦より出生し、その後の経過でHCV 感染の有無を観察可能であった55例。

2) 検査方法

HCV RNA の定量は分岐 DNA プローブ法あるいはRT-PCR 法(定量法)を用いた。HCV 抗体の測定は、当院及び関連病院それぞれで実施されている方法が異なっているため、各施設で通常実施されている方法(RIA 法、EIA 法、CLEIA 法等)に従い評価した。分娩様式と母子感染との関係を明らかにする目的で、55例を分娩様式(予定帝王切開、緊急帝王切開、自然分娩)、児の感染の有無で分類し、それぞれの児の授乳法、在体週数、出生時体重、母体のHCV RNA 量、出産後よりRNA 測定時するまでの期間、検出されたHCV のgenotypeあるいはserotypeについて、後方視的(一部、前方視的)に評価した。

3) 結果と考察

結果を表4に示す。児は最低6ヶ月間経過を観察し、HCV 抗体が完全に陰性化した場合を非感染例とした。一部の症例ではRT-PCR 法(定性)でHCV RNA が陰性であることも加えて確認した。昨年度、HCV 抗体陽性母より出生した児における母子感染成立要因の検討として報告したが、今回はさらに症例を加えることができた。感染成立例は全例経膈分娩例で、帝王切開例では緊急、予定ともC型肝炎ウイルスの母子感染は成立していなかった。感染成立例にやや女兒が多い傾向が認められたが、臨床的意味は不明であった。授乳法に関しては、完全に人工栄養のみの場合は少なく、混合であっても母乳を飲んだ時期、量とも多様であるため、評価は困難であった。在胎週数、出生時体重には感染例、非感染例の間には一定の傾向は認められなかった。genotype に関しては、感染例では本人から検出されたウイルスのgenotypeとして調べられている例が多いが、非感染例では本人から調べるこ

は困難であり、母体の肝機能が正常な場合、検出されたウイルスの genotype については検査未実施の例が多く、評価は難しかったが、調べられている範囲内においては、一定の傾向は認められなかった。母体のウイルス量に関しても、前方視的に検討された症例は少ないため、出産前後で測定された症例は少なく、測定時期によって C 型肝炎ウイルス量の検査法が、分岐 DNA プローブ法、RT-PCR 法(定性、定量)、RT-PCR 法(ハイレンジ)と様々であったため、評価が困難であった。

(倫理面への配慮)

本研究は、個々の診療における一般的な検査のデータを集約したもの及び患者の同意を得て採取した検体中のウイルスを解析したものである。この研究を遂行するに当たり、プライバシーを尊重し、施設、個人名が特定出来ないように配慮した。

E. 健康危険情報

特記事項はなし。

F. 研究発表

1 論文発表

Ban K, Sugiyama K, Goto K, Mizutani F, Togari H. Detection of PHKA2 gene mutation in four Japanese patients with hepatic phosphorylase kinase deficiency. *Tohoku J Exp Med.* 2003;200:47-53.

Goto K, Sugiyama K, Sugiura T, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Ban K, Togari H. Bile salt export pump gene mutations in two Japanese patients

with progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36: 647-50.

Terabe K, Sugiyama K, Goto K, Mizutani F, Wada Y, Yokoyama T, Ando Y. Relationship between human cytomegalovirus glycoprotein B genotype and serum alanine aminotransferase elevation in infants. *Tohoku J Exp Med.* 2003;203:339-344, 2004

Sugiura T, Goto K, Imamine H, Ando T, Ban K, Sugiyama K, Togari H. Prevalence of SEN virus among children in Japan. *Virus Res.* 100:223-228, 2004

Sugiura T, Goto K, Ito K, Ueta A, Fujimoto S, Togari H. Chronic zinc toxicity in an infant who received zinc therapy for atopic dermatitis. *Acta Paediatrica (in press)*

2. 学会発表

安藤寿啓、杉浦時雄、後藤健之、稲垣晴代、河辺義和、杉山幸八郎: HCV 母子感染例の臨床経過. 第19回肝臓研究会 (2002.7、土浦)

後藤健之、安藤寿啓、杉浦時雄、杉山幸八郎、戸苅創: 小児期の劇症肝炎における E 型肝炎ウイルスの関与に関する検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会(2003、4/25~4/27、

福岡)

杉浦時雄、後藤健之、安藤寿啓、杉山幸八郎、戸荻創:日本人小児における SEN Virus 感染の検討. 第 30 回日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会(2003、11/7~11/8、北九州)

Kenji Goto, Tokio Sugiura, Toshihiro Ando, Fumihiko Mizutani, Koji Terabe, Kyoko Ban, Kohachiro Sugiyama, Togari Hajime. Two Japanese Patients with Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Displaying Mutations in the Bile Salt Export Pump, 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2004.7/5 Paris

Tokio Sugiura, Kenji Goto, Hiroki Imamine, Toshihiro Ando, Kyoko Ban, Kohachiro Sugiyama, Hajime Togari. Prevalence Of SEN Virus among Children in Japan, 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2004.7/5 Paris

Yasuko Takasaki, Tokio Sugiura, Kenji Goto, Toshihiro Ando, Yoshishige Miyake, Fumihiko

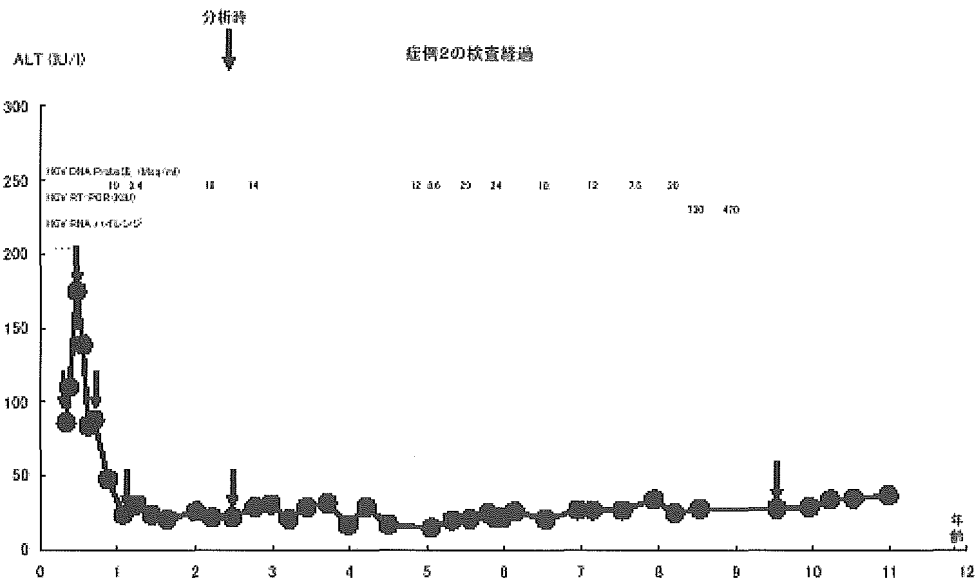
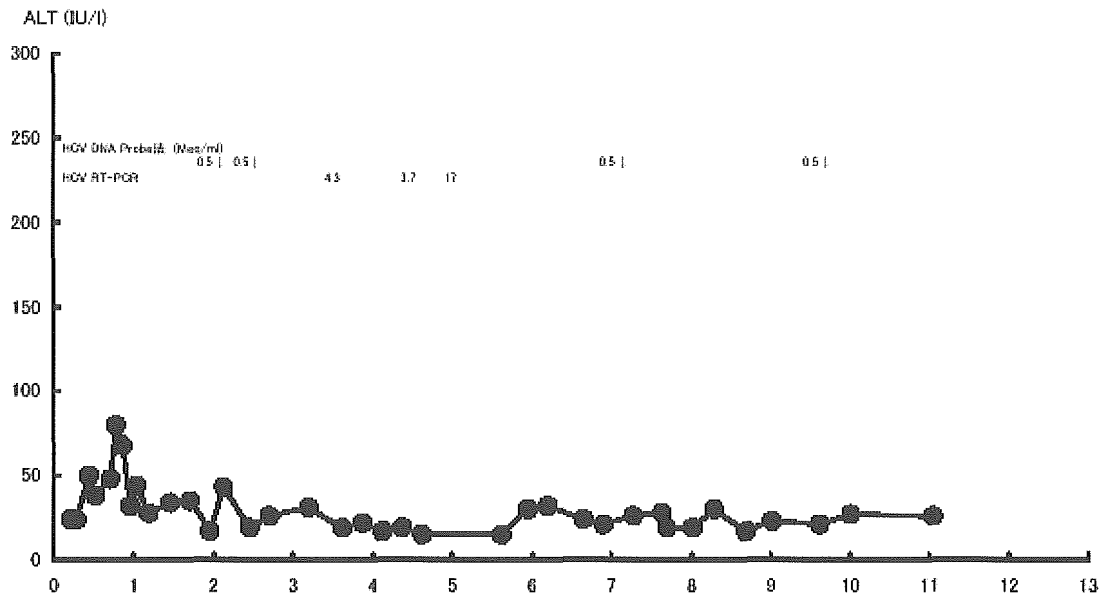
Mizutani, Yoshikazu, Kawabe, Kohachiro Sugiyama, Hajime Togari. Study of Hepatitis E Virus among Japanese Children with Fulminant Hepatitis, 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2004.07/5 Paris

伊藤孝一、後藤健之、小野水面、杉浦時雄、安藤直樹、水野晴夫、鷺見聡、藤本伸治、浅井雅美、杉山幸八郎、戸荻創. CMV-DNA コピー数の観察が、病態の把握に役立つ CMV 感染症の男児例、第8回東海小児感染症研究会 (2004、10/23、名古屋)

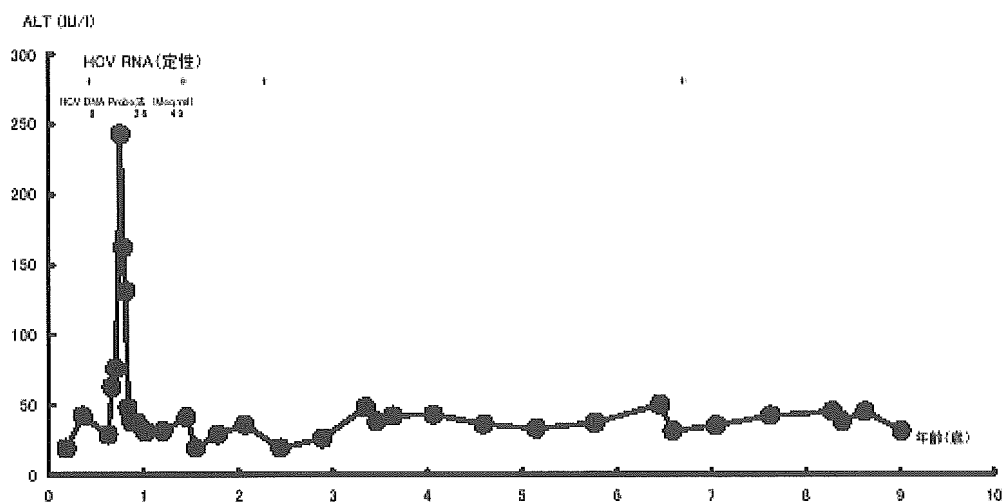
杉浦時雄、後藤健之、伊藤孝一、加藤丈典、福田純男、側島久典、坂京子、安藤寿啓、戸荻創. C 型肝炎ウイルス(HCV)の母子感染に関する検討、第 49 回日本未熟児新生児学会 (2004、12/6、横浜)

G. 知的財産権の出題・登録状況
現時点でなし。

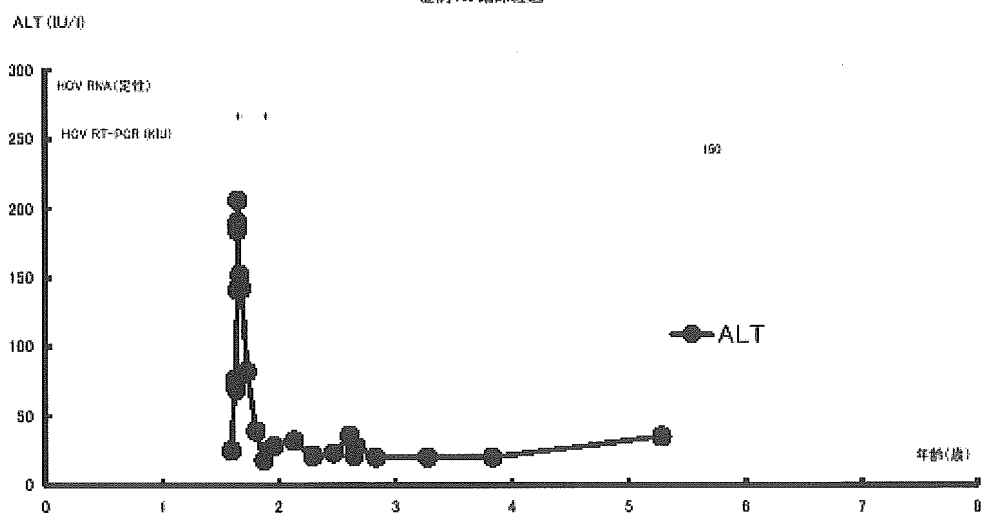
症例1の検査経過



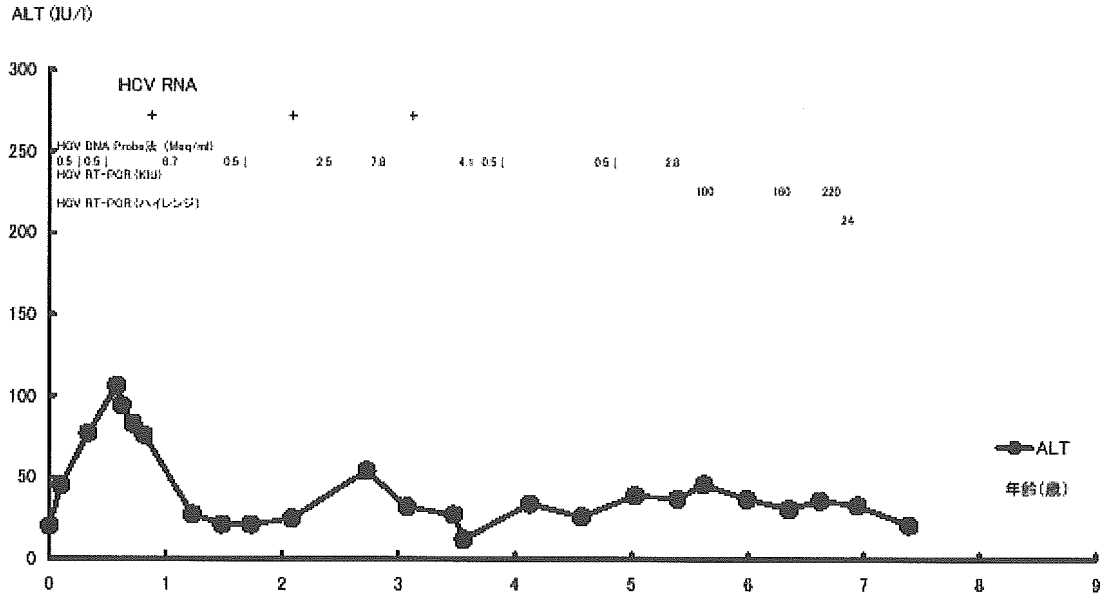
症例3の臨床経過



症例4の臨床経過



症例5の臨床経過



症例6の臨床経過

