

HBV が存在し続けており、血液中にも HBV が放出されている (NAT により検出できる量の HBV DNA が放出されている) 場合があり、時にこの状態の血液が感染源となって輸血後 B 型肝炎が起こる場合があることもわかってきました。

HBc 抗体陽性 (HBs 抗原は陰性) の血液が、HBV の感染源となり得ることが初めて認識されたきっかけは、1970 年代に、当時国立療養所東京病院で輸血後肝炎の追跡調査をしておられた外科の片山透先生が輸血後 B 型劇症肝炎の 1 例に遭遇されたことでした。

当時は既に凝集法 (R-PHA 法) による HBs 抗原のスクリーニング検査が定着していましたが、この患者への輸血に使われた血液を提供した献血者全員の協力を得て血液を再採血して改めて調べてみると、HBs 抗原は全例陰性であったものの、1 例だけ HBc 抗体が陽性 (高力価陽性: 2^{12} LAHA 価) の献血者がみつき、この献血者の血液が感染源になったと想定されました。

当時は、ごく微量の HBV を直接検出する方法がなかったため、HBs 抗原が陰性であっても、高力価の HBc 抗体が検出される血液 (の一部) は他に対して感染源となる場合もあり得る、という、いわば傍証を得た段階で終わっていたわけです。

スライド 6

HBV 感染の特性に基づいた 血液の安全性向上のための対策	
HBV 感染の態様	対 策
・ HBV 持続感染 (HBV キャリア状態)	: HBs 抗原の検出
・ HBV 感染既往 (HBV 感染の晩期)	: HBc 抗体の検出、測定 : 核酸増幅検査 (NAT) による HBV DNA の検出 (過去の献血履歴)
・ HBV 感染の新規発症 (HBV 感染の早期)	: 核酸増幅検査 (NAT) による HBV DNA の検出 : 安全性向上のための教育 (検査を目的とした献血の排除)

1980年代に入り、当時埼玉県赤十字血液センターの研究部にいた袖木久雄氏（現 日赤中央血液研究所 NAT部 部長）がHBc抗体陽性（HBs抗原は陰性）の血液を対象としてHBV DNAの検出を試みた結果、HBc抗体価が高い値を示す（HBs抗原陰性の）集団では、比較的高い頻度でHBV DNAが検出されること、HBc抗体価が2⁶HI 価未満の集団では（当時の検出感度では）HBV DNAは検出されないことがわかりました。

この成績が基礎となって、全国の日赤血液センターにおいて1989年11月からHBc抗体が2⁶HI 価以上の血液を排除するスクリーニングが導入されることとなりました（現在はHBc抗体：2⁵HI 価以上の血液を排除）。

更に、1999年10月からは核酸増幅検査（NAT）によるHBV DNA検査が導入され、輸血後B型肝炎は日常的にはほとんどその姿をみることはない程にまで減少し今日に至っていることは初めにお話しした通りです。

スライド7

HBc抗体価別にみたHBV DNA検出率		
- HBc抗体価測定によるスクリーニングの根拠となったデータ -		
- Iizuka H. et al. Vox Sang 1992 -		
HBc 抗体価 2 ^N HI 価	対象数 ¹⁾	HBV DNA 陽性数 ²⁾ (%)
12 ^U	13	5 (38.5)
11	8	1 (12.5)
10	14	0
9	13	2 (15.3)
8	26	1 (3.8)
7	48	1 (2.0)
6	53	2 (3.8)
5	53	0
4	49	0
3	17	0
合計	294	12

12 / 175 (6.9)
 0 / 119

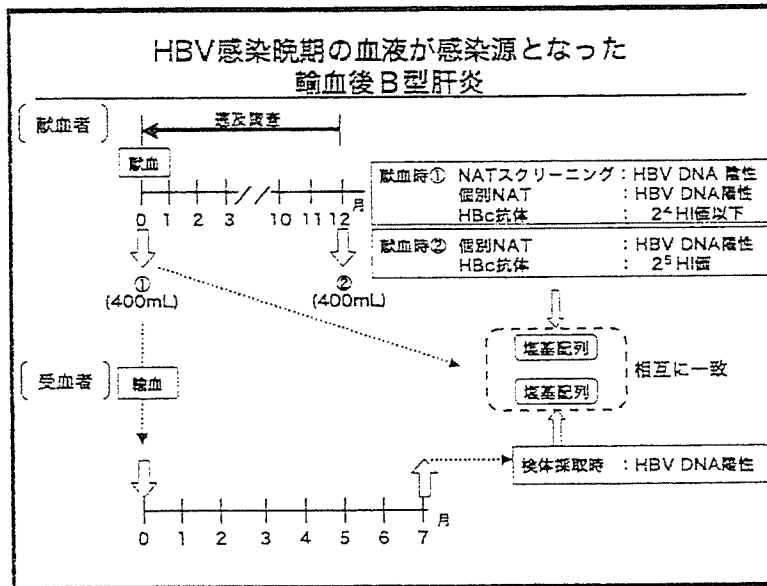
1) HBs抗原 陰性
 2) PCR によるHBV DNAの検出 (1980年代)

しかし、一方では、日赤血液センターによって行われた丹念な遡及調査の結果、HBc抗体価が、現在のスクリーニングレベルである2⁵HI 価未満で、当時の50本ミニプールNAT（献血された血液50本をプールしたものを1検体としてNATによりHBV DNAを検出する方法）ではHBV DNAが検出できない（HBV DNA量に換算して、10³ コピー/ml 未満のHBV量の）血液が感染源となった輸

血後B型肝炎例も見つかってきました。

ここで、「HBV感染の晩期」という概念を形作る過程で得た様々な傍証、確証を順を追って話しておきたいと思います。

スライド8



血中のHBs抗原が陰性であっても、HbC抗体価が高い値 (2¹² IU/ml以上) を示す例では肝細胞内にHBVが存在する場合がある (正しくは肝細胞内にHBs抗原、HbC抗原の存在が証明される場合がある) ことは1977年に蛍光抗体法により初めて見出されました。これは、当時岐阜大学の内科に居られた小島峯雄先生の症例を、当時東京都立臨床医学総合研究所に居た私達が蛍光抗体法により染め出したことにより明らかになったものです。

その後、永い間にわたり、この問題についての進展はみられませんでした。1990年代の後半に入り、肝移植が行われるようになってから、再び注目を集めることとなりました。

まず、1997年に、HBVに免疫を持たない患者 (レシピエント) が、HbC抗体陽性 (HBs抗原は陰性) の提供者 (ドナー) 由来の肝臓の移植を受けると、その75%はHBVに感染するとの報告が米国からなされました。

同様に、1998年には、京都大学のグループから、その100%にHBVの感染がおこるとの報告がなされています。

当初、私達は片山先生の例、および蛍光抗体法による経験などから、ドナー

のHBc抗体価は高い値を示すに違いないと考えていたのですが、京都大学からの報告では、ドナーのHBc抗体価を測定しており、HBc抗体価が高い場合でも、低い場合でも全てのレシピエントにHBVの感染が成立するとされている点が驚きでした。これらの報告が契機となって、その直後から多くの研究者によってHBc抗体陽性（HBs抗原は陰性）の人の肝細胞内でのHBV DNAの局在（存在状態）が調べられ、最終的には2000年に、同じ京都大学のグループによって、このような症例では（現在の検出系による感度では血中にHBV DNAが検出されない場合でも）肝細胞の中にはHBVそれ自体が存在し続けていることが明らかにされました。

つまり、従来は「感染既往」=「完全治癒後の状態」と考えられていた一過性感染経過後あるいはHBVキャリア状態からの離脱後の状態は、ウイルス学的には全てウイルスの持続感染状態であると言って良いこと（従来の概念を変更する必要があること）が初めて明らかにされたわけです。

スライド9

HBVの急性感染経過後（HBs抗原陰性、HBc抗体陽性）の肝細胞内にHBVは存在し続ける

1977	Immunohistological evidence of staining HBsAg/HBcAg in the liver
(Japan)	<i>Immunohistological evidence of staining HBsAg/HBcAg in the liver</i>
Gastroenterology	CORRELATION BETWEEN TITER OF ANTIBODY TO HEPATITIS B CORE ANTIGEN AND PRESENCE OF VIRAL ANTIGENS IN THE LIVER
	<i>Immunohistological evidence of staining HBsAg/HBcAg in the liver</i>
1997	Transmission of HBV to naive recipients of liver transplantation
(USA)	<i>Transmission of HBV to naive recipients of liver transplantation</i>
Transplantation	INFECTIVITY OF HEPATIC ALLOGRAFTS WITH ANTIBODIES TO HEPATITIS B VIRUS
	<i>Transmission of HBV to naive recipients of liver transplantation</i>
1998	Transmission of Hepatitis B Virus from Hepatitis B Core Antibody-Positive Donors in Living Related Liver Transplants
(Japan)	<i>Transmission of Hepatitis B Virus from Hepatitis B Core Antibody-Positive Donors in Living Related Liver Transplants</i>
Transplantation	<i>Transmission of Hepatitis B Virus from Hepatitis B Core Antibody-Positive Donors in Living Related Liver Transplants</i>
2000	Molecular evidence of latent infection in the liver
(Japan)	<i>Molecular evidence of latent infection in the liver</i>
Hepatology	Latent Hepatitis B Virus Infection in Healthy Individuals With Antibodies to Hepatitis B Core Antigen
	<i>Molecular evidence of latent infection in the liver</i>

この事実は、核酸増幅検査（NAT）により HBV DNA が検出された献血者集団のウイルス、血清学的解析結果からも裏付けられています。

日赤血液センターにおいて、1999年7月からの首都圏での試行、同年10月からの全面実施以来、2005年12月末までに、計33,837,075本の献血者の血液を対象として核酸増幅検査（NAT）によるHBV DNA、HCV RNA、HIV RNAの同時検査が行われ、HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 陽性の血液がそれぞれ625本、93本、12本見出されています。

スライド10

核酸増幅検査（NAT）による HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA検出数					
— 日赤中央血液研究所 1999.7.1～2005.12.31 —					
期間	検体の プールサイズ	検査数	陽性数		
			HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
1999.7～2000.1	500	2,140,207	19	8	0
2000.2～2004.8	50	24,702,784	473	72	8
2004.8～2005.12	20	6,994,084	133	13	4
合 計		33,837,075	625	93	12

HBV DNA が検出された625人の献血者を10歳きざみの年齢集団ごとに区切り、日常検査に用いられている凝集法（HI法）よりも検出感度の高い酵素抗体法（EIA法）によりHBc抗体を検出したところ、30歳代以下の集団ではわずか5例にHBc抗体が検出されたにすぎないのに対して、40歳代では18.3%、50歳代では52.0%、60歳代では88%にHBc抗体が検出される（これらの献血者は「HBV感染の晩期」にあたる）という結果が得られました。

現在、日赤血液センターでは、HBc抗体価が2⁵HI価以上の値を示し、中和抗体であるHBs抗体価が200mIU/ml未満の値を示すという条件を満たす献血者の血液は核酸増幅検査（NAT）によるHBV DNA検査に回される前にあらかじめ排除されています。

にもかかわらず、スライド8に示したような「HBV感染晩期」の血液を感染源とする輸血後B型肝炎例が稀ながら現実に発生していること、また、ここに

示したようにNATによりHBV DNAが検出された高年齢層の献血者を調べてみると、その多くは現行のHBc抗体のスクリーニング基準ではチェックされない、ごく低力価のHBc抗体陽性者によって占められていることから、HBc抗体価のスクリーニングレベルを現行の2⁵HI価よりも低く設定することにより、血液の安全性の向上を図ろうと言う考え方も当然出てくることとなります。

しかし、この考え方は、はたして現実的、かつ有効なものなのでしょうか。これからいくつかの傍証をもとに話をすすめていってみたいと思います。

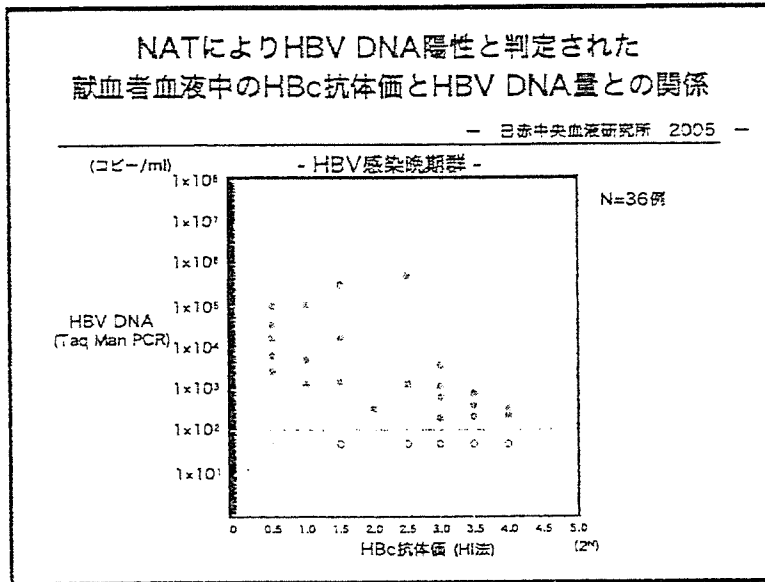
スライド11

核酸増幅検査 (NAT) により HBV DNAが検出された献血者625例の 年齢別にみたHBc抗体陽性率 — 日赤中央血液研究所 2005.12 —		
年 齢	HBV DNA 陽性数	HBc抗体 陽性数 (%)
10代	67	2 (3.0)
20代	285	3 (1.1)
30代	138	0
40代	60	11 (18.3)
50代	50	26 (52.0)
60代	25	22 (88.0)
合 計	625	64 (10.2)

・HBc抗体の測定：HI法 and/or AxSYM[®] による

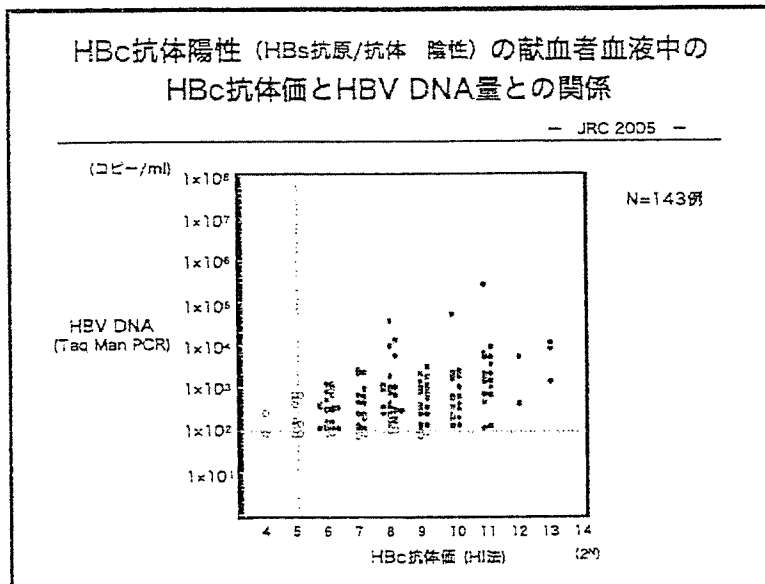
まず、NATによりHBV DNAが検出され、同時に低力価の(2⁵HI価未満の)HBc抗体が検出された、計36例の献血者由来の血液中のHBV DNA量とHBc抗体価の分布を対比してみると、この集団で見ると、HBV DNA量とHBc抗体価との間に相関はみられないことが明らかとなりました。(HBc抗体価がごく低力価を示すものでも、HBV DNAの量が多い例が見られます)。

スライド12



更に、この関係は、HBc抗体価が2³HI価以上の(HBs抗原、抗体陰性の)143例の集団でみた場合でも同じで、HBV DNA量とHBc抗体価との間に相関はみられません。では、核酸増幅検査(NAT)に回す前に、各都道府県の血液センターの検査室でHBc抗体価を測定する意味はどこにあるのでしょうか？

スライド13



無作為に集めた HBc 抗体陽性 (HBs 抗原は陰性) の 143 例の集団を、現在の核酸増幅検査 (NAT) による検出感度、すなわち、HBV DNA 量に換算して、 10^2 コピー/ml 以上を「陽性」、それ未満のものを「陰性」と判定して、HBc 抗体価別に並べてみますと、HBc 抗体価が高い集団では、HBV DNA 陽性と判定される頻度が高く、HBc 抗体価が低い集団では HBV DNA 陽性と判定される頻度が低いという関係があることがわかりました。

現在、HBs 抗原が検出されない場合でも HBc 抗体が 2^5 HI 価を上回る献血者の血液は (中和抗体である HBs 抗体が 200mIU/ml 未満である場合には) あらかじめ、排除するというスクリーニング法が採用されていますが、このスクリーニング方式は結果的に、NAT により HBV DNA が検出される頻度の高い集団をあらかじめ排除し、その後に残った (HBV DNA が検出される頻度が低い) HBc 抗体低力価の (2^5 HI 価未満の) の集団を NAT による HBV DNA 検査によりバックアップして安全性の向上を図るという合理的なシステムになっていたことが改めてわかったわけです。

スライド 14

**HBc 抗体陽性 (HBs 抗原/抗体 陰性) 463 例の
HBc 抗体価別にみた HBV DNA 検出率**

- JRC 2005 -

HBc 抗体価 (2^N HI 価)	対象数	HBV DNA 陽性数 (%)
12 ⁰	5	5 (100.)
11	20	17 (85.0)
10	31	19 (61.3)
9	48	24 (50.0)
8	54	27 (50.0)
7	72	17 (23.6)
6	96	23 (24.0)
5	117	9 (7.7)
4	20	2 (10.0)
合計	463	143 (30.8)

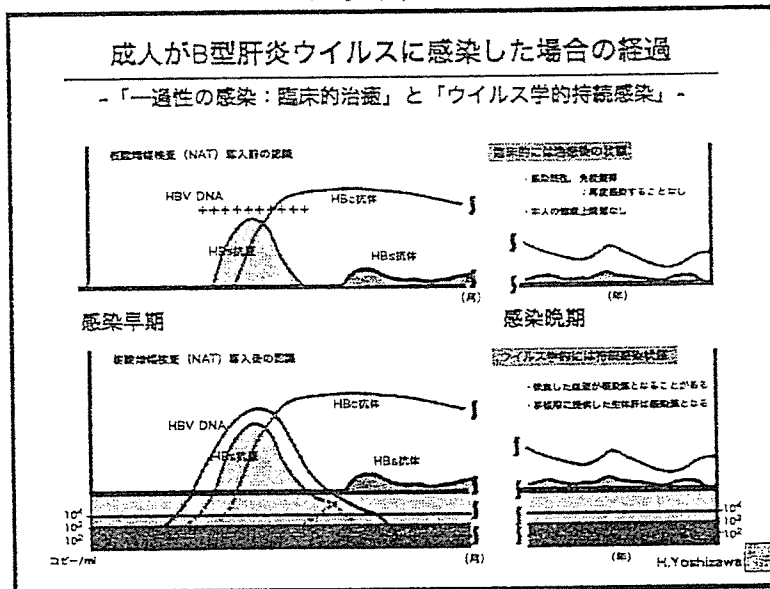
ここで、これまでの話をもとに、成人が HBV に急性感染した場合の自然経過について従来の理解と、核酸増幅検査 (NAT) 導入後の (現時点における) 理解とを対比してまとめておきたいと思います。

従来の理解では、HBVに感染すると、一定の潜伏期を経て、HBV DNA、HBs抗原、HBc抗体が順を追って血中に出現し、HBs抗原が血中から消失した後に、月単位での間隔をあけて、HBs抗体が出現する。この状態は臨床的には完全治癒、免疫を獲得した状態であり、生涯にわたってHBVに再感染することはない状態になったと解釈されてきました。また、もちろん（肝臓の病気に関しては）本人の健康上問題はありません。くり返しますが、臨床的には、HBVの急性感染経過後の概念については、これまでの理解を変更する必要はありません。

しかし、ウイルス学的に精査すると、一過性の感染経過後も、HBVは肝細胞の中に存在し続け、血中にもごく微量ながらHBV DNAは放出され続けており、時に核酸増幅検査（NAT）の検出感度（ 10^2 コピー/ml）、あるいはこれを上回る濃度に達する場合があること、また、輸血後B型肝炎の原因となる場合もあることを理解しておく必要があることがわかってきました。つまり、一過性感染経過後の状態（同様に、HBVキャリアからの離脱後の状態も）は、ウイルス学的にみればHBVの持続感染状態にあると理解しておくことが必要であると言えます。この状態を「HBV感染の晩期」と呼ぶことにいたします。

なお、「HBV感染早期」の経過をウイルス学的立場からみた詳細については後程、話をさせていただきます。

スライド15



HBc 抗体陽性率が低い欧米では、低力価のものも含めて、HBc 抗体陽性の全ての血液を排除すれば、「HBV 感染晩期」の血液を感染源とする輸血後 B 型肝炎の問題については解決済みということになります。

しかし、広島県赤十字血液センターで調べてみると、低力価のものも含めると、献血者における HBc 抗体陽性率は 19% にものぼり、特に 50 歳代以上の年齢層では 30% を越えることがわかりました。日本国内では、いずれの地域においてもこれと似たような状況であると考えられることから、欧米のやり方をまねて低力価のものも含めて HBc 抗体陽性の血液の全てを排除することは実際的ではないことは誰が見ても明らかなことだと言えます。

スライド 16

年齢別にみた HBc 抗体陽性率						
- HBs 抗原陰性の献血者 375 例について -						
- 広島県赤十字血液センター, 2001 -						
年齢	合計		男性		女性	
	献血者数	HBc 抗体 陽性数 (%)*	献血者数	HBc 抗体 陽性数 (%)	献血者数	HBc 抗体 陽性数 (%)
-19	40	3 (7.5)	20	3 (15.0)	20	0
20-29	40	2 (5.0)	20	1 (5.0)	20	1 (5.0)
30-39	40	3 (7.5)	20	2 (10.0)	20	1 (5.0)
40-49	98	12 (12.2)	50	7 (14.0)	48	5 (10.4)
50-59	96	32 (30.0)	60	26 (43.3)	36	6 (16.5)
60-	61	21 (34.5)	31	9 (29.0)	30	12 (40.0)
合計	375	73 (19.5)	201	48 (23.9)	174	25 (14.4)

* HBc 抗体の測定: AxSYM[®] による

ここで、「HBV 感染晩期」の状態を、再度整理してまとめてみました。

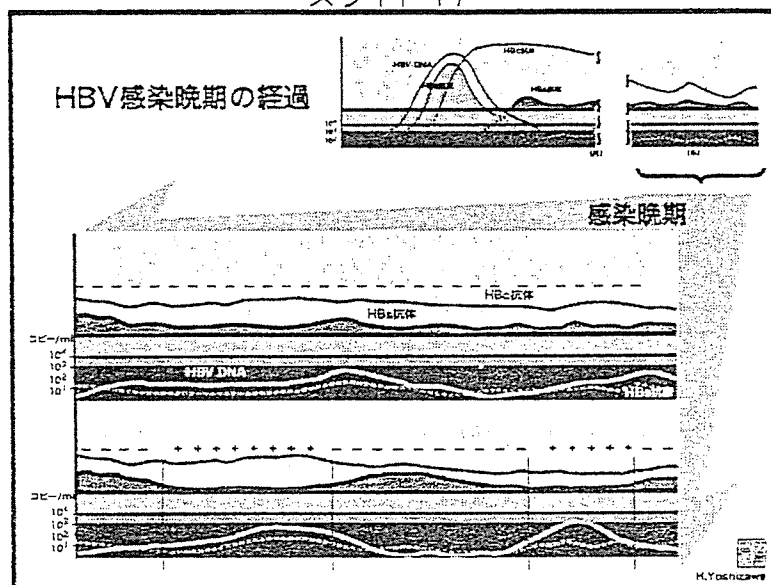
「HBV 感染晩期」の状態にあるほとんどの人の血中には HBV はごくわずかに存在するものの、中和抗体である HBs 抗体が過剰に存在する (HBs 抗体が検出される) か、あるいは、HBV との免疫複合体を作っていることから、HBs 抗体は検出されないものの、血液を輸血に用いても感染源とはならない場合がほとんどであると考えられます。

ごく稀に、経過中に血中に放出された HBs 抗原により HBs 抗体が消費されて中和能力が低下したり、血中に放出される HBV 量が増えたりするなどして、中和抗体と HBV とのバランスが崩れた場合に輸血に伴う HBV の感染源となるこ

とがあると考えられます。

実際、日赤血液センターが行なった遡及調査の結果によれば、現在のミニプールのNATによる日常検査ではHBV DNAは検出されず（ 10^3 コピー/ml未満のウイルス量で）、低力価（ 2^5 HI価未満）のHBc抗体が共存するという条件を満たす血液を感染源とする輸血後B型肝炎は、年間1例～2例おこるにすぎないと推定されています。

スライド17



これまで順を追って話してきたことをもとにまとめると、HBc抗体価の測定と核酸増幅検査（NAT）によるHBV DNA検査との組み合わせによるスクリーニングが行われている現状では、「HBV感染晩期」の血液を対象とした場合、更なる血液の安全性向上を図るための対策として、HBc抗体価のスクリーニングレベルを現行の 2^5 HI価より低いところに設定し直して、献血された血液の廃棄率をこれ以上増やす必要はほとんど無いということが出来るかと思えます。

むしろ、HBc抗体価のスクリーニングレベルは現行の 2^5 HI価から動かさずに据え置いて、NATによるHBV DNAの検出感度を現行のものより1ケタ上げる（ 10^2 コピー/ml前後にまで上げる）ことができれば、残された問題のほとんどは解消できるのではないかと考えられます。

スライド18

**HBV感染晩期の献血者の血液を対象とした
安全性向上のための対策**

HBc抗体 (価) のスクリーニングレベルを現行の
2⁵ HI値よりも低く設定することは必須か？

↓

NO!

核酸増幅検査 (NAT) による
HBV DNA検査と組み合わせた
スクリーニングが行われている現状では

1) HBc抗体価 (HI価) とHBV DNA量 (コピー/ml) との相関なし
 2) HBV感染晩期の血液を感染源とする輸血後B型肝炎発生数はごく稀
 (max.年間数例)
 3) 献血者における (EIA法による) HBc抗体陽性率は、19%にも満たる

3つ目のHBV感染の態様、すなわち、1番の難問である「HBV感染早期」の血液を対象とした安全性向上の問題に話をすすめてみたいと思います。

結論から先に言うと、ウイルス感染の検査を目的とした献血をしない、あるいはさせないという教育を徹底すること、この1点に尽きると言うことができると思います。

スライド19

**HBV感染の特性に基づいた
血液の安全性向上のための対策**

HBV感染の態様	対 策
<ul style="list-style-type: none"> • HBV持続感染 (HBVキャリア状態) : HBs抗原の検出 	
<ul style="list-style-type: none"> • HBV感染既往 (HBV感染の晩期) : HBs抗体の検出、測定 	<ul style="list-style-type: none"> : 核酸増幅検査 (NAT) によるHBV DNAの検出 (過去の献血履歴)
<ul style="list-style-type: none"> • HBV感染の新規発生 (HBV感染の早期) : 核酸増幅検査 (NAT) によるHBV DNAの検出 	<ul style="list-style-type: none"> : 安全性向上のための教育 (検査を目的とした献血の排除)

核酸増幅検査（NAT）によりHBV DNAが陽性と判定された625例の年齢別にみた陽性者数の分布を再度見ていただきます。陽性者数は20歳代～30歳代の献血者に圧倒的に多いことがわかります。

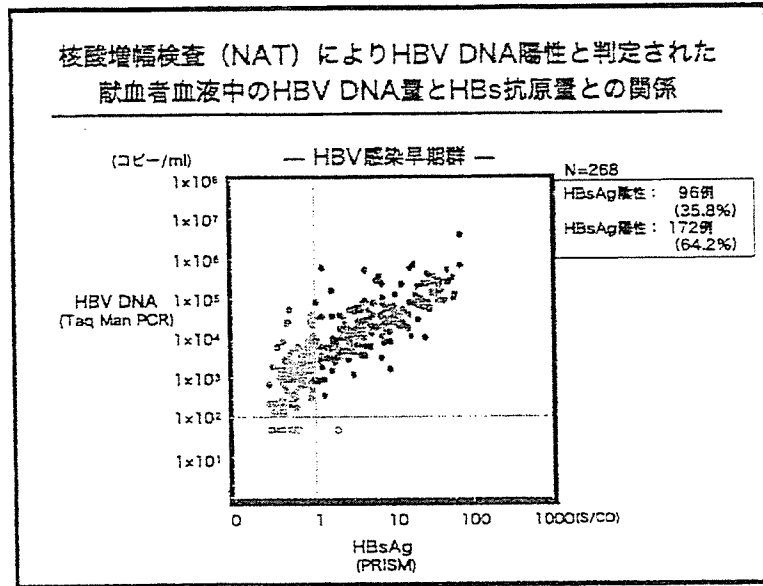
スライド20

核酸増幅検査（NAT）により HBV DNAが検出された献血者の年齢分布			
— 日赤中央血液研究所 2005.12 —			
年 齢	男女計	男性	女性
10～19	67	22	45
20～29	285	173	112
30～39	138	105	26
40～49	60	45	15
50～59	50	39	11
60～69	25	20	5
合 計	625	404	221

このうち、HBc抗体陰性（「HBV感染早期」）の血清を対象として、現在、最も検出感度、および特異度が高いとされている検出系を用いてHBs抗原を検出し、HBs抗原価とHBV DNA量との関係を見ました。その結果、HBs抗原は、HBV DNA量が 10^5 コピー/ml以上に達した群のほとんどで陽性と判定されるのに対して、 10^3 コピー/ml以下の群のほとんどで陰性と判定されるという関係があることがわかりました。

では、 10^3 コピー/ml以下のHBV（DNA）量の血液を輸血に用いた場合、HBVの感染は起こるのでしょうか？

スライド21

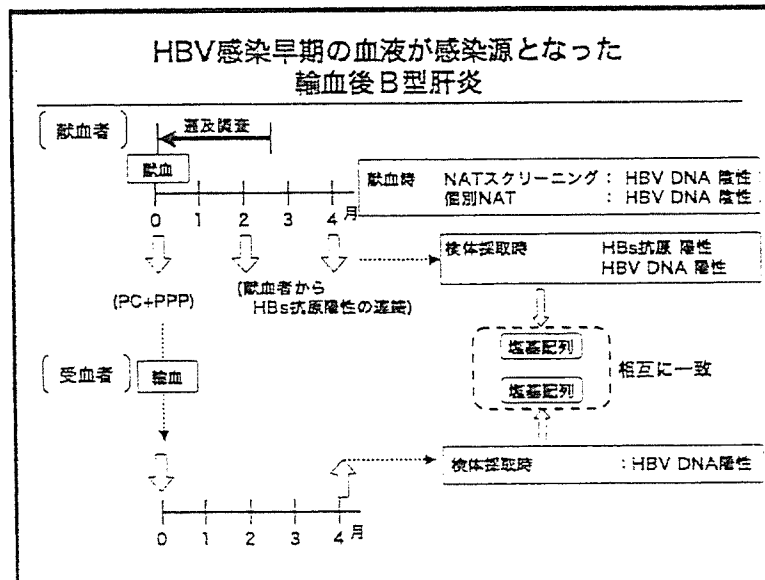


日赤血液センターが行なった遡及調査から、HBV DNA量が核酸増幅検査 (NAT) の検出感度である 10^2 コピー/mlを下回る、HBV感染ごく初期の血液の輸血によってHBVの感染が起こった実例が見出されています。

生体 (宿主) が抗体を産生し始める前の「HBV感染早期」の血液中に存在するHBVは、免疫複合体 (immune complex) を形成していないことから、「HBV感染晚期」の血液に比べて感染成立に必要な最少ウイルス量が少ないことは容易に想定されます。

私達は、「HBV感染早期」の血清を用いて、感染を成立させるために必要な最少ウイルス量を明らかにするための感染実験を行いましたので、ここで、その成績を紹介させていただきます。

スライド22



感染実験は、

1. 感染成立に必要な最少 HBV 量 (in-vitro での測定値として表示される HBV DNA 量に換算したウイルス量)。
2. NAT のウィンドウ期、すなわち、末梢血中の HBV DNA 量が個別の NAT の検出感度である 10^2 コピー/ml に達するまでの期間。
3. 末梢血中の HBV DNA 量が 2 倍量、10 倍量に増えるために要する時間。
4. および、これらは HBV のジェノタイプによって差があるかどうか。

を明らかにすることを目的として行ないました。

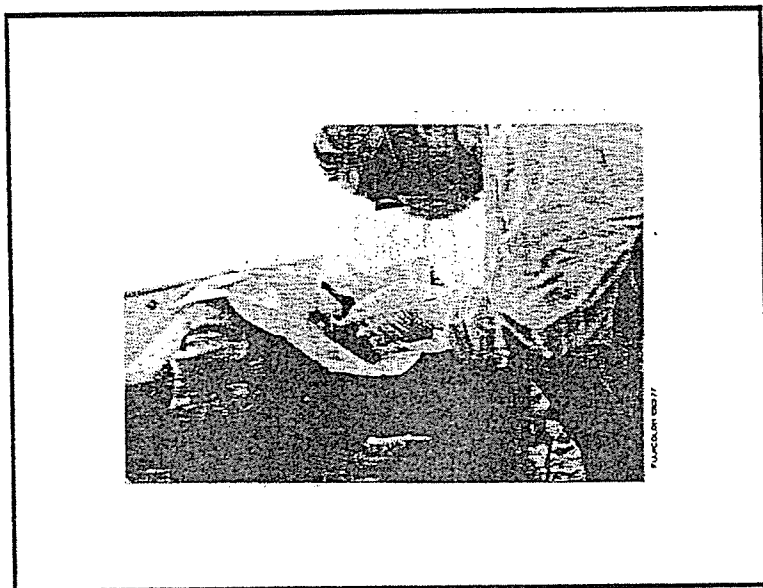
スライド 23

HBVの感染論的視点からのアプローチ
— 感受性動物 (チンパンジー) を用いた感染実験 —

- 1) 感染成立に必要な最少HBV量 (絶対量) は?
- 2) NATのウィンドウ期間は?
- 3) 末梢血中においてHBV DNAが2倍、10倍に増えるために要する時間 (doubling time, log time) は?
- 4) HBVのジェノタイプによる増殖速度の差は?

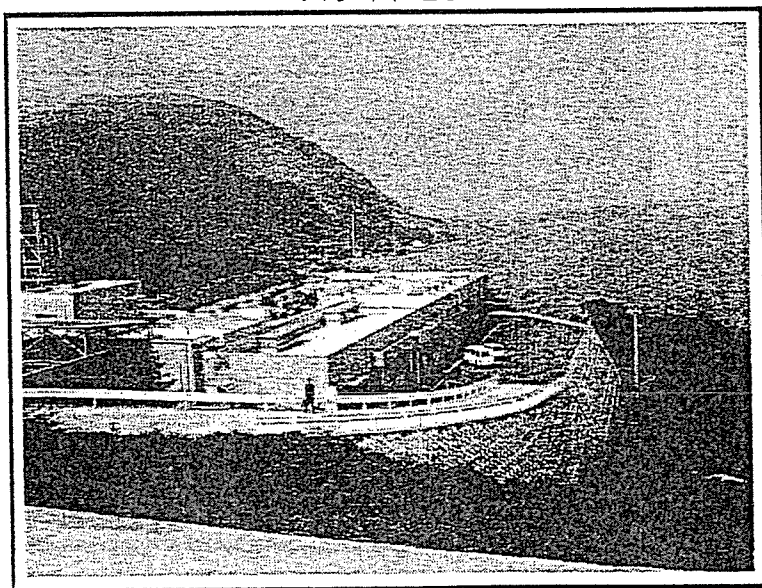
これは、1970年代に東京の真中（東京都立臨床医学総合研究所の7階）で感染実験をしていた頃の、30歳代の私です。30歳代の初めから半ば過ぎまでの6年半にわたってチンパンジーを相手に実験をしていました。

スライド24



これが現在、感染実験を委託している熊本の三角半島にあるチンパンジーのコロニーの実験棟です。感染材料は、その都度現地まで出かけて、自分で希釈して準備し、接種以降の採血は実験担当者をお願いしています。

スライド25

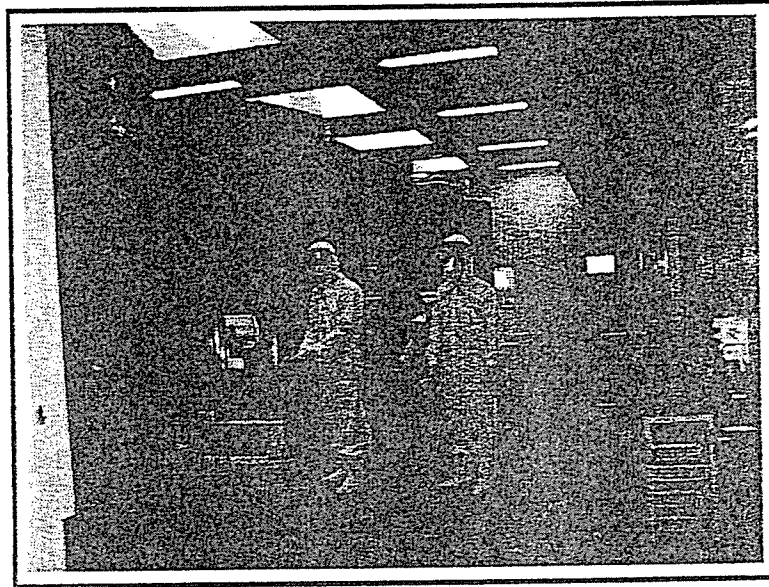


実験棟の中の、感染実験を行なっている室の様子です。

1970年当時の私達の実験室と違って広々としており、実験環境は大分よくなっています。

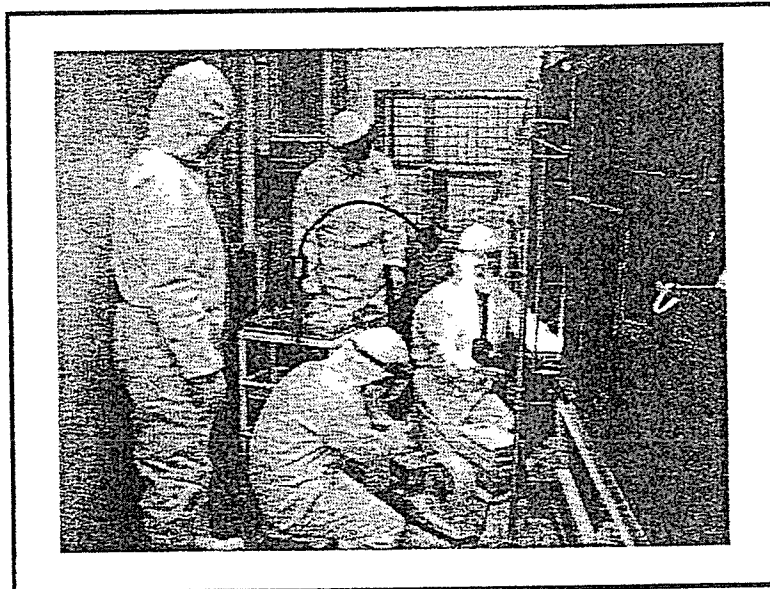
実験担当者はこのように完全武装の状態、実験者自身の安全性の確保はむろんのこと、感染個体から別の個体への汚染の伝播（carry over）も完璧に抑えた状態で実験を行ないます。

スライド26



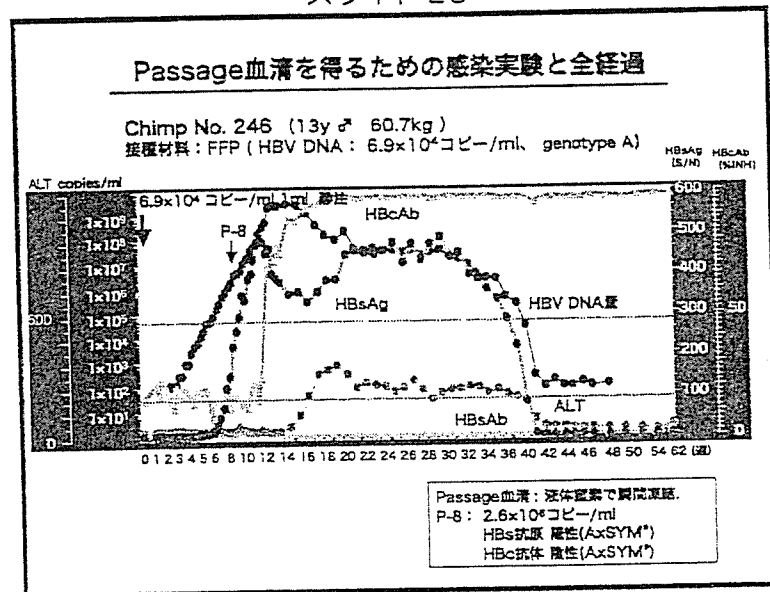
いまや、私はただ立って見ているだけの人になってしまったわけです。これは実験担当者が3人で手分けして、ヒトと同じ方式で、血液バックを使って採血をしているところです。

スライド27



まず、実験は感染性の減弱を最少限に抑えた「HBV 感染早期」の感染材料を入手することから始めます。このために、過剰のHBVを接種して感染を成立させた後に、宿主のHBc抗体が出現する前の段階で、かつ、HBV DNA量ができるだけ多くなった時期（この実験では接種後8週目）の血液を採取し、すみやかに血清を分離、少量（1.1ml）ずつに分注した後に、液体窒素にて瞬間凍結し、そのまま -80°C のディープフリーザー中に保存しました。

スライド28



感染材料 (HBVのジェノタイプA、HBV DNA量 2.6×10^6 コピー/ml、HBc抗体陰性) を 37°C 温浴にて穏やかに融解し、あらかじめ採血し、保存しておいた、実験に用いるチンパンジーの自己血清を用いて 10^N 倍に段階稀釈します。稀釈後、各3本に分注した後に液体窒素にて瞬間凍結し、 -80°C のディープフリーザー中に保存します。

各3本のうちの1本を用いて、HBV DNA量を定量し、 10^2 コピー/ml相当 (10^4 倍稀釈) まで、正しく稀釈されていることを確かめた上で、 10^5 倍稀釈のもの (10 コピー/ml相当)、 10^6 倍稀釈のもの (1 コピー/ml相当) を接種材料として選び、各3本のうちの2本目を 37°C 温浴にて穏やかに融解し、それぞれを、図に示した順序に従って3頭のチンパンジーの静脈内に、正確に1mlずつ注射して経過を観察しました。

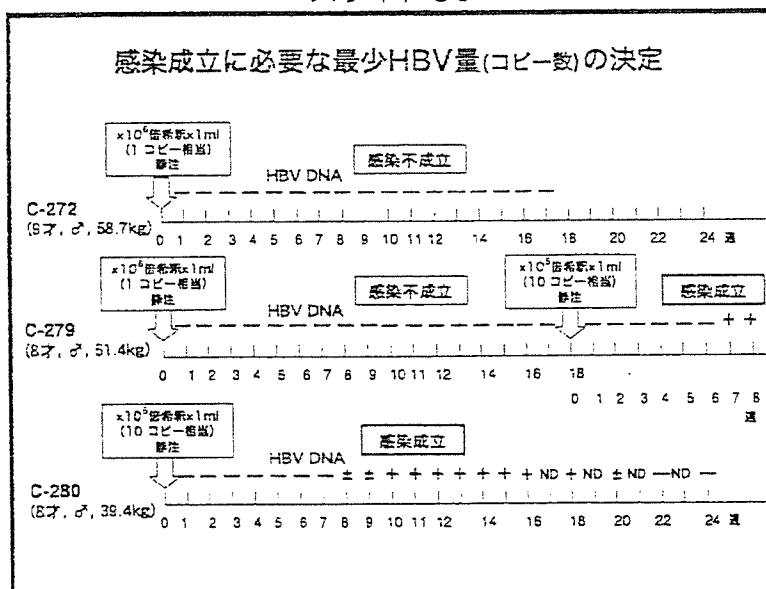
スライド 29

被接種チンパンジーの自己血清による 段階希釈と、各サンプル中のHBV DNA量							
接種材料：チンパンジーの血清、HBV感染早期：HBe抗体陽性、1st passage HBV ジェノタイプ A							
被接種 Chimp	接種希釈	HBV DNA (実測値)				7週目	10週目
		$\times 10^1$ 倍 コピー/ml	$\times 10^2$ 倍 コピー/ml	$\times 10^3$ 倍 コピー/ml	$\times 10^4$ 倍 コピー/ml		
C-272	$\times 10^1$	2.3×10^5	2.0×10^4	2.0×10^3	1.7×10^2	<100	<100
C-279	$\times 10^2$	2.0×10^5	2.4×10^4	2.0×10^3	2.4×10^2	<100	<100
C-280	$\times 10^3$	2.3×10^5	2.3×10^4	1.6×10^3	2.8×10^2	<100	<100

HBV DNA定量：Taq Man PCR

その結果、HBV DNA 量に換算して1コピー相当のHBVを接種した2頭のチンパンジーでは感染は成立しなかった（C-272、およびC-279、1回目の接種）のに対して、10コピー相当のHBVを接種した2頭のチンパンジー（C-280、C-279、2回目の接種）では接種後7～8週目に末梢血中にHBV DNAが出現し感染の成立が確認されました。

スライド 30



また、次の感染実験では、同様に準備したジェノタイプCの感染材料（HBV感染初期のヒト新鮮凍結血漿接種後29日目のチンパンジー由来の血清、HBV DNA量 3.0×10^6 コピー/ml、HBc抗体陰性）を同様に37°Cの温浴にて融解後、それぞれのチンパンジーの自己血清で 10^N 倍に段階希釈し、希釈した3本のうちの1本を用いてHBV DNA量を定量しました。

3本のうちの2本目を37°C温浴にて穏やかに融解し、今度は、2頭のチンパンジーを用いて、図に示した順序に従って、それぞれを正確に1mlずつ静脈内に注射して経過を観察しました。

スライド31

被接種チンパンジーの自己血清による 段階希釈と、各サンプル中のHBV DNA量						
接種材料： チンパンジーの血清、HBV感染早期：HBc抗体陰性、1st passage HBVジェノタイプC						
希釈倍率		$\times 10^1$ 倍	$\times 10^2$ 倍	$\times 10^3$ 倍	$\times 10^4$ 倍	
被接種 Chimp		HBV DNA (実数値)				
		コピー/ml	コピー/ml	コピー/ml	コピー/ml	
C-269		3.8×10^5	3.9×10^4	3.6×10^3	4.6×10^2	<100
C-285		3.5×10^5	3.6×10^4	4.6×10^3	4.3×10^2	<100

希釈：それぞれのChimpの自己血清による。
HBV DNAの定量：Taq Man PCRによる。

その結果、1コピー相当のHBVを接種した1回目の実験では、2頭とも感染は成立せず、10コピー相当のHBVを接種した2回目の実験で、接種後5週～6週目に、末梢血中にHBV DNAが出現し、2頭とも感染の成立が確認されました。

ここまでの実験で、感受性の減弱を最少限に抑えた「HBV感染早期の血清」を用いた場合、感染成立に必要なHBV DNA量に換算したウイルス量は、HBVのジェノタイプA、もしくはCにかかわらず10コピー相当であることが明らかとなりました。