

## (2)当科における HCV 母子感染—第 2 報—

分担研究者 稲葉 憲之 獨協医科大学病院  
病院長

研究協力者

喜多 恒和 防衛医科大学校病院  
産婦人科 講師

塚原 優己 国立成育医療センター  
周産期診療部産科 医長

谷口 晴記 三重県立総合医療センター  
産婦人科 医長

小林 信一 国立成育医療センター  
膠原病・感染症科 医師

佐久本 薫 琉球大学医学部附属病院  
周産母子センター助教授

山崎 一美 奈良尾病院 内科 院長

松田 秀雄 防衛医科大学校病院  
産婦人科 助手

大島 教子 獨協医科大学 産婦人科 講師

西川 正能 獨協医科大学 産婦人科 助手

林田 綾子 獨協医科大学 産婦人科  
大学院生

### 妊婦における HCV RNA 陽性率

1365 名の妊婦に HCV 抗体検査を行い、陽性者は HCV RNA 確認検査を追加、更に HCV RNA の genotyping を実施した。キャリア妊婦 51 名は他施設からの紹介妊婦であり、これを除外した「真」の陽性率は 0.7% (9/1314) で、同時期に調査された婦人供血者の HCV 抗体陽性率 0.6% (594/94935) にほぼ同等であった。

### HCV 母子感染率, 陽転時期, キャリア化児の肝機能

キャリア妊婦 94 名の出生児 121 名を定期的

に且つ前方視的にフォローアップし、HCV 感染状況を調査した。フォローアップ期間は 6-112 ヶ月間である。13 名の児が HCV RNA 陽性となり、少なくとも 6 ヶ月間 HCV RNA 陽性が持続し、母子間における HCV genotype は全ペアにて一致をみた。即ち、HCV キャリア妊婦の出生児における母子感染率は 10.7% となり、その陽転時期は臍帯血から月齢 3 ヶ月に及んだ。また、これらのキャリア化児は全て経膣分娩で出生した。

### HCV 母子感染のリスクファクター

HCV キャリア妊婦における HCV 母子感染のリスクファクターを検討し、以下の結果を得た。(今回の対象に HCV と HIV の混合感染妊婦はいなかった。)

#### キャリア妊婦分娩時 HCV RNA-titers

分娩時母体血中ウイルス力価と母子感染率との間に正の相関は認められなかったが、viral load は感染力の最も確かな指標であり、今後正確にウイルスコピー数を測定し、症例数を増やして検討すべきであろう。しかし  $10^5$  copy/ml 以下では母子感染は認められておらず、低い titer では経膣分娩でも母子感染は起こらない可能性が示唆されている。

#### ② キャリア妊婦の分娩時肝炎発症

母体が分娩時に  $ALT \geq 110$  の群と  $ALT < 110$  の群を比較したところ母子感染に有意な差は見られなかった。

### キャリア化児の予後

13 名のキャリア化児は HCV RNA 陽転後少なくとも 6 ヶ月以上持続して血中 HCV RNA 陽性で、6 名の児は観察期間中 HCV RNA 陰性になる事は無かった。他方、4 名のキャリア化児はキャリア成立後、血中 HCV RNA 持続陰性と

なり、脱キャリア化が示唆された。また、残り 1 名のキャリア化児はキャリア成立後同様に chemical hepatitis を発症、回復と共に HCV RNA 陰性となったが、3 ヶ月後に再びキャリア状態になった。また 2 名が 3 ヶ月以上の持続陰性であり今後も経過を確認予定である。

表1 母子感染の有無と分娩様式（調査期間が明らかなもの）

母子感染あり			母子感染なし				
分娩様式	調査期間	転帰	分娩様式	調査期間	転帰		
CASE 1	NSD	96M	脱キャリア(36M)	CASE 5	NSD	34M	(31Mより陰性化)
CASE 2	NSD	66M	一時陰性化	CASE 6	NSD	31M	脱キャリア化(18M)
CASE 3	NSD	45M		CASE 7	NSD	20M	(17Mより陰性化)
CASE 4	NSD	40M					
母子感染あり			母子感染なし				
CASE 8	NSD	6M		CASE 24	NSD	16M	
CASE 9	NSD	8M		CASE 25	NSD	12M	
CASE 10	NSD	84M		CASE 26	NSD	8M	
CASE 11	C/S	24M		CASE 27	NSD	24M	
CASE 12	C/S	24M		CASE 28	NSD	13M	
CASE 13	NSD	112M		CASE 29	予定C/S	23M	
CASE 14	NSD	12M		CASE 30	NSD	12M	
CASE 15	NSD	36M		CASE 31	NSD	18M	
CASE 16	緊急C/S	24M		CASE 32	NSD	24M	
CASE 17	NSD	41M		CASE 33	NSD	10M	
CASE 18	NSD	33M		CASE 34	NSD	11M	
CASE 19	C/S	25M		CASE 35	NSD	12M	
CASE 20	NSD	24M		CASE 36	予定 C/S	6M	
CASE 21	NSD	12M		CASE 37	NSD	7M	
CASE 22	NSD	35M		CASE 38	NSD	11M	
CASE 23	緊急 C/S	50M					

平成18年度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

### 筑波大学関連施設におけるC型およびB型肝炎ウイルス母子感染の現況

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	筑波大学大学院人間総合科学研究科教授
	工藤 豊一郎	筑波大学臨床医学系小児内科講師

#### 研究要旨

C型およびB型肝炎ウイルスの母子感染の最新の頻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疫学調査を行った。筑波大学小児内科関連施設におけるC型肝炎ウイルス抗体陽性母体の頻度は0.4%、HBs抗原陽性母体のそれは0.5%であった。B型肝炎ウイルスではHBs抗原陽性母体から出生した42例のうち2例が感染した。これら2例は外国人の母親から出生しており、適切な感染防止策を行ったにもかかわらず児が感染していた。感染後の対策としてC型肝炎母子感染例3例にインターフェロン治療を行い全例著効を確認した。小児期に積極的治療を行うことに意義があるかどうか考察した。

#### A. 研究目的

C型およびB型肝炎ウイルス母子感染は将来の肝炎、肝硬変、肝がん等の予防の上で重要であり、肝炎等克服緊急対策研究事業において従来より疫学研究が行われている。

しかし疫学的状況は常に変化しており、新しい情報は常に継続した調査から得られる。C型およびB型肝炎ウイルス母子感染の今後の動向を把握するため疫学的研究を2005年1月より改めて行っているのを報告する。

#### B. 研究方法

(C型およびB型肝炎ウイルス母子感染の前方

視的疫学研究)

筑波大学小児内科関連施設において、通常の診療手順および白木らによる「C型肝炎ウイルスキャリア妊婦とその出生児の管理ならびに指導指針」「B型肝炎母子感染防止対策の手引き」に則り分娩を予定した母体についてHCV抗体・HBs抗原を検索し、抗体陽性の場合にはHCV RNAを検索した。HCV RNAの定量には定量的PCR法(ロシュ社・アンプリコアモニター法)を使用した。

これらのマーカーが陽性であった場合に、通常の診療として病状の説明を行い、下記の筑波大学医の倫理委員会において承認を得た

様式を用いて妊産婦に本疫学調査への協力を依頼した。すなわち匿名での筑波大学への分娩時情報の提供を依頼し、可能であれば分娩時血清の提供を依頼した。文書で了解が得られた場合に研究に参加するものとした。

出生した児は通常の診療手順および上述の指針に則り、定期的追跡および／または B 型ワクチン接種を受けた。

児に感染が発生した場合は専門性に鑑みて通常の診療手順に則り筑波大学小児内科を紹介受診するものとした。

(倫理面への配慮)

上記の手順およびこれに使用する様式については、「疫学研究に関する倫理指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号)」に則り、筑波大学医の倫理委員会において審議の上承認を得、筑波大学関連施設において承認を得た。

(母子感染による C 型慢性肝炎例に対するインターフェロン治療)

後方視的な発見例を含めて筑波大学小児内科に紹介された C 型慢性肝炎例について6歳まで自然経過を観察し、自然治癒傾向がないことを確認した上でインターフェロン治療に関して利益・不利益の説明を行い、撤回可能な同意を書面で得たのち藤澤らの方法に則って1年間のペグ化インターフェロン単剤投与を行った。治療終了後は6カ月以上の経過観察を行った。

## C. 研究結果

### 1. C型肝炎ウイルス母子感染の前方視的疫

学研究(表1)

2005年1月以後、筑波大学小児内科関連施設においてHCV RNA 陽性妊婦から出生した児は17例見出された。これらの児を最長16カ月間追跡し、2例の感染児を見いだした。HCV 抗体陽性妊婦は妊娠7,436例中30例(0.4%)であった。

HCV RNA 陽性妊婦からの出生児の追跡期間は1-16カ月であった。またHCV RNA 陽性妊婦のウイルス量は93-4,300(KIU/ml)、平均1,100(KIU/ml)であった。

### 2. B型肝炎ウイルス母子感染の前方視的疫学研究(表2)

HBs 抗原陽性の母親から出生した児は7,436例中42例(0.5%)見出された。このうち48時間以内の適切なHBIG接種にも関わらず42例中2例で感染がみられキャリア化した。HBs 抗原陽性の母親22例のうち中国人・ベトナム人などアジア系外国人が8例(36%)であり、感染例の母親は2例ともアジア系外国人であった。

### 3. 母子感染による C 型慢性肝炎例に対するインターフェロン治療

6歳から9歳の男児3例に対して約1年間のペグ化インターフェロン単剤投与を行った。ゲノタイプはいずれも1bであった。治療前ウイル

量は 970-3,100(KIU/ml)と高値であった。治療開始後 12 週間目には 3 例とも血清 HCV RNA は陰性化し、投与終了から 6 カ月間陰性を持続し、著効例と判定された。

9 歳の 1 例で製剤の成分に関連すると思われる副反応(ALT 値の上昇)を認めたが、投与終了後は消失した。

#### D. 考察

平成 16 年度肝炎等克服緊急対策研究事業における「C 型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究」総括研究報告書では、HCV 抗体保有妊婦の頻度は概ね 0.4-0.7% とされている。また、同事業において大戸らは、妊婦の世代が若くなると共に陽性率が低下する傾向にあったことを指摘している。

B 型肝炎ウイルスについても感染母体は減少傾向にはあるが、HBs 抗原陽性妊婦の内訳は変化しつつあり、国内の人種の多様化によって感染防止対策も対応を迫られる可能性が考えられた。

C 型肝炎ウイルスに対する有効なワクチンは未だないが、感染例に対する治療は可能である。母子感染で小児期に慢性肝炎を発症した 3 例に対する治療結果は良好であった。成人ではインターフェロンおよびリバビリンの 2 剤投与が一般的であるが、著効率は約 50%である。ペグ化インターフェロン単剤で高率に著効を得たことは成人の成績と比して特筆に値し、医療費削減の効果もあると思われた。

自然治癒傾向のない母子感染例を初老期まで放置すれば著効率が低下することは想像に

難くない。従って放置すれば肝硬変・肝細胞癌のような合併症のリスクがある。しかし一方でインターフェロン治療の歴史は未だ浅く、小児期に治療を行うことの長期的な弊害は、少ないとは推定されるものの未だ充分明らかにされていない。

今後も観察を継続し、小児期に治療を行う利益と不利益が、成人してから治療を行う利益と不利益に比して優るかどうか、慎重に評価すべきと思われた。

#### E. 結論

C型肝炎ウイルス感染母体は減少の傾向にあると推察される。またワクチンは未だ得られないものの、万一児に感染が生じた場合は有効な治療手段があることが確認された。

一方、B型肝炎ウイルス感染母体は日本人では減少傾向にあるものの、わが国の人種の多様化を反映した変化が観察され、新たな対策が必要かどうか今後も注意を要すると思われた。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

(日本人における HBs 抗原陽性妊娠の頻度は低下する一方で、中国人など外国人が HBs 抗原陽性の母子感染の母体として増加しており、感染成立率も高いことが疑われた。)

#### G. 研究発表

(論文発表)

Matsui A:Hypertransaminemia: the end of a

thread. J Gastroenterol 40: 859-860,  
2005.

(学会発表)

該当なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

表 1. 2005 年 1 月 1 日から 2006 年 10 月の HCV 感染母体児の追跡状況

病院略称	分娩総数	HCV 抗体陽性	RNA 陽性妊婦	RNA 陽性患児
A	1,249	8	4	0/3
B	1,227	8	5	2/5
C	1,834	6	3	0/3
D	2,372	6	5	0/5
E	480	1	0	0/0
F	274	1	n. a.	n. a.
計	7,436	30	17	2/16

表 2. 2005 年 1 月 1 日から 2006 年 10 月の HBV 感染母体児の追跡状況

病院略称	分娩総数	HBs 抗原陽性	HBs 抗原陽性患児
A	1,249	10	1/10
B	1,227	14	1/14
C	1,834	12	0/12
D	2,372	5	0/5
E	480	0	0/0
F	274	1	0/1
計	7,436	42	2/42



### C型肝炎母子感染例におけるPEG-IFN単独療法の効果

分担研究者 藤澤知雄 国際医療福祉大学附属熱海病院 小児科 教授  
研究協力者 乾あやの, 小松陽樹, 十河 剛

#### 研究要旨

HCV母子感染例におけるPEG-IFN単独療法の効果と安全性について検討した。現時点で評価可能例は5例であり、全例 genotype IIであった。HCV RNA量が1,000 KIU/ml以上の高ウイルス群の2例では、投与中にHCV RNAは陰性化せず、1例が中止し、1例は成人最大投与量まで増量した。残りの3例は経過中にHCV RNAは陰性化し、1例は著効を示している。副作用は全例で発熱がみられたが、それ以外の症状は従来のIFNに比して軽微であった。PEG-IFNは利便性が高く、母子感染のC型慢性肝炎小児例で安全に施行することができる。

#### A. 研究目的

小児のHCV感染はその約80%が輸血関連で、約10%が母子感染である。HBVと異なりHCVではワクチンが開発されておらず、有効な治療法は現時点ではInterferon(IFN)製剤を用いたものである。小児のC型肝炎は、輸血関連によるHCV感染は献血スクリーニングにより激減したが、HCV母子感染は依然として存在する。小児での従来のIFN単独療法は、成人に比して効果も高く、副作用も少ない。しかし、週1回の投与で十分な効果が得られるPegylated-IFN(PEG-IFN)が開発され、成人では多数の使用例があるが小児での使用経験はきわめて少ない。我々は母子感染例におけるPEG-IFN単独療法の効果と安全性につい

て検討した。

#### B. 研究方法

HCV母子感染によるC型慢性肝炎患児7例に対して、Pegylated-Interferon  $\alpha$  2a(PEG-IFN)を投与し、その効果ならびに副作用について検討した。投与方法は、PEG-IFNを3  $\mu$ g/kg/回あるいは100  $\mu$ g/m<sup>2</sup>/回(最大投与量180  $\mu$ g/回)を週1回、計48週投与した。経過中は、投与前に血液検査を行い、好中球数が750/mm<sup>3</sup>未満あるいは血小板数が50,000/mm<sup>3</sup>未満で半量に減量し、好中球数が500/mm<sup>3</sup>未満あるいは血小板数が25,000/mm<sup>3</sup>未満あるいはHbが8.5g/dl未満で中止とした。HCV RNAウイルス量はアンプリコアハレンジ法で行い、5KIU/ml未満になった場合

は、アンプリア定性法に変更した。効果判定は、①著効(SVR):PEG-IFN 終了後 6 か月後の HCV RNA 定性が陰性、②無効:著効以外、とした。また、原則として、投与 12 週で HCV RNA が投与前より 2log 以上低下(著減例と略)しない、あるいはアンプリア定性法で陰性化しない場合は、離脱例として PEG-IFN の増量あるいは治療法の変更をおこなった。

(倫理面の配慮)

倫理面については、当院倫理委員会に承諾を得て書面にて患児の保護者にインフォームド・コンセントを得た。

### C. 研究結果

投与例の男女比は3:4で投与時年齢は6-14歳(平均8.0歳)であった。HCV genotypeはIIaが5例、IIbが2例で、投与前のウイルス量は11-3,500KIU/ml(平均1016.6 KIU/ml)であった。投与開始後12週までに著減したのは4例でそのうち3例は著効し、残りの1例は投与終了後4週までの経過でHCV RNAは持続陰性化している。著減が得られなかった3例では、1例が31週で中止し、2例は13週から180 µg/回へ増量した。増量した2例のうち、1例は増量後著減し、1例は著減が得られなかったため、PEG-IFN α2b+リバビリンに変更した。著減した1例は増量から48週投与し、現在投与終了後4週でHCV RNAは持続陰性化している。PEG-IFN α2b+リバビリンへの変更例は変更後12週で著減にいたっている。

副作用は全例に発熱がみられた以外、全身倦怠感などのその他のインフルエンザ症状は3例(43%)、局所の発赤・腫脹が2例(29%)、軽度の脱毛2例(29%)、発疹2例(29%)、アレルギー疾患の悪化1例(14%)、口内炎1例(14%)で、成人で

高頻度にみられる抑鬱傾向はみられなかった。

### D. 考察

PEG-IFN 単独療法は、従来の IFN 療法より①投与回数が少ない、②副作用が軽微であるという点で患児の QOL の面では良好であった。しかし、効果については2例について経過中 HCV RNA が12週までに陰性化しなかった。成人の PEG-IFN 療法ではこのような症例では著効はほとんど期待できないため、患家に説明し、1例は31週まで続行して断念し、1例は13週目から最大投与量まで増量した。これら2例は、genotype IIa にもかかわらず、投与前の HCV RNA 量は1000 KIU/mlと高値であった。小児における従来の IFN 単独療法では治療中に HCV RNA が消失しない例はほとんどなく無効と判断して投与を中断する例はなかった。今後、PEG-IFN の小児至適投与量の検討をする必要がある。

### E. 結論

HCV 母子感染例における PEG-IFN 単独療法は、優秀な効果が得られ、安全かつ良好な adherence が得られた。経過中に HCV RNA が陰性化せず、増量あるいは PEG-IFN α2b+リバビリンへ変更をした症例が各々1例あったが、いずれも投与法変更後12週で著減しその後 HCV RNA は陰性化しており、小児における PEG-IFN 療法は成人に比しても良好な効果が得られた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Michitaka K, Hiroike N, Duong TN, Yagura M, Harada H, Shibayama T, Inui A,

Fujisawa T, Matsuura K, Hiasa Y, Onji M. Heterogeneity of hepatitis B virus genotype D in Japan. Intervirology 2006 22:150-155

2) 乾あやの, 藤澤知雄. HBウイルス母子感染予防. 周産期医学 36 増刊号:917-918 (2006)

3) 乾あやの. C型肝炎. 小児臨床検査ガイド. 五十嵐隆, 水口 雅 編. 文光堂 p414-418 東京 2006

## 2. 学会発表

1) H Komatsu, T Sogo, A Inui, T Fujisawa. Evolution of hepatitis C virus after mother to infant transmission role of humoral cellular response. 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research. (2005, 11/24-26, Tokyo)

2) 乾あやの, 十河 剛, 小松陽樹, 阿部賢治, 藤澤知雄. B型肝炎母子感染防止事業前後におけるHBV genotypeの変遷. 財団法人 宮川庚子記念研究財団 平成 17 年度第 2 回研修会. (2006,2/4, 東京)

3) 乾あやの, 十河 剛, 小松陽樹, 永井敏郎, 藤澤知雄. HBV genotypeと臨床経過の検討. 第 109 回日本小児科学会. (2006,4/21-23, 金沢)

4) 小松陽樹, 乾あやの, 十河 剛, 藤澤知雄. 小児 C 型慢性肝炎における PEG-IFN  $\alpha$ 2a 単独療法の効果. 第 10 回日本肝臓学会大会. (2006.10/11,12, 札幌)

5) 乾あやの, 菅原秀典, 橋本卓史, 十河剛, 小松陽樹, 藤澤知雄. 小児 C 型慢性肝炎における PEG-IFN  $\alpha$ 2a 単独療法の効果. 第 38 回日本小児感染症学会. (2006, 11/10,11, 高知)

平成17年度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

本邦におけるB型肝炎ウイルス関連腎症6例のウイルス学的検討

C型肝炎母子感染例に対しPEG-IFN療法を実施中に肝障害を生じたため中止せざるを得なかった症例についての報告

「HBワクチン早期接種によるB型肝炎母子感染防止効果の研究」に関する当院の状況

分担研究者 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学 教授  
共同研究者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学 助教授  
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 日下部 篤宣 名古屋市立大学大学院 臨床機能内科学 院生  
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

B型肝炎ウイルス関連腎症(HBV-associated nephropathy)は、ウイルス、宿主、環境因子の相互作用によるimmune-mediated disorderと考えられているが、これまでB型肝炎ウイルス(HBV)の genotype、遺伝子変異と腎症発症との関係について検討した報告はほとんど認めていない。そこで今回、我々は本邦におけるHBV-associated nephropathyとHBV genotype、遺伝子変異との関連性について検討した。6例のHBV-associated nephropathyの genotypeはAa 2例、Ae 2例、Ce 2例とHBV/Aが優勢であった。データベースから作成した各 genotypeの consensus sequenceと比較したところ、HBV/Aの2例においてprecore領域G1862T変異とこれに伴うアミノ酸変異(Val17→Phe17)を認めた。またHBV/Ceの1例においてcore領域のdeletionを認めた。これら以外には他の全ての領域において、腎症発症に特異的と思われる遺伝子変異は認められなかった。今回の検討では症例数が少ないため、今後更に症例を増やしての検討が必要と思われる。

HCV母子感染成立例に対しPEG-IFN療法を実施したが、投与中に肝障害を生じたため中止せざるを得なかった症例を経験し、小児期にPEG-IFN製剤を投与する場合の問題点について検討した。

HBV母子感染予防について、今回の研究班では、従来の日本での方法と異なるHBワクチン早期接種法について検討することになった。この共同研究に参加するにあたり、当院IRB上問題となった点及び現時点での実施例の中間結果について報告した。

## A. 本邦におけるB型肝炎ウイルス関連腎症6例のウイルス学的検討

### a 研究の目的

B型肝炎ウイルス関連腎症(HBV-associated nephropathy)の発症メカニズムについては様々な要因が報告されてきたが、依然詳細は不明である。現在、最も受け入れられているものは、B型肝炎ウイルス(HBV)抗原(特にHBe抗原)を中心に形成される免疫複合体が腎組織に沈着することで発症するというメカニズムである。

一方、HBVには現在8つのgenotype(A-H)が報告されており、genotypeにより地域特異性が存在することが明らかにされている。更に近年、HBV genotypeの違いにより臨床病態や治療効果に違いがあることが報告されている。しかし、これまでHBV-associated nephropathyとHBV genotype、遺伝子変異との関係について検討した研究はほとんど認めていない。そこで今回、我々は本邦におけるHBV-associated nephropathyとHBV genotype、遺伝子変異との関連性について検討した。

### b 対象と方法

#### 対象:

大阪府立急性期・総合医療センター、鳥取大学病院、聖マリアンナ大学病院、名古屋市立大学病院の4施設にてHBV-associated nephropathyと診断した患者6例。

なおHBV-associated nephropathyの診断は以下の様に定義した。

- ・血清HBsAgが6ヶ月以上持続陽性である。
- ・尿検査で蛋白尿などの異常所見を認める。
- ・他の原発性あるいは二次性腎疾患が除外されているもの。

今回の検討では全6例に対して腎生検が施行され、膜性腎症あるいは膜性増殖性糸球体腎炎との病理学的診断がなされた。

#### 方法:

① 6例の患者について、以下の項目をretrospectiveに調査した。

年齢、性別、家族歴(肝疾患の有無)、感染経路、血液生化学的検査、血清HBVマーカー(HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc)、血清HBV-DNA量、腎症に対するウイルス療法とその効果

#### ② HBVのウイルス学的検討方法

HBV-DNAは保存血清100 $\mu$ lからQIAamp DNA extraction kitを用いて抽出し、以前我々が報告したprimer setを用いたPCR法によって増幅した。

増幅したHBV-DNA fragmentはABI Prism Big Dye version30.kitを用いABI 3100 DNA automated sequencerによって、その塩基配列を5', 3'両方向から決定した(Direct Sequence法)。塩基配列が決定されたHBV-DNA fragmentはGENETYX version11.0を使用してassembleし、complete HBV genomeを決定した。

6症例のHBV nucleotide sequenceに対してCLUSTAL Xを使用してmultiple alignmentを実施した後、近隣接合法にて分子系統樹を作成した。また特異的な遺伝子変異を調べるため、比較対象としてHBV genotype毎のconsensus sequence(genotype Aa, Ae, Ba, Bj, Ce, Csの6種類)を作成した。作成方法はgenotype毎のHBV nucleotide full sequenceをDDBJ/EMBL/GenBank databaseから取り出し、これらからconsensus sequenceを作成した。

HBV-associated nephropathy 6例と6種類のconsensus sequenceとの間で、Pre-S, S, X,

pre-Core/Core, P 領域それぞれにおける特異的遺伝子変異, アミノ酸変異がないか比較検討した。

### c 結果

6 症例の臨床データについては Table 1 に, 臨床背景については Table 2 に示す。

6 例すべて男性で HBeAg 陽性であり, HBV-DNA 量は高値であった。

HBV-associated nephropathy 6 例の分子系統樹を Fig 1 に示す。

図が示すようにこれら 6 例の genotype は HBV/Aa 2 例, HBV/Ae 2 例, HBV/Ce 2 例であった。HBV/Ce の 1 例 (Patient6) において core 領域における deletion を認めた。また HBV/Aa の 2 例で precore 領域 G1862T 変異を特異的に認め (Fig 3), この変異によってアミノ酸変異 (Val17→Phe17) を認めた (Fig 2)。今回の検討ではこれらの他には, 全ての領域 (Pre-S, S, X, pre-Core/Core, X) において HBV-associated nephropathy に特異的と思われる遺伝子変異は認められなかった。

### d 考察

HBV-associated nephropathy の発症メカニズムについては, 依然不明な点が多いが, 現在のところ HBeAg が免疫複合体を形成し, それが腎組織に沈着することによって発症するという説が有力である。今回検討した 6 例では免疫染色で HBeAg の腎組織への沈着は証明できなかったが, 全例血清 HBeAg が陽性であり血清 HBV-DNA 量は高値であったことから, 過剰に発現した HBeAg が HBV-associated nephropathy 発症に影響しているのかもしれない。

ウイルス学的検討では 6 例中 4 例が genotype A であった。本邦における慢性 B 型

肝炎の genotype 毎の割合については, 折戸らが genotype C:84.7%, genotype B:12.2%, そして genotype A についてはたった 1.7%と報告している。この点からすると, 症例数は少ないが今回の検討では HBV-associated nephropathy 発症に関して HBV/C では稀であるが, HBV/A ではより発症しやすい可能性が示唆された。遺伝子変異については, HBV/Aa の 2 例において precore 領域 G1862T 変異とこれに伴うアミノ酸変異 Val17→Phe17 を認めた。

HBV database で検索したところ, G1862T 変異は HBV/Aa では 32%に認められたが, 他の genotype には稀な変異であった。またこの変異が HBeAg の細胞内蓄積に影響を及ぼす可能性が示唆されており, G1862T 変異が HBV/Aa における HBV-associated nephropathy 発症に影響している可能性が考えられた。一方, HBV/Ce の 1 例において core 領域の deletion を認めたが, これが腎症発症と関連するかについては不明であった。

これら以外には, 他の全ての領域において HBV-associated nephropathy 発症との間に関連性があると思われる HBV genotype, 遺伝子変異は認められなかった。今回の検討では症例数が少ないため, 今後症例数を増やしての検討が必要と思われる。

### B. C 型肝炎母子感染例に対し PEG-IFN 療法を実施中に肝障害を生じたため中止せざるを得なかった症例について

#### a 研究の目的

最近の研究から HCV RNA 陽性の母体から出生した場合, C 型肝炎の母子感染は約 10%に成立することが明らかとなった。しかしながら, 一旦, 母子感染が成立した例については, 小児期での肝炎の発生率や臨床経過など明ら

かでない部分も多い。またその治療法についても明確なものはなく、解決すべき重要な課題と考えられる。今回我々は、HCV 母子感染例に対して PEG-IFN 療法中、肝障害が悪化し治療を中止せざるをえなかった男児例を経験したので報告する。

## b 症例

5歳, 男児.

### <家族歴>

母: C 型慢性肝炎, 感染経路は不明.  
Genotype 2a.

父: 特記すべきこと無し.

### <出生歴>

初産, 39 週5日, 3400g, APGAR 10 点, 経膈分娩で出生. 人工栄養児. 母体は, 妊娠中肝障害は無かった.

### <既往歴>

特記すべきこと無し. 人工栄養児. 輸血歴はない.

### <現病歴>

1 歳時に近医で HCV 抗体陽性を指摘され, 経過観察されていたが, HCV RNA 陽性とトランスアミナーゼの上昇が持続したため, 3 歳時に当院紹介された. 転院後の経過でも, トランスアミナーゼの上昇が持続したため, PEG-IFN (ペガシス: PEG-IFN  $\alpha$ -2a) 治療目的で入院となった.

### <現症>

血圧: 114/72 mmHg, 脈拍: 98, 体温: 36.8 °C, 体重: 25.8 kg, 身長: 117.8 cm.  
心音: 整. 雑音なし. 肺音: 清. 腹部: 平坦, 軟で肝脾を触知せず. 黄疸なし.

### <インターフェロン療法開始時の検査所見>

治療開始時の検査結果を Table 3 に示す. 血液・一般生化学検査ではトランスアミナーゼの軽度高値を認める以外, 異常値は認めなかつた.

血清 IgG, A, M 値, 甲状腺機能も問題はなかつた. HBV, HIV 等の重複感染はなく, CMV の急性感染も否定的であった. HCV RNA は 1400 KIU/ml, 抗核抗体は 40 倍であった. 抗平滑筋抗体陰性, 抗ミトコンドリア抗体陰性, 抗 LKM-1 抗体陰性, MPO-ANCA は基準値未満であり, 異常は認めなかつた.

### <治療前の肝組織>

門脈域の繊維性拡大は目立たず, 軽度の炎症像を認め, F0A1 に相当する所見であった.

### <経過>

経過を Fig 4 に示す. PEG-IFN 90  $\mu$ g 週 1 回投与の単独療法を開始した. 初回投与後, すぐに発熱を認めたが, 4 日で解熱した. その後, 症状は落ち着いたため, 入院期間は 3 週間とし, 以後は通院とした. HCV RNA は当初陽性であったが, 9 週目には定性法で陰性となった. 血清 ALT 値は 3 週目よりほぼ正常化した, 7 週目から再上昇し, 投与開始後 10 週目には 610 U/l と異常高値を示したため, PEG-IFN の投与を中止した. ALT 値は PEG-IFN 投与中止後, 速やかに低下した. 治療中止後 2 ヶ月で, 再び HCV-RNA は陽性となり, 以後, 現在まで断続的に ALT 値の上昇を認めている. 経過中, 貧血, 白血球減少, 血小板減少, 間質性肺炎, 甲状腺機能異常等は認めなかつた.

## c 考察

現在, 成人の C 型慢性肝炎の難治例に対しては合成核酸アナログであるリバビリンとの併用療法が標準的治療となっているが, 小児では, リバビリンの催奇形性や溶血性貧血などの副作用が重大であることから適用が難しい. 一方, PEG-IFN  $\alpha$ -2a は既存の IFN  $\alpha$ -2a に 40KDa 分枝ポリエチレングリコール (PEG) を結

合させ血中からの IFN 消失時間を延長し効果を持続させた薬剤で、週 1 回投与で C 型慢性肝炎の治療が可能であり、従来のものより、注射の回数が少なく、中和抗体を生じるリスクが少ないことから、小児に適しているとされる。今回我々は、藤沢らと共同で「小児 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN 療法」の多施設共同研究に参加し、患者及びその両親に対し同意を得た上で、規定のプロトコールに従い、小児の C 型慢性肝炎例に対して PEG-IFN 単独療法を行った。しかしながら、経過中、7 週目より、PEG-IFN 薬剤の副作用と思われる重篤な肝障害を発症したため、投与を中止せざるを得なかった。

一般的にインターフェロン製剤の場合、PEG 化した方が副作用は少ないとされているが、逆に頻度が高い副作用もある。例えば、リンパ球減少、血小板減少、赤血球減少といった血球系への影響は PEG 化製剤の方が頻度の高いことが報告されている。肝障害についても同様である。Table 4 に各 IFN 製剤使用時の肝障害発生頻度の比較を示す。内容は全て添付文書による。PEG 化製剤である、ペガシス、ペグイントロンの肝障害の頻度はそれぞれ、10% 以上、5% 以上と従来型の製剤より、多いことが記され、特にペガシスにおいては ALT 値上昇、AST 値上昇の頻度が 21% と高頻度である。IFN 投与中の ALT 値上昇の機序として①IFN 自体による薬剤性肝障害、②IFN による自己免疫性肝炎の誘発、③IFN による直接的な抗ウイルス作用および、生体の免疫能の変化を介した HCV 感染肝細胞のアポトーシス、壊死によるものが一般的に考えられているが、今症例の場合はスコアリングシステムから AIH の可能性は低いと考えられ、1、または 3 の機序が考えられた。

HCV 感染小児例に対して PEG 化製剤は注射回数を減少出来るなど有用な点も多いが、一方副作用の出現頻度が高いものもあり、投与に際しては注意を要すると考えられた。

### C. 「HB ワクチン早期接種による B 型肝炎母子感染防止効果の研究」に対する当院 IRB の指摘事項とその対応と当院での現在までの実施例についての検討

#### a 研究の目的

B 型肝炎の母子感染予防が保険適応となり日常的に行われるようになった現在でも、母子感染は年間数十～数百例の単位で成立していると予想される。成立例の約 3 割は HBIG やワクチンの未投与、投与時期の間違い等によると推定され、その発生要因の一つとして母子感染防止のための処置が妊娠から生後 6 か月までと長期にわたることが挙げられる。そこで HBV 母子感染予防処置として有効かつ安全な HB ワクチン早期接種方式の検討が必要となってきた。今回、大戸主任研究者のもと、従来の日本での方法（出生後 0, 2 ヶ月時に HBIG 接種を実施し 2, 3, 5 ヶ月時に HB ワクチンを接種する方法）と異なる HB ワクチン早期接種法（出生後 0 ヶ月に HBIG を接種し、出生後 0, 1, 3 ヶ月に HB ワクチンを接種する方法）について検討することとなり、我々ものこの共同研究に参加するため、当院 IRB に、研究計画書を提出したが、その際、幾つかの事項を指摘された。指摘事項とその対策及び当院における現時点での実施例について詳細を中間報告する。

#### b 当院 IRB 及び事前会議の指摘事項

当院 IRB で「HB ワクチン早期接種研究計画書」に対して指摘された事項を以下に示す。

1. 「分娩前の検体を凍結保存しておく。」との



記載があるが、母体の検体に対する検体採取目的、同意、目的外使用をしないことの説明、同意書がない。試験終了後の検体について破棄するか否かの記載がない。

2. 説明と同意取得について、小児科医師がこの study を担当する場合で、特に入院後すぐに分娩がなされる際には、分娩前の説明・同意取得の実施が困難で、分娩後になる可能性が高い。その場合、母体の検査や血清の保存には問題ないか。(同意取得前に検体を保存することになる。)同意の取得方法については、分娩前、分娩後と、それぞれに分類して記載してはどうか。

3. 同胞のデータを取得するとの記載があるが、説明、同意はどのようにして行うのか。患者説明書にそれについての記載がない。

4. 適格性のない症例で「情報提供に関する説明と同意」に同意された方のデータについての扱いが明確でない。

### c 指摘事項に対する対策

今回、指摘された事項に対応し、実施した対策について以下に示す。

#### 1 同意取得の方法について

初回のHBIGの接種については、分娩後、産科医師又は小児科医師が行う。研究の同意について、本来ならば、分娩前に取得しておくのが理想的であるが、分娩は緊急を要する場合も多いため、分娩後、HBIG 接種後に小児科医が取得する場合もある。理由として、通常の医療においても、分娩後早期に HBIG を接種する必要があり、研究の同意を待って接種する事に倫理上問題があると考えられること、HBIG 接種後に同意を得ても、研究内容に本質的な影響はないと考えられるためである。尚、本人だけでなく、母親、父親、同胞についても、同意書を用いて、データ提供の同意を得る。

#### 2 母体血清の保存、利用について

分娩後に同意を取得した場合、分娩前の検体が残っていれば、その検体(血清)の保存および必要な検査を実施する。分娩前の検体が残っていない場合、同意取得後、母体の血液を採取し、必要な検査を実施し検体(血清)を保存する。保存した血清はこの研究内容の遂行に関するものに限り使用し、他の目的には利用しない。検体は小児科研究室で保存する。

#### 3 適格性のない症例で「情報提供に関する説明と同意」に同意された方のデータについて

今回の試験はケーススタディであり、対象となるのは、現在まで蓄積した厚労省方式症例としている。適格性のない症例で「情報提供に関する説明と同意」に同意された方のデータは厚労省方式症例となるため、症例数が多ければケースに対するコントロール症例とする。症例数が少ない場合には参考データとする。

上記対策を踏まえて、当院用に作成した同意書、及び補足説明書を資料として添付した。

#### d 当院実施例の中間報告

現在までの中間結果を Table 5 に示す。現時点で対象となった症例中には母子感染予防失敗例は無い。今後も継続し、症例数を増して検討していく予定である。

(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。

#### D. 健康危険情報

特記事項はなし。

#### E. 研究発表

##### 1 論文発表

Shinkai N, Tanaka Y, Orito E, Ito K, Ohno T, Hirashima N, Hasegawa I, Sugauchi F, Ueda R, Mizokami M. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen as predicting factor for relapse after cessation of lamivudine therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2006 ;36(4):272-276.

Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kurbanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, Kato M, Lai CL, Ueda R, Mizokami M. Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2006 ;45(5):646-53.

Sugauchi F, Orito E, Ohno T, Tanaka Y, Ozasa A, Kang JH, Toyoda J, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Akahane Y, Ichida T, Izumi N, Inoue K, Hoshino H, Iino S, Yotsuyanagi H, Kakumu S, Tomita E, Okanoue T, Nishiguchi S, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sata M, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatol Res.* 2006 ;36(2):107-114.

Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K,

Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2006 ;44(2):326-34.

Orito E, Fujiwara K, Tanaka Y, Yuen MF, Lai CL, Kato T, Sugauchi F, Kusakabe A, Sata M, Okanoue T, Niitsuma H, Sakugawa H, Hasegawa I, Mizokami M. A case-control study of response to lamivudine therapy for 2 years in Japanese and Chinese patients chronically infected with hepatitis B virus of genotypes Bj, Ba and C. *Hepatol Res.* 2006 ;35(2):127-34.

Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, Orito E, Vargas V, Esteban JI, Yuen MF, Lai CL, Kramvis A, Kew MC, Smuts HE, Netesov SV, Alter HJ, Mizokami M. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology.* 2006 ;130(3):703-14.

Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver*

Int. 2006 ;26(1):90-6.

## 2.学会発表

(国際)

Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Mizokami M. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. 6th HCC workshop in Asia. November 19, 2006. Tokyo.

Sugauch F, Orito E, Tanaka Y, Ozasa A, Kang JH, Mizokami M. Influence of hepatitis B genotypes as well as precore and core promoter mutations on fulminant outcome of acute infection. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. October 27-31 2006. Boston.

Nakamura I, Ochiai K, Tanaka Y, Moriyasu F, Mizokami M, Imawari M. Classification of interspousal HCV infection in acute hepatitis C patients by phylogenetic analyses of HCV E1 region. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. October 27-31 2006. Boston.

Orito E, Ito K, Sugaucji F, Tanaka Y, Mizokami M. Difference of HBV genotypes and hepatocellular carcinoma in Asian countries. International Symposium on HBV. May 27 2006. Kyoto.

(国内)シンポジウム

田中靖人, 杉山真也, 溝上雅史. シンポジウム2:急性B型肝炎におけるウイルス遺伝子多

様性と臨床的意義. 第36回日本肝臓学会東部会. 平成18年12月9日. 東京.

菅内文中, 田中靖人, 溝上雅史. シンポジウム5:劇症肝炎の抗ウイルス療法 劇症肝炎におけるB型肝炎ウイルス遺伝子型の特徴と抗ウイルス療法の適応

第10回日本肝臓学会大会, 平成18年10月11-12日. 札幌.

田中靖人, 小笹貴士, 伊藤清顕, 菅内文中, 折戸悦朗, 溝上雅史. パネルディスカッション:劇症肝炎をめぐる諸問題 B型劇症肝炎に寄与するウイルス因子の検討. 第32回日本急性肝不全研究会. 平成18年5月24日. 京都.

折戸悦朗, 田中靖人, 溝上雅史. シンポジウム5:B型肝炎に対する抗ウイルス療法(年齢等の背景因子と治療選択) B型慢性肝炎に対するラモスナブ治療反応性とHBV genotypeとの関連性について. 第92回日本消化器病学会総会. 平成18年4月20-21日. 小倉.

田中靖人, 溝上雅史. シンポジウム:治療戦略に直結する臨床検査 肝炎ウイルス遺伝子検査に基づいた診療. 第45回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会. 平成18年3月5日. 浜松.

伊藤孝一, 後藤健之, 杉浦時雄, 今峰浩貴, 安藤直樹, 植田昭仁, 水野晴夫, 大野敏行, 杉山幸八郎, 戸荻創. PEG-IFN単独療法中, 一過性のHCV-RNAの陰性化を認めたが, 肝障害の悪化により治療を中止せざるを得なかったHCV母子感染男児例, 第10回東海小児感染症研究会, 2006, 名古屋

杉浦時雄, 金原有里, 岸本恵美子, 清澤秀輔, 野村真祈子, 野村孝泰, 牧野泰子, 村田水紀, 小野景子, 竹内幸, 安田和志, 幸脇正典, 伊藤剛, 山田拓司, 藤田直也, 後藤健之, 小山典久. PEG-IFN が有効であった C 型肝炎ウイルス関連糸球体腎炎の 1 女児例, 第 33 回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2006, 大阪

伊藤孝一, 後藤健之, 杉浦時雄, 三宅能成, 安藤寿啓, 稲垣晴代, 水谷文彦, 河辺義和, 杉山幸八郎, 戸荻創. 当院における最近 23 年間の小児 HBV 感染例の検討, 第 109 回日本小児科学会学術集会, 2006, 金沢

#### F. 知的財産権の出題・登録状況

現時点でなし.