

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。

## II. 「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」における当院での実施例についての検討

### A. 研究の目的

HBe 抗原陽性の妊婦から出生した児は、B 型肝炎母子感染予防処置を実施しない場合、90%以上に母子感染が成立し、感染した児の多くはキャリア化する。そこで、最近では母子感染予防が保険適応となり、ほとんどの例で実施されるため、母子感染例を経験することは少なくなった。しかし母子感染例を全く経験しなくなった訳ではない。予防処置を実施しても母子感染が成立する理由として、胎内感染など避けられないものもあるが、HB ワクチン、HBIG の投与方法や投与時期が間違っているなど医療機関あるいは保護者の過誤によって感染が成立してしまう例も少なからず存在する。特に投与時期について、現行の方法では、HBIG は 0、2 ヶ月、HB ワクチンは 2、3、5 ヶ月と出生後長期に渡り実施しなければならないこと、里帰り分娩の習慣によって、出生した病院との関係が切れ、きちんとフォローされないことが、投与忘れや投与間違いを増加させていると推定される。

この対策として、今回の研究班では、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)と異なり、諸外国では既に実施されている 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った。この方法では、出産した病院で 1 ヶ月健診を受ける場合には、最低でも同病院で 2 回目までの HB ワクチンを受けることが出来、投与間違いによる母子感染の発生をかなり減少できると考えられる。またこの方法では 3 ヶ月までに HB ワクチンを終了することが可能となり、BCG やポリオ、3 主混合ワクチンなどとの接種時期の干渉を少なくすることが可能となる。

HB ワクチン早期接種について、現時点での当院での実施例について報告する。

### B. 当院実施例の結果及び考察

期間内の早期接種対象例は 7 例であった。内、1 例については他院からの紹介例で、母親のデータ、児の背景データについて詳細は不明である。全例に書面での同意を取得した。母の HBV 関連データを Table 3 に示す。HBe 抗原陽性例は 2 例、HBe 抗原陰性例は 5 例であった。Genotype については、A が 1 例、B が 1 例、C が 3 例で、不明又は未実施が 2 例あった。症例 7 の HBs 抗原は 0.1 と減少していた。Table 4 に対象児の体重、身長、在胎週数等の背景データを示す。37 週未満の早期産例が 2 例(症例 1,6)含まれていた。体重は全例 2500g 以上であった。双胎例はなく、全例出産時に異常は認めなかった。

Table 5 に HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体の推移について 1 ヶ月時、4 ヶ月時、12 ヶ月時のものを示す。全例、観察期間内には母子感染は成立しなかった。1 年間以上観察可能であった 2 例について、12 ヶ月時の HBs 抗体価はそれぞれ 351mIU/mL、239mIU/mL と充分感染予防力価として維持されていた。

症例 5(他院からの紹介例)についてはワクチン低反応例であった。Fig 4 に出生後のワク

チン接種状況と各種抗体価の推移を示す。日齢 191 に追加ワクチンを接種したが、HBs 抗体について、経過中の再上昇は観察されなかった。今後、HBs 抗原が陽転してくるか否かについては不明であり、注意深い観察が必要と考えられた。

ワクチン低反応で抗体価が低下する例における追加接種については、実施しなくても結果は変わらないとの考え方と、実施すべきとの考え方があるが、今回の症例については、ご両親と相談し、追加接種を実施した。

### III. HCV 母子感染例における HCV NS5B 領域の塩基置換速度の母子間の比較

#### A. 研究目的

最近では、輸血用血液のスクリーニング法が進み HCV の感染経路として輸血によるものはほとんど無くなり、新たな患者の発生は減少している。しかし、残念ながら、現時点では HCV については確立された母子感染予防法はなく、母親の血清中 HCV RNA が陽性の場合、その約 10% に母子感染が成立するとされ、現在でも全国では数百人規模の新規感染例が存在すると推定される。感染例の約 2/3 は HCV キャリアの状態となり、大部分は小児期から成人に至るどこかで慢性肝炎を発症する。今後、これら母子感染例の予後を予測し、治療を進めていく上で、HCV 母子感染の病態を解明することは、重要な課題の一つと考えられる。

HCV 母子感染の小児例では肝線維化の進展の程度は成人と比較して軽度である。また、治療においては IFN 単独療法の成績は小児では、成人と比べて良好である。このような小児と成人で臨床像に差の生じる理由は明らかにされていないが、ホストである母子の免疫能

の違いや、ウイルスの遺伝子変異が病態に関わる可能性も考えられる。HCV 母子感染における、母子間での HCV 遺伝子の変異速度や変異部位の違いが明らかになれば、小児と成人での臨床像が異なる原因を究明する上で意義あるものと考えられる。今回、我々は HCV 母子感染例を対象に、それぞれ母子から検出したウイルスの遺伝子解析を実施することにより、病態の一部を解明したいと考えた。

母親に存在する HCV クローンは quasispecies の状態にあり、必ずしも major なクローンだけが児へ感染するとは限らず、minor でありながら感染性の強いクローンが感染する可能性が示されている。また、quasispecies の増加は宿主に最も適応したウイルスを選択する過程において生じることから、ホストの免疫能が強まることにより、ウイルスが多様化し変化が加速する可能性がある。即ち母由来の HCV クローンは新たな宿主である児のもとで母とは異なる方向性の変化を来す可能性がある。母由来のウイルスは、遺伝的には似ているが免疫力の異なる児の下で、進化の速度、方向性に違いを見せるのか、あるいは似た方向を示すのであろうか。

HCV 遺伝子の NS5B 領域は、HCV RNA ゲノムの複製において重要な役割を担っている RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) をコードし、その領域の変異は HCV RNA の複製に重要な影響を与えることが、明らかとなり、インターフェロン治療との関連性も指摘されている。しかしながら、HCV 母子感染例の小児期における HCV NS5B 領域の多様化(進化)について母子間で比較した研究は少なく、詳細は不明である。そこで、今回我々は HCV NS5B 領域を主要な解析対象とした。

## B. 対象と方法

対象は当院小児科にてフォロー中の HCV 母子感染患者7例及びそれぞれの母親とした。採取した血液は凝固後、直ちに遠心し、RNA 抽出時まで凍結保存した。

解析時、保存血清 50  $\mu$ l より SepaGene-RVR (三光純薬)を用い、添付のマニュアルに従い HCV RNA を抽出した。

抽出した RNA、random primer 及び逆転写酵素 SuperScript II を用い、逆転写を実施し cDNA を作成後、NS5B 領域(nt 8279-8614 ) に設定した primer 及び、FastTaq を用い、nested PCR 法で増幅した(Fig 5)。

増幅産物は、3%アガロースゲルで泳動後、陽性バンドから DNA を切り出した。切り出した DNA、2nd PCR で用いた 2 組の primer、BigDye Kit ( Applied BioSystems ) にて、Sequence 反応を実施し、Sequence 解析装置で、目的領域の塩基配列を両方向から決定した(Direct Sequence 法)。配列中の一部の塩基は quasispecies によるものと思われる信号の混合を認めたが、順方向と逆方向の両者を解析し、より信号の強いものを採用した。

母子7家系につき NS5B 領域の 336 塩基配列、アミノ酸配列を決定し比較検討した。

経時的に観察可能であった6家系の母子については、塩基置換速度を母子間で比較した。

## C. 結果、考察

### 1. 患者背景と臨床経過

患者背景を Table 6 に示す。ALT の持続高値を示したのは Case C と Case F の 2 例であり、いずれも PEG-IFN 単独療法を施行されていた(1 例は現在治療中)。Fig 6~Fig 12 に Case A-G の ALT 値および HCV RNA 量の推移を示し、HCV 遺伝子解析を行った時点を矢印で

示す。Case C と Case F の 2 例については図中に PEG-IFN 単独療法を施行した時期を示す。Case C は現在治療中の児であり、治療開始 12 週の時点で HCV RNA は定性法で陰性化している。Case F は PEG-IFN 治療を開始後、血清中 HCV-RNA が著明に減少し、一旦は定性法で陰性化したが、10 回投与した時点で ALT 値が 600IU/l を超える著明な上昇を認めたため、PEG-IFN の副作用と考えられ、治療を中断した。その後、HCV-RNA は陽性化したが、徐々に減少していき、中断後約 1 年半の時点で再び定性法で陰性化している。また、HCV コア抗体価も漸減している(Fig 13)。

### 2. 母子間での NS5B 領域の比較検討

7 家系につき母子それぞれの HCV 株の NS5B 領域の塩基配列を決定し、分子系統樹を作成した(Fig 14)。この系統樹から、それぞれの母子の HCV 株の塩基配列は近縁に存在することが示された。また、母子間の HCV 株の塩基相同性を求めると(母子ともに最も年齢の若い時期で HCV 株の塩基配列を比較)、母子間の塩基相同性は高く、平均 99.2%(97.3-99.7%)、アミノ酸相同性も平均 99.8%(98.2-100%)と高い相同性を示した。アミノ酸配列については、2 箇所のアミノ酸残基の不一致を示した 1 家系を除き、6 家系で 100%の相同性を示した(Table 7)。NS5B 領域が感染ルートの確定に有用であることが再確認された。

### 3. 母子感染例の児における NS5B 領域の変化

母子感染の児は 7 例につき観察期間中の HCV NS5B 領域の塩基置換の数、およびアミノ酸置換の数、塩基置換速度(塩基置換/塩基/年)を求めた。それぞれ最も若い時点での HCV の塩基配列を基準とした(Table 8)。Case A は 9 歳、10 歳、11 歳の時点では 6 ヶ月時の

配列と比較して塩基置換がみられたが、12歳の時点では塩基置換がみられなかった。Case B では塩基置換がみられたが、4歳から16歳にかけて3ヶ所の塩基置換がみられたが、アミノ酸置換は伴わない変化であった。残りの5例では塩基置換がみられなかった。IFN- $\alpha$ 2a単独療法を施行したCase F(肝障害の発生により、10週目で治療中断)では治療前後で塩基置換がみられなかった。

#### 4. 母子感染例の母における NS5B 領域の変化

経時的に観察可能であった母子感染例の母6例につき観察期間中のHCV NS5B領域の塩基置換の数、およびアミノ酸置換の数、塩基置換速度(塩基置換/塩基/年)を求めた。それぞれ最も若い時点でのHCVの塩基配列を基準とした(Table 9)。Case Aの母、Case Bの母、Case Eの母、Case Gの母で塩基置換がみられ、Case Eの母ではアミノ酸置換を伴っていた。

#### 5. NS5B 領域の塩基置換速度の母子間の比較

母子ともに経時的に観察可能であった6家系について塩基置換速度を比較した(Table 10)。HCV株のNS5B領域の塩基置換速度を母子で比較すると、児の方が遅い傾向がみられた。このHCVの塩基置換速度の差異は宿主の免疫力の差が影響している可能性が推察された。また、臨床経過とHCVの塩基置換速度との関係について明らかなものは認めなかった。

(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。

#### D. 健康危険情報

特記事項はなし。

#### E. 研究発表

##### 1 論文発表

1) Kusakabe A, Tanaka Y, Goto K, Mizokami M et al., Virological features of hepatitis B virus-associated nephropathy in Japan. J Med Virol. 79: 1305-1311, 2007

2) Ito K, Goto K, Tanaka Y, Mizokami M et al., Evidence of mother to infant transmission of hepatitis C virus and the evolutionary pattern by molecular evolutionary analyses, submitted, 2007

##### 2.学会発表

(国内)シンポジウム

1) 日下部 篤宣、田中 靖人、折戸 悦郎、菅内 文中、坂本 知行、新海 登、岡本 泰幸、後藤 健之、田尻 仁、村上 潤、奥瀬 千晃、四柳 宏、城 卓志、溝上 雅史: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。平成19年5月31日 第43回日本肝臓学会総会。東京

2) 日下部 篤宣、田中 靖人、折戸 悦郎、菅内 文中、後藤 健之、坂本 知行、新海 登、松浦 健太郎、中尾 春壽、野尻 俊輔、宮木 知克、千田 勝博、城 卓志、溝上 雅史: 当院におけるB型肝炎ウイルス関連腎症2例のウイルス学的検討。日本消化器病学会東

海支部第107回例会 平成19年11月17日。  
名古屋

3) 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.

4) 田中靖人, 折戸悦朗, 溝上雅史. シンポジウム6:ウイルス肝炎進展因子の解明 HBV genotype によるウイルス増殖効率及び蛋白合成能の違い-複製モデルを用いて 第10回日本肝臓学会大会、平成18年10月11-12日. 札幌.

5) 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.

6) 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史. ワークショップ1:ウイルス性肝炎研究の最先端. B型肝炎ウイルス遺伝子型による複製効率の違い-ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて-. 第42回日本肝臓学会総会. 平成18年5月25-26日. 京都.

7) 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.

8) 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.

9) 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, 戸苺 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

10) 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

11) 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, 戸苺 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。

**Table 1 : Clinical data of the 6 patients with HBV-associated nephropathy**

Patient	Age (yrs)	Gender	Genotype	HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc	HBV-DNA (LGE/ml)	Plt ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	Alb (g/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	$\gamma$ -GTP (IU/L)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)
1	2	M	Aa	+	+	-	+	8.7	27	3.0	108	127	NA	10	0.2
2	55	M	Aa	+	+	+	+	8.7	32.1	1.3	44	38	46	20	0.8
3	24	M	Ae	+	+	-	+	8.5	15.8	2.1	70	91	109	9.1	0.8
4	13	M	Ae	+	+	-	+	8.7	19	2.6	58	89	NA	12	0.7
5	37	M	Ce	+	+	-	+	7.8	18.9	3.7	78	127	59	10	1.0
6	70	M	Ce	+	+	-	NA	8.7	11	2.4	124	115	84	13.3	1.4
Mean	33.5							8.5	20.6	2.5	80.3	97.8	74.5	12.4	0.8

NA; not available,

**Table 2 : Clinical Backgrounds of the 6 patients with HBV-associated nephropathy**

Patient	HBV infection in family	Transmitted root	Kidney Biopsy	Immunostain	Therapy for nephropathy	Therapy effect for nephropathy
1	Brother (16yrs) : HBV carrier Parents : negative	Horizontal transmission	MN	HBsAg (-)	IFN	Improve
2	Unknown	Not clear	MN	NA	No therapy	-
3	Unknown	Horizontal transmission	MN	HBsAg (+)	IFN	Self discontinuance
4	Brother (10yrs) : HBV carrier Parents : negative	Not clear	MN	NA	IFN	Improve
5	Unknown	Not clear	MN	HBsAg,HBcAg,HBeAg (-)	Lamivudine	Improve
6	Unknown	Blood transmission susp (40 years old)	MPGN	HBsAg(-)	Lamivudine	Improve

NA, not available; MN, Membranous nephropathy, MPGN; membranoproliferative glomerulonephritis, IFN; interferon,

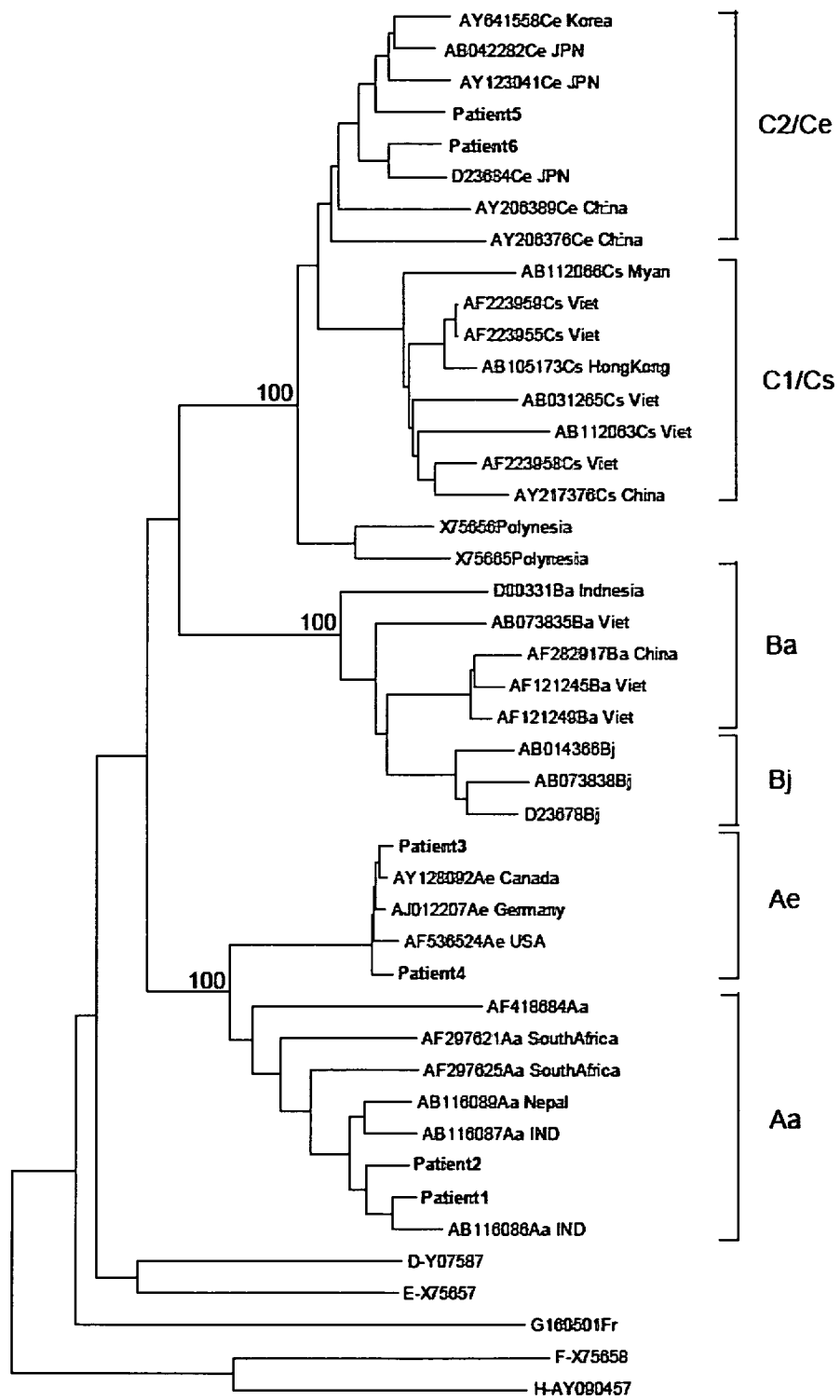


Fig 1



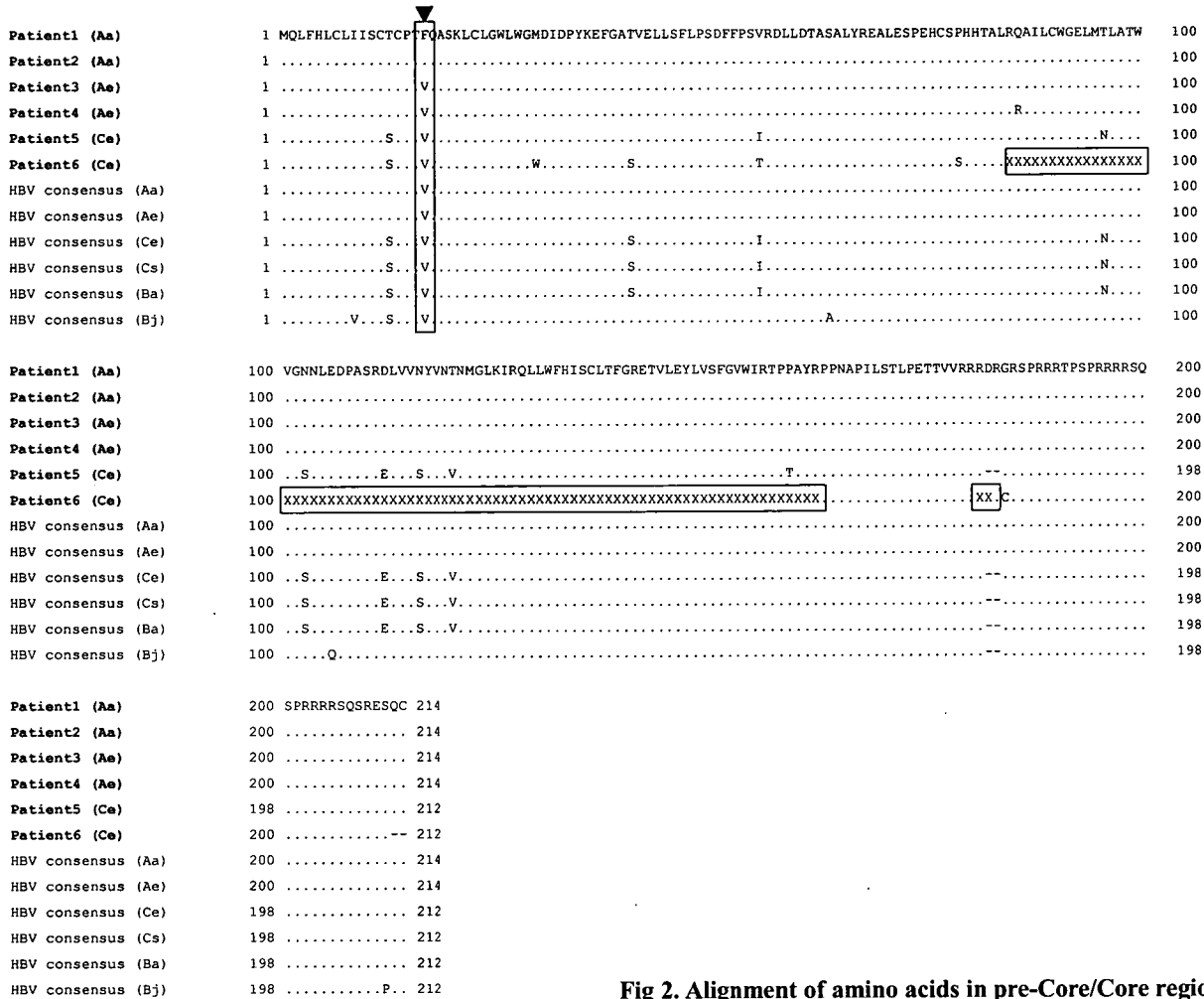


Fig 2. Alignment of amino acids in pre-Core/Core region.

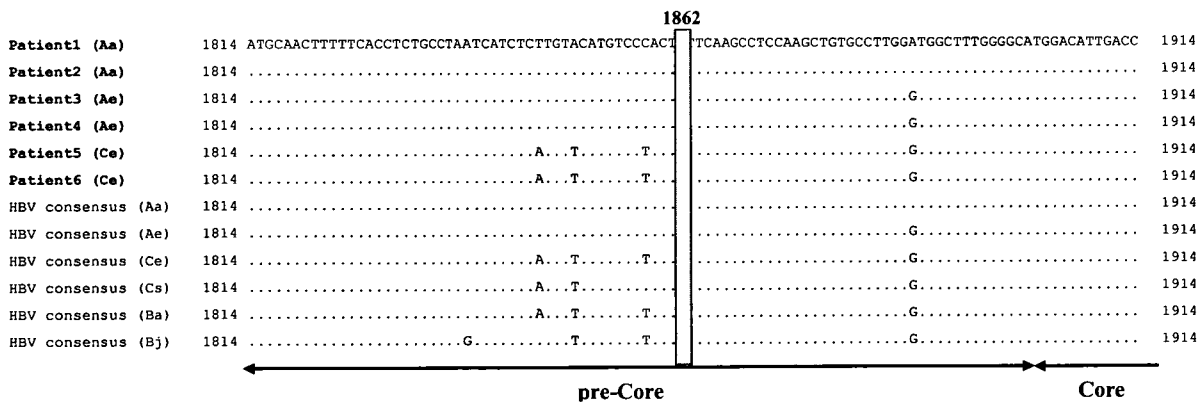


Fig 3: Alignment of sequence in pre-Core/Core region.

Table 3 母のHBV関連データ

	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	genotype	HBV DNA
1	2000 ↑	n.t.	0.2 ↓	100 ↑	100 ↑	A	4.7(TMA)
2	6810	n.t.	1030	24.7	100 ↑	C	8.1(TMA)
3	2000 ↑	n.t.	0.2 ↓	100 ↑	100 ↑	C	2.6 ↓ (PCR)
4	2000 ↑	n.t.	0.2 ↓	100 ↑	n.t.	C	2.6 ↓ (PCR)
5	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-
6	2000 ↑	0.5 ↓	1600	0.1 ↓	n.t.	n.t.	8.4(TMA)
7	0.1	(-)	0.5 ↓	57.6	99.6	B	2.6 ↓ (PCR)

症例2、6はHBeAg陽性。症例7はHBsAg低下例だが、HBcAbは高力価。

症例5は他院からの転入例。

Table 4 児の背景データ

	体重	身長	頭囲	在胎週数	Apgar	性別	胎児数	仮死	疾患
1	2542	47	32.5	35w4d	8/9	F	1	(-)	(-)
2	3314	52	34	39w4d	7/9	F	1	(-)	(-)
3	2920	49	33.5	40w1d	9/9	M	1	(-)	(-)
4	2652	49	30.5	40w1d	9/10	M	1	(-)	(-)
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2882	51	32	36w4d	9/10	M	1	(-)	(-)
7	3084	48	33.5	39w0d	7/7	M	1	(-)	(-)

Table 5 HB関連抗体価の推移

	HBIG 投与時間	1 mo			4mo			12mo		
		HBsAg	HBsAb	HBcAb	HBsAg	HBsAb	HBcAb	HBsAg	HBsAb	HBcAb
1	12	0.05 ↓	158	100 ↑	0.05 ↓	1830	100 ↑	0.05 ↓	351	89.2
2	13	0.05 ↓	149	100 ↑	0.2 ↓	145	100 ↑	0.3	239	92.5
3	9	0.2 ↓	128	100 ↑	0.2 ↓	233	99.5			
4	20	0.2 ↓	89.7	100 ↑	0.3	395	99.9			
5	-	0.1 ↓	324.7	-	0.05 ↓	48.6	100 ↑			
6	5	0.05 ↓	116	99.8						
7	3	0.05 ↓	229	99.7						

ワクチン低反応の1例

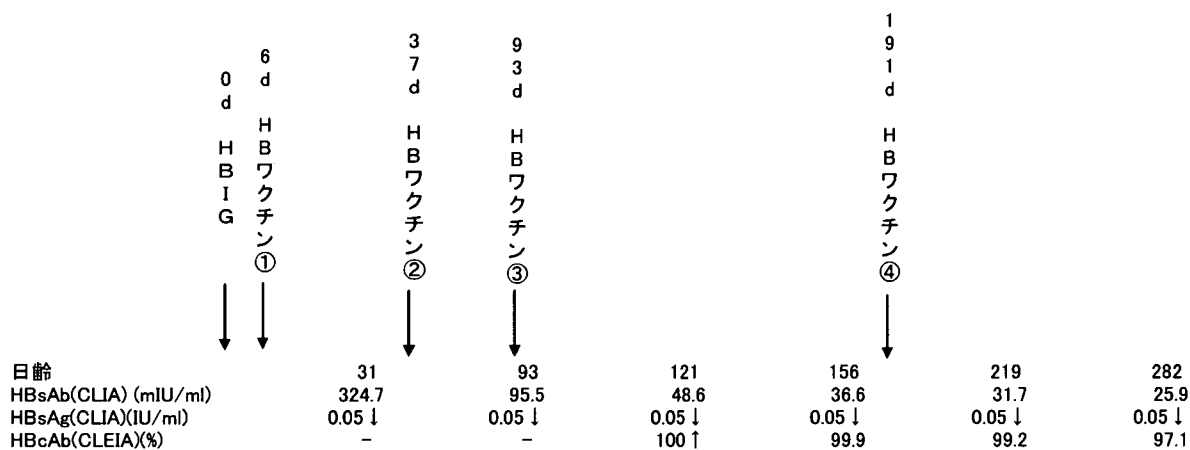


Table 6 患者背景

Case	性	HCV genotype	観察期間 (年齢)	観察期間 (年)	ALTの持続高値	PEG-IFN 治療
A	f	1b	0.3 - 13.6	13.3	-	-
B	f	1b	4.6 - 17.6	13.0	-	-
C	f	1b	1.3 - 8.7	7.4	+	+
D	f	2a	0.1 - 0.5	0.4	-	-
E	m	2a	1.2 - 3.0	1.8	-	-
F	m	2a	1.2 - 7.0	5.8	+	+
G	f	2b	0.1 - 9.9	9.8	-	-

Table 7 母子間の塩基配列、アミノ酸配列の比較

Case	HCV genotype	児検体	母検体	塩基置換	塩基相同性 (%)	アミノ酸置換	アミノ酸相同性 (%)
A	1b	6m	6m	1	99.7	0	100.0
B	1b	4y6m	13y6m	9	97.3	2	98.9
C	1b	5y9m	7y5m	1	99.7	0	100.0
D	2a	2m	2m	1	99.7	0	100.0
E	2a	1y11m	1y4m	2	99.4	0	100.0
F	2a	3y10m	3y11m	2	99.4	0	100.0
G	2b	5y3m	6y11m	3	99.1	0	100.0

母子間のHCV NS5B領域の塩基相同性は高く、アミノ酸配列も高い相同性を示した。

Table 8 HCV母子感染の小児7例におけるHCVの塩基置換速度

Case	年齢1		年齢2	塩基置換	アミノ酸置換	塩基置換速度 (塩基置換/塩基/年) × 10 <sup>-3</sup>
A	0y6m	vs.	2y0m	0	0	0.00
	0y6m	vs.	9y6m	2	0	
	0y6m	vs.	10y6m	1	0	
	0y6m	vs.	11y11m	1	0	
	0y6m	vs.	12y6m	0	0	
B	4y6m	vs.	13y6m	2	0	0.74
	4y6m	vs.	14y5m	1	0	
	4y6m	vs.	16y6m	3	0	
C	5y9m	vs.	6y10m	0	0	0.00
	5y9m	vs.	7y8m	0	0	
D	2m	vs.	5m	0	0	0.00
E	2y0m	vs.	2y3m	0	0	0.00
F	3y10m	vs.	5y9m	0	0	0.00
G	5y3m	vs.	8y4m	0	0	0.00

Table 9 HCV母子感染の小児6例の母におけるHCVの塩基置換速度

Case	年齢1 *2		年齢2 *2	塩基置換	アミノ酸置換	塩基置換速度 (塩基置換/塩基/年) × 10 <sup>-3</sup>
A-M*1	0y6m	vs.	0y7m	2	0	
	0y6m	vs.	4y6m	2	0	
	0y6m	vs.	9y6m	3	0	
	0y6m	vs.	10y6m	4	0	
	0y6m	vs.	11y11m	2	0	0.52
B-M*1	13y6m	vs.	16y6m	1	0	0.99
C-M*1	5y9m	vs.	6y10m	0	0	0.00
	5y9m	vs.	7y8m	0	0	0.00
E-M*1	1y4m	vs.	2y4m	3	1	8.93
F-M*1	2y0m	vs.	3y11m	0	0	0.00
G-M*1	6y11m	vs.	8y4m	1	0	2.10

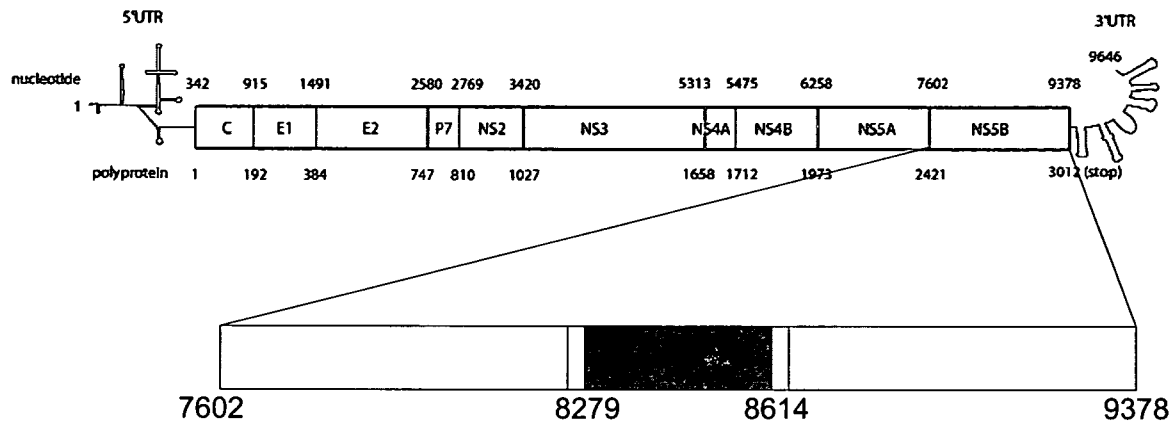
\*1 A-M : A の母、B-M : B の母、C-M:Cの母、D-M:Dの母、E-M:Eの母、F-M:Fの母、  
G-M:G の母

\*2 検体採取時の児の年齢

Table 10 HCV母子感染6家系における、HCV NS5B領域の塩基置換速度のまとめ

Case	HCV genotype	PEG-IFN 治療期間	Time1	Time2	観察期間 (年)	変異塩基数	塩基置換速度 (塩基置換/塩基/年) × 10 <sup>-3</sup>
A	1b	-	0y6m	12y6m	12.0	0	0.00
B	1b	-	4y6m	16y6m	12.0	3	0.74
C	1b	8y5m~	5y9m	6y10m	1.1	0	0.00
E	2a	-	2y0m	2y3m	0.3	0	0.00
F	2a	5y1m~ 5y3m	3y10m	5y9m	1.9	0	0.00
G	2b	-	5y3m	8y4m	3.1	0	0.00
A-M	1b		0y6m	11y11m	11.5	2	0.52
B-M	1b		13y6m	16y6m	3.0	1	0.99
C-M	1b		5y9m	7y8m	1.9	0	0.00
E-M	2a		1y4m	2y4m	1.0	3	8.93
F-M	2a		2y0m	3y11m	1.9	0	0.00
G-M	2b		6y11m	8y4m	1.4	1	2.10

Fig 5



1st PCR → ←

2nd PCR → ←

1st sense primer:8269S(8249-8269)

5'-GTTCTCGTATGAYACCCGCTG-3'

1st antisense primer:8618AS(8618-8639)

5'-GTACCTGGTCATAGCCTCCGTG-3'

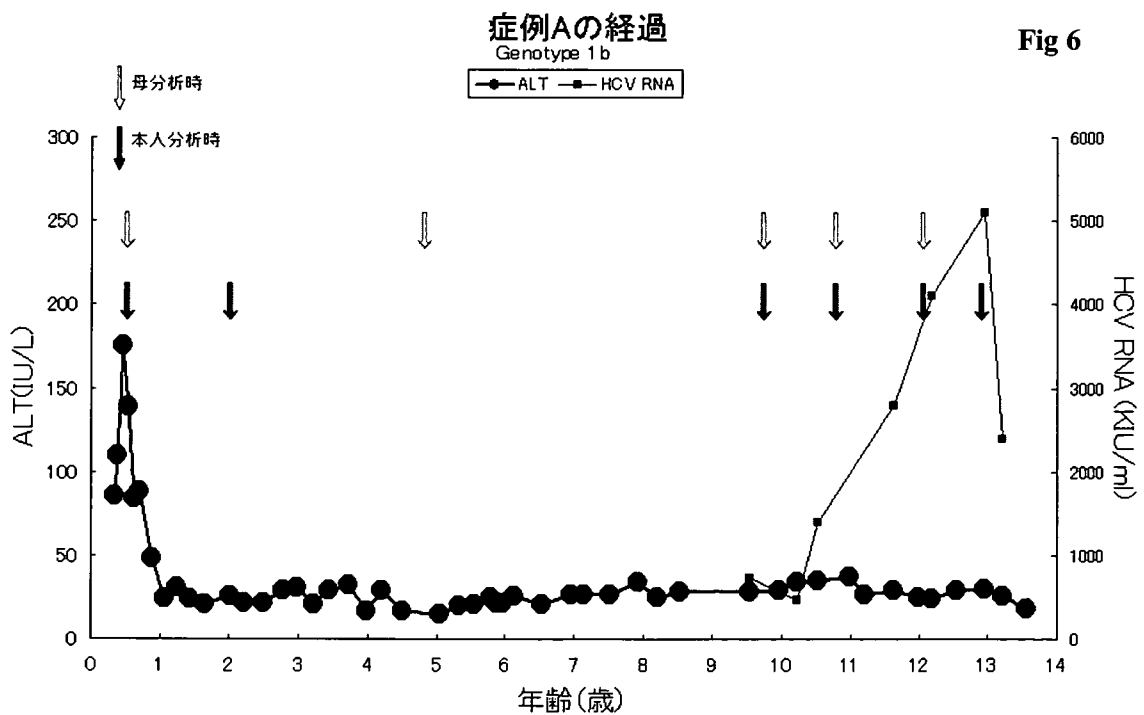
2nd sense primer:8278S(8258-8278)

5'-TGATACCCGCTGYTTTGACTC-3'

2nd antisense primer:8615AS(8615-8637)

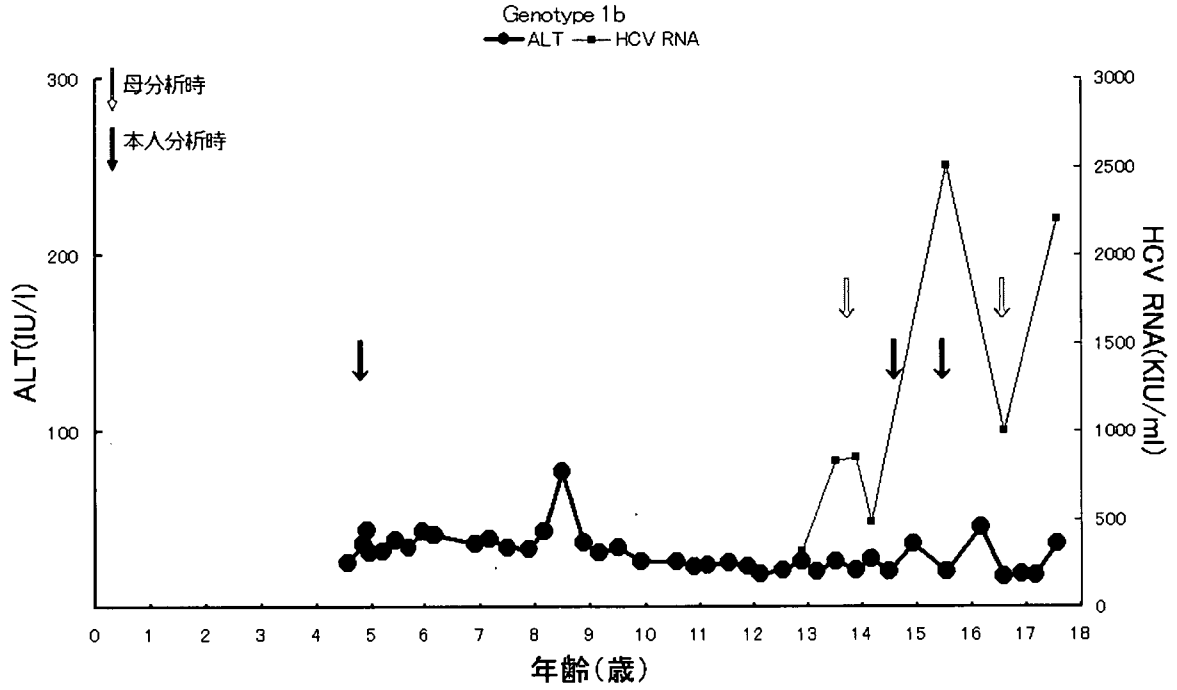
5'-TACCTGGTCATAGCCTCCGTGAAG-3

Fig 6



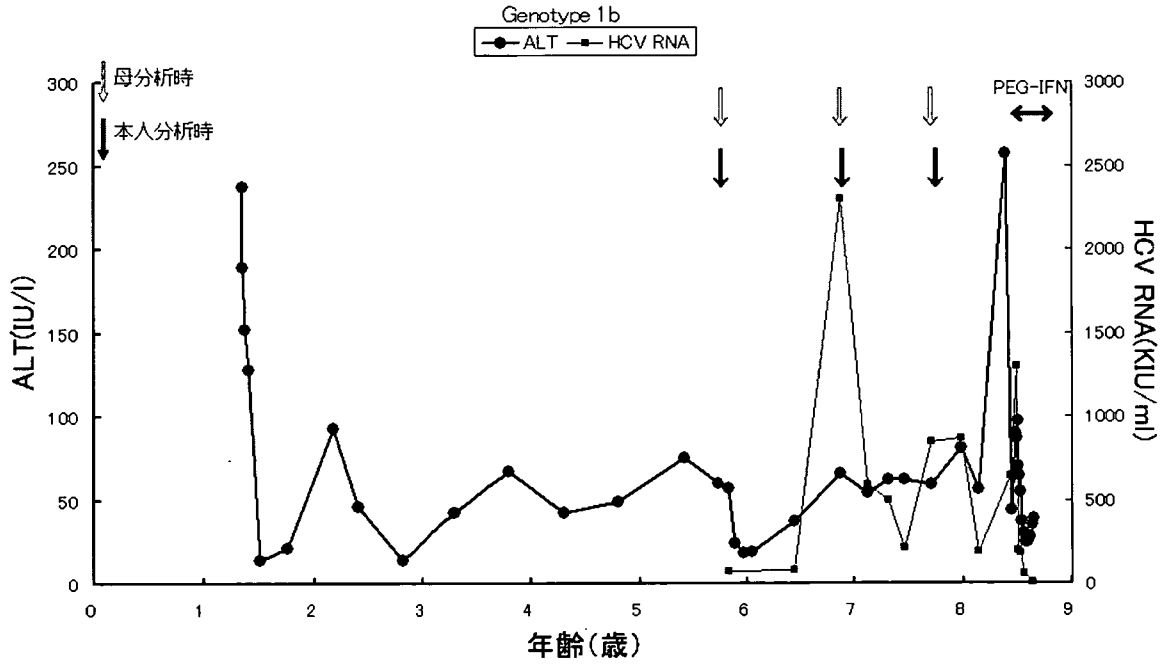
症例Bの経過

Fig 7



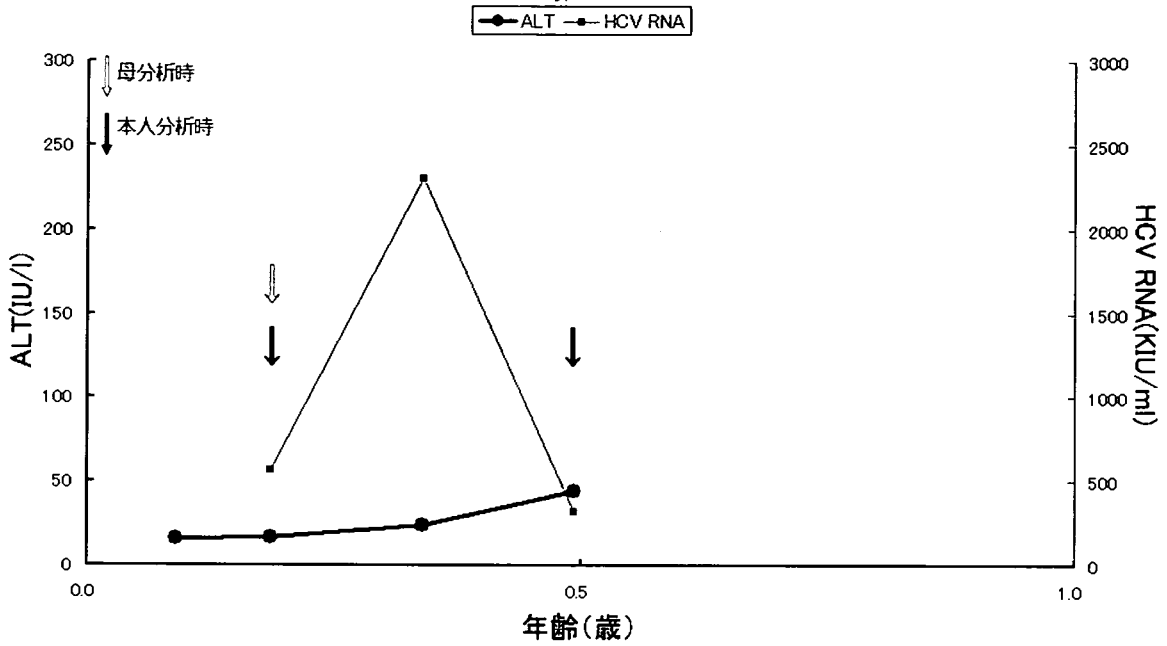
症例Cの経過

Fig 8



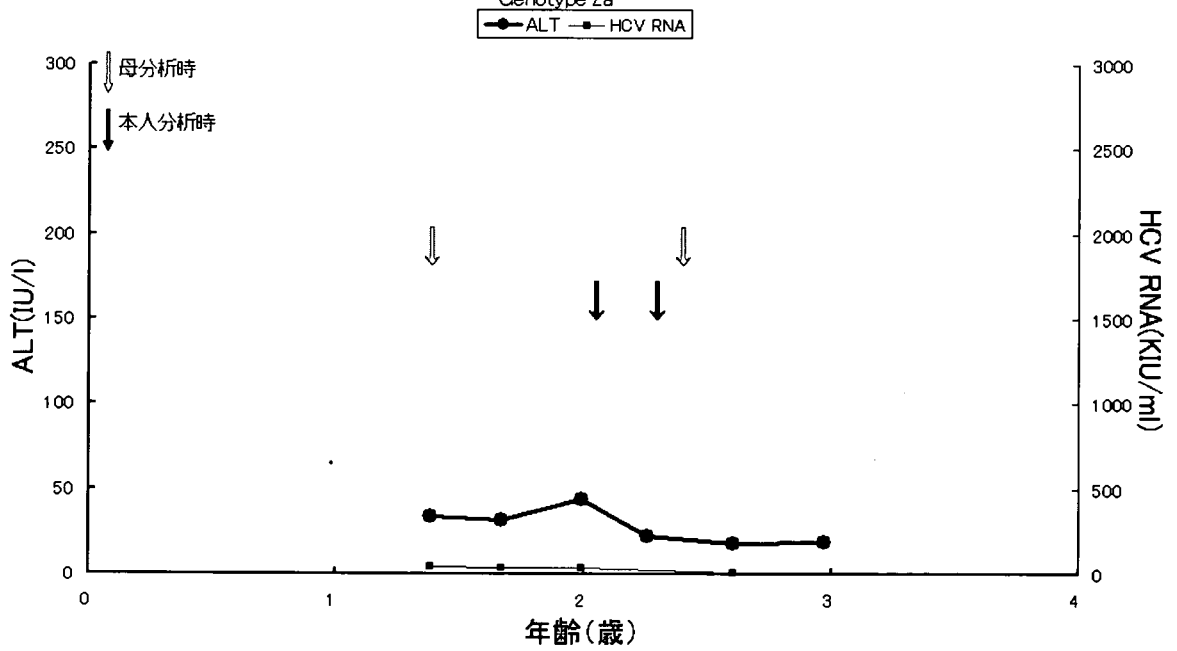
症例Dの経過  
Genotype 2a

Fig 9



症例Eの経過  
Genotype 2a

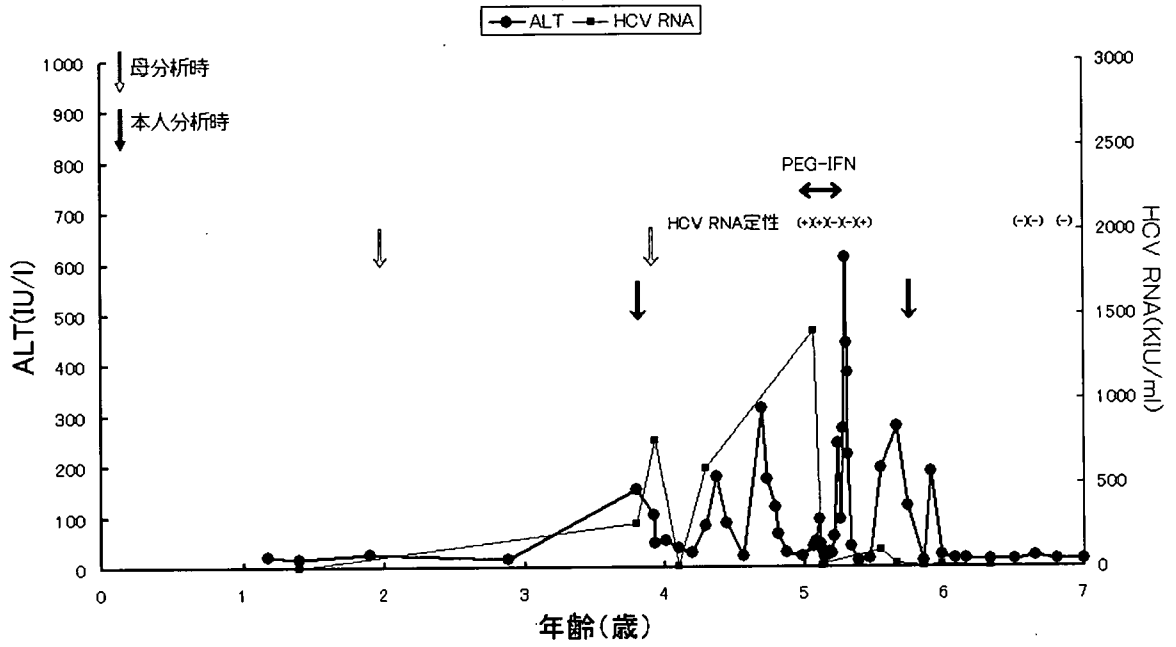
Fig 10





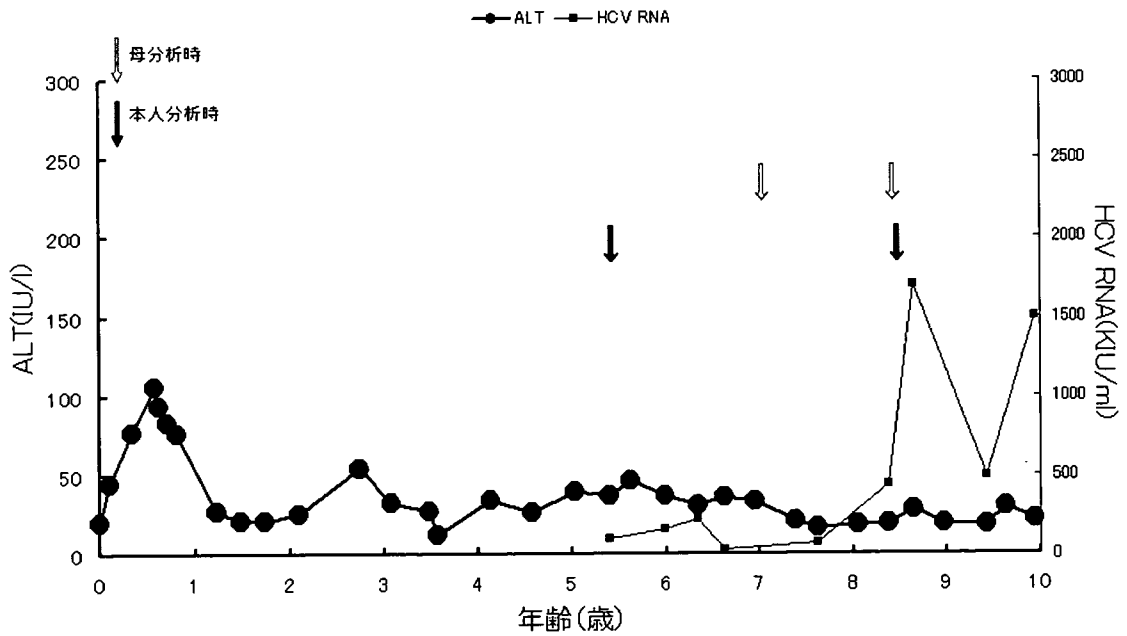
症例Fの経過  
Genotype 2a

Fig 11



症例Gの経過  
Genotype 2b

Fig 12



症例FのPEG-IFN治療後の経過

Fig 13

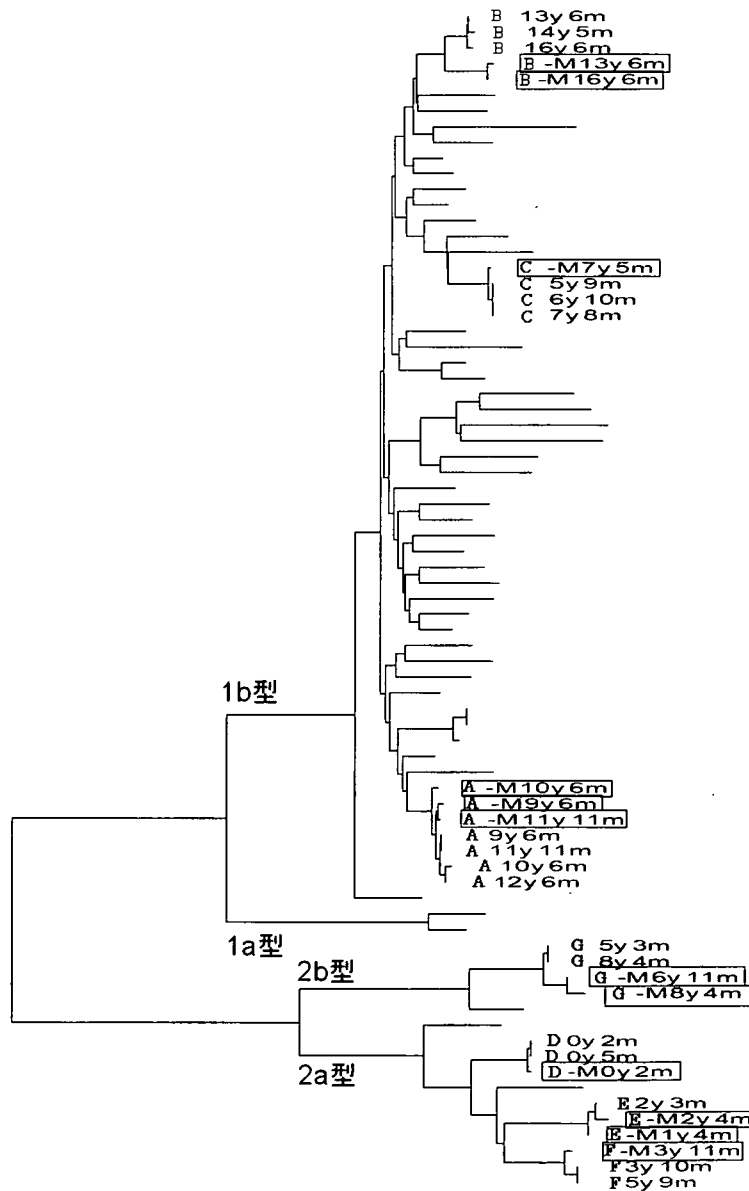
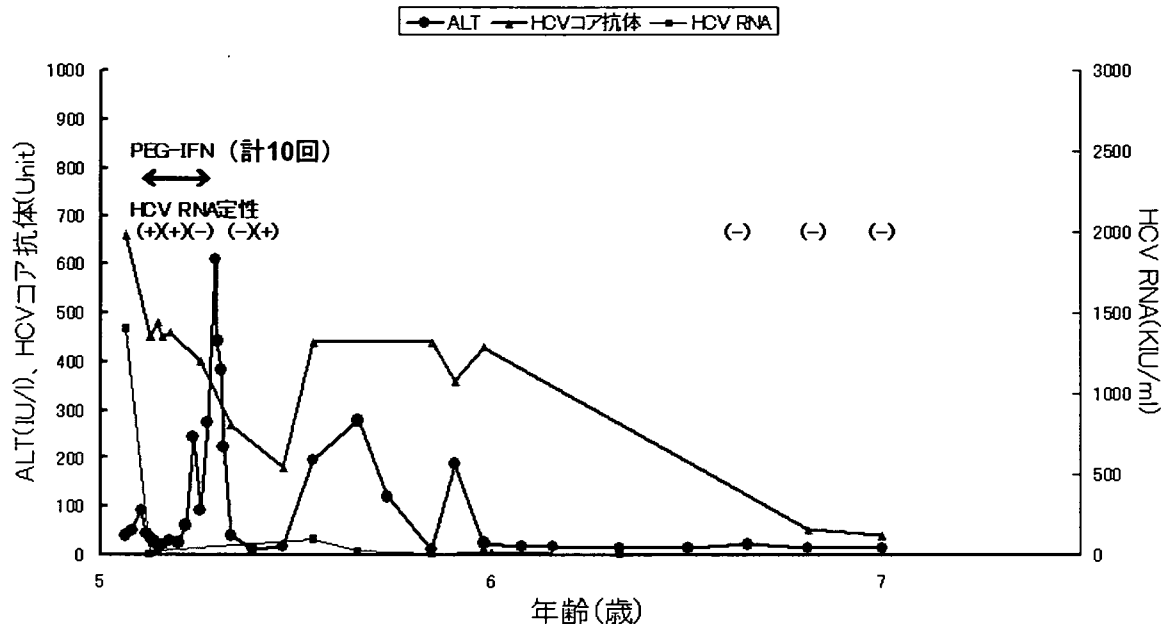


Fig 14

□内は母由来株

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」(H17-肝炎一般-008)

分担研究報告書

## 小児 B 型肝炎の診療ガイドライン作成

### 小児期・青年期の C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリンの併用療法

分担研究者 田尻 仁 大阪府立急性期・総合医療センター 小児科

研究協力者 恵谷 ゆり 大阪府立急性期・総合医療センター 小児科

研究協力者 清原由起 大阪大学大学院医学系小児科

#### 研究要旨

研究目的は、第 1 に小児 B 型肝炎の診療ガイドラインを作成することである。近年、小児科領域で経験される B 型肝炎は次第に減少し、若い小児科医には B 型肝炎の臨床経験が乏しいものが増えてきており、B 型肝炎診療についての指針が強く求められている。そこで一般小児科医が B 型肝炎患児の診療に当たって拠りどころとなることを目的として、B 型肝炎の研究・診療に経験豊富な人々からなるワーキンググループによって、現時点でのエビデンスに基づいてガイドラインを作成することになった。

第 2 の研究目的は、小児期・青年期の C 型慢性肝炎 16 例においてペグインターフェロンとリバビリンの併用療法を行っており、その成績を検討した。対象は、男児 7 名：女児 9 名、18 歳（10～21）、母子感染 5：輸血後 11。無効 1 例と副作用（強い倦怠感）1 例、計 2 例が治療を中断した。治療継続中が 6 例あり、8 例が予定の治療を終了した。終了後 6 ヶ月時に HCV RNA 定性法陰性（著効）が 7 例中 7 例であった。残りの 1 例は終了後 4 ヶ月時点で HCV RNA 定性法陰性である。対象 16 例の中で、予定の治療を終了した 8 例全例において HCV-RNA が陰性化しており、同療法は小児期・青年期の C 型慢性肝炎に対して有効であると考えられた。

#### 【研究1】小児 B 型肝炎の診療ガイドライン作成

##### A. ガイドライン作成に至った背景と目的

B型肝炎はかつては小児科臨床で日常的に見られる疾患であった。1970 年以降、輸血、血液製剤の B 型肝炎ウイルス(HBV)関連マーカー検査、医療器材のディスポ化などにより HBV の水平感染は減少し、更に 1985 年に厚生省(現在の厚生労働省)「B型肝炎母子感染

防止事業」が開始されると、母子感染による HBV キャリア発生は激減して 1995 年にはおおよそ 10 分の 1 にまで減少したと推算されている。これらの結果、近年、小児科領域で経験される B 型肝炎は次第に減少し、若い小児科医には B 型肝炎の臨床経験が乏しいものが増えてきている。しかしながら数は減っても依然として

小児のHBVキャリアは発生しているし、B型急性肝炎、B型慢性肝炎も時に見られ、これらに対する診療ガイドラインの必要性がむしろ強くなっており、B型肝炎診療についての指針が強く求められている。

## B. ガイドライン作成の経過

2005年10月7日 小児栄養消化器肝臓学会・運営委員会にて最初の案内

2005年11月5日 厚労省班会議、第1回ガイドライン作成会議(予定、分担等の確認)

2006年4月22日 日本小児科学会、第2回ガイドライン作成会議(第1案審議)

2006年7月1日 厚労省班会議、第3回ガイドライン作成会議(第1案改定案:第2案を報告)

2006年10月6日 小児栄養消化器肝臓学運営委員会にて経過報告

2006年10月7日 第4回ガイドライン作成会議(第2案改定案である第3案を審議)

2006年12月頃から 上記運営委員の間に第4案(第3案の改訂版)の持ち回り審議

2007年4月22日 小児栄養消化器肝臓学会・運営委員会にて最終案(第5案)紹介

2007年5月23日 日本小児科学会雑誌へ最終案を委員会報告として掲載依頼

2007年7月 日本小児科学会雑誌に掲載:  
111巻7号 Page 949-958

## C. ガイドラインの概要

ガイドラインの内容は、ウイルス学的診断、感染疫学、経過などに関する基本的知見のまとめと、現時点における治療の適応、薬剤、さらに感染予防、管理指導からなり、出来る限りエビデンスに基づいて記述した。前述のような理由からわが国における小児B型肝炎の治療に関する最近の論文は多くないので、一部は外国からの論文、成人領域からの報告を参考とした。

## D. 結語

本ガイドラインは、小児科医がB型肝炎の診療に当たってよりどころとなることを目標として、現在の時点での出来るだけエビデンスに基づいた指針を示すものであるが、B型肝炎に対する治療薬は日々開発されつつあり、今後、それらの新しい展開とともに改訂されるべきものとする。

## [研究2] 小児期・青年期のC型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリンの併用療法

### A. 研究の背景と目的

現在の成人C型慢性肝炎に対する治療は、ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリンの併用療法(PEG-Rib療法)が主流になっているが、小児・青年での報告は少ない。我々は、小児期・青年期の16例においてPEG-Rib療法

を行っているのでその経過を報告する。

### B. 研究方法

男児7名、女児9名。中央値18歳(範囲10~21)。母子感染5:輸血後11(表)。HCV genotype 1b 11名, 2a 4名, 不明1名。治療前のウイルス量は中央値2300 KIU/mL(範囲94