

HBs 抗体の in-vivo での
感染阻止能定量のための基礎実験
－HBIG 投与による受動免疫後のヒト肝細胞置換キメラマウスへの
既知量（感染価）の HBV による感染実験－

分担研究者 片山恵子¹⁾
研究協力者 田中純子¹⁾、田淵文子¹⁾、小宮裕¹⁾
柚木久雄²⁾、水井正明³⁾、丸山功⁴⁾、
島田卓⁴⁾、吉澤浩司¹⁾

- 1) 広島大学大学院 疫学・疾病制御学
- 2) 日赤中央血液研究所 核酸増幅検査部
- 3) 広島県赤十字血液センター
- 4) (株) フェニックスバイオ

研究要旨

HBs 抗体の in-vivo での感染阻止能を定量的に計測する基礎を確立することを目的として、(1) 既知の HBV 感染材料 (2) 抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG) (3) ヒト肝細胞非置換 SCID マウス (4) ヒト肝細胞置換キメラマウスの 4 者を用いた基礎的検討を含む感染実験を行い、以下の結果を得た。すなわち、

- 1) SCID マウスでは、受動免疫により上昇した末梢血中の HBs 抗体価の経時的減衰は、ヒト（半減期 2 週間）に比べて速いこと。
- 2) HBIG 50ul を 5 日間連続筋注し、これに加えて 8 週間目まで週 1 回の追加投与を行いつつ受動免疫を継続したヒト肝細胞置換キメラマウスでは、 10^5 コピー(10^5 MID) の HBV の感染を防御できていること。

なお、今後は、チャレンジする HBV 量を接種可能な最大量 (10^5 コピー) に固定し、HBIG による受動免疫の回数を減少させることにより、in-vivo での感染防御に必要な最少 HBs 抗体量を定めるための実験を行う予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染に感受性を有するヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験により、in-vivoでのHBs抗体のHBV感染阻止能を定量的に計測するための基礎を確立する。

B. 対象と方法

1) 実験動物

(1) ヒト肝細胞非置換 SCID マウス、計 22 匹、および

(2) ヒト肝細胞 (LotBD87) 置換キメラマウス (以下キメラマウスと略記する)、計 6 匹 (置換率 68.3%~82.6%、実験開始時の体重 13.4g~20.6g、♂4 匹、♀2 匹) を用いた。

2) 接種材料

チンパンジーを用いた感染実験により、あらかじめ性質が明らかとなっている (既知の) 感染材料を用いた^{1)~4)}。その由来、性質は下記の通りである。すなわち、

(1) ヒト (献血者) 由来の HBV 感染早期の新鮮凍結血漿 (FFP) 接種後 57 日目のチンパンジーの血清、

(2) HBV のジェノタイプ A、

(3) HBV DNA 量 2.6×10^6 コピー/ml、

(4) HBc 抗体陰性、

(5) チンパンジーに接種した場合の感染価、Chimpanzee Infectious Dose : CID= 10^1 コピー、

(6) キメラマウスに接種した場合の感染価 : Mouse Infectious Dose : MID= 10^{-1} コピー。

3) 抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG)

市販の HBIG (日赤製、Lot No.2B018、Lot No.2B019、Lot No.2B020、HBs 抗体価 200,000mIU/ml) を用いた。

4) HBIG 投与による受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の上昇

ヒト肝細胞非置換 SCID マウスを、

HBIG 1 回投与、2 回投与、3 回投与、5 回投与群の 4 群に分け、各群 3 匹ずつ、計 12 匹に HBIG を 50ul/回、後脚大腿部筋肉内に注射した。2 群、3 群、4 群には左右交互にそれぞれ目的とする回数だけ連日筋注し、それぞれの群ごとに筋注後 48 時間目に屠殺、全採血して、HBs 抗体価を同時測定した。

5) 受動免疫により上昇した末梢血中の HBs 抗体価の経時的減衰

HBIG 50ul/回、連続 5 日間計 5 回筋注することにより末梢血中の HBs 抗体価を上昇させたヒト肝細胞非置換 SCID マウス計 10 匹を、各群 2 匹ずつ 5 群に分け、受動免疫終了後 2 日、7 日、14 日、28 日、56 日目にそれぞれ屠殺、全採血して HBs 抗体価を同時測定した。

6) HBs 抗体価の測定

Microparticle EIA 法 (AxSYM[®]、アボットジャパン KK、東京) を用いて測定し、HBs 抗体価 (mIU/ml) を求めた。

7) 既知の接種材料をもととしたチャレンジ実験用感染材料の調製

上記 2) に記述した既知の接種材料を、ヒト肝細胞非置換 SCID マウスのプール血清を用いて $1:10^1 \sim 1:10^4$ まで 10^N 倍ずつ段階希釈し、各希釈サンプル中の HBV DNA 量を測定し、希釈が正しく行われていることを確認した。

8) HBV DNA 量の測定

Taq Man PCR[®] (ロシュダイアグノスティクス KK、東京) により測定し、HBV DNA 量 (コピー/ml) を求めた。

C. 結果

1) 受動免疫による末梢血中の HBs 抗体価の上昇

HBIG 1 回投与、2 回投与、3 回投与、5 回投与群までの末梢血中の HBs 抗体価は、1 回投与群では 2,248mIU/ml~3,645mIU/ml (平均値 2,920mIU/ml)、

2回投与群では同様に 4,098mlU/ml ~ 5,650mlU/ml (平均値 4,818mlU/ml)、3回投与群では 4,380mlU/ml ~ 6,238mlU/ml (平均値 5,399mlU/ml)、5回投与群では 7,005mlU/ml ~ 7,290mlU/ml (平均値 7,110mlU/ml) と上昇した。この結果は、1群、2群間での上昇率に比べて2群~3群、4群間では上昇率は鈍化することを示しているといえる (図-1)。

2) 受動免疫により上昇した末梢血中の

HBs抗体価の経時的減衰

末梢血中の HBs 抗体価は観察を開始した2日目~14日目までの10日間ではほぼ1/5にまで減少し、56日目(8週目)には検出限界以下にまで低下した(図-2)。

この結果は、SCIDマウスでは受動免疫により上昇した抗体の半減期はヒトにおける半減期(一般に約2週間とされている)に比べて短いことを示しているといえる。

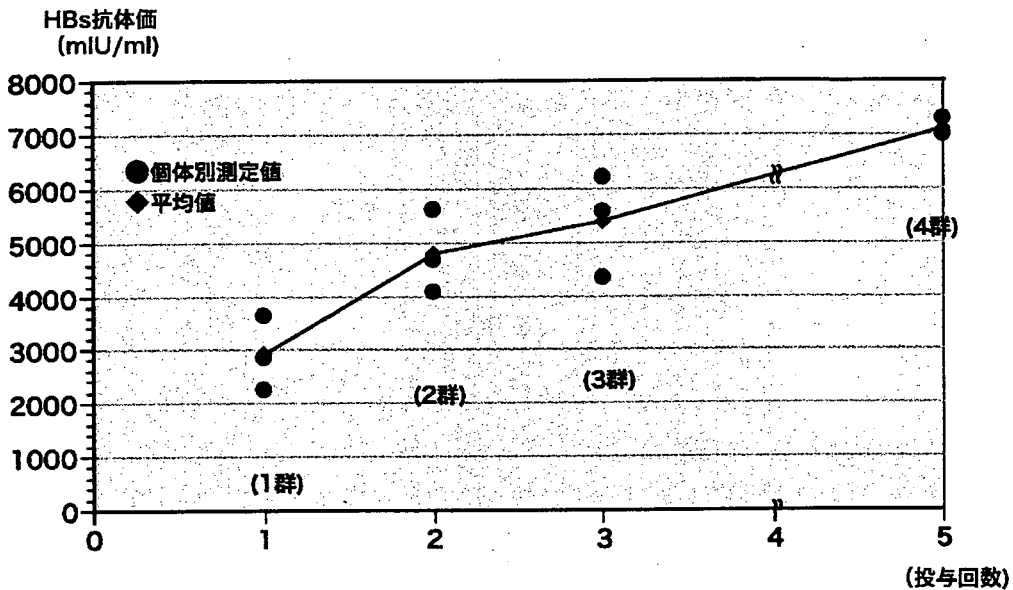


図-1. HBIGの投与回数と末梢血中のHBs抗体価の上昇

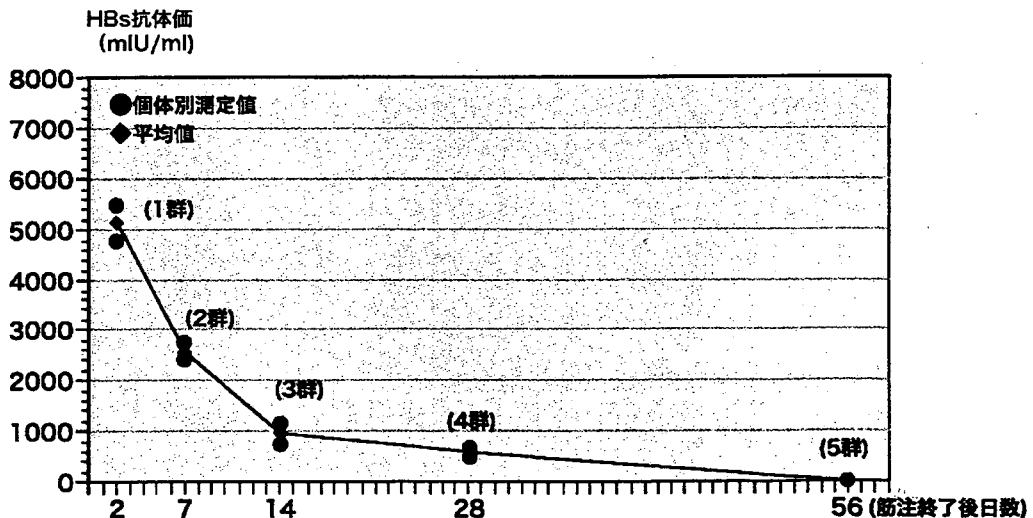


図-2. 受動免疫により上昇した末梢血中のHBs抗体価の経時的減衰

3) 既知の接種材料をもととした感染材料の調製

接種材料 (チンパンジー由来の原血清) を SCID マウスのプール血清により 1:10¹、1:10²、1:10³、1:10⁴ 倍に希釈したサンプル中の HBV DNA 量の測定結果は表-1 に示した通りであり、正しく希釈が行われていることが確認された (表-1)。

4) 実験に用いたキメラマウスと接種 HBV (DNA) 量

キメラマウスを 3 群に分け、各群 2 匹ずつにそれぞれ 10¹ コピー、10³ コピー、10⁵ コピーの HBV を接種した。

実験に用いたそれぞれの群のキメラマ

ウスの性、(実験開始時の) 体重、ヒト肝細胞の Lot、置換率は表-2 に示した通りである。

5) 受動免疫後のキメラマウスに対する既知量 (感染価) の HBV のチャレンジとその転帰

HBIG 50ul を 5 日間連日筋注した後、HBV 量を接種 (チャレンジ) し、接種後 8 週目まで毎週 1 回の頻度で HBIG 50ul ずつを追加筋注しつつ経過を観察した。

その結果、最大量 10⁵ コピー (10⁵MID) の HBV をチャレンジした群まで、3 群、計 6 匹全てのキメラマウスで HBV の感染は阻止されていた (図-3)。

表-1. 同種マウスのプール血清による 10^N倍段階希釈と各サンプル中の HBV DNA 量の測定

	接種材料 (原血清)	10 ^N 倍段階希釈			
		1:10 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴
HBV DNA コピー/ml	2.6×10 ⁶	2.5×10 ⁵	2.1×10 ⁴	2.8×10 ³	4.8×10 ²

既知の接種材料: HBV感染早期のヒト由来FFP接種後
57日目のチンパンジー血清
HBVジェノタイプ A
HBV DNA 2.6×10⁶コピー/ml
HBc抗体 陰性
チンパンジー感染価 (1CID): ~10¹コピー
キメラマウス感染価 (1MID): ~1コピー

表-2. 実験に用いたヒト肝細胞置換キメラマウス

接種チャレンジ HBV量 [絶対量]	マウスNo.	性	体重(g)	ヒト肝細胞 のLot No.	ヒト肝細胞 置換率(%)
1群 [10 ¹ コピー] 10 ¹ MID相当	1	♂	16.1	BD87	81.6
	2	♂	20.6	BD87	75.3
2群 [10 ³ コピー] 10 ³ MID相当	3	♀	13.4	BD87	71.8
	4	♀	15.5	BD87	68.3
3群 [10 ⁵ コピー] 10 ⁵ MID相当	5	♂	16.3	BD87	82.6
	6	♂	18.3	BD87	78.5

MID : (Chimera) Mouse Infectious Dose
HBV DNA : Taq Man PCRにより測定

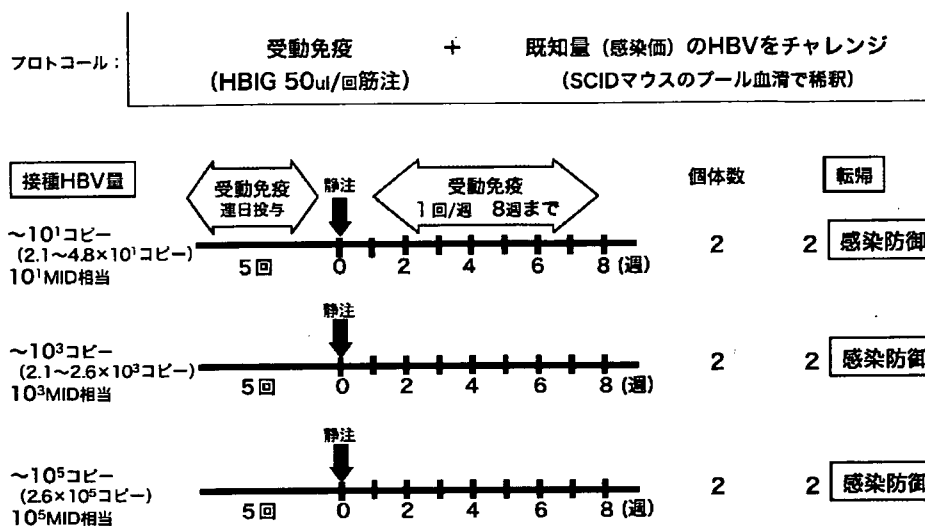


図-3. 受動免疫後のキメラマウスに対する既知量(感染価)のHBVのチャレンジとその転帰

D. 結論

受動免疫により付与した HBs 抗体の in-vivo での感染阻止能を定量するための基礎実験を行い、以下の結果を得た。

1. SCID マウスでは、受動免疫により上昇した末梢血中の HBs 抗体価の経時的減衰は、ヒト (半減期 2 週間) に比べて速いこと。
2. HBIG 50ul を 5 日間連日筋注し、これに加えて 8 週間目まで週 1 回の追加投与を行いつつ受動免疫を継続したヒト肝細胞置換キメラマウスでは、10⁵ コピー (10⁵MID) の HBV の感染を防御できていること。

今後、チャレンジする HBV 量を 10⁵ コピーに固定し、HBIG による受動免疫の回数を減少させることにより、感染防御に必要な最少 HBs 抗体量を定めるための実験を行う予定である。

E. 文献

- 1) 吉澤浩司 他
 感染成立に必要な最少 HBV 量 (コピー/ml) の決定
 「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

報告書 pp93-96

- 2) 吉澤浩司 他

ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた肝炎ウイルス (HBV、HCV) の感染実験
 - チンパンジーの代替実験動物としての有用性の検証 -

「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 17 年度報告書 pp87-90

- 3) 吉澤浩司 他

ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV の感染実験
 - チンパンジーの代替感染実験系としての有効性と、定量的感染実験系としての応用 -

「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 18 年度報告書 pp97-102

- 4) Komiya Y, Katayama K, Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H.

Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of

viremia between genotype A and genotype C. Transfusion, 2008; 48:286-294

F. 研究発表

1. Komiya Y, Katayama K, Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H.

Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. Transfusion, 2008; 48:286-294

G. 知的所有権の取得状況

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）

H19年度分担研究報告書

「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」に関する研究

分担研究者 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 教授
研究協力者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 准教授
日下部篤宣 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器代謝内科学 大学院生
坂本 知行 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器代謝内科学 大学院生

研究要旨

近年 HB ワクチンに対する HB ワクチンエスケープミュータント（エスケープミュータント）の出現とその増加が問題となっている。本研究では本邦におけるエスケープミュータントの出現率を急性 B 型肝炎 58 例について塩基配列を決定し、アミノ酸配列を比較・検討したところ、感染初期には少ないが anti-HBs が陽性になる後期にかけて増加していた。このことは HB ワクチンの防御効果を減少させる可能性が考えられ、今後はこれらの変異株の感染力や現行の HB ワクチンのこれらの変異株に対する感染阻止力について検討する必要があることを示唆していると思われた。

A. 研究目的

HB ワクチンエスケープミュータント（エスケープミュータント）の出現とその増加が問題となっているので、本邦におけるエスケープミュータントの出現率とその変異株の状態について急性 B 型肝炎例を使用して検討した。

B. 対象と方法

対象は全国 18 施設で診断された劇症肝炎（FH）、急性重症肝炎（ASH）を含む急性 B 型肝炎患者 58 例である。この 58 例を HBsAg、anti-HBs の状態により、以下の 4 群に分類した。

A 群として HBsAg 陽性且つ anti-HBs 陽性例 23 例、B 群として HBsAg 陰性且つ anti-HBs 陽性例 5 例、C 群として HBsAg 陰性且つ anti-HBs 陰性例 7 例、また D 群とし

て HBsAg 陽性、anti-HBs 陰例 23 例を使用した。

方法：

上記急性 B 型肝炎患者 58 例の保存血清 100 μ l から QIAamp DNA extraction kit を用いて HBVDNA を抽出し、以前我々が報告した primer set を用いた heminested PCR 法（ first-round PCR; nt18-989, second-round PCR; nt414-989）によって S 遺伝子領域の HBVDNA を増幅した。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）。

この塩基配列から決定した 58 症例の HBV S 領域アミノ酸配列に対して CLUSTAL X を

使用して multiple alignment を実施した後、HBs 抗原の共通抗原基 alfa-loop 領域のアミノ酸変異の有無を比較検討した。

(倫理面への配慮)

この研究に参加した 18 施設は全例各施設の倫理委員会の承認を得ている。また、被験者からは全員 informed consent を取得した。

C. 研究結果

まず、4 群の患者背景を表 1 に、a 領域の変異株数のまとめを表 2 に示す。

全症例 58 例中、alfa-loop 領域に過去に報告されているワクチンエスケープ変異株としての変異(EM)、あるいは EM 変異株としての報告はないがアミノ酸の性質変化(疎水性、親水性、酸性、塩基性)を伴う変異(UM)を認めた症例は 8 例(13.8%)であった。このうち、これまでにエスケープ変異株として報告されている変異は、T/I126S/N 4 例(6.9%)、G130N 1 例(1.7%) (126 変異との重複変異症例)であった。

これを各グループ別に検討すると、A 群は 4 例(17%)で EM (126S/N) 2 例(8.7%)、UM 2 例(8.7%)であった。B 群は 1 例(20%)で EM (126S/N and 130N) 1 例(20%)、UM 1 例(左記 EM 症例と同一症例)1 例であった。C 群では 2 例(28.6%)で EM (126S/N) 1 例(14.3%)、UM 1 例(14.3%)であったが、コントロールである D 群では EM は認めず、UM 1 例(4.3%)のみであった。

さらに 4 群を anti-HBs 陽性あるいは HBsAg 陰性である A-C 群(35 例)とコントロール群である D 群(23 例)の 2 群に分類して検討すると、A-C 群では 7 例(20%) ; EM4

例(11.4%)、UM3 例(8.6%)に変異を認めたが、D 群では UM 1 例(4.3%)を認めたのみであり、anti-HBs 陽性あるいは HBsAg 陰性の急性 B 型肝炎では alfa-loop 領域のアミノ酸変異が高率であることを認めた。

D. 考察

現在本邦では HB ワクチンは母親をスクリーニングする選択的投与が行われているが世界的には universal vaccination が主流である。しかしながら、universal vaccination を施行している国々では近年 HB ワクチンに対する B ワクチンエスケープミュータント(エスケープミュータント)の出現とその増加が問題となっている(1)。また、わが国でも前もって anti-HBs 陽性が確認されている症例が急性 B 型肝炎に感染し典型的エスケープミュータントであったことが報告されている(2)。

そこで、本研究では本邦におけるエスケープミュータントに対する検討をおこなった。エスケープミュータントは HBV DNA の S 遺伝子領域の alfa-loop 構造をとる領域のアミノ酸変異によるとされている(1)。このために今回全国 18 施設から集めた急性 B 型肝炎症例 58 例を解析対象とし、S 遺伝子領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列の変異を検討した。何故なら急性 B 型肝炎は、感染初期は HBsAg 陽性且つ anti-HBs 陽性、感染中期は HBsAg 陰性且つ anti-HBs 陰性、感染後期は HBsAg 陰性且つ anti-HBs 陽性となり、さらに全ての経過で HBVDNA は陽性となるため、これらの経過中のアミノ酸配列の変化が明らかになるからである。その結果、典型的エスケープミュータントである S 遺伝子領域の alfa-loop 構造の 145

番目がアルギニンに変異する 145R は認めなかったが、126 番目やまだ報告されていないアミノ酸変異が予想したように感染初期には少ないが、anti-HBs が陽性になる後期にかけて増加していた。このことは HB ワクチンの防御効果を減少させる可能性が考えられる。そこで、今後はこれらの変異株の感染力値や現行の HB ワクチンのこれらの変異株に対する感染阻止力について検討する必要があるが、従来 HBV の感染実験はチンパンジーなどの大型類人猿を使用するしかなかった。

現在、我々は HBV をクローン化し Huh7 細胞に transfection する系を確立した(3,4)。またさらにヒト肝細胞を不死化して 3次元で培養すると最低一ヶ月は培養可能であることを見出した(5)。そこで、来年度は、典型的エスケープミュータントである 145R や 126S/N と今回発見した alfa-loop 領域のアミノ酸配列を変化させた HBV クローンを各種作成し、まず Huh7 細胞に transfection しその後 3次元ヒト肝細胞培養に感染させることで感染力値を測定し、現行の HB ワクチンで作成した抗体で感染阻止力値を測定したいと考えている。

E. 結語

急性 B 型肝炎患者から現在 HB ワクチンに使用している alfa-loop 変異株の変異株を認めた。しかも anti-HBs 陽性あるいは HBsAg 陰性の急性 B 型肝炎では臨床経過につれ増加していた。このことは alfa-loop 領域のアミノ酸変異が起りやすいことを示しており、今後さらなる検討が必要であると思われる。

文献

- 1) Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat.* 1997;4 Suppl 1:11-20.
- 2) Kajiwara E, Tanaka Y, Mizokami M. A case of the hepatitis B caused by a hepatitis B surface escape mutant. *J Gastroenterol*, in press
- 3) Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M. et al, Early dynamics of hepatitis B virus in chimeric mice carrying human hepatocytes monoinfected or coinfecting with genotype G. *Hepatology.* 2007 Apr;45(4):929-37.
- 4) Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology.* 2006 Oct;44(4):915-24.
- 5) Tanaka Y, Sugauchi F, Mizokami M, et al, 投稿中

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表予定

坂本 知之、日下部 篤宣、田中 靖人、溝上 雅史. ワークショップ B 型肝炎ウイルスワクチンの今日的課題. 「B 型急性患者における HBs 抗体エスケープ変異株の発生頻度とその対策」. 第 44 回日本肝臓病学会総会. 2008 年. 愛媛

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用実案新案 なし

3. その他

表 1.4 群間の患者背景

	平均年齢	男女比	病態
<u>A 群 (23 例) : HBsAg(+), anti-HBs(+)</u>	42.1	16:7	AH:13, ASH:2, FH:8
<u>B 群 (5 例) : HBsAg(-), anti-HBs(+)</u>	38.2	4:1	AH:2, ASH:3
<u>C 群 (7 例) : HBsAg(-), anti-HBs(-)</u>	40.4	4:3	AH:6, ASH:1
<u>D 群 (23 例) : HBsAg(+), anti-HBs(-)</u>	39.0	16:7	AH:23

AH:急性 B 型肝炎、ASH:急性 B 型肝炎重症型、FH:B 型劇症肝炎

表 2.4 群間の HBs 抗原共通抗原基 a 領域における変異株数

	全変異株数 (EM+UM)	エスケープ変異株数 (EM)	異性質アミノ酸変異株数 (UM)
<u>A 群 (23 例) : HBsAg(+), anti-HBs(+)</u>	4 例 (17.4%)	2 例 (8.7%)	2 例 (8.7%)
		[126S:1 例、126N:1 例]	[127H:1 例、127T+134Y:1 例]
<u>B 群 (5 例) : HBsAg(-), anti-HBs(+)</u>	1 例 (20%)	1 例 (20%)	1 例 (20%)
		[126S+129L+130N:1 例]	[126S+129L+130N : 1 例]
<u>C 群 (7 例) : HBsAg(-), anti-HBs(-)</u>	2 例 (28.6%)	1 例 (14.3%)	1 例 (14.3%)
		[126S:1 例]	[120S:1 例]
<u>D 群 (23 例) : HBsAg(+), anti-HBs(-)</u>	1 例 (4.3%)	0 例	1 例 (4.3%)
		(コントロール群)	[145A:1 例]

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小高千加子	抗HBs人免疫グロブリン、乾燥抗HBs人免疫グロブリン、ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン、乾燥ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン	渡辺治雄	生物学的製剤 基準2007年版	じほう	東京	2007	211-216

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kajiwara E, Tanaka Y, Oohashi T, Uchimura K, Sadoshima S, Kinjo M, Mizokami M.	A case of the hepatitis B caused by a hepatitis B surface escape mutant.	J Gastroenterol. (in press)			
Komiya Y, <u>Katayama K</u> , Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakaya Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H.	Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C.	Transfusion	48	286-294	2008
水落利明、 <u>小高千加子</u> 、山口一成	国内で販売されている抗HBs抗体定量用体外診断用医薬品の評価：国内標準品を用いた検討	臨床検査	52	111-115	2008

抗 HBs 人免疫グロブリン

概 説

【疾患について】 B型肝炎（Hepatitis B）は、ウイルス肝炎の一種であるB型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus：HBV）の感染によって起こる。HBVは主として感染しているヒトの血液を介して感染する。また感染している血液が混入したヒトの体液などを介して感染することがある。

HBVの一過性感染を受けた人の多くは自覚症状がないまま治癒し（不顕性の感染）、一部の人急性肝炎を発症する（顕性感染）。また急性肝炎を発症した場合、まれに劇症化することがある。HBVの持続感染者（HBVキャリア）のうち約10～15%が慢性肝炎を発症する（慢性B型肝炎）。慢性B型肝炎を発症した場合、放置すると、気がつかないうちに肝硬変、肝がんへ進展することがあるので注意が必要である。

【疾患の動向】 B型肝炎ウイルスに感染しても、時間の経過とともに自然に体内から排除される例もしばしば見受けられる。一方、ウイルスが排除されずにキャリアとなる例があるが、これは、出生時や乳幼児期に感染した場合が多いとされており、わが国には120～140万人のキャリアがいると推定されている。B型肝炎ウイルスのキャリアの率は、40歳代以上では、どの年代でも人口の1～2%であり大きな差はないが、30歳代以下では、1%未満と少なく、特に制度として母子感染対策を開始した1986年以降に生まれた世代での新たなキャリアの発生は少ない。

【製剤について】 抗HBs人免疫グロブリンは、HBs抗原陽性血液の汚染事故後のB型肝炎や新生児のB型肝炎の発症予防を目的として開発された特殊免疫グロブリン製剤である。

B型肝炎（Hepatitis B）と免疫グロブリン（Immunoglobulin）のそれぞれの略語をつらねてHBIGと略称されることがある。当初は液剤の本剤のみであったが、のちに乾燥製剤である「乾燥抗HBs人免疫グロブリン」も承認された。

また、現在の製造工程ではヒトパルボウイルスB19等のウイルスを完全に不活化・除去することは困難であり、感染症伝播の危険性を完全に排除することはできない。

【適応症】

1. HBs抗原陽性血液汚染事故後のB型肝炎発症予防

汚染血中のB型肝炎ウイルス（HBV）は肝細胞で増殖するが、早期（48時間以内、遅くとも1週間以内）に本剤を投与すると、血中HBVは肝細胞に取り込まれる前に抗HBs抗体で中和処理される。

2. HBs抗原陽性の母親から生まれた新生児のB型肝炎予防（原則として、沈降B型肝炎ワクチンとの併用）。

用法：筋肉内注射のみに使用すること。決して、静脈内には注射してはならない。

今回の改正のポイント

1. 「適応症」の記述を変更修正。
2. 2.1 原血漿の一部記述の変更。
3. 2.3 最終バルク及び小分について変更修正。
4. 3.8 力価試験について変更修正。

解 説

2 製法：2.1 原血漿

血液製剤総則3により、HBs 抗原陽性の血液は血液製剤の原材料として使用してはならないと規定されている。HBs 抗原には4つのサブタイプ (adw, adr, ayw, ayr) があることが知られている。このサブタイプの分布は地域によって異なっているが、現在わが国では adw, adr がほとんどを占めている。抗 HBs 人免疫グロブリンには、どのタイプにも感染防御に重要な共通抗原 a に対する抗体が含まれているので、他のサブタイプの HB ウイルス感染に対しても予防効果があると考えられている。

2.3 最終バルク及び小分

原画分に安定剤、等張化剤などを含む液を加えて、最終バルクを作り、分注する。この際、1 mL 中の抗 HBs 抗体価を 200 単位以上になるようにする (3.8 力価試験の項参照)。製剤中のたん白質濃度についての規定はない。適当な保存剤を用いることができる。保存剤の規定は人免疫グロブリンと同じである (「人免疫グロブリン」2.3 最終バルク及び小分の項 (p 191) 参照)。

3 小分製品の試験

保存剤を使用しない場合は、3.2を除く。

3.8 力価試験

一般試験法 A 「抗 HBs 抗体価測定法」(p 251) 参照。

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：小高 千加子]

乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン

概 説

前述の抗 HBs 人免疫グロブリン（液剤）の凍結乾燥製剤である本剤は、保存剤を加えることなく製造でき、しかも有効期間が液剤の2年に対して本剤では5年と長く、長期間保存可能な製剤である。その他の点は、「抗 HBs 人免疫グロブリン」（p 211）を参照。

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：小高 千加子]

ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリン

概 説

ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリンは、静注用の製剤である。

また、現在の製造工程ではヒトパルボウイルス B 19 等のウイルスを完全に不活化・除去することは困難であり、感染症伝播の危険性を完全に排除することはできない。

【適応症】 HBs 抗原陽性血液汚染事故後の B 型肝炎発症予防。

用法：本剤は直接静注するか、又は日本薬局方生理食塩液など中性に近い補液に混じて、点滴注射する。直接静注する場合は、極めて徐々に行う。

今回の改正のポイント

1. 「適応症」について記載。
2. 2.2 原画分について記載。
3. 2.3 最終バルク及び小分について記載。
4. 3.3 免疫グロブリン G 重合物否定試験について記載。
5. 3.8 力価試験について記載。

解 説

1 本質及び性状

本剤は、ヒトのポリエチレングリコール処理免疫グロブリン G 中の「抗 HBs 抗体」を含む液剤である。

2 製法：2.1 原血漿

「抗 HBs 人免疫グロブリン」2.1 項 (p 212) 参照。

2.2 原画分

免疫抗体を変質させることなく、更に肝炎ウイルスその他の病原微生物を除去できる方法によって原血漿を画分し、免疫グロブリン G 画分を集める。得られた画分を更にポリエチレングリコールを用いて分画し、静注可能な原画分とする。

2.3 最終バルク及び小分

「人免疫グロブリン」2.3 項 (p 191) 参照。この際、1 mL 中の抗 HBs 抗体価を 200 単位以上になるようにする（一般試験法 A 「抗 HBs 抗体価測定法」(p 251) 参照）。

3 小分製品の試験：3.3 免疫グロブリン G 重合物否定試験

「ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン」3.3 項参照。

3.8 力価試験

一般試験法 A 「抗 HBs 抗体価測定法」(p 251) 参照.

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：小高 千加子]

乾燥ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン

概 説

本剤は、ヒトのポリエチレングリコール処理免疫グロブリンG中の「抗HBs抗体」を含む乾燥製剤であり、前述の「ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン」の解説を参照されたい。

過去10年に遡って、製剤として製造されていない。

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：小高 千加子]

Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C

Yutaka Komiya, Keiko Katayama, Hisao Yugi, Masaaki Mizui, Harumichi Matsukura, Tetsushi Tomoguri, Yuzo Miyakawa, Ayako Tabuchi, Junko Tanaka, and Hiroshi Yoshizawa

BACKGROUND: In planning optimal hepatitis B virus (HBV) blood screening strategies, the minimum infectious dose and early dynamics of HBV need to be determined for defining the window period for HBV DNA as well as for hepatitis B surface antigen (HBsAg).

STUDY DESIGN AND METHODS: Pairs of chimpanzees were inoculated with preacute-phase inocula containing HBV of genotype A or genotype C to determine the minimum infectious dose, and two pairs of chimps infected with the lowest infectious dose of genotypes A and C were followed for HBV markers.

RESULTS: The minimum 50 percent chimpanzee infectious dose (CID₅₀) was estimated to be approximately 10 copies for genotype A and for genotype C. In the two chimps inoculated with the lowest infectious dose, the HBV DNA window was 55 to 76 days for genotype A and 35 to 50 days for genotype C, respectively. The HBsAg window was 69 to 97 days for genotype A and 50 to 64 days for genotype C, respectively. The doubling times of HBV DNA were 3.4 days (95% confidence interval [CI], 2.6-4.9 days) for genotype A and 1.9 days (95% CI, 1.6-2.3 days) for genotype C. When comparing the replication velocity of HBV DNA between the two genotypes, the doubling time of genotype C was significantly shorter than that of HBV genotype A ($p < 0.01$).

CONCLUSION: Although the CID₅₀ of approximately 10 copies was similar for the two HBV genotypes, the doubling time and pre-HBV nucleic acid amplification technology (<100 copies/mL) window period in chimps infected with the lowest infectious dose seemed to be shorter for genotype C than for genotype A.

Posttransfusion infection with hepatitis B virus (HBV) has decreased dramatically since screening for hepatitis B surface antigen (HBsAg) was introduced in the early 1970s. The number of reported posttransfusion hepatitis B cases has been further reduced after screening for antibody to HBV core (anti-HBc) was implemented in the late 1980s in the United States and Japan.^{1,2} Japan introduced HBV DNA screening by nucleic acid amplification technology (NAT) in minipools (MPs) in 1999. Since introduction of MP-NAT, more than 500 seronegative donations with detectable HBV DNA have been interdicted, although there are still units of blood in an early or late phase of HBV infection

ABBREVIATIONS: CID₅₀ = 50 percent chimpanzee infectious dose; CLIA = chemiluminescent immunoassay; JRC = Japanese Red Cross; MP(s) = minipool(s).

From the Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima; Primate Park, Sanwa Kagaku Kenkyusho, Ltd, Kumamoto; the Department of NAT, Central Blood Institute, Japanese Red Cross Society, Tokyo; the Department of Laboratory Medicine, Japanese Red Cross Hiroshima Blood Center, Hiroshima; the Department of Research and Development of Reagents, Japanese Red Cross Osaka Blood Center, Osaka; and the Miyakawa Memorial Research Foundation, Tokyo, Japan.

Address reprint requests to: Hiroshi Yoshizawa, MD, Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Minami-Ku, Hiroshima 734-8551, Japan; e-mail: eidcp@hiroshima-u.ac.jp.

This work was supported in part by grants from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

Received for publication May 7, 2007; revision received July 30, 2007, and accepted August 2, 2007.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01522.x

TRANSFUSION **,**,**_**.

with low viral load that can escape detection by NAT.³ Interestingly, the lookback program of the Japanese Red Cross (JRC) demonstrated that low viral load donations in the window phase were more than 10-fold more often implicated in HBV transmission reports than were occult carriers with anti-HBc titers below the exclusion limit of the anti-HBc hemagglutination inhibition screening assay.³ Bearing in mind the relatively high infectivity of HBV in the window phase, exact knowledge on early dynamics of HBV replication is important for residual risk estimations.⁴⁻⁷ It will determine the threshold of NAT in identifying blood donors during the preacute phase of HBV infection, which is important for planning and executing evidence-based hepatitis B blood screening strategies.^{7,8} In this context, the relative infectivity of HBV in the early window phase is an important factor for measuring the effect of NAT screening systems on the residual risk of HBV transmission by blood transfusion.^{7,9}

Chimpanzees are the only experimental animals susceptible to human hepatitis viruses and have been very useful in transmission studies.¹⁰ As early as the mid-1970s, it was demonstrated that blood units from HBV carriers, especially those positive for the presence of hepatitis B e antigen (HBeAg), have a tremendously high infectious potential and can transmit infection to chimps by intravenous inoculation with 1 mL of plasma diluted to 1:10⁸.¹¹ Now that NAT enables detection of HBV DNA in blood donors even in individual-donation format, it can be estimated by mathematical modeling what the residual risk would be depending on the minimum copy number required for infection.⁹ More conservative risk modeling assumes that a single copy of HBV, if it successfully reaches a hepatocyte in susceptible hosts, may be enough to establish infection.⁵ To pursue strategies for preventing HBV infections by blood transfusions, additional information on the infectivity of HBV is crucially required. It is imperative to define not only the minimum copy number of HBV DNA or number of virions required for transmission of HBV, but also the early dynamics of HBV replication in the circulation of infected hosts. This can be established more accurately in chimpanzee experiments. In this report on experimental transmission of hepatitis B in chimps, the minimum infectious dose was determined separately for HBV of genotypes A and C, and the copy number of HBV DNA for establishing infection was defined for each of them. Moreover, the doubling time and logarithmic time of HBV DNA were determined by following the viral dynamics in the preacute phase of chimpanzees who had received the minimum infectious dose of HBV.

MATERIALS AND METHODS

Chimpanzees

Six chimps entered this study. Their age, sex, and weight, as well as the HBV inocula that they received are listed in Table 1 along with the infection outcome. Every chimp was kept in an individual cage and received humane care in accordance with all relevant requirements for the use of primates in an approved institution. None of the six chimps had serologic or molecular biologic evidence of past or present HBV infection prior to the inoculation. They were also not infected with hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus type-1. Chimps were inoculated intravenously while they were under anesthesia by intramuscular injection with ketamine hydrochloride. After the inoculation, serum samples were obtained once a week or more frequently as required, until 16 weeks or longer. They were tested for HBV DNA, HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, and alanine aminotransferase as well as aspartate aminotransferase.

Inocula containing HBV

The chimpanzees received four kinds of inocula (Table 1). Inocula I and III were fresh-frozen plasma (FFP) units from blood donors acutely infected with HBV genotypes A and C, respectively. Inocula II and IV were plasma samples from chimps infected with inoculum I of genotype A and inoculum III of genotype C, respectively (see Figs. 1A and 1B). Inocula II and IV were: 1) recovered in the preacute phase of HBV infection before immune responses of the host had developed; 2) positive for the presence of HBV DNA in the highest titer before anti-HBc developed; and 3) taken with utmost care to maintain the infectious activity and avoid attenuation during serial processing from blood collection until storage. Immediately after blood drawing

TABLE 1. Six chimpanzees and HBV inocula and HBV infection outcomes

Chimpanzee	Age, sex, weight	HBV DNA copies	Outcome
Inoculum I: FFP from a human donor in the preacute phase of HBV infection of genotype A			
1 Chimp 246	13 years, male, 60.7 kg	1 mL (6.9 × 10 ⁴ copies/mL)	Infected
Inoculum II: Preacute-phase plasma of Chimp 246 containing HBV (2.6 × 10 ⁶ copies/mL)			
2 Chimp 272	9 years, male, 58.7 kg	1 mL (1:10 ⁶ dilution)	Not infected
3 Chimp 279	8 years, male, 51.4 kg	1 mL (1:10 ⁶ dilution)	Not infected
3 Chimp 279	Reinoculation	1 mL (1:10 ⁵ dilution)	Infected
4 Chimp 280	8 years, male, 39.4 kg	1 mL (1:10 ⁵ dilution)	Infected
Inoculum III: FFP from a human donor in the preacute phase of HBV infection of genotype C			
2 Chimp 272	Reinoculation	5 mL (5.3 × 10 ⁵ copies/mL)	Infected
Inoculum IV: Preacute-phase plasma of Chimp-272 containing HBV (3.0 × 10 ⁶ copies/mL)			
5 Chimp 269	11 years, male, 62.5 kg	1 mL (1:10 ⁶ dilution)	Not infected
6 Chimp 285	7 years, male, 41.1 kg	1 mL (1:10 ⁶ dilution)	Not infected
5 Chimp 269	Reinoculation	1 mL (1:10 ⁵ dilution)	Infected
6 Chimp 285	Reinoculation	1 mL (1:10 ⁵ dilution)	Infected