

表2. Genotype 別 HBV DNA 陽性例数

~2007.12.31

年齢	Genotype													
	A		B		C		D		E		H		計	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
10代	4		1	5	19	41	1						25	46
20代	68	1	19	18	121	105	1	3		1			209	128
30代	41	2	14	4	78	43	2				1		136	49
40代	11		15	3	35	12		1			1		64	16
50代	5		19	5	34	15	1				1		60	20
60代			8	3	28	5							36	8
計	131	3	76	38	315	221	5	4	0	1	3	0	530	267
	134		114		536		9		1		3		797	

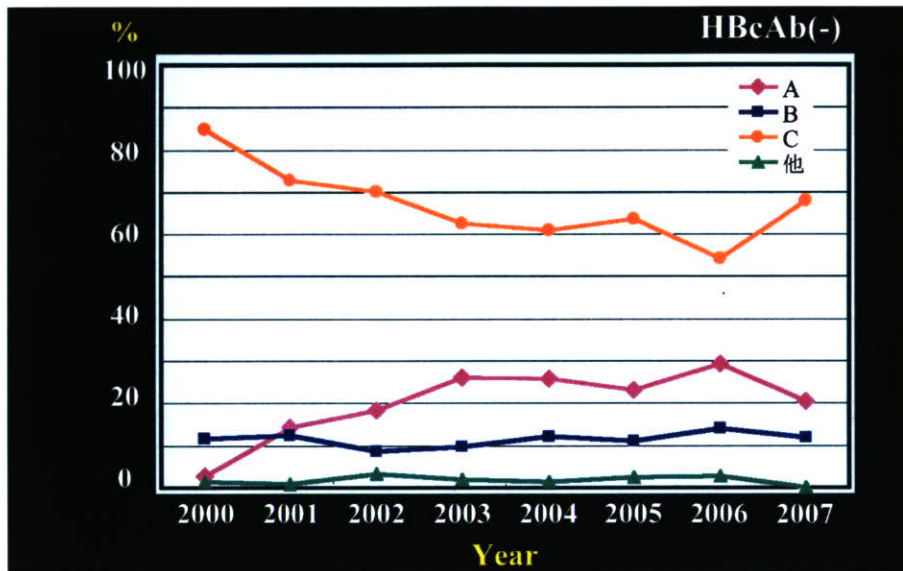


図1. HBV Genotype の比率

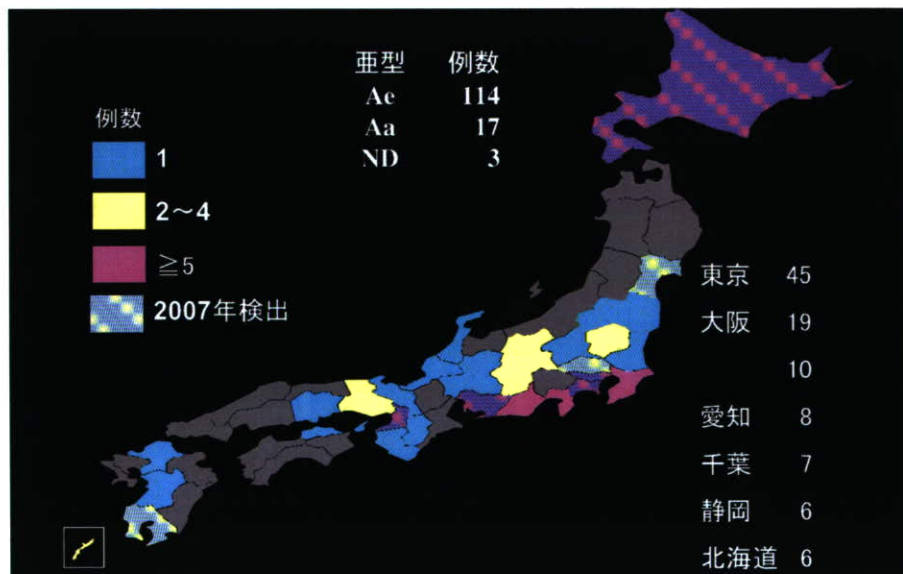


図2. Genotype A の地域分布 (134例)

D. 結論と考察

NATにより見出された HBV DNA 陽性の全ての献血者、計795例の血清を対象として解析した。その結果、ジェノタイプ A の HBV は 2001 年から検出され始め、2003 年以降は全 HBV DNA 陽性例の 20% 強を占め続けていること、年齢、性別にみると、20～30 歳代の男性が中心であること、地理的には東京、大阪、神奈川を中心に北海道、九州にまで拡散し始めていること、分子ウイルス学的には欧米型 (Ae) が中心 (87.0%) で、アジア・アフリカ型 (Aa) も約 13.0% にみられること、などが明らかとなった。

思春期以降の若い年齢層における HBV 感染の広がり、今後も継続してモニタリングしていく必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 知的財産の出願・登録状況

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)

「肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究」

平成19年度 班長研究協力者 研究報告書

わが国の慢性B型肝炎患者におけるHBV genotype分布の変遷

— 全国16施設共同研究 —

班長研究協力者 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 溝上雅史

研究要旨

HBV genotypeは地域特異性や特異的遺伝子変異が存在しており、その臨床像の違いに影響を及ぼしていると考えられている。われわれは、わが国の慢性B型肝炎患者におけるHBV genotypeの分布について報告しており(Orito et al, Hepatology 2001), genotype B(HBV/B), C(HBV/C)が大部分を占め、genotype A(HBV/A)は1.7%と少数であった。近年、わが国において急性B型肝炎は増加しており、HBV/Aの頻度が高いことが報告されている。急性HBV/Aは他のgenotypeに比べ成人感染でも慢性化しやすいことが報告されており、わが国においてHBV/Aの慢性B型肝炎患者が蔓延することが危惧されている。今回、日本の慢性B型肝炎のHBV genotypeを再調査し、2001年と比較した。2005年7月頃から2006年10月に、全国16施設へ通院中であった慢性B型肝炎の患者1370例 について、EIA法でgenotype の分類が可能であった1272例の分布、genotype間での臨床像の違いについて検討した。さらに、HBV/Aについては、Pre-S2からS領域、可能なものについては、全塩基配列をdirect sequence法により決定し、遺伝子系統解析を行った。Genotypeの分布はそれぞれA:44例(3.5%)、B:179例(14.1%)、C:1046例(82.2%)、D:2例(0.2%)、H:1例(0.1%)であり、2001年の報告と比べ有意にHBV/Aの割合が増えていた($P<0.05$)。関東、沖縄でHBV/Aの割合が高かった。HBV/AとB、C間で臨床像を検討すると、年齢についてはHBV/Aは、B、Cに比べ若く、Cに比べASCの割合が高く、高ウィルス療法例が少なかった。HBV/AのHBe抗原陽性率はBより高い傾向であった。HBV/Aの遺伝子系統解析ではHBV/Aeは欧米株と混在し、一部、日本株のクラスターを形成し、HBV/Aaはフィリピン・インド株とクラスターを形成していた。

遺伝子系統解析より、海外からHBV/Aが流入し、わが国ですでに複数の株が蔓延していることが示唆され、疫学的にもHBV/Aの割合が増加している結果であり、今後、わが国においてさらに、HBV/Aの慢性B型肝炎患者が蔓延することが危惧される。

共同研究者氏名

松浦健太郎, 田中靖人, 宮川侑三

各施設共同研究者

髭修平, 小松真史, 倉光智之, 河田純男, 斉藤貴史, 田中栄司, 松本晶博, 泉並木, 朝比奈靖浩, 奥瀬千晃, 各務伸一, 岡上武, 伊藤義人, 山田剛太郎, 村脇義和, 法正恵子, 日野啓輔, 恩地森一, 日浅陽一, 佐田通夫, 井出達也, 佐久川廣, 前城達次

A. 研究目的

HBV genotypeは地域特異性や特異的遺伝子変異が存在しており, その臨床像の違いに影響を及ぼしていると考えられている。われわれは, わが国の慢性B型肝炎患者におけるHBV genotypeの分布について報告しており(折戸ら, *Hepatology* 2001), genotypeB(HBV/B), C(HBV/C), がそれぞれ12.2%, 84.7%と大部分を占め, genotype A(HBV/A)は1.7%と少数であった。近年, わが国において急性B型肝炎は性行為感染症として増加しており, genotypeの分布に関しては, 慢性肝炎患者とは異なり, HBV/Aの頻度が高いことが報告されており, とりわけ大都市でこの傾向が顕著にみられている。わが国では従来, 急性B型肝炎は一過性の感染で慢性肝炎に移行する可能性は1%程度とされているが, 欧米では10%程度慢性化するとされており, genotypeの分布の違いが影響していると考えられている。急性HBV/Aは他のgenotypeに比べ慢性化しやすいことが報告されており, わが国においてHBV/Aの慢性B型肝炎患者が蔓延することが危惧されている。今回, 日本の慢性B型肝炎のHBV genotypeを再調査し, 2001年と比較した。

B. 研究方法

2005年7月頃から2006年10月に, 全国16施設へ通院中であった慢性B型肝炎の患者1370例について, EIA法でgenotypeの分類が可能であった1272例の分布, genotype間での臨床像の違い(検討項目;年齢, 性別, 臨床診断, 抗ウイルス療法の有無, 血小板, ALT, ALP, γ GTP, HBV-DNA, HBe抗原陽性率)について検討した。さらに, HBV/Aについては, Pre-S2からS領域, 可能なものについては, 全塩基配列をdirect sequence法により決定し, 遺伝子系統解析を行った。また, 最近の日本における急性B型肝炎患者から得られたHBV/Aの株を系統解析に加え, HBV/Aによる慢性肝炎と急性肝炎の関連について検討した。

C. 研究結果

Genotypeの分布はそれぞれA:44例(3.5%), B:179例(14.1%), C:1046例(82.2%), D:2例(0.2%), H:1例(0.1%)であり, 2001年の報告と比べ有意にHBV/Aの割合が増えていた($P < 0.05$)。地域別の分布をみると, 東北, 沖縄以外の地域では, HBV/Cが大部分を占め, 沖縄, 東北ではHBV/Bの割合が高かった。関東, 沖縄でHBV/Aの割合が高くそれぞれ, 9.5%, 9.1%であった。HBV/AとB, C間で臨床像を検討すると, 年齢についてはHBV/Aは, B, Cに比べ若く, Cに比べASCの割合が高く, 高ウイルス療法例が少なかった。HBV/AのHBe抗原陽性率はBより高い傾向であった。HBV/BとCの比較は, 既報のとおりでCのほうが, LC, HCCの割合が高く, ALT, HBeAgの陽性率が高かった。HBV/Aの遺伝子系統解析ではHBV/Aeは欧米株と混在し, 一部, 日本株のクラスターを形成し, 急性肝炎患者のHBV/Aとも高い相同性をみとめた。HBV/Aaはフィリピ

ン・インド株とクラスターを形成していた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

D. 考察

本研究の結果、わが国の慢性肝炎患者における HBV/A 割合は 2001 年の報告と比べ有意に HBV/A の割合が増えていた。近年、わが国の急性 B 型肝炎は性感染症として増えており、外来株である HBV/A の頻度が高いことが報告され、さらに HBV/A は他の genotype に比べ慢性化しやすいとされている。本研究の結果、疫学的に HBV/A の割合は増加し、また、系統解析より、HBV/A は欧米、アジア諸国から流入し、すでに日本の中で蔓延し、日本のクラスターを形成していると推測された。genotype 間の臨床像の違いについては、既報どおり HBV/C は B より HBeA 率が高く、病態の進行した症例の割合が高く、予後不良と考えられた。一方、HBV/A は、HBV/C より IC の割合が高く、予後良好であると考えられた。しかし、HBeAg 率が HBV/B よりも高く HBV/B より予後不良である可能性も考えられたが、症例数が少なく、HBV/A の慢性肝炎患者の臨床像については今後も検討を要する。

E. 結論

遺伝子系統解析より、海外から HBV/A が流入し、わが国ですでに複数の株が蔓延していることが示唆され、疫学的にも HBV/A の割合が増加している結果であり、今後、わが国においてさらに、HBV/A の慢性 B 型肝炎患者が蔓延することが危惧される。

G. 研究発表

2008 JDDW で発表予定。

HBV 感染の経過に伴う HBV DNA、HBs 抗原の消長とその特性
—新しく開発された HBs 抗原検出系の HBV 感染の特性解明への応用の可能性について—

分担研究者 吉澤浩司¹⁾、柚木久雄²⁾、田中純子¹⁾
研究協力者 片山恵子¹⁾、田淵文子¹⁾、小宮裕¹⁾
水井正明³⁾、友栗徹士⁴⁾、日野邦彦⁵⁾
星野博美⁵⁾、松原直子⁶⁾、伊藤哲雄⁶⁾

- 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) 三和化学熊本霊長類パーク
- 5) 大阪府赤十字血液センター
- 6) デルタクリニック
- 7) 先端生命科学研究所

研究要旨

宿主が産生する HBs 抗体の存在下でも影響を受けることなく HBs 抗原を検出できる高感度の HBs 抗原検出系 (ALSI-HBsAg) を用いて、様々なグループから成る保存検体を対象として HBs 抗原の検出を行い、既存の HBV DNA の検出結果、及び新たに追加して行った nested PCR による HBV DNA の検出結果とを対比することにより以下の結果を得た。

1. HBV 感染早期 (HBc 抗体出現以前) の検体を対象とした場合、この測定系は HBV DNA 量が 10^3 コピー/ml に達した検体については例外なく捕捉することができ、 10^2 コピー/ml に達している検体についても、その大半を捕捉することが可能であること。
2. 特に HBc 抗体が出現した後の、HBV 感染中期～後期の検体を対象とした場合には、nested PCR による HBV DNA の検出とほぼ同等か、時にはそれ以上 (HBV DNA 量が 10^2 コピー/ml 未満にまで低下している検体まで) の捕捉能を示す場合があること。

以上の結果は、今後更に対象 (群) を増やしてこの測定系を広く用いることにより、HBV 感染の特性をより詳細に解析できる可能性を示すものであると言える。

A. 研究目的

宿主が産生するHBs抗体の存在下でも影響を受けずにHBs抗原を検出できる高感度の検出系(ALSI-HBsAg)を用いて、様々な検体を対象としてHBs抗原の測定を行い、HBV DNAの測定結果と対比することにより、新たな視点からHBV感染の特性の解明を試みることを目的とした。

B. 対象と方法

1. 高感度のHBs抗原測定系(ALSI-HBsAg)のデザイン

HBs抗原のepitopeには表面に露出している「外側」epitopeと表面には露出していない「内側」epitopeとがあり、通常のHBs抗原測定法では「外側」epitopeに対する抗体が使用されている。HBs抗原の変異はs抗原タンパクの144aa付近(「外側」epitope)におこることが知られているが、表面に露出していない「内側」epitopeについては変異が入る可能性は極めて低いと考えられている。

一方、HBVに感染した宿主の体内で産生されるHBs抗体は、理論上、

「外側」epitopeに対するものであると考えられている。

本研究で用いたHBs抗原検出系(ALSI-HBsAg)は、通常の測定系が認識する「外側」epitopeに対するモノクローナル抗体と、「内側」epitopeに対するモノクローナル抗体を併用することにより、HBs抗原の検出能力を高め、さらに「外側」epitopeに対する変異体や、HBs抗体が共存する検体にも対応してHBs抗原の検出を可能にしたものである。

なお、この検出系はConjugateとしてアルカリフォスファターゼをラベルしたモノクローナル抗体を用いる一般的なサンドウィッチ法によるものであるが、効率のよい抗原抗体反応環境を整えること、2次抗体の標識法の改良による発光、発色強度の増幅によ

り、検出感度を向上させた測定系である。

2. 測定、解析の対象

下記の検体を対象として、HBs抗原、HBV DNAを検出、測定し、解析した。

- 1) 実験的にHBVを感染させたチンパンジーの感染経過中の一連の血清
 - (1) ジェノタイプAのHBVを感染させたチンパンジー(chimp246)の経過中の血清
 - (2) ジェノタイプCのHBVを感染させたチンパンジー(chimp272)の経過中の血清
- 2) 核酸増幅検査(NAT)により見出されたHBV DNA陽性の献血者由来の血漿
- 3) 経過観察中に抹消血中のHBV DNAが消失したB型慢性肝疾患患者由来の血清

3. HBs抗原、HBV DNAの検出、測定

HBs抗原は、microparticle EIA法(AxSYM®)、化学発光による測定法(CLIA法、アボットジャパンKK、東京)、ALSI-HBsAg(先端生命科学研究所、東京)により検出、測定した。HBV DNAはTaq Man PCR®(ロシュダイアグノスティクスKK、東京)、およびnested PCRにより検出、測定した。

C. 結果

1. チンパンジーの血清を対象とした測定、解析結果

- 1) 図-1に示したジェノタイプAのHBVを感染させたチンパンジー(chimp No.246)の一過性感染経過中のHBV DNAとHBs抗原の測定結果を示す。

HBV DNAは、HBV接種後17日目(HBV DNA量が 1.2×10^2 コピー/mlに達した時点)から検出可能となり、278日目(HBV DNA量が 2.7×10^2 コピー/mlに低下する)まで連続して検出され、これ以後334日目までは断続的に検出された(HBV

DNA量は 1.1×10^2 コピー/mlから 1.7×10^2 コピー/mlの範囲内)。

これに対して、ALSI-HBsAgにより、HBs抗原はHBV接種後15日目(HBV DNA量が 2.7×10^2 コピー/mlに達し、検出可能となった日の2日前)に検出可能となり、HBV DNAが最後に検出された334日目から数えて48日後まで連続して検出された。また、図-1から明らかなように、末梢血中のHBV DNA量がピークを越えた118日目以降では、HBV DNAに比べてむしろHBs抗原はより感度よく捉えられている点が注目された。

- 2) 図-2にジェノタイプCのHBVを感染させたチンパンジー(chimp No.272)の経過中のHBV DNAとHBs抗原の測定結果を示す。

HBV DNAは、HBV接種後6日目(HBV DNA量が 3.0×10^2 コピー/mlに達した時点)から検出可能となり、189日目(HBV DNA量 1.0×10^2 コピー/mlに低下した時点)まで検出され、196日目の時点では検出不可となっている。

一方、ALSI-HBsAgにより、HBs抗原はHBV接種後10日目(HBV DNA量が 1.1×10^3 コピー/mlに達した時点)から検出可能となり、182日目(HBV DNA量が 1.7×10^2 コピー/mlに低下した時点)まで検出され、189日目(HBV DNA量 1.0×10^2 コピー/mlとなった時点)には検出できなくなっている。なお、chimp246と同様に、末梢血中のHBV DNA量がピークを越えたHBV感染の後期では、HBs抗原はHBV DNAに比べてむしろ感度よく捉えられていた。

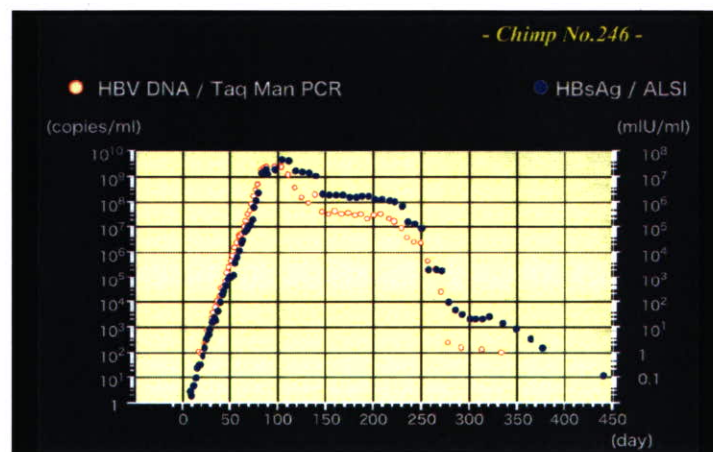


図1. HBV (ジェノタイプA) を接種したチンパンジーの末梢血中におけるHBV DNAとHBs抗原の消長

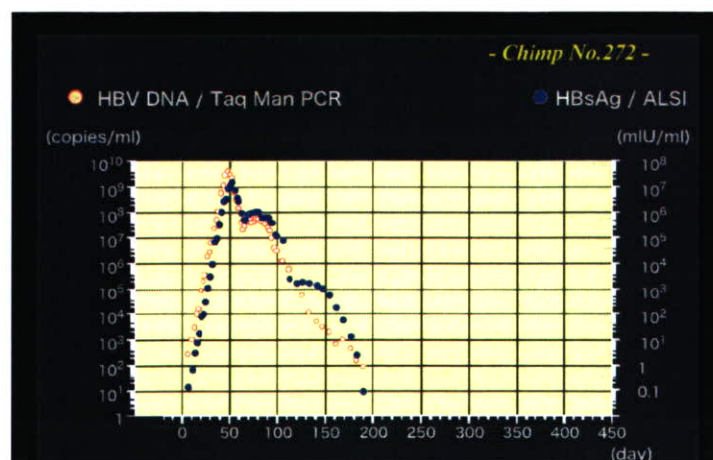


図2. HBV (ジェノタイプC) を接種したチンパンジーの末梢血中におけるHBV DNAとHBs抗原の消長

2. 核酸増幅検査 (NAT) により見出された HBV DNA 陽性の献血者由来の血漿を対象とした測定、解析結果

図-3 に NAT により見出された HBV 感染早期 (HBc 抗体陰性期) の献血者由来の血漿 234 検体を対象とした HBs 抗原と HBV DNA の検出結果を対比して示す。

HBs 抗原は microparticle EIA 法 (AxSYM®) による測定値 (S/N) を、また、HBV DNA 量は Taq Man PCR® による測定値 (コピー/ml) により、示した。

HBs 抗原は対象とした検体の半数以上が陰性と判定されており、また、HBV DNA

量と HBs 抗原の測定値 (S/N) とは必ずしも 1 対 1 の対応をなしてはいない。

図 保存検体を用いて ALSI-HBsAg により HBs 抗原を測定し、同様に整理してまとめたものである。HBV DNA 量が少量 ($10^2 \sim 10^3$ コピー/ml) であった例のごく一部 (4 検体のみ) が HBs 抗原陰性と判定されている。

これらの 4 検体の HBV DNA 量は $1.0 \sim 2.8 \times 10^2$ コピー/ml といずれもごく微量であり、HBV のジェノタイプについてはジェノタイプ A と B が各 1 検体、ジェノタイプ C が 2 検体と、特定のジェノタイプへの片寄りは認められなかった。

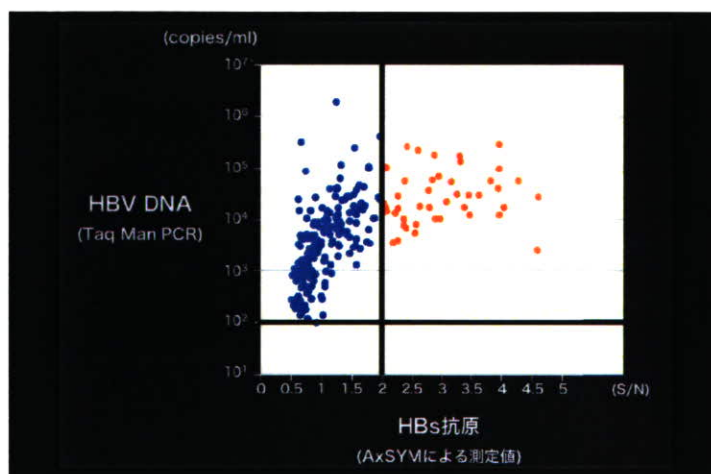


図3. HBV DNA 量と HBs 抗原測定値 (S/N 値) との関係
— NAT により見出された HBV 感染早期の 234 検体について —

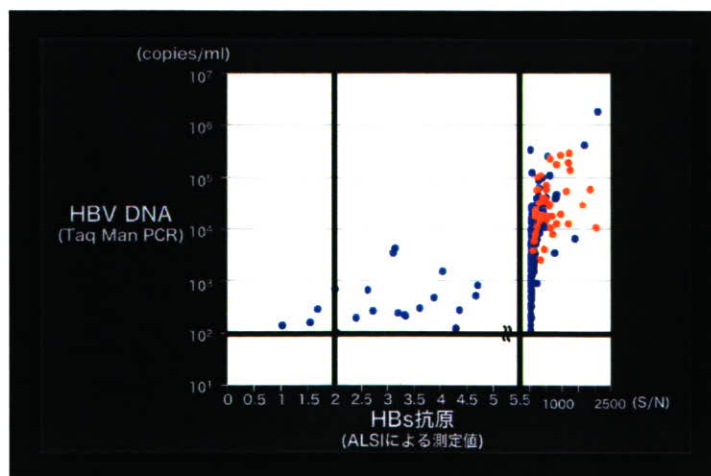


図4. HBV DNA 量と HBs 抗原測定 (S/N 値) との関係
— NAT により見出された HBV 感染早期の 234 検体について —

3. 末梢血中の HBV DNA が検出されなくなった B 型慢性肝疾患例の経過を追った血清を対象とした測定、解析結果

図-5 に、経過観察中に末梢血中の HBV DNA と HBs 抗原の両者が自然消失した症例の経過を示す。

この症例の保存血清を用いて、retrospective に nested PCR による HBV DNA、および ALSI-HBsAg による HBs 抗原の検出を試みたところ、HBV DNA 消失後、長期間にわたってごく微量の HBV DNA と共に、HBs 抗原が持続して検出されることが明らかとなった。

図-6 は、核酸アナログ製剤による治療開始後、比較的早期に末梢血中の HBV DNA が消失した例の経過をまとめたものである。この症例は HBV DNA が消失してから約 1 年後に HB ワクチンの接種を開始しているが

3 回目の接種直後に HBs 抗体価の急上昇（ブースター反応）がみられた。この症例の保存血清を用いて、nested PCR による HBV DNA、および ALSI-HBsAg による HBs 抗原の検出を試みたところ、ごく微量の HBV DNA の消失に続いて、HBs 抗原の消失がおり、その後数カ月を経て HB ワクチンの接種を開始していたことが明らかとなった。

図-7 も核酸アナログ製剤による治療例で、HBV DNA 消失後約 1 年目に HB ワクチンの接種を行ったものの十分な効果が得られなかった例の経過をまとめたものである。この症例は nested PCR による HBV DNA の消失、ALSI-HBsAg による HBs 抗原の消失後に HB ワクチンの接種を開始してはいるものの、図-6 に示した症例に比べて HBV マーカーが消失してから HB ワクチン接種開始までの期間（間隔）が短い点が異なっていた。

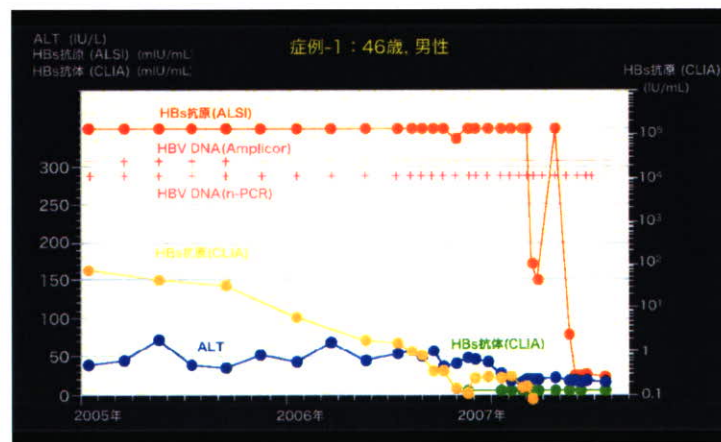


図5. HBV 感染の経過に伴う HBV DNA、HBs 抗原の消長＜自然経過例＞

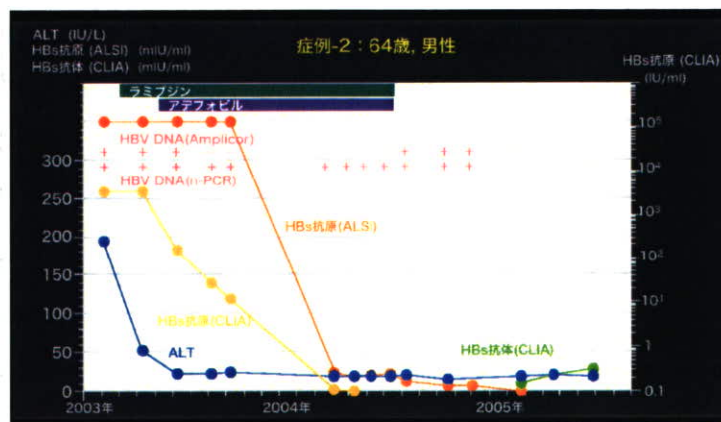


図6. HBV 感染の経過に伴う HBV DNA、HBs 抗原の消長
＜治療+HB ワクチン接種例＞

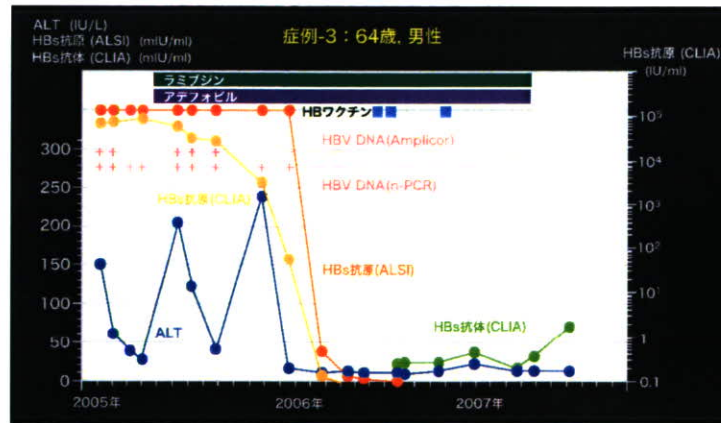


図7. HBV 感染の経過に伴う HBV DNA、HBs 抗原の消長
 <治療+HB ワクチン接種例>

D. 結論と考察

新しく開発された高感度のHBs 抗原測定系 (ALSI-HBsAg) を用いて、様々なグループから成る保存血清を対象としてHBs 抗原の再測定を行い、既存のHBV DNA の検出結果、及び新たに追加して行った nested PCR によるHBV DNA の検出結果との対比を行い、以下の成績を得た。

1. HBV 感染早期 (HBc 抗体出現以前) の検体を対象とした場合、この測定系はHBV DNA 量が 10^3 コピー/ml に達した検体については例外なく捕捉することができ、 10^2 コピー/ml に達している検体についても、その大半を捕捉することが可能であること。
2. 特にHBc 抗体が出現した後の、HBV 感染中期～後期の検体を対象とした場合には、nested PCR によるHBV DNA の検出とほぼ同等か、時にはそれ以上の捕捉能を示す場合があること。

以上の結果は、今後、更に対象 (群) を増やして、この測定系を広く用いることによりHBV 感染の特性をより詳細に解明できる可能性を示すものであると考えられた。

抗 HCV ヒト免疫グロブリン (HCIG) 開発を旨とした基礎的研究
—感受性動物小動物 (ヒト肝細胞置換キメラマウス) を用いた感染実験による中和活性の検証—

分担研究者 吉澤浩司¹⁾、柚木久雄²⁾、田中純子¹⁾
研究協力者 片山恵子¹⁾、田淵文子¹⁾、小宮裕¹⁾
水井正明³⁾、木次克彦⁴⁾、藤原稔也⁴⁾
松倉晴道⁵⁾、伴野丞計⁶⁾、前野英毅⁶⁾
丸山功⁷⁾、島田卓⁷⁾

- 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) オーソクリニカルダイアグノスティクス
- 5) 大阪府赤十字血液センター
- 6) 日赤血漿分画センター
- 7) フェニックスバイオ

研究要旨

抗 HCV ヒト免疫グロブリン (HCIG) の開発を旨とした基礎的研究の第一歩として、(1) 既知の HCV 感染材料、(2) HCV のエンベロープに対する抗体 (HCVenV 抗体) 高力価陽性のヒトプール血漿を原料として調製したガンマグロブリン (HCIG 候補)、(3) ヒト肝細胞置換キメラマウスの 3 者を用いた感染実験を行い、以下の結果を得た。すなわち、

- 1) HCV (ジェノタイプ 1a) の遺伝子 (E1+E2+P7 領域) 由来の計 624aa から成るペプチドを抗原として用いた測定系により検出される抗体 (HCVenV 抗体) は、HCV キャリアの血清中に比較的高い頻度で見出された。
- 2) HCVenV 抗体高力価陽性者由来のプール血漿を界面活性剤と還元剤処理 (SD 処理) した後に作製したガンマグロブリン分画では HCV の感染力は失われていることが明らかとなった。
- 3) HCVenV 抗体高力価を示す複数の HCV キャリアのプール血漿を原料として調製した HCIG 候補には、HCV の感染を阻止する中和活性があることが明らかとなった。

以上、本研究により得られた成果は、抗 HCV ヒト免疫グロブリン (HCIG) 開発の可能性にむけた第一歩であり、今後はより強い中和活性を有する原料血漿の選別法 (HCVenV 抗体測定系の改良)、感染防御の対象となるべき (それぞれの患者血中の) HCV と HCIG 候補の Lot ごとにみた中和能とのマッチングの検討などが必要になると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスのエンベロープに対する抗体（以下HCVenv抗体と略記）陽性のプール血漿を原料として調製したガンマグロブリン分画（抗HCVヒト免疫グロブリン候補；以下HCIG候補と略記）がHCV感染防御機能を有するか否かをヒト肝細胞置換キメラマウス（以下キメラマウスと略記）を用いた感染実験により検証することを目的とした。

B. 対象と方法

1. HCVenv抗体の検出、測定系に用いた抗原

HCV（ジェノタイプ1a）の遺伝子（E1+E2+P7領域）由来の発現ペプチド（E1：192-383aa+E2+P7：384-815aa、合計624aaから成るペプチド）を抗原として用いた。

2. HCVenv抗体の測定と原料血漿選択のためのスクリーニング

以下の手順により、目的に適った原料血漿の選択を行った。

(1)HCV抗体陽性の血漿（HCV感染既往者とHCVキャリアの両者由来の血漿153検体から成るパネル血漿）を対象とし、HCVenv抗体測定値（O.D値）とHCV抗体価（2NHCV PHA価）とを対比した。その結果、HCVキャリア由来の血清を対象とすることにより、高力価HCVenv抗体陽性の検体を効率良く見出すことができることが明らかとなった。

(2)HCVキャリアの保存血清、計624検体を対象とし、原血清、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍希釈サンプルを検査して得た測定結果（O.D値）から、 10^3 倍希釈サンプルによる測定値を用いることにより、効率良く高力価HCVenv抗体を選別できることを確認した。

(3)HCVキャリアの血漿（献血者由来の血

漿、計298バッグ分）の 10^3 倍希釈後の測定値（O.D値）を求めた。

3. HCIG候補用原料血漿のプール

上記(2)の集団から、 10^3 倍希釈後の測定値（O.D値）が1.0以上を示す10検体、計25ml、および(3)の集団から、 10^3 倍希釈後の測定値（O.D値）が0.8以上を示す35バッグ分合計2,225ml、合計45人分、計2,250mlの血漿をプールし、HCIG候補用原料とした。

4. ガンマグロブリン分画の調製

プールした原料血漿を界面活性剤と還元剤によりウイルスの不活化処理（SD処理）を行った後、定法（コーン冷エタノール分画法）によりガンマグロブリン分画を調製した（タンパク濃度5.76%、溶媒0.3Mグリシン）。

5. 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）接種材料を用いた¹⁾²⁾。

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HCV感染早期の新鮮凍結血漿（FFP）接種後7週目のチンパンジーの血清（Passage 7: P-7）、

(2)HCVのジェノタイプ：1b+2a

(3)HCV RNA量： 2.2×10^5 コピー/ml、

(4)HCV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： $\sim 10^1$ （18～26）コピー。

6) 実験に用いたヒト肝細胞置換キメラマウス

同一Lotのヒト肝細胞（Lot.BD87）を用いて置換したキメラマウス（置換率66.7%～90.3%）、計22匹を用いた。実験開始

時の体重は、12.7 g～ 20.6 g。

C.結果

1. 抗体の測定値と HCV 抗体価

1) HCVenv 抗体測定値 (O.D 値) と HCV 抗体価 (2^NHCV PHA 価) との対比

HCVenv 抗体測定値 (O.D 値) は、HCV 抗体価が中～低力価を示す HCV 感染既往例ではいずれも低値を示していた。一方、HCV 抗体価が 2¹²HCV PHA 価以上の高力価を示す (HCV キャリア) 群では、高値を示すという傾向がみられた (図-1)。

2) HCV キャリア集団における高力価 HCVenv 抗体陽性例の頻度

原血清 10³ 倍稀釈サンプルを検査して得た HCVenv 抗体測定値 (O.D 値) が 1.0 以上を示す例を「高力価 HCVenv 抗体陽性例」とした場合、その頻度は 624 検体中 10 検体 (1.6%) であり、これらは主として HCV 抗体高力価の (2¹⁴HCV PHA 価以上の) 群から見出された (表-1)。

同様に献血者由来の血漿 10³ 倍稀釈サンプルを検査して得た HCVenv 抗体測定値 (O.D 値) が 0.8 以上を「高力価 HCVenv 抗体陽性例」とした場合の頻度は 298 バッグ中 35 バッグ (11.7%) であり、これらは 2¹³HCV PHA 価以上を示す群から見出された (表-2)。

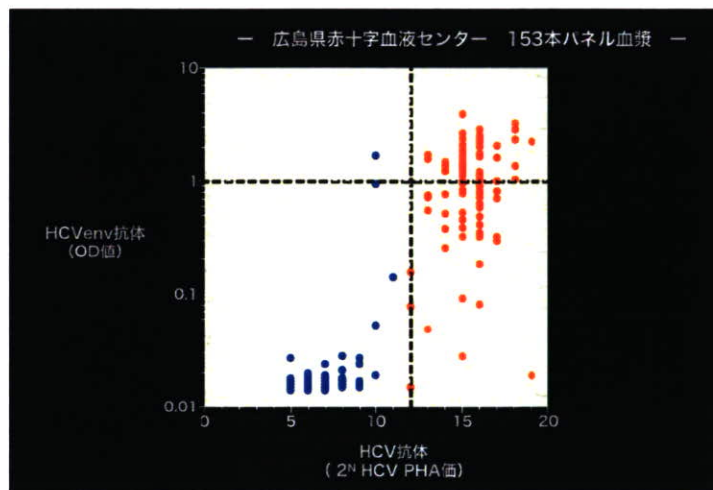


図1. HCV 抗体価 (2^N PHA 価) と HCVenv 抗体測定値と HCV 抗体価との対比

表1 HCV 抗体価 (2^NHCV PHA 価) 別にみた高力価 HCVenv 抗体陽性例の分布

— HCIG (候補) の原料として選別した10例 —

HCV抗体 (2 ^N HCV PHA価)	検体数	高力価HCVenv抗体 陽性数 (%)	
2 ¹²	98	0	
2 ¹³	116	0	
2 ¹⁴	120	2	(1.7)
2 ¹⁵	153	4	(2.6)
2 ¹⁶	90	3	(3.3)
2 ¹⁷	41	1	(2.4)
2 ¹⁸	6	0	
合計	624	10	(1.6)

高力価HCVenv抗体：原血清1,000倍稀釈後の測定値 O.D 1.0以上

表2 HCV抗体価（2^NHCV PHA価）別にみた高力価HCVenv抗体陽性例の分布

— HCIG（候補）の原料として選別した35例 —

HCV抗体 (2 ^N HCV PHA価)	検体数	高力価HCVenv抗体 陽性数 (%)
2 ¹²	17	0
2 ¹³	38	4 (10.5)
2 ¹⁴	69	8 (11.6)
2 ¹⁵	61	5 (8.2)
2 ¹⁶	63	9 (14.3)
2 ¹⁷	35	6 (17.1)
2 ¹⁸	12	3 (25.0)
2 ¹⁹	2	0
2 ²⁰	0	0
2 ²¹	1	0
合計	298	35 (11.7)

高力価HCVenv抗体：原血清1,000倍希釈後の測定値 C/D 0.8以上

表3 既知の接種材料^{a)}をもととした感染材料の調製

— 同種マウスのフル血清による10^N倍段階希釈と各サンプル中のHCV RNA量の測定 —

P-7 (原血清)	10 ^N 倍段階希釈	
	1:10 ¹	1:10 ²
HCV RNA		
2.2 × 10 ⁵ コピー/ml	4.4 × 10 ⁴ コピー/ml	4.6 × 10 ³ コピー/ml

a) 既知の接種材料：HVC感染早期のヒト由来FFP接種後49日目のチンハンジー血清 (P-7)

HCVジェノタイプ 1b + 2a
HCV RNA 2.2 × 10⁵ コピー/ml
HCV抗体 陽性
チンハンジーへの感染価 (1CID) : ~10¹ コピー

b) HCV RNA : Taq Man PCR により測定

表4 感染成立に必要な最少HCV量の測定

— 接種HCV量別にみたキメラマウスの転帰 —

群 [接種HCV (RNA) 量]	マウスNo	性	体重 (g)	ヒト肝細胞 変換率 (%)	転 帰
I 群 [~10 ⁴ コピー]	1	♀	15.7	67.8	感染成立
	2	♀	14.5	66.7	感染成立
	3	♀	15.3	76.1	感染成立
II 群 [~10 ³ コピー]	4	♀	13.6	76.5	感染成立
	5	♀	13.1	85.4	感染成立
	6	♀	14.7	88.2	感染成立
	7	♀	14.1	79.2	感染成立
III 群 [~10 ² コピー]	8	♂	15.8	76.9	感染成立
	9	♂	16.4	74.9	感染成立
	10	♀	15.6	68.8	感染不成立

感染成立に必要な最少HCV量：
(Mouse Infectious Dose : MID : ~10² [220~460] コピー)
チンハンジー感染価 (CID) との対比 : 1 MID ≒ 10 CID

表5 既知の接種材料 (P-7) の希釈による3種類の感染材料の調製

— 同種マウスフル血清、HCIG候補、HBIGにより希釈したサンプル中のHCV RNA量の同時測定 —

	P-7 (原血清)	マウスフル血清 による希釈	HCIG候補 による希釈	HBIG による希釈
HCV RNA (コピー/ml)	2.2 × 10 ⁵ (8.5 × 10 ⁵) [※]	4.4 × 10 ⁴	7.1 × 10 ⁴	9.1 × 10 ⁴

既知の接種材料 (P-7) : HCV感染早期のヒトFFP接種後49日目のチンハンジー血清

(1 CID : 10 コピー
1 MID : 10² コピー)

HCV RNA : Taq Man PCR により測定
(参考 8.5 × 10⁵ コピー/ml[※] : 同時測定時の値)

2. 感染成立に必要な最少HCV量

感染成立に必要な最少HCV量（マウス感染価、Mouse Infectious Dose : MID) を以下の手順で測定した。

1) 感染材料

既知の接種材料 (P-7) を、ヒト肝細胞非置換の同種マウスのプール血清を用いて 1:10¹、1:10² 倍に希釈し、サンプル中のHCV RNA 量を定量し正しく希釈されていることを確認した後、それぞれのサンプルを感染材料として用いた (表-3)。

2) キメラマウスへの接種とそれぞれのマウスの転帰

感染材料各々 100ul ずつを尾静脈経由で接種した 3 群のキメラマウスと、それぞれの転帰を表-4 にまとめて示した (表-4)。

10⁴ コピー相当、10³ コピー相当の HCV を接種した 1 群の 3 匹、および 2 群の 4 匹は全例で感染が成立した。

これに対して、10² コピー相当の HCV を接種した 3 群の 3 匹では、2 匹が感染成立、1 匹は感染不成立という結果が得られた。

以上のことから、既知の接種材料 (P-7) を用いて、LotBD87 のヒト肝細胞置換キメラマウスを実験動物とした場合の、感染成立に必要な最少HCV量 (Mouse Infectious Dose : MID) は 10² コピー相当 (220~460 コピー) であることが明らかとなった。

3. HCIG 候補による受動免疫後のキメラマウスへの既知量 (感染価) の HCV のチャレンジ

1) 感染材料

既知の感染材料 (P-7) を、ヒト肝細胞非置換の同種マウスのプール血清、HCIG 候補、HBIG により、1:10¹ 倍に希釈し、それぞれのサンプル中の HCV RNA 量を定量して、

正しく希釈されていることを確認した後に感染材料として用いた (表-5)。

なお、対照実験用の感染材料とした HBIG による希釈は、市販の HBIG (200 IU/ml、日赤製) を用いた。

2) キメラマウスへの接種とそれぞれのマウスの転帰

(1) 実験プロトコール (I) : in-vivo での中和実験

HCIG 候補を図-2 に示したプロトコールに従って投与した後に、10⁴ コピー相当の HCV を 4 匹のキメラマウスに、また、10³ コピー相当の HCV を 3 匹のキメラマウスに接種して、接種後 6 週目まで経過を観察した。

その結果、10⁴ コピー相当の HCV をチャレンジした 4 匹中 3 匹では接種後 1 週目から末梢血中に HCV が出現し、6 週目まで持続して検出された。残りの 1 匹では、接種後 1,2,3,5 の各週で HCV が検出されたが 4 週目および 6 週目には HCV は検出されなかった。

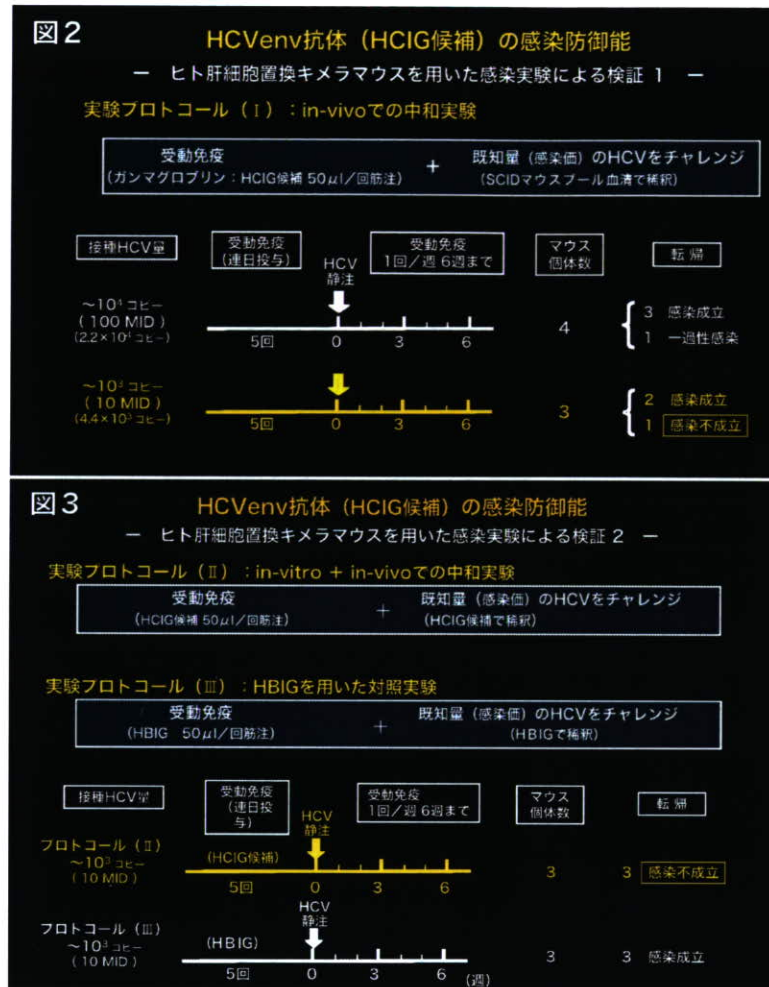
一方、10³ コピー相当の HCV をチャレンジした 3 匹中 2 匹では接種後 1 週目から 6 週目までの末梢血中に HCV が検出されたが、残りの 1 匹では全経過を通じて HCV は検出されなかった。

(2) 実験プロトコール (II) : in-vivo + in-vitro での中和実験及び実験プロトコール (III) による対照実験

図-3 に示した実験プロトコール (II) に従って受動免疫したキメラマウス 3 匹に、P-7 を HCIG 候補により 1:10¹ 倍に希釈し、37°C、30 分間温浴槽内で incubate した後に接種したところ、3 匹とも HCV の感染はみられなかった。

これに対して実験プロトコール (III) に従って行った対照実験では全例で

HCV の感染は成立した。



D.結論と考察

抗 HCV ヒト免疫グロブリン (HCIG) 開発を目ざした基礎的研究の第一歩として、感受性動物 (ヒト肝細胞置換キメラマウス) を用いた HCV の感染実験を行い、以下の結果を得た。

1. HCV エンベロープ抗体 (HCVenv 抗体) は、HCV 抗体中 ~ 低力価を示す HCV 感染既往例では低値を示し、HCV 抗体価高値を示す HCV キャリアでは高値を示すことが明らかとなった。
2. HCVenv 抗体高力価陽性者 (その全例は HCV キャリア) 由来のプール血漿を界面活

性剤と還元剤により HCV の不活化処理 (SD 処理) を行った後に作製したガンマグロブリン分画では HCV の感染力は失われていることが明らかとなった。

3. HCIG 候補には、HCV 感染を阻止する中和活性があることが明らかとなった。
4. 一方、本実験研究によって示された中和活性は必ずしも十分なものではない (10 Mouse Infectious Dose : 10MID を防御できる程度) であることも明らかとなった。
 以上のことから、今後は、
 (1) より強い中和活性を有する原料血漿の選別法の検討、すなわち HCVenv 抗体測

- 定系の改良、
- (2) HCIG の Lot と感染の防御対象となるべき HCV とのマッチングの検討などが必要になると考えられた。

文献

- 1) 吉澤浩司他：
in-vitro で定量される C 型肝炎ウイルス量
(HCV RNA 量 copy/ml) とチンパンジー
感染価 (CID/ml) との関係確定のための
実験的研究
「C 型肝炎の自然経過および介入による
影響等の評価を含む疫学的研究」
平成 14 年度報告書 pp81-89
- 2) Katayama K, Kumagai J, Komiya Y,
Mizui M, Yugi H, Kishimoto S,
Yamanaka R, Tamatsukuri S, Tomoguri
T, Miyakawa Y, Tanaka J, Yoshizawa H:
Titration of hepatitis C virus in
chimpanzees for determining the copy
number required for transmission
Intervirology. 47:57-64,2004.

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

肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究

(課題番号 H19 - 肝炎 - 一般 - 009)
(3年計画の1年目)

平成19年度 研究成果

主任研究者 吉澤 浩司

平成20(2008)年 3月

肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究
平成19年度 班構成

主任研究者

吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授

分担研究者

田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 准教授
 小山 富子 岩手県予防医学協会 県南センター 所長
 日野 啓輔 山口大学大学院 基礎検査学 教授
 三浦 宜彦 埼玉県立大学 保健医療福祉学部情報科学 教授
 阿部 弘一 岩手医科大学 第一内科 講師
 池田 健次 虎の門病院 肝臓科 部長
 鳥村 拓司 久留米大学 消化器内科 准教授
 柚木 久雄 日赤中央血液研究所 核酸増幅検査部 部長
 相崎 英樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

班長研究協力者

丸山 功 (株)フェニックスバイオ 研究部 研究員
 菅野 雅元 広島大学大学院 免疫学 教授
 佐田 通夫 久留米大学 消化器内科 教授
 松崎 靖司 東京医科大学 霞ヶ浦病院 消化器内科 教授
 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長
 星野 博美 デルタクリニック 研究員
 高橋 和明 東芝病院 研究部 研究員
 松倉 晴道 大阪府赤十字血液センター 副部長
 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学 教授
 宮川 侑三 (財)宮川庚子記念研究財団 専務理事