

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)

肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築

(主任研究者:水落利明)

分担研究報告書

小児の HBV 水平感染の実態に関する検討

分担研究者 多屋 馨子 国立感染症研究所感染症情報センター第三室室長
研究協力者 越田 理恵 金沢市福祉保健局こども福祉課長
戸口 翔平 国立感染症研究所感染症情報センター非常勤職員
岡部 信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長

研究要旨

保育施設に勤務する看護師ならびに市の保健所・本庁等に勤務する保健師等(医療職)の B 型肝炎に関する知識について調査した。昨年、一昨年に実施した保育施設長と保育士への調査と比較すると、今年度は医療職への調査であったこと、昨年度に本研究班の結果説明を兼ねて研修会を開催したこともあり、知識保有率は高かったが、まだ不十分な点も残されていた。

乳幼児期の B 型肝炎ウイルス水平感染予防の観点から、保育関係者ならびに保育に関連する医療職への正確な情報の提供と血液媒介感染症に関する教育啓発が必要と考えられた。特に、血液や浸出液に関する注意事項の徹底が必要である。

保育施設での B 型肝炎ウイルス感染症の水平感染を予防するためには、教育啓発が必要と考え、小冊子を作成した。また、教育啓発のみでは不十分な点も残されるため、現行の母子感染予防の徹底ならびに universal vaccination が必要であると考えられた。

A. 研究目的

乳幼児期に B 型肝炎ウイルスの初感染を受けると、キャリア化率が高いことが知られている。また近年、成人になってから感染しても、キャリア化する可能性がある遺伝子型(genotype)が国内で増加している。

一昨年度、昨年度の本研究班では、乳幼児が集団で生活している保育施設の職員の意識調査を目的として、金沢市にある保育施設の長(あるいは主任保育

士)、一般保育士の B 型肝炎に対する意識について調査した。

今年度は、金沢市内の保育施設の看護師(民間保育施設)および金沢市に勤務する保健師等(医療職)を対象として同様の調査を実施し、水平感染のリスクについて検討し、B 型肝炎ワクチンの universal vaccination の必要性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

金沢市内にある民間保育施設に勤務する看護師および、金沢市の本庁・保健所・福祉健康センター等に勤務する市の職員（保健師等）を対象に、KAP（knowledge 知識, attitude 態度, practice 実践）調査を実施した。

方法は、全施設に質問票を送付し、無記名で金沢市福祉保健局（研究協力者）宛に郵送してもらい、国立感染症研究所感染症情報センターで集計・解析した。

C. 研究結果

金沢市の医療職（保健師等）職員（常勤・非常勤）65 人から調査票の回収があり、回収率は 100%であった。民間保育所の看護師 25 人から調査票の回収があり、回収率は 93%であった。

回答者の所属は、金沢市福祉健康センター 48 人（53.3%）、保健所 9 人（10.0%）、金沢市本庁 6 人（6.7%）、民間保育所の看護師 23 人（25.6%）、その他 3 人（3.3%）、未記入 1 人（1.1%）で、職種は、市に勤務する保健師 59 人（内訳：母子保健 20 人、生活習慣病予防（介護予防含む）16 人、精神保健 8 人、感染症 7 人、その他 8 人（小児慢性特定疾患、管理、介保、高齢者、保健事業全般））（65.6%）、1つの民間保育所に専属の看護師 23 人（25.6%）、市に勤務する看護師 5 人（5.6%）、市に勤務する助産師 1 人（1.1%）、未記入 2 人（2.2%）であった。

回答者の年代は、中央値 40 代、20 代 12 人（13.3%）、30 代 16 人（17.8%）、40 代 30 人（33.3%）、50 代 30

人（33.3%）、60 代 2 人（2.2%）で、性別は、全員女性であった。

回答者 90 人の内、B型肝炎ワクチンを受けていたのは 59 人（65.6%）であった。保育所の看護師は 25 人中 13 人（52.0%）がB型肝炎ワクチン接種歴ありと回答した。

保育所の看護師を対象とした質問で、自施設の中にB型肝炎ワクチンの接種を受けている児童がいると回答した者は 1 施設（4.0%）のみで、いないが 14 施設（56.0%）、受けているかどうか不明と回答した者が 10 施設（40.0%）であった。

1) 保育所の看護師のみを対象とした質問

1. 自施設にB型肝炎ウイルスのキャリア児童がいると回答した者は 1 施設（4.0%）で、施設内で情報を共有していた。いないと回答した施設は 12 施設（48.0%）、12 施設（48.0%）は不明と回答していた。

2. 近年、皮膚疾患（アトピー性皮膚炎など）を有する児童が増加しているが、施設内で薬剤の塗布を行ったことがある者は 23 人：92.0%で、昨年度の保育士への調査結果 58.5%より多かった。23 人中 11 人（47.8%）は素手で薬剤を塗布していた。

3. おむつ交換時には、16 人（64.0%）が常に手袋を着用し、便の時など、時々手袋を着用していたのは 9 人（36.0%）であり、していないと回答した者はいなかった（図 1）。いつもしていると回答した者の割合は、施設長より少ないが、保育士より多

かった。

4. 出血時の処置については、昨年度実施した保育士への調査より手袋着用率は高かったものの、4人(16.0%)が手袋の着用をしていないと回答し、いつもしているは8人(32.0%)にとどまった(図2)。

5. 鼻血の処置の際、常に手袋を着用しているのは8人(32.0%)であり、時々が9人(36.0%)、8人(32.0%)は手袋の着用はしていなかった(図3)。保育施設長、保育士の手袋着用率に比較すると、医療職では高い着用率であった。

6. 血の付いた綿球をビニール袋に入れて捨てるのは17人(65.4%)で、そのままゴミ箱に入れるが7人(26.9%)、ビニール袋に入れて専用のゴミ箱に入れるが1人、トイレットペーパーで拭いて、トイレに流すが1名であった(図4)。保育施設長、保育士の手袋着用率に比較すると、僅かにビニール袋に入れて捨てる割合は高かった。

7. 園児のタオルは、個別使用が20施設(55.6%)、ペーパータオル使用が15施設(41.7%)であり、両方と回答した施設がこの内10施設であった。

8. 歯ブラシの個別洗浄は84.0%でなされていたが、1施設は個別洗浄されていなかった。

9. 園児のかみつき後の連絡については、80%がいつも連絡する、20%が時々連絡すると回答した。

2) 市職員(医療職)を対象とした質問

1. キャリアの方やその家族からの相

談は39人(60.0%)が有りと回答した。しかし、職場内で情報を共有したり、ケース検討などの話し合いが行われていたのは22人(33.8%)であった。

2. アトピー性皮膚炎あるいは湿疹のある児への薬剤塗布の指導は5人(7.7%)が積極的に勧めており、30人(46.2%)が勧めていた。勧めていないは8人(12.3%)にとどまった。

3. 保育所や、小さい子どもたちが集まる催しで、薬剤の塗布等の処置を行う場合の手袋の着用指導については、57.1%がしていないと回答した。出血の処置の際の手袋の着用指導についても、58.5%がしていないと回答し、着用率は高くなかった。

4. 血の付いた綿球の処置についての指導方法は、ビニール袋に入れて捨てると回答した者は45.5%で、専用のゴミ箱にそのまま捨てるが19.7%、そのままゴミ箱に捨てるが3.0%であった。

5. 鼻血処置の際の手袋着用については、機会が無いと回答した8人を含めて、41人(63.1%)が手袋着用を指導していないと回答した。

6. おむつ交換時の手袋着用については、機会が無いと回答した8人を含めて、36人(55.4%)が手袋着用を指導していないと回答した。

7. 血液媒介感染症に関する教育については、いつもしているが 5 人 (7.7%)、時々しているが 9 人 (13.8%)、滅多にしないが 27 人 (41.5%)、しないが 17 人 (26.2%) であった (図 5)。

3) 全員を対象とした B 型肝炎についての知識に関する質問

1. 世界中のキャリアの数、感染者の数、キャリア低頻度国・高頻度国については、約 40~70% が知らないと回答した。
2. B 型肝炎ウイルスの感染経路については 94.4% が知っている と回答し、予防法については 94.4% が知っている と回答した。この割合は、保育士あるいは施設長より高かった。
3. 乳幼児期に感染を受けるとキャリア化の率が高いことは 4.4% が知らない と回答し、キャリア化した後の予後については 8.9% が知らない と回答したが、施設長あるいは保育士よりその割合は極めて低かった。一方、近年成人になってから感染してもキャリア化率の高い遺伝子型 (genotype) が国内でも増えていることについては、52.2% が知らない と回答した。
4. 以前保育施設で職員・児童を巻き込んだ B 型肝炎ウイルス感染症の集団発生があったことについては 66.7% が知らない と回答した。知っていた 26.7% は昨年度の研

修会で研究分担者が講演したことにより記憶に残っていたと考えられた。

B 型肝炎の深刻さについての知識は、医療従事者である看護師、保健師等においても十分とは言えなかった。

市職員 (医療職) からのコメントとして、B 型肝炎より重要なことが多いので全部は知らない。との回答があった。また、未経験の項目が多いので、マニュアルやパンフレットがあれば保育の機会に指導できると思った。との回答が寄せられた。

保育所の看護師からは、保育園の危機管理体制への不安、保育士への理解を深めたいという意見が寄せられた。病院勤務時は感染状況が把握できたが、保育所では、親からの情報がないかぎり不明なため、常に感染症を持っていると考えて防いでいかなければいけないと思っているとの意見も寄せられた。

これらの結果を受けて、血液媒介感染症を知ってもらうことを目的として、保育所等乳幼児が集団で集まる機会がある施設に関連する職種の方を対象とした小冊子「保育所で気をつける血液のお話：血液媒介感染症のことをご存じですか？」を作成した。

D. 考察

保育所入所待機児童ならびに保育施設入所児童者数が年々増加傾向にあり、また低年齢化しているのも現状である。このことから、乳幼児の集団生活における

感染症対策は益々重要となっている。

保育関係者への正確な情報の提供と感染症に関する啓発が必要であり、特に、血液や浸出液に関する注意事項の徹底が必要と考えられた。

昨年、一昨年に実施した施設長と保育士への調査とは異なり、今年度は保健師や看護師等の医療職への調査であったこと、昨年度に本研究班の結果説明を兼ねて研修会を開催したこともあり、知識保有率は高かったが、不十分な点も残されていた。

B型肝炎ウイルスを保有している、していないにかかわらず、血液媒介感染症全体に対する啓発が必要であり、今年度本研究班で作成した教育啓発用の小冊子を保育関係者に配布し、血液媒介感染症に関する知識を伝えたい。

B型肝炎に関しては、知識の普及のみでは不十分と言わざるを得ない。教育啓発と並行して、WHO が推奨している universal vaccination の必要性があると思われた。

E. 結論

乳幼児期の B型肝炎ウイルス水平感染予防の観点から、保育関係者への正確な情報の提供と血液媒介感染症に関する教育啓発が必要と考えられたことから教育啓発用の小冊子を作成した。乳幼児施設では、医療機関と同様に、血液や浸出液に関する注意事項の徹底が必要である。保育施設での B型肝炎ウイルス感染症の水平感染を予防するためには、教育啓発に加えて、現行の母子感染予防

の徹底ならびに universal vaccination が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 多屋馨子: 特別講座 「保育園における感染症対策」～感染症の基本的な理解と予防・対応策について. 第 19 回保育園保健セミナー. 平成 21 年 6 月. 埼玉県

2) 多屋馨子: 「保育園での感染症対策」～予防接種で予防可能疾患について～. 横浜市医師会保育園医部会第 17 回研修講演会. 平成 21 年 7 月. 横浜市

3) 多屋馨子: 保育園における感染症とその予防. 川崎市公立保育園保育士会研修. 平成 21 年 10 月. 川崎市

4) 多屋馨子: 小児ワクチンの現状と課題. シンポジウム I ワクチンで予防可能な疾患: 徹底討論. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 平成 21 年 10 月. 東京

5) 多屋馨子: 子どもの予防接種と感染症. 平成 21 年度東京都第 7 回母子保健研修. 平成 21 年 12 月. 東京

3. その他

小冊子: 「保育所で気をつける血液のお話: 血液媒介感染症のことをご存じですか?」

G. 知的所有権の取得状況

なし

図1 おむつ交換時の手袋着用

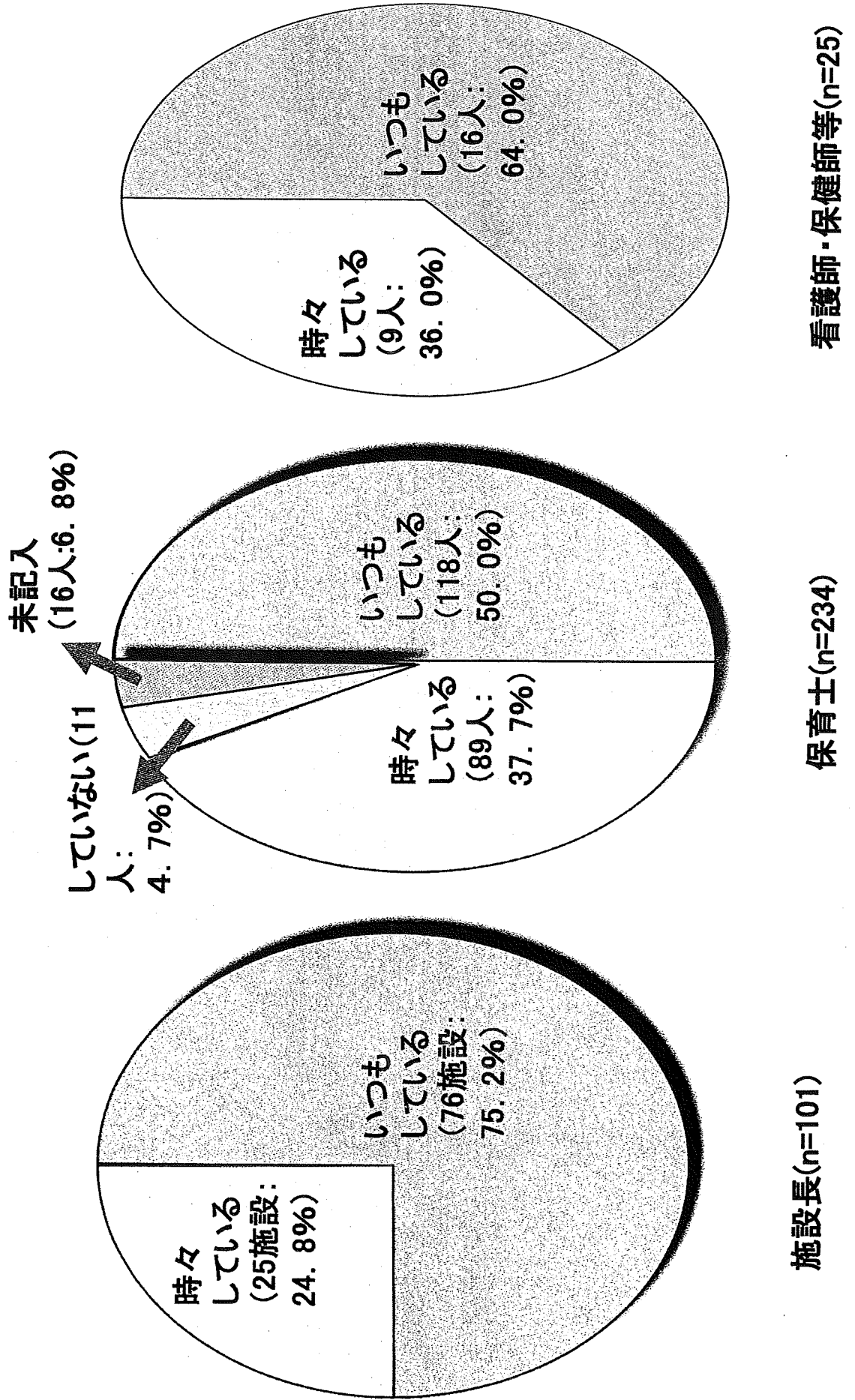


図2 出血処置の際の手袋着用

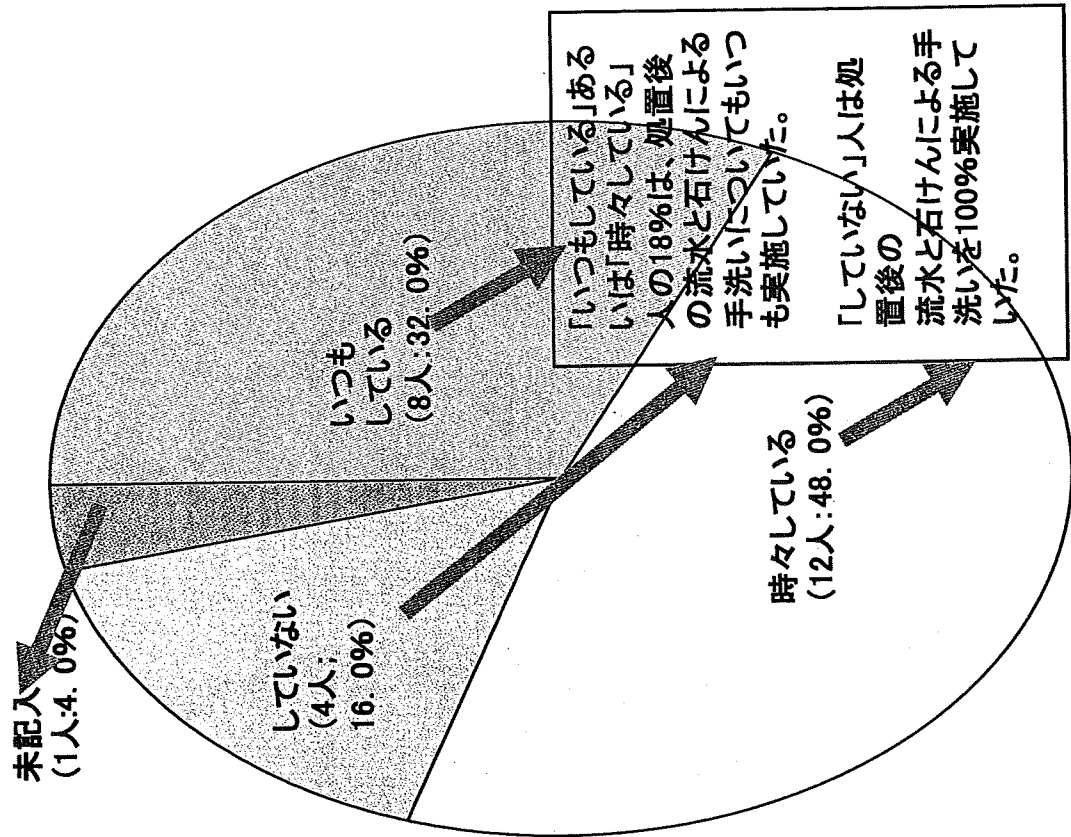
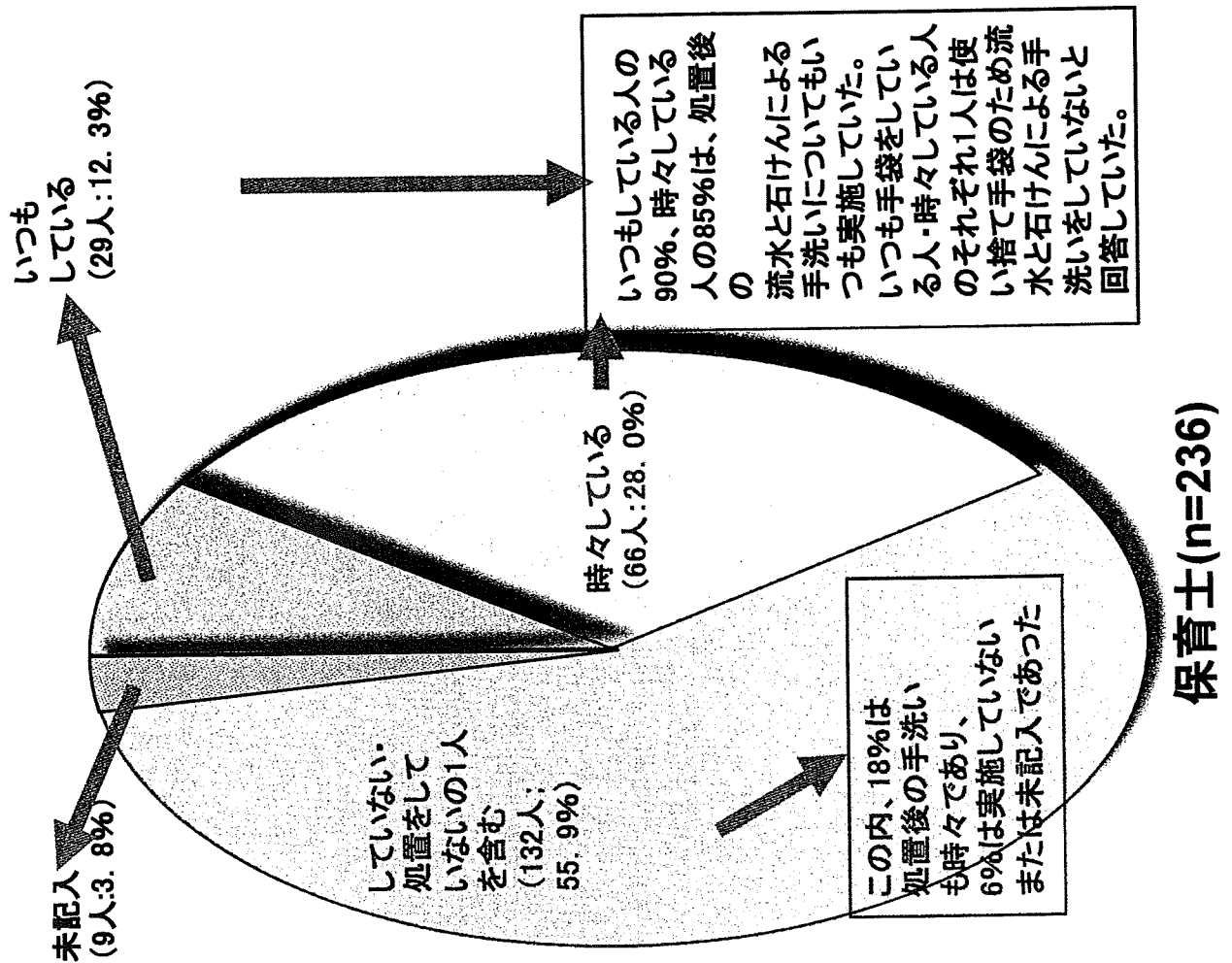


図3 鼻血の処置の際の手袋着用

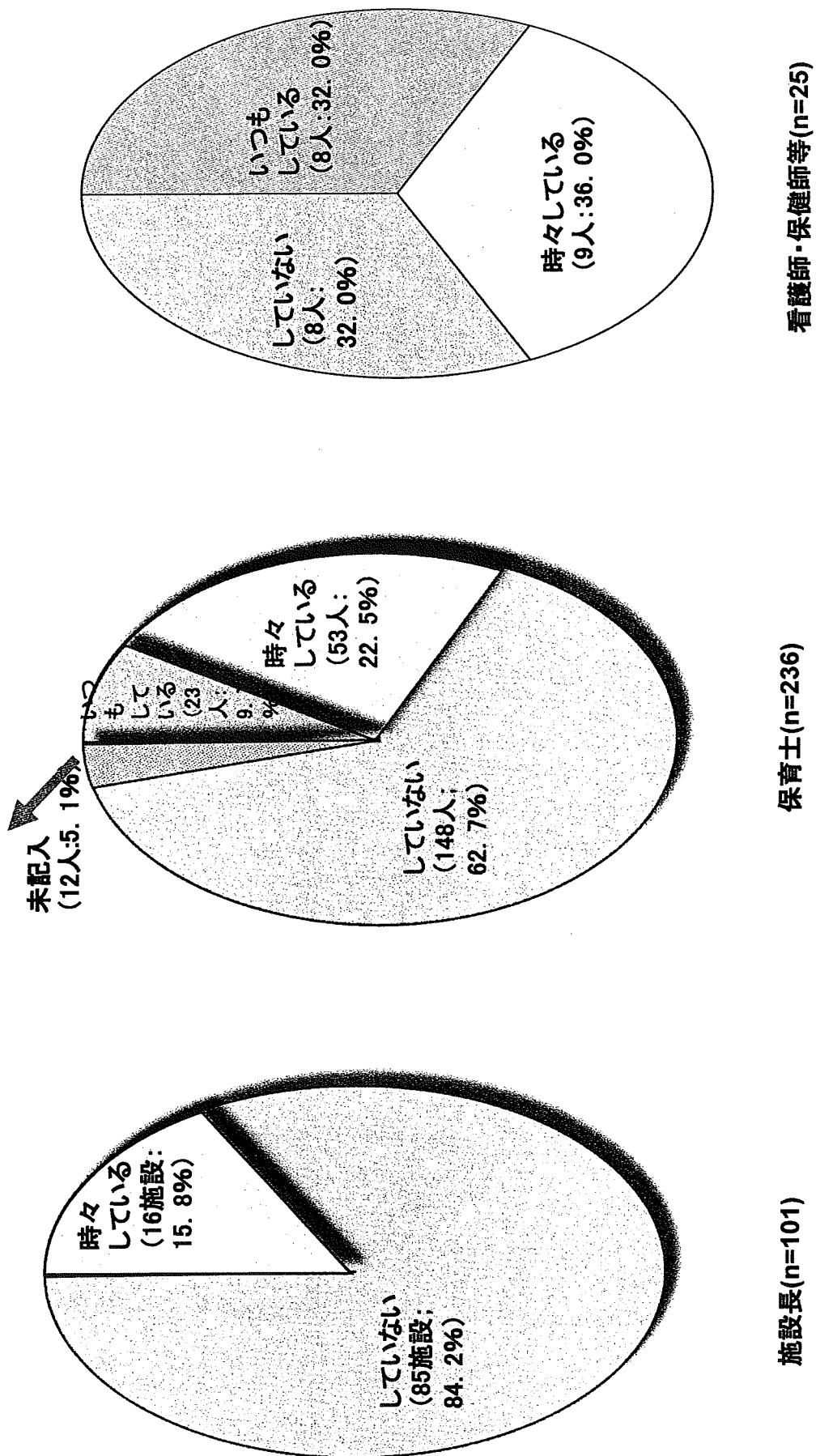
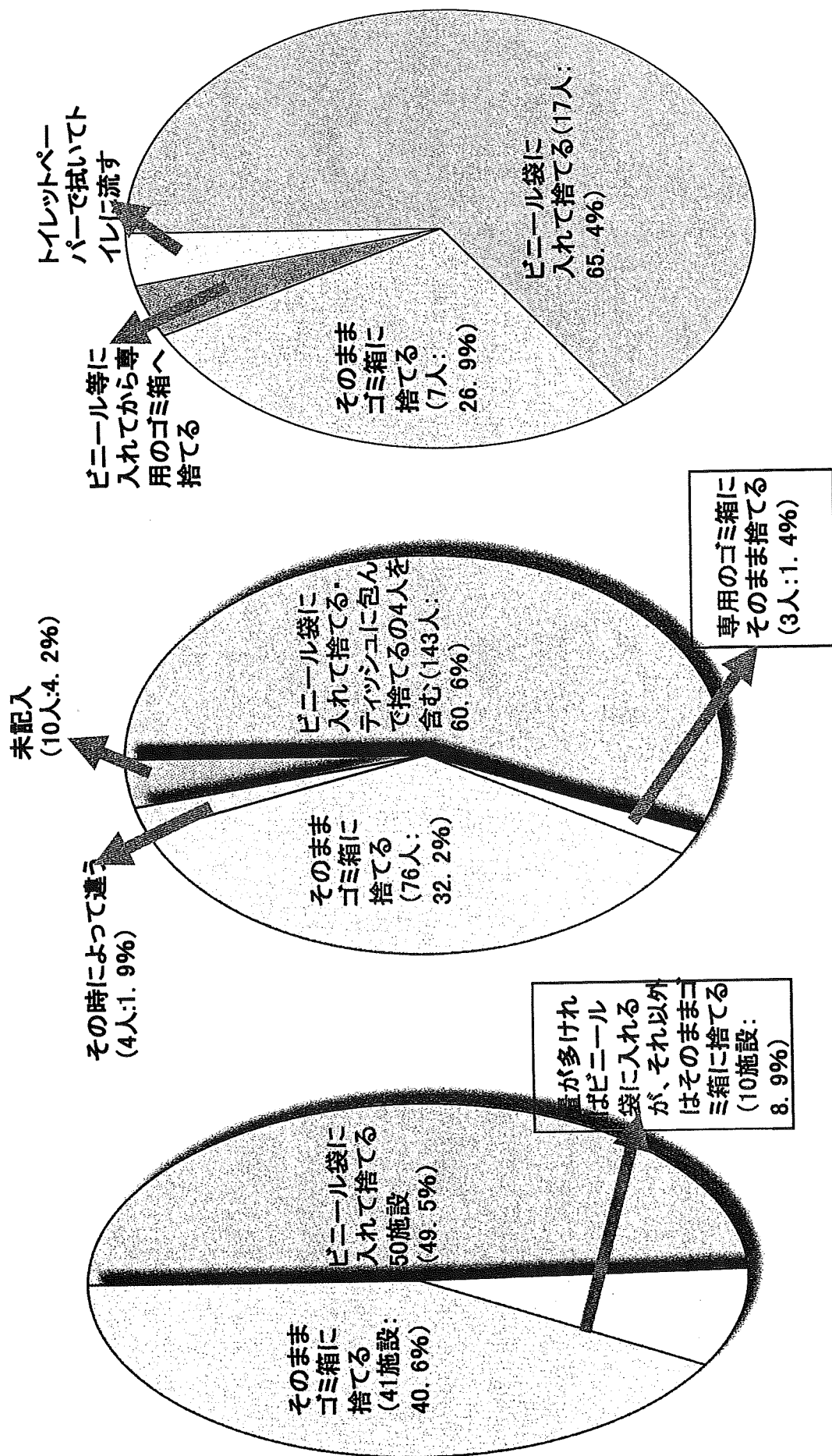


図4 血の付いた綿球の処置

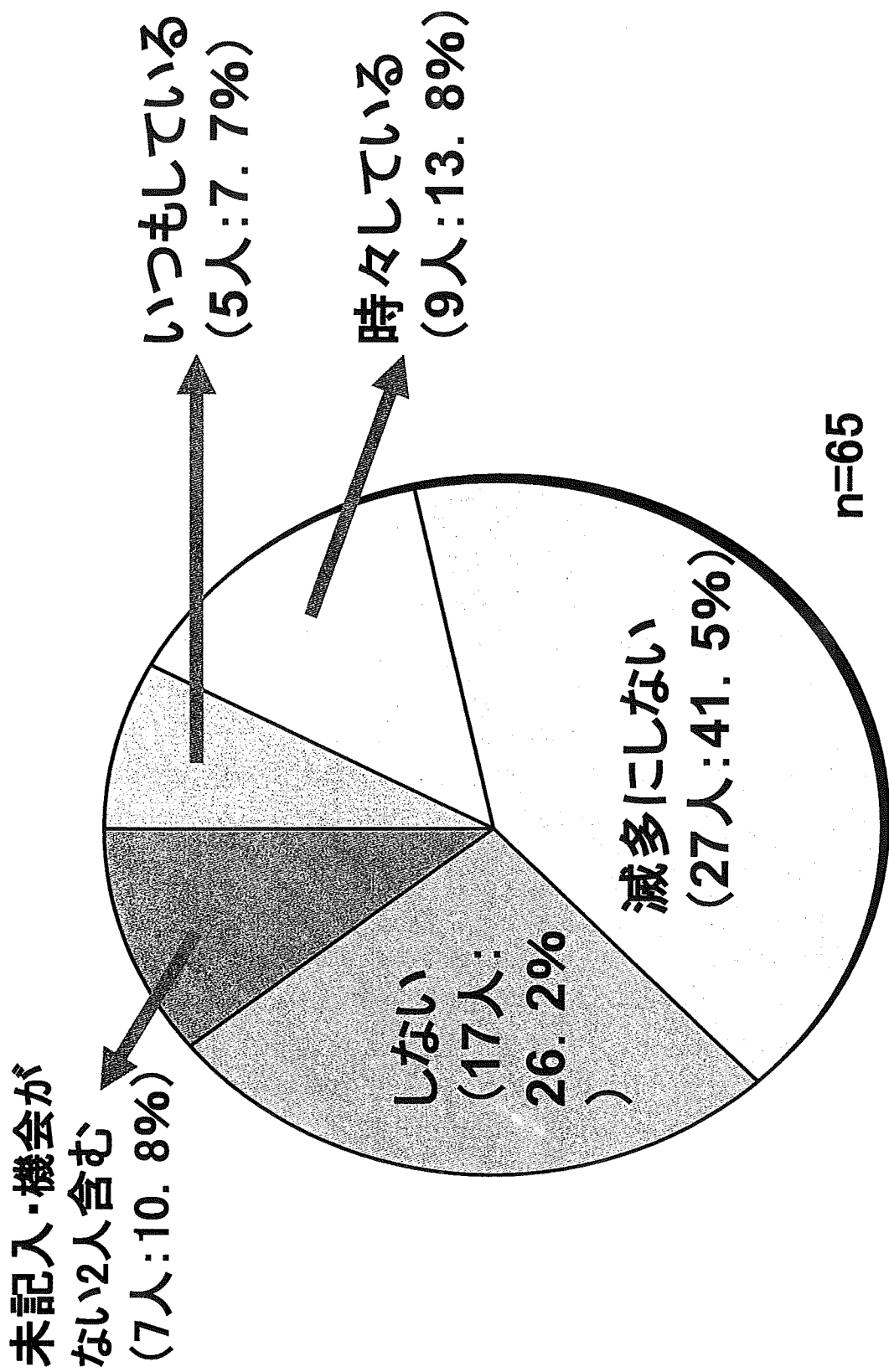


施設長(n=101)

保育士(n=236)

看護師・保健師等(n=25)

図5 市職員(看護師・保健師等)への質問:血液媒介感染症の教育



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)
肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築班
(研究代表者:水落利明)

分担研究報告書

小児の HBV 水平感染の実態に関する検討

研究協力者 恵谷 ゆり (大阪府立母子保健総合医療センター)

研究分担者 多屋 馨子 (国立感染症研究所感染症情報センター)

研究要旨:

我が国に B 型肝炎ウイルス(HBV)母子感染予防処置が導入された 1986 年以降にどのような小児における HBV 感染症が発生しているのかを明らかにするために、1986 年以降大阪府立母子保健総合医療センター消化器・内分泌科を受診した HBV 感染症 32 例を後方視的に検討した。うち母子感染は 19 例 (59%) を占めていたが、父子感染が 7 例 (22%)、父子感染以外の水平感染が 6 例 (19%) 存在した。従来主要な感染経路であった母子感染が予防処置により軽減しているが、その一方で 4 割もの小児が父子・水平感染により HBV 感染をきたし、その大部分がキャリア化していることから、乳児期早期からの HB ユニバーサルワクチンの導入が強く望まれる

A. 研究目的

我が国では 1986 年から HB 母児感染予防処置が施行されているが、HB ユニバーサルワクチンは未だに導入されていない。1986 年以降、どのような小児 HBV 感染症が発生しているのかを明らかにし、日本における HBV 感染予防の問題点を検討する。

B. 研究方法

1986 年から 2009 年 5 月までに大阪

府立母子保健総合医療センター消化器・内分泌科を受診した HBV 感染症の小児 32 例 (男児 16 例、女児 16 例) の診療録を後方視的に検討した。

C. 研究結果

HBV 感染症と診断された年齢は 0 歳～14 歳で、平均年齢は 3 歳であった。母児感染例は大部分が生後 3 ヶ月までに診断されていたが、幼児期以降に診断された例も 3 例あり、フォロー

が不十分であることが示唆された(図1)。感染経路は母児感染が19例(59%)、父子感染が7例(22%)、水平感染が6例(19%)であり、父子・水平感染が4割を占めていた(図2)。母子感染例のうち子宮内感染が9例(47%)、予防処置不完全施行が2例(11%)、詳細不明が8例(42%)であった。父子感染例ではHBワクチン投与を受けていた例はなかった。水平感染6例中輸血歴のあるものが3例あったが、全例日赤でHBVのスクリーニングを受けた血液の投与を受けていた。32例の臨床経過であるが、うち15歳で継父から感染した例以外は全例キャリア化し、そのうちセロコンバージョンを確認できたのは13例(41%)であった。ただしそのうちの1例はセロコンバージョン後もHBV-DNA高値で肝機能異常が遷延している。セロコンバージョンしていない18例のうち2例で軽度の慢性肝炎を認めている。IFN療法は男児4例、女児1例で施行した。基本的に天然型IFN-a10 MU/Kg週3回皮下注射を6ヶ月間施行し、5例中4例でセロコンバージョンが得られた。肝生検は9例で施行し、うち6例は線維化なし、2例は軽度の線維化のみであったが、上記のセロコンバージョン後も肝炎が遷延している例ではbridging fibrosisを認めた。

D. 考察

我が国の50歳以上のHBV感染率は1~2%だが、1986年以降に出生した世代ではHBVの母児感染予防処置によってHBVキャリアは激減し、HBV感染者は0.02%まで減少している。しかし今回の我々の検討でも明らかになったように、未だにいくつかの問題点が挙げられる。まず、現在の母児感染予防処置では胎内感染を防ぐことはできない。妊娠後期における抗ウイルス剤の内服やHBIGの投与が試みられている国もあるが、日本では推奨されていない。また、予防処置の不完全履行によるキャリア化が未だに発生していることは非常に問題である。母児感染予防処置が保険適応となってから、対象者の把握漏れが増えているとの指摘もある。我が国の複雑な予防処置スケジュールを、より簡便な国際方式(HBグロブリンは出生時の1回投与のみ、HBワクチンは出生時、生後1ヶ月時、3ヶ月時に接種)に変更することも予防漏れを防ぐ一助になると考えられる。

このようにして、もっとも重要な感染経路である母児感染例をより確実に減らしていくことは大切であるが、一方で我が国ではHBユニバーサルワクチンが導入されていないため、乳幼児期に父子感染や保育所内感染などの水平感染によってHBVに感染し、

キャリア化してしまう例が少なからず見られており、我々の検討でも実にHBキャリア児の4割を占めていた。成人ではGenotype Aによる急性B型肝炎による水平感染が都市部で急増しており、感染後のキャリア化が危惧されているが、このような乳幼児期の父子感染・水平感染を防ぐためにも、出生後早期のHBユニバーサルワクチンの導入が強く望まれる。

E. 結論

- ・ HBV の胎内感染を防ぐ方法に関する検討が必要である。
- ・ HBV 母児感染予防処置を完遂し、HBV 感染が成立していないことを確認するべきである。
- ・ HBV キャリアの家族はHBワクチン接種を勧められなければならない。
- ・ WHO 加盟国の 88%にあたる 171 カ国でHB-UV が導入されており、日本でも早期の導入が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

恵谷ゆり 日本で接種できる任意接種のワクチン:B型肝炎ワクチン

チャイルドヘルス特集「定期接種以外のワクチンも子どもには大切です」2010; 1: 31-33.

2. 学会発表

恵谷ゆり、池田佳世、中長摩利子、庄司保子、位田忍。当科におけるB型肝炎ウイルス感染症32例に関する検討。第36回日本小児栄養消化器肝臓学会、札幌、2009.10.9-11

Yuri Etani, Kayo Ikeda, Mariko Nakacho, Yasuko Shohji, Shinobu Ida. Clinical analysis of 32 children with hepatitis B virus infection in Japan: a 23-year single institution experience. 11th Asian Pan-Pacific Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. ソウル、2009.9.25-28

図1 診断時年齢と感染経路

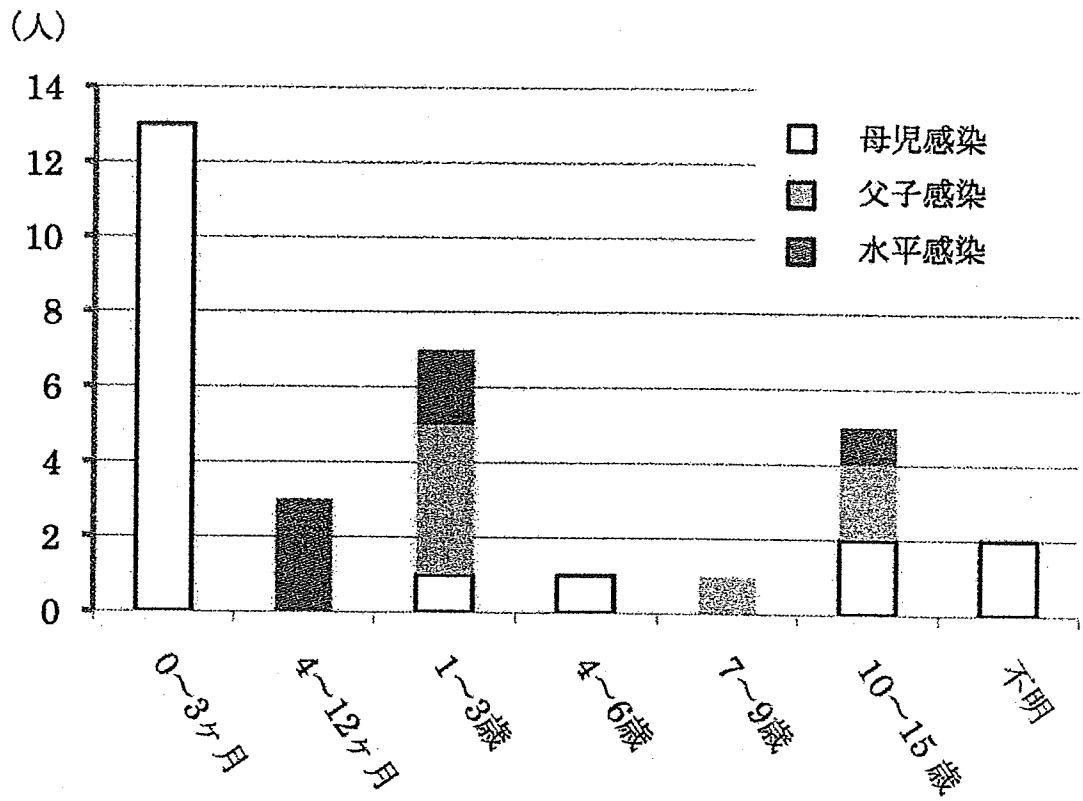
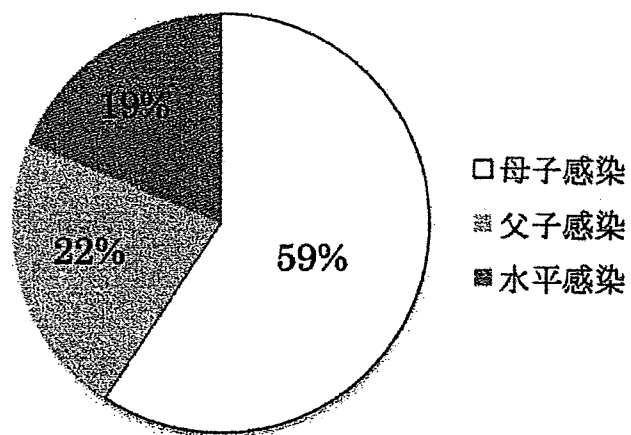


図2 感染経路の割合



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）
肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築
21年度 分担研究報告書

HBs 抗体の in-vivo での
感染阻止能定量のための基礎実験
-受動免疫後のヒト肝細胞置換キメラマウスへの HBV 感染実験-

分担研究者 片山恵子¹⁾
研究協力者 田中純子¹⁾、松尾順子¹⁾、田淵文子¹⁾、
吉澤浩司²⁾

- 1) 広島大学大学院 疫学・疾病制御学
2) 広島大学名誉教授

研究要旨

本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染を防御する HBs 抗体価を明らかにすることを目的としている。まず、HBs 抗体の in-vivo での感染阻止能を定量する基礎を確立するための実験を行った。

すなわち、

1. SCID マウス (15 匹) を用いた同一個体での HBIG 投与量別にみた受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移、
2. ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV genotype 別 (genotype A 及び genotype C) の最少感染価の標準化実験、
(接種材料は、チンパンジーを用いた感染実験ですでに最少感染価が明らかとなっている感染材料を用いて、各 genotype 別に 10^1 コピー、 10^0 コピーを接種する 2 群、各群 3 匹ずつ)
3. ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた、HBIG による受動免疫後の HBV 感染実験 (1) ~ (4)
 - (1) HBIG (50ul: 10IU/回)を連日 5 回投与後に HBV (genotype A)を 10^5 コピー、 10^3 コピー、 10^1 コピー接種する実験 (各群 3 匹)、
 - (2) HBIG (50ul: 10IU/回)の投与量を連日 5 回投与、連日 3 回投与、1 回投与の 3 群に調整し、HBV genotype 別 (genotype A&genotype C) に 10^5 コピー接種する実験 (各群 3 匹×3 群×2 群)、

- (3) HBIG を減量 (2 倍希釈したものを 25ul: 2.5IU/回)し、投与回数を連日 3 回、1 回投与の 2 群として HBV genotype A を 10^5 コピー接種する実験 (各群 3 匹)、
- (4) HBIG を減量し、2 倍希釈したもの (25ul: 2.5IU/回) と 4 倍希釈したもの (25ul: 1.25IU/回)をそれぞれ 1 回投与後に HBV genotype A を 10^5 コピー接種する実験 (各群 3 匹)、
- を行い、末梢血中の HBs 抗体価を経時的に定量、
4. チンパンジーを用いた感染実験で最少感染価がすでに明らかとなっている感染材料 HBV genotype A を用いて、最大ウイルス量 10^5 コピーをヒト肝細胞置換キメラマウスに接種し、HBV 感染動態を観察 (計 3 匹)、
- である。

今年度は、3 年計画の 3 年目であり、3. の(2)、(3)、(4)を実施したが、3. の(3)を実施したところ、不測の事態が発生し、(3)は再実験の実施を余儀なくされ、さらにはその原因究明のため、急遽 4.を実施した。現在も実験は実施継続中である。

本報告書において前年度実施継続中であった 1. 及び今年度結果を得られた 3. の(2)、(3)について報告する。3.の(4)及び 4.については、実験を継続中であり、さらなる究明を必要としている。

今年度の研究では、HBIG 量を 2.5IU/回に減量し、3 回連日投与及び 1 回投与の受動免疫を行った後、HBV genotype A 10^5 コピーを接種した実験において感染の防御が成立しており、末梢血中の HBs 抗体が HBV 接種時に 1000mIU/ml においては感染が防御されることが明らかとなった。

今後、さらに HBs 抗体価を調整した感染実験を行い、感染ウイルス量とその感染を防御した抗体価の量的関連性をもとに、感染防御抗体能の解析を行う予定である。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染を防御する HBs 抗体価を明らかにすることを目的として、HBV 感染に感受性を有するヒト肝細胞置換キメラマウスに抗 HBs 免疫グロブリン(HBIG)による受動免疫後に感染実験を実施し、in-vivo での HBs 抗体の HBV 感染阻止能を定量するための基礎を確立する。

B. 対象と方法

1) SCID マウスを用いた同一個体での HBIG 投与量別にみた受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移 (1.、前年度より継続) (図-1)

(1)実験動物

ヒト肝細胞非置換 SCID マウス(SCID: Severe combined immunodeficiency disease mouse)計 15 匹を用いた。

(2) 受動免疫に用いた HBIG

抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG:日赤製、Lot No.2B020) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3)HBIG 投与方法

計 15 匹のヒト肝細胞非置換 SCID マウスを各群 3 匹ずつ、HBIG 連日 5 回投与、4 回投与、3 回投与、2 回投与、1 回投与群の 5 群に分け、HBIG を 1 日 1 回 50ul ずつ、後脚大腿部筋肉内に注射した。

(4)採血

各群とも、筋注後 48 時間目、1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、5 週目、6 週目、7 週目、8 週目に採血し、血中の HBs 抗体価を同時測定した。

(5)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 HBs 抗体価 (mIU/ml) を測定した。

2) HBIG の投与量を調整した受動免疫実施後に、HBV genotype A と genotype C をそれぞれ接種材料とした HBV の感染実験-1 (3.の(2)) (図-2)

(1)実験動物

ヒト肝細胞置換キメラマウス(以下キメラマウスと略記する)を計 18 匹用いた。

(2) 受動免疫に用いた HBIG

前述の基礎実験と同一の抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG:日赤製、Lot No.2B020) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3)接種材料

a) genotype A の接種材料 P-57 :

ヒト(献血者)由来の HBV 感染早期の新鮮凍結血漿(FFP)を接種後 57 日目のチンパンジーの血清で、HBV のジェノタイプ

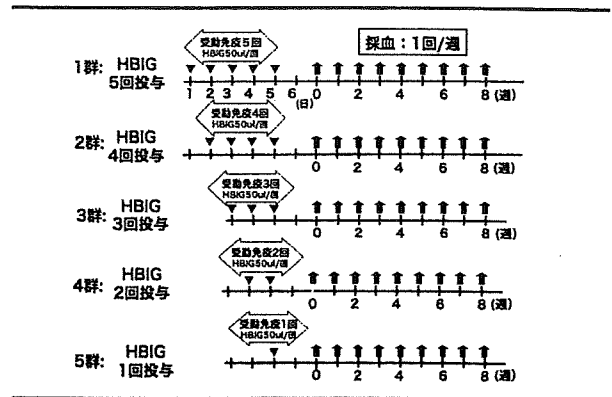


図-1. 基礎実験プロトコール: SCIDマウスにおけるHBIG投与回数を調整したHBs抗体価の検出

A、HBV DNA 量 2.6×10^6 コピー/ml、HBc 抗体陰性である¹⁾。

この血清をチンパンジーに接種した場合の感染価(Chimpanzee Infectious Dose: CID)は、 10^1 コピーである¹⁾。

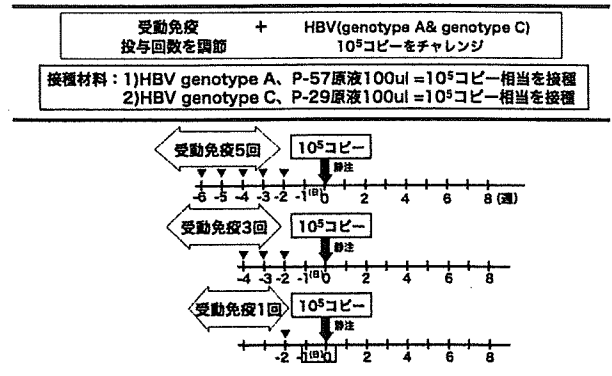


図-2. 実験1: プロトコール

b) genotype C の接種材料 P-29 :

ヒト(献血者)由来の HBV 感染早期の新鮮凍結血漿(FFP)を接種後 29 日目のチンパンジーの血清で、HBV のジェノタイプ C、HBV DNA 量 3.0×10^6 コピー/ml、HBc 抗体陰性である¹⁾。

この血清をチンパンジーに接種した場合の感染価(CID)も、 10^1 コピー¹⁾である。

(4)HBIG 投与方法

接種する genotype 毎に、1 回 HBIG 50ul を連日 5 回筋注する群、連日 3 回筋注する群、1 回筋注する群の 3 群に分け、各群 3 匹ずつ、HBIG を筋注した。

(5)HBV 接種

各群の HBIG 筋注終了から 48 時間後に、genotype 別 (genotype A、genotype C) に接種材料 10^5 コピー相当をキメラマウスに接種した。

週 1 回採血をして感染成立の有無を接種後 8 週目まで観察した。観察終了時に、末梢血中の 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 HBs 抗体価 (mIU/ml) を測定した。

3) HBIG の投与量をさらに減量した受動免疫実施後に、HBV genotype A を接種材料とした HBV の感染実験-2 (3.の(3)) (図-3)

(1)実験動物

ヒト肝細胞置換キメラマウス(以下キメラマウスと略記する)を計 6 匹用いた。

(2) 受動免疫に用いた HBIG

前述の基礎実験と同一の抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG: 日赤製、Lot No.2B020) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3)接種材料

前述の接種材料と同一である (genotype A の接種材料) を用いた。

(4)HBIG 投与方法

HBIG200IU/m を生食にて 2 倍に希釈し、これまでの投与量の半量の 1 回 25ul (2.5IU)を連日 3 回筋注する群、1 回筋注する群の 2 群に分け、各群 3 匹ずつ、HBIG を筋注した。

(5)HBV 接種

各群の HBIG 筋注終了から 48 時間後に、genotype A の接種材料 10^5 コピー相当をキメラマウスに接種した。

週 1 回採血をして感染成立の有無を接種後 8 週目まで観察し、観察終了時に、末梢血中の 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 HBs 抗体価 (mIU/ml) を測定した。

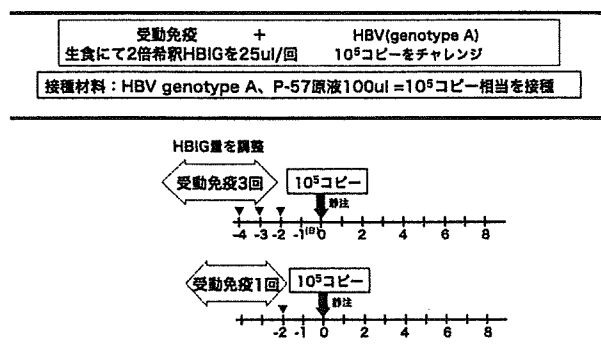


図-3. 実験2: プロトコル

4) HBIG の投与量をさらに減量した受動免疫実施後に、HBV genotype A を接種材料とした HBV の感染実験-3 (3.の(4)) (実施継続中)

(1)実験動物

ヒト肝細胞置換キメラマウス(以下キメラマウスと略記する)を計 6 匹用いた。

(2) 受動免疫に用いた HBIG

前述の基礎実験と同一の抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG: 日赤製、Lot No.2B020) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3)接種材料

前述の接種材料と同一である (genotype A の接種材料) を用いた。

(4)HBIG 投与方法

HBIG200IU/m を生食にて 2 倍に希釈し、投与量 1 回 25ul (2.5IU) を 1 回筋注する群と HBIG 200IU/m を生食にて 4 倍に希釈し、投与量の 1 回 25ul (1.25IU) を 1 回筋注する群の 2 群に分け、各群 3 匹ずつ、HBIG を筋注した。

(5)HBV 接種

各群の HBIG 筋注終了から 48 時間後に、genotype A の接種材料 10⁵ コピー相当をキメラマウスに接種した。

週 1 回採血をして感染成立の有無を接種後 8 週目まで観察し、観察終了時に、末梢血中の HBs 抗体価を同時測定する。

5) HBV genotype A 接種材料として 10⁵ コピーを接種する HBV の感染実験-4 (4. control 実験) (実施継続中)

(1)実験動物

ヒト肝細胞置換キメラマウス(以下キメラマウスと略記する)を計 3 匹用いた。

(2)接種材料

genotype A の接種材料を用いた。

(3)HBV 接種

genotype A の接種材料 10⁵ コピー相当をキメラマウスに接種した。

週 1 回採血をして感染成立の有無を接種後 8 週目まで観察する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、倫理審査を行い、実施している。また、マウスの採血時にはイソフルラン麻酔下で行っている。

C. 結果

1) SCID マウスを用いた同一個体での HBIG 量別にみた受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移

HBIG の投与回数別にみた末梢血中の HBs 抗体価を測定した (図-4-a)。

HBIG4 回から 1 回投与群については、投与回数に応じた、投与後 2 日目の HBs 抗体価の上昇が認められ、1 週間後に約 1/2 の HBs 抗体価を示した。

しかし、5 回投与群については、十分な上昇を認めず、追加の再実験を行った (図-4-b)。追加実験においても、個体ごとの HBs 抗体価の上昇にばらつきを認めた。

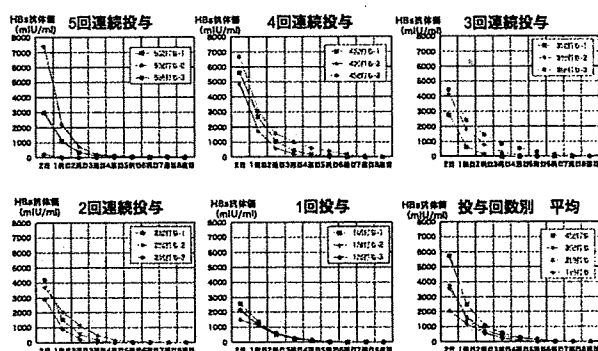


図-4-a). 基礎実験結果-1: SCIDマウスにおけるHBIG投与回数別にみたHBs抗体価の推移

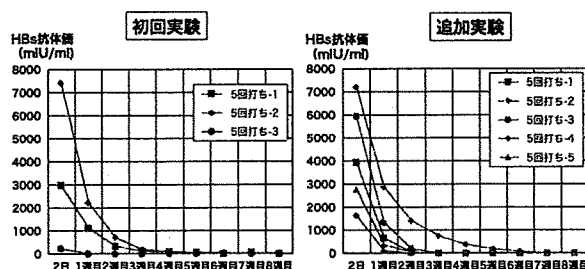


図-4-b). 基礎実験結果-2: SCIDマウスにおけるHBIG投与回数別にみたHBs抗体価の推移
HBIG5回投与の追加実験結果

2) HBIG の投与量を調整した受動免疫実施後に、HBV genotype A と genotype C をそれぞれ接種材料とした HBV の感染実験-1 (図-5)

HBV genotype A 10^5 コピーを接種材料とした HBIG の投与回数を 5 回連日、3 回連日、1 回投与の 3 群いずれも 8 週目までの観察で HBV DNA を検出せず、感染防御が成立した。また、経過中の末梢血中の HBs 抗体価の推移をみると HBIG 投与終了後 2 日目には HBs 抗体価は十分に上昇し、HBV 接種後 1 週目には、いずれの群も 1000~2000mIU/ml を維持し、ほぼすべての個体で接種後 8 週目まで HBs 抗体陽性となっていた (図-5 の 1))。HBV genotype C 10^5 コピーを接種材料とした実験においてもいずれの群も感染防御が成立し、末梢血における HBs 抗体価の推移も同様であった (図-5 の 2))。

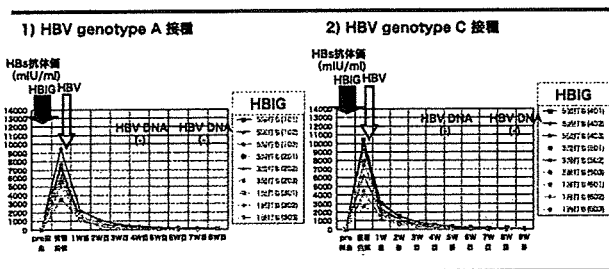


図-5. 実験-1結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移

3) HBIG の投与量をさらに減量した受動免疫実施後に、HBV genotype A を接種材料とした HBV の感染実験-2 (図-6)

HBIG の 1 回の投与量をこれまでの 4 分の 1 量として、連日 3 回打ち、1 回打ちの 2 群で、HBV genotype A 10^5 コピーを接種したところ、連日 3 回打ちの 3 匹のうち、1 匹は HBV 接種後 1 日目に死亡し、HBIG1 回打ちの 3 匹中 1 匹は接種後 1 日目、1 匹は 3 日目に死亡した。

生存した HBIG 3 回連日投与の 2 匹及び 1 回投与の 1 匹は、8 週目まで経過を観察し、いずれも HBV DNA は検出せず、感染防御が成立した。

また、経過中の末梢血中の HBs 抗体価の推移をみると HBIG 投与終了後 2 日目には HBs 抗体価は十分に上昇し、HBV 接種時には、3 回投与群は 2000mIU/ml を維持し接種後 7 週目まで HBs 抗体陽性となっていた。1 回投与群の 1 匹は HBV 接種時には、HBs 抗体価は 1000mIU/ml を維持し、接種後 1 週目には、300mIU/ml であり、接種後 4 週目まで HBs 抗体陽性となっていた。

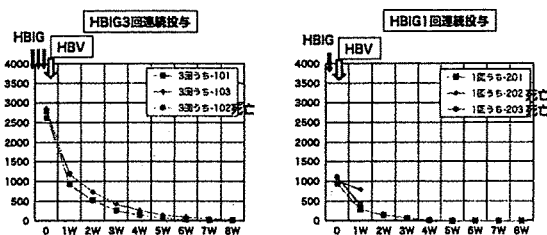


図-6. 実験-2結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移

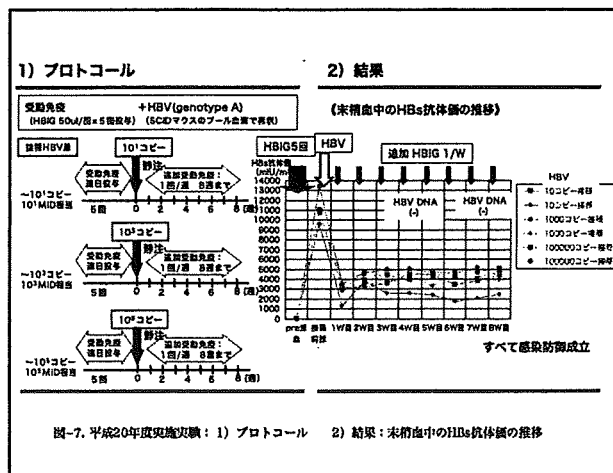


図-7. 平成20年度実施実験: 1) プロトコル 2) 結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移