

- (1) HBIG (50ul: 10 IU/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: 2.5 IU/回) と 4 倍希釈したもの(25ul:1.25 IU/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) (現在実施中)、
- 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) (現在実施中)、
- である。

上記の 3 年計画の実験を実施した結果、以下の事項が明らかとなった。

- 1) HBIG による受動免疫後の末梢血中における HBs 抗体価の経時的推移をヒト肝細胞非置換の SCID マウスで観察したところ、受動免疫による HBs 抗体価の経時的減衰は、ヒト (半減期 2~3 週間) に比べて約 1 週間と速いこと。
 - 2) チンパンジーでの最少感染価がこれまでに明らかとなっている HBV genotype 別 (genotype A および genotype C) の接種材料を用いたヒト肝細胞置換キメラマウスにおける最少感染価は、個体による差も考慮し、今後、検討の必要がある。
 - 3) HBIG 量を調整して受動免疫を行い、HBV genotype A の 10^5 コピーの感染が防御される感染実験を試みたが、現時点では HBIG を 2.5IU/回 1 回投与により、感染の防御が成立した。現在もさらに HBIG 量を減量した感染実験を進行中である。
 - 4) チンパンジーでの最少感染価がこれまでに明らかとなっている HBV genotype A の接種材料の最大ウイルス量 10^5 コピーをヒト肝細胞置換キメラマウスに接種した感染実験は現在実施中である。
- 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 HBIG による受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移

1) 「HBIG の投与回数別にみた HBs 抗体価の上昇」 (平成 19 年度報告)

(1) 実験動物

ヒト肝細胞非置換 SCID マウス(SCID: Severe combined immunodeficiency disease mouse)計 12 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) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3) HBIG 投与方法

HBIG50ul/回を各群 3 匹ずつ、連日 5 回投与、3 回投与、2 回投与、1 回投与群の 4 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 時間後に採血し、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) 「HBIG5 回投与後の HBs 抗体価の減衰」

(平成 19 年度報告)

(1) 実験動物

SCID マウス計 10 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) HBs 抗体価 200 IU/ml を用いた。

(3) HBIG 投与方法

各群 2 匹ずつ、HBIG を 1 日 1 回 50ul 連日 5 回投与し、後脚大腿部筋肉内に注射した。

(4) 採血

筋注後 48 時間後に採血する群、7 日後に採血、14 日後に採血、28 日後に採血、56 日後に採血の 5 群に分け、全採血を行い、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。

3) 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 (平成 20~21 年度報告) (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。

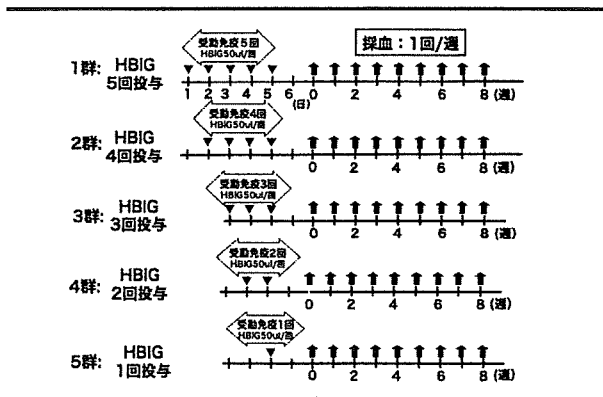


図-1. 実験 1-3) :プロトコル
SCIDマウスにおけるHBIG投与回数別にみたHBs抗体価の推移

(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. 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

(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)計12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、感染価が明らかとなっている genotype Aと genotype Cの感染材料を用いた¹⁾。

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)を接種してHBV感染したチンパンジーの接種後57日目の血漿

で、HBVのジェノタイプA、HBV DNA量 2.6×10^6 コピー/ml、HBc抗体陰性である(図-2)。

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 コピーであり¹⁾、キメラマウスに接種した場合の感染価(Mouse Infectious Dose: MID)は 10^0 コピーである²⁾。

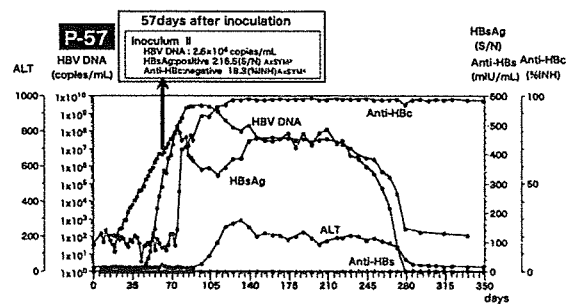


図-2. 実験 2.
HBV genotype Aの感染早期のヒト新鮮凍結血漿を接種した経過図

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)を接種後感染したチンパンジーの接種後29日目の血漿で、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(図-3)。この血清をチンパンジーに接種した場合の感染価(CID)は、 10^1 コピー¹⁾である。

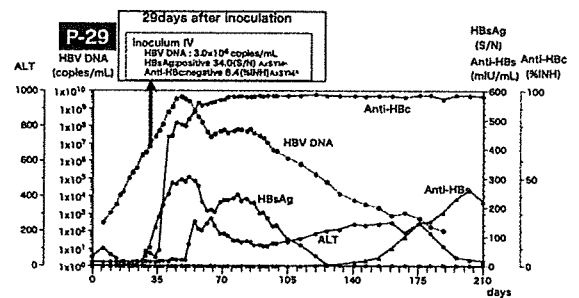


図-3. 実験 2.
HBV genotype Cの感染早期のヒト新鮮凍結血漿を接種した経過図

(3) 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。

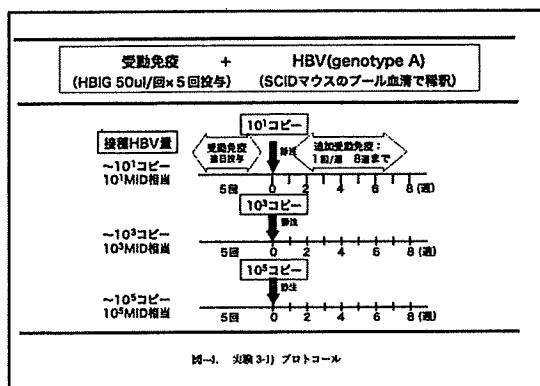
(4) 標準化実験用感染材料の調製

上記(2)に記述した接種材料を、ヒト肝細胞非置換 SCID マウスのプール血清を用いてそれぞれ $1:10^1 \sim 1:10^5$ まで 10^N 倍ずつ段階希釈した。さらに各希釈サンプル中の HBV DNA 量を測定し (表-1)、希釈が正しく行われていることを確認した後に接種材料として用いた。

(5) HBV genotype 別の最少感染価の標準化実験

接種材料の genotype 別にそれぞれキメラマウスを 2 群に分け、各群 3 匹ずつにそれぞれ 10^1 コピー相当、 10^0 コピー相当の HBV を接種した。1 週間毎に 8 週目まで採血を行い、感染成立の有無を観察した。

表-1. 感染材料の調製とそのHBV DNA量					
HBV genotype A					
	10 ^N 倍段階希釈				
接種材料 (P-57鼠血清)	1:10 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
HBV DNA コピー/ml	2.6×10 ⁸	4.0×10 ⁵	5.0×10 ⁴	2.0×10 ³	2.0×10 ²
HBV genotype C					
	10 ^N 倍段階希釈				
接種材料 (P-29鼠血清)	1:10 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
HBV DNA コピー/ml	2.5×10 ⁸	6.3×10 ⁵	5.0×10 ⁴	4.0×10 ³	4.0×10 ²



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 (3. の(1)) (平成 19~20 年度報告) (図-4)

(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) 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

1 回 HBIG 50ul を各群連日 5 回筋注した。

さらに、HBV 接種後には、週に 1 回追加投与を観察終了の 8 週目まで行った。

(5) HBV 接種

各群の HBIG 筋注終了から 48 時間後に、genotype A の接種材料を各群 2 匹ずつ 10^5 コピー相当、 10^3 コピー相当、 10^1 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。

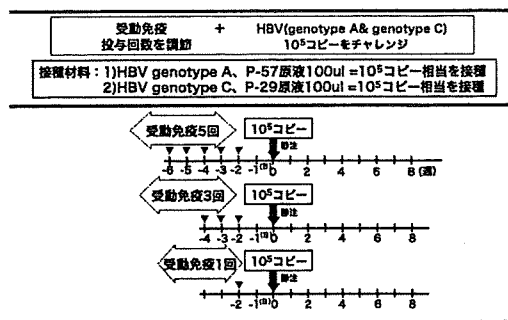


図-5. 実験(3-2) プロトコール

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 10⁵ コピー接種する実験 (3.の(2)) (平成 20~21 年度報告) (図-5)

(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

前述と同一の抗 HBs 人免疫グロブリンを用いた。

(3) 接種材料

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

(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 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 回採血し、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。

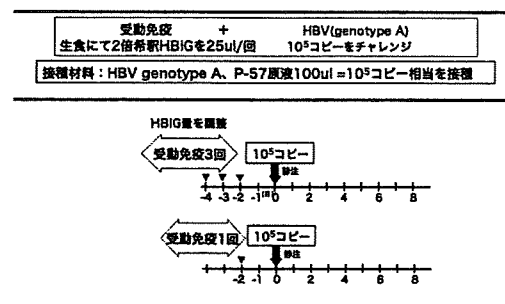


図-6. 実験(3-3) プロトコール

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 感染実験 (3.の(3)) (図-6)

(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

前述と同一の抗 HBs 人免疫グロブリンを用いた。

(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 10⁵ コピー相当をキメラマウスに接種した。

週1回採血を実施し、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。

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.の(4))

(実施継続中) (図-7)

(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)HBs抗体価200IU/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HBIG200IU/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回採血し、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。

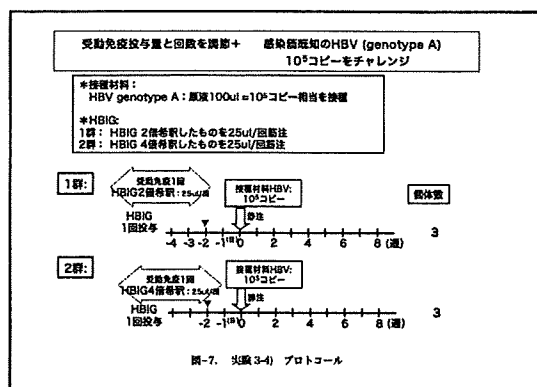


図-7. 実験(3-4) プロトコール

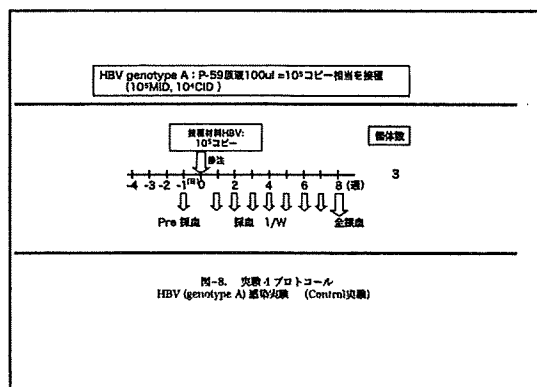


図-8. 実験1 プロトコール
HBV (genotype A) 感染実験 (Control実験)

4. 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. control 実験)(実施継続中) (図-8)

(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

前述の接種材料と同一である(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回採血し、感染成立の有無を接種後8週目まで観察する。

(4) HBV DNAの検出

nested PCR法により行った。

(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 HBIG による受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移

1) 「HBIG の投与回数別にみた HBs 抗体価の上昇」及び「HBIG5 回投与後の HBs 抗体価の減衰」 (平成 19 年度報告) (図-9)

SCID マウスを用いた受動免疫により HBIG の投与回数に応じて末梢血中の HBs 抗体価は上昇し 1 回投与により 3000 mIU/ml まで上昇すること、また、末梢血中における半減期はヒトにおける半減期 (約 2 ~ 3 週間とされている) に比べて短いことが示された。

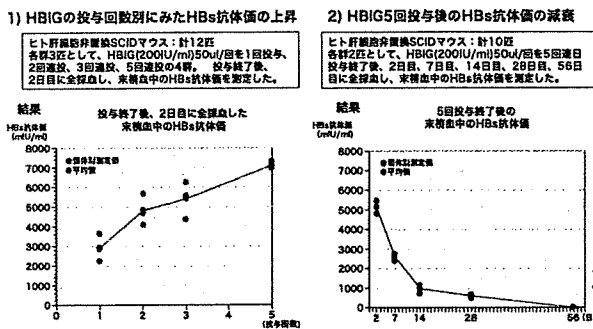


図-9. 実験 1) & 2) 結果
HBIG による受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移

2) 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 (平成 20~21 年度報告)

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-10 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-10 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。

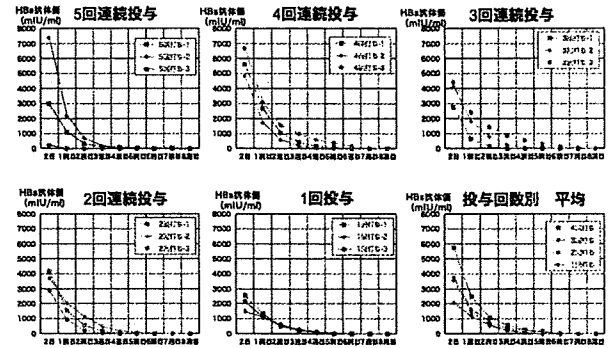


図-10 a). 基礎実験結果-1: SCID マウスにおける HBIG 投与回数別にみた HBs 抗体価の推移

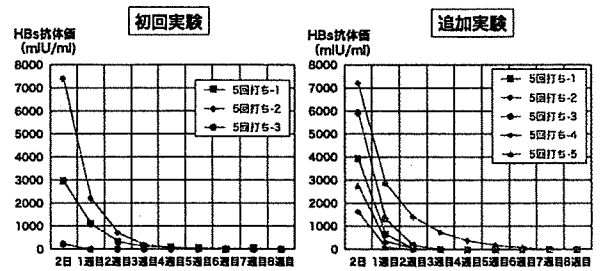


図-10 b). 基礎実験結果-2: SCID マウスにおける HBIG 投与回数別にみた HBs 抗体価の推移
HBIG5 回投与の追加実験結果

2. 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 (平成 20 年度報告)

1) HBV genotype A を接種材料とした実験では、 10^1 コピー接種では、3 匹中 2 匹に接種後 4 週目から HBV DNA を検出した。一方、HBV 1 コピーを接種材料とした 3 匹については、8 週目までの経過観察中に HBV DNA は検出されなかった。

2) HBV genotype C を接種材料とした実験では、 10^1 コピー接種では、3 匹中 1 匹

に接種後4週目からHBV DNAを検出した。また、HBV 1コピーを接種材料とした3匹についても、3匹中1匹に接種後4週目からHBV DNAを検出した。

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) HBIG5回連日投与後、HBV接種量を調節し、週1回追加免疫した実験(実験3-(1))

HBIG5回連日投与後、 10^1 コピー、 10^3 コピー、 10^5 コピー接種の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1000~3500 mIU/mlを維持し、追加HBIG投与により経過観察期間8週目までHBs抗体は3000~5000 mIU/mlを維持した(図-11)。

2) HBV genotype Cを接種材料とした実験でも、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。

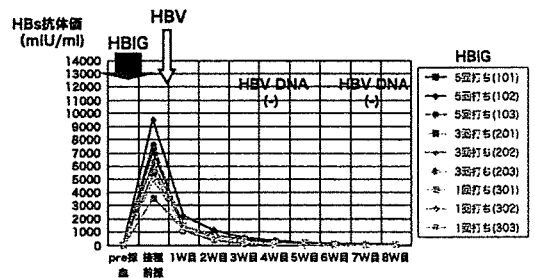


図-11. 実験 3-1) 結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移

2) HBIG投与を調整し受動免疫した後、HBV genotype 別に (genotype A & genotype C) 10^5 コピーを接種した実験(実験3-(2)) (図-12)

1) HBV genotype Aを接種材料とした実験では、HBIG連日5回投与、3回投与、1回投与のいずれの群も8週目までの経過観察中にHBV DNAは検出されず、感染防御が成立した。(図-13)

また、経過中の末梢血中のHBs抗体の推移をみると、HBIGの投与回数に応じて、投与2日目に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1000~2000 mIU/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。

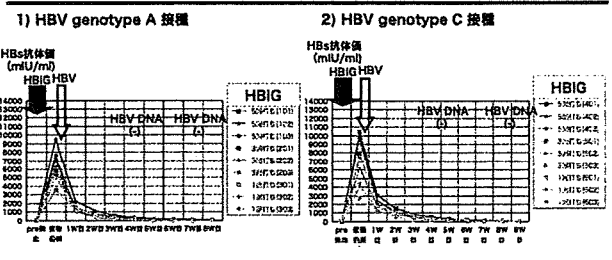


図-12. 実験 3-2) 結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移

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感染実験(実験3-(3)) (図-13)

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HBIG3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 2000 mIU/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 回投与群の生存した 1 匹の HBs 抗体価は、HBV 接種時には 1000 mIU/ml を維持し、接種後 1 週目には、300 mIU/ml であり、接種後 4 週目まで HBs 抗体陽性となっていた。

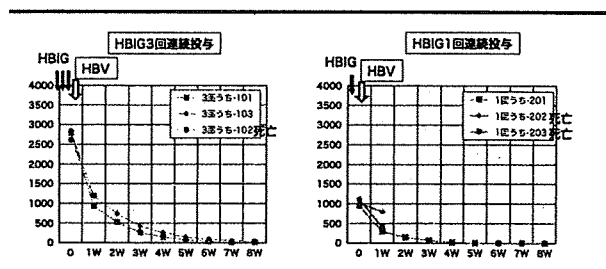


図-13. 実験 3-3) 結果: 末梢血中のHBs抗体価の推移

D. 考察

HBIG による受動免疫後の末梢血中の HBs 抗体価の推移を SCID マウスを用いてみると、末梢血中における半減期はヒトにおける半減期（約 2~3 週間とされている）に比べて短いことが示された。SCID マウスにおいては、HBIG 50ul(10 IU)の 1 回投与から 4 回連続投与までは、投与量に応じた末梢血中の HBs 抗体価上昇を認めしたが、連日 5 回投与群では、個体の差が大きく、十分 HBs 抗体価が上昇しない個体も認められた。

また、すでに我々が行った実験²⁾では、チンパンジーを用いた実験で最少感染価が 10 コピーである genotype A の最少感

染価は、キメラマウスでは 1 コピーであったが、今回の実験では、この genotype A の接種材料での最少感染価は、10 コピーとなり、個体差、個体数など考慮した検討が必要であると考えた。HBV genotype C については、初めて試みたので、同様に今後、さらに実験を検討する予定である。3 年間の実験により HBIG 投与量 1 回 50ul(10 IU)の 1 回打ちにより、感染早期の血漿である HBV 10^5 コピーの感染を防御することが明らかとなったため、さらに HBIG 量をこれまでの 4 分の 1 量の 2.5 IU/回に減量し試みたが、2.5 IU/回 1 回投与でも感染の防御は成立した。

現在、さらに HBIG を減量した受動免疫を実施後、感染実験を進行中である。

また、HBIG 量を減量し HBV 10^5 コピーを接種した実験においては、6 匹中 3 匹のマウスが接種後 1~3 日以内に死亡したため、この原因についても検討中である。

今後、感染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。

E. 結論

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、3 年計画で実験を行い、以下のことが明らかとなった。

1) HBIG による受動免疫後の末梢血中における HBs 抗体価の経時的推移をヒト肝細胞非置換の SCID マウスで観察したところ、受動免疫による HBs 抗体価の経時的減衰は、ヒト（半減期 2~3 週間）に比べて約 1 週間と速いこと。

- 2) チンパンジーでの最少感染価がこれまで明らかとなっている HBV genotype 別 (genotype A および genotype C) の接種材料を用いたヒト肝細胞置換キメラマウスにおける最少感染価は、個体による差も考慮し、今後、検討の必要がある。
- 3) HBIG 量を調整して受動免疫を行い、HBV genotype A の 10^5 コピーの感染が防御される感染実験を試みたが、現時点では HBIG を 2.5IU/回 1 回投与により、HBV 接種時の末梢血中の HBs 抗体価 1000mIU/ml で感染の防御が成立した。現在もさらに HBIG 量を減量した感染実験を進行中である。

F. 文献

- 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
- 2) Tabuchi A, Tanaka J, Katayama K, Mizui M, Matsukura H, Yugi H, Shimada T, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Titration of hepatitis B virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV infection: transmission experiments to chimeric mice with human liver repopulated hepatocytes. *J Med Virol*, 2008; 80; 2064-2068.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tabuchi A, Tanaka J, Katayama K, Mizui M, Matsukura H, Yugi H, Shimada T, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Titration of hepatitis B virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV infection: transmission experiments to chimeric mice with human liver repopulated hepatocytes. *J Med Virol*, 2008; 80; 2064-2068.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 片山恵子、松尾順子、田淵文子、田中純子、B 型肝炎ウイルス感染防御能としての HBs 抗体価の定量-ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験-、第 39 回日本肝臓学会西部会、2009 年、鳥取。
- 2) 田淵文子、片山恵子、田中純子、吉澤浩司、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験 B 型肝炎ウイルスの感染実験、第 6 回 日本予防医学会 学術総会、2008 年、東京

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
H19-21 年度総合分担研究報告書

「B 型肝炎ウイルスワクチンエスケープ変異」に関する研究
分担研究者 菅内 文中 名古屋市立大学大学院医学研究科

研究要旨：ユニバーサル(UV)ワクチンの導入にあたり、異なるB型肝炎ウイルス(HBV)遺伝子型への効果や、vaccine escape mutant (VEM)に対する反応を明らかにする必要がある。本邦の急性B型肝炎におけるVEMの出現率と*in vitro*でVEMのウイルス学的特徴について検討した。145R変異株では、野生株と比較してウイルス複製能の低下を認め、また培養上清中のHBsAg値が野生株と比較して低下していた。*In vivo*ではHBVに対するモノクローナル抗体を用いてヒト肝細胞キメラマウス(uPA/SCID mice)におけるHBV中和試験を行った。感染源として遺伝子型A野生株、遺伝子型C野生株、遺伝子型C-145R導入変異株の3種類を用いた。二回目接種3週後の検討において遺伝子型A(n=3)およびC(n=3)野生株HBV群ではHBV-DNAの検出はされなかったが、遺伝子型C-145R導入変異株(n=3)においては全てHBV-DNAが検出された(4.4×10^4 copies/ml)

共同研究者
名古屋市立大学大学院医学研究科
溝上雅史、田中靖人

A. 研究目的

我が国においては1986年からの母子感染予防法施行によって垂直感染からのB型肝炎ウイルス(HBV)キャリア数は減少したが、近年、水平感染による急性B型肝炎(AHB)が増加傾向にあると報告されており、我が国においてもユニバーサルワクチンの必要性が議論となってきている。本研究の目的は本邦のAHBにおけるvaccine escape mutant (VEM)の出現率の検討を行い、異なるHBV遺伝子型への効果や、VEMに対する反応を明らかにすることである。

B. 研究方法

(1)我が国の急性 B 型肝炎患者における VEM の出現率についての検討。

対象は本邦において AHB と診断された 46 例。このうち来院時に採取された血清で HBs 抗原陽性/HBs 抗体陽性と診断された 23 症例を A 群とし、この A 群と年齢・性別を match させた HBs 抗原陽性/HBs 抗体陰性 23 症例を B 群とした。来院時の患者血清から S 遺伝子領域の遺伝子配列を決定し、HBs 抗原の共通抗原基 a 領域の変異について 2 群間で比較検討した。

(2)VEM のウイルス学的特徴についての検討。

代表的 VEM である I126S 変異と G145R 変異株についてウイルス学的特徴を検討した。既存の 1.24 倍長 HBV/Ce wild clone に対して、I126S、G145R、I126S+G145R アミノ酸変異を挿入した HBV 複製モデルを作成し、Huh7 細胞株に transfection させ、3 日後に培養上清、培養細胞を回収し、それらを用いてウイルス複製や HBs 抗原発現量などについて比較検討した。

(3)不死化ヒト肝細胞を用いた三次元培養系における感染実験。

不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2 細胞)を用いた新しい三次元培養系を開発し、この系における HBV 感染能や複製動態について検討した。HuS-E/2 細胞を中空系バンドルに注入し充填培養することで、tissue-like formation を形成させた(三次元培養系)。12 穴シャーレ内で作成した三次元培養系と 1.24 倍長 HBV ゲノム(HBV/Ce wild)を組み込んだプラスミドの遺伝子導入によって得られたウイルス粒子を培養した。培養上清中の HBV DNA 量や細胞内の cccDNA 量は real-time PCR により定量し、HBsAg や HBcrAg は CLEIA 法で測定した。HBV 感染防御実験については、遺伝子導入により得られたウイルス粒子 (HBV/Ce wild)と抗 HBs 人免疫グロブリン (HBIG)を 37°C で 2 時間接触させた後、三次元培養を行い、培養上清中の HBV DNA 量を経時的に測定した。

(4) ヒト肝細胞キメラマウス (uPA/SCID mice)における HBV 中和試験。

細胞マイクロアレイシステムを用いて精製された、HBV ワクチン (ビームゲン) 接種後から得られた数種類の抗体のうち、最も中和活性の高いモノクローナル抗体 (HBV-S 抗体)を取得した (Yoshihara et al. Cytometry 2007)。この抗体を用いてヒト肝細胞キメラマウス (uPA/SCID mice)における HBV 中和試験を行った。感染源については 3 種類の 1.24 倍長 HBV 複製モデルを作成し (遺伝子型 A 野生株、遺伝子型 C 野生株、遺伝子型 C-145R 導入変異株)、これを Huh7 細胞に transfection してできた培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種、回収されたマウス血清を材料として感染実験を行なった (1.0×10^4 copies/匹)。HBV-S 抗体は 1 種類の

遺伝子型 C 野生株感染マウスには 0.1 μ g/匹、その他の全マウスには 10 μ g/匹を HBV 感染源と同時に投与した。HBV-DNA の検出にはリアルタイム PCR を使用した。

C. 研究結果

(1)Table 1 に HBsAg 陽性/HBsAb 陽性 23 例 (A 群)と HBsAg 陽性/HBsAb 陰性 23 例 (B 群)の患者背景を示す。A 群は B 群と比較して、劇症肝炎または重症肝炎症例が有意に高率であった (43% vs. 0%; $P < .001$)。Table 2 に a 領域の変異株についてのまとめを示す。a 領域に変異を認めたのは AHB 患者全 46 例中 7 例 (15%)であった。その 7 例のうち 6 例は A 群に認められ、1 例のみであった B 群と比較して有意に高率であった。全 7 例の変異のうち、VEM としての報告がある変異は 4 例 (126S or N; 3 例、145R; 1 例)であり、一方エスケープミュータントとしては過去に報告はされていないがアミノ酸 profile 変化を伴う変異は 3 例認められた。これらについて上記の各 2 群に分けて検討すると、アミノ酸 profile 変化を伴う変異については A 群 2 例、B 群 1 例と差は認められなかったが、エスケープミュータント変異については B 群では 1 例も認められなかったのに対して、A 群では 4 例 (17%)に認められ、有意に高率であった。

(2)Table 3 に 4 種のクローン (HBV/Ce wild type, 126S mutant, 145R mutant, 126S+145R mutant)を Huh7 細胞に transfection して得られた培養上清中の HBsAg、HBeAg、HBcrAg 値と細胞中の HBcrAg 値の測定結果を示す。培養上清中の HBeAg、HBcrAg 値については 4 種のクローン間で大きな差を認めなかったが、HBsAg 値については 145R 変異を有する 2 種のクローン (145R mutant,

126S+145R mutant)において、他の2種類のクローン(HBV/Ce wild type、126Smutant)と比較して明らかに低値であった。ウイルス複製については、細胞中の HBcrAg 量、Southern blot analysis 共に、145R 変異を有する2種類のクローンは HBV/Ce wild type、126S mutant と比較して8割程度の複製効率を示す結果であった。

(3) Fig 1 に三次元培養系における培養上清中 HBVDNA レベルの推移を示す。HuS-E/2細胞単層培養においてはHBV接種3日目以降で急激に培養上清中 HBVDNA 量が減少したのに対して、3次元培養系では培養上清中のHBV DNA 量はHBV感染から1ヶ月以上高値($> 10^7$ copies/ml)を持続した。HBV/Ce wild type のウイルス粒子を三次元培養系に感染させた結果、Southern blot analysis にて細胞内でのHBVDNA複製が確認された。また細胞内のcccDNAレベルは単層培養と比較して三次元培養系で高値であった。同様に培養上清中のHBsAg、HBcrAgレベルも3次元培養系の方が高値であった。Fig 2 にHBIGによる感染防御実験の結果を示す。三次元培養系に対してHBV/Ce wild type (約1000copies/mL)と各濃度のHBIGを投与したところ、HBIG30mIU/mL(抗体量約27.5 μ g/mL)以上の投与では培養上清中にHBVDNAを検出できなくなった。一方コントロールとして投与したIgG27.5 μ g/mL投与群では培養上清中にHBVDNAを検出した。Fig 2 にHBIGによる感染防御実験の結果を示す。三次元培養系に対してHBV/Ce wild type (約1000copies/mL)と各濃度のHBIGを投与したところ、HBIG30mIU/mL(抗体量約27.5 μ g/mL)以上の投与では培養上清中にHBVDNAを検出できなくなった。一方コントロールとして投与したIgG27.5 μ g/mL投与

群では培養上清中にHBVDNAを検出した。(4) ヒト肝細胞キメラマウス(uPA/SCID mice)におけるHBV中和試験において、HBV感染源および抗体投与6週目において、HBV-S抗体10 μ g投与群の遺伝子型A(n=3)およびC(n=3)野生株HBV群では全てにおいてHBV-DNAの検出はされなかった。HBV116抗体0.1 μ g投与群遺伝子型Cでは1/3例でHBV-DNAが検出された(1.1 $\times 10^4$ copies/ml)。遺伝子型C-145R導入変異株では2/3例でHBV-DNAの検出された(1.1 $\times 10^4$ and 3.3 $\times 10^4$ copies/ml)。遺伝子型A(n=3)およびC(n=3)野生株HBV群の未感染マウスに関してはHBV-S抗体1 μ g投与を行い、遺伝子型C-145R導入変異株で1匹の未感染マウスに関してはHBV-S抗体10 μ g投与を行い再感染実験を行った。第二回目接種3週後では遺伝子型A(n=3)およびC(n=3)野生株HBV群では同様にHBV-DNAは全てのマウスで検出はされなかった。第1回目接種で未感染であった1匹の遺伝子型C-145R導入変異株においてはHBV-DNAが検出された(4.4 $\times 10^4$ copies/ml)

D. 考察

本邦においてHBワクチンは母親をスクリーニングしたうえでの選択的投与が行われているが、諸外国においてはuniversal vaccinationによるHBV感染予防が一般的である。しかし近年、universal vaccination 施行国においてHBワクチンに対するVEMとその増加が問題となっている。また本邦においては垂直感染からのHBVキャリア数は減少したが、近年、水平感染によるAHBが増加傾向にあると報告されている。

本邦の急性B型肝炎患者におけるVEM出現率とその変異株の状態について検討した結果、年齢・性別をmatchさせたHBsAg陽

性/HBsAb 陽性 AHB 患者 23 例(A 群)と HBsAg 陽性/HBsAb 陰性 AHB 患者 23 例(B 群)での比較を行ったところ、HBsAb 陽性である A 群において、VEM やアミノ酸 profile の変化を伴う変異が B 群と比較して有意に高率に認められた。A 群には劇症肝炎や重症肝炎といった症例が多く含まれていたことから、宿主側の強い免疫応答によって VEM より誘導されやすくなっていた可能性が示唆された。

次にこれら VEM のウイルス学的特徴を検討するために、以前から我々が報告してきた HBV をクローン化し Huh7 細胞に transfection させる系を用いて、今回多く認められた VEM である 126I 変異株と代表的な VEM である 145R 変異株、更にはこれら 2 つの変異を有する 126I/145R 変異株を作成し検討した。この結果、145R 変異を有する 2 つのクローン株においては、これらを有さない 2 つのクローン株(HBV/Ce wild type、126I 変異株)と比較して Southern blot analysis でウイルス複製レベルが約 8 割と低下していたが、更に注目すべきは複製レベルの違い以上に培養上清中 HBsAg 値が他のクローンと比較して低下していたことであった。このことから共通抗原基 a 領域における 145R 変異が HBs 抗原の構造変化を惹き起こし、従来の HBsAg 検出系では検出を困難としている可能性が示唆された。

次に検討すべき点は VEM の感染力や抗体による感染阻止力であると思われるが、これまで HBV の感染実験はチンパンジーなどの大型類人猿を用いるか、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いるといった *in vivo* 実験系しか使用できず、これが HBV 感染実験の妨げとなってきた。これに対し、我々は

不死化したヒト肝細胞(HuS-E/2 細胞)を三次元培養すると約 1 ヶ月間にわたって培養可能であることを見だし、これが HBV の感染実験、更には抗体による感染防御実験に使用可能ではないか検討した。HBV/Ce wild type クローンをを用いた感染実験において、HuS-E/2 細胞の単層培養では感染 3 日以降で急激に培養上清中の HBVDNA 量が減少したのに対し、同細胞を三次元培養することで約 1 ヶ月間という長期にわたって HBVDNA 量が検出できることをまず確認した。また Southern blot analysis にて 3 次元培養系における HBV 複製についても確認した。続いて、臨床において HBV 感染防御に使用されている HBIG を用いた感染防御実験を試みた。この結果、コントロールとして使用した IgG27.5 μ g/mL 投与では培養上清中に HBVDNA を検出したのに対し、これと同量の抗体量である HBIG30mIU/mL(約 27.5 μ g/mL)を投与すると培養上清中に HBVDNA が検出できなくなることが確認され、感染防御の可能性が示唆された。

次に *in vivo* 実験系として HBV に対するモノクローナル抗体を用いてヒト肝細胞キメラマウス(uPA/SCID mice)における HBV 中和試験を行った。感染源として遺伝子型 A 野生株、遺伝子型 C 野生株、遺伝子型 C-145R 導入変異株の 3 種類を用いた。投与 6 週目において、遺伝子型 A および C 野生株 HBV 群では BV-DNA の検出はされなかった。遺伝子型 C-145R 導入変異株では 2/3 匹で HBV-DNA が検出された(1.1 $\times 10^4$ and 3.3 $\times 10^4$ copies/ml)。第二回目接種 3 週後では遺伝子型 A および C 野生株 HBV 群では同様に HBV-DNA の検出はされなかった。この結果から異なる HBV 遺伝子型への HBV ワクチン投与の有効性が示唆された。第 1

回目接種で未感染であった1匹の遺伝子型 C-145R 導入変異株においても HBV-DNA が検出された (4.4×10^4 copies/ml)。このことから HBV145R 変異株に対する HBV ワクチンによる感染阻止は限定的であることが示唆された。今後は Pre-S 抗体を用いて同様にヒト肝細胞キメラマウスにて感染中和実験を行う予定である。

E. 結論

- 1) 本邦の AHB 全 46 例中 7 例 (15%) に HBs 抗原の a 領域に変異を認めた。HBV 複製モデルを用いた *in vitro* の検討において HBV の 145R 変異株では、野生株と比較してウイルス複製能のおよび培養上清中の HBsAg 値の低下を認めた。
- 2) 不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2) を用いた新規三次元培養システムでの HBV 感染の成立と、長期間の持続感染を認めており、感染防御実験の可能性が示唆された。
- 3) HBV に対するモノクローナル抗体を用いてヒト肝細胞キメラマウス (uPA/SCID mice) における HBV 中和試験では、異なる HBV 遺伝子型への HBV ワクチン投与の有効性が示唆された。また、VEM 株として多数報告されている HBV145R 変異株に対する HBV ワクチンによる感染阻止は限定的で、アミノ酸変異に伴う立体構造の変化なども考慮する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N,

Kang JH, Sumino Y, Yatsushashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y and Mizokami M. A Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. *Hepato Res* 39:648-56, 2009.

2. Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, and Mizokami M. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. *J Clin Microbiol* 47:1476-83, 2009.
3. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. Genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 83:10538-47, 2009.

2. 学会発表

1. Matsuura K, Tanaka Y, Sugauchi F, Tokunaga K, Mizokami M. Identification of genetic variants associated with chronic hepatitis B or C in a genome-wide association. The 8th JSH Single Topic Conference "HBV Now In Asia" November 21-22 2009, Tokyo, Japan.
2. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Hige S, Asahina Y, Kurosaki M, Ito T, Korenaga M, Hino K, Mita E, Tnaka E, Mochida S, Oyama K, Honda M, Hiasa Y, Sugauchi F, Tokunaga

- K, Mizokami M. A genome-wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP associated with chronic hepatitis B. 60th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), Oct 30-Nov 3 2009, Boston MA, USA.
3. Sugauchi F, Tanaka Y, Kurbanov F, Nojiri S, Matsuura K, Roman S, Arturo P, Kan JH, Ito K, Joh T, Mizokami M. Clinical significance of a novel high-sensitivity hepatitis B surface antigen immunoassay in patients with hepatitis B virus infection. 60th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), Oct 30-Nov 3 2009, Boston MA, USA.
 4. Matsuura K, Tanaka Y, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Sugauchi F, Nojiri S, Mizokami M. Predicting sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon and ribavirin using the Abbott RealTime HCV assay and the Roche Cobas TaqMan HCV assay. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), March 2-24, 2009, Washington, DC, USA.
 5. 松浦健太郎, 田中靖人, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 千田勝博, 新海登, 宮木知克, 菅内文中, 野尻俊輔, 城卓志, 溝上雅史. B型肝炎に対する Entecavir の治療成績と各種血清マーカーの推移. 第38回日本肝臓学会西部会 2009年12月4-5日 米子
 6. 菅内文中, 田中靖人, 溝上雅史. B型慢性肝炎難治例への対策 B型肝炎に対する Adefovir, Entecavir の治療成績と多剤耐性 HBV 変異株に対する Tenofovir の有効性 (シンポジウム 10: B型慢性肝炎難治例への対策). 第13回日本肝臓学会大会 2009年10月14-16日 京都.
 7. 田中靖人, 菅内文中, 溝上雅史 (コンセンサスミーティング 1: B型肝炎). HBV 遺伝子型と病態・予後. 第45日本肝臓学会総会 2009年6月4-5日 神戸.
 8. 木村達治, 田中靖人, 菅内文中, 坂本知行, 新海登, 日下部篤宣, 松浦健太郎, 杉山真也, 溝上雅史. HBV genotype A, B, C, Dにおける HBs 抗原定量の臨床的意義. 第45日本肝臓学会総会 2009年6月4-5日 神戸.
 9. 松浦健太郎, 田中靖人, 日下部篤宣, 千田勝博, 坂本知行, 新海登, 宮木知克, 菅内文中, 野尻俊輔, 城卓志, 溝上雅史. 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. 第12日本肝臓学会大会 2008年10月1-2日 東京.
 10. Kurbanov F, 田中靖人, 坂本知行, 杉山真也, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 菅内文中, 溝上雅史. ヒト肝細胞を有するキメラマウスにおける遺伝子型 H 重感染を示す B型肝炎ウイルス遺伝子型 G の特性. 第12日本肝臓学会大会 2008年10月1-2日 東京.
 11. 日下部篤宣, 田中靖人, 杉山真也, 野尻俊輔, 菅内文中, 宮木知克, 坂本知行, 新海登, 千田勝博, 松浦健太郎, 土方誠, 下遠野邦忠, 城卓志, 溝上雅史. 新規3次元培養系を用いた HBV 感染防御実験の試み. 第12日本肝臓学会大会 2008年10月1-2日 東京.
 12. 坂本知行, 田中靖人, 杉山真也, Kurbanov F., 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 菅内文中, 城卓志, 溝上雅史. In vitro 複製モデルを用いた B型肝炎ウイルス Genotype G 複製メカニズムの解明.

第12日本肝臓学会大会 2008年10月
1-2日 東京.

13. 田中靖人、菅内文中、向出雅一、溝上雅史. B型ウイルス肝炎の治療 B型慢性肝炎に対するエンテカビル長期投与の有効性(ワークショップ). 第44日本肝臓学会総会 2008年6月5-6日 愛媛
14. 田中靖人、菅内文中、溝上雅史. B型慢性肝疾患の治療戦略 エンテカビル長期投与による治療効果及び耐性変異出現パターン(ワークショップ). 日本消化器病学会総会 2008年5月8-10日 福岡
15. Sugauchi F, Tanaka Y, Sakamoto T, Kusakabe A, Matsuura K, Sugiyama M, Nojiri S, Takashi J, Mizokami M. Influences of hepatitis B virus genotype and precore mutations on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
16. Sakamoto T, Tanaka Y, Sugiyama M, Kurbanov F, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism for the Dependence of Hepatitis B virus genotypes G on Coinfection with Other Genotypes for Viral Replication. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
17. Kusakabe A, Tanka Y, Yamaguchi T, Segawa H, Kurubanove F. Sugiyama M, Sugauchi F, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infectio. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
18. Sugauchi F, Tanaka Y, Yatsushashi H, Enomoto M, Sakamoto T, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype and X/core promoter/pre-S mutations in young-onset hepatocellular carcinoma. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Disease (APASL) March 23-26 Seoul Korea.

Table 1: Anti-HBs 陽性急性 B 型肝炎患者と anti-HBs 陰性急性 B 型肝炎患者間の臨床背景

Features	HBsAg(+)/ anti-HBs (+)	HBsAg(+)/ anti-HBs (-)	P value
Number	23 cases	23 cases	Matched
Age (years)	39.3±11.0	39.0±14.0	Matched
Male	16 (70%)	16 (70%)	Matched
HBeAg positive	14 (61%)	23 (100%)	<.001
ALT (IU/L)	3521±1703	1773±1060	<.001
AST (IU/L)	2711±2118	1343±1194	<.05
T.Bil (mg/dL)	13.2±19.2	7.8±7.4	NS
PT (%)	58.3±48.1	81.2±17.9	<.05
HBVDNA (log copies/mL)	5.26±1.03	5.99±1.48	NS
HBV genotype			*:<.005
A:B:C:D	1*:4:17†:1	9*:4:10†:0	†:<.05
FH or ASH	10 (43%)	0 (0%)	<.001

Table 2: anti-HBs 陽性急性 B 型肝炎患者と anti-HBs 陰性急性 B 型肝炎患者間における共通抗原基'a'領域の変異株のまとめ

	HBsAg(+)/anti-HBs (+) (n = 23)	HBsAg(+)/anti-HBs (-) (n = 23)	Total (n = 46)	P value
escape mutation	4 (17%)*	0 (0%)*	4 (9%)	* <.05
	126S or N : 3cases 145R : 1case			
other mutation	2 (9%)	1 (4%)	3 (7%)	NS
Total	6 (26%)*	1 (4%)*	7 (15%)	* <.05

escape mutation: T or I126S or N, G130N, K141E and G145R amino acid substitution which is reported as an escape mutation.

other mutation: amino acid substitution which are associated with change of amino acid profile.

Table3: 4 種類のクローン間における培養上清あるいは細胞内の HBV マーカーの比較

	Supernatant		Intracellular	
	HBsAg (IU/mL)	HBcrAg (kU/mL)	HBeAg (IU/mL)	HBcrAg (kU/mL)
HBV/Ce wild type	71.9	4296	212.1	23943
126S mutant	76.3	5042	224.7	21543
145R mutant	3.9	4145	213.0	18088
126S+145R mutant	2.1	4639	220.4	17005

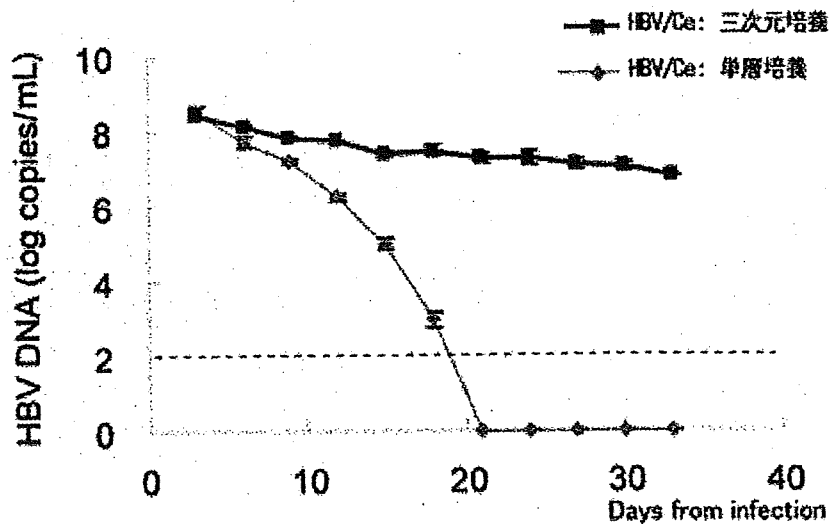


Figure 1. 三次元培養システムにおける培養上清中 HBVDNA レベルの推移

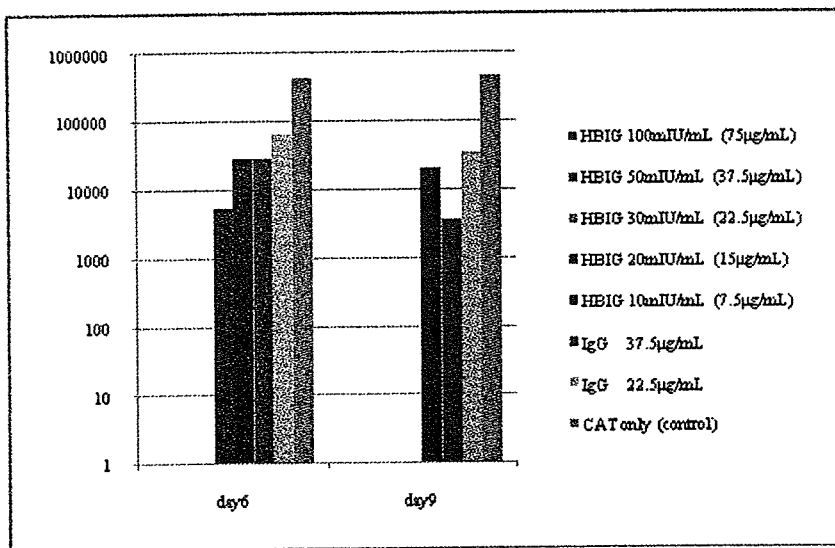


Figure 2. 抗体投与(HBIG)による HBV DNA 量(copies/ml)の変化

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
小方則夫	医療従事者におけるB型肝炎ウイルス (HBV)・C型肝炎ウイルス (HCV) 陽性血液曝露事故後の感染予防対策：国際標準との整合性確立に向けて。	伊藤庄平	労働者健康福祉機構・病院機能向上研究結果報告集	独立行政法人労働者健康福祉機構	川崎	2009	301-313
岡部信彦・多屋馨子	B型肝炎		予防接種に関するQ&A集 2008	日本細菌製剤協会	東京	2008	101-104

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.	Hepatitis B caused by a hepatitis B surface antigen escape mutant.	J Gastroenterol.	43	243-247	2008
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