

図1 C型肝炎ウイルス検査手順 2003年4月～2010年3月

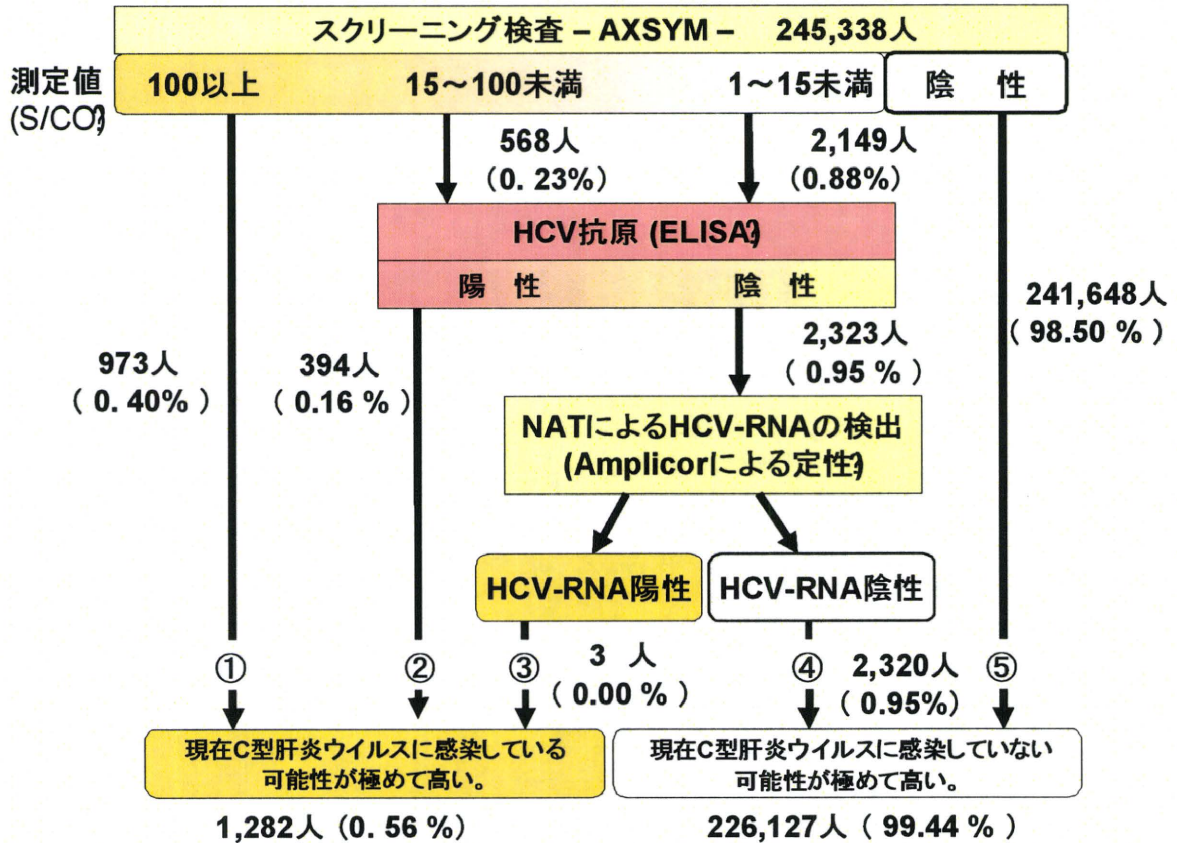


図2 HCV 抗原陰性 / HCV-RNA 陽性 3 例の遡及・追跡調査

症例 1 41 歳 F

一日人間ドック受診 (2005.11.25)

HCV抗体 (AxSYM) cut off 1.0 s/co	陽性 (中力価: 95.03)
HCV抗原 (ELISA) cut off 44.4 fmol/L	陰性 (11 fmol/L)
HCV抗原 (ARCHITECT) cut off 3fmol/L	陽性 (4 fmol/L)
HCV RNA (定性)	陽性
AST (GOT)	84 u/l
ALT (GPT)	133 u/l
IFN 治療歴	無

医療機関受診 (2005.12.19)

臨床診断	慢性肝炎
HCV-RNA (ハイレンジ法)	陽性 (21 KU/ml)
HCV ジェノタイプ	Ⅲ

IFN 治療後 (2006.12.19)

HCV-RNA (定性)	陰性
--------------	----

IFN 治療後の経過

HCV-RNA (TaqMan)	陰性、陰性、陰性
(2008.9, 2009.3, 2010.2)	

図3 HCV抗原陰性 / HCV-RNA陽性3例の遡及・追跡調査
症例2 47歳 F

既往歴 医療機関受診 (1998.8.17)	
臨床診断	慢性肝炎
HCV-RNA (分岐プローブ)	陽性 (15 Meq/ml)
HCVセログループ	1
IFN治療歴	無
職域健診受診 (2008.5.19)	
HCV抗体 (Axsym) cut off 1.0 s/co	陽性 (中力価: 65.70)
HCV抗原 (ELISA) cut off 44.4 fmol/L	陰性 (21 fmol/L)
HCV抗原 (ARCHITECT) cut off 3fmol/L	陽性 (7.66 fmol/L)
HCVRNA (TaqMan)	陽性 (2.62×10^2 IU/ml)
AST (GOT)	28 u/l
ALT (GPT)	30 u/l
IFN治療歴	不明
医療機関受診 (2008.10.31)	
臨床診断	慢性肝炎
IFN治療歴	治療中
HCV-RNA (TaqMan)	陰性
IFN治療後の経過	
HCV-RNA (TaqMan)	陰性、陰性
(2009.9, 2010.7)	

図4 HCV抗原陰性 / HCV-RNA陽性3例の遡及・追跡調査
症例3 45歳 M

既往歴	
臨床診断	慢性肝炎
治療歴	有 (38歳 ~ 治療中)
	(治療内容不明)
IFN治療歴	有
一日人間ドック受診 (2008.7.3)	
HCV抗体 (Axsym) cut off 1.0 s/co	陽性 (中力価: 97.50)
HCV抗原 (ELISA) cut off 44.4 fmol/L	陰性 (8 fmol/L)
HCV抗原 (ARCHITECT) cut off 3fmol/L	陰性 (0.00 fmol/L)
HCVRNA (TaqMan)	陽性 (6.63×10^1 IU/ml)
AST (GOT)	98 u/l
ALT (GPT)	144 u/l
IFN治療歴	不明

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）
肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入対策に関する研究
平成22年度 分担研究報告書

1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況

研究分担者 相崎 英樹 国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究要旨：肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝臓死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は我が国には100-150万人が存在すると推定されているが、一方、C型急性肝炎に関する疫学情報は少ない。そこで本年度は、感染症法による届出基準に基づき1999年4月から2009年12月までの間に提出された本邦におけるC型急性肝炎の年別発生状況、年齢別分布、都道府県別報告状況、症状、感染原因・経路等について解析した。急性肝炎の発生動向を全数把握できる制度は他国でも少なく、これらの情報は予防対策、啓発活動に大変有効であると考えられた。

A. 研究目的

現在、我が国にはC型肝炎ウイルス(HCV)の感染者が100-150万人以上存在すると考えられている。感染後は慢性肝炎、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を合併することが知られており、公衆衛生上きわめて重要な病原ウイルスである。

国は新しい「肝炎対策基本法案」において、B型、C型肝炎ウイルス感染について国の責任を明確にするとともに、肝炎患者の経済的負担の軽減措置や肝炎予防策の推進、治療レベルを全国で均一にする対策を講じることを定めている。そのためには、インターネット等の媒体を通じて、一般のヒト、患者、医療関係者、専門家向けに、それぞれに必要な情報をわかりやすく、情報を発信することは非常に有効と考えられる。

ウイルス性肝炎に関するホームページは、既に、肝炎財団、厚労省、日本消化器病学会、日本肝臓学会、製薬会社、病院、患者団体、個人など多く存在しているものの、ほとんどは臨床的な内容であり、最近の疫学や基礎研究の情報発信はほとんどない。特に、C型急性肝炎に関する疫学情報は皆無である。本邦では、1999年4月に施行された感染症法によりウイルス

性肝炎を診断した医師は全例保健所へ届け出ることが必要になり、現在C型急性肝炎は5類感染症に分類され、その発生状況が監視されている。本研究では、1999年4月から2009年12月までの間に届け出されたC型急性肝炎723症例について解析した。

B. 研究方法

感染症法による届出基準に基づき提出された1999年4月から2009年12月までの間に届け出されたC型急性肝炎723症例について、本邦におけるC型急性肝炎の年別発生状況、年齢別分布、都道府県別報告状況、症状、感染原因・経路等について解析した。

（倫理面への配慮）

急性肝炎のデータ等、本研究において得られた情報は全て匿名化し、集計解析している。情報公開の際も個人を識別できる情報は排除する。

C. 研究結果

C型急性肝炎患者の年別発生症例数は、1999年136症例から2001年65症例と減少傾向が認められたが、それ以降2009年まで年間約30-70

症例ではほぼ横ばいに転じている。年齢別の報告数は、30代前半及び50代後半の2つのピークが認められた。都道府県別のC型急性肝炎の人口100万人あたりの報告症例数は、宮崎県(23症例)、高知県(19症例)、大阪府(14症例)、岡山県(13症例)の順に多く、一方全く報告が無い地域も3県あり、地域によって大きな偏りがあった。届出票の記載方法の改正により症状が補足しやすくなった2006年4月以降に報告された168症例に関してその症状について調べたところ、肝機能異常は86%の症例に認められ、全身倦怠感52%、黄疸34%、褐色尿19%、嘔吐11%、発熱11%の順で観察された。また、感染原因・経路別に分類したところ、原因不明62%、針等刺入22%、性的接触11%の順であった。

D. 考察、結論

最近数年間のC型急性肝炎の報告数に減少傾向は見られなかった。また感染原因や経路の検討から、針等刺入の対策が重要と考えられた。一方、血液検査で肝機能異常が指摘されるまで診断が難しい症例が多く、感染原因・経路が不明な症例が過半数を占めていることから、自覚症状が無く感染に気がついていない症例が多い可能性が強く示唆された。

感染症法により届出が義務付けられているものの、必ずしも厳格に守られておらず、C型急性肝炎症例の実数は届け数をかなり上回ると推察される。急性肝炎の発生動向を全数把握できる制度は他国でも少なく、これらの情報は予防対策、啓発活動に大変有効であると考えられた。感染予防対策を構築する上でも、医療関係者に届出義務を周知する必要があると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*. 2011;410:38-47.

2) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res*. 2010;85:520-524.

3) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol*. 2010;84:5824-5835.

4) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博、C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成、日本ウイルス学会、雑誌ウイルス、東京、2011、60、87-92.

5) 相崎英樹、コレステロールとスフィンゴ脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、ミノファゲン製薬、Minophagen medical review、東京、2010、1-10.

2. 学会発表

1) 相崎英樹、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.

2) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

3) Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

4) 相崎英樹、HCV粒子形成と脂質の役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

5) 渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCVエンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖

- の機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 6) 安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 7) 山本真民、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 8) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 9) 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、分割ユビキチン法を利用した HCVNS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 10) 斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、Squalane synthase 阻害剤の C 型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- F. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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）
肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入対策に関する研究
平成22年度 分担研究報告書

輸血用血液に対する核酸増幅検査で見出される HBV の性状
－検査法変更前後での比較－

研究協力者 内田茂治 日本赤十字社中央血液研究所 感染症解析部

研究要旨 2008 年に日本赤十字社は輸血用血液製剤の安全性向上のため、輸血用血液のスクリーニング検査法を変更した。NAT で検出される HBV の性状をスクリーニング検査法変更前後で比較すると、①NAT で陽性となる HBV-DNA 数には変化が無かった、②HBc 抗体陽性率は変更前 14.0%、変更後 72.2%と陽性率が著しく上昇していた、③HBV-DNA 陽性となった献血者の 50 歳以上の割合は変更前 16.7%、変更後 62.8%と上昇していた、④検出される HBV-DNA のコピー数は、定量感度（100 copies/mL）未満が変更前 9.7%、変更後 66.7%と増加していた。

以上、スクリーニング検査法変更により NAT で検出される HBV-DNA は、変更前は初感染の感染初期例が主であったが、変更後は感染既往と考えられる例が主となっていた。また、今回のスクリーニング検査法変更により、年 7.8 例と考えられていた輸血による HBV 感染が、年 4.7 例に減少すると推測された。

A. 研究目的

2008 年に日本赤十字社は輸血用血液製剤の安全性向上のため、輸血用血液のスクリーニング検査法を変更した。血清学検査は従来の凝集法から化学発光免疫測定法（CLEIA 法）に、核酸増幅検査（NAT）は第二世代の機器・試薬へと更新された。これらの変更にともない HBs 抗原検査は数百倍感度が向上し、HBV-DNA の検出感度も大幅に高感度化が図られた。スクリーニング検査法変更の、輸血用血液製剤の安全性向上に対する効果を検証するために、NAT で検出される HBV の性状を変更前後で比較した。

B. 研究方法

輸血用血液に NAT を導入した 1999 年 7 月から 2010 年 3 月までに、HBV-DNA が陽性となった 1,008 例を対象とした。スクリーニング検査法変更前例として 2008 年 8 月までの 828 例を、スクリーニング検査法変更後例としては 2008 年 9 月以降の 180 例を解析対象とした。HBV-DNA 陽性例は EIA 法により HBc 抗体を測定し、リアルタイム PCR 法によりウイルスのコピー数を定量した。陽性となった献血者の情報は血液事業統一システムを用いて入手した。

また、2000 年から 2009 年までに輸血により感染が確認された HBV84 例を解析し、スクリーニング検査法変更が輸血用血液の

C. 研究結果

先ず NAT で陽性となる HBV-DNA 数が、スクリーニング検査法変更前後でどのように変化したのかを調べた（表 1）。検査本数あたりの陽性率は、2006 年 0.0019%、2007 年 0.0017%、2008 年 0.0016%、2009 年 0.0020%、2010 年 0.0022%と変更後に若干

表 1 HBV-DNA 陽性数

年	検査数	陽性数
2006	4,790,905	92
2007	4,766,287	80
2008	4,900,082	80
2009	5,118,972	104
2010	5,160,760	113

の上昇傾向はあるものの、有意な差ではなかった。これら NAT で陽性となった HBV 例の HBc 抗体陽性率は、検査法変更前は 828 例中 116 例（14.0%）が陽性であったのに対し、変更後は 180 例中 130 例（72.2%）が陽性と陽性率の著しい上昇が認められた。また、検査法変更前は陽性となる献血者は若年者が多く、50 歳以上が 135 人（16.3%）であったのに対し、変更後は 113 人（62.8%）と高齢者が主となっていた。陽性となった検体の HBV-DNA 量は、検査変更前には低濃度のものが少なく、定量感度（100 copies/mL）未満は 9.7%であったのに対し、変更後は定量感度未満が 66.7%と低濃度検体が増加していた。

輸血後 HBV 感染症例の原因血液 84 例を、初感染（ウインドウ期）の個別 NAT 陽性・陰性、感染既往の個別 NAT 陽性・陰性に分け、そのウイルス濃度から検査法変更の有

効性を検証した。2004 年 8 月以降の 20 本プール NAT で比較すると、変更前では 1 年あたりの感染献血数が、ウインドウ期の個別 NAT 陰性 1.5、ウインドウ期の個別 NAT 陽性 3.0、感染既往の個別 NAT 陰性 0.3、感染既往の個別 NAT 陽性 3.0 で合計 7.8 であった。変更後ではウインドウ期の個別 NAT 陰性 0.7、ウインドウ期の個別 NAT 陽性 1.3、感染既往の個別 NAT 陰性 0.7、感染既往の個別 NAT 陽性 2.0 で合計 4.7 と変更前より 3.1 減少した。

D. 考察

スクリーニング検査法変更により NAT で検出される HBV-DNA は、変更前は初感染の感染初期例が主であったが、変更後は感染既往と考えられる例が主となっていた。血清学検査は従来の凝集法から化学発光免疫測定法（CLEIA 法）に変更され、HBs 抗原検査は数百倍感度が向上したため、従来は NAT で検出されていた感染初期例の多くが、HBs 抗原検査で捕捉されていると考えられる。また、NAT も第二世代の機器・試薬へと更新され、HBV-DNA の検出感度が大幅に向上したため、従来は検出できなかった感染既往の低濃度 HBV を多く検出していると考えられる。血清学検査ならびに第二世代の NAT がほぼ同時期に変更されたため、このような差異が認められた。

今回のスクリーニング検査法変更により、HBV の輸血による感染リスクは 1 年間で 7.8 から 4.7 に減少すると推測された。しかしこの減少は、ウインドウ期ならびに感染既往ともに個別 NAT 陽性の血液であり、個別 NAT 陰性の血液による感染リスクには

ほとんど影響がないと考えられた。今後も安全対策の効果の検証を実施し、その結果について評価や更なる安全対策の必要性について検討することが重要である。これらの検討により輸血医療の安全性向上に資することとしたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 井上 淳、上野義之、福島耕治、近藤泰輝、嘉数英二、小原範之、木村 修、涌井祐太、下瀬川徹、内田茂治

輸血の6ヵ月後に発症したB型急性肝炎の1例

日本内科学会雑誌 第99巻 第8号
1910-1912, 2010.

2) Bouike Y, Imoto S, Mabuchi O, Kokubunji A, Kai S, Okada M, Taniguchi R, Momose S, Uchida S, Nishio H. Infectivity of HBV DNA positive donations identified in look-back studies in Hyogo-Prefecture, Japan. Transfusion

Medicine, 21:107-115, 2011.

2. 学会発表

1) 平 力造、大塚裕司、鈴木 光、百瀬俊也、内田茂治、日野 学. スクリーニング NAT のプール数の縮小効果について. 第58回日本輸血細胞治療学会総会(2010年5月 名古屋)

2) 小川正則、伊藤 明、菅原嘉都恵、稲葉頌一、百瀬俊也、内田茂治、吉田和彦. HBV-DNA 陽性血液受血者の追跡. 第58回日本輸血細胞治療学会総会(2010年5月 名古屋)

3) 長谷川隆、山岸尚仁、古居保美、星 友二、鈴木 光、内田茂治、佐竹正博、田所憲治. HBV-NAT 陽性血液の解析における高感度検出法の導入. 第34回日本血液事業学会総会(2010年9月 福岡)

**C型肝炎ウイルス（HCV）の感染防御抗体に関する検討
－ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験－**

広島大学大学院 疫学・疾病制御学

田中純子、片山恵子、松尾順子、田淵文子

研究要旨

本研究では、HCV env 抗体高力価陽性者（全例 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 の不活化処理を行った後に作製したガンマグロブリン分画（HCIG 候補）について、これまでに *in vitro* での感染阻止能について検討を行った結果、感染増殖（virus 活性の）抑制能が認められ、特に genotype 1b に対する感染阻止能を有する可能性が示唆された。また、*in vivo* において、HCV genotype 2a の接種材料に対する中和活性は必ずしも十分なものではなかった。

今年度、HCIG 候補投与後に genotype 1b の接種材料を用いた感染実験を実施したところ、この HCIG 候補は、HCV genotype 2a に対するより genotype 1b に対する感染阻止能を有することが示唆された。

A. 研究目的

これまでに、抗 HCV ヒト免疫グロブリンの開発を目指して、HCV env 抗体高力価陽性者（全例 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）を行った後にガンマグロブリン分画

（HCIG 候補）を作製し、この HCIG 候補の *in vivo* での感染力及び感染阻止能について検討を行った。その結果、HCV genotype 2a の接種材料に対する HCIG 候補の中和活性は必ずしも十分なものではなかった。一方、この HCIG 候補に

ついて *in vitro* での感染増殖阻止能についての検討を行ったところ、genotype 1b に対する感染阻止能を有する可能性が示唆されたことから、今年度はこの HCIG 候補の HCV genotype 1b に対する感染阻止能を確認するためにヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験を行った。

B. 対象と方法

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；PXB マウス®フェニックスバイオ(株)；lot. BD85）を計3匹用いた（表1）。

2. HCIG 候補：

HCV env 抗体高力価陽性者由来のプール血漿(HCV genotype 1b)のプール血漿を不活化処理（SD 処理）後、コーン冷エタノール分画法により作製した（タンパク質濃度 5.76%）。

3. HCIG 候補の投与：

HCIG 候補 50ul/回（タンパク量 2.88mg/回）を5回連日投与後、2日目にHCV を接種した。接種後、HCIG 候補（50ul/回）を週1回追加投与し続け12週目まで観察した（図1）。

4. 接種材料は、フェニックスバイオ(株)保有の接種材(lot.080811)；HCV RNA 10⁷copies/ml、genotype 1bを用いた。この接種材料は、10⁴コピー相当をそれぞれキメラマウス3匹に接種した感染実験により、3匹すべてに接種後1週目から末梢血中にHCV RNA が検出された。最大10⁶コピー/ml から10⁹コピー/mlを示し、HCV 感染が成立したことは確認されている（図2）。

この接種材料を10²倍希釈し、100ul を経尾静脈で接種した（10⁴コピー相当を接種）。

表1. ヒト肝細胞置換キメラマウスの内訳

個体番号	性別	h-ab (mg/ml)	置換率 (%)	体重 (g)	HCV 接種時週齢
101	♀	9.7	80	17.9	11
102	♀	8.3	76	18.3	11
103	♂	11.9	86	17.1	10

受胎検査 + 投与終了2日目HCV (genotype 1b)接種 + 追加受胎検査

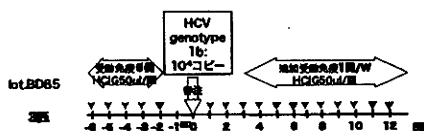


図1. プロトコール

接種材料：HCV RNA:10⁷copies/ml、genotype 1b (lot.080811; フェニックスバイオ(株)保有感染材料)
10²倍希釈し、100ul接種：10⁴コピー相当接種

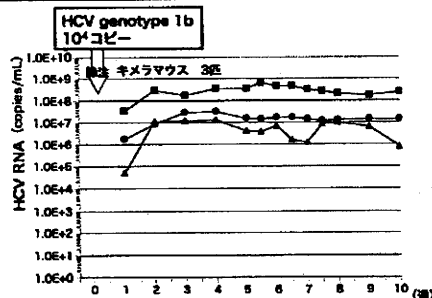


図2. HCV genotype 1b 10⁴コピーを接種した感染実験結果 (フェニックスバイオ(株)より提供)

5. 採血：週3回採血を行い、接種後12週目まで経過を観察した。

6. 測定項目：HCV RNA の検出は5'non-coding region を primer とする nested RT PCR により行い、HCV RNA 量の定量は Real time PCR (ABI One

Step®)により行った。HCV env 抗体価の測定は、EIA 法にて行った。

C. 結果

キメラマウス 3 匹中、No.101 は、12 週間の経過観察期間内に HCV RNA は検出されず、感染防御が成立した。キメラマウス No.102 は、HCV 接種後 6 週目までは HCV RNA は検出されなかったが 7 週目以降より HCV RNA が検出され感染成立を認め、残りの 1 匹 No.103 は、HCV 接種後早い時期から HCV RNA を検出し、3 匹中 2 匹に感染の成立を認めた (図 3)。

D. 結論と考察

これまで(前年度まで)に、HCIG 候補による受動免疫後に HCV genotype 2a :10⁴ コピー相当をキメラマウス 4 匹に接種した場合、6 週までの観察期間内に、1 匹は一過性感染、3 匹は 1 週目から HCV RNA が検出され感染が成立した (図 4)。HCIG 候補の HCV genotype 2a に対する感染阻止能は、感染を防御するほど十分なものでないことが確認されている。

今年度の検討 (genotype 1b : 10⁴ コピー相当の接種実験) では、6 週までの観察期間内に、1 匹は感染したが、2 匹は感染が認められず、この HCIG 候補は、HCV genotype 2a に対するより genotype 1b に対する感染阻止能を有することが示唆された。12 週までを観察期間とした場合には、7 週目より HCV RNA が検出され最終的に 3 匹中 2 匹の感染が確認された。

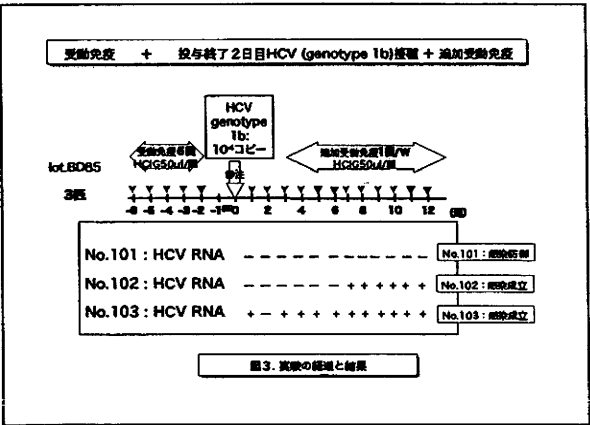


図3. 実験の経過と結果

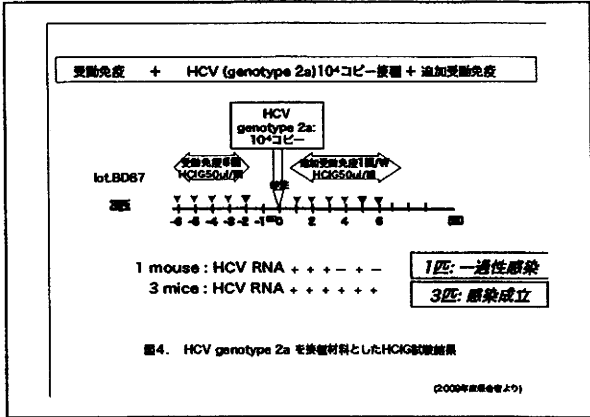


図4. HCV genotype 2a を接種材料としたHCIG試験結果

(2009年度報告より)

HCIG 候補作製時にプールされた血漿は genotype1b であったことから、感染防能はプールされた血漿の genotype が影響を受けることも考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

In-vivo における HBs 抗体の感染阻止能定量についての検討
－ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験－

広島大学大学院 疫学・疾病制御学

田中純子、片山恵子、松尾順子、田淵文子

研究要旨

本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染を防御する末梢血中の HBs 抗体価とウイルス量との関係を明らかにすることを目的として、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて HBIG による受動免疫後に HBV genotype A を接種する感染実験を行った。

これまでに HBIG 2.5IU/回 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 コピーを接種した感染実験では感染防御が成立した。末梢血中の HBs 抗体価は約 1000mIU/ml (HBV 接種時) では感染が防御されることが明らかになっている。今年度はさらに HBs 抗体価を減量調整し、接種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明らかにする。HBV genotype A 10^5 コピーの感染を防御する末梢血中の HBs 抗体価の定量（最少）を試みた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染を防御する末梢血中の 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)による受動免疫を行った後に、HBV を接種し、HBV genotype A 10^5 コピーの感染防御できる末梢血中の最少 HBs 抗体価の定量を試みた。

B. 対象と方法

1. HBIG の投与量を減量調整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（実験-1）

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；PXB マウス®フェニックスバイオ(株)；lot. BD85）を計 6 匹用いた（表 1）。

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) 接種材料 (HBV genotype A の接種材料 P-59)

ヒト (献血者) 由来の HBV 感染早期の新鮮凍結血漿(FFP)接種後 59 日目のチンパンジーの血清で、HBV の genotype A、HBV DNA 量 4.8×10^6 コピー/ml、HBc 抗体陰性である¹⁾。

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 1 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 2 群、各群 3 匹ずつ、HBIG を筋注した。

5) HBV 接種方法

各群の HBIG 筋注終了から 48 時間後に、genotype A の接種材料 100ul (10^5 コピー相当) を経尾静脈より接種した (図 1)。

6) 採血：

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。

7) 測定項目：

HBs 抗体価の測定は、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。

また、HBV DNA の検出は S-region を primer とする nested PCR により行い、HBV DNA 量の定量は Real time PCR(ABI One Step®)により行った。

表 1. ヒト肝細胞癌細胞系 HCC-Ma の内臓 (実験-1)

個体番号	性別	h-alb (mg/ml)	置換率 (%)	体重 (g)	HBV 接種時週齢
1群:					
101	♀	8.2	75	21.0	13
102	♂	10.1	81	20.9	13
103	♂	10.3	82	18.4	12
2群:					
201	♂	8.9	78	20.1	13
202	♂	9.7	80	21.7	12
203	♂	11.5	85	18.6	11

受動免疫 + 投与終了2日目にHBV (genotype A; P-59)
(2匹各群、4匹各群HBIG 25ul/回 1回) (原液: 10^5 コピー相当を接種)

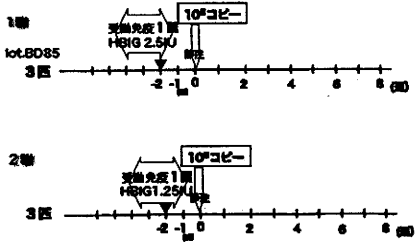


図 1. 実験プロトコール (実験-1)

表 2. ヒト肝細胞癌細胞系 HCC-Ma の内臓 (実験-2)

個体番号	性別	h-alb (mg/ml)	置換率 (%)	体重 (g)	HBV 接種時週齢
1群:					
301	♂	10.2	82	21.7	13
302	♂	9.2	79	19.4	13
303	♂	11.4	85	20.9	12
2群:					
401	♂	9.6	80	20.1	13
402	♂	10.2	82	19.8	13
403	♀	9.8	80	18.5	13

2. HBIG 2.5IU/回を 1 回投与した受動免疫実施後に、HBV genotype A の接種日を調整した感染実験 (実験-2)

同 6 匹を用いて (表 2)、HBIG 2.5IU/回を 1 回投与した受動免疫実施後に、HBV genotype A の接種日を調整した感染実験 (HBIG 筋注終了後 5 日目に接種する 1 群と、10 日目に接種する 2 群) を行った (図 2)。いずれも、感染材料接種後、週 1 回採血し感染成立の有無を HBV DNA の検出の有無により接種後 8 週目まで観察し、観

察終了時には末梢血中の HBs 抗体価をすべての採血時の血清を同時測定した。

HBs 抗体価の測定は、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。

また、HBV DNA の検出は S-region を primer とする nested PCR により行い、HBV DNA 量の定量は Real time PCR(ABI One Step®)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、マウスの採血はイソフルラン麻酔下で行っている。

C. 結果

1. HBIG の投与量を減量調整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 (実験-1)

HBIG2.5IU を 1 回投与した 1 群では、8 週目までの経過観察中に HBV DNA は 3 匹すべて検出されず、感染防御が成立した(図-3上段)。HBIG 投与 2 日目の HBV 接種時の末梢血中の HBs 抗体価は 800~900mIU/ml を示した。

HBIG1.25IU を 1 回投与した 2 群では、3 匹中 2 匹に感染が成立し (8 週目に HBV DNA が検出)、残りの 1 匹は、感染防御が成立した (8 週目まで HBV DNA は検出されず)。この 3 匹の HBV 接種時の末梢血中の HBs 抗体価は 380~420mIU/ml であった (図-3下段)。

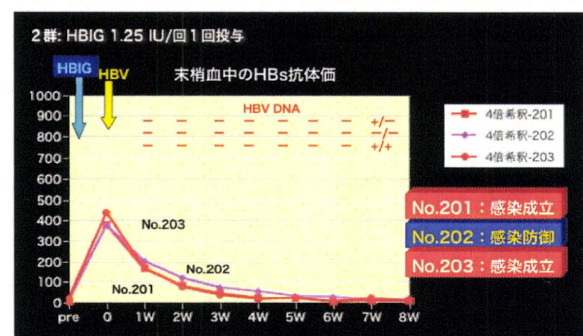
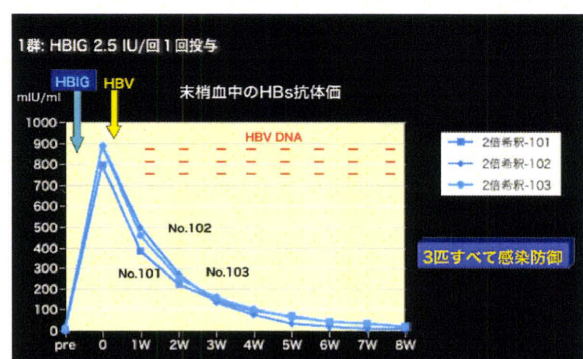
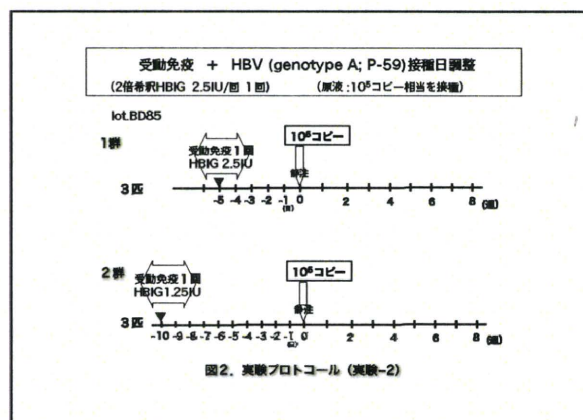


図3. 実験-1 結果

2. HBIG 2.5IU/回を 1 回投与した受動免疫実施後に、HBV genotype A の接種日を調整した感染実験 (実験-2)

1) HBIG2.5IU を 1 回投与し、HBIG 投与 5 日目に HBV 接種を行った 1 群:

8 週目までの経過観察中に 3 匹すべて HBV DNA は検出されず、感染防御が成立した。この 3 匹の HBIG 投与後 1 日目の末梢血中の HBs 抗体価は、490、780、790 mIU/ml を示した (図 4)。

2) HBIG2.5IU を1回投与し、HBIG 投与10日目にHBV接種を行った2群は、現在実験進行中である。

D. 考察

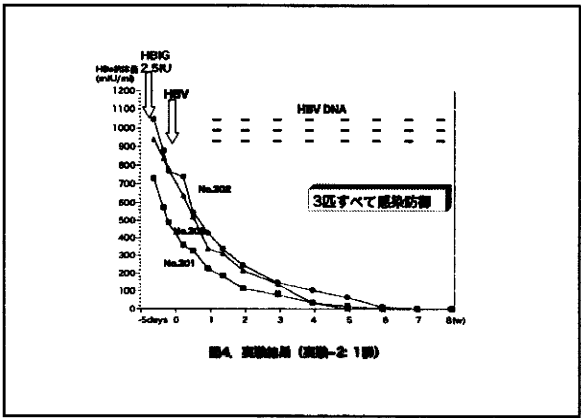
これまでに実施した感染実験結果を本に検討した結果、今年度は、HBIGの投与量を2.5IU/回の1回投与に減量し、かつ、HBV接種日を調整することで、感染防御しうる最少の末梢血中のHBs抗体価を決定することを試みた。

今年度の結果から、感染早期のHBV10⁵コピーの感染を防御する末梢血中のHBs抗体価は、抗体産生能を有しないキメラマウスにおいてHBs抗体価400mIU/ml前後と推定されるが、現在、最少のHBs抗体価を決定するための感染実験を進行中である。

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. 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



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

献血を契機に発見された HCV キャリアの追跡調査
- 長期経過中の肝炎発症と HCV RNA 自然消失 -

田中純子 松尾順子 片山恵子 田淵文子 秋田智之

広島大学大学院 疫学・疾病制御学

広島県肝炎調査研究会

研究要旨

広島県赤十字血液センターでは、1991 年 8 月から、献血時の検査に於いて見つかった HCV キャリアに対して通知を行い、以後の献血の辞退への協力をお願いと共に、県内の肝臓専門医への受診をすすめてきた。専門医と、広島県赤十字血液センター、広島大学および広島県肝炎調査研究会では、献血を契機に見出された無症候性 HCV キャリアの病態や経年推移を明らかにすることを目的に 1991 年から調査を開始し 2003 年までの 1,019 例についての前向き調査結果をまとめた。さらに 2009 年度に調査を再開し、2009 年時点における肝病態の推移について報告した⁽¹⁻⁸⁾。

調査対象は、前回から 2 例増加し、また 1 例 HCV キャリアでないことが判明したため、1,020 例である。下記の結果が得られた。

- 1) 献血を契機に判明した無症候性 HCV キャリアのうち 54%では、初診時すでに臨床的に慢性肝炎かそれ以上に肝疾患が進展していた。このことから、住民検診や職場での健康診断を契機に HCV キャリアと判明した場合でも、同様の結果が得られるものと推測された。
- 2) 調査開始より 18 年目(2009 年)の調査では、75%が受診継続をしていない。この中には治癒例が含まれているが、1 日のみの受診も含め 1 年未満で受診を中止したものは約 30%であった。今後の検討課題といえた。
- 3) IFN による抗ウイルス療法を施行しないまま、観察期間中に HCVRNA が消失した 3 例の IL 28B SNPs genotype は、自然治癒と関連が指摘されているタイプのメジャーアレルであった。初診時「異常を認めず」と診断された HCV キャリアからの HCVRNA 自然消失率は、1 万人年あたり 13.2 であった。
- 4) 初診時「異常を認めず」のいわゆる無症候性キャリアからの 10 年累積慢性肝炎罹患率は 40 代で最も高く(67%)、他の年代では 40%程度であった。観察終了時の累積慢性肝炎罹患率は全体では 87.5%となった。
- 5) コックス比例ハザードモデルを用いて多変量解析をすると、肝発がんの独立したリスク要因としては、「初診時の年齢が高い」、「初診時に慢性肝炎と診断された」ものが挙げられた。観察期間中に、慢性肝炎と診断された 703 例を対象として検討した結果、「慢性肝炎診断時の年齢」が肝発がんの独立したリスク要因としてあげられた。

A. 研究目的

自覚症状がないまま、献血を契機に見出された HCV キャリアの発見時の肝病態と、それらの経年的な経過を明らかにすることを目的として調査を行っている。今年度は、献血で見つかった自覚症状がない HCV キャリアの通知された後の受診継続状況、抗ウイルス療法の施行状況、また、いつまで無症候性キャリアなのか、など長期経過中の肝炎発生状況と自然消失を中心として検討した。

B. 対象と方法

広島県赤十字血液センターでは 1991 年から 2001 年までに献血時の HCV 抗体陽性者に HCV キャリアとして 3,377 例通知を行い、県内 20 の病院の肝臓専門医への受診を勧奨した(図 1)。そのうち 1,097 例が受診し、受診率は 32.5%であった。

2003 年までの報告では受診後、初診日がはっきりし診断名確定した対象 1,019 例について各医療機関での診療データに基づいて肝病態の推移、経過を解析した。2009 年に新規に受診した症例が加わったことで、対象 1,020 例となりそれらの経過について以下のような解析を行った。なお、本調査は広島大学疫学研究倫理審査委員会の承認を得ている。

1) 全体を対象とした解析

- a) 初診時・最終受診時の臨床診断の内訳と推移
- b) 受診継続の状況
- c) HCV RNA 自然例と消失率

2) 無症候性キャリアから発症した慢性肝炎をエンドポイントとした解析

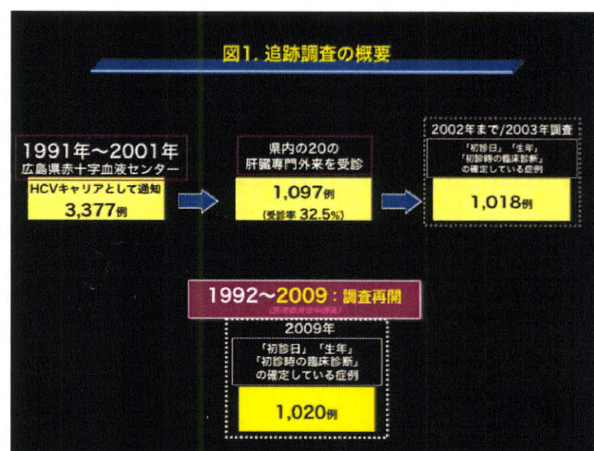
3) 肝がん発症をエンドポイントとした解析

- a) 全体を対象とした解析
- b) 観察期間中に「慢性肝炎」と診断されたものを対象とした解析

表 1. 広島県肝炎調査研究会 2009-2010

安佐市民病院	辻 恵二	広島総合病院	石田 邦夫
県立安芸津病院	三浦 敏夫	広島鉄道病院	山科 敬太郎
県立広島病院	北本 幹也	呉医療センター	高野 弘嗣
呉市医師会病院	片山 紀彦	広島西医療センター(前)	津田 敏孝
呉共済病院	山口 修司	福山医療センター	坂田 達朗
広島大学病院	茶山 一彰		金吉 俊彦
	高橋 祥一	三菱三原病院	寺面 和史
広島記念病院	児玉 英章	庄原赤十字病院	鎌田 耕治
広島市民病院	荒木 康之		(前) 中西 敏夫
	岡本 良一	中国労災病院	守屋 尚
広島赤十字・原爆病院	相坂 康之	中電病院	石原 浩人
	(前) 相光 汐美	日本鋼管福山病院	吉田 智郎
広島県赤十字血液センター		尾道総合病院	大林 諒人
広島大学名誉教授	吉澤 浩司	広島大学大学院	疫学・疾病制御学

図 1. 追跡調査の概要



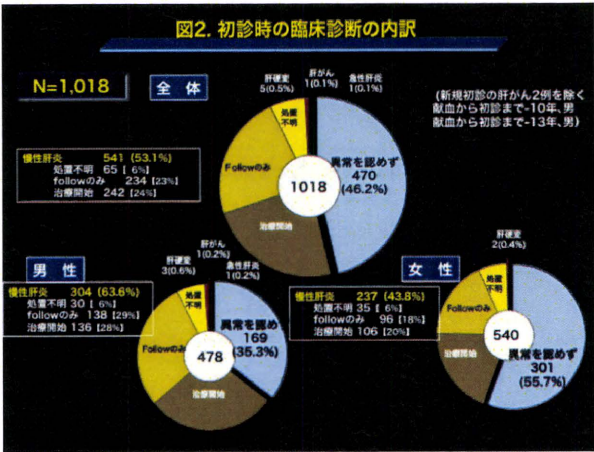
C. 結果

1) 全体を対象とした解析

a) 初診時・最終受診時の臨床診断の内訳と推移

新規初診の 2 例を除く 1018 例で初診時の臨床診断の内訳は、53%以上が「慢性肝炎」と診断され、平均観察期間は 7.13 ± 6.65 年で(最短 1 日から最長 18.43 年) 男性は 480 例 (47.0%)、女性は 541 例 (53.0%) であった。1,020 例中 541 例 (53.1%) が慢性肝炎、5 例 (0.5%) が肝硬変、3 例が肝がん、1 例が急性肝炎と診断された。残りの 470 例は血液生化学検査や、画像検査などで異常を認めないと診断されていた(図 2)。残り 65 例

は診断時処置判断不明であった。2009 年の調査のでは、初診時肝がんの 2 例が追加となった。

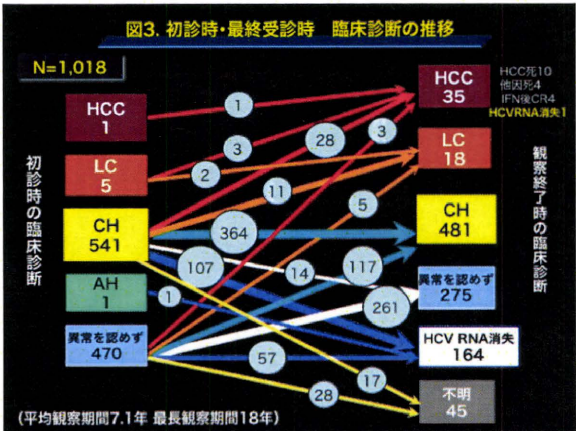


男女別にみると慢性肝炎と診断された男性は半数以上 62.2 % (299/480)、女性では 42.6 % (231/542) であった。肝がんと診断されたのは 3 例とも男性であった。

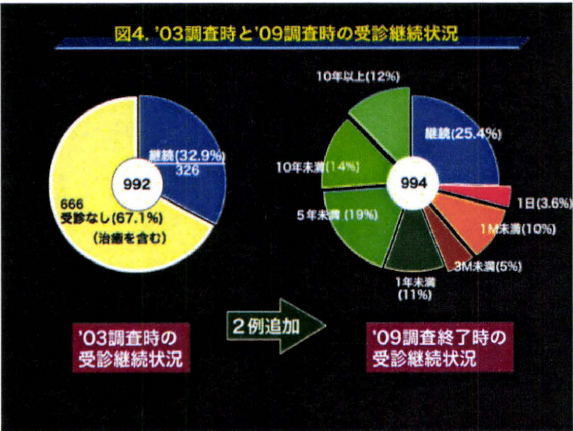
2009 年調査時における最終受診日の臨床診断の内訳を、初診時からの推移として図 3 に示す。最終的に肝がんと診断されたものは 35 例であった。初診時に「異常を認めず」と診断された 3 例から、慢性肝炎と診断された 28 例から肝がんへと肝疾患の進展が認められた。HCV RNA 消失は 164 例に認められ、そのうちインターフェロン (IFN) 治療を行っていないのに HCV RNA の消失していた例が今回の調査で計 3 例であった。これについては後述する。

b) 受診継続の状況

2003 年の調査時に初診日および最終受診日



が確定していた 992 例にて、2003 年の調査時現在で受診の継続があるかないかを検討すると、666 例 (67.1 %) は受診継続が無くなっていた (図 4)。受診がない理由は 539 例 (80%) が不明で、治癒と死亡が各 10 例ずつ (1.5%)、転院 107 例 (16.1 %) であった。



そのうちの 100 例は、その後に再受診していたことがわかったが、2009 年調査終了時に、受診継続があるものは 252 例 (25.3 %) しかいなかった。受診が 1 回だけの 1 日を含む、3 ヶ月末満で受診をやめてしまったのが全体の約 20 %、1 年未満を含めると約 30 % となった。

c) HCV RNA 自然例と消失率

IFN 治療をしていない自然経過による HCV RNA 消失は 3 例に認められた (表 2)。2 例は初診時に「異常を認めず」であり、1 例

は慢性肝炎と診断されていた。ジェノタイプは2a、2b、検出できずであった。IL28 B 関連SNPsの検討では、3例すべて、rs8099917とrs12979860について、TTとCCでありどちらも日本におけるメジャーアレルであった。

表 2. IFN治療なしでHCV RNAの消失を認めた3症例

性別	初診/消失確認 年齢	初診時/ 最終診断	genotype	IL 28B SNPs	
				rs8099917	rs12979860
1 M	64(94)/70(00)	異常を認めず /異常を認めず	2a	TT	CC
2 F	43(93)/58(08)	異常を認めず /脂肪肝	N.D.	TT	CC
3 M	54(92)/69(07)	CH /LC・HCC	2b	TT	CC

N.D.: 検出できず

また、IFN 治療をしていない 599 例について、初診時診断別に自然経過による HCV RNA 消失率を算出すると(表 3)、初診時に「異常を認めず」と診断された 331 例では、1 万人年あたり 13.2、また「慢性肝炎」と診断された 264 例では一万人年あたり 0.90 となった。初診時に肝硬変か肝がんと診断された症

表3. 初診時診断別の自然経過によるHCV RNA消失率

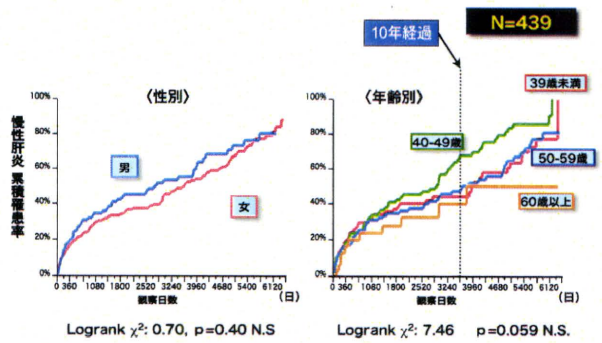
初診時診断	例数	消失例	観察期間(年)	HCV RNA消失率 /10,000人年 (95%CI)
異常を認めず	331	2 (0.6%)	1509.5	13.2 (1.6-47.5)
慢性肝炎	264	1 (0.4%)	1117.0	0.90 (0.2-49.9)
肝硬変	3*	0	25.8	
肝臓癌	1*	0	2.9	
計	599			

例は少なく、また自然消失例はないため、算出は行わなかった。

2) 無症候性キャリアから発症した慢性肝炎をエンドポイントとした解析

HCV キャリアが「異常を認めず」と診断されても、どれくらいの時間経過にて慢性肝炎と判断できる程度病態が進行するかを明らかにするために、慢性肝炎発症の累積罹患率を検討した。対象は初診時「異常を認めず」と診断された 439 例で、「慢性肝炎」と診断された時をエンドポイントとし、カプランマイヤー法にて算出を行った(図 5)。男女別、年齢別での有意差は認められなかった。10 年累積罹患率をみると 40 代では 67%と一番高く、他の年代では約 40%であった。

図5.初診時「異常を認めず」を対象とした慢性肝炎への移行



3) 肝がん発症をエンドポイントとした解析
a)全体を対象とした解析

最終受診日、最終臨床診断、IFN 治療の有無が明らかだった 963 例を対象とし、性別、初診時年齢、初診時診断、IFN 治療の有無を要因とし、初診日をスタートポイント、肝がん診断日をエンドポイントとして、コックス比例ハザードモデルにて解析を行った(表 4)。独立したリスク要因として「初診時の年齢が高い」と「初診時に慢性肝炎と診断された」ということが挙げられた。初診時年齢が 40 歳代でのリスク比は 7.78 (95 % C.I. :1.45-143)、50 歳代で 13.1 (95% C.I. : 2.57-240)、60 歳以上では 23.0 (95% C.I. :

4.07-431)であり、年齢が高くなるほど、リスク比も高くなった。

また、「初診時慢性肝炎と診断された」のリスク比は 6.57(95%C.I. : 2.24-28.0)であった。

表 4.

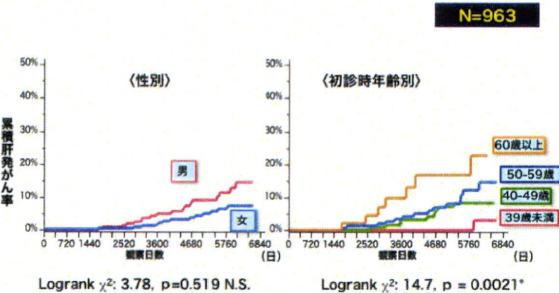
肝発がんに関連する独立要因の検討				
要因	対象数	リスク比	95%信頼区間	p 値
性別 (男/女)	451/512	2.02	0.97-4.29	0.0596
初診時年齢				
(40～49歳/～39歳)	285/293	7.78	1.45-143	0.0131*
(50～59歳/～39歳)	300	13.1	2.57-240	0.0006*
(60歳～/～39歳)	85	23.0	4.07-431	0.0001*
初診時診断 (慢性肝炎/異常を認めず)	524/439	6.57	2.24-28.0	0.0002*
IFN治療の有無 (有/無)	389/574	1.25	0.60-2.72	0.5471
N=963				

しかし、無症候性キャリアからの発がんリスクは低いと経験的にも充分予想されうることであり、その影響をなくして解析するため、肝炎に進展してからの肝発がん発症について検討した。

b)観察期間中に「慢性肝炎」と診断されたものを対象とした解析

初診時を含めた観察期間中に「慢性肝炎」と診断された 703 例のみを対象とし、慢性肝炎の診断日をスタートポイント、肝がん診断日をエンドポイントとしてカプランマイヤー法を用い、リスク要因について単変量解析を行った(図 6)。

図6. 肝発がんに関連する要因の検討



-Kaplan-Meier法による生存時間解析-

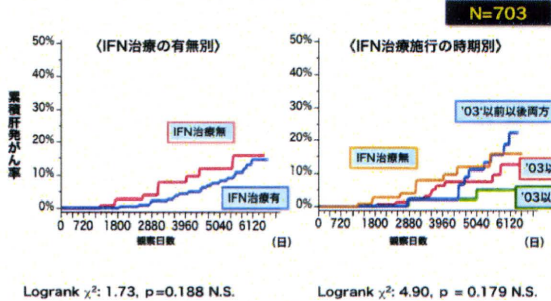
(1020例より初診時肝硬変・肝がん・急性肝炎の9例と最終受診日・診断不明の48例を除く)

性別では有意差は認められないが、慢性肝炎

診断時の年齢別では高齢であるほうが、有意にリスクが高くなっていた。

続いて、IFN 治療の有無別にて検討を行うと有意差は認められなかった(図 7)。

図7. 慢性肝炎を対象とした肝発がんに関連する要因の検討
- IFN治療の有無・時期別 -



-Kaplan-Meier法による生存時間解析-

しかし、この IFN 治療には、1990 年代の治療効果がまだ高くないものも含まれているため、さらに IFN 治療施行の時期別で検討すると、有意差は認められなかったものの 2003 年以降に IFN 治療を受けたものは累積肝発がん率が低くなっていた。

コックス比例ハザードモデルによる多変量解析でも単変量解析と同様に、慢性肝炎診断時の年齢が高いことのみが独立したリスク要因として挙げられた(表 5)。

慢性肝炎を対象とした肝発がんに関連する独立要因の検討

要因	対象数	リスク比	95%信頼区間	p 値
性別 (男/女)	354/339	2.12	1.03-4.49	0.0426
慢性肝炎診断時の年齢				
(40～49歳/～39歳)	198/192	7.07	1.31-130	0.0191*
(50～59歳/～39歳)	230	12.1	2.33-221	0.0011*
(60歳～/～39歳)	83	22.8	4.07-426	<.0001*
IFN治療の有無(有/無)	377/326	1.26	0.56-2.69	0.5618
N=703				