

野好彦、川田潤一、木村宏、伊藤嘉規. 肝移植後小児におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性の検討（成人例との比較）、第44回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012. 11. 24-25

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

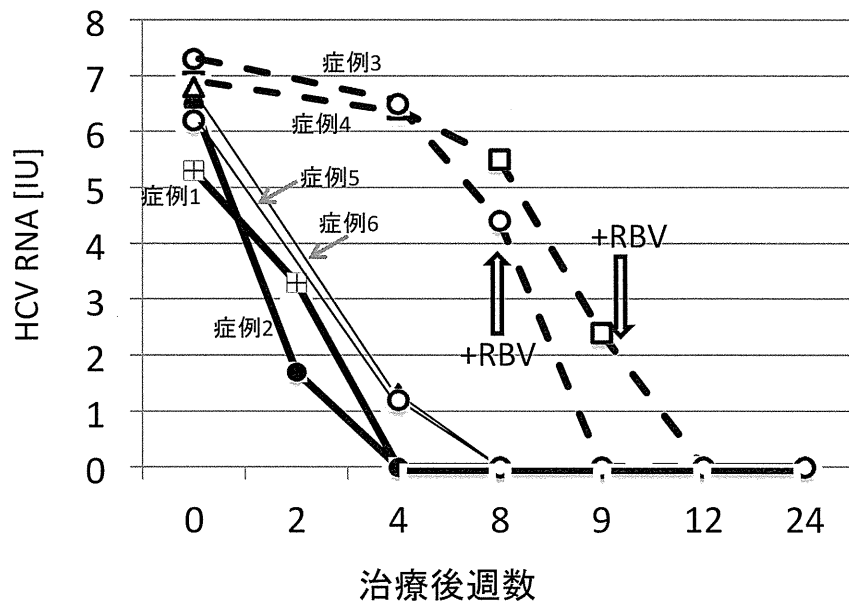
なし

(表1) HCVゲノタイプII型ペグインターフェロン治療例

症例No.	年齢(治療開始時)	性別	初回/再治療	治療開始	RBV併用開始	治療4週	治療終了時	治療終了6カ月後
1	9	M	初回	Peg-IFN α -2a	使用せず	RVR	ETR	SVR
2	9	F	初回	Peg-IFN α -2a	使用せず	RVR	ETR	SVR
3	13	F	初回	Peg-IFN α -2a	治療10週		ETR	SVR
4	8	F	初回	Peg-IFN α -2a	治療8週		ETR	SVR
5	11	M	再治療	Peg-IFN α -2b	治療開始	RVR	ETR	SVR
6	12	F	初回	Peg-IFN α -2b	治療開始	RVR	ETR	-

RVR, rapid virological response; ETR, end-of-treatment response; SVR, sustained virological response

(図1) ペグインターフェロン治療後のHCV RNAの推移



厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
小児期のウイルス性肝炎に対する治療法の標準化に関する研究
分担研究報告書

小児 HBV 感染および HCV 感染の治療効果に関する疫学的評価
小児 B 型慢性肝炎のインターフェロン治療効果について

研究分担者 細野覚代 愛知県がんセンター研究所 疫学・予防部 主任研究員

研究要旨

成人の B 型慢性肝炎および C 型慢性肝炎に比較して、小児ウイルス慢性肝炎の患者数は非常に少ない。そのため、小児ウイルス肝炎の自然経過や治療効果について大規模な調査を行うのが困難であった。本研究班の目的である「小児ウイルス肝炎の標準的治療方法の立案」のため、昨年度は小児ウイルス肝炎の診療情報データベース作成を行った。治療ガイドラインの策定に必要な情報として、小児ウイルス肝炎症例の基本データ、治療情報、長期予後などを調査項目とした。

本年度はこのデータベースを使用し、小児 B 型慢性肝炎のインターフェロン (IFN) 治療効果を検討した。今回の解析では小児 B 型慢性肝炎に対する IFN 治療効果はセロコンバージョンと有意な関連は示されなかった。しかし、長期間観察すると IFN 治療例ではセロコンバージョンを起こす可能性がより高いようである。現在もデータ収集を継続しているので、来年度はより大規模な小児 B 型および C 型慢性肝炎のデータ解析と検討を行う予定である。

A. 研究目的

小児ウイルス肝炎の治療ガイドラインの策定には、まず正確な小児ウイルス肝炎の実態把握調査が必要である。前年度より継続して小児 B 型慢性肝炎および C 型慢性肝炎の診療情報を収集し、これを基に全国的規模の小児慢性ウイルス肝炎データベースを作成した。このデータベースを用いて、小児 B 型慢性肝炎のインターフェロン (IFN) 治療効果と治療効果に影響する因子について解析を行う。

B. 研究方法

(1) 調査対象者

昨年度作成した調査票を用いて本研究の協力施設より診療情報の提供を受け、データベースを作成した。

今回は 1977 年 9 月から 2012 年 9 月までに診断された小児 B 型慢性肝炎 244 例を対象に IFN 治療の効果を検討した。

(2) 解析方法

アウトカムはセロコンバージョンを使用した。診断日を観察開始とし、セロコ

ンバージョン症例ではセロコンバージョンの確認日、セロコンバージョンを起こさなかった例は最終受診日を観察打ち切りとした。検定はログランクテスト、多変量解析はコックス比例ハザードモデルを使用した。調整因子は治療直前または診断時 ALT (ALT 60 IU/L 未満または 60 IU/L 以上)、性別 (男または女)、診断年齢 (3 歳未満または 3 歳以上)、HBV ゲノタイプ (C 型または non-C 型または不明・未検)、HBVDNA 定量 (4 log copies/mL 未満または以上または不明・未検) とし、治療施設、治療年も解析に含めた。肝生検は実施症例が少ないため、肝炎の活動性 (A0・A1 または A2・A3 または不明) と繊維化 (F0・F1 または F2・F3・F4 または不明) の評価はログランクテストのみ実施した。

C. 研究結果

B 型慢性肝炎 244 例 (IFN 治療例 37 例と非治療例 207 例) を解析対象とした。

非治療例の診断年齢は 0 から 20.1 歳 (中央値 0.09)、治療例の診断年齢は 0 から 12.0 歳 (中央値 4.56) で、治療例で有意に診断年齢が高かった ($P = 0.0122$)。治療直前または診断時 ALT は治療例で有意に高いが ($P < 0.001$)、HBVDNA 定量は有意に低かった ($P = 0.0279$)。治療例の HBV ゲノタイプは C 型が多く、非治療例では不明・未検が多かった ($P = 0.001$)。IFN 治療例のセロコンバージョン率は 73.5%、非治療例は 36.1% であった (表 1)。

ログランクテストでは、IFN 治療の有無に関して P 値が 0.036 と統計学的な有意差を認めた (図 1)。さらに、治療直前または診断時 ALT が 60 IU/L 未満と 60 IU/L 以上のグループでログランクテスト

を行った場合、それぞれの P 値は 0.041 と 0.108 であった。(図 2-1, 2-2)

しかし、多変量解析では、IFN 治療の HR は 0.80 (95%CI : 0.38-1.70, $P = 0.566$) であった。治療直前または診断時 ALT が 60 IU/L 以上 (HR = 3.17, 95%CI : 1.79-5.61, $P < 0.001$)、診断年齢が高い (HR = 1.09, 95%CI : 1.03-1.15, $P < 0.001$) ことが HBV のセロコンバージョンに有意に関連していた (表 2)。

肝炎の活動性に関しては、A0・A1 症例のみの解析、A2・A3 症例の解析のいずれも IFN 治療とセロコンバージョンとの間に有意な関連は示されなかった (図 3-1, 3-2)。繊維化についても同様の結果であった。

D. 考察

小児 B 型慢性肝炎に対する IFN 治療効果を検討した。多変量解析では治療直前または診断時 ALT と診断年齢がセロコンバージョンと有意に関連していたが、IFN 治療では関連は示されなかった (表 2)。しかし、長期間観察すると IFN 治療例ではセロコンバージョンを起こす可能性が高いようである (図 1)。今後さらに登録症例を増やし、解析を行う。

E. 結論

小児 B 型慢性肝炎に対する IFN 治療効果は今回の解析ではセロコンバージョンと有意な関連は示されなかった。しかし、長期間観察すると IFN 治療例ではセロコンバージョンを起こす可能性が高いようである。2001 年以降に IFN 治療を受けた症例が全体の 59.4% を占めているので、これからも厳密な予後調査を行い、長期的な観点から IFN 治療効果を検討する必

要がある。

2013.1.25 大阪

現在も症例登録が続いているので、データベース完成後に最終的な解析を行う予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

F. 健康危険情報

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakao M, Hosono S, Ito H, Watanabe M, Mizuno N, Sato S, Yatabe Y, Yamao K, Ueda R, Tajima K, Tanaka H, Matsuo K. Selected polymorphisms of base excision repair genes and pancreatic cancer risk in Japanese. J Epidemiol. 2012;22(6): 477-83.
- 2) 細野覚代、松田彩子、伊藤秀美 卵巣癌の罹患と死亡の動向 産科と婦人科 2012;79(6): 685-90.

2. 学会発表

- 1) Satoyo Hosono, Keitaro Matsuo, Hidemi Ito, Miki Watanabe, Isao Oze, Kaoru Hirose, Kazuo Tajima, Hideo Tanaka. Genetic risk predictor for colorectal cancer in Japanese population. 71th annual meeting of the Japanese Cancer Association. 2012.9.19. Sapporo.
- 2) 細野覚代 遺伝子多型による日本人の大腸癌リスクの予測について 第57回人類遺伝学会 2012.10.25 東京
- 3) 細野覚代 日本人女性におけるニコチン依存度と子宮頸がんリスクとの関連 第23回日本疫学会学術総会

表 1 小児 B 型慢性肝炎症例の特性

	IFN非治療例	IFN治療例	P値*
合計	207	37	
セロコンバージョン			<0.001
あり	129	9	
なし	73	25	
不明	5	3	
診断年齢			
中央値 (min, max)	0.09 (0, 20.1)	4.56 (0, 14.1)	0.012
性別			
男性	121	22	0.740
女性	86	15	
ALT (IU/L)			
中央値 (min, max)	43 (5, 1149)	131.5 (26, 1095)	<0.001
HBVDNA定量 (log copies/mL)			
中央値 (min, max)	9 (1, 98.3)	7.65 (6.6, 10)	0.028
HBVゲノタイプ			
C型	78	24	0.001
non-C型	13	4	
未検・不明	116	9	
診断年			
1990年以前	26	13	<0.001
1991-2000年	47	13	
2001年以降	124	11	

*カイ二乗検定またはWilcoxonランクサムテストによる。セロコンバージョン不明例は解析対象

表 2 多変量解析の結果

	治療例/非治療例	ハザード比 (95%信頼区間)*	P値*
インターフェロン			
治療なし	0/207	1 (reference)	
治療あり	37/0	0.80 (0.38-1.69)	0.555
診断年齢			
3歳未満	16/128	1 (reference)	
3歳以上	21/79	1.09 (1.03-1.15)	0.002
性別			
男性	22/121	1 (reference)	
女性	15/86	0.78 (0.46-1.31)	0.342
ALT (IU/L)			
60未満	5/118	1 (reference)	
60以上	27/68	3.37 (1.87-6.06)	<0.001
不明	5/21	-	
HBVDNA定量 (log copies/mL)			
4未満	0/5	1 (reference)	
4以上	11/66	0.54 (0.09-3.15)	0.489
未検・不明	26/136	0.66 (0.11-4.00)	0.648
HBVゲノタイプ			
C型	24/78	1 (reference)	
non-C型	4/13	1.78 (0.67-4.72)	0.248
未検・不明	9/116	0.98 (0.44-2.17)	0.955

*調整因子: 診断年齢、性別、ALT、HBVDNA定量、HBVゲノタイプ

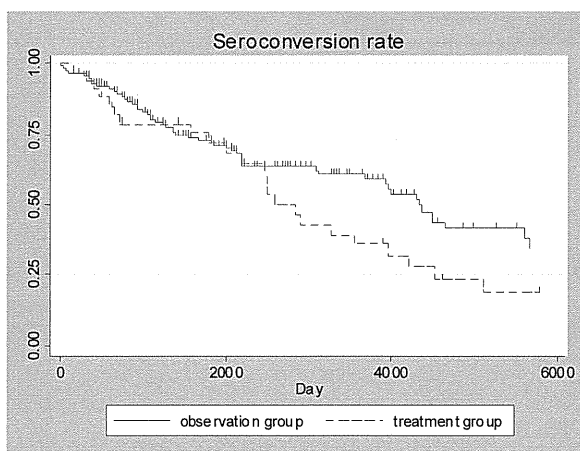


図 1 (ログランクテスト P = 0.034)

図1 IFN治療とセロコンバージョン

図2-1,2 ALTによる層別化解析:
IFN治療とセロコンバージョン

図3-1,2 肝炎活動性による層別化解析:
IFN治療とセロコンバージョン

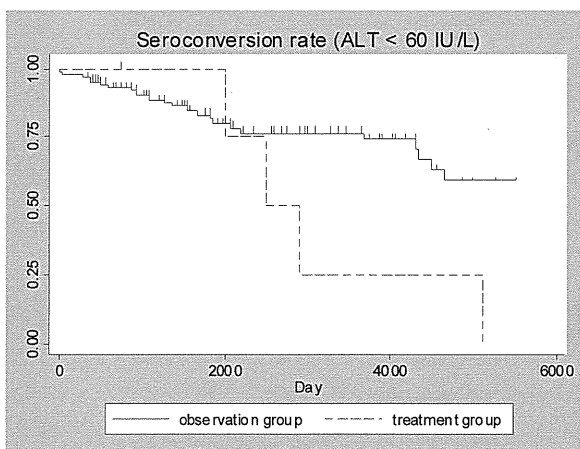


図 2-1 (ログランクテスト P = 0.041)

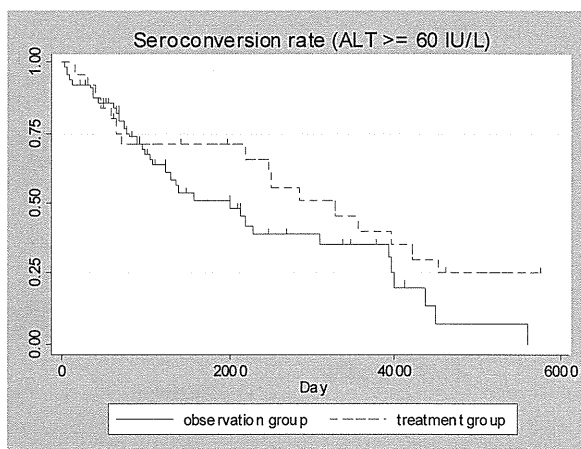


図 2-2 (ログランクテスト P = 0.108)

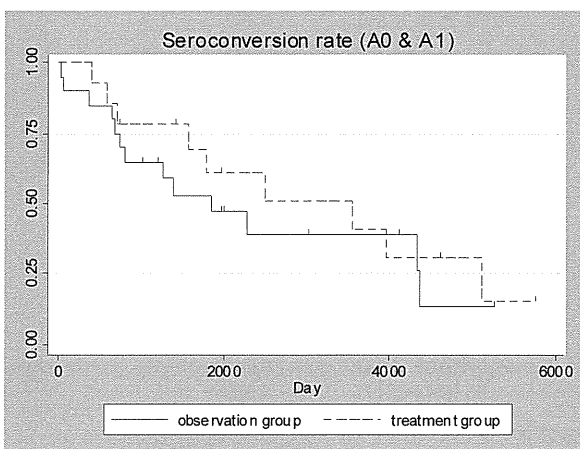


図 3-1 (ログランクテスト P = 0.508)

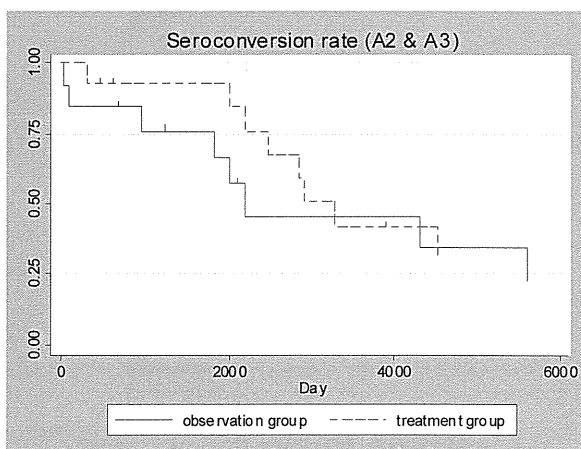


図 3-2 (ログランクテスト P = 0.749)

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
小児期のウイルス性肝炎に対する治療法の標準化に関する研究
分担研究報告書

高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防

研究分担者	田中 靖人	名古屋市立大学大学院	ウイルス学	教授
研究協力者	杉浦 時雄	名古屋市立大学大学院	新生児・小児医学	助教
研究協力者	田尻 仁	大阪府立急性期・総合医療センター	小児科	部長
研究協力者	伊藤 孝一	名古屋市立大学大学院	新生児・小児医学	助教
研究協力者	遠藤 剛	名古屋市立大学大学院	新生児・小児医学	助教

研究要旨

海外では、母親のウイルス量が多く、母子感染のハイリスクが予想される場合、妊娠後期に抗ウイルス薬を内服すると母子感染が減るという報告がある。今回我々は、第一子で HBV 母子感染が成立した母親に対して、第二子妊娠時に HBV 母子感染予防目的でラミブジンを投与し、母子感染防止に成功した。症例 1 は 33 歳女性。HBe 抗原陽性無症候性キャリア。3 年前に第一子出産。第一子は女兒。40 週、自然分娩、出生体重 3110g。通常通り出生時と生後 2 ヶ月時に HBIG、生後 2、3、5 ヶ月時に HB ワクチンを施行。生後 1 ヶ月時点で HBs 抗原陰性だったが、生後 6 ヶ月時に HBs 抗原陽性が判明。第二子妊娠時血液検査所見：AST 22 IU/L、ALT 14 IU/L、HBsAg 陽性、HBsAb 陰性、HBeAg 陽性、HBeAb 陰性。HBV DNA 9.1 Log copies/mL (リアルタイム PCR 法)。症例 2 は 31 歳女性。HBe 抗原陽性無症候性キャリア。3 年前に第一子出産。第一子は女兒。40 週、自然分娩、出生体重 2940g。通常通り予防処置を施行。生後 1 ヶ月時点で HBs 抗原陰性だったが、生後 3 ヶ月時に HBs 抗原陽性が判明。第二子妊娠時血液検査所見：AST 28 IU/L、ALT 21 IU/L、HBsAg 陽性、HBsAb 陰性、HBeAg 陽性、HBeAb 陰性。HBV DNA 9 Log copies/mL (リアルタイム PCR 法)。症例 1 は妊娠 28 週から、症例 2 は妊娠 32 週からラミブジンの内服を開始した。各施設倫理委員会承認。ラミブジン開始後、ウイルス量は出産前に症例 1 で HBV DNA 6.3 Log copies/mL まで、症例 2 で HBV DNA 6.7 Log copies/mL まで低下した。症例 1 は出産後 3 ヶ月で、症例 2 は出産後 1 ヶ月でラミブジン内服中止。2 例とも内服中止後も、トランスアミナーゼ値上昇は認めていない。ラミブジン内服中止後、2 例ともウイルス量は 9 Log copies/mL まで上昇した。2 例とも第二子は女兒。40 週、自然分娩。症例 1 の第二子は出生体重 3432g、症例 2 の第二子は出生体重 3512g。通常通り予防処置を施行。症例 1 の第二子、症例 2 の第二子ともに生後 1 歳時点で HBs 抗原陰性を確認している。HBV 高ウイルス量の妊婦に対し、妊娠第三期から抗ウイルス薬を投与し、出産時のウイルス量を下げることにより、2 例とも HBV 母子感染防止に成功した。

A. 研究目的

本邦では、1985年のB型肝炎ウイルス(HBV)母子感染防止事業開始以来、母子感染成立例は急速に減少した。母子感染によるHBVキャリア化率は1985年が0.26%であったのに対して、1995年には0.024%と、10年間で10分の1以下に低下している。しかしながら、HBe抗原陽性妊婦からの出生児の場合、防止処置を行っても5%はキャリア化する。海外では、母親のウイルス量が多く母子感染のハイリスクが予想される場合、妊娠後期に核酸アナログ(ラミブジン)を内服すると母子感染が減るという報告がある。今回我々は、第一子でHBV母子感染が成立した母親に対して、第二子妊娠時にHBV母子感染予防目的でラミブジンを投与した。

B. 研究方法

対象：名古屋市立大学病院の症例1は33歳女性。HBe抗原陽性無症候性キャリア。3年前に第一子出産。第一子は女兒。40週、自然分娩、出生体重3110g。通常通り出生時と生後2ヶ月時にHBIG、生後2、3、5ヶ月時にHBワクチンを施行。生後1ヶ月時点でHBs抗原陰性だったが、生後6ヶ月時にHBs抗原陽性が判明。第二子妊娠時血液検査所見：AST 22 IU/L、ALT 14 IU/L、HBsAg陽性、HBsAb陰性、HBeAg陽性、HBeAb陰性。HBV DNA 9.1 Log copies/mL(リアルタイムPCR法)(表)。

大阪府立急性期・総合医療センターの症例2は31歳女性。HBe抗原陽性無症候性キャリア。3年前に第一子出産。第一子

は女兒。40週、自然分娩、出生体重2940g。通常通り予防処置を施行。生後1ヶ月時点でHBs抗原陰性だったが、生後3ヶ月時にHBs抗原陽性が判明。第二子妊娠時血液検査所見：AST 28 IU/L、ALT 21 IU/L、HBsAg陽性、HBsAb陰性、HBeAg陽性、HBeAb陰性。HBV DNA 9 Log copies/mL(リアルタイムPCR法)(表)。方法：症例1は妊娠28週から、症例2は妊娠32週からラミブジンの内服を開始した。各施設倫理委員会承認。

C. 研究結果

ラミブジン開始後、ウイルス量は出産前に症例1でHBV DNA 6.3 Log copies/mLまで、症例2でHBV DNA 6.7 Log copies/mLまで低下した(図)。症例1は出産後3ヶ月で、症例2は出産後1ヶ月でラミブジン内服中止。2例とも内服中止後も、トランスアミナーゼ値上昇は認めていない。ラミブジン内服中止後、2例ともウイルス量は9 Log copies/mLまで上昇した。2例とも第二子は女兒。40週、自然分娩。症例1の第二子は出生体重3432g、症例2の第二子は出生体重3512g。通常通り予防処置を施行。症例1の第二子、症例2の第二子ともに生後1歳時点でHBs抗原陰性を確認している(表)。

D. 考察

HBV高ウイルス量の妊婦に対し、妊娠第三期から抗ウイルス薬を投与し、出産時のウイルス量を下げることにより、2例ともHBV母子感染防止に成功した。海外では、母親のウイルス量が多く、母子

感染のハイリスクが予想される場合、妊娠後期にラミブジンを内服すると母子感染が減るという報告がある。最近のメタ解析においても HBV 高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与の有効性、安全性が報告されている (Shi Z, et al. Lamivudine in late pregnancy to interrupt in utero transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010)。

出産時のウイルス量と母子感染のリスクに関して、母体の HBV DNA が 108 copies/ml 以上だと HBV 母子感染のハイリスクと報告されている。Xu らは 109 copies/ml 以上の高ウイルス量妊婦を対象とした多施設二重盲検試験を行い、ラミブジン投与群で分娩時に 107 copies/ml までウイルス量が低下し、プラセボ群に比べて児の母子感染率が有意に低下したと報告している (Xu WM, et al. Lamivudin in late pregnancy to prevent perinatal transmission of HBV infection: a multicenter, randomized, dupleblind, placebo-controlled study. *J Viral Hepat* 2009)。Shi らは前述のメタ解析の結果を踏まえて 106 copies/ml 以上がラミブジン投与の適応となると報告している。ラミブジンの内服開始時期は、報告によって妊娠 24 週から 32 週とばらつきがあるが、28 週が多かった。Shi らはラミブジン投与開始時期として 28 週以降を推奨している。名古屋市立大学病院では 28 週から、大阪府立急性期・総合医療センターでは 32 週から開始した。胎児の器官形成が終了していること、投

与開始からウイルス量の低下まで時間がかかること、予定日より早く生まれる可能性があること等を考慮すると妥当な週数と考えられる。

平成 22 年度 B 型慢性肝炎の治療ガイドラインでは、核酸アナログ未使用例での第一選択薬はエンテカビルが推奨されている。しかし、エンテカビルは妊婦への安全性が確立していない。一方ラミブジンはヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対してすでに多くの妊婦で投与されており、安全性は確立しているといえる。平成 22 年度 HIV 母子感染対策マニュアル第 6 版においても、妊婦へのラミブジンを含めた多剤併用が推奨されている。そのため、今回は胎児の安全性を考慮し、HBV 母子感染予防目的でラミブジンを選択した。ただし、ラミブジンの長期投与では、薬剤耐性による breakthrough や中止後の再燃が問題となる。耐性変異出現時期がラミブジン投与 6 カ月目以降であることを考慮して、名古屋市立大学病院では妊娠 28 週から産後 3 カ月まで計 6 カ月間の投与で終了し、大阪府立急性期・総合医療センターでは妊娠 32 週から産後 1 ヶ月まで計 3 ヶ月間の投与で終了した。2 症例とも中止後 HBV ウイルス量は再上昇したが、トランスアミナーゼ値上昇は認めていない。

国際的には Universal vaccination の方向に進んでおり、WHO によると 2009 年時点で世界の 92% の国でルーチンワクチンとなっており、世界の乳児の 70% が HB ワクチンを受けている。また、現行では予防処置のドロップアウトによるキャリア化や、父もしくは祖父母からの

水平感染も問題となっている。今後さらに HBV 感染を減らすためには、本邦においても universal vaccination の導入と高ウイルス量妊婦への個別対応が必要である。

今後多施設で症例数を増やしていく予定である。

E. 結論

HBV 高ウイルス量妊婦では、母子感染対策として妊娠後期のラミブジン投与が有効である。

謝辞：高野智子先生、田尻仁先生（大阪府立急性期・総合医療センター小児科）

F. 健康危険情報

特記事項はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. 高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. 肝臓. 53 巻 10 号: 610-614, 2012.
- 2) Endo T, Ito K, Sugiura T, Goto K. Hepatitis C virus clearance after discontinuation of pegylated interferon alpha-2a monotherapy in a child. Case Rep Med. 2012: 597348-51, 2012.

2. 学会発表

- 1) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 田中靖

人. HBV 母子感染ハイリスク妊婦へのラミブジン投与. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012.6.8. 金沢

- 2) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. HBV 母子感染予防目的でラミブジン投与した 1 妊婦例. 第 48 回日本周産期・新生児医学会. 2012.7.10. 大宮
- 3) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. HBV 母子感染ハイリスク妊婦へのラミブジン投与. 第 73 回名市大集談会. 2012.9.15. 名古屋
- 4) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. HBV 母子感染ハイリスク妊婦へのラミブジン投与. 第 16 回東海小児感染症研究会. 2012.10.27. 名古屋
- 5) Kobayashi M, Sugiura T, Goto K, Endo T, Ito K, Suzumori N, Tanaka Y. Lamivudine treatment during pregnancy to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection. 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Nov 14-17, 2012. Taipei
- 6) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人, 高野智子, 田尻仁. 高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. 第 16 回中部出生前医療研究会. 2013.3.2. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

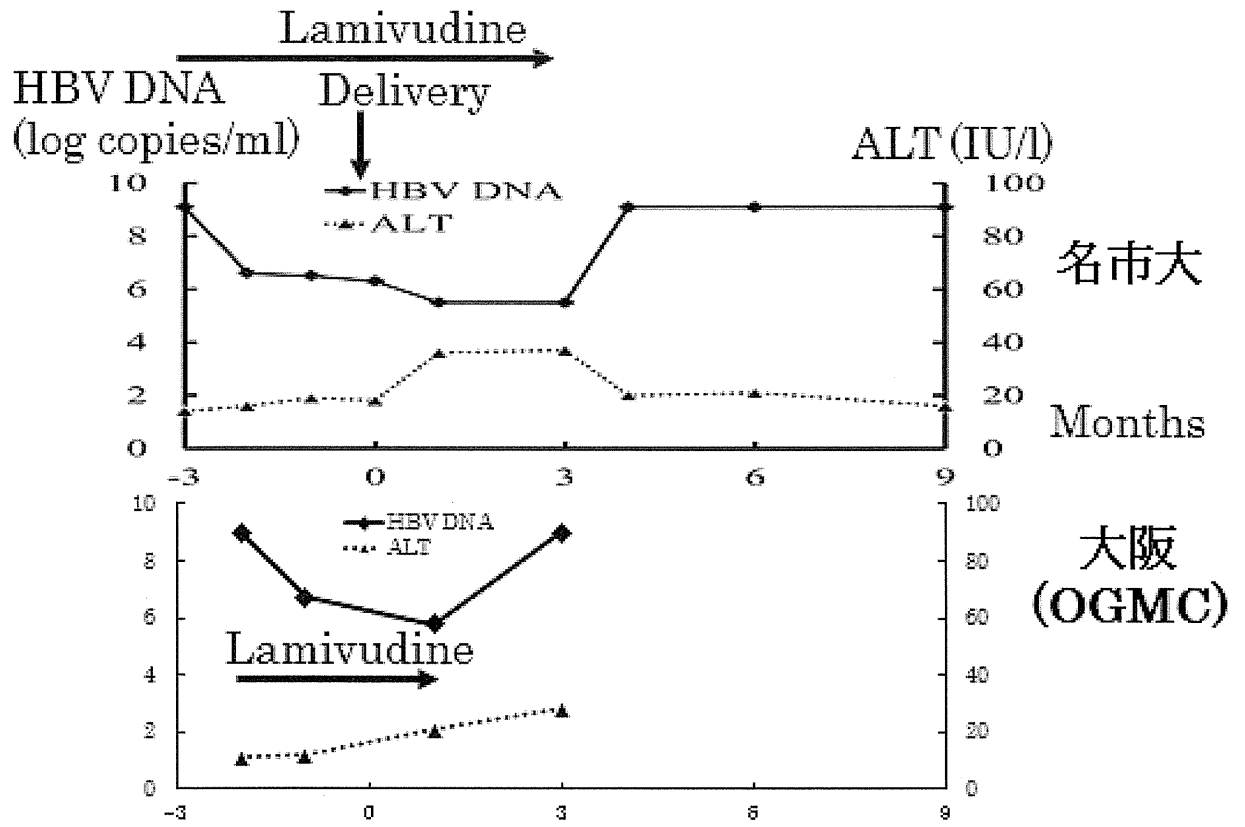
なし

表

Mother	名市大	大阪(OGMC)
Age	33	31
HBe-Ag	(+)	(+)
(CLEIA)	10000 ↑	994
HBe-Ab	(-)	(-)
HBV-DNA (Real time PCR)	9.1 log copies/ml	9 log copies/ml
AST IU/l	22	28
ALT IU/l	14	21

First daughter	名市大	大阪(OGMC)
Age	3	3
Gestational weeks	40	40
Delivery	Vaginal	Vaginal
Birth weight	3110g	2940g
Prophylaxis	HBIGx2+HBVaccinex3	HBIGx2+HBVaccinex3
HBsAg + 1year	6 months	3 months
HBe-Ag	(+)	(+)
(CLEIA)	1600 ↑	1799
HBe-Ab	(-)	(-)
HBV-DNA (Real time PCR)	7.5 log copies/ml	9 log copies/ml
AST IU/l	52	172
ALT IU/l	47	192

Seond daughter	名市大	大阪(OGMC)
Gestational weeks	40	40
Delivery	Vaginal	Vaginal
Birth weight	3432g	3512g
Prophylaxis	HBIGx2+HBVaccinex3	HBIGx2+HBVaccinex3
1year		
HBs-Ag	(-)	(-)
HBs-Ab	(+)	(+)
(CLEIA)	998	72
AST IU/l	44	39



厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
小児期のウイルス性肝炎に対する治療法の標準化に関する研究
分担研究報告書

治療効果を規定する宿主因子の検討

研究分担者 杉山真也 国立国際医療研究センター肝炎免疫研究センター肝疾患研究部

研究要旨

C型慢性肝炎の治療効果を規定する因子として、IFN- λ 3の遺伝子型と発現量が重要な因子であることを明らかとしてきたが、直接的なデータは得られていなかった。そこで、我々はIFN- λ 3について、mRNAと血中タンパク量を特異的に定量する系の樹立を行った。リアルタイムPCRではIFN- λ 1、- λ 2、- λ 3について、 10^7 コピー/mLまでIFN- λ 遺伝子間の交差反応を認めず、10コピー/mLからの定量を実現した。また、IFN- λ 3特異的な抗体の取得に成功し、ELISAとCLEIA（化学発光系）系を樹立した。測定レンジとしては、CLEIAでは0.1 - 10,000 pg/mLで定量可能である。これらの実験系を用いて、再びC型慢性肝炎患者のPBMC中のmRNAとex vivo培養液中のIFN- λ 3タンパクを定量した。その結果、治療感受性遺伝子型の患者においてIFN- λ 3が有意に高値を示した。さらに、治療抵抗性遺伝子型であってもHCVが排除された症例（いわゆる例外症例）においてもIFN- λ 3が高値であることが明らかとなった。このことから、治療前のIFN- λ 3の発現量は直接治療効果と関連すると考えられ、IFN- λ 3遺伝子型の判定よりも優れていると考えられた。以上のことから、今回開発したIFN- λ 3特異的な定量系は基礎的な研究の進展だけでなく、臨床応用も期待できる有用なものであると考えられる。

A. 研究目的

インターフェロンラムダ（IFN- λ ）ファミリーは2003年にKotenkoら、Shepperdら（共にNat Immunol 2003）により報告されて以来その研究が進められてきた。IFN- λ ファミリーには3つの相同性の高い遺伝子が属しており、特にIFN- λ 2とIFN- λ 3の相同性は97%で、IFN- λ 1とIFN- λ 2/3の間では81%である。各遺伝子の特異的変異は遺伝

子内に飛び地状に存在しており、各遺伝子を個別に定量することは困難であった。そのため、これまではIFN- λ 2/3について合算して定量することで研究が進められており、遺伝子特異的な解析をするに至っていなかった。

一方で、我々は全ゲノム関連解析を用いてC型慢性肝炎に治療効果に関連する遺伝子としてIFN- λ 3を同定した（Tanaka Y, Sugiyama M, et al. Nat Genet 2009）。この

遺伝子型を判定することで、80%程度の確率で治療効果を予測できるようになった。このとき、末梢血単核球 (PBMC) 中の IFN- λ 2/3 の mRNA (合算値) についてリアルタイム PCR で定量したところ、治療感受性の遺伝子型で高値を認めた。このことから、IFN- λ 3 の発現量が重要な因子であることが示唆されたが、直接的なデータは得られていなかった。

そこで、我々は IFN- λ 3 について、mRNA と血中タンパク量を特異的に定量する系の樹立を行った。

B. 研究方法

(1) リアルタイム PCR での mRNA の定量系の樹立のために、IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3 について、特異的なプローブとプライマーを設計した。測定サンプルの取得のために、細胞株 (HuH7, HepG2, Jurkat, HT-60, Raji) を IFN アルファ刺激した 16 時間後に LPS, polyIC, センダイウイルスで更に刺激を加えた。その後、経時的に 2 時間おきで mRNA の回収を行った。

(2) IFN- λ 3 特異的な抗体の取得を目指して、IFN- λ 3 特異的なアミノ酸配列部位のペプチドを合成した。また、293T 細胞での組換え IFN- λ 3 発現を行い、その精製蛋白を抗原とした。それにより得られた複数種類の抗体について、免疫した抗原で反応性をスクリーニングし、IFN- λ 3 特異的に結合するモノクローナル抗体を選択した。(1) と同様の刺激方法で培養して得た細胞培養液を回収し、抗体反応性を検証した。この他に、健常者から得た血清と血漿を用いて阻害反応の有無を検証した。

(3) C 型慢性肝炎患者の治療前の血液から PBMC を分離し、上記と同様の刺激を加えた。mRNA と蛋白質の定量には、それぞれ 4 時

間と 24 時間後の回収を行った。

C. 研究結果

(1) IFN- λ の mRNA を回収して、クローン化した。それを用いて、直線性と交差反応性を検証したところ、 10^7 コピー/mL まで IFN- λ 遺伝子間の交差反応を認めず、 10 コピー/mL からの定量を実現した。

細胞株を刺激して得られた mRNA を定量したところ、血球系の細胞株では、肝細胞系の細胞株よりも約 10 倍の発現量が得られた。さらには、IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3 の間の発現レベルは、おおよそ 100 : 10 : 1 といった比率であった。

(2) IFN- λ 3 特異的な配列で合成したペプチドで免疫したが、IFN- λ 3 特異的な抗体は得られなかった。そこで、293T 細胞で発現させた組み換え蛋白質を抗原としてマウスに免疫したところ、IFN- λ 3 特異的な抗体を複数クローン得ることが出来た。それらの認識部位を検討したが、立体構造での認識のみ陽性であり、アミノ酸配列は不明であった。

それらの抗体を応用して、血中もしくは細胞培養液中の IFN- λ 3 の定量系を作るために、ELISA を作成し、その高感度化で CLEIA (化学発光系) 系を樹立した。測定レンジとしては、CLEIA では 0.1 - 10,000 pg/mL で定量可能であった。健常者検体で血液を使用した際の反応性を検証したが、特に目立った阻害反応はなく、良好な特異的反応と感度を示した。

細胞培養液中の IFN- λ 3 を定量したところ、いずれの刺激でも高値を示したが、センダイウイルスの刺激では感染の持続があるためか 24 時間長に渡り IFN- λ 3 の産生増加が認められた。一方で、LPS 刺激等では、一過性の産生となり、12 時間で産生が止まりプラトーに達することがわかった。

(3) これらの実験系を用いて、C型慢性肝炎患者のPBMC中のmRNAとex vivo培養液中のIFN- λ 3タンパクを定量した。その結果、治療感受性遺伝子型の患者においてIFN- λ 3が有意に高値を示した。さらに、治療抵抗性遺伝子型であってもHCVが排除された症例(いわゆる例外症例)においてもIFN- λ 3が高値であることが明らかとなった。

D. 考察

これらのことから、治療前のIFN- λ 3の発現量は直接治療効果と関連すると考えられ、IFN- λ 3遺伝子型の判定よりも優れていると考えられた。以上のことから、今回開発したIFN- λ 3特異的な定量系は基礎的な研究の進展だけでなく、臨床応用も期待できる有用なものであると考えられる。より正確なデータを得るためには、多くの検体での検証が必要である。

E. 結論

IFN- λ 遺伝子の特異的なmRNA定量系を樹立した。また、IFN- λ 3特異的な抗体を取得し、その高感度な蛋白定量系も確立した。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2012 Dec 5. In press
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2012 Nov 7 in press
- 3) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e44743.
- 4) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.

- 5) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet.* 2012 Jun 19;13:47.
- 6) Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, Murata K, Mizokami M. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for λ 3-interferon. *Hepatol Res.* 2012 Nov;42(11):1089-99.
- 7) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2012 Oct;42(10):958-965.
- 8) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 2012 Oct;56(4):1448-56.
- 9) Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 2012 Feb;32(2):339-45.
- 10) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: in vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Jan 15;23(2):503-6.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 「宿主・ウイルスゲノム解析によるC型肝炎の病態解明にむけて“Host and viral genome analyses on hepatitis C”」杉山真也 ワークショップB1 国立遺伝学研究所研究会 NIG Workshop 国立遺伝学研究所 三島 2012年3月12日
- 2) 「IL28B 特異的測定系の開発と臨床的意義の検討」杉山真也, 村田一素, 溝上雅史 シンポジウム S1-1 第77階日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 神戸商工会議所 神戸 2012年6月21日
- 3) 「C型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用」杉山真也, 平峯智, 西田奈央, 伊藤清顕, 村田一素,

正木尚彦、井戸章雄、坪内博仁、溝上雅史
ワークショップ WS25-3 第 48 回日本肝
臓学会総会 ポルテ金沢 金沢 2012 年
6 月 7 日

国際学会

- 1) 「The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication.」
Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi and Masashi Mizokami Poster P-109 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses Oxford, England Sep 25, 2012,
- 2) 「Genetic variation in IL-28B promoter region consisting of TA dinucleotide repeat could improve the prediction of chronic hepatitis C and spontaneous clearance with rs8099917 genotyping.」
Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, and Masashi Mizokami Poster P-1765, Oct 13th Boston, American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
小児期のウイルス性肝炎に対する治療法の標準化に関する研究
分担研究報告書

一塩基遺伝子多型と自然経過での HBe 抗原セロコンバージョンの関連について

研究分担者 乾 あやの 済生会横浜市東部病院こどもセンター 小児科 担当部長
研究協力者 小松 陽樹 東邦大学佐倉医療センター 小児科 准教授
研究協力者 角田 知之 済生会横浜市東部病院こどもセンター 小児科 医員
研究協力者 村上 潤 鳥取大学医学部 小児科 講師
研究協力者 藤澤 知雄 済生会横浜市東部病院こどもセンター 肝臓・消化器部門 顧問

研究要旨

小児 B 型慢性肝炎における一塩基遺伝子多型と自然経過での HBe セロコンバージョンとの関連を検討した。B 型慢性肝炎患児 61 例（A 群：10 歳以下でセロコンバージョン；n=44、B 群：20 歳以上でセロコンバージョンまたは 20 歳以上でもセロコンバージョンしない；n=17）を対象に、B 型肝炎ウイルス感染制御との関連が報告されている 6 か所の遺伝子多型を解析した。解析した遺伝子多型の P 値は 0.15-0.96 であり、統計学的な有意差を示さなかった。今後症例数を増やして再検討する必要がある。

A. 研究目的

小児 B 型慢性肝炎における HBe セロコンバージョンと遺伝子多型の関連を後方視的に検討した。

B. 研究方法

対象は済生会横浜病院小児科および鳥取大学医学部小児科でフォロー中の HBV キャリア 174 名[初診時年齢; 0-20 歳(median 5), M/F = 97/77]を対象とした。対象を 2 群に分け、A 群を 10 歳以下で HBe セロコンバージョンした例、B 群を 20 歳以上でセロコンバージョンした、または、20 歳以上でもセロコンバージョンしない例とした。A 群、B 群ともにインターフェロンや核酸アナログ製剤の投

与は受け入っていない症例とした。一塩基多型の解析方法は、血清または全血を用いて DNA を抽出し、PCR を施行したのちダイレクトシーケンスを実施した。血清を用いた場合は nested PCR を施行した。B 型肝炎ウイルスの病態と関連が報告されている一塩基遺伝子多型 6 か所、①rs1800871 (IL-10-819) ②rs1800872 (IL-10-592) ③rs3077 (HLA-DP A1) ④rs9277535(HLA-DP B1) ⑤rs7453920(HLA-DQ B2) ⑥rs2856718(HLA-DQ B1) を解析対象とした。

Chi-square test を用いて、統計学的な有意差を 0.05 以下とした。