

HLA-DP 提示 B 型肝炎ウイルス抗原の網羅的
探索

日本組織適合性学会第 23 回大会

2014 年 9 月 14 日 長崎

7) 宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、
徳永勝士、溝上雅史

慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する
HLA-DP の機能解析

第 59 回日本人類遺伝学会 第 21 回日本遺伝子
診療学会 合同大会

2014 年 11 月 22 日 東京

8) 岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子、
徳永勝士

Screening and identification of HBV antigens that
can be presented to HLA-DP

第 43 回日本免疫学会学術集会

2014 年 12 月 11 日 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

HBV 再活性化例における HBV 高感度測定系と HBs 抗体の推移

研究分担者：是永匡紹 所属先 独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
研究協力者：杉山真也 所属先 独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
研究協力者：向出雅一 所属先 独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

研究要旨：B 型肝炎ウイルス (HBV) 再活性化は、がん化学療法および自己免疫疾患治療など幅広い分野で問題となっており、昨今の分子標的治療では特に注目されている。再活性化時の対処の遅れは患者の死に繋がるため、その診断と治療法の確立が求められている。我々は、再活性化要因として HBVDNA を従来法より約 4-8 倍検出感度を上昇させることに成功し、再活性化例でその有用性を確認したところ、従来法で検出される数ヶ月前に、超高感度 HBVDNA 測定にて陽性例が確認される一方、陽性となっても HBVDNA が増加しない症例も確認し、その様な症例では、HBs 抗体価の上昇が確認され HBs 抗体産生増加が HBVDNA 増殖を抑制し、その推移は再活性化予測に繋がる可能性がある。検出感度を上昇させても再活性化は予測できず、検出された HBV の PC/BCP 領域の新規測定法の開発に着手した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 再活性化は、がん化学療法および自己免疫疾患治療など幅広い分野で問題となっており、再活性化時の対処の遅れは患者の死に繋がるため、その診断と治療法の確立が求められている。

2009 年 1 月、厚生労働省ガイドラインが発表され (坪内ら、肝臓 2009)、その後 2011 年 9 月に改訂版が発表された。がん化学療法および免疫抑制療法後の B 型肝炎対策として HBs 抗原陰性ハイリスク群に対して“HBV-DNA モニタリングによる preemptive therapy”が推奨されている一方で、疾患・治療薬による再活性化率が異なること、また再活性化後も HBVDNA が増加しない症例も確認され、モニタリング回数や抗ウイルス剤投与例を減少できる可能性があるも、その判別は困難である。われわれは、再活性化症例を正確に抽出するために超高感度 HBVDNA 測定系の開発を以前より進めており、その臨床的有効性の検討を行った

B. 研究方法

検討 1：HBVDNA の抽出効率増加と contamination を避けるため 1st PCR まで完全自動化、更に Easy-to-use phylogenetic analysis system を用いた PCR の増幅効率 (Sugiyama et al. Hepatol Res 2011) の上昇により HBVDNA 高感度測定系を構築し、従来法 [Taqman PCR (Roche)] と比較検討した。更に、本研究で

集められた保存血清より、高感度測定系の陽性率、及びその有用性について検討した。

検討 2：再陽性化した症例のなかで、HBVDNA が上昇せず、自然に低下した症例の HBs 抗体を経時的に測定した

検討 3：次世代シーケンサーを用いて pre core / core promoter 変異の高感度定量測定系開発を行った。

C. 研究結果

ガイドラインに従い HBVDNA が陽性になった時点で抗ウイルス剤を介入することで劇症・重症化を予防できることが明らかになった。また、各疾患・治療薬により再活性化率が異なる事も明らかになり、RCHOP 療法でもその率は 7-8% に収まり m リウマチ疾患を含む多剤免疫抑制剤治療や固形がんに対する化学療法 + ステロイド製剤併用では、それぞれ 5% 未満、1% 未満と低率であった。(図 1)

また、HBVDNA が増量後に抗ウイルス剤治療を開始しても、治療可能であった症例も存在するため、抗ウイルス剤投与を遅らせられる可能性はある。(図 2)

今回の検討で、従来法であるコバス Taqman PCR より 4-8 倍感度良い、高感度系を開発し (図 3,4)、再活性化前より HBVDNA が検出可能であった症例がある反面、多くは HBVDNA がその後「再陽性化」せず (図 5)、また、「再陽性化」した症例でも、HBVDNA が増

加しない症例が存在した(図 6,7)。この中で HBDNA が陽性後1ヶ月以内で HBs 抗体価の上昇が確認された。ウイルスの増殖に HBVDNA の変異が関与する可能性もあり、ddPCR 法により pre core / core promoter 変異の高感度定量系開発が終了した。

D. 考察

再活性化症例を、早期に発見するためには、従来法よりも高感度な HBVDNA 測定系を用いても限界があるが、検出された point の血清より次世代シーケンサを用いた高感度 pre core 変異、core promoter 変異を検索することが可能になり、増殖要因が高い症例にのみ、抗ウイルス剤や HBVDNA のモニタリングをすることが可能になる可能性がある。また、HBVDNA が再陽性化しても、増殖しない症例が存在すること、図 8 においても HBs 抗体陽性例では、HBVDNA 再陽性化に時間を要しており、リツキシマブのように B 細胞を knock down する薬剤は除外し、HBs 抗体陽性例では、その変化をみること、再活性化の危険度を予測し、抗ウイルス剤投与が回避される可能性もある。

(図 9)

本測定法にてウイルス変異を測定し、pre core 変異がある症例には、更に宿主側の増殖因子として HLA haplotype を組み合わせることで、「再陽性症例」を除外し、再活性化症例、更には劇症化症例を予測できる可能性があり、強いては、現在の抗ウイルス剤予防投与症例を減少させ、医療費減少に貢献できると考えられたが、更なる検討が必要である

E. 結論

HBV 超高感度測定系を構築したが、高感度系陽性のみで再活性化予測は困難であった。その中で HBVDNA が検出されながら増殖しない症例が存在すること、その場合 HBs 抗体価が上昇することが確認された。高感度法の技術を生かし、HBVDNA の変異を測することで、従来法では検討不可能なウイルス変異測定が可能となり、更に宿主因子や HBs 抗体加えることで再活性化症例、更には劇症化症例を予測できる可能性がある。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

(1) Nishida N, Korenaga M, Mizokami M. et al. 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.

(2) Sawai H, Korenaga M, Mizokami M. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012 Jun 19;13:47.

(3) Nishida N, Korenaga M, Mizokami M. et al. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. PLoS One. 2014 10;9:e86449.

(4) Mukaide M, Korenaga M, Mizokami M. et al. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. J Virol Methods. 2014;207:169-77.

2. 学会発表

JDDW2013((第 17 回日本肝臓学会大会/第 55 回日本消化器病大会) シンポジウム 1: B 型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題 是永匡紹、杉山真也、溝上雅史 高感度 HBVDNA 測定系の開発と B 型肝炎ウイルス再活性化例への応用

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし

図 1

がん化学療法・免疫抑制療法中の B 型肝炎ウイルス(HBV)再活性化 (=HBVDNA が定量可能)に対するガイドラインの有効性が証明された一方で、疾患・治療薬によって再活性化率が異なることが明らかになった。

対象疾患	治療内容	再活性化判定	再活性化率*
未治療 CD20 陽性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫	リツキシマブ + ステロイド 併用全身化学療法	定量可能 (シグナル陽性は除く)	7.6%(21/275) (4年7ヶ月)
リウマチ・膠原病	ステロイド、インフリキシマブ メトトレキサートなど	定量可能(2.1log _c /mL) (シグナル陽性4例は除く)	3.3%(5/122)
固形癌	ゲムシタビン, CDDP, 5FU ステロイド(デキサメサゾン)	定量可能(1.5log _c /mL) (シグナル陽性7例は除く)	0.9%(3/336)

図2

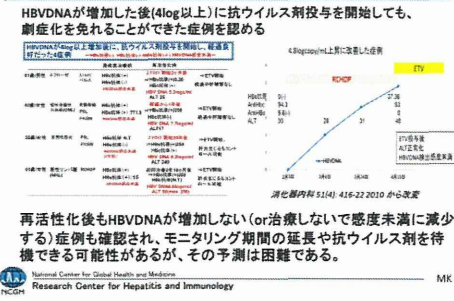


図3. 臨床検体(血清)を用いた検出感度試験

(高感度法 vs. コバスタqMan HBV-DNA定量法)

B型肝炎患者・健康人 (100検体)	TaqMan法 (0.7ml)	
	検出	検出せず
高感度法 (0.5ml)	検出 42 (42%)	検出せず 14 (14%)
	検出せず 3 (3%)	検出 41 (41%)

n = 100

McNemar検定: p = 0.015
OR = 4.667 (95%CI=1.3-25.3)

図4 HBV陽性血清希釈パネルによる検出感度試験

(高感度法 vs. コバスタqMan HBV-DNA定量法)

濃度 (コピー/ml)	検出数	高感度法 (0.5ml) 検出数	高感度法 (0.5ml) 検出率 (%)	TaqMan法 (0.7ml) 検出数	TaqMan法 (0.7ml) 検出率 (%)
256	24	24	100	24	100
128	24	24	100	24	100
64	24	24	100	22	91.7
32	24	24	100	20	83.3
16	24	22	91.7	13	54.2
8	24	11/16	68.8	6	25.0
4	24	11	45.8	3	12.5
2	24	5	20.8	1	4.2
0	24	0	0.0	0	0.0
最小検出感度 (PROFIT分析)	LOD 95	19,906		71,646	
	LOD 75	8,204		26,990	

図5: 長期間再活性化を認めない(HBVDNA感度未満)固形癌症例 : 8症例 84検体 [平均10point/例 平均観察期間15M]

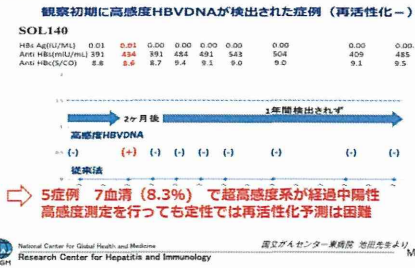


図6 RA治療中のHBVDNAの変動(73歳 男性)

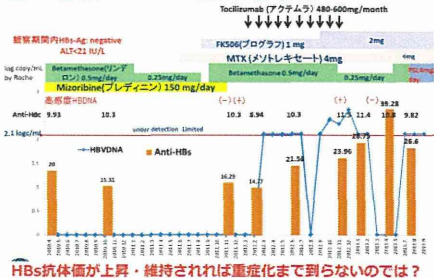


図7: RA治療中のHBVDNAの変動(73歳 男性)

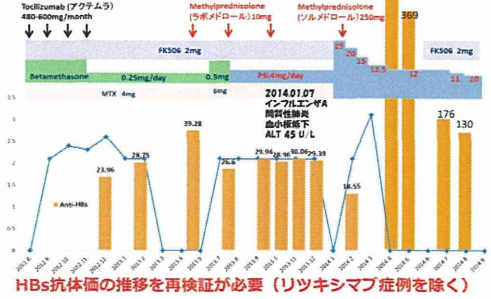


図8 HBs抗体値は再活性化・重症化のモニタリングに重要では?

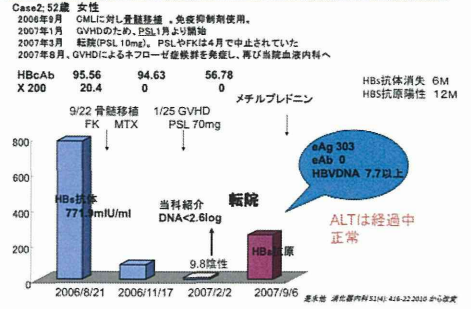
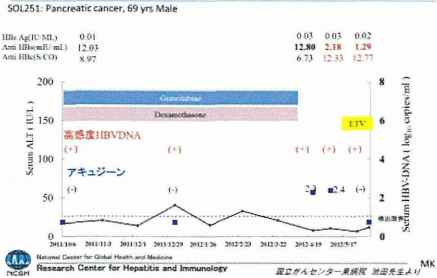


図9. 固形癌の再活性化での検討(HBs抗体陽性→陰性化へ)



造血幹細胞移植後における B 型肝炎ウイルス再活性化の実態および予防に 関する多施設共同臨床研究

研究分担者：木村公則 都立駒込病院 肝臓内科 部長
研究協力者：坂巻 壽 都立駒込病院 名誉院長
神田善伸 自治医大附属病院 血液科 教授
石川哲也 名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 教授
井上和明 昭和大学医学部藤が丘病院 消化器内科 准教授
垣花和彦 都立駒込病院 血液内科 医長
楠本 茂 名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 講師
香西康司 都立多摩総合医療センター 血液内科 部長
高橋和弘 国家公務員共済組合連合会浜の町病院 肝臓科 部長
橋野 聡 北海道大学 保健センター 内科 教授
丸澤宏之 京都大学医学部大学院医学科 消化器内科 講師
山本正英 東京医科歯科大学附属病院 血液内科 助教

研究要旨：造血幹細胞移植後の B 型肝炎ウイルス (HBV) 再活性化は悪性リンパ腫に対するリツキシマブ投与後と並んで発症頻度が高い病態であるが、国内での HBV 再活性化の実態や劇症肝炎発症率などは不明な点が多い。また移植後は様々な合併症の治療コントロールが予後に関与しており、その一つである HBV 再活性化の予防ならびに治療の対策が急務である。これらの状況をふまえて、今回平成 25 年度より造血幹細胞移植後の再活性化率の実態調査及び対策を検討する臨床研究を開始した。まず再活性化率の検討では、後方視的観察で当院の 2008 年から 4 年間で造血幹細胞移植を実施した症例 303 例であり、HBc 抗体陽性の HBV 既往感染者は 42 例で再活性化を生じた症例は 5 例、約 11.6%であった。再活性化例は全例同種移植後の発症であった。更に、HBV 再活性化の発症を予防する治療法として HBV ワクチンに注目し、造血幹細胞移植後のワクチン投与の有用性を検討するため多施設共同臨床研究を計画し、平成 25 年 9 月より登録開始した。平成 27 年 3 月の段階で参加施設は 10 施設、登録症例は 30 例 (内脱落症例 8 例)、3 症例が HBV ワクチンの接種を開始している。

A. 研究目的

1. 造血幹細胞移植後の HBV 再活性化発症率を検討するために後方視的に観察研究を行う。また再活性化症例において宿主の HBV に対する免疫応答を解析し病態の発症メカニズムを検討する。
2. 造血幹細胞移植を受ける HBs 抗原陰性 (-) HBc

抗体陽性 (+) の既往感染症例に対して HBV ワクチン接種を行い、再活性化の予防効果を前方視的調査で解明する。HBV 既往感染例を登録して血清 HBV-DNA を 1 ヶ月ごとに測定し、移植後 12 ヶ月の時点で全ての症例にワクチン接種を行う。それらの症例の再活性化の頻度を明らかにすることによりワクチン投与の有用性および HBV

-DNAモニタリングの有効性を検討する。

B. 研究方法

1. <対象>

2008年1月から2011年12月までの4年間で当院血液内科にて造血幹細胞移植を実施した303例を対象とした。

<方法>

(1) HLA-A*02 または*A24 陽性の患者末梢血から単核球を密度勾配遠心法を用いて分離する。Phosphate-buffer saline (PBS)で洗浄した後、10% ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタミンを含む RPMI 1640 メディウムに浮遊させ CO2 5%、37°Cで培養を行う。ペプチド刺激を行う場合は A2 envelope、A2 core、A2 polymerase、A24 core、A24 polymerase のペプチド抗原に加え brefeldin と recombinant human IL-2(10IU/ml)を添加し 4 時間培養する。同時に PE 標識された以下のペプチドを用いて患者の HBV 抗原特異的な免疫応答を解析する。HLA-A*0201 HBV core, amino acids 18- 27 (FLPSDFFPSV) 、HLA-A*2402 HBV core; amino acids 117- 125 (EYLVSFQVW) 、HBV polymerase; amino acids 756- 764 (KYTSFPWLL)

2. <対象>

初回造血幹細胞移植を実施予定しているHBs抗原(-)HBc抗体(+)のHBV既往感染例患者(輸血による偽既往感染を考慮しHBs抗体(+)は適格規準より除外した)

<方法>

- (1) 適格規準を満たす造血幹細胞移植予定症例を駒込病院登録センターへ登録する。
- (2) 造血幹細胞移植前に HBV-DNA 定量検査を行い、血清 HBV-DNA が陰性(-)であることを確認する。

- (3) 移植後 1 年間は月 1 回の頻度で HBV-DNA 定量検査を行い、12 ヶ月以降は 2 ヶ月に 1 回の頻度で登録後 3 年間まで前方視的にモニタリングする(HBV-DNA モニタリング)。血清 HBs 抗原、HBs 抗体を 2 ヶ月に 1 回の頻度で測定する。HBV-DNA 定量検査は本試験対象では研究費負担にて行う。外注検査会社に連結可能匿名化された検体として送付し、測定する。
- (4) HBV ワクチンの接種を移植後 12 ヶ月の時点で開始する。移植後 13, 18 ヶ月の時点で追加接種をおこなう。ワクチン接種は移植の自家・同種は問わない。HBV ワクチンは本試験対象では研究費負担にて行う。
- (5) HBV 再活性化(HBV-DNA 陽性化)が認められた場合には、慢性 B 型肝炎として治療介入を行うことを強く推奨する。(日本肝臓学会の免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドライン(改訂版)に基づき、エンテカビルの使用を推奨する。)
- (6) 経過中、原疾患の再発・増悪を認め再移植の適応となった場合は脱落としてモニタリングを中止する。

<評価項目>

(1) 主要評価項目

HBV ワクチン投与症例における HBV 再活性化割合

(2) 副次評価項目

1. HBV再活性化による肝障害割合
2. HBV再活性化による劇症肝炎発症割合
3. HBVワクチン投与の安全性
4. HBV 再活性化割合と GVHD の関与
5. HBV ワクチン投与による GVHD の増悪
6. HBV 再活性化割合と HLA の関与
7. HBV 再活性化と抗原特異的細胞 T 細胞、制御性 T 細胞、B 細胞の関与

<目標症例数>

66 例

既存の報告から HBV 再活性化率を 20% とする。HBV ワクチン投与群の再活性化率を 4% と仮定する。第一種過誤 5%、検出力 80% として有意差を得るためには 49 例が必要である。造血幹細胞移植後の再発および病態の悪化による脱落症例を約 20~30% 考慮し目標登録症例数を 66 例とした。

<倫理面への配慮>

- (1) 本試験実施に先立ち、試験担当医師は対象患者に説明同意文書に基づき十分に説明し、患者が試験内容をよく理解したことを確認した上で患者本人より文書で同意取得する。
- (2) 本試験への参加に際しては、本試験実施計画書および患者への説明同意文書が各施設の倫理審査委員会もしくは IRB (機関審査委員会: Institutional Review Board) で承認されなければならない。IRB 承認が得られた場合、各施設の臨床研究責任医師は IRB の承認文書の原本を自らが責任を持って保管し、その写し (コピー) を駒込病院登録センターへ送付する。IRB の承認文書の写しは駒込病院登録センターが保管する。

C. 研究結果

- (1) 造血幹細胞移植後の再活性化発症率
2008 年 1 月から 2011 年 12 月までの 4 年間で当院血液内科にて造血幹細胞移植を実施した 303 例を対象とした。HBs 抗原 (-) HBc 抗体 (+) の HBV 既往感染例は同種移植 37 名 (15%)、自家移植 6 名 (12%) で、HBV 再活性化した症例はそれぞれ、5 (13.5%)、0 名 (0%)、計 5 名 (11.6%)

であった。再活性化の定義としては HBV-DNA の陽転化を用いた。再活性化群と非再活性化群とで年齢、性別、移植前治療等各因子を比較検討したが、有意な結果は認めなかった。報告が散見される HBs 抗体価の差も認めなかった。今回既往感染例の診断に関して、HBs 抗体 (+) を除外したが造血幹細胞移植症例 228 例中 9 例に輸血による偽陽性の結果が得られた。輸血による移行 HBs 抗体の特徴として、a) HBs 抗体価の低値 b) 一過性の陽性が上げられ、ポリグロビン、新鮮凍結血漿投与後に多く見られた (論文投稿中)。この結果により今回の臨床研究では HBV 既往感染例を HBs 抗原 (-) HBc 抗体 (+) とした。

- (2) 造血幹細胞移植後の再活性化症例に対する抗ウイルス治療効果

当院で経験した造血幹細胞移植後の再活性化症例は 2008 年から追跡調査後 8 例経験した。全例同種移植後の症例であり、再活性化発症時に全例エンテカビル (ETV) の投与を開始した。しかし、ETV 投与開始後 HBV-DNA の低下が造血幹細胞移植後以外の再活性化症例と比較し緩徐であることが判明したため、末梢血を用いて HBV に対する免疫応答の解析を行った。比較対象は、造血幹細胞移植後以外の再活性化症例 6 例を用いた。末梢血よりリンパ球を採取し、CD8 陽性 HBV テトラマー陽性細胞数を解析した。造血幹細胞移植症例においては、有意に HBV 特異的 CD8 陽性細胞数が低下しており、抗ウイルス効果の低下に寄与している可能性が示唆された。

- (3) 造血幹細胞移植後のワクチン投与における再活性化予防の検討

平成 25 年 8 月 23 日に [UMIN000011543](#) として登録し、9 月 1 日より症例登録を開始した。H27 年 3 月現在、登録症例数は 30 例 (内脱落症例

8) で、22 例が追跡調査を行っている。3 例の症例に対して HBV ワクチン(ビームゲン)を投与し、特に重篤な副作用を認めず経過観察している。

(4) 造血幹細胞移植実施施設でのHBV再活性化に対するアンケート調査

国内の年間造血幹細胞移植数が10例以上の施設に対してHBV再活性化に対する実態を把握するためアンケート調査を実施した。回答施設は33施設であり、集計結果として1)HBV既往感染者に対する造血幹細胞移植後は再活性化の頻度が高いことは周知されており、約9割の施設で移植前にHBV-DNAの測定がなされていた。2)移植後のHBV-DNAのモニタリングは約半数の施設で毎月実施されていたが、適宜の施設が多く、モニタリングの重要性を周知する必要があると考えられた。3)実際HBV再活性化を経験した施設は39%あり、ほとんどの症例に対してエンテカビルが投与されていた。また再活性化症例の内、1例劇症化例があった。病状の臨床経過は不明であるが、死亡の転帰を認めておりHBV-DNAのモニタリングの重要性が示唆された。

D. 考察

造血幹細胞移植では種々の免疫抑制薬・抗悪性腫瘍薬を使用し、長期にわたって強力な免疫抑制状態に置かれるため、HBV再活性化を生じる頻度が高く、実際国内外より報告例が多数散見される。都立駒込病院での最近4年間の集計では全移植数は303症例(同種:252症例、自家:51症例)、うちHBV既感染症例は43例であった。その中でHBV再活性化症例は約12%認められた。HBV再活性化症例は重篤な肝炎がおこりやすく、その予防が極めて重要と考えられる。現在HBV再活性化後の経過観察の報告より、約10%の症例が肝不全になり、約70%の症例では慢性肝炎を生じラミブジンやエンテカビルの投与が行

われている。またエンテカビル投与の中止規準の設定が困難であり継続投与している症例がほとんどである。これは、国、個人の両方に経済的に負担が大きく、HBV再活性化の予防は重要な課題の一つである。また今回我々が示した結果より、造血幹細胞移植後の再活性化症例では抗ウイルス薬の治療効果が低下しており、一層再活性化予防の重要性が示唆された。橋野らは、造血幹細胞移植後のHBV既往感染例に対してHBVワクチン接種が再活性化の予防が可能であったと報告しており、今回の臨床研究においてHBVワクチン接種の有効性を確認することの意義は大きいと考える。

E. 結論

HBV既往感染例における造血幹細胞移植後のHBV再活性化発症率は、約12%と高率であり全例が同種移植後であった。造血幹細胞移植後の再活性化症例においては、抗ウイルス薬の治療効果が低下しておりこれは宿主の免疫応答、特に抗原特異的CD8陽性細胞の数量が関与していると思われた。現在造血幹細胞移植後の再活性化を予防するためのHBVワクチンの有用性を多施設共同臨床研究として開始しており今後データの蓄積をおこなう。

研究協力施設；

都立駒込病院
東京医科歯科大学医学部附属病院
多摩総合医療センター
自治医科大学附属さいたま医療センター
北海道大学病院
浜の町病院
東北大学病院
久留米大学病院
兵庫県立がんセンター
東海大学医学部附属病院

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1. Aoki J, Kimura K, Kakihana K, Ohashi K, Sakamaki H. Efficacy and tolerability of Entecavir for hepatitis B virus infection after hematopoietic stem cell transplantation. SpringerPlus 2014 Aug 20;3:450

2. Kowazaki Y, Osawa Y, Imamura J, Ohashi K, Sakamaki H, Kimura K. Immunological analysis with HBV reactivation in a patient after bone marrow transplantation. Internal Medicine 2015 in press

3. Kimura K. Should we try anti-viral therapy for hepatitis C virus infection with pyoderma gangrenosum-like lesions? Hepatol Res. 2014 Feb;44(2):173-5.

4. Aoki J, Kowazaki Y, Ohtsuki T, Okamoto R, Ohashi K, Hayashi S, Sakamaki H, Kohara m, Kimura K. Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8⁺ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation. J gastroenterology 2013 Jun;48(6):728-37.

2. 学会発表

(1) Kimura K, Aoki J, Kowazaki Y, et al. Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD 8+ T cells in patients with onset of viral reactivation. Poster presentation, AASLD (American Association for the study of Liver Diseases) Single topic Conference, Washington DC, Feb 20 13

(2) Yoshioka K, Kimura K, et al. The efficacy of entecavir in patients with hepatitis B virus reactivation after allo-HSCT. 第75回日本血液学会学術集会、Poster presentation PS-1-374、札幌 2013

(3) 木村公則、坂巻壽 他. 造血幹細胞移植後のHBV再活性化における宿主の免疫応答の解析. 第17回日本肝臓学会大会2013年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

国内で使用されているHBVマーカー検査キットに関する性能調査
HBV genotype既知の献血由来検体による検討

研究分担者	大隈 和	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
研究協力者	水落利明	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	客員研究員
研究協力者	内田茂治	日本赤十字社	中央血液研究所	部長
研究協力者	飯沼一茂	国立国際医療研究センター	肝炎・免疫研究センター	客員研究員
研究協力者	出口松夫	大阪大学医学部附属病院	臨床検査部	主任臨床検査技師
研究協力者	藤野達也	国立病院機構長崎医療センター	臨床検査科	主任臨床検査技師
研究協力者	松林圭二	日本赤十字社	北海道ブロック血液センター品質部	副部長
研究協力者	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	上級研究員
研究協力者	百瀬暖佳	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	主任研究官
研究協力者	浜口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長

研究要旨：免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策ガイドラインが作成され、ますますB型肝炎ウイルス(HBV)マーカーの血清学的検査の重要性が認識されるようになってきたのは周知の通りである。これまで、国内で製造承認後販売されているHBVマーカー検査キットの性能調査を実施し、キット間での比較検討を行ってきた。本研究ではこの検討をより詳細に行うため、日本赤十字社の協力のもとHBV genotype既知の献血由来検体を用いて、国内で現在使用されているHBs抗原・抗体、HBe抗原・抗体、HBc抗体検出／測定キットに関する性能調査を実施した。その結果、HBs抗原検査キットでは、高感度検査キットにおいて、Genotypeに関わりなく全ての検体を陽性と判定した。しかし、Genotype Bの検体においては、キット間での判定乖離が認められ、他のGenotypeの検体より顕著だった。HBs抗体検査キットでは、国産キットと海外キットの間に判定の乖離が多く見られ、特にGenotype BとCの検体で顕著に認められた。またHBe抗原・抗体、HBc抗体検査キットでは、国産キット、海外キットを問わず判定結果は比較的良く一致しており乖離は殆どなかった。以上から、現在使用されているHBVマーカー検査キットの一部には判定結果に注意を要するものがあり、最終的な診断には他の検査結果を含めた総合的な判断が必要になることが改めて明らかとなった。今後も今回のような検査キットの性能調査を継続して実施する必要があると考えられた。

A. 研究目的

平成21年に「免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策ガイドライン」が作成公表され、ますますB型肝炎ウイルス(HBV)マーカーの血清学的検査の重要性が認識されるようになってきた。これまで我々は国内で製造承認後販売されているHBVマーカー(HBs抗原・抗体、HBe抗原・抗体、HBc抗体)検査キットの性能調査を実施し、キット間での検討を行ってきた。そこで本研究では、この検討をより詳細に行うため、日本赤十字社にHBV genotype既知の献血由来検体を供与頂いた。これらの検体を用いて国内で現在使用されているHBVマーカー検出／測定キットに関する性能調査を実施し、キット間の性能を比較検討することを目的とした。

B. 研究方法

【評価試薬】

国内で販売されているHBs抗原検出／測定試薬1

3キット、HBs抗体測定試薬8キット、HBe抗原・

抗体検出試薬6キット、HBc抗体検出試薬7キット
(IgMは2キット)

【評価検体】

1. HBs抗原国内標準品希釈系列（陰性を含む10検体）
2. HBs抗原陽性検体：日本赤十字社献血由来検体（126例）(Genotype A:19, B:60, C:39, D:8)

【評価内容】

1. 国内標準品の測定結果の比較：各HBs抗原検出／測定試薬を用い、国内標準品を測定した（測定回数n=1）
2. HBs抗原陽性検体を用いた測定結果の比較：各検出／測定試薬を用い、日本赤十字社献血由来HBs抗原陽性検体126例について測定した。測定範囲を超えた検体については、各試薬の希釈測定手順に従って、希釈後再検した。（測定回数n=1）

(倫理面への配慮)

日本赤十字社から供与された献血由来検体の使用については、国立感染症研究所の倫理審査委員会ですべて了解されている。

C. 研究結果

1. 国内標準品を用いたHBs抗原検査キットの性能調査結果

陰性を含むHBs抗原国内標準品希釈系列10検体を用いて測定し結果を比較したところ、13キット数中1キット数、10検体中1検体に判定乖離が認められた。乖離があった1検体は低濃度であったため、乖離があった1キットは他のキットに比べて感度が低い可能性が考えられた。

2. HBs抗原陽性検体を用いたHBs抗原検査キットの性能調査結果

日本赤十字社献血由来HBs抗原陽性検体126例を用いて測定し結果を比較したところ、Genotype Aについては13キット数中8キット数、19例中1例、Genotype Bについては13キット数中2～6キット数、60例中7例、Genotype Cについては13キット数中5及び7キット数、39例中2例に判定乖離が認められ（特にGenotype Bの検体において顕著）、Genotype D 8検体については乖離は認められなかった。高感度のHBs抗原検査キットでは、Genotype eに関わりなく全ての検体を陽性と判定した。

3. HBs抗原定量キット測定値の相関性に関する検討

国内で販売されている3種類のHBs抗原定量キットの測定値において相関性を検討した。その結果、相関直線の傾きが1近傍にはならない検体が認められたが、相関性は非常に高かった。

4. HBs抗体検査キットの性能調査結果

日本赤十字社献血由来HBs抗原陽性検体126例を用いて測定し結果を比較したところ、Genotype Aについては8キット数中2キット数、19例中2例、Genotype Bについては8キット数中1～6キット数、60例中27例、Genotype Cについては8キット数中1～7キット数、39例中10例、Genotype Dについては8キット数中2及び7キット数、8例中3例のみに陽性が認められた（特にGenotype B、Cの検体において判定乖離が顕著）。

5. HBe抗原・抗体、及びHBc抗体検査キットの性能調査結果

日本赤十字社献血由来HBs抗原陽性検体126例を用いて検査し結果を比較したところ、どのGenotypeにおいても判定結果は比較的良く一致しており、乖離は殆ど認められなかった。

D. 考察

本研究では、HBVマーカー検査キットのこれまで

の一斉性能調査に更に踏み込んだ形で、日本赤十字社の協力のもとGenotype別の献血由来HBs抗原陽性検体を用いて、現在国内で承認販売されているHBs抗原・抗体、HBe抗原・抗体、HBc抗体検査キットについて性能調査を行った。その結果、HBs抗原・抗体検査キットでは、特にGenotype B、Cの検体に判定乖離が認められ、キット間の性能に差があることが分かった。この差は、使用している抗原・抗体の違いや反応条件の差などに起因すると考えられた。Genotype B、Cの感染は日本人に多く見られるため、この判定乖離はわが国にとって問題である。以上のことから、現在販売されているHBs抗原・抗体検査キットの判定結果には注意を要し、最終的な診断には他の検査結果を含めた総合的な判断が必要になることが改めて明らかとなった。今後は、このような検査キット間の判定乖離を可能な限り改善するために、参照品等を制定し、それを用いた検査法の標準化などを考慮し検討する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では、Genotype別の献血由来HBs抗原陽性検体を用いて、現在国内で承認販売されているHBVマーカー検出/測定キットについて一斉に性能調査を行った。その結果、一部のGenotypeの検体において判定乖離がある検査キットが認められ、キット間の性能に差があることが分かり、本性能調査の重要性が改めて明らかとなった。今後も今回のようなHBVマーカー検査キットの一斉性能調査を継続して、可能であれば定期的の実施していく必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okuma K, Fukagawa K, Tateyama S, et al., Development of an Infectious Surrogate Hepatitis C Virus Based on a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins and Green Fluorescent Protein. 2015, Jpn J Infect Dis. in Press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体肝移植後 B 型肝炎ワクチンの効果予測としての HLA-DP の一塩基多型の意義

研究分担者：調 憲 九州大学 消化器・総合外科

研究協力者：吉住 朋晴 九州大学 消化器・総合外科

研究要旨：B型肝炎関連の肝移植では予防策を講じなければB型肝炎の再活性化により、グラフト・ロスとなることが報告されている。予防策として核酸アナログと高力価HBsヒト免疫グロブリンが用いられ、ほぼ制御できることが明らかになっている。しかしながら、生涯にわたる投与が必要で、患者のQOL低下、医療費の上からも問題である。とくにHBIGは試算によれば国内消費の60%以上は肝移植後に用いられている。HBIGは95%以上が海外輸入依存しており、輸入超過に陥っている血液製剤現状からも大きな問題である。この状況を改善するにはワクチンによる自己抗体の陽転化が重要である。しかしながら、必ずしも陽転化率は高くはなく、陽転化が事前に予測できればワクチン接種が推奨しやすくなるものと考えられる。そこでHLA-DPの一塩基多型に注目し、コンパニオン診断としての意義を検討した。HLA-DPB1上のrs9277535の遺伝子多型の検討では、GG/GAがワクチン無効8例では各7/1例、ワクチン有効11例では各3/8例であった (P=0.007)。このようにHLA-DPB1の一塩基多型がHBVワクチンの陽転化予測に重要であることが明らかになってきた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)による非代償性肝硬変に対する究極の治療として肝移植が普及したが、移植後のウイルス制御が未解決である。HBV関連肝移植には末期B型肝炎硬変に対する肝移植とHBc抗体陽性ドナーからの肝移植がある。HBV肝移植では高力価HBsヒト免疫グロブリン(HBIG)と核酸アナログはHBV再活性化を制御するが、生涯にわたるHBIG投与は患者QOLを低下させ、医療行政上、累積数十億の医療費が必要と推定されること、HBIGの95%以上は海外輸入に依存していることが問題である。このため、ワクチン接種による能動免疫の獲得が理想的である。ワクチン接種で抗体陽転化すればHBIGは不要だが、陽転化の予測ができず率も低いいため積極的な接種が行われていない。HLA-DPの遺伝子多型によるHBs抗体産生の規定が報告され、コンパニオン診断として有用な可能性がある。ワクチン高容量投与による抗体陽転化率の向上を示唆するデータが得られている。肝移植後のB型肝炎感染予防を遺伝子解析の視点から行った研究はこれまで皆無である。遺伝子の多型によって変化するHLA蛋白の

三次元構造の変化が明らかになれば、現在使用可能なB型肝炎ワクチンの問題点などが明らかになり、新たなワクチン開発にもつながると考えられる。

B. 研究方法

九州大学病院で肝移植を施行した症例の中でB型肝炎ウイルス陽性26例、B型肝炎既往感染34例及びHBVワクチン投与19例を用いた。該当症例の末梢血より、ゲノムDNAを抽出した検体にてHLA-DPA1及びDPB1の一塩基多型、サブタイプについて検討した。

C. 研究結果

生体肝移植後HBIGと核酸アナログでB型肝炎感染予防を10ヶ月以上行い、肝機能がほぼ正常な症例19例に対し、B型肝炎ワクチンを毎月投与した。ワクチンが無効であった8例とワクチンが有効でHBIGから離脱可能であった11例を比較検討した。無効8例の男/女比は6/2、有効11例の男/女比は1/10 (P=0.002)、生体肝移植時の平均年齢は各々54.3歳、37.0歳であった

(P=0.01)。無効8例の原疾患は壊死後性肝硬変6例、B型劇症肝炎1例、血管腫1例であった。有効11例では壊死後性肝硬変4例、B型劇症肝炎4例、胆道閉鎖症3例であった。ワクチン開始時の平均年齢は各々56.6歳、40.3歳であった(P=0.02)。HLA-DPA1上のrs3077の遺伝子多型の検討では、CC/CTがワクチン無効8例では各5/3例、ワクチン有効10例では各6/5例であった(有意差なし)。HLA-DPB1上のrs9277535の遺伝子多型の検討では、GG/GAがワクチン無効8例では各7/1例、ワクチン有効11例では各3/8例であった(P=0.007)。

D. 考察

B型肝炎ワクチン有効例ではHLA-DPB1上のrs9277535はGAの可能性が有意に高い事が明らかとなった。現在、2例でワクチン投与中、8例が肝移植後ワクチン待機中であるため、来年度はこれらの症例についても解析予定である。最近、HLA-DPのサブクラスの遺伝子型がB型肝炎感染と相関するとの報告があった。今後、当該症例のサブクラス解析も行う予定である。

さらに有意な因子であった年齢、性、HLAタイピングでスコアリングを行い、その精度のvalidationの目的で前向きの研究も行っていく予定。

E. 結論

HLA-DPB1上の一塩基多型がHBVワクチンの効果と関連する事が示唆された。今後、ワクチン効果予測を高い精度で行えるシステムを開発する。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1. Bae SK, Shimoda S, Ikegami T, et al. The risk factors for hepatitis B virus recurrence after living donor liver transplantation: A 17-year experience at a single center. *Hepatol Res.* 2015 Jan 15. doi: 10.1111/hepr.12489. [Epub ahead of print]

2. Ijichi H, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Ikeda T, Kawanaka H, Uchiyama H, Yamashita Y, Morita M, Oki E, Mimori K, Sugimachi K, Saeki H, Watanabe M, Shirabe K, Maehara Y. Recurrent hepatitis B following recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2013 Oct;104(10):376-82.

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

HBV 感染既往献血者における HBV-DNA 陽性率と陽転化率

分担研究者：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：HBs 抗原陰性で HBc 抗体低力価陽性（CLEIA 法 COI 値；1.0～12.0）献血者検体 4,742 中 92 検体（1.94%）から HBV-DNA が検出された。検出された HBV-DNA 量は、92 検体中 14 検体（15.2%）は 20 コピー/mL 以下であったが、残り 78 検体（84.8%）は測定感度以下であった。HBc 抗体の力価と HBV-DNA 陽性率との相関は認められなかった。HBV-DNA 陽性献血者は男性 65 名（70.7%）、女性 27 名（29.3%）であり、平均年齢は 57.6 歳（29-69 歳）であった。HBs 抗体は 59 検体（64.1%）が陰性（10mIU/mL 以下）であり、残り 33 検体も低力価で 100mIU/mL 以上を示した検体は 1 例のみであった。また、このような HBV 感染既往者が、自然経過中に HBV-DNA の陽転化をどれくらいの頻度で起こすのかを調査した。輸血用血液の HBc 抗体基準強化による遡及調査対象者のうち、前回献血時も HBc 抗体陽性であった 12,231 名の今回・前回献血の個別核酸増幅検査（NAT）を行った。前回献血時の個別 NAT が陽性の場合にはさらにその前へと遡り、最終的には個別 NAT 陰性までたどり着くことができた。これらの結果から、HBV 感染既往者における HBV-DNA 陽転化は 115 名/12,231 名（0.94%）が確認された。

A. 研究目的

リツキシマブをはじめとする分子標的薬治療や、免疫抑制剤療法による B 型肝炎ウイルス（HBV）の再活性化が問題となり、免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドラインが作成された。一方、このような治療・投薬をともなわない HBV 感染既往者も、自然経過中に HBV-DNA の陽転化や陰転化を起こすことが報告されている。感染既往献血者における HBV-DNA 陽性率と HBs 抗体価との関係、ならびに HBV 再活性化予防対策を実施していくうえで、コントロールとなり得る自然経過中の HBV-DNA 陽転化率を明らかにするため、輸血用血液の HBc 抗体基準強化による遡及調査を利用して調査を行った。

B. 研究方法

HBc 抗体の測定は CLEIA 法（富士レリオ社 CL4800）にて行い、HBs 抗体価の測定は CLIA

法（アボット社アーキテクト）にて行った。

HBV-DNA の検出はロシュ社の TaqScreen システム（50%検出限界 3.2IU/mL）およびコバス TaqMan HBV「オート」v2.0 により行った。

日本赤十字社は感染既往献血者血液による HBV 感染を防止するため、2012 年 8 月 6 日より輸血用血液の HBc 抗体基準を COI 12.0 未満から 1.0 未満へと強化した。この変更にともない COI 1.0 以上 12.0 未満の献血者も遡及調査の対象となった。HBV 関連の遡及調査は 1) 献血者の過去の献血時の保管検体を用いて個別の核酸増幅検査（NAT）を実施する、2) 過去の保管検体が HBV-DNA 陽性で、かつ HBc 抗体も陽性の場合は HBV-DNA が陰性化するまで何回でも遡る、とされている。

2012 年 8 月から 2013 年 8 月までの全国の HBc 抗体陽転による遡及調査対象者のうち、前回献血時に HBc 抗体弱陽性であった 12,231 名を対象として個別 NAT を実施した。あわせ

て遡及調査の発端となった今回の献血血液は、陽性通知のための個別 NAT を行った。

C. 研究結果

HBs 抗原陰性で HBc 抗体低力価陽性 (CLEIA 法 COI; 1.0~12.0) 献血者検体 4,742 中 92 検体 (1.94%) から HBV-DNA が検出された。検出された HBV-DNA 量は、92 検体中 14 検体 (15.2%) は 20 コピー/mL 以下であったが、残り 78 検体 (84.8%) は測定感度以下であった。HBc 抗体の力価別 HBV-DNA 陽性率は、COI 値 1.0~1.9 群で 1.56%、2.0~2.9 群 1.37%、3.0~3.9 群 2.95%、4.0~4.9 群 2.18%、5.0~5.9 群 1.47%、6.0~6.9 群 2.66%、7.0~7.9 群 1.18%、8.0~8.9 群 1.72%、9.0~9.9 群 4.22%、10.0~10.9 群 0.95%、11.0~11.9 群 1.05%であり、HBc 抗体価と HBV-DNA 陽性率に相関は認められなかった。

HBV-DNA 陽性献血者 92 名の性別は、男性 65 名 (70.7%)、女性 27 名 (29.3%) で、年齢は 20 歳代 1 名、30 歳代 3 名、40 歳代 5 名、50 歳代 41 名、60 歳代 42 名と高齢者に多く、平均年齢は 57.6 歳 (29-69 歳) であった。

HBs 抗体は 59 検体 (64.1%) が陰性 (10mIU/mL 以下) であり、残り 33 検体も低力価のものが多く、10~19mIU/mL 18 検体、20~29 mIU/mL 6 検体、30~50 mIU/mL 4 検体、50~99 mIU/mL 4 検体で 100mIU/mL 以上 (131 mIU/mL) を示した検体は 1 例のみであった。

HBc 抗体陽転による遡及調査対象者 12,231 名のうち今回献血時の個別 NAT 陽性は 115 名 (0.94%) であった。115 名のうち前回献血時の保管検体が個別 NAT 陰性は 100 名 (87.0%)、前回は陽性であったが前々回陰性は 10 名 (8.7%) であった。以下、陰性が確認されるまで遡った回数は、3 回 1 名、4 回 2 名、6 回 1 名、8 回 1 名であった。115 名の性別は男性 82 名 (71.3%)、女性 33 名 (28.7%) で、年齢は 20 歳代 1 名、30 歳代 7 名、40 歳代 13 名、50 歳代 46 名、60 歳代 48 名と高齢者に多かつ

た。しかしながら、個別 NAT で検出された HBV-DNA はすべて低濃度であり、HBs 抗原が陽転化するような例は認められなかった。

D. 考察

HBs 抗原陰性で HBc 抗体低力価陽性の感染既往者の HBV-DNA を測定したところ、1.94% が陽性であった。HBV-DNA の検出率と HBc 抗体価との相関は認められなかった。HBV-DNA が検出された献血者は男性が 70.7%を占めており、また年齢では高齢者が多く、50 歳代、60 歳代で全体の 90.2%を占めた。われわれはサイトメガロウイルス (CMV) でも同様に、高齢者で血漿中に CMV-DNA が多く検出されたことを報告している。一般的に女性の方が男性より、若年者の方が高齢者より免疫力が強いといわれ、HBV-DNA の陽性率にも免疫力が関係していると考えられた。

HBV-DNA が検出された検体は、HBs 抗体価の低い例で多く検出された。HBV 感染既往者の肝臓移植後では、高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリンの投与により、血中の HBs 抗体価を一定量以上に維持すれば再活性化を防止できるといわれている。また、輸血用血液の場合も HBc 抗体が高力価陽性であっても、同時に HBs 抗体が 200mIU/mL 以上の血液からの輸血感染例は確認されていない。HBs 抗体価が高い検体では、HBV との免疫複合体が赤血球上の CR1 (complement receptor 1) と結合し、網内系へと運搬され除去されているものと考えられる。

HBV の再活性化は血液疾患患者で 8%、リウマチ患者で 2%、固形がん患者では 1%発生するといわれ、われわれはそのコントロールとなり得る、HBV 感染既往者の自然経過中の HBV-DNA 陽転化率の調査を行った。HBV-DNA の陽転化が確認された献血者は、陽性率調査と同様に男性が 70%以上を占め、また高齢者が多かった。しかし、陽転化した HBV-DNA はすべて低濃度であり、さらに自然経過中に陽転と陰転を繰り返すような例も報

告されており、再活性化と同列に扱うことはできないのではないかと考えられた。今後の検討課題の一つである。再活性化防止のためのHBV ワクチン接種の検討も行われている。HBs 抗体の重要性が今後も注目されると思われる。近い将来わが国でも導入されるHBVの Universal vaccination が、HBV を取り巻く状況を大きく変化させる可能性がある。

E. 結論

HBs 抗原陰性でHBc 抗体低力価陽性の感染既往者のHBV-DNA を測定したところ、1.94%が陽性であった。HBV-DNA の検出率とHBc 抗体価との相関は認められず、男性が70.7%を占め、50歳代、60歳代で全体の90.2%を占めた。HBc 抗体基準強化による遡及調査対象者のうち、前回献血時もHBc 抗体陽性であった12,231名の今回・前回献血の個別NATを行い、自然経過中におけるHBV感染既往者のHBV-DNA陽転化が115名/12,231名(0.94%)で確認された。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Taira R, Satake M, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, Uchida S, Tadokoro K. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. *Transfusion*, 2013; 53: 1393-1404.
- 2) 本田豊彦、小河敏伸、佐藤美津子、濱岡洋一、百瀬俊也、内田茂治: Occult HBV carrier からの輸血による急性B型肝炎が強く疑われた1例. *血液事業*, 2013; 36: 721-725.
- 3) Furui Y, Satake M, Hoshi Y, Uchida S, Suzuki K, Tadokoro K. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors.

Transfusion, 2013; 53: 2190-2197.

- 4) Sobata R, Shinohara N, Matsumoto C, Uchida S, Igarashi S, Hino S, Satake M, Tadokoro K. First report of human immunodeficiency virus transmission via a blood donation that tested negative by 20-minipool nucleic acid amplification in Japan. *Transfusion* 54: 2361-2362, 2014.
 - 5) Owada T, Kaneko M, Matsumoto C, Sobata R, Igarashi M, Suzuki K, Matsubayashi K, Mio K, Uchida S, Satake M, Tadokoro K. Establishment of culture systems for Genotype 3 and 4 hepatitis E virus (HEV) obtained from human blood and application of HEV inactivation using a pathogen reduction technology system. *Transfusion* 54: 2820-2827, 2014.
 - 6) 田中英夫、伊藤秀美、内田茂治、石川喜樹 日本国内のB型およびC型肝炎ウイルス感染者数は? —献血者スクリーニングデータを補正して— *Japanese Association of Cancer Registries No.20* 29-38, 2014.
- ### 2. 学会発表
- 1) 本田豊彦、小河敏伸、佐藤美津子、濱岡洋一、百瀬俊也、内田茂治: Occult HBV carrier からの輸血による急性B型肝炎の1例. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会 (2013年5月 横浜)
 - 2) 本田豊彦、小河敏伸、佐藤美津子、濱岡洋一、五十嵐滋、内田茂治: HBc 抗体陽転化の遡及調査で、輸血から1年10ヶ月後に判明したHBV感染の一例. 第37回日本血液事業学会総会 (2013年10月 札幌)
 - 3) 内田茂治: 輸血副作用発生防止への取り組み: 感染症副作用 (ウイルス、細菌、寄生虫). 第38回日本血液事業学会総会 (2014年10月 広島)
 - 4) 相馬静穂、星友二、長谷川隆、山岸尚仁、若林菜穂子、五反田裕子、内田茂治、佐竹

正博、田所憲治:HBV スクリーニング NAT
陽性事例の変遷. 第 38 回日本血液事業学
会総会 (2014 年 10 月 広島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

HBV再活性化に關与する免疫因子の解析

研究分担者：考藤達哉 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：HBV再活性化は、がん化学療法および自己免疫疾患治療など幅広い臨床分野で問題となっている。再活性化時の対処の遅れは患者の生命予後に繋がるため、その予測法、診断・治療法の確立が必要である。HBVの再活性化には様々な要因が關与している。疾患の種類、治療薬によって再活性化のリスクが異なることは既に知られている。免疫抑制薬、抗癌剤、分子標的薬等によって、患者体内の免疫環境が変化することが発症に關与することは明らかであるが、その詳細な機序に関しては不明である。

HBV再活性化に關与する免疫因子を明らかにすることを目的として、慢性関節リウマチ患者、固形がん患者を対象として、治療経過中の血清ケモカイン、サイトカインを網羅的に解析した。経過中にHBVDNA > 2.1 log copies/ml以上に増加した再活性化症例と、非再活性化症例を比較した。HBVDNA増加かつALT正常時にはCCL21, CCL19などが増加し、ALT上昇時にはCXCL10, CXCL11などが増加していた。以上の結果より、再活性化の過程で特徴的に変化するケモカインが確認され、経過中に同ケモカインをモニターすることで再活性化のリスク評価に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HBV再活性化は、がん化学療法および自己免疫疾患治療など幅広い臨床分野で問題となっている。再活性化時の対処の遅れは患者の生命予後に繋がるため、その予測法、診断・治療法の確立が必要である。疾患種類、治療薬、HBVゲノム変異などが再活性化に關与することが報告されているが、免疫因子に関しては明らかではない。今年度は、HBV再活性化に關与する免疫因子を明らかにし、再活性化リスク評価への応用可能性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

当院に通院中の慢性関節リウマチ患者の中で、HBs抗原陰性、HBc抗体またはHBs抗体陽性のHBV既感染症例を対象とした。経過中にHBVDNAが2.1 log copies/mlに増加し、その後ALT41IU/Lと上昇した症例が存在した。本症例は、核酸アナログの投与なく、その後自然にHBVDNAとALTは正常化した。またHBV既感染の固形がん患者でも同様に、経過中HBVDNAが陽性化した症例が存在した。いずれも核酸アナログの投与がなく自然にHBVDNAは陰性化した。HBVDNA陽性化（再活性化）例と非再活性化例の血清

中ケモカイン、サイトカインを Multiplex 法を用いて網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える

C. 研究結果

慢性関節リウマチ患者、固形がん患者で HBV 再活性化を認めた症例では、① HBVDNA 陽性化した時期②ALT 上昇した時期③HBVDNA、ALT が正常化した時期に特徴的なケモカイン、サイトカインが明らかとなった (①CCL21、IL-10 ②CXCL10、CXCL11③CXCL13)。非再活性化例では、経過中ケモカイン、サイトカインの変動は軽微であった。

D. 考察

慢性関節リウマチ、固形がん領域で HBVDNA が陽性化しても、その後自然に陰性化し肝炎を発症しない症例が存在することが明らかになった。また HBVDNA の変動に対応して免疫系が反応しており、免疫反応の性質や強度が肝炎の発症の有無に関与する可能性がある。

E. 結論

HBV 再活性化の過程で特徴的に変化するケモカインが確認され、経過中に同ケモカインをモニターすることで再活性化のリスク評価に応用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

1) Aoki, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Yoshio, S., Kurosaki, M., Hashimoto, S., Yatsushashi, H.,

Nomura, H., Jong-Hon, K., Takeda, T., Naito, S., Kimura, T., Yamagiwa, Y., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., Izumi, N., Kage, M., Mizokami, M., and Kanto, T. Association of serum IFN-λ3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014 (in press)

2.学会発表

1) Yoshio S, Kanto T, Shouji H, Mano Y, Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) **The 11th JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research**, Hiroshima, Japan, 2014

2) Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. **The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links**. Hiroshima, Japan, 2014.

G. 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 肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

がん化学療法及び免疫抑制療法中の
B型肝炎ウイルス再活性化予防対策法の確立を目指した
ウイルス要因と宿主要因の包括的研究

（H24—肝炎—一般—004）

平成 24～26 年度 総合研究報告書

発行日 平成27(2015)年3月
発行者 「がん化学療法及び免疫抑制療法中のB型肝炎ウイルス再活性化
予防対策法の確立を目指したウイルス要因と宿主要因の包括的研究」
研究代表者 溝上 雅史
発行所 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
〒272-8516 千葉県市川市国府台1-7-1
TEL : 047-372-3501 FAX : 047-375-4760
