

一方、わが国において B 型肝炎ウイルス (HBV) ワクチン接種は医療従事者において施行されているが、その抗体獲得に関する実態は明らかでない。また、今までの報告では HBc 抗体を測定している報告は少ないため、HBs 抗体獲得がワクチンによるものか潜在性感染によるものかの判別が不能であった。そこで、今回我々は病院職員を対象に HBs 抗体、HBc 抗体を測定するとともに、アンケート調査にて HBV ワクチン接種歴を調べた。

B. 研究方法

1. 国立国際医療研究センター国府台病院およびセンター病院職員を対象とした研究として、当センターの倫理委員会にて既に承認されている。

2. 同施設において、過去の職員検診結果より抗体獲得不良例および良好例を抽出・選択し、同意書を取得後に採血を行う。各例よりリンパ球を分離・抽出し、naïve および memory CD4⁺T 細胞に分けた後、それぞれに対し、DUSP6 活性、miR-181a 発現を western blotting、real-time PCR にて、それぞれ測定する。DUSP6 活性、miR-181a 発現と年齢、性別、HBV ワクチン接種後の抗体獲得状況などと比較検討する。

3. 国立国際医療研究センター・センター病院職員を対象として血液採取およびアンケート調査を施行した。血液採取およびアンケート調査に関しても、同センターにおける倫理委員会にて既に承認されている。

C. 研究結果

1. 細胞内シグナル伝達系の解析では、まず、HBV ワクチン接種状況に多様性（接種回数の相違、接種対象者が年度により異なる、など）があり、症例の選択に苦慮した。結局、「過去に 1 回でも HBs 抗体陽性を示し、平成 24 年度検診で陰性を示した 15 例」に

限って検討した。上記 15 例に関して Naïve CD4⁺T 細胞の miR-181a の発現は年齢と逆相関にあり、memory CD4⁺T 細胞内の miR-181a の発現は年齢との相関を認めなかった。このことは過去の報告に一致する所見であった。HBs 抗体が陰性であったため、1 回のブースターワクチン接種を行った後の HBs 抗体価別に naïve CD4⁺T 細胞内の miR-181a 発現を検討すると、低い HBs 抗体価しか得られなかった例では miR-181a の発現が低く、高抗体価が得られた例では miR-181a の発現は高度であった。一方、memory CD4⁺T 細胞内の miR-181a 発現と獲得抗体価との関連は認めなかった。以上より、本研究の仮説通り、年齢と共に miR-181a の発現低下することによってワクチン不応性となる可能性が考えられた。

2. 2013 年に 1,359 名が職員検診を受診し、うち本研究参加に同意が得られた 1,085 名を研究対象とした。HBc 抗体陽性者は 27 名 (2.5%) で、HBc 抗体陽性率は年齢と共に上昇した ($p < 0.01$)。HBc 抗体陰性 1,058 名中 HBs 抗体は 879 名 (83.1%) であった。HBc 抗体陰性かつ HBV ワクチン接種者 902 名の HBs 抗体陽性率は 87.5% (789 名) であった。一方、「ワクチン非接種」と答えた 107 名中 52 名 (48.6%)、「不詳」と答えた 49 名中 38 名 (77.6%) で HBs 抗体が陽性であった。ワクチン接種歴があり、かつ HBc 抗体陽性であったのは 6 名存在した。うち 2 名に明らかな HBV 暴露歴があった。1 例は HBV 暴露時には HBV ワクチン接種は行っていないが、残りの 1 例は HBV ワクチン接種後に HBV 暴露していた。

D. 考察

本研究により HBV ワクチン接種後の抗体獲得にはリンパ球内細胞シグナルが関連することが予想されたが、症例の HBV ワクチン接種に関する多様性などから明確には

出来なかった。今後の課題としたい。

一方、今回の研究にて健康成人例に対するHBVワクチン接種を行っても12.5%に抗体獲得不良例が存在することが明らかになった。また、ワクチン接種後にHBV暴露した症例でHBc抗体が陽性であったことからHBs抗体を獲得しても臨床的感染は防御できても潜在感染の防御は完全にはできない可能性があると考えられた。

米国疾病管理予防センター (CDC)は、一旦有意なHBs抗体を獲得した例で急性B型肝炎の発症はなかったとの報告を根拠として10mIU/mL以上のHBs抗体価を一度でも獲得した場合は、その後抗体価が10mIU/mL未満となっても追加接種の必要はないとの指針を出し、わが国においても日本環境感染学会も同様のガイドラインを出しているが、HBs有意抗体価があれば完全な感染防御が可能かどうかは疑問が残る。HBs抗体獲得不良例の対策と共に今後の課題と考える。

E. 結論

健康成人におけるHBVワクチン接種とHBs抗体獲得に関する研究を行った。

F. 研究発表

論文発表

1. Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, Yatsushashi H, Nomura H, Kang JH, Takeda T, Naito S, Kimura T, Yamagiwa Y, Korenaga M, Masaki N, Izumi N, Kage M, Mizokami M, Kanto T. Association of serum IFN- λ 3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2015;50: 894-902
2. Hiramine S, Sugiyama M, Furusho N,

Uto H, Ido A, Tsubouchi H, Watanabe H, Ueno Y, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Hayashi J, Thomas DL, Mizokami M. A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2015;50:1069-1077.

3. 村田一素, 正木尚彦. I. 外来のガイドライン診療-診断、管理・治療-. 肝炎・肝硬変. *ガイドライン外来診療* 2015. 日経メディカル開発. P173-184, 2015.
4. 村田一素, 溝上雅史. HBV キャリアへの薬物治療中止時期の見きわめ. *日本医事新報* 2015;4743:61-63.
5. Masaki N, Yamagiwa Y, Shimbo T, Murata K, Korenaga M, Kanto T, Mizokami M, and the prefectural members to the Japanese interferon Database. Regional disparities in interferon therapy for chronic hepatitis C in Japan: a nationwide retrospective cohort study. *BMC Public Health* 2015;15:566-576.
6. Ito K, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, Mizokami M, Japanese AHB and CHB Study Group. Geographic distribution and characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 (in press)
7. Ueyama M, Nishida N, Korebaga M, Korenaga K, Yanai H, Adachi H,

- Katsuyama H, Moriyama S, Hamasaki H, Sako A, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanazawa A, Watada H, Okamoto K, Honda K, Kon K, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S. The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* (in press)
8. Kumagai E, Korebaga K, Korenaga M, Imamura M, Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S. Appropriate use of virtual touch quantification and Fibroscan^B M and XL probes according to the skin capsular distance. *J Gastroenterol* (in press)
9. 村田一素. B型肝炎ウイルスワクチンの現状とその対策—抗体が陽性にならない私、どうすればよいのか?—. *肝臓クリニカルアップデート* 2015;1:183-187.
10. Yanase M, Murata K, Mikami S, Nozaki Y, Masaki N, Mizokami M. Hepatitis B virus vaccination-related seroprevalence among health-care personnel in a Japanese tertiary medical center. *Hepatol Res* (in press).
- (平成27年5月21日～22日、熊本)
2. 青木孝彦、杉山真也、村田一素、由雄祥代、八橋 弘、野村秀幸、姜 貞憲、竹田 努、山極洋子、是永匡紹、今村雅俊、正木尚彦、泉 並木、鹿毛政義、溝上雅史、考藤達哉. C型慢性肝炎患者における血清IFN λ 3測定とその臨床的意義についての検討. 第51回 日本肝臓学会総会 (平成27年5月21日～22日、熊本)
3. 是永匡紹、是永圭子、上山三鈴、熊谷恵里奈、青木孝彦、由雄祥代、山極洋子、野崎雄一、柳瀬幹雄、今村雅俊、村田一素、考藤達哉、正木尚彦、溝上雅史. Sofosbuvir、Ledipasvir治療中のリバビリン併用は血小板を増加させる. 第51回 日本肝臓学会総会 (平成27年5月21日～22日、熊本)
4. 加賀朋子、高野ゆかり、吉澤雅子、榊原綾乃、川崎 郁、川村幸恵、佐野浩士、酒匂赤人、柳内秀勝、村田一素、上村直実. 当院での臨床研究活性化に向けて—臨床研究支援室設立から支援活動・実績までの活動報告. 第69回 国立病院総合医学会 (平成27年10月 2日～3日、札幌)
5. 村田一素、松本晶博、溝上雅史. 核酸アナログ製剤投与による新規発見サイトカインFactor Xの誘導とそれに伴うHBs抗原低下作用. 第19回 日本肝臓学会大会 (平成27年10月 8日～11日、東京)
6. 是永匡紹、渡部 武、上山三鈴、熊谷恵里奈、杉山真也、由雄祥代、青木孝彦、山極洋子、是永圭子、今村雅俊、村田一素、考藤達哉、正木尚彦、溝上雅史. HCV薬剤耐性変異株測定の問題点. 第19回 日本肝臓学会大会 (平成27年10月 8日～11日、東京)
7. Kumagai E, Korenaga K, Korenaga M, Ueyama M, Aoki Y, Yamagiwa Y, Imamura M, Murata K, Kanto T,

学会発表

1. 松本晶博、村田一素、田中榮司. 核酸アナログ (NA)/Peg-IFN シークエンシャル治療におけるHBs抗原量低下予測因子の検討. 第51回 日本肝臓学会総会

- Masaki N, Watanabe S, Mizokami M. Association of skin capsular distance with accuracy of liver stiffness measurements of the FibroScan XL probe-comparison with virtual touch quantification and the FibroScan M probe. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
8. Yamagiwa Y, Masaki N, Nishida N, Kawashima M, Khor SS, Miyadera H, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Tanaka Y, Koike K, Tokunaga K, Mizokami M. Association between severe rash and HLA polymorphism in telaprevir-based therapy for chronic hepatitis C in a multi-center study in Japan. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 9. Mukaide M, Murata K, Sugiyama M, Mizokami M. High-throughput and ultrasensitive assay for the quantification of HBV precore and basal core promoter mutants and their clinical significance. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 10. Sugiyama M, Kanto T, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. Impact of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 11. Murata K, Matsumoto A, Inoue T, Sakamoto M, Sugiyama M, Enomoto N, Tanaka E, Mizokami M. IFN- λ 3 induction by nucleotide, not nucleoside, analogs and its clinical significance in HBV patients. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 12. Kang JH, Murata K, Karino Y, Matsui T, Ozeki I, Takahashi K, Arai M, Mizokami M. Early elevation in serum IFN- λ 3 is responsible for progressive liver failure caused by acute infection of Hepatitis E virus genotype 4. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 13. Watabe T, Korenaga M, Sugiyama M, Kumagai E, Ueyama M, Aoki Y, Yamagiwa Y, Korenaga K, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Mizokami M. Distribution of pre-existing NS5A/NS5B resistance associated variants in genotype 1b patients with hepatitis C virus and response to direct acting antivirals. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)
 14. Ueyama M, Korenaga M, Nishida N, Korenaga K, Kumagai E, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K,

Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanto T, Watanabe S, Mizokami M. PNPLA3 and JAZF1 variants influence hepatocellular carcinoma development in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes patients. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)

15. Kumagai E, Korenaga M, Korenaga K, Ueyama M, Imamura M, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Watanabe S, Mizokami M. Usefulness of mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) for advanced fibrosis and hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The 66th annual meeting of the American association for the study of liver diseases (Nov 13-17, 2015, San Francisco, USA)

①遺伝子型が異なるウイルスに対するB型肝炎ワクチンの効果の検討 ②名古屋市立大学病院小児患者のHBV検査成績

研究分担者 井上 貴子 名古屋市立大学大学院医学研究科 共同研究教育センター
共同研究者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学分野 教授
村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学分野 特任助教
堤 進 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学分野 博士研究員

研究要旨

①遺伝子型が異なるB型肝炎ウイルス (HBV) に対するワクチン効果を明らかにする目的で、遺伝子型C由来のワクチンによる感染防御能を検討した。マウスおよびヒト肝細胞を用いた感染実験により、遺伝子型C由来のワクチン（ビームゲン®）によって得られた抗体は、遺伝子型AのHBVに対しても十分な感染防御効果を有することが証明された。ビームゲン®接種者の血液中には、HBVの遺伝子型に関係なく、HBs抗原と反応する抗体が存在することが示唆された。

②わが国での0歳児へのHBワクチン定期接種の導入に向けて、小児のHBV感染の実態を調査した。当院小児患者のHBs抗原陽性率は0.49%、HBc抗体陽性率は2.45%であった。HBV一過性感染者はキャリア数の数倍以上存在することが予想された。HBV集団感染や小規模の水平感染が散発していることから、今後小児のHBV水平感染に対する対策を進める必要があると考えられた。

A. 研究目的

①ビームゲン®(遺伝子型C)由来抗体によって、他の遺伝子型のHBV感染の防御が可能か検証する。

・ヒト肝細胞キメラマウスによる *in vivo* HBV感染中和試験/ヒト初代肝細胞を用いたビームゲン®由来抗体による *in vitro* HBV感染中和試験：遺伝子型C由来抗体を用いて、各遺伝子型のHBVに対する中和効果を *in vivo/in vitro*より検証する。

・HBV由来ペプチドとビームゲン®接種者の抗体との反応性の検討：HBV中和活性を持つ抗体と強く結合する各遺伝子型のHBV由来ペプチドと、ビームゲン®接種者の抗体との結合能を *in vitro*で検証する。

②小児のHBV感染の実態を調査する。

・わが国での0歳児へのHBワクチン定期接種の導入に向けて、当院小児患者のHBs抗原・HBc抗体陽性率、HBV母子感染予防処置を行った小児のHBc抗体価推移を調査し、小児におけるHBV感染の現状を把握する。

B. 研究方法

①倫理面への配慮：遺伝子組み換えについ

ては学内倫理委員会の審査を経た。ヒト肝細胞は米国での倫理審査を経たものを使用した。同意を得られたビームゲン®接種者から血清提供を受けた。

・ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、ビームゲン®由来抗体による *in vivo* HBV感染中和試験を行う。

・ヒト初代肝細胞を三次元培養し、*in vitro* HBV感染中和試験を行う。感染源と遺伝子型C由来抗体を同時に細胞に添加、または抗体処理後の細胞に感染源を添加して感染成立の有無を確認する。

・ビームゲン®を接種した健常人から血清を採取する。HBV中和活性を有する抗体と強く結合する各遺伝子型のHBV由来ペプチドと、ビームゲン®接種者の血清中の抗体との反応性を *in vitro*で検討する。

②倫理面への配慮：本検討は予め当院の倫理委員会の承認を得て行った。

・HBs抗原、HBc抗体、HBs抗体はCLEIA法 (HISCL HBsAg、HISCL HBcAb、HISCL HBsAb)で測定を行う。

・HBs抗原およびHBc抗体陽性率算出の母集団は、2011年1月から2013年10月に

当院で検査を受けた15歳以下の小児である。HBc抗体陽性率は、母からの移行抗体や抗HBsヒト免疫グロブリン投与の影響が疑われる児を除いた実数から算出する。
・HBV母子感染予防処置後、2011年1月から2015年4月の期間内に1年6か月以上当院小児科で経過観察を行った15歳以下の小児のHBc抗体価推移を調査する。

C. 研究結果

①・キメラマウスによる*in vivo* HBV感染中和試験：ビームゲン®由来のHB0116抗体とHB0478抗体によって、遺伝子型AのHBV感染も防御できた。HB0478抗体は、遺伝子型Cのワクチンエスケープ変異株の感染も防御できた。

・ヒト初代肝細胞を用いた*in vitro* HBV感染中和試験：ビームゲン®由来のHB0478抗体は、遺伝子型CのHBV感染は5.5 mIUで完全阻止、遺伝子型AのHBV感染は5.5 mIUで90%阻止、55 mIUで完全に阻止することができた。

・HBV由来ペプチドとビームゲン®接種者の抗体との反応性の検討：遺伝子型A、CのHBV由来ペプチドとワクチン接種者の抗体との結合能は良好で、ワクチン接種者の血液中には遺伝子型に関係なく反応する抗体が存在することが示唆された。

②・HBs抗原検査受検者1821名中陽性は9名で、陽性率は0.49%であった。内訳は母子感染5名、水平感染2名、輸血後肝炎2名であった。

・HBc抗体調査受検者612名中陽性は15名で、陽性率は2.45%であった。基礎疾患は先天性心疾患8名（うち2名は輸血歴あり）、母子感染6名、悪性腫瘍1名であった。

・20年来、当院でHBV母子感染予防処置を行った小児のHBV母子感染成立例はない。経過観察を行った17名中16名で生後2年までにHBc抗体が陰性化し、1名で抗体価が再上昇した。

D. 考察

①キメラマウスおよびヒト肝細胞を用いた感染実験により遺伝子型C由来のワクチン（ビームゲン®）によって得られた抗体は、遺伝子型AのHBVに対しても感染防御効果を有することが示された。ビームゲン®接種者には、HBVの遺伝子型に関係なくHBs抗原と反応する抗体が存在することが示

唆された。

②HBV一過性感染者はキャリア数の数倍以上存在すると想定される。HBV母子感染予防処置成功例のHBc抗体価再上昇は、HBVへの暴露を示唆する。小児の日常生活において、母子感染予防のみでは防げない水平感染が起こっている可能性が示された。

E. 結論

①遺伝子型C由来のワクチン（ビームゲン®）によって得られた抗体は、遺伝子型AのHBVに対しても反応し、一定濃度以上で感染防御効果を有すると考えられた。

②今後0歳児へのHBワクチン定期接種に加え、HBワクチン接種適応年齢の拡大へと議論を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Susumu Hamada-Tsutsumi, Etsuko Iio, Tsunamasa Watanabe, Shuko Murakami, Masanori Isogawa, Sayuki Iijima, **Takako Inoue**, Kayoko Matsunami, Kazuto Tajiri, Tatsuhiko Ozawa, Hiroyuki Kishi, Atsushi Muraguchi, Takashi Joh, and Yasuhito Tanaka. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by *in vitro* and *in vivo* infection. PLoS ONE. 2015; 10(2): e0118062.
- 2) 大根 久美子, 可児 里美, 大橋 実, 新海 登, **井上 貴子**, 脇本 幸夫, 田中 靖人 HBs抗体価の測定方法間差～HBワクチン接種者由来モノクローナルHBs抗体を用いた検証 臨床病理 63 (8): 907-912 2015年8月
- 3) **井上 貴子**, 田中 靖人 今日の新しい臨床検査一選び方・使い方 (3) 肝疾患 週刊日本医事新報 No. 4771 2015年10月3日発行
- 4) **Takako Inoue** and Yasuhito Tanaka. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. Microbial Cell. In revision.

2. 学会発表

- 1) Shuko Murakami, Tsunamasa Watanabe, Katsumi Omagari, Takako Inoue, Sayuki Iijima, Susumu Hamada-Tsutsumi, Sanae Hayashi, Kazuto Tajiri, Hiroyuki Kishi, Yasuhito Tanaka. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai, China.
- 2) Takako Inoue, Noboru Shinkai, Kumiko Oone, Shuko Murakami, Susumu Tsutsumi, Shintaro Ogawa, Masanori Isogawa, Tsunamasa Watanabe, Yasuhito Tanaka. The Neutralizing Activity of Monoclonal HBs Antibodies Separated from Hepatitis B Vaccinated Recipients and the Influence of the titers by Different Measurement Methods. AASLD The Liver Meeting, Nov. 7-11, 2014. Boston, USA.
- 3) Takako Inoue, Kumiko Oone, Noriyo Ochi, Noboru Shinkai, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Shintaro Ogawa, Tsunamasa Watanabe, Yasuhito Tanaka. A Newly Developed High-Sensitive HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay is a Precise Application as a pre-Transfusion Screening Test to Detect Occult HBV. AASLD The Liver Meeting, Nov. 7-11, 2014. Boston, USA.
- 4) 井上 貴子、大根 久美子、越知 則子、新海 登、五藤 孝秋、大橋 実、脇本 幸夫、田中 靖人 高感度HBs抗原定量法 (HBsAg-HQ) を用いた輸血前スクリーニング検査の有用性 第60回日本臨床検査医学会学術集会 2014年11月22日～25日 福岡市
- 5) 大根 久美子、可児 里美、大橋 実、脇本 幸夫、井上 貴子、新海 登、田中 靖人 HB ワクチン接種者から分離されたモノクローナル HBs 抗体の中和活性能および抗体価の測定方法間差への影響 第60回日本臨床検査医学会学術集会 2014年11月22日～25日 福岡市
- 6) 井上 貴子、堤 進、田中 靖人 当院における小児患者の HBc 抗体陽性率および遺伝子型が異なる B 型肝炎ウイルスに対する B 型肝炎ワクチン効果の検討 第51回日本肝臓学会総会ワークショップ「疫学からみたウイルス肝炎対策」 2015年5月21日～22日 熊本市
- 7) 井上 貴子、飯尾 悦子、荻原 貴之、新海 登、松波 加代子、藤原 圭、野尻 俊輔、蜂谷 真代、今枝 憲郎、岡山 直司、田中 靖人 慢性肝疾患と糖尿病・糖代謝異常の関係と糖尿病合併肝細胞癌の臨床的特徴 第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2015年5月23日 下関市
- 8) 井上 貴子、新海 登、飯尾 悦子、松波 加代子、河島 圭吾、堤 進、村上 周子、五十川 正記、田中 靖人 輸血前スクリーニング検査における高感度 HBsAg 定量法「HBsAg-HQ」の評価 第19回日本肝臓学会大会 (JDDW2015) 2015年10月8日～11日 東京
- 9) Takako Inoue, Tomoya Iwase, Satomi Kani, Kumiko Oone, Takaaki Goto, Yukio Wakimoto, Yasuhito Tanaka. Performance Assessment of Common Anti-hepatitis B Core Antigen Assays in Japan for Prevention of HBV Reactivation. AASLD The Liver Meeting, Nov. 13-17, 2015. San Francisco, USA.
- 10) Takako Inoue, Shuko Murakami, Susumu Tsutsumi, Kumiko Oone, Kazuto Tajiri, Hiroyuki Kishi, Shintaro Ogawa, Noboru Shinkai, Takaaki Goto, Yukio Wakimoto, Yasuhito Tanaka. Comparative Study for Anti-Hepatitis B Surface Antigen Titers Based on Two Measurement Methods: Using Monoclonal Antibodies Isolated from Hepatitis B Vaccinated Japanese Recipients. AASLD The

- Liver Meeting, Nov. 13-17, 2015.
San Francisco, USA.
- 11) **Takako Inoue**, Noriyo Ochi,
Takaaki Goto, Shintaro Ogawa,
Noboru Shinkai, Kumiko Oone,
Yukio Wakimoto, Yasuhito Tanaka.
Application of Highly Sensitive
Chemiluminescent Enzyme
Immunoassay for Hepatitis B
Surface Antigen to Detect Occult
HBV infection: an Appropriate
Method as Pre-Transfusion Testing.
AASLD The Liver Meeting, Nov.
13-17, 2015. San Francisco, USA.
 - 12) 五藤 孝秋, 脇本 幸夫, 井上 貴子,
田中 靖人 電子カルテのアラート機
能を応用した肝炎ウイルス検査支援
システムの構築 第 62 回日本臨床検
査医学会学術集会 2015 年 11 月 19
日～22 日 岐阜市
 - 13) **Takako Inoue**, Noriyo Ochi,
Takaaki Goto, Shintaro Ogawa,
Noboru Shinkai, Yukio Wakimoto,
Yasuhito Tanaka. Application of
Highly Sensitive CLEIA for HBsAg:
an Appropriate Method to Detect
Occult HBV viremia. APASL
“Modern Hepatology”, Feb. 20-24,
2016. Tokyo, Japan.
 - 14) 井上 貴子、五藤 孝秋、杉浦 時雄、
遠藤 剛、伊藤 孝一、脇本 幸夫、田
中 靖人 当院における小児患者の
HBc 抗体陽性率および HBV 母子感染予
防処置をした小児の HBc 抗体価推移
について 第 55 回日本臨床検査医学
会東海・北陸支部総会 2016 年 3 月 6
日 浜松市

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。

B型肝炎ウイルスの異なるジェノタイプに対するワクチン効果に関する研究

研究分担者 黒川 真奈絵 聖マリアンナ医科大学大学院

疾患プロテオーム・分子病態治療学 准教授

研究要旨

B型肝炎ワクチン接種者血清中のHBs抗体について、異なるジェノタイプ由来のHBs抗原に対する反応性を検討した。ジェノタイプA由来のヘプタバックスIIを接種し臨床検査でHBs抗体陽性となった健常人61例の血清(genoA血清)、同様にジェノタイプC由来のビームゲンを接種し臨床検査でHBs抗体陽性となった健常人52例の血清(genoC血清)、およびHBワクチン未接種であり臨床検査でHBs抗体陰性の健常人39例の血清(not immunized [NI]血清)を用い、ジェノタイプA由来HBs抗原の主要な蛋白質の型であるadw2(genoA抗原)、およびジェノタイプC由来HBs抗原の主要な蛋白質の型であるadrq+(ビームゲン、genoC抗原)に対する反応をsandwich ELISAにて測定した。実験間の差を内部標準血清で補正したところ、NI血清の補正OD値の平均+2x標準誤差は、genoA抗原の系で0.059 AU、genoC抗原の系で0.086 AUとなり、これをHBs抗体陽性/陰性のカットオフ値として規定した。その結果、genoA血清およびgenoC血清の全例が、genoA抗原およびgenoC抗原に対して陽性であった。genoA抗原に対するgenoA血清群の平均±標準誤差は4.379±4.051 AU、genoC血清群は、18.182±31.302 AUであった(p=2.457E-4)。genoC抗原に対するgenoA血清群の平均±標準誤差は6.888±6.347 AU、genoC血清群は34.758±53.046 AUであった(p=1.422E-7)。genoA血清のgenoA抗原とgenoC抗原への反応性はp=0.9805(p<0.0001)、genoC血清のgenoA抗原とgenoC抗原への反応性はp=0.9815(p<0.0001)と、両者とも非常に高い相関を示した。genoA血清10検体を両抗原で吸収したところ、genoA抗原では100%、genoC抗原では96.4±6.5%吸収された。同様に、genoC血清10検体を両抗原で吸収したところ、genoC抗原では100%、genoA抗原では96.0±2.0%吸収された。以上より、HBワクチンを接種しHBs抗体陽性となった血清は、接種ワクチンと異なるジェノタイプのB型肝炎ウイルスの感染も防御出来る可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

本邦のB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus, HBV)感染の主原因であった産道感染は、1986年開始の免疫グロブリンとワクチンによる母子感染事業により激減した。しかし家族内や幼児間での感染や性行為等による新規感染者は後を絶たず、また近年では既感染者の免疫抑制下におけるHBVの再

活性化が問題となっている。故に日本国民においてHBワクチンをユニバーサルに施行する必要性が考えられるが、それにはいくつかの課題を克服しなければならない。

その1つが、現行のワクチン製剤がHBVの全ての遺伝子型(ジェノタイプ)の感染を防御し得るかという点である。HBVは遺伝子変異により、複数のジェノタイプ(A-J)に分類

される。「あるジェノタイプのHBVの配列から作製されたワクチンで、他のジェノタイプのHBV感染を効果的に防止できるか」について、疫学研究からは可能と考えられるが、試験管内の検討はなされてない。現在日本で使用可能なHBワクチンは、ジェノタイプA及びC由来の2種類がある。両者ともsmall S抗原の組換え蛋白質である。一方、日本人の幼児期を含めた主な感染HBVはジェノタイプCであるが、近年青年期において性行為等の水平感染による急性B型肝炎の発症が問題となっており、これは主にジェノタイプAの感染によることが知られている。

以上より、本研究ではHBVのジェノタイプA由来ワクチン接種により作製されたHBs抗体がジェノタイプC由来のHBs抗原と結合するか、またジェノタイプC由来ワクチン接種により作製されたHBs抗体がジェノタイプA由来のHBs抗原と結合するかを検討する。ヒト血清中のポリクローナルなHBs抗体のレベルでHBs抗原との結合能を測定することにより、他のジェノタイプに対する感染防御能の有無を検討することを目的とする。

B. 研究方法

ジェノタイプA由来HBs抗原のワクチン(ヘプタバックスII、MSD)を接種し臨床検査(ステイシアCLEIA法 ad、LSIメディエンス社、またはアーキテクトオーサブ法 adw+ayw、アボット社)でHBs抗体陽性を示した健康人193例、およびジェノタイプC由来HBs抗原のワクチン(ビームゲン、化学及血清療法研究所)を接種し臨床検査(アーキテクトオーサブ法)でHBs抗体陽性を示した健康人141例、およびHBワクチン未接種であり臨床検査(ステイシアCLEIA法)でHBs抗体陰性を示した健康人109例より、同意のもとに血清を採取した。

ジェノタイプA由来HBs抗原の主要な蛋白質の型であるadw2(genotype A2由来、アブ

カム社、genoA抗原)、およびジェノタイプC由来HBs抗原の主要な蛋白質の型であるadrq+(ビームゲン、genoC抗原)に対する反応性を、ELISAにて測定した。具体的には、各HBs抗原を5 μ g/mLで固相化し、血清およびペルオキシダーゼを標識した検出用HBs抗原(ad+ay、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティック社、エンザイグノスト、Anti-HBsII)を反応させ、HBs抗体の反応を検出した。OD値が1.5を超える場合は血清を希釈し、OD0.25-1.5となるよう調整して使用した。内部標準血清の測定値を用いて実験間の差を補正し、補正OD値に血清の希釈倍数を乗じて、HBs抗体価(AU)を算出した。

また、ヘプタバックスII接種HBs抗体陽性血清(genoA血清)10例およびビームゲン接種HBs抗体陽性血清(genoC血清)10例を、接種ワクチンと同一および異なるジェノタイプ由来のHBs抗原0.15、0.5、1.5、5.0 μ g/mLで吸収した後に、同一ジェノタイプ由来のHBs抗原を固相化した上記ELISAで測定し、接種ワクチンと異なるジェノタイプ由来のHBs抗原に対する反応を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、多施設臨床試験として聖マリアンナ医科大学および筑波大学生命倫理委員会に申請し、承認を得て行った。

C. 研究結果

HBワクチン未接種でHBs抗体陰性である健康人39例の血清(not immunized [NI]血清)は、genoA抗原に対し0.033-0.058 AU、genoC抗原に対し0.039-0.093 AUを示した。NI血清の補正OD値の平均+2x標準誤差は、各々0.059 AU、0.086 AUとなり、これをHBs抗体陽性/陰性のカットオフ値として規定した。

genoA血清のうち61例、genoC血清のうち52例について測定したところ、全ての血清が両抗原のカットオフ値を超える値を示し

た。genoA抗原に対するgenoA血清群の平均±標準誤差は4.379±4.059 AUであり、genoC血清群は同様に18.182±31.302 AUであった(p=2.457E-4)。genoC抗原に対するgenoA血清群の値は同様に6.888±6.347 AUであり、genoC血清群の値は34.758±53.046 AUであった(p=1.422E-7)。

HBs抗体陽性血清の、接種ワクチンと同一および異なるジェノタイプ由来のHBs抗原に対する反応性の相関を検討したところ、genoA血清のgenoA抗原とgenoC抗原への反応性は $p=0.9805$ ($p<0.0001$)、genoC血清のgenoA抗原とgenoC抗原への反応性は $p=0.9815$ ($p<0.0001$)と、両者とも非常に高い相関を示した。

異なるジェノタイプ由来のHBs抗原に対する反応性を詳細に検討するため、genoA血清およびgenoC血清に対し、同一および異なるジェノタイプ由来のHBs抗原を用いた吸収試験を行った。同一ジェノタイプ由来のHBs抗原を固相化した上記ELISAにて、HBs抗体陰性血清と同等かそれを下回るOD値を示した場合に完全に吸収されたと定義したところ、同一ジェノタイプ由来のHBs抗原5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で吸収すると完全に吸収されることが分かった。この吸収率を100%とし、異なるジェノタイプ由来のHBs抗原5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で吸収した場合の吸収率を測定した。

genoA血清10検体を両抗原で吸収したところ、genoA抗原では100%、genoC抗原では96.4±6.5%吸収された。同様に、genoC血清10検体を両抗原で吸収したところ、genoC抗原では100%、genoA抗原では96.0±2.0%吸収された。この20検体中19検体は、異なるジェノタイプ由来のHBs抗原により92.4-100%の吸収率を示したが、genoA血清の1例のみが79.2%と低い値を示した。

D. 考察

特定のジェノタイプ由来HBs抗原に対するHBs抗体の測定系をsandwich ELISA法として確立した。genoA抗原、genoC抗原に対する測定系で、NI血清群は補正OD値で0.1を超えず、HBs抗体陽性血清は全例カットオフ値を超える抗体価を示した。このことから、当測定系はHBs抗体価を適切に反映していると考えられた。

genoA血清・genoC血清の両者が、genoA抗原・genoC抗原の両者に対して陽性であったことより、特定のジェノタイプ由来HBs抗原ワクチン接種により、他のジェノタイプ由来のHBs抗原へも結合するHBs抗体が得られることが示された。これは特定のHBワクチン接種により、将来的に異なるジェノタイプのHBVに感染した際に感染防御が成り立つ可能性を示しており、HBワクチンのユニバーサル化を推進する根拠の一つになると考えられる。

今回の測定では、genoA抗原・genoC抗原の両者に対して、genoC血清がgenoA血清より高い抗体価を示した。この理由としては、3回目のワクチン接種後、genoC血清は1~2か月後に採血されたのに対し、genoA血清は3~33か月に採血されており、ワクチン接種終了時から採血までの期間の差異によると考えられた。

genoA血清、genoC血清とも、genoA抗原とgenoC抗原への反応性に非常に高い相関を示した。接種ワクチンと同一および異なるジェノタイプ由来のHBs抗原への反応性が高い相関を示すことは、異なるジェノタイプ由来のHBVの感染防御も高い確率でなされることを示唆する。

異なるジェノタイプ由来のHBs抗原を用いた吸収試験では、両血清とも平均96%という非常に高い値を示した。このことより、特定のワクチン接種により獲得したHBs抗体は、接種ワクチンと異なるジェノタイプ

のHBVの感染も防御出来る可能性が高いと考えられた。

吸収試験を行ったHBs抗体陽性血清は1例を除き、異なるジェノタイプ由来のHBs抗原での吸収において92%以上の吸収率を示したが、1例のみが79.2%と低い値を示した。このような抗体のプロファイルをもつHBs抗体陽性者が低い頻度で存在すると考えられるが、このような症例のHBs抗体価が時間と共に低下した場合、異なるジェノタイプのHBVの感染を防御しきれぬかが問題となる可能性がある。

E. 結論

HBワクチンを接種しHBs抗体陽性となった血清は、接種ワクチンと異なるジェノタイプのHBVの感染も防御出来る可能性が高いと考えられた。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Noguchi Y, Kurokawa MS, Okuse C, Matsumoto N, Nagai K, Sato T, Arito M, Suematsu N, Okamoto K, Suzuki M, Itoh F, Kato T. Serum peptides, represented by complement 3f des-arginine, are useful for prediction of the response to pegylated interferon- α plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2013;43:743-56.
- 2) Ando T, Iizuka N, Sato T, Chikada M, Kurokawa MS, Arito M, Okamoto K, Suematsu N, Makuuchi H, Kato T. Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. *Hum Immunol* 2013;74: 852-7.
- 3) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Atsumi T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S; for JMAAV. Prediction of response to treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. *PLOS ONE* 2013;8: e63182.
- 4) Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Suematsu N, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. *J Proteomics* 2013;91C:259-69.
- 5) Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2013, Epub ahead of print.
- 6) Onodera H, Arito M, Sato T, Ito H, Hashimoto T, Tanaka Y, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Kato T. Novel effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells revealed by a proteomic approach. *Brain Res* 2013;1534:87-94.

- 7) Noguchi M, Sato T, Nagai K, Utagawa I, Suzuki I, Arito M, Iizuka N, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Yamaguchi N, Kurokawa MS. Roles of serum fibrinogen α chain-derived peptides in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2014;29:808-18.
- 8) Endo W, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Omoteyama K, Iizuka N, Okamoto K, Suematsu N, Nakamura H, Beppu M, Kato T. Effect of sulfasalazine and tofacitinib on the protein profile of articular chondrocytes. *Mod Rheumatol* 2014;24:844-50.
- 9) Kojima S, Koitabashi K, Iizuka N, Okamoto K, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Suematsu N, Shibagaki Y, Yasuda T, Kimura K, Kato T. Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using micro-sieving. *Am J Nephrol* 2014;29:36-45.
- 10) Asano K, Arito M, Kurokawa MS, Omoteyama K, Okamoto K, Suematsu N, Yudoh K, Nakamura H, Beppu M, Kato T. Secretion of inflammatory factors from chondrocytes by layilin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:85-90.
- 11) Koizumi H, Arito M, Endo W, Kurokawa MS, Okamoto K, Omoteyama K, Suematsu N, Beppu M, Kato T. Effects of tofacitinib on nucleic acid metabolism in human articular chondrocytes. *Mod Rheumatol* 2015;13:1-6.
- 12) Ohyama K, Sato T, Tanaka K, Manabe S, Nagae H, Arito M, Iizuka N, Kojima S, Omoteyama S, Seki Y, Kurokawa MS, Suematsu N, Okamoto K, Pringle CK, Kato T, Kitagawa H. A peptide profile of amniotic fluid in a fetal lamb model of gastroschisis. *Integr Mol Med* 2014;1:67-72.
- 13) Takenouchi K, Arito M, Sato T, Takahashi K, Kurokawa MS, Yudoh K, Takai S, Kato T, Nakamura H. Proteomic analysis of celecoxib on chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Mod Res Inflamm* 2014;3:90-8.
- 14) 黒川真奈絵、加藤正樹、松浦哲彦. プロテオミクスの自己免疫疾患解析への応用. *炎症と免疫* 2014;22:8-12.
- 15) 黒川真奈絵、浅野孝太. リウマチ性疾患のプロテオーム解析. *医学のあゆみ* 2014;251:958-62.
- 16) Suzuki I, Noguchi M, Arito M, Sato T, Omoteyama K, Maedomari M, Hasegawa H, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Yamaguchi N, Kurokawa MS. Serum peptides as candidate biomarkers for dementia with Lewy bodies. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015;30:1195-206.
- 17) Arito M, Nagai K, Ooka S, Sato T, Takakuwa Y, Kurokawa MS, Sase T, Okamoto K, Suematsu N, Kato T. Altered acetylation of proteins in patients with rheumatoid arthritis, revealed by acetyl-proteomics. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33:877-86.
- 18) Tsuno H, Suematsu N, Sato T, Arito M, Matsui T, Iizuka N, Omoteyama

- K, Okamoto K, Tohma S, Kurokawa MS, Kato T. Effects of methotrexate and salazosulfapyridine on protein profiles of exosomes derived from a human synovial sarcoma cell line of SW982. *Proteomics - Clin Applications*, in press.
- 19) Adachi T, Arito M, Suematsu N, Ikemori AK, Omoteyama K, Sato T, Kurokawa MS, Okamoto K, Kimura K, Shibagaki Y, Kato T. Roles of layilin in TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;467:63-9.
- 20) 黒川真奈絵. リウマチ・膠原病と翻訳後修飾異常. *臨床リウマチ* 2015;27:313-7.
- 21) Suzuki H, Chikada M, Yokoyama MK, Kurokawa MS, Ando T, Furukawa H, Arito M, Miyairi T, Kato T. Aberrant glycosylation of lumican in aortic valve stenosis revealed by a proteomic analysis. *Int Heart J* 2016;57:104-11.
2. 学会発表
- 1) Noguchi Y, Kurokawa MS, Okuse C, Matsumoto N, Nagai K, Sato T, Arito M, Suematsu N, Okamoto K, Suzuki M, Itoh F, Kato T. Serum peptides, represented by complement 3f des-arginine, are useful for prediction of the response to pegylated interferon-α plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *HUPO2013*, Sep, 2013.
- 2) Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Suematsu N, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. *HUPO2013*, Sep, 2013.
- 3) Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka H, Suematsu N, Okamoto K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a biomarker for Behcet's Disease. *HUPO2013*, Sep, 2013.
- 4) Tsuno H, Suematsu N, Sato T, Arito M, Iizuka N, Omoteyama K, Kurokawa MS, Okamoto K, Kato T. Proteomic analysis of effects of antirheumatic drugs on exosomes derived from synovial sarcoma cells. *HUPO2013*, Sep, 2013.
- 5) Sato T, Arito M, Kurokawa MS, Takakuwa Y, Ooka S, Nagai K, Nakamura H, Iizuka N, Suematsu N, Okamoto K, Kato T. Comprehensive analysis of aberrantly glycosylated proteins in rheumatoid arthritis. *HUPO2013*, Sep, 2013.
- 6) Omoteyama K, Arito M, Sato T, Iizuka N, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Kato T. 2D-DIGE analysis of cell surface proteins reveals characteristic proteome profiles for effects of sulfasalazine in human synovial sarcoma cell line, SW982. *HUPO2013*, Sep, 2013.

- 7) Suzuki I, Kurokawa MS, Noguchi M, Sato T, Utakwa I, Arito M, Iizuka N, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Yamaguchi N, Kato T. Serum peptide profiles as a candidate biomarker for dementia with lewy bodies. HUPO2013, Sep, 2013.
- 8) Kojima S, Koitabashi K, Nobuko Iizuka N, Okamoto K, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Suematsu N, Yasuda T, Kimura K, Kato T. Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using micro-sieving. HUPO2013, Sep, 2013.
- 9) Ohyama K, Sato T, Arito M, Iizuka N, Omoteyama K, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Kitagawa H, Kato T. A peptide profile of amniotic fluid in a fetal lamb model of gastroschisis. HUPO2013, Sep, 2013.
- 10) Onodera H, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Tanaka Y, Hashimoto T, Kato T. Investigation of effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells. HUPO2013, Sep, 2013.
- 11) Endo W, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Okamoto K, Suematsu N, Omoteyama K, Beppu M, Kato T. Investigation of effects of angiotensinII (ATII) on human articular chondrocytes by proteomic approach. HUPO2013, Sep, 2013.
- 12) Kurokawa MS, Yoshioka T, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a biomarker for Behcet's Disease. American College of Rheumatology. Annual meeting 13, Oct, 2013.
- 13) Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Suematsu N, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. American College of Rheumatology. Annual meeting 13, Oct, 2013.
- 14) 中村洋、高橋謙治、高井信朗、黒川真奈絵、加藤智啓. 変形性関節症の薬物治療. 第41回日本関節病学会、2013年11月.
- 15) Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Oxidative modification in myeloperoxidase in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 16) Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behcet's disease. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。

- 17) 田島佑紗、山田秀裕、山崎宜興、土田興生、永渕裕子、黒川真奈絵、尾崎承一。左心疾患による肺高血圧症を合併した膠原病患者3例の検討。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 18) 表山和樹、佐藤利行、有戸光美、飯塚進子、黒川真奈絵、岡本一起、加藤智啓。ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 の細胞表面タンパク質に対する抗リウマチ薬の影響。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 19) 津野宏隆、末松直也、佐藤利行、有戸光美、飯塚進子、表山和樹、松井利浩、當間重人、岡本一起、黒川真奈絵、加藤智啓。抗リウマチ薬刺激による滑膜肉腫細胞株 SW982 分泌 exosome protein profile の変化の解析。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 20) 小泉英樹、有戸光美、遠藤渉、佐藤利行、黒川真奈絵、表山和樹、飯塚進子、岡本一起、中村洋、別府諸兄、加藤智啓。関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する sulfasalazine と tofacitinib の影響。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 21) 佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、高桑由希子、大岡正道、永井宏平、中村洋、飯塚進子、岡本一起、加藤智啓。関節リウマチにおける糖蛋白質の糖鎖構造の変異。第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月。
- 22) 岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓。ピリドキシンと協調して抗炎症作用を発揮する抗炎症タンパク質 MTI-II を利用した抗炎症剤の開発、日本ビタミン学会第66回大会、2014年6月。
- 23) 有戸光美、小泉英樹、遠藤渉、佐藤利行、黒川真奈絵、表山和樹、岡本一起、末松直也、別府諸兄、加藤智啓。sulfasalazine 及び tofacitinib によるヒト関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する影響。日本プロテオーム学会 2014 年会、2014 年 7 月。
- 24) 黒川真奈絵、野口美和、佐藤利行、永井宏平、有戸光美、末松直也、岡本一起、山口登、加藤智啓。アルツハイマー病の血清におけるフィブリノゲン α 鎖由来ペプチドの上昇。日本プロテオーム学会 2014 年会、2014 年 7 月。
- 25) 表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、岡本一起、末松直也、加藤智啓。網羅的定量的細胞表面タンパク質想定法の薬剤作用機序解明への応用に関する研究。日本プロテオーム学会 2014 年会、2014 年 7 月。
- 26) 岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓。新しいタイプの核内レセプター・コアクティベータ (MTI-II) を利用した NF- κ B 阻害薬の開発。第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月。
- 27) 表山和樹、佐藤利行、有戸光美、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓。サーフェスオミックスを利用したサラズスルファピリジンの作用の解析。第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月。
- 28) 有戸光美、黒川真奈絵、表山和樹、遊道和雄、中村洋、別府諸兄、加藤智啓。ヒト関節軟骨細胞における Layilin を介したシグナルによる炎症因子の誘導。第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月。
- 29) 有戸光美、小泉英樹、遠藤渉、黒川真奈絵、表山和樹、別府諸兄、加藤智啓。

- ヒト関節軟骨細胞における tofacitinib の核酸代謝に対する影響。第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月。
- 30) 内田貞輔、永井宏平、佐藤利行、大岡正道、有戸光美、尾崎承一、黒川真奈絵、加藤智啓。ANCA 関連血管炎における好中球ミエロペルオキシダーゼの酸化修飾。第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月。
- 31) 野澤洋平、有戸光美、黒川真奈絵、大岡正道、表山和樹、加藤智啓。SLE 患者末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルの解析。第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月。
- 32) Suzuki H, Chikada M, Yokoyama M, Kurokawa MS, Furukawa H, Arito M, Miyairi T, Kato T. Aberrant Glycosylation of Lumican in Aortic Valve Stenosis Revealed by a Proteomic Analysis. 23th ASCVTS 2015, May, 2015.
- 33) Kurokawa MS, Suzuki I, Noguchi M, Arito M, Sato T, Omoteyama K, Maedomari M, Hasegawa H, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Yamaguchi N. Serum peptides as candidate biomarkers for dementia with Lewy bodies. 第 11 回日本臨床プロテオーム研究会、2015 年 5 月。
- 34) 岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓。炎症性転写因子 NF- κ B のコリプレッサー MTI-II を利用した抗炎症剤の in vivo 抗炎症効果と副作用。日本ビタミン学会第 67 回大会、2015 年 6 月。
- 35) 有戸光美、黒川真奈絵、大岡正道、表山和樹、加藤智啓。SLE 患者末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルの解析。日本プロテオーム学会 2015 年会、2015 年 7 月。
- 36) 表山和樹、有戸光美、佐藤利行、岡本一起、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓。シェドミクス法の確立に関する研究。日本プロテオーム学会 2015 年会、2015 年 7 月。
- 37) Kurokawa MS, Arito M, Sato T, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Kato T. Serum peptides as candidate biomarkers for dementia with Lewy bodies. 日本プロテオーム学会 2015 年会、2015 年 7 月。
- 38) 黒川真奈絵、有戸光美、加藤智啓。プロテオミクスを用いた RA の病態解析。第 43 回日本関節病学会、2015 年 11 月。
- 39) 岡本一起、佐藤政秋、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道 和雄、加藤 智啓。NF- κ B コリプレッサー (MTI-II) の作用部位を利用した短鎖ペプチド抗炎症薬の In vivo 試験。BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会)、2015 年 12 月。

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

特になし。

国際方式による B 型肝炎母子感染予防効果および 異なる HBV 遺伝子型由来ワクチンの予防効果の検討

研究分担者 乾 あやの 済生会横浜市東部病院 小児肝臓消化器科 部長

研究協力者 小松 陽樹 東邦大学医療センター 小児科 准教授

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 顧問

研究要旨

B 型肝炎母子感染予防措置において、旧厚生省方式から世界標準である新生児期からワクチン接種を開始する国際方式への移行を見据え、旧厚生省方式と国際方式の予防効果を比較検討した。さらに、本邦で使用されている 2 種類の異なる HBV 遺伝子型由来（遺伝子型 A と B）の B 型肝炎ワクチンの互換性を検討した。妊婦の HBe 抗原の有無にかかわらず HBIG を 1 回投与かつ新生児期からワクチン接種を開始する国際方式は、母子感染予防不成功例が 1 例もなく良好な感染予防効果が得られ、旧厚生省方式と同等の効果を示した。遺伝子型が異なるワクチンの母子感染予防効果が疑問視されていたが、HBV キャリア妊婦（遺伝子型 A）と異なる HBV 遺伝子型（遺伝子型 C）のワクチンを用いても母子感染予防は可能であった。さらに、異なる遺伝子型由来のワクチンを 3 回接種の同一スケジュールで混合接種しても、単一遺伝子型ワクチン 3 回接種と同等の HBs 抗体価の上昇が得られ、異なる遺伝子型由来のワクチン混合接種は、単一ワクチン接種と同等の感染予防効果が得られると考えられた。

A. 研究目的

本邦では諸外国と比べ、B 型肝炎ウイルス（HBV）感染予防に関していつかの異なる状況が存在する。まず、母子感染予防措置方法は、本邦と諸外国で HBIG の投与回数とワクチン接種時期に違いがある。諸外国では妊婦が HBs 抗原陽性であれば HBe 抗原の有無に関係なく、出生時に 1 回だけ HBIG の投与を行い、同時に、初回ワクチンを接種し、2 回目が生後 1-2 か月、3 回目が満 1 歳までに実施するスケジュールが一般的である。一方、本邦では 1986 年より HBIG と HB ワクチンによる B 型肝炎母子感染予防措置が開始されたが、諸外国で一般的に行われている国際方式による母子感染予防の効果については不明である。

さらに、本邦では HBV 遺伝子型が異なる HB ワクチンが市販されている。Genotype A (GTA) 抗原由来の HB ワクチンは多数の国や地域で使用され、異なる genotype に対する予防効果は一定の評価が得られている。一方、世界市場における Genotype C (GTC) 抗原由来の HB ワクチンは少数派であり、異なる genotype に対する予防効果のデータは乏しい。従って、母子感染予防において HBV キャリア妊婦の genotype が判明している場合、キャリア妊婦の genotype と一致する HB ワクチンの使用をすべきか明らかではない。また、両方のワクチンを用いた混合接種プロトコールでの感染予防効果は不明である。

本研究の目的は、①国際方式による母子

感染予防の効果、②GTA キャリア妊婦に対する GTC 由来ワクチンの予防効果、③同一スケジュール内で GTA 由来 HB ワクチンおよび GTC 由来 HB ワクチンを組み合わせた接種による感染予防効果、以上 3 点を明らかにすることである。

B. 研究方法

①国際方式による母子感染予防効果

対象：1995 年（HBV 母子感染予防が健康保険適応に移管）以降に HBV キャリア妊婦から出生し接種方法に同意が得られた 119 名に対して国際方式で予防措置を実施した。妊婦の HBe 抗原の有無に関係なく、出生後 12 時間以内に HBIG 200 単位（乾燥 HB グロブリン—ニチャク；日本製薬株式会社）筋注し、①生後 5 日以内、②月齢 1、③月齢 3 に HB ワクチン 5 μ g（ビームゲン；化学及血清療法研究所）を合計 3 回皮下接種するスケジュールを国際方式とした。HBs 抗体価は EIA 法で測定し、HBs 抗体価の測定は月齢 1、ワクチン 3 回目接種から 1 か月後、1 歳、2 歳、3 歳の合計 5 回行った。HBs 抗体価 100 mIU/mL 以上を得た例を HBs 抗体産生良好者 (Good Responder : GR) と定義した。

②GTA キャリア妊婦に対する GTC 由来ワクチンの効果

対象：2007 年から 2012 年までに済生会横浜市東部病院にて HBV 母子感染予防を実施した母子。生後 48 時間以内（国際方式は生後 12 時間以内）に HBIG 200 単位（乾燥 HB グロブリン—ニチャク；日本製薬株式会社）を筋注し、旧厚生省方式では HB ワクチンを月齢 2、3、5、国際方式は日齢 5 以内、月齢 1、3 に接種した。HB ワクチンは GTC 由来のワクチン 5 μ g（ビームゲン）を使用した。HBs 抗体価は原則として月齢 1、ワクチン 3 回接種終了 1 か月後、1 歳、以後 1 年ごとに測定した。HBs 抗体は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA 法）で測定し、2007 年

～2014 年 8 月まではルミパルス II HBsAb（富士レビオ株式会社）、2014 年 8 月以降はルミパルス HBsAb-N（富士レビオ株式会社）を使用した。ワクチン 3 回接種終了 1 か月後の血液検査にて HBs 抗原陰性かつ HBs 抗体陽性を母子感染予防成功と定義した。

③同一スケジュール内で GTA 由来 HB ワクチンおよび GTC 由来 HB ワクチンを組み合わせた接種による HBV 感染の予防効果

対象：2007 年 4 月から 2015 年 5 月までに、済生会横浜市東部病院にて HB ワクチン接種を実施した症例を対象に後方視的に検討した。接種プロトコールは母子感染予防の場合、旧厚生省方式または国際方式を用いた。母子感染予防以外の予防接種スケジュールは 2 回目接種が初回接種から 2 か月後、3 回目接種が初回から 6 か月後の 3 回皮下接種とした。GTA 由来のワクチンはビームゲン、GTC 由来のワクチンはヘプタバックス-II（Merck Sharp and Dohme）を使用した。HBIG は乾燥 HB グロブリン—ニチャク（日本製薬株式会社）を使用した。抗体価は EIA 法で測定し、HBs 抗体価の測定は 3 回接種から 1 か月後、6 か月後および 1 年後の合計 3 回実施した。HBs 抗体価の protective levels と考えられる 100mIU/mL 以上の抗体価を得た例を HBs 抗体産生良好者 (Good Responder : GR) と定義した。

<統計>

2 群間の検定には Mann-Whitney-U test を用いた。統計学的処理は Excel（Microsoft 社）と Stat Mate III（アトムス社）で行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

（倫理面への配慮）

本研究は済生会横浜市東部病院倫理委員会による承認を得ている（倫理委員会承認番号 2015013）。