

## カンボジアにおける妊婦を対象とした肝炎ウイルス母子感染状況把握のための 前向き血清疫学的研究【中間報告】

研究代表者: 田中純子<sup>1,2)</sup>

研究協力者: Bunthen E<sup>1,2)</sup>、KO KO<sup>1,2)</sup>、永島 慎太郎<sup>1,2)</sup>、Serge Ouoba<sup>1,2)</sup>、高橋和明<sup>1,2)</sup>

1)広島大学大学院医系科学研究科 疫学・疾病制御学

2)肝炎・肝癌対策プロジェクト研究センター

### 研究要旨

カンボジア王国において、2016～2017年に国際共同研究のPIとして我々が行なった全国規模の血清疫学調査により、5～7歳の集団ではHBsAgの陽性率は0.56%、その母親集団では4.39%であることを明らかにした。

この全国調査により、5歳以下のHBs抗原陽性率を2018年までに1%以下にするというWHO目標を、カンボジアでは達成したものの、出産可能対象年齢集団のHBsAg陽性率が依然として4%を超え高く、HBV母子感染が高頻度に行き起こることが推察された。このことは、肝炎ウイルス感染の排除をめざしたWHOの2030年の目標達成を阻害する要因となると考えられた。

本研究では、カンボジア王国における妊婦のHIV・梅毒に続くHBVスクリーニングシステムの確立に寄与することを目的とし、同国第二の都市であるSiem Reap州の妊婦を対象に血清疫学的前向きコホート調査を実施した。

- ① Study1: 2020年2月～2020年9月にカンボジア王国シェムリアップ州の3医療機関(Mondule Mouy Health Center、Angkor Chhum Referral Hospital, Siem Reap Provincial Hospital)の産婦人科を受診し、本研究の参加に同意が得られた1,565人の妊婦を対象とした。妊婦検診時に静脈採血、Dried Blood Spot(DBS)検体採取、及びHBsAg Rapid Testを実施し、HBsAg Rapid Test陽性者及び系統抽出法で選択されたコントロール群に対してへの参加を呼び掛けた。
- ② Study-2: Study-1で参加を呼び掛けたもののうちHBsAg陽性群35人、コントロール群80人に対して、出産時の臍帯より採血を行った。その後、HBsAg陽性群とコントロール群両群に対して、児の6か月検診時に、児よりDBS検体を採取する調査を継続中である。

本研究は広島大学疫学研究倫理委員会（第E-1693号）及びカンボジア保健省による承認（223-NECHR）を得て行っている。

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 2020年2月～2020年9月にカンボジア王国シェムリアップ州の3医療機関(Mondule Mouy Health Center、Angkor Chhum Referral Hospital, Siem Reap Provincial Hospital)の産婦人科を受診し、本研究の参加に同意が得られた1,565人（平均年齢：28.3±5.7歳）の妊婦を対象とした。
2. 妊婦集団1,565人の調査登録時のHBsAg陽性は67例(4.28%)であり、中程度(Intermediate: WHO)の感染状況であることが明らかとなった。同集団調査登録時のHBsAb陽性は603例(38.5%)、HBcAb陽性は362例(23.1%)であった。HCV抗体陽性者は8例(0.51%)であった。また多変量解析により、HBV持続感染のリスク低減に有意な項目はHBワクチン接種であることが示唆された。
3. 妊婦集団1,565人のうちHBs抗原陽性であった67例中、Full-Sequenceが得られた37例を含む系統樹解

析からは、当該地域において Genotype C1 が 26 例で dominant であることが示唆された。また、系統樹解析をみるといくつかのクラスターが掲載されており、地域内での連鎖感染の可能性が示唆された。また 11 例は Genotype B と判定され、全例 B/C リコンビナントであった。

4. 調査登録時の HBsAg 陽性 67 例のうち 28 例(41.8%)が HBeAg 陽性であった。対象妊婦集団の平均年齢が 28.3 歳と低いことから、HBe 抗原陽性率が高いことが推測され、HBV 母子感染のリスクも高いことが示唆される。同国においては妊婦の HBV スクリーニングと感染予防的治療「National screening program and prophylaxis treatment among pregnant women」が母子感染予防のために必要であると考えられた。
5. 現在進行中の Study-2 において、HBsAg 陽性群 35 組の 1 組の母児より母の調査登録時 HBsAg 陽性かつ児の 6 か月検診時 HBsAg 陽性が認められた。母の登録時の血清の測定結果では、HBe 抗原陽性かつ高いウイルス量が認められた。今後、母児例から得られた臍帯血の測定等を通してさらに詳しい検討を行う予定としている。一方、コントロール群 80 組の児において、6 か月検診時 HBsAg は全例陰性であった。
6. 以上により、カンボジア王国 Siem Reap 州の妊婦及びその新生児に対する血清疫学調査の結果、妊婦の感染状況及び母子感染の状況が明らかとなり、同国における HBV スクリーニングシステム確立の重要性が明らかとなった。

## A. 研究目的

カンボジア王国において、2016～2017 年に国際共同研究の PI として我々が行なった全国規模の血清疫学調査により、HBsAg の陽性率は 5～7 歳の子供で 0.56%、母親で 4.39%であることを明らかにした。

カンボジアでは、5 歳以下の HBs 抗原陽性率を 2018 年までに 1%以下にするという目標を達成したものの、出産可能対象年齢集団の HBsAg 陽性率が高く、HBV 垂直感染が高頻度に起こることが推察された。このことは、肝炎ウイルス感染の排除をめざした WHO の 2030 年の目標達成を阻害する要因となると考えられた。

カンボジアの保健省は医療施設での出産を促進するための協調的な活動を策定し、JICA の支援を受けた医療従事者による活動を行った結果、現在、妊婦の 84%が医療施設で出産している状況となっている。現在、妊婦の出産前ケアにおけるスクリーニングシステムを確立したが、対象は HIV と梅毒のスクリーニングシステムであり、HBV はまだ含まれていない。

本研究では、カンボジア王国における妊婦の HIV・梅毒に続く HBV スクリーニングシステムの確立に寄与することを目的とし、同国第二の都市である Siem Reap 州の妊婦を対象に血清疫学的前向きコホート調査を実施した。

## B. 対象と方法

### 1. 対象

2020 年 2 月～2020 年 9 月にカンボジア王国シェムリアップ州の 3 医療機関(Mondule Mouy Health Center、Angkor Chhum Referral Hospital、Siem Reap Provincial Hospital)の産婦人科を受診し、本研究の参加に同意が得られた 1,565 人の妊婦を対象とし、Study-1 及び study-2 の血清疫学調査を行った(図 1)。

- ① Study-1:対象者 1,565 人の妊婦検診時に静脈採血、Dried Blood Spot(DBS)検体採取、及び HBsAg Rapid Test を実施した。HBsAg Rapid Test 陽性者 67 人及びコントロール群 135 人に対して Study-2 への参加を呼び掛けた。
- ② Study-2: Study-1 で参加を呼び掛けたもののうち、HBsAg 陽性群 35 人及び系統抽出法によるコントロール群 80 人に対して、出産時の臍帯より採血を行った。児の 6 か月検診時に、児より DBS 検体を採取した。

### 2. 研究方法

対象とする血清、臍帯血、DBS 抽出物を用いて HBV 関連マーカーの測定を行った。また、HBV DNA が検出された検体に関して Sequence 解析と系統樹解析を行った。

### 3. 測定方法

- 1) HBV Rapid Test  
Abbott Determine™ HBsAg II Plus 100 T
- 2) HBV 関連マーカー
  - ① HBsAg(ルミパルス HBsAg-HQ、CLEIA 法、富士レビオ)
  - ② HBs 抗体(ルミパルス HBsAb-N、CLEIA 法、富士レビオ)
  - ③ HBc 抗体(ルミパルス HBcAb-N、CLEIA 法、富士レビオ)
  - ④ HCV 抗体(ルミパルス II オーツ HCV、CLEIA 法、富士レビオ)
  - ⑤ HBeAg(ルミパルス I HBeAg、CLEIA 法、富士レビオ)
  - ⑥ HBe 抗体(ルミパルス HBeAb-N、CLEIA 法、富士レビオ)

### 3) Real-time PCR

試薬：Taqman Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)  
機器：Applied Biosystems StepOne, Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 4) Nested PCR

試薬：PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)  
機器：MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 5) Sequence 解析：Direct Sequence 法

### 6) 系統樹解析：UPGMA 法 (MEGA version 7)

(倫理面への配慮)

この研究は広島大学疫学研究倫理委員会 (第 E-1693 号) 及びカンボジア保健省 (223-NECHR) による承認を得た。

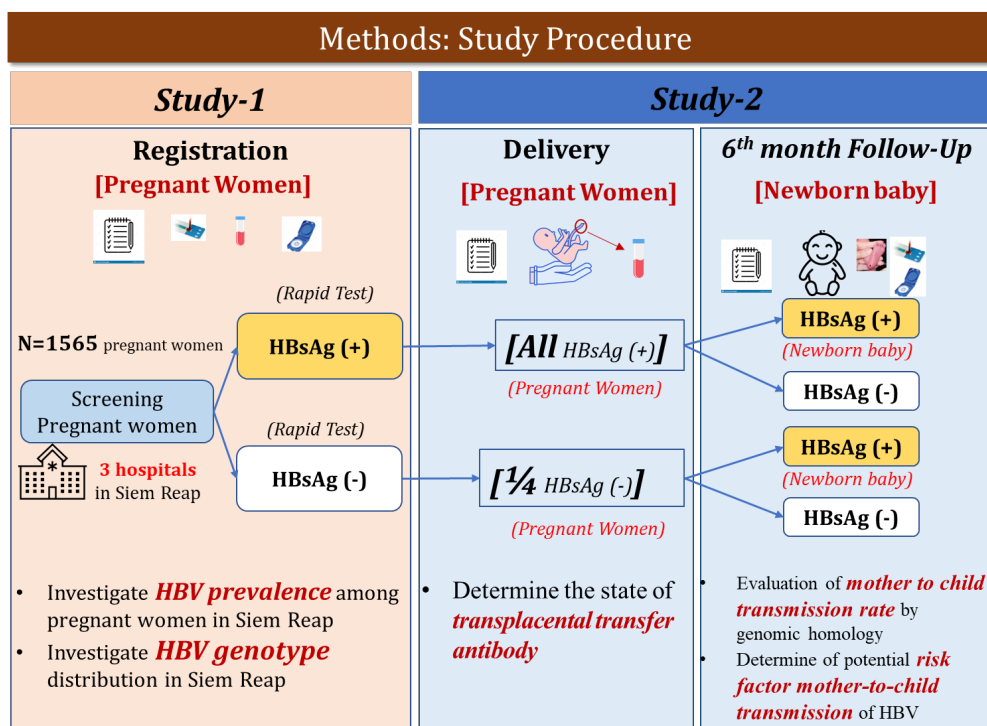


図 1. HBVDNA の Nested PCR・Sequence 解析・系統樹解析のフローチャート

### C. 研究結果

#### 1. 妊婦検診受診者 1,565 人の社会的背景

表 1 に妊婦検診受診者 1,565 人の社会的背景を示す。年齢階級としては、25 歳～34 歳が最も多く 59.5%であり、平均年齢は 28.3±5.7 歳であった。最

終学歴は高校卒業が最も多く、54.8%であった。職業は、自営業が 38.2%と最も多かった。

肝炎感染のリスク行動としては、輸血歴が 2.4%、手術歴が 13%、ピアス歴が 99.4%であった。HB ワクチン接種歴は 15%であった。

2. 妊婦検診受診者 1,565 人の HBV、HCV マーカー測定結果

図 2 に妊婦検診受診者 1,565 人の HBV マーカー及び HCV マーカーの測定結果を示す。

HBsAg 陽性者は 67 例(4.28%)、HBsAb 陽性者は 603 例(38.5%)、HBcAb 陽性陽性者は 362 例(23.1%)

であった。HBsAg 陽性者 67 人の中で 41.8%が HBeAg 陽性であることが示された。HBsAg 陽性者 67 人に対して、HBVDNA 量を測定したところ、12 名が  $10^8$  以上を示すなど、全体としてやや高値に分布していることが分かった。HCV 抗体陽性者は 8 例 0.51%であった。

表 1.カンボジアシェムリアップ州の妊婦 1,565 人の社会的背景

<i>Background characteristic of pregnant women</i>			
Variables	Pregnant Women (N=1565)		
	Frequency	(%)	
<b>Age</b> (mean=28.29 ± 5.67)			
	15-24	408 26.07	
	<b>25-34</b>	931 <b>59.49</b>	
	≥35	226 14.44	
<b>Ethnic</b>			
	Khmer	1561 99.74	
	Other	4 0.26	
<b>Education level</b>			
	≤Primary School	324 20.7	
	<b>High School</b>	857 <b>54.76</b>	
	University	384 24.54	
<b>Occupation</b> (Head of household)			
	Farmer/Fisherman/Labourer	255 16.29	
	Public Officer	217 13.87	
	Privat Company Employee	495 31.63	
	<b>Self-employed</b>	598 <b>38.21</b>	
<b>Number of children</b>			
	<b>1-3</b>	1469 <b>93.87</b>	
	≥4	96 0.13	
<b>Number of family member</b>			
	<b>1-5</b>	1178 <b>75.27</b>	
	6-9	344 21.98	
	>9	43 2.75	
<b>Blood transfusion history</b>			
	No	1527 97.57	
	<b>Yes</b>	38 <b>2.43</b>	
<b>Surgical history</b>			
	No	1361 86.96	
	<b>Yes</b>	204 <b>13.04</b>	
<b>Ear-piercing</b>			
	No	9 0.58	
	<b>Yes</b>	1556 <b>99.42</b>	
<b>HBV vaccination</b>			
	<b>Yes</b>	236 <b>15.08</b>	
	No	1313 83.9	
	Don't know	16 1.02	

## Result: Prevalence of HBV and HCV sero-markers in Pregnant Women in Siem Reap

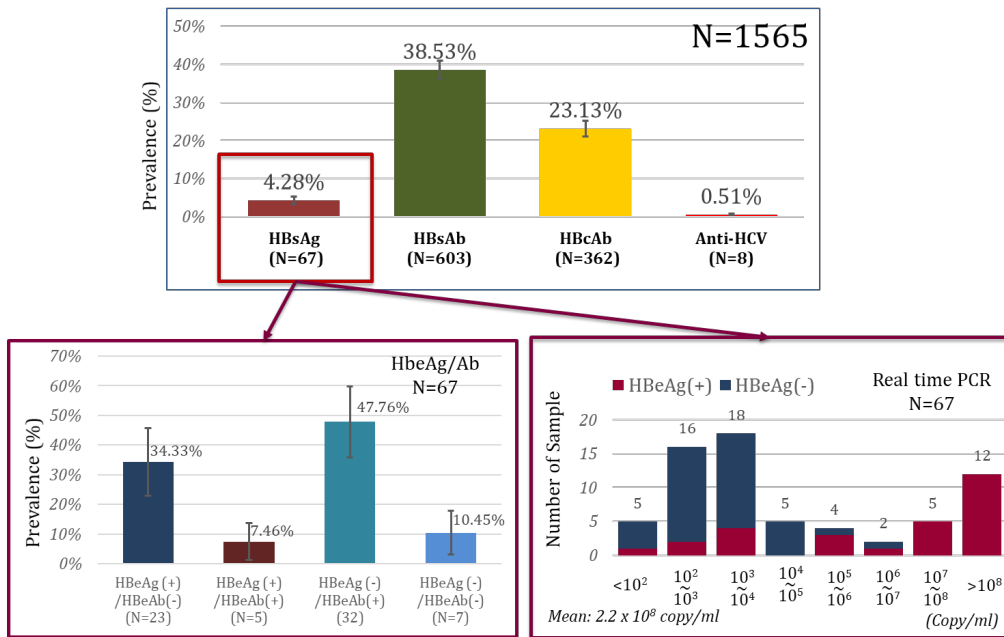


図 2.カンボジアシムリアップ州の妊婦 1,565 人の HBV・HCV 関連マーカー陽性率

### 3. 妊婦検診受診者 1,565 人における HBsAg 陽性のリスク因子

表 2 に妊婦検診受診者 1,565 人の HBsAg 陽性リスク因子について、カイ二乗検定及び多変量解析を行った結果を示す。年齢階級、人種、最終学歴、輸血歴、ピアス歴等の要因は有意差が出なかったのに対し、HB ワクチンの未接種は接種済に対して HBV 持続感染の調整オッズ比 4.44 と高いことから、HB ワクチン接種は感染リスク低減に効果的であることが示唆された。

### 4. 妊婦検診受診者の HBsAg 陽性者 67 人のうち Full-Sequence が可能であった 37 例の系統樹解析

妊婦検診受診者 1,565 人のうち HBsAg が陽性であった 67 人に対して Full-Sequence 解析を試みたところ、37 例の Full-Sequence 決定が可能であった。GISAID より得た既知株との系統樹解析を図 3 に示す。

系統樹解析の結果、Genotype C が 70.3%と当該地域では Dominant であることが明らかとなり、Subtype は全例 C1 であることがわかった。Genotype B は 29.7%であり、Subtype は全例 B4 であり、かつ B/C のリコンビナントであることが明らかとなった。

表 2.妊婦検診受診者 1,565 人における HBsAg 陽性リスク因子の検討

Variables	Chi-Square test (N=1565)			Multi-variable analysis (N=1506)		
	HBsAg+ (n=67)	(%)	p-value	AOR	(95% CI)	p-value
<b>Age</b> (mean=28.29 ± 5.67)						
15-24	15	3.68		1.00	(Reference group)	
25-34	40	4.30	0.622	1.09	0.59-2.06	0.744
≥35	12	5.31		1.64	0.73-3.66	0.231
<b>Ethnic</b>						
Khmer	67	4.29	0.672	-	-	-
Other	0	0		-	-	-
<b>Education level</b>						
≤Primary School	13	4.01		1.00	(Reference group)	
High School	35	4.08	0.758	1.02	0.51-2.03	0.959
University	19	4.95		1.37	0.62-3.04	0.439
<b>Occupation</b> (Head of household)						
Farmer/Fisherman/Labourer	6	2.35		1.00	(Reference group)	
Public Officer	10	4.61	0.318	2.15	0.73-6.31	0.163
Privat Company Employee	26	5.25		2.47	0.96-6.36	0.060
Self-employed	25	4.18		1.94	0.76-4.92	0.166
<b>Number of children</b>						
1-3	63	4.29	0.954	-	-	-
≥4	4	4.17		-	-	-
<b>Number of family member</b>						
1-5	58	4.92	0.066	1.00	(Reference group)	
6-9	9	2.62		0.53	0.26-1.08	0.079
>9	0			-	-	-
<b>Blood transfusion history</b>						
No	65	4.26	0.762	-	-	-
Yes	2	5.29		-	-	-
<b>Surgical history</b>						
No	62	4.56	0.166	1.00	(Reference group)	
Yes	5	2.45		0.50	0.19-1.28	0.148
<b>Ear-piercing</b>						
No	0	0	0.525	-	-	-
Yes	67	4.31		-	-	-
<b>HBV vaccination</b>						
Yes	3	1.27		1.00	(Reference group)	
No	64	4.87	<b>0.029</b>	<b>4.44</b>	1.36-14.49	<b>0.014</b>
Don't know	0	0		-	-	-

# Phylogenetic Tree of Full-Sequence from Siem Reap study and Cambodia study

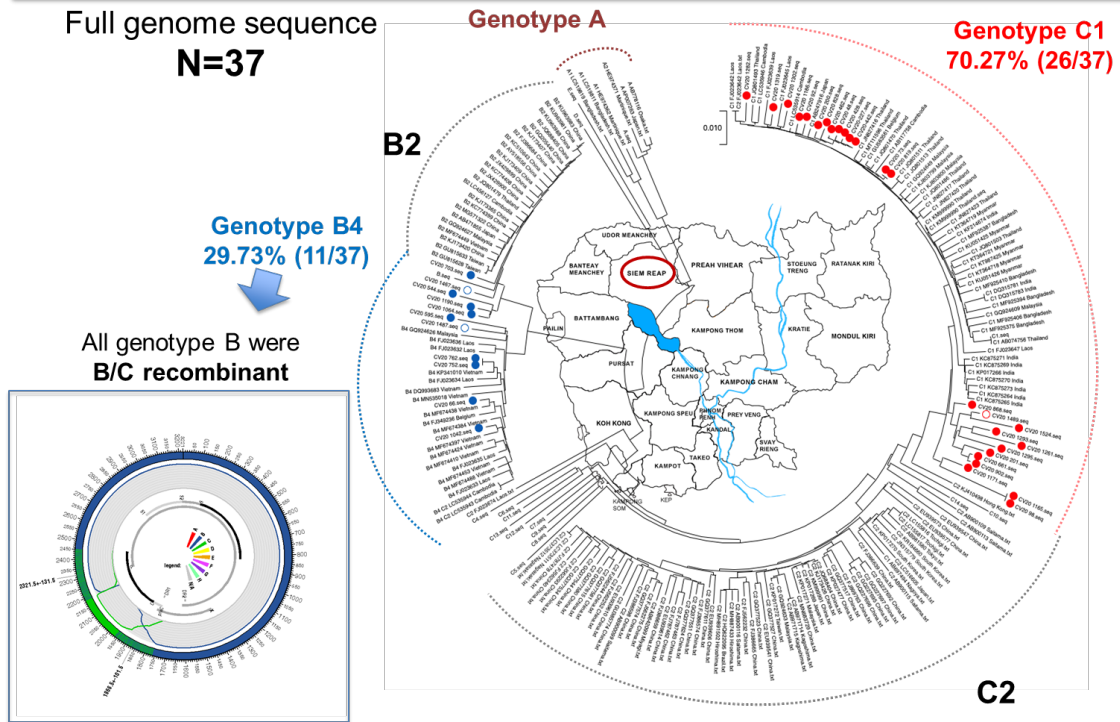


図 3. カンボジア王国 Siem Reap 州の妊婦より得られた HBV Full-Sequence 37 例の系統樹

## 5. カンボジア母子 115 組の垂直感染の検討(中間報告)

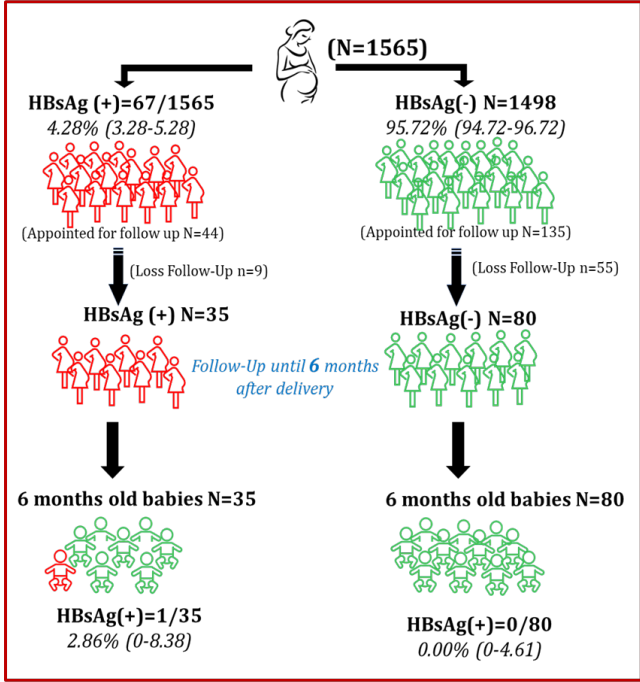
Study-2 における検体の収集状況と HBV 母子感染状況について検討した結果を図 4 に示す。HBsAg 陽性者 67 人に本研究への継続参加を呼び掛けたところ、35 人が新生児の 6 か月検診時に参加した。35 人の新生児のうち、HBsAg 陽性者は 1 人であった。一方、HBsAg 陰性者のうち、ランダム選択された 135 人に参加を呼び掛けたところ、80 人が新生児の 6 か月検診時に参加した。80 人の新生児のうち、HBsAg 陽性者は 0 人であった。

HBsAg 陽性群の 1 組の母児より母の調査登録時 HBsAg 陽性かつ児の 6 か月検診時 HBsAg 陽性が認められた。図の右側に母児の社会的背景及び HBV 関連検査の測定値を示す。母は 30 歳で HBeAg 陽性、ウイルス量  $5.90 \times 10^8$  コピー/mL とウイルス量の高い個人であることがわかつ

た。以上のことから、母子垂直感染であることが示唆された。しかし、新生児に関しては、帝王切開での出産、バースドーズを含めた 4 回ワクチン接種完了であることも分かった。今後さらに詳細な解析を進め、検討していく方針としている。一方、コントロール群 80 組の児において、6 か月検診時 HBsAg は全例陰性であった。

## Mother to Child Transmission (Ongoing Investigation)

115 pregnant women & their new-born babies were followed up until 6 months after delivery



<b>Mother of positive Child</b>	
Age	30
Vaccine Status	No
HBsAg	Positive
HBeAg	Positive
HBeAb	Negative
HBV DNA level	5.90 x 10 <sup>8</sup> Copy/ml
Genotype	B4

<b>HBsAg(+) Child</b>	
Gender	Female
Gestational	39 weeks
Delivery Type	Caesarean Section
HBIG (24h)	Yes
HepB Vaccine	Birth dose +3 boosters
HBsAg	Positive (rapid test*)

\*Abbott Determine™ HBsAg II Plus 100 T

図 4.カンボジア母子 115 組の母子垂直感染の検討



#### D. 考察および結論

1. 2020年2月～2020年9月にカンボジア王国シムリアップ州の3医療機関(Mondul Mouy Health Center、Angkor Chhum Referral Hospital, Siem Reap Provincial Hospital)の産婦人科を受診し、本研究の参加に同意が得られた1,565人(平均年齢:  $28.3 \pm 5.7$  歳)の妊婦を対象とした。調査登録時に得られた血清に対し測定を行ったところ、HBsAg陽性者は67例(4.28%)であり、WHO中程度(Intermediate: WHO分類)の感染状況であることが明らかとなった。HBsAb陽性者は603例(38.5%)、HBcAb陽性陽性者は362例(23.1%)であった。Siem Reap州の妊婦1,565人を対象とした本調査によって、HBsAg陽性率がまた、多変量解析により、HBワクチン接種がHBV持続感染のリスク低減に効果的であることが示唆された。HCV抗体陽性者は8例(0.51%)であった。
2. Full-Sequenceが得られた37例を含む系統樹解析からは、当該地域においてGenotype C1が26例でdominantであることが示唆された。また、いくつかのクラスターが認められ、地域内での感染が示唆された。また、Genotype Bと判定された11例は全例B/Cリコンビナントであることも明らかとなった。
3. HBsAg陽性67例の41.8%がHBeAg陽性であった。対象妊婦集団の平均年齢が低いため、HBe抗原陽性率が高く、垂直感染のリスクも高いことが示唆される。同国において「National screening program and prophylaxis treatment among pregnant women」が母子感染予防のために必要であると考えられた。
4. HBVの母子垂直感染例が1例で認められ、母のHBe抗原陽性及び高いウイルス量の例として認められた。本母子例から得られた臍帯血の測定等を通してさらに詳しい検討を行う予定としている。

以上により、カンボジア王国 Siem Reap 州の妊婦及びその新生児に対する血清疫学調査の結果、妊婦の感染状況及び母子感染の状況が明らかとなり、同国における HBV スクリーニングシステム確立の重要性が明らかとなった。

#### E 健康危険情報

特記事項なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

