

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09701

研究課題名(和文) HBV母子感染予防不成功例におけるS抗原変異株のminor clone の解析

研究課題名(英文) Evaluation of the escape mutant of the hepatitis B virus as a minor strain in mother-to-child transmission

研究代表者

小松 陽樹 (KOMATSU, Haruki)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：80424711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HBワクチンやHBIGが接種されていないHBVキャリアの約10%にG145R変異株がminor cloneとして存在し、HBeAgと高ウイルス量がG145R変異株出現に関連していた。母子感染予防不成功例では、G145R変異株が24%の高頻度で存在し、一部ではmajor cloneとして存在する症例もあった。HBIGやHBワクチンによる免疫学的圧力がG145R変異株出現率を上昇させたと予想されるが、HBeAg陽性かつ高ウイルス量の症例が多いこともG145R変異株の高い出現率と関連した可能性はある。HBVキャリア妊婦も約10%においてG145R変異株はminor cloneとして存在していた。

研究成果の概要(英文)：The frequency of the G145R mutant as a minor as well as major strain was approximately 25% in children who were infected due to immunoprophylaxis failure. HBeAg positivity and high viremia were closely related to the detection of the G145R mutant as a minor population in patients without a history of HB vaccinations, HBIG, or antiviral treatment. Although the G145R mutant as a minor population was detected in pregnant women who were HBeAg-positive and had a high viral load, none of the infants born to the mothers infected with the G145R mutation showed breakthrough infection. Thus, the pre-existence of the G145R mutation as a minor population in mothers does not always cause immunoprophylaxis failure after birth. However, treatment with nucleotide analogues for HBV carrier pregnant women, based on an HBeAg-positive status and the level of HBV DNA, should be encouraged to reduce the risk of breakthrough infection.

研究分野：小児感染症

キーワード：B型肝炎ウイルス 母子感染 ワクチン HBIG S抗原 変異株 minor clone 予防不成功

1. 研究開始当初の背景

(1)1986年から始まった厚生省「B型肝炎母子感染防止対策事業」により、B型肝炎ウイルス(HBV)による母子感染は激減した。しかし、この抗HBs免疫グロブリン(HBIG)とHBワクチンを用いたHBV母子感染の感染阻止率は約90%であり、約10%において母子感染が成立する(breakthrough infection)。感染予防措置を施行したにもかかわらず母子感染が成立する(breakthrough infection)要因としては、胎内感染や不適切な予防措置などに加えて、中和抗体である抗HBs抗体から逃避するエスケープ変異株(S抗原変異株)の出現が報告されている[1]。

(2)通常、HBVは変異を持たない株と変異を持つ株が混在している。母子感染予防不成功例の約10-20%に変異株が検出されるが、これらはサンガー法(従来までの塩基配列解析方法)で検出できる多数派株(major clone)である。しかし、サンガー法では検出できない少数株(minor clone)として存在する変異株と母子感染予防成功の有無との関連は明らかではない。特に高ウイルス量の場合は、少数株であってもS抗原変異株の臨床的な意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的はminor cloneとして存在するS抗原変異株がB型肝炎母子感染予防のbreakthrough infectionに関与しているか否かを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)対象は2007年から2015年までの間、東邦大学佐倉病院小児科及び済生会横浜市東部病院小児肝臓消化器科にてフォローされていたHBVキャリア患者である。そして、HBVキャリア患者をHBワクチンやHBIGを投与された既往がないB型肝炎持続感染者(A群)、母子感染予防不成功例(B群)およびHBVキャリア妊婦(C群)に分類した。A群とB群は後方視検討、C群は前方視検討である。

(2)患者血清からHBV DNAを抽出した。その後、抽出したHBV DNAを用いてconventional PCR[2]とサンガーシーケンス及びLocked Nucleic Acids (LNA) probeを組み合わせたreal-time PCR法にて、G145R変異株(nucleotide position at 587: G A)を検出した。Real time PCRのprimer(2組)とLNA probeは以下のような配列である[3]。Forward 1: CCATGCAAGACCTGCA (nt 512-527), reverse 1: GATGATGGGATGGGAATACA (nt 599-618); (amplicon size: 111 bp), forward 2: CTCTTGTGCTGTACAAAACC (nt 559-579), reverse 2: AGGCCCACTCCCATAG (nt 638-653); (amplicon size 99 bp), LNA-based probes (nt 582-591) Probe-G (wild-type sequence); 5'-FAM-CGGACGGAAA-IBFQ-3',

Probe-A (mutant-type sequence); 5'-HEX-CGGACAGAAA-IBFQ-3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). LNA塩基は下線部と太字で示した。さらにLNA probe PCR陽性例に対して共通抗原決定領域を含むHBs抗原の遺伝子配列のdeep sequencing(Roche GS junior sequencer)を実施した[3]。

4. 研究成果

(1) 研究結果

HBワクチンやHBIGを投与された既往がないB型肝炎持続感染者(A群:126例, M=53, 年齢1-50歳, median 17歳, genotype A=1, B=15, C=110, HBV DNA: 2.1-9 log copies/mL, median 5.3, HBeAg陽性=75) 母子感染予防不成功例(B群:25例, M=11, 年齢1-13歳, median 5歳, genotype B=1, C=24, HBV DNA: 2.5-9 log copies/mL, median 8.5, HBeA陽性=22)およびHBVキャリア妊婦(C群:31例, 年齢21-39, median 31歳, HBV DNA: 2.1-9 log copies/mL, median 4.6, HBeA陽性=14)が対象となった。

LNA probe PCR法にてA群では13例(10.3%), B群では6例(24%)においてG145R変異株が検出された。A群陽性例では全例G145Rはminor cloneとして存在していたが、B群陽性例では6例中2例においてG145Rはmajor cloneであった。HBeAg陽性、血中HBV DNA量高値は有意にG145R出現と関連していた。

A群にてLNA probe PCR陽性だった13例中7例に対してdeep sequencing実施し(総リード数3,434-10,048)G145R変異出現頻度は0.25%-4.10% (median 1.11%)であった。一方、B群LNA probe PCR陽性例ではG145Rがmajor cloneではない4例に対してdeep sequencingを実施し(総リード数7,164-18,523)、G145R変異出現頻度は0.54%-6.58% (median 0.76%)であった。LNA probe PCR陰性群18例に対してdeep sequencing施行したが、G145Rのクローン数は10以下であり頻度を0.1%以上示した例はなかった。

C群では妊婦31例中4例(12.9%)がLNA probe PCR陽性を示し、全例G145Rはminor cloneであった。LNA probe PCR陽性妊婦は全例HBeAg陽性、HBV DNA量は7.8 log copies/mL以上であり、1例は第1子がG145R変異株出現を伴う母子感染予防不成功例であった。PCR陽性妊婦4例から出生した児において、出生後3回ワクチン接種終了までフォロー可能であった児は2例であり、2例とも3回ワクチン接種後のHBsAgは陰性であった。

HBワクチンやHBIGが接種されていない

HBV キャリアの約 10%に G145R 変異株が minor clone として存在し、HBeAg と高ウイルス量が G145R 変異株出現に関連していた。母子感染予防不成功例では、G145R 変異株が 24%の高頻度で存在し、一部では major clone として存在する症例もあった。HBIG や HB ワクチンによる免疫学的圧力が G145R 変異株出現率を上昇させたと予想されるが、HBeAg 陽性かつ高ウイルス量の症例が多いことも高い出現率と関連した可能性はある。PCR の結果は deep sequencing のデータと相関した。HBV キャリア妊婦も A 群同様に約 10%において G145R 変異株は minor clone として存在していた。幸いにも 3 回ワクチン接種終了後までフォロー可能だった 2 例は感染予防が成功しており、妊婦の G145R 変異株は必ずしも母子感染予防不成功の原因にはならないと考えられた。

(2) 成果の位置づけ

海外では、高ウイルス量の妊婦は HBV 母子感染予防の breakthrough infection のリスク因子と考えられており、妊婦の変異株の有無は調べられていないが、妊娠後期に核酸アナログが投与されている[4,5]。本研究から、本邦では妊婦を含めて HBV キャリアの約 10%に G145R 変異株が存在していることが明らかとなった。G145R の存在は HBe 抗原陽性または高ウイルス量と相関していた。つまり、高ウイルス量の妊婦は G145R 変異株を有する確率が高い。妊婦の G145R の存在が必ずしも児の breakthrough infection を生じさせる訳ではないが、児の感染リスクを増加させる。今回は G145R を タ - ゲットにして解析したが、S 抗原変異株は G145R 以外も存在する。本研究は新たな HBV 母子感染予防戦略に資するデータとなる。

(3) 今後の展望

海外の HBV 母子感染予防プロトコールでは、妊娠中期に妊婦のウイルス量を測定し、高ウイルス量の場合には妊婦に対して核酸アナログを投与する。本邦ではウイルス量に加えて、遺伝子変異を同定できる PCR または次世代シーケンシングを用いた HBV 遺伝子解析にて妊婦スクリーニングを行い、S 抗原変異株が検出された場合は、妊婦に対する核酸アナログ投与を考慮する。費用対効果が未解決であるが、キャリア妊婦の HBV ウイルスの量と質の評価を行い、breakthrough infection を確実に防ぐことが可能となる。

<引用文献>

Hsu HY, et al. (1997) Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* (Baltimore, Md) 26: 786-791.

Komatsu H, et al. (2012) Hepatitis B surface gene 145 mutant as a minor

population in hepatitis B virus carriers. *BMC research notes* 5: 22.

Komatsu H, et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One*. 2016;11:e0165674.

European Association for the Study of the Liver (2012) EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 57: 167-185.

Terrault NA, et al. (2016) AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 63: 261-283.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

乾 あやの, 藤澤 知雄, 小松 陽樹. わが国における HB ワクチン使用の現状と展望. *Mebio*. 35 巻 Page88-95. 2018. 査読無し.

Komatsu H, et al. Pediatric hepatitis B treatment. *Ann Transl Med*. 2017;5:37. doi: 10.21037/atm.2016.11.52. 査読有り.

Tsunoda T, Inui A, Iwasawa K, Oikawa M, Sogo T, Komatsu H, et al. Acute liver dysfunction not resulting from hepatitis virus in immunocompetent children. *Pediatr Int*. 2017;59:551-556. 査読有り. doi: 10.1111/ped.13249.

小松 陽樹, 他. 急性肝炎. *小児科*. 58 巻 Page1519-1522. 2017. 査読無し

小松 陽樹, 他. ウイルス性肝炎. *小児内科*. 49 巻 Page1629-1633. 2017. 査読無し.

乾 あやの, 藤澤 知雄, 小松 陽樹. HB ワクチンの定期接種化. *医学のあゆみ*. 262 巻 Page1353-1358. 2017. 査読無し.

乾 あやの, 小松 陽樹, 藤澤 知雄. 定期接種化となった B 型肝炎ワクチン. *小児看護* 40 巻 Page564-567. 2017. 査読無し.

小松 陽樹, 他. B 型肝炎ウイルス再活性化. *小児科*. 58 巻 Page27-34. 2017. 査読無し.

Komatsu H, et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One*. 2016;11:e0165674.

doi:10.1371/journal.pone.0165674. 査読有り.

Komatsu H, Inui A. Chronic hepatitis B in children in the United States and Canada: international origins place the disease burden on children even in the era of universal vaccination.

- Transl Pediatr. 2016;5:1-4. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.12.08. 査読有 .
小松 陽樹,他. 異なる HBV 遺伝子型由来の HB ワクチンを組み合わせた予防接種効果. 小児感染免疫. 28 巻 Page179-183. 2016. 査読有 .
 乾 あやの, 小松 陽樹,他. B 型肝炎ワクチン定期接種化に期待すること .小児科. 57 巻 Page1101-1106. 2016. DOI : 10.18888/J00639.2016357541. 査読無し .
小松 陽樹,他. トランスアミナーゼと病態 感染症 . 小児内科 . 48 巻 Page843-845. 2016. 査読無し .
 乾 あやの, 小松 陽樹,他. B 型肝炎ユニバーサルワクチネーションに向けて. 臨床消化器内科. 31 巻 Page339-344. 2016. DOI : 10.19020/J01937.2016206717. 査読無し .
 乾 あやの, 小松 陽樹, 他 . B 型肝炎ワクチン 定期接種化へ向けて. 小児科診療. 79 巻 Page517-521. 2016. 査読無し .
Komatsu H, et al. Lack of infectivity of HBV in feces from patients with chronic hepatitis B virus infection, and infection using chimeric mice. BMC Res Notes. 2015;8:366. doi: 10.1186/s13104-015-1337-z. 査読有 .
Komatsu H, et al. Hepatitis B virus infection in children. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;13:427-50. doi: 10.1586/14787210.2015.1019867. 査読有 .
 Iwasawa K, Inui A, Tsunoda T, Kondo T, Kawamoto M, Sogo T, Komatsu H, Fujisawa T. Hepatitis B (HB) immunoglobulin plus HB vaccine for intrauterine HB virus infection. Pediatr Int. 2015;57:401-5. 査読有 . doi: 10.1111/ped.12528.
Komatsu H, et al. Transmission route and genotype of chronic hepatitis B virus infection in children in Japan between 1976 and 2010: A retrospective, multicenter study. Hepatol Res. 2015;45:629-37. doi: 10.1111/hepr.12396. 査読有 .
 乾 あやの, 小松 陽樹, 他 . 小児 B 型慢性肝炎に対する IFN 療法 . 日本臨床 . 73 巻増刊 9 新ウイルス性肝炎学 Page685-691. 2015. 査読無し .
 21 小松 陽樹, 他 . Genotype A の B 型肝炎ウイルスキャリア妊婦に対する genotype C 由来の抗原を用いた HB ワクチンの母子感染予防効果. 肝臓 56 巻 Page675-677. 2015. DOI : 10.2957/kanzo.56.675. 査読有 .
 22 乾 あやの, 小松 陽樹, 他 . B 型肝炎ワクチン 定期接種化に向けて. 小児科臨床. 68 巻 Page2631-2635. 2015. 査読なし .
 23 小松 陽樹, 他 . 感染症に対する医療費助成 . 小児内科 . 47 巻 Page1187-1190. 2015. 査読無し .
 24 乾 あやの, 小松 陽樹. B 型肝炎 . メディカル朝日 .44 巻 7 号 Page26-27. 2015. 査読無し .
 25 乾 あやの, 角田 知之, 十河 剛, 小松 陽樹, 他 . 肝炎ウイルス感染症 . 小児内科. 47 巻 Page582-585. 2015. 査読無し .
- 〔学会発表〕(計 2 件)
Komatsu H, et al. Evaluation of the G145R mutant of the hepatitis B virus as a minor strain in mother-to-child transmission. 34th European Society for Paediatric Infectious Diseases. 2016. (国際学会)
小松陽樹, 乾あやの, 藤澤知雄 . B 型肝炎母子感染における G145R 変異株 minor clone の検討第 52 回日本肝臓学会総会 . 2016 年 .
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
 なし
- 取得状況 (計 0 件)
 なし
- 〔その他〕
 ホームページ等
 なし
- 6 . 研究組織
 (1) 研究代表者
小松 陽樹 (KOMATSU, Haruki)
 東邦大学・医学部・准教授
 研究者番号 : 80424711
- (2) 研究分担者
館野 昭彦 (TATENO, Akihiko)
 東邦大学・医学部・教授
 研究者番号 : 10138993
- (3) 連携研究者
 なし ()
 研究者番号 :
- (4) 研究協力者
乾 あやの (INUI, Ayano)