

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08451

研究課題名(和文) 感染症診断の新しいアプローチ B型肝炎ウイルス感染における爪と毛髪の有用性の検討

研究課題名(英文) A novel approach for the diagnosis of hepatitis B virus infection using nails and hair

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染症における爪と毛髪の有用性を明らかにすることである。慢性B型肝炎患者71名が本研究に参加した。爪と毛髪からDNAを抽出し、real-time PCRにてHBV DNAの定量を実施した。爪検体の93%、毛髪検体の82%がHBV DNA陽性であった。毛髪と爪のHBV DNA量は有意な相関関係を示した。爪検体の59%からHBs抗原が検出された。爪と毛髪から抽出したHBV DNAを用いて系統樹解析を実施し、塩基配列は血液検体と高い相同性を示した。【結論】爪と毛髪は血液と同様に診断や感染源の同定に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療資源が限られている国や地域ではB型肝炎ウイルス(HBV)感染の検査が受けられない場合も少なくない。血液はさまざまな病原体を含む検体であり、保存状態も制約を受けるため検査検体として扱いに注意を要する。爪や毛髪は高度にケラチン化された生体試料であり、疫学的には感染源とは考えられていない。感染性が低く、取り扱いが容易な検体を用いたHBV感染の診断方法が開発できれば、医療資源が限られている地域に対して貢献できる。また、国内でも血液検体を得られずHBV感染源特定が困難な場合、爪・毛髪は感染源特定の有用な試料となり得る。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) is detected in extrahepatic tissues of individuals with HBV infection. Whether nails and hair contain HBV has been unknown. Methods: We examined patients with chronic HBV infection. HBV DNA in the patients' fingernails and hair were measured by real-time PCR. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) of fingernails was evaluated by an enzyme immunoassay. Immunochemical staining was performed on nails. Results: Of those 70 nail samples, 65 (93%) were HBV DNA-positive. Of the 60 hair samples, 49 (82%) were HBV DNA-positive. The nail HBV DNA level was significantly higher than the hair HBV DNA level. The nails and hair HBV DNA levels were correlated ($r=0.325$, $p<0.05$). A phylogenetic tree analysis of the complete genome sequence of HBV isolated from nails and hair identified the infection source. HBsAg was detected in the nails by immunochemical staining. Conclusions: Nails and hair were the reservoir of HBV DNA. Moreover, nails can contain HBsAg.

研究分野：感染症

キーワード：B型肝炎ウイルス HBV DNA 爪 毛髪 HBs抗原 系統樹解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) B型肝炎ウイルス(HBV)は世界の3人に1人は感染既往または持続感染しており、HBV感染の撲滅は世界規模の重要な課題である。通常、HBV感染は血液を用いて血清学的あるいは核酸増幅法にて診断される。しかし、また、血液はさまざまな病原体の感染性を含む検体であり、冷蔵施設など保存状態や輸送にも制約を受けるため、医療資源に乏しい地域では検査検体として扱いにくい。

(2) 爪や毛髪は主成分はケラチンであり、化学的・物理的に安定した生体試料である。従来から、爪や毛髪はその特殊性から微量元素の測定や法医学分野でのDNA遺伝子解析の試料として用いられている。例えば、爪や毛髪の微量元素の測定は、重金属による環境汚染・体内暴露の把握、公衆衛生としての栄養状態の指標、口腔がんや乳がんのスクリーニングなどに役立ってきた[1-3]。さらに、「爪の郵送」による糖尿病スクリーニングを目指して爪の糖化蛋白を測定し、その有用性を示した報告もある[4]。感染性が低く、取り扱いが容易な検体を用いたHBV感染の診断方法が開発できれば、医療資源が限られている地域に対して貢献できる。また、爪や毛髪は代謝動態が血液と異なるため、HBV病態解明に新しい展開をもたらす可能性がある。しかし、HBV感染と爪との関係を調べた報告はNishiyoriら[5]以外ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HBV感染症における爪と毛髪の有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)【対象患者】HBVキャリア71例(男22例、女49例、年齢：中央値18歳)から爪と毛髪の組み合わせた検体を収集した。さらに、デルタ肝炎ウイルス(HDV)と重複感染しているHBVキャリア15例(モンゴル人 男7例、女8例、年齢：中央値54歳)から爪検体を収集した。

(2)【HBV DNA、HDV RNAの抽出と測定】爪と毛髪のHBV DNAを抽出は爪・毛髪専用のDNA抽出試薬(DNA Extractor FM Kit, WAKO)にてDNAを抽出した。HDV RNAは爪組織を融解させた後にRNA抽出試薬(Direct-zol RNA Mini Prep, Zymo Research)を用いて抽出した。DNAとRNAを抽出後、real-time PCR法にてHBV DNAとHDV RNA量を測定した。同時に内部コントロールとしてアクトチンのDNAをreal-time PCR法で測定した。

(3)【HBVとHDVの分子系統樹解析】遺伝子解析はダイレクトシーケンス法で実施した。HBV及びHDV全塩基配列を決定した後、分子系統樹解析を実施した。

(4)【HBs抗原測定】爪に対してトリプシンが含まれた培養細胞剥離剤(TrypLE Select Enzyme10X, Thermo Fisher Scientific)を加えて、爪表面からHBs抗原を剥離させて、HBs抗原を高感度法(ルミパルスHBsAg-HQ)にて測定した。

(5)【免疫電子顕微鏡】HBs抗原が検出された爪の溶出液に対し、HBs抗体を用いて免疫電顕を行った。

(6)【爪の免疫組織染色】HBV抗原が爪に含まれてことを証明するため、HBs抗体、HBc抗体、HDV抗体を用いて爪の免疫組織染色を実施した。

(7)【ヒト肝細胞キメラマウスによる感染実験】ヒト肝細胞を有するキメラマウスを用いて爪の溶解液の感染性を検証した。

4. 研究成果

(1) HBVキャリア71例から爪と毛髪の組み合わせた検体を収集した。71例の血中HBV DNA量は中央値が >9.0 Log copies/mLであった。爪は70例(99%)、髪は60例(85%)が $-actin$ DNA陽性であった。HBV DNAは $-actin$ DNA陽性の爪70例中65例(93%)、 $-actin$ DNA陽性の髪60例中49例(82%)が陽性であった。爪と髪のHBV DNA量の中央値はそれぞれ 5.0 ($3.0-6.9$) log copies/mLと 4.3 ($2.3-5.8$) log copies/mLであった。爪と髪のHBV DNA量は有意な相関を示した($r=0.325$, $P<0.05$) (図1)。血清HBV DNA高値例に爪・髪のHBV DNA陽性例が多かった。

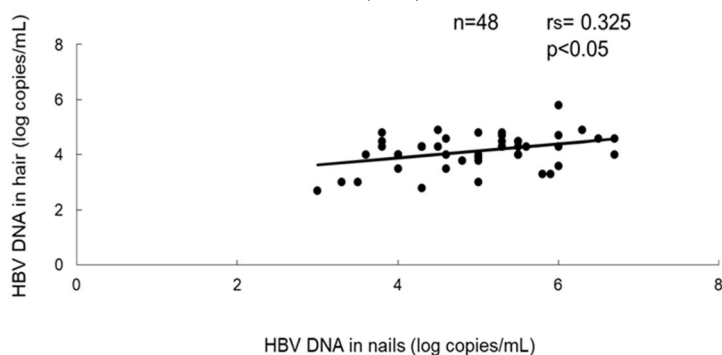


図1 爪と毛髪のHBV DNA量の関係

しかし、血液 HBV DNA は爪や毛髪の HBV DNA 量と有意な相関は示さなかった (図 2、 図 3)。

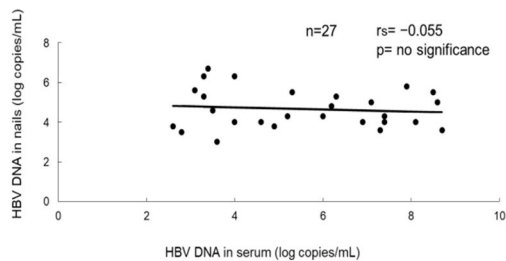


図 2 血液と爪の HBV DNA 量の関係

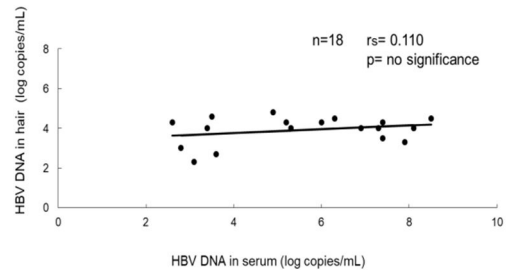


図 3 血液と毛髪の HBV DNA 量の関係

(2) 64 例の爪検体を用いて HBsAg を測定し、38 例 (59%) が 陽性であった (0.005-1.630 IU/mL, 中央値: 0.0465 IU/mL)。しかし、爪の HBsAg の有無は爪の HBV DNA の有無とは相関しなかった。

(3) インターフェロンや核酸アナログなどの抗ウイルス治療により、血液 HBV DNA 量が低下すると、爪や毛髪の HBV DNA 量は減少する傾向が見られた (図 4)。

(4) HDV との重複感染者 15 例から爪検体を収集した。15 例全例が HBe 抗体陽性者であり、血中 HBV DNA 量は中央値が 2.6 Log copies/mL、HDV RNA 量は中央値が 5.9 Log IU/mL であった。爪から HBV DNA および HDV RNA が検出された例は、それぞれ 15 例中 2 例 (3.3 Log copies/mL, 4.0 Log copies/mL) および 3 例 (5.0 Log copies/mL, 6.7 Log copies/mL, 6.7 Log copies/mL) であり、両者が同時に検出された例は 1 例のみであった。HBs 抗原は 15 例中 8 例で爪から検出された (0.006-0.034 IU/mL, 中央値 : 0.021 IU/mL)。

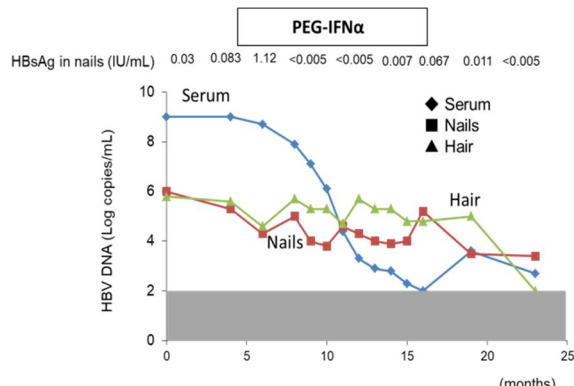


図 4 抗ウイルス治療による HBV DNA 量の推移

(5) 爪と髪から抽出した HBV DNA (母子感染例の 4 組から得られた爪、毛髪、血液の合計 18 検体) を用いて HBV 全遺伝子配列を決定し、分子系統樹解析を実施した。母子の爪や毛髪から得られた HBV DNA の遺伝子配列は、血液検体と高い相同性を示し、爪や毛髪が血液検体同様に感染経路の同定に有用であることを示した。同様に、分子系統樹解析は爪から得られた HDV RNA も感染源同定に有用であることを示した。

(6) 爪を用いた免疫組織染色にて HBsAg (図 5) と HDV 抗原 (図 6) を検出できたが、HBcAg は検出できなかった。



図 5 爪の免疫染色 (HBs 抗原)



図 6 爪の免疫染色 (HDV 抗原)

(7) 免疫電顕では多数の HBV 小形粒子を観察できたが、Dane 粒子は観察されなかった。

(8) 爪の溶出液 (HBV DNA : 4.8 Log copies/mL, HBsAg: 0.1 IU/mL) を濾過滅菌してキメラマウス 2 匹に静脈投与したが、感染は成立しなかった。

【結論】爪や髪はHBV DNA やHBsAg の reservoir であり、診断や疫学データの集積に有用な生体試料となる。爪に感染性はないと考えられた。

<引用文献>

1. He K. Trace elements in nails as biomarkers in clinical research. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(1):98-102.
2. Rodrigues EG, Kile M, Dobson C, Amarasiriwardena C, Quamruzzaman Q, Rahman M, et al. Maternal-infant biomarkers of prenatal exposure to arsenic and manganese. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2015;25(6):639-48.
3. Kishabongo AS, Katchunga P, Van Aken EH, Speeckaert MM, Lagniau S, Husein D, et al. Glycated nail proteins: a new approach for detecting diabetes in developing countries. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2014;19(1):58-64.
4. Bengtsson CF, Olsen ME, Brandt LO, Bertelsen MF, Willerslev E, Tobin DJ, et al. DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. *Annals of anatomy*. 2012;194(1):17-25.
5. Nishiyori A, Fukuda K, Sata M, Tanikawa K. HBV DNA can be detected from nail clippings of HBs Ag positive patients. *The Kurume medical journal*. 2000;47(1):95-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komatsu Haruki, Tamaki Kazutomo, Hirabayashi Masaaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Cytomegalovirus DNA in the nails of an infant diagnosed with a congenital cytomegalovirus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics & Neonatology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pedneo.2020.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Haruki, Inui Ayano, Yoshio Sachiyo, Fujisawa Tomoo	4. 巻 22
2. 論文標題 Pharmacotherapy options for managing hepatitis B in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 449 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14656566.2020.1841165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Haruki, Klenerman Paul, Thimme Robert	4. 巻 50
2. 論文標題 Discordance of hepatitis B vaccination policies for healthcare workers between the USA, the UK, and Germany	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 272 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Komatsu Haruki, Inui Ayano, Suzuki Yasuto, Sugiyama Masaya, Fujisawa Tomoo	4. 巻 19
2. 論文標題 Deep sequencing of hepatitis B surface antigen gene in the preserved umbilical cords in immunoprophylaxis failure against mother-to-child HBV transmission	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-019-4624-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小松陽樹	4. 巻 42
2. 論文標題 B型肝炎 ワクチンの開発と導入の歴史	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 123 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Haruki Komatsu
2. 発表標題 Novel approach for the diagnosis of chronic hepatitis B virus infection using nails and hair
3. 学会等名 第36回欧州小児感染症学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス感染に対する爪と毛髪を用いた新しい診断アプローチ
3. 学会等名 第22回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	舘野 昭彦 (Taneno Akihiko) (10138993)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	星野 廣樹 (Hoshino Hiroki) (90810531)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	乾 あやの (Inui Ayano)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
モンゴル	National Center for Communicable Disease			