

令和元年6月10日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10070

研究課題名(和文) 小児HBVキャリアーにおけるHBV遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of HBV genes in pediatric HBV carriers

研究代表者

伊藤 孝一 (Ito, Koichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00444977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HBe Seroconversion(SC)が確認された小児HBVキャリアーを対象にHBV遺伝子解析を実施した。8例中2例(25%)でプレコア領域の変異(G1896A)を認めた。コアプロモータ領域の変異は認めなかった。SC後は全例が無症候性キャリアとなった。また、HBs抗体エスケープ変異株による家族内感染が疑われた1家系(3例：母、姉、弟)において、HBV遺伝子解析を実施した。3例全てで、HBV遺伝子にG145R、P120Q変異を認め、HBs抗体エスケープ変異株の感染であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少数での解析であるが、小児のHBVキャリアーにおいてはコア領域、コアプロモータ領域の変異の頻度は、成人より少ない。成人と小児におけるこの差はホストの免疫状態の違いによると考えられた。日本国内において、HBs抗体エスケープ変異株による家族内感染の存在がされた。HBs抗体エスケープ変異株は通常の母子感染予防処置プロトコルでは感染予防・診断が困難と考えられ、その対策が必要である。

研究成果の概要(英文)：HBV gene analysis was performed on pediatric HBV carriers with confirmed HBe Seroconversion (SC). Mutation of the precore region (G1896A) was observed in 2 of 8 cases (25%). No mutation was found in the core promoter region. All patients became asymptomatic carriers after SC. In addition, HBV gene analysis was performed in one family (3 cases: mother, sister, younger brother) suspected to be infected within the family by the HBs antibody escape mutant. In all three cases, G145R and P120Q mutations were found in the HBV gene, and it was confirmed that this was an infection with the HBs antibody escape mutant.

研究分野：小児肝臓学

キーワード：小児 B型肝炎 遺伝子変異 エスケープ変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎診療における、HBVの遺伝子解析の重要性が明らかになってきている。さまざまなHBV遺伝子変異と、HBs抗体エスケープ変異ウイルス、肝細胞癌、劇症肝炎、などとの関係が示されており、抗ウイルス治療の際に出現する薬剤耐性ウイルスの存在も問題となっている。HBVの母子感染を防ぐため、HBVキャリア母から出生した児に対してHBグロブリンとHBワクチンによる予防処置がなされると、約95%は感染予防が可能とされる。しかし、我々の研究グループは母子感染予防処置後の検査でHBs抗原陰性で、予防成功と考えられた乳児の血清中から、Nested PCR法を用いてHBV DNAが検出されることを、世界に先駆けて報告した。その後、この現象はOccult HBV感染という概念として認知され、Occult HBV感染の一部はHBV遺伝子のS領域の変異によるHBs抗体エスケープ変異ウイルスによって起こることが分かってきた。一方で、HBe抗原セロコンバージョンと関連があるとされるコアプロモーター・プレコア領域の変異は6歳未満の小児では少ないことを我々研究グループは報告した。

2016年には本邦において、HBVワクチンが定期接種化された。HBVの水平感染を予防することで、患者数の減少が期待される一方、ワクチンの選択圧によってHBs抗体エスケープ変異株の増加が懸念される。国内でのHBs抗体エスケープ変異株の存在に関する調査は必須と考えられる。また、HBeセロコンバージョンの前後では、プレコア領域およびコアプロモーター領域の変異株が増殖することが知られている。母子感染例の多くが、小児・若年成人期にHBeセロコンバージョンがみられることから、小児例を対象にHBV遺伝子解析することは、予後予測の点でも有用と考えられる。

2. 研究の目的

- 1) 小児HBVキャリアを対象にHBeセロコンバージョンの前後でのプレコア領域およびコアプロモーター領域の変異頻度を明らかにする。
- 2) 小児HBVキャリアを対象にHBs抗体エスケープ変異株の存在頻度を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 小児HBVキャリアを対象として、血清中のHBV遺伝子解析を実施し、HBeセロコンバージョンの前後でのプレコア領域およびコアプロモーター領域の変異を明らかにする。
- 2) 臨床的にHBs抗体エスケープ変異株による家族内感染が疑われる家系(母、姉、弟)を対象に血清中のHBV S領域の遺伝子解析を行いHBs抗体エスケープ変異株の存在を明らかにする。

【対象1】1983年～2008年の期間中に名古屋市立大学病院を定期受診され、期間中にHBeセロコンバージョンが確認された小児B型慢性肝炎患者。

【対象2】臨床的にHBs抗体エスケープ変異株の感染が疑われた小児例とその家族。

【方法】特異度の高いプライマーを用いてB型肝炎ウイルス遺伝子のうちプレコア、コアプロモーター、S領域をPCR法にて増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

4. 研究成果

【結果1と考察】期間中にHBeセロコンバージョンが確認された小児B型慢性肝炎患者は8例(男4、女4)。ジェノタイプAが2例、Cが5例、Dが1例。全ての患者は臨床的に母子感染と診断された。6例は無治療・自然経過で、2例はインターフェロンを用いた治療後にHBeセロコンバージョンがみられた。各患者の保存された血清のうち、最も古い時点、HBeセロコンバー

ジョン直前、直後と、最も新しい時点、の計4点の検体を解析対象とした。フォローアップ開始年齢は1歳3ヶ月~11歳11ヶ月で、フォローアップ期間は平均3.0年であった。8例中2例(25%)でプレコア領域の変異(G1896A)を認めた。コアプロモーター領域の変異は認めなかった(図1)。

図1 小児HBVキャリアにおけるプレコアおよびコアプロモーター領域の変異

Case	genotype	sex	HBcrAg	HBV load	A1762	G1764	G1896	セロコンからの時間
1	D	Male	619200	4.8 × 10 ⁹	-	-	-	2Y4M before
			53300	7.0 × 10 ⁷	-	-	-	1M before
			328	6.5 × 10 ³	-	-	-	1M after
2	C	Female	143800	1.6 × 10 ⁹	T	A	R	1Y1M before
			126690	1.2 × 10 ⁹	T	A	R	7M before
			93380	1.1 × 10 ⁹	T	A	A	3M after
			235.2	1.4 × 10 ⁸	T	A	R	3Y1M after
小児経口感染例								
3	A	Male	45773	-	-	-	-	2Y3M before
			90	1.8 × 10 ³	-	-	-	2M before
			67.4	2.4 × 10 ³	-	-	-	3M after
4	C	Male	24596	1.9 × 10 ⁷	W	R	R	1Y5M before
			6280.3	4.0 × 10 ⁸	T	A	R	6M before
			7.9	陽性(定量不可)	T	A	-	1Y 6M after
5	C	Female	20704	-	-	-	-	10M before
			1217.5	3.2 × 10 ⁹	W	R	-	1M before
			73.5	6.5 × 10 ³	W	R	R	1M after
IFN治療例								
6	C	Female	151760	5.5 × 10 ⁷	-	-	-	10M before
			166	9.5 × 10 ⁸	-	-	-	1M after
7	A	Male	160065	1.2 × 10 ⁹	-	-	-	6Y before
			10688	4.0 × 10 ⁷	-	-	-	1Y 6M before
			1183	2.0 × 10 ⁹	-	-	-	7M after
IFN・小児経口感染例								
8	C	Female	40400	-	T	A	-	2Y10M before
			66660	3.5 × 10 ⁷	T	A	-	2M before
			164	1.0 × 10 ⁹	T	A	-	3M after

セロコンバージョンの時期を示す

W = T or A
R = A or G

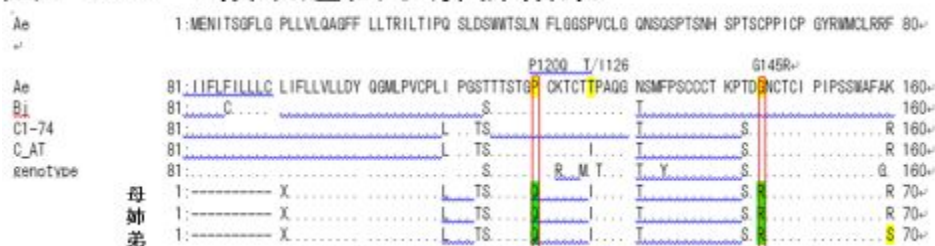
SC後は全例が無症候性キャリアとなった。少数での解析であるが、小児のHBVキャリアにおいてはコア領域、コアプロモーター領域の変異の頻度は、成人より少ない。成人と小児におけるこの差はホストの免疫状態の違いによると考えられた。

【結果2と考察】HBs抗体エスケープ変異株による家族内感染が疑われた家系(母、姉、弟の3例)のHBV遺伝子解析を実施。症例(弟)の臨床経過の概要を以下に記す。

【症例】2歳男児【家族歴】母、姉がHBVキャリア【経過】HBVキャリア母体(HBe抗原陽性)から自然経膈分娩で出生し、同日HBIGと、HBVワクチン接種を受けた。その後、総計3回のHBVワクチン接種を受けた。9ヶ月時、HBs抗原陰性、HBs抗体 1000 mIU/mL。1歳6ヶ月時、HBs抗原陰性、HBs抗体 333.8 mIU/mL。2歳8ヶ月時、HBs抗原陽性、HBs抗体 115.6 mIU/mL、ALT 12 IU/l、HBe抗原陽性、HBe抗体陽性、Hbc抗体陽性、HBV DNA 3.5LogIU/mL。

遺伝子解析結果(図2) : S領域にG145R、P120Q変異を認めた。母、姉にも同じ変異を認めた。

図2 HBV S領域遺伝子解析結果



【考察・結論】G145R、P120Q 変異は HBs 抗体エスケープとなる変異であることが過去に報告されている。HBs 抗体エスケープ変異株による家族内感染であることが示された。HBs 抗体エスケープ変異株は通常の母子感染予防処置プロトコールでは感染予防が困難で、感染診断も困難である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Wakano Y, Sugiura T, Endo T, Ito K, Suzuki M, Tajiri H, Tanaka Y, Saitoh S. Antiviral therapy for hepatitis B virus during second pregnancies. J Obstet Gynaecol Res.2018.44,p.566-569 査読有
- (2) 伊藤孝一. 【産婦人科医が身につけたい新生児の診察法】 母児感染.周産期医学. 2018,48,p.991-994. 査読無
- (3) Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K, Negishi Y, Kudo T, Ito R, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Saitoh S. Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing. J Pediatr. 2016,171,p.171-177. 査読有
- (4) Ito S, Hayashi H, Sugiura T, Ito K, Ueda H, Togawa T, Endo T, Tanikawa K, Kage M, Kusahara H, Saitoh S. Effects of 4 phenylbutyrate therapy in a preterm infant with cholestasis and liver fibrosis. Pediatr Int. 2016,58(6).p.506-509 査読有
- (5) Kawase K, Sugiura T, Nagaya Y, Yamada T, Sugimoto M, Ito K, Togawa T, Nagasaki R, Kato T, Kouwaki M, Koyama N, Saitoh S. Single nucleotide polymorphisms in AGTR1, TFAP2B, and TRAF1 are not associated with the incidence of patent ductus arteriosus in Japanese preterm infants. Pediatr Int.2016,58(6),p.461-466. 査読有
- (6) 河寄 翔太, 杉浦 時雄, 遠藤 剛, 伊藤 孝一, 加藤 丈典, 齋藤 伸治. B型肝炎ウイルス母子感染予防の新方式は周知されているか? 日本周産期・新生児医学会雑誌. 2016,52(3),p.874-878. 査読有
- (7) 大江 雅美子, 杉浦 時雄, 遠藤 剛, 伊藤 孝一, 齋藤 伸治. 高ウイルス量妊婦へのテノホビル投与によるB型肝炎ウイルス母子感染予防. 日本周産期・新生児医学会雑誌.2016,52(1),p.165-168. 査読有
- (8) 伊藤孝一. 【周産期医学必修知識第8版】 新生児編 高直接ビリルビン血症.周産期医学.2016,46増刊,p.728-731. 査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) Koichi Ito. DIRECT HYPERBILIRUBINEMIA SHORTLY AFTER BIRTH IS ASSOCIATED WITH CONGENITAL HEART DISEASE. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2018. 2018年10月25 - 27日 Hollywood,USA

- (2) 太田隆徳, 伊藤孝一. 2歳で診断された HBs 抗体エスケープ変異株による HBV 母子感染の一例. 第 35 回 日本小児肝臓研究会 2018 年 7 月 14~15 日 仙台
- (3) 伊藤孝一. 先天性心疾患児における生後早期の胆汁うっ滞. 第 121 回日本小児科学会学術集会 2018 年 4 月 20~22 日 福岡
- (4) 杉浦時雄, 伊藤孝一, 齋藤伸治, 田中靖人, 他. 高ウイルス量妊婦への核酸アナログ投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. 第 272 回日本小児科学会東海地方会 2018 年 2 月 12 日 津
- (5) T. Sugiura, K. Ito, S. Saitoh, et al. ANTIVIRAL THERAPY DURING PREGNANCY SUCCESSFULLY PREVENTED MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HEPATITIS B VIRUS INFECTION. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Annual Meeting. 2017 年 11 月 1~4 日 Lasvegas, USA
- (6) Shogo Ito, Koichi Ito, Takeshi Endo, Tokio Sugiura, Yasuhito Tanaka, Shinji Saitoh. OCCULT HEPATITIS B VIRUS INFECTION IN CHILDREN BORN TO HEPATITIS B VIRUS MOTHERS AFTER PASSIVE-ACTIVE IMMUNOPROPHYLAXIS IN JAPAN. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Annual Meeting. 2017 年 11 月 1~4 日 Lasvegas, USA
- (7) Koichi Ito, Shigeru Honda, Takeshi Endo, Takao Togawa, Tokio Sugiura, Shinji Saitoh. Bilateral hypoplasia of the internal carotid artery in two Japanese patients with Alagille syndrome. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology Hematology and Nutrition. 2016 年 10 月 5~8 日 Motreal, Canada
- (8) Shota Kawasaki, Koichi Ito, Takeshi Endo, Tokio Sugiura, Yoshishige Miyake, Shinji Saitoh. Successful pegylated interferon therapy for chronic hepatitis B in 5-year-old child patient. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology Hematology and Nutrition. 2016 年 10 月 5~8 日 Motreal, Canada
- (9) Tokio Sugiura, Shota Kawasaki, Koichi Ito, Takeshi Endo, Takenori Kato, Shinji Saitoh. Implementation of a new protocol to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection in Japan. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology Hematology and Nutrition. 2016 年 10 月 5~8 日 Motreal, Canada
- (10) 若野 泰宏, 杉浦時雄, 遠藤 剛, 伊藤孝一, 齋藤伸治, 田中靖人, 高野 智子, 田尻 仁, 鈴木 光幸. 高ウイルス量妊婦への核酸アナログ投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2016 年 9 月 16 日~18 日 つくば
- (11) 河崎 翔太, 杉浦時雄, 遠藤 剛, 伊藤孝一, 加藤 丈典, 齋藤伸治. B型肝炎ウイルス

母子感染予防の新方式は周知されているか? 第43回日本小児栄養消化器肝臓学会 2016年9月16日~18日 つくば

(12)伊藤 孝一, 遠藤 剛, 戸川 貴夫, 杉浦 時雄, 三宅 能成, 齋藤 伸治. ペグインターフェロン治療中にHBe抗原セロコンバージョンが得られたB型慢性肝炎5歳例. 第119回日本小児科学会学術集会 2016年5月13日~15日 札幌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 齋藤伸治

ローマ字氏名: Saitoh Shinji

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00281824

研究分担者氏名: 杉浦時雄

ローマ字氏名: Sugiura Tokio

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 10381881