

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015  
課題番号：25461625  
研究課題名(和文) 小児のoccult HBV感染の病態解明と感染予防への応用  
  
研究課題名(英文) Occult HBV infection in children  
  
研究代表者  
伊藤 孝一 (ITO, KOICHI)  
  
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
  
研究者番号：00444977  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【研究の背景と目的】母子感染によるOccult HBV感染は十分な調査がなされていない。本研究の目的は母子感染によるOccult HBV感染の頻度を明らかにすること。【方法】HBVキャリア母から出生した児の血清からDNAを抽出し、Real-time PCR法を用いてHBV DNAの検出を試みた。【結果】対象67例のうち、HBc抗体陽性者は45例(67%)。HBc抗体陽性者のうち、26例でReal-time PCRを実施し、7例(27%)でHBV DNAが検出された。DNA量は微量であり、その解釈には慎重を要する。Occult HBV感染の正確な実態解明のために更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：【Background/Aims】Presence of occult HBV infection in HBV vaccinated children remains largely unknown. The aim of this study was to investigate the prevalence of occult HBV infection among HBV vaccinated children in Japan. 【Methods】HBsAg negative sera from vaccinated children were enrolled. The titers of HBV DNA were determined by Real-time PCR. 【Results】Anti-HBc was detected in 45 (67%) children. Among these, 26 subjects were analyzed by Real-time PCR. Seven out of 26 (27%) subjects were HBV DNA positive. The titers of HBV DNA were so low that the results need to be interpreted carefully. To clarify the precise prevalence of occult HBV infection in children, further study is needed.

研究分野：肝臓

キーワード：HBV 小児 母子感染 ワクチン

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Occult HBV 感染は血清中に HBs 抗原が陰性であるにも関わらず、肝組織中に HBV が持続感染している状態のことをいい、肝組織または血清中から低濃度の HBV DNA が検出されることで診断される。HBV の感染後の治癒過程において、血清中の HBs 抗原が陰性化しても肝組織には増殖可能な HBV が存在することが明らかになっている。近年、Occult HBV 感染が関与する以下の病態が知られるようになった。

HBs 抗原陰性かつ Hbc 抗体陽性ドナーからの生体肝移植においてレシピエントに高率に発生する B 型肝炎。

HBV 再活性化による肝炎発症。HBs 抗原陰性患者に対して免疫抑制・化学療法を行うことで HBV が増殖し、重篤な肝炎を発症することがある。

Occult HBV キャリアによる輸血後 B 型肝炎。低濃度の HBV を保有する HBs 抗原陰性の献血者から輸血を受けることで、輸血後 B 型肝炎を発症しうる。

(2) HBV の感染経路として母子感染は主要なものであり、本邦では感染予防策として HBV キャリア母から出生した児に対して抗 HBs 人免疫グロブリン (HBIG) と HB ワクチンが投与されている。しかし、母子感染防止処置を完遂しても 5% 程度は母子感染が成立する。母子感染による Occult HBV 感染については十分な調査がなされていないが、従来から、母子感染予防成功とされてきた例の一部で、HBs 抗原陰性だが Hbc 抗体が持続陽性となることがしばしば経験されている。また、母子感染予防処置を実施した乳児の血清中から、PCR 法を用いて高頻度に HBV DNA が検出されることも報告されている。したがって、数多くの Occult HBV 感染が見逃されている可能性がある。

(3) 近年の測定技術の進歩により、微量な HBV DNA および HBs 抗原の測定が可能になった。Real-Time PCR 法は十分な感度があり、低濃度の HBV を保有する Occult HBV キャリアを診断可能である。また、超高感度 HBs 抗原測定法 (検出感度 0.0005 IU/ml) も開発されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は HBV キャリアの母から出生した小児における Occult HBV 感染の頻度を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HBV キャリア母から出生し、適切な母子感染予防処置 (HBIG と HB ワクチン) が投与され、2004 年～2015 年に名古屋市立大学病院小児科にて血液検査が実施され、保護者の同意のもとに血清が保存された児を対象とした。HBs 抗原陽性例は除外した。診療録を用いて Hbc 抗体陽性者を抽出した。なお、Hbc 抗体測定法について、2004 年～2010 年は

CLEIA 法 (抑制率で表記) 2011 年～2015 年は CLEIA 法 (C.O.I で表記) で測定された。

(2) HBV DNA の検出

Hbc 抗体陽性者の血清から DNA を抽出し、以下の解析を行った。

HBV DNA 定量: Real-time PCR 法 (TaqMan PCR 法)

HBV DNA 発現: PCR 法

解析プロトコール

DNA 抽出

抽出キット (スマイテスト EX-R&D (MBL)) を用いて添付文書の手順に従って DNA を抽出した。血清 60 μl から DNA を抽出し、ペレットを蒸留水 15 μl に溶解した。

HBV-DNA 定量

Eagle Taq Master Mix with ROX (Roche) を用いて TaqMan PCR を行った。用いたプライマーおよびプローブは以下のものである。

F-Primer: HBV-166-F21 (HBSF1)

5'-CACATCAGGATTCCTAGGACC-3'

R-Primer: HBV-344-R20 (HBSR)

5'-AGGTTGGTGAGTGATTGGAG-3'

Probe: HBV-242-F26FM (HBSP1)

FAM-5'

CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC-3'

-TAMRA

Standard mode、以下のプログラムで行った。

		45cycles		
50	95	95	60	4
2:00	10:00	0:15	1:00	∞

HBV フラグメント解析

ウイルス量が 3.0 log copies/ml 未満の場合は、200 塩基対程度の非常に短い範囲を増幅するプライマーを使い、Hemi-Nested PCR を行った。Reagent として AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (ABI-ThermoFischer) を使用した。用いたプライマーは以下のものである。

[1st]

F-Primer: HBSF2

5'-CTTCATCCTGCTGCTATGCCT-3'

R-Primer: HBSR2

5'-AAAGCCCAGGATGGGAT-3'

\*1st PCR で増幅が不十分な場合のみ、さらに 2nd PCR を行った。用いたプライマーは以下のものである。

[2nd]

F-Primer: HBSF2

5'-CTTCATCCTGCTGCTATGCCT-3'

R-Primer: HBSR3

5'-CCANGATGATGGGATGGGAATAC-3'

以下のプログラムで行った。

	50cycles		
95	95	62	4
10:00	0:15	0:30	∞

電気泳動で増幅を確認後、cycle sequence 反応を行い、sequencer で解析した。Reagent

は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた。

### (3) 超高感度 HBsAg 測定

シスメックス社の HISCL 2000i を使用して超高感度 HBsAg 測定( 検出感度 0.0005 IU/ml ) を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) HBc 抗体陽性者の頻度

対象 67 例(男 41 女 26)のうち、HBc 抗体陽性者は 45 例( 67%;男 29 女 16 )。HBc 抗体陽性の定義は抑制率 50%以上または C.O.I 1.0 以上とした。

### (2) HBc 抗体陽性者の背景因子と臨床的特徴

HBc 抗体陽性時の年齢

1 歳未満 : 37 例

1 歳 : 10 例

2 歳以上 : 7 例

母体の HBe 抗原

陽性 : 9 例

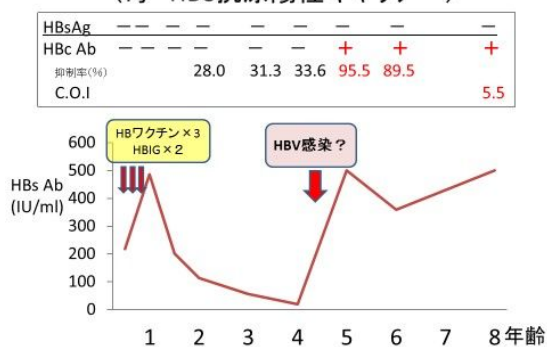
陰性 : 26 例

不明 : 10 例

HBc 抗体価の経時的推移

HBc 抗体価は経年的に低下する傾向を認めたが、1 例において、5 歳時に再上昇がみられた。HBs 抗体価も同時に再上昇していることが確認され、Occult HBV 感染が疑われた。図にその臨床経過を示す。

図 Occult HBV 感染が疑われた 1 例  
(母 HBe 抗原陽性キャリアー)



\*HBc 抗体価は以下の通りであった。

1 歳:HBc 抗体 陰性( 32.7% 抑制率)

2 歳:HBc 抗体 陰性( 28.6% 抑制率)

3 歳:HBc 抗体 陰性( 31.3% 抑制率)

4 歳:HBc 抗体 陰性( 33.6% 抑制率)

5 歳:HBc 抗体 陽性( 95.5% 抑制率)

6 歳:HBc 抗体 陽性( 89.5% 抑制率)

8 歳:HBc 抗体 陽性( 5.5 C.O.I )

### (3) HBV DNA 解析

HBc 抗体陽性者のうち、抑制率 90%以上または C.O.I. 10.0 以上または増加傾向を示す 26 例( 男 15 女 11 )を対象に Real-time PCR を実施した。年齢分布は以下の通り。

1 歳未満 : 21 例

1 歳 : 3 例

2 歳以上 : 2 例

7 例( 27% )で HBV DNA が検出された。DNA 量が微量であり、現在のところシーケンスには至っていないため、慎重に解釈する必要がある。今回の結果からは Occult HBV 感染の正確な頻度を明らかにすることは困難であった。さらなる研究が必要である。

表 Occult HBV 感染が疑われた 1 例における  
Real-time PCR 法および超高感度 HBs Ag 測定結果

年齢	1	2	4	5	6
ALT (IU/l)	19	15	17	14	27
HBs Ag	-	-	-	-	-
HBc 抗体判定	-	-	-	+	+
HBc 抗体抑制率(%)	32.7	28.0	33.6	95.5	89.5
HBs 抗体価 (mIU/ml)	487	114	19	500	359
HBV DNA (Real-time PCR法)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
超高感度 HBs Ag	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
ND*: 検出感度以下					

### (4) HBc 抗体の再上昇がみられた 1 例についての詳細調査

1、2、4、5、6 歳時の血清を用いて HBV Real-time PCR と超高感度 HBsAg 測定を実施した。全ての検体において、Real-time PCR 法での HBV DNA は検出感度以下、超高感度 HBsAg 測定法も検出感度以下だった( 表 )。

本例は Occult HBV 感染の定義を満たさないが、HBc 抗体と HBs 抗体の推移からは 4 歳から 5 歳にかけて HBV 感染があったことが示唆された。直近の HBs 抗体価が減衰していた( 19.9mIU/ml )ことと、母の HBe 抗原が陽性で高ウイルス量であったことが、感染の要因として考えられた。母児感染予防策として、出生直後に HBIG と HB ワクチン投与するのみでなく、HBs 抗体価を一定以上に維持することも重要であることが示唆された。

## 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 7 件 )

(1) 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. The Journal of Pediatrics、査読有、171、2016、171-177  
DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.01.006

(2) Ito S, Hayashi H, Sugiura T, Ito K, Ueda H, Togawa T, Endo T, Tanikawa K, Kage M, Kusuhara H, Saitoh S. Effects of 4-phenylbutyrate therapy in a preterm infant with cholestasis and liver

fibrosis. *Pediatrics International*, 査読有、2016

DOI:10.1111/ped.12839.

(3) 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. *Pediatrics International*. 査読有、2015  
DOI: 10.1111/ped.12861.

(4) Sato N, Sugiura T, Nagasaki R, Suzuki K, Ito K, Kato T, Inukai S, Saitoh S. Effects of tolvaptan on congestive heart failure complicated with chylothorax in a neonate. *Pediatrics International*. 査読有、57(5) 2015、1020-1022.  
DOI: 10.1111/ped.12697.

(5) Bando Y, Nakagawa M, Ito K, Ozawa Y, Sakurai K, Shimohira M, Shibamoto Y. Horseshoe lung associated with left lung hypoplasia: Case report and systematic review of the literature. *Polish Journal of Radiology*. 査読有、80 2015、464-469  
DOI: 10.12659/PJR.894445

(6) Kei Ohashi, Koichi Ito, Takeshi Endo, Tokio Sugiura, Risa Awaya, Tatenobu Goto, Yoshiaki Nagaya, Hiroko Ueda, Rika Nagasaki, Takenori Kato, Shinji Saitoh. Viral load before and after exchange transfusion in a neonate with hyperbilirubinemia and congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Case Reports*. 査読有、4:343、2014  
DOI:10.4172/2165-7920.1000343

(7) Sugiura T, Endo T, Ito K, Goto K, Sato Y, Kondo S, Suzuki T, Hashimoto T. Recurrent Cholangitis with Congenital Hepatic Fibrosis and Pancreaticobiliary Maljunction after Roux-en-Y Reconstruction. *European Journal of Pediatric Surgery Reports*. 査読有、1(1) 2013、43-45  
DOI: 10.1055/s-0033-1341420.

〔学会発表〕(計 8件)

立川雅美子、杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝二、齋藤伸治、田中靖人. 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、第119回日本小児科学会学術集会、2016年5月14日、「ロイトン札幌(北海道・札幌)」

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、「さつばる芸文館(北海道・札幌)」

伊藤孝一、遠藤剛、戸川貴夫、杉浦時雄、齋藤伸治. de novo B型肝炎予防のためにエンテカビルを使用した腎芽腫の女児例、第32回日本小児肝臓研究会、2015年7月25日、「鳥取大学医学部(鳥取県・米子)」

杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝一. 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51回日本周産期・新生児医学会学術集会、2015年7月10日、「ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡)」

杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝一. 疫学からみたウイルス肝炎対策 当県におけるB型肝炎ウイルス母子感染予防の実態とキャリア妊婦の頻度、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月21日、「ホテル日航熊本(熊本県・熊本)」

杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝一. 第一子でB型肝炎ウイルス母子感染が成立した母親に対する次子妊娠時の周産期管理、第59回日本未熟児新生児学会・学術集会、2014年11月10日、「ひめぎんホール(愛媛県・松山)」

伊藤孝一、遠藤剛、杉浦時雄、齋藤伸治. 小児のOccult HBV感染の実態調査、第41回日本小児栄養消化器肝臓学会、2014年10月12日、「東京ステーションコンファレンス(東京)」

杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝一、高野智子、田尻仁、田中靖人. 治療困難例に対する抗ウイルス療法(透析、HIV合併、肝移植後、小児例を含めて) HBV母子感染ハイリスク妊婦へのラミブジン投与、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29日、「ホテルニューオータニ(東京)」

〔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) 研究代表者

伊藤 孝一 (ITO, Koichi)

名古屋市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00444977

(2)研究分担者

杉浦 時雄 (SUGIURA Tokio)  
名古屋市立大学・医学研究科・講師  
研究者番号：10381881

(3)連携研究者

田中 靖人 (TANAKA Yasuhiro)  
名古屋市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90336694