

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0262

研究課題名（和文）SDGs目標のウイルス肝炎排除を目指したアジア地域の共同開発研究

研究課題名（英文）Joint development research in the Asian region aiming at eliminating viral hepatitis, SDG's target

研究代表者

田中 純子（Junko, Tanaka）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：70155266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、カンボジアにおいて同国保健省、産科医療機関、WHO等と協力し、妊婦およびその出生児を対象とした血清疫学調査を実施、同国のHBV感染排除戦略立案に資する基礎資料を提示した。1,565人の妊婦が調査に参加し、HBs抗原陽性率は4.3%（95%CI：3.4-5.4%）、HBV遺伝子型は、C1が70.3%と最多であった。HBs抗原陽性の妊婦から出生した児35人のうち、1人（2.9%、Birth dose含むHBワクチンとHBIG投与済）がHBs抗原陽性であった。なお本研究では、乾燥濾紙血法による検体収集を併用し、同法が開発途上国における遺伝子解析を含む疫学調査に有用である可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVの高浸淫地域である開発途上国では、社会インフラシステムが十分に整っていないことから免疫学的・遺伝子レベルでの血清疫学調査は困難であり、それに起因する不利益として、エビデンスに基づく効果的なHBV感染排除のための政策提言は困難であった。

本研究では、乾燥濾紙血法（DBS）を用いて低侵襲・迅速簡便な検体収集を実施、濾紙からの遺伝子抽出ならびに解析に成功し、カンボジア王国における妊婦のHBV感染状況、遺伝子型の分布、およびHBV母子感染率を明らかにした。同国のHBV排除に向けた戦略立案に貢献するとともに、開発途上国で遺伝子解析を含む疫学調査にDBSが有用である可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted a sero-epidemiological survey of pregnant women and their babies in Cambodia in cooperation with the Ministry of Health of Cambodia, hospitals and WHO to obtain evidence that contribute to HBV elimination strategies in Cambodia. Totally 1,565 pregnant women participated in the survey, and the HBs antigen positive rate was 4.3% (95% CI: 3.4-5.4%). HBV genotype C1 was predominant at 70.3%. Of the 35 infants born to HBs antigen-positive pregnant women, one (2.9%, HB vaccine containing Birth dose and HBIG administered) was HBs antigen positive. In this study, blood sample was collected by using the dried blood spots method, and it was useful for sero-epidemiological studies, including genetic analysis, in developing countries.

研究分野：肝炎ウイルスの疫学

キーワード：B型肝炎ウイルス（HBV） 母子感染 妊婦 HBVワクチン効果評価 サーベイランスシステム 乾燥濾紙血法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス肝炎対策は、持続可能な開発目標(国連 SDGs 3.3)の一つであり重要な地球規模課題である。研究代表者らは、カンボジア王国での 8 年に渡る国際共同疫学研究ならびに 2016~2017 年に実施したカンボジア全土大規模血清疫学調査研究(多段階層化無作為調査研究、協力:WHO、米国 CDC、カンボジア保健省、カンボジア健康科学大学)の結果から、同国 5 歳児の HBsAg 陽性率が 0.56%であり、2017 年までの WHO/WPRO 目標(5 歳児 HBs 抗原陽性率 1%以下)を達成していることを明らかにした。一方で出産可能年齢女性集団の HBs 抗原陽性率は 4.39%と依然高く、HBV 母子感染防止対策が同国の HBV Elimination に向けて特に重要課題であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、カンボジアにおける HBV 母子感染防止戦略立案に寄与することを目的とし、同国第二の都市である Siem Reap 州の妊婦および出生児を対象に血清疫学的縦断調査を実施した。

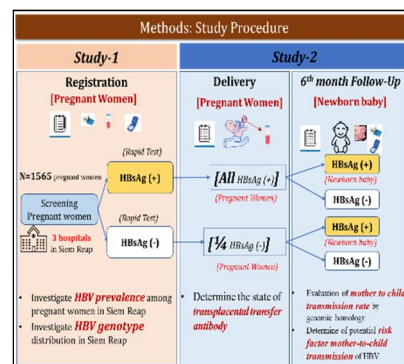
なお、本研究は広島大学疫学研究倫理委員会(第 E-1693 号)及びカンボジア保健省(223-NECHR)による承認を得て実施した。

3. 研究の方法

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(Module 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。

Study-1: 妊婦検診時に静脈採血、乾燥濾紙血法(Dried blood spots: DBS, HemaSpot™)を用いた血液検体採取、及び HBsAg Rapid Test を実施した。HBsAg Rapid Test 陽性者全員及び陰性者のうち 4 人に 1 人を Study-2 の対象者とした。

Study-2: 出産時の臍帯より採血、および児の 6 か月検診時に、児の血液検体を DBS 法により採取した。



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。

《測定方法》

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

4. 研究成果

妊婦検診受診者 1,565 人(平均年齢は 28.3 ± 5.7 歳)中、HBsAg 陽性者は 67 人(4.28%)、HBsAb 陽性者は 603 人(38.5%)、HBcAb 陽性者は 362 人(23.1%)であった。HBsAg 陽性者 67 人

の中で 41.8%が HBeAg 陽性であった。HCV 抗体陽性者は 8 人 (0.51%) であった。

HBsAg 陽性者 67 人に対して、HBV DNA 量を測定したところ、12 名が 10^8 copy/ml 以上であった。

HBsAg 陽性のリスク因子について、多変量解析を用いて探索した結果、年齢、人種、最終学歴、世帯主の職業、子どもの人数、同居家族の人数、輸血歴、手術歴、ピアス歴はいずれも有意な関連因子ではなく、HB ワクチン未接種であることが独立して有意に関連するリスク因子であることが示された (調整オッズ比 4.44)。

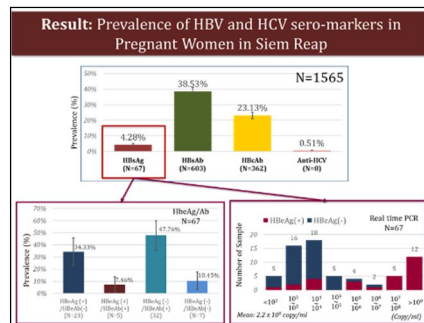
HBsAg が陽性であった 67 人に対して Full-Sequence 解析を試みたところ、37 例の Full-Sequence 決定が可能であった。Genotype C が 70.3%と当該地域では Dominant であることが明らかとなり、Subtype は全例 C1 であった。Genotype B は 29.7%であり、Subtype は全例 B4 であり、かつ B/C のリコンビナントであることが明らかとなった。

HBsAg 陽性妊婦 67 人から出生した児のうち 35 人が、Study-2・児の 6 か月検診時の検査を受けた。その結果、1 人 (2.9%、0.5-14.5%) が HBsAg 陽性であった。同児の母は 30 歳、HBeAg 陽性、ウイルス量 5.90×10^8 copy/mL であった。母と児の HBV 遺伝子配列は 100%一致しており、母子垂直感染であることが示唆された。帝王切開での出産、児には Birth dose を含めた 4 回ワクチンおよび HBIG が投与されたにもかかわらず、母子感染が成立した高ウイルス量妊婦の症例であった。

なお、HBsAg 陰性妊婦 1,498 人のうち、ランダム選択された 135 人に Study-2 への参加を呼び掛けたところ、80 人の児が 6 か月検診時の検査を受け、HBsAg 陽性者は 0 人であった。

本研究では、カンボジアの妊婦における HBV 感染の流行レベル、遺伝子型の分布、および HBV 母子感染率を明らかにした。また、乾燥濾紙血法 (Dried blood spots: DBS, HemaSpot™) による低侵襲・迅速簡便な検体収集を併用することで、開発途上国で遺伝子解析を含む疫学調査に DBS が有用である可能性を明らかにした。

これらの調査結果は、カンボジアにおける HBV 感染排除の戦略立案に資する基礎資料として同国保健省および WHO と共有されている。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamamoto Chikako, Nagashima Shintaro, Isomura Mitsuo, Ko Ko, Chuon Channarena, Akita Tomoyuki, Katayama Keiko, Woodring Joseph, Hossain Md. Shafiqul, Takahashi Kazuaki, Tanaka Junko	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the efficiency of dried blood spot-based measurement of hepatitis B and hepatitis C virus seromarkers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60703-1	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 該当する

1. 著者名 Ork Vichit, Woodring Joseph, Shafiqul Hossain Md., Wasley Annemarie, Nagashima Shintaro, Yamamoto Chikako, Chuon Channarena, Sugiyama Aya, Ohisa Masayuki, Akita Tomoyuki, Ko Ko, Mao Bunsoth, Tanaka Junko	4. 巻 37
2. 論文標題 Hepatitis B surface antigen seroprevalence among pre- and post-vaccine cohorts in Cambodia, 2017	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5059 ~ 5066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2019.06.073	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 該当する

1. 著者名 Chuon Channarena, Takahashi Kazuaki, Matsuo Junko, Katayama Keiko, Yamamoto Chikako, Ko Ko, Hok Sirany, Nagashima Shintaro, Akbar Sheikh Mohammad Fazle, Tanaka Junko	4. 巻 9
2. 論文標題 High possibility of hepatocarcinogenesis in HBV genotype C1 infected Cambodians is indicated by 340 HBV C1 full-genomes analysis from GenBank	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48304-z	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 該当する

1. 著者名 Bunthen E, Pichetra Ou, Serge Ouoba, Md Razeen Ashraf Hussain, Ko Ko, Shintaro Nagashima, Aya Sugiyama, Tomoyuki Akita and Junko Tanaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Prevalence and genotype distribution of viral hepatitis B in Cambodia between 1990 and 2020 a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archive of Public Health	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13690-022-00880-9	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Bunthen E, Pchetra Ou, Sugiyama Aya, Akita Tomoyuki, Tanaka Junko
2. 発表標題 Prevalence of Hepatitis B virus (HBV) infection in Cambodia: A Systematic Review and Meta-analysis of published studies
3. 学会等名 第31回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka J, Woodring J, Vichit O, Wasley A, Bunsoth M, Nagashima S, Yamamoto C, Chuon C, Ko K, Hossain MS
2. 発表標題 Sero-prevalence of Hepatitis B surface antigen among 5-7 years old children and their mothers in Cambodia by nationwide multi-stage stratified random sampling strategy
3. 学会等名 53rd the international liver congress 2018 (EASL) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本周子, 永島慎太郎, Chuon Channarena, Ko Ko, 大久真幸, 秋田智之, 片山恵子, 高橋和明, 田中純子
2. 発表標題 DBSを用いた肝炎ウイルスマーカー測定の見出し効率の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会(大阪)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bunthen E, Ko Ko, Shintaro Nagashima, Serge Ouoba, Kanon Abe, Aya Sugiyama, Kazuaki Takahashi, Rattana Kim, Vichit Ork, Md Shafiqul Hossain, Junko Tanaka
2. 発表標題 The sero-epidemiological study on the prevalence of hepatitis B virus infection among the pregnant women and their newborn baby in Cambodia
3. 学会等名 The 44th meeting of Western Branch of the Japan Society of Hepatology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bunthen E, Ko Ko, Shintaro Nagashima, Serge Ouoba, Kanon Abe, Aya Sugiyama, Kazuaki Takahashi, Rattana Kim, Vichit Ork, Md Shafiqul Hossain, Junko Tanaka
2. 発表標題 Prevalence and genotype distribution of hepatitis B among pregnant women in Siem Reap province, Cambodia
3. 学会等名 The 31st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of Liver (APASL 2022, SEOUL_Korea) (国際学会)
4. 発表年 2022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	高橋 陵宇 (Takahashi Ryou) (10625510)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授 (15401)	
研究分担者	秋田 智之 (Akita Tomoyuki) (80609925)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師 (15401)	
研究分担者	杉山 文 (Sugiyama Aya) (50778280)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	
研究分担者	大久 真幸 (Ohisa Masayuki) (20727250)	広島大学・医系科学研究科(医)・研究員 (15401)	
研究分担者	永島 慎太郎 (Nagashima Shintaro) (60846898)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	

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
---------	---------