

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24257

研究課題名(和文) 肝炎ウイルス排除に対応する途上国における乾燥濾紙法による肝炎マーカー測定 の提案

研究課題名(英文) A proposal of viral hepatitis markers measurement using Dried Blood Spot (DBS) method in developing countries, for elimination of viral hepatitis

研究代表者

永島 慎太郎 (Nagashima, Shintaro)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：60846898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では医衛生環境が不十分な南アフリカの途上国であるブルキナファソの母子240組より血液濾紙法(DBS)により得られた検体を用いて、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の免疫血清学的測定を実施した。HBVの感染率は母6.3%、子0.8%であることが明らかとなった。また、測定結果と質問票の情報を連結し、感染リスク因子の検討を行った。その後HBV・HCV陽性検体に対してウイルス遺伝子の解析を行うためNested PCR・Sequence解析・系統樹解析を行い、同国におけるHBV・HCVの型の決定や児の感染経路の推定等を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医衛生環境が不十分な途上国において、通常の採血による血清疫学調査は困難である。本研究では、指先の穿刺のみで行う低侵襲で簡便な採血法である血液濾紙法(Dried Blood Spot: DBS)の一つであるHemaSpot™-HF (Spot On SCIENCES)を用いて、B型肝炎ウイルスの測定による疫学調査・ウイルス学的解析の方法を確立し、途上国ブルキナファソでの疫学調査の実施を可能とし、同国のB型肝炎ウイルス感染状況に関する貴重な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the epidemiology of HBV and HCV infections in mothers and children in Burkina Faso, a developing country in south Africa. Blood samples were collected from fingertip using the Dried Blood Spot (DBS) method. Immunoserological measurements of hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) markers were conducted, and HBV infection rate was 6.3% in mothers and 0.8% in children. Nested PCR, genetic sequencing, and phylogenetic tree were performed to analyze the viral genomes of positive specimens to determine circulating HBV and HCV genotypes in the country and to estimate the route of infection in children.

研究分野：疫学

キーワード：肝炎ウイルス 血液濾紙法 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

WHO は 2016 年年次総会において 2030 年までにウイルス肝炎を Elimination (排除) するコミットメントを表明し、全地球的ウイルス肝炎排除に取り組むことを公にした。このコミットメント達成のため、各国が肝炎ウイルス感染状況を把握し、実態に応じた対策を行うことが重要である。途上国、特にサハラ砂漠以南のアフリカ諸国は、医衛生環境が不十分な為、通常の採血による血清疫学調査は困難であるため、感染状況の把握は難しい。

血液濾紙法 (Dried Blood Spot: DBS) は指先の穿刺のみで行う低侵襲で簡便かつ少量の採血法で血清調査が可能な方法であることから、医衛生環境が不十分な発展途上国での利用が期待されている。DBS には Whatman 903 (GE Health care)、HemaSpot™-HF (Spot On SCIENCES) 等があり、WHO 等は途上国における血清疫学調査に Whatman 903 を用いていた。Whatman 903 は HBV・HCV・HIV のウイルスマーカー測定が可能であるが、1 枚のカード状である為コンタミネーションが起こる可能性や乾燥に時間を要するという問題があり、遺伝子解析の方法も未だ確立していなかった。HemaSpot™-HF は特徴として、コンタミネーションが少ない、長期間の保存に適している、使用方法が比較的簡便の特徴があり、検出効率もよく発展途上国での利用が期待されている。

一方、申請者が、博士課程のときから在籍している広島大学 疫学・疾病制御学研究室 (講座主任 田中純子教授) で実施された、カンボジア全土における血清疫学調査に計画段階から参加し、採取検体の HBV・HCV・HAV のウイルス学的測定を行った。その調査では通常の採血に加え、DBS による検体採取を行ったが、その時用いた HemaSpot™-HF は特徴として、コンタミネーションが少ない、長期間の保存に適している、使用方法が比較的簡便の特徴があり、検出効率もよく、Sequence 解析等の遺伝子学的解析への利用可能性も示唆された。

これらのことから、途上国での血清疫学調査における HemaSpot™-HF の有用性が示唆され、HBV、HCV 関連マーカー及び Nested PCR・Sequence 解析等のウイルス学的測定法の確立が急務であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、西アフリカに位置するブルキナファソの the clinical research unit of Nanoro (CRUN) と協力し、医療設備の整っていない全血採血が困難な地域における DBS による肝炎の血清疫学的調査手法の確立と DBS を用いて同国農村部における HB ワクチン導入後の HBV 感染状況を明らかにすることを目的とした。また、HBs 抗原陽性検体・HCV 抗体陽性検体に対して Nested PCR を施行した結果 HBVDNA、HCVRNA を検出できた検体に関して、Sequence 解析を試行し、系統樹解析、Genotype 決定だけでなく、Full-genome sequence を特定する方法を確立することも目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、これまでの共同研究により広島大学 疫学・疾病制御学と協力体制が得られている IRSS-Direction Régionale du Centre Ouest-Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN), Nanoro, Burkina Faso の Dr. Lingani Moussa と共同で行った。

対象は、ブルキナファソの Nanoro 地区の地域保健センター 4 か所を訪問した住民 480 名の母子ペア (母 240 人、子 240 人) から既に得られた検体を用いた。小児の対象者については、ブルキナファソで The Expanded Programme on Immunization (EPI) に HBV ワクチンが導入された 2006 年以降の出生者とした。サンプルサイズの決定では、ブルキナファソ全体の HBV 有病率を過去のメタアナリシスの結果から 12% と見積もり、精度を 5%、信頼区間を 95%、データの欠損や血液サンプルの不具合等が 10% と仮定すると、成人・小児それぞれ 190 人必要であることから、本研究のサンプルサイズは 400 人以上 (成人 200 人、小児 200 人) とした。

得られた検体に対して、広島大学にて、DBS 検体より血液成分を抽出した。抽出液には、カンボジアにおける先行研究で用いた Tris-buffered saline, NaCl, Proclin 300 等を混合し、塩酸を用いて pH を 7.2 に調整した溶液を調製した。60 µl 相当の血清が染み込んだ濾紙を 600 µl 溶液で血液成分を抽出し、測定用の検体とした。

測定用検体に対して免疫血清学的測定を行い、以下の各種肝炎マーカーの陽性率を算出した。

HBV : (1)HBs 抗原(CLEIA 法 : Lumipulse)、(2)HBs 抗体(CLEIA 法 : Lumipulse)、
(3)HBc 抗体(CLEIA 法 : Lumipulse)、(4)HBe 抗原(CLEIA 法 : Lumipulse)、
(5)HBe 抗体(CLEIA 法 : Lumipulse)、(6)HBV DNA(real time PCR, Nested PCR)
HCV : HCV 抗体(CLEIA 法 : Lumipulse Ortho HCV)

測定した各マーカーの陽性判定に際して、当教室の先行研究の血清と DBS の測定データの ROC 解析に基づき、陽性の COI を変更して判定を行った。また、質問票より得られた社会的背景(子のワクチン歴、母のワクチン歴、母の年齢階級、子の出産場所、学歴等)との関連を単変量・多変量解析により検討した。

抽出液の測定により判明した HBs 抗原陽性者、HCV 抗体陽性者を対象として HBVDNA、HCVRNA の検出を Nested PCR により試みた。HBVDNA・HCVRNA を検出できた検体に関して、Sequence 解析を試み、部分配列・Full-genome sequence を得られたものについて Genotype 分類、系統樹解析を行った。これらの結果をもとに、HBV/HCV に持続感染している母児について感染経路の推定を行った。

4. 研究成果

研究初年度より、調査対象の母子 240 組より得られた 480 の DBS 検体より血液成分を抽出、免疫血清学的測定(CLEIA 法)を実施した。測定する肝炎マーカーは当初の予定である HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体、HBe 抗原、HBe 抗体、HCV 抗体を実施した。その結果、母の HBsAg の陽性率が 6.3%、HBV 感染既往を示す HBc 抗体の陽性率が 89.2%である一方、子の HBsAg の陽性率が 0.8%、HBc 抗体の陽性率が 59.2%であることが明らかとなった。HCV 抗体陽性率は母が 5.4%であり、子が 2.1%であった。

以上の測定により得られた結果と質問票の情報(子の出生場所、性別、ワクチン歴、母の学歴等)を連結し、母と子それぞれのデータベースを作成し、単変量・多変量解析を用いて各マーカーの結果と関連する因子について検討した。その結果、子の出生場所が Health center ではなく実家である場合に HBs 抗体の陽性率が統計学的に有意に低いことが明らかとなり、十分な HB ワクチン接種が制限される因子として示唆された。ブルキナファソでは 2006 年に HB ワクチンを国の小児を対象とした接種スケジュールに導入したが現在においても接種率は充分ではなく、これからも接種に対する意識を向上させることが喫緊の課題であると考えられた。また、HBs 抗原陽性特に HBe 抗原陽性の妊婦出産時に子に感染するリスクが大きいことから、同国において HBV 関連マーカー検査と感染予防を改良していく必要性が認められた。

HCV 抗体陽性率に関しては、輸血歴の有無では輸血歴なしと比較してオッズ比が 6.2 倍と輸血歴有りの方で陽性率が高かったが有意差を認めなかった。同国では HCV の感染に関して公衆衛生上の問題として十分な注意が払われていなかったことから、今後 DAA による治療などの介入が積極的に開始されることが重要と考えられた。

HBV・HCV 関連マーカーの測定後、HBV・HCV の遺伝子学的解析を行うため Nested PCR を実施し、HBsAg 陽性検体、HCV 抗体陽性検体にウイルス核酸の検出とその後の Sequence 解析(部分配列、Full-sequence)、系統樹解析を行った。

その結果、HBVDNA に関しては、6 例の S 領域の部分配列に加えて 7 例の Full-Sequence を得ることができた。6 例の S 領域の部分配列においては、Genotype A が 3 例、Genotype E が 3 例であった。7 例の Full-Sequence の配列情報・系統樹解析により、5 例が Genotype E、2 例が Genotype A3/E のリコンビナントであることが明らかとなった。また、Full-Sequence 7 例の中に全遺伝子配列の 100%の一致を示し、母子垂直感染を強く示唆する Genotype E の母子のペアが存在した。

HCVRNA に関しては Sequence 解析の結果 1 例の部分配列が得られ、系統樹解析の結果 Genotype 2 であり、フランス株と近縁であることが分かった。この株に対して Full-Sequence 解析を試みた。HCVRNA の各領域の Nested PCR 及び Sequence 解析を行い、各 Sequence を連結する必要があるが、現時点で完了しなかった。また、DBS にて HCV 抗体が陽性かつ Nested PCR が陰性の 17 例に対し、Real-time PCR を施行したところ、1 例が陽性であった。この 1 例に関して、Primer の変更等を行った上での Nested PCR の再測定などを検討する必要性が示唆された。

研究期間を通して、当初の予定であった免疫血清学的測定に加え、Nested PCR も施行し、HBVDNA の Full-sequence の決定も可能であることが確認された。HCV 抗体、HCVRNA 等の関連する追加の測定項目も測定可能であり、当初の予定より詳しい解析を行うことができた。

最終年度には、本研究で得られた新しい知見に基づき、2021 年より実施されている、同国で妊婦を対象とした HBV の母子感染に関してさらに詳細に検討する新たな血清疫学調査の考案・実行に参画した。

以上のように、当初の目的である医療設備の整っていない全血採血が困難な地域における DBS による肝炎の血清疫学的調査手法を確立することができた。質問票調査と組み合わせた本手法により、同国農村部における HB ワクチン導入後の HBV 感染状況を明らかにし、社会的

な因子との関連についても検討を行うことができた。

HBs 抗原陽性検体に対して Nested PCR を施行した結果、HBVDNA に関しては、ウイルス量等の制約があるものの一部の例において Full-genome sequence を特定する方法を確立することができた。HCV 抗体陽性検体に関しては部分配列を解読できた例が 1 例であり、Full-Sequence は試行するのみにとどまったが、今後 DBS の保管方法を含めた RNA の抽出効率の改良により一部検体において施行できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Moussa Lingani, Tomoyuki Akita, Serge Ouoba, Shintaro Nagashima, Palwende Romuald Boua, Kazuaki Takahashi, Basile Kam, Aya Sugiyama, Theodore Nikiema, Chikako Yamamoto, Athanase Some, Karim Derra, Ko Ko, Hermann Sorgho, Zekiba Tarnagda, Halidou Tinto and Junko Tanaka	4. 巻 20
2. 論文標題 The changing epidemiology of hepatitis B and C infections in Nanoro, rural Burkina Faso: a random sampling survey.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-019-4731-7.	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0件

〔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

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		
ブルキナファソ	Clinical Research Unit of Nanoro		