

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10416

研究課題名（和文）イムノクロマトグラフィー法を用いたB型肝炎コア関連抗原の簡易迅速検査の開発・評価

研究課題名（英文）Development and evaluation of immunochromatographic rapid diagnostic test to detect hepatitis B core-related antigen (HBcrAg RDT)

研究代表者

島川 祐輔 (Shimakawa, Yusuke)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員教授

研究者番号：10814692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：富士レビオ社とイムノクロマトグラフィー法によるB型肝炎コア関連抗原検出の簡易迅速検査（HBcrAg-RDT）を開発し、その妥当性を検討した。ガンビアのB型肝炎感染者の保存血清を用いた後ろ向き評価、および、ブルキナファソのHBV感染者の指尖血（全血）を用いた前向き評価、いずれにおいても、HBcrAg-RDTがHBV DNA高値の診断に有用であることを示した。また、ブルキナファソにおける医療経済評価を行い、B型肝炎母子感染予防にHBcrAg-RDTを用いた方が従来からのHBV DNA測定などに比べて安価に実施できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血清、血漿、全血中の高ウイルス血症を検出する迅速検査を新規に開発した。本検査は、試料準備が簡易、機器やコールドチェーンが不要で、動作温度は39℃まで対応し、迅速なターンアラウンドタイム（45分）という特長があり、低・中所得国でのポイント・オブ・ケアでの使用に適している。WHOが推奨する妊婦の抗ウイルス予防の適用基準（ウイルス量200,000 IU/mL以上）を診断するのにあたり、ガンビアの生殖年齢女性では感度100%、特異度87.5%、ブルキナファソの母親から採取した指尖血（全血）では感度89.7%、特異度94.2%と、非常に有望であった。

研究成果の概要（英文）：With FujiRebio, we developed a rapid and simple test for detecting hepatitis B core-related antigen (HBcrAg-RDT) using immunochromatography. We assessed its validity through retrospective evaluation using stored serum samples from hepatitis B-infected individuals in The Gambia and prospective evaluation using finger-prick capillary blood samples from HBV-infected individuals in Burkina Faso. In both studies, we found that HBcrAg-RDT has high diagnostic performance in identifying individuals with high HBV DNA levels. Furthermore, we conducted a microcosting analysis in Burkina Faso and found that utilizing HBcrAg-RDT for preventing mother-to-child transmission of hepatitis B could be less costly compared to conventional strategies such as the use of HBV DNA testing.

研究分野：疫学

キーワード：B型肝炎 B型肝炎コア関連抗原 簡易迅速検査 妥当性評価 アフリカ グローバルヘルス 肝炎エリミネーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B 型 (HBV) 肝炎は世界的に極めて重要な感染症であり、全世界で推定 2 億 5 千万人が慢性感染し、毎年 90 万人以上が肝がんや肝硬変により死亡している。2016 年、WHO は 2030 年までに全世界的な肝炎の排除 (グローバル・エリミネーション)、すなわち「新規感染者数の 90% 削減・死亡者数の 65% 削減」を目指した戦略を発表した。日本をはじめ一部先進国ではこの目標に到達可能とされるが、世界的にみると HBV 感染者の 9 割以上はアジアやアフリカの低・中所得国に偏在しており、保健インフラの脆弱な国においても実施可能な対策を講ずることが、グローバル・エリミネーションの実現に必須と考えられる。

途上国における HBV 対策の中でも特に重要なのは、母子感染 (垂直感染) 予防、及び、慢性感染者における肝がん・肝硬変の予防である。2000 年代以降、乳児の HB ワクチン接種が途上国に普及したことにより、水平感染が予防され、小児における新規感染者数は減少傾向にある。しかし、HB ワクチン単独では、感染妊婦、特にウイルス量の高い妊婦から児への垂直感染を十分に予防できない。このため、WHO は 2020 年、母子感染予防ガイドラインを発表し、出生直後の新生児への HB ワクチン接種に加えて、高ウイルス量 (HBV DNA >200,000 IU/ml) の妊婦への核酸アナログ投与を新たに推奨した。

また、HB ワクチンが普及する前に生まれた世代では、小児期に感染し現在まで症状のないまま持続感染し続けている若年成人が多数いる。今後、肝がん・肝硬変の好発年齢を迎えるにあたり、途上国における HBV 関連死亡者数のなる増加が懸念される。核酸アナログによって肝がん・肝硬変の発症リスクを軽減させることが重要だが、そのためには B 型肝炎 s 抗原 (HBsAg) を用いたスクリーニングと、HBsAg 陽性者におけるウイルス量測定を含めた治療適応判定が必須となる。

このように、HBV エリミネーションの実現には、血中のウイルス量測定によるハイリスク・キャリアの同定と、核酸アナログ治療が鍵となる。核酸アナログについては安価 (400 円/月) なジェネリック薬により途上国での治療も十分可能となった。一方、ウイルス量測定に用いられる PCR 法は、高コスト、高度な技術を持った検査技師の育成、高い品質管理、などが障壁となり途上国では広く普及していない。そこで、安価で簡易に実施できる代替マーカーとして、日本で開発されたコア関連抗原 (HBcrAg、富士レピオ社) に着目して我々は研究を行ってきた。HBcrAg は、コア抗原・HBeAg・プレコア蛋白 (p22cr) を CLEIA 法により網羅的に検出する方法で、国内においては血中の HBV DNA 量と正の相関があることが以前より知られている。我々は、アフリカの慢性 HBV 感染者の検体でも同様の相関があり、治療適応判定に極めて有用であることを初めて報告した (Shimakawa Y et al. Clin Infect Dis 2019)。また、1 万人を超える個人データを用いたメタ解析を行い、無治療の慢性感染者の中から高ウイルス量 (>200,000 IU/ml) 患者を識別するのに、ウイルスのジェノタイプの影響を受けることなく、HBcrAg 測定が高い感度 (91.8%) 特異度 (90.5%) を持つことを示した (Yoshida K et al. Clin Gastroenterol Hepatol 2020)。これら予備研究では HBcrAg の測定に CLEIA 法を用いたが、次のステップとして、本研究では途上国でも十分実施可能なイムノクロマトグラフィー法を用いて HBcrAg を定性的に検出する簡易迅速検査の開発・評価を行った。

2. 研究の目的

HBcrAg を定性的に検出する簡易迅速検査 (HBcrAg-RDT) の開発・評価を行う。

3. 研究の方法

(1) ガンビアの血清検体を用いた簡易迅速検査の臨床的妥当性の後ろ向き評価

ガンビアの慢性HBV感染者の保存血清を用い、高ウイルス量検体を区別できるかどうか、治療適応があるかどうかの判別に関して、簡易迅速検査の臨床的妥当性を評価した。

(2) ブルキナファソにおける末梢血を用いた簡易迅速検査の臨床的妥当性の前向き評価

ブルキナファソの出産後のHBV感染している女性の指尖血を用いて、簡易迅速検査の臨床的妥当性を前向きに評価した。

4. 研究成果

(1) ガンビアの血清検体を用いた簡易迅速検査の臨床的妥当性の後ろ向き評価

PROLIFICA研究で得られた保存血清を用いて臨床的妥当性の後ろ向き評価を行った。75人のHBsAg陰性ガンビア人のうち、HBcrAg-RDTで陽性反応を示した者はおらず、HBsAg陰性集団における特異度は100%(95%信頼区間、95.2-100)だった。284人のHBsAg陽性ガンビア人におけるHBV DNAレベルの分布は、検出限界未満(42%)、50-1999 IU/mL(35%)、2000-199,999 IU/mL(11%)、および200,000 IU/mL以上(12%)だった。抗ウイルス療法の適用基準に該当する割合は、AASLD基準で21%、EASL基準で20%、およびAPASL基準で22%だった。HBcrAg-CLEIAは53%で検出され、HBcrAg-RDTは23%で陽性反応を示した。臨床的に重要なHBcrAg-CLEIAレベルを診断するためのHBcrAg-RDTの感度と特異度は、それぞれ3.6 log₁₀ U/mL以上で73.3%と100%、4.5 log₁₀ U/mL以上で95.2%と97.3%、および5.3 log₁₀ U/mL以上で100%と92.8%だった。臨床的に重要なHBV DNAレベルを診断するためのHBcrAg-RDTの感度と特異度は、それぞれ2000 IU/mL以上で72.7%と91.7%、20,000 IU/mL以上で86.7%と88.7%、および200,000 IU/mL以上で91.4%と86.3%だった。HBcrAg-RDTの感度はHBeAg-EIAより高く、HBcrAg-CLEIAと同等だった。生殖年齢の女性(n=67)において、ウイルス量200,000 IU/mL以上を示すHBcrAg-RDTの感度と特異度は、それぞれ100%と87.5%だった。HBcrAg-RDTの性能はウイルス遺伝子型によって変化しなかった。治療適用基準を示すためにHBcrAg-RDTを使用する簡易アルゴリズムでは、モデル1(HBcrAg-RDT/ALT/FibroScan)の感度と特異度はそれぞれEASL基準で96.6%と83.2%、AASLD基準で93.2%と86.7%、およびAPASL基準で90.5%と96.8%だった。モデル2(HBcrAg-RDT/ALT)はモデル1よりも性能が劣ったが、TREAT-B(HBeAg-EIA/ALT)と同等だった。

本研究では、血清、血漿、全血中の高HBcrAgレベルと高ウイルス血症を検出する迅速検査を新規に開発した。この検査は、生産コストが低く、試料準備は簡易、機器やコールドチェーンが不要で、動作温度は39°Cまで対応し、迅速なターンアラウンドタイム(45分)という特長があり、低・中所得国でのポイント・オブ・ケアでの使用に適している。WHOが推奨する、妊婦の抗ウイルス予防の適用基準(ウイルス量200,000 IU/mL以上)を診断するのにあたり、ガンビアの生殖年齢女性におけるHBcrAg-RDTの性能(感度100%、特異度87.5%)は非常に有望であった。また、本研究はHBcrAg-RDTを用いたアルゴリズムが、治療適用基準を決定する上で有用であることを示唆した。特に、モデル2(HBcrAg-RDT/ALT)は、PCR検査もFibroScanもラボベースの免疫測定法も必要としないため、一次医療施設での臨床管理を可能にすると考えられた。

(2) ブルキナファソにおける末梢血を用いた簡易迅速検査の臨床的妥当性の前向き評価

ブルキナファソでの前向き分析は2022年5月から2023年9月まで行われた。Hauts-Bassins地域にある24の保健センターにて出産後9-18ヶ月後の母親より指尖血を採取し、HBsAg迅速検査

(Determine HBsAg 2, Abbott) と HBcrAg 迅速検査を同時に実施した。HBsAg 陽性と判定された参加者には、静脈血サンプルの提供も求められ、このサンプルは6時間以内に Centre Muraz の研究所に送られた。凍結された血清サンプルは後に、Cobas® AmpliPrep/Cobas Taqman HBV アッセイを用いて qPCR を実施するために使用された。

264 人の HBsAg 陽性の母親のうち、39 人が高ウイルス量 (200,000 IU/mL 以上)、225 人が低ウイルス量 (200,000 IU/mL 未満) だった。高ウイルス量の母親のうち 35 人で HBcrAg 迅速検査は陽性だった (感度 89.7%、95% 信頼区間 75.8–97.1%)。一方、低ウイルス量の母親のうち 212 人で HBcrAg 迅速検査は陰性だった (特異度 94.2%、95% 信頼区間 90.3–96.9%)。

以上より、全血を用いた場合でも比較的高い感度が認められ、妊婦の抗ウイルス予防の適用基準 (ウイルス量 200,000 IU/mL 以上) を診断するのに有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名 Shimakawa Yusuke, Ndow Gibril, Kaneko Atsushi, Aoyagi Katsumi, Lemoine Maud, Tanaka Yasuhito, Cerceau Theo, Ceesay Amie, Perpetue Vincent Jeanne, Watanabe Takehisa, Baba Masaya, Sanneh Bakary, Baldeh Ignatius, Njie Ramou, D' Alessandro Umberto, Mendy Maimuna, Chemin Isabelle, Thursz Mark R | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Rapid Point-of-Care Test for Hepatitis B Core-Related Antigen to Diagnose High Viral Load in Resource-Limited Settings | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology | 6. 最初と最後の頁 1943 ~ 1946.e2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2022.05.026 | 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 Vincent Jeanne Perpetue, Ndow Gibril, Ogawa Shintaro, Ceesay Amie, Njie Ramou, Sanneh Bakary, Baldeh Ignatius, D' Alessandro Umberto, Mendy Maimuna, Thursz Mark, Chemin Isabelle, Tanaka Yasuhito, Lemoine Maud, Shimakawa Yusuke | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) to evaluate liver fibrosis and cancer in HBV-infected patients in West Africa | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Global Health | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7189/jogh.12.04076 | 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 Gosset Andrea, Drabo Seydou, Carrieri Patrizia, Tiendrebeogo Abdoul Salam Eric, Vincent Jeanne Perpetue, Tanaka Yasuhito, Sombie Roger, Tall Haoua, Kania Dramane, Boyer Sylvie, Shimakawa Yusuke | 4. 巻 Online ahead of print |
| 2. 論文標題 Costs of integrating hepatitis B screening and antiviral prophylaxis into routine antenatal care in Burkina Faso: Treat all versus targeted strategies | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Gynecology & Obstetrics | 6. 最初と最後の頁 1-18 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijgo.15515 | 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jeanne Perpetue Vincent |
| 2. 発表標題 Hepatitis B core-related antigen rapid test (HBcrAg-RDT) to identify HBV-infected women at high risk of mother-to-child transmission in Cambodia, Cameroon, and Burkina Faso |
| 3. 学会等名 Global Hepatitis Summit 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shimakawa Y, Ndow G, Cerceau T, Ceesay A, Kaneko A, Hasegawa A, Yamamoto N, Aoyagi K, Vincent JP, Watanabe T, Baba M, Sanneh B, Baldeh I, Njie R, D' Alessandro U, Mendy M, Chemin I, Thursz MR, Lemoine M, Tanaka Y |
| 2. 発表標題 Rapid point-of-care test for hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) to identify HBV-infected patients eligible for antiviral therapy |
| 3. 学会等名 Internationa Liver Congress 2022 (EASL: European Association for the Study of the Liver) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Jeanne Perpetue Vincent |
| 2. 発表標題 Evaluation of hepatitis b core-related antigen rapid test (HBcrAg-RDT) to identify HBV-infectedwomen eligible for peripartum antiviral prophylaxis in resource-limited countries. |
| 3. 学会等名 Internationa Liver Congress 2023 (EASL: European Association for the Study of the Liver) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023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 | 馬場 理也 | 熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授 | |
| | (Baba Masaya) | | |
| | (10347304) | (17401) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|