

課題番号 : 29指2
研究課題名 : カンボジアにおけるB型肝炎の感染状況とHBワクチン効果に関する血清・ゲノム調査研究
主任研究者名 : 考藤達哉
分担研究者名 : 田中純子

キーワード : カンボジア, B型肝炎, 多段階層化無作為調査, 大規模血清疫学研究, HB ワクチン効果

研究成果 :

【背景・目的】世界規模で始まっている「ウイルス肝炎の排除 elimination」の対策には、当該地区・地域における肝炎ウイルス感染率の疫学的把握と調査が必要である。しかし、肝炎ウイルス感染高度侵淫地区であり肝癌死亡率が高いとされる東南アジア地域では、感染状況の把握が進んでいない。B型肝炎ウイルス (HBV) 感染の主な感染経路は、母子感染と水平感染 (主に小児期) であり、5歳以下の感染は高頻度に慢性化するが、現在では安全かつ有効なワクチンによって予防が可能となっている。しかし、疫学調査が進んでいない国では、出生時 HB ワクチンの効果評価は困難である。カンボジア王国は 2001 年から出生以後 6,10,14 週の HB ワクチンが推奨され、2005 年にはこれらに birth dose を含めた計 4 回の HB universal vaccine が導入された。2005 年以降に出生した児とその母親における HBV 感染や HB ワクチンの接種状況を明らかにするために、広島大学 (田中純子) は、WHO、米国 CDC、カンボジア保健省、カンボジア健康科学大学の協力を得て、カンボジア全土における HBV 感染状況の把握と疫学的考察を行うための多段階層化無作為調査による大規模血清・ゲノム疫学調査を行った。本研究はその調査および解析の一部を担っている。

【方法】多段階層化無作為調査により、カンボジア全国 1,621 自治体から 70 自治体を選出し、70 自治体に属する村から 4 村ずつ計 280 村を選出した。その後、各村から 5-7 歳児とその母のペア 9 組 (小児、母親それぞれ 2,520 人) を無作為に抽出し、聞き取り調査 (27 項目) および HBs 抗原 Rapid test、乾燥濾紙法 (DBS) による血液検体採取を行った。DBS 検体は広島大学に輸送後、HBs 抗原 (CLEIA 法)、HBs 抗体 (CLEIA 法)、HBc 抗体 (CLEIA 法)、HCV 抗体 (CLEIA 法) 等の測定を行った。本研究は、広島大学および WHO、米国 CDC、カンボジア保健省の倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】母親集団 (N=2,026) の平均年齢は 32.5±6.1 歳であった。小児集団 (N=2,520) の HBs 抗原陽性率は、Rapid test にて 0.56% (95%CI: 0.27-0.85) であり、母親集団では 4.39% (95%CI: 3.50-5.29) であった。一方、HBs 抗原陽性の母親から出生した児 (N=89) の HBs 抗原陽性率は 10.11% (95%CI: 3.85-16.38) と高率であった。

小児集団において、出生時 HB ワクチン接種率は 78% (1,976 人)、そのうち生後 24 時間以内の接種率は 46% (1,145 人) であり、HBs 抗原陽性率はそれぞれ 0.3%、0.2% であった。一方、計 4 回の HB ワクチンを一度も接種していない HB ワクチン未接種児 (2.6%, 65 人) における HBs 抗原陽性率は 4.6% であり、母親集団と同程度の値を示した。多変量解析により、小児の HBs 抗原陽性と有意に関連した項目は、母親の HBs 抗原が陽性であること (AOR=91.2, p<0.001)、小児が HB ワクチン未接種であること (AOR=46.5, p<0.05) であった。

【考察と今後の展望】本研究のこれまでの結果から、カンボジア王国の小児 (5-7 歳児) における HBs 抗原陽性率は、WHO の掲げた 2017 年までの地域目標 (5 歳未満の小児の HBsAg 陽性率 1% 未満) に達していることが明らかになった。一方で、出生時 HB ワクチン接種の実施率は 78%、HB ワクチン未接種群における HBs 抗原陽性率は母親集団と同様に高かったことから、出生時 HB ワクチンを出生後 24 時間以内に実施することが重要であり、また、HBs 抗原陽性の母から出生した児の HBs 抗原陽性率が 10.1% と高いことから母子感染防止対策の徹底が必要と考えられた。今後は、乾燥濾紙法 (DBS) による HBs 抗体 (CLEIA 法)、HBc 抗体 (CLEIA 法)、HCV 抗体 (CLEIA 法) 等の測定、評価を行い、母親及び小児における肝炎ウイルス感染状況や感染経路に関するウイルス遺伝子学的解析と検証を行う予定である。

Subject No. : 29-shi-2

Title : Sero-genomic surveillance study of hepatitis B virus infection and impact of HB vaccine in Cambodia

Researchers : Tatsuya Kanto and Junko Tanaka

Key word : HBV, dried blood spot (DBS), epidemiology, SNPs, mother-to-child transmission

Abstract :

Background: Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem. Epidemiological data on viral markers in HBV endemic countries, such as Cambodia, should be needed to launch national action plan against viral hepatitis and to implement anti-HBV therapeutic and management strategy. Recent investigations have revealed that some single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in infection- or disease-related genes, such as *CXCR5*, *CXCL13*, *NTCP* or *HLA-DP/DQ*. The distribution of such SNPs in population could provide useful information to establish comprehensive strategy against HBV. We aimed to establish reliable methods for host genotyping even in countries where infrastructure is underdeveloped.

Methods: In order to obtain sero-genomic surveillance data of HBV infection in Cambodia, we performed field examination in designated urban/rural areas for 35 days. The subjects enrolled were 2,250 pairs of mother and child, 2,021 of which agreed the participation in the study. DBS samples were collected from all participants (100µl/spot, DBS method), and venipuncture (5ml) was done from 400 pairs. For the establishment of DBS genomics platform, we collected blood samples from 12 healthy controls and 30 patients with chronic hepatitis B (CHB) by DBS and venipuncture. We compared the quantity and quality of DNA samples obtained by different combination of DNA extraction methods. We utilized DBS blood sampling kit (HemaSpot™ (HS), NucleoCard® (NC)) and DNA extraction kit (SMITEST® EX-R&D (ST) and NucleoSpin® Tissue (NS)). We analyzed SNPs in *CXCR5* (*rs497916*), *CXCL13* (*rs355687*), *NTCP* (*rs2296651*), *HLA-DP* genes by TaqMan PCR or Luminex methods as reported previously. We verified whether the results of SNPs were matched or not between the DBS and the conventional methods. Furthermore, we verified the feasibility of DBS methods in patients with HBV infection.

Results: The serological analyses of HBV markers using DBS samples from Cambodia have been underway. In comparison of DNA quantity between DBS and venipuncture, the combination of HS and ST (HSxST) showed the highest yields compared to the others. By TaqMan PCR, we successfully determined SNPs of all the above-mentioned genes from DNA samples extracted by any of combination methods. Identical TaqMan PCR results were obtained if >0.07 ng/ul extracted DNA had been used. To perform HLA-DP typing, >1.0 ng/ul extracted DNA was necessary. All genetic variations of SNPs were matched between the DBS and the venipuncture. In samples from CHB, the genotyping results were matched with those of conventional methods, by using DNA extracted by HSxST from DBS.

Conclusion: Based on the DBS system, we successfully established genotyping methods of HBV infection and/or pathogenesis-related genes. Because the DBS is a low-cost, durable, transportable and easy-to-handle modality, the DBS-genotyping is a feasible tool for getting deeper understanding of HBV epidemiology especially in middle- or low-income countries.

Researchers には、分担研究者を記載する。

カンボジアにおけるB型肝炎の感染状況とHBワクチン効果に関する血清・ゲノム調査研究

平成29年度：

調査対象者：2,520組の母子

DBS採血同意取得者：2,021組

うち静脈採血も実施：400組



乾燥濾紙血法 (DBS) を用いたB型肝炎病態関連ゲノム解析

HemaSpot™

NucleoCard®

FTA® Eluteカード

乾燥濾紙
(3種類)



* 濾紙に溶解液など
染み込ませてある

血液量

25 µl
(2fin)

12.5 µl
(1fin)

25µl

5 µl

抽出用キット
(3種類)

Xtract™ DNA Kit
NucleoSpin® Tissue
スマイテスト® EX-R&D

Bufferで洗浄のみ

SNP
測定結果
(健康成人)

検体	rs497916 (CXCR5)			rs355687 (CXCL13)			rs2296651 (NTCP)		
	HemaSpot™	NucleoCard®	FTA® Elute カード	HemaSpot™	NucleoCard®	FTA® Elute カード	HemaSpot™	NucleoCard®	FTA® Elute カード
1	CC	CC	CC	CT	CT	CT	GG	GG	GG
2	CC	CC	CC	TT	TT	TT	GG	GG	GG
3	CC	CC	CC	TT	TT	TT	GG	GG	GG
4	CC	CC	CC	TT	TT	TT	GG	GG	GG
5	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AG	AG	AG
6	CT	CT	CT	TT	TT	TT	GG	GG	GG
7	CC	CC	n.d.	CT	CT	n.d.	GG	GG	n.d.
8	CC	CC	CC	TT	TT	TT	GG	GG	GG
9	CT	CT	n.d.	TT	TT	n.d.	GG	GG	n.d.
10	CC	CC	n.d.	TT	TT	n.d.	GG	GG	n.d.
11	CC	CC	n.d.	TT	TT	TT	GG	GG	GG
12	CC	CC	n.d.	TT	TT	n.d.	GG	GG	n.d.

n.d.,
判定不能

課題番号 : 29指2

研究課題名 : カンボジアにおけるB型肝炎の感染状況とHBワクチン効果に関する血清・ゲノム調査研究

主任研究者名 : 考藤達哉

分担研究者名 : 考藤達哉

キーワード : 乾燥濾紙法 (Dried Blood Spot: DBS)、B型肝炎病態関連ゲノム解析

研究成果 :

本研究では検体の採取にあたり乾燥濾紙血法 (DBS) を用いている (一部の対象者では標準化比較のため全血採取)。B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析においてDBS法の信頼性と有用性を検討した報告は少なく、カンボジアDBS検体の解析に先立ち、DBS法を用いた血液の採取及び検体のゲノム抽出法、測定法を開発し、その患者群での応用可能性を検証した。

まず、研究対象者のうち対象健常群である健康成人12名に対してそれぞれ3種の血液サンプル保存用キット (HemaSpot™、NucleoCard®、FTA® Eluteカード) を用いて検体を採取し、ゲノムDNAの抽出、精製にはスマイテスト® EX-R&D、NucleoSpin® Tissue、Xtract™ DNA Kitを用いた。上記のキットを組み合わせ得られた抽出DNAについて濃度、品質およびB型慢性肝炎との関連が報告されている遺伝子上のSNP (CXCR5、CXCL13、NTCP、HLA-DP) を用いた分析精度を比較した。対象健常群において、ゲノムDNAの抽出効率HemaSpot™ xスマイテスト® EX-R&Dで最も高く ($7.08 \pm 1.97 \text{ ng}/\mu\text{l}$)、SNP (TaqMan Probe法) およびHLA (PCR-Luminex法) タイピングによる型判定に耐えうるゲノムDNAを得ることができた。

次にB型肝炎患者30名において、対象健常群の解析で得られたゲノム解析法の妥当性を検討した。対象健常群と同様の検討及び全血検体を用いた標準化比較を施行し、患者群においても同様の結果が得られた。また正確な型判定に必要なとされたDNA濃度は、SNPタイピング (TaqMan PCR) においては $>0.07 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、HLAタイピング (Luminex) においては $>1.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。

上記の検討により、B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析において、一般集団、患者集団ともに応用可能なDBS法を開発することができた。今後は同法を用いてカンボジアですでに採取できているDBS検体 (2,021組の母子) において、B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析を施行する予定である。

課題番号 : 29指2

研究課題名 : カンボジアにおけるB型肝炎の感染状況とHBワクチン効果に関する血清・ゲノム調査研究

主任研究者名 : 考藤達哉

分担研究者名 : 田中純子

キーワード : 乾燥濾紙法 (Dried Blood Spot: DBS)、母子感染、カンボジア、B型肝炎病態関連ゲノム解析、多段階層化無作為調査、大規模血清疫学研究、HBワクチン効果

研究成果 :

カンボジアにおけるフィールドワーク (研究分担者: 田中純子)

カンボジア血清疫学調査を行うにあたり、共同研究者との調査打ち合わせ後、現地のフィールド調査員に対する5日間の研修を行った。カンボジア全土にわたる対象地区(1,621自治体から70自治体を無作為抽出)でのフィールド現地調査を実施した。調査対象者2,520組の母子のうち、同意の得られた母子から乾燥濾紙血法(DBS)により血液を採取し、このうち、400組の母子から静脈採血を同時に行った。採取した乾燥濾紙血法(DBS)による採血検体及び静脈採血により得られた血清検体を日本に冷凍輸送し、検体の登録と分注およびDBS検体の前処理と分注を行った。現在、聞き取り調査のデータ入力および集計を行い、肝炎ウイルスの免疫血清学的測定を実施している。小児集団(N=2,520)のHBs抗原陽性率は、Rapid testにて0.56%(95%CI: 0.27-0.85)であり、母親集団では4.39%(95%CI: 3.50-5.29)であった。一方、HBs抗原陽性の母親から出生した児(N=89)のHBs抗原陽性率は10.11%(95%CI: 3.85-16.38)と高率であった。平成29年度に計画したカンボジア全土を対象とした無作為抽出血清疫学調査は計画通り実施した。

乾燥濾紙血法を用いたB型肝炎病態関連ゲノム解析法の開発 (研究代表者: 考藤達哉)

本研究では検体の採取にあたり乾燥濾紙血法(DBS)を用いている(一部の対象者では標準化比較のため全血採取)。B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析においてDBS法の信頼性と有用性を検討した報告は少なく、カンボジアDBS検体の解析に先立ち、DBS法を用いた血液の採取及び検体のゲノム抽出法、測定法を開発し、その患者群での応用可能性を検証した。まず、研究対象者のうち対象健常群である健康成人12名に対してそれぞれ3種の血液サンプル保存用キット

(HemaSpot™、NucleoCard®、FTA® Eluteカード)を用いて検体を採取し、ゲノムDNAの抽出、精製にはスマイテスト^R EX-R&D、NucleoSpin^R Tissue、Xtract™ DNA Kitを用いた。上記のキットを組み合わせ得られた抽出DNAについて濃度、品質およびB型慢性肝炎との関連が報告されている遺伝子上のSNP(CXCR5、CXCL13、NTCP、HLA-DP)を用いた分析精度を比較した。

対象健常群において、ゲノムDNAの抽出効率、HemaSpot™ xスマイテスト[®] EX-R&Dで最も高く(4.17±1.10ng/μl)、SNP(TaqMan Probe法)およびHLA(PCR-Luminex法)タイピングによる型判定に耐えうるゲノムDNAを得ることができた。次にB型肝炎患者30名において、対象健常群の解析で得られたゲノム解析法の妥当性を検討した。対象健常群と同様の検討及び全血検体を用いた標準化比較を施行し、患者群においても同様の結果が得られた。また正確な型判定に必要なとされたDNA濃度は、SNPタイピング(TaqMan PCR)においては>0.07ng/μl、HLAタイピング

(Luminex)においては>1.0ng/μlであった。上記の検討により、B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析において、一般集団、患者集団ともに応用可能なDBS法を開発することができた。今後は同法を用いてカンボジアですでに採取できているDBS検体(2,021組の母子)において、B型肝炎病態関連宿主ゲノム解析を施行する予定である。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指2

研究課題名：カンボジアにおけるB型肝炎の感染状況とHBワクチン効果に関する血清・ゲノム調査研究

主任研究者名：考藤達哉

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
わが国の肝炎総合対策：厚生労働省と肝炎情報センターの取り組み	瀬戸山博子、考藤達哉	消化器・肝臓内科	第3巻第3号	2018年
Immunity against hepatitis B virus and HBV vaccines.	Doi, H, Morikawa K, Kanto T	eLS	9780470015902. a0026254, doi: 10.1002	2018年1月
Hepatitis Action Plan and Changing Trend of Liver Disease in Japan: Viral Hepatitis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.	Kanto T, Yoshio S.	Euroasian J Hepatogastroenterol.	7(1), 60-64	2017年
【B型肝炎の現状とワクチン定期接種化の意義】 B型肝炎ワクチンの成人における接種の現状とその意義(解説/特集)	土肥弘義、考藤達哉	化学療法の領域	33(11): 2168-2173	2017年
Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study	Razavi-Shearer D et al. (Tanaka J: 196人中175番目)	The LANCET Gastroenterology & Hepatology		in press
Hepatitis B virus core-related antigen levels predict progression to liver cirrhosis in hepatitis B carriers	Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kobayashi N, Akita T, Tanaka J	Jorunal of Gastroenterology and Hepatology	33(4) 918-925	2018年
肝炎医療コーディネーターの活動実態調査研究—広島県および全国調査の結果から—	杉山文、海嶋照美、坂宗和明、田中純子	肝臓	59(1) 33-40	2018年
Viral eradication reduces both liver stiffness and steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection who received direct-acting antiviral therapy	Tada T, Kumada T, Toyoda H, Sone Y, Takeshima K, Ogawa S, Goto T, Wakahata A, Nakashima M, Nakamuta M, Tanaka J	Alimentary Pharmacology & Therapeutics	47(7) 1012-1022	2018年
A seroepidemiological survey of the effect of hepatitis B vaccine and hepatitis B and C virus infections among elementary school students in Siem Reap province, Cambodia	Fujimoto M, Chuon C, Nagashima S, Yamamoto C, Ko K, Svay S, Hok S, Lim O, Ohisa M, Akita T, Katayama K, Matsuo J, Takahashi K, Tanaka J	Hepatology Research	48(3) E172-E182	2018年

研究発表及び特許取得報告について

Pilot study for hepatitis virus screening among employees and effective approach to encourage screened positive employees to receive medical care in Japan	Sugiyama A, Fujii T, Nagashima S, Ohisa M, Yamamoto C, Channarena C, Akita T, Matsuo J, Katayama K, Takahashi K, Tanaka J	Hepatology Research	48(3) E291-E302	2018年
Post-treatment levels of α -fetoprotein predict long-term hepatocellular carcinoma development after sustained virological response in patients with hepatitis C	Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Yama T, Tanaka J	Hepatology Research	47(10) 1021-1031	2017年
Reduced prevalence of hepatitis B surface antigen positivity among pregnant women born after the national implementation of immunoprophylaxis for babies born to hepatitis B virus-carrier mothers in Japan	Sugiyama A, Ohisa M, Nagashima S, Yamamoto C, Channarena C, Fujii T, Akita T, Katayama K, Kudo Y, Tanaka J	Hepatology Research	47(12) 1329-1334	2017年
Viral Eradication reduces all-Cause Mortality, Including non-Liver-Related Disease, in Patients With Progressive Hepatitis C Virus-Related Fibrosis	Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Yama T, Tanaka J.	J Gastroenterol Hepatol.	32(3) 687-694	2017年
Clustering infection of hepatitis B virus genotype B4 among residents in Vietnam, and its genomic characters both intra- and extra-family	Matsuo J, Do SH, Yamamoto C, Nagashima S, Chuon C, Katayama K, Takahashi K, Tanaka J	PLOS ONE	12(7) e0177248	2017年
Differences in the impact of prognostic factors for hepatocellular carcinoma over time	Toyoda H, Kumada T, Tada T, Yama T, Mizuno K, Sone Y, Maeda A, Kaneoka Y, Akita T, Tanaka J	Cancer Science	108(12) 2438-2444	2017年
Progression of liver fibrosis is associated with non-liver-related mortality in patients with nonalcoholic fatty liver disease	Tada T, Kumada T, Toyoda H, Mizuno K, Sone Y, Akita T, Tanaka J	Hepatology Communications	1(i9) 899-910	2017年

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
乾燥濾紙血法 (DBS) を用いたB型肝炎病態関連宿主ゲノム解析法の開発	瀬戸山博子、西田奈央、土浦貴代、溝上雅史、佐々木裕、田中純子、考藤達哉	第54回肝臓学会総会	大阪	2018年6月
ウイルス肝炎撲滅に向けて-世界と日本の現状	考藤達哉	第28回抗ウイルス療法学会	札幌	2018年6月
Critical role of B cell lineage in dictating response and non-response to hepatitis B vaccine	Doi, H, <u>Kanto T, et al.</u>	The Liver Meeting 2017: Annual Meeting of AASLD.	Washington, DC	2017年10月
健康成人集団におけるB型肝炎ワクチンによるHBs抗体獲得機序の検討-B細胞関連マーカーの意義	土肥弘義、考藤達哉、他	第53回日本肝臓学会総会	広島	2017年6月
B型肝炎ワクチンによる抗体獲得における免疫細胞ダイナミクス的重要性	土肥弘義、考藤達哉、他	第21回日本肝臓学会大会	福岡	2017年10月
Distribution of HCV genotype and estimation of HCV genome mutation rate per year in Cambodia and Vietnam	Yamamoto C, Nagashima S, Svay S, Hok S, Do HS, Chuon C, Fujii H, Fujimoto M, Katayama K, Takahashi K, Tanaka J	24th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses(HCV2017)	マサチューセッツ(America)	2017年9月
Prevalence of hepatitis B virus infection and characteristics of HBV genomes by full-length genome analysis among adult population in Cambodia	Channarena Chuon、山本周子、Ko Ko、Muzembo Basilua Andre、Somana Svay、Sirany Hok、大久真幸、秋田智之、片山恵子、松尾順子、高橋和明、田中純子	第53回日本肝臓学会総会	広島	2017年6月
HBV prevalence in Vietnam	Tanaka J	United States-Japan Cooperative Medical Science Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (招請講演)	北京 (China)	2018年1月

研究発表及び特許取得報告について

HBV prevalence estimated by nationwide survey in Cambodia	Tanaka J	ANRS Cambodian site scientific days (招請講演)	Phnon Penh (Cambodia)	2018年1月
---	----------	--	-----------------------	---------

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
めざせ肝臓撲滅！C型肝炎は飲み薬で治癒を目指せます	考藤達哉、加藤直也、早坂章、田中武継	朝日新聞 (座談会)	千葉県、東京都	2017年12月27日 (朝刊)
B型肝炎ウイルス (HBV) の母子感染防止を目指す 大規模な血清疫学調査がカンボジアでスタート ～広島大学、カンボジア健康科学大学、カンボジア保健省、WHO、CDC の国際共同研究プロジェクト～	田中純子	広島県内主要メディア (新聞・TV) への記者会見	広島大学	2017年3月9日
「肝炎ウイルス検査の推進、国際共同研究 (カンボジア) の内容について」	田中純子	FMちゅーピー『節子の部屋』	広島市	2017年7月3日、2017年7月10日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者 (申請者) (共願は全記載)	登録日 (申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。