

ウイルス母子感染防止に関する調査研究

HCV 母子感染の prospective study

分担研究者 白木和夫 鳥取大学小児科
研究協力者 長田郁夫 村上 潤 飯塚俊之 細田淑人
鳥取大学医学部小児科

要約：HCV 浮遊密度と HCV 母子感染成立の機序を検討する目的で HCV 粒子の浮遊密度、quasispecies の母子間での比較を検討した。1992 年 6 月から 1998 年 12 月までの期間で妊婦 21,791 例に対しスクリーニングを行った。127 例(0.58%)が抗体陽性であり、そのうち HCV-RNA が 84 例に検出された。HCV-RNA 陽性妊婦より出生した児のうち経過観察が可能であった児 68 例(双子 1 組を含む)のうち 7 例(10%)に HCV 感染が確認されている。妊婦の HCV RNA 量が多いことが感染の risk factor となっている。HCV 母子感染例を対象に、臨床経過、超遠心による HCV 浮遊密度の測定、cloning による Hypervariable region(HVR)のアミノ酸配列の検討を行った。母子間の比較で、乳児期早期の HVR の検討で homogeneous な場合と heterogenous な場合があり、minor clone だけではなく、major clone も母子感染し得ることが示唆された。HCV 抗体価と %Top の推移から、移行抗体と児に感染したウイルスが反応しているものの十分に中和されていないと考えられた。経時的な HVR の検討から児の免疫機構を逃れた escape mutant の出現すると感染が持続し、major clone が排除され残った minor clone のウイルス量が少ないと一過性感染に終わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの我々の前方視的疫学調査によると、C型肝炎ウイルス(HCV)母子感染はほぼ10%に成立することが明らかになっている。今回の研究は母子感染の感染要因を調査研究し、将来の感染防止の基礎的資料とすることを目的とする。

HCVには1つの個体の中で様々なcloneが存在する状態(quasispecies)が知られている。またHCV粒子には浮遊密度の異なる粒子、すなわち密度の小さいfreeのウイルスと密度の大きい免疫複合体を形成した粒子が存在し、その比率により感染性が異なること、病態により比率が変化することが知られている。我々はHCV浮遊密度とHCV母子感染成立の機序を検討する目的でHCV粒子の浮遊密度、quasispeciesの母子間での比較を検討した。

B. 研究方法

1992年6月から1998年12月までの期間で妊婦21,791例に対しスクリーニングを行った。127例(0.58%)が抗体陽性であり、そのうちHCV-RNAが84例に検出された。HCV-RNA陽性妊婦より出生した児のうち経過観察が可能であった児68例(双子1

組を含む)のうち7例(10%)にHCV感染が確認されている。7例のうち1例は1年未満でdrop outした。残りの6例のうち5例にトランスアミナーゼの上昇が見られ、うち1例は2年以上高値が持続した。生後15ヶ月以降HCV-RNA陰性となった一過性感染例が1例認められた。他の5例は感染が持続している。risk factor としては妊婦のHCV RNA量が多いこと、その他は引き続き検討中である。

HCV母子感染例を対象に、血清ALT値、血清中HCV-RNA量(nested RT-PCR, bDNA)を経時的に測定した。Hijikataらの方法に準じ血清を比重1.063のNaCl溶液に重層、超遠心し、上層1ml(Top fraction)と、pelletを含む下層1ml(Bottom fraction)とに分離した。Top fractionとBottom fractionのHCV RNA量をRT-PCRの限界希釈法により測定し、Topと全HCV RNA量比(%Top)を経時的に求めた(1)。Top, Bottom fractionの各々についてEnomotoら(2)の方法に準じて、母子ともにTop・Bottomそれぞれより15 cloneずつをcloningし、Hypervariable region(HVR)のアミノ酸配列を決定、比較検討した。また児のHVRのアミノ酸配列を経時的に検討した。

C. 研究結果、考察

a. 母子間でのHVRの比較検討

Case 1では生後2ヶ月時のBottomのcloneのみHVRの解析が行えた(Table 1)。生後2ヶ月時には1種類のcloneのみ検出された。このcloneは母親の分娩時にはTop, Bottomに検出された。Case 2では生後1ヶ月時のTop, Bottomに3種類のclone(2A, 2B, 2G)が共通して見られた(Table 2)。この3種類のcloneと、Bottomにのみみられたcloneのうち2Fが母親の分娩時にも認められた。Top, Bottomに分布の違いは認めなかった。

Case 1は2ヶ月時のcloneがhomogeneousであったが、Case 2では1ヶ月時のcloneはheterogenousとなっていた。minor cloneだけではなく、major cloneも母子感染し得ることが示唆された。

母子感染におけるHCV粒子の浮遊密度の関与については、Top, Bottomのpopulationに差は見られなかったことから、はっきりとした傾向は認めなかった。

b. 母子感染例におけるHCV抗体価と%Topの推移 (Figure 1,2)

生下時より高値であったHCV抗体価が生後3-4ヶ月時に一時低下した後上昇し、同時期に%Topが最高値となり、その後低下した。新生児期の免疫能は未熟であるにもかかわらず生下時よりHCV抗体価が高値であり、新生児にはHCVに反応し得る母親の移行抗体が存在すると考えられた。HCV抗体価と%Topの推移から、移行抗体と児に感染したウイルスが反応しているものの十分に中和されていないと考えられた。

c. 母子感染例におけるHCV quasispeciesの推移

< 持続感染例(Figure 1) > 持続感染例はALT 100 IU/L前後が18ヶ月続いた。HCV抗体価は生下時より高値であり、生後6ヶ月頃に一時的に低値となった後上昇した。逆に%Topは生下時低値で生後6ヶ月まで上昇した後低下した。HCV-RNAは生後10ヶ月時に一時的に低下した以外は高値を持続していた。

肝機能障害が増悪しHCV RNA titerが一時的に低下した後に、生後2-4ヶ月に優位であったclone(Group A)がほぼ消失した。このcloneは児の免疫機構により排除されたと考えられた。

4ヶ月時に新たにTopの優位を占めたclone(Group B)がHCV RNA titerが一時的に低下した後に多数を占めたことから、この新たに出現したcloneが児の免疫機構を逃れescape mutantとして持続感染に関与することが示唆された。

< 一過性感染例(Figure 2) > 一過性感染例は3ヶ月時にALT 125 IU/Lを頂値とし、以後正常化した。HCV抗体価は生下時より高値であり、生後3ヶ月頃に一時的に低値となった後上昇した。逆に%Topは生下時低値で生後3ヶ月まで上昇した後低下した。HCV-RNAは生後3ヶ月時に頂値となった後減少し、生後15ヶ月以降はRT-PCR法で検出されなくなった。生後1ヶ月時のcloneの1つ(Group A)が、血清ALT値のピークである生後3ヶ月時にはTop, Bottomのmajor cloneとなった。このmajor cloneは生後6ヶ月には消失し、全体のウイルス量・Topの比率とも低下し、生後1ヶ月時のminor clone(Group B,C)がmajor cloneとなっていた。RNA titerは低下し、生後15ヶ月以降はRT-PCR法で検出されなくなった。major cloneが排除され、残ったminor cloneのウイルス量が少ないと一過性感染に終わる可能性が示唆された。

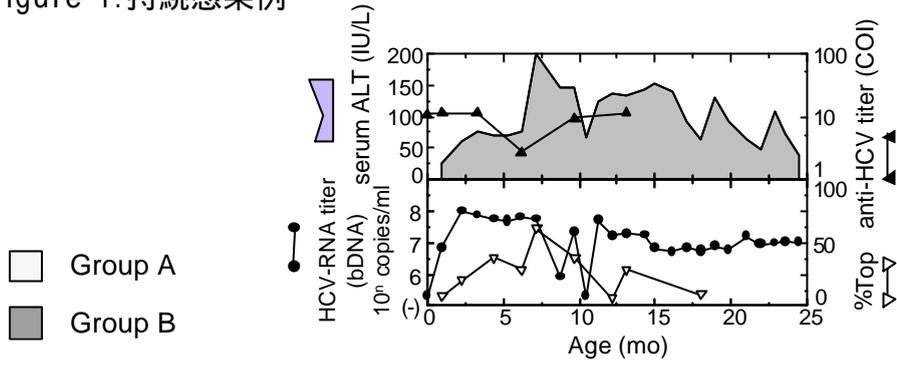
Table 1. Evolution of HVR clones in Case 1

a. Mother at delivery	b. Case 1 at the age of 2 months
<i>Top fraction</i>	
1A :E.H.T....A...R: 9	Undetectable
1C :.....A...R: 2	
1B :.....: 2	
1D :EAH.T..K.....: 2	<i>Bottom fraction</i>
	1B :ATRTIGGEAGRTTG:15
<i>Bottom fraction</i>	
1A :E.H.T....A...R: 4	
1B :.....: 8	
1E :.....V.....: 1	
1F :QS.....AS: 2	

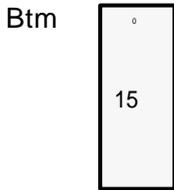
Table 2. Evolution of HVR clones in Case 2

a. Mother at delivery	b. Infant at the age of 1 month
<i>Top fraction</i>	
<u>2A</u> :.....: 2	<u>2A</u> :RTTMSFARFFAPGA: 5
<u>2F</u> :.....S.L.N...: 2	<u>2B</u> :..ASGLT.L.S...: 4
<u>2C</u> :.....L.N...: 1	<u>2G</u> :HAASGLT.....P: 6
<u>2B</u> :..ASGLT.L.S...: 1	
<u>2D</u> :.A.S.LT.L.....: 2	<i>Bottom fraction</i>
<u>2E</u> :Y..S....L.K...: 1	<u>2A</u> :.....: 1
<u>2G</u> :HAASGLT.....P: 5	<u>2F</u> :.....S.L.N...: 6
<u>2H</u> :HAASGLT..L...P: 1	<u>2B</u> :..ASGLT.L.S...: 1
	<u>2Q</u> :.AASGLT.L.S...: 1
<i>Bottom fraction</i>	<u>2G</u> :HAASGLT.....P: 6
<u>2F</u> :.....S.L.N...: 1	
<u>2J</u> :.....S.L.N..P: 1	
<u>2K</u> :H..S....L.K...: 1	
<u>2L</u> :H.AS.LT.L....P: 1	
<u>2G</u> :HAASGLT.....P: 7	
<u>2M</u> :.S....SSL.T...: 1	
<u>2I</u> :.....SSL.T...: 3	

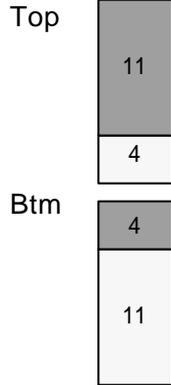
Figure 1: 持續感染例



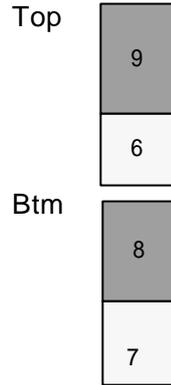
a. At 2 mo of age
Top fraction
not detected by
HVR PCR



b. At 4 mo of age



c. At 9 mo of age



d. At 12 mo of age

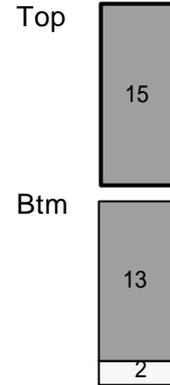
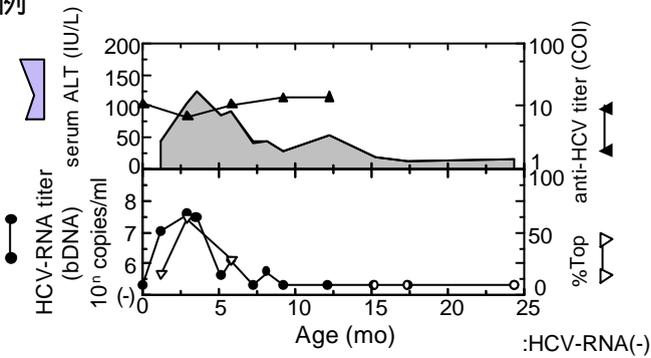
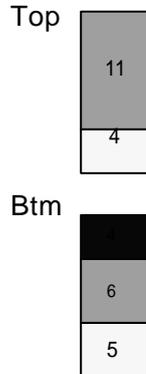


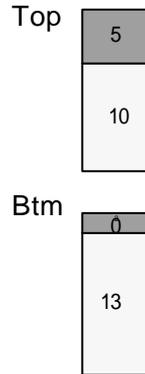
Figure 2: 一過性感染例



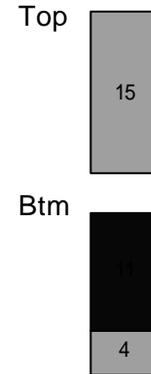
a. At 1 mo of age



a. At 3 mo of age



a. At 6 mo of age



Group A
Group B
Group C