輸血後 B 型肝炎の防止における HBc 抗体検査導入の意義

小安美佐子 伊丹 直人 神田 裕三

埼玉県立がんセンター臨床検査部 (現 埼玉県立精神保健総合センター検査部)

(平成 4 年 11 月 6 日受付)

THE SIGNIFICANCE OF INTRODUCTION OF ANTI-HBc (ANTIBODY TO HEPATITIS B CORE ANTIGEN) ASSAY IN PREVENTING FOR POST-TRANSFUSION HEPATITIS B

Misako Koyasu*, Naohito Itami and Yuzo Kanda

Department of Laboratory Medicine, Saitama Cancer Center

*present: Clinical Laboratory Department, Saitama Comprehensive Mental Health Center

Since November 1989, the blood centers in Japan have introduced anti-HBc assay of the blood unit for transfusion in addition to HBs-Ag assay so far carried out, in attempting at the further reduction of the incidence of post-transfusion hepatitis B which still occurred sporadically in recent years.

In Saitama Cancer Center where the authors were working, there developed five cases of post-transfusion hepatitis B during 2 and a half years preceeding the introduction of anti-HBc assay. The blood units from the recipients all contained high-titered anti-HBc ($\geq 2^{10}$) in these cases. And in two of them, the authors could successfully demonstrated that hepatitis B transmitted by the blood units from the recipients by means of assay and comparison of HBV DNA sequence between the patient and the recipient.

For 3 years since the introduction of anti-HBc assay, not a single case of post-transfusion hepatitis B has developed in Saitama Cancer Center. From these results the authors discuss that the introduction of anti-HBc assay of the blood unit for transfusion was very significant.

はじめに

わが国の血液センターでは1976年以来、逆受身赤血球凝集法 (RPHA 法) による B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面抗原 (HBs 抗原) のスクリーニングを採用した。それにより輸血後 B 型肝炎は著減したが、稀に発生がみられてきた。その発生を更に減らすために1989年11月より輸血用血液に対し、HBs 抗原の検出に加えて HBc 抗体検査を導入した。

今回、輸血用血液に HBc 抗体検査を採用した前後の期間において、当センターでの輸血後 B 型肝炎の発生状況をその前後で比較した結果、HBc 抗体検査導入による充分な意義を認めたので報告する。

対象と方法

輸血用血液に対する HBc 抗体検査を、血液セ

ンターでは1989年11月から全国一斉に導入したが、当センターの供給元である埼玉県赤十字血液センターでは、それに先がけて1988年12月中旬から全面的に導入を試みている。従ってその導入前 (1986年5月から1988年10月までの2年6カ月間) と導入後 (1989年1月から1991年12月までの3年間) に輸血を受けた人を対象に、輸血後 B 型肝炎の発生状況を比較検討した。

導入前は2,038人に78,746単位、導入後は2,338人に91,904単位の輸血が行われた。導入前・後の期間において、輸血後6カ月以上生存した患者は各々1,309人 (64.2%)、1,553人 (66.4%) であり、輸血単位数は各々36,181, 48,070であった。これらの輸血の中から、導入前に5例の輸血後 B 型肝炎が発生し、合計271単位が輸血されていた。

これらの輸血後 B 型肝炎患者と、その感染源と

表1 輸血後B型肝炎発症例のHBV関連マーカー

症例	年齢 性	原疾患	輸血 単位数	ALT	HBsAg		HBe	IgM HBcAb
					RPHA	subtype	Ag/Ab	
1	41F	上咽頭腫瘍	6	1936	+	adw	-/-	+
2	14F	急性骨髄性白血病	124	2233	+	adw	-/-	+
3	64M	悪性リンパ腫	10	2620	+	adw	-/-	+
4	71M	胃腫瘍	17	>1000	+	n.t	n.t	n.t
5	44F	悪性リンパ腫	114	2740	+	n.t	n.t	+

(1986.5—1988.10)

考えられる供血者血液の同定をするためにHBVマーカーの検索を行った。HBs抗原はRPHA法および酵素抗体法(EIA法)、HBs抗体は受身赤血球凝集法(PHA法)、subtypeはEIA法¹⁾、HBe抗原・抗体はEIA法、HBc抗体は凝集阻止反応(HI法²⁾)、IgMクラスHBc抗体はEIA法³⁾でそれぞれ測定した。またHBV-DNAはポリメラーゼ連鎖反応⁴⁾(PCR法)を用いて測定した。

〔PCR法によるpre-core領域の増幅方法〕

血清100μlからDNAをフェノールクロロホルムで抽出後、エタノール沈澱を行い、TE緩衝液で溶解した。次に示すオリゴヌクレオチドプライマーの20-mer(5'-CATAAGAGGACTCT-TGGACT-3':プラス鎖HBV-DNAで1653—1672迄の塩基)と24-mer(5'-AAAGAATTCAGAAGGCAAAAAAGA-3':マイナス鎖HBV-DNAで1949—1972迄の塩基、アンダーラインのTはEcoRIの切断部位を作るためにGからTに換えた)を合成した。

この合成プライマーを用いて30サイクルのPCR法により、pre-core領域(HBV-DNAの1814—1900塩基部位)を増幅した。増幅したHBV-DNAをEcoRIとHincIIの酵素で切断し、また同様に両酵素で切断したM13mp11バクテリオファージを用いてクローニングした。クローン化したHBV-DNAのpre-core領域(1814—1900塩基部位)の塩基配列をディデオキシチェーンターミネーション法により解析した。

結 果

1. HBc抗体検査導入前の輸血後B型肝炎の発生状況

1986年5月から2年6カ月間に発生した輸血後

表2 輸血後B型肝炎患者に使用されたHBc抗体陽性血液のHBV関連マーカー

症例	輸血 単位数	HBc 抗体(2 ⁹)	HBs 抗原(OD)	HBe Ag/Ab
1	6	12	0.069(-)	-/-
		10	0.083(-)	-/-
2	124	10	0.102(-)	-/-
		10	0.189(+)	-/+
3	10	12	0.090(-)	-/+
4	17	10	0.053(-)	-/+
5	114	10	0.580(+)	-/+

B型肝炎は5例(5/1,309・0.4%)でHBV関連マーカーの測定結果を表1に示した。

全例とも輸血前のHBs抗原(EIA法)およびHBc抗体は陰性であった。ALTのピーク時ではいずれの症例もHBs抗原、IgMクラスHBc抗体が陽性となり、B型急性肝炎と診断された。

これら5例に用いられた供血者血液271単位の中で、HBs抗体陰性でHBc抗体価が2⁶以上のものが7検体認められた。その結果を表2に示す。この7検体のうち、HBs抗原がEIA法で陽性となったものは2検体であり他の5検体は陰性であった。輸血後B型肝炎を起こした5例に使われた供血者血液には、HBc抗体価が2¹⁰以上の血液が少なくとも1単位含まれていた。

症例3は劇症肝炎により死亡した例である(図1)。患者(64歳、男)は悪性リンパ腫で制癌剤(CHOP)の治療中、1988年2月に新鮮凍結血漿10単位の輸血をうけている。その供血者血液中に、HBc抗体価の高い(2¹²)検体が1単位存在し、この血液からHBs抗原(EIA法)は検出されなかったが、PCR法でHBV-DNAが検出された。感染源確認のために、患者と供血者の双方からの

図1 輸血によるHBV感染で劇症肝炎に至った症例3の臨床経過

HBV-DNAの核酸配列の比較検討を行った。

同様に症例5についても検討を行った。

2-1 症例3とその供血者血液中の核酸配列の比較

患者および供血者血液の血清検体からHBV-DNAを抽出し、M13ファージベクターに組み込みクローニングを行った⁴⁾。解析したクローンの数は患者分で11、供血者分で12である。得られた

クローンをHBV-DNAのpre-core, s gene領域について解析し、比較検討した。

その結果、pre-core領域では患者と供血者双方から2種類の同じsequenceが得られた(図2-1)。即ち1つはpre-core領域の83番目の核酸G→Aのpoint mutationでTrp→Stop codonに変化した株であった。また他の株は26番目の後に2つの核酸G, Tのinsertionがあり、アミノ酸配

HBV DNA clones			变 異 型	
		pre-core 变 異 株	I	II
患 者	11	11 (100%)	1	10
供血者	12	12 (100%)	4	8

図2-1 患者(症例3)と供血者血液より得られた2種類のHBV-DNA cloneのpre-core領域における核酸配列の比較

を示す検体が1単位含まれていた。この供血者血液と患者からのHBV-DNAを各々11, 32クローンについて、pre-core領域について解析した。あわせて43クローンすべてが83番目の核酸G→Aのpoint mutationを起こし、Trp→Stop codonに変異した株であり、双方の核酸配列が一致し、感染の因果関係が判明した(図3)。なお本症例は劇症化しなかった。

症例3, 5に用いられた供血者血液中に含まれていたHBVは、HBe抗原を分泌できない株で、しかもHBs抗原は低力価でありながらHBc抗体は高力価を示す株であった。そしてこのようなHBe抗原を産生できないpre-core欠損株に感染した例の中から、症例3の劇症肝炎例が発生した。

3. HBc抗体導入後の追跡調査

血液センターでは1989年11月からHBc抗体検査のスクリーニングを開始した。当センターではその約1年前からHBc抗体陽性血液を除外した輸血を行ってきた。1989年1月から1991年12月までの3年間、受血者の追跡観察を行った。その間の受血者2,338名のうち、輸血後6カ月以上生存した患者は1,553名(66.4%)で48,070単位を使用していた。観察期間の1992年6月までの間に輸血後B型肝炎を発症した例は認められなかった。

この結果は、HBc抗体のスクリーニング以前の輸血後B型肝炎の発症率0.4%(5/1,309)と以後の発生率0.0%(0/1,553)とでは統計的に有意に差を認めた($p<0.05$)。

考 察

HBs抗原陽性血液が輸血後B型肝炎の原因となるという大河内の指摘以来、全国の血液センターでHBs抗原のスクリーニングが行われ、輸血後B型肝炎は激減した。しかしながら、稀ながらも依然として輸血後B型肝炎は発生していた。その原因となった供血者血液中には、低濃度のHBs抗原が存在していた。このようなHBs抗原の低濃度のHBV株は多くの場合、HBe抗原を産生できないpre-core欠損株⁴⁾であった。

この稀な輸血によるHBV感染でB型肝炎急性肝炎を起こした例の中で、重症化あるいは劇症肝炎例は、最近の研究からhost側の因子もあろうが、

ウイルス側の因子としてpre-core欠損株、即ちHBe抗原を産生できないHBV株が大きな要因であることが解ってきている⁶⁾。

一方、HoofnagleらはHBV carrierは高力価のHBc抗体を維持している⁷⁾ことを示したが、自験例のようなHBs抗原価の低い症例でもHBV carrierである限り、HBc抗体価はかなり高力価を維持していることが飯塚ら²⁾により示されている。この事は逆にHBc抗体が高力価を示すような血液の中には、HBs抗原が検出されないような低濃度のHBV carrierが存在することを示唆している。従って高力価のHBc抗体を保有する血液を輸血に用いなければ、現在稀に発生している輸血後B型肝炎を防止することが出来るであろうとの予測から、血液センターでは1989年11月からHBc抗体のスクリーニングを開始した。

当センターでは、HBc抗体検査の導入前と後とで受血者の追跡観察を行ったが、導入前は受血者の0.4%程度の輸血後B型肝炎の発生をみた。導入後ではそれより長い期間、患者数も1,553名とより多い集団を観察しているが、輸血後B型肝炎の発生は認められていない。このようにHBc抗体検査の導入は、その前後での輸血後B型肝炎の発生頻度が示すように統計上有意を認め($p<0.05$)、輸血後B型肝炎の防止に大きな効果のあることを示している。

しかし、HBs抗原もHBc抗体も検出されないHBV感染初期の血液は、現行の検査体制では除去できない。このような血液による輸血後B型肝炎がどの程度発生し得るのか、今後も追跡観察していく必要があろう。

む す び

1. 輸血後B型肝炎を発症した受血者に用いられた供血者血液中には、HBc抗体価の高い($\geq 2^{10}$)例が含まれていた。

2. 高力価のHBc抗体陽性を示す血液を除外した輸血を行ってから、輸血後B型肝炎の発生は認められなくなった。

謝辞 本研究にご協力頂いた埼玉県赤十字血液センター、同研究部、自治医科大学予防生態の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) Usuda, S., Tsuda, F., Gotanda, T., Tachibana, K., et al.: A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies. *J. Immunol. Method*, 87: 203—210, 1986.
 - 2) Iizuka, H., Ohmura, K., Ishijima, A., Satoh, K., et al.: Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang*, 63: 107—111, 1992.
 - 3) Shimizu, M., Ohyama, M., Takahashi, Y., Udo, K., et al.: Immunoglobulin M antibody against hepatitis B core antigen for the diagnosis of fulminant type B hepatitis. *Gastroenterology*, 84: 604—610, 1983.
 - 4) Okamoto, H., Yotsumoto, S., Akahane, Y., Yamanaka, T., et al.: Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J. Virol.*, 64(3): 1298—1303, 1990.
 - 5) Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., et al.: Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J. Virol.*, 61(10): 3030—3034, 1987.
 - 6) Kojima, M., Shimizu, M., Tsuchimochi, T., Koyasu, M., et al.: Posttransfusion fulminant hepatitis B associated with precored defective HBV mutants. *Vox Sang*, 60: 34—39, 1991.
 - 7) Hoofnagle, J.H., Gerety, R.J., Ni, L.Y. and Barker, L.F.: Antibody to hepatitis B core antigen. *New Eng. J. Med.*, 290(24): 1336—1340, 1974.
-