



Title	腎臓移植後のB型肝炎ウイルス再活性化の検討
Author(s)	山田, 錬
Description	配架番号 : 2720
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14985号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14985
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88825
Type	doctoral thesis
File Information	YAMADA_Ren.pdf



学位論文

腎臓移植後の B 型肝炎ウイルス再活性化の検討

(Investigation of hepatitis B virus reactivation in
kidney transplant patients)

2022 年 3 月

北海道大学

山田 錬

学位論文

腎臓移植後の B 型肝炎ウイルス再活性化の検討

(Investigation of hepatitis B virus reactivation in
kidney transplant patients)

2022 年 3 月

北海道大学

山田 錬

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
研究方法	10 頁
研究結果	19 頁
考察	27 頁
結論	31 頁
謝辞	32 頁
利益相反	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Ren Yamada, Kenichi Morikawa, Kiyohiko Hotta, Daiki Iwami, Tatsu Tanabe, Sachiyo Murai, Nobuo Shinohara, Sonoe Yoshida, Shunichi Hosoda, Akinori Kubo, Yoshimasa Tokuchi, Takashi Kitagataya, Megumi Kimura, Masato Nakai, Takuya Sho, Goki Suda, Mitsuteru Natsuizaka, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto.

Incidence of hepatitis B virus reactivation in kidney transplant patients with resolved hepatitis B virus infection

American Journal of Transplantation (投稿中)

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. Ren Yamada, Kenichi Morikawa, Naoya Sakamoto

Incidence of hepatitis B virus reactivation in kidney transplant patients with or without resolved HBV infection

第28回日本消化器関連学会週間、2020年11月5日～11月8日、神戸

要 旨

【背景と目的】

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) は、ヘパドナウイルス科に属する不完全二本鎖環状 DNA (relaxed circular DNA; rcDNA) を有するウイルスである。肝細胞に感染するために、HBV はまず HBV 特異的な受容体を介して肝細胞の表面から侵入し、細胞質内に取り込まれる。肝細胞への侵入後、rcDNA は HBVヌクレオカプシドから放出され、核内へ移行し、宿主の DNA 修復酵素を用いて完全閉鎖二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) に変換される。cccDNA から pregenomic RNA (pgRNA) を含む 4 本の mRNA が転写され複数の HBV 蛋白が翻訳され、HBV の複製が行われる。cccDNA は宿主クロモソームに囲まれて存在しており安定性が非常に高く、長期にわたり HBV 複製の供給源となるため、HBV の持続感染の鍵となる分子である。

HBV ワクチンが存在しているにも関わらず、HBV 感染症は世界的な健康問題となっている。HBV は、宿主の免疫系を回避して持続的な感染を確立し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因となっており、HBV キャリアは世界中で 2 億 5,000 万人以上と推定されている。本邦では、人口の約 1% が HBV キャリアであり、HBV 既往感染者は人口の約 20~30% と推定されている。

腎移植は、末期腎不全の唯一の根治的治療法である。本邦における 2019 年の腎移植数は 2,057 人と年々増加傾向にあるが、献腎移植登録数は 12,505 人であり相対的なドナー不足の状態である。移植実施数の増加に伴いドナー臓器の安全性の向上が求められている。HBV 既往感染者では、cccDNA は完全に体内から除去されずに長期間にわたって肝組織内に残存しているが、腎臓内に潜伏性または持続性の HBV 感染が存在するかの知見はない。したがって、HBV 既往感染者のドナー腎による HBV 感染リスクの可能性は否定できない。Mahboobi らは、HBc 抗体陽性ドナー腎を使用した腎移植後のレシピエントの HBV セロコンバージョン率に関するメタアナリシス解析を行った。1,385 人の腎不全患者を対象とした 9 つの研究を解析しており、腎移植後の HBV マーカーのセロコンバージョン率の合計は 3.24% であった (45/1,385: HBs 抗原 (n=4)、HBc 抗体 (n=32)、HBs 抗体 (n=5)、HBc 抗体または HBs 抗体のいずれか (n=4))。

腎移植患者は、移植後の維持期にステロイド剤、代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤などの複数の免疫抑制剤を併用している。化学療法や免疫抑制療法を受けた HBV 既往感染者において、HBV の再活性化による肝炎を発症した症例報告がなされている。化学療法や免疫抑制剤による二次的な HBV の再活性化は、劇症肝炎を引き起こす可能性があるため、その防止は重要な課題である。腎移植後の免疫抑制剤による HBV 既往感染レシピエントにおける HBV 再活性化の割合はおおよそ 2.9~6.5% である。HBV 既往感染者の腎臓内に HBV が潜伏または持

続的に存在すると仮定すると、ドナーが HBV 既往感染者の場合、腎移植を介して HBV が感染する可能性がある。本研究の目的は、①HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエント (A 群)、②HBV 既往感染レシピエント (B 群)、の腎移植後の HBV 再活性化の現状を明らかにすることである。

【対象と方法】

北海道大学病院で 1996 年 8 月から 2019 年 12 月までに腎移植が施行された 340 症例のドナーとレシピエントを対象とし、臨床背景や血中 HBV ステータスの変化、HBV 再活性化の頻度を後ろ向きに解析した。2019 年 9 月から 2021 年 8 月にかけて腎移植に関連する腎生検が施行された症例の中で、HBV 既往感染ドナー腎を使用した 32 症例の腎組織中の cccDNA を測定した。HBV の腎組織内での複製を評価するために、ヒト胎児腎細胞株である HEK293T 細胞およびヒト近位尿細管細胞株である HK-2 細胞へ HBV ゲノムを含むプラスミドを用いてトランスフェクション実験を行った。また、肝細胞と腎細胞における HBV 増殖能を比較するために、HEK293T 細胞とヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞へ HBV プラスミドをトランスフェクションし、トランスフェクション効率を補正した上で HBV 蛋白や pgRNA の発現量を比較検討した。

【結果】

HBs 抗原陽性ドナーは認められなかったが、レシピエントでは 5 症例が HBs 抗原陽性であった。HBV 既往感染者はドナーが 70 症例 (33%、70/212)、レシピエントが 73 症例 (27.4%、73/266) であった。全ての症例で免疫抑制剤が 3 剤以上使用されていた。HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへ腎移植が施行された 45 症例のうち、1/45 症例 (2.2%) で HBc 抗体の陽性化、1/45 症例 (2.2%) で HBV-DNA の陽性化が認められた。HBV 既往感染レシピエントの 63 症例のうち、3/63 症例 (4.8%) で HBV の再活性化がみられた。いずれの症例においても免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドラインに従い HBV 再活性化対策を行った結果、肝炎の発症は認めなかった。

HBV 既往感染ドナー腎を使用した 32 症例の腎生検検体の cccDNA 測定したところ、A 群の血中 HBV-DNA が定性陽性化した 1 症例から cccDNA が 3.2log copies/ug で検出された。

HBV プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞および HK-2 細胞の培養上清に HBs 抗原、HBe 抗原、HBcr 抗原の分泌が確認された。HBV プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞と HepG2 細胞の HBV 蛋白や pgRNA の発現量を eGFP 陽性細胞で補正すると、いずれも HEK293T 細胞での発現量が低いことが確認された。

【考察】

HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへの移植では、HBV ステ

タスの陽性化率は、HBc 抗体で 2.2% (1/45) 、HBV-DNA で 2.2% (1/45) であり、HBV 検出において最も感度の高いとされる HBV-DNA レベルでの報告はこれまでになく、本研究が新規の報告になる。また、HBV 既往感染レシピエントにおける腎移植後の HBV 再活性化率は 2.9-6.5%と報告されており、既報と同等の結果であった。

HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへの移植群で血清 HBV-DNA が定性陽性化した症例の腎生検検体から cccDNA が検出され、HBV 既往感染ドナーの腎組織に潜伏していた HBV が移植時にレシピエントへ伝播した可能性があると考えられた。HBV プラスミドを腎細胞株へトランスフェクションし、その後の HBV 分泌蛋白を確認し、腎細胞が HBV 複製能を有すると考えられたが、肝細胞株に比べて HBV 蛋白の発現量は低く、腎細胞は肝細胞に比べて HBV 複製能が低いと考えられた。

【結論】

HBV 既往感染レシピエントにおける HBV 再活性化の頻度は既報と同等であった。HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへ腎移植が施行された症例のうち、1/45 症例(2.2%)で HBc 抗体の陽性化、1/45 症例 (2.2%) で HBV-DNA の陽性化が認められた。HBV-DNA 陽性化症例の腎生検検体から cccDNA が検出され、HBV 既往感染者における HBV の腎潜伏感染の可能性が示唆されたが、HBV に関連した肝炎の発症はなく、比較的安全であると考えられた。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

ALT, alanine aminotransferase

AST, aspartate aminotransferase

BAX, basiliximab

cccDNA, covalently closed circular DNA

DR, direct repeat

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium

ETV, entecavir hydrate

GAPDH, Rodent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HBc, hepatitis B core

HBcr, hepatitis B core related

HBe, hepatitis B e

HBs, hepatitis B surface

HBV, hepatitis B virus

HCV, hepatitis C virus

HIV, human immunodeficiency virus

HLA, human leukocyte antigen

HNF4 α , Hepatocyte nuclear factor 4 alpha

MMF, mycophenolate mofetil

MP, methylprednisolone

ND, no data

NTCP, sodium taurocholate co-transporting polypeptide

pCMV-eGFP, plasmid cytomegalo virus-enhanced green fluorescent protein

pgRNA, pregenomic RNA

PPAR α , Peroxisome proliferator activated receptor alpha

rEGF, recombinant epidermal growth factor

rcDNA, relaxed circular DNA

RXR α , Retinoid X receptor alpha

TAC, tacrolimus

TAF, tenofovir alafenamide,

緒 言

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) は、ヘパドナウイルス科に属する不完全二本鎖環状 DNA (relaxed circular DNA; rcDNA) を有するウイルスである (Grzegorzewska et al., 2016 ; Hoofnagle et al., 2007)。肝細胞に感染するために、HBV はまず HBV 特異的受容体である sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) を介して肝細胞表面から侵入し、細胞質内に取り込まれる (図 1)。肝細胞への侵入後、rcDNA は HBV ヌクレオカプシドから放出され、核内移行し、宿主 DNA 修復酵素を用いて完全閉鎖二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) に変換される。cccDNA から pregenomic RNA (pgRNA) を含む 4 本の mRNA が転写、複数の HBV 蛋白が翻訳され、HBV の複製が行われる。cccDNA は宿主クロモソームに囲まれて存在しており安定性が非常に高く、長期にわたり HBV 複製の供給源となるため、HBV の持続感染の鍵となる分子である。 (Morikawa et al., 2016)。

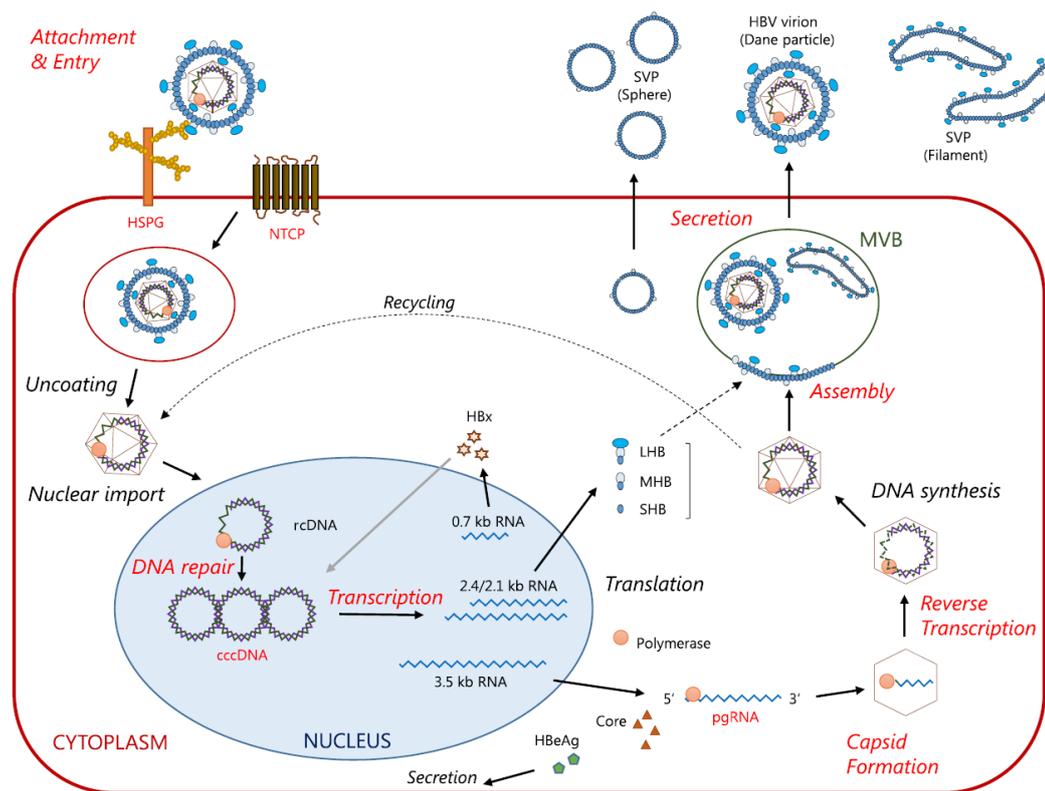


図 1. B型肝炎ウイルスの生活環 (Morikawa et al., 2016) より引用)

HBV ワクチンが存在しているにも関わらず、HBV 感染症は世界的な健康問題

となっている。HBV は、宿主免疫系を回避して持続的な感染を確立し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因となっている。母子感染による垂直感染、乳幼児期の水平感染、医療行為や性交渉などによる水平感染が主な感染経路となる。成人における HBV 初感染の大部分は一過性感染で経過するが、一部慢性化し、キャリアとなる。免疫応答の未発達な乳幼児期に垂直感染や水平感染により HBV に感染すると、9 割以上の症例で HBV 持続感染が成立する。大部分は、免疫応答が発達する思春期頃に肝炎を発症するが、若年期に hepatitis B e (HBe) 抗原陽性から HBe 抗原陰性へと HBe セロコンバージョンを起こして非活動性キャリアとなり、病態が安定する。一部の症例では、hepatitis B surface (HBs) 抗原が消失し、HBs 抗体が出現する HBs セロコンバージョンがおこり、臨床的寛解へと至る。1990 年代に開始された HBV ユニバーサルワクチン接種プログラムにより、世界的には急性 HBV 感染の発生率と慢性キャリアの有病率が低下しているが (Chen et al., 2004; Hsu et al., 2004; Kao et al., 2002; Ni et al., 2016; Roberts et al., 2016)、HBV キャリアは世界中で 2 億 5,000 万人以上 (World Health Organization, 2017)、本邦では人口の約 1% が HBV キャリアであり、HBV 既往感染者は人口の約 20~30% と推定されている (Kusumoto et al., 2009; Urata et al., 2011)。近年、母子感染以外の感染者数が予想以上に多いことや、HBV 既往感染者でも免疫抑制状態で潜伏感染した HBV が再活性化することで重症肝炎を発症することが明らかになってきた。これらの知見の蓄積により、日本では予防接種法が改正され、2016 年 10 月から 1 歳未満の乳児に対する HBV ワクチンの全国接種が開始された。HBV 既往感染者の多くは、HBc 抗体と HBs 抗体の両方が陽性であるが、中には hepatitis B core (HBc) 抗体陽性または HBs 抗体のみが陽性の患者もいる。HBs 抗体単独陽性 (HBs 抗原陰性かつ HBc 抗体陰性) 例においても、HBV の再活性化は報告されており、ワクチン接種歴が明らかな場合を除き、ガイドラインに従った対応が推奨されている (Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, 2020)。

腎移植は、末期腎不全の唯一の根治的治療法である。本邦における 2019 年の腎移植数は 2,057 人と年々増加傾向にあるが、献腎移植登録数は 12,505 人であり相対的なドナー不足の状態である (図 2) (石井., 2020)。

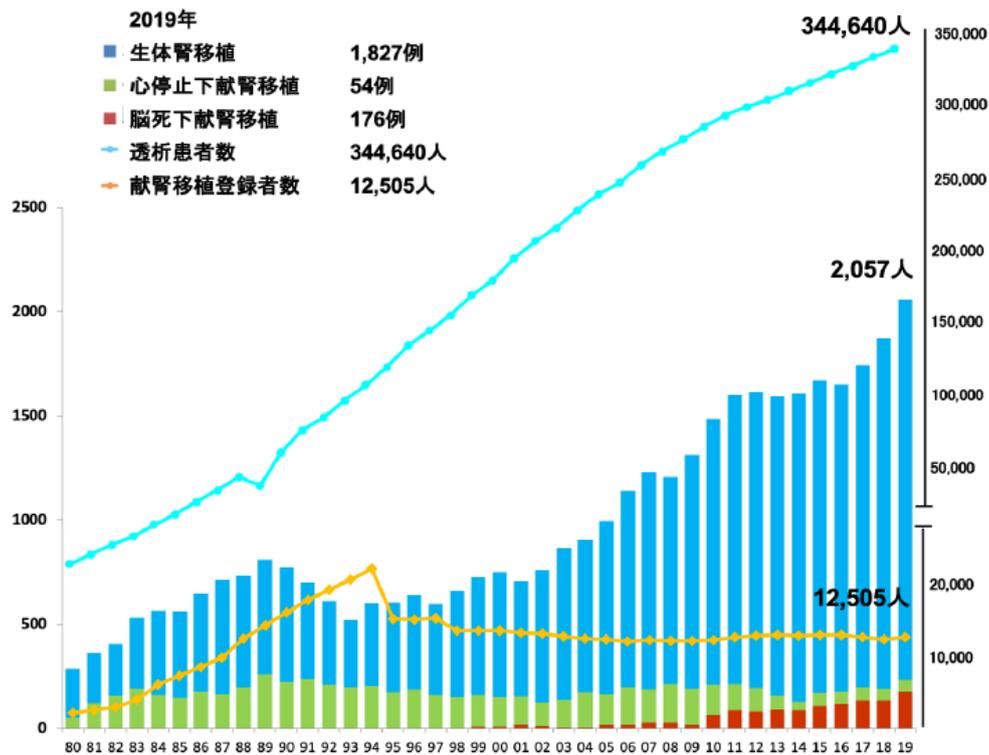


図 2. 本邦における腎移植数の推移 (石井., 2020 より引用)

移植数の増加の最大の要因は生体腎移植数の増加であり、血液型不適合移植や高齢者の移植が増加していることが挙げられる。移植実施数の増加に伴い、ドナー臓器の安全性の向上が求められている。日本臓器移植ネットワークのレシピエント選択基準にはC型肝炎について記載があるもののB型肝炎に関する詳細な記載はない(日本臓器移植ネットワーク 腎臓移植希望者選択基準 2021年4月1日改正版)。生体腎移植のドナーガイドラインではドナーとして全身性活動性感染症を伴わないことと記載されているが詳細な記載がないのが現状である(両角 他., 2014)。Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO)の報告では、HBs抗原陽性のドナーからHBV未感染のレシピエントへの移植は、血液を介したHBV感染のリスクがあるため禁忌とされている(Chadban et al., 2020)。HBV既往感染者では、cccDNAは完全に体内から除去されずに長期間にわたって肝組織内に残存するが、腎臓内に潜伏性または持続性のHBVが存在するかの知見はない。したがって、HBV既往感染者のドナー腎臓内にHBVが潜伏または持続的に存在すると仮定すると、ドナーがHBV既往感染者の場合、腎移植を介してHBVが感染する可能性がある。

Mahboobiらは、HBc抗体陽性ドナー腎を使用した腎移植後のレシピエントのHBVセロコンバージョン率に関するメタアナリシス解析を行った。1,385人の

腎不全患者を対象とした9つの研究を解析しており、腎移植後のHBVマーカーのセロコンバージョン率の合計は3.24%であった(45/1,385:HBs抗原(n=4)、HBc抗体(n=32)、HBs抗体(n=5)、HBc抗体またはHBs抗体のいずれか(n=4)) (Mahboobi et al., 2012)。HBc抗体陽性のドナーからの移植で、HBV未感染のレシピエントのみを対象とした報告では、HBs抗原で0.4% (1/185)、HBc抗体で2.2% (4/185)、HBs抗体で1.6% (3/185)と、4.3% (8/185)でHBVマーカーのセロコンバージョンが観察された。(Akalin et al., 2005; De feo et al., 2006; Satterthwaite et al., 1997; Veroux et al., 2005; Wachs et al., 1995)。ただしこれらの報告ではドナーのHBV感染を把握するための最も感度の高い検査とされるHBV-DNAの測定は施行していない。

腎移植患者は、移植後の維持期にステロイド剤、代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤などの複数の免疫抑制剤を併用している。化学療法や免疫抑制療法を受けたHBV既往感染者において、HBVの再活性化による肝炎を発症した症例報告がなされている(Hui et al., 2006; Kim et al., 2013; Kusumoto et al., 2009; Kusumoto et al., 2011; Oketani et al., 2012; Yeo et al., 2009)。化学療法や免疫抑制剤による二次的なHBVの再活性化は、劇症肝炎を引き起こす可能性があるため、その防止は重要な課題である。腎移植後の免疫抑制剤によるHBV既往感染レシピエントにおけるHBV再活性化の割合はおよそ2.9~6.5%である(Chen et al., 2013; Kanaan et al., 2012; Querido et al., 2019)。

本研究の目的は、①HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエント、②HBV既往感染レシピエント、の腎移植後のHBV再活性化の現状を明らかにすることである。また、腎移植患者の腎生検検体のcccDNA測定や腎細胞株へHBVプラスミドのトランスフェクション実験を施行し、HBVの腎臓への感染の可能性について検討した。

研 究 方 法

1. 患者

①北海道大学病院で1996年8月から2019年12月までに腎移植が施行された340症例のドナーとレシピエントを対象とした。HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエント群（A群）とHBV既往感染レシピエント群（B群、ドナーのHBVステータスは問わない）に分類して、血清HBVステータスおよび臨床背景とHBV再活性化の関連性を調べた。

②2019年9月から2021年8月にかけて腎移植に関連する腎生検が施行された症例の中で、HBV既往感染ドナー腎を使用した32症例の腎組織中のcccDNAを測定した。

(1) 対象患者

ドナー：北海道大学病院において腎臓移植施行の腎臓提供者。

レシピエント：北海道大学病院において腎臓移植施行の患者。

(2) 選択基準

① 同意取得時において年齢が20歳以上の患者

② 本試験参加について、試験参加前に本人に十分な説明を行い、本人による同意文書が得られた患者

③ 腎臓のドナーが以下の除外基準に抵触しない方

④ 腎臓のレシピエントが以下の除外基準に抵触しない方

(3) 除外基準

① コントロールの困難な心疾患（心筋梗塞、心不全、不整脈等）のある患者

② 核酸アナログ製剤に過敏症の既往歴のある患者

③ 添付文書にある併用禁忌の薬剤を投与中の患者

④ その他、主治医が本検討に際し、参加が不相当であると判断した患者

⑤ その他、研究責任者が被験者として不相当と判断した患者

・ HBVステータス取得困難

・ ドナー、レシピエントともにHBV未感染

・ HBs抗原陽性レシピエント

・ HBVワクチン接種歴を有するHBs抗体単独陽性者

・ 複数回の腎移植患者

本研究は、北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行われ（IRB-015-0014 お

よび IRB-019-0075)。全ての対象患者に 1964 年ヘルシンキ宣言に拠るヒトを対象とする医学研究の倫理原則に基づきインフォームドコンセントを行い、書面での同意を得た。この研究は UMIN 臨床試験に登録している (UMIN000040545)。

2. 研究の方法

- (1) 研究の種類・デザイン
過去起点コホート観察研究
- (2) 観察および検査項目とその実施方法

以下の項目について、腎移植ドナーは移植前 1 回のみ、腎移植レシピエントは 3 ヶ月～一年毎に観察および検査を実施し、そのデータを本研究に利用する。8) は本研究のために実施するものであり、測定のために採血量が約 7ml 増加する (トータル最大 292 ml / 10 年間)。1)～7)、9) はすべて日常診療で実施される項目であり、その頻度も日常診療と同等である。

【診療情報】 性別、年齢、身長、肝組織診断、既往歴、内服歴、腎疾患、透析歴、脳死・生体の種類、HLA ミスマッチ、クロスマッチ陽性、血液型不適合の有無、輸血歴、拒絶反応、グラフト不全

【血液等検査項目】

- 1) ウイルス側因子：HBV-DNA、HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体
- 2) 末梢血液検査：WBC、WBC 分画、Hb、Plt
- 3) 肝機能検査：aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)
- 4) 生化学検査：LDH、BUN、総ビリルビン、直接ビリルビン、ALP、 γ -GTP、総タンパク、アルブミン、クレアチニン、Na、K、Cl
- 5) (任意) 肝線維化・腫瘍マーカー：P-III-P、ヒアルロン酸、IV 型コラーゲン 7S、M2BPGi、AFP
- 6) 耐糖能関連検査：空腹時血糖、インスリン、HbA1c、脂質代謝検査：TC、LDL-C、TG
凝固能検査
- 7) (任意) フィブロスキャンによる肝硬度測定
- 8) 保存血清 7ml
- 9) 肝・腎画像検索：腹部超音波検査・CT・MRI 等 (年 1 または 2 回)

【腎生検組織検査項目】

下記の項目を泌尿器科で行われる移植腎の病理組織診断に使用する一部を本研究に利用する。生検試料の一部を使用するため、本研究のための、追加腎組織の採取は行わない。

- 1) HBV 完全閉鎖 2 本鎖 DNA (covalently closed circular DNA : cccDNA)

表1. 検査測定場所および観察期間

項目	測定場所	観察間隔
血液一般検査	○	3ヶ月毎
肝機能検査	○	3ヶ月毎
生化学検査	○	3ヶ月毎
肝線維化マーカー	△	6ヶ月毎
腫瘍マーカー	△	3ヶ月毎
脂質代謝検査	○	3ヶ月毎
耐糖能関連検査	○	3ヶ月毎
ウイルス側因子（但し HBc 抗体は初回のみ）	○	1年毎
血清保存（7mL）	●	3ヶ月毎
フィブロスキャン測定	△	1年毎
腎組織中 cccDNA	■	不定期

●：保存血清 ○：院内測定 △：可能な限り実施する

■：腎組織（HBV cccDNA：消化器内科研究室にて測定）

(3) 被験者の研究参加予定期間

各被験者は同意後、外来受診時、または入院時参加する。

(4) 研究終了後の対応

本研究終了後は、この研究で得られた成果も含めて、研究責任者は被験者に対し最も適切と考える医療を提供する。

3. HBV マーカー測定

血清 HBs 抗原測定は Architect HBs 抗原 QT assay kit (Abbott Japan, Tokyo, Japan) (検出域 0.05-250 IU/mL) で行なった。検出限界上限を超えた検体では、1: 20 から 1: 500 の段階希釈法を用い、250-125,000 IU/mL までの測定を行なった。血清 HBs 抗体、HBc 抗体はそれぞれ Architect Anti-HBs assay kit, the Architect HBc assay kit (Abbott Japan, Tokyo, Japan) で測定した。血清 HBV DNA 値の測定はリアルタイム PCR 法 (Cobas Taqman HBV Auto v2 or the Cobas 6800/8800 systems, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) (検出感度 2.1 log₁₀ copies/mL 以上) を用いた。

4. 分析方法

1996年8月から2019年12月までに腎移植が施行された340症例のドナーとレシピエントを対象とした。HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエント群(A群)とHBV既往感染レシピエント群(B群)に分類して、血清HBVステータスおよび臨床背景とHBV再活性化の関連性を調べた。患者背景、血液学的データ、ウイルス学的データを検討した。HBV再活性化の定義は、HBs抗原の陽転化もしくはHBV-DNA検出感度以上への増加(HBV-DNA 20IU/mL(1.3 Log IU/mL、または2.1 log copies/mL)以上とした(楠本他., 2018)。肝逸脱酵素の上昇は、血清ALT値が100IU/Lを超えて3倍以上に上昇した場合と定義した(Lee et al., 2018)。

5. 腎組織中cccDNA測定

2019年9月から2021年8月にかけて腎移植に関連する腎生検が施行された症例の中で、HBV既往感染ドナー腎を使用した32症例の腎組織中のcccDNAを測定した。

試薬及び材料

2-mercaptoethanol(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、All protect Tissue Reagent(QIAGEN, Tokyo, Japan)、AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini(QIAGEN, Tokyo, Japan)、TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Tokyo Japan)、フォワード・リバープライマー、cccDNA TaqManプローブ(Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)。

pUC-D-IND (genotype D; deposited into GenBank with accession number AB246347)は、Sugiyamaらが作成した野生型の1.24倍長のHBVゲノムを含むHBV発現プラスミドを供与頂いた(Sugiyama et al., 2006)。

DNA抽出:腎生検からAllPrep® DNA/RNA/Protein Miniを用いて以下の方法で行った。

- ①検体をAll protect Tissue Reagentに浸透させ、試薬中の組織を2-8°Cで一晩インキュベートした後、組織を試薬から取り出して-80°Cで保存
- ②Buffer RLT 600 μ L、2-mercaptoethanol 6 μ L、5.0 mm ジルコニアビーズを加え、2.0 mL 破砕用 tube に検体を入れ、ビーズクラッシャー(μ T-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて60秒間 x 2で腎組織を破砕
- ③13,300 rpm、3分間室温で遠心し、上清を2 mL collection tube 中にセットしたAllPrep DNA スピンカラムに入れ、13,300 rpm、30秒間、室温遠心

し、ろ液を廃棄

④AllPrep DNA スピンカラムを新しい microtube にセットし、500 μ L の Buffer AW1 を AllPrep DNA スピンカラムに添加し、13,300 rpm、15 秒間、室温遠心し、ろ液を廃棄

⑤500 μ L の Buffer AW2 を AllPrep DNA スピンカラムに添加し、13,300 rpm、2 分間、室温で遠心し、ろ液を廃棄

⑥AllPrep DNA スピンカラムを新しい microtube にセットし、13,300 rpm、1 分間、室温遠心し、ろ液を廃棄

⑦AllPrep DNA スピンカラムを新しい microtube にセットし、20 μ L の Buffer EB を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、室温で1分間インキュベートした後に13,300 rpmで1分間、室温で遠心した。同作業を2回行った。DNAを含む溶出液を回収

⑧DNAの濃度測定は、分光光度計(DS-11 Spectrophotometer, DeNovix)を用いて行った。

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Real time polymerase chain reaction)

cccDNAはTaqMan® real-time PCRを用いて測定した。cccDNAは完全な二本鎖DNAであるが、relaxed circular DNA(rcDNA)は、マイナス鎖の直接反復(direct repeat;DR)1とプラス鎖のDR2の近くにギャップが存在する(Nassal., 2015)。プライマーをDR1とDR2の外側に設定することで、rcDNAの伸長反応は途中で止まるため、cccDNAに特異的なプライマーとなる。TaqMan® real-time PCRでは、pUC-D-INDのプラスミドDNAからウイルスのコピー数を算出し、定量用の検量線を作成したところ、検出限界は 1.08×10^2 copies/ μ gであった。

本研究では、2つのオリゴヌクレオチドプライマー、フォワードプライマー(5'-CTCCCCGTCTGTGCCTTCTC-3'、nt1545~nt1564)およびリバースプライマー(5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGAA-3'、nt1863~nt1882)、およびTaqManプローブ(5'-FAM-CCGTGTGCACTTCGCTTCACC-TAMRA-3'、nt1575~nt1595)を用いてcccDNAを測定した。PCRは、抽出したDNA、TaqMan® Fast Advanced Master Mix、各プライマー300nmol、プローブ250nmolを用いて行った。cccDNAの増幅は以下のように行った。

① 200 μ L 96-well plate に、TaqMan® Fast Advanced Master Mix 10 μ l・フォワードプライマー 0.4 μ l・リバースプライマー 0.4 μ l・TaqMan プローブ 1 μ l・DNA sample 1 μ l・Nuclease-free Water 7.2 μ lを加え、計 20 μ lに調整。

② 50°Cで2分間、次に94°Cで10分間、その後94°Cで15秒、60°Cで1分間を

35 サイクルの条件で the Step One Plus (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いて定量的 PCR を行った。pUC-D-IND を 10 段階に希釈し、スタンダードカーブを作成し、定量した。

6. 腎細胞株への HBV プラスミドトランスフェクション

試薬及び材料

10%FBS (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、100 U/mL ペニシリン、100 ug/mL ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、Keratinocyte-SFM (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、P3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、pUC-CAT (genotype C; deposited into GenBank with accession number AB246375) は、Sugiyama らが作成した野生型の 1.24 倍長の HBV ゲノムを含む HBV 発現プラスミドを供与頂いた (Sugiyama et al., 2006)。

HK-2 細胞 (ヒト腎近位尿細管細胞株) は北海道大学大学院医学研究院 免疫・代謝内科学教室 中沢大悟先生より供与頂いた。

細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 (HEK293T) は、10%FBS、100 U/mL ペニシリン、100 ug/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/高グルコースで培養した。HK-2 細胞 (ヒト腎近位尿細管細胞株) は recombinant epidermal growth factor (rEGF) およびウシ下垂体抽出物を添加した Keratinocyte-SFM で培養した。細胞培養は、95%の空気と 5%の CO₂ で加湿し 37°C で維持した。

トランスフェクション: Lipofectamine 3000 を用いて施行した。

- ① 5.0×10^5 個の HEK293T 細胞および HK-2 細胞を 6 well collagen coat に散布
- ② Opti-MEM Medium 125 μ l と Lipofectamine 3000 Reagent 7.5 μ l を混合
- ③ pUC-CAT 2.5 μ g と Opti-MEM Medium 125 μ l を混合した後に P3000 Reagent 5 μ l と混合。ネガティブコントロールとして HBV ゲノムが入っていない pcDNA を pUC-CAT と同量で使用した。
- ④ ②③ をそれぞれ 125 μ l ずつ混合して室温で 10 分間インキュベート
- ⑤ 細胞散布から 24 時間経過した well に ④ の混合液を 250 μ l ずつ滴下
- ⑥ 細胞散布 72 時間後に培養上清を回収した。

HBV マーカー測定:

SRL 社に委託して培養上清の HBs 抗原、HBe 抗原、hepatitis B core

related(HBcr)抗原の測定を行った。

7. 腎細胞および肝細胞のHBV分泌蛋白およびpgRNA産生の比較検討

試薬及び材料

10%FBS (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、100 U/mL ペニシリン、100 ug/mL ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、P3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)、plasmid cytomegalo virus-enhanced green fluorescent protein(pCMV-eGFP)(Addgene, Tokyo, Japan)、

pUC-CAT(genotype C ; deposited into GenBank with accession number AB246375)は、Sugiyama らが作成した野生型の 1.24 倍長のHBV ゲノムを含むHBV 発現プラスミドを供与頂いた (Sugiyama et al., 2006)。

2-mercaptoethanol(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、QIAshredder(QIAGEN, Tokyo, Japan)、AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini(QIAGEN, Tokyo, Japan)、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)、TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Tokyo Japan)、Gene Expression Assays (Rodent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH))(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)、フォワード・リバースプライマー、pgRNA TaqManプローブ (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)。

pUC-D-IND (genotype D ; deposited into GenBank with accession number AB246347) は、Sugiyama らが作成した野生型の 1.24 倍長のHBV ゲノムを含むHBV 発現プラスミドを供与頂いた (Sugiyama et al., 2006)。

細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 (HEK293T) およびヒト肝癌細胞 (HepG2) は、10%FBS100 U/mL ペニシリン、100 ug/mL ストレプトマイシンを添加したDMEM/高グルコースで培養した。細胞培養は、95%の空気と5%のCO₂で加湿し37°Cで維持した。

トランスフェクション : Lipofetamine 3000 を用いて施行した。

① 5.0×10^5 個の HEK293T 細胞および HepG2 細胞を 6 well collagen coat に散布

②Opti-MEM Medium 125 μ l と Lipofectamine 3000 Reagent 7.5 μ l を混合

③pUC-CAT 1 μ g と pCMV-eGFP 0.5 μ g、Opti-MEM Medium 125 μ l を混合した後

に P3000 Reagent 3 μ l と混合

④②③をそれぞれ 125 μ l ずつ混合して室温で 10 分間インキュベート

⑤細胞散布から 24 時間経過した well に④の混合液を 250 μ l ずつ滴下

⑥細胞散布 72 時間後に蛍光顕微鏡による蛍光度観察でトランスフェクション導入効率を比較計算した。

⑦細胞ペレットおよび培養上清を回収した。

HBV マーカー測定：

SRL 社に委託して培養上清の HBs 抗原、HBe 抗原、HBcr 抗原の測定を行った。トランスフェクション導入効率を補正した値を算出するために、eGFP 陽性細胞の比率を元に計算した。

RNA 抽出：回収した細胞から AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini を用いて以下の方法で行った。

①Buffer RLT 600 μ L、2-mercaptoethanol 6 μ L を加え、ボルテックス

②2.0 mL collection tube にセットした QIAshredder スピンカラムに添加し、13,300 rpm、2 分間室温で遠心

③ホモジナイズしたライセートを 2 mL collection tube 中にセットした AllPrep DNA スピンカラムに入れ、13,300 rpm、30 秒間、室温遠心

④③のろ液に 100%エタノール 400 μ l を加えピペッティングにより混和

⑤サンプルを 2 mL collection tube 中にセットした RNeasy スピンカラムに入れ、13,300 rpm、15 秒間、室温遠心し、ろ液を廃棄

⑥500 μ L の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、13,300 rpm、15 秒間、室温遠心し、ろ液を廃棄

⑦500 μ L の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、13,300 rpm、2 分間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。

⑧RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセットし、13,300 rpm、1 分間、室温遠心し、ろ液を廃棄

⑨RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセットし、50 μ L の RNeasy free water を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、室温で 1 分間インキュベートした後に 13,300 rpm で 1 分間、室温で遠心し、RNA を含む溶出液を回収

⑩RNA の濃度測定は、分光光度計 (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix) を用いて行った。

cDNA 合成：High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて以下の手法にて行った。

① 10 \times RT buffer・dNTP・Random Primer・Transcriptase・RNase

inhibitor・RNA サンプル・RNase free water が計 20 μ L となるように調製し、サーマルサイクラーにセット。25 $^{\circ}$ C10 分、37 $^{\circ}$ C120 分、85 $^{\circ}$ C5 分、

4°Cでインキュベーションを行い cDNA を合成した。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) :

pgRNA は TaqMan® RT-qPCR を用いて測定した。本研究では、2つのオリゴヌクレオチドプライマー、フォワードプライマー (5' -CGCGTCGCAGAAGATCTCAA-3') およびリバースプライマー (5' -AGCCCCGTAAAGTTTCCCAC-3')、および TaqMan プローブ (5' -FAM-TCGGGAATCTCAATGTTAGTATCCC-TAMRA-3') を用いて pgRNA を測定した。

①200 μ L 96-well plate に、TaqMan® Fast Advanced Master Mix 10 μ l・フォワードプライマー 0.4 μ l・リバースプライマー 0.4 μ l・TaqMan プローブ 1 μ l・cDNA template 1 μ l・Nuclease-free Water 7.2 μ l を加え、計 20 μ l に調整。GAPDH の発現を各サンプルのインターナルコントロールとして使用した。GAPDH は、TaqMan® Fast Advanced Master Mix 10 μ l・Gene expression assay 1 μ l・cDNA template 1 μ l・Nuclease-free Water 7.2 μ l を加え、計 20 μ l に調整した。

②95°C 20 秒を 40 サイクル、95°C 1 秒、60°C 20 秒を 40 サイクルの条件で the Step One Plus (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いて定量的 RT-PCR を行った。

トランスフェクション導入効率を補正した値を算出するために、eGFP 陽性細胞の比率を元に pgRNA の発現量を計算した。

8. 統計解析

培養実験データは平均値と標準偏差で表した。2 群での検定には、student t-test を用いた。統計解析には、解析ソフトである Prism 8.4.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用し、P 値は 0.05 未満で有意差ありと判定した。

研 究 結 果

1. レシピエントの患者背景

対象症例 340 症例のうち、HBV 既往感染者はドナーが 70 症例 (33%、70/212)、レシピエントが 73 症例 (27.4%、73/266) であった。HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへ腎移植が施行された症例は 45 症例 (A 群)、HBV 既往感染レシピエントは 63 例 (B 群) が登録された (図 3)。各群のレシピエントの移植時の臨床背景を表 2 にまとめた。B 群は HBV 既往感染レシピエント群であり高齢で透析期間が長い傾向にあった。両群すべての症例で 3 種類以上の免疫抑制剤が使用されていた。ステロイドの使用率は A 群で 84.4% (38/45)、B 群で 90.5% (57/63)、リツキシマブの使用率は A 群で 40.0% (18/45)、B 群で 33.3% (21/63)、移植後の輸血は A 群で 42.2% (19/45)、B 群で 41.3% (26/63) で施行されていた。移植時、B 群の HBs 抗体陽性者は 57 人 (90.5%、57/63)、HBc 抗体陽性は 43 人 (68.3%、43/63) であった。レシピエントの中で HBs 抗原や HBV-DNA の陽性者はいなかった。B 群に hepatitis C virus (HCV) 抗体陽性者を 2 人確認したが、いずれの症例も HCV-RNA は陰性であった。

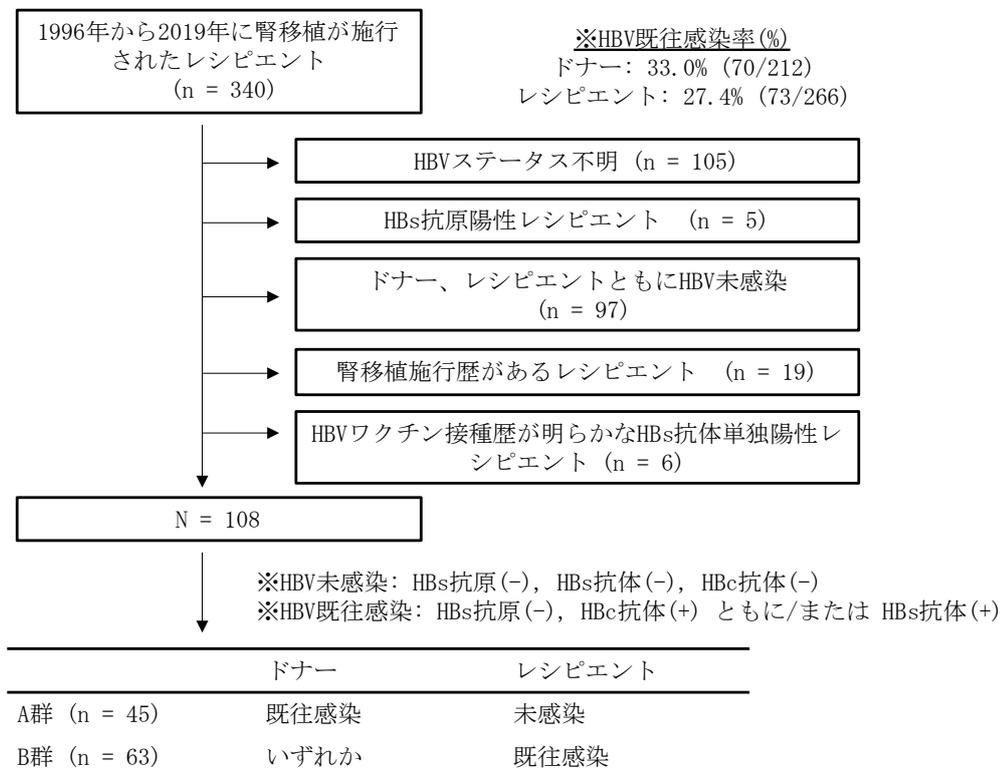


図 3. 対象患者

表 2. レシピエントの患者背景

	A 群 (n = 45)	B 群 (n = 63)
年齢, 歳 (中央値, 範囲)	39 (4-64)	56 (10-69)
性別 (男性/女性)	27/18	33/30
糖尿病, n (%)	8 (17.8%)	14 (22.2%)
高血圧, n (%)	23 (51.1%)	36 (57.1%)
虚血性心疾患, n (%)	1 (2.2%)	6 (9.5%)
肝硬変, n (%)	0 (0.0%)	1 (1.6%)
腎疾患, n (%)		
糖尿病性腎症	8 (17.8%)	6 (9.5%)
腎硬化症	3 (6.7%)	2 (3.2%)
糸球体腎炎	14 (31.1%)	25 (39.7%)
嚢胞腎	3 (6.7%)	13 (20.6%)
ネフローゼ症候群	3 (7.7%)	1 (1.6%)
その他	16 (35.6%)	16 (25.3%)
腎移植前の透析, n (%)		
血液透析	23 (51.1%)	43 (68.3%)
腹膜透析	4 (8.9%)	6 (9.5%)
平均透析期間, 日	819	2069
ドナーの種類 (生体/脳死)	45/0	55/8
HLA ミスマッチ, 平均 ± SD	2.7 ± 1.3	3.4 ± 1.6
ABO 不適合, n (%)	12 (26.7%)	20 (31.7%)
クロスマッチ陽性, n (%)	3 (6.7%)	3 (4.8%)
免疫抑制剤, n (%)		
バシリキシマブ	42 (93.3%)	61 (96.8%)
タクロリムス	43 (95.6%)	55 (87.3%)
シクロスポリン	7 (15.6%)	14 (22.2%)
ミコフェノール酸モフェチル	45 (100%)	63 (100%)
メチルプレドニゾロン	38 (84.4%)	57 (90.5%)
リツキシマブ	18 (40.0%)	21 (33.3%)
ウイルスマーカー, n (%)		
HBs 抗原	0 (0.0%)	0 (0.0%)
HBs 抗体	0 (0.0%)	57 (90.5%)
HBc 抗体	0 (0.0%)	43 (68.3%)
HBV-DNA	0 (0.0%)	0 (0.0%)
HCV 抗体	0 (0.0%)	2 (3.2%)
HIV 抗体	0 (0.0%)	0 (0.0%)
観察期間, 日 (平均, 範囲)	3081 (60-2430)	2984 (15-6390)
腎移植後の輸血, n (%)	19 (42.2%)	26 (41.3%)
拒絶反応, n (%)	9 (20.0%)	14 (22.2%)
グラフト不全, n (%)	3 (6.7%)	2 (3.2%)
死亡, n (%)	1 (2.2%)	1 (1.6%)

Abbreviations: HBc, hepatitis B core; HBs, hepatitis B surface; HBs, hepatitis B surface; HBV-DNA, hepatitis B virus-DNA; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leukocyte antigen; SD, standard deviation.

2. 腎移植後の HBV ステータスの変化

腎移植後に肝逸脱酵素の上昇を認めた症例は少数であり、両群ともに HBV に関連する肝炎の症例は認めなかった（表 3）。A 群の HBV 既往感染ドナーから HBV 未感染レシピエントへ腎移植が施行された 45 症例のうち、1/45 症例（2.2%）で HBc 抗体の陽性化、1/45 症例（2.2%）で HBV-DNA の陽性化が認められた。B 群の HBV 既往感染レシピエント 63 症例のうち、3/63 症例（4.8%）で HBV の再活性化がみられた。

表 3. 腎移植後の HBV ステータスの変化

n (%)	A 群 (n = 45)	B 群 (n = 63)
セロコンバージョン		
HBs 抗原	0 (0.0%)	2 (3.2%)
HBs 抗体	0 (0.0%)	0 (0.0%)
HBc 抗体	1 (2.2%)	0 (0.0%)
HBV-DNA	1 (2.2%)	2 (3.2%)
肝逸脱酵素の上昇	4 (8.9%)	3 (4.8%)
HBV 関連肝炎	0 (0.0%)	0 (0.0%)
肝不全	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Abbreviations: HBc, hepatitis B core; HBs, hepatitis B surface; HBs, hepatitis B surface; HBV-DNA, hepatitis B virus-DNA.

HBV ステータスのセロコンバージョンを起こした 5 症例の特徴と転帰を表 4 に示す（表 4）。A 群の症例 No. 1 では、ドナーは HBs 抗体と HBc 抗体の両方が陽性であったが、HBV-DNA は陰性であった。レシピエントは腎移植時に HBc 抗体陰性であったが、腎移植から 3 年後に HBc 抗体が陽性化した。輸血などの他の経路の HBV 感染を疑う病歴はなかった。その後の経過観察では、他の HBV ステータスの変化はなく、肝炎の発症はなかった。A 群の症例 No. 2 は、同じく輸血歴はなく、他の HBV 感染に関連する明らかな危険因子がない症例であった。ドナーは HBs 抗体と HBc 抗体が陽性であったが、HBV-DNA は陰性であった。レシピエントは腎移植 2 ヶ月後に HBV-DNA が定性陽性となったが、腎移植 4 ヶ月後に HBV-DNA は陰性化し、他の HBV ステータスの変化や肝炎の発症はなく経過観察となっている（図 4）。B 群の HBV 再活性化の 3 例は、免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドラインに従い HBV 再活性化対策を行った結果、肝炎の発症は認めなかった (Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, 2020)。症例 No. 3 は、HBs 抗原と HBV-DNA の両方が陽性化した。腎移植 15 年後に顔面神経麻痺に対するステロイド治療前の HBV 評価採血で HBs 抗原と HBV-DNA が陽性であることが判明した。HBV-DNA は 7.3 log copies/mL と高値であり、テノホビル・アラフェナミド (tenofovir alafenamide, TAF) に

表 4. 腎移植後 HBV のステータスがセロコンバージョンした 5 症例

	年齢 (歳)	性別	ドナーの HBV ステータス			レシピエントの HBV ステータス			腎移植後 輸血歴	免疫抑制剤	HBV ステータス セロコンバージョン	セロコン バージョン 期間(年)	肝炎	抗ウイルス 治療
			HBs 抗体	HBc 抗体	HBV DNA	HBs 抗体	HBc 抗体	HBV DNA						
A 群														
No. 1	58	男	+	+	-	-	-	ND	-	TAC+MMF+MP+BAX	HBc 抗体	3	-	経過観察
No. 2	49	女	+	+	-	-	-	-	-	TAC+MMF+MP+BAX+ Rituximab	HBV-DNA	0.2	-	経過観察
B 群														
No. 3	53	女	-	-	-	+	-	-	+	TAC+MMF+MP+BAX	HBs 抗原, HBV-DNA	15	-	TAF
No. 4	64	男	ND	ND	ND	+	+	ND	+	TAC+MMF+MP+BAX	HBs 抗原	8	-	ETV
No. 5	65	男	-	ND	ND	+	ND	-	-	TAC+MMF+BAX	HBV-DNA	12	-	経過観察

Abbreviations: BAX, basiliximab; ETV, entecavir hydrate; HBc, hepatitis B core; HBs, hepatitis B surface; HBV, hepatitis B virus; MMF, mycophenolate mofetil; MP, methylprednisolone; ND, no data; TAC, tacrolimus; TAF, tenofovir alafenamide; HBV-DNA, hepatitis B virus-DNA.

よる抗ウイルス療法が開始となった。症例 No. 4 は HBs 抗原が陽性となった症例であり、腎移植 8 年後に胃癌を発症し、胃癌の補助化学療法の前にエンテカビル(entecavir hydrate, ETV)を開始した。症例 No. 5 は、腎移植後に HBV-DNA の定期的なフォローを行い、腎移植後 12 年目に HBV-DNA が定性陽性化した。HBV-DNA ウイルス量は 2.1 log copies/mL 以下を維持しており、現在も経過観察中である。B 群の症例はいずれもリツキシマブの投与を受けていなかった。

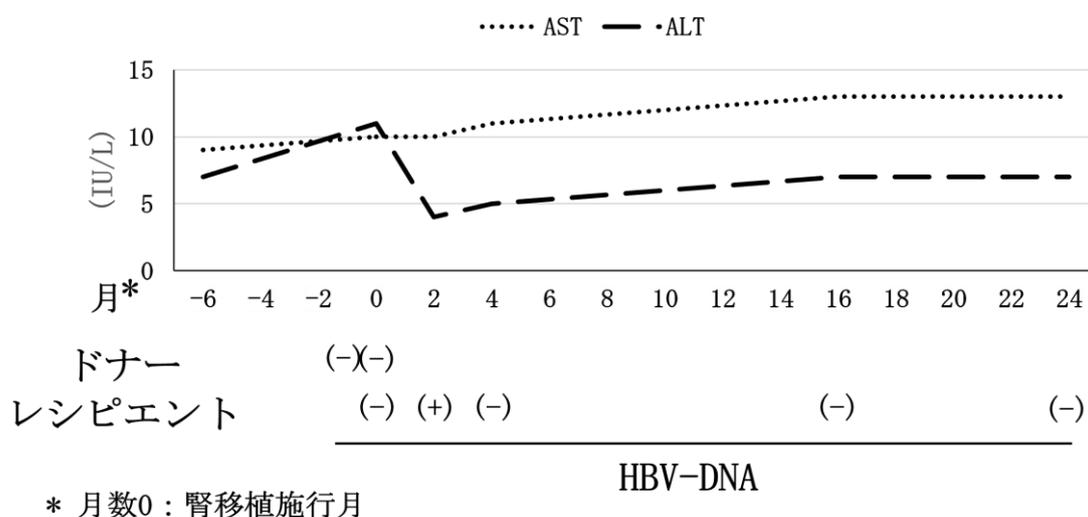


図 4. No. 2 症例の AST/ALT、HBV-DNA の推移

3. 腎組織中 cccDNA 測定

HBV 既往感染者の腎内に潜伏・持続性のある HBV が存在する可能性を検証するために、2019 年 9 月から 2021 年 8 月にかけて腎移植に関連する腎生検が施行された症例の中で、HBV 既往感染ドナー腎を使用した 32 症例の腎組織中の cccDNA を測定した。

A 群の症例 No. 2 の腎移植時の検体で、腎組織の cccDNA が 3.2 log copies/ug で検出された (図 5)。他の 31 症例の腎検体からは cccDNA は検出されなかった。

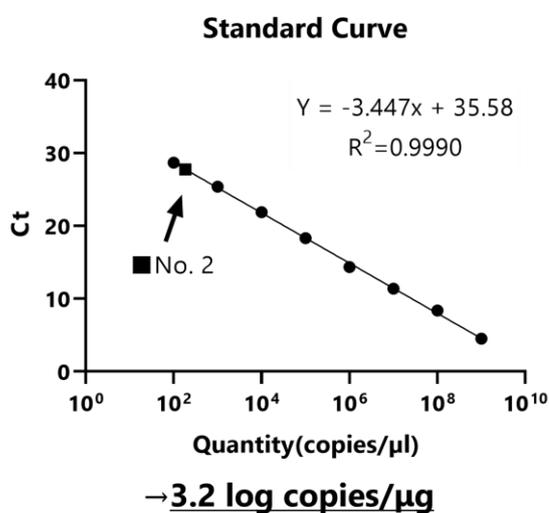


図 5. 腎組織中 cccDNA 測定

4. 腎細胞株における HBV 複製能

HBV の腎組織内での複製を評価するために、HBV 発現プラスミド pUC-CAT を用いて、HEK293T 細胞および HK-2 細胞へのトランスフェクション実験を行った。pUC-CAT をトランスフェクションした腎細胞株では、いずれも HBs 抗原、HBe 抗原、HBcr 抗原の分泌が確認された (図 6)。これらの結果は、HBV が非肝組織である腎臓内で複製するための能力を有していることを示している。

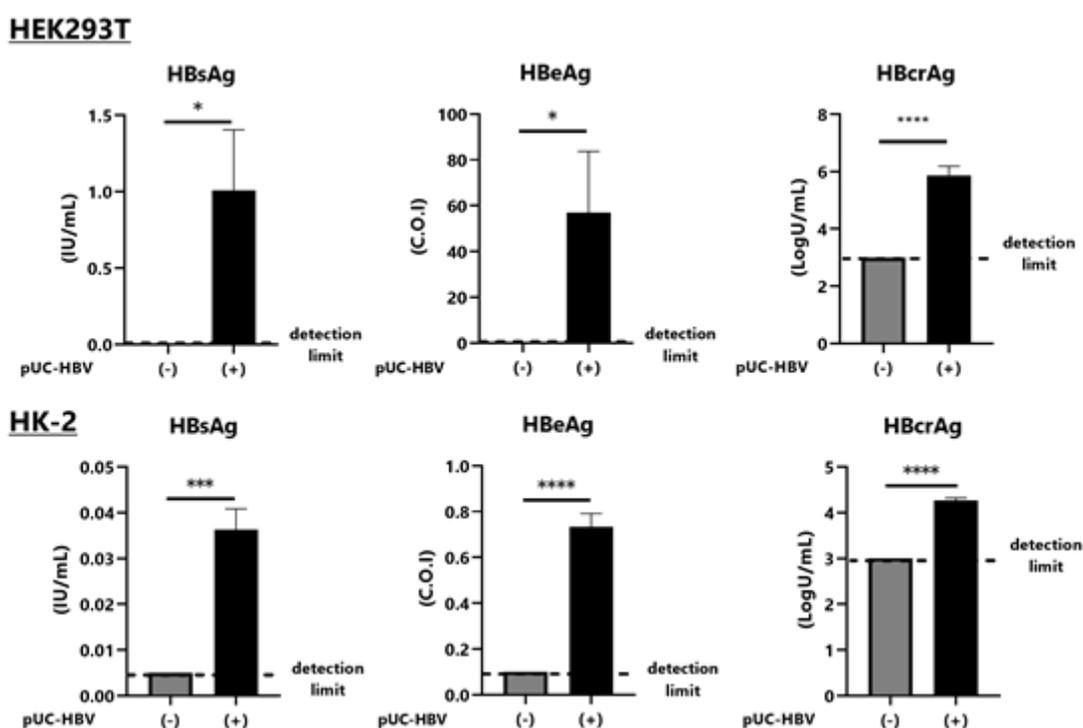


図 6. 培養上清中 HBV マーカー測定

HEK293T 細胞と HK-2 細胞の培養上清中の HBs 抗原、HBe 抗原、HBcr 抗原の値を示す。

各群 n=3、平均値、および標準偏差で示す。* ; $P < 0.05$ 、*** ; $P < 0.001$ 、**** ; $P < 0.0001$ 。

5. 腎細胞株と肝細胞株における HBV 複製能の比較

HBV プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞と HepG2 細胞の HBV 分泌蛋白量や pgRNA の発現量を eGFP 陽性細胞で補正すると、腎細胞株である HEK293T 細胞での発現量が低いことが確認された(図 7、8)。

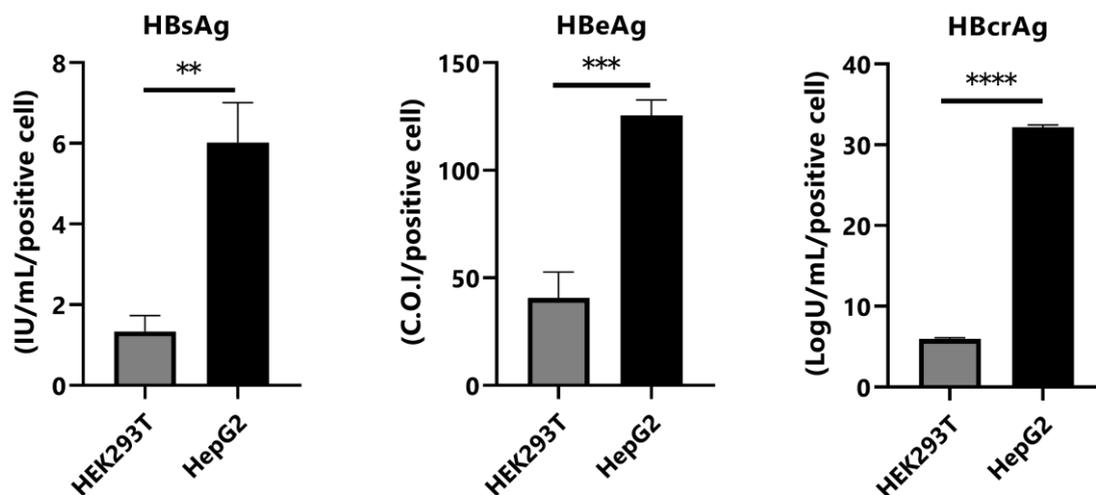


図 7. HEK293T 細胞と HepG2 細胞の培養上清中 HBV 分泌蛋白量の比較。各群 n=3、平均値、および標準偏差で示す。** ; $P < 0.01$ 、*** ; $P < 0.001$ 、**** ; $P < 0.0001$ 。

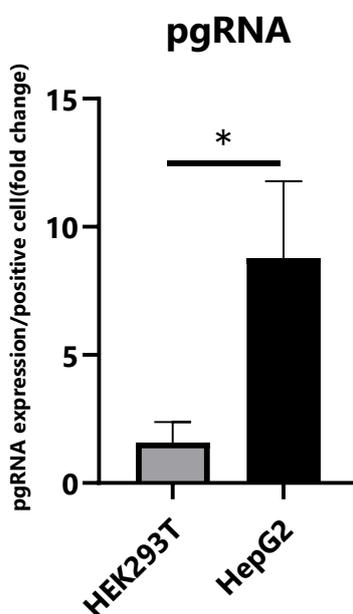


図 8. HEK293T 細胞と HepG2 細胞の細胞内 pgRNA 発現量の比較。各群 n=3、平均値、および標準偏差で示す。* ; $P < 0.05$ 。

考察

腎移植においてHBc抗体陽性のドナーはHBV感染を伝播するリスクが低いと複数の論文で報告されている (Mahboobi et al., 2012; Marinaki et al., 2017; Ouseph et al., 2010; Veroux et al., 2011; Veroux et al., 2016)。腎移植後に複数の免疫抑制剤が併用されるため (Chadban et al., 2020)、HBV既往感染レシピエントはHBV再活性化のリスクがある。腎移植におけるHBV既往感染ドナー腎によるHBV感染を評価するためにはドナーがHBV既往感染者、レシピエントがHBV未感染者と限定する必要がある。また、HBc抗体陽性のドナーの場合、レシピエントをHBV既往感染者とHBV未感染者に区別してHBV感染を評価する必要がある。我々は、HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエントへの腎移植後のHBVステータスのセロコンバージョンを調査した論文を検索した。過去の報告によると、HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエントへの移植では、HBs抗原で0.5% (1/185)、HBc抗体で2.2% (4/185)、HBs抗体で1.6% (3/185) と低率でHBVステータスのセロコンバージョンが観察された (Akalin et al., 2005; De Feo et al., 2006; Satterhwaite et al., 1997; Veroux et al., 2005; Wachs et al., 1995)。ただしこれらの報告ではドナーのHBV感染を把握するためのHBV-DNAの測定は施行していない。本研究では、1例 (2.2%、1/45) がHBc抗体陽性となり、既報とほぼ同じ割合であった。HBV感染を把握するための最も感度の高い検査は、HBV-DNA PCR検査であると考えられている (Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, 2020; European Association for the Study of the Liver, 2017)。本研究ではこれまで報告のないHBV-DNA陽性化の症例を認めた。HBc抗体およびHBV-DNAが陽性化したそれぞれの症例では、ドナーの移植前HBV-DNAは陰性であるにも関わらず、レシピエントのHBVステータスのセロコンバージョンが生じており、血液を介したコンタミネーションではなく、腎臓組織に潜伏していたHBV感染が伝播した可能性が示唆された。Mahboobiらは、HBc抗体陽性のドナーにおいて腎移植施行前に、血清中のHBV-DNAと腎臓組織中のHBV-DNAを評価することで、その後のレシピエントのHBV感染リスクを低減できる可能性を論じている (Mahboobi et al., 2012)。我々は、HBV既往感染ドナー腎を使用した32症例の腎移植時もしくは移植後の定期的な腎生検により採取したヒト腎組織を用いてHBVのcccDNA量を測定し、A群の1例でcccDNA陽性を確認した。cccDNAが陽性となった症例で、血清HBV-DNAが定性陽性化しており、腎臓でのHBV潜伏感染および複製の可能性が示唆された。Heらは、HBV関連糸球体腎炎の小児43人の腎臓組織を対象に、in situ hybridization assayによりHBV-DNAを調べた (He et al., 1998)。

HBV-DNAは43例中41例（95.3%）で確認され、糸球体の上皮細胞とメサンギウム細胞の核と細胞質、および腎尿細管の上皮細胞内に概ね分布していた。また、ChenらはHBV関連糸球体腎炎の腎検体（2例/5例）からnested PCRによりcccDNAが検出されたと報告している（Chen et al., 2009）。既報ではHBV関連腎症においてcccDNAが検出された報告があるもののHBV既往感染者の腎検体でcccDNAが検出された報告はなく、本研究が初の報告となる。

HBVの細胞内への侵入は、NTCPを介して行われるとされており（Mitra et al., 2018; Schulze et al., 2007; Verrier et al., 2016; Yan et al., 2012）、胆汁酸塩輸送体としてのNTCPは肝細胞に強く発現している（Mitra et al., 2018）。Yangらは、B型慢性肝炎患者の血清中のエクソソームに、rcDNAなどの核酸やHBs抗原などのウイルスタンパク質を含むHBV成分が検出されたことを報告している（Yang et al., 2017）。これらのエクソソームは、非感染の肝細胞にHBVを導入することが確認された。エクソソームを介した感染経路は受容体を介さないため、NTCPを発現していない腎臓組織にもHBVが感染する可能性が示唆される。また、本培養実験で、HBVプラスミドを導入した腎細胞では、HBV蛋白分泌が確認された。今回、腎細胞株であるHEK293T細胞と肝細胞株であるHepG2細胞でのHBV分泌蛋白とpgRNA発現量を比較したところ、HEK293T細胞での発現量が低いことが示された。cccDNAからpgRNAを含むmRNAが転写されるための代表的な転写因子としてはRetinoid X receptor alpha (RXR α)、Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)、Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α)があるが（Bar-Yishay et al., 2011）、RXR α やPPAR α は多臓器に発現し、HNF4 α はほぼ肝臓、腎臓、腸管に限定して発現しており、いずれの転写因子も肝臓に比べると腎臓での発現量が低いことが知られている。YangらはNTCP発現HEK293T細胞にHBVを感染させ、これらの転写因子を強発現させたHEK293T細胞でpgRNAの産生量の増加を確認しており、転写因子がHBV複製において重要な因子であると述べている（Yang et al., 2020）。これらの結果から、HBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエント群である症例No. 2の症例のドナー腎にはcccDNAが潜伏感染しており、腎移植に伴ってHBV伝播が起り、HBVが低レベルで増殖した可能性が考えられた。

本研究のHBV既往感染ドナーからHBV未感染レシピエントへの腎移植後にHBc抗体やHBV-DNAが陽性化したレシピエントは、HBs抗原陽性化や肝炎発症は認められなかった。Mahboobiらは、HBc抗体陽性のドナーからの腎移植後に観察した症例では、症候性肝炎の発症、死亡率の増加、生存期間の短縮は見られなかったと報告している（Mahboobi et al., 2012）。また、Verouxら

は、B型肝炎免疫グロブリンやHBVワクチンの接種によりHBc抗体陽性ドナーの移植において、HBVステータスのセロコンバージョンのリスクを減少させる可能性がある」と指摘している(Veroux et al., 2016)。したがって、HBc抗体陽性ドナーからの腎移植によるHBV感染のリスクはあるものの、腎移植後の生存期間延長や透析中止といった利益を考慮すると、腎移植の利点はHBV感染の潜在的なリスクを上回ると考えられる。

本研究では、HBV 既往感染レシピエントにおける HBV 再活性化の割合は 4.8% (3/63) であった。腎移植における HBV 再活性化のリスクは 2.9～6.5%と報告されている (Chen et al., 2013; Kanaan et al., 2012; Querido et al., 2019)。全ての症例で 3 種類以上の免疫抑制剤が併用されていた。リツキシマブとステロイドの併用は化学療法を受けている患者の de novo 肝炎発症の重要な危険因子であると考えられており、腎移植においても HBV 再活性化のリスクである (Lee et al., 2018)。Lee らは、標準量のリツキシマブを投与され、HBV 再活性化を経験した 5 人の患者のうち、4 人が肝炎の再燃を起こし、そのうち 1 人は後に肝不全で死亡したと報告している。しかし、本研究における HBV 既往感染レシピエントの中で HBV 再活性化を起こした症例はリツキシマブを使用していなかった。本研究では、HBV の再活性化は移植後 8、12、15 年目に発生したが、Querido らは、HBV の再活性化は移植後 3 年目にも発生する可能性がある」と報告しており、移植後早期だけでなく、晩期においても HBV の再活性化に注意する必要がある (Querido et al., 2019)。また、免疫抑制剤の投与量減量により HBV の再活性化に伴う肝炎が発生するリスクが上昇する (Querido et al., 2019) が、本研究で HBV 再活性化をきたした症例は免疫抑制剤の投与量の変更は認めなかった。今回、HBV 再活性化の症例が少なく、HBV 再活性化のリスク因子を分析することができなかつたため、今後の症例の蓄積が必要であると考えられる。

本研究の Limitation としては、第一に、この研究は単施設での過去起点コホート研究である。第二に、HBV 既往感染レシピエント群で HBV 再活性化を認めた症例のドナーの HBV 感染状況の把握が不十分であったため、HBV ステータスの変化がドナー由来の HBV 感染の要素を完全に否定するための十分な解析ができなかつたことが挙げられる。

結論として、HBV 既往感染レシピエントの腎移植後の HBV 再活性化率は 4.8% (3/63) であり、他の報告と同様であった。また、HBV 既往感染ドナーからの HBV 未感染レシピエントでは、HBc 抗体陽性となった症例が 1 例 (2.2%、1/45)、HBV-DNA が定性陽性となった症例が 1 例 (2.2%、

1/45) 認められたが、肝炎の発症はなく、比較的安全であると考えられた。しかし、ドナーが HBV 既往感染者の場合、腎臓内に HBV が潜伏感染し、腎移植を介して HBV が感染する可能性があるため、移植後の HBV モニタリングを実施する必要がある。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

- ・HBV 既往感染レシipientの腎移植後のHBV再活性化率は4.8% (3/63)であり、他の報告と同様であった。

- ・HBV 既往感染ドナーからのHBV未感染レシipientでは、HBc抗体陽性となった症例が1例 (2.2%、1/45)、HBV-DNAが定性陽性となった症例が1例 (2.2%、1/45)認められたが、肝炎の発症はなく、比較的安全であると考えられた。

- ・HBV 既往感染ドナーからのHBV未感染レシipientで、HBV-DNAが定性陽性となった症例の報告はなく、本研究により新たに発見されたものである。

- ・本研究で初めてHBV 既往感染腎検体からcccDNAが検出された。同症例での血清HBV-DNAが定性陽性化したことから、HBV 既往感染者における腎臓でのHBVの潜伏感染および複製の可能性が考えられた。

- ・培養細胞を用いた検討では、腎臓でHBVは複製されるものの肝臓に比べると複製能は低いと考えられた。

今後は、症例の集積や長期間経過観察が、本研究で明らかとなった事実のさらなる検証に必要と考えられた。さらに腎細胞への感染の機序や腎細胞での複製に必要な因子の探索、腎細胞で産生されたHBV粒子の感染性の検討などが必要と考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：森川賢一准教授には、臨床研究及び基礎研究に対して、その心構え、信念、実験方法、データ解析、論文作成そして学会での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援頂きました、厚く御礼申し上げます。

臨床における技術指導や、検体の採取、症例登録、臨床試験参加同意取得などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 肝臓グループの諸先生方、北海道大学病院泌尿器科 移植グループの諸先生方、北海道大学大学院医学研究院 免疫代謝内科学教室腎臓グループの諸先生方には、深謝いたします。

本研究において血清提供と同意をして頂いた患者さんに深く深謝いたします。

2022年 3月
山田 錬

利益相反

なし

引用文献

Akalin, E., Ames, S., Sehgal, V., Murphy, B., and Bromberg, J.S. (2005). Safety of using hepatitis B virus core antibody or surface antigen-positive donors in kidney or pancreas transplantation. *Clin. Transplant.* *19*, 364-366.

Bar-Yishay, I., Shaul, Y., and Shlomai, A. (2011). Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. *Liver Int.* *31*, 282-290.

Chadban, S.J., Ahn, C., Axelrod, D.A., Foster, B.J., Kasiske, B.L., Kher, V., Kumar, D., Oberbauer, R., Pascual, J., Pilmore, H.L., et al. (2020). KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation.

Chen, G.D., Gu, J.L., Qiu, J., and Chen, L.Z. (2013). Outcomes and risk factors for hepatitis B virus (HBV) reactivation after kidney transplantation in occult HBV carriers. *Transpl. Infect. Dis.* *15*, 300-305.

Chen, H.L., Chang, C.J., Kong, M.S., Huang, F.C., Lee, H.C., Lin, C.C., Liu, C.C., Lee, I.H., Wu, T.C., Wu, S.F., et al. (2004). Pediatric fulminant hepatic failure in endemic areas of hepatitis B infection: 15 years after universal hepatitis B vaccination. *Hepatology* *39*, 58-63.

Chen, L., Wu, C., Fan, X., Gao, J., Yin, H., Wang, T., Wu, J., and Wen, S.W. (2009). Replication and infectivity of hepatitis B virus in HBV-related glomerulonephritis. *Int J Infect Dis* *13*, 394-398.

Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, t.J.S.o.H. (2020). Japan Society of Hepatology Guidelines for the

Management of Hepatitis B Virus Infection: 2019 update. *Hepatol Res* *50*, 892-923.

De Feo, T.M., Grossi, P., Poli, F., Mozzi, F., Messa, P., Minetti, E., Sandrini, S., Boschiero, L., Rigotti, P., Maresca, C., et al. (2006). Kidney transplantation from anti-HBc+ donors: Results from a retrospective Italian study. *Transplantation* *81*, 76-80.

Grzegorzewska, A.E., Świdorska, M.K., Mostowska, A., Warchoń, W., and Jagodziński, P.P. (2016). Antibodies to HBV surface antigen in relation to interferon- λ 3 in hemodialysis patients. *Vaccine* *34*, 4866-4874.

He, X.Y., Fang, L.J., Zhang, Y.E., Sheng, F.Y., Zhang, X.R., and Guo, M.Y. (1998). In situ hybridization of hepatitis B DNA in hepatitis B-associated glomerulonephritis. *Pediatr. Nephrol.* *12*, 117-120.

Hoofnagle, J.H., Doo, E., Liang, T.J., Fleischer, R., and Lok, A.S.F. (2007). Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology* *45*, 1056-1075.

Hsu, H.Y., Chang, M.H., Ni, Y.H., and Chen, H.L. (2004). Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut* *53*, 1499-1503.

Hui, C.K.I.N., Cheung, W.W.W., Zhang, H.A.I.Y., Au, W.Y.A.N., Yueng, Y.U.I.H., Leung, A.Y.H., Leung, N., Luk, J.M., Lie, A.K.W., Kwong, Y.O.K.L.A.M., et al. (2006). Kinetics and Risk of De Novo Hepatitis B Infection in HBsAg -. *Gastroenterology* *59-68*.

Kao, J.H., and Chen, D.S. (2002). Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect. Dis.* *2*, 395-403.

Kanaan, N., Kabamba, B., Maréchal, C., Pirson, Y., Beguin, C., Goffin, E., and Hassoun, Z. (2012). Significant rate of hepatitis B reactivation following kidney transplantation in patients with resolved infection. *J. Clin. Virol.* *55*, 233-238.

Kim, S.J., Hsu, C., Song, Y.Q., Tay, K., Hong, X.N., Cao, J., Kim, J.S., Eom, H.S., Lee, J.H., Zhu, J., et al. (2013). Hepatitis B virus reactivation in B-cell lymphoma patients treated with rituximab: Analysis from the Asia Lymphoma Study Group. *Eur. J. Cancer* *49*, 3486-3496.

Kusumoto, S., Tanaka, Y., Mizokami, M., and Ueda, R. (2009). Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Int. J. Hematol.* *90*, 13-23.

Kusumoto, S., Tanaka, Y., Ueda, R., and Mizokami, M. (2011). Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-plus-steroid combination chemotherapy. *J. Gastroenterol.* *46*, 9-16.

Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H.L.A., Papatheodoridis, G., Zoulim, F., and Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *67*, 370-398.

Lee, J., Park, J.Y., Kim, D.G., Lee, J.Y., Kim, B.S., Kim, M.S., Kim, S. Il, Kim, Y.S., and Huh, K.H. (2018). Effects of rituximab dose on hepatitis B reactivation in patients with resolved infection undergoing immunologic incompatible kidney transplantation. *Sci. Rep.* 1-8.

Mahboobi, N., Tabatabaei, S. V, Blum, H.E., and Renal, S.M.A. (2012). Renal grafts from anti-hepatitis B core-positive donors : a quantitative review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.* *445-451*.

Marinaki, S., Kolovou, K., Sakellariou, S., Boletis, J.N., Delladetsima, I.K., Marinaki, S., Kolovou, K., and Boletis, J.N. (2017). Hepatitis B in renal transplant patients. *World J Hepatol* *9*, 1054-1063.

Mitra, B., Thapa, R.J., Guo, H., and Block, T.M. (2018). Host functions used by hepatitis B virus to complete its life cycle: Implications for developing host-targeting agents to treat chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* *158*, 185-198.

Morikawa, K., Suda, G., and Sakamoto, N. (2016). Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatol. Res.* 871-877.

Nassal, M. (2015). HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* *64*, 1972-1984.

Ni, Y.H., Chang, M.H., Jan, C.F., Hsu, H.Y., Chen, H.L., Wu, J.F., and Chen, D.S. (2016). Continuing Decrease in Hepatitis B Virus Infection 30 Years After Initiation of Infant Vaccination Program in Taiwan. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 1324-1330.

Oketani, M., Ido, A., Uto, H., and Tsubouchi, H. (2012). Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatol. Res.* *42*, 627-636.

Ouseph, R., Eng, M., Ravindra, K., Brock, G.N., Buell, J.F., and Marvin, M.R. (2010). Review of the use of hepatitis B core antibody - positive kidney donors. *Transplant. Rev.* *24*, 167-171.

Report, S. (2020). Japan Society of Hepatology Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection: 2019 update. *Hepatol.*

Res. 50, 892-923.

Roberts, H., Kruszon-Moran, D., Ly, K.N., Hughes, E., Iqbal, K., Jiles, R.B., and Holmberg, S.D. (2016). Prevalence of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in U.S. households: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1988-2012. *Hepatology* 63, 388-397.

Querido, S., Weigert, A., Adragão, T., Rodrigues, L., Jorge, C., Bruges, M., and Machado, D. (2019). Risk of hepatitis B reactivation in hepatitis B surface antigen seronegative and core antibody seropositive kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1-7.

Satterthwaite, R., Ozgu, I., Shidban, H., Aswad, S., Sunga, V., Zapanta, R., Jr., Asai, P., Bogaard, T., Khetan, U., Mendez, R.G., and Mendez, R. (1997). Risks of transplanting kidneys from hepatitis B surface antigen-negative, hepatitis B core antibody-positive donors. *Transplantation* 64, 432-435.

Schulze, A., Gripon, P., and Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46, 1759-1768.

Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kato, T., Orito, E., Ito, K., Acharya, S.K., Gish, R.G., Kramvis, A., Shimada, T., Izumi, N., et al. (2006). Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 44, 915-924.

Urata, Y., Uesato, R., Tanaka, D., Kowatari, K., Nitobe, T., Nakamura, Y., and Motomura, S. (2011). Prevalence of reactivation of hepatitis B virus replication in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol* 21, 16-23.

Veroux, M., Puliatti, C., Gagliano, M., Cappello, D., Macarone, M., Vizcarra, D., Spataro, M., Di Mare, M., Ginevra, N., and Veroux, P. (2005). Use of hepatitis B core antibody-positive donor kidneys in hepatitis B surface antibody-positive and -negative recipients. *Transplant. Proc.* *37*, 2574-2575.

Veroux, M., Corona, D., Ekser, B., Giaquinta, A., Tallarita, T., Martino, C. De, Gentile, F., Virgilio, C., Gagliano, M., Fiamingo, P., et al. (2011). Kidney Transplantation From Hepatitis B Virus Core Antibody - Positive Donors : Prophylaxis With Hepatitis B Immunoglobulin. *Transplant. Proc.* *43*, 967-970.

Veroux, M., Ardita, V., Corona, D., Giaquinta, A., Ekser, B., Sinagra, N., Zerbo, D., Patanè, M., Gozzo, C., and Veroux, P. (2016). Kidney transplantation from donors with hepatitis B. *Med. Sci. Monit.* *22*, 1427-1434.

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S.C., Habersetzer, F., Durantel, D., Abou-Jaoudé, G., et al. (2016). A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* *63*, 35-48.

Wachs, M.E., Amend, W.J., Ascher, N.L., Bretan, P.N., Emond, J., Lake, J.R., Melzer, J.S., Roberts, J.P., Tomlanovich, S.J., Vincenti, F., and et al. (1995). The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg(-), HBcAb(+), HBIgM(-) organ donors. *Transplantation* *59*, 230-234.

World Health Organization. (2017). WHO global hepatitis report 2017.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate

cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012, 1-28.

Yang, X., Cai, W., Sun, X., Bi, Y., Zeng, C., Zhao, X., Zhou, Q., Xu, T., Xie, Q., Sun, P., et al. (2020). Defined host factors support HBV infection in non-hepatic 293T cells. *J Cell Mol Med* 2507-2518.

Yang, Y., Han, Q., Hou, Z., Zhang, C., Tian, Z., and Zhang, J. (2017). Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 465-475.

Yeo, W., Chan, T.C., Leung, N.W.Y., Lam, W.Y., Mo, F.K.F., Miu, T.C., Chan, H.L.Y., Hui, E.P., Lei, K.I.K., Mok, T.S.K., et al. (2009). Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J. Clin. Oncol.* 27, 605-611.

石井 大輔. (2020). Fact Book 2020 on Organ Transplantation in Japan. 日本移植学会ホームページ.
<http://www.asas.or.jp/jst/pdf/factbook/factbook2020.pdf> 2021/11/3 確認

楠本 茂., 小野澤 真弘., 田中 靖人., 他. (2018). 造血細胞移植ガイドライン. 日本造血細胞移植学会ホームページ.
https://www.jshct.com/uploads/files/guideline/01_03_06_hepatitis.pdf 2021/11/3 確認

日本臓器移植ネットワーク 腎臓移植希望者選択基準 2021年4月1日改訂版. (2021). 日本臓器移植ネットワークホームページ.
<https://www.jotnw.or.jp/files/page/medical/manual/doc/rec-kidney.pdf> 2021/11/3 確認

両角 國男., 市丸 直嗣., 片山 昭男., 他. 生体腎移植ドナーガイドライン. 日本移植学会ホームページ.

<https://cdn.jsn.or.jp/guideline/pdf/Donor-guidelines.pdf> 2021/11/3
確認