

表2. 輸血に伴うTT Virusの感染状況 (200年1月~9月)

輸血前TTV (N22)	陽性 33例 (33.7%)
対象: 98例	陰性 65例
輸血後の経過	TTV N22陽性化* ¹⁾ 22例 (64.7%)
対象: 輸血前陰性の34例	TTV gt 1型陽性化* ²⁾ 15例 (44.1%)
発症率	TTV N22感染例の9.1% (2/22例)
	TTV gt 1型感染例の6.7% (1/15例)

*1) 輸血量7.26±7.34本

*2) 輸血量8.56±8.48本

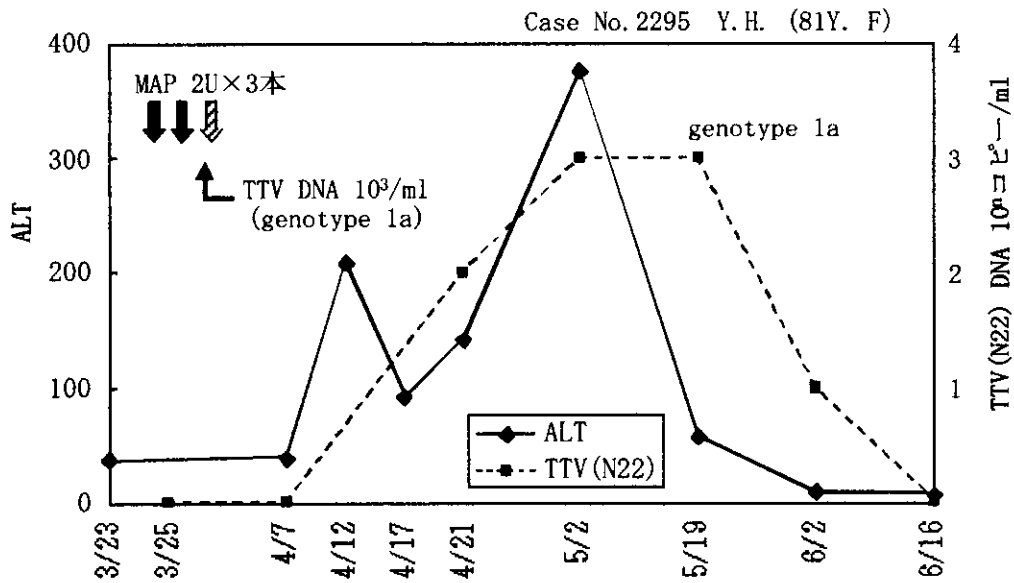


図1. TT Virusによる輸血後肝炎の経過

II. 地域住民における TTV 肝炎の疫学的検討
分担研究者 佐藤俊一 岩手医科大学副学長

研究要旨 昨年度までの調査で、TTV 感染は多少の地域差は存在するものの全体として住民の過半数がキャリアで、かつ肝機能異常を示す頻度は少ないことが明らかとなった。最近 TTV は肝のみならず骨髄でも増殖していることが明らかにされた。そこで今年度は TTV 感染と血液疾患、特に貧血との関連を検討した。N22 領域 primer 陽性例と陰性例について赤血球数と Hb 値を測定したが、両者の間には全く差がみられず、TTV 感染と貧血との関連性はみいだせなかった。

研究協力者

石川和克 岩手県立大学看護学部
教授

阿部弘一 岩手医科大学第一内科
講師

小山富子 岩手県予防医学協会
臨床検査課長

沿岸部 Y 村、山間部 Z 村) 計 591 を対象とした。岡本らの TTV の N22 領域の primer を用いた PCR 法による陽性例と陰性例に分け、赤血球数および Hb 値を比較検討した。検体はデジタル化し整理し、測定データから個人の同定ができないようにプライバシーに配慮し行った。

A. 研究目的

1997 年、新しい肝炎ウイルスの候補として発見された TT virus (TTV) は、昨年度までの検討で、多少の地域差はあるものの一般住民の過半数が感染し、肝障害をおこす頻度は低率であることが明らかとなった。また肝機能異常と感染ウイルスの genotype との間にも明らかな関連性はみいだせなかった。最近、岡本により TTV は肝以外に骨髄でも増殖していることが明らかにされた。したがって今年度は TTV 感染と血液疾患、特に貧血との関連性の有無を検討することとした。

B. 研究方法

岩手県予防医学協会の検診を受けた岩手県の 3 つの自治体の住民(内陸部 X 市、

C. 研究結果 (表 1)

1) 赤血球数

対象 591 例全体は 447 ± 40 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)、TTV-DNA 陽性 208 例は 449 ± 41 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)、TTV-DNA 陰性 383 例は 447 ± 40 ($\times 10^4/\text{mm}^3$) を示し差はみられなかった。

2) Hb 値

対象 591 例全体は 13.5 ± 1.5 (g/dl)、TTV-DNA 陽性 208 例は 13.5 ± 1.5 (g/dl)、TTV-DNA 陰性 383 例は 13.5 ± 1.5 (g/dl) を示し、全く差はみられなかった。

D. 考察

今回の一般住民のデータからは、TTV 感染と貧血との関連は認められなかった。今後はさらに TTV の局在部位とその部位の病変の有無および感染経路との関連

などが明らかにされるべきと考えられる。
 しかし TTV はヒトに広く感染している
 ものの、肝病変および肝外病変を起こす
 ことはまれと考えられた。

E. 結論

TTV 感染と貧血の関連は明らかではな
 かった。

表1. TTV-DNAの有無と赤血球数とHb値

	TTV-DNA(+) (N=208)	TTV-DNA(-) (N=383)	計 (N=591)
赤血球数 ($\times 10^4$)/mm ³	449 \pm 41	447 \pm 40	447 \pm 40
Hb値 (g/dl)	13.5 \pm 1.5	13.5 \pm 1.5	13.5 \pm 1.5

厚生科学研究費補助金 (新興再興感染症研究事業)
非 A 非 B 肝炎の予防、疫学に関する研究班 分担研究報告書

日本における B 型肝炎ウイルス genotype の分布状況と
その臨床的差違に関する研究

分担研究者：溝上雅史 名古屋市立大学医学部臨床検査医学教授

研究要旨

B 型肝炎ウイルス(HBV)は、最近その遺伝子配列の解析から A 型から G 型までの 7 つの genotype に分類されたが、日本での genotype の分布状況の調査はなされていない。今回日本全国から集められた HBs 抗原陽性患者血清 720 例について検討したところ、A 型が 1.7%、B 型が 12.2%、C 型が 84.7%、D 型が 0.4%、混合型が 1.0%であった。しかし地域別に見ると、沖縄で B 型が 60.0%、また東北で 22.9%と他地域と比べ B 型が多く見られた。B 型と C 型との臨床所見を比較したところ、B 型では有意に HBe 抗体陽性例が多く、HBV DNA も低値であった。以上から日本では大多数が C 型であるが、南北に B 型が多く見られる地域があり、また両者で臨床所見の違いが認められることが示された。

A.研究目的

従来、HBV はその表面蛋白に対する血清学的な抗体反応によって adr、adw、ayr、ayw の 4 つの主要な subtype に分類されていたが、わずか 1 つのアミノ酸の変異で見かけ上別の subtype の反応性を示すことが示されてから、現在ではウイルスの遺伝子配列の系統解析から A 型から G 型までの 7 つの genotype に分類されることになった。しかし、genotype は遺伝子配列による分類のため、広い地域での多数の検体を測定する場合は

いちいち配列を決定しなければならなかったため、費用や時間の問題から容易には検討できなかった。われわれは、PCR 産物を制限酵素を用いてそれぞれの genotype に分類する方法を考案したため、比較的容易に多検体処理が可能となった。今回この方法を用いて日本における genotype の分布状況を検討し、その臨床所見との関連性について検討することを目的とした。

B.研究方法

対象症例は、北海道から沖縄までの全国 12 大学に通院中の HBs 抗原陽性患者 720 例（男：女=469：251，平均年齢=43.6±14.9 才）である。それぞれの患者から Informed consent を得て採血し、その臨床所見とともに収集した。HBV genotype は、Mizokami らの方法に従い、S 遺伝子部分にセットした primer を用いてウイルス遺伝子を増幅し、*AlwI*、*EcoRI*、*HpaI*、*NciI* および *NlaIV* の 5 種類の制限酵素を順に用いてそれぞれの切れた断片の長さを判定することによって genotype A から F までを判定した。また、制限酵素による切れ方が非定型的で判定不能であった場合は、S 遺伝子の PCR 産物から直説法にて遺伝子配列を決定し、既報のそれぞれの genotype 遺伝子配列とともに分子系統樹を作成し、genotype を判定した。

C. 研究結果

720 症例のうち 25 症例が判定不能であったため、遺伝子配列から genotype を確認した。その結果 720 症例の内、A 型は 12 例（1.7%）、B 型が 88 例（12.2%）、C 型が 610 例（84.7%）、D 型が 3 例（0.4%）で、7 例（1.0%）が混合型であった。それぞれの genotype の地域分布を見ると、特に沖縄では B 型が 60.0%、また岩手、山形の東北地区では B 型が 22.9%と全国平均よりはるかに B 型

が多く認められた。

また、720 症例の臨床背景について genotype B 型および C 型との間で差が認められるかを比較検討した。B 型の症例は、年齢 53.6±17.2 才と C 型の 42.2±14.1 才より有意に高かったが、男女比はそれぞれ 54:34 と 397:213 と差はみられず、また疾患の内訳も、B 型では ASC:CH:LC:HCC=23:38:12:15 で、C 型ではそれぞれ 122:276:112:100 と差は見られなかった。しかし、HBe 抗原の陽性率を見ると、B 型では 18.4% であったのに対し、C 型では 50.6% と有意に効率であった。また HBV DNA 量についても同様にそれぞれ 5.02±1.70 と 5.87±1.82 で B 型症例の方が有意に低値であった。

D. 考察

日本においては、genotype C 型が 84.7% と大部分を占め、次いで B 型が 12.2% を占めた。ヨーロッパなどで主流となっている A 型や D 型は 2.1% と稀であり、E 型、F 型は日本では見られなかった。しかし、地域別にその分布状況を検討すると、沖縄と東北地区は、他の地域とはあきらかに異なる分布を示していた。すなわち、沖縄では、B 型：C 型は 60.0%：38.7% と B 型が過半数を占めており、また東北地区でも B 型：C 型は 22.9%：69.7% と C 型の方が多いものの、B 型があきらかに全国平

均より高く、日本の南と北に B 型の患者が多く見られる地区が存在することが示された。この事実は、過去の subtype による日本の分布解析の結果とも一致しており、日本人の古代の人類学的な歴史と関連すると考えられている。すなわち、genotype B に感染していた縄文人が約 1 万 2 千年から 3 万年前に台湾、沖縄を經由して日本に移住してきたが、約 2 千 300 年前に中国から朝鮮半島を経て genotype C に多く感染した弥生人が移住してきて、先にいた縄文人を日本の南北に追いやったという歴史的経緯と関連させるとこの分布状況が理解しやすいと考えられ、たいへん興味深い。

また、genotype B と C との症例間で、臨床的差違を検討したが、B 型症例において有意に HBe 抗体陽性率が高く、また HBV DNA 量も低値であった。この点からは、B 型の方がウイルスの活動性が低い症例が多く、肝病態の進行した例も少ないと思われたが、病態別の genotype 間での差は今回見られなかった。これは、今回集められた症例は肝機能異常などを指摘されて現在通院中の患者がほとんどのため、HBe 抗体陽性でかつ GPT 正常の症例はあまり含まれていないことによると考えられる。年齢・性別を一致させた case control study の

検討でも、B 型と C 型との間での臨床的・ウイルス学的差違は顕著に見られることが既に報告されている。今後さらに両者間での差違を検討する場合は、general population も含めた調査が必要となってくると考えられる。

E. 結論

日本における HBV genotype 分布について検討した。C 型が 84.7% で日本の major genotype であり、ついで B 型が 12.2% を占めた。しかし、沖縄と東北地区では B 型が多く見られ、地域特異性が見られた。また、B 型症例では C 型に比べ HBe 抗体陽性例が多く、genotype 間での臨床的差違も認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Orito E, Mizokami M,
Sakugawa H, et al.

A casecontrol study for
clinical and molecular
biological differences between
hepatitis B virus of genotypes
B and C.

Hepatology 33(1): 218-223,
2001.

2. 学会発表

E. Orito, M. Mizokami,
 T. Ohno, et al.
 Prevalence of hepatitis B
 Virus genotype in Japan and
 its clinical significance.
 12th Meeting of Asian Pacific
 Association for the Study of
 Liver,
 Fukuoka, June 3-4,2000.

折戸悦朗、溝上雅史、大野智義他
 日本における B 型肝炎ウイルス
 genotype の分布状況とその臨床的
 意義について
 第 36 回日本肝臓学会総会、
 平成 12 年 6 月 8 日～9 日、福岡

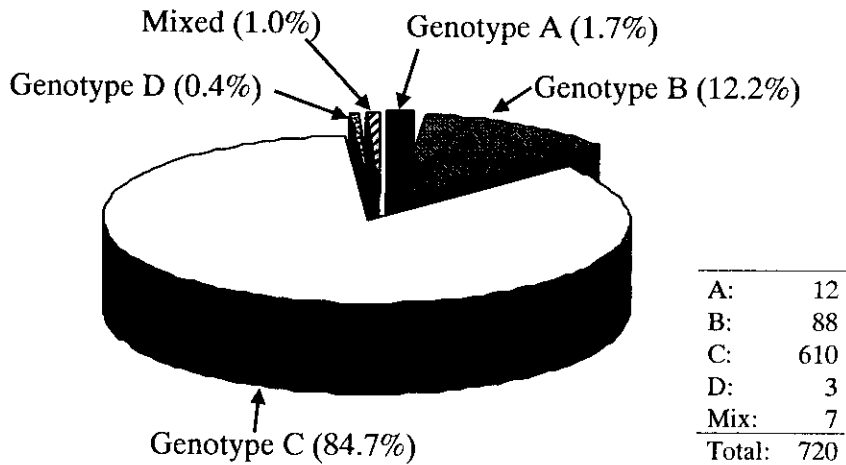
Table 1. Characteristics of 720 patients with positive HBsAg

Characteristics	n=720
Gender (M:F)	469:251
Age (years, mean±SD)	43.6±14.9
Disease	
ASC	149
CH	324
LC	129
HCC	118
Liver function test	
Total bilirubin (mg/dl)	0.99±1.61
AST (IU/L)	61.3±85.7
ALT (U/L)	78.8±115.8
ALP (U/L)	240.8±155.2
γ-GTP (U/L)	55.3±95.1
HBV markers	
HBeAg (positive rate, %)	46.2%
HBV DNA level (LGE/ml)	5.69±1.84

Table 2. Clinical differences among different HBV genotypes

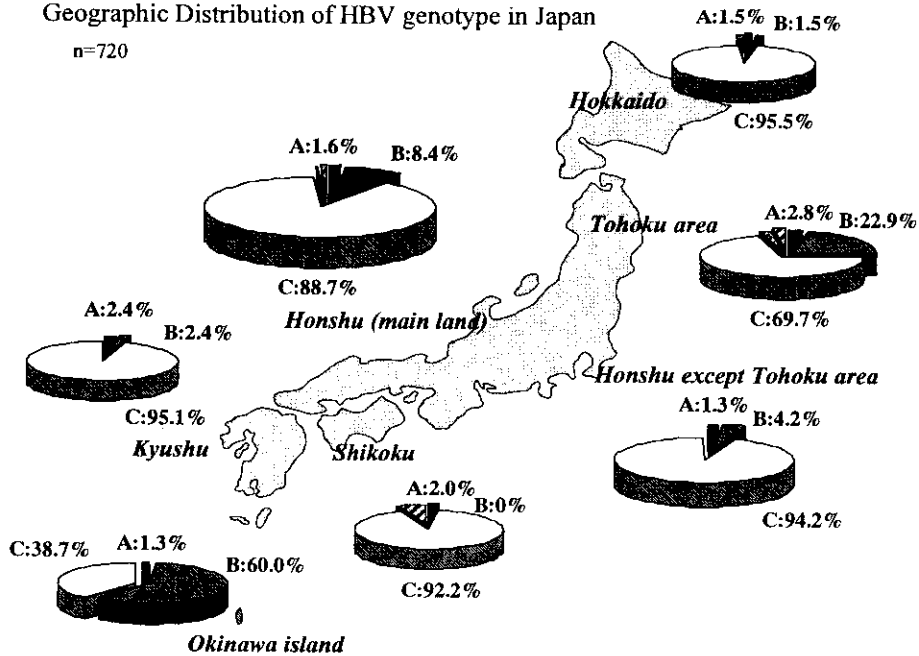
Characteristics	HBV genotype			P (B vs C)
	A n=12	B n=88	C n=610	
Age	45.4 ± 14.3	53.6 ± 17.2	42.2 ± 14.1	<0.01
Gender (M:F)	8:4	54:34	397:213	NS
Disease				NS
Asymptomatic carriers				
HBeAg-	2	19	74	
HBeAg+	1	4	48	
Chronic hepatitis	5	38	276	
Liver cirrhosis	2	12	112	
Hepatocellular carcinoma	2	15	100	
Total bilirubin (mg/dl)	0.9 ± 0.3	1.0 ± 1.1	1.0 ± 1.7	NS
ALT (IU/L)	133.9 ± 274.5	75.8 ± 131.5	78.6 ± 109.6	NS
AST (IU/L)	113.1 ± 200.3	67.7 ± 161.7	59.7 ± 66.7	NS
ALP (IU/L)	224.7 ± 73.4	197.1 ± 126.9	247.5 ± 159.1	<0.05
γ-GTP (IU/L)	57.0 ± 49.4	49.0 ± 43.9	56.0 ± 101.9	NS
Positive HBeAg (%)	33.3	18.4	50.6	<0.01
HBV DNA level (LGE/ml)	5.58 ± 2.50	5.02 ± 1.70	5.87 ± 1.82	<0.01

HBV genotype in Japan



Geographic Distribution of HBV genotype in Japan

n=720



厚生化学研究費補助金 (新興再興感染症研究事業)
非 A 非 B 肝炎の予防、疫学に関する研究班 分担研究報告書

オーストラリア先住民族から分離された B 型肝炎ウイルスの遺伝子型について

分担研究者：溝上雅史 名古屋市立大学病院臨床検査医学教授

研究要旨：HBs 抗原はオーストラリア先住民族から発見されたが、その先住民族から分離された B 型肝炎ウイルス (HBV) の塩基配列は現在まで報告されていない。今回、我々はその全塩基配列を決定し分子進化学的検討を加えた。HBs 抗原陽性の 5 人の先住民族から血清を採取した。それら 5 本と international database (DDBJ/EMBL/GenBank) 登録株 54 本の HBV 全塩基配列を用い系統樹解析を施行した。5 本のうち 3 本は genotype D に分類され Papua New Guinea の株と近縁関係にあった。残りの 2 本は亜型の genotype C に分類され X、Core 領域でポリネシア民族と近縁関係にあった。2 本の亜型の genotype C は S 領域では new genotype に分類され、血清型は過去に genotype C では報告のない ayw を呈した。これらの結果は HBV の世界各地への分散やオーストラリア先住民族の共通祖先、民族移動についての検討に有益であると考えられた。

A. 研究目的

現在までに B 型肝炎ウイルス (HBV) は遺伝子型として A から G までの 7 型に分類されており、各世界の地域におけるその遺伝子型の分布には地域特異性が存在する。HBs 抗原はオーストラリア先住民族の血清から発見され、それ以降それら先住民族においては HBV 感染の high risk group であると広く理解されている。しかし、現在までにオーストラリア先住民族における HBV-DNA 塩基配列および遺伝子型は報告されていない。本検討では、そのオーストラリア先住民族から分離された HBV 株の全塩基配列を決定し、系統樹解析を施行した。

B. 研究方法

対象 1989 年から 1994 年の期間にオーストラリア Queensland に住居している HBs 抗原陽性オーストラリア先住民族 5 人から血清を採取した。それら 5 人の臨床病理学的特徴を Table.1 に示す。HBe 抗原陽性者は 3 人、Hbe 抗体陽性者は 2 人であった。1 人は組織学的に肝細胞と診断されていた。

方法 患者血清より DNA を抽出後、polymerase chain reaction (PCR) 法にて HBV-DNA を増幅し、直接塩基配列法にて HBV 全塩基配列を決定した。使用

したプライマーを Table 2 に示した。これら決定された 5 本の塩基配列は、genotype A-G の DNA database (DDBJ/EMBL/GenBank) 登録全塩基配列 HBV 株 (約 3200bp) 54 本、及び人以外の霊長類 6 本の HBV 株とアライメントを作成し、遺伝子進化距離、系統樹、ブーツストラップの分子進化学的手法を用い解析した。さらに 91 本の S 遺伝子 (681bp) 登録株についても同様に解析を施行した。全ての分子進化学的解析は国立遺伝学研究所 (三島) のプログラム『ODEN』を使用した。

C. 結果

遺伝子距離及び系統樹解析

5 本の HBV 株 AustDF、AUSTKW、AustGC、AustRC、AustSJ の全塩基配列長はそれぞれ、3182、3182、3182、3215、3194 であった。HBV 全塩基配列を用いた系統樹解析では、AustDF、AUSTKW、AustGC は genotype D に分類された。さらにこれら 3 本の株は Papua New Guinea の株と近縁関係にあった。残りの 2 本 AustRC、AustSJ は亜型の genotype C (mean nucleotide difference from genotype C 6.7%; range 5.9-7.4%) に分類された (Fig. 1a)。pair-wise 解析による mean percentage nucleotide difference を Table 4 に示す。

S 遺伝子領域の解析では、AustRC、AustSJ 株は既存の genotype C から分離

された新たな genotype に分類された (Fig. 1b)。さらに 91 本の S 遺伝子領域の DNA database (DDBJ/EMBL/GenBank) 登録 HBV 株を加え解析を施行した。AustRC、AustSJ 株は同様に新たな genotype に分類された (fig. 2)。

X、Core 遺伝子領域の検討において、AustRC、AustSJ 株はニューカレドニア、ポリネシア民族の株と近縁関係にあった (fig. 1c-f)。

アミノ酸及び血清学的関連

5 本の全ての HBV 株は血清型 ayw に分類されたが、AustRC、AustSJ 株は Arg¹²²、Lys¹⁶⁰、Thr¹²⁷ を示す ayw3 であった。一方 AustDF、AUSTKW、AustGC の 3 本は Arg¹²²、Lys¹⁶⁰、Pro¹²⁷ を示す ayw1 であった (Fig. 3)。

D. 考察

オーストラリア先住民族から分離された 5 本の HBV 株 AustDF、AUSTKW、AustGC、AustRC、AustSJ の全塩基配列を報告した。2 本の AustRC、AustSJ 株は S 遺伝子領域の解析では、いわゆる new genotype に分類されたが、我々は全塩基配列の検討から亜型の genotype C と結論付けた。

オーストラリア大陸とパパニューギニア大陸は 4 万年前にザウル大陸として東南アジアから分離して形成された。7 千年前ザウル大陸は Torres 海峡を界にオーストラリア大陸とパパニューギニ

ア大陸に分離され現在の地理的状况に至っている。オーストラリア先民族とパバニューギニア民族が共通の祖先を持つことは、ヒト α -globin haplotypes の検討からも証明されている。genotype D に分類された AustDF、AustKW、AustGC の 2 本の HBV 株を用いた分子進化学的検討からも、同様に両者の民族が共通祖先を持つ事が示唆された。また、亜型の genotype C に分類された AustRC、AustSJ の 2 本の HBV 株においては、ニューカレドニア、ポリネシア民族の HBV 株と近縁関係にある事が示された。この事は人類学上非常に興味深い結果である。ニューカレドニア、ポリネシア民族とオーストラリア先民族の関係については今後の検討が期待される。

HBV の血清型は現在 9 型に分類されている (*adw2*, *adw4*, *adr*, *adrq*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, and *ayr*)。現在までに genotype C に対応する血清型は、*adr*, *ayr* が報告されているが、オーストラリア先民族から分離され、genotype C に分類された 2 株の HBV AustRC、AustSJ は血清型 *ayw* を示した。しかし、血清型 *ayw* は genotype D で多く認められており、genotype C においてはこれまでに報告されていなかった。この事は今後、血清型と遺伝子型の関連を検討する際にはその対応を十分に注意する必要がある事を示唆している。

E. 結論

オーストラリア先民族から分離された HBV 全塩基配列を初めて決定し、その分子進化学的検討から興味深い結果を報告した。これらの結果は HBV の全世界への分布や、血清型と遺伝子型の関係や、オーストラリア民族との共通祖先についての検討に大いに貢献するものと考えられる。今後、オーストラリア民族の歴史的な民族移動について、HBV の遺伝子型を考慮する事によってより興味深い結果が得られるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness

Fuminaka Sugauchi, Masashi Mizokami, Etsuro Orito, Tomoyoshi Ohno, Hideaki Kato, Seiji Suzuki, Yoshihide Kimura, Ryuzo Ueda, L. A. Butterworth and W. G. E. Cooksley

Journal of General Virology, 2001
(imprinting)

G. 知的所有権の取得

The international DNA database accession number: AB048701 through AB048705

Table 1. Clinicopathological features of Australian Aborigines

	Collection data	Age	BTH	Place of birth	Residence	HBeAg	anti-HBe	ALT	AST	Liver Biopsy finding
AustRC	7/5/92	54yr	-	Cherbourg	Ipswich	-	+	62	317	Liver cancer
AustSJ	8/12/94	36yr	-	Murgon	Cherbourg	+	-	56	34	CH with mild fibrosis
AustGC	25/7/91	22yr	-	Brisbane	Brisbane	+	-	108	48	CH with no fibrosis
AustKW	14/11/91	53yr	-	Cherbourg	Weipa	-	+	29	19	NT
AustDF	2/3/89	26yr	-	Gympie	Unknown	+	-	127	52	CH with no fibrosis

CH, chronic hepatitis; BTH, blood transfusion history; NT, not tested

Table 2. List of the 26 HBV strains of genotype C and D used in this study

Accession no	Genotype	Serotype	Country of origin	References
AustSJ	Var-C	ayw3 ^{††}	Australia	in this study
AustRC	Var-C	ayw3 ^{††}	Australia	in this study
D23684	C	adr [†]	Japan	Horikita <i>et al.</i> , 1994
D23681	C	adr [†]	Japan	Horikita <i>et al.</i> , 1994
M38636	C	adr [†] *	Korean	Kim <i>et al.</i> , 1988
AB014378	C	adr [†]	Japan	Takahashi <i>et al.</i> , 1998
D50520	C	adr [†]	Japan	Asahina <i>et al.</i> , 1996
X04615	C	ayr [*]	Japan	Okamoto <i>et al.</i> , 1986
Y18857	C	adw2 [†]	China	Unpublished
AF068756	C	adr [†] *	Thailand	Monkongdee <i>et al.</i> , 1998
X75665	C	adrq- [*]	New Caledonia	Norder <i>et al.</i> , 1994
X75656	C	adrq- [*]	Polynesia	Norder <i>et al.</i> , 1994
AustGC	D	ayw ^{††}	Australia	in this study
AustDF	D	ayw ^{††}	Australia	in this study
AustKW	D	ayw ^{††}	Australia	in this study
X65259	D	ayw [*]	Italy	Unpublished
X68292	D	ayw [*]	Italy	Unpublished
X65258	D	adw2 [*]	Italy	Unpublished
J02203	D	ayw3 [†]	France	Galibert <i>et al.</i> , 1979
X85254	D	ayw [†]	Italy	Unpublished
X97849	D	ayw3 [*]	UK	Alexopoulou <i>et al.</i> , 1996
X80924	D	ayw [*]	UK	Unpublished
M32138	D	ayw [†]	Turkey	Tong <i>et al.</i> , 1990
L27106	D	ayw [†]	UK	Hasegawa <i>et al.</i> , 1994
Y07587	D	ayw [*]	Germany	Stoll-Becker <i>et al.</i> , 1997
AB033559	D	ayw [*]	Papua New Guinea	Okamoto <i>et al.</i> , 1988

* mentioned in an article or a description of registration.

† deduced from sequence data.

†† determination by seroreaction.

Table 3. HBV-DNA oligonucleotide primers used for full-length sequencing

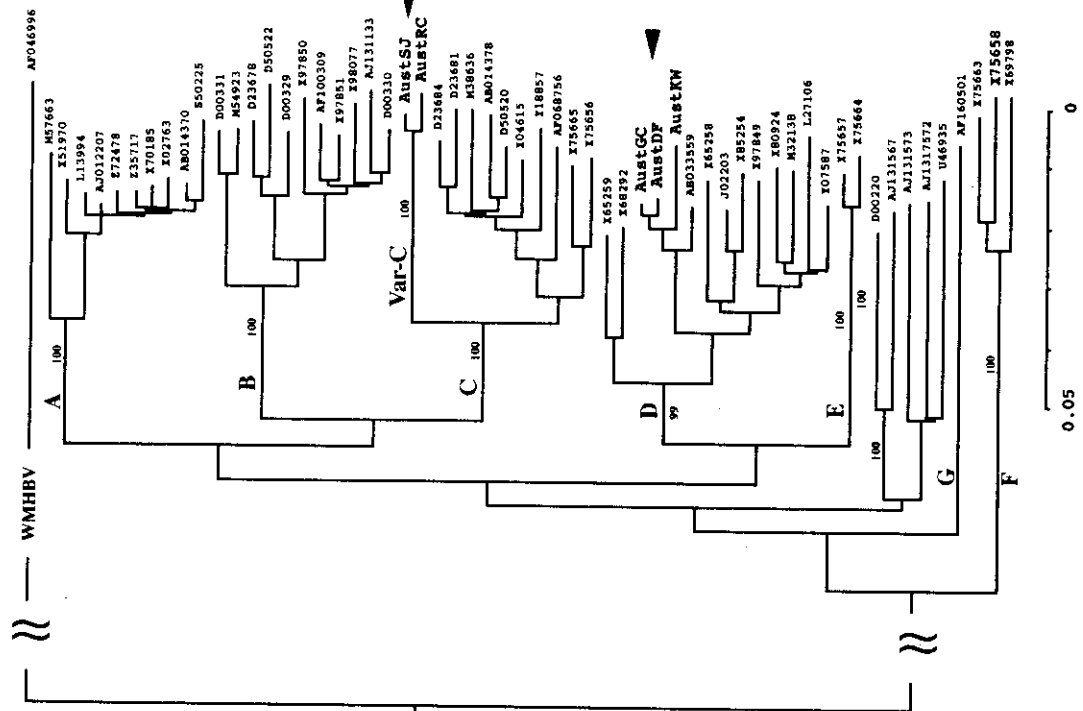
Primer	Nucleotide sequence	Nt position	Polarity
HB1F	: 5'-AAGCTCTGCTAGATCCCAGAGT-3'	(18 - 39)	sense
HB1R	: 5'-GAAACATAGAGGTGCCTTGAGCAG-3'	(557 - 534)	antisense
HB2F	: 5'-TGCTGCTATGCCTCATCTTC-3'	(414 - 433)	sense
HB2R	: 5'-CATACTTCCAATCAATAGG-3'	(989- 970)	antisense
HB3F	: 5'-GCCAAGTCTGTACAACATCTTGAG-3'	(760 - 783)	sense
HB3R	: 5'-AGTTGGCGAGAAAAGTGAAAGCCTG-3'	(1107-1084)	antisense
HB4F	: 5'-CCTATTGATTGGAAAAGTATGTCA-3'	(970 - 992)	sense
HB4R	: 5'-CGGGACGTAGACAAAAGGACGT-3'	(1434 - 1414)	antisense
HB5F	: 5'-CTCTGCCGATCCATACTGCCGAA-3'	(1256 - 1278)	sense
HB5R	: 5'-TTAACCTAATTCCTCCCCA-3'	(1761 - 1741)	antisense
HB6F	: 5'-TTGTYTACGTCCCGTCGGCG-3'	(1421-1440)	sense
HB6R	: 5'-AACAGACCAATTTATGCCTA-3'	(1803-1784)	antisense
HB7F	: 5'-GAGACCACCGTGAACGCCA-3'	(1611-1630)	sense
HB7R	: 5'-CCTGAGTGCTGTATGGTGAGG-3'	(2072-2048)	antisense
HB8F	: 5'-TTCACCTCTGCCTAATCATC-3'	(1824-1843)	sense
HB8R	: 5'-ATAGGGCATTGGTGGTCT-3'	(2314-2278)	antisense
HB9F	: 5'-TCAGGCAACTATTGTGGTTTCA-3'	(2190-2211)	sense
HB9R	: 5'-GGATAGAACCTAGCAGGCAT-3'	(2654-2635)	antisense
HB10F	: 5'-CGCAGAAGATCTCAATCTCGG-3'	(2417-2437)	sense
HB10R	: 5'-GGGTTGAAGTCCCAATCTGGATT-3'	(2987 - 2965)	antisense
HB11F	: 5'-GGGTCACCATATTCTGGGAA-3'	(2814-2834)	sense
HB11R	: 5'-GAACTGGAGCCACCAGCAGG-3'	(75-56)	antisense
HB12F	: 5'-GTGGAGCCCTCAGGCTCAGG-3'	(3075-3094)	sense
HB12R	: 5'-CGAGTCTAGACTCTGTGGTA-3'	(256-237)	antisense

Table 4. Average percent nucleotide difference , using pair-wise analysis, of small-S gene and complete nucleotide sequence between two Australian strains and other genotypes including 48 HBV DNA isolates from the international database (DDBJ/EMBL/GenBank)

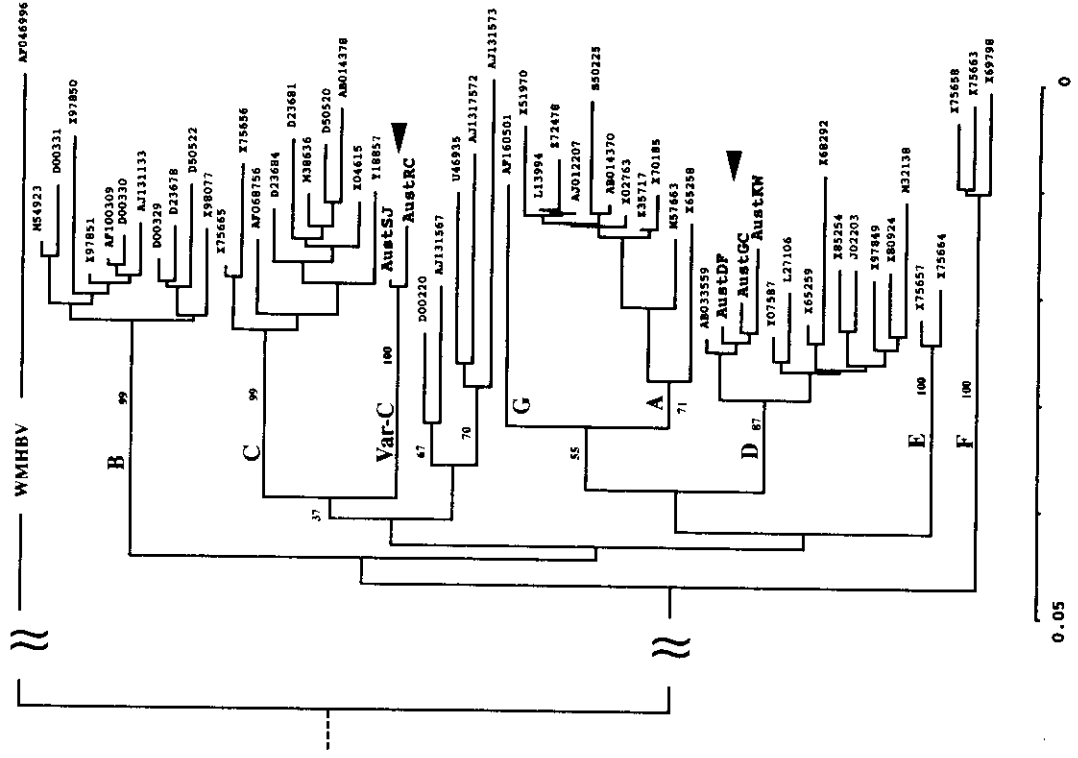
	Genotype							
	A	B	C	Var-C	D	E	F	G
AustSJ								
nucleotide difference (small-S gene)	5.91 % (5.0-6.5)	5.90 % (5.4-6.5)	4.63 % (4.0-5.1)	0.60 %	4.79 % (4.3-6.0)	4.50 % (4.4-4.6)	7.50 % (7.5-7.5)	5.40 %
nuclotide difference (complete genome)	10.1 % (9.9-10.8)	10.3 % (9.8-11.1)	6.9 % (6.2-7.4)	1.5%	11.9 % (10.2-11.7)	10.8 % (10.7-10.8)	13.9 % (13.7-14.2)	13.0 %
AustRC								
nucleotide difference (small-S gene)	6.35 % (5.4-6.9)	6.36 % (5.9-7.0)	5.07 % (4.6-5.6)	0.60 %	5.20 % (4.7-6.5)	4.80 % (4.6-5.0)	7.80 % (7.8-7.8)	5.90 %
nuclotide difference (complete genome)	9.9 % (9.6-10.5)	9.9 % (9.6-10.7)	6.6 % (5.9-7.2)	1.5%	11.7 % (11.1-12.3)	10.8 % (10.7-10.8)	13.7 % (13.5-13.9)	13.2 %

Fig 1

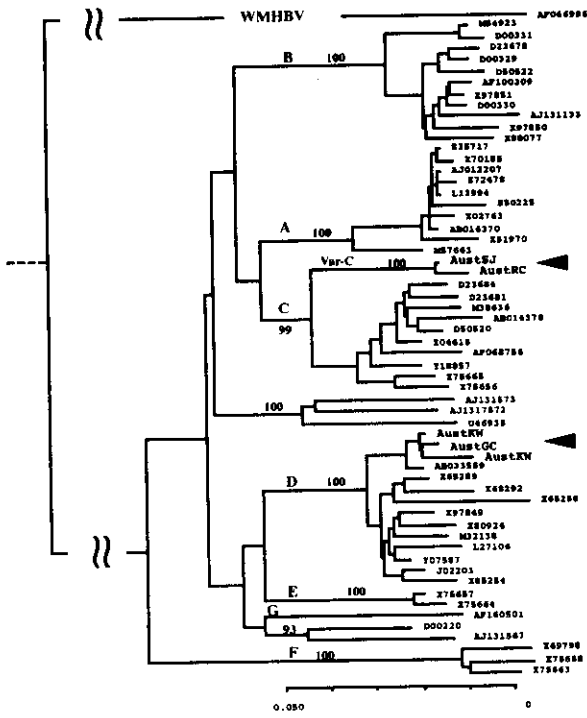
(a) Complete genome



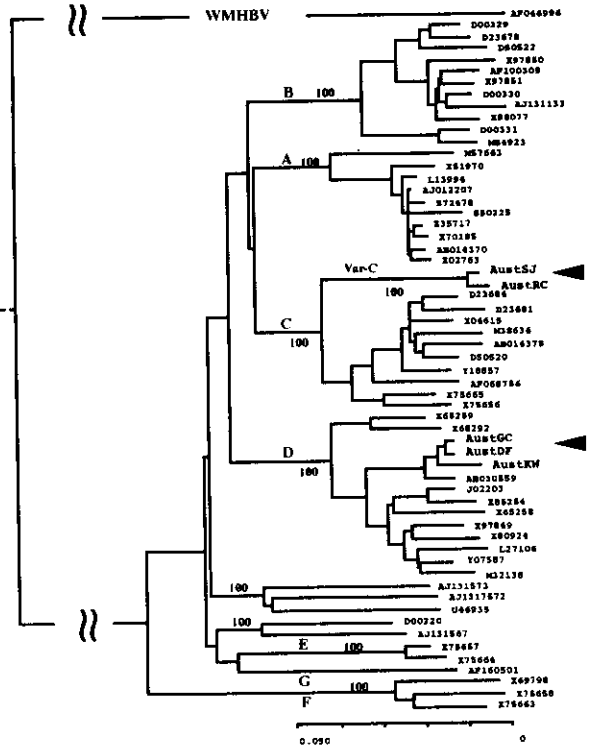
(b) Small-S gene



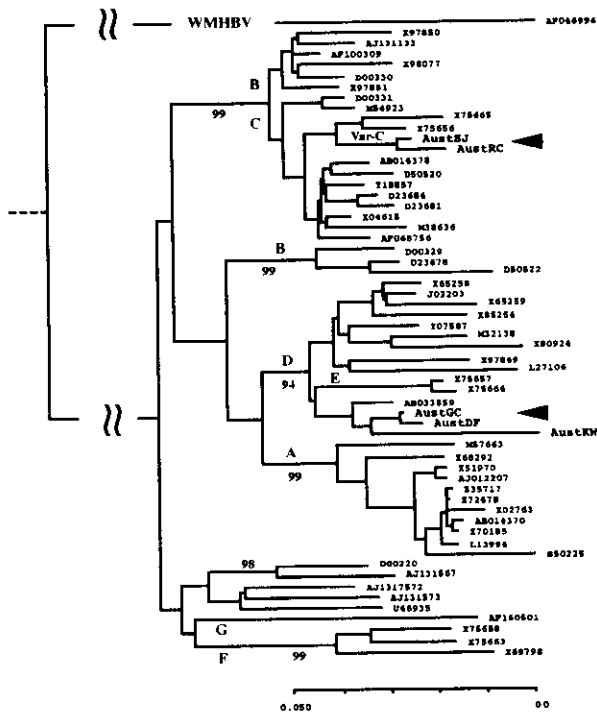
(c) Large-S gene



(d) P gene



(e) Core gene



(f) X gene

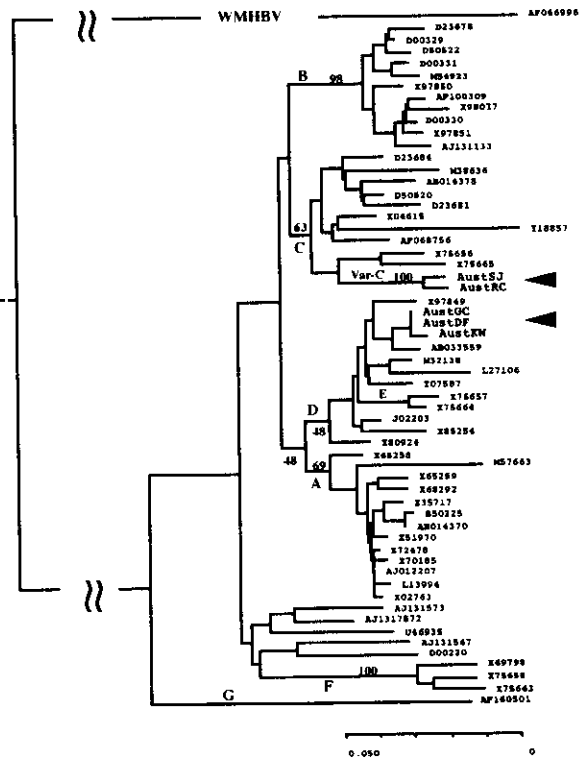


Fig 2

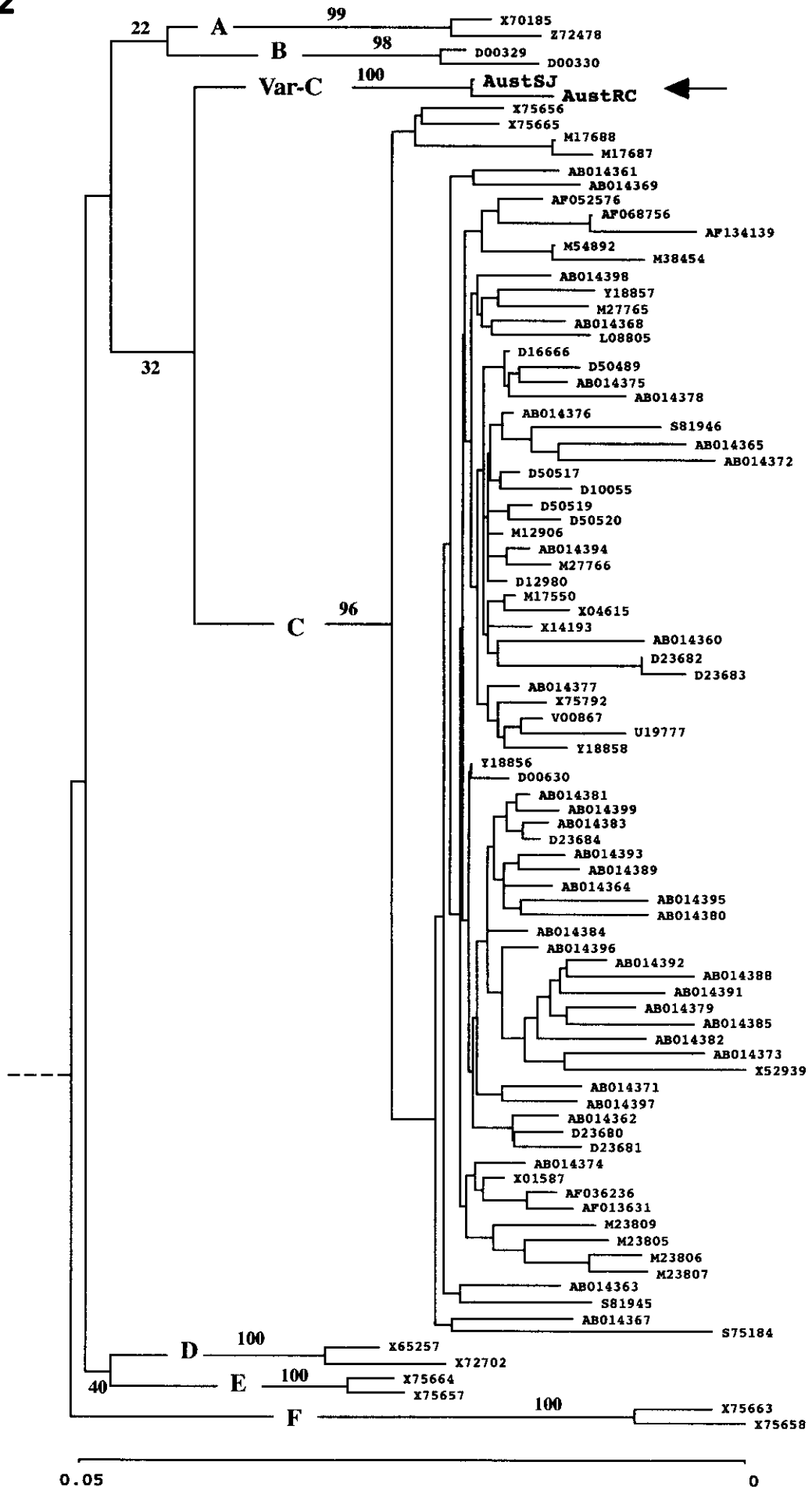


Fig 3

A	X70185	1:..M.E.N.I.T.S.G.F.L.P.G.L.L.V.L.Q.A.C.F.F.L.L.T.R.I.L.T.I.P.O.S.L.O.S.M.W.T.S.L.N.F.L.G.G.S.P.V.C.L.Q.N.S.Q.S.P.T.S.N.H.S.P.T.S.C.P.P.I.C.P.G.Y.R.M.A.C.L.R.R.F.I.F.L.F.I.L.L.C.L.I.F.L.L.V.L.L.D.Y.Q.G.M.L.P.V.C.P.L.I.P.G.S.F.T.T.S.T.G.P	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	M57663	1:.....A.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B	D00331	1:....A..L.....S..K.....L.....E.T.....Q.I..S.....C.....C.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X97850	1:....A..L..H.....S..K.....T.A.P.....Q.I..S.....C.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Var-C	AustrC	1:..S.T.....A.G.I.....Q.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustrS	1:..S.T.....A.A.....Q.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C	D23684	1:..T.T.....A.T.P.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X75665	1:..T.....A.P.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustDF	1:.....T.T.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustGC	1:.....T.T.....T.....T.....F.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustKW	1:.....S.....T.V.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AB033559	1:.....T.T.....T.A.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	J02203	1:.....T.T.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	X75657	1:..S.....K.....A.....S.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X75664	1:..S.....K.....A.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
F	X75663	1:....L...R...V.C....K.....L.R.P.....L.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X69798	1:..D...L...L...V.C....K.....L.G.P.....L.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G	HBVG	1:.....V..P..L.....I.....T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Chimp	D00220	1:.....K.....A.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A	X70185	121:..C.K.T.C.T.P.A.G.N.S.M.F.P.S.C.C.C.T.R.F.T.D.G.N.C.T.C.I.P.I.P.S.M.A.P.A.L.M.E.N.A.S.V.R.F.S.H.L.S.L.L.V.P.F.V.M.G.L.S.P.T.V.L.S.A.I.W.M.H.G.P.L.Y.S.V.S.P.F.I.L.L.P.I.F.F.C.L.W.V.I.I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	M57663	121:.....S..N..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B	D00331	121:.....T.....V.....F...S..N..L..M.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X97850	121:.....T.....V.....F...S..N..L..M...T.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Var-C	AustrC	121:..R...I.T...T.....S.....G..P.....A.....S..N..L..L.....L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustrS	121:..R...I.T...T.....S.....F.....V..I.....S..N..L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C	D23684	121:.....I...T.....S.....R.P.....V.....S..N..L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X75665	121:.....I...T.....S.....V.R.P.....V.....S..N..L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustDF	121:..R...T..Y.....S.....G.P.....A.....I.....V.....S...L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustGC	121:..R...T..Y.....S.....G.P.....A.....I.....V.....S...T.L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AustKW	121:..R...T..Y.....S.....G.F.....A.....V.....S..N.T.L..L.....Y.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AB033559	121:..R...T..Y.....S.....G.P.....A.....V.....S...L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	J02203	121:..R..M..T..T..Y.....S.....G.F.....A.....V.....S...L..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	X75657	121:..R...L...T.....S..S.....G.P.....A.....V.....S..N..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X75664	121:..R..M..L...T.....S..S.....G.F.....A.....V.....S..D..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
F	X75663	121:.....A.L...T.....S..S.....L.G.....A.....Q..C.....L.V...I.....N..C..L.....C.Y...S.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	X69798	121:.....L...T.....S..S.....L.G.....A.....Q..C.....L.V...I.....N..C..L.....C.Y...S.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G	HBVG	121:.....Y.....S.....N..N..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Chimp	D00220	121:.....T..L..I.....S.....F.....A.....L.....N..N..L.....	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

肝炎ウイルス genotype G の検出法の開発と本邦における罹患率の検討

分担研究者：溝上雅史 名古屋市立大学医学部臨床検査医学教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は従来 A から F 型までの 6 つの genotype に分類されてきた。昨年になり新しくアメリカとフランスから genotype G 型が報告された。HBV の genotype には地域特異性が、また病態との関連が示唆されている。HBV の genotyping 法は種々の方法が報告されているが、genotype G を同定する方法は今だ報告がない。今回我々は、新たに PCR 法を用いて HBV genotype G を検出する system を開発し、日本における HBV genotype G の検出を行った。DDBJ/GenBank に登録されている HBV の遺伝子配列を用いて alignment を作成し、genotype G 株に共通して認められる Core 領域への 36 塩基の遺伝子挿入領域にプライマーを設定した。同システムの信頼性を genotype A-G の HBV の血清 144 例を用いて検討したところ、genotype G の血清 4 例中 4 例 (100%) 陽性、genotype G 以外の genotype を有する血清 140 例からは発見出来なかった。次に、日本における 540 例の B 型肝炎患者 (平均年齢 : 43.2 ± 14.3 歳、男女比 313:197、ASC : 106 例、CH : 252 例、LC : 84 例、HCC : 98 例、genotype B40 例、C : 500 例) について genotype G を検討したが、検出されなかった。我々の開発した HBV genotype G を検出するこの新しい system は、HBV genotype と肝病態、HBV genotype の地域分布の検討に有用であると考えられる。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) は A-G 型の 7 つの genotype に分類される。HBV の genotype は地域特異性が、また肝病態との関連が示唆されている。HBV の遺伝子型分類は、種々の

方法が報告されているが、genotype G を同定する方法は今だ報告がない。今回我々は、新たに PCR 法を用いて HBV genotype G を検出する system を開発し、日本における HBV genotype G の検出を行った。

B.研究方法

方法

HBs 抗原陽性患者から血清を採取した。genotype A は South Africa と Dominica から、genotype B と C は日本から、genotype D は Mongolia と Uzbekistan から、genotype E は Cameroon から、genotype F、genotype G は米国から採取した。さらに、日本の HBV genotype G の罹患率を検討するために 540 例の血清を日本において採取した。内訳は、asymptomatic carrier 106 例、chronic hepatitis 252 例、liver cirrhosis 84 例、hepatocellular carcinoma 98 例であった。臨床診断は患者の理学的所見、血液生化学検査にて行った。

HBV の遺伝子型分類は Usuda ら (J Virol Methods, 1999 and 2000) の方法を用いて EIA 法にて行った。同法で分類不能例は preS1, preS2, S 領域の遺伝子配列を決定した。

HBV genotype G の検出は特異的な primer として HBVHKF1, HBVHKF2, HBVHKFR2 を用いて semi-nested PCR 法にて行った。

B.結果

DDBJ/GenBank に登録されてい

る HBV の遺伝子配列を用いて alignment を作成し、genotype G 株に共通して認められる遺伝子配列を同定しこれを primer として PCR 法にて検出した。この primer を用いた PCR 反応の genotype G の特異性を software<Amplify version 1.0>を用いて検討し、他の genotype の代表的な株では DNA 増幅はおこらず、genotype G 株でのみ増幅されることを確認した。

次に、genotype A から G に感染した患者の血清を用い、新しいシステムで PCR 反応を行った (Fig 2)。HBV の G 以外の genotype では増幅がおこらず、genotype G において 357 bp の amplicon が観察された。Table 1 に、様々な地域から集められた genotype A から G の HBV に感染した血清を用い、新しいシステムで PCR 反応を行った結果を示す。genotype A-F に属する HBV を有する血清においては、陽性例は 140 例中 0 例 (0%) で、一方、HBV の genotype G の血清では 4 例中 4 例 (100%) が陽性であった。

Table 2 に今回検討した日本の HBV carrier 540 例の臨床的、ウイルス学的な背景と新しい system を用いた HBV genotype G の検出結果を示す。平均年齢 43.2 ± 14.3 歳、男女比 343 : 192、臨床診断では

Asymptomatic Carrier 106 例、Chronic hepatitis 252 例、Liver cirrhosis 84 例、Hepatocellular carcinoma 98 例であった。HBsAg 陽性率は 46.4%で、HBV DNA 量は TMA 法で測定したが 5.08 ± 1.87 であった。HBV の遺伝子型は B : 40 例、C : 500 例であった。これらについて HBV genotype G の検出を行ったところ 1 例も検出されなかった。

D. 考察

今回我々は、PCR 法を用いた HBV genotype G の検出 system を開発した。過去に HBV の遺伝子型分類法としては様々な報告があるが (Lindh et al. 1997, Mizokami et al. 1999, Usuda et al. 1999, 2000)、いずれも genotype G の分類については言及されていない。我々は、DDBJ/GenBank に登録された配列の検討により HBV genotype G 株の core 領域に 36 塩基の挿入が認められ同領域をもちいて HBV genotype G の検出を行った。この領域は genotype G に属する各々の株間で高度に保存されており HBV genotype G の検出に最適であると考えられる。その証拠に、この系をもちいて世界の様々な地域の各々の遺伝子型を用いて新しい system の検討を行ったところ感度、特異度とも

に満足のできるものであった。

HBV の genotype 分布は地域特異性が示されている。genotype A, D は世界中に広く分布し、genotype B, C は極東アジア、東南アジアにかけて認められる。genotype E は西アメリカに、genotype F は中央、南アメリカで報告されている (Norder et al. 1993, Arauz-Ruiz P. et al. 1997)。現在のところ genotype G は北アメリカとフランスから報告されているのみである (Stuyver et al. 2000)。今回我々は、日本において HBV genotype G の存在の有無について大規模な検討を行ったが、HBV genotype G は検出されなかった。今回我々の用いた血清は Usuda らの EIA 法を用いた遺伝子型分類法を用いて genotype B もしくは genotype C に分類された血清であった。Usuda らの分類法により分類不能例は塩基配列を決定して genotype を決定したもので、結果として HBV の genotype G と他の HBV genotype との共感染を検討したことになが、日本において HBV genotype G は存在しないことがあきらかとなった。今後、genotype G の地理的分布を確立するために、北アメリカとフランス以外の地域に genotype G は存在しないのか、大規模な検討が必要である。