

コム株式会社。

2. 成果発表

その他特になし

疫学調査研究報告書

公立置賜南陽病院 新澤陽英

山形県 A 村における HCV 抗体陽性者の死因に関する検討

【緒言】

C型肝炎は肝細胞癌の高危険群になる一方で、C型肝炎ウイルス（HCV）感染は肺や、腎疾患などを合併することが知られている。また、HCV感染者の肝癌合併頻度についての検討は通院患者を対象としたもので、地域一般住民を対象としたコホート研究で行われたものはほとんどない。

私どもは山形県の A 村で 1993 年に HCV 感染について住民検診を行った。この際 467 名の HCV 抗体陽性者が把握された。このうち 58 名が 1993 年より 2003 年の 11 年間に死亡した。本研究はこれら HCV 抗体陽性者の死因から、HCV 感染者の死因の特徴を推定する目的で行われた。

【対象及び方法】

山形県の A 村において 40 歳以上の住民 6510 名（男性 3166 名、女性 3344 名）を対象として 1993 年に HCV 感染の実態を把握することを目的とした地域住民検診を行った。受診者は 1995 名（32.2%）で、HCV 抗体陽性者は 467 名（23.4%）であった。これら 467 名（男性 139 名、女性 328 名）を 1993 年から 2003 年末まで追跡調査し、死亡者数、

死亡原因を調査した。また A 村全体における死亡者数、死亡原因を観察人数と観察期間から、性・年齢別の観察人年を計算し、その観察人年の年齢構成から期待される全死因、及び主要死因（心疾患、悪性新生物、呼吸器疾患、脳血管疾患）の死亡数を 1999 年度の A 村の人口動態から求め（期待値：E）、実際の死亡数（実測値：O）から O/E 比（標準化死亡比：SMR）を計算した。SMR の 95%信頼区間はポアソン分布に基づく Haenszel の方法で計算した。

【結果】

1) HCV 抗体陽性者の観察人年

男性の HCV 抗体陽性者の観察人年は 1371 人年、女性の HCV 抗体陽性者の観察人年は 3433 人年であった。

2) HCV 抗体陽性者の死因の解析

男性の全死因の SMR は 124.5、女性は 153.5 であった。男性の肝癌の SMR は 2810、女性は 902 であった。各疾患の中で男女とも肝癌が最も高かった。女性は次いで心疾患が 218.6 であった。

全死因の死亡率は 95%信頼区間において男性でも女性でも統計学的に有意差が得られた。肝疾患の死亡率は 95%信頼区間において男性でも女性で

も統計学的に有意差が得られた。心疾患の死亡率は95%信頼区間において女性で統計学的に有意差が得られた。

【考察】

HCV抗体陽性者においては肝臓の死亡率が地域住民と対象とした検討でも高いことが確認された。また女性において心疾患での死亡率が地域住民と比較して高いことが確認された。女性においては全死因の死亡率も高い

ことが確認されたが、これは肝臓死および心疾患死が多いことに起因すると推測される。

HCV抗体陽性者においては。肝臓による死亡が多いことが改めて確認されたが、

今回の検討では女性において心疾患の死亡率が高いことから心疾患にHCVが寄与する可能性が示唆され、検討の余地があるものと思われた。

超高感度免疫測定法（radical immunoassay）を用いた新規の HBs 抗原測定の開発

分担研究者 富樫 整 国立大学法人山形大学医学部消化器病態制御内科学
助教授

研究要旨

HBs 抗原を超高感度に検出可能な radical immunoassay 法を用い、各種肝疾患における HBs 抗原の存在を改めて検証した。原因不明の肝硬変 31 例、原因不明の肝硬変 17 例、C 型肝炎（肝細胞癌なし）30 例、C 型肝炎＋肝細胞癌 40 例、さらにエジプト人慢性肝疾患 30 例を対象にした。尚、全例とも通常の ELISA 法で HBs 抗原は、陰性である。原因不明の肝硬変 31 例中 2 例（6.45%）、原因不明の肝細胞癌 17 例中 2 例（11.86%）、C 型肝炎 30 例中 3 例（10%）、C 型肝炎＋肝細胞癌 40 例中 3 例（7.5%）、エジプト人慢性肝疾患 30 例中 3 例（10%）HBs 抗原が陽性であった。HBs 抗原陽性者の中から、原因不明の肝細胞癌 1 例、C 型肝炎 1 例、エジプト人慢性肝疾患 1 例 HBVDNA が陽性であり、HBVDNA 濃度は低値であった。Radical immunoassay 法は、高感度に HBs 抗原陽性者を選別可能で、低濃度 B 型肝炎ウイルスキャリアーを簡便に、安価に診断できると考えられた。

A. 研究目的

私どもは、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス感染を高感度に検出するため、電子スピン共鳴装置（ESR）を用いた超高感度免疫測定法を開発し、radical immunoassay 法と名づけた。Radical immunoassay 法は、迅速、安価という特徴をあわせ持つ。私どもは、radical immunoassay 法の有用性を明らかにするため、正常人ボランティア、各種肝疾患を対象に低濃度

HBs 抗原陽性率の検証を改めて行った。

B. 研究方法

radical immunoassay 法は、抗 HBs 抗体（マウス・モノクローナル）に標識されたペルオキシダーゼ活性を安定なラジカル（HHTIO・）に置き換え、これを電子スピン共鳴装置（ESR）により定量する原理に基づいている。ESR 法は電子スピンを有する常磁性

種のみを計測するため、バックグラウンドノイズを最小限にし、大幅な感度向上をもたらす。私どもは、本法の汎用性を図る目的にて、全自動ESR分析装置を併せて開発した。(図1)

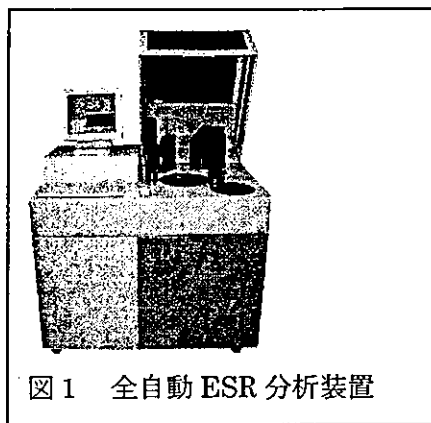


図1 全自動ESR分析装置

ELISA法にてHBs抗原陰性の正常人ボランティア146例にてS/N比からカットオフ値の設定を行った。また、ELISA法にてHBs抗原陰性例の正常人ボランティア210例、原因不明の肝硬変31例、原因不明の肝細胞癌17例を対象にradical immunoassay法にてHBs抗原を測定した。C型肝炎患者において、B型肝炎ウイルスの重感染が肝障害の進展や発癌をもたらす可能性が知られている。C型肝炎患者30例、C型慢性肝炎あるいはC型肝硬変に肝細胞癌を合併した患者40例についてもradical immunoassay法によるHBs抗原測定を行った。さらに、radical immunoassay法が世界規模で適用可能かどうかエジプト人慢性肝疾患30例についても検討した。尚、対象とした全症例ともELISA法にてHBs抗原陰性であった。

(倫理面での配慮)

十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得た。検体の使用目的、予想される効果、参加者の人権の保護などについても、説明した。

C. 研究結果

スミルノフ検定により、歪度の有意点0.33、尖度0.66をとともに満たし、正規分布を示した。カットオフ値は、平均+4SDとし、対応するS/N比は、3.294である。3.294以上を陽性、2.208以下を陰性、その間を判定保留とした。HBs抗原陽性者のS/N比は、非常に高く、ボランティア群と重複しなかった。

HBs抗原パネル血清を用いた予備実験で、radical immunoassay法は、0.025 ng/mlという低濃度まで検出可能であり、最も高感度とされる化学発光法(CLIA法)の約10倍の高感度を有している。我々は、B型肝炎患者より得られた血清を希釈し、real-time PCR法とradical immunoassay法を比較した。HBV定量ダイレクトは、最も高感度なreal-time PCR法である。HBVDNA量が1~2.0 LOG IU/mlになる様に希釈したB型肝炎患者血清を更に希釈しreal-time PCR法とradical immunoassay法を比較した。HBV定量ダイレクトで検出限界以下まで希釈された血清であっても、radical immunoassay法でHBs抗原を検出可能であった。このことからRadical immunoassay法は、驚異的な高感度を有すると考えられる。

正常人ボランティア210例中、6

人がHBs抗原陽性と判定された(2.86%)。原因不明の肝硬変31症例中2例HBs抗原が、陽性であった(6.45%)。原因不明の肝細胞癌17例のうち2例HBs抗原が、陽性であった(11.86%)。インターフェロン治療予定のC型肝炎患者30例中、3例陽性であった(10%)。C型慢性肝炎あるいはC型肝炎に肝細胞癌を合併した患者40名中HBs抗原は、3例陽性であった(7.5%)。Radical immunoassay法により陽性と判定された慢性肝疾患患者10例の血清をリアルタイムPCRにてHBVDNAの有無を検索した。原因不明の肝細胞癌1例(2.3 LOG IU/ml)、C型慢性肝炎群1例(1.6 LOG IU/ml)にHBVDNAが検出された。エジプト人慢性肝疾患30例中3例HBs抗原陽性と判明した(10%)。3例の中で1例(1.0 LOG IU/ml)HBVDNAがreal-time PCRにより検出された。

D. 考察

私どもは、感染症関連蛋白を高感度に検出可能なradical immunoassay法を開発した。私どもがradical immunoassay法で測定した結果では、ルーチンのHBs抗原測定結果が陰性であるにもかかわらず、正常人ボランティアや肝疾患患者においてHBs抗原陽性と判定される方が多いことが判明した。実際、HBs抗原が陽性と判断された13例の内3例にHBVDNAがリアルタイムPCRにより検出された。HBs抗原産生は、B型肝炎ウイルスの増幅を表わしている。

る。ウイルスがリアルタイムPCRにより検出されなかったradical immunoassay法で陽性と判断された10例においても、生体側の免疫機構によりHBV増殖が抑制されているが、微量なHBVが存在すると推測する。従って、radical immunoassay法は、低濃度B型肝炎ウイルスキャリアーを高感度に幅広く簡便に診断できる革命的な手法と考えられる。

疫学的に見てB型肝炎ウイルスの感染率の高い地域(中国を始めとするアジア、アフリカ)においては、母子感染、性行為などに伴う水平感染が社会的な問題になっている。このような地域においては、潜在性B型肝炎が多いと予想されるが、簡便さ、価格、検体処理速度の理由からPCR法の導入は困難である。また、PCR法は、プライマーの設定や測定者の技量の影響を受けやすく、世界標準の測定法になり難い。Radical immunoassay法は、感度と簡便さの面で、PCR法の短所を補うことができる。疫学的にエジプトは、C型肝炎ウイルスの多発地区である。今回のデータで示したように、エジプトにおいても潜在性B型肝炎ウイルスを効率よく拾い上げることができた。潜在性B型肝炎ウイルスは、感染力を有する。Radical immunoassay法による高感度抗原測定法の導入により、母子感染と水平感染と同時に免疫機構の低下に基づくB型肝炎ウイルス再燃を制御し、B型肝炎ウイルスに関連する死を減少させると予測される。

E. 結論

私どもは、免疫測定法をより高感度にする radical immunoassay 法を開発した。本法は、抗体にラベルされたペルオキシダーゼ活性を電子スピン共鳴 (ESR) 装置にて計測する。汎用性を高めるため、全自動 ESR 分析装置を併せて開発した。迅速性と価格の面から遺伝子増幅法 (NAT) を凌いだ。また感度の面からも NAT に匹敵した。今回の研究により、(1) 輸血用血液の安全性の確保がなされ、(2) B 型肝炎ウイルス感染状況の検証が国内・国外において達成され、(3) 微量の HBs 抗

原陽性の病的意義を解明することが可能であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Radical Immunoassay Is Practically Useful for the Diagnosis of Occult Hepatitis B Virus Infection (manuscript in preparation)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

今回の研究においてなし

C型肝炎ウイルスに対する感染防御遺伝子の検討

分担研究者 齋藤貴史 山形大学医学部・消化器病態制御内科学・講師

研究要旨：HCVに対する感染防御遺伝子を検討する目的で、HCVに感染した一般住民の遺伝子一塩基多型 (SNP) を網羅的に解析した。対象は、HCV高感染地域において肝臓病検診を受診した住民で、遺伝子解析の同意の得られた675名である。HBs抗原陰性かつ抗ウイルス治療を受けていないHCV抗体陽性者は238名であった。HCV抗体陽性者において、持続感染者(189名)と既往感染者(49名)の二群間で遺伝子SNPを解析した結果、10遺伝子における12SNPの出現頻度に有意差($P < 0.05$)が認められた。これらは、HCV感染に際し、ウイルスの細胞表面への接着と細胞内増殖、免疫担当細胞の働きに関わる可能性がある遺伝子である。今回の研究で検出された遺伝子群は、HCV感染防御に関わる候補遺伝子であり、HCV感染症における機能解析が今後の重要な研究課題である。

A. 研究目的

ヒトゲノムが解明され、疾患における遺伝的要因の解明が急速に進みつつある。感染症の領域においても、宿主側の感染防御に関わる遺伝的要因の解明は、その感染症の病態解明に寄与するとともに、新たな予後予測因子や治療薬の開発にとって重要である。HCV感染後の経過は個人間で多様であるが、感染後の経過に影響する宿主側の遺伝的要因については未解明である。そこで今回、肝臓病検診を継続的に実施している山形県某町において、HCV抗体陽性の住民におけるウイルス持続感染者と既往感染者の二群間で、遺伝子一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) の網羅的な解析を行った。本研究により、HCV感染後の経過に影響を与える個人の遺伝子多型性が明らかとなり、将来それら遺伝子群の

機能解析により、C型肝炎の病態解明、あるいは新しい診断法や治療法の開発に結びつくことが期待される。

B. 研究方法

1. 対象

山形県某町はHCV感染者が多い地区である。私達は1991年から95年度までに、検診の同意が得られた6歳以上の住民7925名について、HCV感染調査を行い、HCV抗体陽性者が1078名(13.6%)、そのうちHCV RNA陽性者が846名に上ることを確認した。その中でも47集落より形成される北部地区における住民のHCV抗体陽性率は特に高く、6歳以上の住民で19.5%(602/3094名)、40歳以上の住民で32.4%(584/1805名)であった。本地区を中心に、20歳以上の一般住民1040名を対象として、採血による

HCV 感染調査と肝機能検査を行い、遺伝子解析の同意が得られた被験者には遺伝子 SNP 解析を行った。本研究は、国が定めた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、山形大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

2. 方法

検診受診者について、抗 HCV 治療としてのインターフェロン (IFN) 治療歴の有無について問診を行った。また、遺伝子検査に関する同意について、当大学医学部倫理委員会で認められた所定の文書で取得した。肝炎ウイルス感染検査は、HCV 抗体検査 (HCV EI/II: Abott 社製)、HCV RNA 定性検査 (Amplacor HCV v2.0: Roche Diagnostics 社製) を用いた。また HBs 抗原の測定 (HBsAg Dainapac: Dainabot 社製) を行った。遺伝子 SNP 解析の同意が得られた被験者の全血 10 ml より、ゲノム DNA を DNA 抽出用 Kit (Talent 社製) を用いて抽出した。SNP 解析は、Pre-Development Taqman Assay Regents for Allelic Discrimination Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて、TaqMan PCR 法にて行った HCV 感染が成立したと考えられる HCV 抗体陽性者について、ウイルス血症の有無についてのケースコントロール研究を設定した。即ち、HCV 抗体陽性者について、HCV RNA 陽性者 (持続感染者) と HCV RNA 陰性者 (既往感染者) の二群に分け、両群間における遺伝子多型の解析を行った。本解析では、HCV の感染成立や免疫に関与すると考えられる 103 遺伝子を絞り込み、これら遺伝子の 269 SNP についての検討を行った。臨床疫学データの統計解析には、Mann-Whitney U test およ

び Fisher' s exact test を用いた。遺伝子 SNP 解析における統計解析は、二群間における SNP 出頻頻度を、Fisher' s exact test にて検定した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

(1) HCV 感染と血清 ALT 値

被験者 1040 名中、遺伝子検査の同意を得られた者は 675 名 (同意取得率: 65%) であった。HCV 抗体陽性者は 277 / 675 名 (41.0%) であった。遺伝子解析の対象となる HCV 抗体陽性者は、このうち HBs 抗原陽性者および問診により抗ウイルス療法を受けた者を除外し、238 名であった。HCV RNA 定性検査では、陽性が 189 名 (79.4%)、陰性が 49 名 (20.6%) であった。

(2) HCV 持続感染者と既往感染者における臨床疫学データの検討

HCV 抗体陽性者 (238 名) における HCV RNA 陽性者 (189 名) と HCV RNA 陰性者 (49 名) の二群間において、男女比や年齢に有意差はなかった。年齢は両群において平均約 66 歳とほぼ等しかった。血清 ALT 値は、HCV RNA 陽性者では HCV RNA 陰性者に比し、有意に高値であった (43.7 ± 43.8 U/ml vs 21.8 ± 17.7 U/ml; $P < 0.001$)。

(3) HCV 感染者における HCV 感染感受性候補遺伝子の検討

HCV 抗体陽性者における HCV RNA 陽性者と HCV RNA 陰性者間の遺伝子 SNP の出現頻度を比較検討することで、HCV に対する感染防御に関わる遺伝子候補群が検出された。結果を表 1 に示す。

表 1. HCV 感染者における HCV 感染感受性候補遺伝子と SNP

Gene symbol	SNP	At-risk allele	Genetic model	P value	odds ratio (95% CI)	SNP ID (IMS-JST)
SULT2B1	A/G	G	dominant	0.0200	5.23 (1.35-20.27)	075438
AP1B1	C/T	T	dominant	0.0150	2.31 (1.21-4.41)	020466
	C/T	T	dominant	0.0150	2.30 (1.20-4.38)	020470
IFNAR2	A/C	A	recessive	0.0220	2.31 (1.15-4.55)	056061
IFI27	A/G	A	dominant	0.0230	2.18 (1.15-4.14)	010856
IFI41	C/T	T	dominant	0.0350	4.14 (1.15-14.92)	013416
PRL	A/G	G	dominant	0.0030	2.75 (1.40-5.40)	055776
CD4	C/T	C	dominant	0.0180	2.71 (1.22-6.02)	006379
TGFB1	G/T	T	dominant	0.0140	2.42 (1.23-4.75)	013663
	G/T	G	dominant	0.0490	2.13 (1.06-4.30)	013665
LTBP2	A/G	G	dominant	0.0006	3.83 (1.81-8.11)	058392
TNFRSF1A	G/T	G	dominant	0.0490	2.04 (1.06-3.94)	034139

D. 考察

感染症において、病原体に対する宿主の免疫応答は個人間で多様である。個人間における遺伝的要因が HCV 感染の成立とその後の免疫応答の差異に関わっているが、HCV 感染宿主における遺伝子多型性についてはほとんど解明されていない。HCV の感染後経過に影響する宿主の遺伝的要因を解明するために、今回の検討では、HCV 抗体陽性者における HCV RNA 陽性者と HCV RNA 陰性者の二群間にみられる遺伝的多型性を、遺伝子 SNP 出現頻度の違いから明らかにした。このようなケースコントロールの設定により、HCV 感染後のウイルス持続感染と排除に関与する遺伝的要因の解明が期待される。HCV 感染における持続感染者と既往感染者の遺伝子 SNP 解析により、①HCV の感染標的細胞上におけるウイルス接着に関わる遺伝子多型性、②ウイルスの細胞内増殖に関わる遺伝子多型性、③免疫担当細胞に関わる遺伝子多型性、が明らかとなった。HCV の感染標的細胞への感染成立のメカニズムについては、そのレセプターの同定を含め、

未解明である。HCV が属するフラビウイルスの標的細胞への感染経路については、ウイルスの細胞膜への融合に際し、ウイルス粒子の細胞膜表面上における硫酸多糖への捕捉と、接合蛋白によるウイルスの被覆が必要である。最近、HCV 感染に際しても、HCV の細胞表面への吸着に際し、ヘパラン硫酸多糖が必要であることが報告されている。本研究にて、HCV 持続感染者と既往感染者の間には、硫酸多糖および接合蛋白の産生に関与する 2 種の遺伝子、SUT2B1 および AP1B1 に遺伝子多型性が存在することが明らかとなった。これは、細胞表面上の HCV 接着因子の発現に個人間における差異がある可能性を示唆している。また、IFN は、HCV 感染細胞や免疫細胞で誘導される重要な抗ウイルス蛋白である。IFN の標的細胞におけるシグナル伝達は、ウイルスの複製阻害、宿主の自然免疫や細胞性免疫の賦活などの広範な抗ウイルス作用を惹起する。HCV 持続感染者と既往感染者の間に認められた IFNAR2、IFI27、IFI41 などの遺伝子多型性は、個人間における IFN 感受性に差異

がある可能性を示唆している。さらに HCV 感染においては、T細胞、マクロファージあるいは NK 細胞等の各種の免疫担当細胞により、多くのサイトカインネットワークが存在する。特に CD4 陽性細胞は HCV 感染者の肝障害時の免疫調節作用に重要な役割を担っているが、HCV 持続感染者と既往感染者間にはこの CD4 遺伝子の SNP 出現頻度に違いが認められた。これら、HCV 感染に深く関与すると考えられる免疫担当細胞に影響を与えると考えられる、PRL、TGFB1、LTBP2、TNFRSF1 等の遺伝子にも遺伝子多型性が見出された。以上より、これらの遺伝子多型性は、HCV の感染宿主におけるウイルスの持続感染と排除に関わる免疫学的に重要な遺伝的要因である可能性がある。

E. 結語

本研究で検出された遺伝子多型を有する遺伝子群は、HCV 感染防御に関わる候補遺伝子であり、今後、これら遺伝子の HCV 感染における機能解析により、HCV トランスレショナル・リサーチの発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Saito T, Ji G, Shinzawa H, Togashi H, Muramatsu M, Kawata S, et al. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 335-341
- Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Transmission of hepatitis C virus quasispecies between human adults. *Hepatology* 2004; 30: 57-62

- 斎藤貴史、渡辺久剛、富樫 整、河田純男. ラミブジンと IFN 併用療法の効果と問題点。ウイルス性肝炎 (下)。日本臨床 2004; 62、増刊号 8: 326-330
- 斎藤貴史、河田純男. B型肝炎診療 Q&A HBe 抗原陰性、肝機能異常を繰り返す B型慢性肝炎にいかに対処するか。臨床医 2004; 30: 1604-1606

2. 学会発表

- 斎藤貴史、村松正明、河田純男. C 型肝炎ウイルス感染者における遺伝子 SNPs 解析：感染経過に影響を与える宿主主要因の分子疫学的検討、第 14 回日本疫学会学術総会、2004. 1. 22
- 斎藤貴史、富樫 整、新澤陽英、河田純男、他. HCV 感染者のゲノム解析より見出された創薬候補分子 (ワークショップ：C 型肝炎の新たな治療戦略)、第 176 回日本消化器病学会東北支部例会、2004. 2. 7
- 斎藤貴史、新澤陽英、河田純男. 肝臓病検診地域における HCV 感染感受性に関連する宿主遺伝子検索 (シンポジウム：消化器がん検診における分子マーカー診断—ゲノム・プロテオミクス応用の可能性と課題)、第 43 回日本消化器集団検診学会総会、2004. 5. 21
- 斎藤貴史、富樫 整、河田純男、他. HCV 感染者 (男性) におけるプロラクチン遺伝子の多型性と血中濃度の検討、第 8 回日本肝臓学会大会、2004. 10. 21

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特願 2004-13667

2. 実用新案・その他 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

- 1) Kato H. Hepatitis B virus genotype G is an extremely rare genotype in Japan. *Hepatol Res.* 2004; 30: 199-203.
- 2) 阿部弘一. HBV キャリアからの重症化・劇症化症例にいかに対処するか. *臨床医* 2004; 30: 1607-1611.
- 3) 阿部弘一. B型肝炎重症化例の治療. *内科* 2004; 93:471-476.
- 4) 鈴木一幸. HBV 無症候性キャリアの自然経過, 予後, 死因. *日本臨牀* 2004; 62: 227-232.
- 5) Sato S. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. *Hepatol Res.* 2004; 30: 155-161.
- 6) 長尾由美子. 歯学部並びに歯科衛生士学校の学生を対象に実施したB型及びC型肝炎に対する意識調査. *感染症学会誌* 2004; 78: 554-565.
- 7) Sata M. Lamivudine Therapy of Hepatitis B in Japan. *Therapy for Viral Hepatitis and Prevention of Hepatocellular Carcinoma* 2004: 32-37.
- 8) Kawaguchi T. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1499-508.
- 9) Ito K. Predicting relapse after cessation of Lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 490-495.
- 10) Yoshida H. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2004; 53: 425-430.
- 11) Nagao Y. Analysis of approach to therapy for chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res.* 2004; 28: 30-35.
- 12) Nagao Y. A cohort study of chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan: a prospective analysis for 12 years. *Int J Mol Med.* 2004; 13: 257-265.
- 13) Yano M. A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J*

- Gastroenterol. 2004; 39: 570-574.
- 14) Tanaka Y. Prognostic indicators of breakthrough hepatitis during lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol.* 2004; 39: 769-775.
 - 15) Kuwahara R. Genetic heterogeneity of the precore and the core promoter region of genotype C hepatitis B virus during lamivudine therapy. *J Med Virol.* 2004; 72: 26-34.
 - 16) Takao Y. Antibody reactive to a hepatitis C virus (HCV)-derived peptide capable of inducing HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes is detectable in a majority of HCV-infected individuals without HLA-A2 restriction. *Microbiol Immunol.* 2004; 48: 507-517.
 - 17) Yosida T. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med.* 2004; 199: 1701-1707.
 - 18) Kuwahara R. Adefovir dipivoxil as a treatment for hepatic failure caused by lamivudine-resistant HBV strains. *Dig Dis Sci.* 2004; 49: 300-303.
 - 19) Nagao Y. Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19: 1101-1113.
 - 20) Nagao Y. Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med.* 2005; 15: 237-241.
 - 21) Muto H. Types of human leukocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon-Alpha in patients with chronic hepatitis C: analysis by a prospective study. *J Gastroenterol.* 2004; 39: 674-680.
 - 22) Tanaka N. Ribavirin-induced pure red-cell aplasia during treatment of chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1264-1265.
 - 23) Imai Y. Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol.* 2004; 39: 1069-1077.
 - 24) Kasahara A. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *J Viral Hepat.* 2004; 11: 148-156.

- 25) Kiyosawa K. Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology*. 2004; 127: S17-S26.
- 26) Kato M. Changes in virus loads and precore mutations in chronic hepatitis B patients treated with 4 weeks of daily interferon alfa-2a therapy. *Hepatol Res*. 2004; 28: 73-78.
- 27) 加藤道夫. HBV マーカーと発癌リスクよりみた HBV キャリアのステージ分類-適切な抗ウイルス治療の選択に向けて- 2004; 45: 581-588.
- 28) 加藤道夫. くり返し Two-step Interferon Rebound Therapy が奏功した難治性 C 型慢性肝炎の 1 例. *治療学* 2004; 38: 73-75.
- 29) 加藤道夫. Two-step Interferon Rebound Therapy とその適応. *日本臨牀* 2004; 62: 497-501.
- 30) 伊与田賢也. C 型慢性肝炎に対する IFN 再治療の成績とその適応. *日本臨牀* 2004; 62: 502-505.
- 31) Kakiuchi Y. Circulating soluble Fas levels in patients with hepatitis C virus infection and interferon therapy. *J Gastroenterol*. 2004; 39: 1189-1195.
- 32) Kobayashi M. Wild-type precore and core promoter sequences in patients with acute self-limited or chronic hepatitis B. *Scand J Gastroenterol*. 2004; 39: 53-59.
- 33) Kobayashi M. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol*. 2004; 39: 844-850.
- 34) 斎藤貴史. 肝検診地域の住民における C 型肝炎ウイルス感染感受性遺伝子の解析. *日消集検誌* 2005; 43: 13-19.
- 35) Saito T. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 317: 335-341.
- 36) Saito T. Transmission of hepatitis C virus quasispecies between human adults. *Hepatol Res*. 2004; 30: 57-62.
- 37) 斎藤貴史. ラミブジンと IFN 併用療法の効果と問題点. *日本臨牀* 2004; 62: 326-330.
- 38) 斎藤貴史. Hbe 抗原陰性, 肝機能異常を繰り返す B 型慢性肝炎症例にいかに対処するか. *臨床医* 2004; 30: 1604-1606.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Hepatitis B virus genotype G is an extremely rare genotype in Japan

Hideaki Kato^{a,b}, Fuminaka Sugauchi^c, Atsushi Ozasa^b, Takanobu Kato^a,
Yasuhito Tanaka^a, Hiroshi Sakugawa^d, Michio Sata^e, Keisuke Hino^f,
Morikazu Onji^g, Takeshi Okanoue^h, Eiji Tanakaⁱ, Sumio Kawata^j,
Kazuyuki Suzuki^k, Shuhei Hige^l, Tomoyoshi Ohno^b, Etsuro Orito^b,
Ryuzo Ueda^b, Masashi Mizokami^{a,*}

^a Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi 1, Mizuho-ku, Mizuho-cho, Nagoya 467-8601, Japan

^b Department of Internal Medicine and Molecular Science, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

^c Department of Transfusion Medicine, Warren Grant Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

^d First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

^e Department of Medicine, Division of Gastroenterology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

^f Department of Laboratory Sciences, Faculty of Health Sciences, Yamaguchi University, School of Medicine, Ube, Japan

^g Third Department of Internal Medicine, Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan

^h Department of Molecular Gastroenterology and Hepatology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan

ⁱ Second Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan

^j Second Department of Internal Medicine, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan

^k The First Department of Internal Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

^l Department of Gastroenterology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

Received 26 July 2004; received in revised form 13 September 2004; accepted 28 September 2004

Available online 14 November 2004

Abstract

Background: Hepatitis B virus (HBV) has been classified into seven genotypes (A–G). HBV genotypes have a geographically characteristic distribution. Since HBV genotype G (HBV/G) was identified recently, little is known about the distribution of HBV/G in Japan. The aim of this study was to clarify this issue.

Patients and methods: Seven hundred and twenty-one serum samples obtained from patients with HBV in Japan were investigated. The patients included 149 asymptomatic carriers, 325 with chronic hepatitis, 129 with liver cirrhosis, and 118 with hepatocellular carcinoma. Six HBV genotypes (A–F) were determined by restriction fragment length polymorphism targeting to the S region of the HBV genome. Furthermore, HBV/G was investigated by polymerase chain reaction with hemi-nested primers derived from an HBV/G-specific nucleotide sequence.

Results: Of the 721 serum samples investigated, 12 subjects were classified as having HBV/A, 88 HBV/B, 610 HBV/C, 3 HBV/D, and 1 HBV/F. Seven subjects had a mixed infection with distinct genotypes, two with HBV/A and HBV/D, and five with HBV/B and HBV/C. HBV/G was not identified among the 721 samples.

Conclusion: HBV/G was not identified in a large cohort of patients with HBV, either single or dual infection. HBV/G seems to be an extremely rare genotype in Japan.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Distribution; Genotypes; Hepatitis B virus; Japan; Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism

* Corresponding author. Tel.: +81 52 853 8292; fax: +81 52 842 0021.

E-mail address: mizokami@med.nagoya-cu.ac.jp (M. Mizokami).

1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infects approximately 350 million individuals worldwide and can cause a wide spectrum of liver disease [1]. HBV has been classified into seven genotypes based on an entire genome difference of more than 8% [2–4]. HBV genotypes have a geographically characteristic distribution [5]. HBV genotype A (HBV/A) and HBV/D are the most common genotypes worldwide, and account for the majority of cases in Europe and Africa. HBV/B and HBV/C are found in East Asia. HBV/E is confined to Africa, and HBV/F has been identified in indigenous populations of Central and South America. In 2000, a unique strain harboring a 36-base pair (bp) insertion into the core region was identified in France and was phylogenetically classified into the seventh genotype, G [4]. Thereafter, HBV/G was revealed to be distributed in San Francisco [6,7], Germany [8], Mexico [9], and Canada [10], and accounted for 1–5% in these areas. Although little is known about the virological and clinical characteristics of HBV/G, one of its unique characteristics is frequent coinfection with the other genotypes. In San Francisco, eight of the eight HBV/G patients were coinfecting with HBV/A [6,7], and all of the HBV/G isolates from Canada were also coinfecting with HBV/A, or HBV/A and HBV/C [10].

In Japan, HBV/C is the most common genotype, accounting for approximately 85% of all genotypes, and HBV/B follows with 12% [11–13]. However, little is known about the distribution of HBV/G in Japan. We have formerly investigated the 540 sera from patients with hepatitis B collected in and around Nagoya, and found that there were no HBV/G among them [14]. However, the serum samples in the study was obtained from a restricted area, a central part of Japan, therefore, further studies including serum samples collected from the other part of Japan had been required to conclude how often HBV/G distributed in Japan. Moreover, since HBV/G is frequently coinfecting with the other genotypes, there is a possibility that HBV/G might exist as a minor population in the sera classified into the other six genotypes (A–F). At this time, to elucidate this issue, we conducted nationwide study of the distribution of HBV/G by analyzing sera obtained from patients with hepatitis B, including those whose genotypes were already known, using hemi-nested polymerase chain reaction (PCR) with HBV/G-specific primers. We also discussed the issues of HBV/G to date.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Seven hundred and twenty-one serum samples were collected from patients with HBV in Japan. The patients resided in Hokkaido, Iwate, Yamagata, Niigata, Tokyo, Kanagawa, Nagano, Nagoya, Kyoto, Fukuoka, and Okinawa. The

Table 1
Demographics of the 721 patients in this study

Sample	721
Gender (M:F)	470:251
Age (year)	43.6 ± 14.9
ALT (IU)	78.8 ± 115.8
ALP (IU)	240.8 ± 155.2
γ-GTP (IU)	52.2 ± 96.2
T. bil (mg/dl)	0.99 ± 1.60
HBeAg (%)	45.2
HBV DNA ^a (LGE/ml)	5.69 ± 1.84
Diagnosis	
Asymptomatic carrier	149
Chronic hepatitis	325
Liver cirrhosis	129
Hepatocellular carcinoma	118

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; LGE, log genome equivalents; T. bil, total bilirubin; TMA, transcription-mediated amplification.

^a Value was calculated using available data of transcription-mediated amplification of 255 subjects.

patients in this study were overlapped with some of the previous report [11]. They included 470 (65.1%) males and 251 (34.8%) females. The mean ± S.D. age was 43.6 ± 14.9 years (Table 1).

2.2. Detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B e antigen (HBeAg) and HBV DNA level

HBsAg was detected by a particle-agglutination test using a commercial kit (Serodia; Fujirebio, Tokyo, Japan), and HBeAg was detected by ELISA using a commercial kit (Serodia; Kokusai-shiyaku, Tokyo, Japan), following the manufacturer's recommendations. Levels of HBV DNA were determined by the transcription-mediated amplification (TMA) method (Chugai Industry, Tokyo, Japan), and the results were expressed as log genome equivalents (LGE) per millilitre.

2.3. Determination of six HBV genotypes (A–F) by restriction fragment length polymorphism (RFLP)

DNA was extracted from 100 μl of serum samples using commercial kits (Smitest EX R&D; Genome Science, Fukushima, Japan) under manufacturer's recommendation. The extracted DNA was amplified in a 50-μl reaction mixture containing 0.5 μM of a sense primer MF1 (5'-YCC TGC TGG TGG CTC CAG TTC-3'; nt. 55–75), 0.5 μM of an antisense primer MR2 (5'-AAG CCA NAC ART GGG GGA AAG C-3'; nt. 730–709), 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan), 0.2 mM each dNTPs, 3 mM MgCl₂, and 1 × AmpliTaq Gold Buffer. The reactions were performed in a GeneAmp PCR system 9600 thermocycler. The sample was denatured at 96 °C for 9 min, and subjected to 40 cycles of PCR (95 °C for 1 min; 60 °C for 1 min; 72 °C for 1 min) followed by 72 °C for 5 min at final extension in a 96-well cycler (GeneAmp 9600; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). The amplified product

was subjected to the second round PCR with a sense primer MF2 (5'-GTC TAG ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC-3': nt. 246–271) and MR2 under the same condition as the first round PCR. The second round PCR product with the length of 485 bp was subjected to the digestion with five kinds of restriction enzymes. Genotype B could be distinguished by digestion with *EarI* because of no recognition site of it was existed. Similarly, genotype C also could be distinguished by digestion with *AlwI*, as no recognition site of it was found within the amplified product. Only genotype E had a recognition site of *NciI*, and only genotype F had no recognition site of *HphI*. Finally, the distinction between genotypes A and D were done by digestion with *NlaIV*. Genotype A has a recognition site of *NlaIV*, result in the generation of fragments of 220 and 265 bp. While genotype D had two recognition site of *NlaIV*, result in generation of fragments of 34, 186, and 265 bp. Therefore, genotypes A and D were distinguished by if each of 220 and 186 bp were observed, respectively. The digested amplicon were run on 3% agarose gel stained with ethidium bromide and observed under UV light [15].

2.4. Identification of HBV/G

Nucleic acids extracted from serum were subjected to PCR with hemi-nested primers designed on the 36-bp insertion in the C gene of HBV/G genomes. In brief, the DNA was amplified by the first round of PCR for 40 cycles with HBHKF1 (sense: 5'-ACG GGG CGC ACC TCT CTT TAC-3' [nt. 1519–1539]) and HBHKR2 that involved the 36-bp insertion characteristic of HBV/G (antisense: 5'-AGC CAA AAA GGC CAT ATG GCA-3' [nt. 17–37 in the core gene of HBV/G]) in the presence of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). The second round of PCR was performed for 40 cycles on the product of the first-round PCR with HBHKF2 (sense: 5'-GCA CTT CGT TTC ACC TCT GCA-3' [nt. 1581–1601]) and HBHKR2. Then, the products were examined for fragments of 357 bp [15].

3. Results

3.1. Demographics, laboratory findings, and diagnosis of the patients

The mean value of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase, and total bilirubin in the sera was 78.8 ± 115.8 IU, 240.8 ± 155.2 IU, 52.2 ± 96.2 IU, 0.99 ± 1.60 mg/dl, respectively (Table 1). Three hundred and twenty-six patients (45.2%) were positive for HBeAg. The mean value of HBV DNA measured by TMA was 5.69 ± 1.84 LGE per millilitre. One hundred and forty-nine patients (20.1%) were diagnosed as asymptomatic carriers, 325 (45.1%) with chronic hepatitis, 129 (17.9%) with liver cirrhosis, and 118 (16.4%) with hepatocellular carcinoma.

Table 2
Six genotypes (A–F) and HBV genotype G in 721 subjects from Japan

Genotype	No.	No. of HBV genotype G
A	12	0
A + D	2	0
B	88	0
B + C	5	0
C	610	0
D	3	0
F	1	0

3.2. HBV/G among 721 serum samples

Of the 721 serum samples investigated, 12 subjects were classified as having HBV/A, 88 HBV/B, 610 HBV/C, 3 HBV/D, and 1 HBV/F (Table 2). Seven subjects had a mixed infection with distinct genotypes, two with HBV/A and HBV/D, and five with HBV/B and HBV/C. HBV/G was not identified among the 721 samples.

4. Discussion

Several lines of evidence about the clinical significance of HBV genotypes have been accumulated in recent years. HBV/C causes more severe liver diseases than HBV/B by prolonging active hepatitis accompanying HBeAg production [16,17]. In a Western study, the rate of sustained remission after seroconversion was higher in genotype A than in genotype D hepatitis in patients who seroconverted to anti-HBe, and mortality related to liver disease was more frequent in genotype F than in genotype A or genotype D hepatitis [18]. Clinical data concerning HBV/G are very limited. One previous study analyzed 165 patients living in San Francisco and showed that the ALT level was higher in HBV/G than in HBV/C, and HBeAg was more prevalent in HBV/G than in HBV/C or HBV/D [7]. Further studies with a large sample size are warranted to confirm these findings.

Coinfection with distinct genotypes was seen also in other than HBV/G. In this study, coinfections with HBV/A and HBV/D as well as HBV/B and HBV/C were observed. In the previous study, analyzed 256 sera from the USA, Japan, Uzbekistan, Bangladesh, South Africa, and Cameroon, coinfection with distinct genotypes was identified in 28 subjects (10.9%) [19]. The occurrence of coinfection with distinct genotypes is important in virological aspects. It is reported that genomic recombination between distinct genotypes resulted in hybrid HBV strains, which causes distinct degree of liver diseases [20,21]. In such cases, genomic recombination never occurs without coinfection with distinct genotypes. However, clinical implication of coinfection with distinct genotypes per se still remains unanswered.

Ten years before the classification of HBV/G by Stuyver et al. [4], a unique strain with a 36-nucleotide insertion into the core region, which is known to a characteristic of HBV/G nowadays [22], was isolated from a homosexual man with hu-