

200933027A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

B型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など
本邦における実態とその予防に関する研究

(H21-肝炎-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 22(2010)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など
本邦における実態とその予防に関する研究

(H21-肝炎-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 22(2010)年 3 月

***** 目 次 *****

I. 総括研究報告書

B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究（溝上雅史）	1
--	---

II. 分担研究報告書

1. B 型肝炎急性肝炎発症後の遷延化・慢性化に寄与するウイルス因子及び宿主因子の 同定（田中靖人）	7
2. B 型肝炎 genotype A の慢性化率と慢性化機序（伊藤清顕）	9
3. 当科における HBV genotype の最近の動向（狩野吉康）	13
4. 急性肝障害重症化と B 型肝炎ウイルスおよびその遺伝子型との関連（滝川康裕）	15
5. B 型肝炎ジェノタイプ B 型高浸淫地域における急性 B 型肝炎の実態に関する臨 床研究（斎藤貴史）	21
6. ユニバーサル HB ワクチネーションは必要か？～当院における急性 B 型肝炎の 現状からの考察～（正木尚彦）	25
7. 東京近郊における HBV Genotype A による急性肝炎の臨床学的・ウイルス学的 特徴（荒瀬康司）	31
8. 千葉県における急性 B 型肝炎症例の臨床背景の検討（今関文夫）	35
9. 首都圏におけるジェノタイプ A 型感染の現状（四柳 宏）	37
10. B 型肝炎急性肝炎の実態（黒崎雅之）	39
11. B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関 する研究（梅村武司）	41
12. 当院における B 型肝炎急性肝炎の現況と治療介入（三田英治）	43
13. B 型肝炎ウイルス初感染例と持続感染例におけるゲノタイプ分布の差異に関す る検討（道堯浩二郎）	47
14. B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関 する研究（山本和秀）	49
15. 当院の B 型肝炎急性肝炎の発生状況および B 型肝炎急性肝炎を発症した 2 名の相撲部員 に関する報告（八橋 弘）	51
16. 沖縄県の一般住民における B 型肝炎ウイルスキャリアの推移（佐久川 廣）	55
17. 献血者における HBs 抗原陽性率および genotype 分布（内田茂治）	59
18. HIV と HBV の混合感染に関する研究（田沼順子）	63
19. 感染症法に基づく B 型肝炎の届出状況（多田有希）	67

III. 研究成果の刊行一覧

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
「B型肝炎ジェノタイプA型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究」

研究代表者：溝上雅史 国立国際医療センター国府台病院
肝炎・免疫研究センター センター長

研究要旨：これまでの我々の多施設共同研究により、本邦のB型肝炎患者において genotype A が近年急速に増加していることが判明した。そこで今回全国規模で genotype A の感染状況を調査し、現状の把握を試みた。現在B型肝炎ウイルスの genotype の測定は保険適応でないため、各施設で匿名化後、単一施設で統一測定し、genotype A の急性肝炎における分布率を調査した。さらに慢性化率や慢性肝炎における genotype A の増加率とそれらの要因を明らかにし、それらの要因を明らかにすることを試みる。一部の症例では遺伝子配列を決定し、分子進化学的解析で国内感染か国外感染かを明らかにし、感染対策上有用な情報が得られるように検討した。さらに先の情報を献血者や HIV 感染者の genotype A の増加率や B 型肝炎の届け出数と比較することで予防対策や感染時の慢性化阻止指針や届け出状況を検討した。

【研究分担者】

伊藤 清顕 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科
狩野 吉康 北海道厚生連札幌厚生病院
滝川 康裕 岩手医科大学医学部内科学講座
斎藤 貴史 山形大学医学部消化器病態制御内科学
正木 尚彦 国立国際医療研究センター 肝炎情報センター
荒瀬 康司 虎の門病院健康管理センター・画像センター
今関 文夫 千葉大学大学院医学研究院
四柳 宏 東京大学医学部感染症内科
黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院消化器科
梅村 武司 信州大学医学部
三田 英治 国立病院機構大阪医療センター消化器科
山本 和秀 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
道堯浩二郎 愛媛県立中央病院消化器病センター
八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター
佐久川 廣 特定医療法人かりゆし会ハートライフ病院
内田 茂治 日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所
田沼 順子 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療研究開発センター
多田 有希 国立感染症研究所 感染症情報センター

【研究協力者】

豊田 秀徳 大垣市民病院消化器科
石井 耕司 東邦大学消化器内科
野村 秀幸 新小倉病院診療部
今井 康陽 市立池田病院

A. 研究目的

本研究は最近本邦で増加しているB型肝炎ウイルス(HBV) Genotype A による B 型急性肝炎の実態を把握し、その慢性化率および慢性化機序を解析することにより、有効な慢性化阻止の方策を確立し、肝硬変、肝癌への移行し、医療に貢献することを目標とする。今回の研究の目的は(1)本邦における B 型急性肝炎の実数把握:感染症法に基づく届出情報のデータと当研究班の研究分担者、研究協力者の所属する施設および関連施設から収集したデータを比較した。(2)HBV genotype A の地域差および感染ルートの解析:関連施設より B 型急性肝炎症例の血清を収集し、genotype の分布を解析した。(3)HBV genotype A と HIV との共感染の解析:国立国際医療センター戸山病院エイズ治療研究開発センター(ACC)を受診した HIV 患者の HBV 共感染率を調査した。(4)Genotype A の慢性化機序および実際の慢性化率の解析:a) HBV 感染モデルにより慢性化機序を解析した。b) 前向き調査により、慢性化率を調査した。(5)核酸アナログ製剤は慢性化を阻止するかどうか、(6)慢性化に関わる宿主側 SNPs の解析:前向き調査により、今後明らかにする。現在すでに倫理審査委員会より承認を受けた施設から新規の B 型急性肝炎症例の登録を開始した。

B. 研究方法

1) 後ろ向き研究による過去の B 型急性肝炎の発生状況調査:全国の研究協力施設と共同で、過去5年間のB型急性肝炎の発生状況を調査した。報告には感染地域、感染源、発生時期の項目を含み、感染症法に基づく届出情報と比較した。献血者における HBV の陽性率を調査し、genotype A の分布を解析した。また、ACCを受診した HIV 患者に関して、HBV との共感染率を調査した。

2) 前向き研究による慢性化率、核酸アナログの有効性調査:全国の研究協力施設における新規発生の B 型急性肝炎を登録し、検体の収集を開始した。登録後長期にわたり観察し、治療介入

の有無、慢性化の有無を調査することにより、慢性化率および核酸アナログによる慢性化阻止の有効性を検討する。

3) 感染モデルによる慢性化機序の解明:キメラマウスを用いた感染実験および肝細胞を用いた in vitro study により慢性化機序を解析した。

4) 慢性化に関与する宿主側 SNPs の探索:HLA-DP locus に存在する SNPs が慢性 B 型肝炎に関与することが判明しており、この SNPs が B 型急性肝炎の慢性化に関与するかどうか、また新規 SNPs と慢性化との関連も解析する。宿主側の遺伝子解析に関しては、現在倫理審査委員会に申請中である。

C. 研究結果

1) 感染症法に基づく届出調査 (多田班員):最近3年間の感染症法に基づく届出情報のデータが提出された。それによると、年の届出総数は199例であり、内訳は7例届出をしている病院が2病院、4例届出が4病院、3例届出が6病院、2例届出が20病院そして1例のみの届出が111病院であった。また、2008年に関しては届出総数が178例であり、内訳は5例届出をしている病院が1病院、4例届出が3病院、3例届出が7病院、2例届出が19病院、1例届出が99病院であった。このように、1例のみを届出している施設が圧倒的に多く、しかも大部分の病院が中小の病院であった。これまでの発生状況および報告状況から鑑みて、B 型急性肝炎の国内発生数が200例以下であるということは考えにくく、また各地域の拠点病院等の中心的な病院で発生数がゼロということも考えにくい。以上のことから、感染症法に基づいて届出されている割合はかなり低率であるということが判明した。

2) 献血者における HBs 抗原陽性率および genotype 分布 (内田班員):2006年10月から2007年9月までの1年間にHBs抗原検査で1998

例(献血者数4,959,541人)の陽性例が検出され、遺伝子型が解析できた1887例(男性1372人:女性515人)の集計を行った。その結果は遺伝子型C 1181例(62.6%)、遺伝子型B 581例(30.8%)、遺伝子型A 106例(5.6%)、遺伝子型D 15例(0.8%)、遺伝子型E 2例(0.1%)、遺伝子型F 2例(0.1%)であった。これらのHBs抗原陽性例にはHBVキャリアと感染初期者とが含まれているが、HBVキャリア例の報告に比べ遺伝子型Aと遺伝子型Bの比率が高くなっており、そのほか国内では非常に稀な遺伝子型Eや遺伝子型Fも見出された。輸血用血液に対するスクリーニングNATで陽性となった例のうち、HBc抗体が陰性で感染初期と考えられる743例では、遺伝子型C 505例(68.0%)、遺伝子型A 145例(19.5%)、遺伝子型B 81例(10.9%)、遺伝子型D 7例(0.9%)、遺伝子型H 4例(0.5%)、遺伝子型E 1例(0.1%)であった。感染初期例では遺伝子型Aの検出頻度が著しく高くなっており、逆に遺伝子型Bはキャリア報告例と同程度の頻度となっていた。遺伝子型Aは2000年に2例(2.6%)が検出されたが、2001年には16例(14.2%)、2002年には17例(18.3%)と増加し、2003年以降は検出される感染初期例の20%以上を占めていた。これら感染初期例の遺伝子型Aを更に詳しく調べると大多数は欧米型の遺伝子型Aeであり、欧米型HBVが我が国で蔓延している様子が窺える。一方、持続感染例と考えられる215例では遺伝子型Aは2例(0.9%)に過ぎず、遺伝子型C 129例(60.3%)、遺伝子型B 80例(37.4%)であった。

2) B型急性肝炎における都市部と地方とのgenotype分布の比較(狩野班員、滝川班員、斎藤班員、荒瀬班員、今関班員、四柳班員、黒崎班員、梅村班員、道堯班員、山本班員、八橋班員、佐久川班員):これまでも都市部、特に首都圏でのB型急性肝炎におけるgenotype Aの増加が報告されてきたが、今回の調査でも同様であった。四柳班員によると、genotype Aの占める割合は1994-1997年が31.8%、1998-2001年が35.3%、2002-2005年が41.5%、2006-2009年では71.4%

と急速に増加していることが分かった。他にも武蔵野赤十字病院を受診したB型急性肝炎の約半数がgenotype Aとの報告や、千葉県内6カ所の病院のB型急性肝炎39例においてgenotype Aを67%と報告された。一方で、北海道、岩手、山形、愛媛、長崎等の地方の医療機関においても頻度は少ないながらもgenotype AによるB型急性肝炎の報告が認められた。また、沖縄では高頻度にgenotype Aを認め、すでに地方部でもgenotype Aが蔓延しているということが明らかとなった。

3) HIVとHBVの混合感染に関する研究(田沼班員、正木班員、三田班員):1996年より2009年までの13年間に、ACCを受診したHIV感染者2634名のうち、HBs抗原のスクリーニング検査が行われたものは2501名で、そのうち、198名がHBs抗原陽性(陽性率7.9%)であった。初診時のスクリーニングでHBs抗原陰性であっても、その後の外来通院中に、HBs抗原が陽転化した例が21例あり、年平均1.7例がHIV診断後にHBVに感染していることが分かった。その21例中、15例(15/21, 71.4%)は6カ月以上HBs抗原陽性であることが確認され、慢性HBV感染と診断された。

また、大阪医療センターを受診したHIV感染者でB型急性肝炎を発症した14症例については、抗HIV療法(以下HAART)導入予定の有無で分け、ETV導入の適応、治療の有用性について検討を行った。HAART導入予定の患者が8例、HAART導入予定のない患者が6例であった。HAART導入予定であれば原則、経過観察とし、HBV-DNAの減少、肝障害の鎮静化が見られた時点でHAARTを導入する事とした。HAART導入予定であるが、肝炎の重症化を認めた場合は、患者の同意を得た上でETVを短期間使用し、肝障害が沈静化した時点で3TC/FTC+TDFを含むHAARTに切り替えた。HAART導入予定8症例中、ETV導入を行った症例は4例であった。ETV導入からHAART導入までの期間は 54.7 ± 15.6 日と短期間で、ETV導入後、全例にHBV-DNA量の低下を認め肝炎が鎮静化し、HAARTに切り替え後、3

例で HBV-DNA の陰性化を認めた。非導入例 3 例では、HAART 導入前では HBV-DNA の低下は認めず、HAART 導入後に HBV-DNA の低下を認めた。HAART 導入予定のない 6 例中、ETV 導入例は 3 例であった。ETV 導入例では全例で HBV-DNA 量の低下を認め、1 例で ETV 中止後も HBV-DNA の陰性化を認めた。ETV 非導入 3 例中 2 例で HBV-DNA の低下を認めたが 1 例では再上昇を認め、最終的に全例慢性化した。

4) 慢性化機序に関する研究 (伊藤班員、田中班員): ヒトの肝臓を持つキメラマウスを用いた感染実験の結果から、genotype A のクローンは他の genotype と比較すると増殖速度が遅く、細胞障害性も弱いということが判明した (Sugiyama M, Tanaka Y et al. Gastroenterology 2009)。また、伊藤班員らは HBV genotype A においては HBe 抗原前駆体の C 末端領域における cleavage site に 6 塩基の insertion を認めることを発見し、それが HBeAg の表現形に影響を及ぼし、他の genotype においては単一の分子である HBeAg が genotype A においては複数 (2-3 種類) の分子として産生され、その結果免疫反応に影響を与える可能性を報告した (Ito K et al. J Virol 2009) (表 1)。

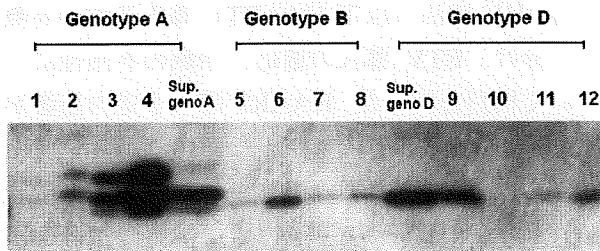


表 1. 各 genotype における血清中の HBeAg

HBeAg は免疫寛容、感染成立に関与していると考えられており、田中班員らが報告した genotype A においては HBV の増殖速度が遅いということと併せて、genotype A に関しては免疫反応が強くは起こらず、慢性化に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

感染症法に基づく届出状況と当班での後ろ向き調査の結果を比較すると、大部分の B 型急性肝炎症例が感染症法に基づいて届出がなされていないということが判明した。感染症の実態を把握するという点から発生数調査は重要であると思われる。このため、どのような理由で届出がされていないのかを明らかにし、届出の必要性の周知徹底、届出の簡易化等の工夫が必要であると考えられる。

今回の調査により、B 型急性肝炎における genotype A が急増しているということがあらためて確認され、特に首都圏ではかなりの高頻度に genotype A が認められた。地方部でも genotype A の頻度が増加しており、すでに全国に拡散していると考えられた。

HIV 感染者における B 型急性肝炎は比較的多く、抗ウイルス剤による交叉耐性の問題があるため、B 型急性肝炎診断時には HIV 感染の有無を必ず検査する必要がある。

B 型急性肝炎の全国での後ろ向き調査に関して、現在のところ慢性化を 8.6%に認め、3 例すべてが genotype A であった。また、遷延化 (HBsAg 消失まで 3 カ月以上経過) 率に関しても genotype A は他の genotype と比較して高率であり、既報のとおり genotype A が慢性化、遷延化する傾向が認められた。

Genotype A の慢性化機序に関して、HBeAg が decoy として免疫寛容、感染成立に働くことから、HBeAg 前駆体 C 末端側に存在する genotype A に特徴的な挿入変異による複数分子の HBeAg 産生と genotype A の増殖速度が遅く、細胞障害性が弱いという特徴とが組み合わせり慢性化、遷延化に関与すると考えられた。

E. 結論

B 型急性肝炎において、genotype A は首都圏ではすでに高頻度に認め、地方部にも拡がりつつある現状が明らかとなった。Genotype A は慢性化、遷延化する傾向にあり、ウイルス側の特徴が関与している可能性が示唆された。

Genotype Aは性行為感染やMSMによる感染が多く、HIVと感染経路が類似しており、共感染率が高い。HIVとHBVの共感染の際には両者の耐性ウイルスを誘導しないように治療に対しては注意が必要と考えられた。

たとえGenotype Aであっても慢性化する症例は一部であり、慢性化に宿主側因子が関与する可能性が高く、今後の検討が必要である。また、核酸アナログにより慢性化が阻止できるかどうかの検討も必要であり、今後はいかに慢性化を阻止し、肝硬変や肝癌への移行を阻止するかを検討する必要があると考えられた。

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
「B型肝炎ジェノタイプA型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究」
平成21年度 分担研究報告書

B型急性肝炎発症後の遷延化・慢性化に寄与する
ウイルス因子及び宿主因子の同定

分担研究者：田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学講座

研究要旨

近年、わが国においてB型急性肝炎は増加しており、HBV/Aの頻度が高いことが報告されている。急性感染のHBV/Aは他のgenotypeに比べ慢性化しやすいことが報告され、実際にHBV/AのB型慢性肝炎患者が増加している。今年度は、臨床研究及びヒトゲノム倫理委員会に申請し、当施設の承認を得た。HLA-DPA1, -B1領域のSNPsを検出するprimerを設定し、ダイレクトシーケンスによる測定系を確立した。全国から得られた検体に関して、ゲノムSNPs及びHBV遺伝子変異を検討し、HBV持続感染に寄与するウイルス因子及び宿主因子を同定する。

共同研究者氏名

松浦健太郎、伊藤清顕、溝上雅史

A. 研究背景・目的

近年、わが国においてB型急性肝炎は性行為感染症として増加しており、genotypeの分布に関しては、慢性肝炎患者とは異なり、HBV/Aの頻度が多いことが報告されており、とりわけ大都市でこの傾向が顕著である。しかも、急性発症後の慢性化例を数%程度認め、2005-2006年に行った全国共同研究では慢性肝疾患においてもHBV/Aは約3.5%と2倍に増加していることがわかった。

近年、ゲノムワイド関連解析が多方面で検討されているが、HBV持続感染にHLA-DP領域のSNPsが関連していることが報告された。今回の研究では、B型急性肝炎発症後の遷延化・慢性化例に関してHLA-DP領域のSNPsの関与を検討する。

B. 研究方法

全国共同研究施設から登録されたB型急性肝炎症例を対象とする。患者の同意が得られた場合には、過去に急性肝炎からキャリア化した症例に関しても対象とする。

HLA-DPA1, -B1領域のSNPsを検出するprimerを設定し、ダイレクトシーケンスあるいはTaqMan PCR法により検出する。

また、重症化に関連しているHBV genotypeやプレコア・コアプロモーター領域の塩基配列を決定し、臨床的意義を検討する。

(倫理面への配慮)

臨床研究及びヒトゲノム倫理委員会の承認を得た上で、患者からは書面上で同意書を取得している。

C. 研究結果

今年度は、臨床研究及びヒトゲノム倫理委員会に申請し、当施設の承認を得た。HLA-DPA1, -B1 領域の SNPs を検出する primer を設定し、最初にダイレクトシーケンスによる測定系を確立した。SNPs 研究を開始する体制を整えた。現時点で、まとまった解析結果は得られていないが、全国から得られた検体に関して、順次 HBV 遺伝子変異の検討を開始している。

D. 考察

B 型慢性肝疾患においても HBV/A の割合が増加している。これは若年男性の性行為による急性発症からのキャリア例の増加に起因している可能性が高い。早急な対策が必要である。

E. 結論

HBV 持続感染に寄与するウイルス因子及び宿主因子を同定することにより、ハイリスク群を囲い込むことができる。ユニバーサルワクチンの導入が施行されていないわが国では、今後増加が予測される HBV/A 感染による B 型急性肝炎のキャリア化に対する対策は重要な課題である。

G. 研究発表

Matsuura K, **Tanaka Y**, Mizokami M et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. J Clin Microbiol. 2009;47(5):1476-83.

Kusakabe A, **Tanaka Y**, Mizokami M et al. A

Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. Hepatol Res. 2009; 39(7):648-56.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

B 型肝炎 genotype A の慢性化率と慢性化機序

分担研究者：伊藤清顕 国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター
臨床研究推進室医長

研究要旨：本邦における B 型肝炎において、genotype A の占める割合が高くなっている。今回の調査により、genotype A は他の genotype と比較して慢性化率、遷延化率が高い傾向にあることが確認された。この原因に関して、genotype A の増殖速度が遅いということに加えて、HBeAg の表現型の違いが CTL の反応に影響を及ぼす可能性が示唆された。Recombination を除くすべての Genotype A において HBeAg 前駆体の C 末端側に 6 塩基（2 アミノ酸）の挿入を認めており、proprotein convertase による cleavage site を変化させることにより複数分子の HBeAg を産生する。

A. 研究目的

HBV は近年世界的に 10 の genotype に分類され、各 genotype により、地理的分布が異なること、臨床像に違いがあるということが明らかにされた。以前より本邦では急性、慢性 B 型肝炎ともに genotype B および C が多数を占めていた。しかし近年、B 型肝炎において欧米型である genotype A の占める割合が増加しており、特に首都圏では 70%以上が genotype A により占められている。さらに、これまで成人の水平感染による B 型肝炎は一過性感染に終息し慢性化はないと考えられていたが、genotype A の急性感染では他の genotype と比較して高頻度に慢性化が起こると報告されている。本邦における各 genotype での慢性化率に関しては、報告により様々であり明らかではない。このため、実際の慢性化率を把握するため、全国の研究協力者と共同で最近の B 型肝炎の発生状況と genotype の分布、慢性化、遷延化の比率を調査した。さらに、genotype A の慢性化機序に関与すると考えられるウイルス側の要因を解析し、感染予防および治療への応用を検討した。ウイルスの排除に重要な役割を果たす CTL に影響する要因として、1. ウイルスの増殖速度と 2. 免疫寛容、感染成立に関

与する HBeAg があげられる。これまでに我々は genotype A の増殖速度が genotype C と比較して遅いということを報告した (Sugiyama et al. Hepatology. 2006)。これに加えて、HBeAg の産生に関して、HBeAg 前駆体の C 末端側に genotype A に特徴的な遺伝子の挿入変異を認めたため、in vivo および in vitro の系で HBeAg 産生に及ぼす影響に関して検討した。

B. 研究方法

後ろ向き研究として、全国の研究協力者に過去 5 年間の B 型肝炎の発生状況を報告していただいた。報告の際には、感染地域、感染源、抗ウイルス剤の投与の有無、慢性化、遷延化の有無を記入していただき、genotype の分布、感染原因、慢性化率、遷延化率等を検討した。

慢性化機序の検討に関しては、慢性化に関与すると考えられる HBeAg 前駆体の C 末端側に存在する特徴的な 6 塩基の挿入配列の有無に関し、データベースを用いて検討した。さらに、患者血清中より HBcAb を用いて免疫沈降後にウェスタンブロッティング法により HBeAg を検出した。また、HBeAg のみを産生するクローンを作成し、遺伝子変異を加え各種細胞株に transfection し、上清中に産生される HBeAg の

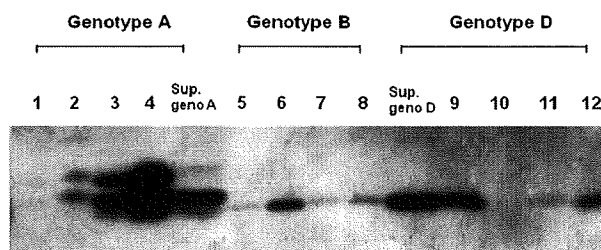
定量およびウェスタンブロッティング法による解析を行い、遺伝子変異が HBeAg 産生に与える影響を検討した。

C. 研究結果

各研究協力者のうち、それぞれの研究施設における倫理審査委員会ですでに承認を受けた 18 施設中 6 施設より、過去 5 年分の B 型急性肝炎の発生状況を報告していただいた。これまでのところ 52 症例が登録されており、genotype A が 22 例 (42.3%)、B が 3 例 (5.8%)、C が 15 例 (28.8%)、H が 1 例 (1.9%)、不明が 11 例 (21.2%) であった。6 カ月以上 follow up できた症例が 35 例あり、慢性化を 3 例 (8.6%) に認め、genotype はすべて Ae であった。HBsAg 陰性化まで 3 カ月以上かかった症例を遷延化と定義すると、35 例中 13 例が遷延化していた。遷延化症例の比率をみると、genotype A においては 10/22 例 (45.5%)、genotype B では 0/3 例 (0%)、genotype C においては 3/15 (20%)、genotype H では 0/1 例 (0%) であり、genotype A に高い傾向が認められた。

また、HBeAg 前駆体 C 末端側の 6 塩基の挿入変異をデータベースにおいて解析した。その結果、genotype A においては 175 例中 171 例と高頻度に認め、このうち挿入を認めなかった 4 例に関しては genotype A と D の recombination であった。一方、genotype B 180 例、genotype C 328 例、genotype D 171 例、genotype E 71 例、genotype F 29 例、genotype G 13 例および genotype H 14 例においてはデータベース上 1 例も挿入変異を認めなかった。

ウェスタンブロッティング法により患者血清中の HBeAg を解析すると、genotype B および D においては HBeAg が単一の分子量として描出されたのに対し、genotype A においては 2-3 の複数の分子量として描出された。さらに、最も強く描出されたバンドは他の genotype より産生された HBeAg と比較して、分子量が大きかった (図)。



Genotype A 症例において複数分子量の HBeAg が産生される原因が、この 6 塩基 (2 アミノ酸) の挿入が原因かどうかを in vitro study によって確認した。Genotype A においては C 末端におけるアミノ酸配列は RRDRGRSPR となっており、proprotein convertase による切断モチーフ (RXXR) を 2 か所に認める。この配列より 2 アミノ酸 (DR) の挿入を削除したクローンにおいては、単一分子量の HBeAg が産生された。また、RRDR を RRGR に変異させたクローンにおいても単一の分子量に変換された。さらに、GR を削除したクローンにおいても HBeAg は単一分子となった。以上より、HBeAg 前駆体の C 末端側は proprotein convertase により切断され、そのモチーフである RXXR のアミノ酸配列が genotype A においては DR の挿入によって分断されており、1 番目の RRDR モチーフが切断されにくいために 2 番目、3 番目のモチーフでも切断され、それが原因で複数の分子量の HBeAg が産生されるということが判明した。

D. 考察

全国での後ろ向き研究に関して、現在のところ慢性化を 8.6% に認め、3 例すべてが genotype A であった。また、遷延化率に関しても genotype A は他の genotype と比較して高率であり、既報のとおり genotype A が慢性化、遷延化する傾向が認められた。

このことに関して、HBeAg が decoy として免疫寛容、感染成立に働くことから、HBeAg 前駆体 C 末端側に存在する genotype A に特徴的な挿入変異による複数分子の HBeAg 産生が慢性化、遷延化に関与する可能性が示唆された。

Milich によると(Milich et al. Hepatology. 2003) HBeAg 産生株による感染においては、HBeAg により免疫反応が Th2 優位に働き、急性感染を惹起したとしても劇症化する可能性は低い。一方で、HBeAg 非産生株においては、Th1 優位の免疫反応を惹起し、劇症化する可能性が高くなる。つまり、HBeAg は過剰な免疫反応を抑えている可能性があり、genotype A のように複数の分子量の HBeAg が産生される際には、さらに免疫反応が弱くなる可能性がある。このような HBeAg の表現型の違いが、どのように免疫系に影響を及ぼすかは今後更なる検討が必要である。

E. 結論

B 型急性肝炎において、genotype A は慢性化、遷延化する傾向にあった。HBeAg 前駆体の C 末端側 arginine rich domain への 6 塩基 (2 アミノ酸) 挿入により genotype A においては複数の分子量の HBeAg が産生された。HBeAg は免疫寛容に関与しており、genotype により異なる HBeAg の表現型が genotype 間における慢性化率の違いに関係している可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表(本研究に関わるもの) 論文発表

1. Yano k, Tamada Y, Yatsushashi H, Komori A, Abiru S, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Ishibashi H; Japan National Hospital Acute Hepatitis Study Group. Dynamic epidemiology of acute viral hepatitis in Japan.

Intervirol. 2010 Jan 5;53(1):70-5.

2. Garacia T, Li J, Sureau C, Ito K, Qin Y, wands J, Tong S. Drastic reduction in the production of subviral particles does not impair hepatitis B virus virion secretion. J Virol. 2009 Nov;83(21):11152-65

3. Ito K, Kim KH, Lok AS, Tong S. Characterization of Genotype Specific Carboxyl

Terminal Cleavage Sites of Hepatitis B Virus E Antigen Precursor and Identification of Furin as the Candidate Enzyme. J Virol. 2009 Apr;83(8):3507-17

4. 伊藤清顕、溝上雅史
感染症制御のための公衆衛生の役割
ウイルス性肝炎
総合臨床 2010.3/Vol.59/No.3

学会発表

1. Ito K, Guarnieri M, Garcia T, Li J, Mizokami M, Wands J, Tong S. Research Center for Hepatitis and Immunology, International Medical Center of Japan Konodai Hospital, Liver Research Center, Brown University, Rhode island Hospital.
Impairment of Hepatitis B Virus Secretion by Missense Mutations in its Small Envelope Protein Can Be Overcome by a Novel Glycosylation Site. (The 8th JSH Single Topic Conference) Tokyo, Japan, November, 2009.

2. Ito K, Kim K, Lok A, Tong S
Characterization of Genotype-Specific Carboxyl-Terminal Cleavage Sites of Hepatitis B Virus e Antigen Precursor and Identification of Furin as the Candidate Enzyme. (The 8th JSH Single Topic Conference) Tokyo, Japan. November, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得：なし
実用新案登録：なし
その他：なし

「当科における HBV genotype の最近の動向」

分担研究者：狩野吉康 札幌厚生病院消化器科 副院長

研究要旨：B 型肝炎疾患において病型別に genotype 別の短期の経過を定点観測した。当院では genotype C が全体の約 80% を占め、慢性肝炎例では抗ウイルス療法の導入率も約 50% と高率であった。Genotype A の慢性肝炎は 3 例のみであったが、2 例で抗ウイルス療法を導入した。一方、genotype B は 12 例中 1 例のみで抗ウイルス療法の導入にとどまり、慢性肝炎では genotype 別に肝炎の活動性が異なっていた。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルスは A から H まで 8 つの遺伝子型 (genotype) に分類され、分布する地域に局在がみられ、予後、病態、抗ウイルス療法に対する治療反応性に大きく関連することが報告されてきている。今回当科における HBV genotype の最近の動向について検討した。

B. 研究方法

2006 年 6 月から 2007 年 6 月までに当科を受診した B 型肝炎症例 141 例を対象とした。対象症例はほとんどが初診患者で以前から定期通院しすでに治療介入されている症例は除外した。診断時の平均年齢は 45.9 歳、男女比は 83:58、HBe 抗原陽性例は 60 例、病型は肝機能正常 HBV キャリアが 50 例、急性肝炎が 3 例、慢性肝炎が 76 例、肝硬変が 12 例であった。HBV genotype の測定は RFLP 法で行った。

(倫理面への配慮) genotype は日常診療の血液検査の一環で測定した。保険適応外の検査であり、検査費用には当科の研究費を充てた。Genotype の測定結果は患者に公開している。研究にあたり、個人情報の保護に留意している。

C. 研究結果

全体でみると genotype は A が 5 例 (Aa 1 例, Ae 4 例), B が 28 例 (Ba 1 例, Bj 27 例), C が 105 例、不明が 3 例と genotype C が 74% を占めた。病型別にみても HBV キャリアでは Ae が 1 例, B が 14 例 (うち Ba が 1 例), C が 32 例、不明が 3 例、急性肝炎では Ae が 1 例, Bj が 2 例、慢性肝炎では A が 3 例 (Aa 1 例, Ae 2 例), Bj が 12 例, C が 61 例、肝硬変では全例 genotype C であった。HBV キャリアでは genotype B の占める割合が 28% と比較的高率であったが、慢性肝疾患 (慢性肝炎、肝硬変) では genotype C が 80% 以上を占めていた。慢性肝疾患症例での診断初期における治療介入としては、genotype B では抗ウイルス療法が 12 例中 1 例で行われたのみであったが、genotype C では 73 例中 34 例と半数近くで抗ウイルス療法が施行された。Genotype A は急性肝炎の 1 例は無治療で 5 ヶ月後に sAb が陽性となり、1 例は無症候性キャリアで期間中 ALT は正常値を持続し、3 例の慢性肝炎中 2 例でエンテカビルの投与を開始した。

D. 考察

慢性肝炎では Genotype A, B, C の慢性肝炎では genotype A が 80.3% と大部分を占め、抗ウイルス療法導入率も 46.6% と高率であった。Genotype A は 3 例と少数であったが、このう

ち 2 例に抗ウイルス療法が導入された。
genotype B では抗ウイルス療法が 12 例中 1 例で行われたのみであり、慢性肝炎では genotype 間で慢性肝炎の経過が異なっていた。

E. 結論

HBV genotype は全体では C が多数を占めたが、病型により差がみられた。慢性肝疾患例では genotype C で診断早期に治療介入された症例が多かった。Genotype A は 3 例のみであったが、2 例で抗ウイルス療法が導入された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表(本研究に関わるもの)

論文発表 無し

学会発表 第 102 回日本消化器病学会北海道地方会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得：無し

実用新案登録：無し

その他：無し

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
「B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究」
平成 21 年度 分担研究報告書

「急性肝障害重症化と B 型肝炎ウイルスおよびその遺伝子型との関連」

分担研究者：滝川康裕 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 准教授

研究要旨：岩手医大消化器・肝臓内科では、「難治性の肝胆道疾患調査研究」班で作成した劇症化予知式に基づいて、近隣 40 施設と共同で急性肝障害患者の登録、搬送システムを構築し、劇症化予知・予防に関するプロスペクティブスタディーを行っている。このシステムを利用し、B 型急性肝炎の重症化および劇症化に関与する臨床的要因の検討を行った。2004 年 8 月から 2009 年 12 月までの間に、プロトロンビン時間 80%以下を示した急性肝障害例 213 例が登録され、うち 155 例が肝炎症例で、48 例が搬送基準に合致し、40 例が実際に岩手医大消化器・肝臓内科に搬送された。全症例のうち B 型肝炎は 39 例（急性感染 13 例、キャリアの再燃 26 例）で、劇症化予知式の劇症化予知正確度は 100%であった。岩手医大に搬送された B 型肝炎は 8 例（急性感染 1 例、キャリアの再燃 7 例）で、うち 3 例が劇症化した。genotype を測定したものは 20 例あり、genotype B が 4 例（20%）、genotype C が 15 例（75%）、genotype H が 1 例（5%）であった。

研究協力者： 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授 鈴木一幸
岩手医科大学 消化器・肝臓内科 助教 宮坂昭生
岩手医科大学 消化器・肝臓内科 助教 熊谷一郎

A. 研究目的

B 型急性肝炎の重症化に関与する臨床的要因の検討を行い、ウイルスゲノタイプとの関連を検討した。

B. 研究方法

岩手医大消化器・肝臓内科（岩手医大）では、「難治性の肝胆道疾患調査研究」班で作成した劇症化予知式（表 1, Takikawa, et al. J Hepatol 2009; 51:1021-1029）に基づいて、北東北 4 県の 40 施設と共同で、急性肝障害患者の登録、搬送システムを構築し、劇症化予知・予防に関するプロスペクティブスタディーを行っている。このシステムでは、各協力施設において、PT80%以下を確認した時点の急性肝障害患者の臨床データを、所定の FAX 用紙を用いて岩手医大に登録し、逐次重症度および搬送基準（予測劇症化確率 20%以上）、特殊治療開始基準（予測劇症化確率 50%以上）の可否を判定し、搬送および治療法のアドバイスを行う。また、非搬送例に関しては、後日、転帰調査用紙

を用いて転帰調査を行う。

2004 年 8 月から 2009 年 12 月までの間に、適格症例 213 例が登録され、うち 155 例が肝炎症例で、48 例が搬送基準に合致し、40 例が実際に岩手医大消化器・肝臓内科に搬送された。

これらの症例の中で、HBV 肝炎についてウイルスゲノタイプおよび劇症化の臨床的要因について検討を行った。

本研究は岩手医科大学倫理委員会の研究承認を受け、また、患者情報の送付に関しては各施設で患者の承諾を得たうえで行った。

C. 研究結果

1. HBV 肝炎の頻度

全 213 例中 HBV 肝炎は 39 例で、うち急性感染が 13 例、キャリア再燃が 26 例であった。

重症化例（プロトロンビン時間：PT 40%以下）は急性感染で 3 例（23%）、キャリア再燃で 6 例（23%）と同率であったが、キャリア再燃では 3 例（12%）が昏睡発現（劇症化）し、

全例死亡した。

2. ゲノタイプの頻度

登録 B 型肝炎 39 例中, genotype を測定したものは 20 例あり, genotype B が 4 例 (20%), genotype C が 15 例 (75%), genotype H が 1 例 (5%) であった。PT が 80%以下に低下した症例の中には genotype A は認めなかったが, 同期間内に本学では genotype A 急性肝炎 1 例を経験している。この症例は岩手県出身者で東京近郊に在住しており, 発症後に郷里に帰って加療した例であり, 岩手県内に感染源を持つ genotype A 急性肝炎は, このシステムでは把握されていない。

genotype と肝炎の重症度との関連を表 2 に示す。明確な関連は認められなかった。

3. 劇症化予知式の精度

HBV 肝炎 36 例に対する劇症化予知と肝不全の予後について比較した (表 3)。劇症化予知のカットオフを予測劇症化確率 50%とすると, 偽陽性例, 偽陰性例ともになく, 100%の正確度であった。予測劇症化確率が 20%に達して, 搬送基準に合致した例は 9 例あり, そのうち 8 例 (急性感染 1 例, キャリア再燃 7 例) が実際に搬送された。

4. 搬送例の劇症化に関与する要因

搬送例について, 専門施設での精査項目で劇症化と関連する因子を検討した。予知式に含まれる項目 (年齢, 成因, PT, ビリルビン) 以外について, 昏睡発現例と非発現例で比較した。有意の差を示したのはアシアロシンチグラフィの LHL15, ATIII, アンモニア, HGF であった (表 4)。

5. 搬送例の治療法とその効果

各種治療法はより重症例に施行される傾向が強く, 劇症化を予防する方向に作用する治療法は見いだせなかった。

D. 考察

B 型肝炎ウイルスによる急性肝炎では, 急性感染かキャリアの再燃かによって, 予後が大きく異なる。今回の検討で, 重症化率は両者で差

はなかったものの, 重症化例からの昏睡発現がキャリア再燃例に限られていたことは, キャリア再燃例が重症化した場合, 極めて予後不良であることを改めて示している。今後は, HBc 抗体陽性者に対する免疫抑制療法の管理強化と, 劇症化予知・予防システムの普及が重要と考えられる。

Genotype の比率は B が 20%で, この地域のキャリアにおける genotype の分布を反映し, また, 急性肝炎の genotype 分布に関するこれまでの報告 (菅内文中ら 肝臓 2006;47:419-424) とほぼ一致する結果であった。岩手県で感染した genotype A 急性肝炎は今回の検討では確認されていないが, 献血者の中にはすでに陽性者が確認されており (四柳宏ら 肝臓 2009;50:269-272), 今後は増加が予測される。この意味からも, 本患者管理ネットワークでは, 対象を全急性肝炎に拡大し, また, 血清送付システムを追加するなど, 成因調査のための体制を強化している。

E. 結論

1. 岩手医大を中心とする多施設共同急性肝炎患者管理システムにおいて, 5 年間で 39 例の急性 B 型肝炎を確認した。
2. その 2/3 はキャリアの再燃で, 急性感染に比し劇症化する例が多かった。
3. Genotype では B が 20%, C が 75%で H が 1 例 (5%) 認められた。
4. 今後の genotype A の感染拡大に備えて, 全数把握および長期監視体制の強化が必要と考えられた。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表 (本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, Tsubouchi H. Early prediction of short-term development of hepatic encephalopathy in patients with acute liver disease unrelated to paracetamol. A prospective study in Japan. J Hepatol 2009;51:1021-1029.

- 2) Suzuki K, Takikawa Y. Biomarkers of Malnutrition in Liver Cirrhosis. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR. Editors. Nutrition, Diet Therapy and Liver. CRC Press; 2009;p. 203-215.
 - 3) Nagata Y, Maesawa C, Tada H, Takikawa Y, Yashima-Abo A, Masuda T, Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. Int J Mol Med 2009;24:35-43.
 - 4) Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsushashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M, Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. Hepatol Res 2009;39:648-656.
 - 5) Kakisaka K, Takikawa Y, Onodera M, Wang T. The influence of plasma of acute liver failure patients on survival of a mouse stem/progenitor cell line. J Iwate Med Assoc 2009 in print
 - 6) 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎劇症化の予知は可能か. 肝胆膵 2009;59:459-467.;
 - 7) 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎の劇症化予知と患者搬送システムに関する多施設共同研究. 日本腹部救急医学会誌 2009;29:591-596.
2. 学会発表
- 1) Kakisaka K, Takikawa Y, Onodera M, Wang T, Suzuki K. The plasma of acute liver failure patients promotes the survival of mouse liver stem/progenitor cells through JNK activation. AASLD Boston, USA, Nov 2-5, 2009.
 - 2) 滝川康裕, 渡辺雄輝, 鈴木一幸. 肝炎劇症化予知式を基にした急性障害管理ガイドラインの試み. 第 45 回総会: ワークショップ「劇症肝炎: 診療ガイドラインの作成の現状と問題点」 2009 年 6 月 5 日, 神戸.
 - 3) 片岡晃二郎, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 熊谷一郎, 渡辺雄輝, 宮坂昭生, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎登録システムからみた劇症肝炎診断名の意義. 第 106 回日本内科学会講演会, 東京, 4 月 10 日, 2009.
 - 4) 小野寺美緒, 滝川康裕, 柿坂啓介, 八角有紀, 渡辺雄輝, 遠藤龍人, 鈴木一幸. 急性肝障害例の成因別による肝細胞死機構 (アポトーシス, ネクローシス) の血清指標の差異. 第 45 回日本肝臓総会, 神戸.
 - 5) 滝川康裕, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 宮本康弘, 遠藤龍人, 鈴木一幸. 急性肝炎劇症化の予知と予防治療の可能性. 第 35 回急性肝不全研究会シンポジウム 1「肝炎劇症化と再生不全: 阻止は可能か?」 神戸, 6 月 3 日, 2009.
 - 6) 宮本康弘, 滝川康裕, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 鈴木一幸. 劇症肝炎に対する肝移植判定基準の評価と適応判定時期の検討. 第 35 回急性肝不全研究会シンポジウム 2「急性肝不全治療の標準化: いつ移植を考えるか?」 神戸, 6 月 3 日, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
- 特許取得: 該当なし
実用新案登録: 該当なし
その他: 該当なし