

HIV と HBV の混合感染に関する研究

分担研究者：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

研究要旨 近年 HIV と HBV の両者に効果を有する核酸アナログが複数登場したが、HIV/HBV 混合感染に対する治療には、未確立の部分が多く、情報の蓄積が急務である。HIV 感染者における HBV 混合感染の現状を把握し、治療効果や問題点を明らかにすることを目的に、HIV 感染者における HBV 感染率と HAART 実施時の抗 HBV 効果に関する、後ろ向き調査を実施した。その結果、HIV 患者の初診時における HBs 抗原陽性率は 7.5% と高率で、年間 1-2 例が、HIV 診断後に HBV に感染していたことが分かった。慢性化率は高く（約 70%）、HBV ワクチンの積極的な接種を検討すべきと考えられる。また、HAART の抗 HBV 効果に関する検討では、TDF/FTC または 3TC を含む HAART 実施例においてのみ、持続的な HBV-DNA 抑制効果が認められた。今後、より長期間の調査や、他剤（entecavir 他）付与効果、HBeAg 陰性者の検討、薬剤耐性、Genotype による臨床経過の違い等の検討を加えた研究を行う予定である。

A. 研究目的

HBV 感染は、最も頻度の高い HIV 合併疾患のうちのひとつである。HIV 感染者の予後が致死的であった 10 年以上前は、合併する肝炎の存在はさほど大きな問題ではなかったが、HAART（抗レトロウイルス療法：highly active antiretroviral therapy：HAART）の登場により著しく予後が改善し、HIV 感染者が日和見感染症で命を落とすことが少なくなった現在では、合併する HBV 感染の問題は、より重要性を増している。

一方、HBV の A-H 型の 8 つの遺伝子型のうち、かつての C 型にとってかわり、近年、より慢性化しやすい A 型、特に欧米由来の Ae 型が増加していることが明らかとなりつつあるが、HIV との重複感染でも例外ではない。また、我々の施設で、HBs 抗原陽性の HIV 感染者と、HBs 抗体陽性の

HIV 感染者の初診時の CD4 数を比較したところ、HBs 抗体陽性の方が、有意に CD4 数が高かったことが分かった。慢性化しやすい遺伝子型の HBV が流行していることに加え、HIV が引き起こす免疫不全により、HIV 感染者では、HBV の慢性化率が非常に高くなっているものと推測される。

また、近年、HIV および HBV の双方に効果を有する、複数の核酸アナログ系逆転写酵素阻害剤が登場してきた。両ウイルスの薬剤耐性獲得のリスクや、HAART 導入後や治療中断時の肝障害悪化のリスクなど、治療上、特別な配慮を要する場面は多いにも関わらず、HIV/HBV 混合感染に対する治療においては、未確立の部分が多い。

そのような背景をふまえ、本研究では、HIV 感染者における HBV 混合感染の現状を知ると共に、治療効果や問題点とその対策を明らかにするこ

とを目的に、HIV 感染者における HBV 混合感染率の調査と、抗 HBV 作用のある核酸アナログを含む HAART 実施時の抗 HBV 効果に関する後ろ向き調査を実施した。

B. 研究方法

1996 年より 2009 年までの 13 年間に、エイズ治療研究開発センターを受診した HIV 感染者を対象に、診療録等を用いて後方視的に調査を行った（後ろ向きコホート研究）。また、一部の症例においては、患者同意を得て保存血清を用いた HBV 関連検査を実施した。

治療効果の評価対象は、6 ヶ月以上 HBs 抗原陽性で慢性 HBV 感染と診断された HIV 陽性者で、HAART 導入時の HBe 抗原が陽性の者とした。エンドポイントは、①HAART 導入後の HBV-DNA 量の変化（治療後 2 年間）②HAART 導入 2 年&4 年後の HBe/HBs Seroconversion (SC) 率とした。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（2008 年ソウル改訂）の精神に従い、「臨床試験に関する倫理指針」（平成 15 年 7 月 30 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 7 月 31 日全部改正、厚生労働省）および「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月 17 日制定、平成 19 年 8 月 16 日全部改正、平成 20 年 12 月 3 日一部改正、文部科学省、厚生労働省）に準拠して実施した。

C. 研究結果

1) HIV 感染者における HBV 混合感染率

1996 年より 2009 年までの 13 年間に、エイズ治療研究開発センターを受診した 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者は 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 ヶ月以上 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。

2) HAART 実施時の抗 HBV 効果

計 213 名の HIV 陽性慢性 HBV 感染者のうち、HBe 抗原陽性は 135 例（135/213, 64.5%）であった。その 95 例に対し HAART が実施された。

平均年齢は 33.9 歳（±8.29, SD）、男女比は 92 : 3 と圧倒的に男性が多く、感染経路も男性同性間性感染 91.6%、異性間性感 5.1%と、血友病 2.1%であった。HCV 抗体陽性率は 5.2%であった。

抗 HBV 作用のある薬剤の有無と種類により、①テノフォビル（tenofovir : TDF）とエムトリシタビン（emtricitabine : FTC）または TDF とラミブジン（lamibuvine : 3TC）の 2 剤を含む HAART を実施した群、②3TC のみを含む HAART を実施した群、③抗 HBV 作用のない薬剤のみの HAART を実施した群、について、比較検討を行った。

表 1 に治療前のデータと、各群の観察期間を示す。いずれの群も、治療前の ALT、HBV-DNA、CD4 数に有意差は認められなかった。一方、2005 年に TDF が本邦で使用可能になるまでは、②3TC のみを含む HAART または③抗 HBV 作用のない薬剤のみの HAART が一般的であったことから、観察期間は、①TDF と FTC または TDF と 3TC の 2 剤を含む HAART が有意に長かった。

表 1 HAART 前検査値と観察期間

	TDF/FTC or 3TC	3TC	抗 HBV 薬 なし	P 値
	平均 (±SD) n=34*	n=41	n=20	
ALT (IU/L)	85 (±106)	49 (±62)	37 (±15)	0.18
HBV-DNA (LGE/ml)	7.1 (±1.4)	7.8 (±1.1)	6.8 (±1.9)	0.43
CD4 (μl)	242 (±210)	199 (±185)	209 (±175)	0.57
観察期間 (週)	146 (±129)	378 (±183)	306 (±173)	<0.0001

* Entecavir 併用 2 名, Adefovir 併用 1 名を含む

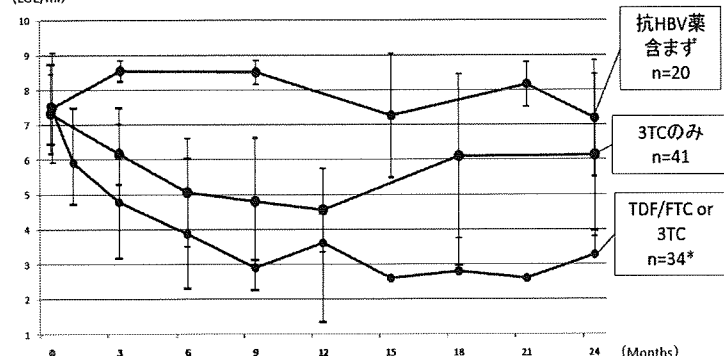
**Kruskal-Wallis H test

HAART 導入後の HBV-DNA 量の変化（治療後 2 年間）を図 1 に示す。

TDF/FTCor3TC 群では、持続的な HBV-DNA 抑制が得られているのに対し、3TC のみでは、HBV-DNA 抑制効果は一時的であることが分かる。更に、抗 HBV 薬を全く含まない群では、全く HBV-DNA 抑制効果がみられず、免疫能の回復だ

Mean (±SD)
(LGE/ml)

図1 HBV-DNA 推移



けでは、HBV 感染を抑止する効果は期待できないものと考えられた。

HAART 導入 2 年と 4 年後の HBe/HBs Seroconversion (SC) 率については、HBe 抗原の消失、HBe 抗体の出現、HBs 抗原の消失、HBs 抗体の出現、いずれも TDF/FTC or 3TC 群で最も高率にみられたが、他の治療群と有意差がみられたのは HBe 抗体の陽性化で、2 年目で約 58%、4 年目約 67%にみられた。HBs 抗体の出現は、TDF/FTC または 3TC 群の 4 年目においても、約 17%にとどまった。

D. 結論

新たに診断された HIV 患者における初診時の HBs 抗原陽性率は 7.5%と高率で、年間 1-2 例が、HIV 診断後に HBV に感染していたことが分かった。6 ヶ月間の HBs 抗原陽性という診断基準に沿って考えると、慢性化率は約 70%と非常に高く、HIV 陽性者においては、HBV ワクチンの積極的な接種を検討すべきと考えられる。

TDF/FTC または 3TC を含む HAART は、2 年間の観察期間中、持続的 HBV-DNA 抑制を示した。しかし、3TC のみを含む HAART では、HBV-DNA 抑制効果が一時的であり、更に抗 HBV 薬を含まない HAART では全く HBV-DNA の抑制がみられなかった。血中の HBV-DNA レベルが、HBV 感染者の予後（肝線維化・肝癌の発生率）に大きく影

響することが知られており、HIV/HBV 混合感染時には TDF/FTC または 3TC を含む HAART が強く勧められる根拠が改めて明らかとなった。一方、HBe 抗体は、TDF/FTC または 3TC を含む HAART においてのみ、効率に認められたが、HBs 抗体の出現は 20%未満に留まった。最終的な治療効果判定のためには、更なる長期間の観察が必要と考えられる。

来年度以降も、同テーマでの研究を続けるとともに、他剤（entecavir 他）付与効果や HBeAg 陰性者の検討、薬剤耐性、Genotype による臨床経過の違い等を検討する予定である。

E. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
(国際学会)
なし
(国内学会)

1)田沼順子、水島大輔、中村春香、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一、正木尚彦. HBe 抗原陽性 HIV 感染者に対する HAART の抗 HBV 効果について. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26-28 日

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

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

「感染症法に基づく B 型肝炎の届出状況」

研究分担者：多田有希 国立感染症研究所 感染症情報センター第二室室長

研究要旨：感染症法のもとで実施されている感染症発生動向調査に報告された B 型肝炎の都道府県別報告状況、届出医療機関数等をみた。B 型肝炎の年間報告数は、1999 年（4-12 月）の 511 例から減少傾向にあり、2003-2006 年は 200-250 例で推移していたが、2007 年以降は年間 200 例を下回っている。感染経路では性的接触の占める割合の増加傾向が認められた。2004-2008 年の 5 年間報告数を都道府県別でみると、東京、大阪、兵庫、神奈川、広島などで多く、人口当たり報告数では岡山、広島、高知、宮崎、山梨などで多かった。一方、5 年間の合計報告数が、1 例（3 県）や 3 例（6 県）と報告数の少ない自治体があった。また、2007-2008 年の 2 年間に届出を行った医療機関は、44 都道府県の 242 施設であった。

A. 研究目的

B 型肝炎に関する母児感染対策が奏功し、乳幼児におけるキャリア化は著しく減少した。また輸血液に対する対策も進み、輸血による B 型肝炎ウイルス感染も減少した。これらに対する警戒、対応は引き続き緩めることなく行なっていくことが必要であるが、従来の母児感染対策、医療行為による感染対策に加えて、性感染症としての観点からの対策も重要となってきた。性感染症としての対策は、成人に性的接触を介して初感染し約 10%が慢性化することが明らかになった genotype A の感染の危険性からも重要である。今後の B 型肝炎の感染予防対策を考えていく上では、その発生状況を的確に把握することが不可欠である。

B 型肝炎は、感染症法施行の 1999 年 4 月以降、4 類感染症の「急性ウイルス性肝炎」（A, B, C, D, E 型, その他, 不明）として全数把握疾患となり、また 2003 年 11 月の感染症法の改正では、5 類感染症の「ウイルス性肝炎（A 型肝炎及び E 型肝炎を除く）」に分類され、全数把握サーベイランスが継続されている。これらのデータを分析することによって、わが国における B 型肝炎ウイルス性肝炎の発生状況、報告症

状を検討し、今後の肝炎対策に資することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1999 年以降は 4 類感染症の「急性ウイルス性肝炎」（A, B, C, D, E 型, その他, 不明）として、2003 年 11 月の改正以降では 5 類感染症である「ウイルス性肝炎（E 型肝炎及び A 型肝炎を除く）」として届けられた B 型肝炎について集計を行なった。2006 年 4 月に、届出基準と届出票の改正があり、同時に報告システムが新設された。この際に、症例に関する届出内容に加え、届出医療機関名や医師名もシステム上に登録されるようになったことから、2007-2008 年の報告を用い、届出医療機関についても集計を行った。

なお、報告数や報告内容は、追加や修正の報告等により修正される場合があり、集計日により若干異なる。

倫理面への配慮：本研究では、感染症に関する情報を取り扱うが、個人を特定できる情報の取り扱いはしない。万一個人的情報が本研究の中に含まれる場合があっても、それに関する機密

保護に万全を期するものである。

C. 研究結果

B型肝炎の年間報告数は、1999年(4-12月)510例、2000年425例、2001年330例、2002年332例、2003年245例、2004年241例、2005年209例、2006年228例、2007年199例、2008年178例と減少傾向がみられ、2009年は165例であった(2010年1月5日現在)。性的接触感染例の占める割合は、1999年43%から2007年67%、2008年66%と増加がみられた。2003-2008年の6年間の報告(1300例)でみると、性的接触と報告された792例の感染地域は、国内695例、国外83例、国内国外不明14例であった。また、2009年に、祖父→その孫→その父親という家族内水平感染事例の報告があり、祖父は2年前の検診ではHBVキャリアの指摘がされていなく、このウイルスはgenotype A2であった〔乾あやの他：B型肝炎の家族内感染例。病原微生物検出情報(IASR) Vol. 31, p21-22:10年1月号〕。

2004-2008年の5年間の報告総数は1,055例で、都道府県別報告数は、東京(182例)、大阪(108例)、兵庫(88例)、神奈川(61例)、広島(57例)に多く、福岡、岡山、宮城、愛知、京都が続く。5年間の報告数を、2006年10月1日現在の各都道府県の推計人口をもとに人口10万人当たり報告数に換算すると、岡山(2.4)、広島(2.0)、高知(1.9)、宮崎(1.9)、山梨(1.8)で多く、宮城、兵庫、東京、和歌山、三重が続いた。一方、5年間の総報告数は、山形、福井、鳥取(各1例)、秋田、香川、佐賀、熊本、鹿児島、沖縄(各3例)で少なく、人口10万人当たりでは、山形、埼玉、福井(各0.1)、福島、新潟、鳥取、熊本、鹿児島、沖縄(各0.2)で少なかった(図と表1)。

2007-2008年の2年間に届出を行った医療機関は、報告の1例もなかった鳥取、山口、佐賀の3県を除く44都道府県の242施設であった。2年間の報告総数は377例で、1医療機関当たりの報告数は1-10例であった(1例173施設、2例38施設、3例15施設、4例8施設、5例5施設、7例1施設、9例1施設、10例1施設)(表2)。本研究の

14名の臨床班員の所属施設の届出状況をみると、届出があったのは、4施設で、各施設の届出はいずれも1例であった(関連病院などでの届出は考慮できていない)。

D. 考察と結論

わが国におけるB型肝炎は、1999年(4-12月)の511例から減少傾向がみられ、2003-2006年は200-250例で推移した後、2007年以降は年間200例を下回る状況となっている。一方、近年の報告では、性的接触による青壮年代での感染が多くを占めるようになっており、これまでの母子肝炎対策、輸血液に対する対策、医療行為あるいは針刺し事項などへの対策に加えて、STD疾患の一つとして捉えた対策の必要性を考慮しなくてはならない。

今後講ずべき予防対策を検討する上では、発生状況を正確に把握することが不可欠である。各種関係学会、医師会、保健所や地方感染症情報センターなどの関係行政機関を通じ、B型肝炎を含むウイルス性肝炎が届出義務のある感染症であることの臨床医への周知を継続して行うことが必要である。その際には、法的義務がある点に留まらず、今後の対策推進のための基礎資料としての重要性を伝えなくてはならないと考える。本研究班での今後の研究として、臨床班員の諸先生等との協力により、届出の実態を把握するとともに、未届けの状況が確認されるようであれば、届出を阻害する要因の有無や必要な対応策を検討して、より正確なB型肝炎発生状況の把握を目指したい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

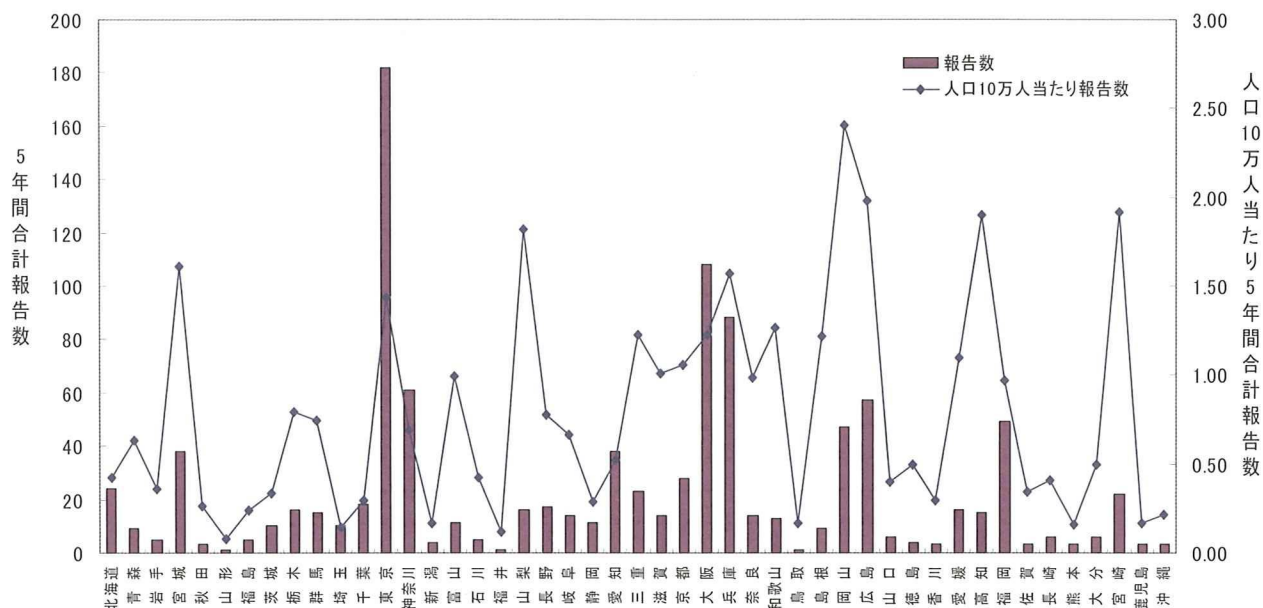
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図と表1 B型肝炎の都道府県別報告数と罹患率(2004～2008年)

人口は2006年10月1日現在推計人口を用いた



	5年間合計報告数	人口10万人当たり 5年間合計報告数
北海道	24	0.43
青森県	9	0.63
岩手県	5	0.36
宮城県	38	1.61
秋田県	3	0.26
山形県	1	0.08
福島県	5	0.24
茨城県	10	0.34
栃木県	16	0.79
群馬県	15	0.74
埼玉県	10	0.14
千葉県	18	0.30
東京都	182	1.44
神奈川県	61	0.69
新潟県	4	0.17
富山県	11	0.99
石川県	5	0.43
福井県	1	0.12
山梨県	16	1.82
長野県	17	0.78
岐阜県	14	0.67
静岡県	11	0.29
愛知県	38	0.52
三重県	23	1.23

	5年間合計報告数	人口10万人当たり 5年間合計報告数
滋賀県	14	1.01
京都府	28	1.06
大阪府	108	1.23
兵庫県	88	1.57
奈良県	14	0.99
和歌山県	13	1.26
鳥取県	1	0.17
島根県	9	1.22
岡山県	47	2.40
広島県	57	1.98
山口県	6	0.40
徳島県	4	0.50
香川県	3	0.30
愛媛県	16	1.10
高知県	15	1.90
福岡県	49	0.97
佐賀県	3	0.35
長崎県	6	0.41
熊本県	3	0.16
大分県	6	0.50
宮崎県	22	1.92
鹿児島県	3	0.17
沖縄県	3	0.22
全国	1055	0.83

表2 B型肝炎の都道府県別届出医療機関数と報告数 2007～2008 年

	届出医療機関数	総報告数	1届出医療機関 当たり報告数
北海道	5	8	1-4
青森	4	4	1
岩手	2	2	1
宮城	5	10	1-3
秋田	1	1	1
山形	1	1	1
福島	2	3	1-2
茨城	2	3	1-2
栃木	3	6	1-3
群馬	4	8	1-3
埼玉	3	3	1
千葉	2	3	1-2
東京都	33	63	1-9
神奈川県	14	19	1-3
新潟	2	2	1
富山	3	3	1
石川	1	1	1
福井	1	1	1
山梨	2	5	5
長野	3	7	2-3
岐阜	3	3	1
静岡県	3	3	1
愛知県	14	22	1-5
三重	4	6	1-3
滋賀	4	7	1-3
京都	9	9	1
大阪府	29	39	1-4
兵庫県	19	26	1-3
奈良	2	2	1
和歌山	3	6	1-3
鳥取	0	0	0
島根	3	4	1
岡山	5	19	1-10
広島	9	23	1-7
山口	0	0	0
徳島	2	2	1
香川	1	2	2
愛媛	4	5	1-2
高知	4	7	1-4
福岡	17	22	1-4
佐賀	0	0	0
長崎	2	2	1
熊本	2	2	1
大分	2	2	1
宮崎	6	8	1-2
鹿児島	1	1	1
沖縄	1	2	2
合計	242	377	

Ⅲ. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渡辺 久剛、齋藤 貴史、河田純男	HCV キャリアからの HCV RNA 自然消失はあるのか？	河田純男、佐々木裕	肝臓病診療：こんなときどうする Q&A	中外医学社	東京	2009	47-51
齋藤 貴史、西瀬雄子、河田純男	わが国で、ALT 値の異常を有する成人の割合はどの程度か？	河田純男、佐々木裕	肝臓病診療：こんなときどうする Q&A	中外医学社	東京	2009	52-54
齋藤 貴史、渡辺久剛、河田純男	PegIFN+ リバビリン療法の治療効果はウイルス学的にどこまで予測できるか？	河田純男、佐々木裕	肝臓病診療：こんなときどうする Q&A	中外医学社	東京	2009	364-367

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kurbanov F, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> .	Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus.	Hepatol Res.	40(1)	14-30	2010
Ikegami T, Matsuki Y, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , Honda A, Hirayama T, Saito Y, Matsuzaki Y.	Impact of determination of hepatitis B virus subgenotype and pre-core/core-promoter mutation for the prediction of acute exacerbation of asymptomatic carriers.	Hepatol Res.	39(4)	341-5	2009
Inoue M, KurahashiN, Iwasaki M, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , Noda M, Tsugane S.	Metabolic factors and subsequent risk of hepatocellular carcinoma by hepatitis virus infection status: a large-scale population-based cohort study of Japanese men and women (JPHC Study Cohort II).	Cancer Causes Control	20(5)	741-50	2009

Tatematsu K, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, <u>Mizokami M</u> .	A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J.	J Virol.	83(20)	10538-47	2009
Matsuura K, <u>Tanaka Y</u> , Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, <u>Mizokami M</u> .	Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A.	J Clin Microbiol	47(5)	1476-83	2009
Fung J, Lai CL, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , Yuen J, Wong DK, Yuen MF.	The duration of lamivudine therapy for chronic hepatitis B: cessation vs. continuation of treatment after HBeAg seroconversion.	Am J Gastroenterol	104(8)	1940-6	2009
<u>溝上雅史</u>	B 型急性肝炎ウイルスと遺伝子型.	日本医師会雑誌	138(6)	1080	2009
松浦健太郎, <u>田中靖人</u> , <u>溝上雅史</u>	わが国における急性肝炎の現状.	肝・胆・膵	59(3)	351-359	2009
杉山真也 <u>田中靖人</u> <u>溝上雅史</u>	HBV 遺伝子型: グローバルオーバービュー 特集 B 型肝炎－病態解明と治療の最前線 B 型肝炎の病態解明最前線.	臨床消化器内科			
Yano k, Tamada Y, <u>Yatsuhashi H</u> , Komori A, Abiru S, <u>Ito K</u> , <u>Masaki N</u> , <u>Mizokami M</u> , Ishibashi H; Japan National Hospital	Dynamic epidemiology of acute viral hepatitis in Japan	Intervirology	53(1)	70-5	2010

Acute Hepatitis Study Group.					
Garacia T, Li J, Sureau C, <u>Ito K</u> , Qin Y, Wands J, Tong S	Drastic reduction in the production of subviral particles does not impair hepatitis B virus virion secretion.	J Virol.	83(21)	11152-65	2009
<u>Ito K</u> , 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.	83(8)	3507-17	2009
<u>伊藤清顕</u> 、 <u>溝上雅史</u>	ウイルス性肝炎.	総合臨床	59(3)	441-446	2010
<u>Takikawa Y</u> , 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.	51	1021-1029	2009
Suzuki K, <u>Takikawa Y</u> . Biomarkers of Malnutrition in Liver Cirrhosis. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR. Editors.	Nutrition, Diet Therapy and Liver.	CRC Press		203-215	2009
Nagata Y, Maesawa C, Tada H, <u>Takikawa Y</u> , Yashima-Abo A, Masuda T	Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice.	Int J Mol Med	24	35-43	2009
Kusakabe A, <u>Tanaka Y</u> , Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, <u>Yatsuhashi H</u> , <u>Takikawa Y</u> , Kaneko S, Yamada G, <u>Karino Y</u> , Tanaka E,	Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B.	Hepatol Res	39	648-656	2009

Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M					
Kakisaka K, <u>Takikawa Y</u> , 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	In print		2009
<u>滝川康裕</u> , 鈴木一幸	急性肝炎劇症化の予知は可能か	肝胆膵	59	459-467	2009
遠藤龍人, <u>滝川康裕</u> , 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	29	591-596	2009
<u>Saito T</u> , Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S	Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population.	Metabolism	58	1067-1075	2009
柄沢 哲、富樫 整、田嶋克史、鈴木明彦、小野寺 滋、芳賀弘明、石井里佳、三沢慶子、三條麻衣、奥本和夫、西瀬雄子、伊藤純一、菅原一彦、斉藤孝治、 <u>斎藤貴史</u> 、河田純男	インターフェロン療法が著効した特発性血小板減少性紫斑病を合併したC型肝炎の1例	日本消化器病学会雑誌	106	405-410	2009
佐藤智佳子、三沢慶子、 <u>斎藤貴史</u> 、河田純男	胃癌術後に発症した非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の一例	治療学	43	1137-1140	2009
<u>斎藤貴史</u> 、西瀬雄子、石井里佳、渡辺久剛、鈴木克典、河田純男	HCV NS3 蛋白質多型性とC型慢性肝炎の予後・治療効果予測	日本消化器病学会雑誌	106	502-507	2009
<u>斎藤貴史</u> 、河田純男	糖尿病（耐糖能異常）と肝疾患のクロストーク．糖代謝異	医学のあゆみ	229	1141-1145	2009

	常と肝発癌—臨床の立場から				
<u>田沼順子</u> 、 <u>正木尚彦</u>	H I V感染症とB型肝炎	感染制御 JICP	5(2)	159-162	2009
山田晃弘、酒匂赤人、 西村 崇、中島 亮、 尾上淑子、藤谷啓一、 津田尚法、朝山直樹、 矢田智之、白井聖一、 赤澤直樹、櫻井俊之、 矢郷祐三、永田尚義、 大嶋隆夫、横井千寿、 笹島圭太、小早川雅 男、秋山純一、今村雅 俊、柳瀬幹雄、上村直 実、 <u>正木尚彦</u>	HIV感染者のB型急性肝炎重 症化に対するエンテカビル投 与により HIV-RNA 量の著明 な低下を認めた1例	日本消化器病 学会雑誌	106(12)	1758-1763	2009
<u>四柳宏</u> 、 <u>山田典栄</u> 、 奥瀬千晃、 <u>安田清美</u> 、 小池和彦	B型肝炎の病態解明最前線 HBV 遺伝子型と急性肝炎	臨床消化器内 科	24	661-665	2009
<u>Umemura T</u> , <u>Ichijo</u> <u>T</u> , <u>Yoshizawa K</u> , <u>Tanaka E</u> , <u>Kiyosawa</u> <u>K</u>	Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan	Journal of Gastroenterol ogy	suppl 19	102-107	2009
坪内博仁、熊田博光、 清澤研道、持田智、坂 井田功、田中榮司、市 田隆文、 <u>溝上雅史</u> 、鈴 木一幸、與芝眞彰、森 脇久隆、日比紀文、林 紀夫、國土典宏、藤澤 知雄、石橋大海、菅原 寧彦、 <u>八橋弘</u> 、井戸章 雄、 <u>滝川康裕</u> 、井上和 明、桶谷真、宇都浩文、 中山伸朗、内木隆文、 多田慎一郎、木曾真 一、矢野公士、遠藤龍 人、 <u>田中靖人</u> 、 <u>梅村武</u> <u>司</u> 、熊谷公太郎	免疫抑制・科学療法により発 症するB型肝炎対策—厚生労 働省「難治性の肝・胆道型疾 患に関する調査研究」班 劇 症肝炎分科会および「肝硬変 を含めたウイルス肝疾患の治 療の標準化に関する研究」班 合同報告—	肝臓	50	38-42	2009

<u>Tanaka Y</u>, Nishida N, Sugiyama M, <u>Kurosaki M</u>, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, <u>Mita E</u>, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, <u>Ito K</u>, Yano K, <u>Masaki N</u>, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, <u>Mizokami M</u>	Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C	Nat Genet.	41(10)	1105-9	2009
Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hagiwara H, Oshita M, <u>Mita E</u>, Fukui H, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, <u>Imai Y</u>, Kato M, Miyagi T, Hohsui A, Ishida H, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N	Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses	J Viral Hepat.	Aug 12		2009
Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Inoue Y, Igura T, Mochizuki K, Imanaka K, Kaneko	Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to	J Viral Hepat.	16(8)	586-94	2009

A, Oshita M, Hagiwara H, <u>Mita</u> <u>E</u> , Nagase T, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, <u>Imai</u> <u>Y</u> , Kato M, Yoshida Y, Tatsumi T, Ohkawa K, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N	pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin				
Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Kurokawa M, Igura T, Mochizuki K, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, <u>Mita</u> <u>E</u> , Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, <u>Imai Y</u> , Kato M, Yoshida Y, Tatsumi T, Ohkawa K, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N	Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin	J Viral Hepat.	16(8)	578-85	2009
Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oze T, Kiso S, Kanto T, Takehara T,	Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance.	J Gastroenterol.	44(8)	864-70	2009

Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Fukuda K, Oshita M, <u>Mita E</u> , Fukui H, Nagase T, Yoshihara H, <u>Imai</u> <u>Y</u> , Kato M, Kashihara T, Hayashi N					
Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Yakushijin T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Oshita M, <u>Mita E</u> , Hagiwara H, Nagase T, Yoshihara H, Hayashi E, <u>Imai Y</u> , Kato M, Kashihara T, Hayashi N	Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B.	J Gastroenterol.	44(6)	601-7	2009
Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Mochizuki K, Yakushijin T, Kurashige N, Inoue Y, Igura T, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, <u>Mita E</u> , Ito T, Inui Y, Hijioka T, Yoshihara H, Inoue A, <u>Imai Y</u> , Kato M, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N	Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis	Hepatol Res.	39(5)	432-8	2009
<u>田中靖人</u> 、 <u>四柳 宏</u> 、 矢野公士、酒匂赤人、	ユニバーサル HB ワクチネー ション：是か非か？	肝臓	50(10)	598-604	2009

三田英治、松浦健太郎、林 和彦、柘植雅貴、田尻和人、吉岡奈穂子、藤澤知雄、 <u>内田茂治</u> 、小池和彦					
A Yoshikawa, K Suzuki, A Abe, T Tanaka, K Yamaguchi, T Tanaka, Y Ishikawa, K Minegishi, Y Gotanda, H Yugi, <u>S Uchida</u> , M Satake, K Tadokoro	Effect of selective vaccination on a decrease in the rate of hepatitis B virus-positive Japanese first-time blood donors.	Transfusion Medicine	19	172-179	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J[†]

Kanako Tatematsu,¹ Yasuhito Tanaka,^{1*} Fuat Kurbanov,¹ Fuminaka Sugauchi,²
Shuhei Mano,³ Tatsuji Maeshiro,⁴ Tomokuni Nakayoshi,⁵ Moriaki Wakuta,⁶
Yuzo Miyakawa,⁷ and Masashi Mizokami^{1,8}

Department of Clinical Molecular Informative Medicine¹ and Department of Gastroenterology and Metabolism,² Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; Nagoya City University Graduate School of Natural Sciences, Nagoya, Japan³; Control and Prevention of Infectious Diseases, Department of Medicine and Therapeutics, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan⁴; Heart Life Hospital, Okinawa, Japan⁵; Wakusan Clinic, Okinawa, Japan⁶; Miyakawa Memorial Research Foundation, Tokyo, Japan⁷; and Research Center for Hepatitis and Immunology, International Medical Center of Japan Kohnodai Hospital, Chiba, Japan⁸

Received 5 March 2009/Accepted 24 July 2009

Hepatitis B virus (HBV) of a novel genotype (J) was recovered from an 88-year-old Japanese patient with hepatocellular carcinoma who had a history of residing in Borneo during the World War II. It was divergent from eight human (A to H) and four ape (chimpanzee, gorilla, gibbon, and orangutan) HBV genotypes, as well as from a recently proposed ninth human genotype I, by 9.9 to 16.5% of the entire genomic sequence and did not have evidence of recombination with any of the nine human genotypes and four nonhuman genotypes. Based on a comparison of the entire nucleotide sequence against 1,440 HBV isolates reported, HBV/J was nearest to the gibbon and orangutan genotypes (mean divergences of 10.9 and 10.7%, respectively). Based on a comparison of four open reading frames, HBV/J was closer to gibbon/orangutan genotypes than to human genotypes in the P and large S genes and closest to Australian aboriginal strains (HBV/C4) and orangutan-derived strains in the S gene, whereas it was closer to human than ape genotypes in the C gene. HBV/J shared a deletion of 33 nucleotides at the start of preS1 region with C4 and gibbon genotypes, had an S-gene sequence similar to that of C4, and expressed the *ayw* subtype. Efficient infection, replication, and antigen expression by HBV/J were experimentally established in two chimeric mice with the liver repopulated for human hepatocytes. The HBV DNA sequence recovered from infected mice was identical to that in the inoculum. Since HBV/J is positioned phylogenetically in between human and ape genotypes, it may help to trace the origin of HBV and merits further epidemiological surveys.

Worldwide, an estimated 400 million people are infected with hepatitis B virus (HBV) persistently, of whom three quarters live in the Southeast and Far East Asia, and one million die of decompensated cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma (HCC) annually (8, 15). HBV is the smallest animal DNA virus and has a genome made of approximately 3,200 nucleotides (nt) that contains four open reading frames for P, C, S, and X genes; they code for DNA polymerase/reverse-transcriptase, core protein, surface protein, and X protein, respectively (49). The S gene is divided into preS1 and preS2 regions and the small S gene, and the C gene splits into PreC and C.

Eight genotypes of HBV have been recognized by a sequence divergence of >8% in the entire genome and named by capital alphabet letters (A to H) in the order of discovery (3, 26, 29, 42). HBV genotypes are further classified into subgenotypes, such as B1/Bj and B2-5/Ba (44), as well as C1/Cs, C2/Ce,

and C3-5 (36). A systematic nomenclature is proposed for designating HBV subgenotypes using Arabic numbers, such as A1, A2, and A3 (25). HBV genotypes have distinct geographical distribution (16, 23). Genotype A is prevalent in Africa, Europe and India, genotypes B and C are common in Asia, and genotype E is common in sub-Saharan Africa. Genotypes F and H are restricted to Central and South American continents, whereas genotype D is distributed all over the world. HBV genotypes have clinical application, and they influence severity and progression of liver disease and the response to antiviral therapies. Previous reports indicate that HCC is more frequent in the patients infected with genotype C than B (7, 47), and interferon is more effective in those infected with genotype B than C in Asia and more effective in those infected with genotype A than D in Europe (18, 34, 51).

Recently, a ninth genotype (I) was tentatively proposed for HBV strains detected in Laos (31). These strains are phylogenetically similar to aberrant Vietnamese strains that display complex recombination over the genome (10). In the present study, an HBV isolate was recovered from a Japanese patient with HCC, who was involved in military actions in Borneo during the World War II. The isolated strain was compared against eight human (A to H) and four ape (chimpanzee, gorilla, gibbon, and orangutan) genotypes and was provisionally designated genotype J. The new genotype was assigned based on a sequence diver-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya, City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi, Mizuho, Nagoya 467-8601, Japan. Phone: (81) 52-853-8292. Fax: (81) 52-842-0021. E-mail: ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 29 July 2009.

TABLE 1. Nucleotide divergence in the full-genome sequence estimated from pairwise comparison between the Ryukyu 34 strain of a provisional genotype J and 1,440 HBV strains from the database entered by September 2008

Genotype	No. of strains	Divergence (%)		
		Range	Mean	SD
A	202	12.1–15.9	13.0	0.4
B	309	11.1–13.6	11.9	0.5
C	396	11.2–13.1	11.9	0.5
D	264	12.6–15.0	13.4	0.2
E	90	12.3–13.4	12.7	0.3
F	56	15.2–16.5	15.6	0.2
G	23	12.8–14.6	13.7	0.3
H	21	15.4–16.3	15.7	0.3
I	16	11.4–12.0	11.7	0.2
Chimpanzee	14	11.6–12.7	12.1	0.3
Gorilla	1	12.2		
Gibbon	34	9.9–11.7	10.9	0.5
Orangutan	12	10.4–11.2	10.7	0.4
Woolly monkey	2	27.2–27.4	27.3	0.1

gence of 10.7 to 15.7% from other genotypes, a unique phylogenetic position between human and ape genotypes, and the absence of strong evidence of recombination.

MATERIALS AND METHODS

Patient. A Japanese man, 88 years old, developed HCC in 2006. He had a history of residing in Borneo during the World War II. No HBV infections were recorded in his family members. In October 1996, he was diagnosed with chronic hepatitis B. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was detected in serum, and the aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels were elevated to 83 and 73 U/liter, respectively (normal levels, <30 U/liter for both). Thereafter, the transaminase levels were normalized, and he had been monitored as an asymptomatic HBV carrier. In August 2000, the level of a tumor marker (des-γ-carboxy prothrombin) was elevated to 52 mAU/ml (normal, <40 mAU/ml), while another tumor marker (alpha-fetoprotein) remained within normal range (<10 ng/ml) as alanine aminotransferases. In October 2006, a tumor (4.3 by 4.1 cm) was detected in the liver by ultrasonography, and he received treatment with transarterial embolization. Des-γ-carboxy prothrombin was elevated to 419 mAU/ml, while the aminotransferase levels remained within normal limits. Hepatitis B e antigen (HBeAg) was negative, and the corresponding antibody (anti-HBe) was detected in his serum. The subtype of HBsAg in this serum was *ayw*.

HBV DNA was extracted from his serum specimen obtained in 2006, and the full-length genome sequence was determined for phylogenetic and biological analyses. An informed consent had been obtained from the patient, and the study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the institution's human research committee.

Markers of HBV infection. HBeAg and anti-HBe were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with commercial kits (HBeAg EIA; Institute of Immunology, Tokyo, Japan), and subtypes of HBsAg by ELISA with commercial kits (HBsAg Subtype EIA; Institute of Immunology). Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) was determined by chemiluminescence enzyme immunoassay (13). The method allows more sensitive detection of core protein and, as was shown in previous studies, HBcrAg levels reflect HBV DNA loads and well correlate with intrahepatic covalently closed circular DNA (cccDNA) levels. The measurement of serum HBcrAg is a useful noninvasive tool for monitoring intrahepatic HBV viral status (52). HBV DNA was quantified by the S gene-targeted real-time detection PCR with a sensitivity of 100 copies/ml (equivalent to 20 IU/ml) (1). However, due to small volumes of sera available from the challenged mice, HBV DNA was extracted from 10-fold-diluted specimens, resulting in reduced assay sensitivity in the present study (1,000 copies/ml [200 IU/ml]).

Determination of the complete nucleotide sequence of HBV/J isolate. HBV DNA was extracted by using the QIAamp DNA blood kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) from 100 μl of serum that had been stored at –80°C. The complete genome sequence of an HBV/J isolate recovered from the patient was determined by the strategy previously reported (43). In brief, two sets of primers were designed to amplify overlapping fragments (A and B) covering the entire

HBV genome (stat not shown). Nested PCR was carried out for 35 cycles (95°C, 30 s; 57°C, 30 s; and 72°C, 2 min) using TaKaRa LA Taq polymerase (Takara Biochemicals, Kyoto, Japan). Amplified fragments were inserted into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI), and cloned in DH5a cells (Toyobo, Osaka, Japan). Obtained HBV DNA clones were confirmed to have the sequence identical to the major-clone consensus sequence determined directly on PCR products by Prism BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the ABI 3100 automated sequencer.

Phylogenetic analysis. Full-length sequences of HBV isolates were aligned with use of the CLUSTAL W software program (48) (available at www.ebi.ac.uk), and the alignment was confirmed by visual inspection. Genetic distances were estimated by the six-parameter method, and phylogenetic trees were constructed with the neighbor-joining method (35). To confirm the reliability of phylogenetic trees, bootstrap resampling and reconstruction were carried out 1,000 times using the program

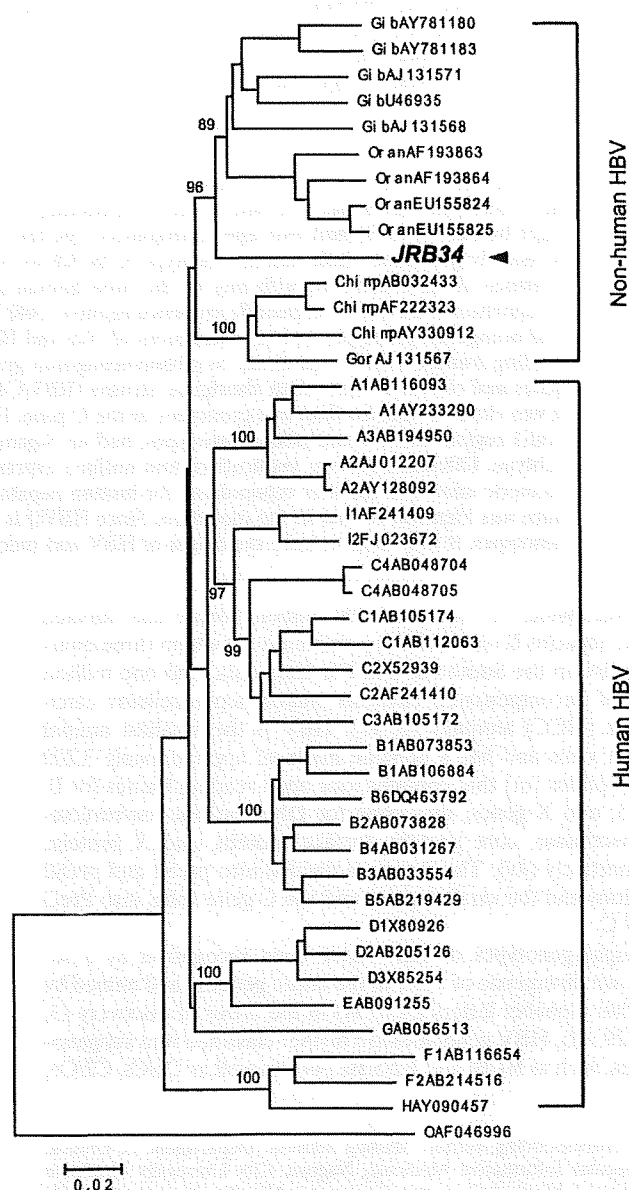


FIG. 1. Phylogenetic tree constructed on the entire genome sequences of 44 HBV isolates representing four ape and eight human genotypes. A woolly monkey HBV isolate serves as an outgroup. The HBV/J isolate (JRB34) is indicated by an arrowhead, and the genetic distance is indicated by a bar below.