

HCV 変異速度に関する検討 ーベトナム、カンボジアにおける血清疫学調査からー

研究代表者: 田中純子
研究協力者: 山本周子、永島慎太郎、KOKO、Channarena Chuon、
大久真幸、秋田智之、片山恵子
広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 疫学・疾病制御学

研究要旨

WHO (2013) によると、世界の肝癌症例の78%に、C型肝炎ウイルス (HCV) とB型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染が認められている。我々はこれまで、カンボジア王国とベトナム社会主義共和国のある地域において血清疫学調査を行い、HCV あるいは HBV 感染状況を把握し、肝炎対策の重要性を指摘してきた。カンボジア王国とベトナム社会主義共和国は、肝癌年齢調整死亡率が高い国の一つ (21.5/10万人、23.7/10万人) (Globocan 2012) とされており、肝炎ウイルスの高度侵淫地区でもある。

今回、HCV genome sequence 解析による遺伝的特性を明らかにすること、及び同一人物の保存血清を元に HCV RNA 遺伝子変異率から HCV 変異速度を推定することを目的に解析を行った。

広島大学疫学倫理審査委員会の承認 (広島大学 第疫 507-2 号、第疫 223-2 号)、カンボジア保健省の承認 (No.0085NECHR) およびベトナム保健省による承認を得ている。なお、対象者からは研究に関しての同意を得た。

1. カンボジア王国における調査対象者 868 名のうち、HCV 抗体陽性率 3.9% (34/868 [95%CI:2.6-5.2%])、HCV RNA 陽性率 1.3% (11/868[95%CI:0.55-2.1%]) であった。ベトナム社会主義共和国における調査対象者 509 名のうち、HCV 抗体陽性率は 3.3%(17/509 [95%CI:1.8-4.9%])、HCV RNA 陽性率 1.8% (9/509 [95%CI: 0.6-2.9%]) であった。
2. 見いだされた HCV キャリアの predominant genotype は genotype 6 であった。
3. 計 20 名 (カンボジア王国: 11 名、ベトナム社会主義共和国: 9 名) の HCV RNA 陽性者の genotype 解析をしたところ、カンボジア王国の genotype1b はベトナム社会主義共和国の genotype1b と近縁であった。
4. カンボジア王国における HCV RNA 陽性者 11 例中、4 例の near full genome sequence 解析を行い、ベトナム社会主義共和国における HCV RNA 陽性者 9 例中、2 例の near full genome sequence 解析を行った。
5. Near full genome sequence 解析が今回可能であった上記 6 例について同 genotype の近縁既知株を検討した結果、カンボジア王国の genotype 6e はベトナム株と近縁であり、カンボジア王国の genotype 6r とベトナム社会主義共和国の genotype 6a はカナダ在住のアジア系移民と近縁であった。また、カンボジア王国の genotype1b は日本株と近縁であり、ベトナム社会主義共和国の genotype 1b はアメリカ株と近縁であった。
6. カンボジア王国の near full genome sequence 解析を施行した 4 例に関して genotype 1b と genotype 6 の変異速度を比較したところ、genotype 6 の方が速かった。
7. カンボジア王国において治療介入のない HCV キャリア間の変異速度比較や genotype 1b と genotype 6 (6e、6r) 間の変異速度比較は本研究が初めての報告となった。
8. HCV genotype 1b よりも genotype 6 の方が塩基変異速度が速く、異議置換数も多かった。

A. 研究目的

世界の肝癌症例の78%に、C型肝炎ウイルス(HCV)とB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染が認められている(WHO 2013)。

特に肝癌年齢調整死亡率が高い国としてカンボジア王国(21.5/10万人)とベトナム社会主義共和国(23.7/10万人)が挙げられ(Globocan 2012)、両国は肝炎ウイルスの高度侵淫地区でもある。

本研究では遺伝的特性を明らかにすること、及び同一人物の保存血清を元にHCV RNA 遺伝子変異率か

らHCV 変異速度を推定することを目的にHCV genome sequence 解析を行った。

B. 対象と方法

1. 対象

2010年から2014年の期間にカンボジア王国シェムリアップ州における一般住民868名、2012年ベトナム社会主義共和国南部ビントン州の成人住民509名を解析対象とした(図1)。



図1. 研究対象地域

2. 研究方法

肝炎ウイルス疫学調査を実施し、HCV RNA 陽性が判明したキャリアの保存血清を用いて、near full genome sequence 解析を行った。

さらに、2012年のカンボジア王国で施行した調査の結果、HCV RNA 陽性であった11名に対して2016年に再調査を試みた。

3. 測定方法

- 1) HCV 抗体：ルミパルス RII オーソ RHCV
- 2) HCV RNA：real-time PCR

- 3) 変異速度：1年間あたりの変異塩基数を用いてHCV 変異速度(base/site/year)と定義した(Marian E Major et al. 1999)。

(倫理面への配慮)

この研究は広島大学疫学倫理審査委員会の承認(広島大学 第疫 507-2号、第疫 223-2号)、カンボジア保健省の承認(No.0085NECHR)およびベトナム保健省による承認を得ている。

C. 研究結果

1. カンボジア王国シムリアップ州の 868 名における性・年齢階級別にみた HCV 抗体、HCV RNA 陽性率と HCV RNA 陽性者 11 名の genotype 内訳

a) 対象者 868 名中、HCV 抗体陽性率は 3.9%(34/868[95%CI:2.6-5.2%])、HCV RNA 陽性率 1.3% (11/868[95%CI:0.55- 2.1%]) であった。

b) HCV RNA 陽性者 11 名における genotype 内訳は genotype 6 が 6 割、genotype4 が 4 割を占めていた (図 2)。

2. ベトナム社会主義共和国ビントン州の 509 名における性・年齢階級別にみた HCV 抗体、HCV RNA 陽性率と HCV RNA 陽性者 9 名の genotype 内訳

a) 対象者 509 名中、HCV 抗体陽性率は 3.3% (17/509[95%CI:1.8-4.9%])、HCV RNA 陽性率

は 1.8% (9/509[95%CI:0.6- 2.9%]) であった。

b) HCV RNA 陽性者 9 名における genotype 内訳は genotype 6 が 7 割、genotype 1b が 1 割であった (図 3)。

3. HCV RNA 陽性者 11 名 (カンボジア王国)、9 名 (ベトナム社会主義共和国) に関して HCV コア領域を基に決定した HCV genotype

a) 計 21 名の HCV RNA 陽性者に関してコア領域の系統樹解析により genotype を決定したところ、カンボジア王国の genotype 1b はベトナム社会主義共和国の genotype 1b と近縁であるということが分かった。

b) 今回は矢印で示した 6 例について near full genome シークエンス解析を行った (図 4)。

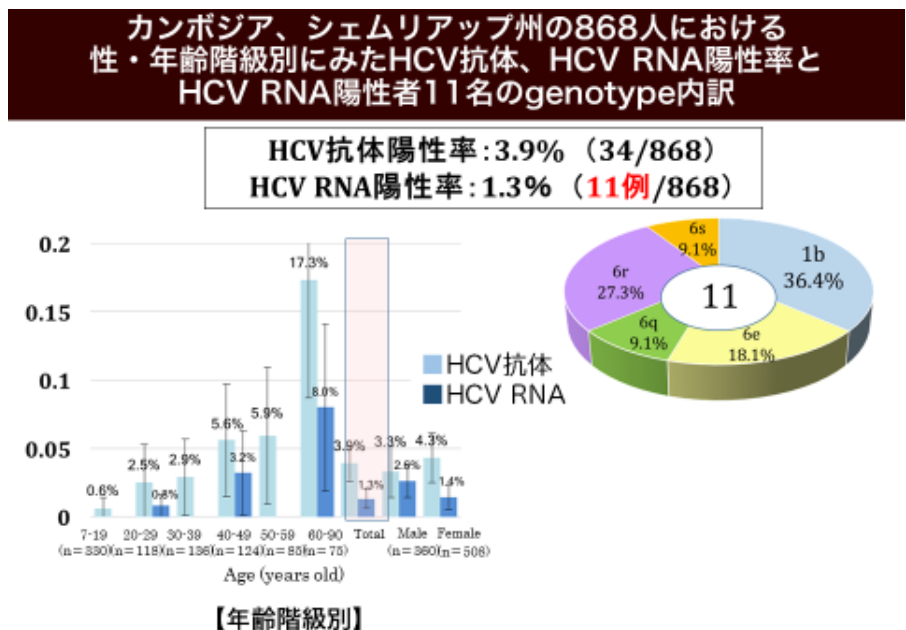


図 2.カンボジア王国における HCV 抗体、HCV RNA 陽性率と genotype 内訳

ベトナム、ピントン州の509人における
性・年齢階級別にみたHCV抗体、HCV RNA陽性率と
HCV RNA陽性者9名のgenotype内訳

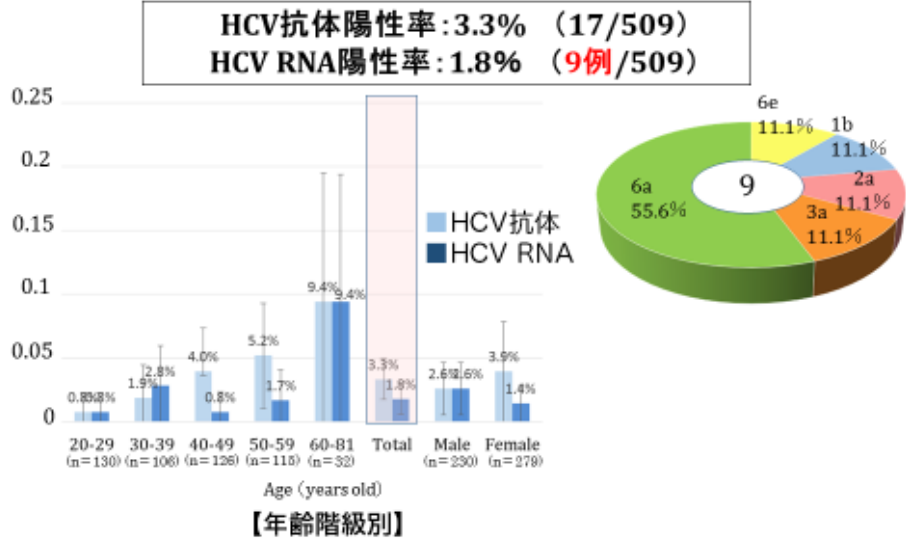


図3. ベトナム社会主義共和国における HCV 抗体、
HCV RNA 陽性率と genotype 内訳

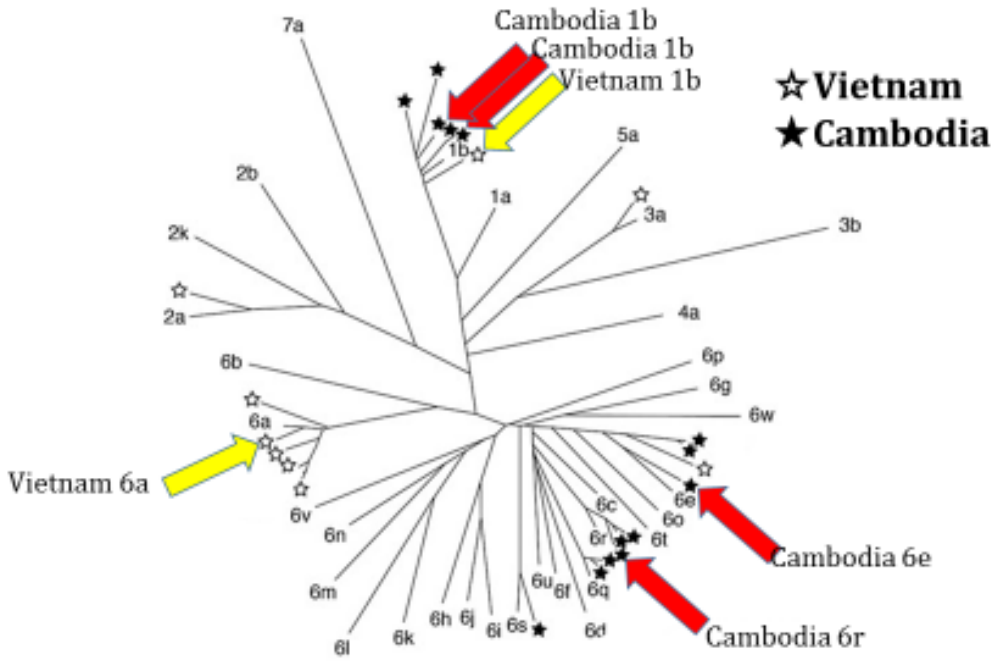


図4. コア領域の系統樹解析

4. カンボジア王国の HCV RNA 陽性者 4 名とベトナム社会主義共和国の HCV RNA 陽性者 2 名の near full genome sequence 解析

a) カンボジア王国の genotype 6r とベトナム社会主義共和国の genotype 6a はカナダ在住の東南アジア系移民株と近縁であり、カンボジア王国の genotype 6e はベトナム株と近縁であった。

b) また、カンボジア王国の genotype 1b は日本株と近縁であり、ベトナム社会主義共和国の genotype 1b はアメリカ株と近縁であることが明らかになった (図 5)。

5. ウイルス変異速度に関して

a) Full genome sequence の HCV 変異速

度に関する文献は 13 件、partial genome sequence の変異速度に関する文献は 12 件存在した。

b) Full genome sequence 変異速度の算出法には 2 種類あり、特定期間内に変異を呈した塩基数を検討し、全塩基数で除して年間 1000 塩基あたりの変異速度を算出する方法と専用のソフトを用いて自動的に変異速度を算出する分子時計という方法がある。

c) Partial genome sequence の変異速度算出法としては特定期間内に変異を呈した塩基数を検討し、該当遺伝子領域の塩基数で除して年間 1000 塩基あたりの変異速度を算出する方法と分子時計を用いて変異速度を算出する方法がある (図 6)。

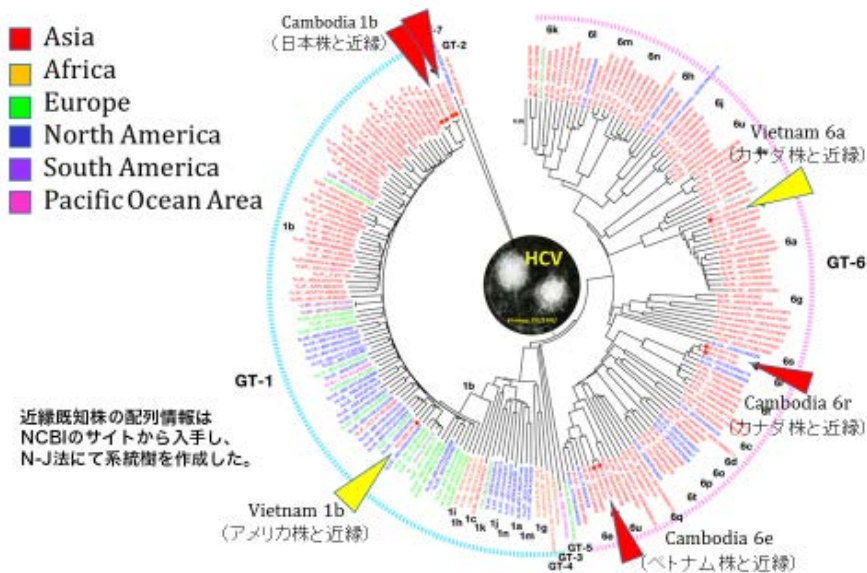


図 5. Near full genome sequence 解析を基に作成した系統樹

	the mutation rate of full genome sequence	the mutation rate of partial genome sequence
文献数	13件 (1992~2017 pubmed)	12件 (1992~2017 pubmed)
変異速度算出法	方法1: 特定期間内に変異を呈した塩基数を検討し、全塩基数で除して年間1000塩基あたりの変異速度を算出。	方法1: 特定期間内に変異を呈した塩基数を検討し、該当遺伝子領域 (Core領域、NS5B領域など) の塩基数で除して年間1000塩基あたりの変異速度を算出。
	方法2: 分子時計(2002~) 遺伝子複製時に一定の確率で複製ミスが生じ、その結果遺伝子変異が起こると仮定。遺伝子変異は時間の経過と共に蓄積し、同義置換に着目し、多重置換数を予測、補正して変異速度を算出する	
変異速度	方法1: 3a: 1.3×10^{-3} (Choudhary et al. 2014) 方法2: 1a: 1.32×10^{-3} (Tanaka Y et al. 2002) 1b: 0.6×10^{-3} (Yuan et al. 2014) 6e: 1.16×10^{-3} (Yuan et al. 2014)	方法1: NS5 and E: 0.71×10^{-3} (P.Simmonds 2001) 方法2: NS5B: 2.17×10^{-3} (Mizokami M et al. 2004) 1b: NS5B: 1.2×10^{-3} (Magjorkinis et al. 2009) Core: 1.0×10^{-3} (Magjorkinis et al. 2009) 6: NS5B: 0.33×10^{-3} (Oliver Pybus et al. 2009) Core: 0.18×10^{-3} (Oliver Pybus et al. 2009)

図6. HCV 変異速度算出法に関する報告

6. 4年間のHCV変異速度の推定(2012~2016年) 4例の検討
- (1b (3009) and 6e (2804) : (p=0.027*),
1b (3072) and 6e (2804) (p=0.025*),
1b (3072) and 6r (2911) (p=0.005*))
- a) 今回我々は near full genome sequence 解析を行った6例のうち、4年後の2時点で採血が可能であったカンボジア王国一般住民の4例について同一人物の4年間に呈した変異塩基数を検討し、全塩基数で除して年間1000塩基あたりの変異速度を算出した。
- b) 4例の変異速度は
- 1b(No.3009):
1.96×10⁻³base substitutions/site/year
 - 1b(No.3072):
1.61×10⁻³basesubstitutions/site/year
 - 6e (No.2804):
2.52×10⁻³base/substitutions/site/year
 - 6r(No.2911):
2.66×10⁻³base substitutions/site/year
- であった。
- c) この4例の変異速度に関して有意差検定を施行したところ、genotype1bよりもgenotype6の方が変異速度は速いことが分かった。
- d) 一方、genotype 1b (3009)と genotype 6r (2911)、genotype 6e (2804)と genotype 6r (2911)間では変異速度に関して有意差はみられなかった。
- e) また、genotype 1bよりも genotype 6の方が異議置換が多いということが分かった。更に、4例の共通点として超可変領域 (Hyper Variable Region: HVR) において異議置換を生じていた (図7)。

感染伝播由来の可能性があり、
genotype 1b は他国からの感染伝播由来の可能性がある。

E. 結論

- 1) カンボジア王国の一般住民（7歳～90歳）868名、ベトナム社会主義共和国の成人住民（20歳～81歳）509名を対象に血清疫学調査を行い、HCVの感染状況を明らかにした。
- 2) カンボジア王国のHCV RNA陽性者11例中4例、ベトナム社会主義共和国のHCV RNA陽性者中2例のnear full genome sequence解析を行い、カンボジア王国のgenotype 1b、6e、6r、ベトナム社会主義共和国の1b、6aと近縁関係にある既知株を明らかにした。
- 3) HCV genotype 1b (No.3009、No.3072)よりもgenotype 6e (No.2804)の方が塩基変異速度が速かった。また、HCV genotype 1b (No.3009)よりもgenotype 6r (No.2911)の方が塩基変異速度が速かった。
- 4) genotype 1bよりもgenotype 6の方が異議置換が多いということが分かった。更に、4例の共通点として超可変領域（Hyper Variable Region: HVR）において異議置換を生じていた。
- 5) カンボジア王国において治療介入がないHCVキャリアにおける2時点のHCV遺伝子配列を比較した報告はなく、本研究が初めての報告となった。

【参考文献】

- 1) Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 223-235
- 2) Oliver G. Pybus et al. Genetic History of Hepatitis C Virus in East Asia. Journal of Virology 2009; 1071-1082

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし