

長崎県約 920 例 HBV 持続感染者の genotype 分布の検討 (2018 年度中間報告)

研究代表者: 田中純子¹⁾
研究分担者: 永島慎太郎¹⁾、山本周子¹⁾、KOKO¹⁾、大久真幸¹⁾、秋田智之¹⁾、
高橋和明¹⁾、山崎一美²⁾

- 1) 広島大学大学院医系科学研究科 疫学・疾病制御学
- 2) 国立病院機構 長崎医療センター

研究要旨

長崎県五島列島の上五島地域では、医療機関・地域健診・職域健診を受診し、HBs 抗原陽性と判定された HBV 持続感染者(キャリア)に対して上五島病院附属奈良尾医療センターにて経過観察および治療介入を行っている。本研究では同地域の HBV キャリアの初診時に得られた血清に対して HBV DNA sequence 及び genotype を解析し、肝病態に関わる領域の mutation の有無を Genotype 別に検討して肝病態の推移との関連を明らかにすることを目的とした。

この研究は広島大学疫学倫理審査委員会の承認を得て行った（広島大学 第 E-1244 号）。

1. 1980 年から 2017 年の期間に長崎県五島列島の上五島地域の医療機関・地域健診・職域健診を受診し、HBs 抗原陽性と判明した成人約 920 名のうち、今回は 478 名（男 268 名、女 210 名、平均年齢不明）の保存血清を対象とした。
2. HBs 抗原陽性の成人 478 例中、Real time PCR 陽性は 321 例(67.2%)であった。Real time PCR によるウイルス量は、101~102 copy/ml が 117 例と最も多く、中央値 2.2×10¹copy/ml(範囲：0~3.9×10⁸copy/ml)であった。
3. HBs 抗原陽性であった 478 例中、今回 274 例の SP 領域における sequence 解析が可能であり、41 例は S 領域における sequence 解析が可能であった。
 - 1) SP 領域における sequence 解析が可能であった 274 例において、94.9%（260/274 例）が genotype C、4.0%（11/274 例）が genotype B、1.1%（4/274 例）が genotype A に属した。
 - 2) S 領域における sequence 解析が可能であった 41 例において、97.6%（40/41 例）が genotype C、2.4%（1/41 例）が genotype B に属した。
4. 最終的に 478 例のうち sequence 解析が可能であった 315 例（SP 領域：274 例、S 領域：41 例）において、95.2%（300/315 例）が genotype C、3.8%（12/315 例）が genotype B、1.0%（3/315 例）が genotype A に属した。

A. 研究目的

長崎県五島列島の上五島地域では、医療機関・地域健診・職域健診を受診し、HBs 抗原検査で陽性と判定された HBV 持続感染者(キャリア)に対して上五島病院附属奈良尾医療センターにて経過観察および治療介入を行っている。

HBV DNA において core promoter 領域に mutation があるキャリアは mutation のないキャリアと比較し HCC のリスクが高く、予後不良であるため、NA 治療等の早期介入が必要であるとする報告¹⁾がある。

本研究では、同地域の HBV キャリアの初診時に得

られた血清に対して HBV DNA の配列と genotype を解析し、Genotype 別、肝病態に関わる領域の mutation の有無別の肝病態の推移との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 対象と方法

1. 対象

長崎県五島列 島の上五島地域において 1980 年から 2017 年の期間に医療機関・地域健診・職域健診を受診し、HBs 抗原陽性と判明した 成人約 920 名のうち、今回は 478 名（男 268 名、女 210 名、平均年齢不明）の保存血清を対象とした。

2. 研究方法

対象とする保存血清を用いて HBV DNA 量の測定を行った。また、HBV DNA が検出された検体に関して系統樹解析を行い、HBV genotype を決定した。

3. 測定方法

- 1) HBV DNA : Real-time PCR、Nested PCR
- 2) Genotype 決定までの手順 (図 1)

a) Real time PCR を行い、HBV DNA 量の測定を行った。

b) 全検体で Nested PCR を行った。コンタミネーションを避ける為、HBV DNA 量が検出感度 (1copy/ml) 以下- 10^3 copies/ml の検体と 10^4 - 10^9 copies/ml の検体に分けて(nt475-nt933: S region・P region の一部：本研究において<SP 領域>とする)の Nested PCR を行った。

c) HBV DNA 量が検出感度以上かつ<SP 領域> Nested PCR が陰性の検体に対して<SP 領域>よりも高感度の<S 領域> (nt455-nt687: S region) を用いて Nested PCR を行った。

d) Direct sequence を行い、得られた塩基配列から MEGA version7 にて UPGMA 法により系統樹解析を行った。

(倫理面への配慮)

この研究は広島大学疫学研究倫理委員会による承認を得た (第 E-1244 号)。

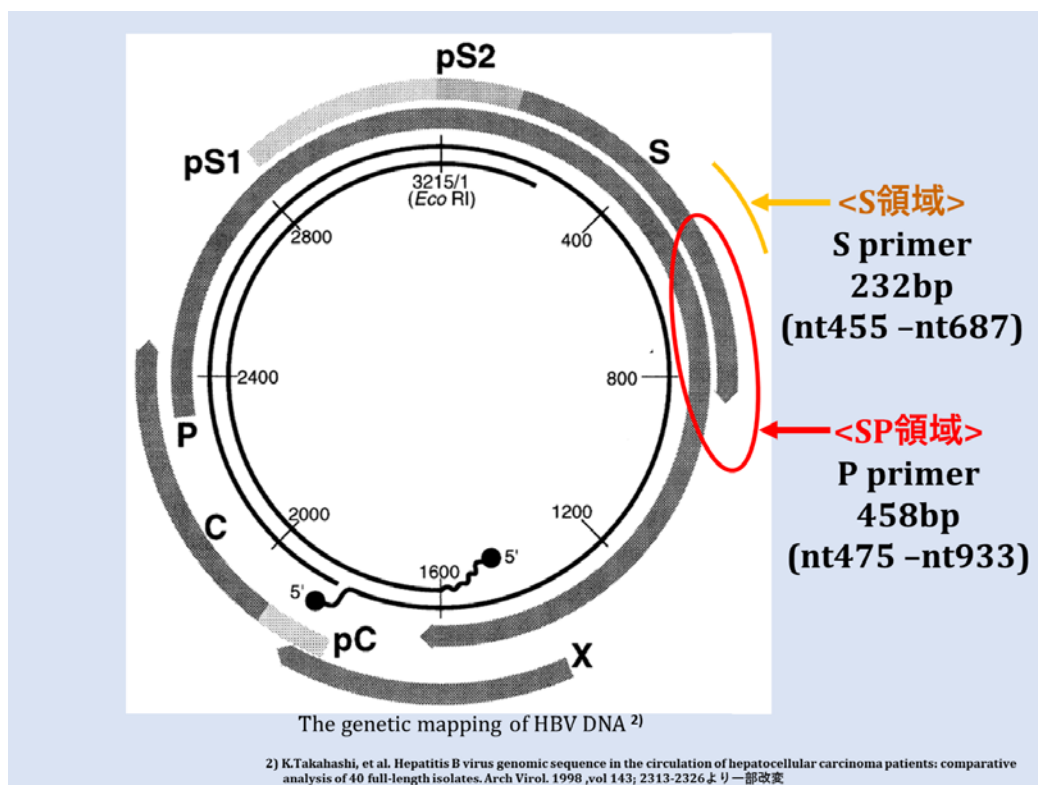


図 1. HBV DNA nested PCR 増幅領域

C. 研究結果

1. HBV キャリア 478 名における HBV DNA 量の分布

Real time PCR を施行した結果、対象とした HBs 抗原陽性の成人 478 例中、Real time PCR 陽性は 321 例(67.2%)であった。Real time PCR によるウイルス量は、 $10^1 \sim 10^2$ copy/ml が 117 例と最も多く、中央値 2.2×10^1 copy/ml (範囲：0～ 3.9×10^9 copy/ml)であった (図2)。

2. HBV キャリア 478 名における HBV DNA 量別にみた Nested PCR 結果の内訳

HBV DNA 量別の nested PCR 対象検体とその結果を示す。リアルタイム PCR で検出感度以下の検体 157 例のうち、45 例が SP 領域の nested PCR で陽性であった。SP 領域の nested PCR では 292 例が陽性となり、そのうち 274 例がシークエンス解析可能であった。SP 領域陰性のものは全例 DNA 量が 10 の 4 乗以下と低く、これに対して感度の高い S 領域の nested PCR を行い、41 例の genotype を決めることが可能であった。(表1)。

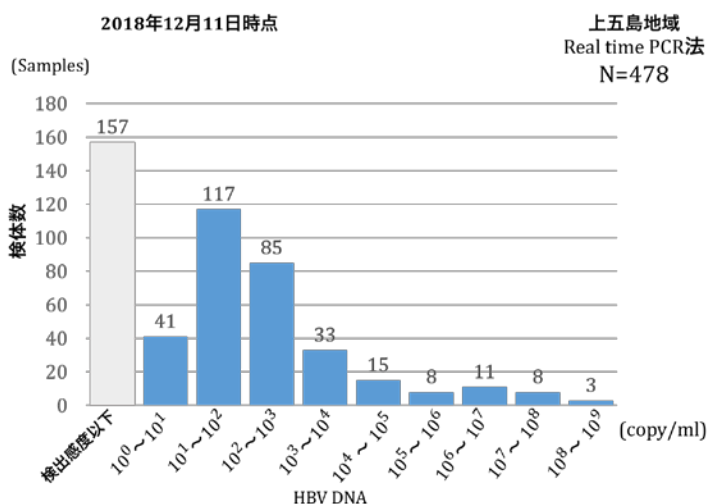


図2. HBV キャリア 478 名における HBV DNA 量の分布

表1. HBV キャリア 478 名における HBV DNA 量別にみた Nested PCR 結果内訳

2018年12月11日時点		上五島地域HBVキャリア N=478					
Real time PCR HBV DNA (copy/ml)	N	<SP領域> Nested PCR 陽性 (%)	<SP領域> Nested PCR 陽性のうち Sequence 解析可	<SP領域> Nested PCR 陰性 (%)	<SP領域> Nested PCR 陰性のうち <S領域> Nested PCR 陽性	<S領域> Nested PCR 陽性のうち Sequence 解析可	
検出感度以下	157	45(28.7%)	35	112(71.3%)			
$10^0 \sim 10^1$	41	23(56.1%)	21	18(43.9%)	9	6	
$10^1 \sim 10^2$	117	79(67.5%)	77	38(32.5%)	25	21	
$10^2 \sim 10^3$	85	70(82.4%)	67	15(17.6%)	14	14	
$10^3 \sim 10^4$	33	30(90.9%)	30	3(9.1%)	1	0	
$10^4 \sim 10^5$	15	15(100%)	14	0			
$10^5 \sim 10^6$	8	8(100%)	8	0			
$10^6 \sim 10^7$	11	11(100%)	11	0			
$10^7 \sim 10^8$	8	8(100%)	8	0			
$10^8 \sim 10^9$	3	3(100%)	3	0			
合計	478	292(61.1%)	274	186(38.9%)	49	41	

3. SP 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 274 名の HBV genotype 内訳

SP 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリアのうち、94.9% (260/274 例) が genotype C に属し、4.0 % (11/274 例) が genotype B、1.1% (3/274 例) が genotype A に属した(図3)。

4. S 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 41 名の HBV genotype の系統樹

S 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリアのうち、97.6% (40/41 例) が genotype C に属し、2.4% (1/41 例) が genotype B に属した(図4)。

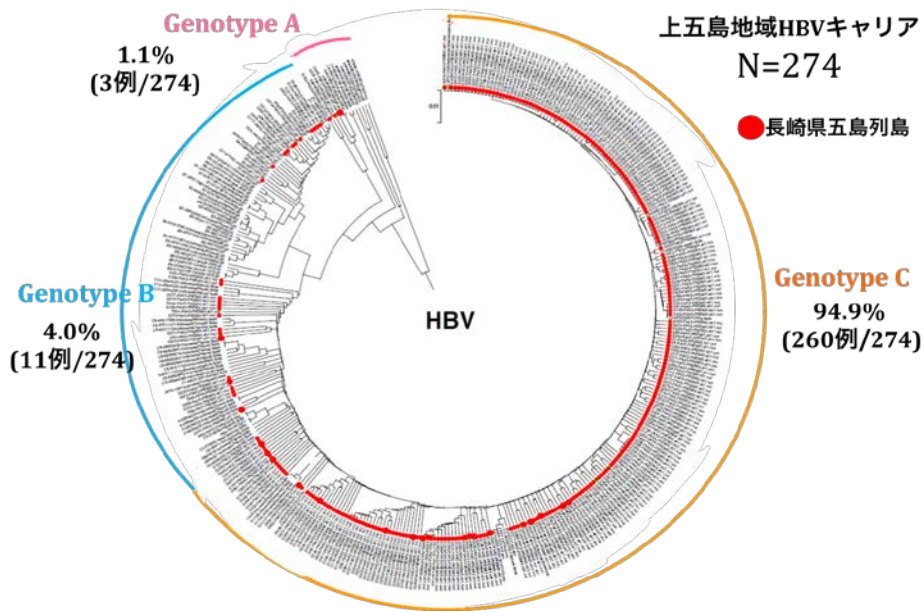


図3. SP 領域の sequence 解析が可能であった 274 例における HBV genotype の系統樹

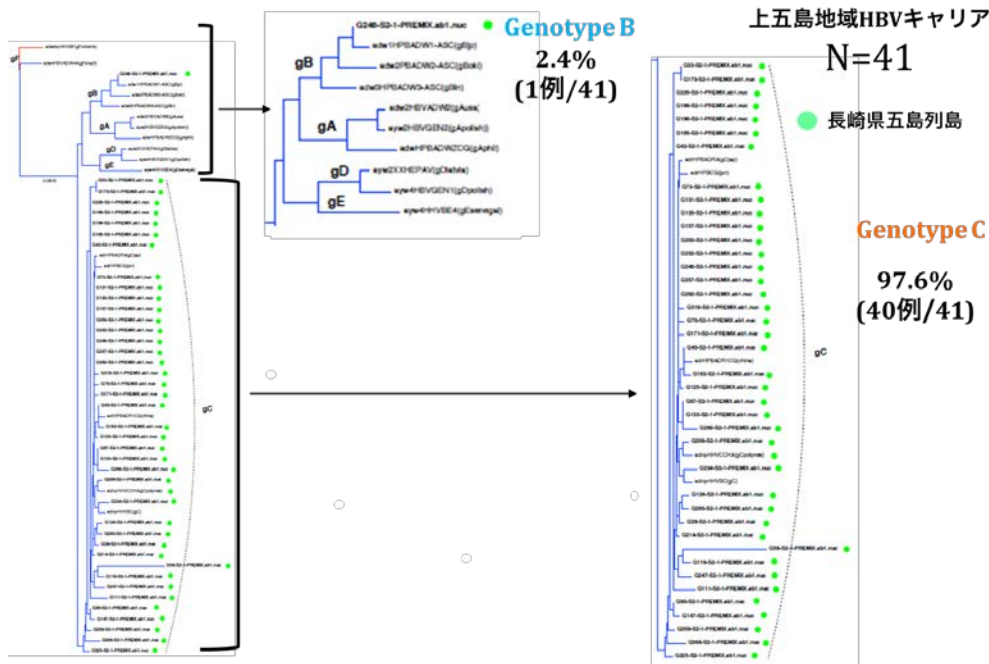


図4. S 領域の Sequence 解析が可能であった 41 例における HBV genotype の系統樹

5. Sequence 解析が可能であった計 315 例の HBV genotype 内訳

478 例中 sequence 解析が可能であった 315 例 (SP 領域 : 274 例、S 領域 : 41 例) において、95.2% (300/315 例) が genotype C、3.8% (12/315 例) が genotype B、1.0% (3/315 例) が genotype A に属した (図 5)。

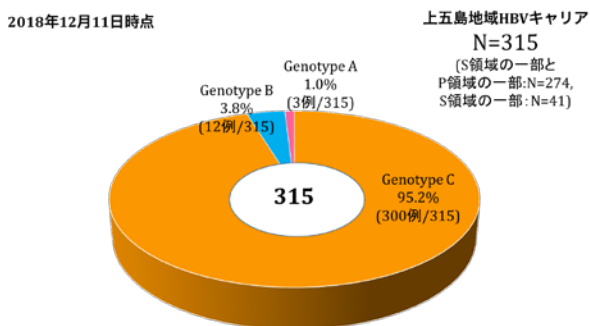


図 5. Sequence 解析が可能であった計 315 例の HBV genotype 内訳

D. 考察および結論

1. 長崎県五島列島の上五島地域において 1980 年から 2017 年の期間に医療機関・地域健診・職域健診を受診した約 920 名のうち、現時点では 478 名の Real time PCR、Nested PCR を行った。
2. Real time PCR を施行した結果、対象とした HBs 抗原陽性 478 例中、Real time PCR 陽性は 321 例 (67.2%) であり、ウイルス量は $10^1 \sim 10^2$ copy/ml が 117 例と最も多かった。
3. SP 領域の nested PCR では 292 例が陽性となり、そのうち 274 例がシーケンス解析可能であった。SP 領域陰性のもは全例 DNA 量が 10 の 4 乗以下と低く、これに対して感度の高い S 領域の nested PCR を行い、41 例の genotype を決めることが可能であった。

(1) SP 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 274 例のうち、94.9% が genotype C に属し、4.0% が genotype B、1.1% が genotype A に属した。

(2) S 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 41 例のうち、97.6% が genotype C に属し、2.4% が genotype B に属した。

4. 最終的に 478 例のうち、sequence 解析が可能であった 315 例 (SP 領域 : 274 例、S 領域 : 41 例) において、95.2% が genotype C、3.8% が genotype B、1.0% が genotype A に属した。

5. 更に残り約 440 例の Sequence 解析を行い、HBV DNA Sequence 解析結果と診療録データ (年齢、診断名、抗ウイルス療法の有無、セロコンバージョン日など) を合わせた解析を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Yin, J. *et al.* Hepatitis B Virus Combo Mutations Improve the Prediction and Active Prophylaxis of Hepatocellular Carcinoma: A Clinic-Based Cohort Study. *Cancer Prev Res (Phila)* 8,978-988, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0160 (2015).
- 2) K. Takahashi, *et al.* Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol.* 1998, vol 143; 2313-2326

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

