

長崎県 916 例 HBV 持続感染者の genotype 分布の検討 (2019 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、人口約 2.4 万人の全住民を対象とした HBs 抗原検査を 1977 年に導入し、2017 年までの全受検者に占める HBs 抗原陽性率は 4.3% である。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及び治療介入を行うと共に、受診毎の血清が保管されている。

本研究では、同地域で見出された全 HBV キャリアの血清を対象に HBV DNA の部分配列および HBV genotype を解析し、同地域における分布を明らかにすることと HBV キャリア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。なお、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)。

その結果、以下のことが明らかとなった。

- 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 951 名のうち、916 名(男 526 名、女 390 名)の保存血清を対象とした。
- HBs 抗原陽性の成人 916 例中、Real time PCR 陽性は 725 例(79.1%)であった。Real time PCR によるウイルス量は、 1.0×10^8 copy/ml 以上が 191 例と最も多く、中央値 4.35×10^4 copy/ml(範囲: 検出感度以下 $\sim 1.0 \times 10^8$ copy/ml 以上)であった。
- HBs 抗原陽性であった 916 例中、現時点で 626 例の SP 領域における sequence 解析が可能であり、97 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 626 例において、95.8% (600/626 例) が genotype C、3.7% (23/626 例) が genotype B、0.5% (3/626 例) が genotype A に属した。Genotype A の株はフィリピン株と近縁、Genotype B の株は中国、ベトナム株と近縁であり、Genotype C の株は C1, C2, C3 に分類され、C2 の中国株の近くには集積が認められた。
 - 2) S 領域における sequence 解析が可能であった 97 例において、95.9% (93/97 例) が genotype C、4.1% (4/97 例) が genotype B に属した。
- 最終的に 916 例のうち sequence 解析が可能であった 723 例(SP 領域: 626 例、S 領域: 97 例)において、95.9% (693/723 例) が genotype C、3.7% (27/723 例) が genotype B、0.4% (3/723 例) が genotype A に属した。
- 引き続き、解析未完了の 141 例に関して Sequence 解析を進める予定である。また、診療録データの情報(年齢、診断名、抗ウイルス療法の有無など)と Sequence 情報を比較することにより、肝病態との関連を検討する予定である。

以上により、五島列島の全住民から拾いあげられた HBV 株が現時点で合計 723 例 Genotype 判定され、うち 95.9%が Genotype C であり、C2 に集積が認められた。当地域の Genotype 分布は九州全体と同様、古代から交流の多い東アジアからの影響が大きいと考えられた。引き続き未解析の 141 例に関する遺伝子解析と肝病態との関連の検討を進めていく予定である。

A. 研究目的

長崎県五島列島の上五島地域では、人口約 2.4 万人の全住民を対象とした HBs 抗原検査を 1977 年に導入し、スクリーニング検査は完了した。2017 年までの全受検者に占める HBs 抗原陽性率は 4.3%である(図 1)。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及び治療介入を行うと共に、受診毎の血清が保管されている。

また、先行研究により、HBV Genotype 別で発癌リスクが異なることが報告されている¹⁾。

本研究では、同地域で見出された全 HBV キャリアの血清を対象に HBV DNA の部分配列および HBV genotype を解析し、同地域における分布を明らかにすることと HBV キャリア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。

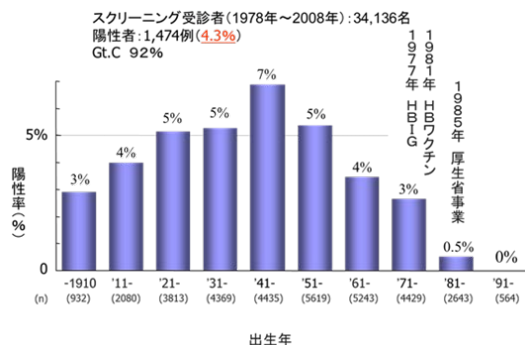


図 1. 上五島地区の HBs 抗原陽性率

B. 対象と方法

1. 対象

長崎県五島列島の上五島地域(図 2)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 951 名(表 1)のうち、血清が得られた 916 名(男 526 名、女 390 名)の保存血清を対象とした。



図 2. 上五島地域

項目	N
性別(男性/女性)	546/405
出生年 (1910-1930/1931-1960/1961-1990)	207/576/168
初診時HBsAg(+/-/Unknown)	245/617/89
初診時HBsAb(+/-/Unknown)	674/270/7
Genotype(A/B/C/D/F/Unknown)	0/13/428/4/1/505
平均観察期間	14.6±9.2年
初診時病態(AC/CH/LC/HCC)	580/233/101/37
最終観察時病態(AC/CH/LC/HCC)	634/125/89/103

AC(Asymptomatic Carrier) : ALT<35 IU/L and HBVDNA <4.0log IU/mL
 CH(Chronic Hepatitis) : ALT≧35 IU/L and HBVDNA ≧4.0log IU/mL
 LC(Liver Cirrhosis) : (AST) to platelet ratio index ≧1.4 or fibrosis-4 index value≧3.6, or platelet count≧130,000, endoscopic varices
 HCC(Hepatocellular Carcinoma) : diagnosed HCC thorough liver bioscopy or laparoscopy

表 1. 長崎県上五島地域 HBV 持続感染者 951 名の対象者情報

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 3)
 - 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

10⁴-10⁹ 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)。

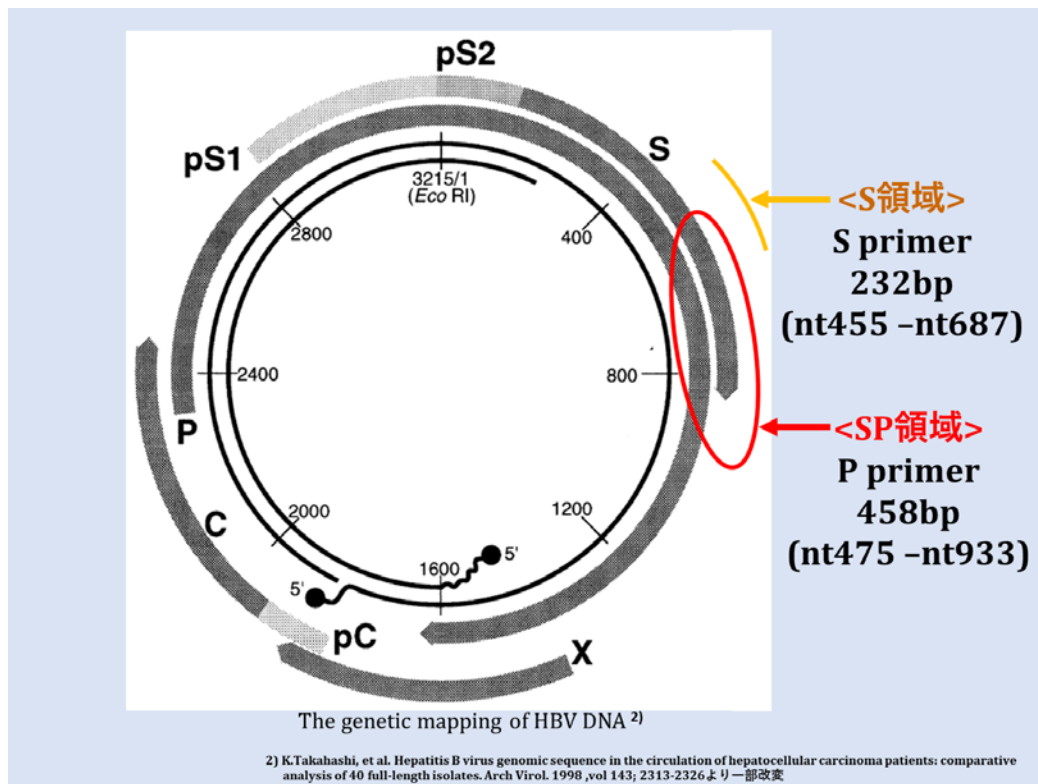


図 3. HBV DNA nested PCR 増幅領域

C. 研究結果

1. HBV キャリア 916 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 916 例中、Real time PCR 陽性は 725 例(79.1%)であった。Real time PCR によるウイルス量は、1.0×10⁸ copy/ml 以上が 191 例と最も多く、中央値 4.35×10⁴ copy/ml(範囲: 検出感度以下~1.0×10⁸ copy/ml 以上)であった (図 4)。

2. HBV キャリア 916 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。SP 領域の nested PCR では 725 例が陽性となり、そのうち 626 例がシーケンス解析可能であった。SP 領域陰性のものに対して感度の高い S 領域の nested PCR を行い、97 例の genotype を決めることが可能であった。(表 2)。

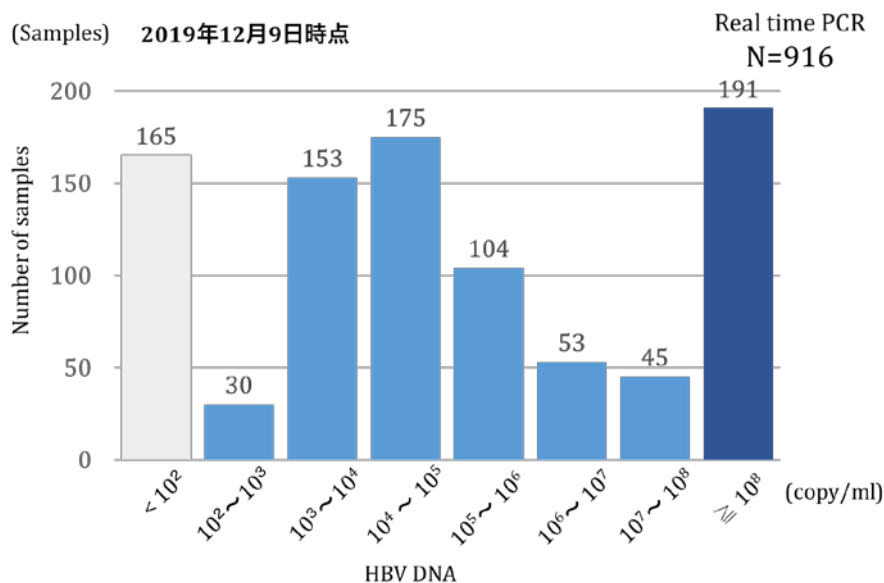


図 4. HBV キャリア 916 名における HBV DNA 量の分布

2019年12月9日時点

上五島地域HBVキャリア N=916

Real time PCR HBV DNA (copy/ml)	N	<SP region> Nested PCR Positive	<SP region> Sequenced	<S region> Nested PCR Positive	<S region> Sequenced	<S region> Nested PCR Negative	Remaining Sample (Not yet finished)
< 10 ²	165	49	39	78	42	30	54
10 ² ~ 10 ³	30	18	16	9	9	5	0
10 ³ ~ 10 ⁴	153	111	105	28	26	14	8
10 ⁴ ~ 10 ⁵	175	160	144	3	17	1	13
10 ⁵ ~ 10 ⁶	104	98	82	2	2	2	18
10 ⁶ ~ 10 ⁷	53	53	41	1	1	0	11
10 ⁷ ~ 10 ⁸	45	45	37	0	0	0	8
≥ 10 ⁸	191	191	162	0	0	0	29
合計	916	725	626 (68.3%)	121	97 (10.5%)	52 (5.7%)	141 (15.5%)

表 2. HBV キャリア 916 名における HBV DNA 量別にみた Nested PCR 結果内訳

3. SP 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 626 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、95.8% (600/626 例) が genotype C に属し、3.7% (23/626 例) が genotype B、0.5% (3/626 例) が genotype A に属した (図5)。

4. S 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 97 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、95.9% (93/97 例) が genotype C に属し、4.1% (4/97 例) が genotype B に属した (図6)。

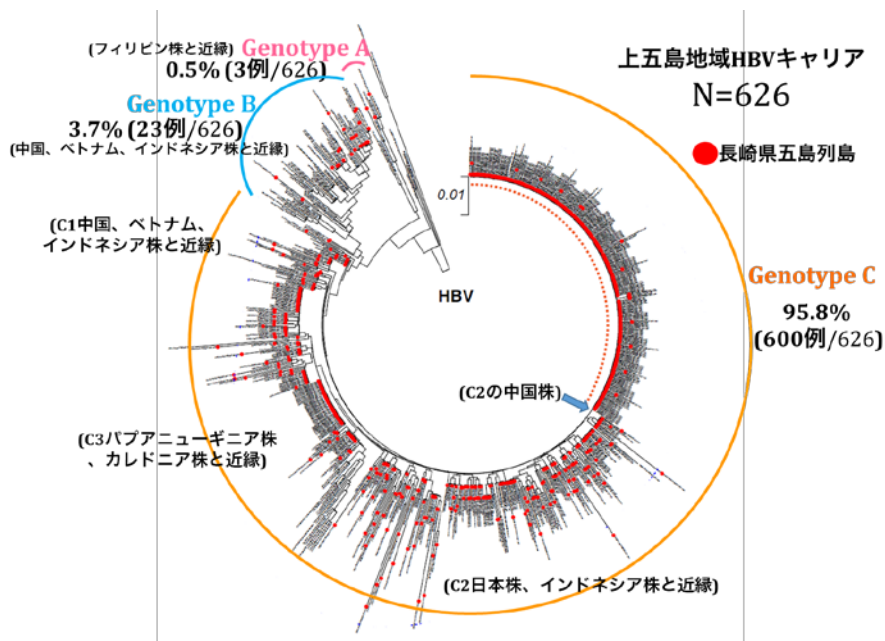


図 5. P 領域の sequence 解析が可能であった 626 例における HBV genotype の系統樹

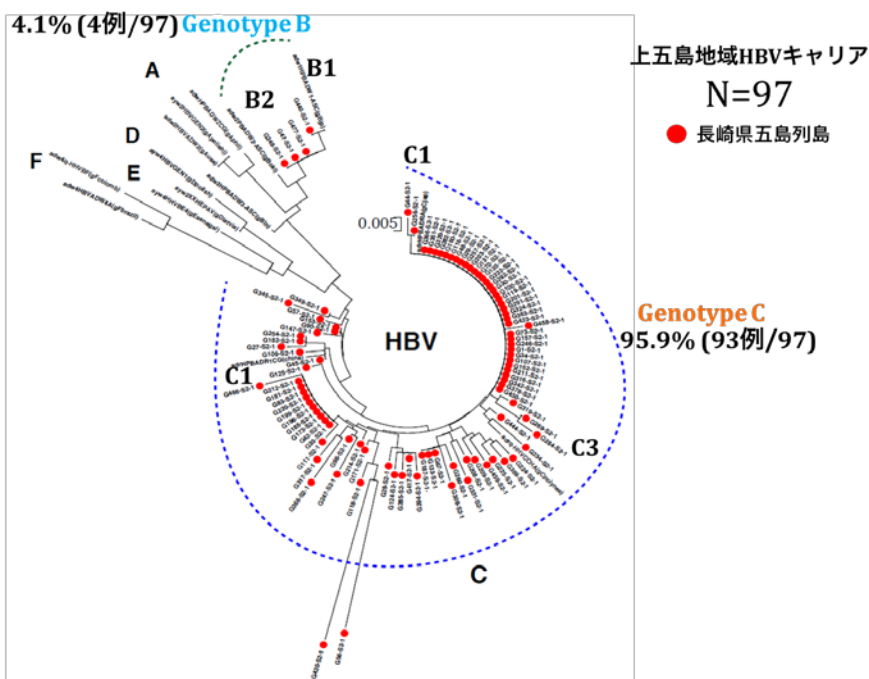


図 6. S 領域の Sequence 解析が可能であった 97 例における HBV genotype の系統樹

5. Sequence 解析が可能であった計 723 例の HBV genotype 内訳

916 例中 sequence 解析が可能であった 723 例 (SP 領域 : 626 例、S 領域 : 97 例) において、95.9% (693/723 例) が genotype C、3.7% (27/723 例) が genotype B、0.4% (3/723 例) が genotype A に属した (図 7)。

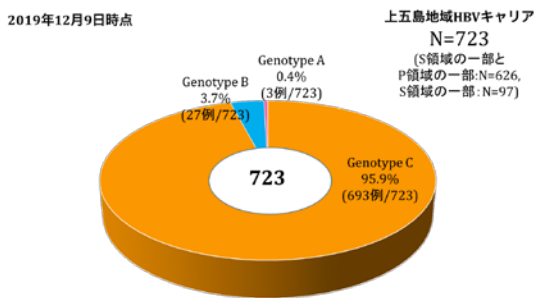
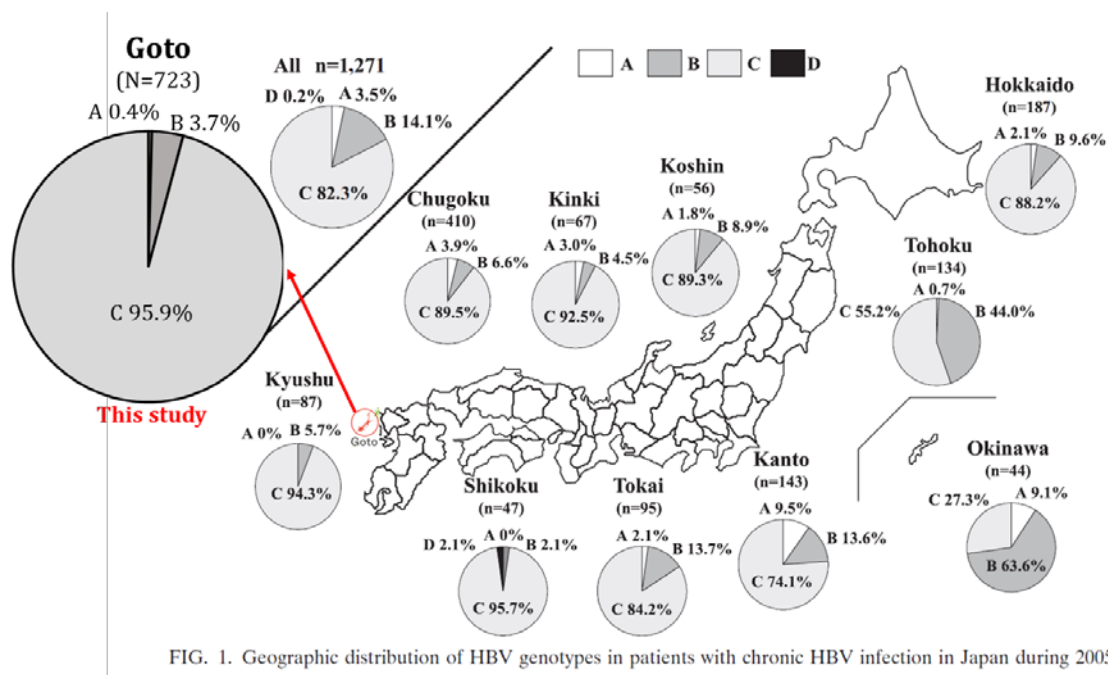


図 7. Sequence 解析が可能であった計 723 例の HBV genotype 内訳

6. 日本全国における HBV genotype 分布

2005 年から 2006 年の日本における HBV の Genotype 分布図³⁾に、本研究の五島列島における HBV Genotype 内訳結果を追加し、本研究の HBV genotype 内訳と比較した。

その結果、五島列島の HBV Genotype 内訳は九州の Genotype 内訳と近いことがわかった (図 8)。



1) K.Matsuura, et al. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. Journal of clinical microbiology. May 2009, 1476-1483より一部改変

図 8. 全国における HBV genotype 分布

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、全住民に対する HBs 抗原検査により見出された HBV 慢性感染者 951 名のうち、血清が得られた 916 名の Real time PCR、Nested PCR、Sequence 解析を行った。全対象 916 例中、Real-time PCR は全例が完了し、Nested PCR では現時点で 775 例が完了した。
2. SP 領域(S 領域の一部と P 領域の一部)を対象とした Nested PCR では genotype 解析できなかった 212 検体について、より高感度で短い領域である S 領域を対象とした Nested PCR を行った結果、97 例の genotype 決定が可能であった。
3. SP 領域の系統樹において、Genotype A の株はフィリピン株と近縁、Genotype B の株は中国、ベトナム株と近縁であり、Genotype C の株は C2 株(中国)と近縁に集積が認められた。
4. SP 領域と S 領域それぞれの Sequence 解析が可能であったのは現時点で合計 723 名(78.9%)である。系統樹解析の結果、95.9% (693 例/723) が genotype C、3.7% (27 例/723) genotype B、0.4% (3 例/723) が genotype A に属した。先行文献との比較では、九州の Genotype 内訳と最も近かった。
今後は HBV full genome sequence 解析を行い、subtype 毎の近縁株を詳細に検討する予定である。
5. 引き続き、解析未完了の 141 例に関して Sequence 解析を進める予定である。また、診療録データの情報(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)と Sequence 情報を比較することにより、肝病態との関連を検討する予定である。

【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
- 3) K.Matsuura, et al.Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. *Journal of clinical microbiology.* May 2009, 1476-1483

以上により、五島列島の全住民から拾いあげられた HBV 株が現時点で合計 723 例 Genotype 判定され、うち 95.9%が Genotype C であり、C2 に集積が認められた。当地域の Genotype 分布は九州全体と同様、古代から交流の多い東アジア(中国)からの影響が大きいと考えられた。引き続き未解析の 141 例に関する遺伝子解析と肝病態との関連の検討を進めていく予定である。

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

