

肝炎ウイルス検査(opportunistic screening)で検出された HBV キャリアの genotype に関する研究

研究代表者: 田中純子¹⁾

研究分担者: 永島慎太郎¹⁾、KOKO¹⁾、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、スクリーニング検査は完了し、出生1991年以降の住民からマイクロエリミネーションが始まっている。また、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。

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951名のうち、916名(男526名、女390名)の保存血清を対象とした。916例の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であった。
2. HBs抗原陽性であった916例中、現時点で700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。SP領域でSequence解析が得られた700例において、674例がGenotype C、23例がGenotype B、3例がGenotype Aに属した。Genotype Cの株はC2の中国株の近くに集積が認められる他サブタイプの多様性が認められた。S領域でSequence解析が得られた97例においては93例がGenotype C、4例がGenotype Bに属した。
3. 最終的に916例のうちSequence解析が可能であった797例(SP領域:700例、S領域:97例)において、96.2%(767/797例)がGenotype C、3.4%(27/797例)がGenotype B、0.4%(3/723例)がGenotype Aに属した。先行文献との比較では九州の内訳とほぼ同等であった。
4. SP領域におけるSequence解析が可能であった700例のうちランダムに選出しFull-Sequence解析を試み、現時点で52例のFull-Sequenceが得られた。Genotype Aの1例はスペイン株と最も近縁であった。Genotype Cの51例はSP領域の系統樹ではC2に集積がある他C1-C14まで多様に分布していたが、Full-Sequenceの系統樹では全例Genotype C2であり、31例(7例、8例、16例:3か所)で集積が認められた。16例の集積は本研究で得られた他の株と系統樹上別の枝に独立して存在することが分かった。島内という狭い地域での同一の感染集団であると推測される。
5. 引き続き、残りの部分配列の解析、Full-Sequence解析を進めるとともに、病態との関連についても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株の96.2%がGenotype Cであることが明らかとなり、さらにFull-Sequence解析によりGenotype Cの株はサブタイプがほぼ全例C2であること、島内という狭い地域で発生した感染集団であることが強く示唆された。

今後はウイルス遺伝子学的特性と臨床診断による病態との関連性について検討を行っていく予定である。

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%であり、出生 1991 年以降の住民からマイクロエリミネーションが始まっている (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。

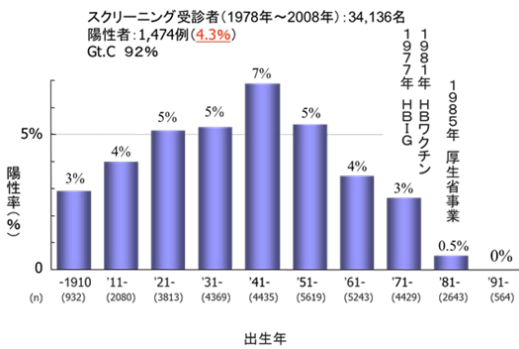


図 1. 上五島地区の HBs 抗原陽性率

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 名のうち、血清が得られた 916 名 (男 526 名、女 390 名 : 表 1) の保存血清を対象とした。



図 2. 長崎県五島列島の上五島地域

項目	N
性別(男性/女性)	526/390
出生年 (1910-1930/1931-1960/1961-1990)	201/557/158
平均観察期間(年)	13.2±8.9
初診時HBeAb(+/-/Unknown)	652/259/5
初診時病態(AC/CH/LC/HCC)	559/222/98/37
最終観察時病態(AC/CH/LC/HCC)	611/119/85/101

AC(Asymptomatic Career) : 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
916 名の属性

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 Sequence 解析と系統樹解析を行い、HBV genotype を決定した。

3. 測定方法

1) HBV DNA 抽出

SMI TEST EX-R&D (Medical&Biological Laboratories CO., LTD, USA)

2) Real-time PCR

試薬 : Taqman Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

機器 : Applied Biosystems StepOne, Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)

3) Nested PCR

試薬 : PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)

機器 : MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)

4) Sequence 解析 : Direct Sequence 法

5) 系統樹解析 : UPGMA 法 (MEGA version 7)

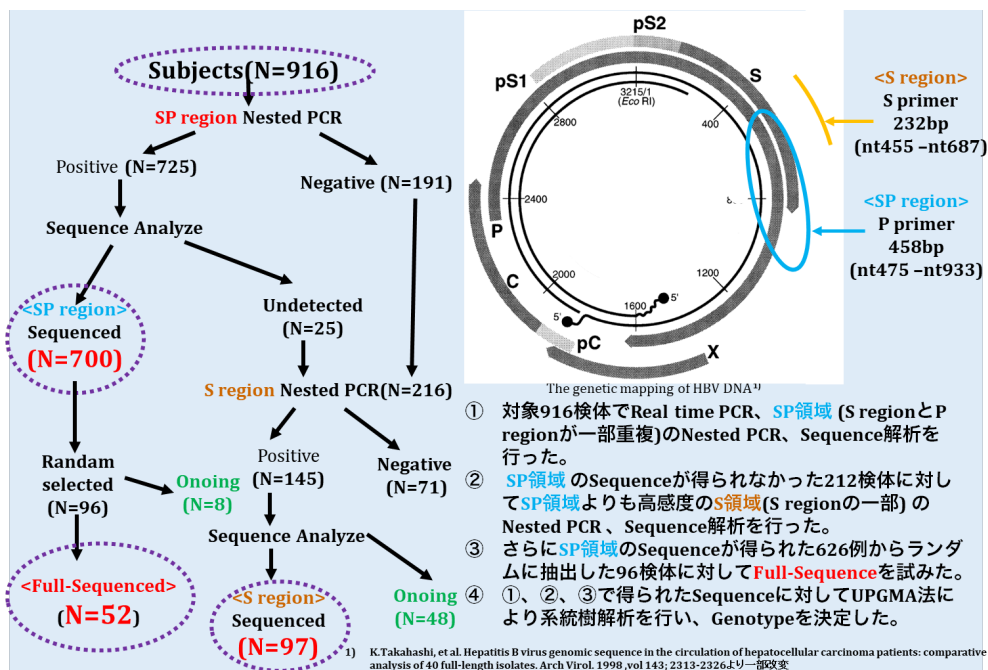
<Nested PCR・Sequence解析・系統樹解析の手順：図>

- ① 対象 916 検体で Real time PCR、SP 領域 (S region と P region が一部重複) の Nested PCR、Sequence 解析を行った。
- ② SP 領域 の Sequence が得られなかった 216 検体に対して SP 領域よりも高感度の S 領域(S region の一部) の Nested PCR、Sequence 解析を行った。

③ さらに SP 領域の Sequence が得られた 700 例からランダムに抽出した 96 検体に対して Full-Sequence を試みた。

- ④ ①、②、③で得られた Sequence に対して系統樹解析を行い、Genotype を決定した。(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)。



- ① 対象916検体でReal time PCR、SP領域 (S regionとP regionが一部重複)のNested PCR、Sequence解析を行った。
- ② SP領域のSequenceが得られなかった212検体に対してSP領域よりも高感度のS領域(S regionの一部)のNested PCR、Sequence解析を行った。
- ③ さらにSP領域のSequenceが得られた626例からランダムに抽出した96検体に対してFull-Sequenceを試みた。
- ④ ①、②、③で得られたSequenceに対してUPGMA法により系統樹解析を行い、Genotypeを決定した。

図 3. HBVDNA の Nested PCR 増幅領域と Sequence 解析・系統樹解析の手順

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 例の Real time PCR によるウイルス量は、 1.0×10^8 copy/ml 以上のものが 191 例(20.9%)と最も多く、中央値 4.35×10^4 copy/ml(範囲： 1.0×10^2 未満～ 1.0×10^8 copy/ml 以上)であった (図 4)。

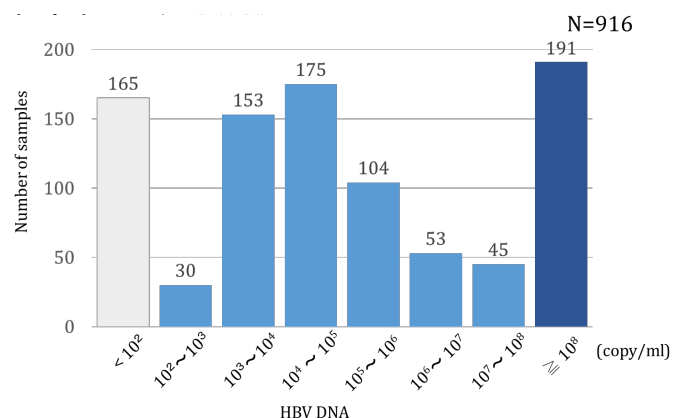


図 4. HBV キャリア 916 名における HBV DNA 量の分布

2. 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、96.3% (674/700 例) が genotype C に属し、3.3% (23/700 例) が genotype B、0.4% (3/700 例) が genotype A に属した (図 5)。

Genotype A の株はフィリピン株等と近縁、Genotype B の株はインドネシア株等と近縁であった。

Genotype C の株は C2 の中国株付近に最大の集積を認め、他にベトナムやタイ由来 C1 株の近縁の株、インドネシアやカレドニア由来 C3 株の近縁の株等、サブタイプの多様な分布が認められた。

3. 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)。

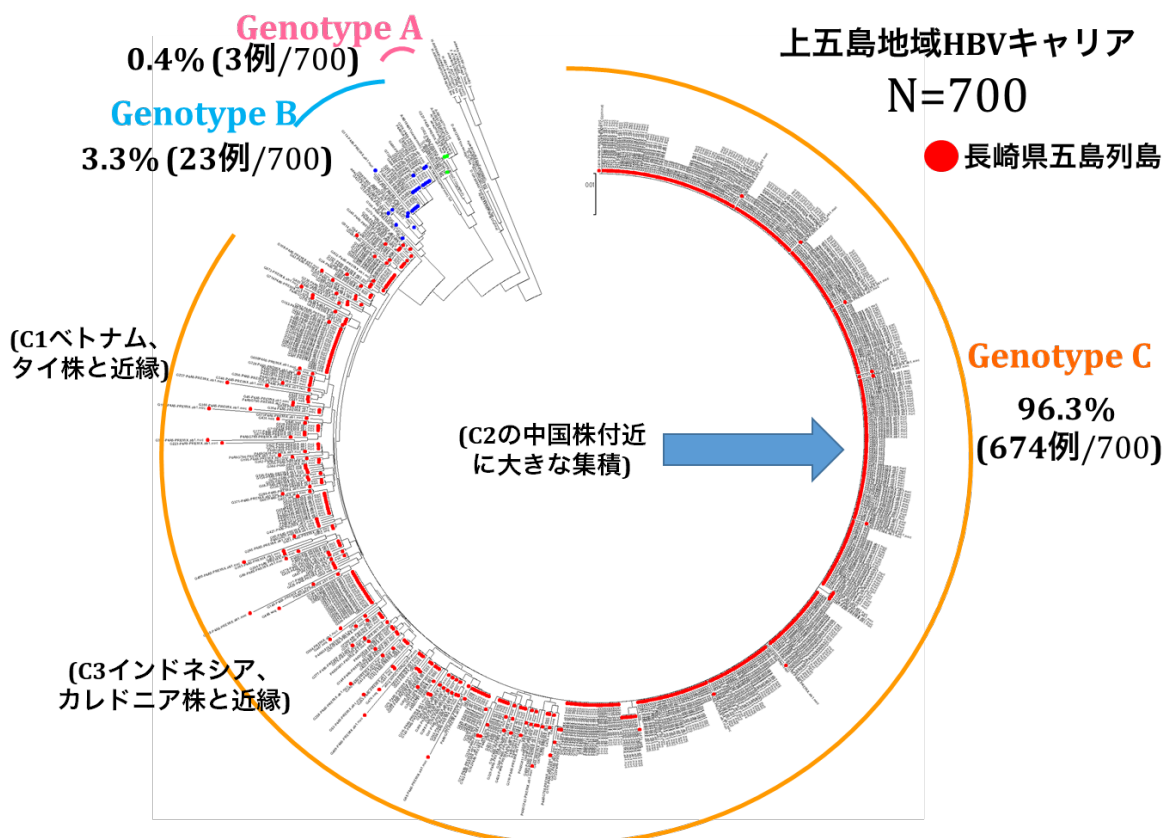


図 5. SP 領域の sequence 解析が可能であった 700 例における HBV genotype の系統樹

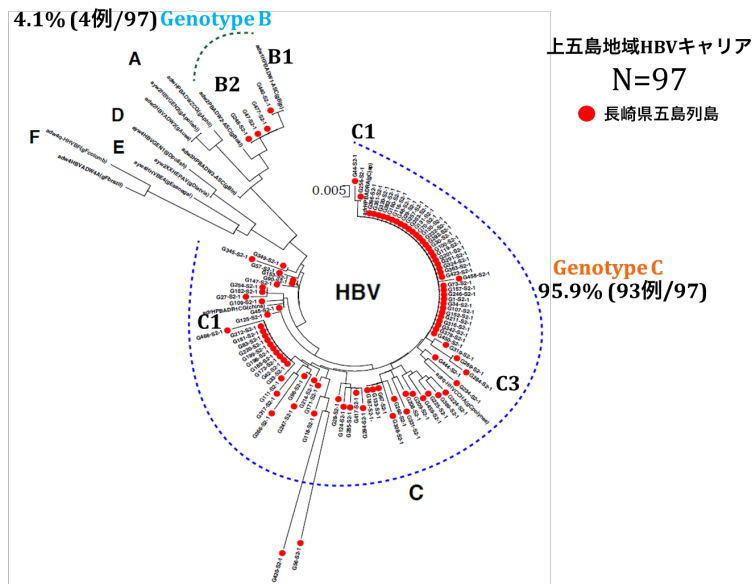


図 6. S 領域の Sequence 解析が可能であった 97 例における HBV genotype の系統樹

4. 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 797 例 (SP 領域 : 700 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。

5. 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 (図 7)、国内の他の地域における HBV genotype 内訳と比較した結果、五島列島の HBV Genotype 内訳は九州の Genotype 内訳とほぼ同等であることがわかった。

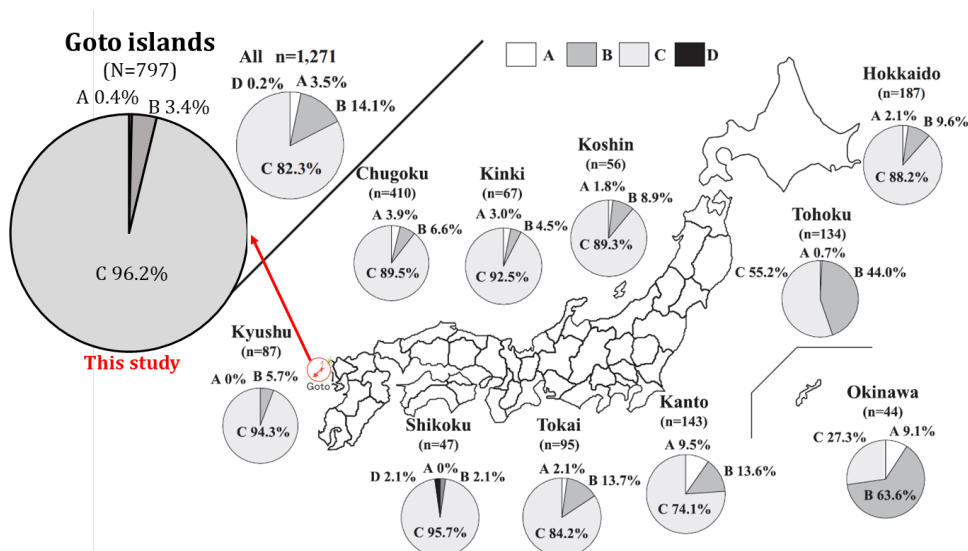


FIG. 1. Geographic distribution of HBV genotypes in patients with chronic HBV infection in Japan during 2005 and 2006.

1) K.Matsura, 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 7. 全国における HBV genotype 分布

6. Full-Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 52 名の系統樹

SP 領域で Sequence が得られた 700 例のよりランダムで選出した 96 例に対して Full-Sequence 解析を試みたところ、現時点で 52 例の Full-Sequence が得られた。内訳は 1 例が Genotype A、51 例が Genotype C であった。得られた Full-Sequence で作成した系統樹を図 8

に示す。Genotype A の株はスペイン株と最も近縁であった。Genotype C の株は全例 Genotype C2 であり、中国、台湾、ホンコン由来の株と近縁であった。

さらに、C2 の枝において、7 例、8 例、16 例と 3 か所に明らかな集積が認められた。16 例の集積は本研究で得られた他の株と系統樹上別の枝に独立して存在することが分かった。

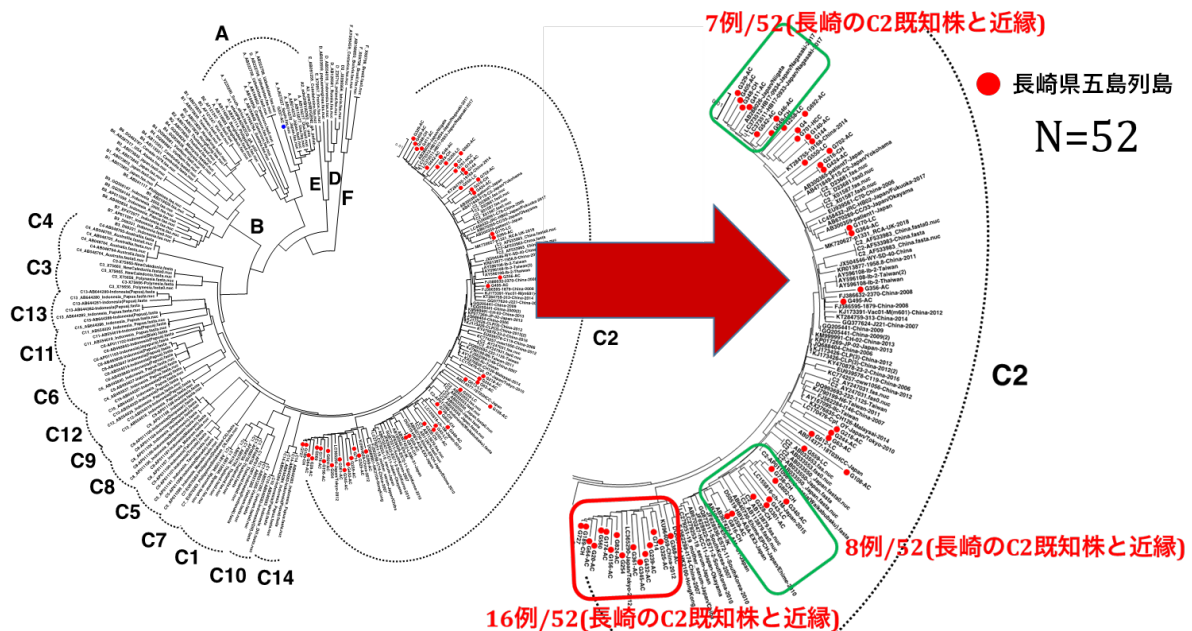


図 8. Full-Sequence が可能であった 52 例における HBV genotype の系統樹

D. 考察および E. 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、系統樹解析を行った。全対象 916 例中、Real-time PCR は全例が完了し、Nested PCR による部分配列による Genotype 決定は現時点で 797 例が完了した。Full-Sequence は現時点で 52 例得られている。
2. SP 領域における sequence 解析が可能であった 700 例において、674 例が genotype C、23 例が genotype B、3 例が genotype A に属した。Genotype C の株は C2 の中国株の近くに集積が認められる他サブタイプの多様性が認められたため、Full-Sequence 解析による詳細な検討が必要であると考えられた。
S 領域における Sequence 解析が可能であった 97 例において、93 例が genotype C、4 例が genotype B に属した。
3. 最終的に 916 例のうち sequence 解析が可能であった 797 例（SP 領域：700 例、S 領域：97 例）において、96.2%（767/797 例）が genotype C、3.4%（27/797 例）が genotype B、0.4%（3/723 例）が genotype A に属した。先行文献との比較では、九州の Genotype 内訳とほぼ同等であった。
4. SP 領域における sequence 解析が可能であった 700 例のうちランダムに選出し Full-Sequence 解析を試み、現時点で 52 例の Full-Sequence が得られた。Genotype A の株はスペイン株と最も近縁であり、欧州由来であることが示唆される。Genotype C の株は SP 領域の系統樹では C2 に集積がある他 C1-C14 まで多様に分布していたが、Full-Sequence の系統樹においては全例 Genotype C2 であり、中国、台湾、ホンコン由来の株と近縁であった。さらに、C2 の枝において全 51 例中 31 例（7 例、8 例、16 例の 3 か所）に集積が認められた。16 例の集積は本研究で得られた他の株と

系統樹上別の枝に独立して存在することが分かった。島内という狭い地域での同一の感染集団であると推測される。

5. 引き続き、残りの部分配列の解析、Full-genome sequence 解析を進めるとともに、病態との関連についても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 株の 96.2% が Genotype C であることが明らかとなった。さらに Full-Sequence 解析を行ったところ、詳細な特徴として Genotype C の株はサブタイプがほぼ全例 C2 であること、島内という狭い地域で発生した感染集団であることが強く示唆された。今後は、ウイルス遺伝子学的特性と臨床診断による病態との関連性について検討を行っていく予定である。

【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

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

