

長崎県五島列島における全島スクリーニング・肝病態フォローされている

HBV キャリア由来株のHBVDNA ゲノム学的解析

(Full-sequence・系統樹・変異点等)による疫学的研究

研究代表者: 田中純子¹⁾

研究分担者: 山崎一美²⁾

研究協力者: 永島慎太郎¹⁾、KOKO¹⁾、高橋和明¹⁾

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(人口約 2.4 万人)では、全住民を対象とした HBs 抗原検査を 1977 年に導入し、現在までに全住民のスクリーニング検査を受検した。1991 年以降出生した住民からの HBs 抗原陽性者はなく、地域限定のウイルス肝炎撲滅、すなわち、マイクロエリミネーションが上五島地域では、開始した。

一方、これまでに HBs 抗原陽性と判定された HBV 持続感染者(キャリア)に対しては、上五島病院附属奈良尾医療センターにて経過観察と治療介入が行なわれてきており、診断と治療効果の研究等のため、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、また、臨床経過との関連性についても検討した。

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）。

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、910 名（男 523 名、女 387 名）の保存血清を対象とした。910 例の Real time PCR によるウイルス量は、 1.0×10^8 copy/ml 以上が 189 例と最も多く、中央値 4.35×10^4 copy/ml であった。
2. 910 例中、760 例の SP 領域、70 例は S 領域合計 830 例に対して Sequence 解析が可能であった。SP 領域における sequence 解析が可能であった 760 例において、734 例が genotype C、23 例が genotype B、3 例が genotype A に属した。系統樹では、Genotype C の株は C2 の中国由来の株の近くに集積が認められる他、C1-C14 に渡りサブタイプの多様性が認められた。S 領域における Sequence 解析が可能であった 70 例において、69 例が genotype C、1 例が genotype A に属した。
3. 最終的に 910 例のうち Sequence 解析が可能であった 830 例（SP 領域：760 例、S 領域：70 例）において、96.8%（803/830 例）が genotype C、2.8%（23/830 例）が genotype B、0.4%（4/830 例）が genotype A に属した。先行研究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 760 例のうちウイルス量を考慮に入れて選出し、Full-Sequence 解析を試み、92 例の Full-Sequence が得られた。Genotype A の株はスペイン由来の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、5か所に明らかな集積が認められた。

5. Full-Sequence が得られた 92 例の変異の有無と最終観察時の肝病態(AC, CH, LC, HCC)について集計した。G1613A の変異がある場合とない場合を比較して肝病態が進行(LC,HCC)となるオッズ比 3.77(p=0.044)と最終観察時に病態が進行していることを示す結果となった。C1653T の変異もオッズ比 2.45 であったが、有意差は認められなかった(p=0.144)。

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 96.8%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 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。変異の解析により、病態進行について、G1613A、C1653T の変異が関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

長崎県五島列島の上五島地域(人口約 2.4 万人)では、全住民を対象とした HBs 抗原検査を 1977 年に導入し、現在までに全住民のスクリーニング検査を受検した。1991 年以降出生した住民からの HBs 抗原陽性者はなく、地域限定のウイルス肝炎撲滅、すなわち、マイクロエリミネーションが上五島地域では、開始した。

一方、これまでに HBs 抗原陽性と判定された HBV 持続感染者(キャリア)に対しては、上五島病院附属奈良尾医療センターにて経過観察と治療介入が行なわれてきており、診断と治療効果の研究等のため、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、また、臨床経過との関連性についても検討した。

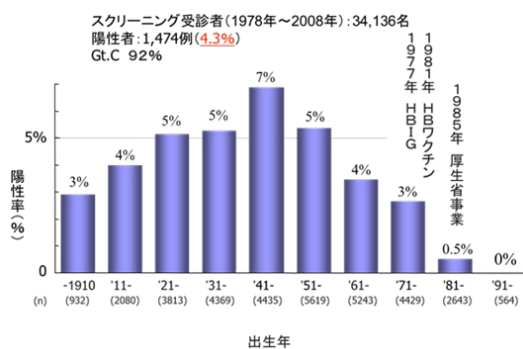


図 1. 上五島地区の HBs 抗原陽性率

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 910 名(男 523 名、女 387 名:表 1)の保存血清を対象とした。



図 2. 長崎県上五島地区

| Contents | N |
|--|----------------|
| Sex (Male/Female) | 523/387 |
| Birth-year (1910-1930/1931-1960/1961-1990) | 199/551/160 |
| HBeAg (+/-/Unknown) | 270/674/6 |
| Anti-HBe (+/-/Unknown) | 647/257/6 |
| Genotype (A/B/C/Unknown) | 9/22/799/80 |
| Mean follow-up period | 13.2±8.9 |
| Liver disease status at the entry (AC/CH/LC/HCC) | 554/222/97/37 |
| Liver disease status at the end (AC/CH/LC/HCC) | 606/120/84/100 |

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 values>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 910 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 3>

- ① 対象 910 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 150 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 760 例のうちウイルス量を考慮に入れて選出し、Full-Sequence 解析を試みた。
- 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)。

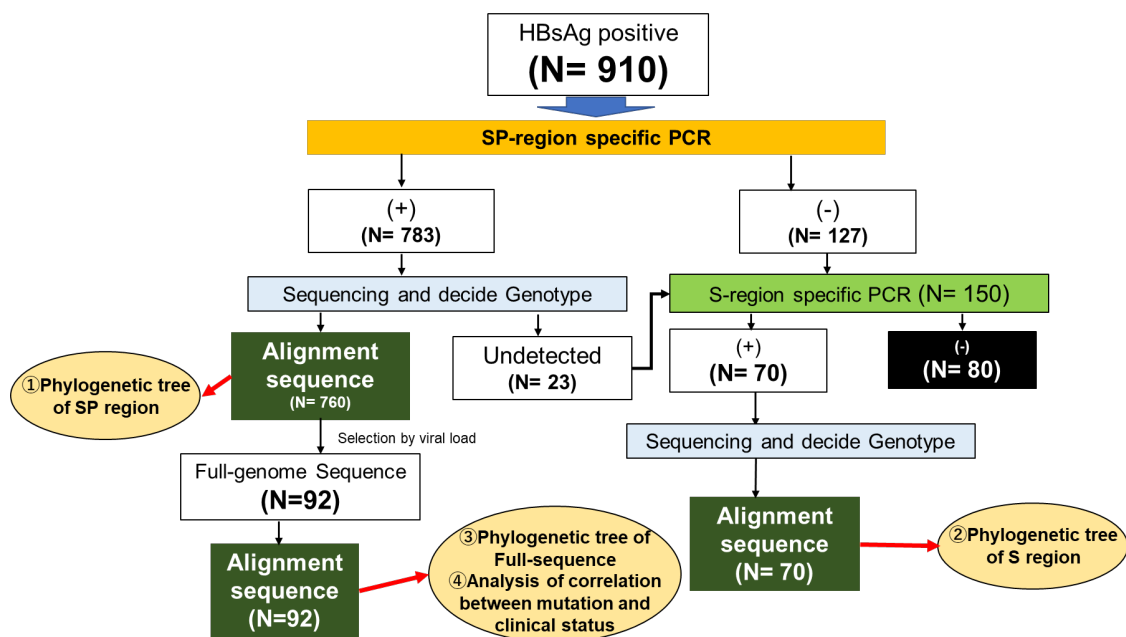


図 3. HBVDNA の Nested PCR・Sequence 解析・系統樹解析のフローチャート

C. 研究結果

1. HBV キャリア 910 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 910 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)。

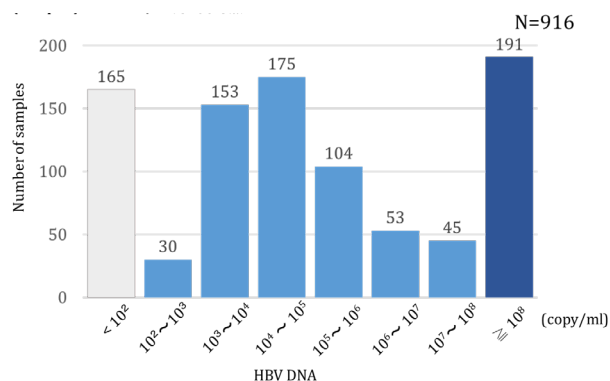


図 4. HBV キャリア 910 名における HBV DNA 量の分布

2. SP 領域 Sequence 解析が可能であった HBV キャリア 760 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、96.6% (734/760 例) が genotype C に属し、3.0% (23/760 例) が genotype B、0.4% (3/760 例) が genotype A に属した (図 5)。

Genotype A の株はフィリピン由来の株等と近縁、Genotype B の株はインドネシア由来の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、98.6% (69/70 例) が genotype C に属し、1.4% (1/70 例) が genotype A に属した (図 6)。

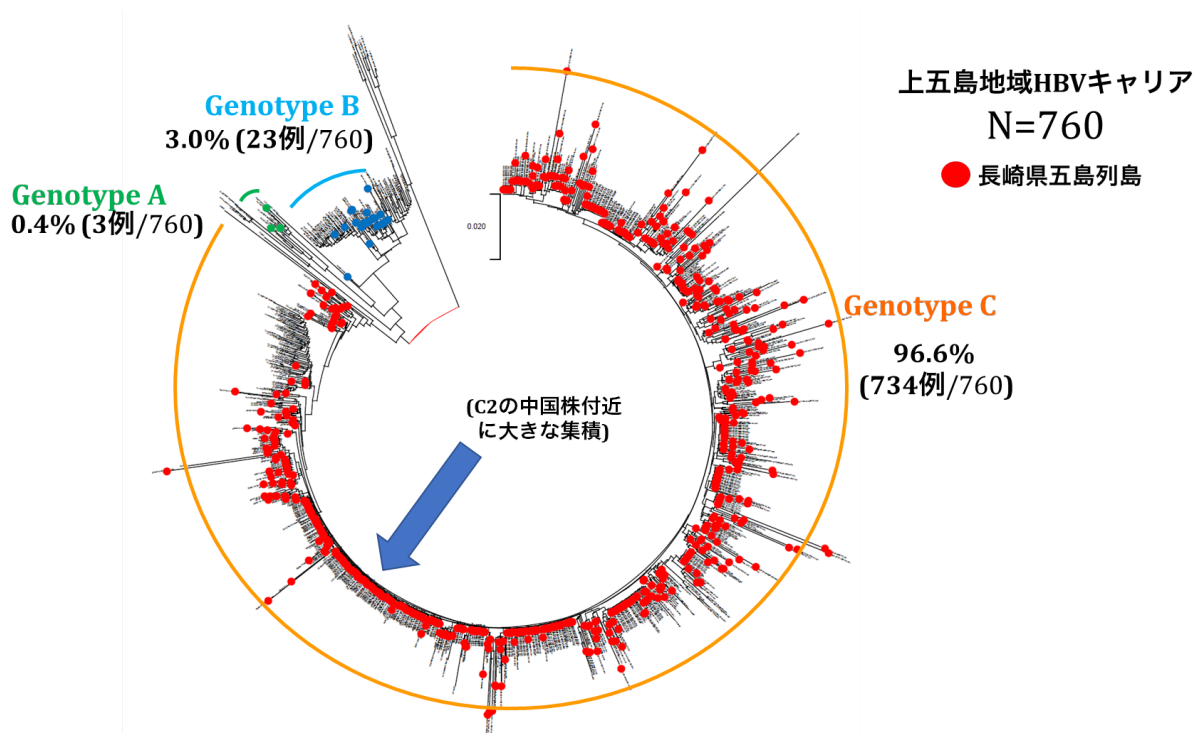


図 5. SP 領域の sequence 解析が可能であった 760 例における HBV genotype の系統樹

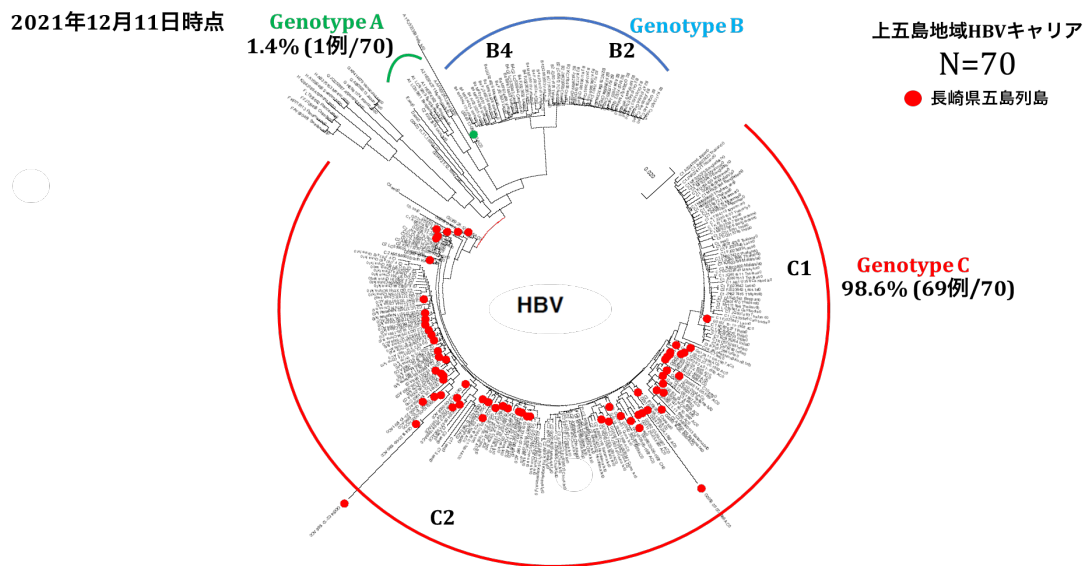


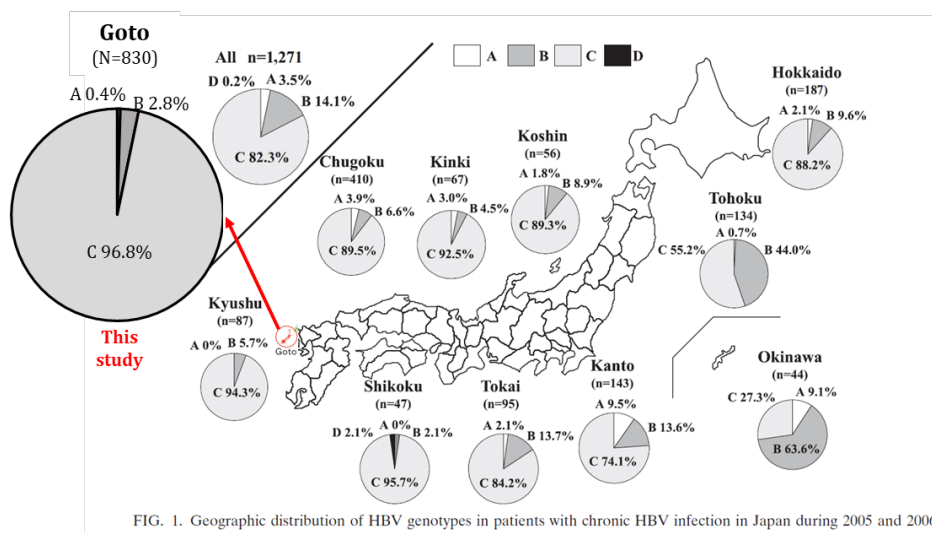
図 6. S 領域の Sequence 解析が可能であった 70 例における HBV genotype の系統樹

4. Sequence 解析が可能であった計 830 例の HBV genotype 内訳

910 例中 sequence 解析が可能であった 830 例 (SP 領域 : 760 例、S 領域 : 70 例) において、96.8% (803/830 例) が genotype C、2.8% (23/830 例) が genotype B、0.4% (4/830 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。



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 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 92 名の系統樹

SP 領域で Sequence が得られた 760 例のうちウイルス量を考慮に入れて選出し、Full-Sequence 解析を試み、92 例の Full-Sequence が得られた。内訳は 1 例が Genotype A、13 例が Genotype B、78 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 5 か所(28 例、17 例、7 例、6 例、5 例)に明らかな集積が認められた。その中で埼玉由来の株と近縁の、17 例の集積は本研究の他の株と別の枝に存在することが分かった。

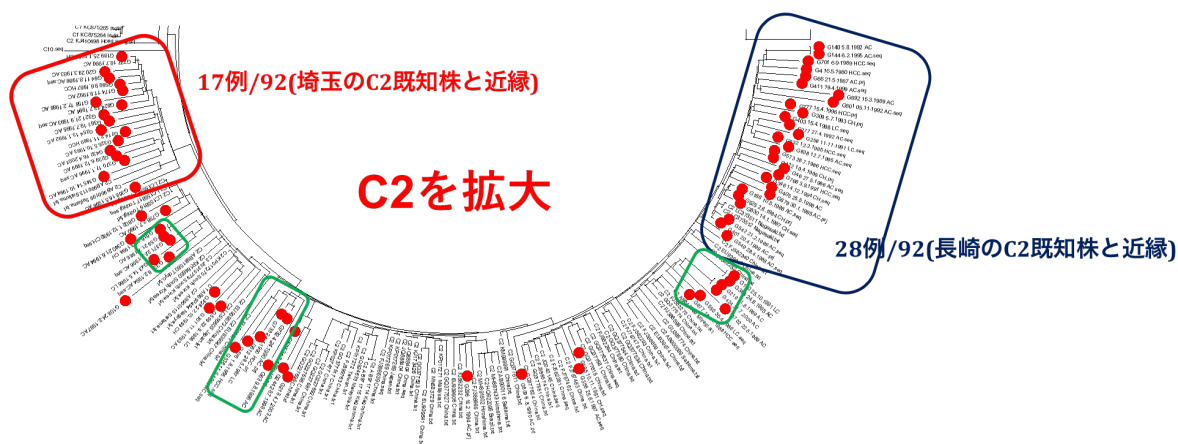


図 8.Full-Sequence が可能であった 92 例における HBV genotype の系統樹

| Mutation | Final Status AC or CH(N=72) | Final Status LC or HCC(N=20) | OR (p value) |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Pre S deletion | 14 | 4 | 1.04 (p=0.792) |
| Additional Pre X | 23 | 6 | 0.91 (p=0.792) |
| G1613A | 9 | 7 | 3.77 (p=0.044) |
| C1653T | 18 | 9 | 2.45 (p=0.144) |
| T1753V | 18 | 5 | 1.00 (p=0.770) |
| Double mutation (A1762T+G1764A) | 37 | 13 | 1.76 (p=0.408) |
| Pre C W28 Stop | 19 | 5 | 0.93 (p=0.870) |
| V130I | 16 | 4 | 0.88 (p=0.925) |

表 2.Full-Sequence が可能であった 92 例の変異の有無と観察最終肝病態との関連

7. Full-Sequence が可能であった 92 例の変異の有無と肝病態との関連の検討

表 2 に、Full-Sequence が可能であった 92 例の変異の有無と最終観察時の肝病態(AC, CH, LC, HCC)について集計した。先行研究にて肝病態との関連が指摘されている 8 種類の変異について検討を行ったところ、G1613A の変異がある場合とない場合を比較して肝病態が進行(LC,HCC)となるオッズ比 3.77(p=0.044)と最終観察時に病態が進行していることを示す結果となった。C1653T の変異もオッズ比 2.45 であったが、有意差は認められなかった(p=0.144)。

これら変異点について病態進行群(LC, HCC)とコントロール群(AC,CH)共に部分配列解読の対象を拡大して比較を行うことにより、より精度の高いリスク評価が可能であると考えられた。

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 910 名の Real time PCR、Nested PCR、Sequence 解析、系統樹解析を行った。全対象 910 例中、Real-time PCR 及び、Nested PCR による部分配列による Genotype 決定が完了し、Full-Sequence は 92 例得られた。
2. SP 領域における sequence 解析が可能であった 760 例において、734 例が genotype C、23 例が genotype B、3 例が genotype A に属した。Genotype C の株は C2 の中国由来の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 70 例において、69 例が genotype C、1 例が genotype A に属した。
3. 最終的に 910 例のうち sequence 解析が可能であった 830 例 (SP 領域:760 例、S 領域:70 例) において、96.8% (803/830 例) が genotype C、2.8% (23/830 例) が genotype B、0.4% (4/830 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 760 例のうちウイルス量を考慮して選出し Full-Sequence 解析を試み、92 例の Full-Sequence が得られた。Genotype A の株はスペイン由来の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、5 か所(28 例、17 例、7 例、6 例、5 例)に明らかな集積が認められた。その中で 17 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. Full-Sequence が可能であった 92 例の変異の有無と最終観察時の肝病態(AC, CH, LC, HCC)について集計した。先行文献にて肝病態との関連が指摘されている 8 種類の変異について検討を行ったところ、G1613A の変異がある場合とない場合を比較して肝病態が進行(LC,HCC)となるオッズ比 3.77(p=0.044)と最終観察時に病態が進行していることを示す結果となった。C1653T の変異もオッズ比 2.45 であったが、有意差は認められなかった(p=0.144)。部分配列解読の対象を拡大して比較を行うことにより、より精度の高いリスク評価が可能であると考えられた。

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。さらに、病態進行について、特定の変異点に関わっていることを疫学的に検証することが可能であることが確かめられた。

【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

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし