

新規に保険収載された検査法 「HBV ジェノタイプ判定に関して」

Evaluation of hepatitis B virus genotyping

しん かい のぼる た なか やす ひと
新 海 登^{1,2)} : 田 中 靖 人²⁾
Noboru SHINKAI Yasuhito TANAKA

HBV ジェノタイプ測定が新規に保険収載された。本稿ではその臨床的意義と、測定原理・方法、測定キットについて述べたい。

I. B型肝炎ウイルス (HBV) の現状と問題点；

1. HBV ジェノタイプと急性肝炎とその慢性化

HBV 感染者数は全世界で4億2千万人、わが国での感染率は約1%程度と考えられており、約150万人の感染者がいると推定されている。その多くが無症候性のキャリアで、10万人程度の慢性肝疾患(3万人程度は肝硬変・肝細胞癌)患者がいると推定されている。HBVはヘパドナウイルス科に属するDNAである。HBV 遺伝子は約3200塩基対からなる環状二本鎖DNAであり、①外被蛋白をコードするpre-S/S遺伝子、②コア蛋白(HBc抗原)とHBe抗原をコードするプレコア/コア遺伝子、③DNAポリメラーゼ・逆転写酵素・5'末端結合蛋白(primase)などをコードするP遺伝子、④X蛋白などをコードするX遺伝子の4種類のORFからなる。一般的にDNAウイルスはRNAウイルスに比較して遺伝子変異が少ないとされているが、このHBVは逆転写過程を持つため高率に変異を起こすことが知られており、DNAウイルスの中では変異しやすいウイルスと考えられている。この遺伝子変異を利用することでHBV 遺伝子配列の比較が可能であり、近年の分子進化学の発展によりA型からH型までの8つの遺伝子型(ジェノタイプ)に分類されている¹⁾。

日本全国13施設の共同研究により解析可能であった720例のHBV ジェノタイプの分布状況は、HBV/Cが約85%、HBV/Bが約12%、HBV/Aが約

2%であり、本邦における持続感染者はHBV/CとHBV/Bがほとんどである。HBV 母児感染予防対策により、HBVの垂直感染は著明に減少し、散発性B型急性肝炎も徐々に減少していくことが予測されていたが、1995年以降徐々に増加傾向であり、中でも特徴的なのは1995年までは稀であった欧米型(HBV/Ae)の割合が近年増加している²⁻⁴⁾。以前より日本に主に存在していたHBV/BjとHBV/Cの水平感染の場合では慢性化をきたすことは少ない⁵⁾。HBV/AによるB型急性肝炎の肝障害の程度はHBV/Cと比較して軽いが、HBs抗原の消失までの期間も長く、HBV/Aの慢性化率はHBV/Cと比較して高くなる傾向にある⁶⁾。本邦における多施設共同研究においても同様にHBV/Aの高い慢性化率を報告している⁶⁻⁸⁾。本邦ではHBV/BjやHBV/CのB型急性肝炎は慢性化がまれであったため、性行為による水平感染への対処としてのユニバーサルワクチンを未だ採用していない。そのため、この遺伝子型の流入により新規感染がさらに拡大する可能性が高い。

現在日本ではHIVに感染している男性同性愛者の間でHBV/Aが感染拡大している⁹⁾。結果として、B型慢性肝疾患においてもHBV/Aの占める割合が増加している(厚生労働省「B型肝炎のジェノタイプA型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究」)。

II. HBV 遺伝子型と病態

前述のようにHBV/Aは本邦において増加傾向にある。急性肝炎におけるHBV/Aの慢性化率は8.7%であった⁷⁾。しかしながらHBV/Aの治療反応性は良好で、ペグインターフェロン治療に対しHBs抗原の

1) 名古屋市立大学 消化器・代謝内科学
2) 同 病態医科学講座
〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

1) Department of Gastroenterology and Metabolism,
2) Virology & Liver Unit,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
(Kawasumi 1, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya)

減少率も高い¹⁰⁾。前述のとおり、日本におけるHBVは主にサブジェノタイプB (HBV/Bj) とC (HBV/C2) である。HBV/Bの垂直感染した患者は比較的若年からHBe抗原のセロコンバージョンを起こし、無症候性キャリアとなりやすいが、HBV/Cの患者は肝炎の程度もHBV/Cに比べて高度で、HBV DNA量も高く、HBe抗原陽性のまま病態が進行してしまう例が多い¹¹⁾。培養細胞株とヒト肝細胞置換uPA/SCIDマウスを用いたHBV genotype A、B、Cの感染実験において、HBV/Cの感染マウスに肝線維化の進展が見られたように、HBV/CはHBV/Bに比べて肝硬変、肝癌への進展が見られることが多い¹²⁾。本邦のHBV関連肝癌のジェノタイプ分布をみると、多くがHBV/Cであり、HBV/Bjは高齢者肝癌の一部に散見されるのみであった。また、HBV/CはHBV/Bに比べて治療抵抗性であり、PegIFNによるセロコンバージョンの頻度が低くセロコンバージョンしてもその持続が短く、HBsAgのクリアランス率も低い。またHBV/Bは2つの亜型に分けられ、若年肝癌がみられるアジア諸国に分布するサブジェノタイプBa (Asia型) と、日本固有のサブジェノタイプBj (Japan型) の2つの亜型がある。HBV/Baはプレコアからコア領域の部分がHBV/Cとウイルス遺伝子組み換えを起こし¹³⁾、HBV/BaはHBV/BjとHBV/Cのちょうど中間的な性質を示していた。

表1にHBV/BjとHBV/Cの性質をまとめた。

表1 HBV genotype BjとCの特徴

特徴	HBV genotype	
	Bj	C
HBe抗原陽性率	低い	高い
HBe抗体陽性率	高い	低い
セロコンバージョンまでの期間	短い	長い
ALT	低い	高い
血中HBV-DNA量	低い	高い
CP変異 (nt. 1762/1764)	15%	63%
プレコア変異 (nt. 1896)	50%	13%
組織進展度	軽い	重い
治療反応性	良好	不良
IFN反応性	良好	悪い
PegIFN反応性	良好	悪い
ラミブジンによるセロコンバージョン	議論の余地有り	
ラミブジン終了後の再燃	少ない	多い
ラミブジン耐性	議論の余地有り	
ラミブジン耐性後の肝炎	議論の余地有り	
アデフォビル反応性	同等	
エンテカビル反応性	同等	
予後	良好	不良

Ⅲ. 測定キットと測定原理・方法

本邦での測定キットとして(株)BMLのPCR-Invader法によるHBV-DNA遺伝子型判定と(株)SRLのEIA法によるHBV遺伝子判定(イムニス®HBVゲノタイプEIA)がある。今回保険収載されたのはEIA法であるため後者を中心に解説する。

1. HBV ジェノタイプング EIA 法の測定原理

前述の通りHBVの遺伝子型は8つに分類されるが、日本においてはそのうちジェノタイプA、B、C、Dの4種でほとんど占められている。HBVの外皮蛋白であるHBs抗原をコードする遺伝子にはS遺伝子をコードする領域(226アミノ酸(aa))、Pre-S2遺伝子をコードする領域(55aa)、Pre-S1遺伝子をコードする領域(119ないし108aa)の3つの領域からなる。HBs抗原のPreS2領域には4種のモノクローナル抗体によって判別できるエピトープm、k、s、uが存在し、ジェノタイプA、B、C、Dではそれぞれsu、m、ks、ksuのエピトープをもっている。このため、m、k、s、uの4つのエピトープの組み合わせ(セロタイプ)により、ジェノタイプA、B、C、Dを判定することができる。

イムニス®HBVゲノタイプEIAは、ワンステップのサンドイッチ酵素免疫測定法(EIA)を用いたHBV PreS2抗原エピトープ検出に基づく、HBV判定試薬で、HBs抗体固相プレートの各ウェルに、PreS2(m、k、s、u)エピトープそれぞれに特異的な酵素標識抗体m、k、s、uを添加し、これにHBs抗原を含む検体を加えると、固相化抗HBs抗体/HBs抗原/酵素標識抗PreS2(m、k、s、u)抗体のサンドイッチ免疫複合体が形成される。

洗浄後、酵素基質を添加すると酵素反応により発色し、各エピトープの有無を検出し、ジェノタイプを判定する(表2)。この検査系の陽性率はPreS2を

表2

PreS2 エピトープ				PreS2 セロタイプ	HBV ジェノタイプ
m	k	s	u		
-	-	+	+	su	A
+	-	-	-	m	B
-	+	+	-	ks	C
-	+	+	+	ksu	D
				上記以外	保留

含む HBs 抗原量に依存する。B 型肝炎患 344 例で HBs 抗原量と本検査系の陽性率を比較したところ、HBs 抗原が 3IU/ml 以上であればほとんどの症例でジェノタイプを判定できた¹⁴⁾。

2. イムニス®HBV ジェノタイプ EIA の問題点

PreS2 領域のエピトープ部分に変異や欠失があると判定不能の場合があること、さらに臨床的にも重要な HBV/Aa (A1) と HBV/Ae (A2) あるいは HBV/Bj と HBV/Ba といったサブジェノタイプに関しては判定ができない。これに関しては保険外ではあるが前述の BML 社の B 型肝炎ウイルス遺伝子型判定 HBV genotype/subgenotype Invader® assay がある。この原理は① HBV のゲノム DNA 上のコアと S の 2 つの領域を multiplex PCR をし、②ジェノタイプ (A-D)、サブジェノタイプ (Aa, Ae, Ba, Bj) のインバーダーオリゴとシグナルプローブが標的部位とハイブリダイズすることでフラップを形成します。③ DNA 修復酵素の一種である Cleavase® (クリベース) 酵素がフラップを認識して、フラップを切断する。④遊離したフラップが、蛍光色素および蛍光消光因子が標識された検出用の DNA 基質 (FRET カセット) とハイブリダイズして新たなフラップを形成します。⑤このフラップを Cleavase® (クリベース) 酵素が認識し、切断することで、蛍光色素を遊離させ、蛍光測定する¹⁵⁾。

おわりに

HBV genotype によりウイルス学的特徴や臨床像に違いがあり、抗ウイルス治療においても HBV genotype との関連性が指摘されている。HBV genotype も考慮に入れた治療方針を立てることが重要である。今回、HBV ジェノタイプ EIA 法は保険収載されたので、B 型急性肝炎および慢性肝炎の一般診療の中で有効活用することが可能となった。

文 献

- 1) Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* **46** : 329-338, 2003.
- 2) Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, et al. Clinical features of

hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J Gastroenterol* **38** : 656-662, 2003.

- 3) Takeda Y, Katano Y, Hayashi K, et al. Difference of HBV genotype distribution between acute hepatitis and chronic hepatitis in Japan. *Infection* **34** : 201-207, 2006.
- 4) 城里穂, 長谷川潔, 鳥居信之. 肝炎ウイルス感染・増殖のメカニズム～最近の B 型肝炎ウイルス感染症、遺伝子型と病原性～. *Mebio* 2002 : 34-38.
- 5) Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Roumeliotou-Karayannis A, Gerin JL, Purcell RH. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* **92** : 1844-1850, 1987.
- 6) Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, et al. Distinct geographic distributions of hepatitis B virus genotypes in patients with acute infection in Japan. *J Med Virol* **77** : 39-46, 2005.
- 7) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* **44** : 326-334, 2006.
- 8) Sugauchi F, Orito E, Ohno T, et al. Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatol Res* **36** : 107-114, 2006.
- 9) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, et al. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol* **49** : 1017-1024, 2011.
- 10) Moucari R, Martinot-Peignoux M, Mackiewicz V, et al. Influence of genotype on hepatitis B surface antigen kinetics in hepatitis B e antigen-negative patients treated with pegylated interferon-alpha2a. *Antivir Ther* **14** : 1183-1188, 2009.
- 11) Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* **34** : 590-594, 2001.
- 12) Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes. *Gastroenterology* **136** : 652-662 e3, 2009.
- 13) Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, et al. Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Dis* **38** : 1222-1228, 2004.
- 14) Tanaka Y, Sugauchi F, Matsuura K, et al. [Evaluation of hepatitis B virus genotyping EIA kit]. *Rinsho Byori* **57** : 42-47, 2009.
- 15) Tadokoro K, Kobayashi M, Yamaguchi T, et al. Classification of hepatitis B virus genotypes by the PCR-Invader method with genotype-specific probes. *J Virol Methods* **138** : 30-39, 2006.