

平成 21年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590614

研究課題名（和文）凍結保存血清を用いた肝炎流行地域住民の病因と病態との長期的観察

研究課題名（英文）Natural course of hepatitis C virus carrier: a long term prospective study of patients in HCV hyperendemic area of Japan

研究代表者

若山 葉子（WAKAYAMA YOKO）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40104062

研究成果の概要：約 40 年前に発生した主として C 型肝炎ウイルス（HCV）に起因する大規模な肝炎地域流行例において 20 年以上の長期間にわたる既往者の追跡成績から、肝癌など肝病態の進展は発症から比較的早期の血中 HCV 量の増加に関連があることが示唆された。発症年齢・性別・HCV 遺伝子型・B 型肝炎ウイルス抗体（HBs・HBc 抗体）の有無では長期の HCV 量の推移との有意な関連性は認められなかった。HCV 遺伝子型により肝機能の長期経過に差異が認められた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：医歯薬学

分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：地域保健 地域調査 C型肝炎 地域流行 血清疫学 長期追跡 慢性肝疾患
肝がん

1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染は 10～30 年の経過で慢性肝炎・肝硬変さらには肝癌の発生に大きく関与するといわれている。わが国では肝硬変の約 50～60%、肝癌の約 60～80%が HCV 抗体陽性といわれており、HCV 抗体陽性率の高い地域では肝硬変・肝癌の多発が指摘され、地域住民の健康管理上大きな問題となっている。わが国ではこれまで地域特異的な C 型肝炎の流行が報告されてきたが、長期継続的にその予後を観察し宿主側の要因など様々な角度から病因と病態の進展との関連性について報告された例は少ない。

今回、報告者らは 1960 年代に主として

HCV に起因する大規模なウイルス肝炎の流行を経験した地域住民を対象として、その病因と病態との関連性を明らかにするとともに肝炎流行既往地区としての同地域の特徴を把握し住民の健康管理の指針につなげてゆきたいと考える。当該流行は 1962～68 年におよび患者総数 678 名・発生率 7.8%にのぼり、若年症例はきわめて少なく、致命率は 9.7%と高く、遷延・慢性化するものが多いなどの特徴が見られた。病因の特定は肝炎ウイルスの抗原抗体系

の開發を待ち、1989年以降、HCVを主とする流行であったことが判明した。

2. 研究の目的

約40年前のウイルス肝炎流行時より長期群間継続して採取し凍結保存されている既往者およびその家族を含む地域住民の血清を用い、HCVの量的・質的な数十年単位の変動を計測し、病因と宿主側の要因(感染年齢・性別・加齢など)が病態の進展にいかなる影響を及ぼすのかを長期継続的な観察により明らかにし、B型肝炎ウイルス(HBV)など他の複数の肝炎ウイルスとの重感染と病態との関連性についても検討を加える。さらに、HCV-RNAジェノタイプの検索などにより流行当初の感染経路、その後の伝播経路についても考察を加える。本例のように流行当初から継続して採取された既往者のみならず家族を含む地域住民の血清が保存され、問診・各種生化学データとの照合が可能な例はきわめて稀で皆無と云ってよい。このような例において流行終息後30余年を経過した時点から遡り、一時点でない長期継続的な病因と病態との観察を行うことはウイルス肝炎地域流行の予後を解明する上で貴重な知見の集積になるといえる。今回用いる血清は流行当初から1989年までに採取したものでありインターフェロン(IFN)による治療影響はないと考えられ、病因ウイルス・宿主要因と病態の進展との関連性をよりの確に把握できると考えられる。

これらの結果から、個人レベルの推移の解析にとどまらずウイルス肝炎地域流行の長期予後の特徴を明らかにし、地域住民の保健福祉の向上につながる指針を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

流行時の疫学調査により発症年月日が確認され、戸別訪問などにより長期間追跡が可能であった既往者および流行期間中より年一回実施している定期住民健康診査を受診した地域住民を対象とし、問診・臨床像・各種血清生化学データなどから群分けし、その凍結保存血清を用いて検査・測定を実施した。

(1) 対象者

A群：既往者 551名

- A-a 肝臓 A-b 肝硬変
- A-c 20年以上肝機能異常持続
- A-d 10~20年肝機能異常持続
- A-e 1~10年肝機能異常持続
- A-f 1年以内に肝機能正常化
- A-z HBV Carrier

B群：流行地区住民 2754名

- B-1 家族歴のあるもの 715名
- B-2 家族歴のないもの 2039名

C群：非流行地区住民(同地域内にあって

流行時肝炎の発生がなかった地区住民)
1989名

(2) 検査・測定検体

A群 血清の保存状態、採血頻度などから1人あたり1~10検体を抽出

- A-a 11名 A-b 8名
- A-c 107名* A-d 26名* A-e 39名*
- A-f 84名* A-z 11名

*A-a, b, zを含む

B群 1985年定期住民健診受診者

- B-1 51名 B-2 25名

C群 1985年定期住民健診受診者

50名

(3) 検査・測定項目

- ①HCV抗体Ⅲ(CLEIA法) A-a~f, z
B-1, 2, C
- ②HCVコア抗原(IRMA法) A-a~f, z B-1, 2
- ③HCV-RNA定性(RT-PCR法) A-a~f, z
- ④HCV-RNAジェノタイプ(RT-PCR法)
A-a~f, z
- ⑤HCVモニターゲノタイプ A-a~f, z
- ⑥HBs抗原・抗体(CLIA法) A-a~f, z
- ⑦HBs抗体(PHA法) A-a~f, z
- ⑧HBc抗体(CLIA法) A-a~f, z
- ⑨HBV-DNA定量(PCR法) A-z
- ⑩HBe抗原・抗体(CLIA法) A-z
- ⑪HCVシーケエンシング解析 A-a, c
- ⑫IV型コラーゲン(ラテックス凝集法)
A-a~f, z
- ⑬α-フェトプロテイン(AFP)
定量(CLIA法) A-a~f, z

4. 研究成果

(1) 追跡既往者のHCVコア抗原量の推移

①HCV抗体・HCVコア抗原保有状況

今回、測定を実施した既往者(A群)256名のうち239名(93.4%)がHCV抗体陽性者であった。それらのうちHCVコア抗原量が20fmol/L以上の値(抗原陽性)を示したものは182名(76.2%)であった。その割合は肝機能異常持続期間にしたがい20年以上持続する群で最も高く、1年以内に正常化した群で最も低かった。

②長期追跡既往者のHCVコア抗原量の推移と宿主要因・肝病態の進展との関連性

発症後20年以上継続して追跡できたHCV抗体陽性既往者147名(A-a7名、A-b2名、A-c69名、A-d5名、A-e19名、A-f45名)について発症時から約20年経過時点のHCVコア抗原量を測定した。うち106名(72.1%)が20fmol/L以上の値を示し持続感染が示唆された。147名をコア抗原量により2000fmol/L以上*(I群64例)・20~1999fmol/L(II群42例)・20

fmoI/L 未満(抗原陰性:Ⅲ群 41 例)の 3 群にわけ検討した。*IFN の効果判定の cut off 値 100KIU(HCV-RNA)にほぼ相当すると考えられる 1780fmoI/L を基準にした。

その結果、

・発症時年齢・検査時年齢は 3 群間に有意差はなかった。

・HCV 抗原陰性であるⅢ群に比較してⅠ群では 20 年以上肝機能異常持続・ZTT、Ⅱ群では男女比・20 年以上肝機能異常持続・ZTT・アルブミン・VI型コラーゲンで有意差が認められた($p < 0.05$)。

・Ⅰ群・Ⅱ群間では抗原量の多いⅠ群に比較してⅡ群が ZTT は有意に高く、アルブミンは有意に低い値を示した($p < 0.05$)。また、有意差はみられなかったが、Ⅱ群は 20 年以上肝機能異常持続率・Ⅳ型コラーゲン・AFP で高い値を示した。

などの知見が得られた。

さらに、147 例のうち 79 例(Ⅰ群 35 例・Ⅱ群 23 例・Ⅲ群 21)について発症から約 20 年間の 5 年ごとの HCV コア抗原量の推移を観察した。その結果、

・Ⅰ群では発症後 10 年まではⅡ群に比較して低値(～4 年:1284fmoI/L, 5～9 年:2155 fmoI/L)で推移するも経過期間に従って増加し、15 年経過後はⅡ群に比較して有意に高値(15～19 年:4114fmoI/L, 20 年～:7133 fmoI/L)を示した($p < 0.001$)。

・Ⅱ群では発症後 4 年以内に 2854fmoI/L を示すも 10～14 年(4290 fmoI/L)でピークを示した後(15～19 年:2016fmoI/L, 20 年～:1039fmoI/L)低下した。

・Ⅲ群 21 例中 17 例は期間中すべて陰性を示し、4 例のみ発症後 5 年以内に 1030fmoI/L を示すもその後低下し、10 年経過後は陰性となった。

これらの結果から、発症後早期には 2000 fmoI/L 以下の値を示すも持続して増加するⅠ群に比較して、早期から 2000fmoI/L 以上の高値を示し発症から 10～14 年でピークを示したⅡ群が 20 年以上肝機能異常持続高率・ZTT 高値・ALB 低値を示すなど、血清生化学値からみた肝病態の進展は発症から比較的早期の抗原量の増加に関連があることが示唆された。また、Ⅱ群では有意差は認められなかったものの男の割合が高く、抗原量の推移との関連性の可能性も示唆された。

③HCV コア抗原量の推移と HBV 重感染

既往者(A 群)256 名中、Hbs 抗原抗体・Hbc 抗体陽性者は 175 名(68.4%)であり、HCV コア抗原陽性者では 65.9%・陰性者では 74.3%であった。なお、19 名(7.4%)は HCV・HBV 各マーカーともに陰性であった。また、11 名が Hbs 抗原 Carrier であることが確認された。

②において発症後約 20 年経過後の HCV コ

ア抗原量により 3 群(ⅠⅡⅢ群)にわけ検討した 147 名について Hbs・Hbc 抗体陽性率を検討しが各群間に有意差は認められなかった。また、Hbc 抗体陽性者について抗体量を測定し比較したが各群間に有意差は認められなかった。したがって、長期経過後の HCV コア抗原量に Hbs・Hbc 抗体の有無による影響はないと考えられる。

Hbs 抗原 Carrier 11 名のうち長期追跡できた 10 例について、HCV および HBV の各マーカーの推移と肝病態の進展について検討した。6 例が HCV コア抗原陰性(HCV 抗体低力価で陽性)で推移し、HCV コア抗原陽性を示した 4 例も比較的 low 値で推移した。HBV-DNA 量および Hbc 抗体量は HCV コア抗原の有無による差異は見られなかった。10 例中肝硬変・肝癌による死亡が確認されたものが 4 例は(うち 3 例は HCV コア抗原陰性)すべて HBe 抗原陽性・HBe 抗体陰性(検査時年齢:34～58 才)であった。Hbs 抗原 Carrier における HCV 動態および病態の推移についてはさらに詳細な検討を加えて行きたいと考える。

④肝癌症例の HCV コア抗原量の推移

追跡期間中に肝癌による死亡が確認された 11 名のうち 10 例について HCV コア抗原量の推移を検討した。発症から約 20 年経過後の HCV コア抗原量は 20fmoI/L 未満から 13000fmoI/L を示した。5 年ごとの推移では発症から 5～9 年でピークを示した後低下するもその後再び増加する傾向が見られた。発症から比較的早期にピークを示す傾向は②のⅡ群の傾向と類似している。さらに発症年齢を 40 才未満と 40 才以上に別け検討したところ、40 才未満では発症後 1～4 年、40 才以上では 5～9 年でピークを示し 40 才未満のものでは発症後より早期に HCV コア抗原量の増加が認められた。

(2) 追跡既往者の HCV-RNA ジェノタイプ

②において発症から約 20 年経過後の HCV コア抗原陽性を示したⅠ群およびⅡ群 27 名について測定を行った。1b16 例・2a2 例・2b11 例(2 名は 1b・2b とともに検出)であり他のジェノタイプは検出されなかった。Ⅰ群・Ⅱ群間にジェノタイプ別の有意差は認められなかったが、1b はすべて 20 年以上肝機能異常が持続するものであり、2a および 2b は 1 年以内に肝機能が正常化したものの割合が高かった。また、肝癌による死亡が確認されたものでは 1b5 例・2a1 例・2b2 例であった。ジェノタイプにより長期経過の肝病態に差異のあることが示唆された。

また、有意差は認められなかったが、発症年齢では1b(40.2±14.0才)は2a(27.5±12.2才)・2b(37.3±9.9才)に比較して高齢であり、感染経路などを含めた検討課題が残された。

(3) 追跡既往者のHCVシーケンシング解析

宿主体内において長期経過によるHCVの変異と病態の進展について検討するため、追跡期間中に肝癌による死亡が確認されHCV-RNAジェノタイプ1bを示した3例および発症後20年以上追跡できHCVコア抗原量2000fmol/L以上の高値が持続し、ジェノタイプ1bを示した7例について、発症後約10年ごとに(追跡期間中2回)core領域のアミノ酸変異を検討した。肝癌症例1例に特異的な変異が認められたが病態の推移との関連性については解析が十分でなく、今後、対象検体数を増やすなど検討を加えて行く必要があると考える。

(4) 地域住民のHCV抗体保有状況

肝炎流行から約20年経過した1985年に定期住民健康診査を受診した地域住民126名について、流行地域別、性別・年齢別、家族歴の有無別にHCV抗体陽性率を検討した。流行地区では家族歴なし17.6%(男:15.4, 女:20.0)・家族歴あり32%(男:10.0, 女:46.7)を示し、女・家族歴ありで高い割合を示したが有意差は認められなかった。年齢階級別では男60才代・40才未満、女50才代・40才代で高率であった。非流行地区では男女各年齢階級でHCV抗体陽性者はいなかった。これらの結果から流行地区における高い陽性率は過去のウイルス肝炎流行を反映するものと考えられるが、陽性率の高かった男40才未満・女40才代は流行当時10~20才代であり、流行時10才代・20才代の発生率が少なかったことを考慮すると、流行地区におけるHCV抗体保有状況についてはさらなる検討が必要と考えられる。

(5) まとめ

約40年前に発生した主としてHCVに起因する大規模な肝炎地域流行例において20年以上の長期間にわたる既往者の追跡成績から起因ウイルスの血中における動態・宿主要因と肝病態の進展との関連性を検討した。さらに地域住民のHCV抗体保有状況などから、ウイルス肝炎流行既往地区における長期予後の特徴を明らかにした。

肝機能・ZTT・アルブミン・IV型コラーゲンなど血清生化学値からみた肝病態の進展は発症から比較的早期のHCV量の増加に関連があることが示唆され、この傾向は肝癌症例においても認められた。

HCVの推移と宿主要因として発症年齢・性別との関連性について検討したが、有意な成績は得られなかった。しかし、発症早期にHCV量の増加を示すものでは男の割合が高く、性別がHCV量の推移・病態の進展に関与している可能性も考えられる。また、発症年齢に関しては、高齢の既往者は死亡等で長期追跡ができず今回の解析から除かれたものも多く、発症年齢-感染期間・加齢にともなうHCV動態および肝病態の推移については今後さらに検討を加えて行きたい。

HCV-RNAジェノタイプおよびHCVの質的変動を検討したシーケンシング解析については少数例の検索にとどまったが、ジェノタイプにおいては肝機能との関連性・型別による発症年齢の差異が示唆され、シーケンシング解析では特異的な変異の出現の可能性も予想され、今後検査例数をふやした検討を実施して行きたい。

本流行例においては約70%がHBs・HBc抗体を保有しておりHBVの重感染が認められた。HCV量の推移ではHBs・HBc抗体の有無・抗体量による差異は認められず、既往者の長期予後像への影響は少ないと考えられるが、HBs抗原Carrierにおいては多彩なHCVの推移・病態が観察された。また、HCV・HBVともに陰性であるものが追跡既往者中7.4%あり、E型肝炎ウイルスなど他の肝炎ウイルスの検索も今後の課題である。

既往者を除いた流行地域住民における検討ではHCV抗体陽性率から明らかに流行影響が示唆され、定期住民健康診査成績・受療状況・地域死亡状況などから多面的な検討を加え、長期追跡既往者の追跡成績とともに肝炎流行既往地区としての特異性を踏まえた当地域の保健福祉対策につなげて行きたいと考える。

ウイルス肝炎地域流行の研究では原因ウイルス・感染経路の特定を目的としたものが多くを占め、観察・追跡期間も短期間のものが多く、本例のように流行当時から継続して採取した既往者のみならず家族を含む地域住民の血清、問診・各種生化学データが保存されている例は皆無とあってよく、それらを用いて今回解析した20年以上にわたる既往者における起因ウイルスの動態と病態の推移の検討はウイルス肝炎地域流行例の長期予後を解明する上で貴重な知見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 若山葉子、勝又聖夫、川田智之 : HCV持続感染者におけるHCVコア抗原量の長期的観察. 肝臓 50(1) 35-37 2009
査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 若山葉子 : ウイルス肝炎流行地域住民の病因と病態の長期的観察. 第 78 回日本衛生学会総会 2008 年 3 月 29 日 (熊本)
- ② 若山葉子 : ウイルス肝炎地域流行住民の病因と病態との長期的観察. 第 72 回日本民族衛生学会総会 2007 年 11 月 9 日 (富山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若山 葉子 (WAKAYAMA YOKO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 40104062

(2) 研究分担者

勝又 聖夫 (KATSUMATA MASAO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 80169482
川田智之 (KAWADA TOMOYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

(3) 連携研究者

なし