

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305006

研究課題名(和文) 東南アジア特異に流行するHCVゲノタイプ6の多様性、感染拡大様式及び病原性の解明

研究課題名(英文) Genetic diversity and evolutionary history of HCV genotype 6 variants in Southeast Asia

研究代表者

阿部 賢治 (ABE, KENJI)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60130415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムとカンボジアにおけるHCVゲノタイプ分布は、ほぼ同じ様式を示した。つまり、両国共に3種類(1, 2, 6型)のゲノタイプが観察され、中でもゲノタイプ6バリエーションが全体の半数を占めた。ベトナムにおいて、多くのゲノタイプ6バリエーション株はベトナム固有のウイルスであると思われたが、1aは米国、1bと2aは東アジア、2i/2j/2mはフランスから各々由来したものであると思われた。更に、ベトナムに分布する4種のHCV(1a/1b/6a/6e)は、ベトナム戦争時代に急激な感染拡大が起こったものと思われた。ベトナムにおける肝癌の特徴並びに各国における非B非C型肝炎の特徴を報告した。

研究成果の概要(英文)：In Vietnam and Cambodia, we confirmed 3 different genotypes consists of genotypes 1, 2 and 6 were prevalent. In both countries, genotype 6 variants were most predominant (more than half), followed by genotype 1 and genotype 2. We identified multiple HCV lineages (6a/6e/6h/6k/6l/6o/6p) in Vietnam may represent the indigenous strains; 1a was probably introduced from the US; 1b and 2a possibly originated in East Asia; while 2i/2j/2m were likely brought by French explorers. Furthermore, we inferred the evolutionary history for four major subtypes (1a/1b/6a/6e). The obtained Bayesian Skyline Plots (BSPs) consistently showed the rapid HCV population growth from 1955 to 1963 until 1984 or after, corresponding to the era of the Vietnam War. In addition, virological and pathological characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) in Vietnam and occurrence of occult B/C infection among non-B/non-C HCC patients in various countries were reported.

研究分野：感染病理学、国際感染症学

キーワード：B型肝炎 C型肝炎 肝癌 ウイルス変異株 ウイルスゲノタイプ エマージング感染症 ベトナム 東南アジア

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

アジアはとりわけ B 型肝炎ウイルス (HBV) と C 型肝炎ウイルス (HCV) 浸淫国が多く、これが肝癌発生の最大要因となっていることから、その予防対策確立は国際保健上、緊急かつ重要な課題となっている。これら肝炎ウイルス感染の予防は、つまりは肝癌発生の予防にもつながり、その臨床的意義は大きい。一方で、成因不明の肝炎・肝癌も未だに存在し、特に東南アジア地域で多い。HBV と HCV は今までの研究から各種ゲノタイプが存在し、肝病態、治療抵抗との関連が示唆されている。特にアジア地域に流行する肝炎ウイルスは強いバリエーションを示し、病原性との関連も推察されているが、未だ不明な点が多い。また、HCV の持つ遺伝的多様性から、ワクチン開発は困難を極めている。地域特有に流行するウイルス遺伝子の特徴を明らかにして、その起源を探ることは、流行予防・診断・治療法を確立する上で、大きな意義がある。

2. 研究の目的

アジアは、肝炎ウイルス関連肝癌の多発地域であることから、ウイルス感染と肝癌との関連を詳しく解析することは、臨床的にも重要である。本研究では、東南アジアに流行する HBV と HCV ゲノムの多様性を明らかにした上で、肝病態との関連を地理病理学的、分子疫学、分子生物学的に解明することを目的とした。またこの研究に加えて、今東南アジアで流行し、エマージング感染症として臨床的に重要である疾患も併せて調査した。本研究を通じて、東南アジアにおける感染症ネットワーク網を確立し、知識技術の共有・発展を図る基盤形成を目指した。更には、発展途上国への技術移転を積極的に行い、東南アジアにおける保健医療向上に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

アジア7カ国（ベトナム、カンボジア、タイ、ミャンマー、台湾、中国、韓国）と米国の計8カ国との国際連携に基づき共同研究を実施した。参加各国の大学、医療機関の協力で得られた肝炎・肝癌患者血清および肝組織を用いて、病理、ウイルス、遺伝子診断を試みた。

4. 研究成果

(1) ベトナム、カンボジアに流行する HCV ゲノタイプの特徴

ベトナム南部のホーチミン市とカンボジアの首都プノンペン地域に流行する HCV のゲノタイプ分布を検索した。HCV ゲノタイプ同

定は、HCV NS5B 領域からデザインしたプライマーを用いた nested RT-PCR 法にてウイルス遺伝子を増幅し、その産物をシークエンスした。更に得られた塩基配列情報は米国の HCV 遺伝子データベースにアクセスし、ゲノタイプを同定した。結果は、ベトナムでは3種類の HCV ゲノタイプ (1, 2, 6 型) が観察された。内訳は、ゲノタイプ 6 バリエーションが全体の 54.4% を占め、サブタイプ 6a が 23.6%、6e が 22% と主体であった。次いでサブタイプ 1b が 17.3%、1a が 12.4% であった。一方、カンボジアでもほぼ同様で、3種類 (1, 2, 6 型) の HCV ゲノタイプが観察された。内訳は、ゲノタイプ 6 バリエーションが全体の 49.2% を占め、サブタイプ 6e が 31.8% と主体であった。次いでサブタイプ 1b が 44.4% を占めた。以上の成績から、ベトナムとカンボジア地域に流行する HCV は、ゲノタイプ 6 バリエーションが主体であり、その分布様式は両国でほぼ同様であった。供血者と肝疾患群との間におけるゲノタイプ分布に有意差は認められなかった。また、ゲノタイプ 6 には属するが、分類不能の HCV 株も少数例で観察された。

(2) ベトナムに流行する HCV の起源と感染拡大様式

236 例のベトナム人から分離された HCV の core-E1 と NS5B 領域のシークエンスと分子系統樹解析から、多くのゲノタイプ 6 バリエーション株 (6a, 6e, 6h, 6k, 6l, 6o, 6p) はベトナム固有のウイルスであると思われた。これに対し、サブタイプ 1a は米国由来、1b と 2a は東アジア由来、2i/2j/2m はフランス由来である可能性が示された。更に、ベトナムに分布する主要な 4 種の HCV (1a/1b/6a/6e) の進化史を、Bayesian skyline plot モデルで解析した結果、ベトナム戦争時代 (1955-1963 年から 1984 年頃) に急激な感染拡大が起こった可能性が示された。

(3) ベトナムにおける肝癌のウイルス学的、病理学的特徴

ベトナムでは、全癌の中で肝癌は肺癌に次いで上位 2 位を占めており、その対策は極めて重要な課題となっている。そこで、ベトナムにおける肝癌の特徴をウイルス学、病理学的に解析した。対象となったのは、総数 196 例のベトナム人肝癌患者である。外科的に切除された新鮮肝癌組織を材料にして、肝炎ウイルス感染の有無を PCR 法による高感度検出法で検索した。肝癌患者の年齢分布は、22 歳から 80 歳 (平均 53 歳)、性差は男性 4.8 : 女性 1 の比率であった。これに対し、コントロールとして調べた無症候性キャリア群 (非肝

癌患者群) 24 例 (16 歳から 79 歳 : 平均 49 歳) では、性差が 1 : 1 であった。結果は、HBV DNA が 148 例 (76%)、HCV RNA が 31 例 (16%) で肝組織中に検出された。最近の研究から、慢性肝炎にも関わっているとされる E 型肝炎ウイルス (HEV) RNA は全例で陰性であった。肝癌群において、血中の HBsAg/HBV DNA が陰性であっても、肝内 HBV DNA 陽性を示した、いわゆる occult B の症例が 18/48 例 (37.5%) と高率に認められた。この occult B は、男性 15 例に対し女性は 3 例であった。また、occult B 群の 11 例では、ELISA 法にて血中 anti-HBc 陽性 (いずれも高い OD 値) を示した。これに対して、血中 anti-HCV/HCV RNA 陰性の 165 例では、全例で肝内 HCV RNA 陰性であった。この occult B を加えると、ベトナム人の肝癌発生要因としての HBV の関与は、196 例中 163 例 (82%) にも及んだ。検出された HBV 遺伝子の pre-S1/S2 領域のシーケンスの結果、pre-S2 領域におけるウイルス遺伝子の部分欠損が 43/129 例 (33%) で観察されたのに対し、無症候性キャリア群では 1/19 例 (4.2%) のみであった ($p < 0.05$)。欠損塩基数は 3 ~ 192 塩基からなり、そのうち 30 例 (70%) は pre-S2 領域における 4 ~ 57 番目の塩基欠損であった。この領域は、小児肝癌の研究から、我々がホットスポット領域と呼称し、肝発癌に深く関わる欠損変異として重要であると報告した所見と一致する。HBV のゲノタイプを調べることが出来た肝癌群 99 例では、ゲノタイプ B4 (51 例 : 51.5%) と C1 (44 例 : 44%) が大半を占め、次いで B1 (1 例 : 1%)、B2 (3 例 : 3%) であった。これに対し無症候性キャリア群 24 例では、B4 19 例 (79%)、C1 5 例 (21%) であった。以上の成績から、HBV と HCV の関与が否定された成因不明 (非 B 非 C 型) 肝癌の症例が 196 例中 11 例 (5.6%) で存在した。病理組織学的には、非 B 非 C 型肝癌 11 例全例で肝硬変を伴っており、更には、非癌部で門脈域におけるリンパ球を主体とする慢性活動性炎症反応が出現していた。この病理所見から、何らかのウイルスの関与が強く示唆された。

(4) 7 カ国における成因不明 (非 B 非 C 型) 肝癌の特徴

本国際研究に参加した 7 カ国において、血中 HBV と HCV マーカー陰性で、臨床的に成因不明 (非 B 非 C 型) と診断された肝癌患者 (計 297 例) の肝組織を用いて、ウイルス遺伝子の肝内高感度直接検出を試みた。その結果は、occult B がいずれの国でも観察された。内訳は、日本 2/15 (6.7%)、韓国 2/53 (3.8%)、中国 4/41 (9.8%)、台湾 4/55 (7.3%)、タイ 1/14 (7.1%)、ベトナム 18/48 (37.5%)、米国 3/71 (4.2%) であった。これに対し、occult C は米国 (2/71 : 2.8%) でのみ観察された。また米国において、血中 HBsAg/anti-HCV 陰性の非アルコール性脂肪性肝疾患患者 48 例の肝組織を用いた検索では、occult C が 2 例

(4.2%) で存在した。以上の成績から、臨床的に非 B 非 C 型肝癌であると確定するには、肝組織を用いたウイルスの直接肝内検出の重要性が指摘された。肝癌における occult B/C の存在を確認することは、治療指針を図る上でも重要である。

(5) 国際連携による共同研究体制の基盤構築 :

3 年間に亘る本国際研究を通じて、ベトナム、カンボジア、タイ、ミャンマー、台湾、韓国、中国、米国の主要大学・医療機関との間で、緊密な関係を構築することができた。特にベトナム、カンボジア、タイ、ミャンマー、台湾、中国との間では、現地での感染症の病理、血清、遺伝子診断の技術・研究指導、セミナー開催などを活発に行った結果、強い相互信頼関係を築くことができた。本研究の当初の重要な目標の一つである、アジアにおける国際連携に基づく感染症分野での国際共同研究体制の基盤を構築することができた。今後の国際研究活動に活用して行きたい。

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 9 件)

1. Wang H, Yuan Z, Barnes E, Yuan M, Li C, Fu Y, Xia X, Li G, Newton P, Vongsouvath M, Klenerman P, Pybus OG, Murphy D, Abe K, Lu L: Eight novel hepatitis C virus genomes reveal the changing taxonomic structure of genotype 6. *Journal of General Virology* 94: 76-80, 2013 (doi: 10.1099/vir.0.047506-0)
2. Van Hung Pham, Thong Van Nguyen, Truc Thanh Thi Nguyen, Linh Duy Dang, Ngoc Hieu Hoang, Truong Van Nguyen, Kenji Abe: Rubella epidemic in Vietnam: Characteristic of rubella virus genes from pregnant women and their fetuses/newborns with congenital rubella syndrome. *Journal of Clinical Virology* 57: 152-156, 2013 (doi: 10.1016/j.jcv.2013.02.008)
3. Natalia Freitas, Kenji Abe, Celso Cunha, Stephan Menne, Severin O. Gudima: Support of the infectivity of hepatitis delta virus particles by the envelope proteins of different genotypes of hepatitis B virus. *Journal of Virology* 88: 6255-6267, 2014 (doi:10.1128/JVI.00346-14)
4. Huy Tran, Ming-Lung Yu, Chia-Yen Dai, I-Ling Lin, Ming-Lun Yeh, Wan-Long

- Chuang, Kenji Abe: Novel quasi-subgenotype D2 of hepatitis B virus identified in Taiwanese aborigines. *Virus Genes* 49: 30-37, 2014 (doi: 10.1007/s11262-014-1072-x)
5. Chunhua Li, Manqiong Yuan, Ling Lu, Teng Lu, Wenjie Xia, Van H. Pham, An X.D. Vo, Mindie H. Nguyen, Kenji Abe: The genetic diversity and evolutionary history of hepatitis C virus in Vietnam. *Virology* 468-470: 197-206, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.026>)
 6. Chunhua Li, Van H. Pham, Kenji Abe, Ling Lu: Nine additional complete genome sequences of HCV genotype 6 from Vietnam including new subtypes 6xb and 6xc. *Virology* 468-470: 172-177, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.006>)
 7. Van H. Pham, Diem P.H. Nguyet, Khanh N.H. Mai, Khanh H. Truong, Loc V. Huynh, Trang H.T. Pham, Kenji Abe: Measles epidemics among children in Vietnam: Genomic characterization of virus responsible for measles outbreak in Ho Chi Minh City, 2014. *EBioMedicine* 1: 133-140, 2014 (DOI:10.1016/j.ebiom.2014.10.015)
 8. Thong Van Nguyen, Van Hung Pham, Kenji Abe: Pathogenesis of congenital rubella virus infection in human fetuses: Viral infection in the ciliary body could play an important role in cataractogenesis. *EBioMedicine* 2: 59-63, 2015 (DOI:10.1016/j.ebiom.2014.10.021)
 9. Utako Ohba, Yuhki Koga, Takayuki Hoshina, Aiko Suminoe, Kenji Abe, Makoto Hayashida, Tomoaki Taguchi, Toshiro Hara: An adolescent female having hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype H with a deletion mutation in the pre-S2 region. *Journal of Infection and Chemotherapy* 21: 302-304, 2015 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.10.015>)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 大場詩子、古賀友紀、住江愛子、保科隆之、阿部賢治、原寿郎: Pre-S2 遺伝子部分欠損を伴ったゲノタイプ H の HBV 感染により肝細胞癌を発症した 12 歳女児例. 第 30 回日本小児肝臓研究会、2013 年 7 月、大宮
2. Kenji Abe: Invited lecture: Rubella outbreak among children in Vietnam: Molecular characterization of virus and its pathogenesis in human fetuses. 2nd Conference on International Asian Pediatric Infectious Diseases, June 20, 2015, Tokyo, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 賢治 (ABE KENJI)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官
研究者番号: 60130415