



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1552号
学位記番号	第1107号
氏名	都築 祐二
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	Virological characteristics of hepatitis B genotype G/A2 recombination virus in Japan (日本国内における HBV ゲノタイプ G/A2 組み換え体のウイルス学的特徴) Hepatology Research. Vol. 46(8) : P.775-783, 2016
論文審査担当者	主査： 城 卓志 副査： 岡本 尚, 田中 靖人

論文内容の要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は、8つの遺伝子型 (A-H) が同定されており、ウイルス学的な特徴や病態の進行、治療効果が異なることが報告されている。HBV genotype G (HBV/G) は、他の遺伝子型と異なり Core 領域に 36 塩基の挿入を持つ。さらに同一患者内に他の HBV 遺伝子型、特に HBV genotype A (HBV/A) が共感染していることが多い。今回我々は、日本人同性愛者 (MSM) から HBV/G と HBV/A のリコンビナントウイルス (HBV/G/A) 感染例を経験した。臨床的・ウイルス学的な解析を実施したので報告する。

遺伝子型の判定(EIA 法)で HBV/A と判定され、HBV/G 特異的 PCR にて陽性となった 4 例が発見された。全例 MSM (1 例未検査を除き、HIV 感染者)、都市圏 (東京都・神奈川県・愛知県) 在住の 26~35 歳、日本人男性であった。

患者血清より HBV DNA を抽出し、ウイルスの全塩基配列の決定および系統樹・Simplot 解析を行った。さらに、培養細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* と、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた *in vivo* 実験で HBV 複製能を検討した。

全塩基配列を決定、4 例の塩基配列を比較すると、相同性は 99%以上と非常に高かった。系統樹解析では、全例同一のクラスターを形成したが、HBV/G や HBV/A とは異なるクラスターに分類された。次に、相同組み換えを確認するため Simplot 解析を行うと、preS2/S 領域が HBV/A、それ以外の領域が HBV/G であることが分かった。preS2/S 領域とそれ以外の領域を分けて系統樹解析を行うと、preS2/S 領域は HBV/A2 に、それ以外は HBV/G と同一のクラスターを形成した。さらに、HBV/G の特徴である Core 領域に特異的な 36bp の塩基挿入および 2 つの stop codon を持ち、組み換え体 (HBV/G/A2) であることが判明した。すでに国内で報告のある HBV/G/A リコンビナント株の一部とも類似していた。クローニングでは、組み換えのない HBV/A のクローンも検出され、HBV/G/A2 との共感染であることが判明した。

1.24 倍長 HBV クローンを作成し、培養細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* では、HBV/G 同様に複製が認められた。ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV 感染後の血中 HBV DNA の経時推移を検討した。HBV/G/A2 リコンビナント単独では血中 HBV DNA が確認できなかった。HBV/A を重感染させることで HBV DNA の上昇がみられ、ウイルス血症を呈した。感染初期は HBV/A、後期にはリコンビナントが大部分を占めていた。この結果より、HBV/G/A2 リコンビナントは複製を行い、感染することが証明された。

本研究は、4 症例の遺伝学的特徴を検討した結果、HBV/G と HBV/A2 の組み換えウイルスであり、HBV/G の特徴 (Core 領域に特異的な 36bp の塩基挿入および 2 つの stop codon) を持つことが判明した。さらに、Huh7 を用いた *in vitro* および、キメラマウスを用いた *in vivo* で、ウイルス学的特徴を検討し、複製能を有すること、感染には HBV/G と同様に HBV/A の共感染が必要であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

HBV genotype G (HBV/G) は、Core 領域に 36 塩基の挿入を持ち、さらに HBV genotype A (HBV/A) が共感染していることが多い。今回申請者らは、日本人同性愛者 (MSM) から HBV/G と HBV/A のリコンビナントウイルス (HBV/G/A) 感染例を報告した。遺伝子型検査で HBV/A と判定され、HBV/G 特異的 PCR にて陽性となった 4 例は、MSM (1 例未検査を除き、HIV 感染者)、都市圏 (東京都・神奈川県・愛知県) 在住の日本人男性であった。ウイルスの全塩基配列の決定および系統樹・Simplot 解析を行った結果、4 例の塩基配列の相同性は 99% 以上と非常に高く、系統解析では HBV/G や HBV/A とは異なるクラスターに分類された。次に、相同組み換えを確認するため Simplot 解析及び系統解析を行うと、preS2/S 領域が HBV/A、それ以外の領域が HBV/G であることが分かった。すなわち、今回分離された株は HBV/G の特徴である Core 領域に特異的な 36bp の塩基挿入および 2 つの stop codon を有する組み換えウイルス (HBV/G/A2) であることが判明した。興味深いことに、組み換えのない HBV/A のクローンも検出されており、HBV/A との共感染であることがわかった。次に、1.24 倍長 HBV クローンを作成し、組み換えウイルスの複製を *in vitro* で確認したところ、HBV/G 同様に複製が認められたので、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV 感染後の血中 HBV DNA の経時推移を検討した。HBV/G/A2 リコンビナント単独では血中 HBV DNA が確認できなかったが、HBV/A を重感染させることで HBV DNA の上昇がみられ、ウイルス血症を呈した。感染初期は HBV/A、後期には HBV/G/A2 リコンビナントが大部分を占めていた。

本研究は、異なる地域から分離された HBV/G と HBV/A2 の組み換えウイルスの特徴を明らかにした。1) HBV/G の特徴 (Core 領域に特異的な 36bp の塩基挿入および 2 つの stop codon) を持つ。2) preS2/S 領域において HBV/A との遺伝子組み換えがみられる。3) HBV/A との共感染がみられる。4) *in vitro* 培養系でウイルス複製がみられたが、*in vivo* キメラマウス試験では、HBV/G/A2 リコンビナント単独では増殖できず、HBV/A との共感染が必要であることが証明された。

審査委員会では、主査の城教授より、組み換えウイルスができるメカニズムや HBV/A 以外の遺伝子型と共感染可能であるか、遺伝子型毎に病態が違う理由など分子生物学的および臨床との関連について 5 項目の質問があった。第一副査の岡本教授より HBV/G の複製能、組み換え解析を解析する手法の原理について、組み換えウイルスができる要因について、個体内で組み換えウイルスが優位になる理由など論文の背景・方法・結果・考察に関する 10 項目の質問があった。第二副査の田中教授より HBV の治療法や完治しない理由、ユニバーサル HB ワクチン及びインフルエンザの予防や治療、判定方法など専門領域に関する 4 項目の質問があった。一部の質問に対して窮する場面もあったが、本論文については十分に理解し概ね良好な回答が得られ、医学的な知識を習得していると判断された。本研究では、組み換えウイルスのウイルス学的特徴を明らかにし、大都市圏の MSM 集団で組み換えウイルスが伝播し、通常の遺伝子型判定だけでは見逃してしまうことについて注意喚起する点で、臨床的にも意義のある研究と考えられた。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 城 卓志 副査 岡本 尚 田中 靖人