

## B型慢性肝炎患者におけるHBV X-precore領域の変異 についての検討

李, 文

九州大学大学院医学研究院臓器機能医学部門内科学講座感染環境医学分野

<https://doi.org/10.15017/7218237>

---

出版情報：福岡醫學雜誌. 92 (6), pp.225-235, 2001-06-25. Fukuoka Medical Association  
バージョン：  
権利関係：



## 原 著

## B 型慢性肝炎患者における HBV X-precore 領域の変異についての検討

九州大学大学院医学研究院臓器機能医学部門内科学講座  
感染環境医学分野 (指導: 柏木征三郎教授)

李 文

Nucleotide Sequence Analysis of the Hepatitis B Virus  
X-Precore Region in Chronic Hepatitis B

Wen Li

Department of Environmental Medicine and Infectious Diseases (Director : Prof. S. Kashiwagi)  
Faculty of Medical Sciences Kyushu University, Fukuoka, 812-8582 Japan

**Abstract** In chronic hepatitis B virus (HBV) infection, hepatitis B e antigen (HBeAg) is seroconverted from positive to negative. HBeAg is associated with active replication of the HBV and a high disease activity. To elucidate the relation between HBV X-precore region mutation and HBeAg status, HBV replication and liver function were surveyed in chronic hepatitis B patients. HBV DNA was isolated from fifteen serum samples of seven patients with chronic hepatitis B, and the X-precore region was amplified by PCR and sequenced. Each sequence was compared with the consensus sequence of each patient. The most frequently observed mutations were A to T at nt. 1762 and G to A at nt. 1764 in the core promoter region and G to A at nt. 1896 in the precore region. These mutations were more commonly found in HBeAg-negative serum samples than in HBeAg-positive ( $p < 0.001$ , respectively). Of 7 serum samples with the wild type or wild/mutant mixed type in the precore region, 6 were HBeAg-positive and had a high HBV DNA polymerase (DNA-p) activity and serum alanine aminotransferase (ALT) elevation. On the other hand, 6 serum samples with the mutant type only were HBeAg-negative and had a low DNA-p activity and normal ALT level. Interestingly, 2 serum samples with the mutant type only had a high DNA-p activity and serum ALT elevation, despite being HBeAg-negative. Core promoter region mutation was not associated with HBV markers or serum ALT level.

In conclusion, mutation at nt. 1896 in the precore region causes seroconversion from HBeAg-positive to -negative and is accompanied by reductions of viral replication and hepatitis activity.

**Key words** : hepatitis B virus, mutations, precore region, core promoter region, X region

## 序 文

B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus ; HBV) には一過性感染のほかに持続感染が存在する。特に 4 歳以下で感染すると持続感染が成立し、いわゆる carrier となる場合があり<sup>7)10)</sup>, それらの一部は慢性肝炎, 肝硬

変, さらに肝臓へ進行することが知られている。本邦での原発性肝臓の約 15%はこの HBV 持続感染者からと考えられている<sup>8)</sup>。また, HBV 感染の自然経過として, 血清学的に Hepatitis B e antigen (HBeAg) が検出される時期から, 検出されなくなる時期に移行する。HBeAg 陽性から陰性へ (seroconversion) の機

序としてウイルス学的に HBV の遺伝子配列の変異との関連が指摘されており<sup>2)4)17)19)</sup>, その遺伝子変異とウイルス学的活性および臨床像との関連が注目されている。一般的に, HBeAg 陽性時期は HBV の増殖が盛んなため, 血清中のウイルス量が多く, 肝炎の活動性が高いのに対して, seroconversion 後ではウイルス量は減少し肝炎は鎮静化する<sup>11)</sup>。しかし, HBeAg 陰性でも肝炎が持続する例もあり, 血清学的検討だけでは病態を予測することが困難な場合が多い。

HBV の X 領域遺伝子は, X 蛋白をコードするほかに, 2 つの enhancer 領域と core promoter 領域を含んでおり, この領域遺伝子の後半にある 88 塩基から成る領域は, 単独で enhancer 活性を有し, 一部分は core promoter 領域と重複している。core promoter 領域は precore mRNA の転写を調節することが報告されており<sup>3)21)</sup>, enhancer 領域と core promoter 領域が重複している部分である 1741-1777 番塩基に変異が集中していることが観察されている<sup>6)17)20)</sup>。この core promoter 領域の 1762 番塩基の A から T への変異と, 1764 番塩基の G から A への変異が, 肝炎の重症化との関連性があるとされている<sup>11)21)24)</sup>。しかし, その後の報告では, 逆に関連がないとの報告もあり<sup>5)</sup>, それらの変異と病態との係わりに関しては, まだ一定の見解は得られていない。

従来 X-precore 領域遺伝子の変異についての検討の多くは, 塩基配列の決定に direct sequence 法が用いられているが, この場合は検体中で優勢な塩基配列のみが得られ, 少数のウイルスにみられる変異や, 血清中の HBV の多様性についての検討はできない。このため本研究では, B 型慢性肝炎患者の 1 血清検体より HBV X-precore 領域の PCR 産物の cloning と塩基配列の決定を行い, HBV の変異および同一検体中のウイルスの多様性と慢性肝炎の病態との関連について検討した。

### 対象と方法

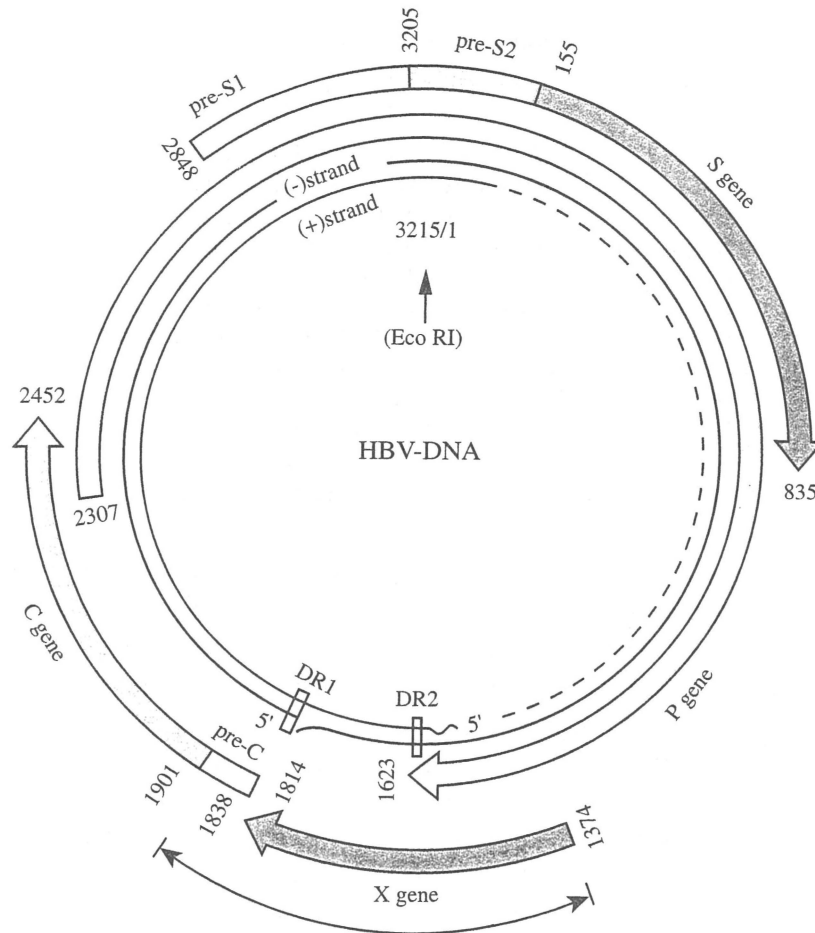
九州大学総合診療部を受診し, ウイルス遺伝子解析への同意が得られた B 型慢性肝炎患者 7 例より得られた血清 15 検体を対象として用いた。対象患者 7 例中 3 例は観察期間中 HBeAg が持続的に陽性で, 2 例は持続的に HBeAg 陰性であった。残り 2 例は観察中, HBeAg 陽性から陰性へと変化した (Table 1)。血清 alanine aminotransferase (ALT) 値は 36 IU/L 以下を正常とし, HBV DNA polymerase 活性 (DNA-p) は 30 cpm/ml 以下を正常とした。

血清中 HBV DNA の抽出には IsoQuick nucleic acid extraction kit (MicroProbe, USA) を用いて行った。血清 100  $\mu$ l から抽出された DNA 溶液 50  $\mu$ l のう

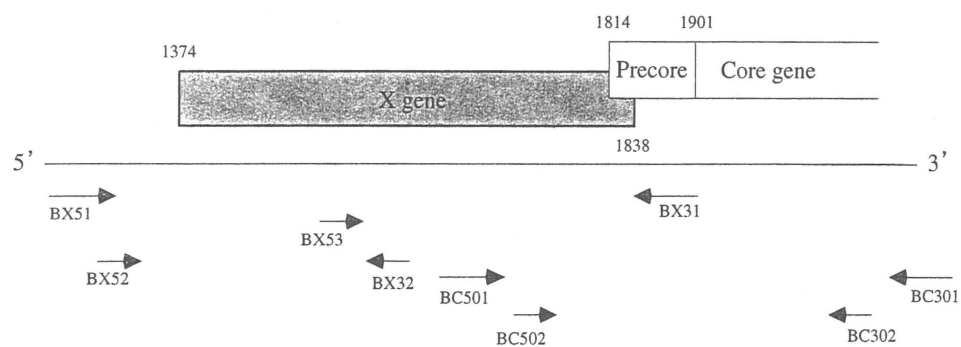
**Table 1** Clinical and laboratory data in serum samples from patients with chronic hepatitis B

| Case | Age | Sex | Sampling date | Samples | HBeAg | ALT (IU/L) | DNA-p (cpm/ml) |
|------|-----|-----|---------------|---------|-------|------------|----------------|
| 1    | 31  | F   | Apr, 1995     | 1-1     | +     | 78         | 1505           |
| 2    | 46  | M   | Apr, 1995     | 2-1     | +     | 54         | 1703           |
| 3    | 46  | M   | Jan, 1991     | 3-1     | +     | 250        | 1986           |
|      |     |     | Apr, 1995     | 3-2     | +     | 102        | 51             |
| 4    | 69  | M   | Jan, 1994     | 4-1     | -     | 21         | 10             |
|      |     |     | Apr, 1995     | 4-2     | -     | 743        | 984            |
| 5    | 19  | M   | Jul, 1994     | 5-1     | -     | 30         | 3              |
|      |     |     | Jan, 1995     | 5-2     | -     | 206        | 6              |
|      |     |     | Mar, 1996     | 5-3     | -     | 32         | 20             |
| 6    | 27  | F   | Jan, 1995     | 6-1     | +     | 94         | 733            |
|      |     |     | Apr, 1995     | 6-2     | -     | 12         | 30             |
|      |     |     | Oct, 1996     | 6-3     | -     | 11         | 5              |
| 7    | 47  | M   | Oct, 1994     | 7-1     | +     | 1273       | 1876           |
|      |     |     | Mar, 1995     | 7-2     | -     | 126        | 110            |
|      |     |     | Nov, 1995     | 7-3     | -     | 181        | 2055           |

A.



B.



**Fig. 1** Map of HBV DNA and primer locations for HBV amplification.  
 A: Map of HBV DNA. The studied X and precore genes are indicated by ( $\leftrightarrow$ ).  
 B: Map of the X and precore genes and primer locations for HBV amplification.  
 HBV DNA fragments amplified by the first and second PCR are indicated at the bottom.

Table 2 PCR primer sequence

| Primer name | Sequence (5' to 3')    | Nucleotide position |
|-------------|------------------------|---------------------|
| BX51 (+)    | CCATACTGCGGAACCTCCTAGC | 1266-1286           |
| BX31 (-)    | TTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTG | 1817-1838           |
| BX52 (+)    | TTTGCTCGCAGCCGGTCTGGA  | 1294-1314           |
| BX32 (-)    | CGGCAGATGAGAAGGCACAGA  | 1552-1572           |
| BX53 (+)    | ACCTCTCTTTACGCGGTCTCC  | 1528-1548           |
| BX31 (-)    | TTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTG | 1817-1838           |
| BC501 (+)   | CATAAGAGGACTCTTGACTC   | 1653-1673           |
| BC301 (-)   | ACATAACTGACTACTAGGTCC  | 2146-2166           |
| BC502 (+)   | GTTTGTTTAAGGACTGGGAGG  | 1717-1737           |
| BC302 (-)   | TGCTTGCCTGAGTGCAGTATG  | 2054-2074           |

+, sense; -, antisense.

Nucleotide position of HBV adr (GenBank accession no. X 75665)<sup>19)</sup>.

ち 2-15  $\mu$ l を template として, X-precore 各領域を 3 つの部分に分けて, nested PCR により増幅した. PCR に使用したプライマーの部位を Fig. 1 に, その塩基配列を Table 2 に示す. 増幅条件は, 94°C 1 分の熱処理後, 94°C 1 分, 54°C 1 分, 72°C 1 分のサイクルを 30 回行った. 次いで first PCR 産物 25  $\mu$ l 中の 3  $\mu$ l を用いて, second PCR を上述と同じ条件で行った. PCR 反応には TaKaRa Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Kyoto) を使用した. PCR 産物の確認は 1.5% アガロースゲルで電気泳動後エチジウムブロマイド染色により行った.

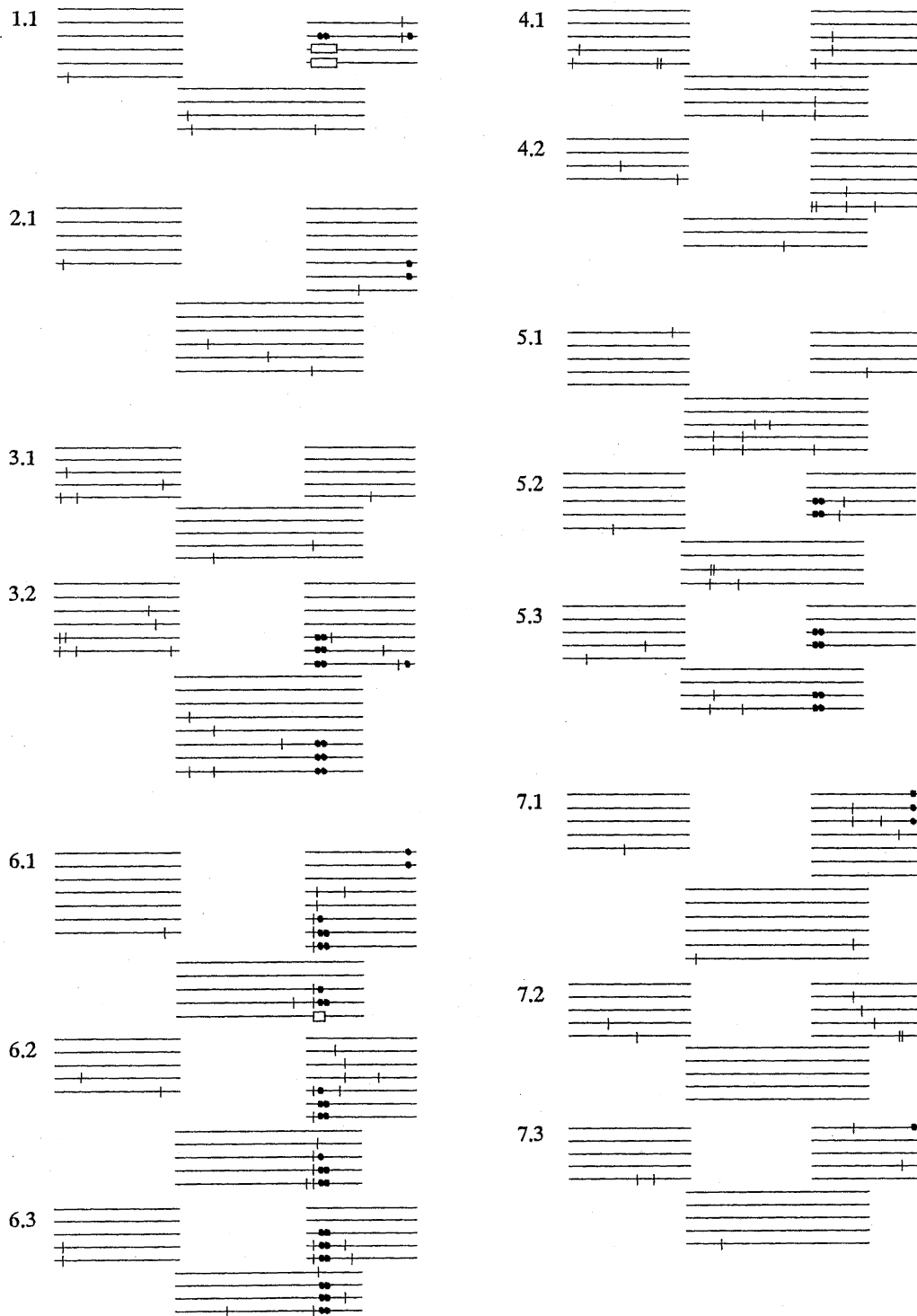
Second PCR 産物を DNA ligation kit (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Kyoto) を用いて PT7 blue T vector (Novagen Inc, USA) に挿入し, 大腸菌を用いて cloning を行った. 各血清から得られた複数のコロニーより, それぞれ, QIAprep spin plasmid column kit (QIAGEN, Germany) を用いて plasmid DNA を抽出した. FITC labeled primer および 7-deaza thermosequence kit (Amersham, UK) を用いてシークエンス反応を行い, automatic sequencer (Shimazu Co., Ltd., Kyoto) にて, それらの塩基配列を決定した. 個人から得られた塩基配列より個人のコンセンサスを作り, このコンセンサスと各塩基配列の差異より各血清中の HBV の変異率を求めた.

## 成 績

B 型慢性肝炎患者 7 例より得られた 15 血清検体の

X-precore 領域の 527 塩基 (nt. 1374-nt. 1900) について 234 配列を決定した. 各塩基配列における各患者のコンセンサスからの変異の分布を Fig. 2 に示した. 全 50730 塩基中, 194 個の変異がみられた. core promoter 領域を含む X 領域全体の変異率は, 0-0.81% で, 平均は  $0.40 \pm 0.22\%$  であり, precore 領域の変異率は, 0-0.88% に分布しており, 平均は  $0.31 \pm 0.30\%$  であった. 同一症例の各検体間の X-precore 領域の変異率には有意な差はみられなかった (Table 3). 変異が高頻度に検出された部位は, core promoter 領域の 1762 番塩基と 1764 番塩基および precore 領域の 1896 番塩基であった. これら以外の変異は 62 ケ所にみられたが, いずれも低頻度で, 特定の部位への集中はみられなかった. 3 検体以上でみられた変異は, 1407 番塩基の 1 ケ所のみで, 各検体で 1 配列ずつしか認められず, 2 検体以上でみられた変異でも, 各検体で優勢となっている変異はなかった. 8 塩基と 18 塩基の欠失がそれぞれ 1 検体にみられたが, その塩基は 1 検体に 1 配列か 2 配列しかみられなかった (Table 4).

変異が集中していた 1762 番塩基, 1764 番塩基および 1896 番塩基について, 各血清検体における wild type と mutant type の数を Table 5 に示した. core promoter 領域については, 1762 番塩基が A である塩基配列を wild type, T である塩基配列を mutant type とし, 1764 番塩基が G である塩基配列を wild type, A である塩基配列を mutant type とし<sup>3)</sup>, precore 領域については 1896 番塩基が G である塩基配列を wild



**Fig. 2** Various mutations in the X-precore region of HBV clones from patients with chronic hepatitis B. Sequences different from the consensus are indicated by solid vertical lines. The core promoter region at nts. 1762, 1764 and the precore region at nt. 1896 different from the consensus sequences are indicated by (●). (□) indicates nucleotide sequence deletion.

**Table 3** The nucleotide sequence divergence rate in the X-precore regions in serum samples of chronic hepatitis B patients

| Case    | Samples | Divergence rate (%) |                         |
|---------|---------|---------------------|-------------------------|
|         |         | X (nt. 1374-1838)   | precore (nt. 1814-1900) |
| 1       | 1-1     | 0.23                | 0.67                    |
| 2       | 2-1     | 0.16                | 0.48                    |
| 3       | 3-1     | 0.26                | 0.22                    |
|         | 3-2     | 0.63                | 0.47                    |
| 4       | 4-1     | 0.40                | 0.00                    |
|         | 4-2     | 0.35                | 0.19                    |
| 5       | 5-1     | 0.34                | 0.27                    |
|         | 5-2     | 0.46                | 0.00                    |
|         | 5-3     | 0.55                | 0.00                    |
| 6       | 6-1     | 0.48                | 0.28                    |
|         | 6-2     | 0.81                | 0.00                    |
|         | 6-3     | 0.80                | 0.00                    |
| 7       | 7-1     | 0.16                | 0.79                    |
|         | 7-2     | 0.24                | 0.88                    |
|         | 7-3     | 0.17                | 0.44                    |
| mean±SD |         | 0.40±0.22           | 0.31±0.30               |

type, Aである塩基配列を mutant type とした<sup>2)4)13)</sup>. 同一検体の core promoter 領域の 1762 番塩基と 1764 番塩基については, 一方が wild type のみであれば他方も wild type のみであり, 一方が mutant type のみであれば, 他方も mutant type のみと, 塩基配列の type が一致していた. HBeAg 陽性 6 検体では 1 検体 (No. 3-1) が core promoter および precore 領域とも wild type であった. 残り 5 検体の precore 領域はいずれも wild および mutant type の混合型で, core promoter 領域が wild type が 1 検体 (No. 2-1), mutant type が 1 検体 (No. 7-1), 混合型が 3 検体 (No. 1-1, 3-2, 6-1) であった. HBeAg 陰性 9 検体の precore 領域は, 8 検体が mutant type で, core promoter は wild type が 1 検体 (No. 5-1), mutant type が 3 検体 (No. 4-1, 4-2, 7-2), 混合型が 4 検体 (No. 5-2, 5-3, 6-2, 6-3) であった. 残り 1 検体は No. 7-3 で, core promoter 領域は mutant type であったが, 同一症例での HBeAg 陽性時期である No. 7-1 と同じ sequence パターンであった.

全 15 検体において, 解析した全塩基配列における HBeAg 陽性/陰性別の wild type sequence の頻度を Table 6 に示す. wild type がみられたのは 1762 番塩基では HBeAg 陽性検体では 73 配列中 48 配列,

65.8%で, HBeAg 陰性検体では 84 配列中 28 配列, 33.3%であり, 1764 番塩基では, HBeAg 陽性検体では 73 配列中 50 配列, 68.5%で, HBeAg 陰性の検体では 84 配列中 30 配列, 35.7%であった. precore 領域の 1896 番塩基では, HBeAg 陽性検体で 39 配列中 25 配列, 64.1%で, HBeAg 陰性検体では 45 配列中 1 配列, 2.2%であった. HBeAg 陽性検体では 3 領域全てにおいて, HBeAg 陰性検体に比較して有意に wild type sequence が高頻度であった (それぞれ,  $p < 0.001$ ).

各血清の core promoter 領域の 1762 番塩基, 1764 番塩基および precore 領域の 1896 番塩基の type と, HBeAg, DNA-p および血清 ALT 値との関連について Table 7 に示した. precore 領域が wild type のみあるいは混合型の 7 検体では, 検体 No. 7-3 を除いた 6 検体では HBeAg 陽性であり, DNA-p も陽性で, 血清 ALT 値も高値を示した. 一方, precore 領域が mutant type のみの 8 検体では全検体が HBeAg 陰性で, このうち 6 検体が DNA-p 陰性であり, この 6 検体のうち検体 No. 5-2 を除いた 5 検体が血清 ALT 値も正常であった. 検体 No. 4-2 および No. 7-2 は core promoter 領域も mutant type のみであったが, DNA-p 陽性であり, 血清 ALT 値も高値を示してい

**Table 4** List of nucleotide mutations found in the HBV X-precore regions except at nt. 1762, nt. 1764, and nt. 1896 in serum samples from chronic hepatitis B patients

| Nucleotide position | Mutation | Sample found  | No. mutated/<br>No. sequences | Nucleotide position | Mutation | Sample found  | No. mutated/<br>No. sequences |
|---------------------|----------|---------------|-------------------------------|---------------------|----------|---------------|-------------------------------|
| 1383                | A to C   | 4.1           | 1/5                           | 1678                | C to T   | 4.2           | 1/3                           |
|                     | C to A   | 6.3           | 2/5                           |                     |          | 5.1           | 1/5                           |
| 1396                | G to A   | 2.1           | 1/4                           | 1722                | T to C   | 3.2           | 1/8                           |
|                     |          | 3.1, 3.2      | 1/5, 2/6                      | 1724                | T to C   | 6.1           | 1/5                           |
| 1407                | G to T   | 1.1           | 1/6                           | 1748                | G to A   | 4.2           | 1/9                           |
|                     |          | 4.1           | 1/5                           | 1750                | A to G   | 5.1           | 1/9                           |
|                     |          | 3.1, 3.2      | 1/5, 1/6                      | 1752                | A to G   | 3.1           | 1/10                          |
| 1426                | T to C   | 5.3           | 1/5                           |                     |          | 6.2           | 1/12                          |
|                     |          | 6.2           | 1/5                           | 1753                | T to C   | 4.1           | 3/9                           |
| 1430                | C to T   | 3.1, 3.2      | 1/5, 1/6                      |                     |          | 6.1, 6.2, 6.3 | 5/13, 5/12, 3/9               |
| 1439                | C to A   | 7.2           | 1/5                           |                     | 18bp del | 1.1           | 2/9                           |
| 1465                | C to T   | 5.2           | 1/5                           | 1756                | G to A   | 4.2           | 1/9                           |
|                     |          | 7.1           | 1/5                           | 1758                | T to C   | 1.1           | 1/9                           |
| 1479                | A to C   | 4.2           | 1/5                           |                     |          | 6.1, 6.2, 6.3 | 2/13, 1/12, 1/9               |
| 1497                | T to G   | 4.1           | 1/5                           | 1765                | T to C   | 4.1, 4.2      | 2/9, 1/9                      |
|                     | T to C   | 7.2, 7.3      | 1/5, 1/5                      | 1768                | 8bp del  | 6.1           | 1/13                          |
| 1499                | A to G   | 4.1           | 1/5                           | 1770                | G to C   | 2.1           | 1/13                          |
| 1504                | G to T   | 5.3           | 1/5                           |                     |          | 6.2           | 1/12                          |
|                     |          | 7.3           | 1/5                           | 1773                | C to T   | 6.2           | 1/12                          |
| 1505                | C to A   | 3.2           | 1/6                           | 1780                | G to A   | 4.2           | 1/9                           |
| 1515                | G to A   | 3.2           | 1/6                           |                     |          | 5.2           | 1/8                           |
| 1527                | C to A   | 6.1, 6.2      | 1/7, 1/5                      | 1783                | G to A   | 5.2           | 1/8                           |
| 1528                | A to G   | 4.2           | 1/4                           | 1785                | A to G   | 6.2           | 1/12                          |
|                     |          | 3.1           | 1/5                           | 1795                | T to A   | 6.3           | 1/9                           |
| 1529                | C to T   | 5.1           | 1/5                           | 1800                | T to C   | 6.1, 6.2, 6.3 | 1/13, 2/12, 2/9               |
| 1533                | T to C   | 3.2           | 1/6                           |                     | C to T   | 7.1, 7.2, 7.3 | 3/13, 1/10, 1/10              |
| 1551                | G to T   | 7.1           | 1/11                          | 1809                | G to A   | 3.2           | 1/15                          |
| 1561                | T to C   | 1.1           | 1/4                           | 1815                | T to C   | 5.1           | 1/9                           |
| 1574                | T to A   | 3.2           | 2/8                           | 1816                | G to A   | 2.1           | 1/13                          |
| 1578                | T to C   | 1.1           | 1/4                           | 1824                | T to G   | 7.2           | 1/5                           |
| 1611                | G to A   | 7.3           | 1/5                           | 1834                | C to A   | 7.2           | 1/5                           |
| 1613                | A to G   | 2.1           | 1/6                           | 1835                | C to T   | 4.2           | 1/6                           |
|                     |          | 5.1, 5.2, 5.3 | 2/5, 1/4, 1/4                 | 1836                | T to G   | 3.1           | 1/5                           |
| 1614                | A to C   | 5.2           | 1/4                           | 1843                | C to A   | 3.2           | 1/7                           |
| 1615                | C to G   | 6.3           | 1/4                           | 1846                | T to A   | 1.1           | 2/4                           |
| 1617                | A to G   | 5.2, 5.3      | 1/4, 1/4                      |                     | A to T   | 7.1           | 1/7                           |
| 1647                | G to C   | 4.1           | 1/4                           | 1858                | T to A   | 7.2           | 1/5                           |
|                     |          | 3.1, 3.2      | 1/5, 2/8                      | 1859                | A to T   | 7.2           | 1/5                           |
| 1652                | G to A   | 5.1, 5.2, 5.3 | 2/5, 1/4, 1/4                 | 1866                | A to C   | 7.3           | 1/5                           |
| 1661                | G to A   | 5.1           | 1/5                           | 1873                | C to G   | 7.1           | 1/7                           |
| 1674                | T to C   | 2.1           | 1/6                           | 1887                | G to A   | 3.2           | 1/7                           |

del: deletion.

た。HBeAg 陽性から HBeAg 陰性への seroconversion を観察できた 2 症例 No. 6 および No. 7 では、precore 領域の塩基配列は HBeAg 陽性時期から wild

および mutant type の混合型であった。また、症例 No. 3 では 1991 年から 1995 年にかけて HBeAg は持続陽性であったが、core promoter および precore のふた

**Table 5** The ratio of wild to mutant type sequences at nt. 1762 and nt. 1764 in the core promoter and at nt. 1896 in the precore region of HBV DNA from the serum samples of 7 patients with chronic HBV infection

| Sample | HBeAg | No. of wild type sequence / No. of mutant type sequence |          |          |
|--------|-------|---------------------------------------------------------|----------|----------|
|        |       | nt. 1762                                                | nt. 1764 | nt. 1896 |
| 1-1    | +     | 9/1                                                     | 9/1      | 4/1      |
| 2-1    | +     | 13/0                                                    | 13/0     | 5/2      |
| 3-1    | +     | 10/0                                                    | 10/0     | 5/0      |
| 3-2    | +     | 9/6                                                     | 9/6      | 6/1      |
| 4-1    | —     | 0/9                                                     | 0/9      | 0/5      |
| 4-2    | —     | 0/9                                                     | 0/9      | 0/6      |
| 5-1    | —     | 9/0                                                     | 9/0      | 0/4      |
| 5-2    | —     | 6/2                                                     | 6/2      | 0/4      |
| 5-3    | —     | 4/4                                                     | 4/4      | 0/4      |
| 6-1    | +     | 7/5                                                     | 9/3      | 2/6      |
| 6-2    | —     | 6/6                                                     | 8/4      | 0/7      |
| 6-3    | —     | 3/6                                                     | 3/6      | 0/5      |
| 7-1    | +     | 0/13                                                    | 0/13     | 3/4      |
| 7-2    | —     | 0/10                                                    | 0/10     | 0/5      |
| 7-3    | —     | 0/10                                                    | 0/10     | 1/4      |

wild type ; nt. 1762 → A, nt. 1764 → G, nt. 1896 → G

mutant type ; nt. 1762 → T, nt. 1764 → A, nt. 1896 → A

**Table 6** The rate of wild type sequences in the core promoter region (nt. 1762, nt. 1764) and the precore region (nt. 1896) by HBeAg status in serum samples from chronic hepatitis B patients

| HBeAg | nt. 1762      |                        | nt. 1764      |                        | nt. 1896      |                        |
|-------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|
|       | no. sequences | wild type (%)          | no. sequences | wild type (%)          | no. sequences | wild type (%)          |
| +     | 73            | 48 (65.8) <sup>a</sup> | 73            | 50 (68.5) <sup>c</sup> | 39            | 25 (64.1) <sup>e</sup> |
| —     | 84            | 28 (33.3) <sup>b</sup> | 84            | 30 (35.7) <sup>d</sup> | 45            | 1 (2.2) <sup>f</sup>   |

a vs b, c vs d, e vs f;  $p < 0.001$  by the  $X^2$  test

つの領域で wild type から混合型への変化がみられた。

### 考 察

本研究で行った HBV 遺伝子の X から precore 全領域の sequence の成績から、個体内の HBV の X および precore 領域は比較的変異を起こしにくいことが判明したが、その中でも core promoter 領域の 1762 番塩基と 1764 番塩基および precore 領域の 1896 番塩基は、これまでの報告と同様に変異が高頻度に認めら

れた<sup>2)~4)17)19)</sup>。これら以外の変異は、低頻度で、複数の個体においてみられた場合でも優勢とならず、遺伝子変異自体はランダムに起こっていると考えられ、統一性は認められなかった。

HBeAg は細胞障害性 T リンパ球を抑制し、HBV に対する免疫寛容状態の成立に深くかかわっているとされており、HBeAg が陽性から陰性へ移行する間に、免疫寛容状態が破綻し、肝炎を発症する<sup>15)</sup>。その際 HBV は HBeAg を産生する wild type から HBeAg

**Table 7** The relation between core promoter region (nt. 1762, nt. 1764) and precore region (nt. 1896) mutations and HBeAg status, viral replication and hepatitis activity

| samples | core promoter<br>(nt. 1762, nt. 1764) | precore<br>(nt. 1896) | HBeAg | DNA-p<br>(cmp/ml) | ALT<br>(IU/L) |
|---------|---------------------------------------|-----------------------|-------|-------------------|---------------|
| 3-1     | wild                                  | wild                  | +     | 1986              | 250           |
| 3-2     | wild/mutant                           | wild/mutant           | +     | 51                | 102           |
| 1-1     | wild/mutant                           | wild/mutant           | +     | 1505              | 78            |
| 2-1     | wild                                  | wild/mutant           | +     | 1703              | 54            |
| 6-1     | wild/mutant                           | wild/mutant           | +     | 733               | 94            |
| 7-1     | mutant                                | wild/mutant           | +     | 1876              | 1273          |
| 7-3     | mutant                                | wild/mutant           | -     | 2055              | 181           |
| 5-1     | wild                                  | mutant                | -     | 3                 | 30            |
| 5-2     | wild/mutant                           | mutant                | -     | 6                 | 206           |
| 5-3     | wild/mutant                           | mutant                | -     | 20                | 32            |
| 6-2     | wild/mutant                           | mutant                | -     | 30                | 12            |
| 6-3     | wild/mutant                           | mutant                | -     | 5                 | 11            |
| 4-1     | mutant                                | mutant                | -     | 10                | 21            |
| 4-2     | mutant                                | mutant                | -     | 984               | 743           |
| 7-2     | mutant                                | mutant                | -     | 110               | 126           |

wild type; nt. 1762 and nt. 1764 → A and G, nt. 1896 → G

mutant type; nt. 1762 and nt. 1764 → T and A, nt. 1896 → A

を産生しない mutant type に置換していく。その際の機序として、core promoter および precore 領域の変異が重要とされているが、本研究から HBeAg の産生に強い影響を与えるのは precore 領域の変異と判明した。一般に、HBV 持続感染者の自然経過として HBeAg の陰性化は 10-19 歳に高頻度に見られているが<sup>9)</sup>、本研究に用いた HBeAg 陽性の症例の年齢は比較的高齢 (27-47 歳) であった。彼らの場合は HBeAg の陰性化が自然に容易には起こらず、肝炎の状態にある症例と考えられた。そのため、彼らの検体では HBeAg 陽性時から precore 領域のほとんどが mutant type と wild type の混合型で、すでに precore 領域では変異が高頻度に出現しているものと考えられた。これらの症例の中から、経過観察中に HBeAg が陰性化した症例もみられ、HBeAg 陰性化前の状態と考えられた。

precore 領域の mutant type の出現は即座に HBeAg 陰性化を引き起こすのではなく、それまでにはさらにいくつかの段階がある。HBeAg 陰性化前には HBV の wild type および mutant type の混合した時期があり、その混合の割合と肝炎の状態との関連が疑われた。precore 領域が mutant type の場合、DNA-

p は低下し、さらに肝炎が鎮静化している例が多く認められたが、なかには血中 HBeAg 陰性であるにも拘わらず活動性の肝炎の状態が続いているものが 2 検体みられた。precore 領域での mutant ウイルスは、様々な病態で検出され<sup>2)4)-6)13)17)19)</sup>、肝炎の病勢と関連はない可能性もあるが、一方では Oketani ら<sup>18)</sup> は HBeAg 陰性の B 型慢性肝炎患者で、mutation-site specific assay を用いて高感度に wild type HBV 量、mutant type HBV 量を測定し、HBV DNA 量が増加し、血清 ALT 値の上昇がみられた症例では、wild type HBV 量が増加していると報告している。したがって、上記の 2 検体については wild type の混在は否定できない。

core promoter 領域の 1762 番および 1764 番塩基の変異も慢性肝炎の活動性に関連しているとの報告があり、肝炎の重症化や活動性との関係が推測されており<sup>1)12)13)</sup>、Buckwold ら<sup>3)</sup> は core promoter 領域の変異は precore mRNA の転写を抑制し、結果として HBeAg の産生を低下させると報告している。本研究でも、1762 番および 1764 番の塩基では、HBeAg 陽性時には wild type が優勢で、HBeAg 陰性になると mutant type が優勢となっていた。本研究でも症例 No. 7 で検体 No. 7-1 および 7-3 はいずれも core pro-

moter 領域が mutant type で, precore 領域が wild および mutant type の混合型であったが, 検体 No. 7-1 は HBeAg 陽性で, 1 年後の検体である No. 7-3 は HBeAg 陰性であり, core promoter の変異も HBeAg の陰性化に寄与していると考えられる。しかし, DNA-p および血清 ALT 値との関連は, 本研究では明らかにできなかった。

本研究では血清中の HBV の X および precore 領域遺伝子の解析から, 1762 番塩基, 1764 番塩基, および 1896 番塩基以外に, 変異は散在性に認められたが低頻度であり, 個体内での多様性も少なく, ウイルス学的および臨床的な関連を指摘することはできなかった。

以上, HBV の X-precore 領域では, 高頻度にみられた precore 領域の 1896 番塩基の変異は血清中の HBeAg を陰性化させ, B 型慢性肝炎をウイルス学的にも臨床的にも鎮静化させるものと考えられた。core promoter 領域のほぼ同時期に起こっている 1762 番塩基および 1764 番塩基の変異は, precore 領域のそれに比較してウイルス学的な影響は少なかったが, HBeAg 陰性化前に mutant type の出現もあり, HBV の life cycle の中で何らかの役割を果たしていることが推測され, 今後症例を重ねて検討する必要があると思われた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 研究のご指導をいただきました柏木 征三郎教授, 並びに, 貴重なご助言をいただきました林 純助教授, 原土井病院の池松 秀之先生, さらに本研究の遂行にご協力いただきました九州大学大学院感染環境医学〔総合診療部〕の医局の方々に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Aritomi T, Yatsushashi H, Fujino T, Yamasaki K, Inoue O, Koga M, Kato Y and Yano M: Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 1125-1132, 1998.
- 2) Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H and Bonino F: Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4186-4190, 1991.

- 3) Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS and Ou JH: Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.* 70: 5845-5851, 1996.

- 4) Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A and Thomas HC: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet.* 2: 588-591, 1989.

- 5) Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML and Lok AS: Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology.* 31: 763-768, 2000.

- 6) Fukuda R, Nguyen XT, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Kohge N, Akagi S, Watanabe M and Fukumoto S: X gene and precore region mutations in the hepatitis B virus genome in persons positive for antibody to hepatitis B e antigen: comparison between asymptomatic "healthy" carriers and patients with severe chronic active hepatitis. *J. Infect. Dis.* 172: 1191-1197, 1995.

- 7) Hayashi J, Kashiwagi S, Nomura H, Kajiyama W and Ikematsu H: Hepatitis B virus transmission in nursery schools. *Am J Epidemiol* 125: 492-498, 1987.

- 8) Hayashi J, Hirata M, Nakashima K, Noguchi A and Kashiwagi S: Hepatitis C virus is a more likely cause of chronic liver disease in the Japanese population than hepatitis B virus. *Fukuoka Acta Med* 82: 648-654, 1991.

- 9) Hayashi J, Kashiwagi S, Ikematsu H, Nomura H, Kajiyama W, Noguchi A and Ikeda K: Sex- and age-specific prevalences of HBeAg and anti-HBe among HBsAg carriers with or without liver function abnormalities in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol* 32: 843-850, 1988.

- 10) Kashiwagi S, Hayashi J, Ikematsu H, Nomura H, Kajiyama W, Shingu T, Hayashida K and Kaji M: Transmission of hepatitis B virus among siblings. *Am J Epidemiol* 120: 617-625, 1984.

- 11) Kashiwagi S, Hayashi J, Ikematsu H, Nomura H, Kajiyama W, Shingu T, Hayashida K and Kaji M: Hepatitis B virus DNA polymerase activity and hepatitis B e antigen (HBeAg)/anti-HBe status among type B chronic liver disease. *Gastroenterol Jpn* 23: 117-123, 1988.

- 12) Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH: Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: Implications for HBeAg status and disease. *J. Gen. Virol.* 78: 1469-1478, 1997.

- 13) Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y and Norkrans G: Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology*. 24: 494-501, 1996.
- 14) Lindh M, Gustavson C, Mardberg K, Norkrans G, Dhillon AP and Horal P: Mutation of Nucleotide 1762 in the core promoter region during hepatitis B e seroconversion and its relation to liver damage in hepatitis B e antigen carriers. *J. Med. Virol.* 55: 185-190, 1998.
- 15) Milich DR, Chen MK, Hughes JL and Jones JE: The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 160: 2013-2021, 1998.
- 16) Norder H, Courouce AM and Magnius LO: Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*. 198: 489-503, 1994.
- 17) Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M: Hepatitis B virus with Mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virol.* 68: 8102-8110, 1994.
- 18) Oketani M, Oketani K, Cui XH and Arima T: Low level wild-type and pre-core mutant hepatitis B viruses and HBeAg negative reactivation of chronic hepatitis B. *J Med Virol* 58: 332-337, 1999.
- 19) Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K and Ohto M: Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1699-1704, 1991.
- 20) Uchida T, Gotoh K and Shikata T: Complete nucleotide sequences and the characteristics of two hepatitis B virus mutants causing serologically negative acute or chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.* 45: 247-252, 1995.
- 21) Yee JK: A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science*. 246: 658-661, 1989.