

virus infections and organization of the guidelines for the national survey have been conducted as a part of researches granted by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare (H-13-Shinko-6 and H13-21 Seiki (gan)-32).

References

1. Alter HJ, Saeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.
2. Arase Y, Ikeda K, Murashima N, et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 1997;79:1494-500.
3. Benhamiche AM, Faivre C, Minello A, et al. Time trends and age-period-cohort effects on the incidence of primary liver cancer in a well-defined French population: 1976-1995. *J Hepatol* 1998;29:802-6.
4. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
5. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999;285:26-30.
6. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;36:S74-83.
7. Hiraoka T, Katayama K, Tanaka J, et al. Lack of epidemiological evidence for a role of resolved hepatitis B virus infection in hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis C virus in Japan. *Intervirology* 2003;46:171-6.
8. Kaczynski J, Oden A. Increasing incidence of primary liver cancer – A matter of aging? *Gastrointest Cancer* 1999;3:67-71.
9. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228-33.
10. Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, et al. Clinical significance of prior hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999;86:793-8.
11. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-5.
12. Koyama T, Matsuda I, Sato S, Yoshizawa H. Prevention of perinatal hepatitis B virus transmission by combined passive-active immunoprophylaxis in Iwate, Japan (1981-1992) and epidemiological evidence for its efficacy. *Hepatol Res* 2003;26:287-92.
13. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
14. Law MG, Roberts SK, Dore GJ, Kaldor JM. Primary hepatocellular carcinoma in Australia, 1978-1997: increasing incidence and mortality. *Med J Aust* 2000;173:403-5.
15. Moriya T, Sasaki F, Mizui M, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants: its frequency and risk factors revisited. *Biomed Pharmacother* 1995;49:59-64.
16. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors. *Jpn J Infect Dis* 2000;53:116-23.
17. Noto H, Terao T, Ryou S, et al. Combined passive and active immunoprophylaxis for preventing perinatal transmission of the hepatitis B virus carrier state in Shizuoka, Japan during 1980-1994. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:943-49.

18. Okada S, Sato T, Okusaka T, et al. Past exposure to hepatitis B virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Br J Cancer* 1998;77:2028-31.
19. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999;107:S10-15.
20. Sonnenberg FA, Beck JR. Markov models in medical decision making: a practical guide. *Med Decis Making* 1993;13:322-38.
21. Stroffolini T, Andreone P, Andriulli A, et al. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998;29:944-52.
22. Tanaka J, Kumada H, Ikeda K, et al. Natural histories of hepatitis C virus infection in men and women simulated by the Markov model. *J Med Virol* 2003;70:378-86.
23. Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, et al. Sex- and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirology*, in press.
24. Uemoto S, Sugiyama K, Marusawa H, et al. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. *Transplantation* 1998;65:494-9.
25. Vogt M, Lang T, Frosner G, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999;341:866-70.
26. Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 2002;62:S8-17.
27. Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, et al. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 2003;37:1172-9.

日本医事新報

No. 4205 2004年(平成16年)11月27日 日本医事新報社
http://www.jmedj.co.jp/

特集

診療所新時代2 新規開業の現状と求められる支援

データ/『新規開業・成功の勘どころ』(米本倉基) / 事例①三枝クリニック ②あんどう
ファミリークリニック ③おおむち診療所 / 病院・医師会からみた現状と支援策 / 考察

(1-26)

糖尿病性神経障害の治療戦略

中村二郎 (37)

学術

ニュース (95-112)

- ◇スタチンと横紋筋融解症……………中村治雄(43)
- ◇感染性腸炎の診断と治療……………大西健児(54)
- ◇小児悪性腫瘍の晩期障害……………前田美穂(61)

- ◇「混合診療」解禁問題を巡る攻防さらに激化
規制改革・民間開放推進会議 / 経済財政諮問
会議 / 中医協基本問題小委 / 参院厚労委
- ◇介護施設居住費・食費を対象外に(自民介護小委)
- ◇財政審議院「医療費で総額管理の検討求める」
- ◇家庭医の可能性巡りシンポ(家庭医療学会)
- ◇平成16年秋の叙勲に輝く人々(2)

- ◇ESD ; endoscopic submucosal
dissection ①……………藤城光弘(33)
- ②……………藤城光弘(33)
- 一週一話
- ◇痒みの評価法……………江畑俊哉(117)

質疑応答 (118-133)

(内 科) 糖尿病性自律神経障害と不整脈による突然死 / HBVキャリアの感染経路 / 呼吸音の連続性と断続性ラ音 / 慢性疲労症候群の症状 (放射線科) 高分解能CTの肺すりガラス陰影 (精神神経科) 発達障害の概念 / わが国の自殺予防対策 (東洋医学) 単味の漢方方劑 (栄養・食品) 動脈硬化と食事の中の油脂 / Ca・Mgの許容摂取量 (社会福祉) 老人ホーム

MEDICAL ESSAYS (71-80)

- ◇筋肉型思考……………石田春夫◇医師の心得(二)……………高橋正雄◇もっと生きようの詩……………稲垣吉弥
- ◇Lancet創刊者Thomas Wakleyへの旅(下)……………山崎茂明

- 書評……………斎藤宣彦・北野正剛(81)
- 時論 (85-90)
- ◇医療過誤—司法側の考え・医療側の考え⑩ 責任を負う自己決定権(その1)……………大城 孟◇声……………赤松高之・安田明正

- 人—武藤芳照氏(転倒予防医学研究会世話人代表)……………(110)
- 医事案内(求人・求職・不動産その他)……………(134)

- ◇パーキンソン病専門医特別座談会—パーキンソン病治療戦略におけるプラミベキニールの位置付け(司会・近藤智恵)……………(9)

- 2) 岩田康雄: COMPLICATION—
糖原病と血糖 4(2): 208, 1999.
3) 四倉正之, 石川恭三: 日本臨床
54(3): 2202, 1996.
4) Stevens NJ, Rafael DN, Allman
KC, et al: Circulation 98: 961,
1998.

（東京女子医大第二
病院内科助教授 高橋良当）

HBVキャリアアの
感染経路

Q B型肝炎ウイルス(HBV)キ
ャリアの患者の母親がB型肝
炎ではない場合、母子感染以
外の感染原因の検索について、また、
何歳までの初感染でHBVキャリア
となるのか。(東京都 F)

A 母親がB型肝炎ウイルスの
持続感染者(HBVキャリア
ア)ではないことがわかっている
HBVキャリアが「うつ、と」で、
どのような経路を介して「感染し
てキャリア化したのかを検索(特
定)することは、ほとんど不可能
であるといわざるをえない。
周知のようにHBVは血液を介
して感染するウイルスであり、血
液中のウイルス量が多いため、こ
く微量のHBVキャリアの血液が
体内に入ることにより感染が成立

すること、衛生環境が必ずしも十
分に整っていないかった過去のわが
国では、他人の血液が何らかの機
会に体内に入る経路は数多く存在
したと考えられることなどがある
ためである(HBVの水平感染・
垂直感染以外の経路による感染の
経路については成書等を参照)。
一九七〇年代の終わりから八〇

年代の初めにかけて行われた調査
成績をみると、当時の献血年齢層
におけるHBVキャリア(献血を
契機に発見されたHBVキャリア)
の約三分の一が母子感染由来の
HBVキャリアであり、残り三分
の二は母子感染によらない(水平
感染由来の)HBVキャリアであ
ると推定されている。また、子
どもを対象とした調査から、その
多くは乳幼児期の水平感染に起因
すると推定されている。

実際、わが国の経済復興が進み、
社会全般の衛生環境が改善され始
めた一九七〇年代以降に出生した
世代を起点にHBVキャリア率は
減少に転じ、八〇年代以降に出生
した世代のHBVキャリア率は
〇・五%前後までに減少している
ことが明らかとなっている。
近年、出産年齢が高齢化し、HBV

キャリアの母親がHBe抗体陽性に
転化(HBe抗原からHBe抗体への
セロコンバージョン)してから出
産する率が高いことを多少考慮に
入れたとしても、HBV母子感染予
防が全国規模で軌道に乗ったのは
一九八六年以降であることから、
一九七〇〜八〇年代前半に出生し
た世代におけるHBVキャリア率
の減少は水平感染由来のHBVキ
ャリアの減少に負うところが大き
いことを示唆しているといえる。

なお、一九七〇年代に松山市周
辺でみられたGiant細胞の流行時
に得られた成績をみると、HBV
の感染時期が若年であればあるほ
ど、キャリア化率が高いことが示
されており、一歳前では約五〇%
が、また三〜四歳時に感染した場
合には約二〇%がキャリア化する
とされている。

一方、成人がHBVに初めて感
染した場合には、ごく例外的にキ
ャリア化する場合があるものの、
ほとんどは一過性の感染で(臨床
的には)治癒するとされてきた。
しかし、近年、特に若年層を中心
に感染の広がりが見え始めたHBV
の genotype A の感染では、感染
の遷延化率(キャリア化率?)が

のこを確定するためには、対象
集団を囲い込んで年余の長期にわ
たって前方視的に追跡し、確定す
る必要があると考えられる(が高
いことが明らかになり始めてお
り、感染するHBVの genotype に
よっては、これまでの概念を一部
修正することを迫られる事態を迎
えつつあるといえる。

〔文 献〕

- 1) ウイルス肝炎研究財団, 編: HBV
とB型肝炎の知識・第4版, 文光
社, 2003.
- 2) 原 茂, 他: 日本輸血学会誌 27:
163, 1981.
- 3) 福田信臣, 他: 肝臓 19: 936,
1978.
- 4) Tanaka J, Kumagai J, Katayama
K, et al: Intervirolog 47: 32,
2004.
- 5) 飯野四郎: ウイルス肝炎の予防と
対策(織田敏次, 編), 中外医学社,
1985, p.43.

（広島大大学院 吉澤浩司）
疫学・疾病制御学教授

呼吸音における連続
性および断続性ラ音
の捉え方

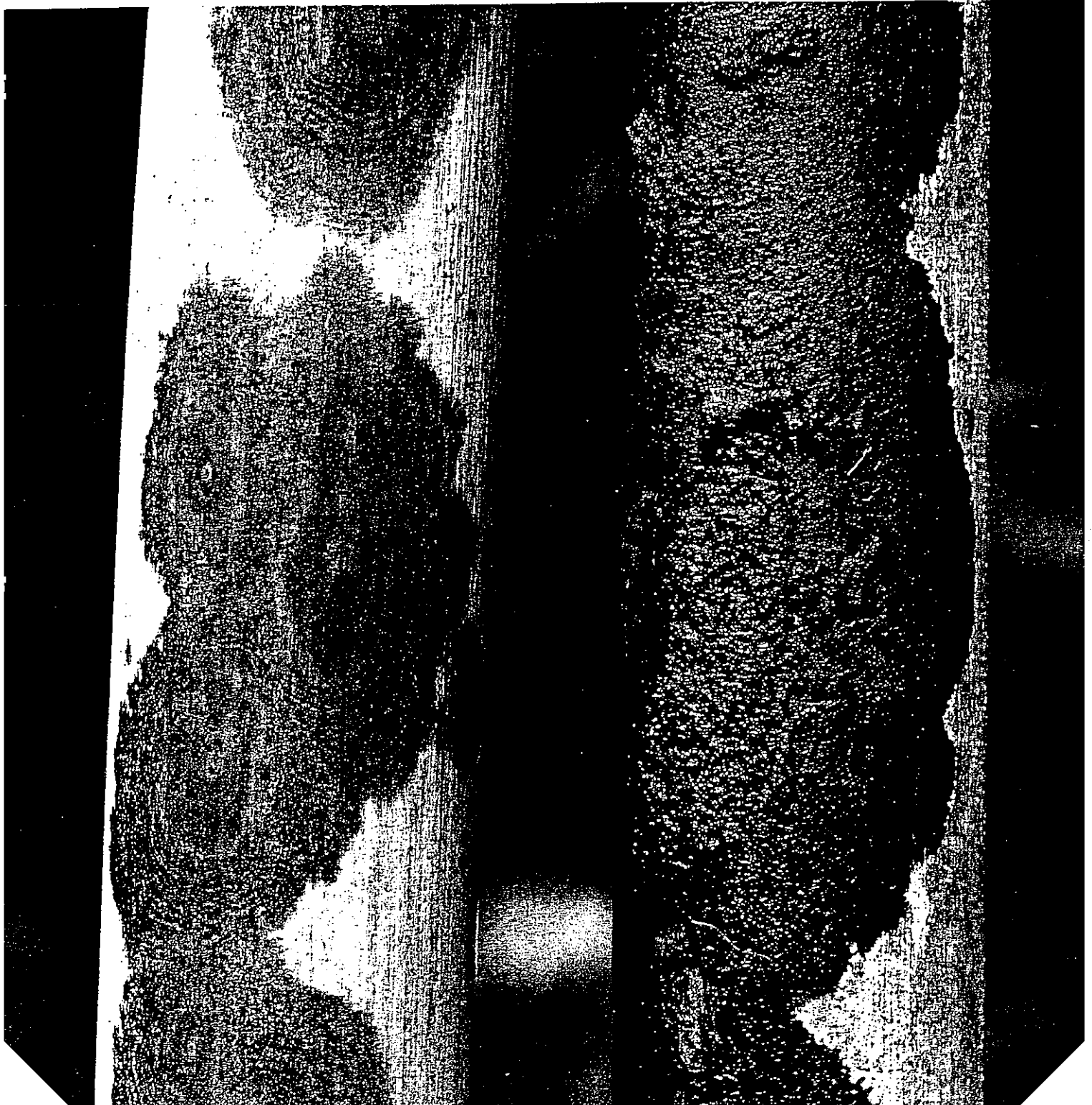
Q 一、呼吸音の分類とダイアグ
ラム(図1)において、連続
性ラ音で呼吸の長さが一般の

medico

2005 January
Vol.36 No.1



【特集】変貌するがんの疫学



特集	変貌するがんの疫学
肝がん対策	
吉澤浩司*	

はじめに

他臓器のがんと異なり、肝がんは①そのほとんどがB型、C型肝炎ウイルスの持続感染者(キャリア)に発生すること、②B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因する肝がん(B型の肝がん)は50歳代の前半に、また、C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染に起因する肝がん(C型の肝がん)は50歳代の後半から60歳代の前半に好発すること、③B型、C型、いずれの肝がんも慢性の炎症が続いたことにより病期が進展した(肝の線維化が進展した)肝臓を発生母地とすること、④わが国では、1975年を境として今日に至るまで増加の一途を辿ってきたこと、⑤この増加分に寄与しているのは主としてC型の肝がんであり、B型の肝がんは1970年代のはじめより増減がないまま今日に至っていること、などの特徴を有している¹⁾。これらの知見と、近年のウイルス肝炎、肝がんの診断、治療法の進歩とを背景として、わが国では2002年4月より、全国規模で肝がん死亡の減少を目指した「肝炎ウイルス検診」が5年計画で実施に移されている。

本稿では肝炎ウイルス検診を開始するに至った疫学的背景、その骨子、およびその成績(途中経過)について述べ、今後に残された問題について考えてみたい。

1. 病因論に基づいた肝がん対策の考え方

肝がんはそのほとんどがウイルス発がんであることから、そのリスク集団である肝炎ウイルスの持続感染者(キャリア)を見出し、組織的な健康管理、必要に応じた治療を実施できる体制を整えることが肝がん対策の第一歩となるといえる。

C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染に起因する肝がん(C型の肝がん)ははじめに述べた特徴に加

えて、①肝の線維化が一定程度進む前の早い時期に、治療(抗ウイルス療法)によりウイルスを肝臓から排除する(キャリア状態からの離脱を図る)ことにより、治癒し、肝発がんのリスクから開放されること、②ウイルスの排除ができない場合でも慢性の炎症を抑え、病期の進展、すなわち肝の線維化の進展を抑えることにより、肝発がんの抑止、遅延を図ることが可能であること、などの特徴を有している。

したがってこれらの特徴をもとに、合理的な肝がん対策を組み立てることが可能となる。すなわち、検診等により見出されたHCVキャリアの肝炎の活動度、病期の進展度、年齢、血液中のウイルス量等をもとに、抗ウイルス療法(インターフェロン治療、インターフェロンとリバビリンの併用療法)の適用がある場合にはまずこれを行い、HCVキャリア状態からの離脱を図る。抗ウイルス療法の適用がないと考えられる場合、あるいは抗ウイルス療法を行っても無効であった場合には、抗炎症療法(肝庇護療法)を行い、病期の進展を抑え、肝発がんの抑止、あるいは遅延を図る。なお、発見時、既に前硬変、または肝硬変の状態にまで病期が進展し、かつ、肝発がんの好発年齢に到達していることが明らかである場合には、肝庇護療法を行うとともに、画像診断、腫瘍マーカー等により、肝がんの早期発見をめざす。以上の手順を組織的、かつ、合理的に実施できる体制を、それぞれの地域における医療事情に合わせた形で組み上げることが肝がん対策の第一歩となるといえる。

なお、現状ではC型肝炎に比べて、治療によりウイルスの排除を望むことが困難であるB型肝炎についても、HBVキャリアを見出し、抗炎症療法による肝発がんの抑止、遅延、および肝がんの早期発見を試みることにより、肝がんを制御するこ

*広島大学大学院疫学・疾病制御学

とは可能である。すなわち、肝がんの早期発見については他臓器のがん検診とは異なり、リスク集団(肝炎ウイルスキャリアであること、肝炎の病期が進展していること、肝発がんの好発年齢に達していることなどの条件を満たす集団)に絞り込んで、がんの早期発見に取り組むことができるという特性がある²⁾。

2. 初回献血者のデータを基に推計した、わが国におけるHBV, HCVキャリア数

本人が気付かないままの状態に社会に潜在するHBV, HCVキャリア数を知っておくために、1995年1月から2000年12月までの6年間に全国の日赤血液センターにおいてはじめて献血した人(各年の初回献血者)、計3,485,648人分のデータを抽出し、それぞれの献血者の出生年をもとに2000年の時点の年齢に換算して、HBs抗原陽性率、HCV抗体陽性率を求めた³⁾。

このうち、HCV抗体陽性と判定された集団については、その約70%がHCVキャリア(HCV RNA陽性)、残りの約30%は感染既往者(HCV抗体陽性、HCV RNA陰性)であるとの過去に得られている成績をもとに、HCVキャリア率を算出した。5歳きざみの年齢別に算出したHBVキャリア率、HCVキャリア率に2000年の時点におけるそれぞれの年齢集団の人口を乗じてHBVキャリア数、HCVキャリア数を推計した結果、わが国の2000年の時点における15～69歳の人口93,325,570人の中に、HBVキャリアは967,753人(806,760～1,128,745人：95%信頼区間)、同様にHCVキャリアは884,954人(725,082～1,044,826人：95%信頼区間)潜在していると推計された。

なお、このうち40～69歳の年齢層に偏在するHBVキャリア数、HCVキャリア数はそれぞれ71.4万人、75.9万人であり、HBVキャリア、HCVキャリア全体のそれぞれ約74%、86%を占めていることが明らかとなった。

3. 肝炎ウイルス検診の骨子

周知のように、2002年4月から5年計画で開始された「肝炎ウイルス検診」は節目検診と節目外検診とからなる。節目検診は老人保健法による基本健康診査対象者(40歳以上の地域住民)のうち、受診を希望する、5歳きざみの年齢の人を対象として実施されている(実施主体は各市町村)。一方、節目外検診は上記の節目の年齢以外の人で、①過去に肝機能異常を指摘されたことがある人、②広汎な外科手術を受けたことがある人で、定期的に肝機能検査を受けていない人、③基本健康診査受診時にALT値(GPT値)の異常により「要指導」とされた人を対象としている⁴⁾。

B型肝炎ウイルスの検査はHBs抗原検査により、C型肝炎ウイルスの検査はHCV抗体、HCVコア抗原、核酸増幅検査の組み合わせにより、現在肝炎ウイルス(B型、C型)に感染しているか否かまでの判定が行われている。

なお、HBVキャリアの主な成因は1980年代半ば以前に出生した世代の出生時の母子感染と、母子感染に由来する同世代のHBVキャリアを感染源とする乳幼児期における水平感染に由来すること、また、現在のわが国では、HCVキャリアの新規発生は極めて稀に起こるにすぎない(献血者で見た場合、10万人/年あたり2～4人、会社の健康診断受診者等ではゼロであることが明らかとなっている)⁵⁾。即ち、現在のわが国では新たな肝炎ウイルスキャリアの発生はごく稀に起こるにすぎないことから、原則として、肝炎ウイルス検診では正しい検査を1回だけ受ければよいとしている。ただし、肝炎ウイルス検診により、肝炎ウイルス(B型、C型)に感染していないと判定された場合でも、その後、肝機能検査上異常が認められたり、肝炎が疑われる症状が認められた場合には、肝炎ウイルス検診とは別に、医師相談し、検査を受けることが大切である。

4. 肝炎ウイルス検診により見出された HBV, HCVキャリア数

厚生労働省老人保健課の集計によれば、節目、節目外検診の両者を併せると2002年度、2003年度のHBs抗原検査受診者数はそれぞれ1,923,113人、1,849,125人であり、HBs抗原陽性、即ちHBVキャリアと判定された数はそれぞれ24,430人、22,520人となっている。同様にHCV検査受診者数はそれぞれ1,923,480人、1,830,270人であり、現在HCVに感染している、即ちHCVキャリアと判定された数はそれぞれ31,398人、23,491人となっている。

なお、節目検診と節目外検診により見出されたHBVキャリア率を見ると、1年目にはそれぞれ1.2%、1.5%、2年目には1.1%、1.4%と節目外検診による発見率がより高率となっている。同様にHCVキャリア率について見ると、1年目にはそれぞれ1.1%、2.7%、2年目には1.0%、2.2%と節目外検診による発見率がより高率となっている。この成績は、全国の各市町村において、節目外検診受診者の選別も適切に行われていることを示すものであるといえる。

以上のように、肝炎ウイルス検診は開始2年目にしてほぼ軌道に乗ったといえよう。しかし、初回献血者のデータから推計したHBV, HCVキャリア数を見ると、今後も正しい検査の普及と、検査受診率の向上を図ることが必要であることを示しているといえる。特に基本健康診査の受診対象とはなっていない都市部の企業労働者(企業の健康保険加入者)についても、肝炎ウイルス検査の普及を図る必要があるといえる。

なお、前項で述べた日赤血液センターにおける初回献血者、計3,485,648人の中で、HBVキャリア、HCVキャリアと判定された人はそれぞれ、22,018人、17,010人(40~69歳までの計501,639人の中ではそれぞれ6,649人、8,628人)であり、これらの人々についても健康管理、必要に応じた治療を受けることができる受け皿を準備することが必要であるといえる。

5. 肝炎ウイルスキャリアの 健康管理体制の構築

広島県では、2003年4月から検診で見出された肝炎ウイルスキャリアの健康管理を組織的に行うことを目的とした「肝炎治療支援ネットワーク」を発足させた。このネットワークは、肝炎ウイルス検診の実施主体である各市町村の保健担当者、かかりつけ医からなる一次医療機関の医師、および肝臓専門医からなる二次医療機関の医師の役割分担を体系化し、検診により発見された肝炎ウイルスキャリアの健康指導、健康管理、必要に応じた治療を組織的に行うことを目的としている⁹⁾。

広島県では、県医師会の了承のもとに、二次医療機関名(病院名)と担当する肝臓専門医師名を公表した。また、一次医療機関向け、二次医療機関向けの役割分担を明示したパンフレット、肝炎ウイルスキャリア向けの小冊子^{7,8)}および健康管理手帳(全国版に訂正)^{9,10)}を作成、配布し、肝炎治療ネットワークの浸透を図っている。なお、健康管理手帳には、一次医療機関や二次医療機関での検査結果および治療方針等を記入するための複写式の3連の記入用紙をとじ込み、1部は記入した医師が、1部は紹介状または返書として、1部は患者本人が記録として保有できるように工夫してある。

おわりに

過去10年以上にわたり蓄積してきたウイルス肝炎、肝がんの疫学的データをもとに発見した肝がん対策の第一歩としての肝炎ウイルス検診を実効あるものにし、肝がん死亡の減少という最終目標にまで結びつけるためには、正しい検査の普及、検査受診率の向上、検査により見出された肝炎ウイルスキャリアの医療機関受診率の向上とフォローアップ率の向上を図ることが大切である。また、肝炎の活動度、病期に応じた適切な健康管理、治療を組織的に行うことができるネットワークを、それぞれの地域の実情に合わせて作り上げることが急務であるといえる。

<文 献>

- 1) Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan : Projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 2002 ; 62 (suppl) : 8-17.
- 2) 田中純子, 吉澤浩司. 厚生労働省 がん検診の適正化に関する調査研究班(班長:久道 茂)報告書. 肝がん, 肝炎検診, 日本公衆衛生協会 ; 2001. p325-362.
- 3) Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, et al. Sex-and Age-Specific Carriers of Hepatitis B and C Viruses in Japan Estimated by the Prevalence in the 3,485,648 First-Time Blood Donors during 1995-2000. *Intervirolg* 2004 ; 47 : 32-40.
- 4) 厚生労働省 肝がん発生予防に資するC型肝炎検診の効果的な実施に関する研究班(班長:吉澤浩司)平成13年度中間報告書.
- 5) Sasaki F, Tanaka J, Moriya T, et al. Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. *J epidemiology* 1996 ; 6 : 198-203.
- 6) 厚生労働省 肝がんの発生予防に資するC型肝炎検診の効果的な実施に関する研究班(班長:鈴木一幸)平成14年度報告書. 広島県全域をカバーする肝炎治療ネットワークの構築, p20-22.

血液透析施設におけるC型肝炎ウイルス (HCV) 感染の実態 ～感染予防の基礎としてのウイルス、血清疫学的調査成績～

広島大学大学院 疫学疾病制御学¹⁾

広島大学大学院 分子内科学²⁾ 広島透析study group

熊谷純子¹⁾ 小宮 裕¹⁾ 片山恵子¹⁾ 田中純子¹⁾ 頼岡徳在²⁾ 吉澤浩司¹⁾

はじめに

血液透析患者集団ではC型肝炎ウイルス持続感染者の比率 (HCVキャリア率) が高いことは以前から知られており、腎性貧血のために頻回の輸血が行なわれたことがその理由として挙げられてきた。

一方、わが国では、1989年11月から第一世代のHCV C100-3抗体検査が、1992年2月から第二世代のHCV抗体検査が、更に1999年11月からは核酸増幅検査 (Nucleic acid Amplification Test; NAT) が輸血用血液のスクリーニングに取り入れられたことにより、輸血後C型肝炎はほぼ駆

逐されるに至っている。これに加えて、1990年からはヒトエリスロポイエチンが保険適用となったことにより、血液透析患者が輸血を受ける機会そのものが減少している。しかし、1994年以降も、血液透析施設内におけるHCV感染事例は後を絶たない現状にある¹⁾。

筆者らは、血液透析施設におけるHCV感染の実態を把握することを目的としたウイルス、血清学的調査を行なっているもので、これまでに得られている成績を中心に紹介したい。

1. 血液透析患者集団におけるHCVキャリア率とその要因

表1 調査時期および対象者数 (男女別)

調査	調査時期	全体 対象者数	男性			女性		
			対象者数	年齢(歳)	透析歴(年)	対象者数	年齢(歳)	透析歴(年)
1	1999年11月	1,664	989	59.3±12.9	6.1±6.5	675	61.8±12.7	6.4±6.2
2	2000年2月	1,677	993	59.4±12.9	6.3±6.6	684	61.8±12.7	6.5±6.3
3	5月	1,712	1,019	59.5±13.0	6.3±6.5	693	61.9±12.8	6.6±6.4
4	8月	1,736	1,027	59.8±13.0	6.3±6.5	709	62.0±12.7	6.6±6.3
5	11月	1,775	1,044	60.0±13.0	6.3±6.5	731	62.3±12.7	6.5±6.4
6	2001年2月	1,808	1,071	60.4±13.0	6.3±6.5	737	62.6±12.7	6.6±6.4
7	5月	1,820	1,080	60.6±12.8	6.4±6.6	740	62.6±12.9	6.6±6.3
8	8月	1,758	1,046	60.5±12.7	6.6±6.6	712	62.7±12.8	6.8±6.4
9	11月	1,774	1,051	60.7±12.8	6.5±6.6	723	63.0±12.6	6.8±6.4
10	2002年2月	1,805	1,060	61.0±12.9	6.6±6.6	745	63.2±12.7	6.8±6.4
11	5月	1,842	1,082	61.2±12.8	6.6±6.7	760	63.3±12.8	6.8±6.4
12	8月	1,859	1,091	61.4±12.7	6.7±6.7	768	63.3±12.8	6.9±6.4
13	11月	1,870	1,094	61.7±12.7	6.7±6.7	776	63.4±12.9	6.8±6.5
14	2003年2月	1,882	1,103	61.7±12.7	6.8±6.8	779	63.6±13.0	6.9±6.6
全調査期間を通じた 対象者数		2,744	1,613	63.3±13.1	6.7±6.4	1,131	65.7±13.2	6.7±6.5

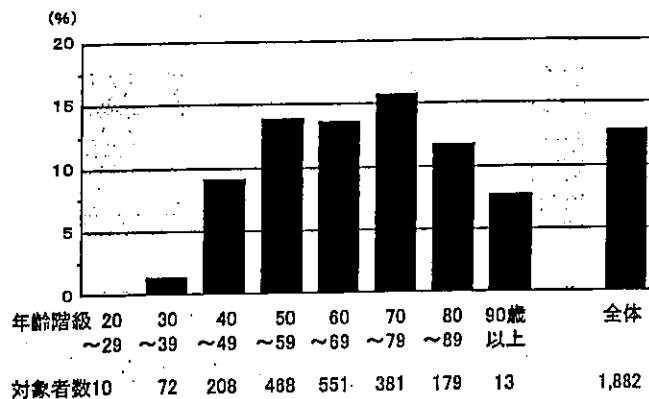


図1 年齢階級別に見たHCV RNA陽性率
調査14(2003年2月)1,882例

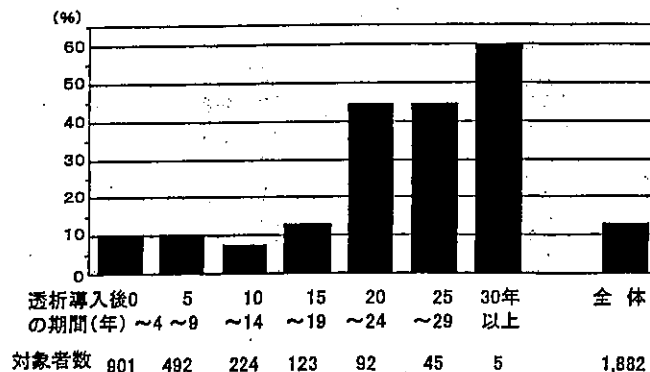


図2 透析導入後の期間別に見たHCV RNA陽性率
調査14(2003年2月)1,882例

調査を開始した1999年11月から2003年2月までの調査対象者数を表1に示す。

筆者らは、広島県内の9つの施設の参加、協力を得、3か月ごとにそれぞれの施設のその時点における全患者を対象として調査を実施している。調査期間内に患者の新規参入と離脱があるため(後述)、調査対象者数はその都度異なるが、個人の重複を除くと、調査期間内における対象患者数は総計2,744例にのぼる。男女別に見たその都度の対象患者数、平均年齢、透析歴(期間)は表1に示した通りである。

2003年2月の調査時点(対象者数1,882例)における年齢階級別に見たHCV RNA陽性者(HCVキャリア)率を図1に示す。HCVキャリア率は70歳から79歳の群で15%以上と最も高い値を示すが、40歳以上の群ではいずれも高い値を示し、各年齢群間で際立った差は認められない。

これに対して、同一の集団を透析歴(透析導入後の期間)別に分けると、20年以上経過した群では、それ未満の群と比較していずれも40%以上と際だって高い値を示している点が注目された(図2)。但し、透析歴20年未満の群においても10%前後と、これまでに得られている献血者群におけるHCVキャリア率²⁾と比較すると、際だって高い値を示している。

それぞれの患者の透析歴(期間)から透析を開始した年(西暦)を算出し、それぞれの集団ごとのHCVキャリア率とそれぞれの時期における輸血後肝炎発生率のデータ³⁾とを対比してみた(表2)。

輸血後肝炎の発生率の推移は表2に示した通りであるが、これまでの調査から、わが国では1972年までは全輸血後肝炎例の約60%が、1973年から1976年までは約80%が、また、1977年から1987年までは約96%がHCVの感染によっていたことが明らかとなっている³⁾。なお、1989年以降は、HBc抗体検査が輸血用血液のスクリーニングのために追加導入されたことから、輸血に伴うHBVの感染は、ごく例

表2 透析導入後の期間別に見たHCV RNA陽性率および背景
調査14(2003年2月)1,882例

透析導入後の期間(年)	例数	HCV RNA陽性者数(%)	年齢	透析導入時期	輸血後肝炎発生率
30~	5	3(60)	56.0±6.4	1968~1972	16.20%
25~29	45	20(44.4)	58.4±6.9	1973~1977	9.60%
20~24	92	41(44.6)	56.9±9.3	1978~1982	19.30%
15~19	123	16(13)	60.1±10.9	1983~1987	12.30%
10~14	224	17(7.6)	58.7±11.1	1988~1992	3.10%
5~9	492	51(10.4)	62.0±13.3	1993~1997	およそ0%
0~4	901	94(10.4)	64.8±13.3	1998~2002	およそ0%

1989輸血用血液のHCV c100-3抗体スクリーニング導入
1990ヒトエリスロポエチン(rHuEPO)健康保険適応
1992輸血用血液のHCV抗体検査(第二世代)スクリーニング導入

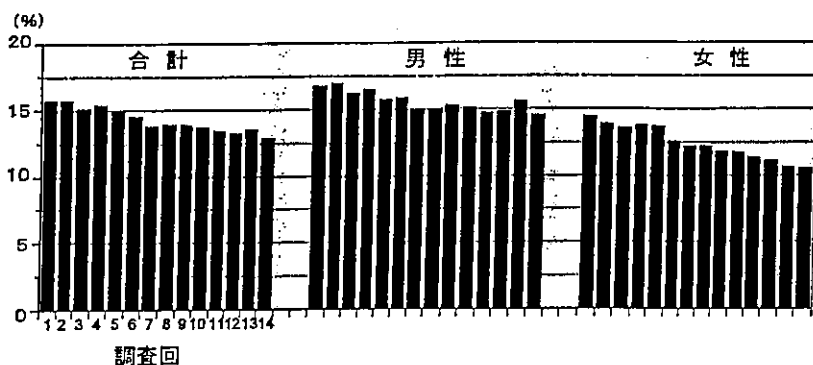


図3 調査時期別HCV RNA陽性率
調査1(1999年11月)～調査14(2003年2月)

外的にみられるにすぎなくなり、これ以降、輸血後肝炎のほとんどはHCVの感染によることが明らかとなっている。

なお、1992年からは、第二世代のHCV抗体検査によるスクリーニングが導入されたことにより、わが国では輸血後C型肝炎もほとんどみられなくなっている⁴⁾。これに加えて、1990年からは、ヒトエリスロポイエチンが保険適用となっている。

以上の背景をもとに考えると、透析歴が20年を越える患者集団における高いHCVキャリア率は、輸血に伴うHCV感染のリスクに数年余の長期間にわたってさらされ続けたことに起因していると理解することができる。

一方、輸血に伴うHCV感染のリスクがほとんどゼロに近い状態となり、かつエリスロポイエチンの導入により、輸血を受ける機会も減少した1990年以降に透析を開始した患者集団でもHCVキャリア率が10%前後と、献血者集団でみられる値に比べて際だって高い値を示している。このことは、血液透析患者集団内において、輸血以外の経路によるHCVの新規感染がその後も起こり続けていることを示すものであり、各地から報告された透析施設内におけるHCV感染事例は氷山の一角を表しているにすぎないと考えられる。

2. 血液透析患者集団におけるHCVキャリア率の推移

血液透析患者集団におけるHCVキャリ

ア率の推移をみると、1999年11月の調査開始時には15.7%であったものが、2003年2月には12.9%と次第にその値が低下している(図3)。この現象がどのような要因に由来するのかを確かめる目的で、調査期間内における途中参入患者群と途中脱落患者群についてまとめてみた(図4)。その結果、途中脱落群862例におけるHCVキャリア率は、調査開始時の患者群1,664例とほぼ同等の15.3%であったのに対して、途中参入群1,080例におけるHCVキャリア率は

10.3%と、相対的に低い値を示していることに起因することが明らかとなった。なお、途中脱落群の内訳は、その約半数が転院、残りの約半数が死亡によることが明らかとなっている。

3. 血液透析患者集団におけるHCVキャリアの新規発生数の推移と今後

調査開始時の検査でHCV抗体とHCV RNAがともに陰性であるという条件を満たし、かつ3ヵ月以上に亘る追跡が可能であった計2,114例の患者集団の中から16例のHCVキャリアの新規発生(0.33/100人年)が認められた⁹⁾。

それぞれの調査時点におけるHCVキャリアの新規発生数の推移をみると、調査がすすむにつれて、その発生数は

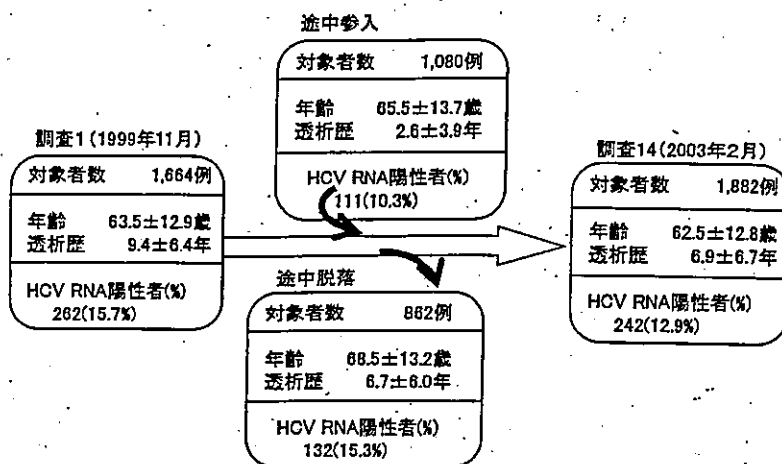


図4 HCV RNA陽性者の動態
調査1(1999年11月)～調査14(2003年2月)

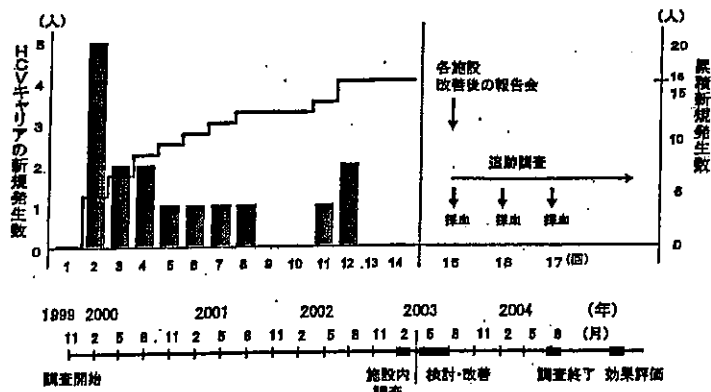


図5 血液透析患者集団におけるHCVキャリアの新規発生数および感染防止のための改善とその効果評価

減少する傾向がみられる (図5)。これは、本調査がすすむにつれて各施設において、HCV感染に関する認識が深まり、設備など透析環境の整備、改善や、スタッフへの教育訓練がすすめられた効果の反映と考えることができる。

なお、2003年7月末までに施設全てにおける透析環境の整備、改善が完了し、器具、機械の取り扱い、清潔域、不潔域の区分の徹底、手洗いや手袋着脱の手順と方法の徹底など、スタッフへの教育訓練を完了し、その効果をみるための追跡調査に入ったところである。

おわりに

透析環境の整備、スタッフへの教育訓練を終えた後の6か月目にあたる2004年2月時点の調査では、HCVの新規感染例は1例もみられないことは既に確認している。1年後に

あたる2004年8月の調査においても同様の結果を得ることができた段階で、透析施設内におけるHCV感染予防の指針の作成にかかることを予定している。

謝辞

今回の長期間に亘る調査は、下記の各施設の調査対象者に対して各主治医から十分な説明を行ない同意を得た上で実施した。本調査に参加、御協力をいただいた原田病院；重本憲一郎、原田知、一陽会クリニック；碓井公治、イーストクリニック；有田美智子、尾道クリニック；浜口直樹、博愛病院；高杉敬久、辰川会山陽病院、山陽腎クリニック；辰川自光、中央内科クリニック；河合淳、博美医院；大上和行、フェニックスクリニック；奥新小百合、梶川憲治、山下医院；山下達博、土谷総合病院；土谷晋一郎の各先生方 (広島透析study group) に深く感謝いたします。

文献

- 1) 秋葉隆, 佐藤千史: 透析医療施設におけるウイルス肝炎の現況, 治療, 予防. 厚生労働省/C型肝炎の自然経過および介入による影響等の評価を含む疫学的研究班/平成13年度報告書, 72-79.
- 2) Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, et al: Sex-and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. Intervirology 47(1): 32-40, 2004.
- 3) 片山透, 上沼優子, 高祖飛佐子: 輸血後肝炎の発生状況. 日赤/輸血後肝炎に関する特定研究班昭和58~60年度成果(経過)報告書, 9-21.
- 4) Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, et al: Predictive value of screening tests for persistent hepatitis C virus infection evidenced by viraemia. Japanese experience. Vox Sang 65(3): 199-203, 1993.
- 5) 田中純子, 頼岡徳在, 熊谷純子ほか: 血液透析施設におけるC型肝炎ウイルス感染の実態. 厚生労働省/C型肝炎の自然経過および介入による影響等の評価を含む疫学的研究班/平成15年度研究報告書, 58-67.

Reliability of Hepatitis C Virus Core Antigen Assay for Detection of Viremia in HCV Genotypes 1, 2, 3, and 4 Infected Blood Donors: A Collaborative Study Between Japan, Egypt, and Uzbekistan

Salah Agha,¹ Yasuhito Tanaka,² Niveen Saady,¹ Fuat Kurbanov,² Mostafa Abo-Zeid,³ Mohamed EL-Malky,⁴ Mohamed Khalaf,⁵ Nobuo Ohta,⁶ Hiroshi Yoshizawa,⁷ and Masashi Mizokami^{2*}

¹Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt

²Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

³Department of Surgery, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt

⁴Department of Medical Parasitology, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt

⁵Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Assuit University, Assuit, Egypt

⁶Department of Molecular Parasitology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

⁷Department of Infectious Disease and Control, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, School of Medicine, Hiroshima, Japan

Nucleic acid amplification-based methods are used for confirmation of viremia in antibody to hepatitis C virus (anti-HCV)-positive patients. However, this technology is labor intensive, time consuming, requires complex laboratory conditions, and expensive. The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of the HCV core antigen (HCVcAg) assay as an alternative approach for confirmation of viremia in HCV-infected subjects with HCV genotype 1–4. Two hundred forty-six asymptomatic HCV RNA-positive donors were enrolled in this study, consisting of 122 blood donors from Egypt (116 with genotype 4, 4 with genotype 1, and 2 with 1 + 4 genotypes), 109 from Japan (85 with genotype 1, and 24 with genotype 2), and 15 from Uzbekistan (all with genotype 3). A total of 234 (95.1%) of 246 RNA-positive specimens were detected by the HCVcAg assay; the sensitivity of HCVcAg assay consisted 93.4, 100, 100, and 94.8% for genotypes 1, 2, 3, and 4, respectively in comparison with RT-PCR assay. The specificity of the assay was confirmed in the absence of the false-positive results among 53 anti-HCV-negative, but anti-*Schistosoma mansoni* (anti-Sm) positive donors from Egypt. A positive correlation between HCVcAg and HCV RNA concentration levels ($r = 0.671$, $P < 0.05$) was observed among specimens with HCV genotype 4. The mean HCVcAg level was significantly lower in specimens with genotype 4 (2,935 fmol/L) comparing to genotypes 1, 2, and 3 (5,034, 4,962, and 4,740 fmol/L, respectively). No specific mutation

was found in the core-encoding region of the studied specimens. In conclusion, HCVcAg is shown to be specific, sensitive, and informative qualitative index for HCV viremia in asymptomatic carriers. *J. Med. Virol.* 73:216–222, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis C virus; HCV core antigen; genotype 4; Egypt; *Schistosoma mansoni*

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is now the predominant cause of post-transfusion and sporadic non-A non-B hepatitis worldwide [Tong et al., 1995]. Infection with HCV causes acute and chronic hepatitis, which lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in most cases [Robert and Johnson, 1997]. Detection of HCV-specific

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Science, and Sports of Japan; Grant number: 14770239; Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Grant number: H13-kanen-2.

*Correspondence to: Prof. Masashi Mizokami, Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Science, Kawasumi, Mizuho, Nagoya 467-8601, Japan. E-mail: mizokami@med.nagoya-cu.ac.jp

Accepted 11 February 2004

DOI 10.1002/jmv.20078

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

antibody (anti-HCV) in serum is used routinely for screening for the infection, and reverse transcription of the viral RNA extracted from clinical specimens followed by amplification with the RT-PCR is applied for the confirmation of active infection. However, nucleic acid amplification techniques are complex, time consuming, costly with inter- and intra-assay discrepant results [Zaaijer et al., 1993]. An HCV core antigen (HCVcAg) detection assay, which allows quantitation of antigenemia has been reported recently, and HCVcAg was proposed as an indirect measure of the viral load [Aoygi et al., 1999; Tanaka et al., 2000]. The assay seems to obviate many of the problems encountered with molecular amplification methods and could have a wide use in blood screening and diagnostic procedures [Tanaka et al., 2000; Icardi et al., 2001; Bouvier-Alias et al., 2002; Laperche et al., 2003; Zanetti et al., 2003]. The aim of this study was to assess the sensitivity, and specificity of the HCVcAg detection assay and reliability of the HCVcAg as a marker of viremia in HCV-infected asymptomatic carriers in different populations including Egypt, Japan, and Uzbekistan, where various HCV major genotypes are circulating (genotypes 1-4). As *Schistosoma mansoni* (*Sm*) is hyperendemic in Egypt [Angelico et al., 1997], anti-HCV-negative, but anti-*Sm* positive donors group was examined as a control, to eliminate the possibility of cross reactive false-positive results among Egyptian specimens.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

One hundred forty-two anti-HCV positive serum samples from Egyptian blood donors were collected in different districts of Egypt (North: Dakahliya and Dumietta; Central: Gharbiya and Monofiya; East: Sharkiya, Ismailiya, and Sinai; West: Beheira; and South: Assiut), and 122, which were found to be HCV RNA-positive, were used for further investigation (Table I).

To compare the sensitivity of HCVcAg assay and the quantitative characteristics of HCVcAg among blood donors with various HCV genotypes worldwide, 109 HCV RNA-positive serum samples (85 with genotype 1 and 24 with genotype 2) obtained from asymptomatic carriers in Japan, and 15 HCV RNA-positive samples (all with genotype 3) obtained from blood donors in

Uzbekistan were also included in this study. As summarized in Table II, a total of 246 samples from HCV RNA-positive blood donors (91 samples of genotype 1, 24 samples of genotype 2, 15 samples of genotype 3, and 116 samples of genotype 4) were enrolled.

Additional 53 anti-HCV-negative but anti-*Sm*-positive specimens obtained from blood donors in Egypt were used in this study as a control group (data not shown). Written informed consent was obtained from all subjects in this study. All serum samples were stored at -80°C until examined.

Methods

Detection of anti-HCV and anti-*SM*. Anti-HCV was detected by ELISA II (Abbott Diagnostika, Wiesbaden, Germany) and Serodia-HCV "particle agglutination" (FUJIREBIO, Tokyo, Japan). For detection of anti-*Sm*, an ELISA was carried out as described by Amélia et al. [2000].

HCVcAg assay. HCVcAg was determined in the serum samples using ELISA (Ortho Clinical Diagnostics, Tokyo, Japan). In brief, 100 μl of the samples was incubated at 56°C for 30 min with 50 μl of a pretreatment solution which contains 0.3% Triton X-100, 1.5% 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonia) propanesulfonic acid, and 15% sodium dodecyl sulfate. From each of these treated samples and standards, 100 μl was added to the plate with 96-wells coated with monoclonal antibodies directed against HCVcAg (c11-3 and c11-7), and than filled with 100 μl of reaction buffer (1% bovine serum albumin, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mol/L NaCl, 3% mouse serum, 0.3% Triton X-100, 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.2). The mixture was incubated for 60 min at room temperature with shaking and then washed with buffer. Two-hundreds microliter of the conjugate containing horse-raddish peroxidase labeled monoclonal antibodies against HCVcAg (c11-10 and c11-14) was added to each well of the plate and incubated for 30 min at room temperature. The wells were washed and 200 μl OPD solution were added and plates incubated at room temperature in the dark for 30 min. The reaction was stopped by addition of 50 μl of 5N H_2SO_4 . The levels of HCVcAg (fmol/L) were calculated using standard curves established in each run by testing the serial dilutions of a standard containing 3,600 fmol/L. The cutoff value was set at

TABLE I. Comparison of the Sensitivity of HCVcAg Assay Versus RT-PCR Among Anti-HCV Positive Egyptian Blood Donors (n = 142)

Districts	No.	HCVcAg		HCV RNA		HCVcAg/RNA no. (%)
		(+ve)	(-ve)	(+ve)	(-ve)	
East	13	12	1	12	1	12/12 (100)
South	24	16	8	17	7	16/17 (94.1)
Central & West	65	59	6	63	2	59/63 (93.7)
North	40	28	12	30	10	28/30 (93.3)
Total (%)	142	115 (81.0)	27 (19.0)	122 (85.9)	20 (14.1)	115/122 (94.3)

TABLE II. Comparison of the Sensitivity of HCVcAg Assay Versus RT-PCR Among Different HCV Genotypes (n = 246)

Genotypes	Japan	Egypt	Uzbekistan	Total
	HCVcAg +ve/ HCV-RNA +ve (%)	HCVcAg +ve/ HCV-RNA +ve (%)	HCVcAg +ve/ HCV-RNA +ve (%)	HCVcAg +ve/ HCV-RNA +ve (%)
1	80/85 (94.1)	5/6 (83.3)*	0	85/91 (93.4)
2	24/24 (100)	0	0	24/24 (100)
3	0	0	15/15 (100)	15/15 (100)
4	0	110/116 (94.8)	0	110/116 (94.8)
Total	104/109 (95.4)	115/122 (94.3)	15/15 (100)	234/246 (95.1)

*Four samples were of genotype 1b and two samples were of mixed infection (1b + 4), which were predominant 1b.

44 fmol/L. Samples with over-scale results were retested after 10-fold dilution.

HCV RNA extraction, RT-PCR, genotyping, and real-time detection (RTD)-PCR. HCV RNA was extracted according to the manufacturer's protocol of SepaGene RV-R nucleic acid extraction kit (Sanko Junyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan). The extracted RNA was reverse-transcribed to cDNA using Super Script II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) with the random hexamer primer (Takara Shuzo Co. Ltd, Tokyo, Japan) as described previously, to detect the presence of the HCV RNA, generated complementary DNA (cDNA) were used for nested PCR amplification with the primers for the highly conserved 5' non-coding region according to the reported protocol [Takeuchi et al., 1999], and HCV genotypes were determined by nested PCR with the mixture of primers specific for genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a deduced from the core encoding region [Ohno et al., 1997].

HCV RNA levels of 61 randomly selected Egyptian serum samples of genotype 4 were monitored by RTD-PCR according to a protocol described previously [Takeuchi et al., 1999].

Sequencing of the core region. Thirteen Egyptian HCV strains of genotype 4 extracted from specimens with relatively low HCVcAg levels including negative cases (range, 6–419 fmol/L) were subjected for partial genome sequencing in the core encoding region; 515 nt segments were amplified in one round PCR with 55 cycles using the primers: S7 (5'–3') AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC [Ohno et al., 1997] and HCV_core_478AS (5'–3') TGT TGC ATA ATT GAT CCC GTC, under standard PCR conditions. The sequencing was performed with Prism Big Dye (Applied Biosystems, Foster city, CA) in the ABI 3100 DNA automated sequencer. Sequenced strains were aligned by using Clustal X program, along with reference sequences retrieved from DDBJ/EMBL/GenBank database.

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out by Mann–Whitney U test and the correlation was assessed using Spearman correlation coefficient test. Differences were considered significant for *P* less than 0.05.

RESULTS

As shown in Table I, 142 anti-HCV positive specimens from Egypt were examined for both HCVcAg and HCV RNA; 81% (115/142) were positive for HCVcAg, and 85.9% (122/142) were positive for HCV RNA by RT-PCR with primers designed for highly conservative 5'-UTR. All specimens positive for HCVcAg had detectable RNA levels, and none of the specimens without detectable HCV RNA was reactive for HCVcAg in this study. Thereby, the sensitivity of the HCVcAg assay compared with RT-PCR test was 94.3% (115/122) and the ratio did not change significantly in different Egyptian districts (Table I). Additionally, as shown in the Figure 1, a significant positive correlation between the serum concentrations of HCV RNA and quantitative levels of HCVcAg has been observed among 61 randomly selected Egyptian samples of genotype 4 ($r = 0.671$, $P < 0.05$). The mean level of HCV RNA was $4.81 \pm 1.04 \log_{10}$ copies/ml, and mean concentration of HCVcAg was $2.79 \pm 0.66 \log_{10}$ fmol/L.

To assess the specificity of the HCVcAg assay, 53 anti-HCV-negative Egyptian samples with anti-Sm were examined for HCVcAg and no cross-reactions were found (data not shown).

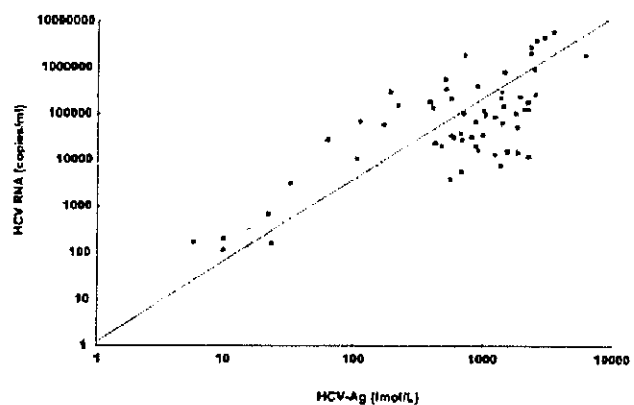


Fig. 1. Correlation between HCV core antigen (HCVcAg) levels and HCV RNA. There is a significant positive correlation ($r = 0.671$, $P < 0.05$) between the serum concentrations of HCV RNA (detected by RTD-PCR test) and quantitative levels of HCVcAg among 61 randomly selected samples of genotype 4.

TABLE III. Frequency of HCV Genotypes in Egyptian Blood Donors in Different Districts

Districts	No.	Genotype 4 no. (%)	Genotype 1b no. (%)	Genotype 1b + 4 no. (%)
East	12	11 (91.7)	1 (8.3)	0
South	17	15 (88.2)	2 (11.8)	0
Central & West	63	61 (96.8)	1 (1.6)	1 (1.6)
North	30	29 (96.7)	0	1 (3.3)
Total	122	116 (95.1)	4 (3.3)	2 (1.6)

All of the 122 HCV RNA-positive samples were genotyped further; genotype 4 was found in 95.1% (116/122); genotype 1 in 3.3% (4/122), and co-infection with genotypes 1+4 in 1.6% (2/122) of cases. There was no significant difference in genotype distribution among Egyptian districts (Table III).

To compare the sensitivity of the HCVcAg assay and the quantitative characteristics of HCVcAg among blood donors with various HCV genotypes spread worldwide, 109 specimens from Japan and 15 specimens from Uzbekistan were enrolled in the study. As shown in Table II, a total of 246 RNA-positive specimens; 116 with genotype 4, 91 with genotype 1 (1b), 24 with genotype 2 (2a or 2b), and 15 with genotype 3 (3a), were compared (2 Egyptian specimens with 1b + 4 genotypes co-infection were included into the predominant genotype 1 group); 95.1% (234/246) were positive by the HCVcAg assay. The sensitivity of the HCVcAg assay versus RT-PCR consisted 93.4, 100, 100, and 94.8%, among genotypes 1, 2, 3, and 4, respectively. Although the number of genotype 2 and 3 specimens was relatively small, no significant difference was observed between all genotypes. Interestingly, 12 of 246 HCV-RNA positive but the HCVcAg negative (<44 fmol/L) samples (consisting of 5 samples [genotype 1] from Japan and 7 [6 with genotype 4 and 1 with genotype 1] from Egypt) had also relatively low HCV-RNA level ($3.07 \pm 0.67 \log_{10}$ copies/ml).

The levels of HCVcAg among the 4 HCV genotypes are shown in Figure 2. The mean value of the HCVcAg level in the genotype 4 group consisted of 2,935 fmol/L (range 6-14,100), which was found to be significantly lower in comparison with the other genotypes ($P < 0.05$). The ranges of the HCVcAg concentration among the other genotypes were as follows; 28-30,035 fmol/L (mean 5,034) for genotype 1, 708-19,539 fmol/L (mean 4,962) for genotype 2, and 216-17,214 fmol/L (mean 4,740) for genotype 3.

Mutations in the HCV core region could be one of the reasons for reduction in sensitivity of the HCVcAg assay or cause the lowered production of HCVcAg itself in the studied donors' specimens with genotype 4. For confirmation of this hypothesis, and also for confirmation of the genotyping results, 13 Egyptian genotype 4 samples with relatively low HCVcAg levels including 6 HCVcAg-negative samples (6-43 fmol/L) were sequenced in the core-encoding region with target epitopes of monoclonal antibodies used in the HCVcAg assay. These 13 samples were classified into genotype 4a by phylogenetic analysis (data not shown). Figure 3 shows amino acids alignment on the sequences of core region (aa 21-147) from the 13 Egyptian strains of genotype 4 generated in this study along with 10 genotype 4 sequences and 5 other genotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 3a) sequences retrieved from DDBJ/EMBL/GenBank database. No specific mutation in the Egyptian genotype 4 samples and no correlation between the HCVcAg levels and numbers of core mutations were found (Fig. 3).

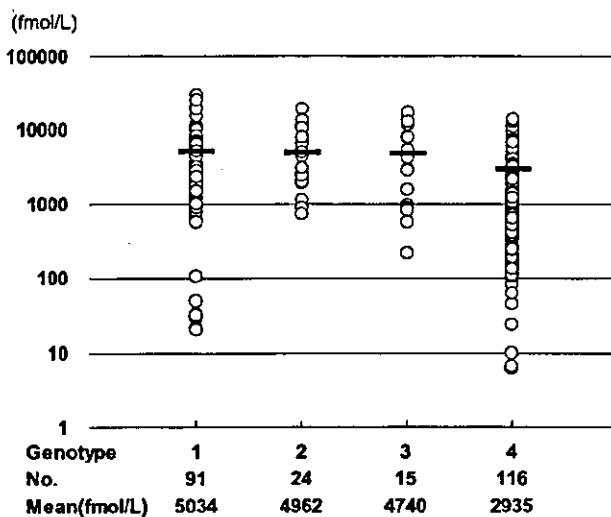


Fig. 2. Mean of serum HCVcAg levels among 246 blood donors with different genotypes. The mean HCVcAg levels in genotypes 1, 2, 3, and 4 were 5,034, 4,962, 4,740, and 2,935 fmol/L, respectively, suggesting significantly lower levels in genotype 4.

DISCUSSION

Molecular biological-based techniques are used currently for confirmation of HCV infection in anti-HCV positive cases and detection of the viremia. However, these methods being labor intensive and time consuming are not suitable in most laboratories in developing countries [Tanaka et al., 2000]. The development of simple and sensitive immunoassay for detection of HCVcAg in anti-HCV positive cases was reported recently, and HCVcAg has been proposed as an indirect marker of the virus active replication in infected subjects [Aoyagi et al., 1999; Icardi et al., 2001; Bouvier-Alias et al., 2002; Laperche et al., 2003; Zanetti et al., 2003]. However, there were no reports of large studies regarding the quantitation of HCVcAg in the HCV genotype 4 infected subjects. In this study we described the comparative investigation of the HCV genotype 4 and all major HCV genotypes (1, 2, and 3).

HCV-1a (AF046878)	21	DWKFFGGQIVGGVLLPREGRLQVRA**PKTSEERSQPRRRROPTPKARRPEGRTWAGGGYFW	83
HCV-1b(J) D95208	21	83
HCV-2a (J61D00944)	21D...ST...K...S...E.....	83
HCV-2b (J81D10985)	21D...ST...K...S...E.....	83
HCV-3a (AF046866)	21V.....S.....R.....D...S...E.....	83
HCV-4 (L25193)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-4 (L29587)	21T.....S.....S.....S.....	83
HCV-4 (L29624)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-4 (U10236)	21Q.....S.....S.....S.....	83
HCV-4 (U10237)	21C.....S.....S.....S.....	83
HCV-4 (U10240)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-4a (Y11604)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-4c (L38338)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-4e (L38323)	21T.....S.....S.....S.....	83
HCV-4f (L38332)	21Q...T.....S.....S.....	83
Egypt Central 10 (12)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt Central 17 (24)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt North 29 (61)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt North 47 (10)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt South 1686 (24)	21S.....S.....S.....S.....H.....	83
Egypt South 1694 (43)	21S.....S.....S.....S.....K.....	83
Egypt North 21 (63)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt Central 100 (83)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt Central 44 (104)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt East 6 (419)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt North 0442 (211)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt South 1406 (217)	21S.....S.....S.....S.....	83
Egypt South 1676 (234)	21S.....S.....S.....S.....	83
HCV-1a (AF290976)	84	PLYTNEGCGWAGNLLSPRRKPSWSPTEPRRSRNLRGKVIETCLTGGFADLMGYIPIVGGAPLGGG	147
HCV-1b(J) D95208	84M.....	147
HCV-2a (J61D00944)	84L.....K...E...V.....V.....V.....V.....	147
HCV-2b (J81D10985)	84T.....H.....R.....I.....V.....V.....V.....	147
HCV-3a (AF046866)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (L25193)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (L29587)	84X..X...K...X.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (L29624)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (U10236)	84K.....I.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (U10237)	84Q...N.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4 (U10240)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4a (Y11604)	84K...G.....V.....S...V.....V.....	147
HCV-4c (L38338)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
HCV-4e (L38323)	84	X..X.....X...K.....NK.....V.....V.....	147
HCV-4f (L38332)	84	..FF.....K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt Central 10 (12)	84K.....L.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt Central 17 (24)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt North 29 (61)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt North 47 (10)	84S.....K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt South 1686 (24)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt South 1694 (43)	84K.....L.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt North 21 (63)	84K.....I.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt Central 100 (83)	84N.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt Central 44 (104)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt East 6 (419)	84K.....A.....L.....V.....V.....V.....	147
Egypt North 0442 (211)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt South 1406 (217)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147
Egypt South 1676 (234)	84K.....V.....V.....V.....V.....	147

Fig. 3. Amino acids alignment in the core region. Thirteen Egyptian genotype 4 sequences were aligned with 10 genotype 4 sequences and 5 other genotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 3a) sequences from database. Closed boxes indicate target epitopes of monoclonal antibodies for the assay, which were located at aa residues 100–120, 120–130, 21–40, and 41–50, respectively. The HCVcAg levels of the last 13 sequences in this study, which included 6 HCVcAg-negative isolates (6–43 fmol/L), were shown in parentheses.

Of 246 HCV-RNA positive samples, the sensitivity of the HCVcAg assay compared with RT-PCR assay was 95.1%, indicating similar data reported previously in comparative studies for HCV genotypes 1 and 2 (94.2–98.2%) [Tanaka et al., 2000; Icardi et al., 2001; Laperche et al., 2003]. Additionally, comparison of the HCVcAg concentration with HCV RNA levels in samples from Egyptian blood donors carrying genotype 4 indicated significant positive correlation between the HCVcAg assay and quantitative PCR assay, which was reported for genotypes 1b and 2a [Tanaka et al., 2000], and for

genotypes 1–5 [Veillon et al., 2003]. The specificity of the HCVcAg assay was assessed by testing anti-HCV-negative Egyptian samples positive for anti-Sm, as this disease is hyperendemic in Egypt [Angelico et al., 1997]. The assay was specific as none of the samples examined gave positive results. Similar findings have been reported [Icardi et al., 2001; Muerhoff et al., 2002; Widell et al., 2002]. Hence the HCVcAg assay could be suitable also for HCV genotype 4, which is the most prevalent genotype in Egypt (95.1%, 116/122) [Agha et al., 1998, 1999; Ray et al., 2000].

The examination by the HCVcAg assay undertaken in 246 blood donors infected with various HCV genotypes (1, 2, 3, and 4) was to reveal any genotypic difference. Although the assay seems to be genotype independent, the mean HCVcAg level of genotype 4 among blood donors was significantly lower than that of the other genotypes 1–3. Similarly, in a previous report using the Roche Monitor version 2.0 assay, the mean level of HCV RNA in genotype 4 samples from HCV-infected, PCR-positive blood donors was significantly lower than that of genotype 1 samples [Mellor et al., 1999]. As for reduction of HCVcAg by mutations, it has been reported that one mutation (Thr49Pro) in the core region is responsible for different results of HCVcAg [Tokita et al., 2000]. However, the amino acids alignment of 23 genotype 4 sequences excluded the presence of the mutation in the core region (Fig. 3). The only one common mutation (Thr110Asn) was found in genotype 4 as well as genotype 2a and 3a, however, its role is not confirmed, as there was a significant positive correlation between the HCVcAg and HCV RNA levels in this study. As four independent monoclonal antibodies directed against HCVcAg are used in the HCVcAg assay, the sensitivity was assumed to be stable even though there are a few mutations in the latter regions.

As reported previously [Tanaka et al., 2003], the HCVcAg assay is highly reproducible [coefficients of variation; 0.89–6.92%] and stable (84.8% of the initial level) with incubation of even 25°C for 7 days, compared with the quantitative PCR test. Additionally, it eliminated successfully inhibitors such as heparin from plasma and could be applied to a variety of clinical specimens [Tanaka et al., 2003]. The high sensitivity of the HCVcAg assay reported in this study would widen its use for identification of HCV infection in the diagnostic window period and consequently could improve the safety of blood. Also, the availability of the assay in a quantitative format allows its use in clinical practice to evaluate the effect of antiviral therapy.

In conclusion, the HCVcAg assay is specific, sensitive, and suitable for the detection of viremia in HCV infected subjects with genotypes 1, 2, 3, and 4. It could be a practical alternative to the molecular techniques for detection of viremia among blood donors especially in areas of the world where the nucleic amplification-based methods cannot be implemented. According to our data, we also believe that the quantitation and the monitoring of the HCVcAg level during clinical course would be valuable in HCV-infected patients. The assay is easier, less costly with low risk of contamination compared with RT-PCR assay.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Kazumi Takagi and Ms. Kumiko Hiramatsu for the excellent technical assistance. This is a collaboration study between Egypt and Japan on a grant supported by Young Scientists (B) from the Ministry of Education, Culture, Science, and Sports of

Japan, grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Agha S, Sherif L, Allam MA, Fawzy M. 1998. Transplacental transmission of hepatitis C virus (HCV) in human immunodeficiency virus (HIV) negative mothers. *Res Virol* 149:229–234.
- Agha S, Al-Gendy M, El-Fiky A, El-Emshaty W. 1999. Correlation of serum hepatitis C virus RNA titre with aminotransferases and liver histopathological findings in HCV-seropositive cases with end-stage chronic liver disease. *Microbes Infect* 1:1091–1094.
- Amélia R, Ilma A, Olívia B, Andréa M, Edward P, Donald H, Mette S, Edgar M. 2000. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens infection and immunity. *Infect Immun* 68:2797–2803.
- Angelico M, Renganathan E, Gandin C, Fathy M, Profili MC, Refai W, De Santis A, Nagi A, Amin G, Capocaccia L, Callea F, Rapicetta M, Badr G, Rocchi G. 1997. Chronic liver disease in the Alexandria governorate, Egypt: Contribution of schistosomiasis and hepatitis virus infections. *J Hepatol* 26(2):236–243.
- Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. 1999. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 37(6):1802–1808.
- Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann A, McHutchison J, Pawlotsky JM. 2002. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: A new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 7:211–218.
- Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone B, Durando P, Lee S, Luigi C, Crovari P. 2001. Novel approach to reduce hepatitis C virus (HCV) window period: Clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol* 39(9):3110–3114.
- Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer T, Zappitelli JP, Lefrere JJ. 2003. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: An alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion* 43(7):958–962.
- Mellor J, Hawkins A, Simmonds P. 1999. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol* 37(8):2525–2532.
- Muerhoff AS, Jiang L, Shah DO, Gutierrez RA, Patel J, Garolis C, Kyrk CR, Leckie G, Frank A, Stewart JL, Dawson GJ. 2002. Detection of HCV core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. *Transfusion* 42(3):349.
- Ohno T, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba KI, Orito E, Mukaide M, Williams R, Lau JYN. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J Clin Microbiol* 35:201–207.
- Ray SC, Arthur RR, Carella A, Bukh J, Thomas DL. 2000. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout Egypt. *J Infect Dis* 182:698–707.
- Robert GG, Johnson YN. 1997. Hepatitis C virus, eight years old. *Viral Hepatitis Rev* 3:17–37.
- Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoe K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. 1999. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 116:636–642.
- Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, Yamaguchi K, Yagi S, Kiyosawa K, Alter HJ. 2000. Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* 32:388–393.
- Tanaka Y, Takagi K, Fujiwara T, Kitsugi K, Fujiwara K, Hiramatsu K, Takasaka Y, Sakai M, Ito Y, Mizokami M. 2003. Stable enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen before and after incubation at room temperature. *Hepatology Res* 26:261–267.
- Tokita H, Kaufmann GR, Matsubayashi M, Okuda I, Tanaka T, Harada H, Mukaide M, Suzuki K, Cooper DA. 2000. Hepatitis C virus core mutations reduce the sensitivity of a fluorescence enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 38:3450–3452.
- Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. 1995. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 332:1463–1466.
- Veillon P, Payan C, Picchio G, Maniez-Montreuil M, Guntz P, Lunel F. 2003. Comparative evaluation of the total hepatitis C virus core antigen, branched-DNA, and amplicor monitor assays in

- determining viremia for patients with chronic hepatitis C during interferon plus ribavirin combination therapy. *J Clin Microbiol* 41(7):3212–3220.
- Widell A, Molnegren V, Pieksma F, Calmann M, Peterson J, Lee SR. 2002. Detection of hepatitis C core antigen in serum or plasma as a marker of hepatitis C viremia in the serological window-phase. *Transfusion Med* 12:107–113.
- Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. 1993. Realibility of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 341:722–724.
- Zanetti AR, Romano L, Brunetto M, Colombo M, Bellati G, Tackney C. 2003. Total HCV core antigen assay: A new marker of hepatitis C viremia for monitoring the progress of therapy. *J Med Virol* 70(1): 27–30.