

Genomic Profiler software. Because of our interest in predicting IFN efficacy in hepatitis C, we compared the NR group against SR/TR group [33–35]. We chose genes with a 5% discriminated expression pattern (T test) between two groups ($(SR \text{ vs. NR}) \cap ((SR + TR) \text{ vs. NR})$). The hierarchical tree for these genes is shown in Fig. 4. Appropriate groups were assigned to all but one case, a TR case that was classified into the NR group.

Development of a new algorithm for hierarchical clustering

Although the classical method dealing with multi-parameters allowed satisfactory classification of the patients into two groups, this method is not useful for practical purposes. Thus, the entire data set is necessary for interpretation of the results from the classical analysis even for the analysis of a single test sample. In general, clinical diagnosis requires the common scale to compare the analytical data from samples. But a classical classification presents only a relative scale among samples for comparison.

For these reasons, we have developed a new algorithm. This method is based on the calculation of MD. The concept of the MD calculation is outlined in Fig. 1. This is one of the pattern recognition analysis and determines how close or how far from the standard group of interest. Thus, it deals with multi-parameters leading to single parameter, Mahalanobis distance (MD) as a scale, from the center of gravity of SSDB established by a training set shown in Fig. 1. Prior to the MD calculation, it was necessary to establish a SSDB with a training data set randomly selected but with clear and known clinical outcome. The standard expression pattern obtained from the SR/TR group, which was the established data source for SSDB, is shown in Fig. 5A and the new test sample pattern of the NR group is shown in Fig. 5B. The red color represents the higher expression profile and green depicts the lower expression profile with an interrelating style at the same time. Then, the pattern recognition algorithm Eqs. (1)–(3) was applied to compare the two groups. Among these expression patterns, we selected the stably and differentially expressed gene set data. Then, every selected gene expression pattern was correlated to each other like connecting a network. Thus, based on Eqs. (1)–(3), the elements that distinguish the groups shown were selected to create the SSDB. The SSDB was created based on variance and covariance. Once we established the SSDB and the center of gravity of the SSDB, we calculated a MD value for each new test sample (Eq. (4)). We utilized SMD value (divided the MD value by the number of parameters) to reduce MD value (Eq. (5)) and simplify understanding of the results [25]. The classification of IFN efficacy prediction to hepatitis C patients is shown in Fig. 6 and clearly shows that this analysis generates

the NR and SR/TR groups and they are predicted with 100% accuracy ($p < 0.005$). The sample size (15 cases) was too small for statistical validation. Further detailed analyses and validation are ongoing in our laboratory and will be reported elsewhere.

Although the MD method is popular in even biological system publications [36,37], an application of MD method to microarray data is not so popular yet. The current studies are not the first published report where MD for analysis of gene expression data [38]. However, that report focused on the differential expression of a causative gene in conjunction with a standard hierarchical clustering algorithm. In our studies, we have attempted to scale the test sample position as a simple understandable parameter with a new pattern recognition algorithm. Once the SSDB scale has been established for a project, the MD can be easily used to classify new data according to the NR and TR/SR groups on an absolute scale (Fig. 6). This system will be acceptable for clinicians as a simple system for understanding the microarray data.

Conclusions

Besides the technical issues, there are many factors that control the variability within a microarray system, including individual differences between patients, the duration of the disease of each patient, different therapeutic protocols, and complications with other diseases. Some of these factors interact with each other, while others are independent. Therefore, an algorithm that allows some variability in the measurements is needed for prediction of therapeutic outcomes. The algorithm presented here appears to satisfy this requirement and it simplifies handling of large data sets. Finally, this algorithm should be generally applicable to the prediction of therapeutic outcome of diseases.

Acknowledgments

We thank Professor Kazunari Akiyoshi and Dr. Akihiko Watanabe (Tokyo Medical and Dental University) for scanning electron microscopy and Professor Kouji Matsushima (University of Tokyo) for helpful discussions.

References

- [1] M. Sanchez-Carbajo, Use of high-throughput DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer, *Clin. Chem.* 49 (2003) 23–31.
- [2] P.F. Macgregor, J.A. Squire, Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1170–1177.
- [3] C.H. Chung, P.S. Bernard, C.M. Perou, Molecular portraits and the family tree of cancer, *Nat. Genet.* 32 (Suppl.) (2002) 533–540.

- [4] N.L. Harris, H. Stein, S.E. Coupland, M. Hummel, R.D. Favera, L. Pasqualucci, W.C. Chan, New approaches to lymphoma diagnosis, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* (2001) 194–220.
- [5] L.T. Lam, O.K. Pickeral, A.C. Peng, A. Rosenwald, E.M. Hurt, J.M. Giltane, L.M. Averett, H. Zhao, R.E. Davis, M. Sathya-moorthy, L.M. Wahl, E.D. Harris, J.A. Mikovits, A.P. Monks, M.G. Hollingshead, E.A. Sausville, L.M. Staudt, Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol, *Genome Biol* 2 (2001) research0041.
- [6] D.G. Beer, S.L. Kardia, C.C. Huang, T.J. Giordano, A.M. Levin, D.E. Misek, L. Lin, G. Chen, T.G. Gharib, D.G. Thomas, M.L. Lizyness, R. Quick, S. Hayasaka, J.M. Taylor, M.D. Iannettoni, M.B. Orringer, S. Hanash, Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma, *Nat. Med.* 8 (2002) 816–824.
- [7] E. Huang, S.H. Cheng, H. Dressman, J. Pittman, M.H. Tsou, C.F. Horng, A. Bild, E.S. Iversen, M. Liao, C.M. Chen, M. West, J.R. Nevins, A.T. Huang, Gene expression predictors of breast cancer outcomes, *Lancet* 361 (2003) 1590–1596.
- [8] M.L. Lee, F.C. Kuo, G.A. Whitmore, J. Sklar, Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9834–9839.
- [9] G.C. Tseng, M.K. Oh, L. Rohlin, J.C. Liao, W.H. Wong, Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2549–2557.
- [10] F. Diehl, S. Grahlmann, M. Beier, J.D. Hoheisel, Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) E38.
- [11] L. Luo, R.C. Salunga, H. Guo, A. Bittner, K.C. Joy, J.E. Galindo, H. Xiao, K.E. Rogers, J.S. Wan, M.R. Jackson, M.G. Erlander, Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes, *Nat. Med.* 5 (1999) 117–122.
- [12] O. Kitahara, Y. Furukawa, T. Tanaka, C. Kihara, K. Ono, R. Yanagawa, M.E. Nita, T. Takagi, Y. Nakamura, T. Tsunoda, Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia, *Cancer Res.* 61 (2001) 3544–3549.
- [13] L. Assersohn, L. Gangi, Y. Zhao, M. Dowsett, R. Simon, T.J. Powles, E.T. Liu, The feasibility of using fine needle aspiration from primary breast cancers for cDNA microarray analyses, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 794–801.
- [14] D.A. Wigle, I. Jurisica, N. Radulovich, M. Pintilie, J. Rossant, N. Liu, C. Lu, J. Woodgett, I. Seiden, M. Johnston, S. Keshavjee, G. Darling, T. Winton, B.J. Breitkreutz, P. Jorgenson, M. Tyers, F.A. Shepherd, M.S. Tsao, Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival, *Cancer Res.* 62 (2002) 3005–3008.
- [15] T.C. Van Der Pouw Kraan, F.A. Van Gaalen, T.W. Huizinga, E. Pieterman, F.C. Breedveld, C.L. Verweij, Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair, *Genes Immun.* 4 (2003) 187–196.
- [16] T. Yamashita, S. Hashimoto, S. Kaneko, S. Nagai, N. Toyoda, T. Suzuki, K. Kobayashi, K. Matsushima, Comprehensive gene expression profile of a normal human liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 110–116.
- [17] T. Yamashita, S. Kaneko, S. Hashimoto, T. Sato, S. Nagai, N. Toyoda, T. Suzuki, K. Kobayashi, K. Matsushima, Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 647–654.
- [18] H. Yatsuhashi, K. Yamasaki, T. Aritomi, P. Maria, D. Carmen, O. Inoue, M. Koga, M. Yano, Quantitative analysis of interferon alpha/beta receptor mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: correlation with serum hepatitis C virus-RNA levels and response to treatment with interferon, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (1997) 460–467.
- [19] E. Mizukoshi, S. Kaneko, M. Yanagi, H. Ohno, K. Kaji, S. Terasaki, A. Shimoda, E. Matsushita, K. Kobayashi, Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients, *J. Med. Virol.* 56 (1998) 217–223.
- [20] F.L. Dumoulin, U. Wennrich, H.D. Nischalke, L. Leifeld, H.P. Fischer, T. Sauerbruch, U. Spengler, Intrahepatic mRNA levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and response to antiviral treatment of chronic hepatitis C, *J. Hum. Virol.* 4 (2001) 195–199.
- [21] H.F. Kawai, S. Kaneko, M. Honda, Y. Shirota, K. Kobayashi, Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis, *Hepatology* 33 (2001) 676–691.
- [22] T. Ito, K. Yasui, J. Mukaigawa, A. Katsume, M. Kohara, K. Mitamura, Acquisition of susceptibility to hepatitis C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes: establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system, *Hepatology* 34 (2001) 566–572.
- [23] A.B. Khodursky, B.J. Peter, N.R. Cozzarelli, D. Botstein, P.O. Brown, C. Yanofsky, DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12170–12175.
- [24] M. Ellis, N. Davis, A. Coop, M. Liu, L. Schumaker, R.Y. Lee, R. Srikanchana, C.G. Russell, B. Singh, W.R. Miller, V. Stearns, M. Pennanen, T. Tsangaris, A. Gallagher, A. Liu, A. Zwart, D.F. Hayes, M.E. Lippman, Y. Wang, R. Clarke, Development and validation of a method for using breast core needle biopsies for gene expression microarray analyses, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1155–1166.
- [25] G. Taguchi, J. Rajesh, *The Mahalanobis-Taguchi strategy*, ed., Wiley, New York, 2002.
- [26] J.C. Chang, E.C. Wooten, A. Tsimelzon, S.G. Hilsenbeck, M.C. Gutierrez, R. Elledge, S. Mohsin, C.K. Osborne, G.C. Chamness, D.C. Allred, P. O'Connell, Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer, *Lancet* 362 (2003) 362–369.
- [27] C. Workman, L.J. Jensen, H. Jarmer, R. Berka, L. Gautier, H.B. Nielsen, H.H. Saxild, C. Nielsen, S. Brunak, S. Knudsen, A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments, *Genome Biol* 3 (2002) research0048.
- [28] J.H. Kim, D.M. Shin, Y.S. Lee, Effect of local background intensities in the normalization of cDNA microarray data with a skewed expression profiles, *Exp. Mol. Med.* 34 (2002) 224–232.
- [29] Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T.P. Speed, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e15.
- [30] X. Wang, S. Ghosh, S.W. Guo, Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) E75.
- [31] E.M. Glare, M. Divjak, M.J. Bailey, E.H. Walters, β -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels, *Thorax* 57 (2002) 765–770.
- [32] P.D. Lee, R. Sladek, C.M. Greenwood, T.J. Hudson, Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies, *Genome Res.* 12 (2002) 292–297.
- [33] S. Nishiguchi, T. Kuroki, S. Nakatani, H. Morimoto, T. Takeda, S. Nakajima, S. Shiomi, S. Seki, K. Kobayashi, S. Otani, Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of

- hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis, *Lancet* 346 (1995) 1051–1055.
- [34] K. Kuwana, T. Ichida, T. Kamimura, S. Ohkoshi, N. Ogata, T. Harada, K. Endoh, H. Asakura, Risk factors and the effect of interferon therapy in the development of hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis in 343 patients, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (1997) 149–155.
- [35] M.R. Brunetto, F. Oliveri, M. Koehler, F. Zahm, F. Bonino, Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study group, *Lancet* 351 (1998) 1535–1539.
- [36] K.R. Coombes, H.A. Fritsche Jr., C. Clarke, J.N. Chen, K.A. Baggerly, J.S. Morris, L.C. Xiao, M.C. Hung, H.M. Kuerer, Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1615–1623.
- [37] O. Samek, H.H. Telle, D.C. Beddows, Laser-induced breakdown spectroscopy: a tool for real-time, in vitro and in vivo identification of carious teeth, *BMC Oral Health* 1 (2001) 1.
- [38] A. Chilingaryan, N. Gevorgyan, A. Vardanyan, D. Jones, A. Szabo, Multivariate approach for selecting sets of differentially expressed genes, *Math. Biosci.* 176 (2002) 59–69.

Natural Interferon α Treatment and Interferon α Receptor 2 Levels in Acute Hepatitis C

KAZUYUKI OHATA,*† KOJI YANO,* HIROSHI YATSUHASHI,* MANABU DAIKOKU,*
MICHIAKI KOGA,* KATSUMI EGUCHI,* and MICHITAMI YANO*

Efficacy of interferon (IFN) therapy during the acute phase of hepatitis C infection is promising, although the optimal regimen has yet to be determined. It is not known whether the known prognostic factors for chronic hepatitis C (CHC) influence the effect of IFN in acute hepatitis C (AHC). Seventeen patients with AHC were analyzed for hepatic IFN α receptor 2 (IFNAR2) prior to IFN treatment. All patients were subsequently treated with either 168 million units (MU) or 336 MU of natural IFN α . Seventeen age-matched samples of CHC were provided as controls. The overall sustained response rate was 64.7% (11/17). In patients who received a total dose of 168 MU IFN, the sustained response rate was 28.6% (2/7), and in those who received 336 MU of IFN, the sustained response rate was 90.0% (9/10). The peaks of ALT and HCV-RNA quantity were not associated with the response to IFN. The hepatic IFNAR2 levels were 1.52 ± 0.34 densitometry units and 0.92 ± 0.16 in AHC and CHC, respectively ($P = 0.042$). There was no difference in hepatic IFNAR2 levels between sustained virological responders (SVR) and nonsustained virological responders (NR). The hepatic receptor levels were higher in AHC than in CHC patients. The levels of hepatic IFNAR2 did not differ in SVR and NR, indicating that high-dose natural IFN α treatment is effective for AHC, irrespective of the levels of hepatic IFNAR2.

KEY WORDS: acute hepatitis C; natural interferon α ; hepatic IFNAR2.

Hepatitis C infection poses a serious problem all over the world. About 30% of patients with chronic hepatitis C (CHC) will develop cirrhosis within 3 to 20 years, and a large number of these patients will develop complications such as liver failure, portal hypertension, and hepatocellular carcinoma (1). Interferon (IFN) is the most common treatment for chronic hepatitis C virus (HCV) infection but a substantial portion of patients does not respond, and many responders relapse after stopping treatment.

It is well known that the virological efficacy of IFN monotherapy on chronic hepatitis C (CHC) is only about 30% (1, 2). IFN and ribavirin combination therapy improved response rate up to about 50% (3, 4). Patient selection, depending on the prognostic factors, however, allows virus eradication in a higher percentage of patients. Such prognostic factors include HCV viral load, HCV genotype, NS-5A mutation, and histological progression of the disease (1, 2). Moreover, others (5) and we (6) have reported a correlation between the effect of IFN and hepatic IFN α receptor 2 (IFNAR2), which play a pivotal role in IFN therapy against HCV infection.

Manuscript received February 21, 2003; accepted October 31, 2003.

From the *Institute for Clinical Research, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Viral Hepatitis, National Nagasaki Medical Center, Nagasaki 856-8562, and †The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto Nagasaki City, Nagasaki 852-8501, Japan.

Address for reprint requests: Hiroshi Yatsuhashi, MD, Institute for Clinical Research, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Viral Hepatitis, National Nagasaki Medical Center, 2-1001-1 Kubara Omura, Nagasaki 856-8562, Japan; yatsuhashi@nmc.hosp.go.jp.

Acute hepatitis C (AHC) infection has a tendency to progress to chronic hepatitis in 55–88% (7–10). Because of the high rate of chronic infection resulting from acute hepatitis C, several studies have been conducted to seek an effective therapy during the acute phase which may prevent progression to chronicity (11–14). Several uncontrolled (15, 16) and controlled (12, 14, 17, 18) studies of

IFN therapy in patients with AHC have been performed aiming to assess the effects of treatment on serum alanine aminotransferase (ALT) level, viral markers, and histological necroinflammation. To increase the statistical power to resolve uncertainty and to improve estimates of effect size, a few meta-analysis based on the results of controlled trials have been performed (19–21). All but one (22) support IFN therapy in AHC, showing effectiveness ranging from 35 to 90%. However, the reason these high virological efficacies of IFN are obtained against AHC infection has not been elucidated to date.

Results of IFN therapy during the acute phase of HCV infection are promising, although the optimal regimen is yet to be determined. Moreover, it is not known whether the known prognostic factors for CHC influence the effect of IFN in AHC. In the current study, we retrospectively analyzed 17 cases of AHC and assessed the efficacy of IFN with respect to pretreatment values including HCV viral load, HCV genotype, and the levels of hepatic IFNAR2.

METHODS

Patient Selection and Diagnosis. Diagnosis of acute hepatitis was based on the finding of elevated values of serum ALT at least five times the normal values, associated with either HCV antibody seroconversion of second-generation ELISA (ELISA III; Ortho Diagnostic System), or positivity of HCV-RNA by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Patients for whom other causes of liver disease were suspected were excluded. Seventeen patients (6 males and 11 females) treated at National Nagasaki Medical Center between 1987 and 1999 fulfilled the inclusion criteria.

Liver biopsy specimens obtained from CHC patients between 2000 and 2001 were provided as controls for immunohistochemistry. CHC patients were routinely subjected to liver biopsy at National Nagasaki Medical Center. Seventeen samples were selected of consecutively obtained 74 CHC samples on a crudely age-matching basis.

Written informed consent was obtained from each patient upon enrollment for the study.

HCV Genotype and HCV-RNA Quantification. HCV genotyping was performed by PCR amplification on core region sequences with universal and five subtype-specific primers according to Okamoto *et al.* (23) and their modified version (24). According to this classification, HCV genotypes can be classified into five distinct categories. Genotypes I, II, III, IV, and V correspond to 1a, 1b, 2a, 2b, and 3a in Simmonds' classification (25), respectively.

HCV-RNA quantification was performed by the branched DNA signal amplification method (Quantiplex 2.0; Chiron Diagnostics), which is based on hybridization with specific probes located in the 5' noncoding region of HCV, with a detection limit of 0.3 Meq/ml.

IFN Therapy and Follow-up. Natural IFN α (Sumiferon; Sumitomo Pharmaceuticals, Tokyo) was administered subcutaneously at doses of 6 million units (MU) daily for either 4 weeks (total, 168 MU) or 8 weeks (total, 336 MU). All patients were hospitalized during the treatment. Patients were followed

up as outpatients monthly for at least 24 weeks after the end of treatment.

Histological Analysis. All liver tissue specimens were obtained by needle biopsy. Specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut to a thickness of 4 μ m, and stained with hematoxylin-eosin and Azan. In each patient, the liver biopsy sample confirmed the diagnosis of acute hepatitis.

Analysis for Hepatic IFNAR2 Levels. Liver biopsy samples were evaluated using an indirect immunoperoxidase staining technique as described previously (6). Briefly, samples embedded in paraffin and cut into 4- μ m slices were deparaffinized with xylene and 100, 90, 80, and 70% ethanol, microwaved for 5 min, then subjected to immunostaining using monoclonal anti-IFNAR2. Mouse monoclonal antibody against human IFNAR2 (kindly provided by Otuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) at a 1:10,000 dilution was applied to the slide and incubated at 4°C overnight. Standard streptavidin-biotin (Histofine SAB-PO(M) kit; Nichirei, Tokyo) method was utilized for immunohistochemical reaction. As a negative control, normal, nonimmune mouse serum was used instead of the anti-IFNAR2. The staining intensity in each image was quantified by computer-image quantitative analysis. The expression intensity was assessed in at least three lobular areas, and the average value for each specimen was determined. The expression intensity in one normal control sample was defined as 1.0 densitometry unit (DU).

Assessment of Efficacy. The treatment was considered to be effective when a sustained virological response (SVR), defined by the absence of detectable levels of HCV-RNA in serum 24 weeks after the end of treatment, was achieved with normal ALT levels. All patients who did not meet the criteria of SVR were defined as nonsustained virological responders (NR).

Statistical Analysis. Data are expressed as mean \pm SD. Differences between groups were examined for statistical significance using nonparametric test (Mann-Whitney *U* test). Chi-square test was also utilized where appropriate. A *P* value less than 0.05 was considered a statistically significant difference.

RESULTS

General Characteristics of the Patients Studied.

The source of infection included blood transfusion (before July 1990; 10 cases; 59%) and needle-stick injury (2 cases; 12%). In five cases (29%), the mode of infection was unclear. The average time from infection to the first signs or symptoms of disease was 43.5 days (median; range, 23 to 180 days). All patients received IFN therapy for 4 or 8 weeks. Genotypes 1b, 2a, and 2b were detected in seven, seven, and one, respectively. All patients completed therapy and follow-up. Patients' clinical backgrounds are listed in Table 1.

Response to IFN Therapy. Overall sustained response rate was 64.7% (11/17). In patients whose total dose of interferon was 168 MU, sustained response rate was 28.6% (2/7). In patients whose total dose was 336 MU, sustained response rate was 90.0% (9/10). No apparent associations were seen between peak of ALT and HCV-RNA quantity or response to IFN. Although modes of infection were not clear in five patients the time from

INTERFERON RECEPTOR LEVELS IN ACUTE HEPATITIS C

TABLE 1. PATIENT CHARACTERISTICS

Patient No.	Age (yr)	Gender	Mode of infection	Peak of ALT (IU/L)	Pre-IFN HCV RNA (Meq/ml)	HCV genotype	IFN, total dose	Effect of IFN
1	40	F	BT	1154	<0.3	1b	6 MU, 4 weeks, daily (168 MU)	SVR
2	33	F	BT	470	<0.3	2a		SVR
3	35	F	BT	1240	21.8	1b		NR
4	48	F	BT	923	<0.3	1b		NR
5	43	M	BT	350	0.4	1b		NR
6	44	F	Unknown	1192	1.4	1b		NR
7	64	M	BT	440	1.6	Mixed (1b and 2a)		NR
8	32	M	BT	380	4.3	1b	6 MU, 8 weeks, daily (336 MU)	SVR
9	41	M	BT	395	12.3	Mixed (1b and 2a)		SVR
10	68	M	Unknown	2412	<0.3	2a		SVR
11	32	F	BT	550	<0.3	2b		SVR
12	28	F	Unknown	1238	0.3	2a		SVR
13	30	M	Needle stick	682	0.8	2a		SVR
14	59	F	Needle stick	300	<0.3	2a		SVR
15	24	F	Unknown	1352	10.0	2a		SVR
16	42	F	Unknown	2304	<0.3	2a		SVR
17	33	F	BT	1138	<0.3	1b		NR

Note. SVR, sustained virological responder; NR, nonsustained virological responder; BT, blood transfusion.

infection to initiation of IFN therapy of the SVR and NR groups were among patients whose transmission route was known.

Comparison of IFN Receptor Levels Between AHC and CHC. Because the mean age of consecutive 74 CHC patients admitted to our hospital in 2000 and 2001 was much higher than that of AHA patients, 17 samples were selected on an age-matching basis and were provided as controls for immunohistochemical study. Table 2 shows the levels of hepatic IFNAR2 levels as well as other parameters of these two groups. Male gender was predominant in the CHC group and female gender was more frequent in the AHC group, but the difference was not significant. Hepatic IFNAR2 levels were 1.52 ± 0.34 and 0.92 ± 0.16 DU in AHC and CHC, respectively ($P = 0.042$). The significance was even higher when all 74 CHC patients (0.95 ± 0.06 DU) were included in the analysis ($P = 0.005$; data not shown).

Adverse Events. Therapy was tolerated in all patients. The spectrum of side effects was similar to that reported in previous reports on IFN monotherapy for CHC, including flu-like symptoms, arthralgia, neutropenia, and thrombocytopenia. There were no serious adverse effects during therapy.

TABLE 2. COMPARISON OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C (CHC) AND ACUTE HEPATITIS C (AHC)

	CHC (n = 17)	AHC (n = 17)	P
Gender (male:female)	11:6	6:11	0.086
Age (yr)	42.1 ± 2.1	40.9 ± 9.9	0.755
Hepatic IFNAR2 (DU)	0.92 ± 0.16	1.52 ± 0.34	0.042
Genotype (1b:other type)	9:7 (mixed in 1)	7:10	

Levels of Hepatic IFNAR2 in AHC. Table 3 shows the comparison between SVR and NR for IFN therapy in acutely HCV-infected patients ($n = 17$). There are no significant difference in gender, age, peak ALT levels, HCV-RNA levels, or hepatic IFNAR2. Genotype 1b was more common in NR according to univariate analysis. Total IFN dose (169 vs 336 MU) strongly affected the outcome of acute hepatitis C ($P = 0.009$).

Figure 1 indicates the levels of hepatic IFNAR2 in AHC and CHC. There was no difference in hepatic IFNAR2 levels between SVR (1.43 ± 0.35) and NR (1.70 ± 0.25) patients with AHC, whereas they were both significantly higher than the hepatic IFNAR2 levels of CHC patients ($P = 0.028$ and $P = 0.012$, respectively).

DISCUSSION

Unlike hepatitis A and hepatitis B virus infection, the rate of chronic evolution of HCV infection is very high. The rate of chronicity in HCV infection has been reported

TABLE 3. COMPARISON OF SUSTAINED VIROLOGICAL RESPONDERS (SVR) AND NONSUSTAINED VIROLOGICAL RESPONDERS (NR)

	SVR	NR	P
Gender (male:female)	4:7	2:4	>0.999
Age (yr)	39.0 ± 13.4	44.5 ± 11.1	0.410
Mode of infection (blood transfusion:others)	5:6	5:1	0.308
Peak of ALT (IU/L)	1021.5 ± 756.2	880.5 ± 392.4	0.679
HCV-RNA (Meq/ml)	5.5 ± 5.4	6.3 ± 10.3	0.890
Hepatic IFNAR2 (DU)	1.43 ± 0.35	1.70 ± 0.25	0.120
Genotype (1b:other type)	2:9	5:1	0.036
Total dose of IFN (336:168 MIU)	9:2	1:5	0.036

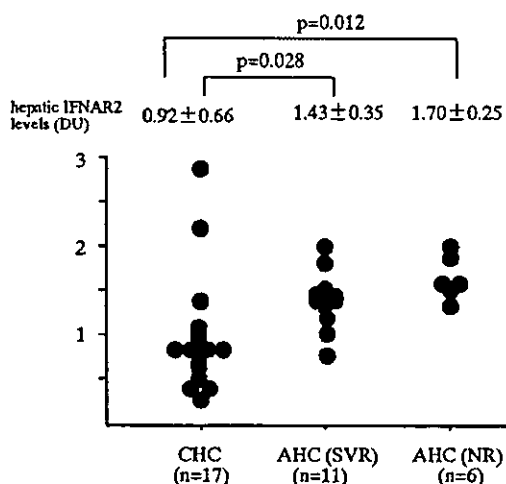


Fig 1. Hepatic IFNAR2 levels in patients with acute hepatitis C ($n = 17$: sustained virological responders, 11; nonsustained virological responders, 6) and chronic hepatitis C ($n = 17$). AHC, acute hepatitis C; CHC, chronic hepatitis C; SVR, sustained virological responders; NR, nonsustained virological responders.

to be 59–88% (7, 8) in transfusion-associated cases and 55–62% (9, 10) in sporadic cases. Once HCV infection progresses to chronic stages, the long-term response to IFN monotherapy is poor. Recently, combination therapy with ribavirin has been established, but it still has limits, including insufficient HCV clearance and significant side effects (26).

On the other hand, high rates of resolution of AHC after IFN therapy have been reported. Hence, it would be rational to challenge stopping infection during the acute phase. For example, recently, a German group (27) reported a nationwide, prospective study in which 44 patients were enrolled. In the study, patients received 5 MU of interferon α -2b daily for 4 weeks and then three times per week for another 20 weeks. Ninety-eight percent of patients had undetectable levels of HCV-RNA in serum at the end of follow-up (24 weeks after the therapy). Based on the results, they suggested that all patients with AHC should be treated, admitting that about 30% of their patients would have had self-limited disease, regardless of whether they received IFN.

Others claim, however, that treating the acutely infected could be harmful, in providing drug therapy for patients whose hepatitis C would have resolved spontaneously (13, 28). Moreover, there is no consensus on the optimal dose, daily versus three times a week injections, or duration of therapy in the setting of AHC.

We reported a comparative study of IFN treatment for AHC in which administration of 6 MU of natural IFN α daily for 4 weeks (total, 168 MU) and 8 weeks (total, 336

MU) was compared. Apparently, the 8-week protocol resulted in a favorable outcome regarding the disappearance of HCV-RNA (90% [9/10] vs. 28% [2/7]).

A total dose of 336 MU of natural IFN α in total is considered to be the “medium” dose in therapy for CHC, suggesting that the amount is safe even for treatment of AHC. Takano *et al.* (12) previously showed a good response (83%) with the same dose of IFN β (336 MU), compared to lower doses, in a randomized, controlled-dose study. Increasing the dose of IFN significantly increased the rate of virological response (as shown in Refs. 12, 14, 18, and 29). Indeed, the German study utilized 440 MU of IFN α 2b in total. They admitted that shorter periods of treatment might have been sufficient in patients in whom serum levels of HCV-RNA quickly became undetectable. Thus, the optimal regimen of IFN for AHC should be further elaborated with care.

The reason these high virological efficacies of IFN are obtained against acute HCV infection has not been elucidated. Additionally, factors that determine the virological response rate after IFN therapy are poorly understood. Gursoy *et al.* (30) studied the effects of IFN α 2b treatment in hemodialysis patients with acute HCV infection to identify factors that predict the response to this therapy. They found that pretreatment HCV load and genotype were not significantly associated with virological sustained response and that quasispecies heterogeneity was the only parameter that predicted virological response in their 53 patients.

On the other hand, Toyoda *et al.* (31) reported a patient with AHC whose HCV was transmitted by a needle-stick accident from a patient with CHC who had failed to eradicate HCV with IFN therapy. The transmitted HCV was successfully eradicated from the patient with AHC, suggesting some host immune responses in patients with acute viral infections distinct from those in patients with chronic infection.

Human IFN α and β have been considered to elicit their effect via their receptor, IFNAR2 (32). We have reported a strong association between the effect of IFN and the levels of hepatic IFNAR2 mRNA (33) and protein (6) in chronic HCV-infected patients. In the current study, we evaluated if the levels of IFN receptor influence the effect of IFN for those acutely infected by HCV.

As stated above, many studies have shown high resolution rates of AHC after IFN therapy but the reason is yet to be clarified. We conducted a retrospective, immunohistochemical study to clarify whether the IFN receptor levels affect the response of acute hepatitis to IFN therapy. The results indicate that acutely HCV-infected liver expresses higher levels of IFN receptor than does chronically infected liver.

Univariate analysis revealed that there was no difference in the levels of IFN receptor between SVR and NR, suggesting a distinct factor that regulates IFN efficacy. Although the limited number of samples did not allow us to perform multivariate analysis to reveal independent factors associated with the effect of IFN therapy, previous data suggest that genotype is not a strong determinant of IFN efficacy in AHC (27, 30, 31). To reveal the impact of IFN receptors on IFN therapy for AHC, further controlled study is warranted.

In conclusion, we showed that the higher-total dose regimen was superior to the lower total dose in the treatment of AHC. The hepatic receptor level was higher in AHC patients compared to CHC patients, suggesting that the IFN receptor is one of the causes of the high resolution rate of IFN α . The levels of IFNAR2 did not differ in SVR and NR, indicating that high-dose natural IFN α treatment is effective for AHC, irrespective of the levels of hepatic IFNAR2.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Ms. Mika Fukuda for her excellent assistance with immunohistochemical staining.

REFERENCES

1. Fried MW, Hoofnagle JH: Therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 15:82-91, 1995
2. Bonis PA, Ioannidis JP, Cappelleri JC, Kaplan MM, Lau J: Correlation of biochemical response to interferon alfa with histological improvement in hepatitis C: A meta-analysis of diagnostic test characteristics. *Hepatology* 26:1035-1044, 1997
3. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, *et al.*: Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 358:958-965, 2001
4. Ferenci P, Brunner H, Nachbaur K, *et al.*: Combination of interferon induction therapy and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology* 34:1006-1011, 2001
5. Mizukoshi E, Kaneko S, Yanagi M, *et al.*: Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 56:217-223, 1998
6. Yatsuhashi H, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M: Immunohistochemical analysis of hepatic interferon alpha-beta receptor level: Relationship between receptor expression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 30:995-1003, 1999
7. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, *et al.*: Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 325:1325-1329, 1991
8. Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Wang CY, Chen DS: Post-transfusion hepatitis revisited by hepatitis C antibody assays and polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 103:609-616, 1992
9. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, *et al.*: The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel

- Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 327:1899-1905, 1992
10. Tanaka E, Kiyosawa K: Natural history of acute hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 15:E97-E104, 2000
11. Omata M, Yokosuka O, Takano S, *et al.*: Resolution of acute hepatitis C after therapy with natural beta interferon. *Lancet* 338:914-915, 1991
12. Takano S, Satomura Y, Omata M: Effects of interferon beta on non-A, non-B acute hepatitis: A prospective, randomized, controlled-dose study. Japan Acute Hepatitis Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 107:805-811, 1994
13. Vogel W: Treatment of acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 31:189-192, 1999
14. Lampertico P, Rumi M, Romeo R, *et al.*: A multicenter randomized controlled trial of recombinant interferon-alpha 2b in patients with acute transfusion-associated hepatitis C. *Hepatology* 19:19-22, 1994
15. Ohnishi K, Nomura F, Nakano M: Interferon therapy for acute post-transfusion non-A, non-B hepatitis: Response with respect to anti-hepatitis C virus antibody status. *Am J Gastroenterol* 86:1041-1049, 1991
16. Palmovic D, Kurelac I, Cmrjakovic-Palmovic J: The treatment of acute post-transfusion hepatitis C with recombinant interferon-alpha. *Infection* 22:222-223, 1994
17. Viladomiu L, Genesca J, Esteban JI, *et al.*: Interferon-alpha in acute posttransfusion hepatitis C: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 15:767-769, 1992
18. Hwang SJ, Lee SD, Chan CY, Lu RH, Lo KJ: A randomized controlled trial of recombinant interferon alpha-2b in the treatment of Chinese patients with acute post-transfusion hepatitis C. *J Hepatol* 21:831-836, 1994
19. Camma C, Almasio P, Craxi A: Interferon as treatment for acute hepatitis C. A meta-analysis. *DigDis Sci* 41:1248-1255, 1996
20. Quin JW: Interferon therapy for acute hepatitis C viral infection—A review by meta-analysis. *Aust NZ J Med* 27:611-617, discussion 617-618, 1997
21. Thevenot T, Regimbeau C, Ratziu V, Leroy V, Opolon P, Poynard T: Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C in naive patients: 1999 update. *J Viral Hepatol* 8:48-62, 2001
22. Calleri G, Colombaro P, Gozzelino M, *et al.*: Natural beta interferon in acute type-C hepatitis patients: A randomized controlled trial. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30:181-184, 1998
23. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, *et al.*: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73:673-679, 1992
24. Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, *et al.*: Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* 74:2385-2390, 1993
25. Simmonds P: Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 31:54-60, 1999
26. Davis GL: Current therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 118:S104-S114, 2000
27. Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, *et al.*: Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 345:1452-1457, 2001
28. Orland JR, Wright TL, Cooper S: Acute hepatitis C. *Hepatology* 33:321-327, 2001

29. Vogel W, Graziadei I, Umlauf F, *et al.*: High-dose interferon-alpha2b treatment prevents chronicity in acute hepatitis C: a pilot study. *Dig Dis Sci* 41:81S-85S, 1996
30. Gursoy M, Gur G, Arslan H, Ozdemir N, Boyacioglu S: Interferon therapy in haemodialysis patients with acute hepatitis C virus infection and factors that predict response to treatment. *J Viral Hepatol* 8:70-77, 2001
31. Toyoda H, Sakamoto H, Mizuno T, Horiguchi Y, Nakano H: Eradication of hepatitis C virus 1b by interferon in a health care worker with acute hepatitis following needlestick transmission from a patient with chronic hepatitis C unresponsive to interferon. *Scand J Gastroenterol* 35:1117-1120, 2000
32. Novick D, Cohen B, Rubinstein M: The human interferon alpha/beta receptor: Characterization and molecular cloning *Cell* 77:391-400, 1994
33. Yatsuhashi H, Yamasaki K, Aritomi T, *et al.*: Quantitative analysis of interferon alpha/beta receptor mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: Correlation with serum hepatitis C virus-RNA levels and response to treatment with interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 12:460-467, 1997

月のテーマ ● わが国の C 型肝炎の現

日本の肝臓は、なぜ多いのか

八橋 弘¹⁾

要旨：日本は、HCV 感染率では高罹患国でないにもかかわらず、世界中の中で日本ほど HCV 感染による肝発癌のリスクが高い国はない。HCV 感染者における肝発癌のリスク要因としては、アルコールや性差などの多くの因子が考えられるが、その中でも年齢の因子が大きく関与していると思われる。すなわち、日本の HCV 感染者に肝臓が多い理由としては、1) HCV 感染による肝臓好発年齢が 60 歳代である、2) 現在の日本の HCV 感染者が 60 歳以後の高齢者に大きな集団を形成している、という二つの要因が現在重なっているからと考えられる。

索引用語：C 型肝炎、肝臓、遺伝子多型

はじめに

わが国には約 150 万人から 200 万人の HCV (C 型肝炎ウイルス) キャリアーが存在すると推定されている。一方、わが国の年間肝臓死亡者数は 3 万 2000 人を越し、肝臓は主要悪性新生物死亡順位の男性では第 3 位、女性では第 4 位に位置している¹⁾。また、その肝臓死亡者の約 8 割が HCV 感染に由来し、日本では HCV 感染者は非感染者に比較して 1000 倍近くの肝臓のリスクを有することも明らかとなっている。一方、世界の HCV 感染者は 1 億 7000 万人存在すると推定されている²⁾。今までに得られた知見によると、HCV 感染率では日本は高罹患国でないにもかかわらず日本ほど HCV 感染による肝発癌のリスクが高い国はないことが明らかとなってきた。各種国際会議においても、日本での HCV 感染と肝臓との関係、日本の特殊性が話題となっているも、なぜ日本人は HCV 感染による高発癌リスクを有するのか、その理由は明確にはされていない。わが国の HCV 感染と肝臓の状況を諸外国と比較することにより、その特殊性をクローズアップしながら、わが国の HCV 感染の状況を現在までに得られている

知見をもとに考察したい。

I わが国の HCV 感染者数の推定

日赤血液センターでは年間 700 万検体の献血血液が採取されており、この検査成績より、わが国の HCV キャリアー数の推定が可能である。日赤血液センターでは、献血時の検査で HCV 抗体陽性が判明した者には結果を通知し、安全な血液の確保の観点から以後の献血の辞退の勧告をおこなっており、また献血辞退勧告を受けない一般献血者の中には 1 年間に複数回献血する者も少なくない。1995 年 4 月から 1996 年 3 月までの 1 年間に献血した全献血者の中から、このようなバイアスを除く目的で、初回献血者 272343 人を抽出し、その集団内における HCV 抗体陽性率が日赤より報告されている³⁾。それによると各年代での HCV 抗体陽性率は、20 歳代で 0.38%、30 歳代で 1.06%、40 歳代で 1.29%、50 歳～64 歳では 2.54% と、年齢が高くなるにつれて HCV 抗体陽性率も明らかに上昇している。一方、日赤調査では 65 歳以上の対象群での HCV 抗体陽性率は不明であるが、各都道府県、市町村単位で実施された各住民検診の結果によると、65 歳以上の人口集団での HCV 抗体

1) 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター
Hepatitis C infection in Japan
Hiroshi YATSUHASHI¹⁾

1) Clinical Research Center, National Nagasaki Medical Center

Table 1. 日本における HCV 抗体陽性者数の推定

年齢階級	HCV 抗体陽性率 (%)	年齢階級別人口 (万人)	HCV 抗体陽性者数 (万人) (%)
20～	0.38	1800	6.8 (3)
30～	1.06	1600	17.0 (8)
40～	1.29	1900	24.5 (11)
50～64	2.54	2400	61.0 (28)
65～	(5.0)	2200	110.0 (50)
			219.3 (100)

陽性率は5～10%であると報告しているものが多い⁴⁾。65歳以上の高齢者は、わが国では最も HCV 感染率の高い集団である。2000年の人口動態統計調査では65歳以上の人口は約2200万人存在することから、この年齢層での HCV 抗体陽性率を仮に5.0%と仮定した場合、この年齢集団には110万人の HCV 抗体陽性者が存在すると算出される。以上のように、各年代別の推定 HCV 抗体陽性者数をそれぞれ加算し、わが国の HCV 抗体陽性者推定数を算出したものが Table 1 である。この概算によると219万人の HCV 抗体陽性者数が存在し、その約50%は65歳以上、約80%は50歳以上の集団で、わが国の HCV 抗体陽性者は高齢者に多いことが容易に理解できる。この HCV 抗体陽性者の概数は、献血集団における各年代の HCV 抗体陽性率から算出され、既に C 型肝炎と診断されて通院、入院加療されているものは対象外で、有病者は含まれないことを考慮しなければならない。また一方で、献血者集団での HCV 抗体陽性者中約70%が HCV-RNA 陽性の HCV キャリアー、約30%が抗体陽性 HCV-RNA 陰性の既往の感染であることが過去の調査より明らかとなっている。以上のような状況を総合的に判断すると、わが国には200～250万人の HCV 抗体陽性者、150～200万人の HCV キャリアー、ウイルス保有者が存在すると推定される。

II 諸外国の HCV 感染状況

今までに文献上、各国の供血者、一般人口を対象とした場合の HCV 抗体陽性率の報告を列記する⁵⁾。HCV 抗体陽性率で最も低い国は英国、スカ

ンジナビアなどで0.04～0.09%の範囲内であった。次に0.15～0.5%の範囲内の陽性率を示したのは、米国、西ヨーロッパ、イスラエル、0.6～0.9%と中等度の陽性率を示した国は、南ヨーロッパ、ケニア、タイ、台湾などであった。1.0～1.5%の範囲内の陽性率を示したのは、インド、中国、キューバ、エチオピア、韓国、フランスなどであった。1.6～3.5%とやや高い陽性率を示した国は、日本、インドネシア、トルコ、ロシア、ブラジル、中近東、シンガポールであった。3.6%以上の陽性率を報告したのは、カメルーン、エジプトで、特にエジプトでは、血液供血者の14%が HCV 抗体陽性と報告している。欧米や開発途上国では、HCV 抗体陽性率が低いものに対して、アジアやアフリカの中でも比較的医療の発達している国では抗体陽性率が高い傾向がみられ、これらの国では、手術、輸血などの医療行為で HCV 感染が広まったと考えられる。

これらの HCV 抗体陽性率は、各国によって、調査対象者、調査方法、HCV 抗体測定時期により測定感度と特異性が異なるため、一律に評価することは困難ではあるが、そのような問題点を考慮しても世界の HCV 抗体陽性率の平均は1.0ないし2.0%の範囲内であり、日本の HCV 抗体陽性率が著しく高くないことが理解できる。一般にアジアやアフリカに比較して欧米では HCV 抗体陽性率は低く、世界の中で一部に高罹患国は存在するものの HBV 感染とは異なり国単位で一般人口の5%を超える高罹患国は極めてまれである。

III 日本と米国との間での HCV 感染、 肝癌に関する疫学の比較

日本と米国との間での HCV 感染の状況、肝癌の発生状況に大きな差が存在する。お互いのデータを対比することにより、グローバルな観点から日本の特異な HCV 感染と発癌との関連をクローズアップすることが可能である (Table 2)。日本の人口は2000年の人口統計で1億2669万人、米国は1995年の調査で2億6275万人である。HCV 抗体陽性者数に関しては、日本は約200万人 (全人口の1.6%)、米国は約400万人 (全人口の2.0%) と推定されている。米国と日本の HCV 抗体陽性

Table 2. 日本と米国の HCV 感染、肝臓に関する疫学の相違点

	日本	米国
総人口	1億2669万人(2000年)	2億6275万人(1995年)
HCV抗体陽性者数(%)	約200万人(1.6%)	約400万人(2.0%)
肝疾患 死者数	肝臓死亡者数 33433人(1998年)	肝疾患死亡者数 30933人(1998年)
	HCV: 約26700人(約80%)	アルコール: 12187人(39%)
	HBV: 約5300人(約16%)	HCV: 3340人(14%)
	原因不明: 約1300人(約4%)	HBV: 1161人(4%)
年齢調整肝臓死亡率 (人口10万人対)	男性 29.0人(1999年)	原因不明: 13683人(44%)
	女性 9.1人(1999年)	3.2人(1994~1998年)

率は、ほぼ同じであり、HCV抗体陽性者絶対数は米国では日本の約2倍に相当する。一方、肝疾患死亡者、肝臓死亡者数の対比では、日本の肝臓死亡者数は1998年には33433人で、その約80%である26700人がHCV感染関連肝臓、約16%の5300人がHBV感染関連肝臓、約4%の1300人が原因不明の肝臓死亡と推定されている。一方米国CDCのデータでは、1998年の肝疾患死亡者数は30933人で、最も多い原因が原因不明の13683人(44%)、次がアルコール関連の12187人(39%)、HCV感染関連死亡が3340人(14%)、HBV感染関連が1161人(4%)であったという。これらの対比は、肝臓死亡者と肝疾患死亡者の比較であり必ずしも同等の要因の比較ではないが、日本のHCV関連肝臓死亡者が約3万人であるのに対し、米国では約3000人で死亡者絶対数が10倍ほどの隔りがある。また人口10万人あたりの年齢調整肝臓死亡率は、1999年のデータによると日本人男性で29.0人、女性で9.1人であるのに対し、米国では1994~1998年の期間の成績では3.2人であった。

ここで問題となるのは、米国と日本ではHCV感染率は1.5~2%の範囲でほぼ同等、HCV感染者絶対数では米国は日本の約2倍存在するという背景の中で、HCV関連肝臓死亡者数、肝疾患死亡者数が、何故米国は日本の10分の1前後にとどまるのか、逆の表現をすれば、何故日本は米国の約10倍のHCV関連肝臓患者が発生するのかという理由である。

IV HCV感染者における肝発ガンリスク

以上の日本と米国との間でのHCV感染関連肝

臓の状況の差を考察するためには、HCV感染者における肝発ガンのリスクに関して、日本と米国間で異なるのか検証する必要がある。現在までにHCV感染における肝発ガンのリスクとして過去の文献上報告されているものとしては、1) アルコール摂取量が1日50g以上、2) 高齢者、3) 感染時年齢が高齢、4) 性差(男性)、5) HBVとの重複感染、6) HIVとの重複感染、7) 感染経路が輸血など、8) 糖尿病ないし肥満の合併、9) ウイルス因子(genotype 1)、10) 肝線維化の進展度(肝硬変)等、11) 人種差がある⁶⁷⁾。

ウイルス因子に関しては、わが国の肝臓患者におけるHCV genotype 1の頻度は70~80%と大多数を占めていることから、かつてgenotype 1がわが国に肝臓患者が多い理由の因子として検討されたが、その後の解析結果から、genotype 1感染者が高齢者に多い、コホート研究ではgenotype 1は有意な因子ではない、ということが明らかとなった⁷⁾。現在では、genotype およびウイルス量ともにウイルス因子は肝発ガンのリスクに関与しないというのがコンセンサスとなっている。その他の因子に関して、米国と日本での背景を比較すると、1) アルコール摂取量が1日50g以上、6) HIVとの重複感染、8) 糖尿病ないし肥満の合併などは、日本よりも米国の方において高頻度に見られる現象であり、それ以外の因子の中に日本においてHCV感染による肝発ガン者が多い理由が存在すると考えられる。

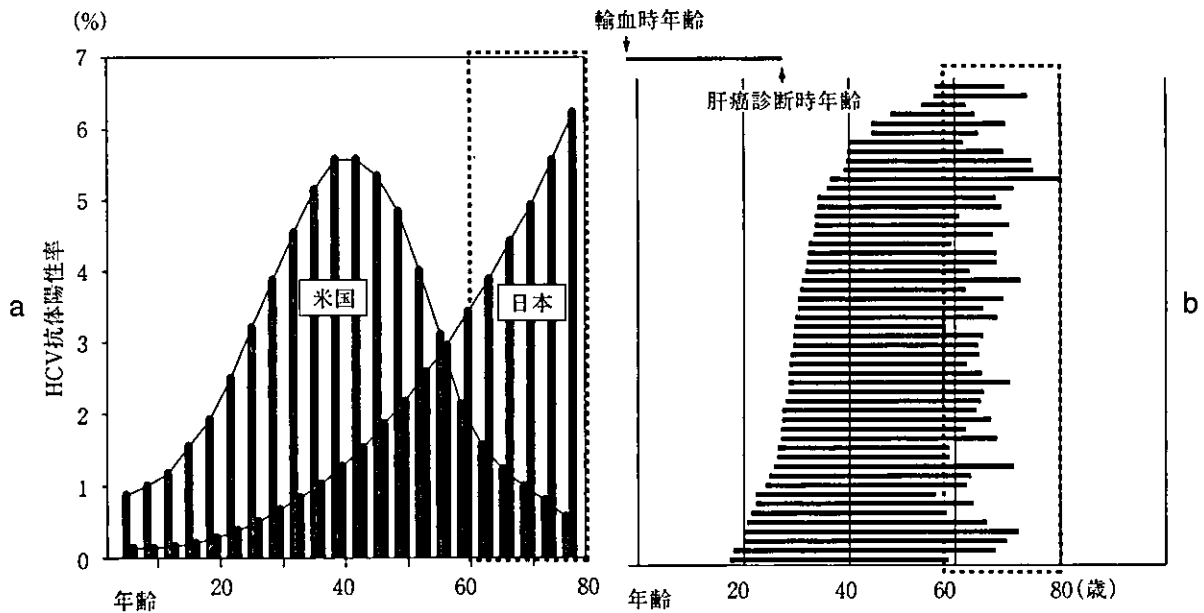


Figure 1. a: 日本と米国の年齢層別 HCV 抗体陽性率の分布の違い¹⁰⁾ b: 輸血による C 型肝炎感染年齢と肝がん発生時年齢—52 症例 輸血の時期: 1949~1979—⁹⁾

V HCV 感染時年齢と HCV 感染期間と発ガン年齢との関係

HCV 感染者の多くは不顕性であり、いつ HCV に感染したのか不明である。唯一、輸血歴を有する HCV 感染者では、その輸血時に感染した可能性が極めて高いことから輸血時年齢を HCV 感染時年齢として置き換えて考察することが可能である。輸血歴を有する HCV 感染者の発ガンに至るまでの検討では、輸血後平均 29 年で肝癌が発生することが報告されている⁹⁾。その部分だけの理解では、20 歳で感染した例では 50 歳前後で発癌、50 歳で感染した例では 80 歳前後で発癌すると考えがちであるが、実際の症例ではそうではない。

HCV 感染時年齢と発ガン年齢と HCV 感染期間との関連を明らかにする目的で、当院で 1949 年~1979 年の期間に輸血され HCV に感染したと思われる 469 例の C 型慢性肝炎を対象として、発ガンに至るまでの経過を検討した⁹⁾。対象例は輸血時点を起点として平均 28 年間観察した集団で、469 例中 52 例 (11.1%) が肝臓癌を併発した。発癌に寄与する因子に関する多変量解析結果からは、1) 感染期間が 26 年以上、2) 肝線維化が高度、

3) 患者の実年齢が 56 歳以上である、などの因子が抽出された。さらに、肝臓癌を併発した 52 例を対象に、輸血時 (感染時) 年齢、発癌年齢をグラフ化したものが Figure 1b である。この図からは 20 歳以下の若年感染例では、感染時から発癌までの年数が長いのに対し、40 歳以後で感染して発癌に至った例では、感染年数が短いことが理解できる。C 型肝炎は感染期間よりも実年齢、60 歳以後に高率に発癌するという見方も可能である。輸血後 C 型肝炎感染例での複数回肝生検所見では、20~30 歳前後で輸血された症例では、感染初期の 10 年~20 年の期間は、肝の線維化は進行しないも、その後 40 歳から 50 歳を過ぎた頃から 4~5 年という比較的短い期間のうちに急速に肝の線維化が進行する例がしばしば見られる。また 50 歳以後に初めて輸血により感染した例では、感染後数年以内に F4: 肝硬変に進展する例が散見される (Figure 2)。

以上、まとめると、HCV 持続感染で病態の進展に関しては年齢の要因が重要であり、30 歳代までは病期、肝線維化の進行度は極めて緩徐であるが、年齢がある時期に達すると病像の進展が急速にな

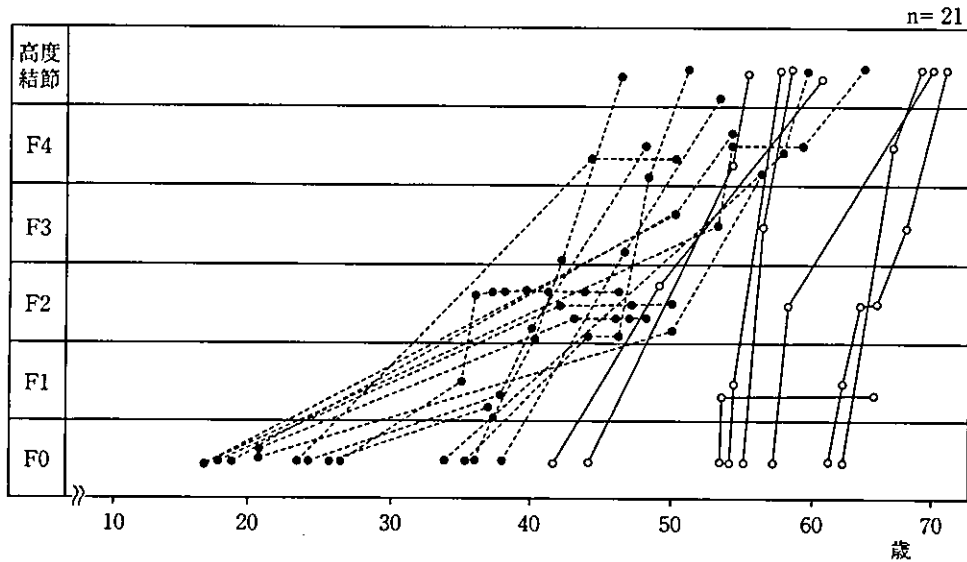


Figure 2. C型肝硬変進展例の輸血時年齢と肝線維化の進展状況

り、数年以内に慢性肝炎から肝硬変に進展する。肝硬変に進展すると年間発ガン率7~8%の発癌のハイリスク群となる。肝硬変進展時期は40歳代後半から50歳代、発ガンの好発年齢が60歳代であるというのが、C型肝炎からの肝癌発生に至るまでの自然経過観察例の典型である。

VI 日本人にHCV感染関連肝癌が多い理由 一年齢分布からの考察

Figure 1aは、日本と米国の年齢層別のHCV抗体陽性者の分布を示したものである¹⁰。既述したごとく、日本のHCV抗体陽性率は、年齢が高くなるにつれて上昇している。わが国で、このように高齢者にHCV感染率が高い理由としては、第二次世界大戦後の10~20年間の社会情勢の混乱およびHCV診断以前の輸血をはじめとする各種医療行為により一般国民にHCV感染が拡散したと考えられ、その時期に感染した者が現在60歳から70歳に達しているためと考えられている。一方米国では、40歳代をピークにHCV抗体陽性率が高い分布を示し、日本とは異なった分布を示している。これは1960年代初頭から1975年まで続いたベトナム戦争が深く関与していることが考察されている。この期間、最高で年間約50万人の米国軍人がベトナムに派遣されたが、戦争中および戦

後の社会の混乱、当時20歳代の若者を中心とした麻薬覚せい剤の流行とともに米国のHCV感染が拡がったと考えられている。第二次世界大戦、ベトナム戦争の戦争終結の時期が1945年と1975年と30年の開きがあり、一般人口におけるHCV感染率の年齢層ピークも日本と米国では、それぞれ70歳代と40歳代と約30年の開きがある点に注目したい。

一方、わが国のHCV感染による肝癌好発年齢が60歳代であること(Figure 1b)と、日本のHCV感染者の絶対数が60歳以後に大きなピークがあること(Figure 1a)を合わせて考えると、わが国ではHCV感染で発ガンのリスクを有した者が大きな集団を形成していることが容易に理解できる。一方、米国ではHCV感染絶対数は相当数存在するも、60歳代の集団は現時点では小さな集団を形成しているに過ぎない。現在は40歳代にピークを形成している米国のHCV感染集団は、IFNによるウイルス駆除をおこなわない限り、年月とともに、このまま水平移動し、40歳代から60歳代へと確実に高齢化することが予想される。仮に米国のHCV感染者も日本人と同様に60歳代に発ガンのリスクを有すると仮定するならば、将来、米国でもHCV感染関連肝癌が急速に増加すること

Table 3. 健常者（各国）とC型慢性肝炎患者（日本）でのIL10 promoter SNPs Haplotype の分布¹¹⁾

Haplotype (-1082/-819/-592) (%)	健常者				C型慢性肝炎（自検）	
	スペイン (2n = 710)	イギリス (2n = 482)	中国 (2n = 166)	日本 (2n = 104)	非進展群 F0/1 (2n = 68)	進展群 F4 (2n = 94)
ATA (IL10 ↓)	25	22	64	69	67	68
ACC	33	29	30	27	24	31
GCC (IL10 ↑)	42	49	2	4	9	1
GTA	0	0	4	0	0	0

P = 0.01
Odds ratio : 0.1

が懸念される。

以上まとめると、現在、日本のHCV感染者に肝癌が多い理由としては、1) HCV感染による肝癌好発年齢が60歳代である、2) 現在の日本のHCV感染者が60歳代以後に大きな集団を形成している、という二つの要因が現在重なっているからと考えられる。一方、現在、米国でHCV関連肝癌が少ない理由としては、1) HCV感染者絶対数は日本より多いが感染集団が40歳代と若い、2) 感染集団が肝癌好発年齢に達していない、ことが考察される。以上の仮説が正しいならば、今後、米国でも感染集団の高齢化とともに日本と同様にHCV感染関連肝癌が急速に増加することが予想される。

VII 日本人にHCV感染関連肝癌が多い理由 —人種差からの考察

米国においても、今後10年から20年の将来に向けて日本と同様のHCV感染関連肝癌が増加するのか、米国でも日本と同様、同規模の肝癌の増加現象が発生するのかという考察で省略できないのは人種差に関する議論である。遺伝的に日本人は肝病変が進展しやすい、肝癌になりやすい遺伝的素因を有していないかという疑問である。

HCV進展に関連する遺伝的要因を明らかにする目的で、既述した輸血後C型慢性肝炎469例の中から輸血後30年以上経過した症例のみ選択し、肝組織検査でF0-Iを確認した肝線維化の非進展群と、F4肝硬変進展を確認した進展群の間で、炎症性サイトカインであるIL10の発現に関するIL10 promoterの遺伝子多型(SNPs)のHaplotype

の組み合わせの頻度を検討した(Table 3)¹¹⁾。その結果、非進展群と進展群の間には、IL10の発現を上昇させるIL10 promoter Haplotype GCCの組み合わせの頻度に有意差が認められた。Haplotype GCCの組み合わせを持つ者ではIL10の発現が高いことが既に確認されており、この結果はIL10の抗炎症作用により肝組織病変の進展が抑制され、それが遺伝的に規定されていることを示唆している。

しかし、今回の解析で最も興味深い点は、IL10 promoter Haplotype GCCの頻度、ATAの頻度に人種差が存在している点である。IL10の発現を低下させるATAの組み合わせの頻度は、日本人、中国人では60%以上、スペイン人、イギリス人では20~30%の範囲内である。また、IL10の発現を上昇させるGCCの組み合わせの頻度は、スペイン人、イギリス人では40%以上であるのに対し、日本人、中国人では10%以下である。この結果は、欧米人はIL10の発現が高い、アジア人はIL10の発現が低い、ということが遺伝的に規定されていることを示唆している。すなわち、このIL10 promoter Haplotypeの組み合わせの人種間の頻度の違いは、欧米人では肝炎の炎症が軽度で進行しない例が多いのに対し、アジア人では肝硬変、肝癌症例が多いというウイルス肝炎の自然経過の人種間差異を説明する上で矛盾しない結果となっている。無論、Th1/Th2バランスは、IL10の発現だけで規定されていないことから、TNF、IFN γ などを含む炎症性サイトカイン、線維化進展、ウイルス排除などに関連する一連の遺伝子発現、発現調

節に関する遺伝的要因を網羅的に検討する必要があるも、この解析結果から、欧米人に比較して日本人は生まれつき肝硬変、肝癌に進展しやすい遺伝的素因を持っているという仮説を立てることは十分可能である。

おわりに

なぜ日本人はHCV感染による高発癌リスクを有するのか、わが国のHCV感染と肝発癌の状況を諸外国と比較することにより、その理由を考察した。グローバルな見地からは、わが国は世界中の国の中でHCV関連肝癌の発生、増加に関しては、最も先行している国のひとつとして位置づけられる。発ガン抑制に関する方策、その結果に関して、その日本から今後世界に向けて情報を発信する必要がある。

文 献

- 1) 清沢研道：日本の肝がんの特徴—世界の肝がんにおける位置づけ。肝がん白書，日本肝臓学会編，1999；5-9
- 2) WHO：Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. J Viral Hepat 1999；6：35-47
- 3) 日赤「輸血後肝炎の防止に関する特定研究班」研究報告 1996；7-14
- 4) 吉澤浩司：肝炎ウイルスキャリアの動向。肝がん白書，日本肝臓学会編，1999；23-32
- 5) Esteban JI：Epidemiology of hepatitis C virus infection；a global perspective. Transfusion associated hepatitis, CBS Publishers and Distributors, New Delhi, 1998；67-77
- 6) Poynard T, Bedossa P, Opolon P：Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Lancet 1997；349：825-832
- 7) Seeff LB：The natural history of hepatitis C. Hepatology 2002；36 (5 Suppl 1)：S35-46
- 8) 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；12：671-675
- 9) Hamada H, Yatsuhashi H, Yano K, et al：Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with posttransfusion chronic hepatitis C. Cancer 2002；95：331-339
- 10) Yoshizawa H：Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan：projection to other countries in the foreseeable future. Oncology 2002；62 Suppl 1：8-17
- 11) Hamada H, Yatsuhashi H, Yano K, et al：Interleukin-10 promoter polymorphisms and liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C in Japan. J Hepatol 2003；39：457-458

〔論文受領，平成16年3月22日〕
〔受理，平成16年3月22日〕

II. B型肝炎ウイルス(HBV)

B型肝炎ウイルスのゲノム疫学

Molecular epidemiology of hepatitis B virus

八橋 弘

Key words : B型肝炎ウイルス, HBV genotype, B型急性肝炎

1. HBVセロタイプ(サブタイプ)とHBV genotype分類

HBVは通常のDNAウイルスとは異なり、ウイルス増殖に際しRNAからDNAへのレトロウイルス様の逆転写の過程を介している。そのため、DNAウイルスでありながらHBVでは高率に遺伝子変異が生じると考えられている。

従来、HBVのウイルス学的分類法としては、HBs抗原の2つのアミノ酸の違いを反映して、adr, adw, ayr, aywの4つのセロタイプ(サブタイプ)に分類する方法が提示され、更に細かく ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr⁻, adr⁺の9種類に分類する方法が示された。1980年代には、世界のHBVの感染状況、各国のB型肝炎の自然経過、治療の反応性の違いなどをウイルス学的に論じる場合には、このセロタイプ分類法が広く用いられた。1988年、Okamotoらは18のHBV strainsの全遺伝子解析を行い、8%以上の遺伝子配列の違いからHBVをAからDの4つのgenotypeに分類し、genotype分類はセロタイプ(サブタイプ)に取って置き換わる、代用可能であることを既に報告していた¹⁾。その後、PCR法の普及によりHBV-DNA配列の分析が容易となったこと、ラミブジンなどの新たな抗ウイルス剤が開発され世界中で使用されるようになったこと、これら

治療薬剤の反応性がgenotypeによって異なることが判明したこと、などを反映して、HBV遺伝子全体の配列の違いからウイルス学的な分類を行う気風が2000年前後頃から高まり、今日では、HBV分類法としては、セロタイプ(サブタイプ)分類からgenotype分類へとほぼ完全に置き換わるようになった。現在、HBV genotypeの種類としては少なくともAからGの7種類が確認されているが、更に最近アメリカインディアンの中から新たなgenotype候補としてgenotype Hの存在が報告されている。

2. HBV genotypeの世界分布

代表的なHBV genotypeであるAからGについて、セロタイプ(サブタイプ)との対応および、世界分布について示したものが表1²⁾である。各HBV genotypeごとに、世界の分布状況、臨床的特徴、問題点などを列記する³⁾。

a. HBV genotype A

genotype Aは、北西ヨーロッパ、北米、中央アフリカで多くみられる型である。ほかにフィリピンと香港からも報告があるも、これらの地域でのgenotype Aの存在は、1世紀以上前の北米やヨーロッパとの密接な交流を反映しているのではないかと考えられている。genotype Aは、HBV PreS領域の塩基の違いから、更にAとA'に大きく分類することが可能であり、subgroup

Hiroshi Yatsunami: Clinical Research Center, National Nagasaki Medical Center 国立長崎医療センター臨床研究センター

表1 HBVセロタイプとHBV genotypeの関係とその世界分布²⁾

HBV genotype	セロタイプ	世界分布
A	adw2, ayw1	北西ヨーロッパ, 北アメリカ, 中央アフリカ
B	adw2, ayw1	東南アジア, 中国, 日本
C	ayr, adr ^{q+} , adr ^{q-} , adw2	東南アジア, 中国, 日本
D	ayw2, ayw3	南ヨーロッパ, 中近東, インド
E	ayw4	アフリカ
F	adw4 ^{q-}	アメリカ原住民, ポリネシア, 中央・南アメリカ
G	adw2	アメリカ合衆国, フランス

Aは欧米型, subgroup A'はアフリカ型とも命名されている。

genotype Aの臨床的特徴としては, HBVキャリアでも自然経過でHBs抗原が消失しやすいこと, IFNなどの治療の反応性が良いこと, 更にHBV成人初感染例でも約10%が一過性感染として終息せずに持続感染化, 慢性肝炎に移行する可能性が論じられている。またgenotype Aでも, subgroup A'ではsubgroup Aとは異なり肝癌への進展率が高いのではないかということが, アフリカ地域でのHBV genotypeの分布調査と発癌率の関係から論じられている。

b. HBV genotype B

genotype Bは, 東南アジア, 中国, 日本(沖縄)で多くみられる型である。沖縄では, 一般人口におけるHBVキャリア率は日本の平均よりも高いもHBV肝癌発生率は低く, HBe抗体陽性の安定したキャリアが多いことが以前から報告されていたが, その多くがgenotype Bであることが明らかとなった。このことから, 我が国ではgenotype Cよりもgenotype Bにおいて一般に予後が良いことが考えられ, Oritoらもcase control studyとして, そのことを確認し報告している⁴⁾。一方, 台湾での若年発症B型肝炎の多くはgenotype Bであり, 台湾におけるgenotype Bは, 必ずしも予後が良い集団ではないことをKaoらが報告した⁵⁾。日本におけるgenotype Bと台湾におけるgenotype Bに関しては, その後の研究によってHBV遺伝子構造が異なることが明らかとなり, それぞれBj (Japan subgroup)とBa (Asian subgroup)と命名して区別するようになった⁶⁾。一般にBaはBjに

比較して病態が進みやすいことが示唆されている。

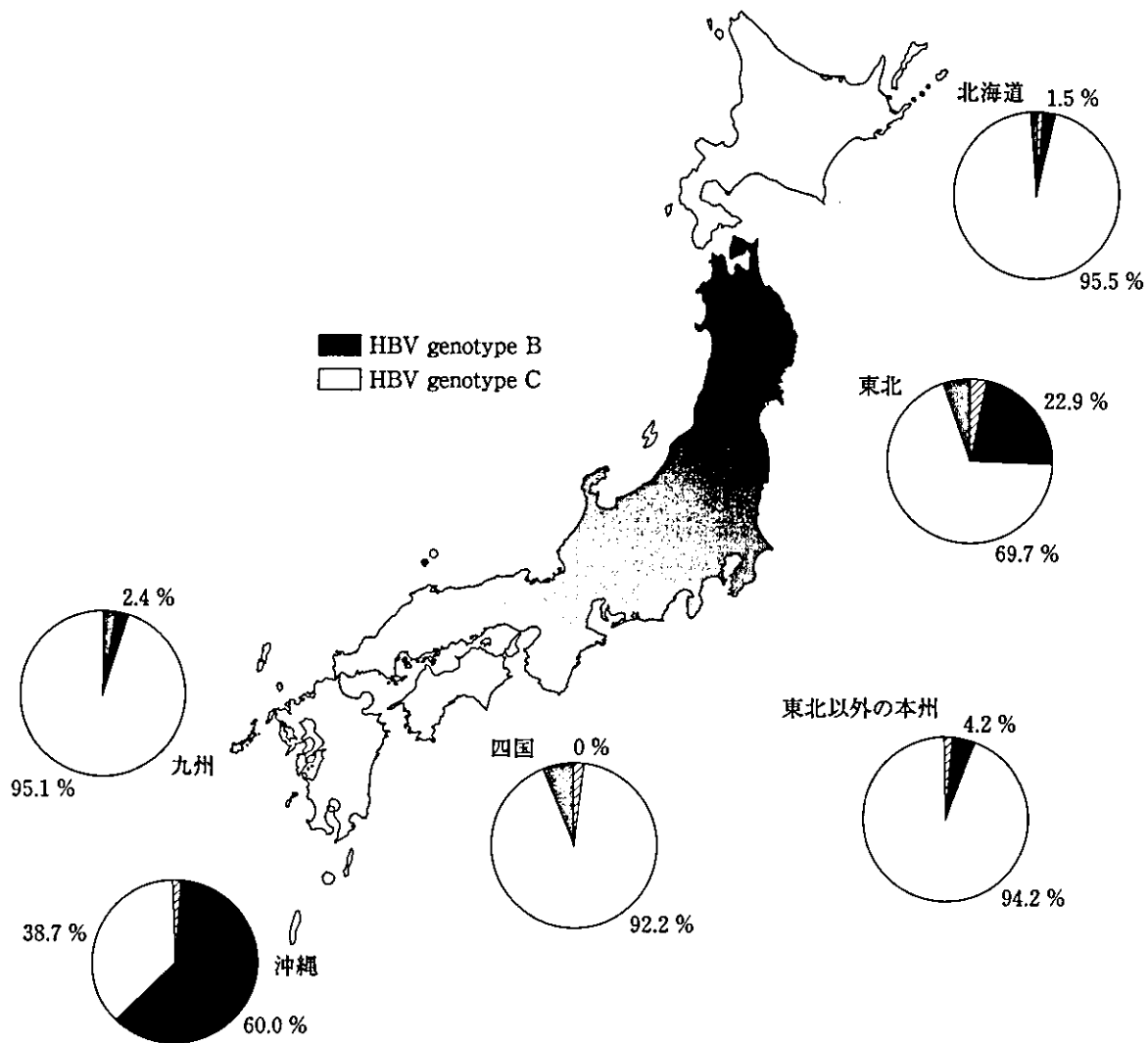
c. HBV genotype C

genotype Cは, 東南アジア, 中国, 日本, 太平洋の地域で多くみられる型である。

Oritoら⁷⁾の我が国の全国集計結果によると, HBVキャリア731例中, genotype Aは1.7%, genotype Bは12.2%, genotype Cは84.7%, genotype Dは0.4%, その他が1.0%であった。東北地域と沖縄においては, genotype Bの割合は, それぞれ22.9%, 60%であるが, それ以外の地域では95%前後はgenotype Cであった(図1)。全国の国立病院でラミブジン治療を行ったB型慢性肝炎248例の検討でも, genotype Aは0.4%, genotype Bは3.2%, genotype Cは96.0%, genotype Fは0.4%であった。我が国のHBVキャリアはgenotype Cが大多数を占めている。genotype Cはgenotype Bに比較すると, 自然経過でもHBe抗原陽性が消失しにくく, IFNなどの治療薬剤の反応性に関しても抵抗を示す例が多いことが報告されている。

d. HBV genotype D, E, F, G

genotype Dは, 南ヨーロッパ, 中東, インドの地域で多くみられる型である。genotype Eは, 分子系統樹的にはgenotype Dと近い場所に位置しており, 世界分布としてはアフリカ地域から報告されている。genotype Fは, アメリカ, ポリネシア, 中央アメリカ, 南米において多くみられる型である。genotype Gは, フランスとアメリカからその存在が報告されている。

図1 我が国のHBV genotype 分布⁷⁾

3. 我が国のB型急性肝炎におけるHBV genotype 分布

既述したように、我が国のHBVキャリアの多くは、沖縄、東北地域を除き genotype Cが95%を占め、genotype Aは1%前後である。しかし、最近、我が国のB型急性肝炎の中で genotype A感染例が少なくないことが報告され、感染源の問題に関連して注目されている。

全国の国立病院における急性肝炎共同研究班に登録されたB型急性肝炎251症例を対象に、HBV genotypeの解析をしたところ、我が国のB型慢性肝炎の1%にしか存在しないといわれている genotype Aが251例中24例(9.6%)に検

出され、コントロールのB型慢性肝炎に比較して genotype Aの頻度が有意に高い結果が得られた($p < 0.0001$)。また genotype AのB型急性肝炎の特徴として、性別頻度が genotype Cでは男性：女性=54.2%：45.8%であったのに対し、genotype Aでは87.5%：12.5%であり($p = 0.0008$)、更に genotype Aの地域別頻度は九州で4.5%、西日本9.1%、関東を中心とする東日本で16.1%で、九州に比較して東日本で genotype Aの検出率が有意に高値であった($p = 0.0061$)。これら genotype Aの分子系統樹による解析では、その8割が欧米型の subgroupに分類された。これらの結果から、我が国のB型急性肝炎の約10%は genotype Aであり、今

表2 B型急性肝炎におけるHBV genotypeの頻度

	地 域	A	B	C	D	E	F	A+C
矢野ら(n=251)	全 国	24 (9.6%)	13 (5.2%)	212 (84.5%)	1 (0.4%)		1 (0.4%)	
四柳ら(n=157)	全 国	27 (17.2%)	9 (5.7%)	121 (77.1%)				
城ら(n=39)	東 京	22 (56.4%)	5 (12.8%)	9 (23.1%)			2 (5.1%)	1 (2.6%)
小西ら(n=34)	愛 媛	4 (11.8%)	0	28 (82.4%)	2 (5.9%)			
末廣ら(n=37)	岡 山	4 (10.8%)	2 (5.4%)	31 (83.8%)				

回の解析結果では genotype Aは、その8割以上が男性でかつ関東を中心とする東日本に多く分布すること、更にその大半は欧米型の sub-groupに属することが明らかとなった。同様の結果は他施設からも報告されている(表2)。

これらの結果から、最近の我が国のB型急性肝炎の感染源として外国人との接触が考えられ、今後、教育啓発活動を含めた公衆衛生的な対応が必要である。

■ 文 献

- 1) Okamoto H, et al: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69: 2575-2583, 1988.
- 2) Chu CJ, Lok AS: Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 35: 1274-1276, 2002.
- 3) Kidd-Ljunggren K, et al: Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83: 1267-1280, 2002.
- 4) Orito E, et al: A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 33: 218-223, 2001.
- 5) Kao JH, et al: Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118: 554-559, 2000.
- 6) Sugauchi F, et al: Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 124: 925-932, 2003.
- 7) Orito E, et al: Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34: 590-594, 2001.