

表 1 肝がんによる死亡率 (人口 10 万人対) の高い都道府県

	1993 平成 5 年	1994 6 年	1995 7 年	1996 8 年	1997 9 年	1998 10 年	1999 11 年	2000 12 年
1 位	佐賀 (37.3)	福岡 (38.3)	佐賀 (42.4)	和歌山 (41.8)	佐賀 (43.3)	福岡 (42.9)	佐賀 (41.7)	佐賀 (44.3)
2 位	福岡 (35.6)	佐賀 (37.4)	福岡 (41.0)	佐賀 (39.9)	福岡 (41.4)	佐賀 (41.4)	福岡 (41.4)	島根 (40.6)
3 位	大阪 (34.2)	広島 (33.8)	広島 (38.0)	広島 (39.8)	和歌山 (40.5)	和歌山 (40.6)	広島 (39.9)	福岡 (40.5)
4 位	和歌山 (33.8)	大阪 (33.2)	大阪 (37.8)	福岡 (38.7)	徳島 (39.5)	広島 (40.3)	和歌山 (39.6)	広島 (39.2)
5 位	広島 (33.0)	和歌山 (32.3)	和歌山 (36.6)	島根 (38.5)	広島 (39.4)	大阪 (39.0)	山口 (38.4)	山口 (38.9)
6 位	徳島 (31.4)	鳥取 (31.6)	山口 (36.3)	大阪 (37.4)	大阪 (37.1)	徳島 (37.9)	大阪 (37.6)	愛媛 (38.9)
7 位	高知 (30.6)	愛媛 (31.6)	長崎 (35.4)	山口 (36.6)	島根 (35.7)	愛媛 (37.8)	大分 (37.3)	大阪 (38.4)
8 位	鳥取 (30.5)	兵庫 (31.2)	兵庫 (34.5)	徳島 (35.7)	山口 (35.7)	兵庫 (36.1)	愛媛 (36.8)	徳島 (37.99)
9 位	山口 (30.4)	山口 (31.2)	山梨 (33.9)	高知 (35.7)	兵庫 (34.7)	島根 (36.0)	山梨 (36.4)	和歌山 (35.8)
10 位	兵庫 (29.6)	山梨 (30.7)	岡山 (33.6)	兵庫 (34.0)	大分 (33.3)	山口 (34.8)	島根 (36.2)	大分 (35.6)

人口動態統計 1993~1997 年
 ~1994 年: ICD 9
 1995 年~: ICD 10

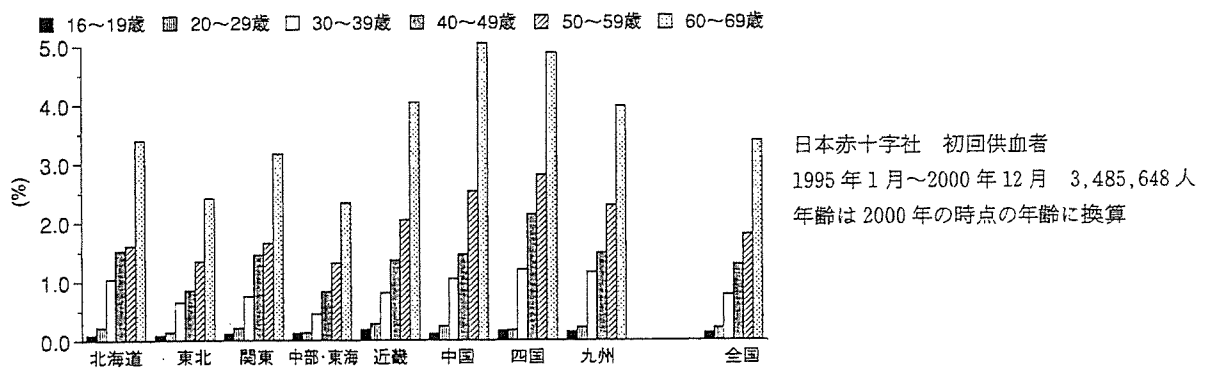


図 3 地域別、年齢階級別にみた HCV 抗体陽性率 (厚生労働省 C 型肝炎疫学研究班)

ていることがわかる (表 1)。

III. 性、年齢、地域別にみた HCV 抗体陽性率と HCV キャリア数 (推計)

図 3 は、1995~2000 年までの 6 年間に全国の血液センターで初めて献血した 3,485,648 人について、地域別 (全国を日赤の基幹血液センターの所在地を中心に八つに分けたもの)、年齢階級別に HCV 抗体陽性率を算出したものである。全体でみると、40 歳以上、特に 50 歳代後半から 60 歳代以上の年齢層での HCV 抗体陽性率が高い値を示している。地域別にみると、肝がん多発地域である西日本の各地域、すなわち九州、中国・四国、近畿地方の 40 歳以上の年齢層における HCV 抗体陽性率が他の地域に比べて高い値を示す傾向がみられる。

また、八つの地域の年齢階級別の HCV 抗体陽性者それぞれの 70% を HCV キャリアとして換算し³⁾、これと 2000 年の国勢調査に基づいた当該地域別・年齢階級別人口とを基に HCV キャリア数を推計すると、わが国の 15~69 歳の人口約 9,300 万人のなかに 88.5 万人 (72.5~104.5 万人: 95%信頼区間) の HCV キャリアが「自覚し

ないまま」の状態で見ると推計された (図 4)。このうち、40~69 歳の人口約 5,100 万人のなかに潜在する HCV キャリア数は 75.9 万人と推計され、HCV キャリア全体の約 86% がこの年齢層に偏在することが明らかとなった^{4,5)}。

IV. HCV キャリアの肝病態とその推移—HCV キャリアの生涯肝発がん率—

図 5 は、広島県赤十字血液センターにおいて献血時の検査で偶然に見つかった 912 人の HCV キャリア (平均年齢 45.5 歳) の病院初診時の臨床診断をまとめたものである。慢性肝炎と診断された人は 547 人 (60.0%)、肝硬変と診断された人は 1 人 (0.2%) であった。男女別にみると、男性は 428 人中 295 人 (68.9%) が、女性は 484 人中 252 人 (52.1%) が慢性肝炎と診断されており、初診の段階から女性に比べて男性のほうが慢性肝炎と診断される率が高いことがわかる。

このうち、5 年以上 (平均 8.2 年) にわたり経過観察し得た 362 人の肝臓の病態の経時的変化をみると、初診時に慢性肝炎と診断された 214 人のなかから 5 人が肝がん

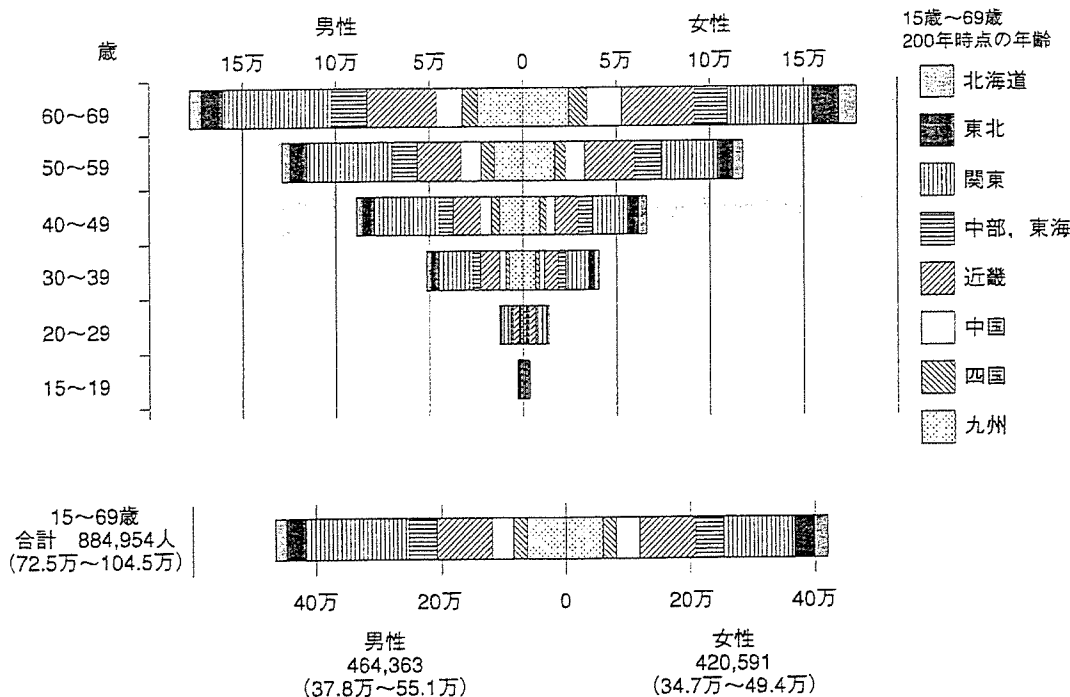


図4 性、年齢別にみたHCVキャリア数:推計値

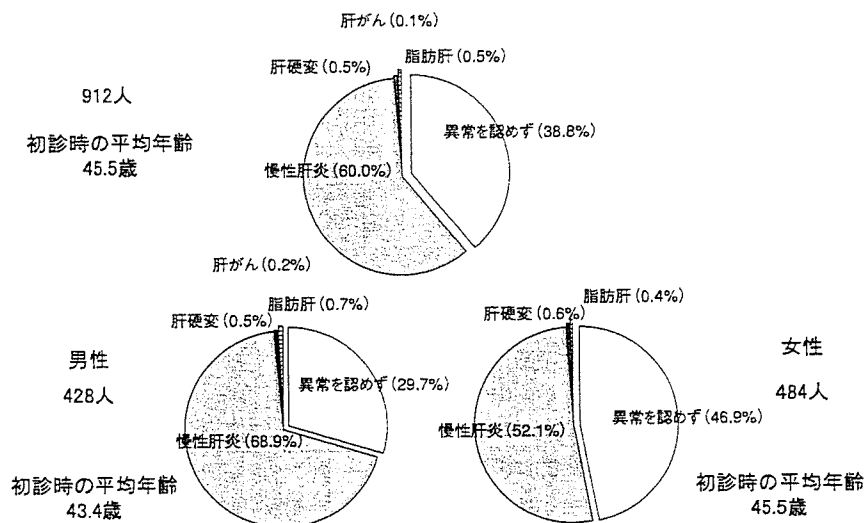


図5 献血を契機に見いだされたHCVキャリアの初診時の臨床診断の内訳 (広島県肝炎調査研究会, 2002年)

へ、11人が肝硬変へ進展していた。また、初診時には異常が認められないと診断された114人のなかから2人が肝硬変へ、52人が慢性肝炎へと進展していた(図6)。

次に、これらのHCVキャリアおよび抗ウイルス療法や抗炎症療法などの積極的治療が行われていなかった通院中のC型慢性肝炎患者、合計942人について1年間隔の診断結果を集積し(診断情報総数21,251件)、それぞれの患者の病態の経時的変化率を数理モデル(マルコフの過程モデル)に当てはめてHCVキャリアの生涯肝発がん率を推計した(図7)。

と60歳の時点の男性の約10%、女性の7~8%が肝がんへ、また70歳の時点の男性の約38%、女性の約20%が肝がんまでに進展すると推計された。なお、この推計値は臨床医がこれまで経験的に認識していた数値とほぼ一致することが明らかになっている。

V. 病因論に基づいた肝炎・肝がん対策の考え方

他臓器のがんと異なり、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、肝発がんのリスク集団である肝炎ウイルスキャリアを検診で発見することが肝炎・

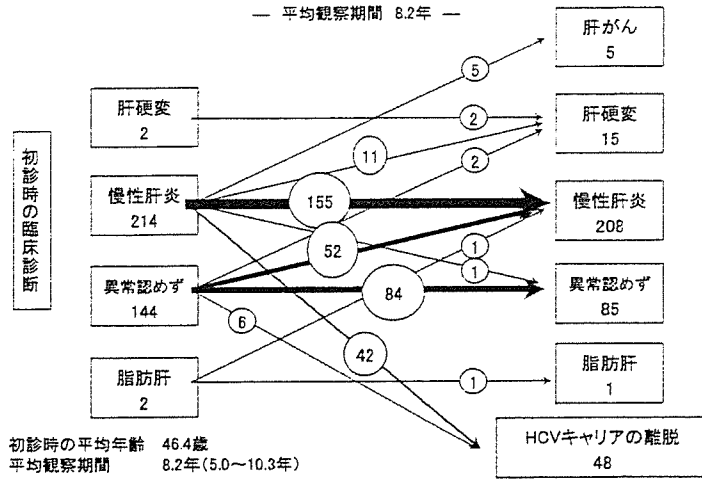


図 6 5年以上の経過観察が可能であった362例の臨床診断の変化

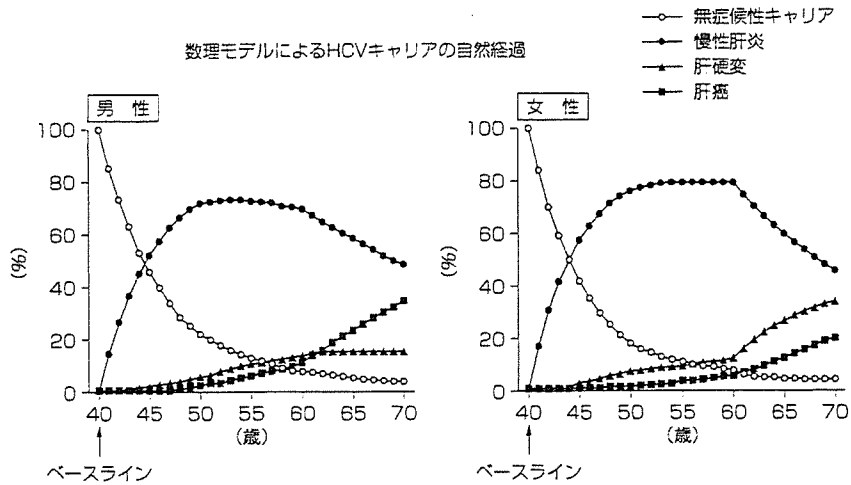


図 7 40歳の時点、無症候性キャリア100をベースラインとした場合の各病態への推移率

肝がん対策の第一歩となるといえる。C型の肝がんは、C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染による、慢性的な炎症が進んだ(線維化が進んだ)肝臓を発生母地として発生すること、肝の線維化が一定程度以上進展する(前硬変または肝硬変になる)前にウイルスが肝臓から排除される(キャリア状態から離脱する)と完全に治癒すること、50歳代の後半から60歳代初めの年齢層に好発することなどが知られている。このことからC型の肝がんは、表2の手順による対策によりその発生を予防、または抑制することが可能となる。すなわち、まず第一に抗ウイルス療法(インターフェロン治療、またはインターフェロンとリバビリンの併用療法)の適応がある場合には、積極的に治療を行い、HCVキャリア状態からの離脱を図る。次に、抗ウイルス療法を行っても無効であった例や、抗ウイルス療法の適応がないと判断され、かつ肝炎の活動度が高い(ALT値が高値を示す)場合には、抗炎症療

表 2 病因論に基づいた肝炎・肝がん対策の考え方

1. 抗ウイルス療法によるキャリア状態からの離脱
2. 抗炎症療法による肝病態(病期)進展の遅延
3. リスク集団を絞り込んだ微小(早期)肝がんの発見

法を行い肝の線維化進展の阻止、または抑制を図る⁹⁾。なお発見時、すでに線維化が進展した状態にあり、かつ肝発がんの好発年齢に到達している場合には、腫瘍マーカー(α -フェトプロテイン、PIVKA-IIなど)による追跡と、画像診断(エコー、CTなど)の併用による定期的な検査により肝がんを早期に発見し、早期に治療を行い延命を図る。

VI. C型肝炎ウイルス(HCV)検診の骨子

HCV検診は、節目検診と節目外検診からなり、節目検診は、老健法による基本健康診査対象者のうち、40~70

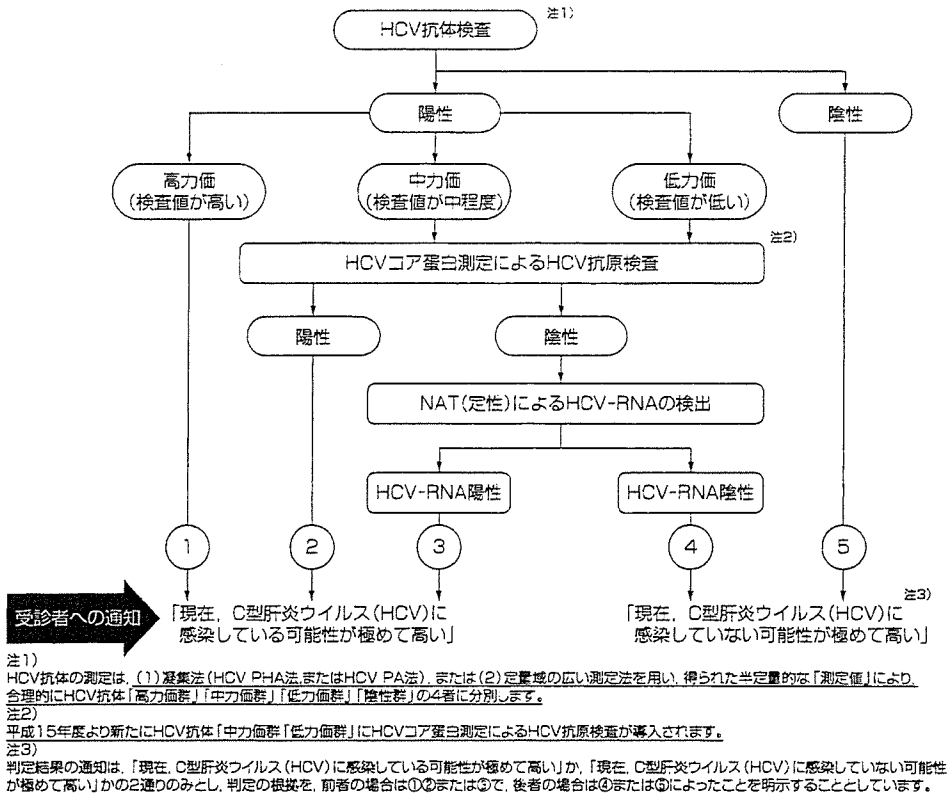


図 8 C型肝炎ウイルス検査の指針 (改訂版)

歳までの5歳刻みの年齢の人を対象として実施されている。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のある人、②広範な外科手術を受けたことのある人、または妊娠・分娩時に多量に出血したことの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。なお、70歳を過ぎた人でも上記のリスク要因がある場合には節目外検診の対象者として受診することができる。

現在のわが国では一般にHCVキャリアの新規発生はほぼ止まっている⁹⁾ことから、原則として検診では正しい検査を1回だけ受ければよいが、検診時に「HCV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や肝炎が疑われる症状が認められた場合などには、HCV検診とは別に医師に相談し検査を受けることが望ましい。

VII. C型肝炎ウイルス(HCV)キャリアを見い出すための検査手順

図8に簡便、安価、かつ高い精度でHCVキャリアを見い出すための検査手順を示す。まず、抗体価を半定量的に測定することができる凝集法(HCV PHA法、HCV PA法)の他、抗体の定量域が広いサンドイッチ法によ

る測定系(マイクロパーティクルCLIA法、マイクロパーティクルEIA法)を用いた検査により第一次のスクリーニング検査を行い、「HCV抗体陽性」と判断されたものを、「高力価群」「中力価群」「低力価群」の3群に群別する。次に、「中力価群」および「低力価群」についてHCVコア抗原検査を行い、「陰性」と判定された場合にのみ核酸増幅検査(nucleic acid amplification test: NAT)によるHCV RNA検査を行う^{10,11)}。ただし、まれにHCV抗体「高力価群」のなかにHCV RNA陰性者が存在すること(抗ウイルス療法中、あるいはその直後、または自然経過でHCVキャリア状態から離脱後間もない場合)や、ごくまれに「低力価群」のなかにHCV RNA陽性者が存在すること(抗体反応の弱い非定型的なHCVキャリア状態、あるいは感染直後のためウイルスがいても抗体価が低値や陰性を示す、いわゆるウィンドウ期にある場合)があるので注意が必要である¹²⁾。

VIII. C型肝炎ウイルス(HCV)キャリアの健康管理体制

C型肝炎ウイルス(HCV)検診を実効あるものにするためにはまず第一に正しい検査の普及、検診受診率の向上を図ることが求められる。次に、検診により発見されたHCVキャリアの医療機関への受診率の向上とフォローアップ率の向上を図ることが必要である。また、肝炎の活動度、病期(線維化の進展度)に応じた治療を組

組織的に行うことができるネットワークを作りあげることが重要である。広島県には広島県、市の行政と医師会、そして大学の三者が一体となって地域保健の問題に取り組む、地域保健対策協議会という組織が設置されており、このなかに設けられた慢性肝疾患対策専門委員会に新たに肝炎治療支援ネットワーク作業部会を設け、討議を行い、検診で発見された HCV キャリアの事後の健康管理を組織的に行うシステムを 2003 年 4 月からスタートさせている。

肝炎治療支援ネットワークは、かかりつけ医からなる一次医療機関と肝臓専門医からなる二次医療機関の役割分担を体系化し、県内の七つの医療圏ごとに検診により発見された HCV 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任務としている。HCV 検診の実施主体である各市町村の保健師は検診受診率を向上させるための普及啓発を行うとともに、検診により見いだされた HCV キャリアに対して出版物など¹³⁾を用いて今後の健康管理、治療の必要性等を説明し、かかりつけ医（一次医療機関）への受診を勧める。一次医療機関と肝臓専門医が担当する二次医療機関は、相互に連携して適切な健康指導、健康管理、必要に応じた治療を行うこととしている。なお、広島県では医師会の了承の下に二次医療機関（病院）名と担当する肝臓専門医氏名を公表している。

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基に、「病因論にもとづいた肝炎、肝がん対策」を全国規模で具現化すべく 2002 年度から肝炎ウイルス検診が 5 年計画で実施に移された。

正しい検査の普及を図ること、検診受診率の向上を図ること、そして検診により発見された HCV 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、さらに肝炎の活動度、病期に応じた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た形で作りあげ、肝炎ウイルス検診が実効あるものにするのが求められている。

文 献

1) 厚生労働省大臣官房統計情報部：編：平成 13 年人口動態

- 統計, 2001.
- 2) 三浦直彦: 肝がん死亡の地理的分布平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 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報告書, 2003, pp 24-30.
 - 3) Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, *et al*: Predictive value of screening tests for persistent hepatitis C virus infection evidenced by viraemia. *Vox Sang* 65: 199-203, 1993.
 - 4) 田中純子, 山中烈次, 片山恵子・他: わが国の健常者集団における HCV キャリア, HBV キャリアの推計数平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 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 報告書, 2003, pp 11-23.
 - 5) 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.
 - 6) 田中純子, 片山恵子, 熊谷純子・他: 献血を契機に見出された HCV キャリアの病態解明に関する追跡調査平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 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 報告書, 2003, pp 31-36.
 - 7) 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* 70: 378-386, 2003.
 - 8) 熊田博光: C 型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) C 型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究報告書, 2003.
 - 9) 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 Epidemiol* 6: 4, 198-203, 1996.
 - 10) 田中純子, 片山恵子, 熊谷純子・他: 簡便, 安価, かつ高い精度で HCV キャリアを見出すための検査手順確立のための基礎的検討平成 13 年度厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業 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 報告書, 2003, pp 31-36.
 - 11) 阿部弘一: HCV キャリアを見出すための効率的な検診システム平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 肝がんの発生予防に資する C 型肝炎検診の効率的な実施に関する研究報告書, 2003, pp 15-19.
 - 12) 吉澤浩司: 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平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (21 世紀型医療開拓推進研究事業) 中間報告書, 2000.
 - 13) (財)ウイルス肝炎研究財団: HCV と C 型肝炎の知識. 第 3 版, 文光堂, 東京, 2003, pp 1-25.

慢性肝炎治療における病診連携

— 広島の例を中心に —

茶山一彰¹⁾ 吉澤浩司²⁾ 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 1) 第一内科教授 2) 疫学・疾病制御学教授

執筆協力者

広島肝炎治療ネットワーク作業部会

相光汐美	広島赤十字・原爆病院内科 部長	田丸隆二	NTT 西日本中国健康管理センター 副所長
大林諒人	尾道総合病院 副院長	吉田智郎	日本鋼管(株) 福山病院 院長
川上広育	川上消化器・内科クリニック 院長	穴戸正巳	広島県福祉保健部保健医療総室保健対策室 主任主査
笠松淳也	広島県福祉保健部保健医療総室保健対策室長	山口博幸	広島県福祉保健部保健医療総室健康増進歯科 保健室 主任
田中純子	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授 (疫学・疾病制御学)	新田康郎	広島県医師会 常任理事
中西敏夫	呉医師会病院 院長		

SUMMARY

- ・肝炎診療に病診連携は必須である。
- ・望ましい病診連携の形態は、肝臓専門医による治療方針の決定と、プライマリケア医による日常的診療（処方、注射）が実践されることである。
- ・病診連携を実施するために、2次医療機関の明示が必要である。
- ・2次医療機関とプライマリケア医との連絡に手帳などの使用が有用である。
- ・病診連携の実施にあたり、普及啓発活動を行う必要がある。

はじめに

慢性肝疾患による死亡は年間3万5千人を超え、厚生労働省も節目検診を行うことを決定するなど、肝疾患死亡を減らすための運動が活発化している。しかし、進行した肝癌となって初めて診断される症例も未だに多数認められる。患者が医療機関を受診していない場合には、診断を受ける機会がなかった症例もあるが、慢性肝疾患と診断されたにもかかわらず、肝硬変への進行、肝細胞

癌発症のリスクを十分に理解しておらず、定期的な受診をしていない症例も多く存在すると考えられる。さらに、医療機関を定期的に受診し、加療を受けていても、定期的な画像診断による肝細胞癌のスクリーニングが実施されていないために、進行した肝細胞癌となって初めて診断される症例も認められる。一般に、慢性肝疾患は症状に乏しく、肝硬変、肝臓癌に進行しても何ら特徴的な症

状が出現するわけではないため、医療者側でもとすれば早期の肝細胞癌の内に診断することができない場合も見られる。さらに、とくにB型肝炎ウイルス感染に起因する肝硬変では肝内の超音波所見が荒く見づらくなり、定期的に画像診断を行っていても大型の肝癌になって初めて診断される症例も見られる。

肝細胞癌は、多くは背景肝が肝硬変となつてから発症するため、個々の症例の慢性肝炎の進行度

を適切に判断し、画像診断や腫瘍マーカー測定の頻度を進行に応じて増やさなければならない。また、進行を防ぐために、インターフェロン、肝底護剤などを適切に用いて治療していく必要がある。どのような症例にどの治療を適応するのがよいか、また、開始した治療が適切であったかどうかは、肝疾患診療に経験の豊富な専門医があたるべきであろう。本稿では広島における病診連携の形成の実情と問題点について論じる。

I 広島県における肝疾患診療に対する病診連携の考え方

肝疾患専門家による診断と治療方針の決定、かかりつけ医による日常的な注射や処方の実施を

原則として行うため、県全域をカバーする肝炎治療ネットワークの構築を行うこととした。

II 広島県における県全域をカバーする肝炎治療ネットワークの構築

広島県では、平成14年から、C型肝炎ウイルス感染に対する節目検診などで陽性であることが判明したC型肝炎ウイルスキャリアが適切にフォローアップを受け、また適切な治療と肝細胞癌の早期発見のための定期検査を受けられるような体制づくりを行うこととした。このために、広島県全県で行うネットワークの構築を行った。このネットワークは、県内の各医療圏に肝臓専門医が勤務している病院を二次医療機関として決定し、かかりつけ医からの紹介を受け、診断と治療方針の決定を行い、連携しながら個々の症例の治療に当たるといふものである。平成14年度の主要な実施項目は(1)一次、二次医療機関向けの普及・啓発パンフレット作成、(2)県内各医療圏の二次医療機関の設定と公表、(3)患者フォロー用肝炎手帳の作成と配布、(4)医療従事者向けの普及・啓発活動の4点であった。以下に各項目について説明する。(1)医療機関向けの啓発・普及用パンフレット作成は、一次医療機関用、二次医療

機関用に分け、一次医療機関用では、C型肝炎ウイルスキャリアの診断とフォローアップについて概説し、初診時検査項目を具体的に示した(図1)。さらに、二次医療機関への紹介について解説し、二次医療機関と担当医の一覧を示した。また、市町村との連携も同時に行うために、C型肝炎ウイルスキャリア用健康管理手帳(図2)を使用することを説明した。二次医療機関用では一次医療機関からの紹介に対応し、診断、治療方針の決定、二次医療機関における受診期間の設定などを一次医療機関の知らせるように指導する内容とした。二次医療機関の一覧は両者に掲載し、人事異動、実績などにより二次医療機関の変更もあり得ることも盛り込んだ。(2)県内各医療圏の二次医療機関の設定と公表については、各医療圏域の医師会に二次医療機関の推薦を依頼し、推薦を受けた機関から適切な数の機関を選択するとともに、肝炎治療ネットワーク作業部会で選定した施設を加え、医師会報などで機関名、担当肝臓専門医の氏



図1 C型肝炎ウイルスキャリア一次医療機関用の啓発・普及用パンフレット
C型肝炎ウイルスキャリアの診断とフォローアップについて概説し、初診時検査項目を具体的に示した。さらに、二次医療機関への紹介について解説し、二次医療機関と担当医の一覧を示してある。

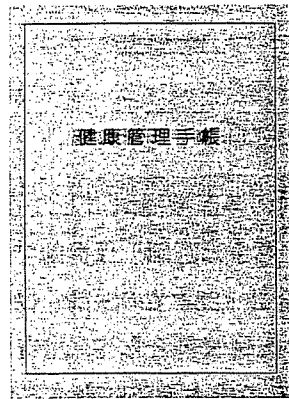


図2 肝炎ウイルスキャリア用健康管理手帳
肝炎ウイルスキャリアが、一次医療機関を受診した場合、二次医療機関を受診するための紹介状（はがき）とその控えを複写として綴じ込み、また二次医療機関からした場合にも一次医療機関への返答用のはがきとその控えを綴じ込んだ。また、肝機能検査の数値もすべて複写とし、医療機関の間でのデータのやりとりに利用できるようにし、かつ患者自身の記録として保管できるようにした。さらに、初診時と受診1年後には市町村あてに受診記録として送付するはがきも綴じ込んだ。また、C型慢性肝疾患についての説明と受診の必要性についても図入りで記載されている。

名を公表した。(3) 患者フォロー用肝炎手帳の作成と配布は、C型肝炎ウイルス感染を指摘されたキャリアが、一次医療機関を受診した場合、二次医療機関を受診するための紹介状（はがき）とその控えを複写として綴じ込み、また二次医療機関からした場合にも一次医療機関への返答用のはがきとその控えを綴じ込んだ。また、肝機能検査の数値もすべて複写とし、医療機関の間でのデータのやりとりに利用できるようにし、かつ患者自身

の記録として保管できるようにした。さらに、初診時と受診1年後には市町村あてに受診記録として送付するはがきも綴じ込んだ。また、C型慢性肝疾患についての説明と受診の必要性についても記した。(4) 医療従事者向けの普及・啓発活動については、各圏域において上記の内容を説明するための講演会を企画し、肝炎治療ネットワーク作業部会の委員が、同一の内容で解説を行えるよう打ち合わせた上で実際の講演会を開催した。

Ⅲ 広島県における県全域をカバーする肝炎治療ネットワークの展開

平成15年度には、さらにその実効性を高めるために以下の4点を実施した。①講演による普及・啓発活動、②一次、二次医療機関向けの普及・啓発パンフレットの改訂、③県内各医療圏毎の二次医療機関の見直し、④患者フォロー用肝炎

健康管理手帳の改訂。

平成15年度に行った活動の詳細を以下に記す。

① 講演による普及・啓発活動

肝炎治療ネットワーク作業部会の委員全員の参

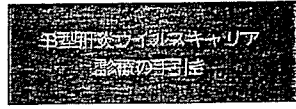


図3 B型肝炎ウイルスキャリア一次医療機関用の啓発・普及用パンフレット

肝臓病は2020年以降から「がん」に分類され、治療法として「手術療法」が中心となることになった。このため、早期発見・早期治療が重要である。本冊は「肝臓病予防センター」が作成した。このパンフレットを診療科、病棟、外来等に配布して、患者への啓発活動を行うことにより、早期発見・早期治療を促すこととされている。

図3 B型肝炎ウイルスキャリア一次医療機関用の啓発・普及用パンフレット
C型肝炎ウイルスキャリア用と同様にB型肝炎ウイルスキャリアの診断とフォローアップについて概説し、初診時検査項目を具体的に示した。さらに、二次医療機関への紹介につて解説し、二次医療機関と担当医の一覧を示してある。

加により、県内の各医療圏域ごとに合計14回の講演を行った。対象は医師、保健師である。合計14回の講演に合計1,284名の医師、保健師が参加した。この際、配付資料として、患者用配付資料である、「肝がんの発生予防に資するC型肝炎検査の効率的な実施に関する研究班」により作成された「C型肝炎ウイルス検査を受けられる方に」、改訂第2版、「B型肝炎ウイルス検査を受けられる方に」を広く配布し、患者に対する普及・啓発活動に利用できるようにした。これらの資料を別添の図1「C型肝炎ウイルス検査を受けられる方に」、改訂第2版、図2、「B型肝炎ウイルス検査を受けられる方に」に提示した。

② 一次、二次医療機関向けの普及・啓発パンフレットの改訂

改訂の要点は以下の4点である。①開業医など一般医家向けに要点を強調、②手帳の改訂と併せて検査項目の改訂、③キャリア用健康管理手帳によるモニタリングの重要性を強調、④2次医療機

関名簿の改訂。なお、C型肝炎ウイルスキャリア診療の手引き-二次医療機関用-改訂第2版には、健康管理手帳が公費負担で行われ、広島県地対協慢性肝疾患対策専門委員会により推進されているものであることを記し、返信はがきの投函による調査への協力の重要性を強調した。

③ 県内各医療圏毎の二次医療機関の見直し

2次医療機関の専門医の移動などにより必要となった専門医名簿の改訂を行った。今後も診療実施状況などにより適宜変更していく予定であり、このことはパンフレットにも盛り込んである。

④ 患者フォロー用肝炎健康管理手帳の改訂

手帳を以下の点について改訂を行った。①開業医など一般医家向けにより使いやすいものに改訂、②診療の手引きと併せて検査項目の改訂、③キャリア用健康管理手帳によるモニタリングの重要性を強調。また、B型肝炎ウイルスキャリア用の手帳についても同様のものを作成し、肝炎ウイルスキャリアの診療に利用可能とした(図3)。

おわりに

平成 14～15 年度の取り組みにおいて、C 型肝炎ウイルス感染陽性者のフォローアップは、一次医療機関と二次医療機関の双方において患者の診療を行っていくというコンセプトを徹底するために、一次、二次医療機関用のパンフレットの作成とその改訂、C 型肝炎ウイルスキャリア用健康管理手帳の作成と改訂を行った。さらに B 型肝炎ウイルスキャリア用の健康管理手帳も作成した。これらの使用が適切に行われるように、講演会による説明も行った。講演会への参加者が千人以上という実績に見られるように、肝炎対策活動に対する関心の高まりが認められた。さらに、一次、二次医療機関向けの普及・啓発用パンフレットの改訂を行い、再配布することしたので、より多くの医療機関において、国策としての肝炎対策、広

島県での取り組みに対する理解が深まることが期待される。今後、改訂された C 型肝炎ウイルスキャリア用健康管理手帳や B 型肝炎ウイルスキャリア用健康管理手帳の利用状況をフォローアップしていくことにより、われわれの構築したネットワークの実効性の評価が可能となっている。さらに将来的には、二次医療機関において、厚生労働省により示された C 型慢性肝炎のガイドラインに沿った治療が有効に実施されているかどうかを検証する必要がある。これらの活動が有効に実施されれば、抗ウイルス療法を受けないままに肝細胞癌を発症するような症例、進行肝細胞癌が初診時に発見されるような症例が減少していくことが期待される。

(参考文献)

- 1) 田中純子、吉澤浩司：肝炎ウイルスと感染者数の推移、慢性肝炎診療マニュアル、5-11, 2001.
- 2) 中西敏夫、舛田一成、栗原祥佳、近松そのこ、平松 憲、片山恵子、熊谷純子、小宮 裕、田中純子、長尾由実子、佐田通夫、佐々木健、中村就一、吉澤浩司：検診を契機に発見された HCV キャリアを対象とした腹部超音波検診および肝外随伴病変としての口腔粘膜検診成績。広島医学、54 (12) : 998-1000, 2001.
- 3) 田中純子、水井正明、片山恵子、熊谷純子、小宮 裕、佐々木健、中村就一、吉澤浩司：地域住民を対象とした HCV 検診—1992 年度から 2000 年度までの総括—。広島医学、54 (12) : 1001-1005, 2001.
- 4) Yoshizawa. H : Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis C Virus Infection in Japan ; Projection to Other Countries in the Foreseeable Future. Oncology, 62 (1) : 8-17, 2002.
- 5) Yoshizawa. H : Trends of hepatitis virus carriers. Hepatology Reserch, 24 : 28-39, 2002.
- 6) Tanaka. J, Kumada. H, Ikeda. K, Chayama. K, Mizui. M, Hino. K, Katayama. K, Kumagai. J, Komiya. Y, Miyakawa. Y, Yoshizawa. H : Natural Histories of Hepatitis C Virus Infection in Men and Women Simulated by the Markov Model. Journal of Medical Virology, 70 (3) : 378-386, 2003.
- 7) 吉澤浩司、田中純子：病因論に基づいた肝炎、肝がん対策—肝炎ウイルス感染と肝がんの疫学的背景および対策の理念—。医学と薬学、49 : 16-25, 2003.
- 8) 田中純子、水井正明、片山恵子、熊谷純子、小宮 裕、中村就一、宍戸正巳、吉澤浩司、広島肝炎調査研究会：献血を契機に見出された HCV キャリアの病態解明に関する追跡調査 2002。広島医学、56 : 827-831, 2003.
- 9) 片山恵子、熊谷純子、小宮 裕、平賀伸彦、児玉英章、田中純子、長尾由実子、平岡雅恵、佐田通夫、中西敏夫、中村就一、宍戸正巳、吉澤浩司：献血を契機に発見された HCV キャリアを対象とした腹部超音波検診および肝外随伴病変としての口腔粘膜検診成績。広島医学、56 : 832-834, 2003.
- 10) 熊谷純子、田中純子、吉澤浩司：肝炎・肝がん対策の実際疫学的見地から。生活教育、47 (12) : 41-50, 2003.

2) 紀田康雄: COMPLICATION—

糖尿病と血癌 4(2): 208, 1990.

3) 西倉正之, 石川泰三: 日本臨床 54(8): 2202, 1996.

4) Stevens MJ, Rafael DM, Allman KC, et al: Circulation 98: 961, 1998

(東京女子医科大学第二
病院内科助教授 高橋良三)

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査について、また、何歳までの初感染でHBVキャリアアとなるのか。(東京都 P)



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キャリアアが「垂直」感染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。

周知のやうに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、ごく微量のHBVキャリア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なかつた過去のわが

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(献血を契機に見えられた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、出生年齢が高齢化して、HBV

キャリアアの母親がHBs抗体陽性に

軽化(HBe抗体から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Giantcell病の流行時に得られた成績によると、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……)の

(文 献)

1) ウイルス肝炎研究財団, 編: HBVとB型肝炎の知識・第1版, 文光堂, 2003.

2) 原 茂, 他: 日本輸血学会誌 27: 163, 1981.

3) 植田直臣, 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(飯野敏次, 編), 中外医学社, 1985, p.43.

(広島 大 大 学 院 三浦浩司
疫学・疾病制御学教授)



Q 呼吸音における連続性および断続性ラ音の捉え方
一、呼吸音の分類はダイヤモンドラム(図1)において、連続性ラ音と呼吸音の長さが一般の

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

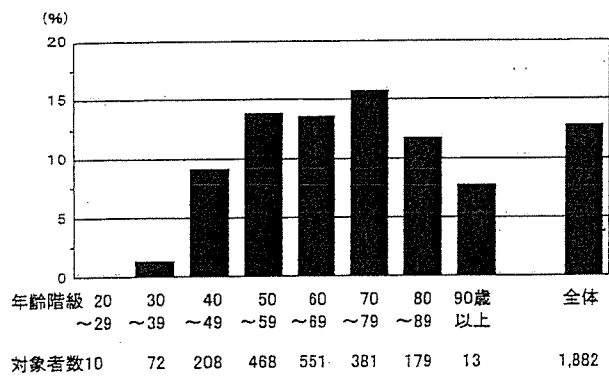


図1 年齢階級別に見たHCV RNA陽性率
調査14(2003年2月)1,882例

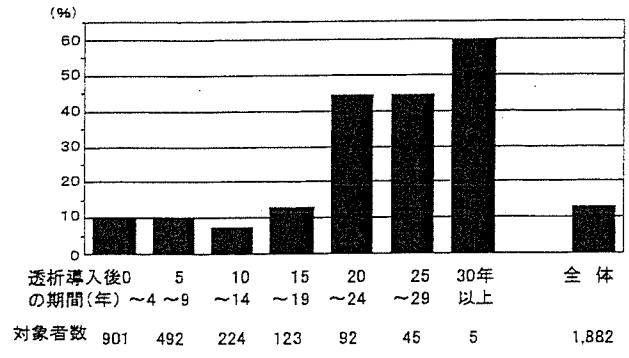


図2 透析導入後の期間別に見たHCV RNA陽性率
調査14(2003年2月)1,882例

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)別に分けてみると、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³⁾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

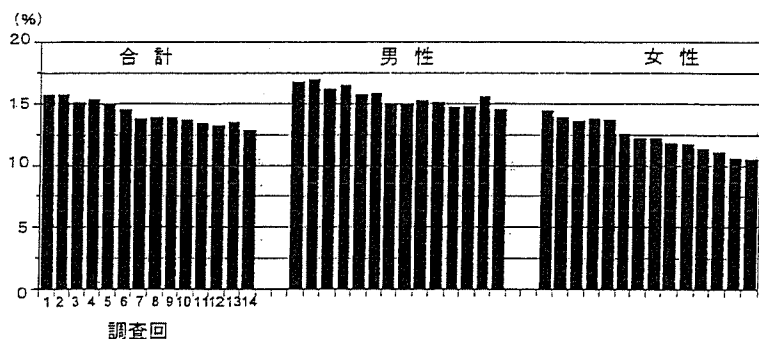


図3 調査時期別みたHCV RNA陽性率
調査1(1999年11月)～調査14(2003年2月)

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⁵⁾。

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

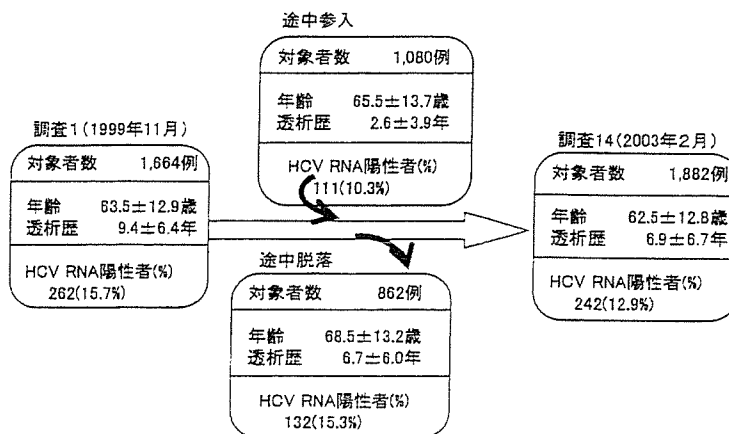


図4 HCV RNA陽性者の動態
調査1(1999年11月)～調査14(2003年2月)

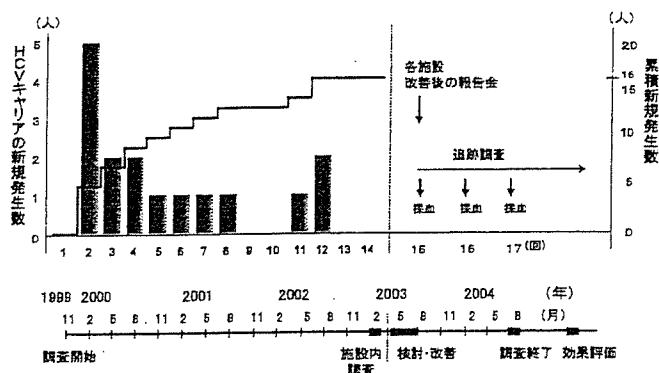


図5 血液透析患者集団におけるHCVキャリアの新規発生数および感染防止のための改善とその効果評価

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)diethylammonia) 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 then 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 a 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 complimentary 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).

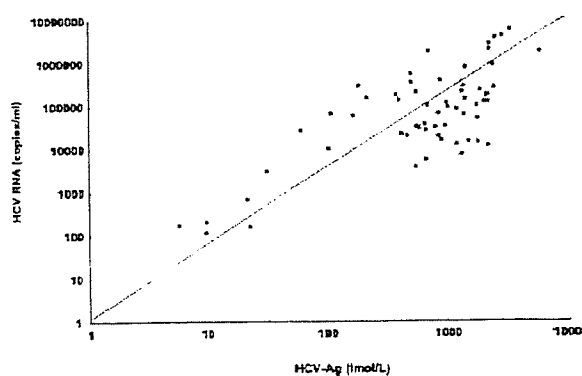


Fig. 1. Correlation between HCV core antigen (HCVcAg) levels and HCV RNA. There is a significant positive correlation ($r = 0.671$, $P < 0.05$) between the serum concentrations of HCV RNA (detected by RTD-PCR test) and quantitative levels of HCVcAg among 61 randomly selected samples of genotype 4.

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).

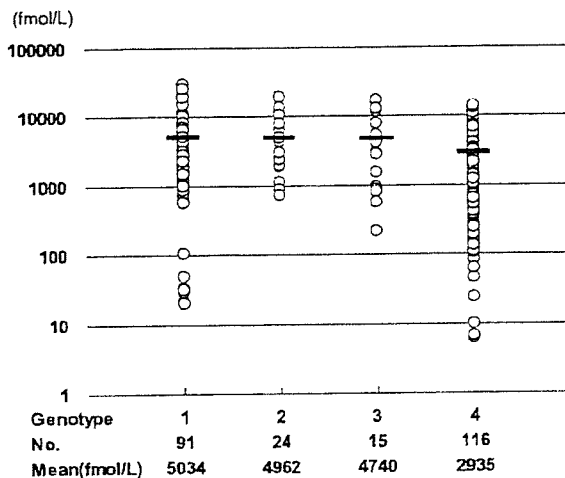


Fig. 2. Mean of serum HCVcAg levels among 246 blood donors with different genotypes. The mean HCVcAg levels in genotypes 1, 2, 3, and 4 were 5,034, 4,962, 4,740, and 2,935 fmol/L, respectively, suggesting significantly lower levels in genotype 4.

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 [Aoygi 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 (AF290978)	21	DVKFPGGGQIVGGVLLPRRGPRLCVRAVTRKTSERSOPRGRQPIKARRPEGRWAOQPGYPN	63
HCV-1b (J) D90208	21	63
HCV-2a (J6) D00944	21D..ST..KS..GK.....	63
HCV-2b (J8) D10988	21D..ST..KS..GK.....	63
HCV-3a (AF046866)	21V.....C.....R.....QSG..S.....	63
HCV-4 (D45193)	21S.....S.....	63
HCV-4 (L29587)	21T.....S.....	63
HCV-4 (L29624)	21S.....S.....	63
HCV-4 (U10236)	21Q.....S.....	63
HCV-4 (U10237)	21Q.....S.....S.....	63
HCV-4 (U10240)	21S.....S.....	63
HCV-4a (Y11604)	21S.....S.....	63
HCV-4c (L38338)	21S.....S.....	63
HCV-4e (L38323)	21T.....S.....	63
HCV-4f (L38332)	21QT.....S.....	63
Egypt: Central 10 (12)	21S.....S.....	63
Egypt: Central 17 (24)	21S.....S.....	63
Egypt: North 29 (61)	21S.....S.....	63
Egypt: North 47 (10)	21S.....S.....S.....	63
Egypt: South 1686 (24)	21S.....S.....H.....	63
Egypt: South 1694 (43)	21S.....KS.....	63
Egypt: North 21 (63)	21S.....	63
Egypt: Central 100 (83)	21S.....	63
Egypt: Central 44 (104)	21S.....S.....	63
Egypt: East 6 (419)	21S.....S.....	63
Egypt: North 0443 (211)	21S.....	63
Egypt: South 1406 (217)	21S.....S.....	63
Egypt: South 1676 (334)	21S.....S.....	63

HCV-1a (AF290978)	84	PLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRP5MGPTDPRR5RNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAFLGGA	147
HCV-1b (J) D90208	84M.....	147
HCV-2a (J6) D00944	84L.....K.....H.....V.....V.....V.....	147
HCV-2b (J8) D10988	84T.....H.....R.....I.....V.....V.....V.....	147
HCV-3a (AF046866)	84K.....	147
HCV-4 (D45193)	84K.....	147
HCV-4 (L29587)	84X.....X.....X.....	147
HCV-4 (L29624)	84K.....	147
HCV-4 (U10236)	84K.....	147
HCV-4 (U10237)	84QK.....	147
HCV-4 (U10240)	84K.....	147
HCV-4a (Y11604)	84K.....G.....	147
HCV-4c (L38338)	84K.....	147
HCV-4e (L38323)	84	X..X.....X.....X.....NK.....	147
HCV-4f (L38332)	84	..FT.....K.....	147
Egypt: Central 10 (12)	84K.....L.....V.....V.....V.....	147
Egypt: Central 17 (24)	84N.....L.....V.....V.....V.....	147
Egypt: North 29 (61)	84K.....	147
Egypt: North 47 (10)	84S.....K.....	147
Egypt: South 1686 (24)	84K.....	147
Egypt: South 1694 (43)	84K.....L.....V.....V.....V.....	147
Egypt: North 21 (63)	84K.....I.....I.....	147
Egypt: Central 100 (83)	84K.....	147
Egypt: Central 44 (104)	84K.....	147
Egypt: East 6 (419)	84K.....A.....L.....	147
Egypt: North 0443 (211)	84K.....V.....	147
Egypt: South 1406 (217)	84K.....	147
Egypt: South 1676 (334)	84K.....	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].