

たスペースを有効に使うために1日3シフトにするのは、スタッフの勤務時間を変更するだけで比較的容易に実現可能である。都市部では早朝から深夜まで公共交通機関が利用可能であり、農村部ではほとんどの患者がクルマで来院する今日、患者もスタッフも早朝や夜間に透析を行なうことに対する抵抗がそれほどあるとは思えない。1日2シフトにこだわるあまり、60～70cmのベッド幅で患者同士のプライバシーも確保できず、B型肝炎患者の隔離を安全に行なえない環境で透析を行なうのはいかなものか、と思う。自分がもし透析患者になったら、アメリカやイタリアのようなベッド間隔の広い透析施設で、夕方から深夜の静かな環境の中で透析を受けたいと思う。

#### ◆おわりに

日本の感染対策は主にアメリカから学んでいるが、一方でCDCガイドラインを異国のものとして頑なに拒否する人もいる。筆者はアメリカの医療施設を数多く見てきたが、必ずしもガイドライン通りに感染対策を行っていないし、独自の手法をとる施設もある。さらに、ヨーロッパには独自の文化があり、感染対策の方針も異なる。我々に必要なことは、海外の医療施設における感染対策やガイドラインを鵜呑みにすることなく、その背景や文化を理解した上で、取り入れるべきものはどんどん取り入れ、一方で日本が誇りにできるものは堂々と自慢することであろう。

ちなみにアメリカでは今、感染対策を組織で行なう方向に徐々に移っているようである。従来、医師・個々のICPがそれぞれ自分自身に割り当てられた仕事を行ない、複数のICPの間で互いのサーベイランスの結果やフィードバックによる介入策も知らないといったことが珍しくなかった。日本は「和」

を尊ぶ文化に基づき、早くからICTによる組織的な感染対策が多くの病院で取り入れられていった。このような感染対策活動は日本がアメリカだけでなく世界に誇れるものであり、今後も守っていくべき姿勢である。

#### 〔参考文献〕

- 1) Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. *MMWR* 2001;50(No.RR-5):1-43.
- 2) 厚生労働科学研究班, 日本透析医学会, 他. 透析施設における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル(三訂版) pp. 67-68.
- 3) Fabrizi F, Poordad FF, Martin P. Hepatitis C infection and the patient with end-stage renal disease. *Hepatology*. 2002; Jul;36(1):3-10.
- 4) Finelli L, Miller JT, Tokars JI, Alter MJ and Arduino MJ. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. *Seminars in Dialysis* 2005;18(1):52-61
- 5) De Vos JY, Elseviers M, Harrington M, Zampieron A, Vlamincck H, Ormandy P, Kafkia T. Infection control practices across Europe: results of the EPD. *EDTNA/ERCA J* 2006;32(1):38-41

#### 著者連絡先

森兼 啓太 (Keita MORIKANE)

国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官  
(Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases)

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

(1-23-1 Toyama Shinjuku-Ku, Tokyo 162-8640)

## 血液透析施設におけるウイルス性肝炎に対する 院内感染防止対策の現況

安藤 亮一<sup>1</sup> 秋 葉 隆<sup>2</sup>

武蔵野赤十字病院腎臓内科<sup>1</sup>

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター血液浄化療法科<sup>2</sup>

キーワード：ウイルス性肝炎，C型肝炎ウイルス，院内感染対策，アンケート調査，血液透析施設  
(要旨)

2000年に続いて、2006年に透析施設におけるウイルス性肝炎の感染の現況を把握し、院内感染防止の実態を明らかにするためにアンケート調査を行った。1,817施設から回答があり、回答率は50.63%であった。HBs抗原陽性率(2.39%)、HCV抗体陽性率(11.27%)はいずれも2000年より低下していた。感染対策委員会、感染対策マニュアルの整備など感染防止体制は、2000年よりも高率に認められた。HCV抗体陽性患者は67.3%で決められたブロックあるいはベッド固定がなされ、11.3%でスタッフ固定がなされ、いずれも2000年よりも増加した。エリスロポエチンの複数患者への分割投与、使用済み注射器の再使用、余った返血用生食の別患者への使用など院内感染の原因となり得る処置はいずれも減少したが、根絶されてはいず、さらに徹底した対策が必要と考えられた。エリスロポエチンのプレフィルドシリンジは94.9%と普及率が高かったが、ヘパリンのプレフィルドシリンジの普及率は27.1%にとどまっていた。透析操作終了時に手袋をする施設のほうがしない施設よりHBs抗原、HCV抗体陽性率が有意に低く、HCV抗体陽性患者にHCV抗体陽性を伝えている施設およびHCV抗体陽性患者への感染予防のための日常生活の注意をしている施設でHCV抗体陽性率が有意に低かった。肝炎ウイルス陽性患者の定期的な画像検査は、80%の施設で定期的に行われていたが、肝臓専門医での診察は25.3%にとどまった。ウイルス性肝炎に対する治療は39.6%の施設で行われていたが、インターフェロンなどの抗ウイルス療法は少なかった。以上より、ウイルス性肝炎に対する院内感染防止対策は、2000年より改善が認められたが、改善する余地が残っている。また、透析患者のウイルス性肝炎の診療は十分とはいえず、今後、透析患者のウイルス性肝炎の診療ガイドラインの策定が望まれる。

### The present status of the hospital infection control for viral hepatitis in hemodialysis facilities

Ryoichi Ando<sup>1</sup> and Takashi Akiba<sup>2</sup>

Department of Nephrology, Musashino Red Cross Hospital<sup>1</sup>; Division of Blood Purification, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University<sup>2</sup>

Key words : viral hepatitis, hepatitis C virus, infection control, questionnaire survey, dialysis facility  
(Abstract)

The status of hospital infection control for viral hepatitis in dialysis facilities was investigated in 2006 and findings were compared to those obtained in 2000. We mailed questionnaires to hemodialysis facilities and recovered them from 1817 facilities (recovery rate of 50.63%). An infection control system such as an infection control commission and infection control manual was organized in a higher portion of facilities in 2006 than in 2000. The rate of bed fixation for anti-HCV antibody-positive patients was 67.3% and was higher than that in 2000. Administration of erythropoietin in a divided dose to different patients, reuse of the used syringe, and use of leftover saline for another patient had decreased, but these practices had not been eradicated. A pre-filled syringe with erythropoietin was used in 94.9% of facilities, but the use of pre-filled syringes for heparin was still

安藤 亮一 武蔵野赤十字病院腎臓内科 〒180-8610 東京都武蔵野市境南町1-26-1

Ryoichi Ando Tel : 0422-32-3111 Fax : 0422-32-9551 E-mail : rando@musashino.jrc.or.jp

[受付日：2009年1月20日，受理日：2009年2月13日]



limited to 27.1%. The HBs antigen-and anti-HCV antibody-positive rates were lower in facilities using gloves when returning blood. Information on anti-HCV antibody-positive result and the daily life consultations for anti-HCV antibody-positive patients were related to the lower anti-HCV antibody-positive rate. Image inspection of viral hepatitis patient was done periodically in 80% of facility, but medical examination by hepatologists was limited to 25.3%. Therapy for viral hepatitis was given in 39.6% of facilities, but anti-viral medical therapy with interferon was administered to fewer patients. In conclusion, infection control measures showed an improvement since 2000, but there is still considerable room for improvement. The diagnosis and treatment of viral hepatitis in dialysis patients remains insufficient. Guidelines for diagnosis and treatment of viral hepatitis in dialysis patient appear to be necessary.

## I. 目 的

1999年に「透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル」が作成され、その後2回にわたる改訂がなされ、透析施設にも十分普及したと思われる。秋葉ら<sup>1)</sup>は、2000年に血液透析施設における院内感染防止対策の現況に関してアンケート調査を行い、その当時、依然として透析患者にウイルス性肝炎の感染が高頻度にみられること、院内感染予防のための一定の努力が行われていることを報告した。

その後、透析患者における肝炎ウイルスマーカー陽性率は年々低下傾向にあり、HCV抗体陽性率は、前記マニュアルが発表された1999年末には15.95%であったが、2007年末には9.84%まで低下した<sup>2)</sup>。

この低下の原因には、ディスプレイ製品の普及やエリスロポエチン製剤のプレフィルド化などの器材の改善に加えて、前記マニュアルの普及を含めた、各透析施設での、感染防止体制の整備も大きな役割を果たしてきたと考えられる<sup>3)</sup>。

しかし、透析施設内ウイルス性肝炎感染事例は根絶されていず、肝炎ウイルスマーカー陽性率は一般人口よりも高いレベルが続いている。

2008年、「透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル」三訂版が刊行された<sup>4)</sup>。これを作成するにあたり、現状の問題点を明らかにし、今後の感染防止対策に生かすことを目的として、透析現場の感染症対策の現況を再び調査した。

## II. 方 法

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）「透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究」（主任研究員 秋葉隆 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター教授）の分担研究の一環として、ウイルス性肝炎感染を中心とした院内感染防止対策の現況に関する調査を施行した。

方法は、日本透析医学会の施設会員のうち、図書館など透析医療を行っていない施設を除いた3,589箇所へ、感染症の実態、感染防止対策、透析操作の実際、ウイルス性肝炎の診療について、アンケート調査を郵送で配布し回収した。

アンケート調査の内容は、2000年に施行された透析施設における院内感染防止対策に関するアンケートの項目に、エリスロポエチンおよびヘパリンのプレフィルドシリンジの普及率とウイルス性肝炎患者および肝がん患者への検査、治療の現況に関する質問を加えたものとした（表1）。

なお、Q11は設問が不適当だったので、集計より除外した。

集計はMicrosoft Excelへの入力後、データ変換を行い、STATVIEW5.0により解析した。データは平均値±標準偏差で表記し、検定はカイ二乗分析、ANOVAにより行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## III. 結 果

### 1. アンケートの回収状況

アンケートは2006年2月上旬に発送し、3月5日締め切りとしたが、郵送の遅れなどを考慮して3月31日到着分までを集計した。

1,817の透析施設より回答が返送され、回答率は50.63%であった。透析ベッド数は53,412台、維持血液透析患者数は129,793名であり、2006年末のわが国の慢性透析療法の現況によると、ベッド数では、51.17%、患者数では、49.08%に相当した。前回（2000年）のアンケートでは、1,681施設、回収率57.8%で、施設数では、今回のアンケートのほうが136施設上回ったが、回収率では、8.72%下回った。

アンケート回答施設の設立母体は、国公立大学2.1%、私立大学2.1%、国立病院1.0%、県市町村立10.1%、社会保険1.2%、厚生連2.3%、その他の公立7.0%、私立総合病院8.4%、私立病院31.4%、私立診療所36.5%で、私立診療所が最多を占めた。また、患



表 1 ウイルス性肝炎の感染の現況，院内感染防止，診療の実態のアンケート内容

施設アンケート

下記の質問に記入，ないしは当てはまるものを選択してください。判断のつかないとき，答えたくないときは空欄のままとしてください。なお，透析施設名はアンケート回収の確認のみに用い，集計されません。

貴施設名 \_\_\_\_\_  
 施設番号 \_\_\_\_\_ (日本透析医学会施設コード)

- Q1. 貴施設で血液透析を開始された年 西暦 \_\_\_\_\_ 年  
 Q2. 貴施設の設立母体 国公立大学・私立大学・国立・県市町村立・社会保険・厚生連・その他の公的・私立総合・私立・私立診療所  
 Q3. 透析ベッド ( ) 床  
 Q4. 入院ベッド 無・有 ( ) 床  
 Q5. 地域 北海道東北・関東・東京・甲信越北陸東海・近畿・中国四国・九州沖縄  
 Q6. 夜間透析 無・有  
 Q7. 職員雇用数 (透析療法に関与する職員のみ記入してください)  
 医師 専従 \_\_\_\_\_ 人，兼務ないし非常勤計 \_\_\_\_\_ 時間/週  
 看護師 専従 \_\_\_\_\_ 人，兼務ないし非常勤計 \_\_\_\_\_ 時間/週  
 臨床工学技士 専従 \_\_\_\_\_ 人，兼務ないし非常勤計 \_\_\_\_\_ 時間/週  
 看護助手 専従 \_\_\_\_\_ 人，兼務ないし非常勤計 \_\_\_\_\_ 時間/週  
 Q8. 維持血液透析患者数  
 週3回透析 \_\_\_\_\_ 名 週2回透析 \_\_\_\_\_ 名 週1回透析 \_\_\_\_\_ 名

- Q9. 院内感染防止の体制  
はい いいえ 自施設で作成した感染対策マニュアルがある。  
はい いいえ 院内感染対策委員会が組織されている。  
はい いいえ 院内感染対策委員会が毎月開かれている。  
はい いいえ HCV 抗体検査を年1回以上行っている。  
はい いいえ HBs 抗原検査を年1回以上行っている。  
はい いいえ 肝機能検査 (GOT, GPT など) を毎月1回以上行っている。  
はい いいえ HBs 抗原，抗体陰性患者に HBV ワクチン接種を勧めている。

- Q10. 肝炎ウイルス感染状況の把握  
はい いいえ 1999年4月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する治療に関する法律 (以下感染症新法)」により，急性ウイルス性肝炎患者が新規に発生したとき届出が必要なることを知っている。  
はい いいえ 「感染症新法」による，血液透析患者の急性ウイルス性肝炎発症の届出をしたことがある。

もし，現在貴施設で血液透析を行っている患者の直近 (1年以内) の HCV 抗体検査，HBs 抗原検査の結果を把握されている場合は記入をお願いします。

全血液透析患者	HCV 抗体陽性	HCV 抗体陰性	HCV 抗体未測定
HBs 抗原陽性	名	名	名
HBs 抗原陰性	名	名	名
HBs 抗原未測定	名	名	名

- HCV 抗体検査法と依頼施設名をお知らせください。  
第1世代 (RIA 固相法) 第2世代 (EIA) 凝集法 (PHA, PA) 第3世代 (IRMA)  
不明 検査施設名 ( )  
はい いいえ B型肝炎のスクリーニングとして HBc 抗体検査を実施していますか。

- Q11. HBV 感染患者への対応  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者と陰性患者とは別室で透析を行っている。  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者と陰性患者とは同室だが，決められたブロック，ベッドで透析を行っている。  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者の透析開始，終了操作を担当するスタッフと非感染患者を担当するスタッフは区別している。  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者であることをスタッフがベッドサイドですぐにわかるような工夫をしてある。  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者全員に HCV 抗体陽性であることを伝えてある。  
はい いいえ HBV 抗体陽性患者全員に周囲への感染予防のための日常生活の注意を伝えてある。

- Q12. HCV 感染患者への対応  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者について血中のウイルスの有無を確認していますか。  
 「はい」の場合，次のどの方法ですか。  
抗体価の力価 アンプリコア定性法 分岐 DNA プローブ法 その他 ( )  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者と陰性患者とは別室で透析を行っている。  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者と陰性患者とは同室だが，決められたブロック，ベッドで透析を行っている。  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者の透析開始，終了操作を担当するスタッフと非感染患者を担当するスタッフは区別している。  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者であることをスタッフがベッドサイドですぐにわかるような工夫をしてある。  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者全員に HCV 抗体陽性であることを伝えてある。  
はい いいえ HCV 抗体陽性患者全員に周囲への感染予防のための日常生活の注意を伝えてある。

(表1つづく)

## Q13. 開始操作

- はい いいえ 透析開始操作は通常患者ひとりについて複数のスタッフで行う。  
はい いいえ 透析開始操作前、患者ごとに手洗いをする。  
はい いいえ 開始操作時、特に穿刺の難しい患者などを除いて手袋をする。  
はい いいえ 穿刺時に使用する手袋は患者一人当たり一対使用している。  
はい いいえ 鉗子や摂子などを消毒しないで患者間で共用することがある。  
はい いいえ 消毒用綿球、摂子などをのせるデスポトレイを使っている。  
はい いいえ 透析開始操作終了時、患者ごとに手洗いをする。

## Q14. 経過観察

- はい いいえ 血圧測定用のカフはベッドごとに決まっている。  
はい いいえ 血圧測定用のカフは1回の透析終了後に消毒している。  
はい いいえ 血圧測定用聴診器は患者ごとに1本ずつ用意されている。

## Q15. 薬物投与

- はい いいえ 透析中に投与する薬物を透析ベッドとは離れた一定の区画で調製している。  
はい いいえ 抗凝固薬は患者ごとにバイアルを決めている。  
はい いいえ 抗凝固薬は肝炎ウイルス感染者と非感染者は別のバイアルで調製を行っている。  
はい いいえ エリスロポエチンの同一アンプルを2人以上の患者に分割投与することがある。  
はい いいえ 薬物投与に用いる注射器を再度使用することがある。  
はい いいえ 返血で余った生理食塩水を、別の患者に投与することがある。

## Q16. 終了操作

- はい いいえ 透析終了操作は通常複数のスタッフで行う。  
はい いいえ 透析終了操作前、スタッフは患者ごとに手洗いをする。  
はい いいえ 透析終了操作時にスタッフは手袋をする。  
はい いいえ スタッフが終了操作時に使用する手袋は、患者一人当たり一対を使用している。  
はい いいえ 消毒用綿球、摂子などをのせるデスポトレイを使っている。  
はい いいえ 鉗子や摂子などは各患者の透析終了ごとに、滅菌消毒を行っている。  
はい いいえ 透析終了操作終了時、スタッフは患者ごとに手洗いをする。  
はい いいえ 止血綿の交換をするとき、担当者は手袋をしている。  
はい いいえ 止血綿の交換をするとき、手袋は患者ごとに交換している。

## Q17. リネン、清拭

- はい いいえ 透析終了後、透析ベッドのシーツは毎透析後に交換している。  
はい いいえ 透析ベッドシーツは週1回以上交換している。  
はい いいえ 透析ベッドシーツが血液で汚れた時は、汚れた部分を消毒、漂白して、全体は交換しない。  
はい いいえ 毎透析終了後に、コンソールを消毒薬で拭く。  
はい いいえ 一日の透析終了後に、コンソールを消毒薬で拭く。

## Q18. 肝炎ウイルス陽性患者への検査

- はい いいえ 肝炎ウイルス陽性患者に対して定期的な画像検査（エコー、CTなど）を行っている（自施設、他施設を問わず）。  
 定期的な検査を行っている場合、その頻度を選んでください。  
年1回未満 年1回 年2回 年3回以上  
はい いいえ 腫瘍マーカー検査を定期的に行っている。  
はい いいえ 肝臓専門医による定期的な診察を行っている。

## Q19. 肝炎ウイルス陽性患者への治療

- はい いいえ 肝炎ウイルス陽性患者への何らかの治療を行っている。  
 もし、肝炎ウイルス患者への治療を行っている場合、過去1年以内の治療内容と人数を下記へ記入お願いします（重複可です）。

	インターフェロン	リバビリン	強力ミノファージェンC	その他
HB	名	名	名	名
HCV	名	名	名	名

## Q20. 肝臓がん発生状況

- はい いいえ 過去1年以内に肝炎ウイルスによる肝臓がんの患者がいる。  
はい いいえ 過去1年以内に肝臓がんに対する治療をした（他施設での治療も含みます）。  
 その治療内容と人数を下記へ記入お願いします（重複可です）。

	動脈塞栓術	ラジオ波	PEIT	抗がん剤	その他
人数	名	名	名	名	名

- はい いいえ 過去1年以内に肝臓がんで亡くなった患者さんがいる。  
 「はい」の場合、何人ですか、 \_\_\_\_\_ 名

者数でも、国公立大学0.2%、私立大学1.2%、国立病院0.2%、県市町村立6.7%、社会保険0.9%、厚生連2.5%、その他の公立6.3%、私立総合病院6.6%、私立病院36.2%、私立診療所39.3%で、私立診療所が最

多を占めた。設立母体10群を後3者の私的施設（私立総合病院、私立病院、私立診療所）とその他に分け、2006年末の日本透析医学会の統計調査の結果を対照として検討すると、設立母体間に差を認めなかった。



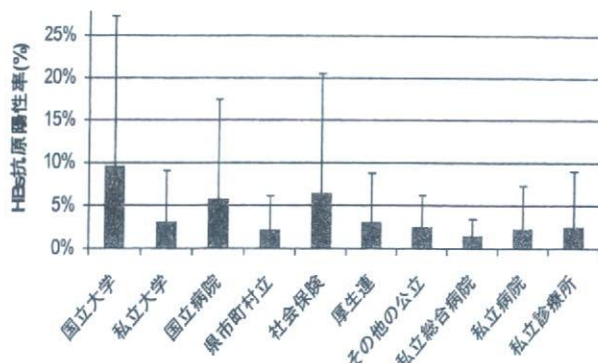


図 1 設立母体別の HBs 抗原陽性率

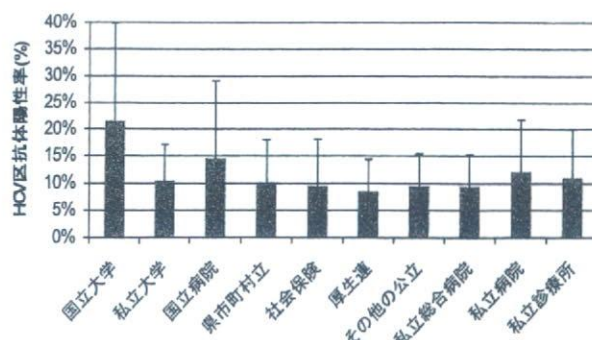


図 3 設立母体別の HCV 抗体陽性率

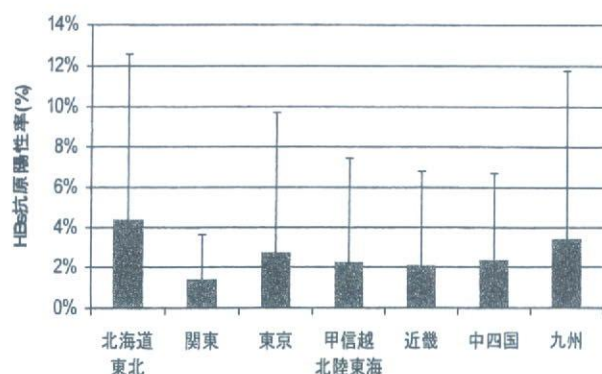


図 2 地域別の HBs 抗原陽性率

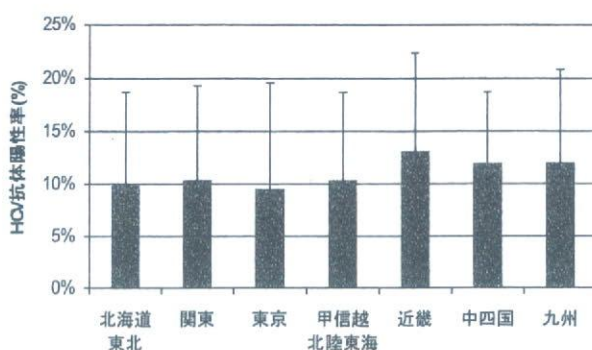


図 4 地域別の HCV 抗体陽性率

また、回答施設の地域は、北海道・東北 12.5%、関東 17.6%、東京 10.2%、甲信越・北陸・東海 16.7%、近畿 15.1%、中国・四国 11.1%、九州・沖縄 15.1%で、日本透析医学会の統計調査の結果を対照とすると、地域間にも差を認めなかった。

## 2. 肝炎ウイルスマーカー

肝炎ウイルスマーカーの記載がされて、施設内検査率、陽性率が算出可能であった施設は 1,133 施設分、93,050 名分であった。このうち、HBs 抗原未測定者 590 名、HCV 抗体未測定者 474 名（うち両者とも未測定者 313 名）であった。HBs 抗原陽性者は 2,214 名（陽性率 2.39%）、HCV 抗体陽性者は 10,435 名（陽性率 11.27%）で、陽性率についてはいずれも 2000 年（HBs 抗原陽性率 2.84%、HCV 抗体陽性率 22.4%）よりも低下していた。

HBs 抗原の施設陽性率は、平均  $2.58 \pm 5.94\%$  で、2000 年 ( $2.20 \pm 4.26\%$ ) よりも高かった。設立母体別には、最も低い私立総合病院 1.54% より、最も高い国立大学 9.67% まで分布し、設立母体で有意に異なっていた ( $p < 0.01$ , 図 1)。また、地域別の HBs 抗原施設陽性率も、最も低い関東 1.40% から、最も高い北海道・東北 4.40% まで分布し、地域間に有意な差を認めた ( $p < 0.001$ , 図 2)。

HCV 抗体の施設陽性率は、平均  $11.17 \pm 8.78\%$  で、2000 年 (17.17%) よりも低下していた。設立母体別にみると、最も低い厚生連 8.56% から、最も高い国立大学 21.57% まで分布し、設立母体間で有意に異なっていた ( $p < 0.01$ , 図 3)。地域別の HCV 抗体陽性率も、最も低い東京 9.55% から、最も高い近畿 13.11% まで分布し、地域間で有意な差を認めた ( $p < 0.01$ , 図 4)。

肝炎ウイルスの施設陽性率と施設が透析医療を開始してからの期間との間には、HBs 抗原、HCV 抗体いずれも有意な関係を認めなかった。

HBs 抗原の施設陽性率と HCV 抗体の施設陽性率は、非常に弱いながら、有意の正の相関関係を認めた ( $r = 0.073$ ,  $p < 0.05$ )。

入院ベッドの有無および夜間透析の有無と HBs 抗原、HCV 抗体の施設陽性率との関連はいずれも認められなかった。

## 3. 感染防止対策の内容

自施設で作成された感染対策マニュアルがある (86.8%)、院内感染対策委員会が組織されている (88.1%)、院内感染対策委員会が毎月開かれている (74.9%) などは、2000 年 (各々 81.6%, 74.5%, 54.4%) と比較していずれも増加していた。

HCV 抗体陽性患者に対して血中ウイルスの確認が行われているのは、68.8%で、2000年(51.2%)より増加していた。

HCV 抗体陽性患者の隔離に関しては、別室に隔離はほとんどなく(0.28%)、決められたブロックあるいはベッドに固定(67.3%)、スタッフを固定(11.3%)、いずれも2000年(43.2%, 5.9%)より増加していた。

透析操作に関しては、複数スタッフによる開始(59.9%)はわずかに増加したが(2000年57.4%)、複数スタッフによる終了(36.6%)は減少していた(2000年43%)。

注射薬に関しては、透析ベッドとは離れた区画での調整(91.7%)は微増し(2000年90.8%)、抗凝固薬を患者ごとにバイアルを決めている(46.5%)は増加した(2000年28.9%)。一方、エリスロポエチンの複数患者への分割投与(1.4%)、使用済み注射器の再使用(1.1%)、余った返血用生食の別患者への使用(0.28%)はいずれも減少したが(2000年5.54%, 2.06%, 0.908%)、根絶されてはいないという結果だった。エリスロポエチンのプレフィルドシリンジは94.9%と普及率が高かったが、ヘパリンのプレフィルドシリンジの普及率は27.1%にとどまっていた。

以下に、各項目の結果を示す。

#### Q9. 院内感染防止の体制(カッコ内は2000年の調査結果)

- 1) 自施設で作成した感染対策マニュアルがある。  
86.8% (81.6%)
- 2) 院内感染対策委員会が組織されている。  
88.1% (74.5%)
- 3) 院内感染対策委員会が毎月開かれている。  
74.9% (54.4%)
- 4) HCV 抗体検査を年1回以上行っている。  
96.9% (93.3%)
- 5) HBs 抗原検査を年1回以上行っている。  
96.9% (94.3%)
- 6) 肝機能検査(GOT, GPT など)を毎月1回以上行っている。  
93.0% (91.8%)
- 7) HBs 抗原, 抗体陰性患者にHBV ワクチン接種を勧めている。  
26.4% (15.4%)

#### Q10. 肝炎ウイルス感染状況の把握

- 1) 1999年4月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する治療に関する法律(以下感染症新法)」により、急性ウイルス性肝炎患者が新規に発生したとき届出が必要なことを知っている。  
89.4% (90.2%)

2) 「感染症新法」による、血液透析患者の急性ウイルス性肝炎発症の届出をしたことがある。

3.8% (2.68%)

3) B型肝炎のスクリーニングとしてHBc抗体検査を実施している。

29.9% (24.3%)

#### Q12. HCV 感染患者への対応

1) HCV 抗体陽性患者について血中のウイルスの有無を確認している。

68.8% (51.2%)

抗体価の力価 37.4% アンプリコア定性法 31.0% 分岐DNAプローブ法 20.2% その他 17.2%

2) HCV 抗体陽性患者と陰性患者とは別室で透析を行っている。

0.28% (0.674%)

3) HCV 抗体陽性患者と陰性患者とは同室だが、決められたブロック、ベッドで透析を行っている。

67.3% (43.2%)

4) HCV 抗体陽性患者の透析開始、終了操作を担当するスタッフと非感染患者を担当するスタッフは区別している。

11.3% (5.90%)

5) HCV 抗体陽性患者であることをスタッフがベッドサイドですぐにわかるような工夫をしてある。

75.4% (71.6%)

6) HCV 抗体陽性患者全員にHCV 抗体陽性であることを伝えてある。

82.4% (70.0%)

7) HCV 抗体陽性患者全員に周囲への感染予防のための日常生活の注意を伝えてある。

67.2% (59.6%)

#### Q13. 開始操作

1) 透析開始操作は通常患者ひとりについて複数のスタッフで行う。

59.9% (57.4%)

2) 透析開始操作前、患者ごとに手洗いをする。

67.0% (56.3%)

3) 開始操作時、特に穿刺の難しい患者などを除いて手袋をする。

81.8% (74.8%)

4) 穿刺時に使用する手袋は患者一人当たり一雙使用している。

95.6% (84.1%)

5) 鉗子や摂子などを消毒しないで患者間で共用することがある。

4.7% (6.12%)

6) 消毒用綿球、摂子などをのせるディスプレイを使っている。

63.2% (49.8%)

7) 透析開始操作終了時、患者ごとに手洗いする。

69.3% (51.4%)

#### Q14. 経過観察

1) 血圧測定用のカフはベッドごとに決まっている。

83.6% (76.7%)

2) 血圧測定用のカフは1回の透析終了後に消毒している。

7.9% (2.91%)



表2 診療内容と肝炎ウイルスマーカー陽性率の関係

肝炎ウイルスマーカー	診療内容		マーカー陽性率	p 値
HBs 抗原	透析操作終了時の手袋着用	有	2.5±5.7% (1,103)	0.0239
		無	5.1±13.0% (27)	
HCV 抗体	透析操作終了時の手袋着用	有	11.1±8.7% (1,102)	0.0044
		無	15.9±12.2% (27)	
	HCV 抗体陽性患者への告知	有	11.1±8.6% (919)	0.0444
		無	12.6±9.3% (185)	
	HCV 抗体陽性患者への感染予防のための日常生活の注意	有	10.9±8.2% (746)	0.0057
		無	12.4±9.8% (357)	

3) 血圧測定用聴診器は患者ごとに1本ずつ用意されている。 8.1% (7.26%)

Q15. 薬物投与

- 1) 透析中に投与する薬物を透析ベッドとは離れた一定の区画で調製している。 91.7% (90.8%)
- 2) 抗凝固薬は患者ごとにバイアルを決めている。 46.5% (28.9%)
- 3) 抗凝固薬は肝炎ウイルス感染者と非感染者は別のバイアルで調製を行っている。 36.1% (22.2%)
- 4) エリスロポエチンの同一アンプルを2人以上の患者に分割投与することがある。 1.4% (5.54%)
- 5) 薬物投与に用いる注射器を再度使用することがある。 1.1% (2.06%)
- 6) 返血で余った生理食塩水を、別の患者に投与することがある。 0.28% (0.908%)
- 7) エリスロポエチンはプレフィルドシリンジで投与している。 94.9%
- 8) ヘパリンはプレフィルドシリンジで投与している。 27.1%

Q16. 終了操作

- 1) 透析終了操作は通常複数のスタッフで行う。 36.6% (43.0%)
- 2) 透析終了操作前、スタッフは患者ごとに手洗いをする。 66.6% (45.6%)
- 3) 透析終了操作時にスタッフは手袋をする。 97.4% (92.2%)
- 4) スタッフが終了操作時に使用する手袋は、患者一人当たり一対を使用している。 97.1% (86.4%)
- 5) 消毒用綿球、摂子などをのせるディスボトレイを使っている。 61.7% (47.8%)
- 6) 鉗子や摂子などは各患者の透析終了ごとに、滅菌消毒を行っている。 82.5% (84.8%)
- 7) 透析終了操作終了時、スタッフは患者ごとに手洗いをする。 70.5% (51.8%)
- 8) 止血綿の交換をするとき、担当者は手袋をしてい

る。 93.1% (83.3%)

9) 止血綿の交換をするとき、手袋は患者ごとに交換している。 93.9% (81.2%)

Q17. リネン、清拭

- 1) 透析終了後、透析ベッドのシーツは毎透析後に交換している。 11.3% (10.8%)
- 2) 透析ベッドシーツは週1回以上交換している。 96.2% (94.9%)
- 3) 透析ベッドシーツが血液で汚れた時は、汚れた部分を消毒、漂白して、全体は交換しない。 8.6% (14.0%)
- 4) 毎透析終了後に、コンソールを消毒薬で拭く。 73.5% (53.4%)
- 5) 一日の透析終了後に、コンソールを消毒薬で拭く。 71.0% (63.4%)

4. 診療内容と肝炎ウイルスマーカー陽性率との関係 (表2)

診療内容と肝炎ウイルスマーカー陽性率との関連の有無を検討した。肝炎ウイルスマーカー陽性率に有意の差を認めた項目は、HBs 抗原、HCV 抗体いずれについても、透析操作終了時に手袋をしている施設のほうが、陽性率が有意に低かった。また、HCV 抗体に関しては、HCV 抗体陽性患者に HCV 抗体陽性を伝えている施設および HCV 抗体陽性患者への感染予防のための日常生活の注意をしている施設のほうが HCV 抗体陽性率が有意に低かった。

5. 肝炎ウイルス陽性患者への検査、治療、肝臓がんの状況

Q18. 肝炎ウイルス陽性患者への検査

1) 肝炎ウイルス陽性患者に対して定期的な画像検査 (エコー、CT など) を行っている。 80.0%

定期的な検査の頻度

- 年1回未満 5.4% 年1回 56.5%
- 年2回 28.8% 年3回以上 9.3%

2) 腫瘍マーカー検査を定期的に行っている。



- 48.9%  
3) 肝臓専門医による定期的な診察を行っている。 25.3%

## Q19. 肝炎ウイルス陽性患者への治療

- 1) 肝炎ウイルス陽性患者への何らかの治療を行っている。 39.6%  
2) 過去1年以内の治療内容と人数

	インターフェロン	リビリン	強力ミノファージェンC	その他
HB	8名	14名	427名	42名
HCV	160名	24名	2,313名	145名

## Q20. 肝臓がん発生状況

- 1) 過去1年以内に肝炎ウイルスによる肝臓がんの患者がいる。 17.5%  
2) 過去1年以内に肝臓がんに対する治療をした（他施設での治療も含む）。 20.1%  
治療内容と人数（重複可）。

	動脈塞栓術	ラジオ波	PEIT	抗がん剤	その他
人数	249名	129名	129名	59名	57名

- 3) 過去1年以内に肝臓がんで亡くなった患者さんがいる。 7.9%  
人数 138名

## IV. 考 察

アンケートの回答率は50.63%で、2000年に行われた前回のアンケートの回答率57.8%より低かったが、無償の郵便による調査としては、比較的良好であった。また、回答施設は設立母体、地域ともに、日本透析医学会の統計調査の分布と差がなく、ほぼ、全国の透析施設と偏りのない調査が行われたと考えられる。

感染対策マニュアルの整備や感染対策委員会の設置、開催など、総じて、2000年よりも院内感染対策の体制作りについては、整備が広く行われてきているが、未だ、自施設の感染対策マニュアルの整備、院内感染対策委員会の設置がなされていない施設が15%近くあり、毎月感染対策委員会が開かれている施設が74.9%にとどまる点は改善の余地があると考えられる。

透析施設における院内感染対策に関するアンケートとしては、兵庫県で2003年と2006年になされ、その間の比較検討がなされている<sup>5)</sup>。今回の全国調査とは、時期、施行間隔が異なるので、単純な比較はできないが、同じように、感染対策は全般的に改善傾向を示した。兵庫県では、感染対策マニュアルが全施設で

用意され、感染対策委員会の設置率が高い（2006年88%）ことは、1999年同県内に発生したB型肝炎ウイルス性肝炎による死亡多発事故以来、同県透析医会の感染対策に対する熱心な取り組みの成果であると考えられる。

2007年4月の医療法改正により、無床診療所であっても、院内感染対策を含む医療安全管理が義務化されている。透析施設の多くを占める無床診療所では、感染対策委員会の設置/開催は義務化されていないが、1999年に発表された「透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル」以後、今回の三訂版においても、透析施設では、感染対策委員会を設置することが求められていることをさらに啓発していく必要がある。

院内感染で、社会的にインパクトが強い事例はウイルス性肝炎である。すなわち、ウイルス性肝炎の院内感染は患者本人や家族の問題であると同時に、社会からの医療に対する信頼低下、病院の質への疑惑につながる「重大な事故」とみられるようになった<sup>6)</sup>。また、HCV抗体陽性患者は、生命予後も不良であることも示されている<sup>7)</sup>。前述したように、透析医学会の統計調査で、透析患者のHCV抗体陽性率は1999年の15.95%より、2007年には9.84%へ年々減少している<sup>2)</sup>。この間、1999年に透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアルの初版が発刊され、2003年に改訂版がでていた。兵庫県での2003年と2006年に施行された感染対策に関するアンケート調査でも、2003年2.4%にみられたC型肝炎の新規感染が2006年には0%であったとしており、C型肝炎の院内感染防止は達成されつつあり、十分に克服可能である<sup>5)</sup>。

今回のアンケート調査では、HBs抗原陽性率は前回調査（2000年）の2.84%から2.58%へ、HCV抗体陽性率は22.4%から11.27%へと、いずれも低下した。「透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究」透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル（三訂版）の附録で、同じアンケート調査の結果として、HBs抗原陽性率は4.00%、HCV抗体陽性率は14.45%としたが、これは肝炎ウイルスマーカーが陽性の患者のみを記載してある施設が含まれていたため、肝炎ウイルスマーカーの陽性率を計算できる施設に限定して検討すると本報告のようになった。

設立母体別の肝炎ウイルスマーカー陽性率が設立母体間で有意な差が認められたが、この傾向は2000年のアンケート調査と同様の傾向であった。いずれも、



国立大学病院で、HBs 抗原、HCV 抗体陽性率が最も高かったが、この原因としては、母数が比較的低い割に、国立大学病院は肝臓疾患の拠点病院となっていることが多く、肝炎ウイルスマーカー陽性の透析患者が多いという患者のソースの違いを反映した結果と考えられる。

また、地域間の肝炎ウイルスマーカー陽性率の違いに関しては、HBs 抗原陽性率が北海道・東北で最も高く、関東、東京が比較的低い点、HCV 抗体陽性率が西高東低の傾向を示す点など、いずれも 2000 年のアンケート調査と同様の傾向であった。この原因としては、一般人口における肝炎ウイルスマーカー陽性率の地域間の違いを反映していると考えられる。すなわち、全国の血液センターにおける初回献血者を対象とした、地域別、年齢階級別の HBs 抗原陽性率、HCV 抗体陽性率の調査によると、HBs 抗原陽性率は北海道で最も高く、関東では低く、HCV 抗体陽性率は 50 歳以上で、近畿以西の西日本で高く、東日本では低く、透析患者における陽性率の傾向と同様の分布を示した<sup>9)</sup>。以上より、透析患者の HCV 抗体陽性率は一般人口と同様の地域差を示したと考えられる。

HCV 抗体陽性透析患者の透析に関しては、わが国では、透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアルの初版から一定の区画でのベッド固定およびスタッフの固定をすすめてきた。これに対して、アメリカの CDC の勧告では、HCV 抗体陽性患者の隔離には意味がないとしている<sup>9)</sup>。世界的な透析治療の標準治療を示した、慢性腎臓病患者の C 型肝炎の予防、診断、評価と治療のための KDIGO (Kidney Disease : Improving Global Outcomes) 診療ガイドラインによると、C 型肝炎患者に対しては、厳格な感染対策をとることが求められているが、隔離や専用の透析機器の使用、すなわち、ベッド固定は勧められていない<sup>10)</sup>。一方、ヨーロッパのガイドラインでは、HCV 抗体陽性患者について、分離が勧められている<sup>11)</sup>。7 개국 308 透析施設のデータを集めた DOPPS 研究では、HCV 抗体の新規陽転率は HCV 抗体陽性患者の隔離や分離の有無では差がなく、経験の長い看護師がいる施設でより低いことが示されている<sup>12)</sup>。一方、HCV 抗体陽性率の高い、中東からの報告では、HCV 抗体陽性透析患者のベッド固定により、有意に HCV 抗体の陽転率の減少が認められている<sup>13)</sup>。今回のアンケート結果では、HCV 抗体陽性患者のベッド固定、スタッフ固定をする施設は 2000 年よりも増加しており、わが国のマニュアルに沿った形で HCV 陽性患者のベッド固定が普及しつつあると考えられた。

透析操作に関しては、複数のスタッフによる透析開始、透析終了が従来のマニュアルではすすめられてきた。今回のアンケートでは、透析開始操作は複数での施行がわずかに増加したが、終了操作は減少しており、その割合も 36.6%にとどまっている。終了操作に関しては、自動返血装置を使用する場合や抜針せずに返血し、機械の操作終了後に、動静脈側を抜針するような単独で問題ないとされる方法での操作が増加している可能性があることを反映していると考えられた。透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル（三訂版）でも、このような現状を考慮して、状況によっては、単独で行うことを許容した内容となっている。

ウイルス性肝炎の院内感染のアウトブレイクの原因は、共通で用いられる、ヘパリンや生理食塩液あるいは注射器であることが報告されている<sup>14)</sup>。注射薬の取り扱いが C 型肝炎の感染予防に最も重要な点である。しかし、エリスロポエチンの分割投与が、減少したとはいえ、未だに根絶されていない点は、使用済み注射器の再使用や返血用生食の使いまわしとともに厳に禁止していく必要がある。また、抗凝固薬を患者ごとにバイアルを決めている施設が、2000 年 28.9%から、今回 46.5%に増加しているが、バイアルの共有がまだ半数以上の施設で行われていることも問題である。プレフィルドシリンジの採用はこの点で感染予防に有利であり、2001 年からエリスロポエチンで普及がすすんできた。また、抗凝固薬であるヘパリンは 2005 年よりプレフィルドシリンジ化されたが、普及に関しては、エリスロポエチンよりも低率にとどまっている。プレフィルドシリンジはコストがかかることや 2008 年に一時供給が不足になった問題等があるが、ウイルス性肝炎の院内感染防止の観点からは、ヘパリンのプレフィルドシリンジは有効と考えられる。

診療内容と肝炎ウイルスマーカー陽性率との関係に関して、肝炎ウイルスマーカー陽性率に有意の差を認めた項目は、HBs 抗原、HCV 抗体いずれについても、透析操作終了時の手袋の有無であった。透析終了時に手袋をしている施設のほうが HBs 抗原、HCV 抗体ともに有意に陽性率が低かったという結果で、手袋の使用が感染対策上重要であることを示していると考えられるが、透析終了時の処置に手袋をしない施設は 27 施設、2.39%と非常に低率であることより、バイアスがかかっている可能性もある。

HCV 抗体に関しては、HCV 抗体陽性患者に HCV 抗体陽性を伝えている施設および HCV 抗体陽性患者への感染予防のための日常生活の注意をしている施設



のほうがHCV抗体陽性率が低かった。これは2000年の調査でも認められた所見で、施設のふだんからこれらの診療行為をしっかりと行うことで、HCV抗体陽性率を下げる可能性が示唆された。

今回新たに調査に追加した、肝炎ウイルス陽性患者への検査、治療については、定期的な画像検査は80%に行われているが、肝臓専門医による定期的な診察が行われている割合は25.3%にとどまっていた。また、肝炎ウイルス陽性患者へなんらかの治療が行われている施設は、39.6%にとどまった。その内容も強力ミノファゲンCの投与が87.4%と大部分を占め、インターフェロンなどの抗ウイルス療法が行われているのは比較的少数例に限られていた。

C型肝炎では、急性肝炎を発症したのち、慢性肝炎、肝硬変、さらには肝がんに進展するので、一般的にはインターフェロンを中心とした抗ウイルス療法の適応となることが多い。透析患者では、肝機能検査値が低い傾向にあり、基準値の設定は一般とは異なり、治療の適応を決定する上で問題となる。また、透析患者のウイルス性肝炎に対する抗ウイルス療法はインターフェロンを中心にいくつか報告されてはいるが、副作用の問題等で広く一般化されているとは言い難い<sup>15-17)</sup>。今回の調査で、過去1年間で肝臓がんが17.5%の施設でみられ、7.9%の施設で過去1年間で138名の透析患者が肝臓がんで死亡しており、透析患者においても肝炎ウイルスによる肝臓がんの発生が問題となってきていることが示された。

このように、透析患者における肝炎ウイルス陽性患者に対する治療の重要性が明らかになっているが、透析患者におけるウイルス性肝炎の診療については十分とはいえず、今後、透析患者のウイルス性肝炎の診療ガイドラインの策定が望まれる。

以上より、ウイルス性肝炎に対する院内感染防止対策は、2000年よりおおむね改善が認められ、肝炎ウイルスマーカーの陽性率の減少も認められた。しかし、まだ、すべての施設で院内感染防止体制が整備されていないこと、ウイルス性肝炎の院内感染の原因となりうる危険な処置は根絶されていないこと、ヘパリンのプレフィルド化が遅れていることなど、改善する余地が残っており、改訂された透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアルの周知徹底が必要である。また、透析患者のウイルス性肝炎の診療は確立された指針はなく、十分とはいえない。今後、透析患者のウイルス性肝炎の診療ガイドラインの策定が望まれる。

謝辞：多忙な中、アンケートにご回答いただいた透析施設の方々に深謝いたします。

本研究は厚生労働省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）透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究（主任研究者秋葉隆）の一環として行った。

#### 文献

- 1) 秋葉 隆, 山崎親雄, 秋澤忠男, 佐藤千史, 吉澤浩司: 血液透析療法における院内感染防止対策の現況. 透析会誌 33: 1303-1312, 2000
- 2) 日本透析医学会統計調査委員会, 同小委員会: わが国の慢性透析療法の現況 (2007年12月31日現在).
- 3) 鶴田良成, 渡邊有三, 山崎親雄, 前田憲志: 愛知県の透析施設におけるB型およびC型肝炎ウイルス感染の状況 (第2報) —愛知県透析医会共同研究—. 日本透析医会雑誌 17: 422-432, 2002
- 4) 平成19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「透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究」透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル (三訂版), 2008
- 5) 稲葉洋子, 斎藤雅文, 西岡正登, 吉矢邦彦, 宮崎哲夫, 吾妻眞幸, 山梨利顕, 足立陽子, 申 曾洙, 寺杣一徳, 宮本 孝: 兵庫県透析医会施設における感染対策と危機管理の実態調査 —平成15および18年のアンケート結果の比較—. 透析会誌 40: 889-895, 2007
- 6) 秋葉 隆: 透析医療における感染症とは, 透析医療における感染症予防・治療マニュアル, 秋葉 隆 編集, pp15-19, 日本メディカルセンター, 東京, 2005
- 7) Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C: Prognosis of anti-hepatitis C virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. J Am Soc Nephrol 11: 1896-1902, 2000
- 8) Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, Komiya Y, Mizui M, Yamanaka R, Suzuki K, Miyakawa Y, Yoshizawa H: 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: 32-40, 2004
- 9) Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5005.pdf>
- 10) Kidney Disease Improving Global Outcomes. KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of Hepatitis C in chronic kidney disease. Kidney Int 73 (Suppl 109): S1-S99, 2008
- 11) Good practice guidelines for renal dialysis/Transmission units prevention and control of blood-borne virus infection. <http://www.dh.gov.uk/PublicationsAndStatistics/>

- Publications/PublicationsPolicyAnd
- 12) Jadoul M, Gillespie B, Hedderwick SA, Rayner HC, Greenwood RM, Akiba T, Young EW : Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents : The DOPPS. *Kidney Int* 65 : 2335-2342, 2004
  - 13) Shamshirsaz AA, Kamgar M, Bekheirnia WR, Ayazi F, Hashemi SR, Bouzari M, Habibzadeh WR, Pourzahedgilani N, Broumand V, Shamshirsaz AA, Moradi M, Borghei M, Haghighi NN, Broumand B : The role of hemodialysis machines dedication in reducing Hepatitis C transmission in the dialysis setting in Iran : A multicenter prospective interventional study. *BMC Nephrol* 5 : 13-17, 2004
  - 14) 藤元昭一, 久永修一, 中山 健 : 宮崎市 C 型肝炎院内感染発生に関する報告. *透析医会誌* 20 : 424-433, 2006
  - 15) Girndt M, Köhler H : Hepatitis B virus infection in hemodialysis patients. *Semin Nephrol* 22 : 340-350, 2002
  - 16) Fabrizi F, Dixit V, Messa P, Martin P : Interferon monotherapy of chronic hepatitis C in dialysis patients : meta-analysis of clinical trials. *J Viral Hepat* 15 : 79-88, 2008
  - 17) Gordon CE, Uhlig K, Lau J, Schmid CH, Levey AS, Wong JB : Interferon treatment in hemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection : a systematic review of the literature and meta-analysis of treatment efficacy and harms. *Am J Kidney Dis* 51 : 263-277, 2008



# Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of CD44 Splicing Variant 6

Yasuteru Kondo,<sup>1,2</sup> Keigo Machida,<sup>1</sup> Helene Minyi Liu,<sup>1</sup> Yoshiyuki Ueno,<sup>2</sup> Koju Kobayashi,<sup>2</sup> Takaji Wakita,<sup>3</sup> Tooru Shimosegawa,<sup>2</sup> and Michael M. C. Lai<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Microbiology and Immunology, University of Southern California Keck School of Medicine, Los Angeles; <sup>2</sup>Division of Gastroenterology, Tohoku University, Sendai City, and <sup>3</sup>National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, and <sup>5</sup>National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

**Background.** A lymphotropic hepatitis C virus strain (HCV, SB strain, hereafter “SB-HCV”) has been shown to infect established T cell lines (Molt-4 and Jurkat) and primary human naive CD4<sup>+</sup> T cells. During T cell development and activation, transient expression of CD44 splicing variant 6 (CD44v6) plays a significant role.

**Methods.** SB-HCV was used to infect Molt-4 cells, and their cellular proliferation and CD44 expression was examined.

**Results.** SB-HCV-infected Molt-4 cells expressed a significantly lower level of the CD44v6 isoform. The infected cells could be divided into 2 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) groups, CFSE-high (indicating low proliferation activity; 34.2% of the cells) and CFSE-low (indicating high proliferation activity; 62.5% of the cells), whereas uninfected cells consisted of only a CFSE-low population. Of the CFSE-high cells, 82.4% were positive for the HCV protein NS5A, whereas only 1.2% of the CFSE-low cells were positive for this protein. Among the HCV proteins, NS5A alone caused the down-regulation of CD44v6 expression. After cells were stimulated with phorbol myristate acetate, the amount of phosphorylated mitogen-activated protein (MAP) kinase was significantly reduced in CFSE-high, SB-HCV-infected Molt-4 cells. After Fas ligand stimulation, SB-HCV-infected Molt-4 cells had increased cleavage of caspase 8 and 3 and enhanced apoptosis, compared with the rates of cleavage and apoptosis in control groups, indicating that SB-HCV infection increased Fas-mediated apoptosis.

**Conclusion.** HCV replication in T cells suppresses cellular proliferation and enhances susceptibility to Fas signaling by inhibiting CD44v6 signaling and expression.

Hepatitis C virus (HCV) infects about 170 million people worldwide and is a major cause of chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. HCV infection is often persistent and cellular immune response to HCV plays an important role in the pathogenesis of chronic hepatitis, cirrhosis, and HCC [2]. Several mechanisms have been proposed for the failure of

HCV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell response during HCV infection; these include deletion, anergy, cytotoxic T lymphocyte exhaustion, and suppression via regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and interleukin-10 (IL-10)-secreting regulatory CD8<sup>+</sup> T cells [3, 4].

Previously we have shown that a strain of HCV (strain SB, hereafter “SB-HCV”) can infect and replicate in not only B cells but also T cells as well, and that HCV replication in T cells can inhibit signaling by interferon- $\gamma$ , signal transducer and activator of transcription factor 1 (STAT-1), and T-bet signaling of T cells [5]. However, the replication activity of SB-HCV in T cells is weaker than that in B cells, suggesting that the lymphotropic SB-HCV might preferentially replicate in B cells but nevertheless affect T cell development in local lymph nodes. In particular, among CD4<sup>+</sup> cells, CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells are the most susceptible to HCV

Received 2 July 2008; accepted 23 September 2008; electronically published 21 January 2009.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: National Institutes of Health (research grants AI40038 to M.M.C.L. and CA108302 to M.M.C.L.).

Reprints or correspondence: Michael M. C. Lai, 2011 Zonal Ave. HMR500, Los Angeles, CA 90033 (michlai@usc.edu).

The Journal of Infectious Diseases 2009; 199:726–36

© 2009 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2009/19905-0018\$15.00

DOI: 10.1086/596739



infection [5]. It is known that during the activation that shifts T cells from naive to effector cells, T cells have to survive activation-induced cell death (AICD), which may contribute to the maintenance of an appropriate level of immune response. Fas–Fas ligand signaling is thought to be one of the mechanisms of AICD [6, 7].

There are several splicing variants of the immune molecules in T cells that contribute to proper immune response [8]. We have reported that SB-HCV could replicate in T cells during different temporal periods [5]. Therefore, we focused on CD44 splicing variants because the temporal regulation of alternative CD44 splicing in T lymphocytes plays a significant role in the maintenance of appropriate T cell development [8]. The CD44 family of transmembrane glycoproteins is present on a wide variety of cell types, including lymphocytes, neutrophils, endothelial cells, and fibroblasts [9, 10]. CD44 molecules display a multitude of functions involving a large array of signal transduction pathways, and CD44 is expressed into multiple splicing variants [11, 12]. During T cell development and activation, transient expression of CD44 splicing variant 6 (CD44v6) plays a significant role [13, 14]. The expression of CD44v6 provides a proliferative stimulus for T cells independent of the T cell receptor (TCR)–CD3 complex. Proliferative activity is accompanied by activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [15]. Moreover, CD44v6 expression could interfere with Fas signaling [16].

Recently, the roles of individual HCV proteins have been studied extensively by using HCV-producing hepatocyte cell lines and the replicon system [17–21]. The processing of the HCV precursor polyprotein requires both host and viral proteases to produce structural and nonstructural proteins. Among the nonstructural proteins, NS5A interacts with a number of cellular proteins and may interfere with host cell signaling pathways [22, 23]. Several authors have reported that NS5A can inhibit the extracellular signal-regulated kinase (ERK)–MAPK pathway; however, several other HCV proteins, such as HCV core protein, have been reported to enhance this pathway [24, 25]. The mechanism of CD44v6 inclusion is still not clear, although it is known that the events upstream of this inclusion mechanism may include Ras-ERK activation [8, 26, 27]. Thus, HCV replication in T cells may affect proliferation and Fas-mediated apoptosis of T cells by altering CD44v6 expression or MAPK activation. During T cell development, T cells undergo vigorous proliferative activity which might facilitate HCV replication in T cells. However, extensive proliferation of HCV in T cells might interfere with proper T cell development.

Previously, our reports have indicated that SB-HCV, which was produced from an HCV-positive B-cell lymphoma cell line (SB cells), can infect and replicate in established B cell lines (Raji and Daudi), established T cell lines (Molt-4 and Jurkat), and primary lymphocytes [5, 28, 29]. HCV infection of these immune cells conceivably can perturb their functions. This study was conducted to analyze whether HCV replication in T lymphocytes

might affect the proliferative activity and apoptosis of T cells as a result of signaling changes and aberrant expression of CD44 variants.

## MATERIALS AND METHODS

**Culture of cell lines.** SB cells, which continuously produce infectious HCV particles, were originally cultured from splenocytes obtained from an HCV-infected patient with type 2 mixed cryoglobulinemia and monocytoid B-cell lymphoma [29]. The cells were maintained in standard RPMI 1640 (Invitrogen) medium that contained 20% fetal bovine serum (FBS) without any supplement. Huh7.5 cells, which were kindly provided by C.M. Rice (Laboratory of Virology and Infectious Disease, Center for the Study of Hepatitis C, The Rockefeller University), were cultured at 37° C in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% FBS.

**In vitro infection of Molt-4 and primary naive (CD45RA - CD45RO ) CD4 cells.** SB cell culture supernatant (5 mL), which contained  $2.2 \times 10^4$  copies/mL of HCV RNA, was used to infect Molt-4 and human naive CD4 cells ( $1 \times 10^5$  cells). Control cells infected with UV-irradiated SB cell culture supernatant (hereafter, "UV-SB-HCV-infected cells") were included in every experiment. Supernatant from Huh7.5 cells transfected with JFH-1 strains [19, 20, 30] at 10 days after transfection were used for several control experiments. Cells were washed 3 times at 5 days after infection. A portion of the cells ( $3 \times 10^5$ – $5 \times 10^5$  cells) was then harvested for analysis; the remaining cells ( $1 \times 10^5$  cells) were kept and incubated further.

**Strand-specific intracellular SB-HCV RNA detection and quantitative SB-HCV RNA detection in the culture supernatant.** Strand-specific intracellular SB-HCV RNA was detected by using a recently established procedure that combined methods published elsewhere [31, 32], with minor modifications [5]. Positive strand-specific and negative strand-specific SB-HCV RNA were detected by use of a nested polymerase chain reaction (PCR) method.

To quantify SB-HCV RNA in the culture supernatant, SB-HCV RNA extraction from culture supernatant (140  $\mu$ L) was carried out with QIAmp Viral RNA Minikit (Qiagen). Amplification was performed in 20- $\mu$ L reaction mixtures that contained AmpliTaq Gold DNA polymerase and optimized buffer (TaqMan Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems) with the ABI prism 7900 sequence detector system. Forward primer (300 nmol/L, nucleotide 215–197, (5'-TCCCGGGAGAGCCATAGTG-3')); reverse primer (600 nmol/L, nucleotide 158–140, (5'-TCCAAGAAAGGACCCRG-3')); and 250 nmol/L TaqMan minor-groove-binding (MGB) probe labeled with 6-carboxy-fluorescein, nucleotide 195–181, (5'-FAM-TCTGCGGAACCGGTG-MGB-3') were also included in the PCR mix reaction. In vitro-transcribed full-length HCV RNA was used as a standard.



**Analysis of standard CD44 (CD44s) mRNA and variant mRNA.** Cells were collected sequentially at various time points after addition of phorbol myristate acetate (PMA) or anti-CD3 antibody. After extraction of total RNA and a reverse-transcriptase procedure, real-time PCR and semiquantitative PCR were carried out. Real-time PCR analysis was performed in accordance with methods described elsewhere, with minor modifications [33, 34]. Forward primer for CD44s (5'-CAACTCCATCTGTGCAGCAA-3'), CD44v3 (5'-GCAGGCTGGGAGCCAAAT-3'), and CD44v6 (5'-GCAACTCCTAGTAGTAC AACGGAAGA-3'); reverse primer for CD44s (5'-CAACTCCATCTGTGCAGCAA-3'), CD44v3 (5'-TCATCAATGCCTGATCCAGAAA-3'), and CD44v6 (5'-CGATATCCCTCATGCCATCTGA-3'); and probe for CD44s (5'-FAM-CATATTGCTTCAATGCTTCAGCTCCACCTC-TAMRA-3'), CD44v3 (5'-FAM-AGGTGTCTGTCTCTTTCATCTTCAT-TAMRA-3'), and CD44v6 (5'-FAM-ACAGCTACCCAGAAGGAACAGTGGTTTGG-TAMRA-3') were used for analysis. Semiquantified analysis was carried out by use of primers and cycles described elsewhere [27].

**Staining of surface CD44s and variants.** The surface expression of CD44s and the variants was analyzed by immunofluorescence labeling. Nonspecific binding was blocked by using PBS containing 1% bovine serum albumin. Cells were incubated for 15 min with the primary antibody. Monoclonal anti-CD44s, anti-CD44v3, and anti-CD44v6 antibodies were all obtained from R&D Systems. Murine IgG2b, IgG2a, and IgG1 were applied as isotype controls. Cells were washed 3 times in PBS, then incubated for 15 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)- or allophycocyanin (APC)-conjugated goat anti-mouse IgG, followed by washing 3 times in PBS. Fluorescence was measured by use of a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson).

**Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining and sorting.** Cells were analyzed with the CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes). CFSE staining was carried out at 5 days after infection; the cell staining methods used were in accordance with the manufacturer's protocol. Stained cells were washed 3 times and incubated for an additional 10 days because our previous study showed that active HCV replication in T cells occurred during this period [5]. Cells were analyzed by use of flow cytometry with 488-nm excitation and emission filters.

**Immunoblotting analysis: MAPK signaling, Fas signaling, and immunoprecipitation (Western blot).** Proteins were resolved by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The membrane was incubated with anti-P44/42 MAP kinase, anti-phospho-P44/42 MAP kinase, anti-MAPK/ERK kinase (MEK) 1/2, anti-phospho-MEK 1/2, anti-phospho-cRaf, anti-caspase 8, or anti-caspase 3 antibodies (Cell Signaling) and then subjected to reaction with peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoreactivity was visualized with enhanced-chemiluminescence detection (Amersham Biosciences).

**Annexin V and propidium iodide (PI) staining.** Cells were stained with annexin V antibody and PI by use of an apoptosis detection kit (R&D systems). The staining methods used were in accordance with the manufacturer's protocol.

**Transfection of HCV individual protein expression plasmids.** The various expression plasmids were constructed by inserting HCV core protein, E1, E2, NS3, NS4B, NS5A, and NS5B cDNA of genotype 1a [35] behind the cytomegalovirus virus immediate-early promoter in pCDNA3.1 (Invitrogen). Molt-4 cells were transfected by use of the Gene Pulser II (Bio-Rad), and various plasmids were purified by using the EndFree plasmid kit (QIAGEN). Viable transfected cells were isolated by Ficoll-Paque centrifugation (Amersham Biosciences) at 24 h after transfection.

**Confocal laser microscopy.** Molt-4 cells ( $3 \times 10^6$  cells/mL) in suspension were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences) at 4°C for 25 min. The cells were then washed 2 times in BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and resuspended in 50  $\mu$ L of BD Perm/Wash buffer containing pre-conjugated polyclonal anti-NS5A antibody (Bioscience International) with an FITC-conjugated anti-mouse antibody.

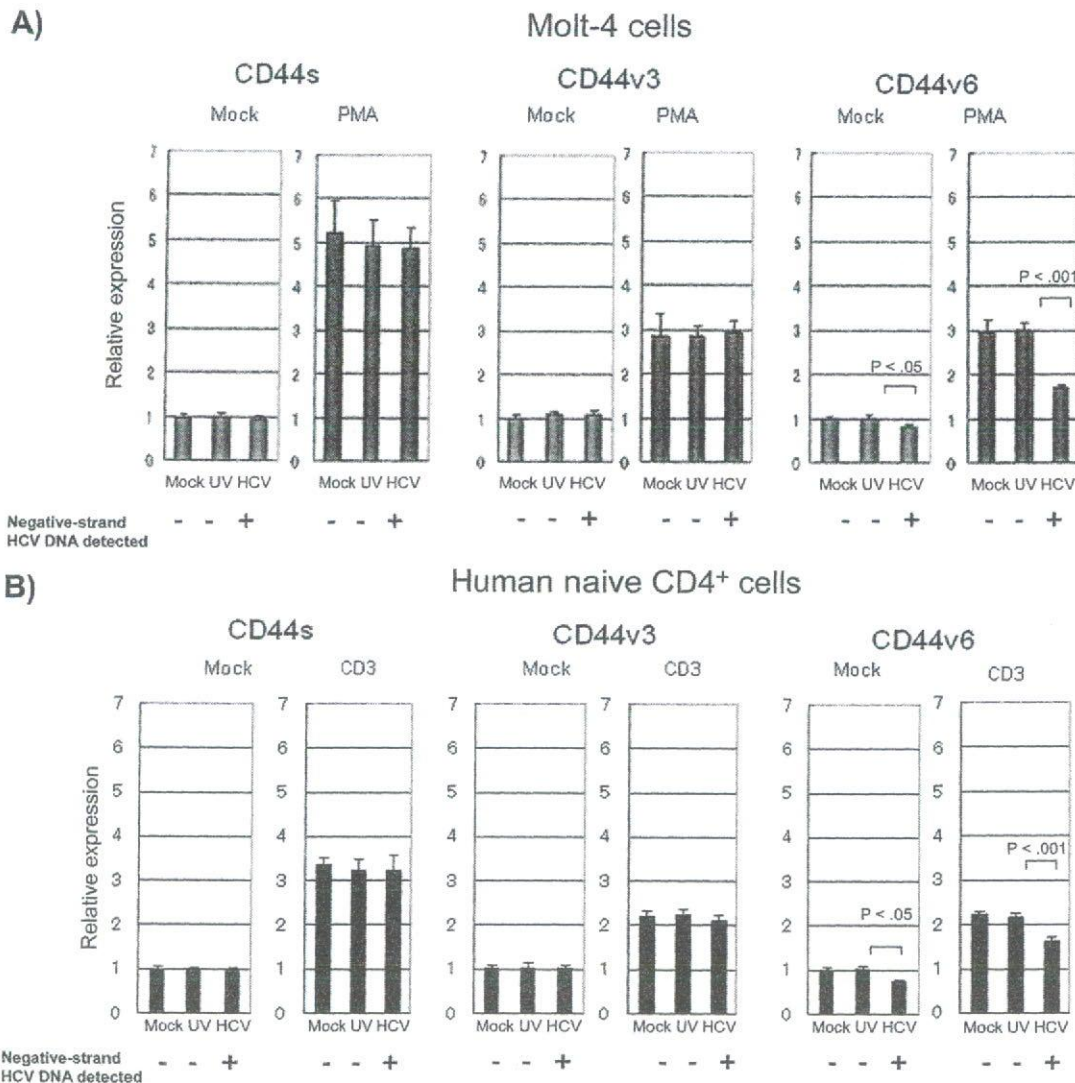
**Isolation of naive CD4 T cells and culture conditions.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Paque centrifugation (Amersham Biosciences). Anti-CD3 (phycoerythrin [PE] labeled), anti-CD4 (PE-Cy3 labeled), anti-CD45RO (PE labeled), and anti-CD45RA (FITC labeled) antibodies (BD Pharmingen) were used in separating different kinds of mononuclear cells with a FACSVantage flow cytometry cell sorter (BD).

**Statistical analysis.** Statistical analysis of the data for figures 1A, 2A, and 3A was performed by independent-sample *t* test in SPSS (version 10.0; SPSS). *P* values  $\leq .05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

**Suppression of CD44v6 mRNA, but not CD44s or CD44v3-mRNA, and its surface protein expression in SB-HCV-infected Molt-4 cells.** Our group has previously reported that SB-HCV [29] can infect and replicate in established B cell lines (Raji and Daudi), T cell lines (Molt-4 and Jurkat), and primary lymphocytes [5]. We also reported that SB-HCV infection can affect the signaling and biological functions of B cells [28, 36, 37]. We then proceeded to study whether SB-HCV infection could affect the functions of T cells. We first examined the expression of splicing variants CD44v3 and CD44v6, the latter of which is regarded as an important factor for T cell development and activation since Molt-4 cells can be used for the analysis of CD44v3 and CD44v6 after PMA stimulation. All the splicing variants of CD44 have previously been shown to be up-regulated by PMA stimulation, which mimics TCR stimulation [38].





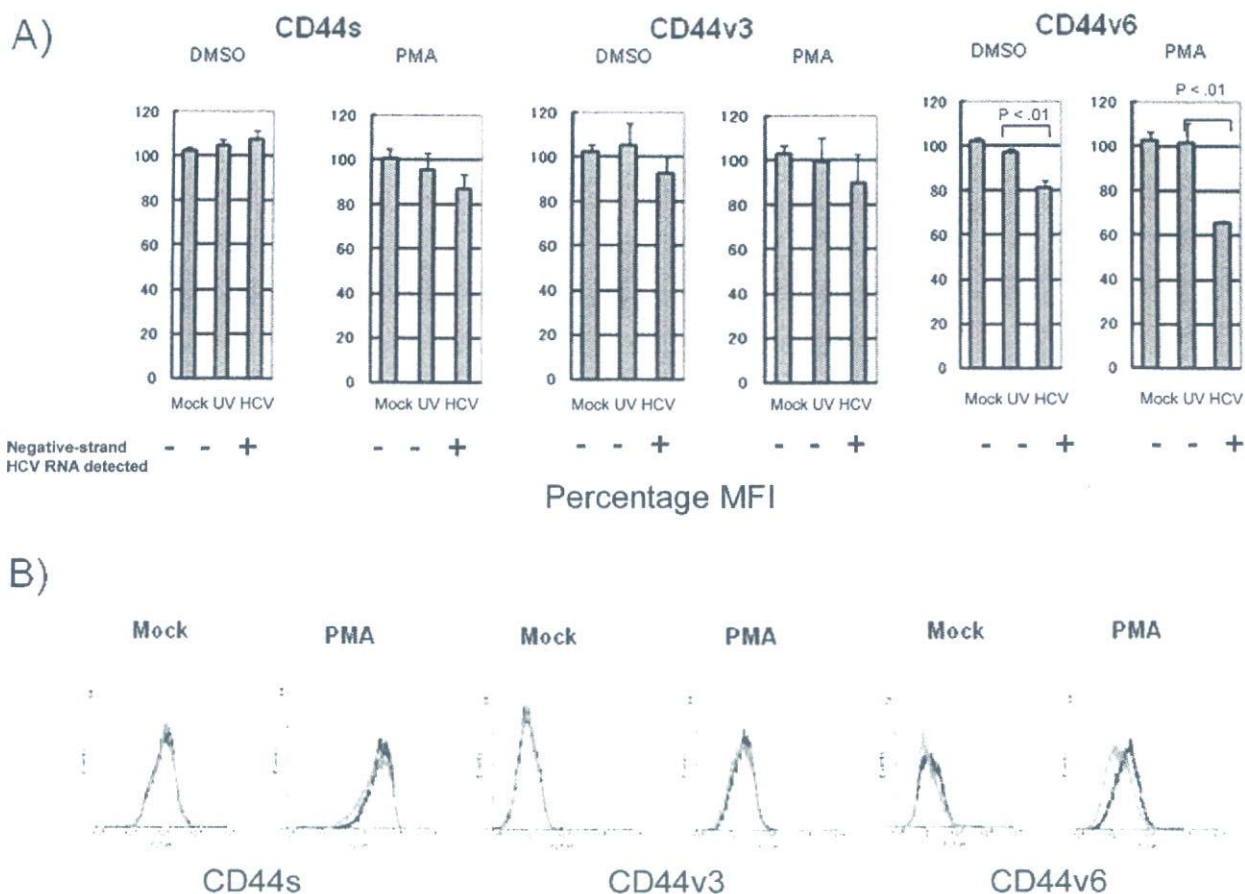
**Figure 1.** Quantification of standard CD44 (CD44s) mRNA as well as mRNA from splicing variants 3 and 6 (CD44v3 and CD44v6) in Molt-4 cells (A) and human CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> naive T cells (B) (samples obtained from 1 healthy subject). Quantification of CD44s, CD44v3, and CD44v6 mRNA with or without stimulation (phorbol myristate acetate [PMA] or anti-CD3 antibody [CD3]) was carried out by real-time polymerase chain reaction with comparative cycle threshold methods. Five independent experiments yielded similar results. Mock, mock-infected cells; HCV, cells infected with hepatitis C virus, strain SB; UV, cells infected with UV-irradiated hepatitis C virus, strain SB.

We first analyzed the time course of CD44s, CD44v3, and CD44v6 mRNA up-regulation in Molt-4 cells after PMA stimulation. We found that the expression of mRNA by these isoforms peaked at 8–12 h after stimulation, whereas the maximum up-regulation of surface expression of these CD44 variants was observed at 24 h after stimulation (data not shown). Therefore, to determine whether HCV could affect the expression of different splicing variants of CD44, we compared the expression level of these variants in cells that had been mock-infected, infected with UV-SB-HCV, or infected with SB-HCV; this comparison was performed at 8 h after activation for mRNA analysis and 24 h after activation for surface protein analysis. The status of HCV infection and replication was confirmed by detecting negative-strand HCV RNA by semiquantitative reverse-transcriptase

PCR (figure 4, which appears only in the electronic version of the *Journal*, and summarized in figure 1B).

All the CD44 variants examined showed a low level of mRNA expression, which was significantly increased after PMA stimulation (figure 1). We noted that CD44v6 mRNA expression in SB-HCV-infected Molt-4 cells was slightly but significantly lower than that observed in control groups, even without PMA stimulation ( $P = .05$ ), and this difference became more prominent after PMA stimulation ( $P = .001$ ) (figure 1). In contrast, the mRNA expression of CD44s and CD44v3 was not affected by HCV infection status. We further confirmed the suppression of CD44v6 mRNA by HCV infection in primary naive T cells (figure 1B). In this case, the primary CD4<sup>+</sup> cells were stimulated with anti-CD3 antibody, and the suppression of CD44v6 mRNA





**Figure 2.** Comparison of surface expression of standard CD44 (CD44s) and splicing variants 3 and 6 (CD44v3 and CD44v6) in Molt-4 cells. **A**, Comparison of mean fluorescence intensity (MFI) among the 3 groups with or without phorbol myristate acetate (PMA) stimulation was carried out with flow cytometry. The percentage MFI was calculated as follows: target mean fluorescence intensity divided by mean fluorescence intensity of mock-infected cells without PMA stimulation times 100. Three independent experiments yielded similar results. **B**, Fluorescence-activated cell sorter analyses of surface expression of different CD44 isoforms. *Red lines*, mock-infected Molt-4 cells; *black lines*, Molt-4 cells infected with UV-irradiated hepatitis C virus, strain SB (UV-SB-HCV); *green lines*, Molt-4 cells infected with SB-HCV.

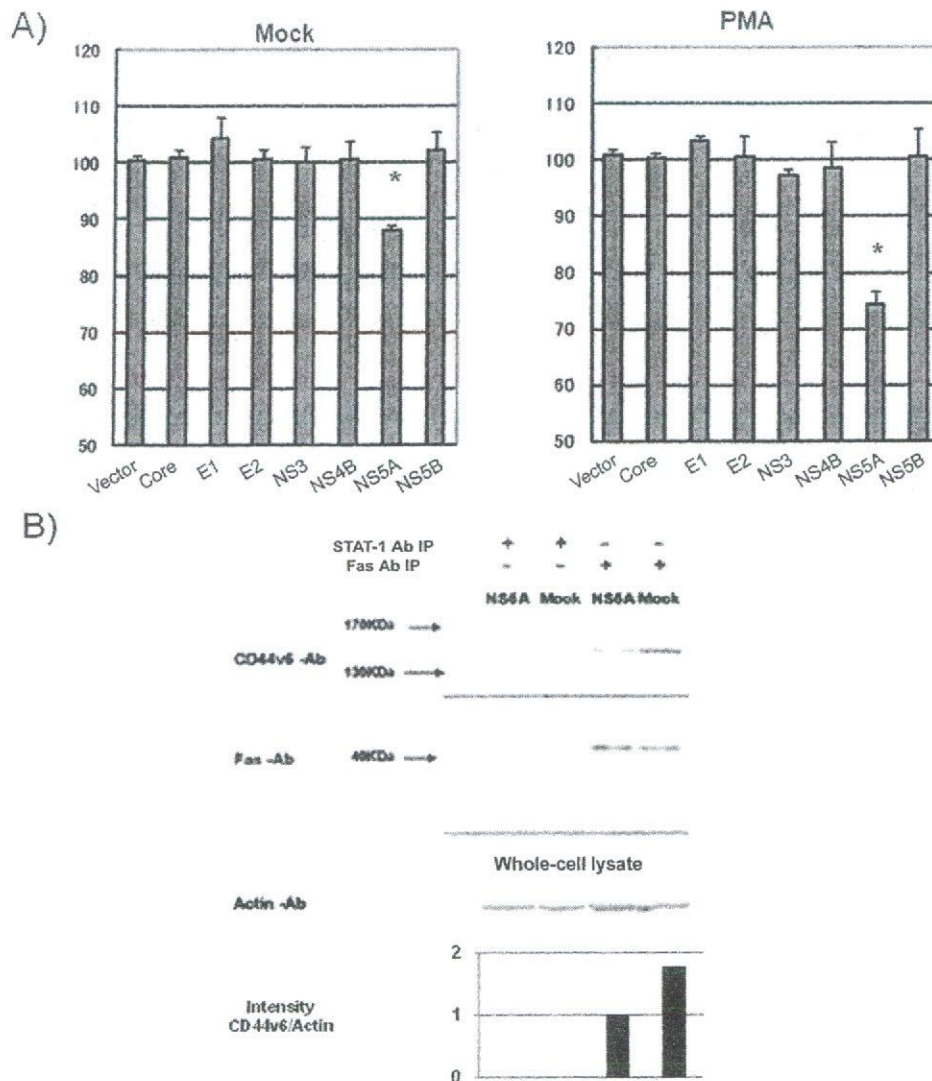
became more apparent after stimulation. Taken together, these data indicate that HCV replication in CD4 cells specifically suppressed CD44v6 mRNA inclusion.

To corroborate this finding, we then analyzed surface expression of CD44s, CD44v3, and CD44v6 among the 3 groups of cells (mock infected, UV-SB-HCV infected, and SB-HCV infected) (figure 2). The mean fluorescence intensity (MFI) of CD44v6 with or without PMA stimulation was significantly suppressed in SB-HCV-infected Molt-4 cells, compared with Molt-4 cells that had been mock infected or infected with UV-SB-HCV ( $P < .01$ ) (figure 2A). CD44s and CD44v3 also showed slightly lower levels of expression after PMA stimulation in HCV-infected cells; however, these differences were not statistically significant. The lower surface expression of CD44v6 in SB-HCV-infected cells was further confirmed by fluorescence-activated cell sorter analysis (figure 2B). These data suggested that SB-HCV infection of T cells caused down-regulation of CD44v6 and that HCV replication in T cells, not merely the binding of HCV to T cells, is required for this effect.

To further demonstrate that HCV replication was required for the down-regulation of CD44v6 expression in T cells, we used JFH-1 HCV [20] to infect Molt-4 cells. We have previously shown that JFH-1-HCV cannot infect or replicate in lymphocytes (Machida et al., unpublished data). Molt-4 cells infected with JFH-1 HCV and Molt-4 cells infected with UV-irradiated JFH-1 HCV showed no difference in mRNA or surface protein expression for CD44s, CD44v3, or CD44v6 (data not shown). Therefore, HCV replication might be necessary for the down-regulation of CD44v6 inclusion in T cells. However, we could not rule out the possibility that SB-HCV has a unique ability to down-regulate CD44v6 inclusion because we have so far only been able to use the SB strain to infect T cells.

**SB-HCV infection of T cells and decreased proliferation.** Since CD44v6 expression is associated with cellular proliferation, we analyzed the proliferative activity of SB-HCV-infected Molt-4 cells [15]. The results showed that SB-HCV-infected Molt-4 cells could be clearly separated into 2 groups (CFSE high





**Figure 3.** NS5A protein and suppression of CD44v6 in T cells. *A*, Effects of individual hepatitis C virus (HCV) proteins on surface expression of CD44 splicing variant 6 (CD44v6). Mean fluorescence intensity (MFI) of CD44v6 on Molt-4 cells transfected with individual HCV proteins was normalized by the MFI of CD44v6 on mock-infected Molt-4 cells. Five independent experiments yielded similar results. *B*, Coimmunoprecipitation of CD44v6 with Fas. Cell lysates were precipitated with anti-Fas antibody (Fas Ab) and detected by immunoblotting with different antibodies. Band intensity was analyzed with Image J (National Institutes of Health). The bar graph shows the relative intensity of CD44v6 and actin. Three independent experiments yielded similar results. IP, immunoprecipitation; STAT-1 Ab, anti-signal transducer and activator of transcription factor 1 antibody.

and CFSE low), which were sorted by use of a flow cytometry cell sorter (FACSVantage; Becton Dickinson), whereas mock-infected cells or cells infected with UV-SB-HCV formed only 1 group (figure 5A). The CFSE-high and CFSE-low groups were separated and analyzed for NS5A expression. The data showed that 82.4% of the CFSE-high group expressed NS5A protein,

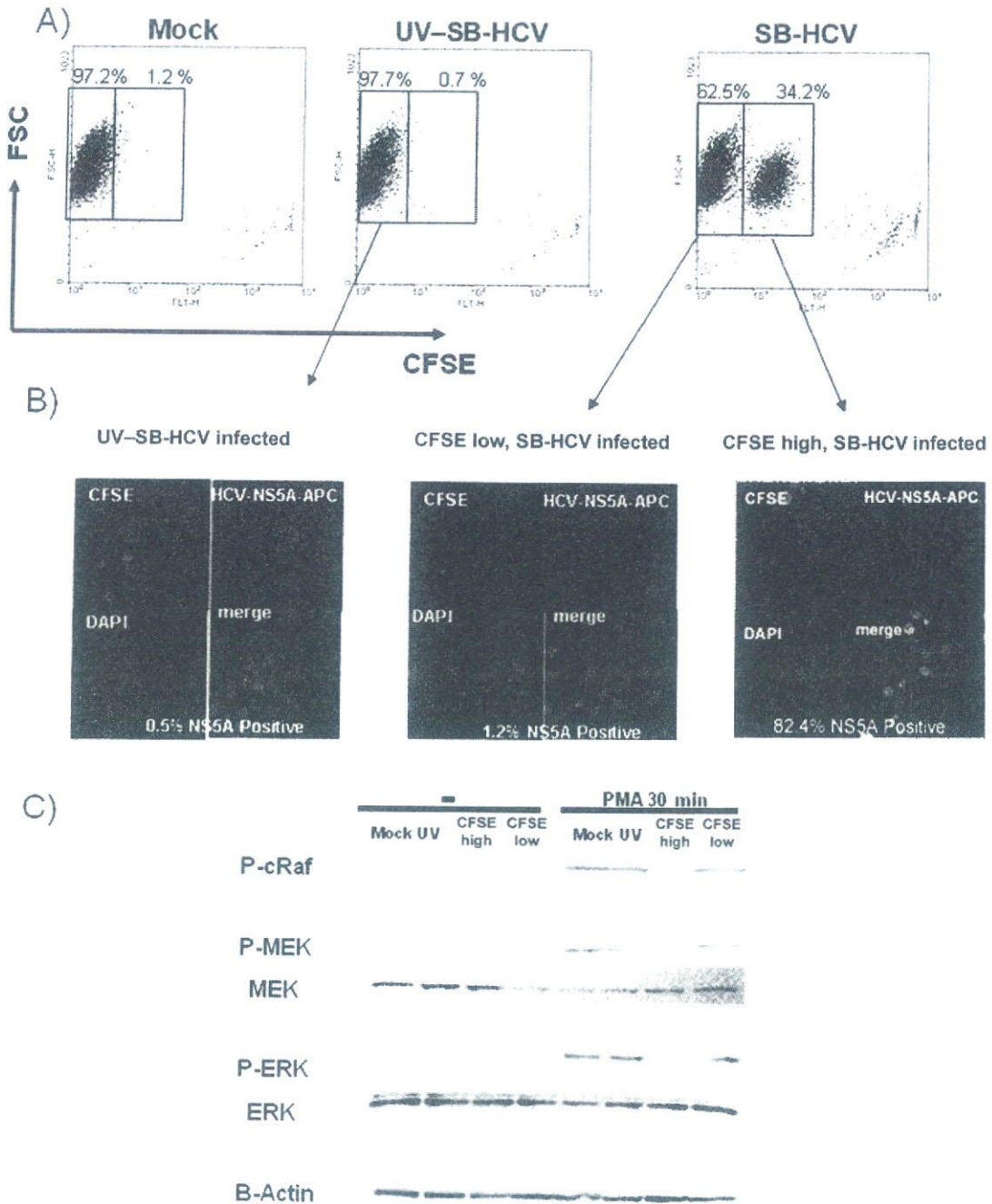
whereas only 1.2% of the CFSE-low group were positive for NS5A (figure 5B). These data indicated that most cells in the CFSE-high group (i.e., the slow-growing group) were infected with SB-HCV, whereas the uninfected cells were mostly fast growing. Therefore, SB-HCV infection suppressed the proliferation activity of Molt-4 cells.

*SB-HCV infection and suppression of Ras-MEK-ERK activation and CD44v6 up-regulation in T cells.* We next analyzed the Ras-MEK-ERK signaling that may induce proliferation-related genes, since it has been reported that this signaling is the upstream mechanism of CD44 variant inclusion and that CD44v6 can enhance this signaling, acting

The figure is available in its entirety in the online edition of the *Journal of Infectious Diseases*.

**Figure 4.** Detection of positive- and negative-strand hepatitis C virus, SB strain (SB-HCV), RNA by semiquantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction.



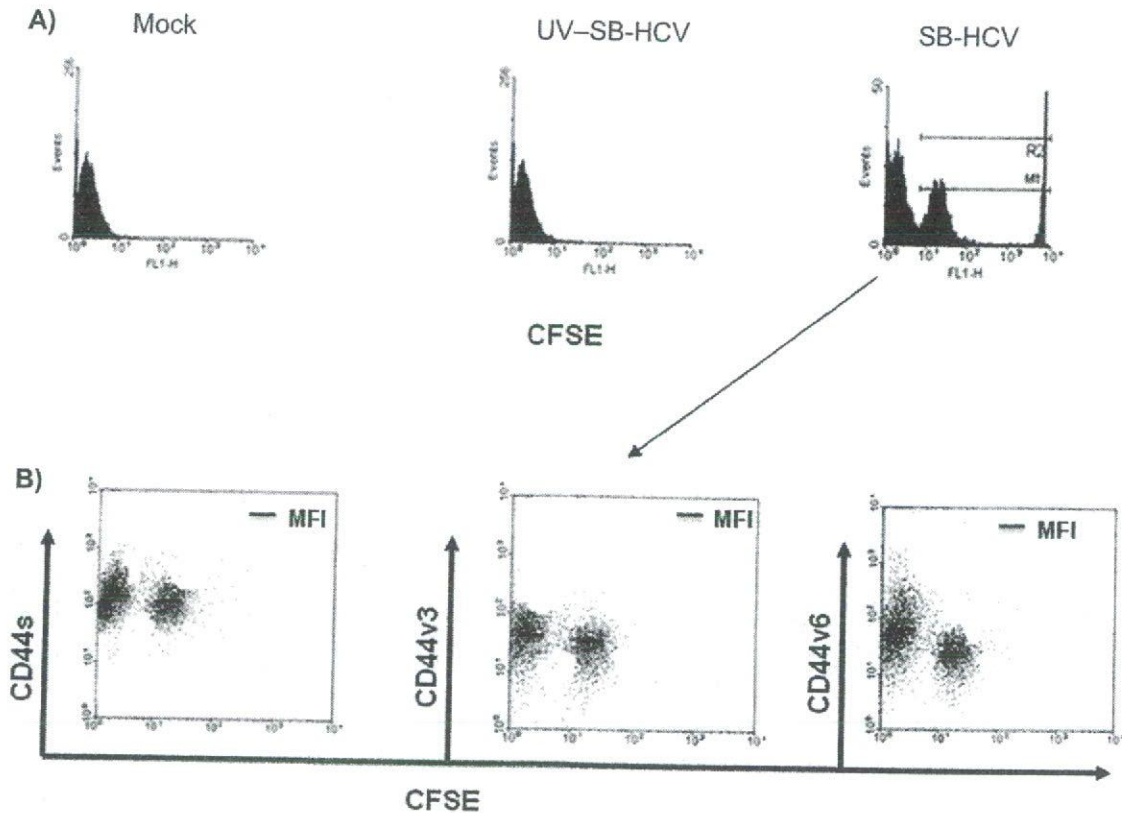


**Figure 5.** Effects of hepatitis C virus, strain SB (SB-HCV), infection on cell proliferation in Molt-4 cells. *A*, Representative fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of cell proliferation. *B*, Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-high and CFSE-low groups were separated by FACS analysis and analyzed for NS5A expression by immunofluorescence analysis. Green stain, CFSE; red stain, NS5A; blue stain, 4',6-diamidino-phenylindole dihydrochloride (DAPI). The percentage of infectivity was determined by counting numbers of positively stained cells per 400 cells. For the negative control, cells treated with UV-irradiated HCV and detection antibody alone were used. *C*, Analysis of Ras/mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling. For details about immunoblotting analysis, see Methods. Three independent experiments yielded similar results. FSC, forward scatter characteristics; P-cRaf, phospho-cRaf; P-ERK, phospho-ERK; P-MEK, phospho-MEK.

like a positive loop [27]. The CFSE-high group (i.e., the enriched SB-HCV-infected Molt-4 cells) showed significantly lower levels of phospho-cRaf, phospho-MEK, and phospho-ERK after PMA stimulation than did cells in the control

groups (mock-infected cells, cells infected with UV-SB-HCV, and cells in the CFSE-low group) (figure 5C). These data indicated that HCV replication in T cells suppressed the PMA-induced activation of Ras-MEK-ERK signaling.





**Figure 6.** Comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-low cells and CFSE-high cells (i.e., cells highly infected with hepatitis C virus, strain SB [SB-HCV]) with respect to expression of standard CD44 (CD44s) and the splicing variants 3 and 6 (CD44v3 and CD44v6). *A*, Representative graphs show CFSE intensity among mock-infected cells, cells infected with UV-irradiated SB-HCV (UV-SB-HCV), and cells infected with SB-HCV. *B*, CD44s and CD44v3 were only weakly suppressed in the SB-HCV-infected CFSE-high cells, compared with the CFSE-low group. Three independent experiments yielded similar results. MFI, mean fluorescence intensity.

We next carried out double staining analysis of CD44 variants and CFSE to further confirm the correlation between low CD44v6 expression and high CFSE staining. The result showed that the CFSE-high group (the cells infected with SB-HCV) had a significantly lower level of CD44v6 expression than did the cells in the CFSE-low group ( $P < .01$ ) (figure 6A). CD44s and CD44v3 were only weakly suppressed in the SB-HCV-infected CFSE-high cells, compared with the CFSE-low group (figure 6B).

**SB-HCV infection and enhanced Fas-dependent apoptosis by suppression of CD44v6.** We next analyzed Fas-mediated apoptosis because CD44v6 has been reported to cause suppression of Fas-mediated apoptosis [16]. Immunoblotting analysis showed that, after treatment with Fas ligand (FasL), Molt-4 cells infected with SB-HCV had a higher extent of cleavage of caspases 8 and 3 than did cells that had been mock infected or infected with UV-SB-HCV (figure 7A), whereas the surface expression levels of Fas and FasL were almost the same among the 3 groups (figure 7B). Moreover, pretreatment of cells with anti-CD44v6 antibody that could block the interaction of CD44v6 with Fas [15] eliminated the differences in caspase activation among the 3 groups (figure 7A). The number of early apoptotic cells, which

were represented as annexin V-positive, PI-negative cells, was significantly increased among the SB-HCV-infected Molt-4 cells after Fas stimulation (the percentage of early apoptotic cells in each group was as follows: mock infected, 29.8%; UV-SB-HCV infected cells, 29.6%; and SB-HCV infected cells, 41.3%) (figure 7C). These results indicated that SB-HCV infection caused suppression of the CD44v6 isoform, leading to the enhancement of Fas-mediated apoptosis.

**NS5A protein and suppression of CD44v6 in T cells.** To determine which viral protein was responsible for CD44v6 suppression, we expressed each HCV protein in Molt-4 cells and then studied its effects on CD44v6 expression. The transfection efficiency of each plasmid was ~50%, and cell viability after transfection was ~80% after purification by Ficoll-Paque centrifugation. The results showed that, among all the viral proteins, only NS5A could suppress CD44v6 significantly ( $P < .01$ ) (figure 3A). The NS5A-induced CD44v6 suppression was particularly evident after PMA stimulation. Immunoprecipitation by Western blot analysis showed that CD44v6 could coprecipitate with Fas, and the amount of CD44v6-associated Fas was reduced in NS5A-expressing Molt-4 cells, compared with Molt-4 cells without NS5A (figure 3B). As a control, STAT-1 antibody did not coprecipitate CD44v6.