

株についてウイルス学的特徴を検討した。

既存の 1.24 倍長 HBV/Ce wild clone に対して、I126S アミノ酸変異、G145R アミノ酸変異、更には I126S+G145R アミノ酸変異を惹き起こす point mutation をそれぞれ挿入した HBV 複製モデルを作成した。この HBV 複製モデルを Huh7 細胞株に transfection させ、3 日後に培養上清、培養細胞を回収し、それらを用いてウイルス複製や HBs 抗原発現量などについて比較検討した。

(3) 不死化ヒト肝細胞を用いた三次元培養系における感染実験と抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG)による感染防御実験

不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2 細胞)を用いた新しい三次元培養系を開発し、この系における HBV 感染能や複製動態について検討した。HuS-E/2 細胞を中空系バンドルに注入し充填培養することで、tissue-like formation を形成させた(三次元培養系)。12 穴シャーレ内で作成した三次元培養系と 1.24 倍長 HBV ゲノム(HBV/Ce wild)を組み込んだプラスミドの遺伝子導入によって得られたウイルス粒子を培養した。培養上清中の HBV DNA 量や細胞内の cccDNA 量は real-time PCR により定量し、HBsAg や HBcrAg は CLEIA 法で測定した。

HBV 感染防御実験については、遺伝子導入により得られたウイルス粒子 (HBV/Ce wild)と抗 HBs 人免疫グロブリン(HBIG)を 37°C で 2 時間接触させた後、三次元培養を行い、培養上清中の HBV DNA 量を経時的に測定した。

### C. 研究結果

(1) Table 1 に HBsAg 陽性/HBsAb 陽性 23 例(A 群)と HBsAg 陽性/HBsAb 陰性 23 例(B 群)の

患者背景を示す。A 群は B 群と比較して、劇症肝炎または重症肝炎症例が有意に高率であった(43% vs. 0%;  $P < .001$ )。Table 2 に a 領域の変異株についてのまとめを示す。a 領域に変異を認めたのは AHB 患者全 46 例中 7 例(15%)であった。その 7 例のうち 6 例は A 群に認められ、1 例のみであった B 群と比較して有意に高率であった。全 7 例の変異のうち、エスケープミュータントとしての報告がある変異は 4 例 (126S or N; 3 例、145R; 1 例)であり、一方エスケープミュータントとしては過去に報告はされていないがアミノ酸 profile 変化を伴う変異は 3 例認められた。これらについて上記の各 2 群に分けて検討すると、アミノ酸 profile 変化を伴う変異については A 群 2 例、B 群 1 例と差は認められなかったが、エスケープミュータント変異については B 群では 1 例も認められなかったのに対して、A 群では 4 例(17%)に認められ、有意に高率であった。

(2) Table 3 に 4 種のクローン(HBV/Ce wild type, 126S mutant, 145R mutant, 126S+145R mutant)を Huh7 細胞に transfection して得られた培養上清中の HBsAg、HBeAg、HBcrAg 値と細胞中の HBcrAg 値の測定結果を示す。培養上清中の HBeAg、HBcrAg 値については 4 種のクローン間で大きな差を認めなかったが、HBsAg 値については 145R 変異を有する 2 種のクローン(145R mutant, 126S+145R mutant)において、他の 2 種類のクローン(HBV/Ce wild type, 126S mutant)と比較して明らかに低値であった。ウイルス複製については、細胞中の HBcrAg 量、Southern blot analysis 共に、145R 変異を有する 2 種類のクローンは HBV/Ce wild type、126S mutant と比較して 8 割程度の複製効率

を示す結果であった。

(3) Fig 1 に三次元培養系における培養上清中 HBVDNA レベルの推移を示す。HuS-E/2細胞単層培養においてはHBV接種3日目以降で急激に培養上清中 HBVDNA 量が減少したのに対して、3次元培養系では培養上清中のHBV DNA量はHBV感染から1ヶ月以上高値( $> 10^7$ copies/ml)を持続した。HBV/Ce wild type のウイルス粒子を三次元培養系に感染させた結果、Southern blot analysisにて細胞内でのHBVDNA複製が確認された。また細胞内のcccDNAレベルは単層培養と比較して三次元培養系で高値であった。同様に培養上清中のHBsAg、HBerAgレベルも3次元培養系の方が高値であった。Fig 2 にHBIGによる感染防御実験の結果を示す。三次元培養系に対してHBV/Ce wild type (約1000copies/mL)と各濃度のHBIGを投与したところ、HBIG30mlU/mL(抗体量約27.5 $\mu$ g/mL)以上の投与では培養上清中にHBVDNAを検出できなくなった。一方コントロールとして投与したIgG27.5 $\mu$ g/mL投与群では培養上清中にHBVDNAを検出した。

#### D. 考察

本邦においてHBワクチンは母親をスクリーニングしたうえでの選択的投与が行われているが、諸外国においてはuniversal vaccinationによるHBV感染予防が一般的である。しかし近年、universal vaccination施行国においてHBワクチンに対するHBワクチンエスケープミュータント(HBV-EM)の出現とその増加が問題となっている。また我が国においてもHBV感染前にanti-HBs陽性であった症例において、急性B型肝炎に感染し、感染ウイルスがHBV-EMであったこ

とが報告されている。また本邦においては垂直感染からのHBVキャリア数は減少したが、近年、水平感染によるAHBが増加傾向にあると報告されている。急性B型肝炎ではその経過においてHBsAg単独陽性の状況から最終的にHBsAg陰性/anti-HBs陽性という状況に推移していくため、anti-HBs陽性の段階ではuniversal vaccinationによる状況と同様にHBV-EMの出現が予想されるが、実際にHBV-EMがどのくらいの頻度で出現しているのかについての検討はほとんど報告がない。

このため、まず本邦の急性B型肝炎患者におけるHBV-EM出現率とその変異株の状態について検討した。年齢・性別をmatchさせたHBsAg陽性/HBsAb陽性AHB患者23例(A群)とHBsAg陽性/HBsAb陰性AHB患者23例(B群)での比較を行ったところ、HBsAb陽性であるA群において、HBV-EMやアミノ酸profileの変化を伴う変異がB群と比較して有意に高率に認められた。A群には劇症肝炎や重症肝炎といった症例が多く含まれていたことから、宿主側の強い免疫応答によってHBV-EM出現がより誘導されやすくなっていた可能性が示唆された。

次にこれらHBV-EMのウイルス学的特徴を検討するために、以前から我々が報告してきたHBVをクローン化しHuh7細胞にtransfectionさせる系を用いて、今回多く認められたHBV-EMである126I変異株と代表的なHBV-EMである145R変異株、更にはこれら2つの変異を有する126I/145R変異株を作成し検討した。この結果、145R変異を有する2つのクローン株においては、これらを有さない2つのクローン株(HBV/Ce wild type、126I変異株)と比較してSouthern



blot analysis でウイルス複製レベルが約 8 割と低下していたが、更に注目すべきは複製レベルの違い以上に培養上清中 HBsAg 値が他のクローンと比較して低下していたことであった。このことから共通抗原基 a 領域における 145R 変異が HBs 抗原の構造変化を惹き起こし、従来の HBsAg 検出系では検出を困難としている可能性が示唆された。これに関しては今後、Western blot analysis 等による HBsAg 発現レベルを確認する予定である。

上記の HBV-EM のウイルス学的特徴の結果を踏まえて、次に検討すべき点は HBV-EM の感染力や抗体による感染阻止力であると思われるが、これまで HBV の感染実験はチンパンジーなどの大型類人猿を用いるか、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いるといった *in vivo* 実験系しか使用できず、これが HBV 感染実験の妨げとなってきた。これに対し、我々は不死化したヒト肝細胞 (HuS-E/2 細胞) を三次元培養すると約 1 ヶ月間にわたって培養可能であることを見だし、これが HBV の感染実験、更には抗体による感染防御実験に使用可能ではないか検討した。HBV/Ce wild type クローンを用いた感染実験において、HuS-E/2 細胞の単層培養では感染 3 日以降で急激に培養上清中の HBVDNA 量が減少したのに対し、同細胞を三次元培養することで約 1 ヶ月間という長期にわたって HBVDNA 量が検出できることをまず確認した。また Southern blot analysis にて 3 次元培養系における HBV 複製についても確認した。続いて、臨床において HBV 感染防御に使用されている HBIG を用いた感染防御実験を試みた。この結果、コントロールとして使用した IgG27.5 $\mu$ g/mL

投与では培養上清中に HBVDNA を検出したのに対し、これと同量の抗体量である HBIG30mIU/mL(約 27.5 $\mu$ g/mL)を投与すると培養上清中に HBVDNA が検出できなくなることが確認され、感染防御の可能性が示唆された。現在、この三次元培養系を用いて、145R に代表される HBV-EM の感染能の確認や HBIG 等の抗体を使用しての感染防御実験を施行中である。また、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いての変異体の感染および感染防御に関する検討についても検討予定である。

## E. 結論

本邦の AHB 全 46 例中 7 例(15%)に HBs 抗原の a 領域に変異を認めた。HBV 複製モデルを用いた *in vitro* の検討において HBV の 145R 変異株では、野生株と比較してウイルス複製能のおよび培養上清中の HBsAg 値の低下を認めた。不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2) を用いた新規三次元培養システムでの HBV 感染の成立と、長期間の持続感染を認めており、感染防御実験及び薬剤感受性実験の可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka Y, Sugiyama M, Kurbanov F, Kusakabe A, Sugauchi F, Tatematsu K, Hijikata M, Shimotohno K, Alter HJ, Mizokami M. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for hepatitis B virus infection. 投稿中。

2. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsushashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y and Mizokami M. A Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. 投稿中.

3. Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, and Mizokami M. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. J Clin Microbiol. 投稿中.

4. 菅内文中, 溝上雅史. 核酸アナログ時代からみる HBV HBV 感染症の natural history up to date. 肝・胆・膵2008; 56巻5号 :665-669

5. 菅内文中, 溝上雅史. B 型肝炎治療 up to date B 型慢性肝炎 HBV 遺伝子型と治療効果; Mebio 2008 25 巻3号:60-65.

## 2. 学会発表

1. 松浦健太郎, 田中靖人, 日下部篤宣, 千田勝博, 坂本知行, 新海登, 宮木知克, 菅内文中, 野尻俊輔, 城卓志, 溝上雅史. わが国の慢性 B 型肝炎患者における HBV genotype 分布の変遷 全国 16 施設共同研究. 第 12 日本肝臓学会大会 2008 年 10 月 1 日—2 日 東京

2. Kurbanov F, 田中靖人, 坂本知行, 杉山真

也, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 菅内文中, 溝上雅史. ヒト肝細胞を有するキメラマウスにおける遺伝子型 H 重感染を示す B 型肝炎ウイルス遺伝子型 G の特性. 第 12 日本肝臓学会大会 2008 年 10 月 1 日—2 日 東京.

3. 日下部篤宣, 田中靖人, 杉山真也, 野尻俊輔, 菅内文中, 宮木知克, 坂本知行, 新海登, 千田勝博, 松浦健太郎, 土方誠, 下遠野邦忠, 城卓志, 溝上雅史. 新規 3 次元培養系を用いた HBV 感染防御実験の試み. 第 12 日本肝臓学会大会 2008 年 10 月 1 日—2 日 東京.

4. 坂本知行, 田中靖人, 杉山真也, Kurbanov F., 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 菅内文中, 城卓志, 溝上雅史. In vitro 複製モデルを用いた B 型肝炎ウイルス Genotype G 複製メカニズムの解明. 第 12 日本肝臓学会大会 2008 年 10 月 1 日—2 日 東京.

5. 田中靖人, 菅内文中, 向出雅一, 溝上雅史. B 型肝炎ウイルスの治療 B 型慢性肝炎に対するエンテカビル長期投与の有用性 (ワークショップ). 第 44 日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 5 日—6 日 愛媛

6. 田中靖人, 菅内文中, 溝上雅史. B 型慢性肝炎の治療戦略 エンテカビル長期投与による治療効果及び耐性変異出現パターン (ワークショップ). 日本消化器病学会総会 2008 年 5 月 8 日—10 日 福岡

7. Sugauchi F, Tanaka Y, Sakamoto T, Kusakabe A, Matsuura K, Sugiyama M, Nojiri S, Takashi J, Mizokami M. Influences of hepatitis B virus genotype and precore mutations on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
8. Sakamoto T, Tanaka Y, Sugiyama M, Kurbanov F, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism for the Dependence of Hepatitis B virus genotypes G on Coinfection with Other Genotypes for Viral Replication. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
9. Kusakabe A, Tanka Y, Yamaguchi T, Segawa H, Kurbanove F, Sugiyama M, Sugauchi F, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infectio. 59<sup>th</sup> American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
10. Sugauch F, Tanaka Y, Yatsuhashi H, Enomoto M, Sakamoto T, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype and X/core promoter/pre-S mutations in young-onset hepatocellular carcinoma. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Disease (APASL) March 23-26 Seoul Korea



Table 1: Anti-HBs 陽性急性 B 型肝炎患者と anti-HBs 陰性急性 B 型肝炎患者間の臨床背景

Features	HBsAg(+)/ anti-HBs (+)	HBsAg(+)/ anti-HBs (-)	P value
Number	23 cases	23 cases	Matched
Age (years)	39.3±11.0	39.0±14.0	Matched
Male	16 (70%)	16 (70%)	Matched
HBeAg positive	14 (61%)	23 (100%)	<.001
ALT (IU/L)	3521±1703	1773±1060	<.001
AST (IU/L)	2711±2118	1343±1194	<.05
T.Bil (mg/dL)	13.2±19.2	7.8±7.4	NS
PT (%)	58.3±48.1	81.2±17.9	<.05
HBVDNA (log copies/mL)	5.26±1.03	5.99±1.48	NS
HBV genotype			*:<.005
A:B:C:D	1 <sup>*</sup> :4:17 <sup>†</sup> :1	9 <sup>*</sup> :4:10 <sup>†</sup> :0	<sup>†</sup> :<.05
FH or ASH	10 (43%)	0 (0%)	<.001

Table 2: anti-HBs 陽性急性 B 型肝炎患者と anti-HBs 陰性急性 B 型肝炎患者間における共通抗原基'a'領域の変異株のまとめ

	HBsAg(+)/anti-HBs (+) (n = 23)	HBsAg(+)/anti-HBs (-) (n = 23)	Total (n = 46)	P value
Escape mutation	4 (17%)*	0 (0%)*	4 (9%)	* <.05
	126S or N : 3cases 145R : 1case			
Other mutation	2 (9%)	1 (4%)	3 (7%)	NS
Total	6 (26%)*	1 (4%)*	7 (15%)	* <.05

Escape mutation: T or I126S or N, G130N, K141E and G145R amino acid substitution which is reported as an escape mutation.

Other mutation: amino acid substitution which are associated with change of amino acid profile.

Table3: 4 種類のクローン間における培養上清あるいは細胞内の HBV マーカーの比較

	Supernatant		Intracellular	
	HBsAg (IU/mL)	HBcrAg (kU/mL)	HBeAg (IU/mL)	HBcrAg (kU/mL)
HBV/Ce wild type	71.9	4296	212.1	23943
126S mutant	76.3	5042	224.7	21543
145R mutant	3.9	4145	213.0	18088
126S+145R mutant	2.1	4639	220.4	17005

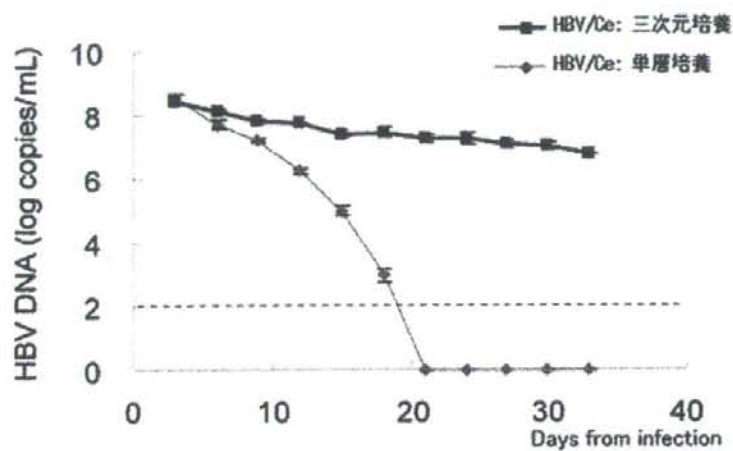


Figure 1. 三次元培養システムにおける培養上清中 HBVDNA レベルの推移

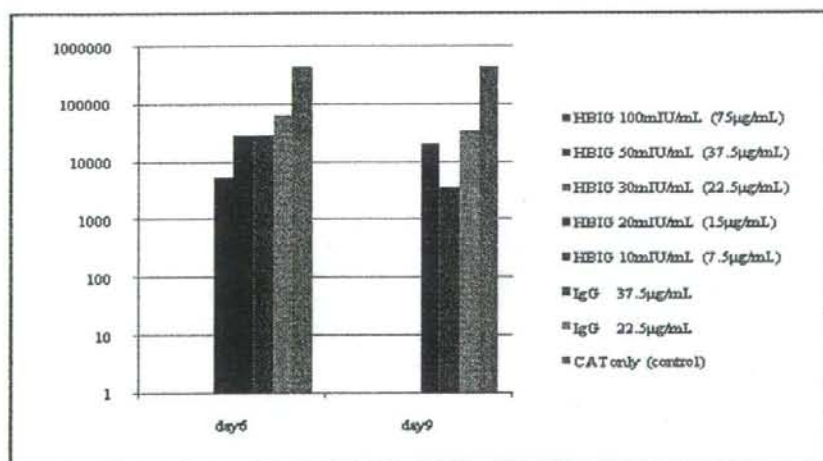


Figure 2. 抗体投与(HBIG)による HBV DNA 量(copies/ml)の変化

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小方則夫	医療従事者におけるB型肝炎ウイルス(HBV)・C型肝炎ウイルス(HCV)陽性血液曝露事故後の感染予防対策：国際標準との整合性確立に向けて。	伊藤庄平	労働者健康福祉機構・病院機能向上研究結果報告集	独立行政法人労働者健康福祉機構	川崎	2009	印刷中
岡部信彦・ 多屋馨子	B型肝炎		予防接種に関するQ&A集 2008	日本細菌製剤協会	東京	2008	101- 104

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
芹川武大, 田中憲一	新潟県内におけるB型肝炎母子感染防止対策の実際	日本産科婦人科学会新潟地方部会誌	99	15-18	2008
Tabuchi A, Tanaka J, Katayama K, Mizui M, Matsukura H, Yugi H, Shimada T, Miyakawa Y, Yoshizawa H.	Titration of hepatitis B virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV infection: transmission experiments to chimeric mice with human liver repopulated hepatocytes.	J Med Virol	80	2064-2068	2008
菅内文中, 溝上雅史	核酸アナログ時代からみるHBV: HBV感染症のnatural history up to date	肝・胆・膵	56	665-669	2008
菅内文中, 溝上雅史	B型肝炎治療up to date B型慢性肝炎 HBV遺伝子型と治療効果	Mebio	25	60-65	2008



# 11 B型肝炎

## 1. B型肝炎について

B型肝炎ウイルスは、ヒトの肝臓に慢性持続性感染を起こし、その内10～15%が慢性肝炎、肝細胞癌・肝硬変を発症することが知られています。感染は主にB型肝炎ウイルス保有者（キャリア）の血液で非経口的に汚染されることによって生じます。母親がB型肝炎ウイルス保有者である場合、妊娠中あるいは、多くは出産時に母親の血液によって胎児あるいは新生児がウイルスの感染を受けます（母子感染）。さらに、血液に接する機会が多い医療従事者などでは、針刺し事故（汚染事故）によって感染する場合があります。また、最近では性感染症のひとつとして重要視されています。海外では、同性愛者、麻薬常習者間での流行が知られています。

成人がウイルス感染を受けると、約30%の人が急性肝炎として発病します。その予後は一般に良好で、キャリアになる割合も母子感染に比べ低くなりますが、約2%は劇症肝炎となり、そのうち約70%は死亡します。近年、成人になってから感染してもキャリアになる割合の高いgenotypeが国内でも見つかるようになってきており、注意が必要です。感染症法に基づく感染症発生動向調査では、急性B型肝炎は5類感染症全数把握疾患のウイルス性肝炎の中に規定され、平成12年（2000）に425名、平成13年（2001）に330名、平成14年（2002）に332名、平成15年（2003）に245名、平成16年（2004）に241名、平成17年（2005）に209名、平成18年（2006）に228名が報告されています。性別は男性が約7割と多く、年齢は男性が20～30代にピークがあり、女性は20代にピークがあります。推定感染経路は、40%は不明であるものの、55%が性的接触による感染が推定されており、今後性感染症としての対策も必要と考えられます。

## 2. B型肝炎ワクチン

組換えB型肝炎ワクチン（HBワクチン）は、B型肝炎ウイルスDNAのHBs抗原に相当する部分を酵母菌や動物細胞などの遺伝子（DNA）に挿入し、培養することで、ワクチンの有効成分であるHBs抗原をつくり、免疫増強剤（アジュバント）としてアルミニウムゲルを加えて調製したものです。また、ヒト培養細胞huGK-14細胞株由来の沈降B型肝炎ワクチンは、HBs抗原は高産生するもののHBウイルスを産生しない細胞を分離・クローニングした細胞株に由来しており、培養上清中に分泌される抗原を精製し、同様にアルミニウムゲルに吸着させてワクチンとしたものです。

これまでの成績では、10%前後に軽度な倦怠感、頭痛、局所の腫脹、発赤、疼痛等の副反応が認められています。

## 3. 予防接種スケジュール

### ①一般的な感染予防スケジュール

通常、0.5mLずつを4週間隔で2回、さらに、20～24週を経過した後に1回0.5mLを皮下又は筋肉内に接種します。ただし、10歳未満の者には、0.25mLずつを同様の投与間隔で皮下に接種します。

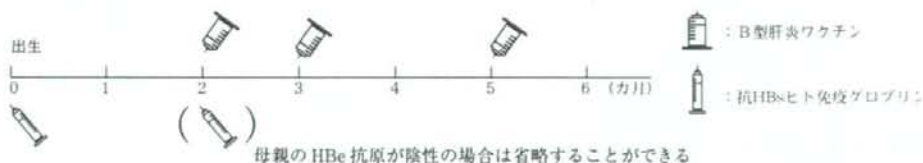
HBs抗体が獲得されていない場合にはさらに追加接種します。



## ②母子感染予防スケジュール（HBs抗原陽性の母親から生まれた小児に対する接種）

通常、0.25mLを1回、生後2～3カ月に皮下に接種します。さらに、0.25mLずつを初回接種の1カ月後及び3カ月後の2回、同様の用法で接種します。（健康保険適用あり）

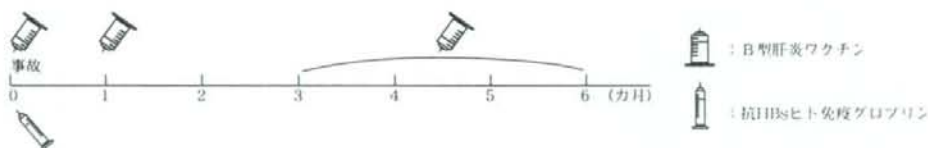
生後6カ月にHBs抗体が獲得されていない場合には、HBs抗原の検査を行い、陰性の場合には必要に応じてさらに追加接種します。なお、生後1カ月の時点でHBs抗原が陽性であった場合は以後の処置は行いません。



## ③汚染事故時の感染予防スケジュール

通常、0.5mLを1回、事故発生後7日以内に皮下または筋肉内に接種します。さらに、0.5mLずつを初回接種の1カ月後及び3～6カ月後の2回、同様の用法で接種します。なお、10歳未満の者には、0.25mLずつを同様の投与間隔で皮下に接種します。（労災保険、健康保険適用あり）

HBs抗体が獲得されていない場合にはさらに追加接種します。



Q1

通常3回が基本となっていますが、2回の接種で抗体が陽性になった場合、3回目は省略してもいいですか。

A

はじめてB型肝炎ワクチンを接種される場合は通常2回の接種では、抗体の上がり方が3回に比べて十分とはいえず、抗体の持続が望めません。3回目の接種によるブースター効果で抗体が急激に上昇しますので、医療関係者、海外長期滞在者等、長期にわたって抗体を持続させる必要のある方には是非とも3回の接種を勧めてください。

Q2

3回接種しても免疫応答が悪い人への対応を教えてください。

A

3回接種しても抗体ができない（免疫反応不応答者：non responder）の頻度は母子感染の場合は約4%、成人の場合は約10%とされています。何回まで追加接種すればいいという目安はありませんが、中には何回接種しても抗体陽転にならない人がいます。そのような場合は、それ以上のワクチン接種はせず、B型肝炎ウイルス曝露時には、HBIG（抗HBsヒト免疫グロブリン）で対応することになります。また、異なるメーカーのワクチンを用いることで免疫が獲得される場合もあると言われています。

Q3

3回接種後どのくらい経過したら追加接種が必要ですか。

A

3回の接種でHBs抗体ができて一生涯続くことはありません。血液を扱う医療関係者など感染のリスクが高い場合には、定期的に抗体検査を行って抗体の維持に努めた方がよいと考えられます。抗体陰性になった場合は、すみやかに1回追加接種することでブースター効果により抗体が上昇しますので、数年間免疫が維持されます。

Q4

汚染事故が起きた場合の対応の手順を教えてください。

A

HBs抗原陽性でかつHBe抗原陽性の血液で汚染を受けた場合、汚染された部分を流水でよく洗った後に、なるべく早く下表に従ってHBIG（抗HBsヒト免疫グロブリン）とワクチンの接種を行うことが必要です。業務上は労災保険、業務外は健康保険等が適用となります。

なお、適用はこれまで汚染源がHBs抗原陽性でかつHBe抗原陽性の血液とされてきましたが、平成16年（2004）4月から、HBe抗原が陰性であってもHBs抗原が陽性であれば労災保険を適用する旨の通知が出されました（平成16年3月30日付基労補発第0330001号厚生労働省労働基準局労災補償部補償課長通知）。ただし、健康保険の適用は汚染源がHBs抗原陽性でかつHBe抗原陽性の血液に限られます。また、HBワクチン接種既往者が汚染事故を受けた場合には、米国のACIP（予防接種諮問委員会）からの勧告が参考になります。

## 汚染事故後の対応

汚染血 汚染事故を受けた者	HBs抗原（+）	
	HBe抗原（+）	HBe抗原（-）
・HBワクチン未接種者 （HBs抗体-）	HBIG 5～10mL（成人）、 小児では0.16～0.24mL/kg筋注 HBワクチン 0.5mL （0，1，3～6カ月）	HBIG 5～10mL（成人）、 小児では0.16～0.24mL/kg

## 米国ACIPの勧告

汚染血 汚染事故を受けた者	HBs抗原（+）	HBs抗原不明
・HBワクチン既接種者 抗体陽転歴あり	まず抗体検査 抗体あり→処置不要 抗体なし→ワクチン1回追加	処置不要
・HBワクチン既接種者 抗体陽転歴なし	HBIG 2回又は HBIG 1回とワクチン1回	ハイリスクの血液であれば 抗原+の処置に準ずる
・HBワクチン既接種者	まず抗体検査	まず抗体検査

※抗体あり＝PHA法で抗体陽性、国際単位10mIU/mL以上



**Q5** 授乳中の母親にHBワクチン接種してもよいでしょうか。

**A** 母乳中にワクチンの成分が分泌されてもごく微量であり乳児に与える影響はないと考えられます。また母体にできた抗体が母乳中に移行することも考えられますが、乳児に対する効果は期待できません。授乳中の母親がHBワクチンを受けても乳児に問題があるとは考えられません。

**Q6** 妊婦へ接種してもよいでしょうか。

**A** 妊婦に対する安全性は確立していませんので、妊婦や妊娠している可能性のある人には接種しないのが原則ですが、妊婦であっても特別に感染のリスクが高い人は接種可能と考えられます。妊娠している女性が妊娠末期に罹患すれば、胎児への垂直感染も考えられるからです。このワクチンは不活化ワクチンですので、胎児への感染あるいは催奇形性はありませんが、自然流産が一定の頻度で認められる妊娠初期は、リスクを避ける意味でワクチン接種は避けた方がよいでしょう。

## 新潟県内におけるB型肝炎母子感染防止対策の実際

新潟大学医学部産科婦人科学教室

芹川 武大・田中 憲一

## 概 要

B型肝炎感染防止対策の実態を把握するため、新潟県において分娩取り扱い全55施設（診療所27、病院28）に対し、平成16年から18年までの3年間における分娩数やHBs抗原陽性妊婦数等についてのアンケート調査を実施した。アンケートは100%の回収率を得た。3年間における全分娩数は延べ58,025であり、うちHBs抗原陽性妊婦は延べ190人と、全体の約0.3%であった。また、HBs抗原陽性妊婦のうち43人（23%）がHBe抗原陽性であった。自施設内で実施されているHBs抗原検査方法は、ほとんどが検出感度の高いEIA（Enzyme Immuno Assay）/CLIA（Chemiluminescent Immuno Assay）/CLEIA（Chemiluminescent Enzyme Immuno Assay）法が採用されていた。HBs抗原陽性妊婦より出生した児に対しては、病院では直ちに自院小児科に対し、免疫グロブリン及びHBワクチン投与を依頼していた。一方、診療所では免疫グロブリンを自施設で投与していたが、1ヶ月健診以降は自施設でワクチン投与をする施設は少なく、2ヶ月目の免疫グロブリン及びHBワクチン、3ヶ月及び5ヶ月目でのHBワクチン投与は自施設以外の小児科に引き継がれていることがわかった。以上より、B型肝炎の母子感染予防のためには、産科から小児科への確実な連携が重要であることが示唆された。

## 緒 言

我が国におけるB型肝炎ウイルス（HBV）のキャリアは約150万人いると推定され、全人口の約1-2%に相当し、B型肝炎は国民病とも呼ばれている<sup>1)</sup>。B型肝炎の主な感染経路の1つに分娩時における母子感染があげられるが、1986年から開始されたB型肝炎母子感染防止事業により、児のキャリア化は大幅に減少した。米国のようなuniversal vaccinationが行われていない我が国において、全妊婦を対象としたHBs抗原検査によるハイリスク集団の検出は、それに引き続く新規キャリアの発生を抑制することに、大きく寄与してきた。しかしながら、完全に抑制されておらず、その一例として、不完全な予防処置によって感染した事例や、一方で正しくHBワクチンが投与されていたにもかかわらず、HBVキャリアとなってしまう、いわゆるescape mutant例も報告されている<sup>2)</sup>。また、現在母体のスクリーニングや児への免疫グロブリン及び

ワクチン投与は行われているが、1995年からは健康保険給付に移管された<sup>3)</sup> ことにより、それまで各地方自治体により把握された同事業実施状況が、その後の児の抗体獲得に関する情報などの追跡が十分に実施されていないのが現状である。

そこで、母子感染防止対策の現状を明らかにし、その後の児の抗体獲得率等を調査し、より適切な免疫的治療法の確立が必要であると考えられる。今回の検討では、まず産科領域でのB型肝炎母子感染防止対策の実際を明らかにすることを目的とし、新潟県内における分娩取り扱い全施設に対し、B型肝炎母子感染防止対策の実際についてアンケート調査を行い解析した。

## 研究方法

平成19年7月における、当院を含む新潟県内分娩取り扱い全55施設（27診療所、28病院）に対し、以下の項目等について平成16年から18年までの3年間における分娩に関してアンケート調査を実施した。アンケート内容の概要は、①HBVキャリア妊婦の実数及び全妊婦における割合、②予防的治療の実際、③児への治療の実際、④産科施設でのフォロー期間、などである。

## 結 果

## (1) アンケート回収率

分娩取り扱い全55施設すべてから有効回答を得た（回収率100%）。これらの施設における分娩数は平成16年19,265件、同17年18,781件、同18年19,979件と大きな変動はなかった。また病院と診療所に分娩件数はほぼ同数であった（図1）。

## (2) 妊娠中のHBs抗原検査時期

55施設全てにおいて、HBs抗原検査が行われてお

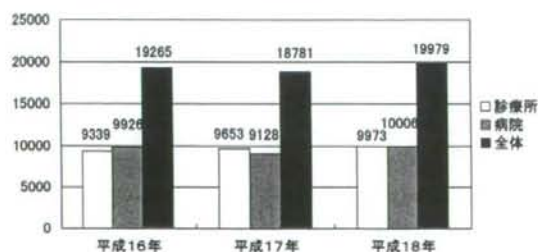


図1 3年間における分娩数

り、初診時3施設（5.5%）、分娩予定日決定時（妊娠8-12週頃）は50施設（90.9%）、妊娠中期以降が2施設（3.6%）であり、約9割の施設において、分娩予定日決定時（妊娠8-12週頃）に検査が実施されていた（図2）。

### (3) HBs抗原検査

病院では25施設（89.3%）の施設において自施設内でHBs抗原検査が実施されていたが、診療所では27全施設が外注検査であった（図3）。検査方法は、自施設で行っている病院では、イムノクロマト法が用いられていた1施設を除いた他は全て高感度測定法（EIA/CLIA/CLEIA法）であった（図4）。全妊婦におけるHBs抗原陽性妊婦の割合は、平成16年72人（0.37%）、同17年58人（0.31%）、同18年60人（0.30%）と概ね0.3%であり、従来言われている1.2%より遥かに低かった。また、病院と診療所では、診療所の方が割合は低かった（図5）。

### (4) HBe抗原検査

診療所では、HBs抗原同様全施設が外注検査であった。病院でも4施設（14.3%）のみが自施設で検査が実施されていた（図6）。なお診療所のうち3施設は、母体がHBs抗原陽性判明時に他の高次医療機関へ紹介していたため、HBe抗原検査は実施されていなかった。

HBs抗原陽性妊婦におけるHBe抗原陽性妊婦の割

合は、平成16年17人（23.6%）、同17年15人（25.9%）、同18年11人（18.3%）と約20%であった（図7）。

### (5) 新生児に対する治療

診療所では、20施設（83.3%）の施設が自施設において免疫グロブリンを出生直後に投与していた。一方病院では、18施設（64.2%）において自施設の小児科に免疫グロブリンの投与を依頼していた。また診療所では、2ヶ月、3ヶ月及び5ヶ月と引き続きワクチン投与をしていた施設が4施設（16.7%）あったが、病院では皆無であった（図8）。

小児科への引き継ぎ方法として、妊娠初期に他院へ紹介する3施設を除いた52施設中38施設（73.0%）で、診療情報提供書（紹介状）による引き継ぎが行われていたが、一部「母子手帳への記載」のみや「特になし」といった回答もあった（図9）。

### 考 察

現在、我が国における1年間の出生数は大凡100万人であり、新潟県内での総分娩数が約2万人（図1）であることから、新潟県単独においては総分娩数の約50分の1を占めていた。

母体におけるHBs抗原の検査時期は、妊娠8-12週頃といった予定日決定時に多かった（図2）。B型肝炎母子感染防止事業は、母子保健法第13条に規定する「妊産婦及び乳幼児に対する健康診査」に基づいて実施されており、母親が妊娠届を地方自治体に提出するこ

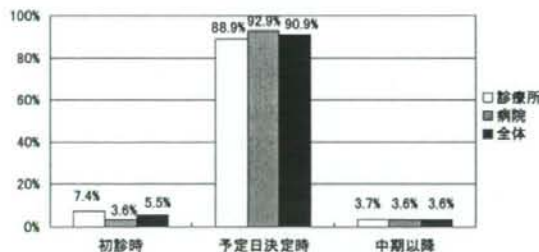


図2 HBs抗原の検査時期

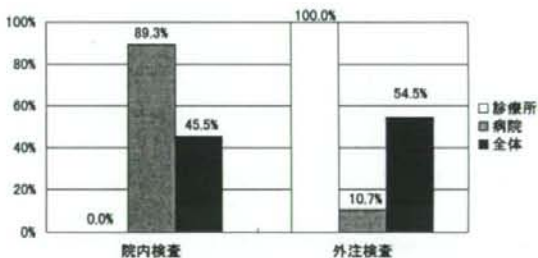


図3 HBs抗原検査

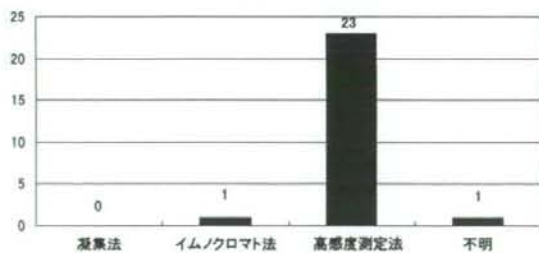


図4 HBs抗原検査方法

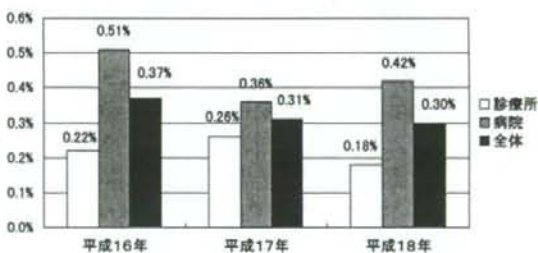


図5 HBs抗原陽性妊婦



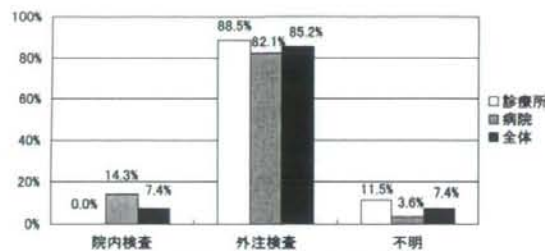


図6 HBs抗原検査

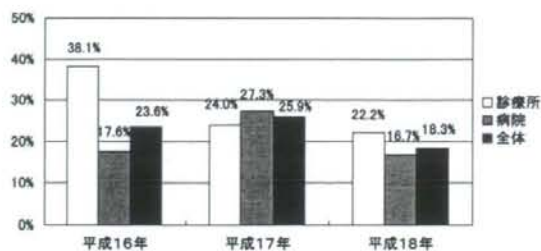


図7 HBs抗原陽性妊婦

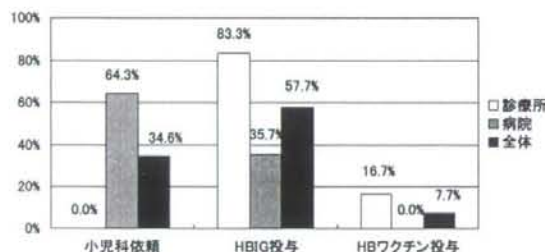


図8 新生児治療

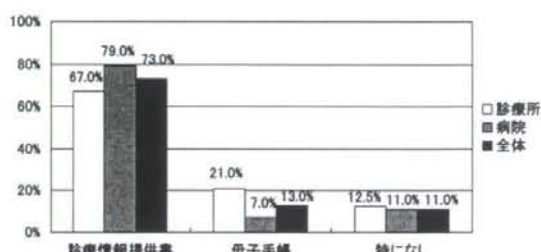


図9 小児科への引き継ぎ方法

とにより「HBs抗原検査受診票(市町村によっては妊婦一般健康診査受診票と一体)」が発行され、地方交付税を財源として受託医療機関において無料(公費)で検査を受けることができる<sup>9)</sup>ことから、予定日を確定し、妊娠届を提出する時期に検査をする施設が多いものと思われた。

HBs抗原検査は、病院では89.3%の施設が自施設で検査を行っていた(図3)。病院は消化器(肝臓)内科を有し、院内において十分数の検体が集まることによると思われた。一方、診療所では全施設外注検査であったのは、採算に見合う十分な検体数が確保できないことによるものと思われた。HBs抗原の検出方法については、全国的には「凝集法」「イムノクロマト法」「EIA/CLIA/CLEIA法」がそれぞれ約10%、40%、50%とみられている<sup>11)</sup>が新潟県内では感度の高い「EIA/CLIA/CLEIA法」がほとんどの病院で採用されており(図4)、HBs抗原偽陰性症例は少ないものと考えられた。

現在、HBVキャリアは全人口の約1-2%と言われている。今から約10年前に宮城県で調査された妊婦のHBs抗原陽性キャリア妊婦は0.97%であった<sup>9)</sup>が、本調査では新潟県における妊婦のHBs抗原陽性率は約0.3%であった(図5)。これは、母子感染防止対策事業が始まって22年が経過するが、若年妊婦など本事業により母子感染によるキャリア化を免れた妊婦も多数いるものと考えられた。また病院と診療所において、HBs抗原陽性率に差が認められたが、病院では高

齢や合併症を有する等ハイリスク妊婦を取り扱うことが多く、一方診療所には比較的若い妊婦が集まることが反映されているものと思われた。

HBs抗原検査については、病院においても14.3%しか自施設で検査を行っておらず、他は外注検査であった(図6)。これは、病院においてもHBs抗原検査と比較して検体数が少ないことによるものと思われた。またHBs抗原陽性者におけるHBs抗原陽性の割合については、本調査では平成16年23.6%、同17年25.9%、同18年18.3%であった(図7)が、前掲の論文でも21.4%と報告されており<sup>9)</sup>、HBs陽性率の割合は変わらなかった。

母親がHBVキャリアであった場合、分娩後児のキャリア化防止策が必要となってくるが、産科独自に行っている施設と小児科に依頼している施設とに二分された。病院では自施設内に小児科が併設されていることが多く、出生48時間後の免疫グロブリン投与を小児科に依頼する施設が多かった。診療所では1ヶ月健診まで自施設において母子ともにフォローすることが多いことから、免疫グロブリン投与までは自施設で実施している施設が多かった。しかしながら、母子感染予防対策が終了する5ヶ月目のワクチン投与まで行っている施設は16.7%と少なかった(図8)。一方で、小児科へ100%確実に情報提供がなされていないことも明らかになった(図9)。今後は、適切な小児科への確実な児への治療の引き継ぎが重要であり、何らかのシステム構築が必要と考えられた。

## 総 括

産科におけるHBV母子感染防止対策の現状を、本アンケート調査により把握することができた。今後は、新潟大学小児科学教室の協力を得ながら、新潟県内の小児科施設にも同様のアンケート調査を実施し、更に感染予防の実態把握を進め、より適切な免疫的治療法の確立を目指していきたい。

## 謝 辞

ご多忙の中、本アンケート調査研究にご協力いただきました、日本産科婦人科学会新潟地方部会の会員の諸先生方に深く感謝いたします。

また本研究は厚生労働省科学研究補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築研究（班長：水落利明）」の分担研究「HBワクチン効果に関する臨床的検討」

により実施されたものである。

## 文 献

- 1) 水落利明：B型肝炎ウイルス感染の血清学的診断法－HBs抗原検査薬。病原微生物検出情報，27：221-222，2006。
- 2) 森島恒雄：B型肝炎母子感染例におけるHBs抗原領域の分子生物学的検討。平成14年度厚生労働科学研究（子ども家庭総合研究事業），530-532，2002
- 3) 厚生省保険局医療課長通知：B型肝炎母子感染防止に係る保険診療上の取扱について。保険発第56号，平成7年3月31日。
- 4) 厚生省児童家庭局長通知：乳幼児に対する健康診査の実施について。児発第285号，平成10年4月8日。
- 5) 谷川原真吾：B型肝炎ウイルス－母子感染としてのHBV－。産婦実録，52：885-893，2003。

## Titration of Hepatitis B Virus Infectivity in the Sera of Pre-Acute and Late Acute Phases of HBV Infection: Transmission Experiments to Chimeric Mice With Human Liver Repopulated Hepatocytes

Ayako Tabuchi,<sup>1</sup> Junko Tanaka,<sup>1\*</sup> Keiko Katayama,<sup>1</sup> Masaaki Mizui,<sup>2</sup> Harumichi Matsukura,<sup>3</sup> Hisao Yugi,<sup>4</sup> Takashi Shimada,<sup>5</sup> Yuzo Miyakawa,<sup>6</sup> and Hiroshi Yoshizawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

<sup>2</sup>Japanese Red Cross Hiroshima Blood Center, Hiroshima, Japan

<sup>3</sup>Japanese Red Cross Osaka Blood Center, Osaka, Japan

<sup>4</sup>Division of NAT, Japanese Red Cross Association, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Phoenix Bio Co., Ltd, Hiroshima, Japan

<sup>6</sup>Miyakawa Memorial Research Foundation, Tokyo, Japan

Studies of hepatitis B virus (HBV) infection in non-human primates such as chimpanzees are no longer possible due to ethical considerations and the endangered status of chimpanzees since April 2007 in Japan. A human hepatocyte transplanted chimeric mouse was used to characterize HBV infectivity in serial stages of acute infection. Chimeric mice were inoculated intravenously with serum samples obtained from an experimentally infected chimpanzee with HBV. Sera from the pre-acute phases (i.e., rump-up viremia prior to anti-HBc) and late acute phases (i.e., declining phase of HBsAg and anti-HBcAb positive) were collected from the chimpanzees 57 and 244 days after inoculation. These sera contained  $2.6 \times 10^6$  and  $2.8 \times 10^6$  copies/ml of HBV DNA, respectively. Three chimeric mice inoculated intravenously with 100  $\mu$ l of pre-acute serum (equivalent to  $10^0$  copy of HBV DNA) developed an HBV infection. The three chimeric mice that received 100  $\mu$ l of pre-acute serum (equivalent to  $10^1$  copies of HBV DNA), developed high levels of serum HBV DNA. None of the three chimeric mice inoculated with 100  $\mu$ l of  $1:10^4$  dilution (equivalent to  $10^1$  copies of HBV DNA) of late-acute serum was infected, while only one of three chimeric mice inoculated with 100  $\mu$ l of  $1:10^3$  dilution (equivalent to  $10^2$  copies of HBV DNA) of late-acute serum developed an HBV infection. Based on these results, chimeric mice can be used as animal models for the study of HBV infectivity, pathogenesis and control. The results show that pre-acute phase HBV serum is about 100-times more infectious than late acute

phase serum. *J. Med. Virol.* 80:2064–2068, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** hepatitis B virus (HBV); acute HBV infection; HBV serum markers; HBV DNA; chimeric mice; minimum infectious HBV dose; experimental transmission of HBV

### INTRODUCTION

In the past, non-human primates such as chimpanzees, have been utilized successfully as human surrogates for the experimental transmission of human hepatitis viruses [Rizzetto et al., 1981; Dienstag, 1983; Prince and Brotman, 2001; Murray et al., 2005]. At present, however, the use of chimpanzees in such experiments is prohibited in Japan since April 2007 and many other countries. As an alternative animal model mice with severe combined immunodeficiency disease (SCID) transgenic for the urokinase-type plasminogen activator gene under the control of albumin

Grant sponsor: Health and Labour Sciences Research Grants of the Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare in Japan.

\*Correspondence to: Junko Tanaka, PhD, Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Minami-Ku, Hiroshima 734-8551, Japan. E-mail: eidcp@hiroshima-u.ac.jp

Accepted 10 July 2008

DOI 10.1002/jmv.21320

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



promotor (uPA/SCID mice) can be transplanted with human hepatocytes [Heckel et al., 1990; Rhim et al., 1994; Tatenno et al., 2004] and utilized for studies of viral transmission, replication and pathogenesis of human hepatitis in vivo [Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005; Tsuge et al., 2005; Sugiyama et al., 2007].

An understanding of the minimal infectious dose of hepatitis B virus (HBV) required for parenteral transmission from blood collected from donors in progressive stages of HBV infection is important for assessing the safety of transfusions and guiding decisions on implementation of nucleic acid amplification tests to interdict infectious units [Yugi et al., 2006; Komiya et al., 2008]. Such studies would also be useful to understand mechanisms of viral-host interactions controlling replication and disease pathogenesis. The present study using these chimeric mice offers a rare opportunity in determining the minimal infectious dose for human hepatitis viruses without resorting to the use of chimpanzees. This study shows that chimeric mice can be used as models in the study of the pathogenesis and control of HBV infection and in determining the infectious status of implicated human sera in the transmission of an HBV infection.

## MATERIALS AND METHODS

### Sera in Pre-Acute and Late Acute Phases of HBV Infection

A chimpanzee (13 years old, male, 60.7 kg) designated as chimp-246, was injected intravenously with 1 ml of fresh frozen plasma obtained from a blood donor in the pre-acute phase of HBV infection [Komiya et al., 2008]. The donor was identified by a nucleic acid amplification test (NAT) for HBV DNA at a Japanese Red Cross Blood Center. The plasma contained  $6.9 \times 10^4$  copies/ml of HBV DNA, genotype A, and was reactive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and negative for antibody to hepatitis B core antigen (anti-HBc). Chimpanzee serum samples were collected serially and immediately aliquoted in 1 ml volume, snap-frozen in liquid nitrogen and stored immediately at  $-80^\circ\text{C}$  for future studies. Individual tubes were thawed gently by immersing in a  $37^\circ\text{C}$  water bath before inoculation of chimeric mice. Experiments using chimpanzees were done before 2006 and ethical approval for each experiment was obtained and applied according to the available facilities.

### Inoculation of Chimeric Mice With the Liver Repopulated for Human Hepatocytes

The human hepatocytes were transplanted into the urokinase-type plasminogen activator transgenic SCID mice (uPA<sup>+/+</sup>/SCID<sup>+/+</sup> mice) and these chimeric mice using the same human hepatocytes lot; Chimeric mice's lot was BD 61.

These chimeric mice (ChiM); lot BD61 were purchased from Phoenix Bio Co., Ltd. (Hiroshima, Japan). The chimeric mice were kept in a clean room and supplied

with sterilized laboratory chaw and water. They were inoculated with 100  $\mu\text{l}$  of diluted chimpanzee sera containing known copy numbers of HBV DNA via the tail vein. Blood samples were taken from orbital venous plexus of the chimeric mice, and sera were separated.

## LABORATORY TESTS

HBsAg, antibody to HBsAg (anti-HBs) and antibody to core antigen (anti-HBc) were determined by micro-particle enzyme immunoassay (MEIA) with AxSYM<sup>®</sup> kits (Abbott Japan, Co., Ltd, Tokyo, Japan) according to the manufactures instructions. The results were expressed in S/N ratio for HBsAg, mIU/ml for anti-HBs and per cent inhibition for anti-HBc. HBV DNA in serum samples was quantitated by TaqMan PCR (Roche Diagnostics KK, Tokyo, Japan) with an established sensitivity of  $10^2$  HBV DNA copies/ml. Human serum albumin in the sera of chimeric mice was determined by the latex turbidimetric immunoassay (Eiken Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan).

## RESULTS

### Chronology of HBV Markers After Experimental HBV Infection in Chimpanzee-246

In chimpanzee-246, infected experimentally with HBV, four HBV makers were shown to appear sequentially during the course of disease. These markers appeared in the following sequential order: HBV DNA, HBsAg, anti-HBc and anti-HBs. The titers and time course of these markers are shown graphically in Figure 1. HBV DNA became detectable at 17 days after inoculation and increased exponentially to  $10^9$  copies/ml until day 83 and then started to decrease at day 118, although it stayed detectable until 335 days after inoculation. HBsAg became detectable 35 days after inoculation and increased to an S/N ratio of greater than 400 until day 71 followed by a gradual decrease and became undetectable 286 days after inoculation. Anti-HBc appeared 79 days after inoculation and increased sharply to high levels until 441 days after inoculation. Anti-HBs appeared 441 days after inoculation at a level 18.1 mIU/ml. Elevated ALT levels were observed at day 97 and remained elevated until 307 days after inoculation. A window of approximately 61 days was observed between the loss of HBsAg and the emergence of anti-HBs. The only markers of any previous HBV infection in this window period were HBV DNA and anti-HBs.

### Dilution of Sera From Chimp-246 in Pre-Acute and Late Acute Phases of Infection

Chimeric mice were inoculated intravenously with 100  $\mu\text{l}$  of serially diluted sera in the pre-acute phase (day 57) and late acute phase (day 244) of the acute HBV infection. Six chimeric mice each were inoculated with dilutions of sera in pre-acute and late acute phases of resolving HBV infection. Their sex, body weight and rate index of human hepatocytes repopulation that was

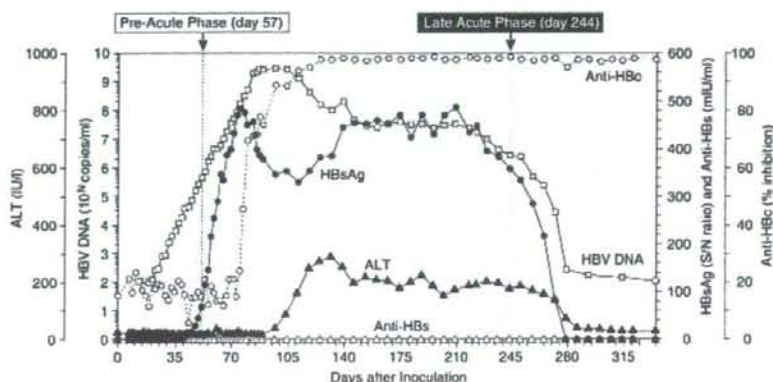


Fig. 1. Markers of HBV infection and transaminase levels of a chimpanzee (chimp-246) inoculated with fresh frozen plasma (FFP) from a donor in the pre-acute phase of infection with HBV of genotype A. Sera from chimp-246 obtained at pre-acute (day 57) and late acute phase (day 244) phases were titrated for HBV DNA, and infectious activity of them were determined in chimeric mice with the liver repopulated for human hepatocytes.

estimated by serum levels of human albumin, are shown in Table I.

Sera of chimp-246 collected either at day 57 in the pre-acute phase when HBV DNA was on the exponential rise or in a late acute phase at day 244 were serially diluted tenfold in pooled SCID mouse sera, and quantitated for HBV DNA by TaqMan PCR (Table II). HBV DNA (26–46 copies/ml) were estimated to be contained in  $1:10^6$  dilutions of serum in the pre-acute phase (day 57), and 20–35 copies/ml of HBV DNA in  $1:10^5$  dilutions of serum in a late acute phase (day 244). Every tenfold dilution of sera was aliquoted into tubes, snap frozen in liquid nitrogen and kept frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until used for inoculation into chimeric mice.

#### Infectious Activity of Serum in the Pre-Acute Phase of HBV Infection

Three chimeric mice (ChiM-1,-2,-3) were inoculated with  $100\ \mu\text{l}$  of  $1:10^5$  dilution inocula of pre-acute phase

taken 57 days after inoculation from chimp-246, containing approximately a  $10^0$  (min–max: 2.6–4.6) copy of HBV DNA. HBV DNA was detected in their serum 4 weeks after the inoculation (Fig. 2A). Similarly in the sera of three chimeric mice (ChiM-5,-6,-7) that were inoculated with  $100\ \mu\text{l}$  of  $1:10^4$  dilution of sera containing approximately  $10^1$  (min–max: 26–46) copies of HBV DNA, HBV DNA was detected (Fig. 2B).

#### Infectious Activity of Serum in a Late Acute Phase of HBV Infection

None of the three chimeric mice inoculated with  $100\ \mu\text{l}$  of a  $1:10^4$  dilution, containing approximately  $10^1$  (20–35) copies of HBV DNA, developed HBV DNA in serum (Fig. 3A). In contrast, one (ChiM-10) of the three chimeric mice inoculated with  $100\ \mu\text{l}$  of a  $1:10^3$  dilution, containing approximately  $10^2$  (200–350) copies of HBV DNA, exhibited HBV DNA in serum (Fig. 3B). Hence, the dose of HBV in serum in a late acute phase, required

TABLE I. Chimeric Mice Used for Experimental HBV Infection

Mouse no.	Sex	Body weight (g)	Human hepatocyte lot. no.	Serum level of human-albumin (mg/ml)	Rate of hepatocyte repopulation (%)
Mice inoculated with pre-acute serum of chimp 246 (57 days after inoculation)					
1	Female	15.3	BD61	13.0	86.0
2	Female	15.8	BD61	9.4	78.1
3	Male	16.6	BD61	6.9	70.7
4	Female	16.0	BD61	10.0	79.6
5	Female	15.5	BD61	7.5	72.7
6	Male	17.0	BD61	9.1	77.4
Mice inoculated with late-acute serum of chimp 246 (244 days after inoculation)					
7	Female	14.0	BD61	6.7	70.0
8	Male	15.2	BD61	5.3	64.3
9	Male	14.1	BD61	6.6	69.6
10	Male	15.8	BD61	6.5	69.2
11	Male	15.6	BD61	5.5	65.2
12	Male	16.8	BD61	5.7	66.1



TABLE II. Titration of HBV DNA in Sera From Chimpanzee Serially Diluted in Mouse Sera

	Dilution of chimpanzee serum					
	Original	1:10 <sup>1</sup>	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>
Serum of chimp-246 in pre-acute phase (57 days after inoculation)						
HBV DNA (copies/ml)	2.6 × 10 <sup>6</sup>	NT	4.6 × 10 <sup>4</sup>	2.7 × 10 <sup>3</sup>	3.4 × 10 <sup>2</sup>	NT
Serum of chimp-246 in late acute phase (244 days after inoculation)						
HBV DNA (copies/ml)	2.8 × 10 <sup>6</sup>	3.5 × 10 <sup>5</sup>	2.6 × 10 <sup>4</sup>	2.7 × 10 <sup>3</sup>	2.0 × 10 <sup>2</sup>	NT

NT, not tested.

for transmitting infection to one third of chimeric mice, was estimated to be 10<sup>2</sup> (200–350) copies. This is about 100 times higher than serum in pre-acute phase at a single (2.6–4.6) copy.

## DISCUSSION

A chimpanzee (chimp-246) was infected experimentally with HBV genotype A obtained from a blood donor during the early acute phase of infection [Komiya et al., 2008]. The patterns of appearance, disappearance, and persistence of hepatitis B markers in this chimpanzee

with acute resolving HBV infection were basically similar to experiments carried out previously [Ling et al., 1979]. Sera were collected from chimp-246 during the pre-acute phase (57 days after inoculation) before the appearance of anti-HBc in circulation, and also during the late acute phase (244 days) when both serum HBV DNA and HBsAg started to decline. A marked difference was observed in HBV infectivity of the two sera *in vivo*, based on the determination of serum HBV DNA concentration. All the three chimeric mice that were inoculated with pre-acute phase chimpanzee serum containing 2.4–4.6 copies of HBV DNA were infected

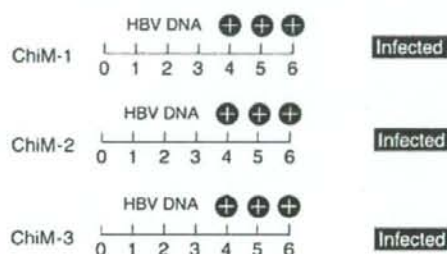
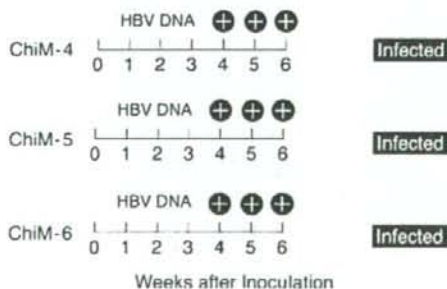
A 10<sup>1</sup> copies/ml × 100μl : equivalent to 10<sup>6</sup> copyB 10<sup>2</sup> copies/ml × 100μl : equivalent to 10<sup>1</sup> copies

Fig. 2. Courses of six chimeric mice inoculated with serum from chimp-246 in the pre-acute phase 57 days after the inoculation. Three mice were inoculated with 10<sup>6</sup> copy (A) and 10<sup>1</sup> copies (B) of HBV DNA.

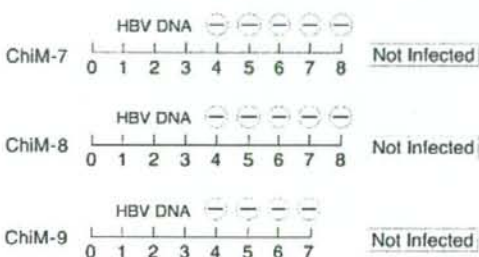
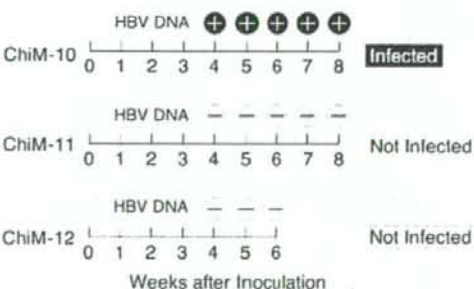
A 10<sup>2</sup> copies/ml × 100μl : equivalent to 10<sup>1</sup> copiesB 10<sup>3</sup> copies/ml × 100μl : equivalent to 10<sup>2</sup> copies

Fig. 3. Courses of six chimeric mice inoculated with serum from chimp-246 in the late acute phase 244 days after the inoculation. Three mice were inoculated with 10<sup>1</sup> copies (A) and 10<sup>2</sup> copies (B) of HBV DNA.