

図2 肝炎ウイルス検診—節目・節目外検診別の受診者数

表 肝炎ウイルス検診—節目、節目外検診により見出されたHBV・HCVキャリア数

HBV	節目・節目外検診合計		節目検診		節目外検診	
	受診者数	HBVキャリア数(%)	受診者数	HBVキャリア数(%)	受診者数	HBVキャリア数(%)
2002	1,923,113	24,430(1.3)	1,291,195	15,239(1.2)	631,918	9,191(1.5)
2003	1,849,125	22,520(1.2)	1,382,663	15,842(1.1)	466,462	6,678(1.4)
2004	1,635,934	18,754(1.1)	1,279,704	13,950(1.1)	356,230	4,804(1.3)
2005	1,546,823	17,130(1.1)	1,205,423	12,735(1.1)	341,400	4,395(1.3)
2006	1,749,592	18,149(1.0)	1,145,291	11,742(1.0)	604,301	6,407(1.1)
合計	8,704,587	100,983(1.2)	6,304,276	69,508(1.1)	2,400,311	31,475(1.3)

HCV	節目・節目外検診合計		節目検診		節目外検診	
	受診者数	HCVキャリア数(%)	受診者数	HCVキャリア数(%)	受診者数	HCVキャリア数(%)
2002	1,923,480	31,393(1.6)	1,298,746	14,672(1.1)	624,734	16,721(2.7)
2003	1,830,270	23,491(1.3)	1,375,583	13,324(1.0)	454,687	10,167(2.2)
2004	1,618,751	16,831(1.0)	1,271,320	10,385(0.8)	347,431	6,446(1.9)
2005	1,527,813	13,976(0.9)	1,196,457	8,909(0.7)	331,356	5,067(1.5)
2006	1,734,195	14,259(0.8)	1,138,005	7,453(0.7)	596,190	6,806(1.1)
合計	8,634,509	99,950(1.2)	6,280,111	54,743(0.9)	2,354,398	45,207(1.9)

(2002.4~2007.3)

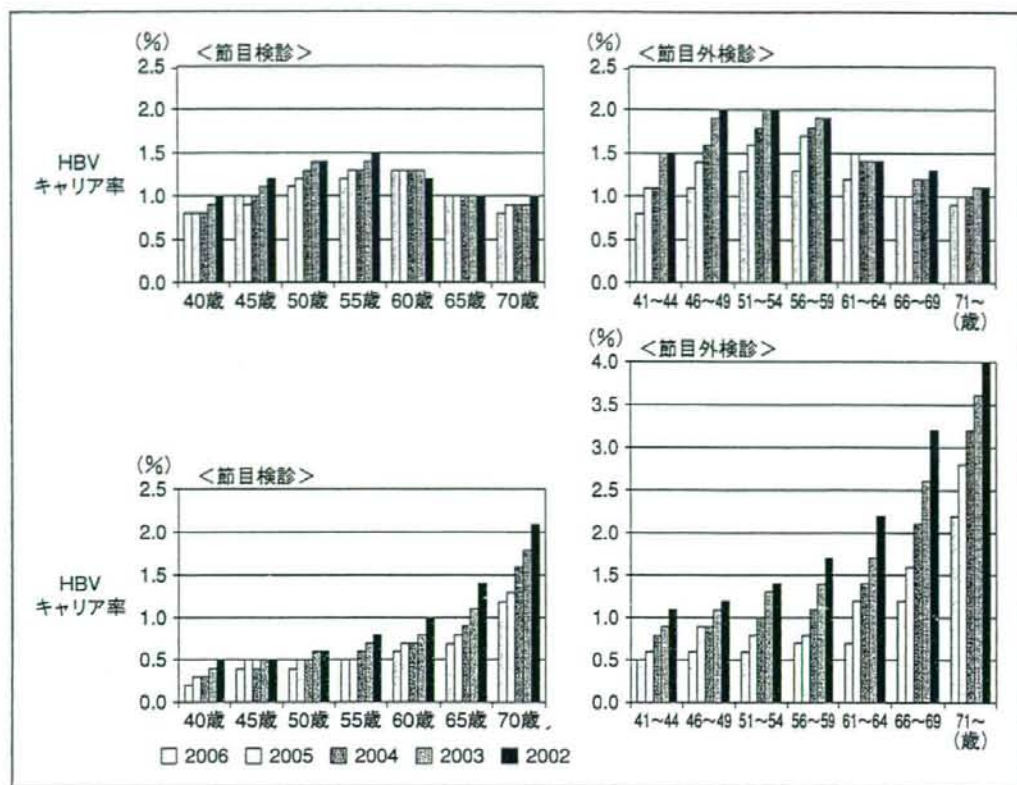


図3 節目・節目外別に見たHBVキャリア率およびHCVキャリア率(2002～2006年度)

節目および節目外の検診により見出されたキャリア数(キャリア率)は、HBVについては合計10万983人(1.2%)、HCVについては合計9万9,950人(1.2%)であった。

「節目」検診受診群と「節目外」検診受診群とに分けてHBVキャリア率を比較すると両者で大きな差は認められない一方、「節目外」検診受診群のHCVキャリア率は、「節目」検診受診群の2倍以上の値を示すという特徴が認められている。見出されたHBVキャリア数の約30%が「節目外」検診受診群であるのに対して、HCVキャリア数では約45%に相当する。これは、「肝炎ウイルス感染のリスクが高いと考えられる集団」を対象とした節目外検診が、HCVキャリアに対して、より適切に実施されていることと、この集団のなかの一部にすでに通院中の患者が紛れ込んできている可能性も考えられる。

検診受診時の実施年度別・受診時年齢別にキャリア率を示す(図3)。節目検診は5歳刻みの節目にあたる者を対象として5年間にわたり実施したことにより、2006年時点の40歳以上74歳までの全年齢を検診の対象者として実施したこととなった。いずれの検診受診群においても、HBVキャリア率は

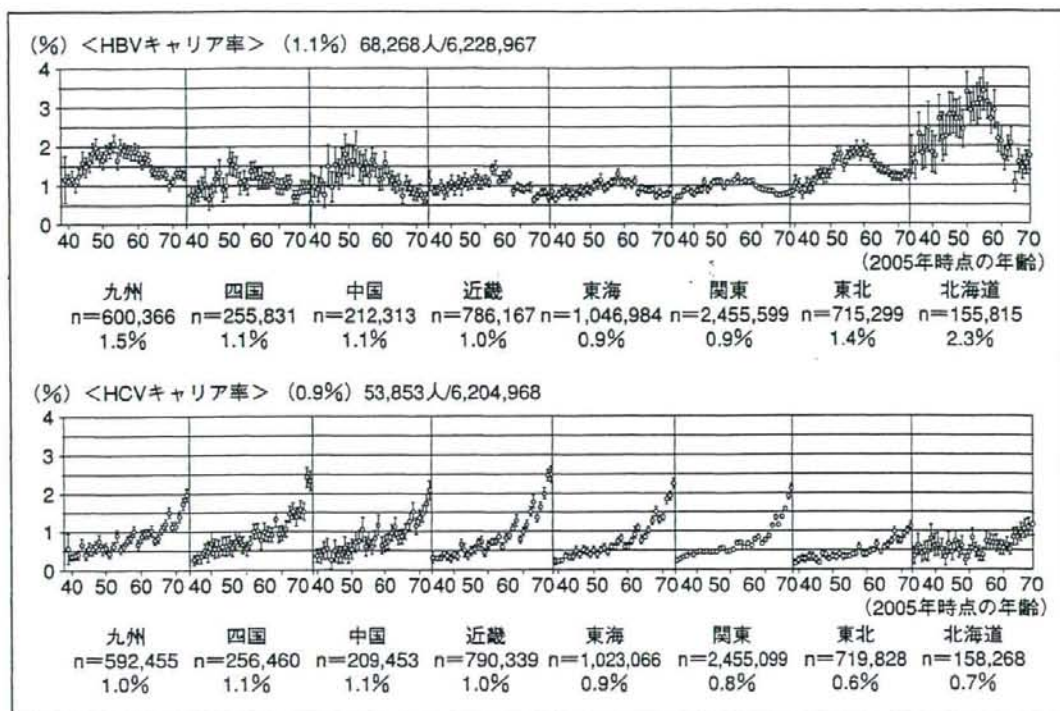


図4 地域別・年齢別に見たHBV・HCVキャリア率
—節目検診受診者(2002~2006年度)<再集計分>

50歳代を中心に高い値を示すのに対して、HCVキャリア率は70歳代をピークとした高齢層で高い値を示すという特徴がみられた。

次に、節目検診受診者を対象として、地域・年齢別に再集計したHBVキャリア率、HCVキャリア率を示す⁵⁾(図4)。HBVキャリア率は、北海道地域では2%を超える値を示した。またいずれの地域においても2005年時点で50~60歳代の集団におけるHBVキャリア率が高い値を示す特徴がみられた。HCVキャリア率については、近畿以西では約1%と、ほかの地域と比べてやや高い値を示した。関東以西では年齢が高い集団においてキャリア率が高い値を示す傾向がみられ、とくに65歳以上の集団では1%を超える値を示した。なお、HBV・HCVキャリア率の95%信頼区間の幅から判断すると、北海道、中国、四国地域における受診者数がほかの地域と比較してやや少ないことがわかる。

これらの成績は、ほぼ同時期に献血を行った348.6万人にのぼる初回献血者集団におけるHBVキャリア率、HCV抗体陽性率(図5)の地域別・年齢別に見た分布³⁾と同傾向を示した。わが国における二つの大規模集団から得られた成績により、HBV・HCVキャリア率の地理・年齢分布の概要が把握できることとなった。

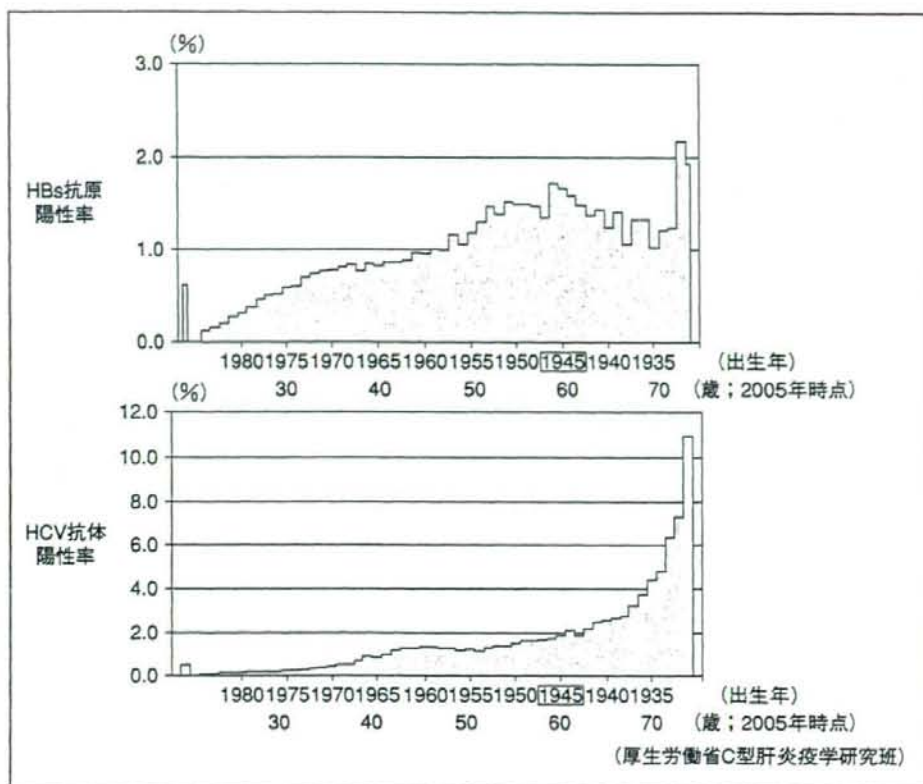


図5 出生年および年齢別に見たHBs抗原陽性率およびHCV抗体陽性率
日本赤十字社 初回供血者(1995.1~2000.12, 3,485,648人)

一方、検診により見出されたキャリア実数を地域別に集計すると、人口が集中している都市部、とくに関東地区に多く(HBV約3.1万人、HCV約3.5万人)、次いで、HBVキャリアでは、九州地域(約1.5万人)、東北地域(約1.5万人)、HCVキャリアでは、東海地域(約1.6万人)、近畿地域(約1.5万人)に多く見出されていた。

なお、献血を契機に見出されたキャリアの肝臓専門医による初診時の臨床診断の成績⁶⁾では、52%が慢性肝炎と診断され、その半数にはただちに治療が開始されたことから、検診後の健康管理体制の重要性は高いと考えられる。

Ⅲ 今後に残された課題

Point

- 5年間の「肝炎ウイルス検診」の受診者は当該対象人口の約15%を占めたにすぎない。
- 受診の機会を逸したまま社会に潜在し続けているキャリアの拾い上げには、キャリアの地域・年齢偏在を考慮した対策が重要。
- 「肝炎ウイルス検査」は、2008年度から健康増進法に基づく個別検診の形で存続されることとなった。

1. 受診の機会がないまま、社会に潜在するHBV、HCVキャリアの存在

人口動態統計(2006年)の資料によれば、わが国の40～74歳の年齢(肝炎ウイルス検診の対象年齢)の人口は5,697万人とされている。この数値に、肝炎ウイルス検診によるHBVキャリア、およびHCVキャリアの発見率(両者とも全体を単純平均すると1.2%)を乗ずると、約68万人のHBVキャリア、HCVキャリアが社会に潜在していると推計される。一方、5年間に「肝炎ウイルス検診」で発見されたHBVキャリア数、HCVキャリア数は、それぞれ10.1万人、および10.0万人であり、それぞれ約58万人のHBV、およびHCVキャリアは受診する機会を逸したままの状態では社会に潜在し続けていると推定される。

5年間の肝炎ウイルス検診受診者数は約870万人であり、検診受診率は当該対象人口の約15%を占めるにすぎない。今後、とくに、都市部における50歳代を中心とした集団の受診率向上を旨とすべく、事後の対応策が望まれている。

2. 見つかったキャリアの医療機関受診状況、事後指導体制の整備

2008年度より健康増進法に基づく個別検診の形で存続されることとなった「肝炎ウイルス検査」は、具体的には、行政(各都道府県)と委託契約を結んだ医療機関での個別検査、および保健所における検査に切り換えられることとなった。HCVの検査は従来の方式(図1)を踏襲することとし、検査によって見出されたHBV、HCVキャリアの事後指導については、治療費が高額に及ぶ場合には肝臓専門医を介した申請を基とした一部助成の導入や、医療機関への受診動機付けと健康管理意識の向上に活用するための健康管理手帳を配布するなど、肝臓専門医が従来よりも、より積極的に関与できるように工夫がなされている。今後は各自治体が設置する「肝炎対策協議会」が機能し、地域単位での効率のよい取組みが望まれている。これまでに蓄積され

てきた疫学的、臨床病理学的成績をもとに、肝炎ウイルスキャリアの拾い上げから適切な治療に至る組織的な対応策を地域単位で確立し実施に移していけば、肝炎ウイルスキャリアのQOLの向上、肝がんの予防、そして肝がん死亡数の減少が人為によってもたされることが期待できる。

文 献

- 1) 厚生科学研究費補助金 21世紀型医療開拓推進研究事業 肝がんの発生予防に資するC型肝炎検診の効率的な実施に関する研究—C型肝炎検診の実施方法の確立に向けた検討—平成13年度中間報告書. 2001
- 2) Yoshizawa, H.: Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 62(Suppl. 1): 8-17, 2002
- 3) Tanaka, J., Kumagai, J., Katayama, K., et al.: Sex- and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirology* 47(1): 32-40, 2004
- 4) Tanaka, J., Mizui, M., Nagakami, H., et al.: Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. *Intervirology* 51: 31-41, 2008
- 5) 田中純子: HBV, 肝炎ウイルス検診受診者(2000.4~2007.3受診群)を対象とした解析, 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究 平成19年度研究報告書. 1-6, 2008
- 6) Mizui, M., Tanaka, J., Katayama, K., et al.: Liver disease in hepatitis C virus carriers identified at blood donation and their outcomes with or without interferon treatment: Study on 1019 carriers followed for 5-10 years. *Hepatol. Res.* 37: 994-1001, 2007

(田中純子)

1 C型肝炎のインターフェロン治療

(5) 高齢者C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療はどう行うべきか

ポイント 本邦のC型慢性肝炎症例は高齢者が多数を占め、線維化が進行している症例が多い。肝癌発症年齢にさしかかった高齢者に対するインターフェロン(IFN)治療は、より重要であるが、実施率は十分でない。高齢者のIFN治療適応は、他の合併症に注意が必要であるが、一度は考慮されるべきである。セログループ1、高ウイルス量症例では、若年に比べ著効率が低いが、それ以外の症例では著効率に差はない。ペグ・インターフェロン(PEG-IFN)の時代に入り治療コンプライアンスが改善されているが、若年者より脱落率が高いことを意識してIFNやリバビリンの投与に工夫が必要である。

Key words IFN療法, 高齢者, C型慢性肝炎

I 本邦におけるC型慢性肝炎患者の現況

Point ●本邦のC型慢性肝炎患者の半数以上は高齢者であり、IFN治療導入状況は満足いくものではない。

1. 本邦のC型慢性肝炎症例の構成

平成14年から5年の計画で肝炎ウイルス検診が行われている。節目検診として40歳から5歳ごとの特定年齢者、および要指導者検診として過去に肝機能異常が指摘されたことがある者などを対象として行われている。当施設の所在する石川県の平成14、15年度の2年間の結果ではC型肝炎ウイルス陽性として精密検査を受診した症例422例中65歳以上が307例(72.7%)と高齢者が大部分を占めていた¹⁾。これは全国的にも同様の傾向といえ、65

歳頃より急激に肝癌症例が増加することを考えると、本邦では肝癌発症年齢に達した C 型慢性肝炎症例が半数以上を占め、インターフェロン (IFN) 療法は高齢者でより重要であると考えられる。

欧米よりの IFN 治療成績の報告を見ると明らかであるが、多数症例の無作為試験などでエビデンスレベルの高いもののほとんどが本邦と比べて明らかに若年である。最近報告された C 型肝硬変症例を対象としたペグ・インターフェロン (PEG-IFN) α 2a/リバビリン併用療法の成績でも平均年齢は 50 歳ほどであり²⁾、本邦の現況とは異なる。これは本邦と米国とでは C 型肝炎が広がった時期に 20 年ほどの差があることが推定されており³⁾、高齢者に対する IFN 治療は現在本邦が抱える大きな課題である。

2. 高齢者 C 型慢性肝炎に対する IFN 治療状況

平成 4 年に IFN 療法が保険認可され、治療を待っていた多数の症例に IFN が一気に行われたが、翌年にうつ病で自殺者が出たこと、間質性肺炎で死亡例が出たことが報道されたため、患者および一般医療家双方に IFN 療法に対する拒否感が広がったことは否めない。また期待よりは著効率が低かったこと、治療適応年齢上限は“65 歳”という認識もあり、高齢者に対して専門医以外では IFN 治療が行われることが少ない。これは高齢者が多い本邦にとっては大いに問題である。

実際に石川県肝炎ウイルス検診で見出された C 型慢性肝炎患者においては 65 歳未満では 115 例中 11 例 (9.6%) に IFN 療法が行われたが、65 歳以上では 307 例中 9 例 (2.9%) にすぎなかった¹⁾。このように肝炎ウイルス検診で症例を拾い上げられても、IFN 治療導入率が高齢者を含め低い理由を検討するために、一般医療者を含め石川県全県下で肝炎診療に関するアンケート調査を行った。その結果として、「IFN 治療を行わない理由 (複数回答)」については“高齢”をあげる医師が多く、次いで“患者拒否”、“GPT 正常”、“禁忌症例”であった (図 1)。また「何歳までが IFN 治療適応と考えるか」という質問には“70 歳以下”が 4 割ともっとも多く、とくに肝臓消化器専門医以外の医師はやや低く考えている傾向があった (図 2)。このように“高齢者 C 型慢性肝炎に対して IFN 治療をどう行うべきか”以前に、いかに高齢者に対しての IFN 治療実施率を上げるかという問題がある。

用語解説

◆肝炎ウイルス検診

潜在する B 型肝炎、C 型肝炎ウイルスキャリアを見出すため平成 14 年より 5 年計画で行われてきた。各地で検診体制、精密検査体制が異なるた

め事後のフォローが統一されていないことが問題である。平成 19 年より対策費が増額され、肝炎検診後のフォローのためのガイドラインが作成中である。

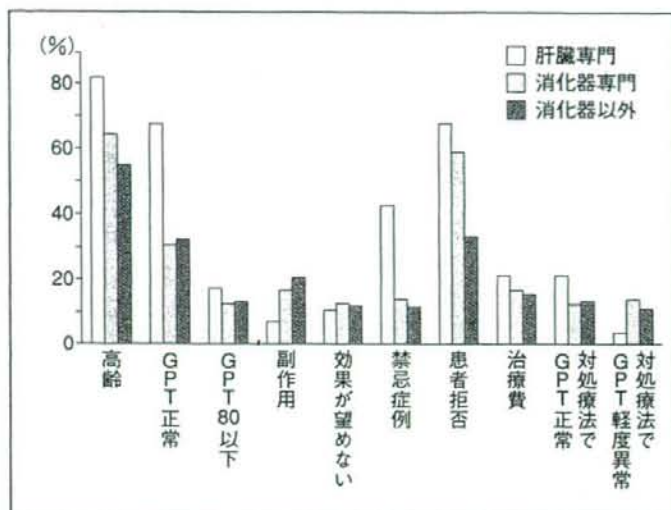


図1 アンケート結果—IFNを投与しない理由は？(複数回答可)
 [鷹取 元, 他: 消化器科 42: 484-490, 2006¹⁾より引用]

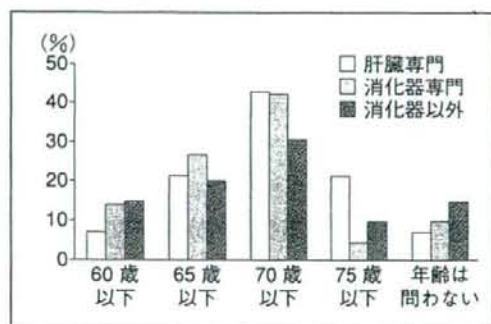


図2 アンケート結果—何歳までがIFN治療の適応と考えるか？
 [鷹取 元, 他: 消化器科 42: 484-490, 2006¹⁾より改変引用]

II 高齢者C型慢性肝炎に対するIFN療法

Point 037

- 高齢者でもIFN療法について一度は考えられるべきである。
- 若年者より脱落率が高く、難治例では著効が得られにくい。
- PEG-IFN治療中のこまかなチェックがより重要である。

1. 適 応

高齢者であってもIFN療法の適応は若年者と本質が変わるものではない。

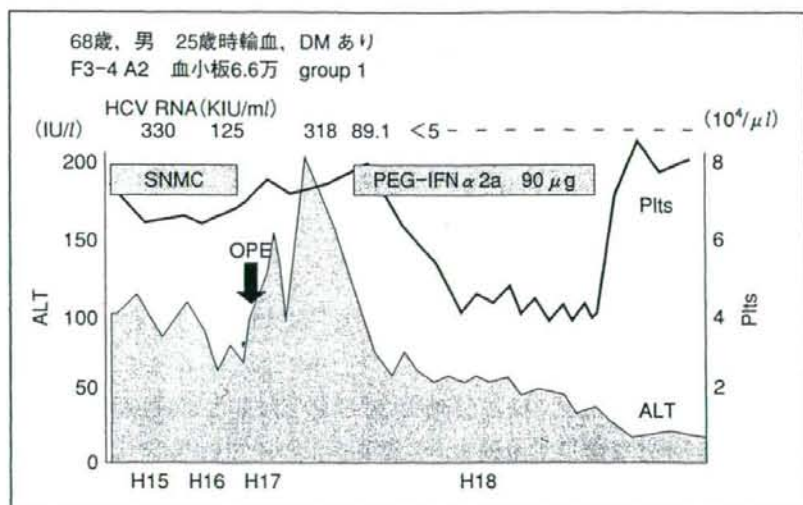


図3 肝癌手術後に IFN 療法を行った高齢 C 型慢性肝炎の 1 例

日本肝臓学会が出している『慢性肝炎の治療ガイド 2006』でも IFN 療法の適応に、「原則として ALT 異常で HCV 感染を認める全ての成人が適応となる」とされている⁴⁾。注釈として「IFN 単独療法が 75 歳，リバビリン併用療法が 65～75 歳を年齢上限」としているが，高齢者は高血圧，糖尿病などを若年者より合併している症例が多く，とくに患者の予後を規定するほかの重篤な疾患がある場合は適応外と考えざるをえない。また高齢者は肝病態が進行した症例が多く，このことは IFN 療法著効率を下げる因子の一つである。若年者より骨髄機能も落ちており脱落例も多い⁵⁾。

しかしながら高齢者を考えるときに，実年齢と身体年齢には個人差があり，適応をネガティブな方向のみに考えると，前述のごとく IFN 療法により救われるべき症例もいたずらに経過観察のみされることになってしまう。当科で経験した症例を図 3 に示すが，66 歳時に近医にて IFN 療法が考慮されたもののグループ 1，高ウイルス症例で著効率が低い，とのことでグリチルリチン製剤 (SNMC) 投与のみにて観察された。2 年後に肝細胞を癌発症し，当施設に紹介され肝切除施行，半年後より本人の意欲もあり PEG-IFN α 2a 半量 48 週間投与を行い著効となった。肝硬変症例で血小板数が少なかったものの継続可能であり，とくに大きな副作用も認めなかった。高齢で肝癌治療後であっても今一度 IFN 治療を考えてみるべきである。

2. 高齢者と若年者の IFN 療法の比較

高齢者に対する IFN 療法の今までの現状について，当科および関連施設の成績を表 1 に示す。若年者 (65 歳未満) 103 例，高齢者 (65 歳以上) 32 例の

表1 若年者と高齢者のIFN治療成績の比較

		65歳未満(n=103)	65歳以上(n=32)
F因子(F3, 4)		26/101(25.7%)	18/26(69.2%)
著効率	グループ1 高ウイルス量	12/62(19.4%)	1/17(5.9%)
	グループ1 高ウイルス量以外	21/36(58.3%)	10/14(71.4%)
脱落率		13/103(12.6%)	8/32(25.0%)

計135例でIFN療法はPEG-IFN認可以前の単独療法、およびリバビリン併用療法である。治療前肝生検では若年では線維化F3以上の進行症例は25.7%であったが、前述のごとく高齢者では69.2%と進行症例が多かった。IFN治療著効率はグループ1、高ウイルス量症例は若年で19.4%であった。高齢では17例中15例でリバビリン併用療法を施行しているがわずか1例(5.9%)が著効であった。一方、グループ1、高ウイルス量症例以外の条件では高齢者でも著効率は71.4%と良好であった。副作用による治療脱落は若年で12.6%、高齢で25.0%であった。高齢者脱落8例の内容としては精神神経症状3例、倦怠感2例、貧血2例、汎血球減少1例であり精神神経症状が若年者に比べて多かった。

以上より高齢者のIFN治療(PEG-IFN前の時代)の問題点として、①線維化進行例が多く、②グループ1、高ウイルス量症例ではリバビリン併用療法でも著効となりにくい、③治療脱落率が高い、の3点があげられた。しかしながらIFN投与によりウイルス排除が得られなくとも肝癌発生率が低下すること⁶⁾、60歳以上であってもIFN療法を行ったほうが非治療例より肝癌発症が抑制されたこと⁷⁾、肝関連死亡が低下したこと⁸⁾など著効が得られなくとも予後改善のため高齢者に対するIFN治療は意義は高いと考えられる。

3. PEG-IFN療法による高齢者治療

上記のごとく高齢者のIFN療法の実績は著効率、脱落率とも若年者に比して不良であったが、平成14年、15年にPEG-IFN α 2a単独療法、PEG-IFN α 2b/リバビリン併用療法が保険収載され新たな期待がもたれている。まず両療法とも週1回のIFN投与でありコンプライアンスが明らかに良い治療法である。

1) PEG-IFN α 2a単独療法

PEG-IFN α 2a単独療法は以前と週3回の製剤と比べ倦怠感、食欲不振などの自覚的副作用が軽いことが特徴である。これは高齢者にとっては有利なものであるが、一方うつ病の頻度は変わらないようであり、間質性肺炎、脳血

管障害、急激な血小板減少の報告もされ注意も要する。事前採血による血球数の確認が必要であり手間でもあるが毎回確認することは安全のために重要である。当施設でも高齢、肝硬変、肝癌治療後などリバビリン併用療法が困難な症例に使用頻度が高いが、グループ 1、高ウイルス量症例以外に 24~48 週間投与を行い判定可能な 11 例すべてで著効であった。またグループ 1、高ウイルス量症例に ALT 低下あるいは肝癌予防を目的に 11 例に投与を行い、6 例(54.5%)に ALT の安定が得られている。投与した 37 例中 8 例(21.6%)で副作用による中止例があったが、高齢、進行症例であることを考えると比較的良好である。

2) PEG-IFN α 2b/リバビリン併用療法

PEG-IFN α 2b/リバビリン併用療法は現在世界標準のもっとも効果の高い IFN 療法である。現在ウイルス排除を目指して高齢者にも多数の症例に投与されている。数多くの治療成績が報告されているが、前述のごとく欧米では検討対象年齢は本邦より若年であり、日本の高齢 C 型慢性肝炎症例で同等の成績が得られるかは明らかでない。本邦からの成績がまたれる。

開発治験で問題となったのはやはり高齢者で脱落例が多いことであり、リバビリン関連の貧血であった。高齢者では腎機能が潜在的に低下していることが一因と考えられる。そこで当施設および関連病院で早期にリバビリン減量を行うことにより、治療脱落防止が得られるか、グループ 1、高ウイルス量高齢者(60 歳以上)で通常投与群と 2 週間後よりリバビリン減量を行う群の 2 群に無作為割付試験を行っている。表 2 に中間解析結果を示すが、投与開始 12 週までに HCV RNA 定性陰性が得られた率は若年、高齢通常投与群、高齢リバビリン減量群で差はなく、脱落率は高齢減量群でとくに早期脱落が防止できる可能性が示された。まだ最終結果でないため、著効率に影響が出るか検討中である。同様に各施設で Hb 低下のスピードにあわせてリバビリン減量を行ったり、リバビリンクリアランスに応じて投与量を設定するなど工夫がなされており、エビデンスレベルの高い報告が期待される。

上記 PEG-IFN 療法が高齢者においても現在主流の治療法と考えられる。

表 2 PEG-IFN α 2b/リバビリン併用療法の成績(中間解析)

		60 歳未満	60 歳以上	
			通常投与群	リバビリン減量群
12 週までに HCV RNA 定性陰性		41/73(56.2%)	13/24(54.2%)	14/25(56.0%)
累積 脱落 率	12 週以前	7/87(8.0%)	6/26(23.1%)	1/26(3.8%)
	13~24 週	9/87(10.3%)	6/26(23.1%)	1/26(3.8%)
	25 週以後	11/75(14.7%)	6/24(25.0%)	2/22(9.1%)

グループ1, 高ウイルス以外であれば年齢に関係なく十分著効が期待できる。ウイルス排除を目指す, あるいは肝発癌予防であっても, IFN投与が1年以上となる症例が増えることが予想される。改めてであるが, IFN治療に対して高齢者は合併症が多く潜在的に骨髄, 腎をはじめ予備能が低下しており, 眼底などの治療前のチェック, 精神状態, 呼吸器, 皮膚症状, 血球数, 血糖, 甲状腺機能など治療中のチェックも若年者以上に気を配るべきである。

文 献

- 1) 鷹取 元, 酒井明人, 金子周一: 高齢者C型慢性肝炎の実態とIFN治療の効果. 消化器科 42: 484-490, 2006
- 2) Everson, G. T., Hoefs, J. C., Seeff, L. B., et al.: Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. Hepatology 44: 1675-1684, 2006
- 3) Tanaka, Y., Hanada, K., Mizokami, M., et al.: Inaugural article: A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15584-15589, 2002
- 4) 第2章 C型肝炎. 日本肝臓学会編: 慢性肝炎の治療ガイド. 20-37, 文光堂, 東京, 2006
- 5) 戸川三省, 山田剛太郎: 高齢者C型慢性肝疾患へのインターフェロン治療. 肝胆膵 45: 1033-1038, 2002
- 6) Imai, Y., Kasahara, A., Tanaka, H., et al.: Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. J. Gastroenterol. 39: 1069-1077, 2004
- 7) Nishiguchi, S., Kuroki, T., Nakatani, S., et al.: Randomized trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis with cirrhosis. Lancet 346: 1051-1055, 1995
- 8) Kasahara, A., Hayashi, N., Mochizuki, K., et al.: Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. Hepatology 27: 1394-1402, 1998

(酒井明人, 金子周一)

【雜 誌】

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,¹ Junko Tanaka,^{1*} Keiko Katayama,¹ Masaaki Mizui,² Harumichi Matsukura,³ Hisao Yugi,⁴ Takashi Shimada,⁵ Yuzo Miyakawa,⁶ and Hiroshi Yoshizawa¹

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

²Japanese Red Cross Hiroshima Blood Center, Hiroshima, Japan

³Japanese Red Cross Osaka Blood Center, Osaka, Japan

⁴Division of NAT, Japanese Red Cross Association, Tokyo, Japan

⁵Phoenix Bio Co., Ltd, Hiroshima, Japan

⁶Miyakawa 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 2.6×10^6 and 2.8×10^6 copies/ml of HBV DNA, respectively. Three chimeric mice inoculated intravenously with 100 μ l of pre-acute serum (equivalent to 10^0 copy of HBV DNA) developed an HBV infection. The three chimeric mice that received 100 μ 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 μ 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 μ 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: eidep@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; Tateno 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 6.9×10^4 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°C for future studies. Individual tubes were thawed gently by immersing in a 37°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^{+/+}/SCID^{+/+} 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 μl 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[®] 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 10^8 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 μl 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

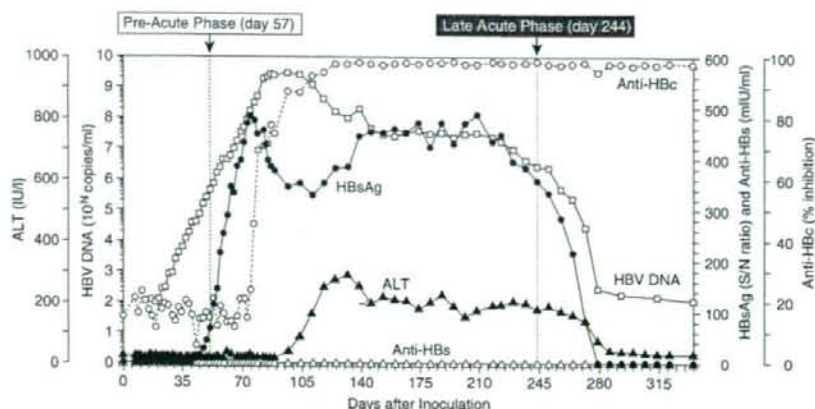


Fig. 1. Markers of HBV infection and transaminase levels of a chimpanzee (chimp-246) inoculated with fresh frozen plasma (FFP) from a donor in the pre-acute phase of infection with HBV of genotype A. Sera from chimp-246 obtained at pre-acute (day 57) and late acute phase (day 244) phases were titrated 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°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 10^6 (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 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
Serum of chimp-246 in pre-acute phase (57 days after inoculation)						
HBV DNA (copies/ml)	2.6 × 10 ⁶	NT	4.6 × 10 ⁴	2.7 × 10 ³	3.4 × 10 ²	NT
Serum of chimp-246 in late acute phase (244 days after inoculation)						
HBV DNA (copies/ml)	2.8 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁵	2.6 × 10 ⁴	2.7 × 10 ³	2.0 × 10 ²	NT

NT, not tested.

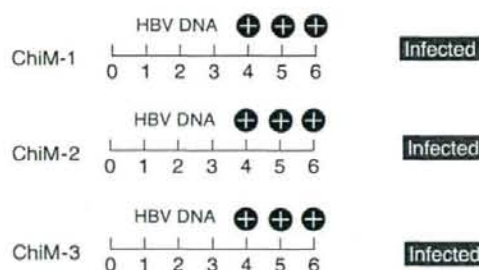
for transmitting infection to one third of chimeric mice, was estimated to be 10² (200–350) copies. This is about 100 times higher than serum in pre-acute phase at a single (2.6–4.6) copy.

DISCUSSION

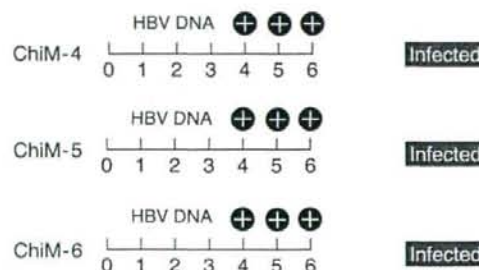
A chimpanzee (chimp-246) was infected experimentally with HBV genotype A obtained from a blood donor during the early acute phase of infection [Komiya et al., 2008]. The patterns of appearance, disappearance, and persistence of hepatitis B markers in this chimpanzee

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 10¹ copies/ml × 100μl : equivalent to 10⁶ copy



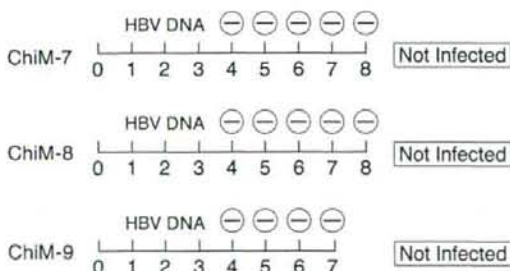
B 10² copies/ml × 100μl : equivalent to 10¹ copies



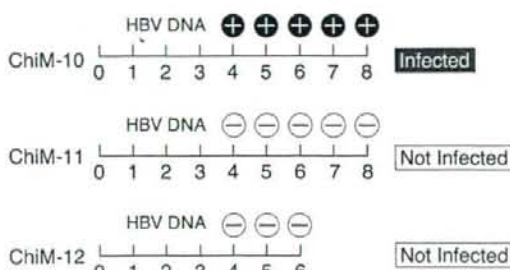
Weeks after Inoculation

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 10⁶ copy (A) and 10¹ copies (B) of HBV DNA.

A 10² copies/ml × 100μl : equivalent to 10¹ copies



B 10³ copies/ml × 100μl : equivalent to 10² copies



Weeks after Inoculation

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 10¹ copies (A) and 10³ copies (B) of HBV DNA.

with HBV (Fig. 2). In contrast, only one chimeric mouse out of three developed an HBV infection upon inoculation with late acute phase serum containing 200–350 copies of HBV DNA (Fig. 3A). Based on these limited studies with the absence of a human immune system precludes study of the impact of the innate and adaptive immune responses on viral replication and pathogenesis, the minimum infectious dose of a pre-acute and late acute HBV serum that is required for HBV transmission to chimeric mice with livers repopulated with human hepatocytes is about 10^0 and 10^2 copies, respectively. This difference may be an indirect indication of higher replication rate of HBV in pre-acute HBV sera. It is also reasonable to assume that the lower potency of HBV in late acute sera may be due to the formation of immune complexes of HBsAg and anti-HBs, 244 days after inoculation. These complexes as expected would be less infectious in chimeric mice than the free (uncomplexed) HBV in pre-acute sera as already has been demonstrated previously [Prince et al., 2001].

Non-human primates such as chimpanzees, have been used for many years to study the natural history, pathogenesis and treatment of several human hepatitis viruses. Substantial progress has been made in the last four decades in understanding the molecular virology, immune pathogenesis, diagnosis and treatment of various forms of hepatitis by the use of chimpanzees for such purposes. However, due to the scarcity of these animals and ethical considerations, the use of chimpanzees in such studies is prohibited in Japan and many other countries. Instead, chimeric mice, with severe combined immunodeficiency disease (SCID) transgenic for urokinase-type plasminogen activator gene under the control of albumin promoter (uPA/SCID mice) can be transplanted with human hepatocytes and used successfully for such studies. In this study, chimeric mice are as practical and chimpanzees for estimating the minimum infectious dose of HBV with a sensitivity 10-times higher than in chimpanzees. Furthermore, chimeric mice have already been used instead of chimpanzees for transmission experiments not only with HBV [Dandri et al., 2001; Meuleman et al., 2005; Tsuge et al., 2005; Sugiyama et al., 2007], but also for HCV transmission [Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Maruyama and Mr. Yokomichi of Experimental Laboratory, Phoenix Bio Co., Ltd for their excellent technical assistance in inoculating and taking blood samples from chimeric mice. We also thank Dr. Isa K. Mushahwar for his kind assistance in the preparation of the manuscript for publication. This work was

conducted under the viral hepatitis research group and supported by Health and Labour Sciences Research Grants of the Ministry of Health, Labour, and Welfare in Japan.

REFERENCES

- Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. 2001. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33:981–988.
- Dienstag JL. 1983. Non-A, non-B hepatitis. II. Experimental transmission, putative virus agents and markers, and prevention. *Gastroenterology* 85:743–768.
- Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. 1990. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 62:447–456.
- Komiya Y, Katayama K, Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H. 2008. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion* 48:286–294.
- Ling CM, Mushahwar IK, Overby LR, Berquist KR, Maynard JE. 1979. Hepatitis B e-antigen and its correlation with other serological markers in chimpanzees. *Infect Immun* 24:352–356.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927–933.
- Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, Leroux-Roels G. 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41:847–856.
- Murray JM, Wieland SF, Purcell RH, Chisari FV. 2005. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17780–17785.
- Prince AM, Brotman B. 2001. Perspectives on hepatitis B studies with chimpanzees. *Ilar J* 42:85–88.
- Prince AM, Lee DH, Brotman B. 2001. Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion* 41:329–332.
- Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. 1994. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 263:1149–1152.
- Rizzetto M, Canese MG, Purcell RH, London WT, Sly LD, Gerin JL. 1981. Experimental HBV and delta infections of chimpanzees: Occurrence and significance of intrahepatic immune complexes of HBcAg and delta antigen. *Hepatology* 1:567–574.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Sakamoto T, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Kato H, Nagao M, Miyakawa Y, Mizokami M. 2007. Early dynamics of hepatitis B virus in chimeric mice carrying human hepatocytes monoinfected or coinfecting with genotype G. *Hepatology* 45:929–937.
- Tateno C, Yoshizawa Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. 2004. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165:901–912.
- Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. 2005. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42:1046–1054.
- Yugi H, Mizui M, Tanaka J, Yoshizawa H. 2006. Hepatitis B Virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing—Japanese experience. *J Clin Virol* S36:S56–S64.

List of Errata

Journal of Medical Virology 80:2064-2068(2008)

Modified Part	Wrong	Correct
P2066 left line 8	1:10 ⁶	1:10 ⁵
P2067 Fig.2. A Title	equivalent to 10 ⁶ copy	equivalent to 10 ⁹ copy