

表1 調査時期および対象者数(男女別)

調査	調査時期	全体対象者数	男 性			女 性		
			対象者数	年齢(歳)	透析歴(年)	対象者数	年齢(歳)	透析歴(年)
1	1999年11月	1,664	989	59.3 ± 12.9	6.1 ± 6.5	675	61.8 ± 12.7	6.4 ± 6.2
2	2000年2月	1,677	993	59.4 ± 12.9	6.3 ± 6.6	684	61.8 ± 12.7	6.5 ± 6.3
3	5月	1,712	1,019	59.5 ± 13.0	6.3 ± 6.5	693	61.9 ± 12.8	6.6 ± 6.4
4	8月	1,736	1,027	59.8 ± 13.0	6.3 ± 6.5	709	62.0 ± 12.7	6.6 ± 6.3
5	11月	1,775	1,044	60.0 ± 13.0	6.3 ± 6.5	731	62.3 ± 12.7	6.5 ± 6.4
6	2001年2月	1,808	1,071	60.4 ± 13.0	6.3 ± 6.5	737	62.6 ± 12.7	6.6 ± 6.4
7	5月	1,820	1,080	60.6 ± 12.8	6.4 ± 6.6	740	62.6 ± 12.9	6.6 ± 6.3
8	8月	1,758	1,046	60.5 ± 12.7	6.6 ± 6.6	712	62.7 ± 12.8	6.8 ± 6.4
9	11月	1,774	1,051	60.7 ± 12.8	6.5 ± 6.6	723	63.0 ± 12.6	6.8 ± 6.4
10	2002年2月	1,805	1,060	61.0 ± 12.9	6.6 ± 6.6	745	63.2 ± 12.7	6.8 ± 6.4
11	5月	1,842	1,082	61.2 ± 12.8	6.6 ± 6.7	760	63.3 ± 12.8	6.8 ± 6.4
12	8月	1,859	1,091	61.4 ± 12.7	6.7 ± 6.7	768	63.3 ± 12.8	6.9 ± 6.4
13	11月	1,870	1,094	61.7 ± 12.7	6.7 ± 6.7	776	63.4 ± 12.9	6.8 ± 6.5
14	2003年2月	1,882	1,103	61.7 ± 12.7	6.8 ± 6.8	779	63.6 ± 13.0	6.9 ± 6.6
	全調査期間を通じた対象者数	2,744	1,613	63.3 ± 13.1	6.7 ± 6.4	1,131	65.7 ± 13.2	6.7 ± 6.5

て9つの透析医療施設の全患者を対象としてHCVマーカーを统一的に測定し、HCVキャリア率、HCVの新規感染発生率を算出した。調査対象者数は個人の重複を除くと計2,744例であるが、調査期間内には患者の新規参入と転院、死亡等による離脱があるため、対象者数は調査回ごとに異なっている。それぞれの調査回ごとの対象患者数、平均年齢、平均透析期間は表1に示した通りである。平均年齢、平均透析期間のいずれも調査の経過とともに高齢、長期化している。

第14回目、2003年2月の時点におけるHCV RNA陽性者(HCVキャリア)率を年齢階級別に整理してみると(図2)、HCVキャリア率は40歳以上の群ではいずれの年齢層も9~14%と高い値を示しており、40歳以上の年齢群間での際立った差は認められない。

一方、透析導入後の期間別に整理してみると(図3)、透析期間が20年以上経過した群におけるHCVキャリア率は40%以上ときわめて高い値を示

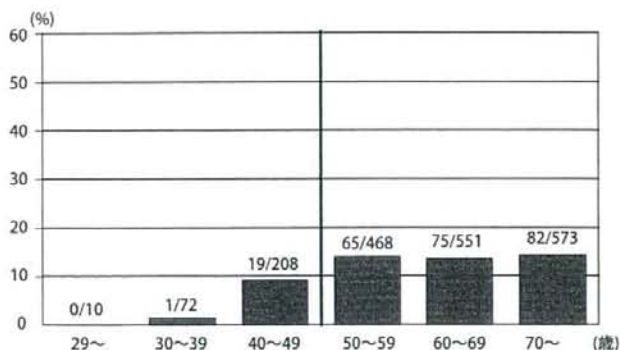


図2 年齢別にみたHCV RNA陽性率(2003.2 N=1,882)

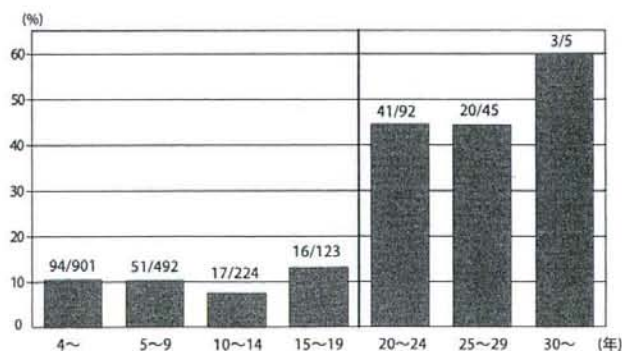


図3 透析開始後の年数別にみたHCVキャリア率(2003.2 N=1,882)

表2 透析導入後の期間別に見た HCV RNA 陽性率および背景 調査 14 (2003年2月) 1,882例

透析導入後の期間 (年)	例数	HCV RNA 陽性者数 (%)	透析導入年齢	輸血後肝炎	
				時期	発生率
30～	5	3(60)	56.0 ± 6.4	1968～1972	16.20%
25～29	45	20(44.4)	58.4 ± 6.9	1973～1977	9.60%
20～24	92	41(44.6)	56.9 ± 9.3	1978～1982	19.30%
15～19	123	16(13)	60.1 ± 10.9	1983～1987	12.30%
10～14	224	17(7.6)	58.7 ± 11.1	1988～1992	3.10%
5～9	492	51(10.4)	62.0 ± 13.3	1993～1997	およそ0%
0～4	901	94(10.4)	64.8 ± 13.3	1998～2002	およそ0%

1989 輸血用血液の HCV c100-3 抗体スクリーニング導入

1990 ヒトエリスロポエチン (rHuEPO) 健康保険適応

1992 輸血用血液の HCV 抗体検査 (第二世代) スクリーニング導入

していることがわかる。しかし、透析期間が20年未満の群においても HCV キャリア率が10%前後の値を示し、これまでに得られている献血者集団や肝炎ウイルス検診受診群等の一般集団における年齢階級別に見た値^{7,8)}と比較すると、目立って高い値を示していることがわかる。

そこで、透析導入時期と、それぞれの時期における輸血後肝炎発生率のデータ⁹⁾、および透析期間別に見た HCV キャリア率とを対比してみた (表2)。

Watanabe Jら (1993) によれば、わが国では1972年までは全輸血後肝炎例の約60%、1973年～1976年までは約80%、また、1977年～1987年には約96%がそれぞれ HCV の感染に起因していたことが明らかとなっている¹⁰⁾。さらに1989年以降は、輸血用血液のスクリーニングのために HBe 抗体検査が追加導入され、輸血に伴う HBV の感染はほとんどみられなくなった。

一方、1989年11月からは第一世代の HCV C100-3 抗体検査が、また1992年2月からは第二世代の HCV 抗体検査が輸血用血液のスクリーニングのために取り入れられ、さらに1999年11月からは核酸増幅検査 (Nucleic acid amplification test: NAT) が追加導入されたことにより、これ以降は輸血に伴う HCV の感染もほぼ駆逐されるに至ったことが明らかとなっている¹¹⁾。1990年には、腎性貧血を改善するためのヒトエリスロポエチンが保険適用となった。

以上のように、血液の安全性が向上し、輸血に伴う HCV 感染のリスクがほとんどゼロに近い状態となったことに加えて、エリスロポエチンの導入により、輸血を受ける機会も減少した1990年以降に透析を開始した患者集団でも HCV キャリア率が10%前後と、高い値を示している。このことは、この集団内において、輸血以外の経路による HCV の新規感染がその後も起こり続けていたことを示すものであると言える。

◆ 4. 血液透析患者集団における HCV キャリアの新規発生率と新規発生数の推移

調査開始時の検査で HCV 抗体あるいは HCV RNA が陰性であり、かつ3ヵ月以上に亘る追跡が可能であった計2,114例の患者集団を対象として、前向きコホート調査を行った結果、3年間の調査期間内に16例の HCV キャリアの新規発生 (0.33/100人年) が認められた⁹⁾。それぞれの調査時点における HCV キャリアの新規発生数の推移は図4に示した通りであり、調査回がすすむにつれて、その発生数は減少する傾向がみられている。これは、調査中に得られた結果をその都度それぞれの施設に報告し、毎年1～2回の検討会を開催し討議を行ったことにより、本調査がすすむにつれて、各施設において HCV の感染予防に関する認識が深まり、透析環境の整備や改善、また、スタッフの感染予防への意識が高まったことの反映と考えることができる。

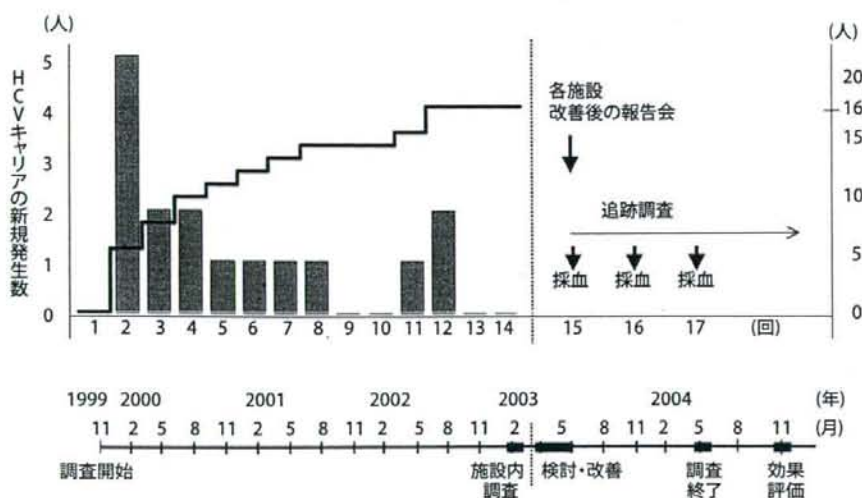


図4 血液透析患者集団における HCV キャリアの新規発生数および感染防止のための改善とその効果評価

◆ 5. 透析医療施設における HCV 感染の防止のための介入とその効果評価

血液透析施設における HCV の感染防止対策は、「血液を介した汚染が起こる可能性のあるすべての経路を遮断すること」が基本となる。具体的には、透析室の環境整備、設備の改善、器具・機材の見直しと適切な配備、およびスタッフへの教育、訓練の実施などを挙げることができる(表3)。

透析室の環境整備、設備の改善としては、透析室の区域化、患者グループごとの使用ベッドの固定、ベッド間隔の確保、手洗い場の改善、廃棄物置き場の改善など、また、器具機材の見直しと適切な配備としては、コップや駆血帯などの十分量、かつ適正な配備、透析開始時・終了時に使用する消耗品類のセット化などを挙げることができる(表3)。

また、スタッフへの教育、訓練は、各種の操作を行う際に、手指、器具、機材、およびカルテや筆記用具などを介した汚染が広がらないようにするための教育や訓練を、実際に即したわかりやすい教材¹²⁾を効果的に用いて、定期的に繰り返して行うことが大切であると言える(写真1~3)。

2003年5月から7月にかけて、以上の対策を実

表3 血液透析施設における HCV 感染防止のための指針

- (1) 設備、環境などの見直しと改善
 - 1) 透析室の区域化
 - 2) 患者グループ毎の使用ベッドの固定
 - 3) ベッド間隔の確保
 - 4) 手洗い場の改善 (→写真1)
 - ・手洗い場の増設
 - ・手動式カランから足踏み式、自動式カランへの変更
 - ・ペーパータオルの設置
 - 5) 廃棄物置き場の改善
 - ・廃棄物運搬の動線距離の短縮
 - ・清潔域と不潔域の区分の徹底
 - 6) 器具、機材の改善
 - ・透析回路をニードルレスタイプとする
 - ・鉗子(コップル)、駆血帯の適正配備 (→写真2)
 - 7) 消耗品のセット化
 - ・透析開始時、終了時の消耗品のセット化
- (2) スタッフへの教育、訓練
 - 1) 清潔域、不潔域の区分の徹底
 - ・清潔物と不潔物との扱いの習得
 - ・清潔域、不潔域での各種操作手順の習得
 - 2) 手洗いの意味とタイミングの習得
 - 3) 手袋着脱の意味とタイミングの習得
 - 4) 予防衣着脱の意味とタイミングの習得
 - 5) 環境、機械、器具、用具を介した汚染拡大の防止法の習得 (→写真3)
 - ・床、テーブル等の適宜清拭
 - ・透析終了後ごとのコンソールの清拭
 - ・記録用紙、ペン等を介した汚染拡大の防止
 - 6) 写真集を用いた繰り返し講習の実施
 - ・無菌操作の実際を習得



写真1-1 手押し式消毒薬の撤去



写真1-2 手押し式消毒薬の撤去

手を介して汚染の広がりを、わかりやすくするため墨汁を使用して、示している。
このタイプの消毒薬は撤去する。
足踏み式や自動式の消毒薬に変更する。

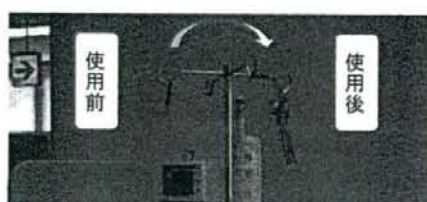


写真2 再利用器具(鉗子)

コップヘルは、使用前のものと使用後のものとはっきり区別し、置く場所を移動して扱う。
使用後に洗浄、滅菌を行う。



写真3 手袋を外すタイミング

手指を介した汚染の拡大を防止するために、手袋を外してから、透析装置を操作する。

< 巻頭カラー頁参照 >

施した。その後、改善効果をみるために1年間にわたってHCV感染に関する追跡調査(全数調査)を行った。

その結果、6カ月目にあたる2004年2月時点の調査では、HCVの新規感染例は1例もみられないことを確認し、1年後にあたる2004年8月の調査においても同様の結果を得ることができた¹³⁾。

◆ 6. 介入による効果評価終了後に、新規に発生したHCV感染例とその原因

2004年8月以降は本調査、研究に参加した9つの全ての透析医療施設では、患者の同意に基づき、従前通りのスケジュールでそれぞれ自主的に継続して検査を行うこととした。

その結果、同一施設内において、2005年3月と2005年10月に各1例の新たなHCV感染事例が見出された。新たな感染の発生が確認された段階で、直ちに調査、検証を行なった結果、その年度途中に採用された看護師が前述の教育訓練を終えないまま透析現場の業務に加わっていたことが原因となっていた可能性を示唆する調査結果が得られた。

◆ 7. おわりに

日本透析医学会からの全国調査報告¹⁴⁾や国際共同研究³⁾の報告によれば、患者100名あたりのHCV抗体陽転化率は3.6人(日本)、同2.1人(米国)、同3.9人(伊)となっており、本稿で示した9つの透析医療施設における新規感染率は、かなり低い値を示しているといえる。このことは、今回の前向き全数調査へ自主的に参加した9つの透析医療施設は、県内の透析医会の幹事を務める施設が中心となっていたことによると考えられる。また、今回のパイロット的な調査、介入では、予防対策を講じた後、全施設において1年間にわたり前向きに追跡して、新たなHCV感染を防止できたことを確認した。

感染予防対策の基本は感染経路の遮断である。チンパンジーを用いた感染実験から、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染成立に必要な最少のウイルス量は、感染早期のウイルス血症の血液では、in-vitroでの測定により得られるHCV RNA換算した絶対量で10 copy相当¹⁵⁾、と極めて微量である。したがって

このことを十分に認識した上で対策を立てる必要があると言える。

また、感染予防対策が軌道に乗った後にも、特に、新たなスタッフを透析現場の業務に参加させる前にはあらかじめ感染予防のための教育、訓練を実施すること、さらに全スタッフに対して、定期的に教育、訓練を繰り返すことも大切であると言える。

[引用文献]

- 1) Sasaki F, Tanaka J, Moriya T, Katayama K, Hiraoka M, Ohishi K, Nagakami H, Mishihiro S, Yoshizawa H. Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. *Journal of Epidemiology*, 1996; 6: 198-203.
- 2) Tanaka J, Mizui M, Nagakami H, Katayama K, Tabuchi A, Komiya Y, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. *Intervirology*, 2008; 51: 31-41.
- 3) 秋葉隆, 丸茂文昭, 山崎親雄他: 欧州・米国・日本の血液透析患者におけるC型肝炎ウイルス感染の現況と解析—DOPPS研究より 第44回日本腎臓学会総会プログラム 75, 2001
- 4) 田辺泰登, 佐々木富美子, 守屋尚, 田中純子, 水井正明, 中西敏夫, 吉澤浩司, 覚醒剤常用者におけるB型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの感染状況についての検討(速報), *肝臓*, 1993; 34: 63.
- 5) Kumagai J, Komiya Y, Tanaka J, Katayama K, Tatsukawa Y, Yorioka N, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Hepatitis C virus infection in 2,744 hemodialysis patients followed regularly at nine centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003. *Journal of Medical Virology*, 2005; 76: 498-502.
- 6) 「図説 わが国の慢性透析療法の実況 2007年12月31日現在」(社)日本透析医学会発行
- 7) 田中純子, 厚生労働省老人保健課, 片山恵子,

- 田渕文子, 小宮裕, 水井正明, 山中烈次, 吉澤浩司 肝炎ウイルス検診受診者(2002.4-2007.3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. 平成19年度 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究班 分担研究報告書 1-6.
- 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) 片山透, 上沼優子, 高祖飛佐子: 輸血後肝炎の発生状況. 日赤 / 輸血後肝炎に関する特定研究班 昭和58～60年度成果(経過)報告書, 9-21.
- 10) Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, Shimada T, Yoshizawa H, Okamoto H, Iizuka H, Tango T, Ikeda H, Endo N, et al. Predictive value of screening tests for persistent hepatitis C virus infection evidenced by viremia. Japanese experience. *Vox Sang*, 1993; **65**: 199-203.
- 11) Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology*, 2002; **62**: 8-17.
- 12) ウイルス肝炎研究財団編, 透析施設における肝炎ウイルス感染防止のてびき, 文光堂, 2007.
- 13) 田中純子, 頼岡徳在, 熊谷純子, 小宮裕, 片山恵子, 吉澤浩司, 辰川自光, 梶川憲治, 川合淳, 大上和行, 高杉敏久, 土谷晋一郎, 浜口直樹, 原田知, 山下達博 血液透析施設におけるC型肝炎ウイルス感染防止のための介入とその効果の検証, 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 平成16年度 B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究班分担研究報告書 35-42.
- 14) 秋葉隆: 透析医療におけるウイルス肝炎の現況, 治療, 予防, 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 平成13年度 C型肝炎の自然経過及び介入による影響等の評価を含む研究班分担研究報告書 72-79.
- 15) Katayama K, Kumagai J, Komiya Y, Mizui M, Yugi H, Kishimoto S, Yamanaka R, Tamatsukuri S, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tanaka J, Yoshizawa H. Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission. *Intervirology*, 2004; **47**: 57-64.

著者連絡先

田中 純子 (Junko TANAKA)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 疫学・疾病制御学 Ph.D 准教授

〒734-0037 広島市南区霞 1-2-3

HCV感染の疫学の変化：現況と将来

田中純子* 片山恵子*
田淵文子* 吉澤浩司**

索引用語：C型肝炎ウイルス (HCV)，HCVキャリア率，コホート効果，肝がん死亡

はじめに

本稿では，成因(原因ウイルス)別にみたわが国の肝がんによる死亡(人口10万対)の年次推移と出生年別にみた初回供血者集団(約350万人)におけるHCV抗体陽性率，および2002年から5カ年計画で実施された肝炎ウイルス検診の節目検診受診者集団(約620万人)における出生年別HCVキャリア率との関連性について示し，HCV感染の現況と将来について述べてみたい。

成因別にみたわが国の肝がん死亡の年次推移

わが国では，1975年を境に肝がんによる死亡実数，人口10万対の死亡数は増加の一途をたどり，2002年に至って，その数はようやく頭打ちの状態となった(2002年34,637人，2004年34,510人，2006年33,662人)¹⁾。1950年以來の肝がんによる死亡実数，人口

10万人対の死亡数の推移を図1にまとめて示した。

この人口10万対の肝がんによる死亡数と日本肝癌研究会による調査成績をもとに，1977年から2003年までの成因別にみたわが国の肝がん死亡(人口10万人対)の年次推移をまとめると図2のようになる^{1,2)}。

まず，HBVの持続感染に起因する肝がん(B型の肝がん)による死亡は，1970年代後半から今日に至るまではほぼ増減がないままの状態推移しており，HBVの持続感染によらない肝がん(非B型の肝がん)がわが国の肝がんによる死亡の増加に寄与していることがわかる。

次に，HCV感染の確定診断が可能になった1992年以降についてみると，それまで非B型の肝がんとされてきた集団の80%以上はHCVの感染に起因する肝がん(C型の肝がん)であることがわかる³⁾。

Junko TANAKA et al: Transition of epidemiology on HCV infection - Current state and the future -

*広島大学大学院医歯薬学総合研究科疫学・疾病制御学 [〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3]

**広島大学名誉教授

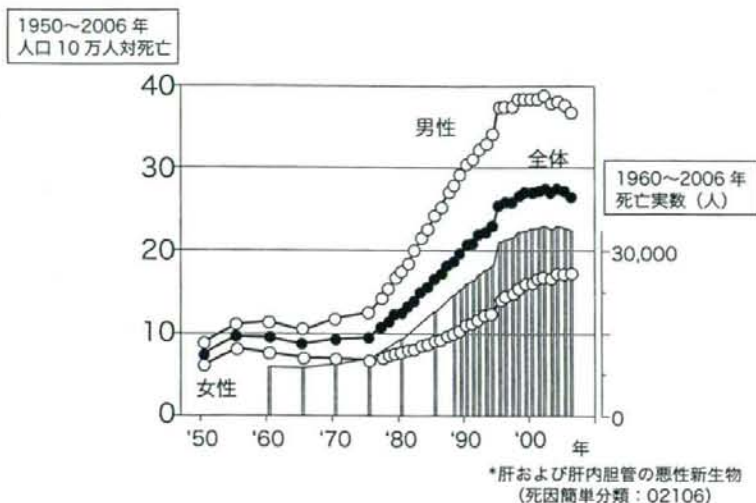
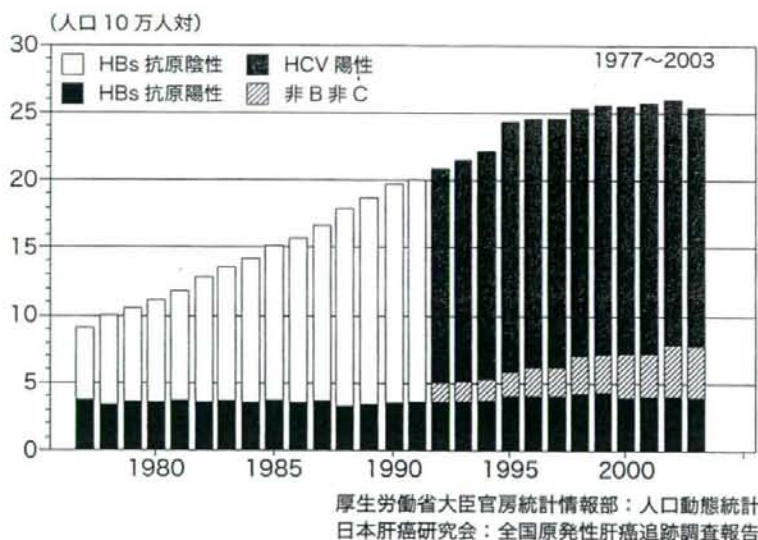


図1 わが国における肝がん*死亡率および死亡実数の推移



厚生労働省大臣官房統計情報部：人口動態統計
日本肝癌研究会：全国原発性肝癌追跡調査報告

図2 わが国における成因別肝がん死亡の推移

初回供血者集団における年齢、地域別にみたHCV抗体陽性率

わが国の一般集団におけるHCVの感染率の近似値は、日本赤十字血液センターの献血者の資料をもとにして算出することができる。血液センターでは、毎年約600万本の献血された血液が、全国一律の精度により検査

されてきた。

厚生労働省の「C型肝炎疫学研究班」が日本赤十字社の全面的な協力のもとにまとめた年齢別、地域別にみたHCV抗体陽性率を図3、図4に示す。解析の対象は、1995年から2000年までの6年間に全国の血液センターで初めて献血した3,485,648人(初回献血者)であり、年齢は2000年の時点に換算して記載し出生

日本赤十字社 初回供血者
1995.1~2000.12 3,485,648人

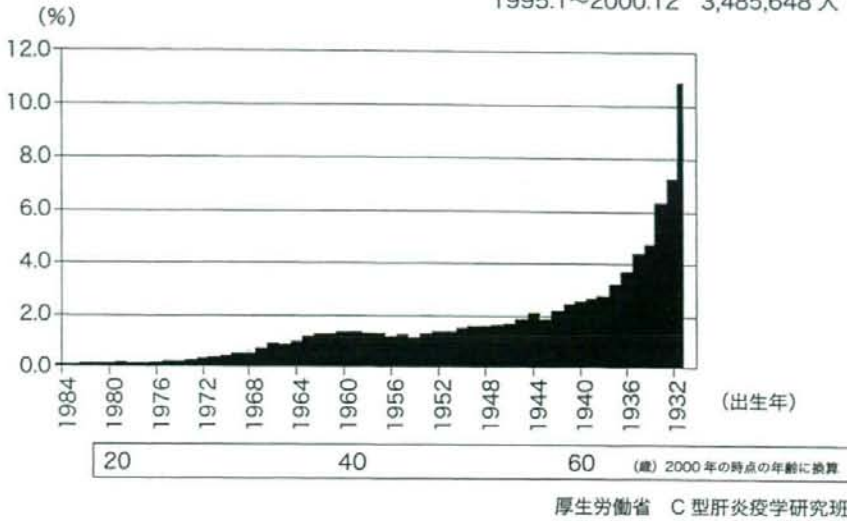


図3 1歳刻みの出生年別にみたHCV抗体陽性率

日本赤十字社 初回供血者
1995.1~2000.12 3,485,648人

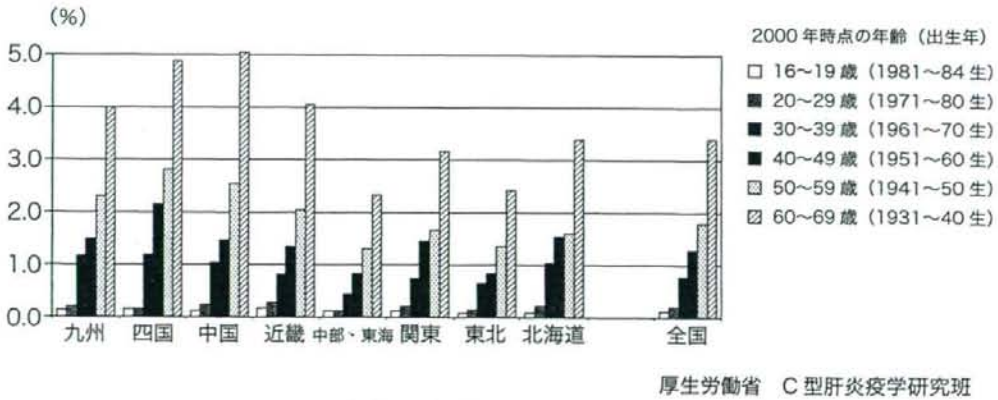


図4 地域別、年齢階級別にみたHCV抗体陽性率

年を併記した⁴⁾。

HCV抗体陽性率を単純平均すると0.5%であるが、年齢が高い集団で高い値を示す傾向がみられる。20歳代以下すなわち1980年以降の出生群では0.2%以下と極めて低い値を示すが、1936年以前の出生群すなわち、2000年の時点における64歳以上の年齢集団

では3%を超える高い値を示している。

全国を8つの地域に分けてみると、肝がん多発地域である西日本の各地域、すなわち九州、中国・四国、近畿地方の1960年以前の出生群、すなわち2000年の時点における年齢が40歳以上の群におけるHCV抗体陽性率が他の地域・年齢層に比べて高い値を示して

表1 HCV感染の新規発生率

地域	献血者			定期献血者	献血者・老人 福祉施設入居者
	広島	大阪	広島	広島	広島・岡山
対象者	1992～1995 114,266	1992～1997 448,020	1994～2004 218,797	1992～1995 3,079	1988～1992 678
キャリア化	3	59*	16	0	0
観察人年	168,726	1,095,668	861,842	5,786	2,712
Incidence	1.8/10万人年	5.4/10万人年*	1.9/10万人年	0	0
95% CI	0.4-5.2	4.1-7.0	1.1-3.0	0-0.6	0-1.3

*抗体陽性

いる。一方、1980年以後の出生群(2000年の時点において20歳以下の群)では、いずれの地域においてもHCV抗体陽性率は0.2%以下と極めて低い値を示していることがわかる。

当時、日赤血液センターでは、凝集法(HCV PHA価、またはHCV PA法)を用いて一定の精度を維持しつつHCV抗体の検査を行っていた。この方法により「HCV抗体陽性」と判定された場合、その約70%がHCV RNA陽性(HCVキャリア：C型肝炎ウイルス持続感染者)であることが、献血者の年齢に関わりなく認められることが過去に行った基礎的調査により明らかにされている。このことから、HCVキャリア率は図3、図4のHCV抗体陽性率の約70%に相当すると考えればよい。

なお、日赤血液センターでは採血前の問診により、過去に輸血歴がある場合、肝炎(肝障害)の既往がある場合など、肝炎ウイルスに感染していると考えられるリスクが多少なりともある場合には献血辞退のお願いをしている。したがって、献血者のデータをもとに算出したC型肝炎ウイルスのキャリア率は、社会一般における実態よりもやや低めに捉えている可能性があることを認識しておく必要がある。

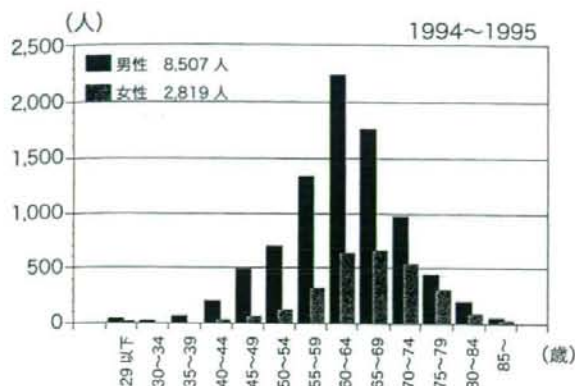
4 HCVの新規感染率の頻度

前項に示した年齢階級別にみたHCV抗体陽性率の分布が加齢効果、すなわち、若い年齢層における低いHCV抗体陽性率は、加齢とともに高くなるのか、あるいは、出生年ごとの集団には時代背景を含めた固有のHCVの曝露率があり、10年20年と加齢しても変わらずその値を保持するのか(コホート効果)を知るためには、一般集団における新規のHCV感染がどの程度起こっているのかを把握しておくことが必要となる。

このことを明らかにするために、広島および大阪の赤十字血液センターにおいて献血者集団を対象に行った前向き調査の成績^{5,6,7)}をまとめて表1に示す。

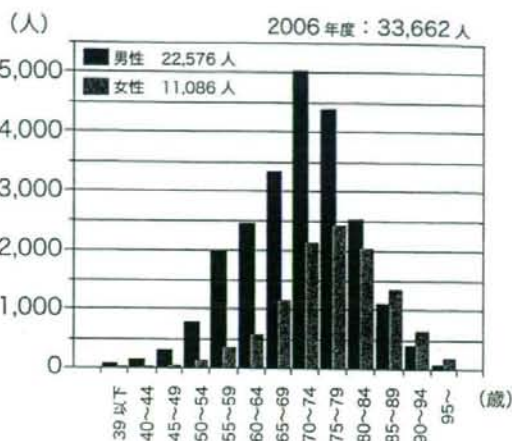
広島の献血者集団では、異なる期間に観察された調査であるにもかかわらず、新規のHCV感染率(新規のHCVキャリア発生率)は10万人年あたり1.8人(95% CI: 0.4-5.2)および10万人年あたり1.9人(95% CI: 1.1-3.0)とほぼ同等の、極めて低い値を示している。大阪の献血者集団においても、10万人年あたりのHCV抗体陽転者は5.4人(95% CI: 4.1-7.0)と低い値を示すに止まっていることが明

臨床的に肝がんと診断された症例



肝がん白書
(社)日本肝臓学会 1999年4月

肝がん*死亡実数



人口動態統計: 2006年
*肝および肝内胆管の悪性新生物
(死因簡単分類: 02106)

図5 性・年齢階級別にみた分布の比較

らかとなった。一方、企業内検診受診者集団およびHCVキャリアも同居している福祉施設での長期入所者における同様の前向き調査を行った成績からも、調査期間内におけるHCVの新規感染は0であることが示されている。これらの成績から、図3に示した年齢階級が高い集団においてHCV抗体陽性率が高い値を示すという現象は、いわゆるコホート効果によるものであると推察できる。

一方、透析医療施設など日常的に観血的処置を行っている医療現場におけるHCV感染のリスクは、国際的にみても高いことが知られており、HCV抗体陽転化率は、患者100名1年あたり3.6人(日本)、同2.1人(米国)、同3.9人(伊)と報告⁸⁾されている。

厚生労働省「C型肝炎疫学研究班」と広島県の透析医会幹事施設との協力のもとに実施した前向き調査⁹⁾においても、HCVの新規感染率は0.33人/100人年と、先に述べた一般健康者集団と比べ高い値を示しており、特定の

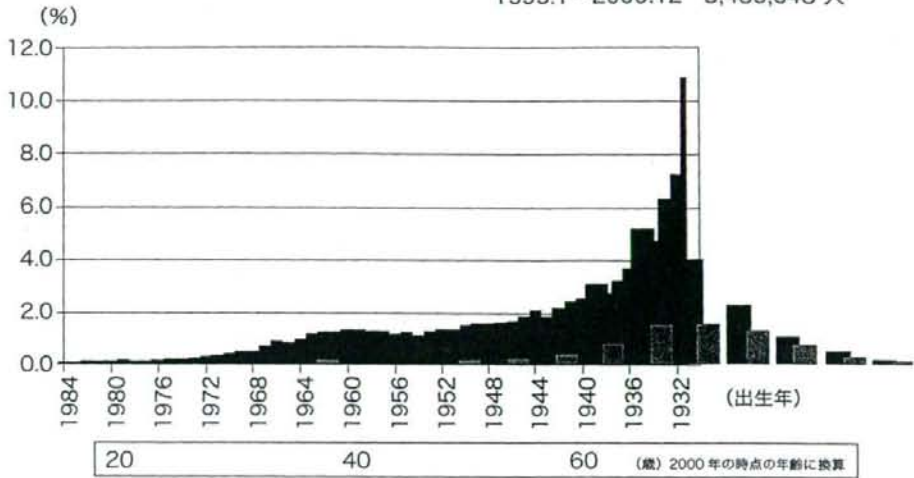
ハイリスク集団においては適切な感染予防対策を講じる必要性は現在も依然として残されていることは銘記しておく必要がある。

5 年齢階級別にみたHCV抗体陽性率と肝がん好発年齢との関係

肝がん白書(1999年)¹⁰⁾から引用した、初めて肝がんと診断された患者数の年齢分布と、人口動態統計から得た年齢ごとの肝がんによる死亡実数を示す(図5)。1945年-1995年の調査時点における診断時の患者の年齢ピークは、男性では60歳代前半、女性では60歳代であるのに対し、2006年の時点における肝がんによる死亡実数は男性では70歳代前半、女性では70歳代であることがわかる。

肝発がんの好発年齢はB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因する肝がんでは50歳代の前半から半ばに、またHCVの持続感染に起因する肝がんは50歳代の終わりから

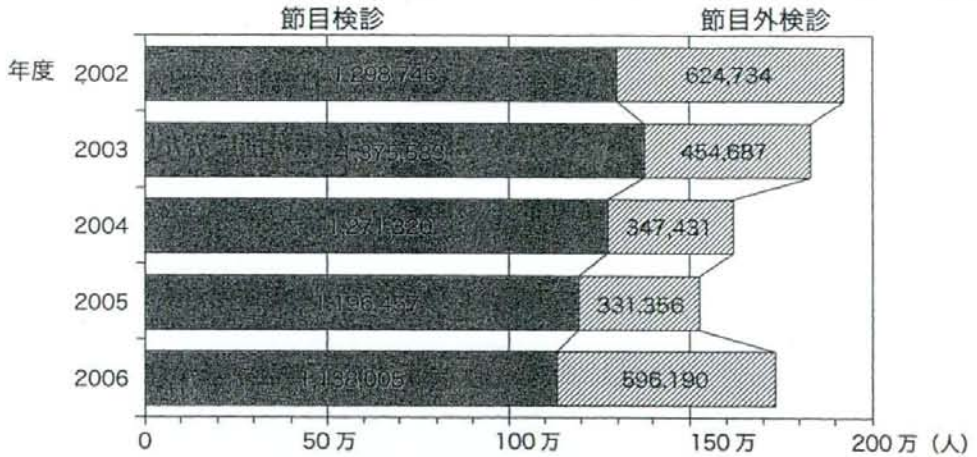
日本赤十字社 初回供血者
1995.1~2000.12 3,485,648人



厚生労働省 C型肝炎疫学研究班

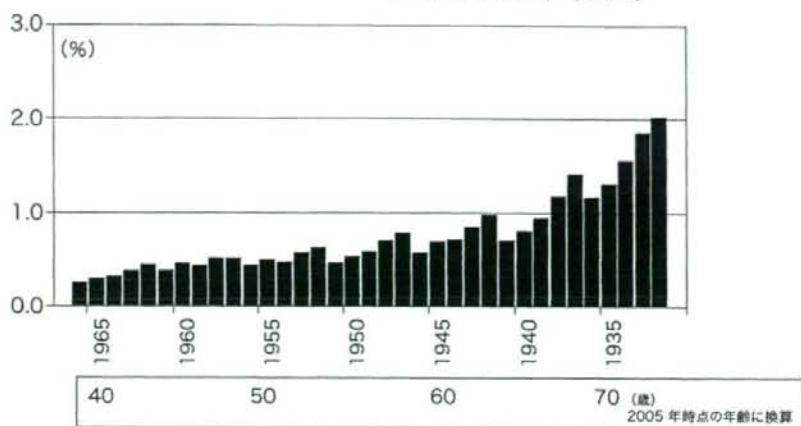
図6 HCV抗体陽性率と肝がん好発年齢

表2 C型肝炎ウイルス検査
節目・節目外検診別の受診者数およびキャリア率



	合計		節目検診		節目外検診	
	受診者数	HCVキャリア率(%)	受診者数	HCVキャリア率(%)	受診者数	HCVキャリア率(%)
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)

【肝炎ウイルス検診】 2002～2006年度
 節目検診受診者 6,204,968人
 HCVキャリア率 (0.9%)



厚生労働省 C型肝炎疫学研究班

図7 地域別、年齢階級別にみたHCVキャリア率

60歳代にピークがあることが知られている。したがって、HCVの持続感染に起因する肝がんのみを考えた場合には、図に示した肝がんの好発年齢は僅かに右方に、すなわち高齢層に移動させてみる必要がある。

図5に示した肝がん好発年齢の分布図と、前項図3に示した1歳刻みのHCV抗体陽性率の分布図を重ねてみると(図6)、2000年の時点はHCV抗体陽性率の最も高いコホート集団(1932年頃に出生した集団)は、肝がんの好発年齢のピークを経過した直後の時期にあたり、2008年の現在はHCV抗体陽性率のやや低いコホート集団(1936年頃に出生した集団)が、肝がんの好発年齢のピークを通過しつつある状態にあることを読み取ることができる。すなわち、わが国における肝がんの新規発生は、すでにピークを過ぎた状態に至っており、肝がんによる死亡は、ここ数年以内に下降線を辿り始めることを容易に読み取ることができる。

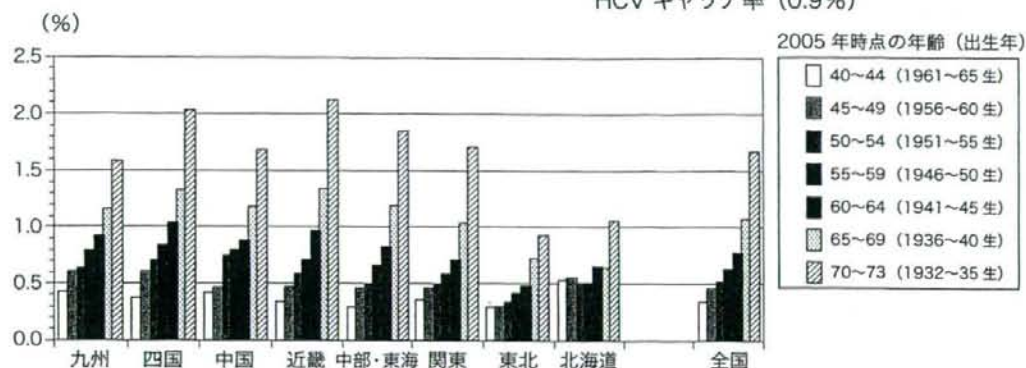
6 肝炎ウイルス検診受診者における年齢、地域別にみたHCVキャリア率

わが国では、2002年度から肝炎・肝がん対策の一環として、肝炎ウイルス検診が5年間計画で実施に移された。この検診は、自覚症状がないまま社会に潜在している肝がんのリスク集団としてのHCVキャリア、およびHBVキャリアを組織的に見つけ出し、それぞれの地域単位で健康管理と適切な治療を行うことにより、肝がんによる死亡を減らすことを目的としたものである¹¹⁾。

厚生労働省によりまとめられた結果によれば、この5年間に、節目、節目外検診の両者を併せて合計8,634,509人がC型肝炎ウイルス検査を受け、99,950人(1.2%)のHCVキャリアが見いだされている(表2)。

「節目」と「節目外」検診受診群とに分けて、見出されたHCVキャリア率を比較すると、いずれの年度においても「節目外」検診受診群では「節目」検診受診群の2倍以上の値を示

【肝炎ウイルス検診】 2002～2006 年度
 節目検診受診者 6,204,968 人
 HCV キャリア率 (0.9%)



厚生労働省 C型肝炎疫学研究班

図8 地域別、年齢階級別にみたHCVキャリア率

し、また、全体の約45%は節目外検診により見いだされている。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」の設定が適切であったこと、また、各自治体において、対象とした節目外検診受診者集団の選別が適切に実施されていたことを示しているといえる。なお、この集団の中の一部には既に通院中の患者も紛れ込んできていた可能性は否定できないであろう。

節目検診は40歳以上の5歳刻みの年齢集団を対象に5カ年間実施され、最終的に2006年度における年齢が40歳から74歳までの全年齢が受診対象者となった。このうち、節目検診を受診した6,204,968人分のデータをもとに、2005年時点における年齢および出生年別にHCVキャリア率を算出し、図7に示した。

この成績は、わが国におけるHCVキャリア率の実態に最も近似するものであるといえる。さらにこのデータを8つの地域別にわけて再集計し、図8に示した。HCVキャリア率は、近畿以西の西日本の地域の高齢層で高

い値を示す傾向が認められている。

7 おわりに

本稿では、約350万人の初回献血者のデータをもとにした年齢別にみたHCV抗体陽性率と、約620万人の節目検診受診者のデータをもとに年齢別にみたHCVキャリア率を提示、対比した。

両者は高齢層では高いHCV抗体陽性率あるいはHCVキャリア率を示すこと、また、地理的にみると西高東低の分布を示すことで一致していた。一方、若い年齢層ではいずれの地域においても陽性率は低い値を示すに止まるという特徴が認められた。

この大規模集団を対象とした2つの成績と1990年代以降のわが国では、HCVキャリアの新規発生はごく稀にみられるに過ぎなくなっていることを併せると、現在のわが国の社会全般の衛生環境と医療環境が維持されれば、HCVキャリア率は減少の一途をたどることになると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部：平成18年人口動態統計。上巻。2006
- 2) 日本肝癌研究会：第4回-第17回全国原発性肝癌追跡調査報告（1977-2003）。
- 3) Yoshizawa H, Tanaka J : A National Project for the Management of Viral Hepatitis toward Prevention of Hepatocellular Carcinoma in Japan. International Kilmer Conference Proceedings 247-264, 2004
- 4) 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 : 32-40, 2004
- 5) Sasaki F, Tanaka J, Moriya T et al : Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. Journal of Epidemiology 6 : 198-203, 1996
- 6) Tanaka H, Tsukuma H, Hori Y et al : The risk of hepatitis C virus infection among blood donors in Osaka, Japan. J Epidemiol 8 : 292-296, 1998
- 7) 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 : 33-41, 2008
- 8) 秋葉隆：透析医療におけるウイルス肝炎の現況、治療、予防、平成13年度 C型肝炎の自然経過及び介入による影響等の評価を含む研究班分担研究報告書 72-79
- 9) Kumagai J, Komiya Y, Tanaka J et al : Hepatitis C virus infection in 2,744 hemodialysis patients followed regularly at nine centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003. Journal of Medical Virology 76 : 498-502, 2005
- 10) 肝がん白書 平成11年度。日本肝臓学会発行
- 11) 吉澤浩司：肝がんの発生予防に資するC型肝炎検診の効果的な実施に関する研究。平成13年度厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）中間報告書。2000

*

*

*

BASIC—LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT

Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in Severe Combined Immunodeficiency Transgenic With Urokinase-Type Plasminogen Activator Mouse With Human Hepatocytes

MASAYA SUGIYAMA,* YASUHIITO TANAKA,* FUAT KURBANOV,* ISAO MARUYAMA,† TAKASHI SHIMADA,‡ SATORU TAKAHASHI,§ TOMOYUKI SHIRAI,¶ KEISUKE HINO,|| ISAO SAKAIDA,|| and MASASHI MIZOKAMI*#

*Department of Clinical Molecular Informative Medicine, and †Department of Experimental Pathology and Tumor Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; ‡PhoenixBio Co, Ltd, Higashi-Hiratsima, Japan; †Department of Basic Laboratory Sciences, †Department of Gastroenterology, and †Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi, Japan; and †Research Center for Hepatitis & Immunology, Kohnodai Hospital, International Medical Center of Japan, Chiba, Japan

Background & Aims: Little is known about the direct cytopathic effect of hepatitis B virus (HBV) and its association with particular viral genotypes or genetic mutations. We investigate HBV genotype-related differences in viral replication, antigen expression, and histopathology in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mice harboring human hepatocytes. **Methods:** Mice were inoculated with wild-type of different genotype strains (3 for each HBV/A2, B1, and C2) recovered from preinfected-mice sera or patient sera. **Results:** Histologic analysis of mice infected with HBV/C2 for 22–25 weeks showed abundant ground-glass appearance of the hepatocytes and fibrosis in the humanized part of the murine liver owing to the activation of hepatic stellate cells mediated by oxidative stress through transforming growth factor- β 1 signaling, whereas neither was observed with HBV/A2 and B1. The HBV-DNA level in sera was the highest in mice infected with HBV/C2 compared with those with HBV/A2 and HBV/B1 (10^9 , 10^7 , and 10^4 log copies/mL, respectively, $P < .05$) during 6–8 weeks postinoculation. HB core-related antigen excretion had a similar trend among the genotypes, whereas secretion of HB surface antigen was more pronounced for HBV/A2 followed by HBV/C2 and much less for HBV/B1. Introduction of precore stop-codon mutation in the HBV/B1 caused a significant increase in viral replication, antigen expression, and a histopathologic picture similar to HBV/C2. **Conclusions:** By using a humanized in vivo model, we show that different HBV genotypes and even particular mutations resulted in different virologic and histopathologic outcomes of infection, indicating that particular genetic variants of HBV may be directly cytopathic in immunosuppressive conditions.

With an estimated 420 million chronic carriers, hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most prevalent chronic viral infections of human beings. The chronic infection often leads to cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma, which is responsible for at least 1 million deaths annually worldwide.¹ The precise mechanism by which chronic viral hepatitis results in hepatocellular carcinoma (HCC) is not known. However, evidence now is available concerning the direct effects of HBV in this process.^{2,3} The important issue of a distinct impact of the various HBV genotypes on the virulence has not been addressed directly so far.^{4,5}

Genotypes are subdivided further into subgenotypes on the basis of phylogenetic relationships.⁶ Evidence for the influence of HBV genotypes/subgenotypes on liver diseases in acute, fulminant, and chronic infection have been reported increasingly.^{7–13} Involvement of genetic mutations of HBV in its pathogenesis is another open question. Previous reports have indicated that mutations in basal core promoter, precore/core, envelope, and X coding regions may be associated with HCC.¹⁴ The term *precore mutants* refers to HBV strains with nonsense frameshift or initiation codon mutation in the precore region that prevent translation of hepatitis B e antigen (HBeAg) precursor and are associated with an increase of viral replication via stabilization of the pregenomic encapsidation signal.¹⁵ However, little is known about the histopathologic implication of the mutants. Complexity

Abbreviations used in this paper: α -SMA, α -smooth muscle actin; PCm, precore stop-codon mutation; HBcrAg, antigens related to hepatitis B virus core; HSC, hepatic stellate cell; 8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine; PCR, polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

© 2009 by the AGA Institute

0016-5085/09/\$36.00

doi:10.1053/j.gastro.2008.10.048

Table 1. Inoculum Profiles on HBV Isolates of Distinct Genotypes/Subgenotypes

Genotype (Subgenotype)	Isolates	Mice (n)	Accession No.	Precore (1896)	HBeAg
A (A2/Ae)	A2_US	4	AB246337	Wild	+
	A2_JPN1	3	AB246338	Wild	+
	A2_JPN2	3	AB362931	Wild	+
C (C2/Ce)	C2_JPN22	4	AB246344	Wild	+
	C2_JPNAT	4	AB246345	Wild	+
	C2_JPN31	3	AB362932	Wild	+
B (B1/Bj_wild)	B1_JPN35w	4	AB246341	Wild	+
	B1_JPN56w	3	AB246342	Wild	+
	B1_JPN58w	4	AB362933	Wild	+
B (B1/Bj_PCm)*	B1_JPN35m	3	*	Mutant	-
	B1_JPN56m	3	*	Mutant	-
	B1_JPN58m	3	*	Mutant	-

*Accession numbers are not shown because these 3 clones identical to the above described HBV/B clones were constructed with G1896A point mutation.

of the host and environmental factors complicates evaluation of the veritable virologic differences between genetic variants of HBV in a clinical study. Therefore, a model that eliminates these factors and allows a direct comparison of early dynamics of HBV genotypes is essential for such investigation.

Recently engineered severe combined immunodeficient mice transgenic for urokinase-type plasminogen activator received human hepatocyte transplants (hereafter referred to as *chimeric mice*)¹⁶⁻¹⁸ and are suitable for the experiments with hepatitis viruses *in vivo*,^{19,20} and offer a rare opportunity in modeling the early kinetics of the HBV replication.²¹

In the present study, infecting human hepatocytes in chimeric mice, we show that different HBV genotypes and even particular mutations within the same genotype have distinct virologic characteristics that may have contributed to the distinct histologic outcomes.

Materials and Methods

Inoculation of Chimeric Mice With the Liver Repopulated for Human Hepatocytes

The chimeric mice were purchased from Phoenix Bio Co, Ltd (Hiroshima, Japan). Human hepatocytes were imported from BD Biosciences (San Jose, CA). The human serum albumin was measured by enzyme-linked immunosorbent assay using commercial kits (Eiken Chemical Co Ltd, Tokyo, Japan). The serum levels of the human

albumins and the body weight were required to be identical among all of the mice to provide reliable comparison. All mice were infected successfully with HBV recovered from preinfected-mice sera or sera of patients as described in our previous report.²¹ Briefly, a mixture of immature virions can be present in supernatants of cell culture transfected with plasmids expressing HBV^{22,23}; therefore, to avoid direct use of the supernatants in experimental mice, the preinfected mice were infected instead, using the culture media, and then were used as a source of HBV inoculums for the experimental mice. Three clones for each HBV/A2, C2, B1_wild, or B1_PC mutant (precure stop-codon mutation [PCm]) were used in this study (Table 1), and each clone was inoculated to 3 or 4 mice.

Patients

Sera were obtained from 6 patients, 3 of whom had acute hepatitis B and the remaining 3 had fulminant hepatitis B. All sera were subjected to HBV extraction and direct sequencing, which determined genotype B (subgenotype Bj/B1) in all of them. HBV genome sequence analysis of the HBV clones isolated from 3 patients with fulminant hepatitis revealed both the presence of the PC mutation (G1896A) and the absence of any other featured mutations such as core promoter or tyrosine methionine aspartate aspartate mutations (Table 2). HBV strains isolated from the 3 acute hepatitis patients were wild type without core

Table 2. Characteristics of Patients From Whom HBV Isolates of Distinct Genotypes/Subgenotypes Were Recovered

Genotype/subgenotype	Isolates	Precore (1896)	Diseases	HBeAg	HBV (LGE ^a /mL)
B1/Bj_wild	B1_JPN1	Wild	AHB	+	6.8
	B1_JPN2	Wild	AHB	+	7.0
	B1_JPN3	Wild	AHB	+	6.7
B1/Bj_PCm	B1_JPN4	Mutant	FHB	-	8.7
	B1_JPN5	Mutant	FHB	-	8.0
	B1_JPN6	Mutant	FHB	-	8.6

AHB, acute hepatitis B; FHB, fulminant hepatitis B.

^aLog genome equivalents.

promoter, precore, and tyrosine methionine aspartate aspartate mutations. The study design conformed to the 1975 Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethic Committees of the participating institutions. Written informed consent was obtained from each patient.

Histopathologic Examination

Liver tissues were fixed in buffered formalin, embedded in paraffin, and stained with H&E, Masson's trichrome (MT), or orcein staining. To detect α -smooth muscle actin (α -SMA) and human nuclei, polyclonal antibodies against anti- α -SMA (Lab Vision Corp, Fremont, CA) and monoclonal antibody against anti-human nuclei (Chemicon International, Inc, Temecula, CA) were used as primary antibodies, respectively. The fibrosis stage was evaluated by an expert pathologist who was blinded to the nature of inocula (S.T.).

Dihydroethidium Labeling of Reactive Oxygen Species in Liver Tissue

In situ reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by staining with dihydroethidium (Invitrogen, Carlsbad, CA) as previously reported with minor modification.²⁴ Briefly, in the presence of ROS, dihydroethidium is oxidized to ethidium bromide and stains nuclei bright red by intercalating with the DNA. The fluorescence was detected with laser scanning confocal microscopy. The relative stained area was quantified using National Institutes of Health image analysis for 5 randomly selected areas of digital images in each specimen.

Detection of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Liver Tissue

Immunohistochemical detection of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) was performed as previously reported with minor modification.²⁵ The detailed protocol is shown in the Supplementary Materials and Methods section (see Supplementary material online at www.gastrojournal.org).

Results

Differences of Replication Efficiency Among HBV Genotypes

The inoculums, each containing approximately 10^5 copies of any 1 of the 4 clones: HBV/A2, C2, B1_wild, and B1_PC mutant (PCm), were inoculated to 3 or 4 mice. HBV DNA was quantified in murine sera weekly. One week after inoculation, HBV DNA was detected in both the HBV/A2 and C2 groups. The titer increased approximately by 2 logs within the next 2 weeks, and continued to increase until 7-12 weeks before reaching a plateau. HBV-DNA levels were 2 logs higher in the mice inoculated with HBV/C2 than HBV/A2 at 6-8 weeks postinoculation ($P < .05$) (Figure 1A).

To assess the role of the PC mutation, 2 variants of HBV/B1 were included in the comparison between the genotypes: the HBV/B1_wild and HBV/B1_PCm. Differently from HBV/A2 and HBV/C2, both of the HBV/B1 variants had shown a so-called *window* period; characterized by the HBV-DNA levels remaining undetectable until weeks 4-5 after the inoculation. However, after the window period, the HBV-DNA level of the B1_PCm detected at week 5 had rapidly increased in titer, reaching the levels of HBV/C2 and A2 by week 11 (Figure 1A). Interestingly, HBV-DNA levels of B1_wild did not show this rapid increment during the whole follow-up period (until week 25). HBV-DNA titer was 3 logs lower in mice inoculated with HBV/B1_wild compared with those with the other genotypes ($P < .01$). To evaluate the replication dynamics of the different genotypes, the time required for a 10-fold increment of the viral load (*log time*) was estimated. When the window periods of HBV/B1_PCm were excluded from the comparison, the log time was similar between the HBV/C2 and B1_PCm, ranging from 7.3 to 8.4 days, whereas HBV/A2 had a longer index (12.9 days), suggesting slower replication. However, the lowest replication efficiency was observed for HBV/B1_wild, with a log time of 27.7 days.

Distinct Characteristics on Antigen Production Among HBV Genotypes

The expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B core-related antigen (HBcAg) (depicted in Figure 1B) did not correspond with that of HBV DNA (Figure 1A) for HBV/B1_PCm, which had rapidly increased antigen expression in the early phase, and then decreased sharply. HBeAg of HBV/B1_PCm was undetectable as expected to confirm the function of the stop codon mutation. In contrast, dynamics of HBcAg and HBeAg expression by HBV/C2 and HBV/A2 resembled those of HBV DNA. The HBcAg levels of HBV/B1_PCm without HBeAg expression revealed lower levels than those of HBV/A2 or C2. To detect core protein alone without detecting HBeAg, only hepatitis B core antigen (HBcAg) was assessed in each mice group at the peak point of HBcAg by enzyme-linked immunosorbent assay. The value of HBV/B1_PCm shown was equal to that of HBV/C2, and higher than that of HBV/A2 (data not shown). HBV antigens of HBV/B1_wild group were detectable, although they had extremely low levels, suggesting a very low replication level for this group. Core protein levels in liver tissue, with adjustment for human albumin levels, showed a similar trend to that of sera (data not shown).

Confirmation of HBV/B1_Wild Infectivity by Using Human Sera

Virus titer of the HBV/B1_wild group was very low and the log time was long in the present study. To further confirm these findings, we used 6 sera: 3 from

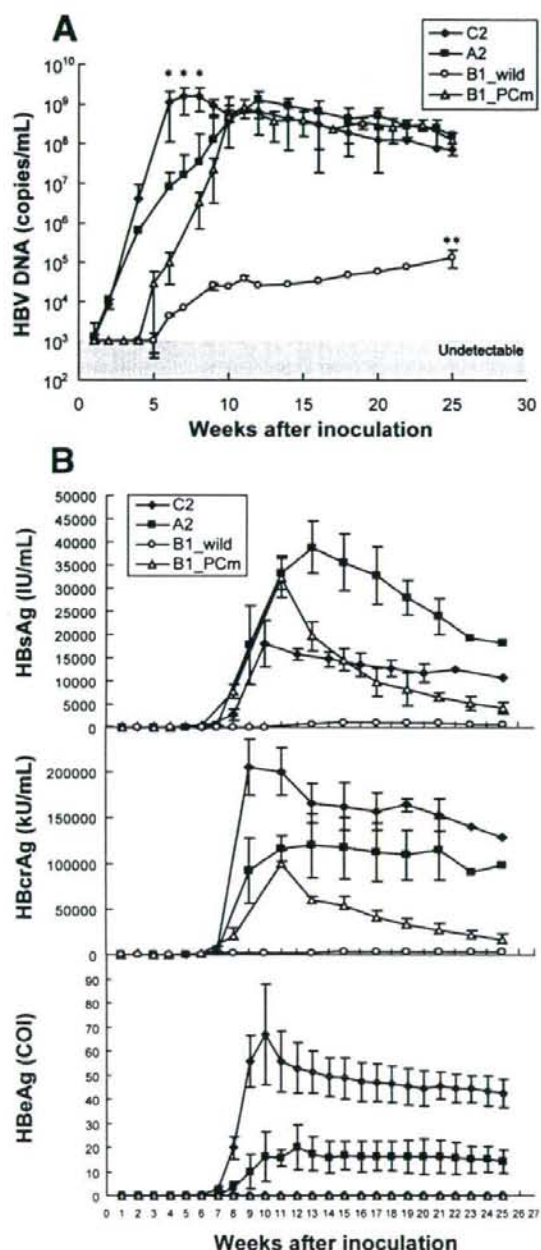


Figure 1. Comparative dynamic profile of HBV DNA and antigen levels in sera of mice inoculated with preinfected mice sera recovered from culture media transfecting HBV construct. (A) Levels of HBV DNA in sera of the chimeric mice inoculated with HBV/A2, C2, B1_wild, or B1_PCm. Shaded gray area (area) below the detection limit (10^3 copies/mL) of the real-time detection PCR assay. *Statistical differences with a *P* value of less than .05. **Statistical differences with a *P* value of less than .01. (B) Dynamic profiles of HBV antigen expression, as revealed by quantification of HBsAg, HBeAg, and HBcAg in sera of the chimeric mice (see Supplementary Materials and Methods section). For each group, mean values observed in 9–11 chimeric mice are depicted with the standard deviation bars.

acute hepatitis B patients harboring precore wild-type HBV/B1 and the other 3 from fulminant hepatitis B patients harboring precore nonsense-mutation B1 (B1_PCm) (Table 2). Three mice were inoculated with each one of the 6 serum specimens adjusted to contain approximately 10^6 copies of HBV DNA (Figure 2A and B). Serum HBV-DNA levels increased immediately after inoculation of HBV/B1_PCm and continued to increase until they reached a plateau at week 6 (Figure 2A), showing extremely high replication efficiency. The window period was shortened to 2 weeks in the acute hepatitis B serum group with HBV/B1_wild; however, the peak of mean HBV-DNA levels still was low (5×10^5 copies/mL), which was similar to the results by inoculation of preinfected-mice sera (Figure 1A). Neither serum levels of the human albumin nor the body weight differed among the mice groups. Based on direct sequencing, no mutations were detected in the HBV complete genomes from any mice 25 weeks after inoculation in comparison with those of inoculated strains.

HBV antigen expression levels of the groups inoculated with human serum samples were compared with those of the groups inoculated with the preinfected-mice sera (Figure 2B). HBV antigens of HBV/B1_PCm waxed and waned in profiles similar to that of the groups inoculated with the mice sera in the early phase.

Liver Pathology of Chimeric Mice Infected With Each Genotype

Figure 3 shows the histology of liver in representative chimeric mice infected with HBV/A2, C2, B1_wild, or B1_PCm during weeks 22–25. The immunofluorescence staining was performed using anti-HBcAg and anti-human albumin polyclonal antibody to confirm the location of HBV infection (Supplementary Figure 1; see Supplementary material online at www.gastrojournal.org). Colocalization of HBcAg and human hepatocytes was shown by double staining for HBcAg and human albumin. Almost all of the mice did not reveal apparent steatosis of hepatocytes with H&E stain. The majority of HBV/C2- or B1_PCm-infected human hepatocytes had a ground-glass appearance on H&E stain, fibrosis of stage 2 with MT stain, as well as neutrophil or monocyte invasion. In contrast, the mice infected with HBV/A2 or B1_wild had neither a ground-glass appearance nor fibrosis. To confirm the ground-glass appearance, these specimens were stained by orcein staining. The orcein staining clearly showed cytoplasmic positivity of human hepatocytes infected with HBV/B1_PCm or C2, but not the other group, including control mice.

Immunostaining Analysis on Expression of α -SMA

Active hepatic stellate cells (HSCs) express α -SMA in the early phase of fibrogenesis. To estimate the activation of stellate cells, we performed immunostaining

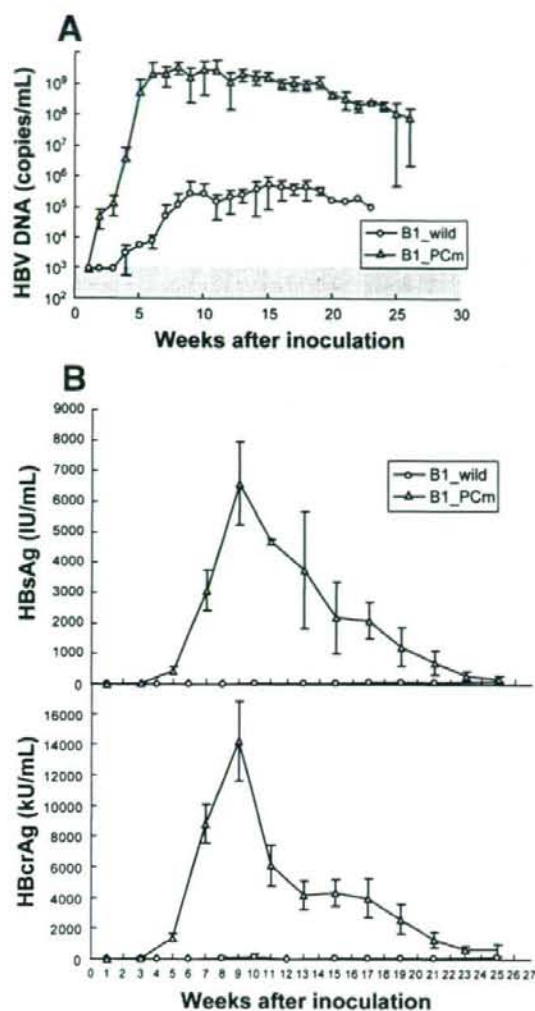


Figure 2. Comparative dynamic profile of HBV DNA antigen levels in sera of mice inoculated with patient sera from HBV/B1_wild (PC_wild type) and HBV/B1_PCm (PC mutant). (A) Mice inoculated with sera from HBV/B1_wild-infected carriers developed acute hepatitis B or from HBV/B1_PCm-infected carriers developed fulminant hepatitis B and were assessed for levels of HBV DNA in mice sera with real-time detection PCR weekly. The area below the detection limit ($<10^2$ copies/mL) is shaded in gray. (B) Dynamic profiles of HBV antigens including HBsAg and HBcAg in mice corresponding to panel A. For each genotype, mean values observed in 9–11 chimeric mice are depicted with the standard deviation bars.

using anti- α -SMA antibody. Immunostaining analysis showed strong staining of α -SMA around fibrosis, which was found by MT staining (Figure 4A). These results indicated that liver fibrosis of HBV/C2 and B1_PCm occurred via profibrotic cytokines from the activated HSCs but not artifacts. The specimen was double-stained for human nuclei and α -SMA to distinguish between

human and mouse cells. As shown in Figure 4B, α -SMA and human nuclei did not stain in the same cells, suggesting that the active HSCs were of mouse origin.

Increased Oxidized State in Liver by HBV Infection

In the fibrosis process, current knowledge establishes that the production of ROS plays a critical role in HSC activation involving transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling.²⁰ Because α -SMA expressed by HSCs was detected in chimeric mice liver, we next investigated ROS production in mice liver. The ROS production was confirmed by dihydroethidium staining (Figure 5A). The level of ROS production was increased statistically when mice were infected with HBV/B1_PC or C2 compared with HBV/A2 or B1_wild ($P < .01$) (Figure 5B). Figure 5C shows representative immunohistochemical staining for 8-OHdG, which is a marker of oxidative DNA damage, in liver; 8-OHdG-positive cells were recognized in both HBV/C2 and B1_PCm groups, whereas few 8-OHdG-positive cells were detected in the other groups. These data were consistent with those of ROS production.

Gene Expression of Fibrosis Markers in the Mice Liver

As for the change of factors associated with TGF- β 1 signaling in the mice, serum alanine aminotransferase (ALT) and TGF- β 1 levels were increased in the fibrosis group (B1_PC and C2) as compared with the nonfibrosis group (A2 and B1_wild) (Figure 6A and B). The TGF- β 1 levels in the fibrosis group showed significant difference ($P < .01$). To determine whether the representative fibrosis-related genes were of human or mouse origin, we established species-specific primer sets. Polymerase chain reaction using the species-specific primers gave bands of specific size showing reliable specificity (Figure 6C) and dissociation curves (data not shown) (the detailed protocol is provided in the Supplementary Materials and Methods section). Gene expression levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and collagen type 1 α 2 were quantified by real-time detection reverse-transcription PCR analyses. Specifically, gene expression of human tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and mouse collagen type 1 α 2 represented significantly higher expression in the fibrosis group than that of the nonfibrosis or control groups ($P < .001$). Matrix metalloproteinase 2 and collagen type 1 α 2 messenger RNA (mRNA) of human origin were undetectable because these genes are produced predominantly in mesenchymal cells.²⁷

Discussion

In the present study, the severe combined immunodeficient mice transgenic for urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes was applied to evaluate genotype-dependent differences in the