

①

学位論文

アヒルB型肝炎ウイルスキャリアーアヒルに於ける
肝炎発症促進の試み

日本消化器病学会雑誌 第89巻 第5号 1992年
(掲載予定)

高下成明

原著

アヒル B 型 肝 炎 ウ イ ル ス キ ャ リ ア ー ア ヒ ル に
於 ける 肝 炎 発 症 促 進 の 試 み

高 下 成 明、 福 田 亮

島 根 医 科 大 学 内 科 学 講 座 第 二

要旨

アヒル B 型肝炎ウイルス (DHBV) キャリアーアヒルに DHBV 蛋白と Freund complete adjuvant (FCA) とを持続接種し、アヒルの DHBV に対する免疫能を賦活することで、活動性のある肝炎の発生が見られた。FCA 単独接種では有意に強い炎症所見は見られないが、DHBV 蛋白を FCA と混合して腹腔内や肝内に持続接種する事でキャリアーアヒルにのみ、門脈域の細胞浸潤を特徴とするヒトの慢性活動性肝炎 (CAH) 様の所見が観察された。同時に、これらのアヒルでは血中 DHBV-DNA の有意な低下も見られた。肝炎の程度は同蛋白の接種回数を増すほど有意に炎症所見が強くなる傾向が見られたが、実験アヒル間で個体差が見られた。同時に行ったアヒルの肝 microsome 分画を含む蛋白溶液の接種実験では肝炎所見の増加はなかった。現在まで hepadnavirus とその本来の宿主との系において慢性肝炎をみるモデルは woodchuck 以外には無く、DHBV を用い

た C A H 様炎症の発生に関する動物実験はヒトの肝炎発症機構の解明に有用であると考えられた。

索引用語

DHBV, Freund complete adjuvant, 実験肝炎

緒言

B型肝炎ウイルス (HBV) キャリアーにおける慢性肝炎の発症機序に関しては、transgenic mouseを用いた実験など *in vitro*系での解析が進んでいるが^{1) 2)}、woodchuck hepatitis virus (WHBV)^{3) 4)}を除いては *in vivo*で宿主と本来の感染ウイルス系を用いて慢性肝炎を生ずる HBVのモデルはない。アヒル B型肝炎ウイルス (DHBV)⁵⁾は HBVと同じ hepadna virus に属し、HBV に類似した感染様式を示し、HBV のモデルとして使用されている^{6) 7)}が、DHBV キャリアーアヒルには活動性肝炎の発症が見られず、healthy carrier に終始する^{6) 8)}。この為、慢性肝炎、肝硬変から肝癌に至る実験モデルとしては不適であるが、扱いやすさ、入手しやすさから、DHBV/アヒル系に慢性肝炎を生じせしめれば、HBV のよいモデルとして期待される。

我々は DHBV キャリアーアヒルに活動性の強い肝炎を発症させる手段として、DHBV 蛋白を

持続接種すると同時に、非特異的にアヒルの免疫能を増強させる FCA を投与し、肝炎発症の有無を検討した。同時に、慢性肝炎の一標的抗原と推測される肝細胞膜蛋白を含む肝 microsomal fraction (LM 蛋白) を FCA と共に持続的に接種し、その肝組織像を検討したので報告する。

材料と方法

1、実験動物及び実験計画

A) アヒルの処理法別分類

日本産ペキンアヒル 117羽を DHBV キャリアーアヒル (82羽) と非キャリアーアヒル (35羽) に大別した。DHBV キャリアーアヒルは、フ化当日に DHBV-DNA 陽性アヒル血清 $25 \mu\text{l}$ (約 4×10^9 個 virion) を足静脈より接種して作製したものである。この方法⁷⁾を用いると、接種アヒルを 100% に DHBV キャリアーアヒルとする事ができると報告されている。実験期間中こ

これらのキャリアーアヒルと非キャリアーアヒルは別々の実験室内で、水と市販の合成飼料により飼育された。これらのアヒルを更に、FCAの投与別、DHBV蛋白投与の有無及び投与方法別、及びLM蛋白投与の有無により、以下の7群 (Table 1) に分類した。

すなわち、1: キャリアーアヒルに FCAを腹腔内投与する群 (12羽)。2: キャリアーアヒルに FCAと DHBV蛋白を腹腔内に投与する群 (20羽)。3: キャリアーアヒルに FCAと DHBV蛋白を肝臓内に投与する群 (24羽)。4: キャリアーアヒルに FCAと LM蛋白 (後述する) を肝臓内に投与する群 (14羽)。5: 無処理群 (12羽)。6: 非キャリアーアヒルに FCA を腹腔内に投与する群 (12羽)。7: 非キャリアーアヒルに FCAと DHBV蛋白をともに、肝臓内に投与する群 (23羽) である。

B) DHBV蛋白の調整

既報のごとく Marionらの方法⁹⁾に基づいて、

DHBV感染アヒル血清からCsCl密度勾配平衡遠心法を用いてDHBV蛋白を精製し、PBSに溶解後、等量のFCAを加えemulsionにして免疫用に用いた。1回の免疫にはDHBV蛋白として約5 μ gを用いた。

C) 肝 microsomal fraction 蛋白 (LM蛋白) の調整

1カ月令のアヒルの肝臓を0.25M sucrose, 5mM Tris-HCL (pH 8.0), 3mM CaCl₂, 1mM EDTAを含むbuffer内でhomogenateし、8.000gで粗遠心後、上清を4 $^{\circ}$ Cで105,000gで1時間超遠心した沈澱をLM蛋白とした¹⁰⁾。LM蛋白投与群では、同蛋白50ngをFCAとemulsionにして肝臓内に投与した。

D) FCA、DHBV蛋白及びLM蛋白の投与方法及び経過中のsampling法

FCA投与は各群ともフ化後10日目よりFCAに等量の生食を加えemulsionとし、その50 μ l

を週3回の割合で投与した (Fig.1)。更に DHBV 蛋白投与群と LM 蛋白投与群では、各々上述した分量をフ化後2週目より1週毎に9週目まで投与した。FCA、DHBV 蛋白、LM 蛋白の投与には、腹腔内、肝臓内とも経皮的に、皮膚を消毒用アルコールで清拭したのち26ゲージの注射針を用いて注入した。DHBV 蛋白、LM 蛋白投与群とも図1のごとく DHBV 蛋白、LM 蛋白投与後1週目に採血し、以後は2、3、4週目に3ないし9羽ずつ屠殺し、9週目にも5羽ずつ屠殺し肝臓と血清を採取した。FCA 投与群、コントロール群では、DHBV 蛋白、LM 蛋白投与群の屠殺週令に一致する週令で、3ないし5羽ずつ屠殺し、肝と血清を採取した。血清は血中 DHBV-DNA の検出に用い、肝臓は病理組織学的検討に用いた。

2、 血中 DHBV-DNA の 検 出

血清 15 μ l を用いて、 32 P でラベルした DHBV-DNA を probe とした spot hybridization test¹¹⁾ を行い血中 DHBV-DNA を検出し、autoradiogram から既知量の DHBV-DNA を標準として densitometry を用いて DNA 量を定量した。

3、 肝 臓 の 組 織 学 的 検 討

ホルマリン固定後、パラフィン包埋した肝臓切片を H & E 染色後、肝臓の炎症所見を炎症性細胞の浸潤程度から Marion らの基準⁹⁾に基づいて 0 から +++ に分類した。

4、 推 計 学 的 検 討

血中 DHBV-DNA 値の有意差検定には student's t test を行い、各群間の肝炎の程度の比較には χ^2 検定を行った。

結果

1 血中 DHBV-DNA の比較

1 週目の時点では各群とも DHBV-DNA 値に有意な差はみられなかった。薬剤無処理キャリア一群では経過中 DHBV-DNA の低下は見られなかった (Fig. 2)。FCA 腹腔内投与のみの群では投与 2 週目より 4 週目にかけて DHBV-DNA の低下傾向が見られたが、無処理群との間に有意差はなかった。

また FCA+DHBV 蛋白の腹腔内投与群では投与後 2 週目より、DHBV-DNA が低下し始め、3、4 週目及び 9 週目では同時期の無処理群に比し各々有意に ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$) 低値であった。FCA+DHBV 蛋白の肝臓内投与群では 4 週目から無処理群より有意な ($p < 0.05$) 低下が観察され、9 週目の時点では 100.2 ± 51.2 と無処理群の約 5 分の 1 にまで、有意に ($p < 0.01$) 低下しており、各群中最も DHBV-DNA は低値であった。

2 肝組織像の比較

A、非免疫群 (Table. 2)

1) 無処理 DHBVキャリアーアヒル

無処理のキャリアーアヒル (Table. 2) では実験期間中に炎症所見±を呈した1羽を除き全例肝炎所見はなく、healthy carrierの状態であった (Fig. 3.A)。

2) FCA腹腔内投与群

非キャリアーアヒルでは投与後4週目に+が1例みられたが残りは±以下であり、有意の炎症所見は無かった。キャリアーアヒルでは投与後4週目に++が1例みられた他、+も5羽あり非キャリアーアヒルに比し炎症所見はやや強い傾向にあったが前述の無処理キャリアーアヒル及び非キャリアーアヒルに比べて、有意の増加ではなかった。

B、免疫群 (Table. 3)

1) FCA + DHBV蛋白投与群

a. DHBVキャリアーアヒル

腹腔内投与 (Table. 3) により、2週目より5羽中4羽までが +/++ で、3週目もほぼ同様の傾向を示し、明かに FCA 単独投与のみの群より肝炎の増強が見られた ($p < 0.05$, Table. 4)。更に9週目では4羽全例に +/++ 以上で1例に +++ が見られ、有意に炎症所見の増加が認められた。これらの肝炎所見は実質内の巣状壊死とともに、門脈域における著明な細胞浸潤が特徴で (Fig. 3. B)、一部で限界板の破壊を伴う piecemeal necrosis 様所見が観察され、実質内にも巣状壊死 (Fig. 3. C) を認めるなどヒトの B 型慢性肝炎における CAH に類似した肝炎像であった (Fig. 3. D)。肝内注入群では3週目まではほぼ腹腔内投与群と同様であるが、4週目では9羽中3羽に +++ がみられた。更に9週目では5羽中4羽までが +++ であり、これは4週目までの肝炎の程度に比し有意に ($p < 0.05$) 強かった (Table. 4)。また腹腔内投与群との間に肝炎の程度の有意

差はなかった。肝内注入群の特徴として実質内に大小の granuloma がみられた (Fig. 3.E)。各群とも、同じ投与期間でも肝炎の程度は + から +++ までと幅広く、肝炎の強さにはアヒルの個体差がみられた。

b. 非キャリアーアヒル

FCA + DHBV の肝内注入群 (Table. 3) でも非キャリアーアヒルでは、肝炎は全例に + 以下であり、同様処理のキャリアーアヒルで観察された肝炎に比し有意に軽度であった ($p < 0.005$, Table. 4)。また、キャリアーアヒル同様、肝実質内に granuloma が認められたが、非キャリアーアヒルでは granuloma はキャリアーに比して小数で、小さいものが多かった。

2) LM 蛋白投与群

投与後 3 週目で 1 羽が + / ++、9 週目で 5 羽中 2 羽が ++ であったが (Table. 3)、残りは + 以下の肝炎のみで同じ肝臓内注入群でも DHBV

蛋白投与群に比して肝炎は軽度であった ($p < 0.005$, Table. 4)。また全例に軽度の granuloma がみられた。

考 察

著者らは、肝炎は感染ウイルス蛋白に対する宿主の免疫反応であると言う仮説に基づき、既に種々の免疫調節剤を投与したアヒルを用いて DHBV 感染実験を行い、免疫賦活剤投与により、一過性感染例ではあるが肝炎の増強される事、またキャリアーアヒルで viremia が短縮される事を報告した。福田ら¹²⁾は同様に免疫賦活剤である OK432 投与により、DHBV 関連肝病変の活動性の増強が見られる事を報告している。本実験で DHBV 蛋白と FCA でキャリアーアヒルを免疫することにより、通常では healthy carrier として経過するアヒルに、人の CAH 様の肝炎が生じる事が示された。FCA は抗原と emulsion にすることで、その抗原の免疫原性を高める adjuvant 作用を持つが、それ

自体，結核菌成分を含む強力な液性及び細胞性免疫賦活作用を持つ¹³⁾。本実験でFCAを併用投与したのも、肝炎がウイルス蛋白に対する細胞性免疫反応であると考えられている事より¹⁴⁾、宿主の免疫状態を高めて肝炎発症を促進する為である。フ化後10日目よりDHBV蛋白の投与を開始した理由は日高ら¹⁵⁾の基礎実験より、アヒルの immune stateがフ化7日目と14日目の間にほぼ完成することが明らかにされており、フ化10日目はこの発育曲線の上昇期に位置し、この時期に宿主の免疫を非特異的に賦活するのが最も効果的と考えられた為である。

FCAのみの投与では、キャリアーアヒルと無処理アヒルの間に有意な差はなく、FCA単独接種では肝炎発症促進作用は弱いと考えられた。しかし、DHBV蛋白とFCAを混合して接種した場合、DHBVキャリアーアヒルに見られた炎症所見が有意に強い。この事はアヒルの体内において、持続的に接種されたDHBV蛋白に

対してある種の免疫反応、ある意味では異物に対する反応が生じ、この免疫反応を介して肝細胞の障害が引き起こされた為と考えられる。現在、ウイルス肝炎における肝細胞障害の機序として肝内浸潤細胞の subset の解析から、肝細胞膜上のウイルス抗原に対する細胞障害性 T 細胞による攻撃や^{16) 17) 18)}、特異抗体が関与する antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 等が考えられている¹⁹⁾。現在までのところ、アヒルの免疫系とくに細胞性免疫機構の解明はほ乳類に比して遅れていることもあり^{20) 21)}、浸潤細胞の特定は未解決の問題である。従って、今回発症した肝炎が、in vivo に於ける抗体産生の増強による ADCC の結果を見ているものか、in vivo でキラー T 細胞の反応を直接みているものかは確定しえない。しかし、今回観察された炎症は、明らかに DHBV 蛋白の接種と深く関連しており、これらの肝炎がウイルス蛋白に対する宿主の反応であると考えられることから、

HBV関連肝疾患同様にCML, ADCCが関与する可能性は高い。特異抗原に対する免疫反応の発動からウイルス感染細胞の破壊までには抗原提示細胞によるウイルス蛋白のprocessingとHLA classII拘束性の抗原提示、抗原特異性ヘルパーT細胞の誘導、HLA classI拘束性のキラーT細胞の誘導活性化という複雑な免疫担当細胞間のinteractionが必要であるが、FCAのみの接種では有為な肝炎の増強がないことから、DHBVキャリアーにおいて非特異的にこの複雑な免疫回路のどこかを増強してもDHBVを異物と認識して排除する程の反応は起らなかった事になる。従って、DHBVの蛋白を再度強く特異抗原として認識させた為に、これらの回路が活性化され肝炎の発症に至ったと考えられる。しかしキャリアーではDHBVは血中に大量に存在しており、今まで不応答だったものが免疫反応を示すと言うことはDHBV粒子をFCAと混合したものが免疫原として認識された事を意味している。この場合、2つの可能性

が考えられる。1つは単にFCAが本来の adjuvantとしての作用を示し、DHBV蛋白の抗原性を高めた場合である。肝臓内に接種した群に炎症が強いのは、肝臓の macrophage を抗原提示細胞として強く活性化した事と関連するのかもしれない。FCAは主として抗体産生即ち、液性免疫を増強させるとされているが、抗原性の低い腫瘍抗原の抗原性を高め、腫瘍細胞を破壊するなど細胞性免疫の増強も見られ²²⁾、今回の実験で見られた炎症にも上述した ADCC、CMLの両機序が考えられる。接種に用いたDHBV蛋白としてDHBV粒子そのものを材料としているため、主としてs抗原が免疫原と考えられるが、SDS-PAGE上、Pre-S抗原、c抗原なども含まれ²³⁾²⁴⁾、当然これらも免疫原として作用すると思われるが、DHBVではS抗原やe抗原の分離採取法が確立されておらず、今回の実験ではどの蛋白が刺激抗原として有効であったかは検討しえなかった。もう一つの可能性はFCAと混合することでDHBV蛋白が変

化を受け、新たな抗原として認識される場合である。FCA単独接種では有為なDHBV-DNAの低下が見られないことからFCAが肝細胞内のウイルスの増殖に影響する可能性は少ない。また、FCAが非特異的にinterferonやtumor necrotizing factorなどの産生を介して細胞内でのDHBV抗原の細胞膜への移行や、被覆抗原の表出、HLA抗原との複合体形成に促進的に働く可能性もあるが、FCA単独では炎症が強くないこと、更に自己蛋白でも抗原提示細胞によりprocessingされHLA複合体を作る事からDHBV蛋白も抗原提示細胞によりprocessingをうけてHLA抗原と複合体を形成していると考えられるが²⁵⁾、肝炎の増強が弱いことを考えると、後者の可能性は高いと推測される。この場合は特に細胞膜上の既存のウイルス抗原と交差性を持つような新たな抗原として認識され、肝炎の標的となった事が推測される。

血中DHBV-DNAの推移と比較してみると、全体として観察期間が長くなるにつれてDHBV-

DNAの低下傾向が見られる。炎症反応のほとんど無い healthy carrierでは DHBV-DNAの低下が殆ど見られないことから、肝炎発症がウイルスの増殖抑制と関連する事を示している。これには肝炎による DHBV増殖細胞の破壊による DHBV-DNAの減少の可能性もあるが、浸潤細胞が分泌する IFN- γ 等の因子を介したウイルスの replication の阻害機構も考えられる²⁶⁾。

慢性肝炎の一因として、ウイルス抗原以外にいくつかの肝細胞膜の構成蛋白に対する宿主の免疫反応が推測されており、Myer zumⁿ Buschenfeldeらがマウスに兎の肝細胞から抽出した Liver specific membrane proteinを投与して慢性肝炎に類似した所見を得たことはよく知られている²⁷⁾。今回われわれの実験で獲られたアヒルの肝細胞 microsomal fraction (LM蛋白) はゴルジ装置、小胞体などの膜分画以外の成分を含んでいるが¹¹⁾、細胞膜上の種々の蛋白を含んでおり、これらの中には自己免疫肝炎の際の抗原となりうるとされ

たものも含まれると考えられる。本実験ではこれらのものを含む蛋白分画を投与しても、対象と比較して有意な変化が見られていない。故に肝細胞膜に対する反応は、少なくとも今回みられたDHBV蛋白投与後の肝炎においては関与が少ないと判定される。

この系を用いて慢性肝炎の発症機構について解明するのは今後の仕事である。しかし、naturalに感染すべき宿主とそれに感染するhepadna virusの系を用いてCAH様の所見が得られた点は大きな進歩と思われる。更にこの系を用いることで、肝炎の標的抗原を解明できる可能性があり、我々も既にrecombinantのDHBV-c抗原を用いて実験を開始している。加えて、本実験でみられた炎症細胞浸潤はかなりの個体差が見られ、この事はHBVキャリアーにおいても一部の症例にしか進行性の肝疾患が見られない事²⁸⁾、又その抗原に反応するか否かは免疫応答遺伝子により規定されること²⁹⁾とよく対応している。免疫増強により肝

炎が増強し、更にこの反応に個体差があることはアヒルと人間のウイルス肝炎の発症に関して共通の反応機構の存在を示唆し、DHBVがHBVのモデルとして、肝炎の機構解明に有用である可能性を示すものと考えられた。

謝 辞

研究にあたり御指導頂きました島田宜浩名誉教授に深謝の意を表します。

附 記

本論文の要旨は第29回日本肝臓学会総会（東京）、第25回日本肝臓学会西部会（出雲）において発表した。本実験の一部は厚生省非A非B型肝炎研究費補助金によった。

文献

- 1) Araki K, Miyazaki J, Hino O, Tomita N, Chisaka O, Matubara M, Yamamura K: Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:207-211
- 2) Moriyama T, Guiuluhot S, Klopchin K, et al: Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. Science 1990, 248:361-364
- 3) Gerin JL: The woodchuck (*Marmota monax*): an animal model of Hepatitis B virus-like infection and disease. In: Chisari F, eds, Advances in Hepatitis Research, New York, Masson Publishing USA, 1984, 40-48.

- 4) Summers, J., J.M. Smolec, and R. Snyder.
A virus similar to human hepatitis B
virus associated with hepatitis and he-
patoma in woodchucks. Natl.
Acad. sci. U.S.A. 1978, 75:4533-4537
- 5) Mason WS, Seal G, Summers J: Virus of
Pekin Duck with structural biologic-
al relatedness to human hepatitis B
virus J. Virol 1980, 36:829~836
- 6) Marion PL, Kight SS, Ho BK, et al:
Liver disease associated with duck
hepatitis B virus infection of dome-
stic ducks. Proc. Natl. acad. Sci. USA
1984, 81:898~902
- 7) 福田 亮: アヒル B 型肝炎ウイルス感染 -
その感染様式と肝病変におけるヒト B 型肝
炎ウイルスとの比較 -。 肝臓 1987. 28:1-7

- 8) Uchida T, Suzuki K, Arii M, et al: Geographical pathology of duck liver infected with duck hepatitis B virus from Chiba and Shimane in Japan and Shanghai in China. *Cancer Research* 1988, 48:1319~1325
- 9) Marion PL, Knight SS, Fettelson MA, et al: Major polypeptide of duck hepatitis B virus surface antigen particles. *J Virol*; 1983, 48:534-541
- 10) Tanigawa Y, Shimoyama M, Asamizu J and Ueda I: Subcellular localization of nicotinamide deamidase in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1971, 230:510-517
- 11) Scott J, Hadchouel M, Hery C, et al: Detection of hepatitis B virus DNA

in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers.

Hepatology 1983, 4:279~284

12) Fukuda R, Okinaga S, Akagi S, et al:
Alteration of infection pattern of duck hepatitis B virus by immunomodulatory drugs. J Med Virol 1988, 26:
387-396

13) Freund J: The mode of action of immunologic adjuvants. Adv Tuberc Res 1956; 7:130-148

14) Dudley FJ, Fox RA, Sharlock S: Cellular immunity and hepatitis-associated Australia antigen liver disease. Lancet 1972, 1:723-726

- 15) 日高光宣：免疫能の発育から見たアヒル型肝炎ウイルスの感染様式の差異。
肝臓 1991, 32: 256-265
- 16) Wands JR, Isselbacher KJ: lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 1974, 72: 1301-1305
- 17) Mondelli M, Vergani GM, Alberti A, et al: Specificity of lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: Evidence that T cell are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. J Immunol 1982, 129: 2773-2779
- 18) Pignatelli M, Waters J, Lever A, et al: Cytotoxic T cell response to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic

hepatitis. Evidence that antibody modulation may cause protracted infection. *J Hepatol.* 1987, 4:15-22

19) Vergani D, Mondelli M: Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver.* 1987, 7:307-315

20) Higgins DA, Chung SH: Duck lymphocytes I. purification and preliminary observation on surface markers. *J Immunol Method.* 1986, 86:231-238

21) Higgins DA, Chung SH: Duck lymphocytes . II. Culture conditions for optimum transformation response to phytohaemagglutinin. *J Immunol Method* 1988, 106:135-145

- 22) Koga S, Kiyohara T, Taniguchi K, et al
: BCG induced killer cell activity.
Urol Res. 1988, 16:351-355
- 23) 福田 亮、島田宜浩、広畑 衛、今井正信
: 抗アヒルB型肝炎ウイルス粒子抗体の作
製。HBVのモデルとしての可能性の検討
三豊総合病院雑誌 1989, 10:71-76
- 24) 横須賀収、小俣政夫、伊藤よしみ、他:
Pre-S1/S2, core抗原ポリペプチドの肝
内における発現について—DHBV感染実
験での経時的検討—, 肝臓 1988, 29: 13
-17
- 25) Lorenz R, Allen PM: Processing and pr-
esentation of self protein. Immunol
Rev 1988, 106:115-127

- 26) Inoue M, Kakumu S, Yosioka K, et al:
Hepatitis B core antigen-specific
IFN- γ production of peripheral blood
mononuclear cells in patients with
chronic hepatitis B virus infection.
J Immunology 1989, 142:4006-4011
- 27) Meyer zum Büschenfelde KH, Miescher
PA: Liver specific antigens, purifica-
tion and characterization. Clin Exp
Immunol 1972, 10:89-102
- 28) 倉井清彦、飯野四朗、鈴木 宏 他: B
型肝炎ウイルス持続陽性者の長期観察—
特に肝機能とHBe抗原・HBe抗体系
との関連について—。肝臓 1984, 25:
1394-1405

29) Celis E, Oud, Otvos L: Recognition of HBsAg by human T lymphocytes. Proliferative and cytotoxic responses to a major antigenic determinant defined by synthetic peptides.

J Immunol 1988, 140:1808 ~ 1815

Attempt to cause hepatitis in duck hepatitis B virus carrier ducks by immunization with DHBV protein

Naruaki KOHGE , Ryo FUKUDA

The Second Department of Internal Medicine, Shimane Medical University (Izumo) Enya-cho 89-1, Shimane 693, Japan

In order to investigate the hypothesis that viral hepatitis is a host immune response against viral protein presented on hepatocytes, we attempted to cause hepatitis in DHBV carrier ducks by immunization with DHBV protein. While ducks injected with Freund Complete Adjuvant (FCA) showed only weak hepatitis, those immunized with DHBV particle protein showed severe hepatitis.

This same procedure could not cause significant inflammation in the liver of ducks without DHBV infection. The severity of hepatitis was well associated with the frequency of the immunization. However, the degree of hepatitis activity was different among same times immunized ducks. Occurrence of hepatitis assumed to have close association with host immune response against viral protein.

DHBV: Duck Hepatitis B Virus

ip: intraperitoneal injection

ih: intrahepatic injection

prot: protein

LM: Liver Membrane

(Liver microsomal fraction)

() : number of ducks

Table 1. Classification of ducks according to the inocula and route of the injection.

DHBV carrier ducks (82)	FCA i.p. (12)
	FCA i.p. + DHBV prot.i.p. (20)
	FCA i.h. + DHBV prot.i.h. (24)
	FCA i.h. + LM prot.i.h. (14)
	not treated (12)
non DHBV carrier ducks (35)	FCA i.p. (12)
	FCA i.h. + DHBV prot.i.h. (23)

FCA : Freund Complete Adjuvant
 DHBV : Duck Hepatitis B Virus
 i.p.: intraperitoneal injection
 i.h.: intrahepatic injection
 prot.: protein
 LM : Liver Membrane
 (Liver microsomal fraction)
 () : number of ducks

Table 2 Relationship between treatment of ducks and the degree of hepatitis.
 — non-immunized group —

Degree of hepatitis	Treatment												
	NT ¹⁾				FCA i.p. ²⁾								
	DHBV carrier				non-carrier				DHBV carrier				
	Sampling time ³⁾												
	2	3	4	9	2	3	4	9	2	3	4	9	
###													
##													
+											1		
+ /+													
+							1			1	2	2	
±		1				3	2	2		2	3	2	1
0		2	3	3	3			1					

Data are shown as the number of Ducks

NT¹⁾: not treated

ip²⁾: intraperitoneal injection

Sampling time³⁾: Numbers correspond to the observation period after starting the immunization in the immunized groups

Table 3 Relationship between treatment of ducks and the degree of hepatitis.

— Immunized group —

Degree of hepatitis	Treatment											
	DHBV+FCA i.p ¹⁾				DHBV+FCA i.h ²⁾				FCA+LM i.h			
	DHBV carrier				DHBV carrier		non carrier		DHBV carrier			
	Sampling time ³⁾											
	2	3	4	9	2	3	4	9	2	3	4	9
###												
##				1			3	4				
+	1	2		1	3	1	1	1				
+ +	3	1		2	1	1	3				1	2
+	1	2	2		1	3	2		2	3	1	2
±			3				*		2	2	2	3
0									1	2	3	

Data are shown as the number of ducks

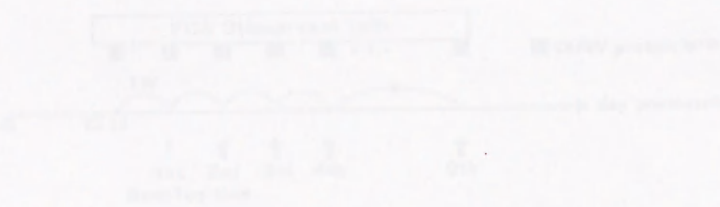
*P<0.05

ip¹⁾ intraperitoneal injection

ih²⁾ intrahepatic injection

Sampling time³⁾ week after starting the immunization

FCA+DHBV protein



FCA+LM protein

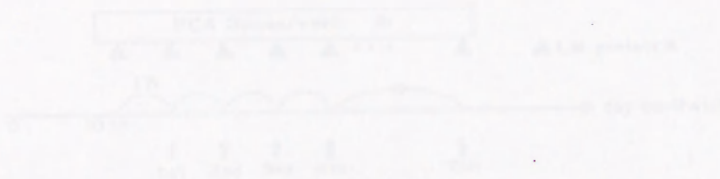


Table 4 Statistical analysis of degree of hepatitis activity.

Ducks ¹⁾	Immunization	Statistical significance
DHBV-carrier	(-)	* ***
	DHBV i.p ²⁾	
	DHBV i.h ³⁾	***
non-carrier	LM i.h	***
	DHBV i.h	***

1) All the ducks were injected with FCA regardless the immunization.

2) i.p: intraperitoneal injection

3) i.h: intrahepatic injection

*P<0.05, **P<0.005 (χ^2 test)

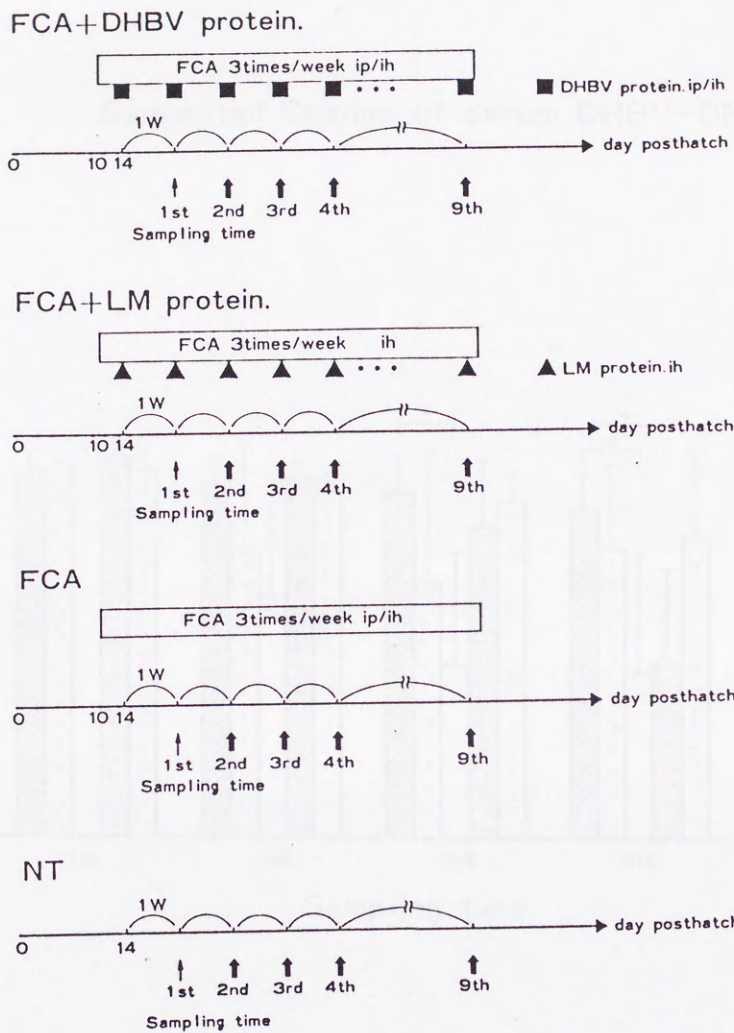


Figure. 1 Experimental schedule of the treatment of ducks.

FCA: Freund complete adjuvant, DHBV protein: duck hepatitis B virus protein, ip/ih: intraperitoneal or intrahepatic injection, LM protein: liver membrane protein, NT: not treated

small arrow indicates serum drawing only and large arrow indicates sacrifice. Number in sampling time means the week after the injection of immunogens. In FCA and NT group, the number in sampling time corresponded to the week in other groups.

Sequential Change of serum DHBV-DNA amount

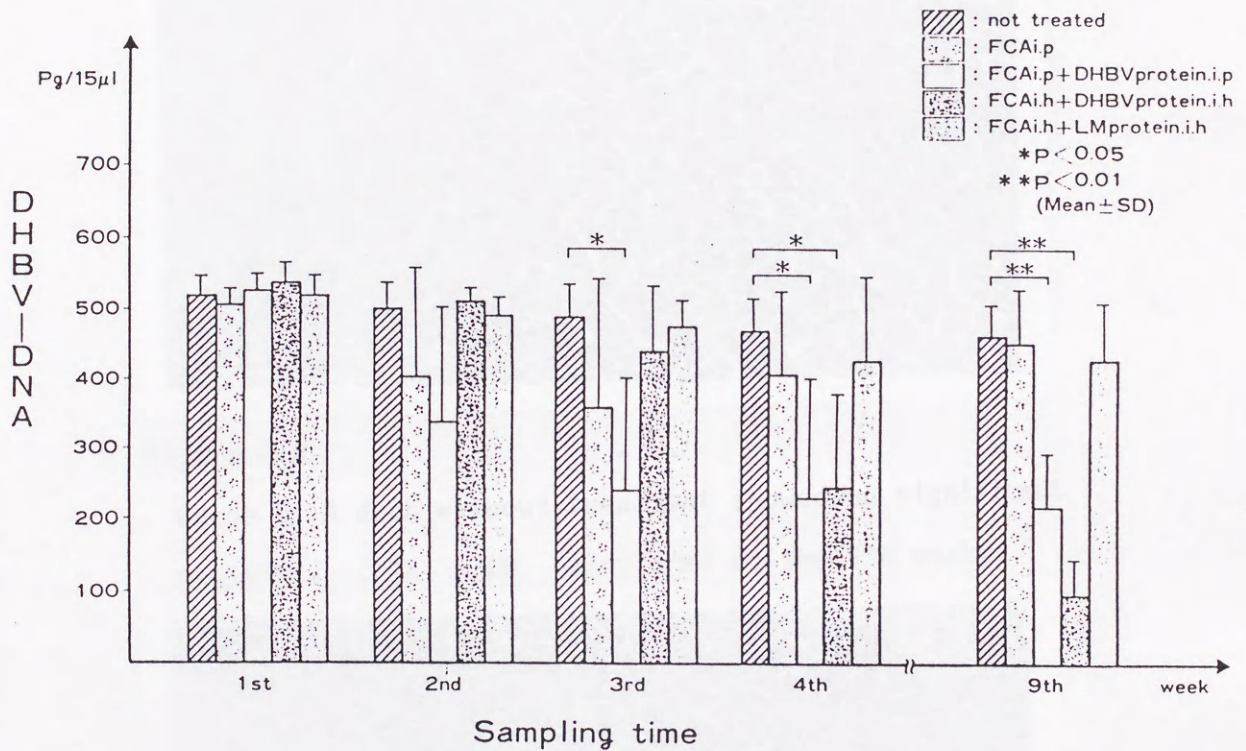


Figure. 2 Sequential changes of serum DHBV-DNA amount.

The amount of DHBV-DNA in ducks without treatment did not show the significant decrease throughout the observation period. Significant decrease of DHBV-DNA was seen in ducks treated with DHBV protein injection compared with those in ducks without treatment.

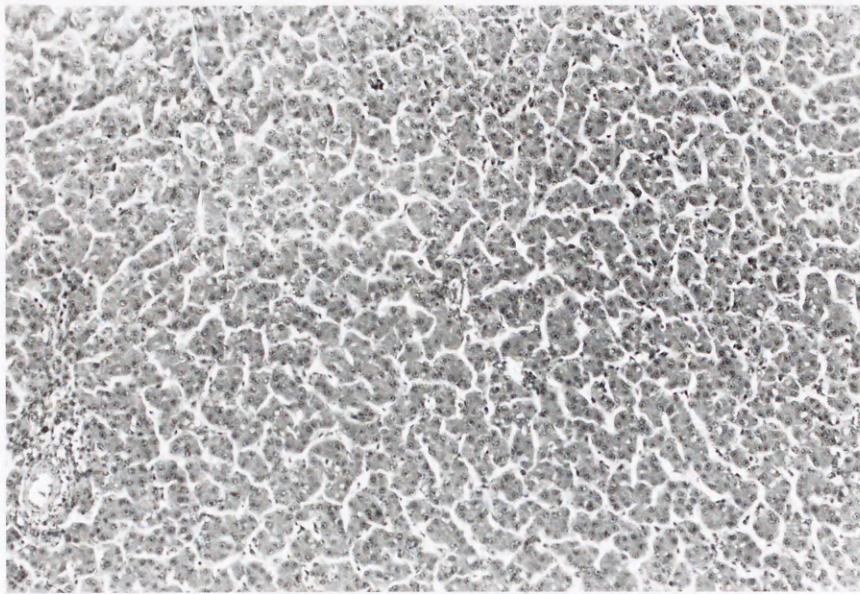


Figure.3.A

Grade 0. A duck without treatment showed no significant hepatitis. (H&E, x100, sacrificed at the 9th week)

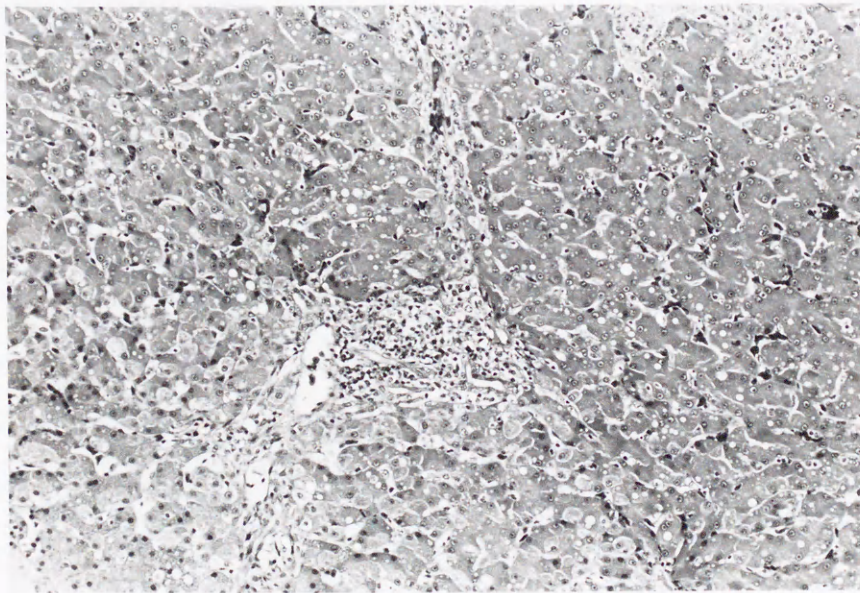


Figure.3.B

Grade III. A liver of duck injected intrahepatically with DHBV protein and FCA showed accumulation of lymphocytes in the portal tract with destruction of the limiting plate. (H&E, x200, sacrificed at the 9th week)

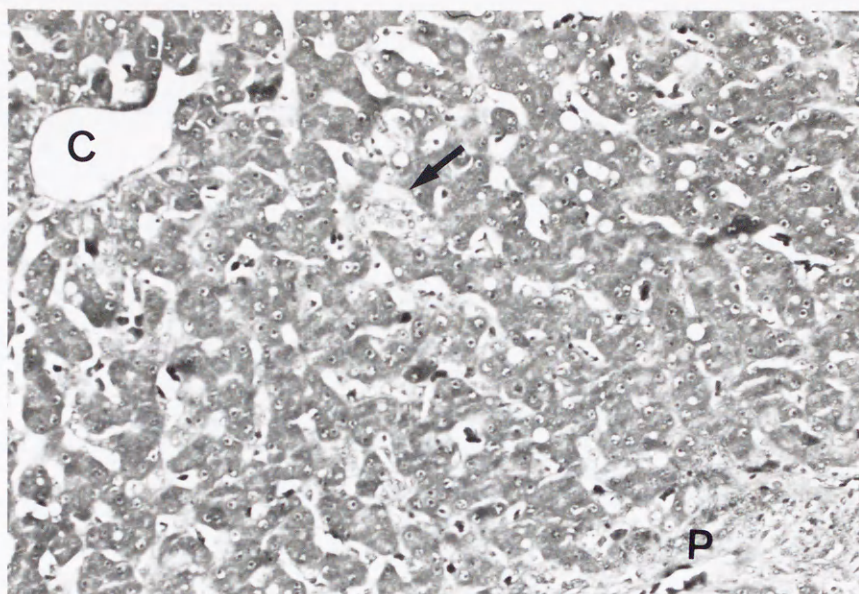


Figure.3.C Spotty necrosis. Intralobular spotty necrosis was seen in duck liver injected with DHBV protein intrahepatically (arrow).

P: portal tract C: Central vein

(H&E, X200, sacrificed at the 4th week)

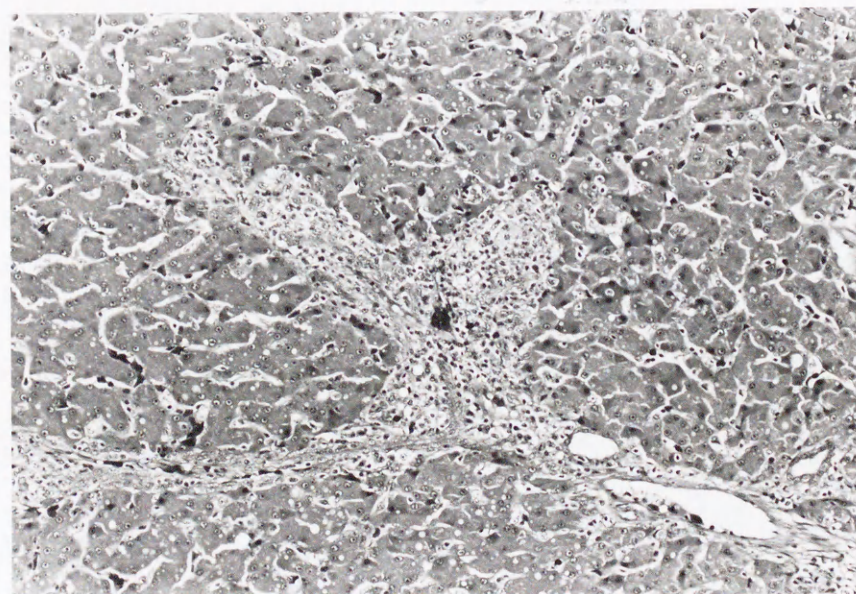


Figure.3.D Grade +++. A duck injected with DHBV protein intrahepatically showed severe hepatitis.

(H&E, X200, sacrificed at the 9th week)

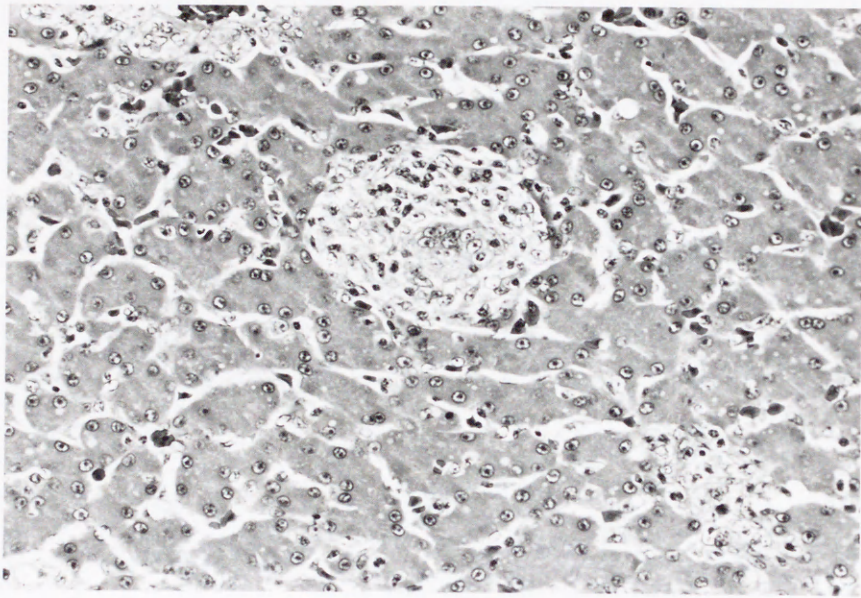
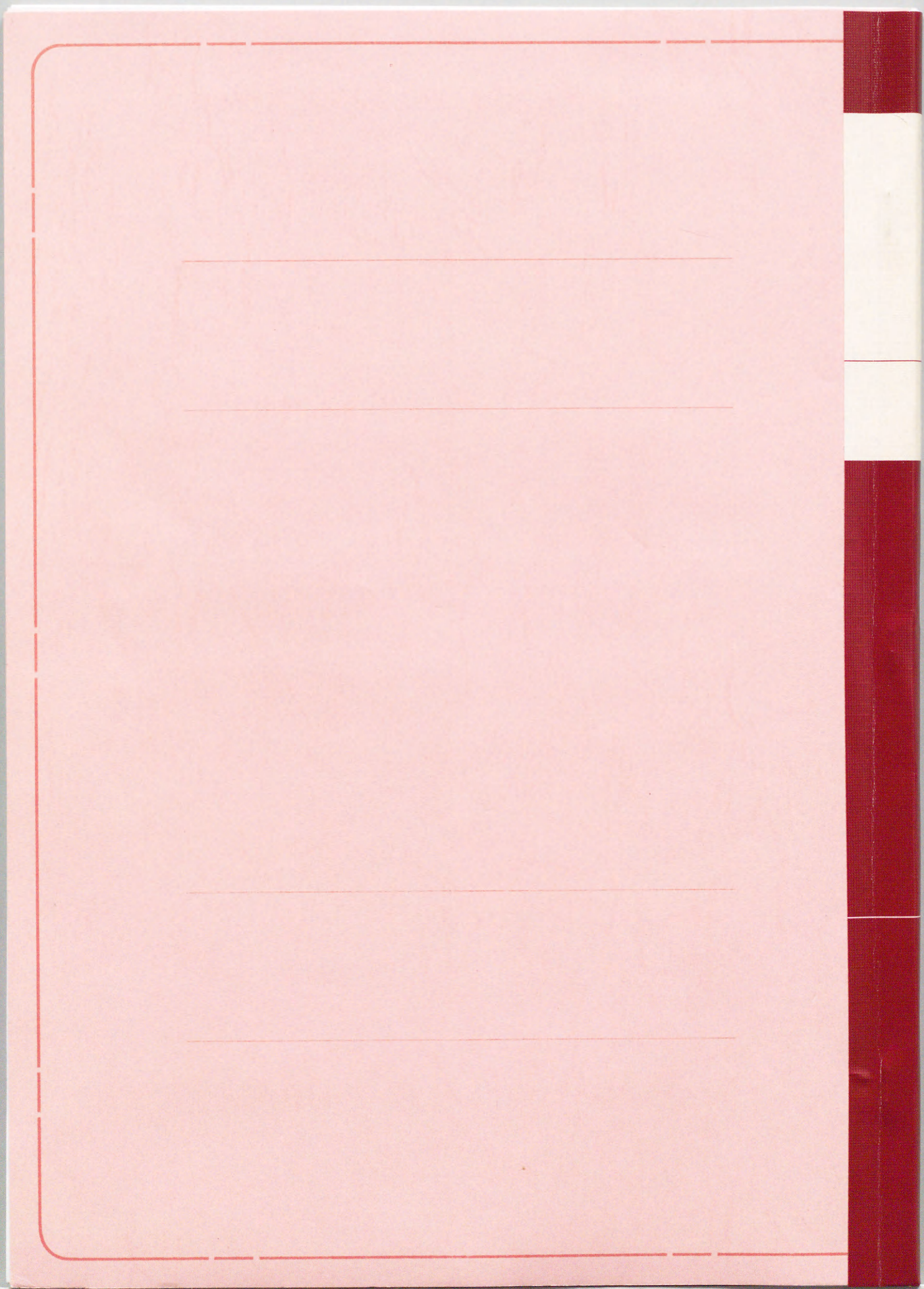


Figure.3.E

A duck injected with DHBV protein intrahepatically showed some granulomas in the parenchyma with various sizes.(H&E,X200,sacrificed at the 4th week)



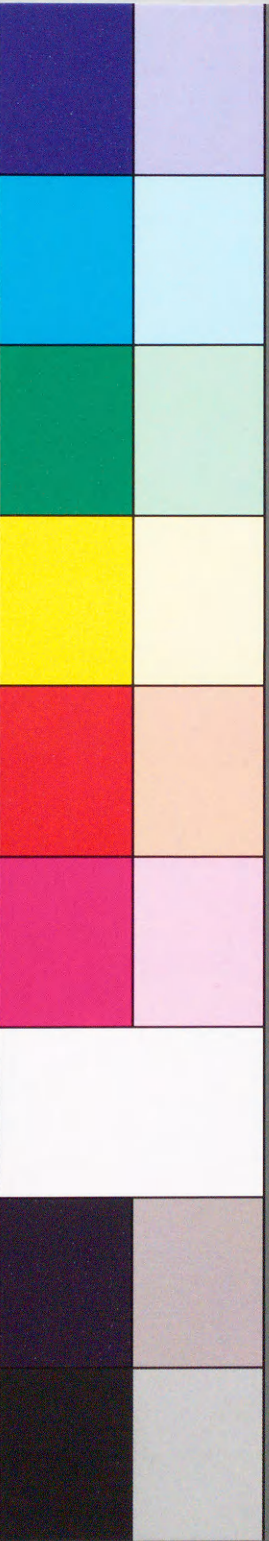
Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
Centimetres 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

KODAK Color Control Patches

© The Tiffen Company, 2000

Kodak
LICENSED PRODUCT

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak