

病理領域における新しい解析方法の導入

PCR 法

—肝炎ウイルスの遺伝子変異の検出と臨床応用へのアプローチ—

東京女子医科大学 消化器内科学

ハセガワ	キヨシ	カトウ	ジュンコ	トリイ	ノブユキ	シズマ	トオル
長谷川	潔	・加藤	純子	・鳥居	信之	・静岡	徹
コジマ	シンジ	イシカワ	カヨ	ヤマウチ	カツミ	ハヤシ	ナオアキ
小島	真二	・石川	賀代	・山内	克巳	・林	直諒

(受付 平成8年1月24日)

はじめに

B型肝炎の診断は通常血清中のウイルス抗原、抗体の検出により行われている。ところが、B型肝炎ウイルス (HBV) の遺伝子診断が行われるようになって、ウイルスの存在診断が血清学的診断と一致しない症例が存在することが明らかとなった。HBV の遺伝子診断の方法は、まず、polymerase chain reaction (PCR) 法により微量な HBV の存在を検出することである。この方法で、従来 HBV が存在しないとされていた HBs 抗原陰性の血液からも HBV が検出され、B型肝炎の診断方法が大きく変わった。次に、PCR 法によりクローニングが容易となり、その結果、以前に比べて、塩基配列の解析が簡便に行うことができるようになった。この方法で HBV の塩基配列解析のデータが集積した結果、HBV の遺伝子配列は患者個々で様でなく、HBV は遺伝子変異により、著しい多様性を有することがわかった。元来 HBV により引き起こされる肝炎の病態もまた多様性を有しており、この病態の差は、宿主の HBV に対する免疫応答の差に起因すると考えられてきたが、その一部は、変異によるウイルス自体の変

化により説明できることもまた明らかとなった。

本稿では、以上の背景のもとに、PCR 法による遺伝子診断の実際と、変異の解析に基づく病態の多様性の検討を、我々のデータを中心に概説する。

1. HBs 抗原陰性慢性肝炎における HBV DNA の検出

現在日赤血液センターでは、献血の際の HBV 検査のスクリーニングに HBc 抗体の測定を導入している。従来、HBV の慢性感染者では、HBc 抗体が高力価で陽性であることが知られていたが、これまでに HBs 抗原、抗体ともに陰性であっても HBc 抗体が陽性である症例に PCR 法で HBV DNA が検出されることが報告された¹⁾。

我々の教室でも、HBs 抗原陰性の慢性肝疾患で、B型肝炎の存在が想定される場合、PCR 法による検査をルーチンに行っている。ただ PCR 法は操作が煩雑であるため、PCR 法を行わなくても HBV の存在が推測可能かどうかをみる目的で、PCR 法により存在診断と HBc 抗体価との関係を調べた。この際、プライマーとしては、HBV の s 領域と、c 領域の 2 カ所の遺伝子領域をカバーする組み合わせを用いた。HBc 抗体が95%以上で陽

Kiyoshi HASEGAWA, Junko KATO, Nobuyuki TORII, Toru SHIZUMA, Shinji KOJIMA, Kayo ISHIKAWA, Katsumi YAMAUCHI and Naoaki HAYASHI [Department of Gastroenterology, Tokyo Women's Medical College]: Clinical implication of detection of mutations of hepatitis B viral DNA using PCR method

性の場合に7例中3例にHBVが検出された(表1)。一方,HBc抗体が95%以下の場合には18例のうち1例もHBV DNAが検出されなかった。また,HBc抗体が95%以上の7例では全例HBe抗原が陰性であった。一般に,HBe抗原が陽性であ

る場合,ウイルスの活動性が高いと考えられており,HBVが検出されるものの微量であるという結果と一致する所見と考えられる。以上の結果は,アガロースゲルにPCR産物を泳動し,エチジウムブロマイドで染色したものであり(図1),さら

表1 HBV DNAの検出とHBc抗体価との関係

cAb (×200)	患者数	eAg		eAb		PCR primer				Southern primer			
		+	-	+	-	set 1		set 2		set 1		set 2	
						+	-	+	-	+	-	+	-
>95%	7	0	7	6	1	3	4	3	4	3	4	4	3
≤95%	18	0	18	16	2	0	18	0	18	0	18	0	18

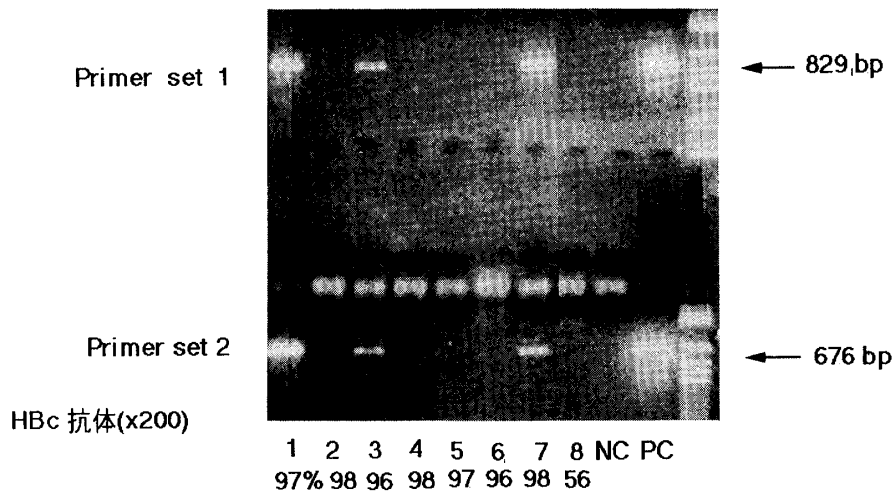


図1 HBc抗体高力価陽性患者におけるHBV DNAの検出(エチジウムブロマイド染色)

primer set 1はcore領域を, primer set 2はS領域をカバーする。HBc抗体価はEIA法で測定し, inhibition (%)で表してある。図下の数字は症例番号を表す。

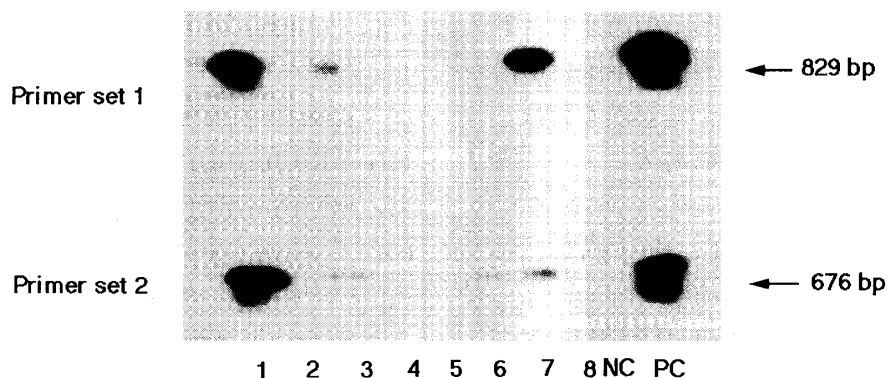


図2 HBc抗体高力価陽性患者におけるHBV DNAの検出(Southern blot hybridization)

用いたプライマーと症例番号は図1と同様である。症例6のprimer set 2は, 図1では陰性だが, 図2では陽性となった。

に泳動後、HBV をプローブに、サザンハイブリダイゼーションを行うと7例中4例と陽性率は増加する(図2)。HBc抗体が95%以下の場合には、サザンハイブリダイゼーションを行っても陽性例は見出されなかった。このPCR法による解析では、1段階のPCRを行ったが、nested PCRを行えば、さらに陽性率が増加する可能性があり、HBc抗体が95%以上で高力価陽性者は、HBVキャリアに準じた扱いをする必要がある。また、サザンハイブリダイゼーションの結果、プライマーのセットにより、陽性率に差が認められたが、これはHBVに変異による株の間に塩基配列による差異が認められるために、プライマーの位置により必ずしも結果が一致しないことがあるためである。

このように、HBs抗原が検出されないにもかかわらずPCR法でHBV DNAが陽性となる機序としては、①HBs抗原が検出感度以下であるほどHBV量が少ないこと、②HBs抗原が肝細胞から流血中に分泌されないようなHBVの変異株であること、③HBs抗原の抗原性が変化した結果、通常のHBs抗原検出キットではHBs抗原が陰性となっていること、等が考えられる。まず第一の可能性については、HBVのポリメラーゼ領域内の点突然変異によって、ウイルスの複製能が低下した変異株の存在が報告されている。この研究結果によれば、PCRでHBV DNAが検出されるHBs抗原陰性の慢性肝疾患患者のポリメラーゼ領域の塩基配列を解析した結果、幾つかの点突然変異を同定し、さらにその一つ一つの変異を野生株に導入して、*in vitro*で、培養肝癌細胞に遺伝子移入して、導入したウイルスの複製能を調べたところ、ただ一つの点突然変異の導入により、複製がほとんど起こらなくなった²⁾。このようにHBVが極めて微量であるためにHBs抗原として検出されないことが考えられる。

2. B型慢性肝炎患者におけるHBs抗原消失の機序

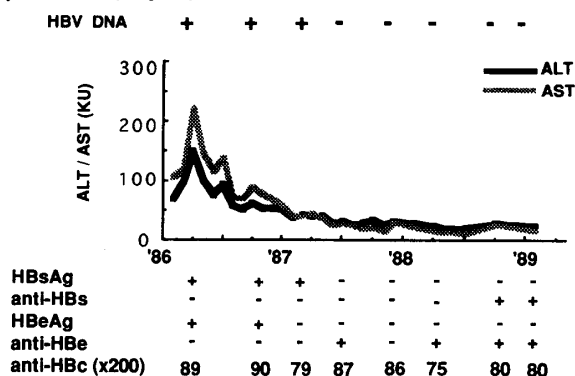
急性肝炎の場合、HBs抗原の消失はB型肝炎ウイルス感染の終熄を意味すると考えられている。一方慢性B型肝炎でHBs抗原が消失するこ

とはまれにしか認められないが、急性肝炎の場合と同様に、肝障害が鎮静化するものと考えられてきた。ところが、慢性肝障害でHBs抗原の消失した症例で、肝硬変、さらには肝癌にまで進展する症例が存在することが明らかとなり³⁾、HBs抗原の消失後もHBVが存続し続けるのかどうか、もし存続するとしたら、どのような形で存在するのかが、このような患者の経過をみていくうえで重要な問題と考えられた。そこで我々は、HBs抗原の消失とそれに引き続くHBs抗体の出現後に至るまで、当科で経過を観察し得た4症例について、HBVを分子生物学的に検討した。すなわち、HBVの、特にHBsの抗原性を規定していると考えられているenvelope領域の塩基配列を経時的に解析し、HBs抗原の消失後のHBVの有無と、HBs抗原消失の機序、加えてHBVがHBs抗原消失後にも検出された場合には、HBVの存続の機序について解明を試みた。

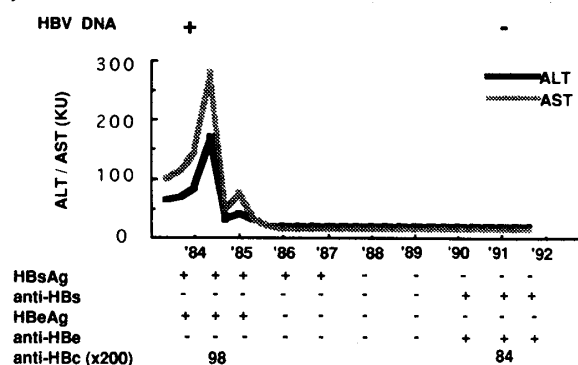
対象とした4例の臨床経過を図3に示す。4例中3例は、HBs抗原消失前に、HBe抗原陽性であったが、HBs抗原の消失に先立ち、HBe抗原が陰性化した。また同じ3例では、HBs抗原消失後、2～4年の間、HBs抗原、抗体ともに陰性の時期をへて、HBs抗体が出現した。経過観察中、HBe抗体陽性の慢性活動性肝炎であった1例では、約3年間、HBs抗原、抗体ともに陽性の期間ののちにHBs抗原が消失した。1例でHBs抗体出現後、時間の経過とともにHBc抗体価が減少したが、他の3例では高値が持続している。全例とも、transaminaseの上昇を契機にHBs抗原の陰性化が起こった。

次にHBs抗原消失、HBs抗体出現後も、血中でHBV DNAが検出されるかどうかを調べるために、経時的に採取した血清よりDNAを抽出し、coreとenvelopeの2カ所の領域に設定したプライマーを用いてPCRを行った。判定は、アガロースゲル上に泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、さらにHBVの全長をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果、HBV DNAの有無を確認した。プライマーには、coreとenvelopeの2カ所の領域にそれぞれ設定し、いづ

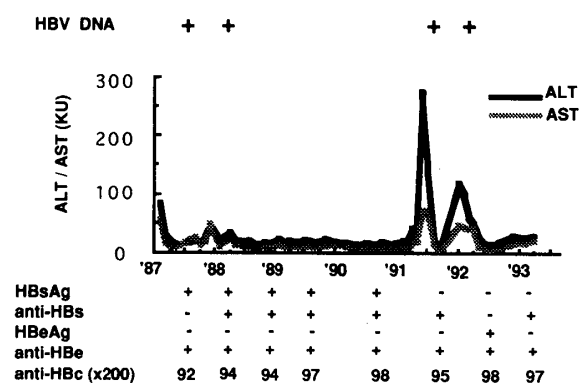
(a) Case 1 (57y M)



(b) Case 2 (57y M)



(c) Case 3 (57y M)



(d) Case 4 (35y M)

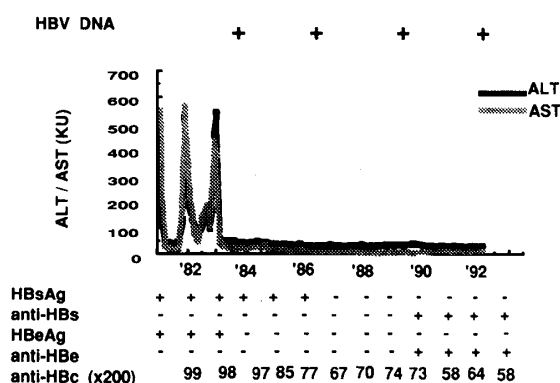


図3 HBs抗原が陰性化した慢性B型肝炎4例の臨床経過

図上段に、PCR法によるHBV DNAの検出結果を示す。症例1、症例2ではHBs抗原消失後、HBV DNAは陰性化した。症例3、症例4では引き続き陽性となった。

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase.

れも nested PCR を行った。PCR の結果を図3 上部に示す。4 例中 2 例では、HBs 抗原の消失とともに、特に症例1では、HBs 抗体の出現より早期にHBV DNAの血中からの消失を認めた。残りの2例ではHBs抗体出現後も持続してHBV DNAが検出された。

一般に、HBs抗原消失後には肝障害が改善するという報告が多いが、今回の我々の検討でも、血液生化学検査のみならず、組織学的にも肝障害が改善することが明らかとなった。したがって、血中のHBs抗原の存在は、肝障害が起こっているかどうかの目安になると考えられるが、HBs抗原陰性でも、HBe抗原陽性の症例があり、このような症例では、引き続き肝炎が持続することもあることが報告されている⁴⁾。これらの症例では、HBVのenvelope領域に遺伝子の点突然変異や欠失が

あることが明らかとなっており、単にHBs抗原としてのエピトープが消失しているためにHBs抗原として検出されないだけであって、ウイルスとしての複製や感染力などは保持されているために肝炎が持続するのだろうと考えられている。

今回検討した症例では、4例中2例にHBs抗原消失、HBs抗体出現後も引き続きHBV DNAが検出されたが、HBV DNAの存続する2例でも、少なくとも観察期間内には、肝障害は認められなかった。この2例を含め、全例でHBe抗体が陽性である点が、先の報告と異なっており、肝障害の存在には、HBs抗原のみでなく、HBe抗原の有無も関与していると考えられた。

また、検討した4例では、いずれもHBs抗原の消失前に一過性のtransaminaseの上昇が認められた。これまでの報告でもHBs抗原の陰性化に

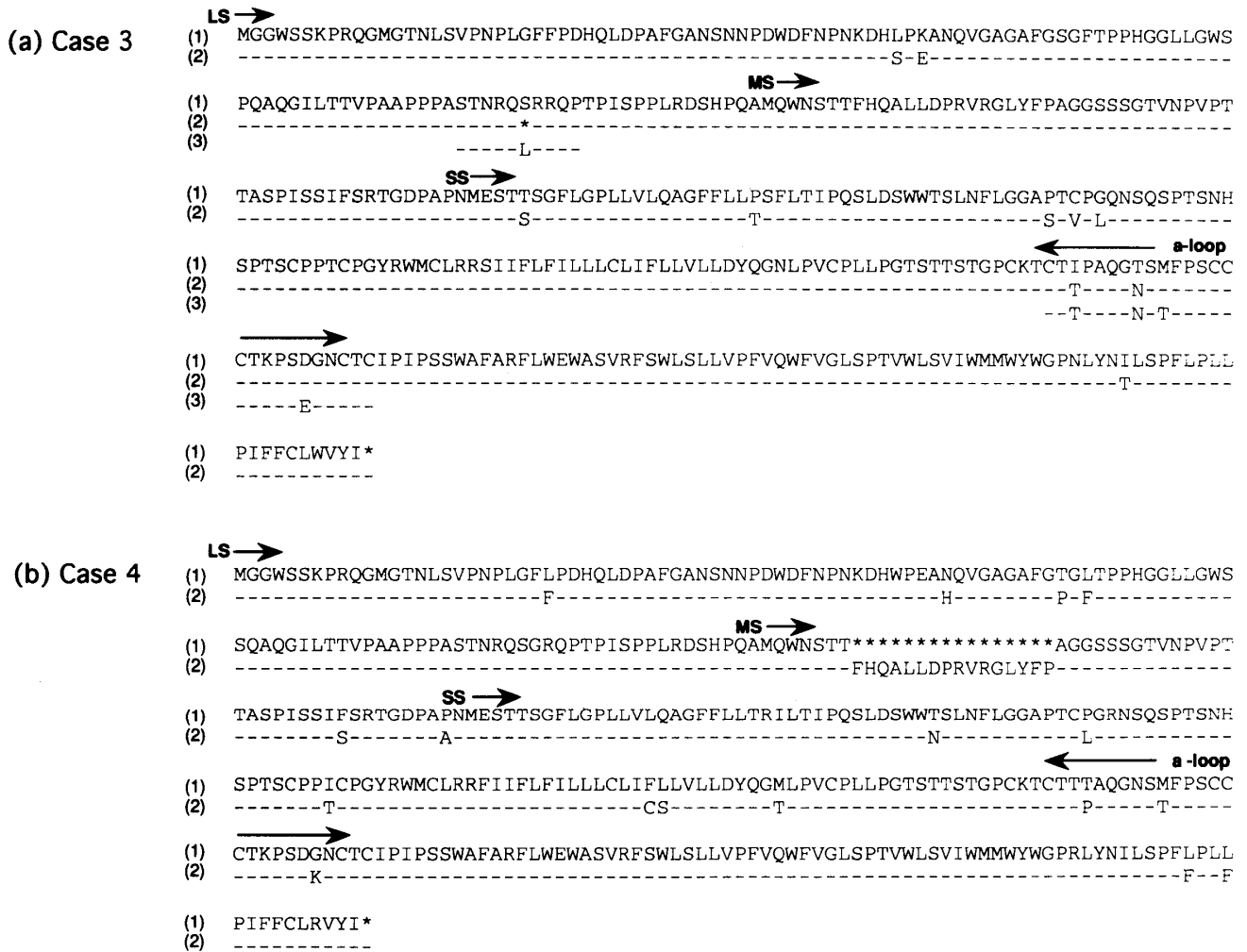


図4 症例3, 症例4におけるHBV DNAの塩基配列の経時的検討
 括弧番号は, 症例3では, (1) HBs抗原消失前, (2) 消失直後, (3) 消失2年後, 症例4では, (1)
 HBs抗原消失前, (2) 消失直後, の時点におけるS領域の塩基配列を表す。
 LS: large S region, MS: middle S region, SS: small S region, *: stop codon.

先立ち, 肝炎の急性増悪が認められている⁵⁾。HBe抗原の seroconversion の場合にも同様に, 肝炎の急性増悪後に起こることが多く, その機序として, 急性増悪の時に宿主の免疫応答が賦活化され, ウイルスの排除ないし弱体化に働くのであろうと考えられている⁶⁾⁷⁾。したがって, 我々の4症例では, 治療は行っていないが, 自然に急性増悪を起こし, これを契機としてHBs抗原の消失が起こったものと推察された。

次にHBs抗原の消失の機序を調べる目的で, HBs抗原の seroconversion 前後で envelope の塩基配列を比較した。

症例1では, ALT上昇しHBs抗原が消失する

直前のHBVは, HBs抗原が安定して陽性であった時期のHBVと比較すると, 24カ所の点突然変異が, アミノ酸にして, 16個の置換が認められた(図4)。そのうち1カ所は, ナンセンス変異であり, pre-S1領域にある3139番目の塩基がCからAへと変化した。この変化によりアミノ酸は, チロシンから終止コドンへと変化した。HBs抗体が出現した後は, 同部位が, AからTへと変化した。終止コドンは消失し, 代わりにロイシンとなった。さらにこの時期には, envelope領域内のaの抗原決定基であるいわゆる, “a-loop”内の126, 131, 133番目のアミノ酸置換を認めた(図5)。

症例2でも同様に, envelope領域の塩基配列を

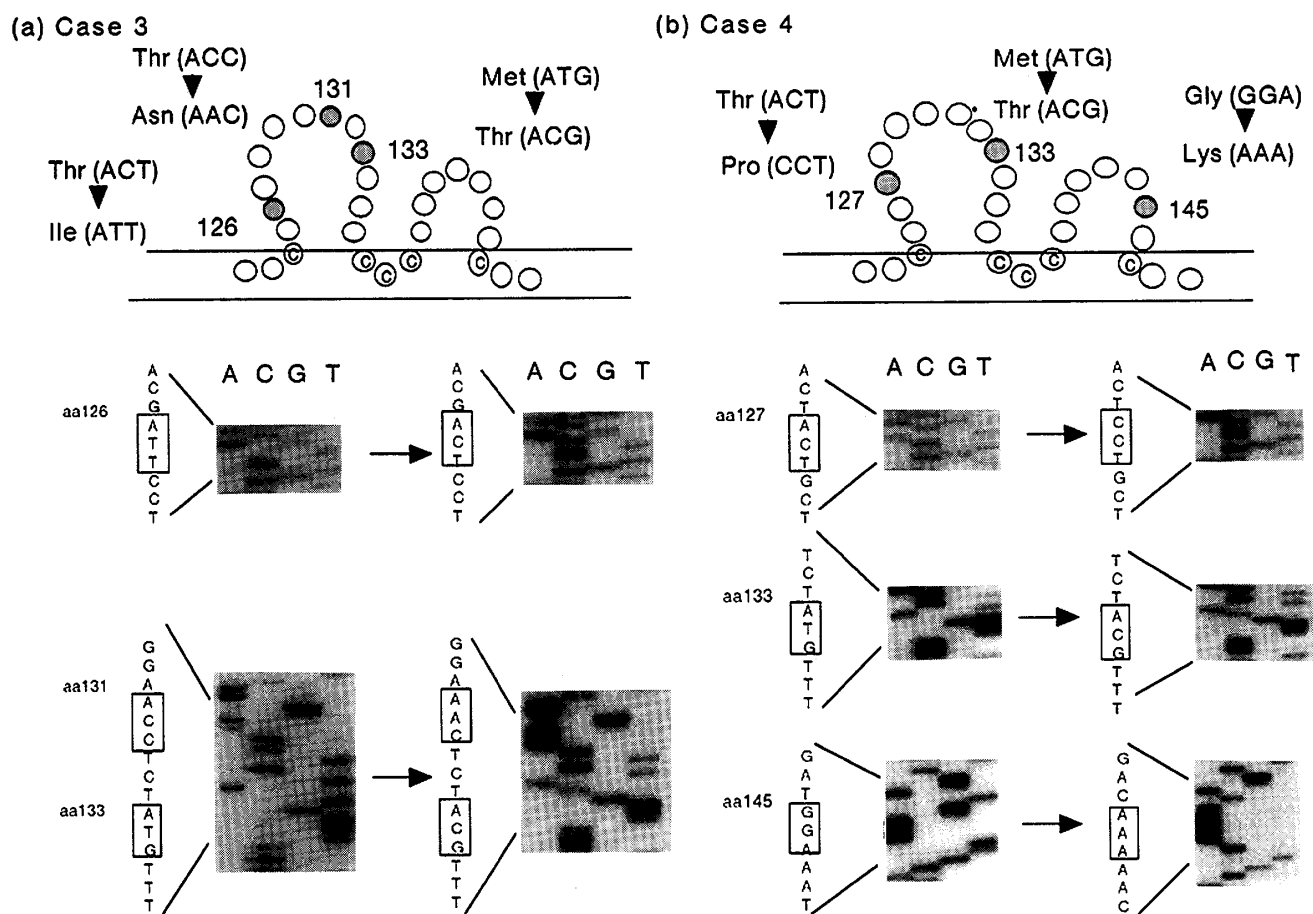


図5 症例3, 症例4における a-loop 領域の塩基配列の変化
網かけは変異が起こった塩基を示す. C: cystein residue.

調べたところ, HBs 抗原消失直前には, 野生株と比較し, pre-S2領域に48塩基の deletion を認めた(図4). HBs 抗体が出現した後の解析では, pre-S2領域の deletion は消失し, 症例1と同様に a-loop の127, 133, 145番目のアミノ酸に変化を認めた(図5).

以上の結果から, HBs 抗原が消失した機序として, 次のことが考えられた. pre-S1, pre-S2は抗体産生に際し, 強い免疫応答性を持つことが知られており⁸⁾⁹⁾, したがって, 症例1では pre-S1抗原が作られなくなり, 症例2では不完全な pre-S2抗原が作られることにより, 宿主の免疫反応から逃れるようになったものと考えられた.

また, このような, pre-S 領域の遺伝子変化により, HBV の機能に欠損を生じることも予想された. 例えば pre-S 領域の機能としては, ①ウイルス粒子の形成: small S 蛋白, middle S 蛋白のみで

は, Dane 粒子, 管状粒子のような mature な粒子が形成されない, ②肝細胞への吸着: pre-S1抗原の N 末端の一部が, envelope 表面に露出し, 肝細胞と吸着しているといわれている. また, pre-S2抗原は重合ヒトアルブミン(pHSA)と結合する受容体活性が存在し, pHSA を介して HBV が肝細胞に吸着すると推定されている, ③ small S 蛋白の発現調節: pre-S1/2 junction に pre-S2, S, の promoter や enhancer が存在する, ④ウイルス粒子の分泌の調節, 等が挙げられる¹⁰⁾.

したがって, pre-S 領域に欠損が生じた場合, ウイルスの感染性や, ウイルス粒子の生成, 分泌等が低下することが予測され, その結果として HBs 抗原量が減少し, 陰性化したものと考えられた. ただしこの欠損ウイルスのままではウイルスは次第に消滅してしまうが, 次の HBs 抗体陽性時にも HBV が存続している機序として, 本症例では

pre-S 領域は完全な配列に復し、代わりに envelope gene に存在する a の抗原決定基である、いわゆる、a-loop にアミノ酸の置換を生じ、それにより、HBs 抗体から逃れ、HBV DNA が存在できたものと考えられた。これまでに HB ワクチンや HBIG 投与の HBs 抗体存在下において、B 型肝炎持続感染を認めた例でも a-loop のアミノ酸置

換を持つ株が報告されており¹¹⁾¹²⁾、我々の 2 例でも、同様の機序が働いていたものと推測された。

3. B 型肝炎の重症化と変異

肝炎の活動性を規定する要因としては、大きく分けて、ウイルス抗原に対する宿主の免疫反応の強さと、ウイルスの複製の亢進、ウイルス抗原の細胞内への蓄積による細胞障害などが挙げられ

表 2 B 型劇症肝炎患者および感染源患者の臨床経過、血清学の推移および precore 領域の解析

Case No.	Age Sex	*Days from onset	**ALT /AST	HBsAg /antiHBs	HBeAg /antiHBe	IgM antiHBc	Outcome	No. of clones studied	nt. 1898	nt. 1901
Fulminant hepatitis										
1	22 F	7	1,010/1,870	-/+	-/-	+	survival	4	4A	4A
2	27 F	4	879/2,925	+/-	-/-	+	death	4	4A	2A/2G
3	25 F	5	5,080/4,165	+/-	-/-	+	death	4	4A	1A/3G
4	61 F	5	1,084/650	+/-	-/+	+	death	3	3A	2A/1G
5	35 M	5	1,182/1,712	+/+	+/-	+	death	3	3A	3A
Acute self-limited hepatitis										
6	53 M	8	2,427/2,550	+/-	-/-	+	survival	4	4A	4G
7	38 M	15	715/1,287	+/-	+/-	+	survival	3	1A/2G	3G
8	41 M	23	355/542	+/-	+/-	+	survival	3	3G	3G
9	28 F	15	386/639	+/-	-/+	+	survival	3	3G	3G
10	61 M	20	312/831	+/-	+/-	+	survival	3	1A/2G	3G

*Onset was defined as the beginning of jaundice.

**Peak levels of ALT and AST in IU/L.



図 6 B 型劇症肝炎院内感染例における precore 領域の塩基配列の解析

患者 1, 2, 3, 4, 6 は劇症肝炎患者, 患者 5 は, 劇症肝炎発生時に入院していた急性肝炎患者である。劇症肝炎患者では precore 領域に 2 カ所の変異が認められ, 急性肝炎患者では変異は起こっていない。

る。おそらくこれらの要因は、単一では劇症肝炎を惹起することはできず、複合してその発症にかかわっていると考えられるが、それでも院内感染による劇症肝炎の発症が報告¹³⁾されていることから考えると、ウイルス側の要因単独でも肝炎を劇症化させる可能性を否定できない。

そこでわれわれは院内感染による発症例の血清中から DNA を抽出し、感染源と断定された患者と、劇症肝炎患者の HBV の塩基配列を解析し、比較検討した。結果を表 2 に示す。HBV の precore 領域は、core 領域の上流に位置する 87 個の塩基対より成り立っているが、その末端の 28 番目のアミノ酸が、終止コドンに置き変わる変異が、HBe 抗体陽性の慢性活動性肝炎患者で報告されている¹⁴⁾。この終止コドンの出現により precore と core 領域の遺伝子産物である HBe 抗原が産生されなくなり、その結果として HBe 抗原陰性、HBe 抗体陽性になるのだろうと推測されていた。また、これまでに小児の劇症肝炎が、しばしば HBe 抗体陽性の母親から生まれた子に発症することが知られており、このような症例において、変異株が劇症肝炎を惹起していることが考えられた。

そこで我々は、院内感染例における感染源 1 例と劇症肝炎患者 5 例の HBV の precore 領域の遺伝子配列を解析した¹⁵⁾。precore 領域をカバーするプライマーを用いて PCR を行い、それをベクターに挿入する手法でクローニングし、そのクローンの塩基配列を解析した。その結果、感染源 1 例、劇症肝炎患者 5 例いずれもが、precore 領域内に終止コドンを持つ株を有していることがわかった(図 6)。これら計 6 例の患者より抽出した HBV は、塩基配列のホモロジー検索より、いずれも同一の株由来であることが明らかになっている。以上の結果は、散発性の劇症肝炎患者の precore 領域の検索においても同様であった(表 2)¹⁶⁾。

これらのことから当初我々は、この precore 領域の終止コドンの存在が劇症肝炎を発症させるものと考えた。ところが、その後の解析により、散発性の劇症肝炎には、必ずしも precore の終止コドンを持たない HBV が検出されることがあるこ

とがわかり¹⁷⁾、この変異は、劇症肝炎の原因というよりはむしろ活発な複製の結果、生じたものと考えられた。このことから、劇症肝炎を惹起するような特定の遺伝子変化の存在が疑問視されたが、前述の院内感染例では、免疫学的な背景の異なる、感染した 5 人の患者が、いずれも劇症肝炎を発症していることから、やはりウイルス株と肝炎の重症化との関連が示唆された。

そこで我々は、院内感染 5 例のうちの 1 人の患者から PCR で増幅して得た HBV を、その全長を接続により完全な環状ウイルスの型に再構成し、in vitro で培養肝癌細胞に遺伝子移入してそのウイルスの動態を調べた。その結果、劇症肝炎患者由来の HBV は、in vitro で、野生株と比較して、はるかに高い複製能を示した。この結果から、劇症肝炎の発症には、複製能の高いウイルス株が関与している可能性が示唆された。

この複製能の亢進に寄与している HBV の遺伝子変化を調べる目的で、劇症肝炎患者由来の HBV の全塩基配列を決定した¹⁸⁾。その結果、precore-core 領域に 12 カ所、envelope 領域に 4 カ所、X 領域に 6 カ所、pol 領域に 15 カ所のアミノ酸置換を伴う点突然変異が認められた。したがって、この変異のうちいずれかが複製能亢進に寄与していると考えられた。最近、この計 27 カ所の点突然変異のうち、X 領域の 2 カ所の変異のみを野生株に導入した人工的変異 HBV 株で高い複製能がみられたという結果が得られ(Liang TJ, 私信)、現在この変異が、他の劇症肝炎患者由来の HBV にも共通してみられるかどうか検討中である。

結 語

PCR 法を基本として、HBV の塩基配列や、複製能等のウイルス学的特性を検討し、B 型肝炎の様々な病態を解明しようと試みた。ここ数年で、分子生物学的手法を用いた HBV に関する知見は爆発的に増加しているが、現在これらの知見を臨床の場にどう生かすかが問われている。我々もより臨床的な問題意識に立脚した研究を目指したいと考えている。

文 献

- 1) Iizuka H, Ohmura K, Mayumi M et al:

- Correlation between anti-HBc titer and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang* 63 : 107-111, 1992
- 2) **Blum HE, Galun E, Liang TJ et al**: Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J Virol* 65 : 1836-1842, 1991
 - 3) **Adachi H, Kaneko S, Matsushita E et al**: Clearance of HBsAg in seven patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 16 : 1334-1337, 1992
 - 4) 上村朝輝, 吉川 明, 市田文弘ほか: 慢性 B 型肝炎における HBs 抗原の持続消失例に関する検討「B 型肝炎のトピックス」(犬山シンポジウム記録刊行会編) pp72-76, 中外医学社, 東京 (1984)
 - 5) 渡部 洋, 清水正賀, 青山重靖ほか: HBs 抗原の持続陰性化を来した B 型慢性肝疾患 6 症例の検討. *肝胆膵* 12 : 793-799, 1986
 - 6) **Tsai SL, Chen PJ, Lai MY et al**: Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. *J Clin Invest* 89 : 87-96, 1992
 - 7) **Maruyama T, Iino S, Koike K et al**: Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 105 : 1141-1151, 1993
 - 8) **Milich DR, Thornton GB, Neurath A et al**: Enhanced immunogenicity of the pre S region of hepatitis B surface region. *Science* 228 : 1195-1199, 1985
 - 9) **Milich DR, Jones JE, McLachlan A et al**: Importance of subtype in the immune response to the pre S2 region of the hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 144 : 3544-3551, 1990
 - 10) **Feitelson MA**: Biology of disease: Biology of hepatitis B virus variants. *Labo Invest* 71 : 324-349, 1994
 - 11) **Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P et al**: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336 : 325-329, 1992
 - 12) **Okamoto H, Yano K, Nozaki Y et al**: Mutation within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mother to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr Res* 32 : 264-268, 1992
 - 13) **Oren H, Hershov RE, Ben-Porath E et al**: A common-source outbreak of fulminant hepatitis B in a hospital. *Ann Intern Med* 110 : 691-698, 1989
 - 14) **Carman WF, Jacyna MR, Hadziyanis S et al**: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigens in patients with chronic hepatitis infection. *Lancet* ii : 588-590, 1989
 - 15) **Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N et al**: A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 324 : 1705-1709, 1991
 - 16) **Hasegawa K, Huang J, Wands JR et al**: Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology* 185 : 460-463, 1991
 - 17) **Liang TJ, Hasegawa K, Munoz SJ et al**: Hepatitis virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Invest* 93 : 550-555, 1994
 - 18) **Hasegawa K, Huang J, Rogers SA et al**: Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol* 68 : 1651-1658, 1994