日本大学医学部総合医学研究所紀要
Vol.1（2013）pp.24-31

研究報告

HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と肝癌発生に与える影響の解明

松岡俊一[1)]，森山光彦[1)]，浅井　聡[2)]，黒田和道[3)]
神野英毅[4)]，田村彰教[1)]

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Shunichi MATSUOKA[1)]，Mitsuhiko MORIYAMA[1)]，Satoshi ASAI[2)]，Kazumichi KURODA[3)]，
Hideki KOHNO[4)]，Akinori TAMURA[1)]

要旨

肝癌（HCC）発生とHBVとの関連性について検討した。1）慢性C型肝疾患468例をPCR法にてHBV DNAを検出した。2）B型；3例，C型；20例，NBNC型（NB）HCC13例の組織内のHBV DNAおよびcccDNAの検出を行った。3）B型HCC4例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みを，患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。HBV DNAは43.6％に検出され，2例の全塩基配列を決定した。各クローンともにgenotypeはCで，SおよびX領域に特徴的な塩基変異を認めた。cccDNAは，B型；100％，C型；10％，NB型；7.7％に検出された。B型HCC全例にヒトゲノムへのHBVゲノムの組み込みを確認した。その組み込みはランダムであった。HBV DNAはC型肝疾患の約40％に存在し，HBs抗原が陰性なのはS領域のアミノ酸変異によることが示唆された。C型やNB型HCCでも，肝組織よりcccDNAが検出されることより，HBVがHCC発生に関与していることが推測された。またHBVの組み込みはランダムではあったが全例に認めた。

1. はじめに

わが国における原発性肝細胞癌（肝癌）死亡は年間3万人を超え，治療法の進歩により5年生存率は向上しているが，高い再発率を背景としてどのような治療法を選択しても疾患死亡率は80％を超えている。したがって肝癌発生予知・抑止は重要な課題である。現在までのところ，肝癌発生に関与している遺伝子やSNPsは多数報告されているが，いずれも確定的とされる原因遺伝子やSNPは今のところ確認されていない。我々は，以前よりHBV感染が肝癌発生に重要な影響を与えていることを報告してきた。肝癌におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については，様々な検討が現在までなされてきた。現状では，HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は，ランダムであり特定の部位への組み込みはないとされている。一方HCV関連肝癌においては，その血中よりHBV DNAが検出されるOccult HBV感染が危険因子であることが既に報告されている。我々は既に，このOccult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。

本研究では，申請者らがこれまで長年にわたり蓄積してきた肝癌発生に関する研究，HCVとHBVの感染研究の成果に立脚し，肝癌発生に関与しているHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式とその部位をFISH法を用いて検討し，新しい肝癌発生の予知・予防の方法論を確立して，臨床に応用可能な基盤的知見を得ることを本研究の目的とする。

本研究により，肝癌におけるHBV遺伝子の組み込み部位を確定し，簡便な検出法を開発することに成功すれば，肝癌発生にHBV感染が関与していることを証明することが可能である。現状では肝癌発生の原因は確定されておらず，HBV感染が背景因子にかかわらず肝癌発生の原因のひとつとして確認す

1）内科学系消化器肝臓内科学分野
2）生体機能医学系薬理学
3）病態病理学系微生物学分野
4）生産工学部応用分子化学科
松岡俊一：matsuoka.shunichi@nihon-u.ac.jp

ることができればユニバーサルワクチネーションをより協力に推進することが可能となり，今後の本邦における肝癌発生の予防・抑止に果たす効果は絶大なるものがある。

2. 対象および方法

本研究は，平成24年度より25年度までの2ヵ年計画である。平成24年度には，(1) まず慢性肝炎および肝硬変例の血中より高頻度にHBV DNAを検出し得るprimer setsを用いたPCR法にてHBV DNAを検出して，Occult HBV症例の頻度を検索する。(2) この結果を基にして，Occult HBV関連肝癌症例の血中ないしは肝組織より同様にOccult HBV症例の頻度を検索する。(3) このうちHBV DNA検出例について，3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を開発してその全塩基配列を決定する。(4) 手術切除した肝細胞癌症例の肝組織より，HBV DNAとcccDNAをPCR法にて検出しHBVの関与を検索する。(5) HBV関連肝癌発生例のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を，PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討する。(6) この結果に立脚して次にHCV関連肝癌におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無を，HBV関連肝癌と同様にFISH法にて検出する。

研究対象と方法は以下に示すごとくである。

1) 1987年より当科にて肝生検術を施行され凍結血清が保存されていた，血中HBs抗原陰性の慢性C型肝疾患468例である。これらの症例は，2000年以後は肝生検時より6ヶ月以内に，我々が設定した高頻度にHBV DNAを検出しうるHBx領域のprimer setを用いたnested PCR法にてHBV DNAを検出した。さらに今回2000年以前の症例についても同意が得られた症例について，凍結保存血清より一括してnested PCR法にてHBV DNAを検出した。これらの検出結果と臨床的背景について検索した。

2) 肝細胞癌におけるoccult HBV感染の検索。

次に我々は，B型肝細胞癌，C型肝細胞癌，NBNC (NB) 肝細胞癌例について，本学消化器外科にて手術切除された癌部および非癌部より，nested PCR法にて組織内のHBV DNAおよびcccDNAの検出を行った。検索対象は，当院消化器外科にて2003年より肝細胞癌の診断にて手術切除され，検体使用の許諾を得た36例である。内訳は，B型肝細胞癌; 3例，C型肝細胞癌; 20例，NBNC型肝細胞癌; 13例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より，通常の方法にてDNAを抽出後，nested PCR法にてHBx DNA (150bp)，PCR法にてHBV-DNA (3.2kbp)，cccDNA (500bp)，の検出を行った。

3) HBs抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出

HBV関連肝細胞癌例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出を，患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。対象は，FISH法施行の同意が得られたHBs抗原陽性の肝細胞癌患者4例である。これらの症例よりヘパリン加試験管に全血15mlを採取して，このうち10mlをFISH法に使用した。残りの血液よりDNAを抽出して3.2kbpを増幅させるPCR法を行った。このうち3例に3.2kbpの増幅が得られた。この3例のPCR産物を精製してFISH法のprobeとして使用した。さらに精製したprobeを用いて試験的にFISHを行い，最もバックグラウンドの少なかった38Tをprobeとして用いて以下の実験に使用した。尚，分子系統樹解析では，38T株はHBV genotype Cに分類された。また検索した細胞数は各症例ともに20細胞である。

4) 次世代高速シークエンサーを用いたヒトゲノム解析

2症例について患者の同意を得て，末梢血リンパ球より次世代高速シークエンサーを用いて，ヒト全ゲノムの解析を行った。試薬類にかかるコストと委託費用などを勘案して，paired endで10 foldのシークエンスを施行した。次世代高速シークエンサー (Illumine Hisex 2000) のランの委託は，実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。

[方法]

①HBV DNAの検出方法

1. 肝がん患者より採取したヘパリン全血または10ml凍結保存血清100μもしくは凍結肝組織より市販のDNA抽出kitを用いてDNAを抽出する。
2. このDNAを用いて，HBx部位に設定したprimer setsを用いて，nested PCR法を行う。

HBV DNA検出プロトコール

1) 凍結保存肝組織よりDNAを抽出する。　ホモゲナイザーで肝組織を破砕後，キアゲン社製DNA blood kitを用いてtotal DNAを抽出する。
2) 凍結保存血清100μlよりtotal DNAを抽出する。このDNAを用いて以下のごとくnested PCRにてHBV DNAを検出する。
3) Primers for 1st PCR
MD24 5'-TGC CAA CTG GAT CCT TCG CGG GAC GTC CTT-3'
MD26 5'-GTT CAC GGT GGT CTC CAT G-3'
4) Primers for 2nd PCR
HBX1 5'-GTC CCC TTC TTC ATC TGC CGT-3'
HBX2 5'-ACG TGC AGA GGT GAA GCG AAG-3'
5) PCR条件
Primers 4ul, 10xEx Taq Buffer 5ul, dNTP 5ul, DNA 2ul, Ddw 34ul ExTaq 0.5ul, Total 50ul
6) 1st and 2nd PCR
94℃ 2min / pre-heat, 94℃ 30sec, 51℃ 30sec, 72℃ 1min// 35 cycles,
72℃ 7min/ last extension, 4℃ 保存

②HBVの組み込みの検出

1) 採取したヘパリン加全血10mlを用いて行う。
2) 血球を分離して，プレパラート上に薄層に添付する。
3) このプレパラートを用いて，Fluorescence labeled in situ hybridization（FISH）法により，染色体上へのHBVの組み込みの検出を行う。
4) B型肝がん患者さんの血清よりPCRにてHBV全長を増幅する。
5) このPCR産物よりprobeを作製する。DNA濃度を1μg/μlに調整して20μgをprobeとして使用する。

染色体解析用固定細胞作製

〈試薬〉

コルセミド溶液:ナカライ 09356-74など，低張液：0.075M KClなど，固定液:メタノール:酢酸=3:1，用時調製

〈染色体標本作成〉

1)浮遊細胞の場合10ml程度の培地で，付着細胞の場合10cmのDishで継代後しばらく培養する。
2)対数増殖期の細胞に0.02μg/ml になるようにコルセミドを添加し，適当時間培養を継続する。
3)コルセミド処理をした細胞浮遊液を15mlチューブに回収し，1200rpm で5分間遠心して細胞をあつめ，上清を捨てる。コルセミド処理時間に影響するので迅速に行う。
4)細胞にパスツールピペットで少量の低張液を加え静かにピペッティングして細胞を分散させる。細胞が分散したらさらに1.5mlまで低張液を加え，ピペッティングにより再度細胞を分散させる。室温に20分間放置して低張処理をおこなう。
5)総量が10ml程度になるようにゆっくりと固定液を加える。
6)静かに全体をパスツールピペットで撹拌し細胞を固定する。
7)1200rpm で5分間遠心し上清をすて，新たな固定液を数滴加え，ピペッティングにより細胞を分散させる。さらに10ml程度の固定液を加え全体を撹拌する。この作業をさらに2回行い完全に固定する。
8)固定が完了したらチューブを固定液で満たし，-20℃で保存。

固定細胞FISHプロトコール

〈試薬〉

FISHプローブ，ホルムアミド，エタノール

〈細胞の変性処理〉

1)細胞標本を70℃ホットプレート上で2時間ハードニング
2)70℃の70％ホルムアミド/2×SSC中2分間変性処理
3)氷冷した70％エタノールに5分浸漬
4)別の70％エタノールで洗った後100％エタノールに5分浸漬
5)風乾もしくは37℃インキュベーターで乾燥

〈プローブの変性処理〉

6)1スライドあたり10μlのプローブをチューブに入れ75℃で10分変性
7)5分以上氷冷

〈ハイブリダイゼーション〉

8)細胞標本にプローブをアプライしカバーグラスをかける

9)37℃で必要時間ハイブリダイズ

〈洗浄・検出（ダイレクト蛍光標識プローブの場合）〉

10)2×SSC中5分浸漬しカバーグラスを静かにはずす

11)37℃の50％ホルムアミド/2×SSC中20分浸漬

12)1×SSCですすいだ後1×SSC中15分浸漬

〈洗浄・検出（ハプテン標識プローブの場合）〉

ⅰ．1％ BSA/4×SSC溶液で希釈した抗体を100μlアプライしパラフィルムでカバーする

ⅱ．37℃で1時間反応

ⅲ．0.1％ Nonidet P-40（0.05％ Tween20）/4×SSCで10分×2回，4×SSCで10分×1回洗浄

13)DAPI染色後マウント

14)蛍光観察

組織切片FISHプロトコール

〈試薬〉

FISHプローブ，ホルムアミド，エタノール，パラホルムアルデヒド，ペプシン

〈切片の前処理〉

（凍結切片）

1. 切片を室温に戻し，氷冷4％ PFA/PBSで30分固定 PBSで十分に洗浄
2. 0.02％～0.5％ペプシン/0.1N塩酸溶液中で37℃，1分～30分反応
3. PBSで洗浄 アルコールシリーズにより脱水・乾燥

（パラフィン包埋切片）

1. 脱パラ
2. 2×SSC中5分浸漬
3. 2×SSC中，10分間電子レンジで加熱
4. PBS中で放冷 0.02％～0.5％ペプシン/0.1N塩酸溶液中で37℃，1分～30分反応
5. PBSで洗浄 アルコールシリーズにより脱水・乾燥

〈ハイブリダイゼーション〉

6. 切片にプローブをアプライしカバーグラスをかける
7. 凍結切片80℃，パラフィン切片80～90℃のホットプレート上で10分間加熱し変性処理する
8. 湿潤箱にて37℃でovernightハイブリダイズさせる

〈洗浄・検出（ダイレクト蛍光標識プローブ）〉

9. 2×SSC中5分浸漬しカバーグラスを静かにはずす
10. 50％ホルムアミド/2×SSC中，37℃，20分浸漬（ヒトXYプローブ・ラットYプローブの場合46℃）
11. 1×SSC中15分浸漬
12. DAPI染色後マウントもしくはDAPI入りマウント剤でマウント
13. 蛍光観察

〈洗浄・検出（ハプテン標識プローブ）〉

9. 2×SSC中5分浸漬しカバーグラスを静かにはずす
10. 50％ホルムアミド/2×SSC中，37℃，20分浸漬（ヒトXYプローブ・ラットYプローブの場合46℃）
11. 1×SSC中15分浸漬
12. Blocking溶液にて30分間Blocking（5% milkまたは1% BSA in 4×SSCなど）
13. 蛍光標識avidinもしくは蛍光標識streptavidin/blocking溶液で30分～1時間反応
14. 0.1％ Nonidet P-40（0.05％ Tween20）/4×SSCで10分×2回，4×SSCで10分×1回洗浄
15. DAPI染色後マウントもしくはDAPI入りマウント剤でマウント
16. 蛍光観察

3. 結果

1) HBV DNAは204例（43.6%）に検出された。HBV DNAの検出率は，F0; 25%，F1; 38.1%，F2; 45.9%，F3; 47.2%，F4: 56.9%であった。さらにHBV DNAは，HBc抗体陽性例71%，陰性例22%に検出された。

2) これらのうち血清が使用可能であったHBV DNA陽性182例について，AMPLICOR HBV MONITOR法にてHBV DNA量を測定した。この結果では，HBV DNA量が検出感度以上は14例（7.7%）であった。最高値が5.3 LC/mlであり，以下2.0 LC/ml未満が12例，2.0 LC/ml以上は2.1, 3.0, 5.3

LC/mlの3例のみであった。

3) 次に，HBV DNAが検出された204例よりバンドが鮮明に検出された例のうち，無作為に6例を抽出して，このPCR産物の塩基配列を決定した。さらにこの塩基配列より分子系統樹解析を行い，Genotypeを検索した。この結果では特徴的な塩基の変異は見られなかったが，6例共にgenotype C型に分類された。

4) HBV DNAが5.3 LC/mlの症例のPCR産物をクローニングして5クローンについてHBV genomeの全塩基配列を決定した。この結果クローン1；2956bp / 3020bp（consensus sequence ; GQ205441）（97 %），クローン2；1548 / 1574（98%），クローン3；2944 / 3019（97%），2977 / 3019（98%），クローン4；2977 / 3019（98%），クローン5：2979 / 3019（98%）であり，各クローンともにgenotype Cとの良好な相同性を示した。

5) 次にGQ205411との各クローン間のアラインメント解析を行った。この結果では，クローン1:塩基配列に欠損が確認された。（モチーフ配列の421-440, 3020-3202bp部分）クローン2:塩基配列に大規模な欠損が確認された。（モチーフ配列の1-493, 1579-2053, 2453-3215bp部分）クローン3:塩基配列に欠損が確認された。（モチーフ配列の3020-3202 bp部分）クローン4:塩基配列に欠損が確認された。（モチーフ配列の3020-3202bp部分）クローン5:塩基配列に欠損が確認された。（モチーフ配列の3020-3202bp部分）

6) genotype Cのコンセンサス配列GQ205441と比較すると，S region; a determinant領域ないしX領域 ; nt.1652より特徴的な塩基の変異を認め，12塩基の挿入が認められた。またCoreないしPre-core部位にも多数の塩基の変異が認められた。以上をまとめると，Occult HBV感染はC型慢性肝炎，肝硬変の約40%に存在し，血中よりHBs抗原が検出されないのはS領域のアミノ酸変異によることが示唆された（Fig.1）。

Fig 1　前塩基配列のコンセンサス配列との比較

(2) 肝細胞癌におけるoccult HBV感染の頻度

1) この結果ではHBx DNAは43％に検出された。内訳は，HBx DNAはB型肝細胞癌；3/3（100％），C型肝細胞癌；6/20（30％），NBNC型肝細胞癌；6/13（46.2％）に検出された。このうち癌部/非癌部の検索では，B型肝細胞癌；100/100％，C型肝細胞癌；25/25％，NBNC型肝細胞癌；38.4/38.4％であった。2）HBV DNA（3.2kbp）は，B型では3例中2例（66.7％）に検出可能であった。C型においては全例で検出されなかった。NBNC型肝細胞癌においては，17例中の1例（7.7％）に検出が可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。

2) このうちNBNC型肝細胞癌より検出可能であった1例のPCR産物より3.2kbの全塩基配列をAuto Sequencerを用いたdirect sequence法にて決定した。この結果より，genotype Cに分類された。この症例においては現在詳細を検索中である。

3) cccDNAは，B型では3例全例に検出可能であった。一方C型では20例中2例（10％）に検出された。NBNC型では13例中1例（7.7％）に検出された。癌部と非癌部の比較では，B型は全例が両者より検出された。一方C型では，癌部2例（10％），非癌部1例（5％）に検出され，NBNC型では癌部/非癌部ともに1例ずつ（7.7/7.7％）に検出された。cccDNAの検出例はいずれもHBx DNAが検出されていた。また3.2kbpのHBV DNAが検出された例からは，HBx DNAおよびcccDNAの両者も検出されていた。NBNC型の3.2kbp HBV DNAの検出例は，HBc抗体陽性であり背景肝はF1 stageのCHであった。

以上より，HBs抗原が陰性の肝細胞癌症例であっても，肝組織よりHBVが検出されること，cccDNAが低頻度ではあるが検出されたことより，HBVがcccDNAの形態にて存在する症例が存在することが確認された。

(3) HBs抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出

1) この結果，B型肝細胞癌例4例全例に，ヒトゲノムへのHBVゲノムの組み込みを確認した。これらの検索結果では，HBVゲノムはヒト染色体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら，特定の部位への組み込みの集積，いわゆるhot spotは認められず，HBVゲノムの組み込みはランダムであった。現在さらに詳細なる検索・検討中である。現在までに得られた結果をまとめると，1q32（13），2q36（10），3q24（11），6q22（10），9p21（11），14q31（10），15q21（11）などに比較的多数のHBVゲノムの組み込みが認められている。

2) 現在同一症例について，切除された癌部と非癌部肝組織についても，同一のprobeを用いてFISH法を検索中である。

3) HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性の肝細胞癌症例1例パイロットスタディとして，B型と同様にFISH法にてHBV genomeの組み込みの有無を検索した。この結果では，B型と同様にHBV genomeのヒトゲノムへの組み込みが認められた。同様にideogramをも提示する。現時点においては，残念ながらhot spotは検出されていない。

(4) 次世代高速シークエンサーを用いたヒトゲノム解析

次世代高速シークエンサー（Illumine Hisex2000）のランの委託は，実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。このdataを感染症ゲノム実験室に設置してある高性能ワークステーションと解析ソフトウェアを用いて，HBVゲノムの組み込み部位の同定を行った。しかしながら，現在までの検索では，HBVゲノムの組み込み部位は認められていない。考察すると，10 foldのrunでは欠失が多く，100 fold程度に読み込みを増加する必要性があると思われ，可能であれば平成25年度に施行する予定である。

4. 考察

HBs抗原陰性のOccult HBV関連肝癌症例の肝組織よりnested PCR法にてHBV DNAを43％に検出し得た。さらにこのうち1例については，クローニングを行い，3.2kbのHBVの全塩基配列を決定した。この結果では，多数の塩基ないしはアミノ酸変異，欠失変異が認められた。

このPCR産物を精製して，FISH法のprobeとし

て使用した。

HBV関連肝癌の末梢血リンパ球を用いたFish法の結果では，多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら，特定の部位への組み込みの集積，いわゆるhot spotは認められず，その組み込みはランダムであった。

一方，現在C型肝細胞癌についても，同様の方法にて末梢血リンパ球よりFISH法を行い，HBV genomeの組み込みを多数認めた。これらのHBVゲノムの組み込み様式も多彩であり，hot spotは現在のところ確認されていない。しかしながらC型肝細胞癌においてもHBV genomeの組み込みがヒト染色体上に多数認められることを確認し得た。今後は，組み込み部位と発癌に関与する遺伝子発現の有無など背景因子について，次世代高速シークエンサーを用いて，さらに検索する。

謝辞

本研究は，日本大学学術研究助成金総合研究（総12-012）による助成を受けて実施したものである。

文献

Yamamoto T, Kajino K, Kudo M,et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. Hepatology 1999; 29: 1446-1452.

Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. Intervirology 2009; 51: 352-361.

Wang J, Lin J, Chang Y, et al. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2010; 30: 425-429.

Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. Clin Cancer Res 2005; 11: 5821–5826.

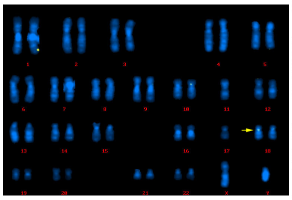
Fig.1

38T-Full genome sequence

```
CTCCACCACGTTCCACCAAACTCTTCAAGATCCCAGAGTCAGGGCTCTGTACCTTCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCCGGAACAGTAAGCCCTGCTCAGAATACTGT
CTCAGCCATATCGTCAATCTTATCGACGACTGGGGACCCTGCGCCGAACATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTT
TTTCTCGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCTAGGGGGAACACCCGTGTGTCGTGGCCAAAATTCGCA
GTCCCAAATCTCCAGTCACTCACCAACCTGTTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTGCATCCTGCTGCT
ATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATCATCAACCACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTG
CACGACTCCTGCTCAAGGAAACTCTTCGCTTCCATCATGTTGTTGTACAAAACCTAGGGACGGAAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGC
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTCTGGCTTTCAGT
TATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAACACCTTGAGACCCTTTATGCCGCTGTTACCCATTTTCTTGTGTCTTTGGGTATACATTTAAACCCT
CACAAAACGAAAAGATGGGGATATTCCCTTAACTTCATGGGATATGTAATTGGGAGTTGGGGCACATTGCCACAGGAACATATTGTCCAAAAAATCAAACTATGT
TTTAGAAAACTTCCTGTAAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCT
TTAAAGCCATTATATGCATGTATACAGGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTTATAAGGCCTTTCTACGTCAACAGTATCTGAACCTTTACCCCGTTGCT
CGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTCCTCTG
CCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCGAAACTCATCGGGACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCCGCAAATATACA
TCGTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAATCGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGC
CGTTTGGGGCTCTACCGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGAC
CGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTTGCATGGAAACCCCCGTGAACGCCCACCGGAGCCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTCAGCAA
TGTCAACGACCGACCTTGAGGCCTACTTCAAAGACTGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGACGAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTA
GGCATAAATTGGTCTGTTCACCAGCACCTTGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAGTCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTTCTATAGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTACTGACTTCTATCCGTCGGTGCGAGACCTCCTAGA
TACCGCCGCTGCACTGTATCGGGACGCATTAGAATCCAATGAACATTGCTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCTATTGTGTGCTGGGGGGAAGTAATGAC
TCTAGCTTCCTGGGTGGGTGGAAATTTACAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCGATTATGTTAACACTAACATGGGCCTAAAGATCAGGCAATTATTGTG
GTTTCACATTTCCTGTCTTACTTTTGGAAGAGAAGTTGTTCTTGAATATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCGCACTCCTCCTGCCTACAGACCACCAAATGC
CCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCACCGCG
TCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCCCAATGTTAGTATCCCTTGGACTCATAAGGTGGGAAACTTTACGGGGCTCTATTCTTCTACAGTACCTGTCTTCAATC
CTGAATGGCAAACTCCTTCTTTTCCAGACATTCATTTGCAGGAGGATATTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGTGGGACCACTTACAGTAAATGAAACCAGGAGAC
TAAAATTAATAATGCCTGCTAGATTTTATCCTAAGGTTACCAAATATTTACCCTTAGATAAAGGGATCAAACCTTATTATCCAGAGCATGTAGTTAGTCATTACT
TCCAGACAAGACATTATTTGCATACTCTTTGGAAGGCGGGGATCTTATATAAAAGAGAGTCAACACAGAGCGCCTCATTCTGCGGGTCACCATATTCTTGGGAAC
AAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGAAAAGGCATGGGGACAAATCTTTCTGTCCCCAATCCCCAGGGATTCTTCCCCGATCATCAGTTGGAC
CCTGCCTTCAAAGCCAACTCAGAAACTCCAGATTGGGACCTCAACCCACACAAAGACAACTGGCCGGACGCCCACAAGGTGGGAGTGGGAGCATTCGGGCCAGGG
TTCACCCCTCCCCATGGGGGACTGTTGGGGTGGAGCCCTCAGACTCAGGGCATACTTACATCTGTGCCAGCAGCCCCTCCTCCTGCCTCCACCAATCGGCAGTCA
GGAAGGCAGCCAACTCCCCTATCTCCACCTCTAAGGGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAA
```

Fig.4

ID3 HBs Ag (+)



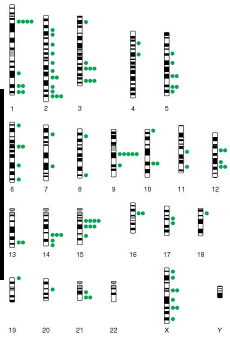
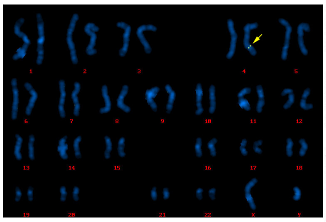


Fig.2

ID1 HBs Ag (+)



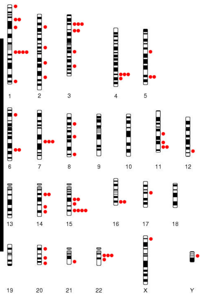
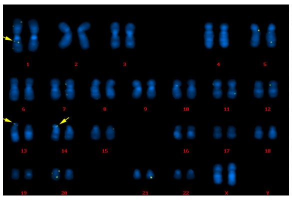


Fig.5

ID4 HBs Ag (+)



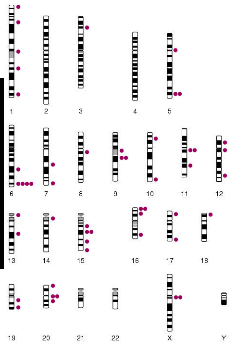
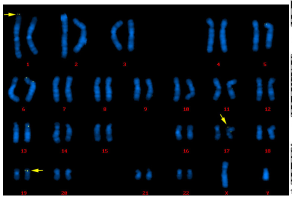


Fig.3

ID2 HBs Ag (+)



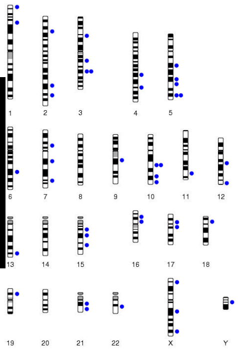
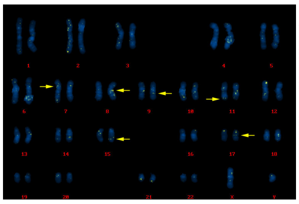
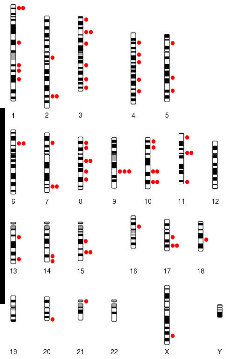


Fig.6

ID4 HCV Ab (+), HBc Ab (-)