

C型慢性肝炎の自然歴と肝発癌に関する研究

分担研究者 矢野 右人 国立病院長崎医療センター 院長

研究要旨： C型慢性肝炎の自然経過を明らかにするために、輸血歴を有する者を対象として発癌の危険因子について検討した。対象は1982年から1998年までに当院を受診したHCV-RNA陽性でかつ輸血歴の明確なC型慢性肝炎患者469名(輸血時平均年齢30歳、初診時平均年齢54.7歳、男女比0.94、平均観察期間5.5年)。436例(93%)に肝生検施行、初診時肝癌症例は除いた。対象例の発癌について、輸血からの期間、危険因子との関係を検討した。その結果、平均発癌年齢は65歳(SD 4.8, range 58-79)であった。52例中60歳以下の発癌は4例のみであり、48例(92%)が60歳以上で発癌していた。肝発癌はHCV感染期間よりも年齢に規定されることが示唆された。

研究協力者

八橋 弘、浜田久之、井上長三、植木俊仁、古賀満明、矢野公士、大黒 学、石橋大海

A. 研究目的

C型慢性肝炎の自然経過のなかで、発癌の危険因子を明らかにすることを目的とした。そのために、HCVの感染時期が比較的明確な輸血歴を有する者を対象として検討を行う。

B. 方法

1982年から1998年までに当院を受診したHCV-RNA陽性でかつ輸血歴の明確なC型慢性肝炎患者469名(輸血時平均年齢30歳、初診時平均年齢54.7歳、男女比0.94、平均観察期間5.5(SD 4.7)年)。436例(93%)に肝生検施行。初診時肝癌症例は除いた。

対象例の発癌について調査し、輸血からの期間、危険因子との関係を検討した。累積肝癌発生率はKaplan-Meier法によって算出し、Log-rank(Mantel-Cox)にて検定した。危険因子をCox比例ハザードモデルにより単変量および多変量解析をおこなった。危険因子は性、輸血時年齢(30歳以上、未満)、初診時年齢(56歳以上、未満)、輸血から初診までの期間(26年以上、未満)、アルコール飲酒量(50g/日×5年以上、未満)、組織(F3以上、未満)、IF治療有無、初診時ウイルス量(5Meq/ml以上、未満)、総ビリルビン値(1.0mg/dl以上、未満)、ALT、AST、ALP、プロトロンビン時間、血小板数(10万/ μ l以上、未満)とした。

C. 研究結果

輸血時から最終観察日までの平均は28.1年(SD 11.7)。肝癌発生は469例中52例(11.1%)。累積肝癌

発生率は輸血からの期間10年(0.2%)、20年(1.1%)、30年(2.8%)、40年(22.6%)、50年(50.9%)であった。単変量で有意差が認められた危険因子は総ビリルビン値(リスク比(RR)=2.66、 $P=0.008$)、血小板(RR=3.30、 $P<0.0001$)、アルコール飲酒量(RR=2.66、 $P=0.008$)、IFN(RR=4.02、 $P=0.0003$)、輸血から初診時までの期間(RR=8.92、 $P<0.0001$)、肝線維化($R=8.17$ 、 $P<0.0001$)、初診時年齢($R=12.3$ 、 $P<0.0001$)であった。多変量解析では輸血時年齢($R=2.17$ 、 $P=0.03$)、輸血から初診までの期間($R=4.56$ 、 $P=0.001$)、肝線維化($R=4.18$ 、 $P=0.002$)、初診時年齢($R=6.33$ 、 $P<0.0001$)の4因子のみに有意差が認められた。

平均発癌年齢は65歳(SD 4.8, range 58-79)であり、52例中60歳以下の発癌は4例のみであり、48例(92%)が60歳以上で発癌していた。

D. 考察

今回対象とした輸血歴を有するC型慢性肝炎患者における肝発癌の最も強い独立危険因子は年齢であった。輸血後の期間、輸血時年齢、肝線維化も発癌の危険因子となりうるが、肝発癌症例の92%(48/52)は60歳以降に発癌しており、60歳前後およびそれ以後の慢性C型肝炎は嚴重な経過観察が必要である。

E. 結論

C型慢性肝炎における肝発癌は、HCV感染期間よりも年齢に規定される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamada H, Yatsushashi H, Yano K, et al. Impact of Aging on the Development of HCC in Post Transfusion Chronic Hepatitis C. *Cancer*, 2002, in press
- 2) Yatsushashi and Michitami Yano. TOWARDS CONTROL OF HEPATITIS C IN THE ASIA-PACIFIC REGION. Natural history of chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15 (Suppl.): E111-E116, 2000.5.
- 3) Khaleque Newaz Khan and Hiroshi Yatsushashi. Effect of alcohol consumption on the progression of hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Alcohol & Alcoholism* 35 (3): 286-295, 2000.
- 4) 井上長三・矢野右人. 肝癌の疫学－肝細胞癌の自然歴. *日本臨牀* 59 増刊号 (6): 20-23, 2001.

2. 学会発表

- 1) Seiji Miyazoe, , Keisuke Hamasaki, Keisuke Nakata, Yuji Kajiya, Kazuaki Ohkubo, Hiroki Ishikawa, Kazuhiko Nakao, Manabu Daikoku, Hiroshi Yatsushashi, Michiaki Koga, Michitami Yano, Katsumi Eguchi. Influence of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphisms on Disease Progression in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection, The American Association for the Study of Liver Diseases 52nd Annual Meeting, (HEPATOLOGY 34(4):311A, 2001)

- 2) Koji Yano, Hamada H, Yatsushashi H, et al. Impact of Aging on the Development of HCC in Post-Transfusion Chronic Hepatitis C, Asia Pacific Digestive Week 2001 in- corporating, Australian Gastroenterology Week (Journal of Gastroenterology and Hepatology 16 (Suppl.): A69, 2001)
- 3) Hiroshi Yatsushashi, Koji Yano, Asao Katsume, Michinori Kohara, Michitami Yano. Intrahepatic IFN Signals Transcription Levels in Patients with Chronic Hepatitis C Correlate with Response to IFN Therapy. Asia Pacific Digestive Week 2001 incorporating. Australian Gastro-enterology Week (Journal of Gastroenterology and Hepatology 16 (Suppl.): A71, 2001)
- 4) 八橋 弘・矢野右人・田中 武・勝目朝夫・小原恭子・染谷秀子・小原道法. 肝細胞 IFN シグナル関連 mRNA 発現レベルと C 型慢性肝炎 IFN 治療効果に関する検討. 第 37 回日本肝臓学会総会. *肝臓* 42 (Suppl.1): A137, 2001.4.25. 横浜 2001.5.17-18.
- 5) 八橋 弘. コンセンサス B 型肝炎 自然経過と感染予防. 第 5 回日本肝臓学会大会、2001
- 6) 浜田久之・八橋 弘・大黒 学・大畑一幸・井上長三・古賀満明・矢野右人. C 型慢性肝炎の自然経過 (輸血歴を有する者での検討). 第 87 回日本消化器病学会総会、2001

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

一塩基多型 (SNP) 解析に関する研究

分担研究者 村松正明 ヒュービットジェノミクス 研究所長

研究要旨：大量の SNP 解析を行うための基礎検討をタイピング反応系およびタイピング結果解析ソフトの両面から評価を行った。タイピング法は Invader 法および Taqman 法を、結果解析ソフトは LD support, Arlequin, HapInfer を用いて行った。

A. 研究目的

一塩基多型 (SNP) 解析により肝炎から肝がんに移移行に関連する宿主側の因子、また肝炎治療 (特にインターフェロン) に対する反応性の個体差に関連する宿主側の因子を検討することを目的とする。本年は SNP の大量タイピングを行うための手法として、Invader 法および Taqman 法の検討を行った。また SNP タイピング結果解析を用いて連鎖不平衡およびハプロタイプ解析を行うためのソフトウェアの評価を行った。

B. 研究方法

Invader 法による SNP 解析の基礎検討を行った。ヒト DNA はコリエル社より入手した。10種類の SNP に対する Invader 試薬を構築し、Thirdwave Technologies のプロトコールに従ってアッセイを行った。Taqman 試薬も同様に試薬を構築し、Applied BioSystem 社のプロトコールに従ってアッセイした。

連鎖不平衡およびハプロタイプ解析ソフトに関しては LDsupport (Dr. Kamatani, Tokyo Womens Medical School), Arlequin (Dr. Excoffier, Univ. Geneva), および HapInfer (Dr. Clark, Univ Penn State) を入手して行った。

C. 研究結果

Invader 法は PCR 増幅をしないゲノム DNA を用いて直接 SNP の検出ができる。今回、SNP タイピングに必要な DNA 量を検討したところ、50 ng 程度の比較的少量の DNA が必要であることが判った。ゲノム DNA を PCR 増幅を行った後で Invader assay も同様に SNP 検出が可能であった。しかし PCR と Invader の両反応を行うためのコストがかかり、このままでは大量解析には向かない、と結論された。マルチプレックス PCR は今回は試みなかった。

一方、Taqman 法は SNP 検出の成功率および精度に関して、Invader 法とほぼ同程度であることが判った。一反応のコストは高いが、反応系を通常の

20ul 系から 5ul 系に下げることが出来たので、この点、改善があった。今回は両方を総合的に判断して、Taqman 法を中心にタイピングを行うことにした。また Taqman 法で解析できないが Invader 法では解析できる SNP、あるいはその逆のケースもあるので、Invader 法も一部の SNP 解析には残すことにした。

連鎖不平衡およびハプロタイプ解析ソフトは LDsupport (Dr. Kamatani, Tokyo Womens Medical School), Arlequin (Dr. Excoffier, Univ. Geneva), および HapInfer (Dr. Clark, Univ Penn State) を検討した。いずれもハプロタイプ解析アルゴリズムは期待値最尤法が用いられている。しかし入力する SNP データ形式、および結果の出力がどれも異なっており、計算できる連鎖不平衡パラメータの種類にもわずかな違いが認められた。同じ SNP データを入力したところ、LD support, Arlequin に関しては同じ結果が得られたが、HapInfer は入力する SNP の順番をかえると、異なる結果が出る場合があることが判った。全2者はほぼ同等の機能を持っているが、作製者が近く、種々の機能変更や追加がより容易な点で LD support の方を今後の解析の中心として用いて行くことで決定した。

D. 考察

本年は SNP の大量解析に向けた準備段階として、SNP のタイピング方法およびタイピング結果の解析方法を検討した。

E. 結論

1. SNP タイピング方法は Taqman 法を主に Invader 法を従に大量解析システムを組む。
2. 連鎖不平衡、ハプロタイプ解析を行うためのソフトウェアとして LDsupport を用いる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
吉田晴彦、白鳥康史、小俣政男	C型肝炎	日本医師会雑誌	126	5-8	2001
吉田晴彦、白鳥康史、小俣政男	インターフェロン療法によるC型慢性肝炎の肝癌死の抑制	消化器	33	541-545	2001
吉田晴彦、白鳥康史、小俣政男	インターフェロン療法の治療効果：長期予後	肝胆臓	43	885-891	2001
吉田晴彦、白鳥康史、小俣政男	C型肝炎治療の個人的・社会的利益－ナショナルサーベイの立場から	Medico	33	85-88	2002
Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M.	Hepatitis C virus core protein activates NF- κ B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor.	J Biol Chem	276	16399-16405	2001
Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schinazi RF, Carrilho FJ, Omata M.	The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance.	J Clin Invest	107	449-455	2001
Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Omata M.	Current options for the therapy of chronic hepatitis B Infection.	Curr Infect Dis Rep	3	137-142	2001
Goto T, Kato N, Ono-Nita SK, Yoshida H, Otsuka M, Shiratori Y, Omata M.	Large isoform of hepatitis delta antigen activates the rat smooth muscle (SM) 22 α promoter via enhancement of transcriptional ability of serum response factor.	Cells of the Hepatic Sinusoid	8	223-224	2001
Sato S, Shiratori Y, Imamura M, Teratani T, Obi S, Koike Y, Imai Y, Yoshida H, Shiina S, Omata M.	Power Doppler signals after percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma predict local recurrence of tumors: a prospective study using 199 consecutive patients.	J Hepatol	35	225-234	2001
Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M.	Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo.	J Med Virol	66	187-199	2002
Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M.	Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression.	Virology		in press	2002
Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Shiratori Y, Omata M.	Induction of proliferation-related signals by irus. hepatitis C virus.	Growth, proliferation, and apoptosis in hepatocytes		81-98	2002
Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Maru Y, Saisho H.	State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma: Existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR.	J Med Virol	64	410-418	2001
Ikeuchi T, Yokosuka O, Kanda T, Imazeki F, Seta T, Saisho H.	The Roles of TT Virus Infection in Various Types of Chronic Hepatitis.	Intervirology	44	219-223	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fujiwara K, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Saisho H, Omata M.	Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis.	J Hepatol	35	112-119	2001
Kato A, Miyazaki M, Ambiru S, Yoshitomi H, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yokosuka O, Nakajima N.	Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection.	J Surg Oncol.	78	110-115	2001
Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Sato S, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Kiyosawa k, Omata M.	Association between Severity of Type A Hepatitis and Nucleotide Variations in 5' Nontranslated Region of Hepatitis A Virus RNA: strains from fluminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions.	Gut		in press	2002
Ueno Y, Moriyama M, Uchida T, Arakawa Y	Irregular regeneration of hepatocytes is an important factor in the hepatocarcinogenesis of disease.	Hepatology	33	357-362	2001
Moriyama M, Matsumura H, Shimizu T, Shioda A, Kaneko M, Miyazawa K, Miyata H, Tanaka N, Uchida T, Arakawa Y	Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis liver in Japan.	J Med Virol	64	74-81	2001
S. Nishiguchi, S. Shiomi, S. Nakatani, et al.	Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis.	Lancet	357	196-197	2001
S. Kubo, S. Nishiguchi, K. Hirohashi, et al.	Effects of long-term postoperative interferon-a therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	Ann Intern Med	134	963-967	2001
M. Nishikawa, S. Nishiguchi, S. Shiomi, et al.	Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma.	Cancer Res	61	1843-1845	2001
Y. Moriyama, S. Nishiguchi, A. Tamori, et al.	Tumor-suppressor effect of interferon regulatory factor-1 in human hepatocellular carcinoma.	Clin. Cancer Res	7	1293-1298	2001
S. Kubo, A. Tamori, K. Ohba, et al.	Previous or occult hepatitis B virus infection in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma without hepatic fibrosis.	Dig Dis Sci	11	2408-2414	2001
新山豪一、他	C型慢性肝炎におけるIFN療法の効果不十分例の対策	ミレニアム消化器	2000	77-80	2000
Takato Ueno, Tatsuya Ide, Osamu Hashimoto, Yasuyo Uchimura, Takuji Torimura, Ryukichi Kumashiro, Sadataka Inuzuka, Michio Sata.	Long-term follow up of interferon-treated chronic hepatitis C and serum hepatic fibrosis markers.	Hepato-Gastroenterology	48	1124-1128	2001
Michio Sata, Yumiko Nagao.	Hepatitis virus and extrahepatic manifestations - skin, mucosa, muscle, and hematopoietic organs -.	Internal Medicine	40	185-189	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Satsuki Kobayashi, Tatusya Ide, Michio Sata.	Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers.	Journal of Hepatology	34	584-586	2001
Yumiko Nagao, Michio Sata, Seiji Noguchi, N Tajiri, Naofumi Ono, T Fukuda, Tadimitsu Kameyama, Takato Ueno.	Various extrahepatic manifestations caused by hepatitis C virus infections.	Review Serices Hepatitis The Schering Plough Journal of Hepatitis	3	15-16	2001
黒松亮子、田中正俊、島内義弘、 緒方理子、井出達也、神代龍吉、 真島康雄、佐田通夫	HBs 抗原陽性初発肝細胞癌患者から得られた定期観察の現状と問題点について原陽性初発肝細胞癌患者から得られた定期観察の現状と問題点について	肝臓	42	126-132	2001
藤山重俊、田中基彦	C型肝炎の疫学と治療－特にIFN療法後の長期予後	臨床病理	48	5-8	2000
永濱裕康、藤山重俊	肝癌ハイリスクグループのフォローアップ	肝胆臓	43	775-783	2001
Hamada H, Yatsunami H, Yano K, et al	Impact of Aging on the Development of HCC in Post-Transfusion Chronic Hepatitis C	Cancer		in press	2002
Yatsunami and Michitami Yano	TOWARDS CONTROL OF HEPATITIS C IN THE ASIA-PACIFIC REGION. Natural history of chronic hepatitis C.	J Gastroen Hepatol	15 (Suppl)	E111- E116	2000
Khaleque Newaz Khan and Hiroshi Yatsunami.	Effect of alcohol consumption on the progression of hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in Japanese patients.	Alcohol & Alcoholism	35	286-295	2000
井上長三・矢野右人	肝癌の疫学－肝細胞癌の自然歴	日本臨牀	59	20-23	2001

20010551

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。