

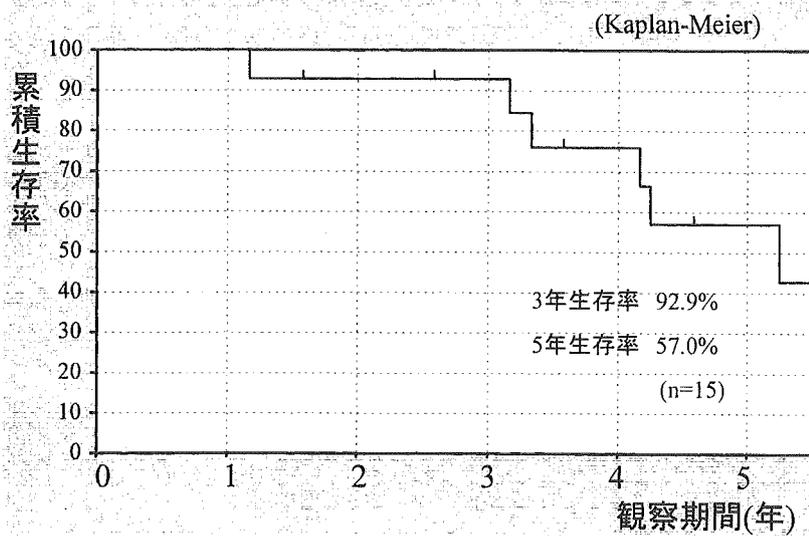
Table 1. 逐年肝検診におけるC型肝炎ウイルス(HCV)の年次別自然陰性化率

検診年	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
対象例数	251	236	211	188	132	321	154	126	108	99
陰性化例数	5	3	1	3	1	0	1	1	1	1
陰性化率(%)	2.0	1.3	0.5	1.6	0.8	0.0	0.6	0.8	0.9	1.0

Table2. 逐年肝検診受診者におけるHCV出没例の年次別HCVRNA検出状況

検診年	初回検診時	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	HCV 抗体価	
症例													
年齢 性													
1.68歳	女	+	未受検	未受検	未受検	未受検	-	+	-	未受検	未受検	未受検	中力価
2.66歳	男	+	-	-	未受検	未受検	未受検	未受検	+	未受検	未受検	未受検	高力価
3.70歳	女	+	-	未受検	未受検	未受検	未受検	+	+	未受検	未受検	-	高力価
4.68歳	女	+	-	未受検	+	-	未受検	+	未受検	未受検	-	+	高力価
5.58歳	男	+	-	+	-	+	+	未受検	未受検	未受検	未受検	+	高力価
6.76歳	女	+	-	+	-	+	未受検	+	未受検	未受検	未受検	未受検	高力価
7.69歳	男	+	未受検	未受検	-	未受検	-	+	-	未受検	未受検	-	中力価

Fig.2. 肝検診逐年受診者に於ける肝細胞癌の累積生存率



超高感度免疫測定法を用いた新規の HBs 抗原測定 of 臨床的意義

分担研究者 富樫 整 国立大学法人山形大学医学部消化器病態制御内科学 助教授

研究要旨

HBs 抗原を超高感度に検出可能な radical immunoassay 法を用い、各種肝疾患における 低濃度 HBs 抗原 の存在を検証した。吸収試験により Radical Immunoassay 法の特異性を確認した。いわゆる HBs 抗原陽性例を除く正常人ボランティア 434 人において 3.00% の 低濃度 HBs 抗原 陽性を示した。低濃度 HBs 抗原 陽性率は、非 B 型非 C 型肝硬変 7.69%、非 B 型非 C 型肝細胞がん 9.68% と正常人ボランティアに比べ有意に ( $p=0.04$ ) 高率であった。肝細胞がんを伴わない C 型肝炎（肝細胞癌を伴わない）9.68%、肝細胞がんを伴う C 型肝炎 10.28% は正常人ボランティアに比べ有意に（各々  $p<0.02$ 、 $p<0.008$ ）高率であった。低濃度 HBs 抗原 陽性例の中で real-time PCR により HBV DNA 陽性を示した症例は、正常人ボランティア 0%、非 B 非 C 型肝硬変 20.0%、非 B 非 C 型肝がん 33.3%、C 型肝炎 26.1% であった。また、HBs 抗原自然消失例 7 例において、消失直後、低濃度 HBs 抗原 は全例陽性であった。内 2 例は、HBV DNA が陽性であり、低濃度 HBs 抗原 陽性を持続している。HBV DNA 陰性 5 例中 3 例は、6、9、24 ヶ月後に 低濃度 HBs 抗原 が陰性化した。残り 2 例は、84、96 ヶ月間陽性を持続している。

低濃度 HBs 抗原 陽性率は、非 B 型慢性肝疾患において有意に高率であった。ルーチン測定による HBs 抗原自然消失後も、低濃度 HBs 抗原 は、長期にわたり陽性を示した。Real-time PCR を併せる事により、低濃度 HBs 抗原 陽性例は、HBV DNA 陽性群と HBV DNA 陰性群に区別できる。前者は潜在性 B 型肝炎キャリアであり、後者の意義は不明であるが、一部 HBs 抗原自然消失例を含むと考えられる。

A. 研究目的

私どもは、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス感染を高感度に検出するため、電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いた超高感度免疫測定法を開発し、radical immunoassay 法と名づけた。Radical immunoassay 法は、迅速、安価という特徴をあわせ持つ。私どもは、radical immunoassay 法を用い、低濃度 HBs 抗原

陽性例が稀ならず存在する事を明らかにした。対象症例を増やし、各種肝疾患における低濃度 HBs 抗原陽性率の検証を改めて行ない、意義について調べた。

B. 研究方法

radical immunoassay 法は、抗 HBs 抗体（マウス・モノクローナル）に標識されたペルオキシダーゼ活性を安定なラジカ

ル (HHTIO・) に置き換え、これを電子スピン共鳴装置 (ESR) により定量する原理に基づいている。ESR法は電子スピンを有する常磁性種のみを計測するため、バックグラウンドノイズを最小限にし、大幅な感度向上をもたらす。私どもは、本法の汎用性を図る目的にて、全自動ESR分析装置を併せて開発した。

ELISA 法にて HBs 抗原陰性例を対象にした。正常人ボランティア 210 例、原因不明の肝硬変 65 例、原因不明の肝細胞癌 62 例を対象に低濃度 HBs 抗原を測定した。C 型肝炎患者において、B 型肝炎ウイルスの重感染が肝障害の進展や発癌をもたらす可能性が知られている。C 型肝炎患者 134 例、C 型慢性肝炎あるいは C 型肝硬変に肝細胞癌を合併した患者 107 例についても低濃度 HBs 抗原測定を行った。さらに、エジプト人非 B 型慢性肝疾患 50 例についても低濃度 HBs 抗原を測定した。低濃度 HBs 抗原陽性例について、リアルタイム PCR 法により HBV DNA を測定した。

HBs 抗原自然消失例 7 例についても、低濃度 HBs 抗原の測定を行い、ルーチンの HBs 抗原測定にて HBs 抗原が消失した症例の推移を検証した。

#### (倫理面での配慮)

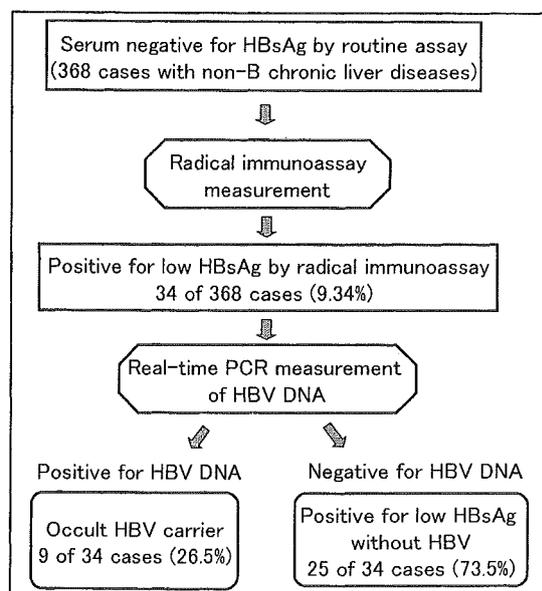
十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得た。検体の使用目的、予想される効果、参加者の人権の保護などについても、説明した。

### C. 研究結果

正常人ボランティア 210 例中、6 人が HBs 抗原陽性と判定された (2.86%)。

原因不明の肝硬変 65 症例中 5 例低濃度 HBs 抗原が、陽性であった (7.69%)。原因不明の肝細胞癌 62 例のうち 6 例低濃度 HBs 抗原が、陽性であった (9.68%)。C 型肝炎患者 134 例中、12 例陽性であった (8.96%)。C 型慢性肝炎に肝細胞癌を合併した患者 107 名中、11 例低濃度 HBs 抗原が陽性であった (10.28%)。低濃度 HBs 抗原陽性と判定された非 B 型慢性肝疾患患者 34 例の血清をリアルタイム PCR にて HBVDNA の有無を検索した。非 B 型慢性肝疾患 34 例中 9 例 HBVDNA が検出された。エジプト人非 B 型慢性肝疾患 50 例中 5 例 HBs 抗原陽性と判明した (10%)。5 例中 1 例 HBVDNA が real-time PCR により検出された。(図)

尚、肝疾患を除いた生活習慣病患者 224 例中 7 例 (3.13%) 低濃度 HBs 抗原が陽性であり、正常人ボランティア群での陽性率と同等であった。両群とも HBV DNA は陰性であった。



図

HBs 抗原自然消失例 7 例において、消失直後、低濃度 HBs 抗原は全例陽性であった。内 2 例は、HBV DNA が陽性であり、低濃度 HBs 抗原陽性を持続している。HBV DNA 陰性 5 例中 3 例は、6、9、24 ヶ月後に低濃度 HBs 抗原が陰性化した。残り 2 例は、84、96 ヶ月間陽性を持続している。

#### D. 考察

私どもは、感染症関連蛋白を高感度に検出可能な radical immunoassay 法を開発した。私どもが radical immunoassay 法で測定した結果では、ルーチンの HBs 抗原測定結果が陰性であるにもかかわらず、正常人ボランティアや肝疾患患者において低濃度 HBs 抗原陽性と判定される方が多いことが判明した。分担研究者の青山は、radical immunoassay 法による HBs 抗原検出の特異性を吸収試験にて確認した。従って、私どもの方法は信頼にたると考えられる。

今回の検討にて、ボランティア 210 例中 6 例、肝がんや C 型慢性肝炎を含む非 B 型慢性肝疾患 368 例中 34 例 低濃度 HBs 抗原が陽性であった。統計学的に非 B 型慢性肝疾患は、有意に高かった。肝疾患を除いた生活習慣病における低濃度 HBs 抗原陽性率は、正常人ボランティア群と変わらなかった（データ提示せず）。HBs 抗原が自然に陰性化する症例が報告されている。非 B 型慢性肝疾患において低濃度 HBs 抗原陽性例が有意に高い第一の理由として、HBs 抗原自然陰性化例が含まれている可能性がある。低濃度 HBs 抗原陽性例において 26.4%

HBV DNA 陽性であった。また、ウッドチャック HBV モデルにおいて、少量の HBV 持続感染は発がんなどの肝疾患を惹起されることが報告されている。第二の理由として、低濃度 HBV DNA（いわゆる潜在性 B 型肝炎ウイルスキャリア）が慢性肝疾患を惹起している可能性がある。以上より、肝機能異常を伴った低濃度 HBs 抗原陽性例は、注意深く経過観察する必要があると考えられる。

この研究において、もう一つの論議すべき点は、低濃度 HBs 抗原陽性かつ HBV DNA 陰性症例である。HBV 増幅は、宿主の免疫機構に依存するため、低濃度 HBV キャリアにおいて HBV DNA が変動している可能性がある。また、HCV によるウイルス干渉により HBV DNA 増幅が抑制されているケースもある。インターフェロン療法を行ない低濃度 HBs 抗原が陽性で HBV DNA 陰性と判断された 3 症例の検討では、インターフェロン投与により HBs 抗原濃度は著明に低下した。低濃度 HBs 抗原は、インターフェロン感受性を有すると考えられる。低濃度 HBs 抗原陽性かつ HBV DNA 陰性例は、経過中 HBV DNA が出現し得る可能性がある。低濃度 HBs 抗原陽性、HBV DNA 陰性例において、化学療法を行なう際、HBV 再活性化が起こらないように、注意深く経過観察する必要がある。

疫学的に見て B 型肝炎ウイルスの感染率の高い地域（中国を始めとするアジア、アフリカ）においては、母子感染、性行為などに伴う水平感染が社会的な問題になっている。この様な地域においては、潜在性 B 型肝炎が多いと予想されるが、簡便さ、価格、検体処理速度の理由から PCR 法の導入は困難である。また、

PCR 法は、プライマーの設定や測定者の技量の影響を受けやすく、世界標準の測定法になり難い。Radical immunoassay 法は、感度と簡便さの面で、PCR法の短所を補うことができる。疫学的にエジプトは、C 型肝炎ウイルスの多発地区である。今回のデータで示したように、エジプトにおいても潜在性 B 型肝炎ウイルスを効率よく拾い上げることができた。潜在性 B 型肝炎ウイルスは、感染力を有する。Radical immunoassay 法による高感度抗原測定法の導入により、母子感染と水平感染と同時に免疫機構の低下に基づく B 型肝炎ウイルス再燃を制御し、B 型肝炎ウイルスに関連する死を減少させると予測される。

#### E. 結論

私どもは、免疫測定法をより高感度にする radical immunoassay 法を開発した。本法は、抗体にラベルされたペルオキシダーゼ活性を電子スピン共鳴 (ESR) 装置にて計測する。汎用性を高めるため、全自動 ESR 分析装置を併せて開発した。

低濃度 HBs 抗原陽性頻度は、非 B 型慢性肝疾患において、正常人ボランティア群、肝疾患を除く生活習慣病群に比べ、有意に効率であった。低濃度 HBs 抗原陽性血清について real-time PCR により HBV DNA を検出すると、34 例中 9 例 HBV DNA (26.5%) が検出された。これらは、潜在性 B 型肝炎と考えられる。一方、低濃度 HBs 抗原陽性かつ HBV DNA 陰性例には一部 HBs 抗原自然消失例が含まれると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

What can we see if the sensitivity of HBsAg detection exceeds the limit? (manuscript in preparation)

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

今回の研究においてなし

「B型およびC型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための感染病態解明に関する研究」  
分担研究報告書

HCVの感染感受性に係わる宿主要因ならびにHCV NS3領域のサブグループと発がんリスクの検討

分担研究者 齋藤貴史 山形大学医学部・消化器病態制御内科学・講師

研究要旨： HCVの感染感受性(防御)に係わる宿主要因を明らかにする目的で、平成16年度研究成果に基づき、heparan sulfate proteoglycan (HSPG)の糖鎖硫酸化に係わる酵素N遺伝子および感染初期の自然免疫の成立に関与すると考えられるTGF- $\beta$ 1遺伝子について、一塩基多型性(SNP)解析を行った。SNP解析は、HCV抗体陽性者のうち、HCV RNA陽性持続感染者と陰性既往感染者の二群間におけるSNP頻度を比較解析した。両群間の比較で、酵素Nの一亜型であるN3遺伝子の2つのSNP、およびTGF- $\beta$ 1遺伝子のプロモーター領域のrSNPに有意差のある遺伝子多型が検出された。これらは、個人のHCV感染感受性(防御)に影響を及ぼす可能性があると思われた。また、HCV-1bのNS3アミノ末端120残基のグルーピングを行い、HCV-1b感染者におけるNS3サブグループと発がんリスクの相関を、臨床症例を用いて後向きコホート研究の手法で解析した。HCV-1b NS3のグループB(サブグループB1-1)の感染者では、その他のグループならびにサブグループ感染者に比し、有意に発がんリスクが高いことが示唆された。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、HCV感染病態を、感染感受性(防御)に係わる宿主要因ならびに発がんに係わるウイルス要因から検討を行うことである。

感染症において、宿主側の感染防御に係わる遺伝的要因の解明は、その感染症の病態解明に寄与するとともに、新たな予後予測因子や治療薬の開発にとって重要である。HCV感染後の経過は個人間で多様である。私たちは、HCV感染者の多い山形県某町において、HCV感染後の経過に影響する宿主側の遺伝的要因を明らかにするためのコホート研究を継続して行っている。HCV抗体陽性の住民においてHCV持続感染者と既往感染者の二群間で遺伝子一塩基多型(Single nucleotide

polymorphism: SNP)の網羅的な解析を行った結果、初年度(平成16年度)にHCV感染感受性候補遺伝子およびSNPとして10遺伝子12SNPを報告した。今年度はこの結果を踏まえ、感染成立に深く関与すると考えられる細胞表面上のheparan sulfate proteoglycan (HSPG)の糖鎖硫酸化に係わる酵素Nに着目し更なる遺伝子多型性解析を行った。また、感染初期の自然免疫に関与すると考えられるTGF- $\beta$ 1について、そのpromotor遺伝子のrSNP解析を行った。

HCV感染に際し、HCV NS3がアミノ末端領域を介してp53癌抑制蛋白と結合すること、および両者の相互作用がNS3領域の配列多様性により異なることが報告されている。私たちは、堀田博教授(神戸大学)との共同研究に

において、HCV-1b NS3 アミノ末端 120 残基の蛋白質二次構造の分類で、HCV-1b NS3 グループ B 感染者に肝がんを有する例が多いことを報告した(Ogata S, et al. J Clin Microbiol 41: 2835, 2003)。そこで、本研究において、HCV-1b感染患者から分離された HCV について、前述の既報分類に基づき、NS3 アミノ末端領域の二次構造を分類し、そのサブグループと肝発癌リスクとの関連性について、当科の臨床症例を用いて後ろ向きコホート研究を行った。

## B. 研究方法

### I. HCV の感染感受性に係わる宿主要因

HCV 高率感染地区の 20 歳以上の一般住民 1040 名を対象として、採血による HCV 感染調査を行った。遺伝子解析の同意が文書で得られた被験者のうち、IFN 治療歴のない HCV 抗体陽性 254 名のサンプルを用いて、遺伝子 SNP 解析を行った。本研究は、国が定めた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り山形大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

#### 1. HSPG の糖鎖硫酸化に係わる酵素 N 遺伝子の SNP 解析

HSPG の糖鎖硫酸化に係わる酵素 N は、4 種の亜型から成り細胞内でゴルジ装置に局在し、HSPG の脱アセチル化と硫酸化に係わる酵素である。HCV E2 の N 末端には、陽性電荷のアミノ酸残基が存在するため、感染の第一段階として HCV の細胞への接着に際しては、HCV が細胞表面に細胞外基質として存在し硫酸基により陰性荷電を受けた HSPG の glycosaminoglycan などの糖鎖部分と接着することが推測されている(Barth H, et al. J Biol Chem 2003 278: 41003)。HSPG の糖鎖硫酸化

に係わる酵素 N の遺伝子多型性により、HSPG 糖鎖の硫酸化と陰性電荷に影響を与える可能性がある。HCV 抗体陽性 254 名のうち、輸血歴のある例を除き、タイピングが可能であった HCV RNA 陽性持続感染者 159 名、同陰性の既往感染者 59 名を対象に、酵素 N の 4 亜型の SNP 解析を行った。また N1 から N4 の各遺伝子毎に連鎖不平衡ブロックを抽出してハプロタイプ解析を行った。

2. TGF- $\beta$  1 遺伝子のプロモーター rSNP 解析  
TGF- $\beta$  1 は、C 型慢性肝疾患における肝線維化や発がん過程に重要な役割を担うことが知られている。また、リンパ球や NK 細胞に対しては免疫抑制的に作用することが知られており、HCV 感染初期のウイルス排除に際しての自然免疫にも関与が推定される。昨年度の研究にて、TGF- $\beta$  1 遺伝子の 2 種の iSNP が感染防御の候補遺伝子として挙げられたが、さらに TGF  $\beta$  1 の rSNP として、プロモーター中にある SNP (-509 C/T) の解析を行った。タイピングが可能であった HCV RNA 陽性持続感染者 184 名、陰性の既往感染者 46 名を対象に TGF  $\beta$  1 遺伝子の rSNP 解析を行った。本解析は、村松正明教授(東京医科歯科大学、ヒュービットゲノミクス社)との共同研究で行われた。以上の SNP 解析は Taqman 法あるいはダイレクトシーケンス法で行った。

### II. HCV-1b NS3 領域のサブグループと発がんリスクの検討

対象は、当科で診断された HCV-1b 感染患者 74 例である。血清より RT-PCR 法にて HCV NS3 アミノ末端部分を増幅し、Robson 法により NS3 アミノ末端領域 120 残基の二次構造を推定分類した。HCV-1b 感染者における HCV NS3 サブグループを既報の分類(Ogata, et al. J Clin Microbiol 41: 2835, 2003)に基づき、グルー

プ A およびグループ B に大別し更にサブグループに分類した。分類不能 8 例および HCC 発生までの期間が 1 年未満の 5 例を除いた 61 例を後ろ向きコホート研究の対象とした。観察期間は慢性肝炎または肝硬変の診断日から 2004 年 8 月までとし、HCC 発生者は診断確定日をエンドポイントとした。HCC 発生の関連要因として、肝硬変有無、年齢、性別、IFN 治療有無を検討し、Kaplan-Meier 法を用いて累積 HCC 発生率を推定し、log-rank test を用いて比較した。また、Cox 比例ハザードモデルを用いて相対リスク(RR)を推定し、サブグループ別のリスクを評価した。

### C. 研究結果および考察

#### I. HCV の感染感受性に係わる宿主要因

##### 1. HSPG の糖鎖硫酸化に係わる酵素 N 遺伝子の SNP 解析

酵素 N の 4 亜型 (N1, N2, N3, N4) について、HCV 持続感染者と既往感染者間で、N3 遺伝子上の 2 つの SNP に際立った有意差が検出された ( $P < 0.005$ )。またハプロタイプ解析においても、N3 遺伝子上に 2 つの連鎖不平衡ブロックが検出された ( $P < 0.01$ )。N3 は主に肝臓等のゴルジ装置で発現し、HCV と細胞表面で接着する HSPG の糖鎖修飾の第一段階を担っている遺伝子であり、4 種の亜型の中で、最も HSPG 糖鎖の脱アセチル活性が強い。したがって、N3 の遺伝子多型による HSPG 糖鎖の修飾程度の相違が、HSPG 糖鎖における硫酸化と陰性荷電状態の程度に影響し、陽性荷電状態にある HCV の細胞接着に影響する可能性があると思われる。HSPG 糖鎖の修飾に係わる酵素 N3 の遺伝子多型が、HCV の細胞接着の差異として感染経過に影響を与えている可能性が示唆された。

2. TGF- $\beta$  1 遺伝子のプロモーター rSNP 解析  
TGF- $\beta$  1 遺伝子-509C のアレルおよび-509CC の遺伝子型はともに HCV RNA 陽性持続感染者に比し陰性既往感染者に有意に多く認められた ( $P < 0.02$ )。またこのプロモーターの-509C/T とシグナルペプチド中にありアミノ酸変化を伴う 869T(Pro)/C (Leu) はほぼ完全な連鎖不平衡にあった。ルシフェラーゼアッセイの結果、-509C アレルを持つプロモーターの方が-509T アレルを持つプロモーターより有意に転写活性が弱かった。TGF- $\beta$  1 は、プロモーターの-509 C/T アレルと翻訳領域 869T(Pro)/C (Leu) アレルの 2 つの SNP により、低発現群と高発現群に分けられる。TGF- $\beta$  1 はリンパ球や NK 細胞に対して免疫抑制的に作用することから、HCV 排除は、TGF- $\beta$  1 低発現群で起こりやすく、強い免疫抑制を引き起こす可能性を持つ TGF- $\beta$  1 高発現群で起こりにくい事が推察された。

#### II. HCV-1b NS3 領域のサブグループと発がんリスクの検討

HCC 発生者数は、観察期間 (8.6 $\pm$ 4.5 年) 中、慢性肝炎 20/49(40%)、肝硬変 11/12(91%)であった。サブグループ別 HCC 発生者数は A1-1, 2/12(16%); A1-2, 0/3(0%); A2-1, 2/4(50%); B1-1, 21/31(67%); B1-2, 3/8(37%); B2-1, 2/2(100%); B2-2, 1/1(100%)であった。サブグループのリスク評価には肝硬変の有無による層別解析を行った。最終的に肝硬変例は対象数が少なく、慢性肝炎 49 例の分析となった。Kaplan-Meier 法で推定された HCC 累積発生率は、A1-1、B1-1、その他でそれぞれ 10 年で 14%, 46%, 33%、15 年で 14%, 81%, 33%であった(log-rank test:  $P=0.011$ , A1-1 vs B1-1)。関連要因の検討では、年齢 50 歳未満に対し高年齢層およびサブグループ B1-1 に有意な

リスク上昇が認められた。年齢層を調整した場合の相対リスクは B1-1 RR=8.92 (P=0.039)、その他 RR= 5.12 (P=0.133)となり、B1-1 では有意なリスクの上昇が認められた。これらの結果より、HCV1b株において、NS3 アミノ末端領域の二次構造の相違により生ずる HCV heterogeneity は、感染宿主における肝発癌リスクと関係している可能性があるものと思われた。

#### D. 結語

HCV 感染感受性に係わる宿主要因の検討において、HSPG 糖鎖修飾酵素 N3 の遺伝多型および TGF- $\beta$  1 の遺伝多型が、宿主側の HCV 感染感受性(防御)に係っている可能性が示唆された。また HCV NS3 アミノ末端 120 残基の蛋白質二次構造の違いにより、HCV 感染者の発がんリスクに差があること示唆された。

#### E. 健康危険情報

特記事項なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Watanabe H, Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Direct cytopathic liver injury and acute respiratory distress syndrome associated with Gilliam-type *tsutsugamushi* disease. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20: 969-971
2. Ito JI, Saito T. Expression of angiotensin II type 1 receptor in human cirrhotic livers: Its relation to fibrosis and portal hypertension (Editorial). Hepatol Res 2005; 32: 73-74

3. Watanabe H, Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Reduction of serum ghrelin concentration during interferon- $\alpha$  therapy in patients with chronic hepatitis C. Hepatol Res 2005; 33: 14-18
4. Haga H, Saito T, Okumoto K, Sugahara K, Takeda T, Saito K, Togashi H, Kawata S: Successful percutaneous radiofrequency ablation of adrenal metastasis from hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 2005; 40: 1075-1076
5. Kimura T, Saito T, Muramatsu M, Kawata S, et al. Association of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. J Infect Dis 2006, in press

##### 2. 学会発表

1. Saito T, Muramatsu M, Kawata S. Genetic variations associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. The 25<sup>th</sup> international symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation. Yamagata, August 4, 2005
2. 西瀬雄子、斎藤貴史、富樫 整、堀田博、河田純男、他. C型肝炎ウイルス1bのNS3領域二次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する後向きコホート研究 (ワークショップ:肝発癌機序)、第41回日本肝臓学会総会、2005. 6.16

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策 研究事業)  
分担 研究報告書

B 型及び C 型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための感染病態解明に関する研究

主任研究者 河田 純男 山形大学医学部 教授

研究要旨

分担研究者 林 純  
九州大学病院  
教授

A. 研究目的

一般住民において喫煙、飲酒、労働を調査し、C型肝炎ウイルス(HCV)感染例における生活習慣のアラニン アミノトランスフェラーゼ(ALT)値異常に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

対象は、福岡県星野村一般住民で、1986年より1992年までを後ろ向きに、1993年より2000年までを前向きに、採血および腹部エコー検査による追跡調査を行い、HCV感染268例とHCV非感染275例を確認し、生活習慣に関する聞き取りアンケート

調査を行った。HCV感染・非感染例において、定期的に測定したALT値をもとに次のように各々2群に分類した。追跡調査中の半分以上の期間でALT値 $\geq 35$  IU/Lの場合は肝機能異常群とし、常に $< 35$  IU/LまたはALT値 $\geq 35$  IU/Lが調査期間の半分以下である場合は肝機能正常群とした。

対象とした住民に研究の説明を行い、同意書をとった。

C. 研究成果

肝機能異常群は、HCV感染例中183例(68.3%)、HCV非感染例中10例(3.6%)であった。HCV感染例におけるALT値異常率は、飲酒なし群で56.2%、飲酒エタノール60g/日以内群で76.9%、飲酒エタノール60g/日以上群で90.0%と飲酒量の増

加にともない有意に高率となり (P<0.0001)、重労働なし群で 63.9 %、重労働 2 時間以内/日群で 73.0 %、重労働 2 時間以上/日群で 86.5 %と重労働時間が延びるとともに有意に高率となり (P=0.0056)、また、喫煙なし群で 58.2 %、喫煙 20 本未満/日群で 77.8 %、喫煙 20 本以上/日群で 81.3 %と喫煙本数の増加にともない有意に高率となった (P=0.0003)。HCV 感染例における ALT 値異常に関わる因子は、多変量解析より、男性 (P=0.003)、血小板数 (P<0.001)、重労働 (P=0.002)、飲酒歴 (P=0.007) が有意な因子であった。ALT 値異常を来すオッズ比 (95%信頼区間) は、重労働なしと比べ重労働 2 時間以内で 1.82 倍 (0.52-6.30) および 2 時間以上で 20.60 倍 (3.25-130.0) であった (P=0.002)。HCV 非感染例において ALT 値異常に関わる因子は、多変量解析より、飲酒量/日のみであった。

#### D. 考察

運動により肝血流量が低下し ALT 値異常を引き起こすため [27]、肝障害を認め

る場合は一般に安静が望ましいと考えられていた。運動により肝血流量低下が肝細胞の低酸素状態および壊死を引き起こし、低酸素がカテコラミン分泌や肝細胞膜透過性亢進を引き起こすことで ALT 値の上昇となる。また、ALT は骨格筋中にも存在することが報告され、重労働後の ALT 値異常は肝障害ではなく筋障害の可能性も考えられる。エルゴメーターやトレッドミルを用いた運動では血清 ALT 値が上昇し、激しい運動後にも血清 ALT 値は上昇する。HCV 感染例では女性においては、労働時間の長さにともない ALT 値異常の割合が増加した。HCV 非感染例においては労働と ALT 値異常の関連を見出せなかったが、HCV 感染例において重労働による ALT 値異常に及ぼす影響を認めた。

著者らはすでに HBV キャリアにおける肝障害の割合は飲酒にともない増加すると報告した。肝障害の原因は、アセトアルデヒド等のアルコール代謝や肝細胞の低酸素状態、微小循環不全、活性酸素の産生物が考えられる。本研究では、肝障害のある HCV 感染例の割合は飲酒にと

ない増加し、飲酒はHCV感染による肝障害を急激に悪化させた。

#### E. 結論

HCV感染例において、重労働時間は、飲酒と同様にALT値異常との関連を認めた。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakamuta M, Kotoh K, Tanabe Y, Kajiwara E, Shimono J, Masumoto A, Maruyama T, Furusyo N, Nomura H, Sakai H, Takahashi K, Azuma K, Shimoda S, Enjoji M, Hayashi J.

Body surface area is an independent factor contributing to the effects of lamivudine treatment.

Hepatology Research 31:13-17, 2005

. Furusyo N, Kubo N, Toyoda K, Takeoka H, Nabeshima S, Murata M, Nakamuta M, Hayashi J.

Helper T cell cytokine response to ribavirin priming before combined treatment with interferon alpha and ribavirin for patients with chronic hepatitis C

Antivir Res 67 (1): 46-54 JUL 2005

Kubo N, Furusyo N, Nakashima H, Kashiwagi K, Hayashi J.

Strenuous physical labor is important as a cause of elevated alanine aminotransferase levels in Japanese

patients with chronic hepatitis C viremia

Eur J Epidemiol 20 (3): 251-261 2005

Nomura H, Kashiwagi Y, Nakashima H, Tanimoto H, Shimono J, Kajiwara E, Maruyama T, Yamashita N, Nagano M, Higashi M, Mukai T, Matsui Y, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H.

Efficacy of prolonged treatment following combination with ribavirin and interferon for chronic hepatitis type C:A pilot study.

Hepatology Research 31:211-216, 2005

##### 2. 学会発表

武岡宏明、他：「C型肝炎ウイルス（HCV）と成人T細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）重複感染におけるHTLV-1外被蛋白抗体と肝病態進行度の検討」第79回日本感染症学会総会 平成17年4月名古屋

山路浩三郎、他：「インターフェロン $\alpha/\beta$ はヒト肝癌細胞株およびC型慢性肝炎患者においてIL-15発現を増強させる」第79回日本感染症学会総会 平成17年4月名古屋

古庄憲浩、他：「九州大学および関連施設におけるIFN $\alpha$ 2b・リバビリン併用療法の大規模臨床成績の検討—Serotype2における検討—」第79回日本感染症学会総会 平成17年4月名古屋

豊田一弘、他:

「C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン $\alpha$ 2aの臨床成績」、第79回日本感染症学会総会 平成17年4月 名古屋 林 純

シンポジウム II 「ウイルス感染症の治療」

ウイルス感染症治療の歴史と現状

ウイルス性慢性肝炎の治療 - 肝癌発症抑制を目指して -

第46回日本臨床ウイルス学会 平成17年6月、福岡

武岡 宏明、他:

「C型肝炎ウイルス(HCV)・成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)重複感染におけるHTLV-1外被蛋白抗体価の肝病態への影響」第75回日本感染症学会西日本地方会 平成17年11月、長崎

豊田 一弘、他:

「狩猟者におけるE型肝炎ウイルス(HEV)感染状況」第75回日本感染症学会西日本地方会 平成17年11月、長崎

古庄 憲浩、他:

「A remarkably high efficacy of eradication treatment for Helicobacter pylori infection in patients with chronic hepatitis C virus infection has important implications in the long term health status of the co-infected patients.」第6回 HEP DART(国際肝炎ウイルス治療学会) 12月、ハワイ

村田 昌之、他:

「Clinical benefit of serum levels of hepatitis C virus core antigen in patients with chronic hepatitis C」第6回 HEP DART(国際肝炎ウイルス治療学会)

武岡 宏明、他:

「Correlation between liver deterioration and anti-human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) envelope protein antibody in patients co-infected with hepatitis C virus and HTLV-1」第6回 HEP DART(国際肝炎ウイルス治療学会) 12月、ハワイ

豊田 一弘、他:

「No influence of Helicobacter pylori infection on the platelet count of chronic hepatitis C virus infected patients」第6回 HEP DART(国際肝炎ウイルス治療学会) 12月、ハワイ

研究テーマ：C型肝炎における新しい酸化ストレスマーカーとしての脂質由来低分子化合物の網羅的分析

分担研究者：今井康陽 市立池田病院 副院長

研究要旨：C型慢性肝疾患において、肝炎の進展、発癌に酸化ストレスの関与が示唆されている。今回、生体中で豊富に存在するリノール酸、コレステロールおよびそれらのエステル体から脂質過酸化によって生成する過酸化物質、アルコール体、カルボニル体を網羅的にアルコール体へ還元しかつ加水分解することによって、それぞれヒドロキシリノール酸（hydroxyoctadecadienoic acid、HODE）およびヒドロキシコレステロール（7-OHCh）として測定する技術を開発した。C型慢性肝炎症例、C型肝硬変症例、健常人について血漿および赤血球膜の total HODE、total HODE の幾何異性体比（ZE/EE 比）、8-iso-PGF2 $\alpha$  および total 7-OHCh の網羅的測定、抗酸化物質の測定（ $\alpha$ 、 $\gamma$ -tocopherol、ascorbic acid）を行った。血漿、赤血球膜 total HODE、total 7-OHCh は健常人に比して、C型肝炎例で有意に高値を示した。また血漿、赤血球膜 8-iso-PGF2 $\alpha$  も健常人に対して、C型肝炎例で有意に高値を示した。血漿、赤血球膜 total HODE はともに血漿、赤血球膜 ZE/EE 比と負の相関を示し、C型肝炎患者におけるラジカル酸化反応の亢進が示された。血漿 total HODE と AST、IV 型 collagen 7S の間に正の相関が認められ酸化ストレスと炎症、線維化との関連性が示唆された。今回、新たに開発した total HODE、total 7-OHCh の網羅的分析はC型肝炎における酸化ストレスのモニターリングに有用であると考えられた。

研究協力者：

市立池田病院 内科医長 澤井良之  
産業技術総合研究所 ヒューマンスト  
レスシグナル研究センター

研究チーム長 吉田康一  
研究員 斉藤芳郎  
センター長 二木鋭雄

#### A. 研究目的

C 型慢性肝疾患において、肝炎の進展、発癌に酸化ストレスの関与が示唆されている。したがって臨床においても酸化ストレ

スマーカーが従来の肝機能検査に加えて重要となっており、良質な定量性に優れた酸化ストレスマーカーの開発が期待されている。今回、生体中で豊富に存在するリ

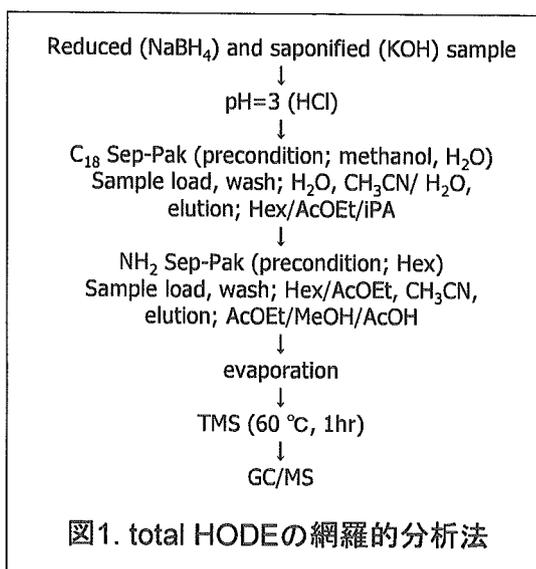
ノール酸、コレステロールおよびそれらのエステル体から脂質過酸化によって生成する過酸化物質、アルコール体、カルボニル体を網羅的にアルコール体へ還元しかつ加水分解することによって、それぞれヒドロキシリノール酸 (hydroxyoctadecadienoic acid、HODE) およびヒドロキシコレステロール (7-OHCh) として測定する技術を開発した。本手法の酸化ストレスマーカーとしての意義を C 型慢性肝疾患において検討した。

## B. 研究方法

生体サンプル中の、リン脂質、コレステロールエステル、トリグリセリド、遊離脂肪酸を化学的に還元および加水分解し、全てアルコール体である HODE にした上で (total HODE)、続いて Sep-Pak C18 などを用いて処理後、TMS 化し、GC/MS 分析によって測定を行った(図 1) (Yoshida Y et al: Free Rad Res 2004; 38: 787-794)。またこの方法では同時に 8-isoPGF2 $\alpha$  の測定も可能である。活性酸素種によるリノール酸の酸化メカニズムを解析した結果、活性種により位置、立体、光学特異的な HODE が生成することがわかった。酵素的な酸化により生成する HODE と、非特異的なラジカル酸化で生じる HODE は、それぞれ異なる異性体を生じるが、これらの HODE 異性体は、GC-MS 法で分離・同定が可能であり、定量法も確立している。HODE 異性体である ZE 体および EE 体の異性体分離を行い、その比率について検討することにより生理的な酵素反応による酸化と非生理的なラジカルによる酸化反応を区別できる可能性があると考えられる。

コレステロールの脂質過酸化物質も同様に還元、水酸化することにより total 7-OHCh として測定した。

C 型慢性肝炎 29 例、C 型肝硬変 25 例、健常人 37 例 (試料は空腹時全血 15 ml) を対象として、血漿および赤血球膜の total HODE、total HODE の幾何異性体比 (ZE/EE 比)、8-iso-PGF2 $\alpha$  および total 7-OHCh の網羅的測定、抗酸化物質 ( $\alpha$ ,  $\gamma$ -tocopherol、ascorbic acid) の測定を行った。また、T-Bil、Plt、AST、ALT、血中フェリチン、ヒアルロン酸、IV 型 collagen 7S との相関も検討した。



## C. 研究結果

1) 血漿 total HODE は健常人  $201 \pm 73$  nM に対して、C 型肝炎例で  $281 \pm 109$  nM と有意に高値を示し、C 型慢性肝炎例 (CH)、C 型肝硬変例 (LC) においてそれぞれ  $254 \pm 84$ ,  $312 \pm 126$  nM で両者間にも有意な差がみられ、いずれも健常人に比し有意に高値であった(図 2)。赤血球膜 total HODE は健常人  $1912 \pm 999$  nmol/l-packed cell に対

し、C型肝炎例で  $2405 \pm 1026$  nmol/l-packed cell と有意に高値を示し、CH、LC それぞれ  $2195 \pm 865$ 、 $2649 \pm 1156$  nmol/l-packed cell と健常人に比し高値であった。

total 7-OHCh も健常人  $200 \pm 116$  nM に対して、C型肝炎例で  $334 \pm 165$  nM と有意に高値を示し、CH、LC においてそれぞれ  $306 \pm 162$ 、 $364 \pm 167$  nM といずれも健常人に比し有意に高値であった。

また血漿 8-iso-PGF $2\alpha$  は健常人  $0.67 \pm 0.56$  nM に対して、C型肝炎例で  $1.08 \pm 0.84$  nM と有意に高値を示し、CH、LC において  $1.06 \pm 0.91$ 、 $1.10 \pm 0.76$  nM といずれも健常人に比し有意に高値であった。赤血球膜 8-iso-PGF $2\alpha$  も健常人  $12.6 \pm 7.9$  nM に対して、C型肝炎例で  $15.9 \pm 7.42$  nM と有意に高値を示し、CH、LC において  $16.0 \pm 7.2$ 、 $15.7 \pm 7.8$  nM といずれも健常人に比し高値を示す傾向にあった。

以上よりC型肝炎患者が高酸化ストレス状態であることが示唆された。

2) 血漿、赤血球膜 total HODE はともに血漿、赤血球膜 ZE/EE 比と負の相関を示し、C型肝炎患者においては生成した total HODE の内、酵素的な酸化で生成する異体 (ZE 体) の割合が減少しており、ラジカル酸化 (非生理的酸化) 反応が亢進しているということが示された (図 3)。

3) 各種相関を検討した。血漿 total HODE と AST、IV 型 collagen 7S の間に正の相関が認められ酸化ストレスと炎症、線維化との関連性が示唆された。(図 4)

4) 各種抗酸化物質、血漿、赤血球膜上の

$\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocopherol、アスコルビン酸について測定した。いずれの抗酸化物質においても健常人に対して、C型肝炎例で有意に低値を示した (表 1)

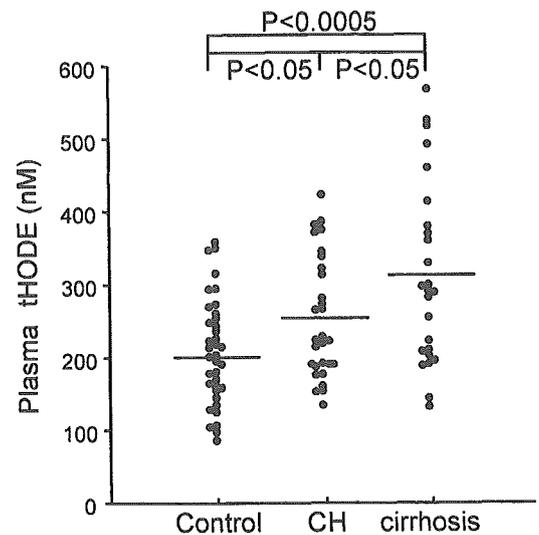


図2. 血漿total HODE 濃度

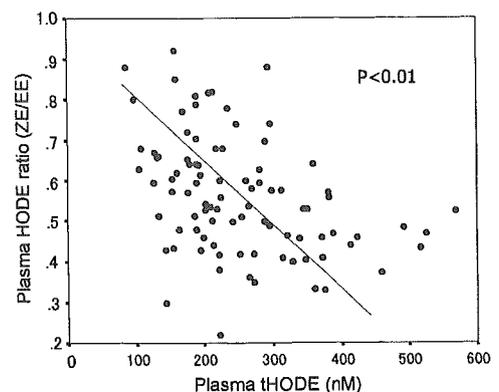


図3. 血漿total HODEと、total HODEの幾何異性体比(ZE/EE比)との相関

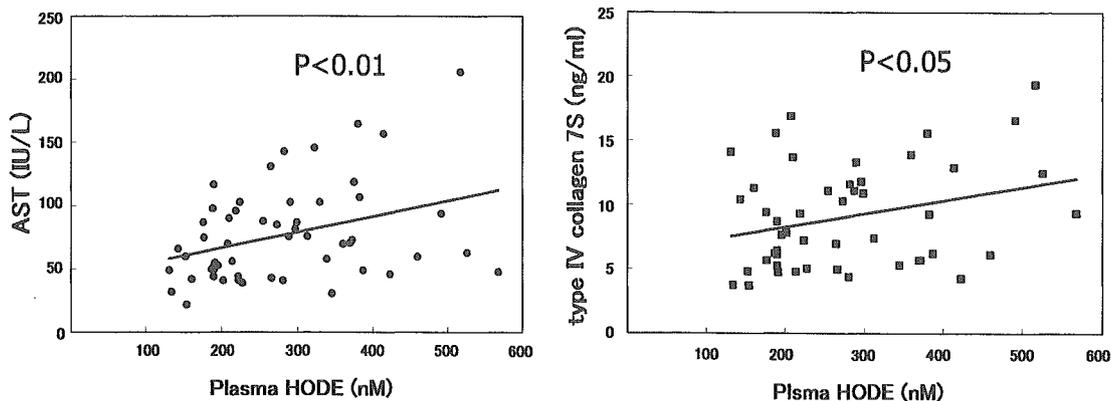


図4 血漿total HODEとAST、IV型コラーゲン7S の相関

	Control group (n=37)	HCV group		
		total (n=54)	chronic hepatitis (n=29)	cirrhosis (n=25)
<b>Plasma (μM)</b>				
α-tocopherol	23.6 ± 8.4	19.9 ± 7.43 <sup>a</sup>	17.9 ± 5.9 <sup>a</sup>	22.1 ± 8.4
γ-tocopherol	2.2 ± 1.0	1.42 ± 1.02 <sup>a</sup>	1.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	1.5 ± 1.1 <sup>a</sup>
ascorbic acid	40.4 ± 17.9	31.6 ± 17.5 <sup>a</sup>	30.6 ± 14.9 <sup>a</sup>	32.6 ± 20.0
<b>Erythrocytes (mmol/L-packed cell)</b>				
α-tocopherol	2.53 ± 1.15	1.73 ± 0.82 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.70 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.95 <sup>a</sup>
γ-tocopherol	0.45 ± 0.50	0.24 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.18 <sup>a</sup>

a, p<0.05 against controls

表1. 健常人、C型肝炎例における血漿、赤血球膜上の各種抗酸化物質濃度

#### D 考察

近年、酸化ストレスがC型肝炎ウイルスによる肝障害に関与しているとの報告が多く見られる。したがって臨床においても酸化ストレスマーカーが従来の肝機能検査に加えて重要となってきており、良質な、定量性に優れたマーカーの開発が期待されている。

現在、酸化ストレスマーカーは大きく分

けて活性酸素による修飾化合物、活性酸素消去系酵素、抗酸化物質があるが、活性酸素による修飾化合物としての酸化ストレスマーカーは8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)、malondialdehyde (MDA)、4-hydroxy-2-nonenal (HNE)があり、1990年にアラキドン酸のラジカル酸化によって生成する8-iso-PGF2αが提案され、その後現在に至るまで様々な疾病に対する本マー

カーの妥当性検証結果が報告されている。

我々は今回、新たな酸化ストレスマーカーとして、生体の体液、組織中より total HODE、total 7-OHCh を測定する新しい方法を開発した。その方法により生体に多く存在するリノール酸やコレステロールからの過酸化物を定量することが可能となった。またこの方法では同時に 8-iso-PGF $2\alpha$  を測定することが可能である。

リノール酸やコレステロールが、活性酸素種により酸化されると、ヒドロペルオキシド体、ケトン体、アルコール体など少なくとも 3 種類の酸化修飾物が生じ、さらにフリーで存在するものと、リン脂質などにエステル化して存在するものなど、その形態は多岐にわたる。そのため、単一の酸化修飾物（たとえばリノール酸ヒドロペルオキシド体を結合したリン脂質など）の解析のみでは、高感度かつ正確な酸化ストレス評価は難しい。そこで今回生体試料を還元・けん化処理を行うことで、生体内に様々な形態で存在しているリノール酸、コレステロールの酸化生成物を一つの生成物である total HODE、total 7-OHCh として誘導化することに成功し、GC-MS を用いた定量法を開発した。

その結果、total HODE、total 7-OHCh は血漿中、赤血球膜中ともに 8-iso-PGF $2\alpha$  よりも 100~1000 倍の高濃度で測定可能となった。さらに今回の測定方法では total HODE の幾何異性体比 (ZE/ EE 比) の検討より、個体の抗酸化能の類推や、その酸化過程 (ラジカル酸化か酵素的酸化か) の類推も可能である。以上の点より total HODE、total 7-OHCh は 8-iso-PGF $2\alpha$  より高感度かつ精密な酸化ストレスマーカー

であると考えられる。

本研究において、血漿、赤血球膜中の total HODE、total 7-OHCh、8-iso-PGF $2\alpha$  はいずれも健常人に対して C 型肝炎で有意に高値を示し、C 型肝炎患者では健常人に比し、高ストレス状態にあることが示された。また、total HODE の幾何異性体比 (ZE/ EE 比) は血漿、赤血球膜において total HODE と負の相関を示した。このことは C 型肝炎患者においてラジカル酸化 (非生理的酸化) 反応が亢進しているという示唆する結果と考えられた。

一方、血漿 total HODE と AST、IV 型 collagen 7S の間に正の相関が認められ酸化ストレスと炎症、線維化との関連性が示唆された。さらに  $\alpha$ -tocopherol、 $\gamma$ -tocopherol、アスコルビン酸といった抗酸化物質は健常人に比し C 型肝炎患者において低値であり、病勢の進行とともにさらに低値を示す傾向が見られた。

これらの結果は酸化ストレスが C 型慢性肝疾患の進展に密接に関わっていることを示唆するものであり、total HODE、total 7-OHCh は C 型肝炎患者における酸化ストレスの評価に適していると考えられた。

## E. 結論

今回、新たに開発した total HODE、total 7-OHCh の網羅的分析は C 型肝炎における酸化ストレスのモニターリングに有用であると考えられた。

## F. 論文発表

- 1) Imanaka K, Tamura S, Fukui K, Ito N, Kiso S, Imai Y, Naka T, Kishimoto T, Kawata S, Shinomura Y; The Kansai

Viral Hepatitis Research Group.  
Enhanced expression of suppressor of cytokine signalling-1 in the liver of chronic hepatitis C: possible involvement in resistance to interferon therapy. *J Viral Hepat.* 2005;12:130-138.

- 2) 今井康陽. 高齢者のインターフェロン療法は？ 肥満と糖尿病  
2005;4:1064 - 1065

G. 学会発表

- 1) 今井康陽、田村信司、木曾真一、藪内以和夫、野田修造、稲田正巳、北田学利、臼井健郎、田中英夫. C型肝炎におけるインターフェロンの治療効果別にみた発癌抑制効果と発癌後の予後第 41 回日本肝臓学会総会大阪
- 2) 田中英夫、今井康陽、福田和人、黒川正典. 地域医療におけるC型肝炎ウイルス検診の現況と問題点—大阪北部地域での取り組み 第 41 回日本肝臓学会総会 大阪
- 3) 澤井良之、今井康陽、永瀬寿彦、藪内以和夫、野田修造、福田和人、朝井章、黒川正典. B型肝炎硬変における lamivudine, adefovir dipivoxil の有効性に関する検討 第 41 回日本肝臓学会総会 大阪
- 4) 井倉枝、田村信司、今井康陽、藪内以和夫、高石健司、柏原赳、田村和子、桐山和雄、稲田正巳、前田祐一、野田修造、福島寿一、鎌田佳宏、木曾真一、篠村恭久、下村伊一郎. IFN/リバビリン併用療法+24週投与の有効性と安全性に関する検討第 91 回日本消化器病学会総会東京
- 5) 澤井良之、福田和人、今井康陽. シンポジウム 2：治療成績向上を目指したウイルス

慢性肝炎の治療 B型肝炎硬変における lamivudine、adefovir dipivoxil の有効性に関する検討 第 82 日本消化器病学会近畿地方会 京都

- 6) Yoshida Y, Sawai Y, Saitoh Y, Hayakawa M, Imai Y, Nuki E. Lipid peroxidation in plasma and erythrocytes of patients with hepatitis C virus infection as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. International Society for Free Radical Research Meeting
- 7) 吉田康一、斎藤芳郎、今井康陽、澤井良之、二木鋭雄. 脂質酸化ストレスマーカー HODE を用いた肝障害評価 第 29 回日本酸化脂質学会 神戸
- 8) 今井康陽、村上卓道、堀雅敏. パネルディスカッション4：各種画像検査の進歩により肝臓の診断、治療は変わるか？ 多血性肝臓における MDCT と SPIO 造影 MRI を用いた検出 第 9 回日本肝臓学会大会 神戸
- 9) 今井康陽、田中英夫、福田和人. ワークショップ 31 肝炎検診の実態と展望 大阪北部地域におけるC型肝炎検診の現況と展望 第 92 回日本消化器病学会総会 神戸
- 10) 澤井良之、福田和人、今井康陽. シンポジウム：酸化ストレスと肝疾患 C型肝炎における新しい酸化ストレスマーカーとしての脂質由来低分子化合物（ヒドロキシリノール酸およびヒドロキシコレステロール）の分析の意義 第 36 回日本肝臓学会西部会 鈴鹿
- 11) 加藤元彦、今井康陽、福田和人. ポスターシンポジウム 2：肝の画像と病理 早期肝細胞癌における血流動態と SPIO 造影 MRI