

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書(平成22年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者:長尾由実子 久留米大学医学部消化器疾患情報講座 准教授

研究協力者:橋本 好司 久留米大学病院臨床検査部 副技師長

研究課題 1:C型肝炎と Oral Medicine の重要性

(①肝炎と口腔カンジダ症、②BCAA・亜鉛含有食品と味覚、③肝炎と歯牙疾患)

研究課題 2:九州X町住民のアルブミン値と予後 -12年間の疫学調査から

**研究要旨:** **研究課題 1** **①C型慢性肝疾患患者における口腔カンジダ症:** 肝疾患患者は、味覚障害、ドライマウス、扁平苔癬等の口腔粘膜疾患を随伴するだけでなく、口腔ケアが健常者よりも不良である。したがって、肝疾患患者にはOral medicine (オーラルメディシン) 的なケアが必要となる。本研究では、インターフェロン (IFN) 治療を受けたC型慢性肝疾患患者において経時的に口腔カンジダ症の発症を観察した。IFN治療を完遂したC型肝炎患者14名のうち、舌表面からカンジダ菌が検出されたのは6名 (42.9%) であった。IFN治療中にカンジダ菌が検出された患者は (7名)、検出されなかった患者 (7名) に比べて、体重減少・粘膜病変の合併・外用ステロイド剤使用の3要因に有意差を示した。口腔カンジダ症発症者は、有意にアルブミン値が低値であった。IFN治療中は、カンジダ症等の日和見感染にも注意が必要である。 **②BCAA・亜鉛含有食品が味覚に及ぼす影響 (Nagao Y et al. Med Sci Monit 2010):** BCAA・亜鉛含有食品が肝疾患患者の味覚感度に及ぼす影響を検討した。対象は慢性肝疾患患者9名。同食品摂取前と90日摂取後の4味(甘・塩・酸・苦)について味覚定性・定量検査並びに生化学検査を実施した。味覚感度は、各味を6スケール (I・II・III・IV・V・VI) に分類し、I・II・IIIを標準感度、IV・V・VIを異常感度とした。1名のみが、味覚異常を自覚していたにもかかわらず、酸味では4名が、苦味では2名が味覚異常所見(他覚所見)を示した。同食品摂取により亜鉛値は有意に上昇 (P=0.0209)、酸味感度は有意に改善 (P=0.0313)、甘味感度も改善傾向を示した (P=0.0625)。BCAA・亜鉛含有食品は、味覚異常者にとって有益なサプリメントになりうる。 **③C型肝炎患者における歯牙疾患の治療意義 (Nagao Y et al. Virol J 2010):** 2003年12月～2010年6月までに、PegIFN治療(併用を含む) 目的のために久留米大に入院した570名について、歯牙疾患が原因で治療導入することができなかった症例について調査した。570名のうち6名が、根尖性歯周炎、辺縁性歯周炎、歯髄炎、智歯周囲炎等の歯牙疾患による急性感染によって導入できなかった。6名は、歯科治療終了後にIFN治療導入に成功したものの、平均61.3日遅延した(最高105日)。唾液分泌量を測定した531名のうち、10.2%にドライマウスを認めた。HCV感染者は、IFN治療前に歯牙疾患の感染源の治療が必要である。 **研究課題 2 (Nagao Y et al. Virol J 2010):** 低アルブミン血症は、生存率に関連すると言われているが、地域住民での長期予後に関する報告は少ない。私どもは1990年よりスクリーニングしている九州X町(HCV高感染地区 HCV抗体陽性率が24%)で、低アルブミン血症が生存率に関与しているかどうかを検討した。12年間の経過観察が行えた454名において、低アルブミン血症の住民 (Alb< 4.0 g/dL, 25名) は有意に死亡率が高く(68%)、肝癌死亡者が多かった。地域住民の死亡に関わる因子は、50歳以上・低アルブミン血症・AST値異常・喫煙歴・非アルコール摂取で、オッズ比は各々20.65, 10.79, 2.58, 2.24, 2.08であった。低アルブミン血症は、死亡に関する独立因子であることが証明された。

## 研究1 C型肝炎と Oral Medicine の重要性 《①C型慢性肝疾患患者における口腔カンジダ症》

### A. 研究目的

慢性肝疾患患者は、味覚障害、ドライマウス、扁平苔癬等の口腔粘膜疾患を随伴する。さらに、これらの粘膜疾患は、インターフェロン(IFN)治療によって、新規に発現あるいは増悪を起こすことがある。

一方、肝炎ウイルス感染患者は、自身の感染を認識していても、歯科医院などの医療機関で受診を拒否されるかもしれないと考え(長尾ら:感染症誌 2008;82:213-219)、健常者よりも口腔ケアが不良であることが報告されている。したがって、肝疾患患者には、Oral medicine (オーラルメディシン) 的なケアが必要となる。

本研究では、C型慢性肝疾患患者において経時的に口腔カンジダ症の発症有無を観察した。

### B. 研究方法

IFN 治療を完遂したC型慢性肝疾患患者 14 名について、スワブ法にて舌表面を擦過し、クロモアガーカンジダ培地を用いて塗抹培養を実施した。同一患者で、IFN 治療前、治療後 2 週間、治療後 3 カ月、治療後 6 カ月、治療終了時、治療終了後 6 カ月と経時的に検体を採取し、カンジダ菌の培養を行い、その発現率や定量を検討した。

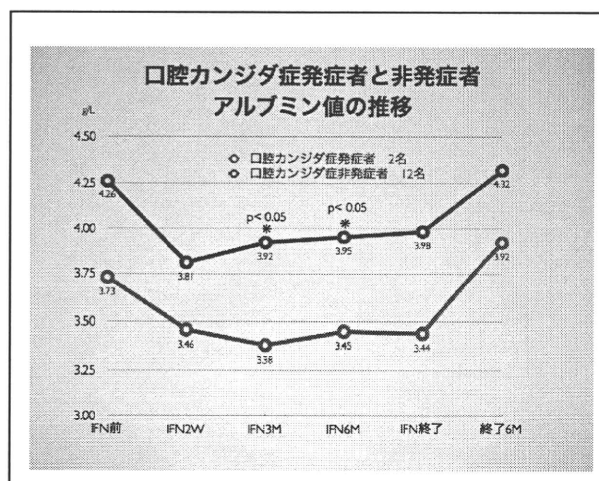
#### (倫理面への配慮)

調査は、久留米大学病院のクリニカルパスに基づき実施した。調査の目的と方法について説明し、同意と承諾の下で調査を実施した。

### C. 研究結果

対象患者 14 名のうち、舌表面からカンジダ菌が検出されたのは 6 名 (42.9%) であった。IFN 治療中に 1 度でもカンジダ菌が検出された患者は (7 名)、全く検出されなかった患者 (7 名) に比べて、体重減少・粘膜病変の合併・外用ステロイド剤使用の 3 要因に有意差を示した。口腔カンジダ症発症者は、有意にアルブミン値が低値であった (図 1)。

図 1 : 口腔カンジダ症発症者と非発症者のアルブミン値の推移



## 《②BCAA・亜鉛含有食品が味覚に及ぼす影響》 -Nagao et al. Med Sci Monit 2010-

### A. 研究目的

慢性肝疾患患者は、味覚障害を合併し、肝疾患の病態が進展するとともに、血中亜鉛濃度が低値を示すことが知られている。一方、非代償性肝硬変患者は、しばしば食事摂取量が十分であるにもかかわらず、低アルブミン血症を呈するため、分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤による治療が行われる。BCAAの長期投与が、イベント発生率(肝癌発生、静脈瘤破裂、肝不全の進行)を有意に低下させる

ことも、本邦大規模臨床試験で証明されている。

私どもは、慢性肝疾患患者に対する臨床試験を経て、BCAA・亜鉛含有栄養補助食品(アミノフィール®)を開発した。本品摂取により、アルブミン値並びに亜鉛値が有意に上昇し、男性ではインスリン抵抗性改善作用を有することを明らかにした(Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M et al. Int J Mol Med 2008) (Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M et al. Liver Int 2007)。

本研究では、本食品が肝疾患患者の味覚感度に及ぼす影響を検討した。

## B. 研究方法

当大学病院通院中の患者で、下記の条件を満たす9名を対象にした。

適応基準:①ウイルス性肝疾患患者、②食事摂取量が保たれているにもかかわらず、低アルブミン血症(3.5-4.0g/dL)を認める者。ただし、肝性脳症を認める者、腹水を認める者、肝細胞癌を認める者、腎不全を認める者は除外した。すなわち、慢性肝疾患患者9名(C型慢性肝炎5名、C型肝炎硬変3名、C型肝炎インターフェロン治療後SVR1例)を対象とした。このうち、1名のみが味覚異常を自覚し、8名は自覚がなかった。

上記患者に対し、アミノフィール摂取前と90日摂取後の4味(甘・塩・酸・苦)について味覚定定量検査並びに生化学検査を実施し、比較検討した。味覚感度は、4味を各々6スケール(I・II・III・IV・V・VI)に分類し、I・II・IIIを標準感度、IV・V・VIを異常感度とした。右側鼓索神経領域を判定味覚領域とした。

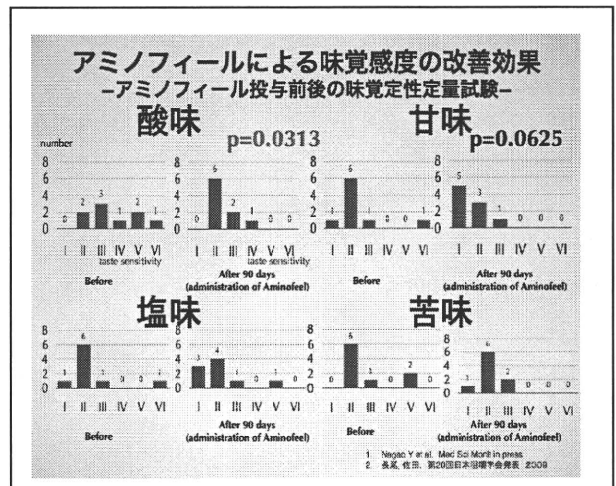
### (倫理面への配慮)

本研究は久留米大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。調査の目的と方法について説明し、同意と承諾の下で調査を実施した。

## C. 研究結果

9名のうち1名のみが、味覚異常を自覚していたにもかかわらず、酸味では4名が、苦味では2名が味覚異常所見を示した。アミノフィール摂取90日後に、酸味の感度は有意に改善し(P=0.0313)、甘味も改善傾向を示した(P=0.0625)(図2)。生化学検査では、亜鉛値がアミノフィール摂取後に有意に上昇した(84.1±18.0 vs. 108.4±23.5, P=0.0209)。

図2:BCAA・亜鉛含有食品による味覚感度の改善効果



### 《③C型肝炎患者における歯牙疾患の治療意義》 -Nagao et al. Virol J 2010-

## A. 研究目的

歯牙疾患が原因でIFN治療導入することができなかった症例について検討した。

## B. 研究方法

2003年12月-2010年6月までに、PegIFN治療(併用を含む)目的のために久留米大学に入院した570名について、口腔内とくに歯牙疾患による感染源の有無を審査し、歯牙疾患がIFN治療の

導入を妨げたかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

調査は、久留米大学病院のクリニカルパスに基づき実施した。調査の目的と方法について説明し、同意と承諾の下で調査を実施した。

C. 研究結果

570名のうち6名が、根尖性歯周炎、辺縁性歯周炎、歯髄炎、智歯周囲炎等の歯牙疾患による急性感染によって導入できなかった。6名は、歯科治療終了後にIFN治療導入に成功したものの、導入が平均61.3日遅延した(最高105日)(図3)。唾液分泌量を測定した531名のうち、10.2%にドライマウスを認めた。

図3: 歯牙疾患がIFN治療導入を妨げた6例

No.	年齢	性別	肝疾患	HCV RNA	HCV genotype	IFN治療が導入できなかった歯科疾患	IFN治療開始までの遅延日数	合併症	IFN治療	IFN効果
1	50	F	CH-C	980 IU/ml	1b	右嚙部炎 (6J per. abs)	49	虫歯、歯槽膿漏	IFN/Na2b/RSV	TR
2	67	M	CH-C	3940 IU/ml	1b	#1. 75.76.77歯肉炎, AA, #2. 75.74.74, #3. 75.74	105	胃潰瘍	IFN/Na2b/RSV	NR
3	36	M	CH-C	over 300 IU/ml	1b	#1 per.	4	なし	IFN/Na2b/RSV	SVR
4	47	F	CH-C	43 IU/ml	2a	#1. 4.1.5.51 Par, #2. 1.34, #1 C4, #3. 2.1.C	97	高血圧、糖尿病、胆石	IFN/Na2a	SVR
5	59	F	LC-C	471 IU/ml	2a	#1. 2 J per. CA, #2. 1 T1 C2	105	うつ病、糖尿病、感染性肝臓炎	IFN/Na2b/RSV	SVR
6	25	F	CH-C	6.2 IU/ml	1b	#1. #T perico, #2. 6 T8 歯根炎	8	なし	IFN/Na2b/RSV	SVR

D. 考察

①C型慢性肝疾患患者における口腔カンジダ症:

C型慢性肝疾患患者の約半数に、舌表面からカンジダ菌が検出された。IFN治療中は、カンジダ症等の日和見感染にも注意が必要である。

②BCAA・亜鉛含有食品が味覚に及ぼす影響:

また、C型慢性肝疾患患者には味覚異常を自覚していなくても、味覚異常所見並びに血中亜鉛濃度が低値であることが示された。亜鉛を含有するアミノフィールは、味覚感度並びに亜鉛値の改善に有

用であった。以上より、アミノフィールは、味覚異常者にとって有益なサプリメントであると考えられた。

③C型肝疾患患者における歯牙疾患の治療意義:IFN治療導入前には感染源の治療を行うべきである。

E. 結論

IFN治療中は、唾液量が減少し、カンジダ菌の菌種が増える傾向にあった。口腔カンジダ症は、アルブミン値が有意に低い。粘膜病変の合併が、口腔カンジダ症を増加させることから、IFN治療中はとくに粘膜疾患の治療が大切である。

一方、肝疾患患者は、自覚症状がなくても味覚感度が低下することがわかったが、BCAA・亜鉛含有食品(アミノフィール)は、味覚感度を上げるのに有用なサプリメントであった(Nagao et al. Med Sci Monit 2010)。

口腔内の感染源になりうるカリエスや歯周病といった歯牙疾患は、IFN治療導入を妨げることが明確であり、IFN治療導入前には感染源の治療を行うべきである(Nagao et al. Virol J 2010)。

研究2 九州X町住民のアルブミン値と予後〜12年間の疫学調査から

-Nagao et al. Virol J 2010-

A. 研究目的

低アルブミン血症は、生存率に関連すると言われていたが、地域住民での長期予後に関する報告は少ない。私どもは1990年よりスクリーニングしている九州X町(HCV高感染地区、地域住民のHCV抗体陽性率24%)で、低アルブミン血症が生存率に関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

1990年に検診を実施した九州X町住民の1割に

相当する住民 509 名において、12 年後に生死が判明したのは 454 名であった。12 年間で、死亡した住民 69 名については、死亡に関わる因子を多変量解析した。

### C. 研究結果

12 年間の経過観察が行えた地域住民 454 名において、低アルブミン血症の住民 (Alb < 4.0 g/dL, 25 名) は有意に死亡率が高く (68%)、肝癌死亡者が多かった (図 4)。地域住民の死亡に関わる因子は、50 歳以上・低アルブミン血症・AST 値異常・喫煙歴・非アルコール摂取で、オッズ比は各々 20.65, 10.79, 2.58, 2.24, 2.08 であった (図 5)。

図 4: アルブミン値別の生存率

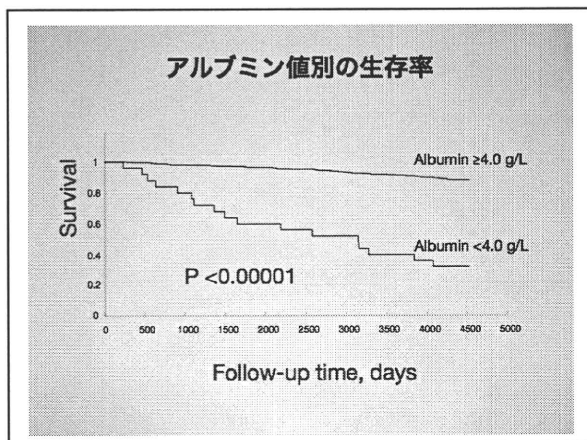


図 5: 死亡に関わる因子 (多変量解析より)

因子	Adjusted odds ratio (95% confidence interval)	P value
50 years or older	20.65 (7.08-88.71)	< 0.0001
Albumin <4.0 g/L	10.79 (4.02-32.75)	< 0.0001
Abnormal AST level (≥ 40 IU/L)	2.58 (1.14-5.79)	< 0.05
History of smoking (yes)	2.24 (1.08-4.65)	< 0.05
Non-alcohol consumption	2.08 (1.03-4.36)	< 0.05

### D. 考察

低アルブミン血症は、死亡に関する独立因子であることが証明された。高齢化するわが国の慢性肝疾患患者において、アルブミン値を上げる施策も大切となる。

### E. 結論

低アルブミン血症は、死亡に関する独立因子として重要な因子である (Nagao et al. Virol J 2010)。

### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Nagao Y, Matsuoka H, Kawaguchi T, Sata M. Aminofeel® improves the sensitivity to taste in patients with HCV-infected liver disease. Med Sci Monit 2010; 16: 7-12.
2. Nagao Y, Sata M. Dental problems delaying the initiation of interferon therapy for HCV-infected patients. Virol J 2010; 7: 192.
3. Nagao Y, Sata M. Serum albumin and mortality risk in a hyperendemic area of HCV infection in Japan. Virol J 2010; 7: 375.
4. 佐田通夫、長尾由実子、大坪維範、岡村孝. C型肝炎. HCV 感染と B cell clonality、口腔癌、インスリン抵抗性についての検討. 犬山シンポジウム記録刊行会 2010; 27: 137-142.
5. 長尾由実子、佐田通夫. C 型肝炎の臨床最前線. IFN 治療普及のための戦略. 肝胆膵 2010; 61: 28-35.
6. 長尾由実子、佐田通夫. 肝炎ウイルスに

よる肝外病変. 今日の消化器疾患治療指針 第3版. 医学書院 東京. 2010: 592-595.

7. 長尾由実子、佐田通夫. 九州X町の疫学研究ー肝疾患並びに肝外病変の病態と治療の方策ー. HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究. 山形大学出版会 山形. 2010: 23-32.
8. Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Taste alteration in palliative care. Handbook of Nutrition and Diet in Palliative Care. 2011 in press.

## 2. 学会発表

1. 長尾由実子. サテライトシンポジウム「HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート調査」九州X町の疫学研究ー肝疾患並びに肝外病変の病態と治療の方策ー. 第46回日本肝臓学会、山形市、2010.5.27-29.
2. 長尾由実子、佐田通夫. HCV あるいはHBV 感染者における歯科治療時の自己申告調査. 第55回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉市、2010.10.16-18.
3. 長尾由実子、佐田通夫. 歯科医療従事者におけるB型並びにC型肝炎ウイルス感染の実態調査. 第55回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉市、2010.10.16-18.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書（平成 22 年度）

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者： 今福信一 福岡大学医学部皮膚科学講座 准教授

研究： HCV の乾癬発症への関与に関する免疫学的研究

研究要旨

乾癬は慢性の炎症性皮膚疾患で、全国調査では乾癬患者の約 6%に C 型肝炎が合併していると推測され、皮膚疾患一般平均より高い。福岡大学病院での詳細調査では HCV は乾癬患者の 5.2%(24/451)で、HCV 感染は殆どの例で乾癬の発症に先行していて、乾癬の発症要因の一部の可能性があると考えられた。それらの患者は免疫抑制剤を含めた乾癬の治療によっても肝炎の悪化は認められなかった。逆に免疫を賦活化する IFN $\alpha$  治療は乾癬の症状を明らかに悪化させていた。これらのことから C 型肝炎は炎症を持続することで乾癬の誘因となると考えられた。それらを証明するために HCV 陽性乾癬患者と非陽性乾癬患者で血清中の TNF $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカインを測定した。また皮膚の生検病理組織から炎症性サイトカインの発現を RT-PCR を用いて検証した。しかし、HCV 陰性の乾癬と比較して、これらの炎症性サイトカインには有意差はみられなかった。これは活動性の乾癬のメディエーターであるサイトカインは原因によらず高値であり、C 型肝炎特異的な inducer があるかを検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

乾癬は本邦での有病率約 0.06~0.1%、患者数 10 万人と推測されている慢性難治性の炎症性角化症である。日本の乾癬の特徴として、全世界的にみられる若年層のピークに比較して高齢発症の患者が多いことが挙げられる。若年発症の乾癬は特定の HLA に強く依存するが、高齢発症のものは無関係で、その誘因は別の元と考えられる。先に行った皮膚科医を対象とした全国調査では乾癬患者の約 6%に C 型肝炎が合併していると推測され、患者数約 6000 人と推測された。(Imafuku S and Nakayama J, JEADV 2009)。福岡大学病院における過去 10 年間の全ての尋常性

乾癬の C 型肝炎合併例について調査したところ 451 名の乾癬患者のうち 24 名 (5.2%, 男 : 女 = 20 : 4、年齢 43~82 歳、平均 62 歳、中央値 64 歳) であり、そのうち 21 例 (92%) において C 型肝炎が先行していることが考えられた。従って HCV は高齢発症の乾癬の誘因の一つであることが推測された。乾癬の発症には TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインが強く関与していて、これを中和する抗 TNF $\alpha$  抗体製剤により著明改善することが知られている。C 型肝炎においても TNF $\alpha$  は肝の線維化を促進し、肝硬変へと至る患者に於いて血清で高値を示すことが知られている。抗 TNF $\alpha$  製剤を用いると、IFN 治療単独よりも SVR 率

が上昇することが報告されている。高齢発症の乾癬には肥満、高脂血症などのメタボリック症候群、喫煙、降圧薬であるβブロッカ、リチウム製剤などが有意差のある誘因として知られているがこれらと同様に一部の素因のある患者において慢性のC型肝炎はインスリン抵抗性の上昇や、肝の線維化と同様に乾癬を誘導している可能性がある(図1:乾癬のHCVモデル)。そこで、乾癬に関与している可能性があるTNFαなどの炎症性サイトカインを患者血清、および診断に用いた病理検体から検出して、HCV陽性例と陰性例で差違があるかを検討した。

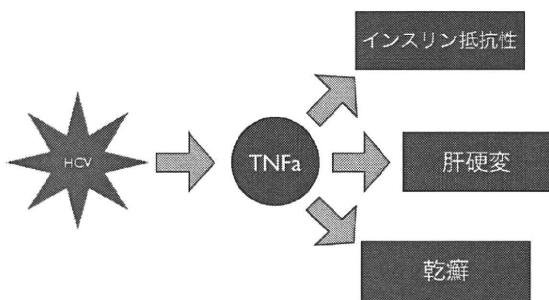


図1 乾癬のHCVモデル

## B. 研究方法

2006年から2009年までに福岡大学病院を受診した乾癬と確定診断された患者のうち、保存血清、および診断時の生検組織がある病理組織を対象とした。血清からはELISA法でTNFα、TARCを測定した。また皮膚生検組織からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて種々のサイトカイン(TSLP, TARC, CCR4, Cathelicidin, IL-1α, IL-1β, IL-23p19, IL-12p40, TNF-α, IL-17A, IL-15, IFN-α, IFN-γ, IL-12p35)を測定した。

(倫理面への配慮) 本研究は保存血清及び病理組織のみを研究対象としている。本研究は福岡大学

倫理委員会により承認を受けている。

## C. 研究結果

### (1) 血清サイトカイン

HCV 陰性(n=48)と陽性(n=4)の患者の血清が保存されていた。採血時の乾癬の重症度(PASIスコア)および血清TNFα、TARCのレベルを表示する(図2)。HCV+乾癬患者は重症度においてもHCV-患者と比較して著変がみられなかった。また血清TNFαは重症度ともあまり相関せず、HCV+/-いずれの患者においても陰性例がおおくみられた。血清TARCは重症度とある程度相関したが、HCV+/-群間で差はみとめられなかった。

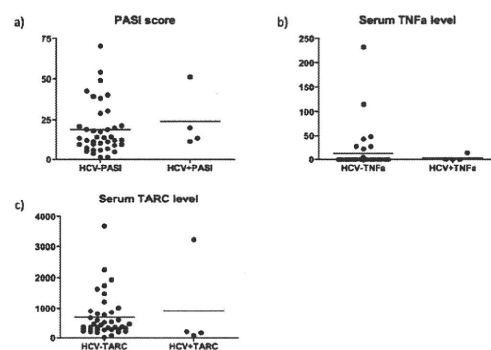


図2 HCV+/-乾癬患者の重症度と血清サイトカインレベル

### (2) 皮膚のサイトカイン発現

皮膚でのサイトカイン発現においては、一般の乾癬患者においてTNFαをはじめとした幅広いサイトカインが発現しているのが観察された。検体からのRNA抽出などの技術的な限界もあり、症例数が少なかったが、比較出来た範囲ではHCV+/-には明らかな差は認められなかった。

## D. 考察

我々は長期間HCVと乾癬の関係について追跡してきたが、TNFαをはじめとした炎症性サイトカイン



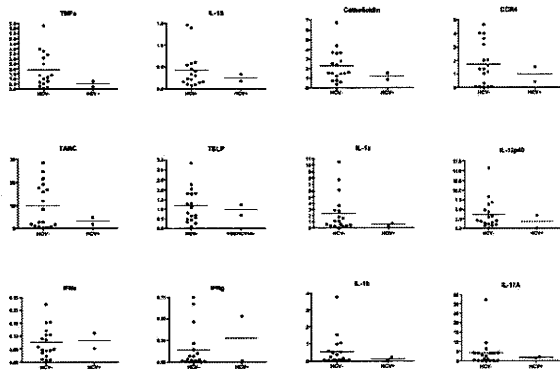


図3：乾癬皮膚における炎症性サイトカイン発現  
(全てのパネルで左 HCV-, 右 HCV+, )

においては HCV+/-では明らかな差がみられなかった。これは例え慢性的C型肝炎による高 TNF $\alpha$  状態が持続していて乾癬の誘因となったとしても、結果として生じた乾癬の状態では有意差はないことがその理由と考えられた。乾癬を発症していない慢性C型肝炎患者で高 TNF $\alpha$  状態がやがて乾癬の発症に結びつくのか、など HCV 陽性患者からみた乾癬の発症を検討することで、HCV が乾癬を誘導する病態を解明する手がかりがえられるものと考えられた。

D. 健康危険情報 特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Imafuku S, Tashiro A, and Furue M. CYCLOSPORINE TREATMENT OF PSORIASIS IN A PATIENT WITH CHRONIC HEPATITIS C. Br J Dermatol. 2007 Jun;156(6):1367-9.

2) 今福信一、中山樹一郎、沖縄地区 CsA 乾癬のシクロスポリン 1.2mg/kg 療法

西日本皮膚科 70 巻 4 号 Page436-441 (2008)

3) 今福信一、中山樹一郎 シクロスポリン投与中

の乾癬患者におけるテルミサルタンの腎機能及び  
血圧に対する効果・安全性の検討 西日本皮膚科  
70 巻 2 号 Page204-207 (2008)

4) Imafuku, S. and J. Nakayama, Questionnaire-based survey of the treatment of patients with psoriasis and hepatitis C in Japan. J Eur Acad Dermatol Venereol. 24(9): p. 1114-6.

2. 学会発表

1) 今福信一 第 109 回日本皮膚科学会総会 教育講演 25:「ウイルス性発疹症の見極め方と対応」

2) Psoriasis 2010 “QUESTIONNAIRE-BASED SURVEY OF THE TREATMENT OF PSORIASIS PATIENTS WITH HEPATITIS C IN JAPAN”, Paris, France 2010. 6. 1-4

3) 今福信一 第 25 回日本乾癬学会「ビタミン D3 ローテーション療法」2010. 9. 3

F. 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

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書(平成 22 年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者:札幌医科大学医学部内科学第四講座 教授 加藤淳二

研究協力者:札幌医科大学医学部内科学第四講座 講師 宮西浩嗣

**研究課題:**C 型肝炎からの発癌過程における DNA 修復酵素の関与

**研究要旨:**C 型慢性肝炎 (CHC) では持続慢性炎症によって惹起される発癌の機序は明らかとなっていないが、発癌過程において細胞内で生じた活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) による酸化的 DNA 損傷が関与する可能性が想定されている。また C 型肝炎の増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目され、鉄イオンが Fenton 反応等を介してヒドロキシルラジカル等の ROS の産生を促進し、酸化的 DNA 損傷を増強することが知られている。われわれは、C 型慢性肝炎および HCC の肝組織中に 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) が著明に蓄積していることを報告してきた。本研究では、HCC 患者における酸化的 DNA 損傷の修復系遺伝子群の異常の有無を検討することを目的とした。検討の結果、酸化的 DNA 損傷の修復系酵素活性の個体差が SNP により生じており、これが発癌危険因子となる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

近年、持続慢性炎症によって惹起される発癌過程には、細胞内で生じた活性酸素 (ROS) による酸化的 DNA 損傷が関与する可能性が想定されている。C 型慢性肝炎の炎症増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目されている。鉄イオンは Fenton 反応を介して ROS を生成し酸化的 DNA 損傷を引き起こす。これまでに我々は、C 型慢性肝炎および HCC の肝組織中に鉄が過剰に沈着しており、酸化的 DNA 損傷のマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) が蓄積していることを報告してきた。8-OHdG は C のかわりに A、T とともにペアリングし DNA 変異を惹起することから、肝発癌へのこの genomic instability の関与が推測される。本研究では C 型肝炎からの発癌に、酸化的 DNA 損傷修復系遺伝子群が関与するか否かを検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

C 型肝炎患者の末梢血リンパ球から高分子 DNA を抽出し、酸化的 DNA 損傷修復酵素である OGG1 および MUTYH 遺伝子の SNPs 解析を direct sequence により行った。さらに C 型肝炎診断時からの肝発癌率曲線の作成と、MUTYH mRNA 発現量の real time PCR 法による測定を行い、SNP type 間における相違を検討した。

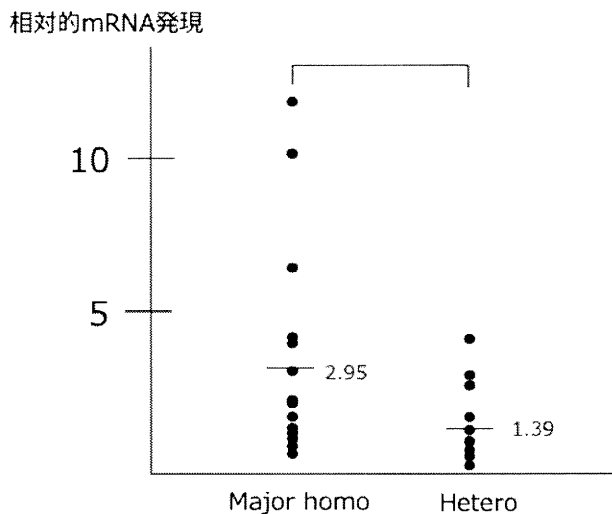
#### (倫理面への配慮)

研究に先立って倫理委員会および IRB 委員会の審査・承認を受け、さらに検体採取に際しては患者に対して十分なインフォームドコンセントを書面で得た。

#### C. 研究結果

HCC 発症群において未発症群に比べて有意に minor allele 保有頻度の高い MUTYH の 1 種の SNP が同定できた (  $p=0.0059$  )。また minor allele 保有者の MUTYH mRNA 発現量は非保有者のそれと比べて有意に低下していた ( 図 1 )。

図 1 MUTYH mRNA 発現量の比較



#### D. 考察

ある種の MUTYH 遺伝子 SNP の minor allele 保有は、肝発癌の危険因子となり得、その一因が mRNA 発現量の低下であることが示唆されたが、その詳細な機序については今後解析が必要である。

#### E. 結論

酸化 DNA 損傷の修復酵素である MUTYH の発現が低下し、遺伝子損傷が蓄積されやすい群では C 型肝炎からの肝発癌が生じやすい。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 佐藤勉, 小船雅義, 加藤淳二. 最近の話題 鉄とアポトーシス. 日内誌 2010, 99 (6):1272-1276
2. 加藤淳二, 宮西浩嗣. C 型慢性肝炎における肝細胞がん発生と鉄の関係. 日医雑誌 2010, 136 (2):307-310.
3. 宮西浩嗣, 河野豊, 小船雅義, 加藤淳二. NASH の診断と治療 NASH における鉄代謝異常と肝内鉄貯留. 肝臓フォーラム記録集 2009:82-86
4. 宮西浩嗣, 河野豊, 小船雅義, 高田弘一, 永島裕之, 佐藤康史, 瀧本理修, 加藤淳二. 非アルコール性脂肪性肝炎における鉄吸収亢進機序と除鉄療法の有用性の検討. アルコールと医学生物学 29:142-146

##### 2. 学会発表

1. Takimoto R, Murase K, Onuma Y, Hirakawa M, Yoshida M, Sato T, Sato Y, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Expression of DNA Repair Factor DDB2 Predicts Chemoresistance in Various Cancer Cell Lines. AACR 101st Annual Meeting 2010. 2010(Apr/17-21), Washington DC, U.S.A
2. Kobune M, Kikuchi S, Murase k, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Long-Term ex vivo Production of Mature Erthroblasts from Umbilical Cord Blood Using a Coculture System with Telomerized Human Stromal Cells. JSH International Symposium 2010 in Akita. 2010(July /16-17), Akita, Japan.
3. 永島裕之, 宮西浩嗣, 加藤淳二.

NASH/NAFLD 発症のメカニズム-NASH 発症・進展における鉄代謝異常の意義とその機序の検討-。(ワークショップ)第96回日本消化器病学会総会。2010(4/22-24), 新潟。

4. 宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二. 代謝異常(金属代謝を含む)からみた C 型肝炎の病態解析- C 型慢性肝炎における鉄代謝異常の発生機序と除鉄療法の肝発癌抑制効果の検討-。(パネルディスカッション)第 14 回日本肝臓学会大会。2010(10/13-16), 横浜。
5. 宮西浩嗣, 永島裕之, 加藤淳二. NAFLD/NASH の最近の知見-NASH に対する除鉄療法の効果の検討-。(シンポジウム)第 14 回日本肝臓学会大会。2010(10/13-16), 横浜。
6. 宮西浩嗣, 永島裕之, 加藤淳二. 肝がんハイリスク群のスクリーニングと経過観察- C 型肝炎からの肝発癌の危険因子としての DNA 修復遺伝子 SNPs の検討-。(ワークショップ)第 14 回日本肝臓学会大会。2010(10/13-16), 横浜。

7.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

- 1) 特許取得 2008-278764 肝細胞癌罹患リスク判定方法
- 2) 特許取得 2008-050375 繊維化抑制のための薬物担体および薬物担体キット

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書(平成 22 年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究協力者: 東南辰幸 久留米大学医学部放射線医学講座 講師  
藤本公則 久留米大学付属病院画像診断センター 准教授

**研究課題:** 肝内鉄沈着の定量化: 拡散強調画像をベースとしたエコープラナーイメージングの有用性

**研究要旨:** 肝内への鉄過剰状態は遺伝性ヘモクロマトーシスをはじめ、多くの慢性肝疾患、溶血性貧血や輸血など様々な病態で引き起こされる。慢性ウイルス性肝炎や肝硬変患者においても軽度から中等度の肝への鉄沈着が観察され、肝臓へ直接、障害を引き起こす鉄沈着は様々なhepatotoxinを誘導し、線維化の進行や肝癌の発現に関与していると考えられている。  
近年、活動性のウイルス性慢性肝炎患者において鉄制限食や瀉血療法などの除鉄療法の有用性が報告され、これらの治療は抗ウイルス剤に代わる治療として推奨されており、患者への治療効果判定や治療計画を行う上では正確に肝内の鉄沈着量を定量化する事は必要不可欠と考えられる。臨床的に肝内の鉄量の評価に関しては血液検査をはじめ、肝生検など行われるが、より正確で、かつ非侵襲的な評価を行う上では、近年、MRIによる肝内の鉄沈着の定量化が注目されている。

**A. 研究目的**

ウイルス性慢性肝炎患者における肝内鉄濃度の定量化に関する拡散強調画像をベースとしたエコープラナーイメージングの有用性について検討した。

**B. 研究方法**

当院において、肝細胞癌の診断にて手術が行われ、術前の MRI がおこなわれたウイルス性慢性肝炎(24名)および肝硬変(10名)の患者を対象とし、2名の画像診断医によって得られた MRI の信号強度(T2-weighted gradient recalled-echo, Diffusion weighted images; b=0, 500, 1000s/mm<sup>2</sup>)と組織学的に評価した肝内鉄濃度( $\mu$ g/g wet liver; Spectrophotometry)の相関性を retrospective study にて検討した。また、さらに背景肝における脂肪沈着の程度を組織学的に評価(Grade1:negative, G2:<5%, G3:5-30%, G4:≥30%)

し、鉄の信号に与える影響をそれぞれのシーケンスにおいて検討した。

**(倫理面への配慮)**

久留米大学倫理委員会の承認済み

個人データは研究責任者によりセキュリティ管理され、個人情報保護に努める。また、登録患者の同定や照合は、登録時に発行される被験者識別番号・施設内整理番号などを用いておこなわれ、第三者が個人を特定できないよう、人権・プライバシーの保護に努める。

**C. 研究結果**

1) 2名耐の画像診断医によって得られた MR 画像の信号強度の一致率

いずれの撮像法においても2名の診断医によって得られた信号強度の一致率は良好であった。また、診断医間における信号強度の相関係数( $\gamma$ ; ピアソン)は以下の如くであった。

T2-GRE;  $\gamma = 0.96$

DWI(b=0);  $\gamma = 0.98$

DWI(b=500);  $\gamma = 0.98$

DWI(b=1000);  $\gamma = 0.96$  (All,  $P < 0.001$ )

## (2) 各撮像法における肝の信号強度と肝内鉄濃度の相関性

各撮像法における肝の信号強度と肝内鉄濃度の相関係数をスプラインモデルを使用した単回帰分析に行った。

T2-GRE;  $\gamma = -0.62$

DWI(b=0);  $\gamma = -0.75$

DWI(b=500);  $\gamma = -0.69$

DWI(b=1000);  $\gamma = -0.62$  (All,  $P < 0.001$ )

## (3) 脂肪沈着の肝内鉄濃度測定に与える影響

脂肪沈着のないグループ(G1)と脂肪沈着のあるグループ(G2-4)に分類し、肝の信号強度と肝内鉄濃度の相関性に関して解析した。

### G1

T2-GRE;  $\gamma = -0.62$

DWI(b=0);  $\gamma = -0.81$

### G2-4

T2-GRE;  $\gamma = -0.72$

DWI(b=0);  $\gamma = -0.94$

## D. 考察

肝内に沈着した鉄は常磁性体の特性に関連した T2\*/T2 短縮効果により MR 信号を低下させるため、MRI は肝内の鉄沈着評価に有用と考えられている。T2-GRE シーケンス鉄に鋭敏なシーケンスであり、従来より肝内の鉄沈着評価に用いられてきた。

一方、拡散強調画像は近年、脳神経領域における急性期脳梗塞の診断をはじめ、腹部領域においては悪性腫瘍の診断に応用され、様々な施設

で撮像されている。また、この撮像法の特徴の一つに、T2-GRE と同様、高い磁化率効果を有するため肝内の鉄沈着に鋭敏と思われる。本研究における結果においても、その事が証明され、さらには従来の撮像法(T2-GRE)と比較して、高い磁化率効果を有する事が証明された。また、脂肪沈着の鉄の信号に与える影響に関しては本研究においてはいずれのシーケンスにおいても大きな影響は見られず、いずれのグループにおいても拡散強調画像における鉄との相関性は従来の撮像法と比較して、高い結果が得られた。

## E. 結論

拡散強調画像をベースとしたエコープランナーイメージングは高い磁化率効果を有する撮像法であり、ウイルス性慢性肝炎・肝硬変患者における微量な肝内の鉄濃度の定量化に有用である撮像法と思われた。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tonan T, Fujimoto K, Qayyum A. Chronic hepatitis and cirrhosis on MR imaging. Magn Reson Imaging Clin N Am. 2010 Aug;18(3):383-40.

### 2. 学会発表

1. Tonan T, Fujimoto K, Qayyum A, Kawaguchi T, Kawaguchi A, Okuda K, Nagata S, Hayabuchi N, and Sata M. Quantification of Hepatic Iron Overload: Usefulness of Echo-planar Imaging Based Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging, in: Proceedings Eighteenth Annual Meeting ISMRM, Stockholm, P523, May 2010.

2. T. Tonan, K. Fujimoto, A. Qayyum, Y. Morita, N. Ono, N. Hayabuchi, O. Nakashima, T. Ueno.

CD14 Receptor Expression and Kupffer Cell Phagocyte Dysfunction in Nonalcoholic Steatohepatitis: SPIO-MRI and Pathologic Correlation. The 9th JSH Single Topic Conference “NASH 2010”, Tokyo, November 2010.

3. 東南辰幸, 藤本公則, Aliya Qayyum, 森田恭代, 中島 収, 小野典之, 内田政史, 早瀬尚文, 上野隆登. NASHにおけるCD14 receptorの発現と Kupffer 細胞機能障害 : SPIO-MRIと病理組織学的所見との相関. 第30回 アルコール医学生物学研究会学術集会. 久留米. 2010.11/26-27.

#### 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

特記事項なし

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者: 矢野 博久 久留米大学医学部病理学講座 教授  
研究協力者: 中島 収 久留米大学医学部病理学講座 准教授  
今関 文夫 千葉大学医学部消化器内科 准教授  
横須賀 収 千葉大学医学部消化器内科 教授

**研究課題:** 非 B 非 C 慢性肝炎・肝硬変における肝発癌要因解明のための病理形態学的研究  
; 非 B 非 C 肝癌の背景肝組織における Large Cell Change に関する病理学的検討と潜在性 HBV 感染に関する分子生物学的検討

**研究要旨:** (目的) 病理学的に非 B 非 C 肝癌の背景肝組織における Large cell change(LCC)の頻度と HBV-DNA の有無(潜在性 HBV 感染)について検討する。(材料と方法) 非 B 非 C 肝癌 129 例(生検 65 例、切除 64 例)の背景肝組織において病理学的に LCC の有無と程度(軽度、高度)を検討した。非 B 非 C 肝癌切除例 20 例の血清、癌部と非癌部凍結肝組織から抽出した DNA を用いて HBs, HBc, HBx の3領域を TaqMan PCR 法で増幅し HBV DNA 定量を行った。(結果と考案) 非 B 非 C 肝癌の背景肝において病理学的に LCC が高頻度(60%, 74.4%)に認められ、潜在性の HBV 感染も組織中で高頻度(癌部: 75%, 非癌部: 80%)に認められたことから非 B 非 C 肝癌の発癌に関してアルコール性肝障害や NASH 以外に HBV の潜在性感染の何らかの関与が示唆された。(結論) 非 B 非 C 肝癌の発癌要因解明に関しては病理学的に LCC に注目し HBV の潜在性感染の有無について検討する必要が有ると考える。

#### A. 研究目的

病理学的に非 B 非 C 肝癌の背景肝組織における Large cell change(LCC)の程度と頻度について検討する。また非 B 非 C 肝癌の癌部と背景肝組織における HBV-DNA の有無(潜在性 HBV 感染)について分子生物学的に検討する。

#### B. 研究方法

九州肝癌研究会に登録された非 B 非 C 肝癌 129 例(生検 65 例、切除 64 例)の背景肝組織において病理学的に LCC の有無と程度(軽度、高度)を検討した。非 B 非 C 肝癌切除例 20 例の血清、癌部と非癌部凍結肝組織から抽出した DNA を用いて HBs, HBc, HBx の3領域を TaqMan PCR 法で増幅し HBV DNA 定量を行った。

#### (倫理面への配慮)

20 例の血清と凍結肝組織から抽出した DNA の検索に関してはあらかじめ久留米大学と千葉大学の倫理委員会を通して行っている。

#### C. 研究結果

##### (1) 非癌部肝組織における LCC

129 例(生検例と切除例)と HBV-DNA の検討を行った 20 例の背景肝における LCC の頻度は各々 74.4%と 60%と高頻度に認められた(図1、図2)。





## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

「特記事項なし」

実用新案登録

「特記事項なし」

### 2. その他

「特記事項なし」

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書(平成 22 年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者：千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 教授 横須賀收

研究協力者：千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 准教授 今関文夫

研究課題：非B非C型肝炎細胞癌における HBV DNA の関与

研究要旨：

非B非C型肝炎硬変における肝発癌とoccult HBV感染との関連を検討するために、久留米大学医学部病理学教室より供与された非B非C型肝炎細胞癌患者20例の血清、凍結肝組織(癌部、非癌部)を用いてTaqMan PCR 法により、HBV-DNAを定量測定した。HBV DNAはsurface、X、core の各領域を増幅し検討した。血中HBV DNAはsurface領域のみの検討で20例中1例が陽性であった。非B非C型肝炎における肝組織中HBV DNA陽性率は、癌部15/20 (75%)、非癌部16/20 (80%)と高率であったが、HBc抗体との関連は認めなかった。また、cccDNAは3例に認められ、そのうち2例はHBc抗体陽性であった。今後は、非B非C型肝炎硬変における血中HBV DNAと肝発癌の関連を検討する前向き試験および非B非C型肝炎における肝組織中HBV DNAの存在様式の検討を行う予定である。

A. 研究目的

非B非C型肝炎細胞癌は種々の原因により生じる疾患群であり、本邦における肝癌の約10%を占めており、C型肝炎の減少に伴い今後増加が予想される。この非B非C型肝炎細胞癌におけるB型肝炎ウイルスの関与については未だ十分に解明されてはいない。そこで、肝硬変、肝癌症例の血中におけるHBV-DNAの陽性率を検討した。

B. 研究方法

久留米大学医学部病理学教室より供与された非B非C型肝炎細胞癌患者20例の血清、凍結肝組織(癌部、非癌部)について検討した。TaqMan PCR 法を用いて、血中および肝組織(癌部、非癌部)中におけるHBV DNAを定量測定した。HBV DNAはsurface、X、core の各領域を増幅した。感度は5 copies/well、血中HBV DNAは52 copies/mlであった。また肝組織中のHBV

cccDNAをTaqMan PCR 法を用いて測定した。

本研究は、千葉大学および久留米大学の倫理委員会において承認されており倫理的に問題ないと考えられる。

C. 研究結果

血中HBV DNAはsurface領域のみの検討で、陽性は20例中1例のみであった。surface、core、X領域の3か所のPCRすべてが陽性であったのは、癌部4例(20%)、非癌部5例(25%)、2か所陽性であったのは癌部3例(15%)、非癌部4例(20%)、どれか1か所陽性であったのは癌部8例(40%)、非癌部7例(35%)であった。どれか1か所が陽性の場合にHBV DNA陽性とする、癌部15例(75%)、非癌部16例(80%)と高率に陽性であった。肝組織中のHBV cccDNAは癌部で1例、非癌部で2例が陽性であり、血中HBc抗体陽性3例中2例でcccDNAが陽性であった。

#### D. 考察

非 B 非 C 型肝細胞癌の癌部 75%、非癌部 80% と極めて高頻度に HBV DNA が認められたことは、病期の進展、肝発癌に HBV の何らかの関与を示唆するものである。血中 HBc 抗体と肝組織中の HBV cccDNA には関連が認められたものの、HBV DNA とは関連はなかった。HBV DNA 陽性例も surface、core、X 領域すべてが陽性だったのは癌部 4 例、非癌部 5 例のみで、HBV DNA が断片的に認められる症例が多かった。これは各領域の PCR の感度の問題なのか、あるいは組込み型を見ているのか、あるいは疑陽性を見ているのか、今後さらに検討する必要がある。

#### E. 結論

非 B 非 C 型肝細胞癌の肝組織には高頻度に HBV DNA が認められ B 型肝炎ウイルス感染症の関与が示唆されたが、発癌への関与にはさらなる検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi M, Maruyama H, Ishibashi H, Yoshikawa M, Yokosuka O. Contrast-enhanced ultrasound with perflubutane microbubble agent: evaluation of differentiation of hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*. 2011 Feb;196(2):W123-31.
2. Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. Increased Serum Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor by Excessive Alcohol

Consumption-Detection and Identification by a Three-Step Serum Proteome Analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Feb;35(2):211-217.

3. Fujiwara K, Kojima H, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Omata M, Yokosuka O. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. *J Med Virol*. 2011 Feb;83(2):201-7.
4. Bekku D, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Long-term follow-up of patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26(1):122-8.
5. Kanda T, Jeong SH, Imazeki F, Fujiwara K, Yokosuka O. Analysis of 5' nontranslated region of hepatitis a viral RNA genotype I from South Korea: comparison with disease severities. *PLoS One*. 2010 Dec 28;5(12):e15139.
6. Fujiwara K, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Oda S, Yokosuka O. The requirement for a sufficient period of corticosteroid treatment in combination with nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol*. 2010 Dec;45(12):1255-62.
7. Kasuga A, Mizumoto H, Matsutani S, Kobayashi A, Endo T, Ando T, Yukisawa S, Maruyama H, Yokosuka O. Portal hemodynamics and clinical outcomes of patients with gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J*