

初年度は全国の乾癬を診療している全国597名の大学病院、一般病院、診療所の皮膚科医に調査を郵送、回収、集計した。次年度は1998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を対象にその陽性率、両疾患の発症の時間的關係、治療、合併症、転帰について調査した。3年目はHCVと乾癬の関係を明らかにするため保存検体を用いて血清および皮膚のサイトカイン発現を測定した。

(倫理面への配慮) 本研究はいずれも後ろ向きの研究で個人情報収集していない。また保存血清及び病理組織のみを研究対象としていて、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) HCV と乾癬の合併

アンケート調査により日本の皮膚科専門医は一人平均0.82人のHCV陽性乾癬患者を診察していると考えられ、平均すると患者は5-6000人いると考えられた。それらの治療では免疫抑制作用を持つシクロスポリンが24%の医師により処方されていた(図1)。即ち免疫抑制作用を持つ全身治療がHCV陽性患者においても行われていて、大きな問題がないこと、また40%の施設では乾癬が悪化する可能性が高いIFN治療が導入されていた。現状が知られるようになった。

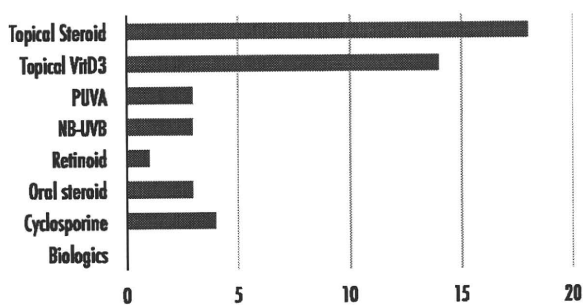


図1：皮膚科専門医がHCV陽性乾癬患者に行っている治療

(2) 詳細調査 皮膚科の詳細調査では福岡大学を受診した乾癬患者の5%にHCVが陽性であった。そのうち88%はHCV感染が乾癬の発症に先行していると考えられた。IFN治療を受けた6例はいずれも乾癬の症状が悪化しており、治療中断を余儀なくされた例が2例あった。また1/3の症例で糖尿病を合併していた。乾癬はmetabolic syndromeの合併率が一般人の1.5倍高いことが知られているが、これは通常の乾癬での合併率よりもさらに高く、HCVによるインスリン抵抗性の上昇が乾癬、MSの両者に関与している可能性が考えられた。免疫抑制剤を含めた乾癬治療によって肝炎の悪化は認められず、HCV陽性であっても通常の乾癬患者と同じくQOL向上を目指した治療を行ってよいと考えられた。以上の研究から乾癬とC型肝炎が合併するモデルを想定した。(図2)

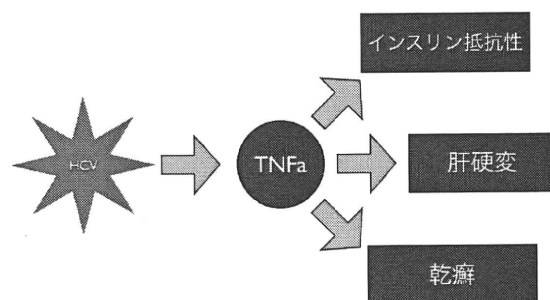


図2：乾癬のHCVモデル

3年目は上記モデルについて検討した。採血時の乾癬の重症度(PASIスコア)および血清TNF α 、TARCのレベルを表示する(図3)。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TNF α 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。

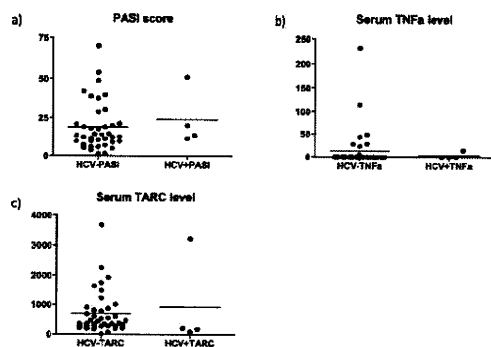


図3 HCV+/-乾癬患者の重症度と血清サイトカインレベル

(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 TNF α 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、日本の乾癬患者の 5-6%が HCV 陽性であること、また C 型肝炎があっても乾癬において免疫抑制的に働くシクロスポリンや抗 TNF α 製剤が効果があり副作用が多くないこと、INF α 治療が乾癬を悪化させること、などが確認された。C 型肝炎が合併していると乾癬の治療が不十分にしか行われなかったり、肝炎の治療が行われなくなったりして患者が不利益を被る場合があるが、今回の研究を通して乾癬の治療をきちんと継続しながらの肝炎治療が可能であることが考えられた。また、本研究を通して、両者の相関がどのような原理に

基づくかのモデル仮説を作ることができた。これを証明する目的で血清及び皮膚で両疾患に関係する炎症性サイトカインについて検討したが、現時点では症例が限られていて明らかな差はみられなかった。しかし両疾患はおなじ慢性炎症性の媒体を介する同一根源の疾患である可能性は十分に考えられ、今後も研究を継続して明らかにしていきたい。

TNF α をはじめとした炎症性サイトカイン

においては HCV+/-では明らかな差がみられなかった。これは例え慢性の C 型肝炎による高 TNF α 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 α 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

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 軽症の乾癬患者はビタミン D3 外用薬で十分か? 第 60 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2008. 10. 18
- 2) 今福信一 第 108 回日本皮膚科学会総会 教育講演 33「ウイルス感染症診断に必要な検査とその読み方」 2009. 4. 26
- 3) 今福信一 第 24 回日本乾癬学会「ビタミン D3 の長期観察からの有用性の検討」 2009. 9. 4
- 4) 今福信一 第 61 回日本皮膚科学会西部支部学術大会「C 型肝炎に伴う皮膚症状」 2009. 10. 24, 25
- 5) 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」
- 6) Psoriasis 2010 “QUESTIONNAIRE-BASED SURVEY OF THE TREATMENT OF PSORIASIS PATIENTS WITH HEPATITIS C IN JAPAN”, Paris, France 2010. 6. 1-4
- 7) 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

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型肝炎からの肝発癌における過剰鉄とDNA修復遺伝子群の関与

研究要旨: C型慢性肝炎 (CHC) では肝細胞内に増加した鉄がフリーラジカル産生に働きDNA損傷を引き起こしそれが肝発癌につながる可能性が想定されている。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おり、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。本研究においては、長期除鉄療法が肝発癌を抑制すること、8-OH-dGが実際に発癌にかかわる遺伝子群に存在すること、酸化的DNA損傷の修復系酵素活性の個体差が発癌危険因子となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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おり、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、除鉄療法の肝発癌抑制効果ならびに 8-OH-dG が傷害する遺伝子群を検索することと、HCC 発生における酸化的 DNA 損傷の修復系遺伝子群の異

常の関与について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 除鉄療法の肝発癌抑制効果

1994 年から 1996 年までに当科で CHC と診断し除鉄療法を施行した症例 35 例を除鉄群とした。また IFN 療法および除鉄療法を受けていない CHC 症例 40 例を非除鉄群と設定した。除鉄療法は Hb 10 g/dl または血清フェリチン 10ng/ml 未満となるまで週 200-400g の瀉血を行い、以後 1-3 ヶ月に一度の瀉血の施行と低鉄食事療法(1日鉄摂取量 5-7mg) の併用により行った。年次発癌率は Kaplan-Meier 法により比較検討した。肝発癌に関わる背景因子の検討は Logranktest により単変量解析を行い、 $p>0.15$ となった因子について Cox 比例ハザード解析により多変量解析を行った。

(2) 抗 8-OH-dG ChIP on Chip 解析

C 型慢性肝炎患者で肝細胞癌を発症し肝切除術を施行された4例を対象とした。非癌部肝組織より genomic DNA を抽出し制限酵素 XbaI で切断後、抗 8-OH-dG 抗体またはコントロール抗体と反応させ、抗体と結合した DNA 断片を免疫沈降により得た。さらに DNA を purification し、両端に adapter を付加し、adapter specific primer を用いて PCR により標的 DNA 断片を増幅した。得られた産物を断片化し蛍光標識して 50K mapping array で解析した。

(3) 酸化的 DNA 傷害修復遺伝子の SNP 解析

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。他の患者背景因子に SNP 解析結果を加え、肝発癌の危険因子を多変量解析し検討した。さらに MUTYH mRNA 発現量を real time PCR 法により測定し、SNP type 間における相違を検討した。

(倫理面への配慮)

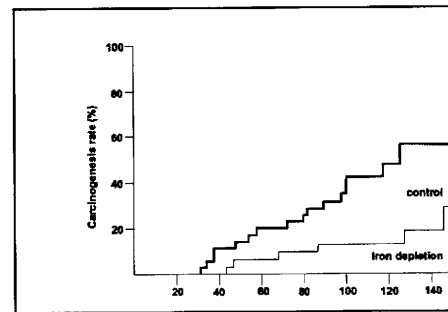
研究に先立って倫理委員会および IRB 委員会の審査・承認を受け、さらに検体採取に際しては患者に対して十分なインフォームドコンセントを書面で得た。

C. 研究結果

(1) 除鉄療法の肝発癌抑制効果

年次発癌率は非除鉄群が 3.9%であったのに対し、除鉄群では 1.8%と有意に低下した ($p=0.0090$)。 (図 1)。更に除鉄群においては平均血清 ALT 値 40 U/l 未満の症例と平均血清フェリチン値 20ng/ml 未満の症例において発癌率が有意に低下した。

図 1 肝発癌率



全体の肝発癌に寄与する有意な危険因子は男性、60 歳以上および除鉄療法施行なしであった。(表 1)。

表 1 肝発癌の危険因子

肝発癌に関わる患者背景因子 (多変量解析)			
	Hazard Ratio	P	95%CI
Gender		0.0118	
F	1		
M	1.78		1.13-3.03
Age		0.0079	
<59 y.o.	1		
≥60 y.o.	1.89		1.17-3.31
plt		0.255	
10.0×10^4	1		
9.9×10^4	1.37		0.78-2.19
Iron reduction therapy		0.0080	
yes	1		
no	1.86		1.17-3.22

(2) 抗 8-OH-dG ChIP on Chip 解析

8-OH-dG が含まれる遺伝子が約 100 個検出された。これらの遺伝子群の中には細胞接着に関わる因子、転写因子、細胞周期に関わる因子、血管新生因子などが多数含まれ、酸化ストレスによる DNA 損傷が発癌に関与していることが示唆された。

(3) 酸化的 DNA 傷害修復遺伝子の SNP 解析

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。両群間の背景因子において単変量解析で有意差を認めたものは、年齢、血清アルブミン値、血小板数に加えて、この SNP であった。多変量解析を行ったところ、年齢と同 SNP が独立した肝発癌危険因子として抽出された。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。

D. 考察

除鉄療法が肝炎活動性、肝線維化および酸化 DNA 傷害を改善することは、種々の検討により報告されてきたが、実際に肝発癌を抑制するか否かについてはこれまで示されていなかった。本研究は、長期間にわたる除鉄療法が肝発癌を抑制することを明らかにした。除鉄群のなかでも血清 ALT 低値例と血清フェリチン低値例での発癌率がより低かったことから、肝内鉄量の低下に伴う炎症の軽減については変異原性塩基の減少が除鉄療法における発癌抑制効果の主因であったと考えられる。さらに抗 8-OH-dG ChIP on Chip 解析により、発癌と癌の進展に関わる多数の遺伝子に 8-OH-dG が認められることが確認できたが、癌部の遺伝子損傷パターンと比較するなどして 8-OH-dG が具体的にどの様な機序で発癌・進展に関与しているのかを今後検討する必要がある。酸化 DNA 傷害修復遺伝子の解析においては 8-OHdG による DNA 損傷の修復酵素である MUTYH の発現低下により、種々の遺伝子損傷が蓄積することが肝発癌の一因と考えられた。同 SNP の minor allele 保有は、肝発癌の危険因子となり得ることが示唆され、今後詳細な機序の解明が必要と考えられる。

E. 結論

長期除鉄療法は C 型慢性肝炎からの肝発癌予防に寄与することが示された。肝内過剰鉄による酸化 DNA 傷害が C 型慢性肝炎からの肝発癌の原因のひとつであり、酸化 DNA 傷害修復酵素の活性個体差が発癌危険因子となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Katsuki S, Sato Y, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Sonoda T, Sakamaki S, Niitsu Y. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res.* 2008;14:48-54.
2. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sagawa T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Gasa S, Sakai H, Tsuchida E, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34(+) cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol.* 2008;87:339-350.
3. Miyanishi K, Ishiwatari H, Hayashi T, Takahashi M, Kawano Y, Takada K, Ihara H, Okuda T, Takanashi K, Takahashi S, Sato Y, Matsunaga T, Homma H, Kato J, Niitsu Y. A Phase I trial of arterial infusion chemotherapy with gemcitabine and 5-fluorouracil for unresectable advanced pancreatic cancer after vascular supply distribution via superselective embolization. *Jpn J Clin Oncol.* 2008;38:268-74
4. Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, Takimoto R, Takada K, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Niitsu Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol.* 2008;26:431-42.

5. Sagawa T, Yamada Y, Takahashi M, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Fukaura J, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Kato J, Sasaki K, Hamada H, Niitsu Y. Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53, and 5-fluorouracil in mice. *Hepatology*. 2008;48:828-40.
6. Nagao Y, Matsuoka H, Seike M, Yamasaki K, Kato J, Nakajima T, Miyazaki Y, Ohno T, Inuzuka S, Ohira H, Yokosuka O, Yatsuhashi H, Mori T, Honda K, Kawaguchi T, Ide T, Sata M. Knowledge of *Vibrio vulnificus* infection among Japanese patients with liver diseases: a prospective multicenter study. *Med Sci Monit* 2009;15:PH115-120.
7. Kobune M, Takimoto R, Murase K, Iyama S, Sato T, Kikuchi S, Kawano Y, Miyanishi K, Sato Y, Niitsu Y, Kato J. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci* 2009;100:948-955.
8. 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
9. 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.
10. 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
11. 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*

2. 学会発表

1. 菊地尚平, 小船雅義, 村瀬和幸, 井山諭, 佐藤 勉, 田中信吾, 瀧本理修, 松永卓也, 矢野真由美, 虎渡恵子, 加藤淳二. 慢性鉄過剰症を合併した輸血依存性貧血患者 2 例に対する ICL670 (deferasirox) の使用経験. 第 70 回日本血液学会総会. 2008.
2. 加藤淳二. Biolron 研究の将来展望-肝炎・肝がんと鉄制御-. Biolron 2007 京都フォローアップ シンポジウム. 2008 (2/15-16) 京都.
3. 高田弘一, 加藤淳二, 河野 豊, 高橋 祥, 小船雅義, 瀧本理修, 宮西浩嗣, 佐藤康史, 佐藤 勉, 高山哲治, 新津洋司郎. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態と治療-非アルコール性脂肪性肝炎における肝内鉄過剰蓄積機序の解析-. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008 (6/5-6) 松山.
4. 小船雅義, 宮西浩嗣, 加藤淳二. HCV 感染における鉄過剰症の実態-C 型慢性肝炎における鉄代謝異常と鉄吸収関連分子の発現検討 -. 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会. 2008 (9/13-14) 青森.
5. Takimoto R, Sagawa T, Kobune M, Sato Y, Sato T, Niitsu Y, Miyanishi K, Kato J. Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53 and 5-fluorouracil in mice. AACR 100th Annual Meeting 2009. 2009 (Apr/18-22), Colorado, U. S. A.
6. Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Nagahima H, Kikuchi S, Takada K, Takimoto R, Sato T, Sato Y, Niitsu Y, Kato J. The comparative analyses of single nucleotide polymorphism of

- oxidative DNA repair genes in patients with HCV related liver disease. 2009 International BioIron Society Meeting. 2009(Jun/7-11), Porto, Portugal.
7. 宮西浩嗣. NASH 診断と治療—NASH における鉄代謝異常と肝内鉄貯留—. 第 22 回肝臓フォーラム(東部). 2009(6/20), 東京.
 8. 宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二. 炎症と消化器発癌—C 型肝炎からの肝発癌における DNA 修復遺伝子の SNPs と損傷遺伝子群の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会. 2009(10/14-16), 京都.
 9. 宮西浩嗣, 河野豊, 加藤淳二. C 型慢性肝炎に対する peg-IFN+RBV 併用無効例に対する方策—除鉄療法の C 型慢性肝炎からの肝発癌抑制効果. 第 13 回日本肝臓学会大会. 2009(10/14-16), 京都.
 10. 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
 11. 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 Erythroblasts 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.

G. 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

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/mm²)と組織学的に評価した肝内鉄濃度(μ 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、個人情報の保護に努める。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(γ ;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. 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.

G. 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

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)
総合分担研究報告書(平成20年度～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: 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
鹿毛 政義 久留米大学医学部病院病理部 教授
谷川 健 久留米大学医学部病理学講座 助教
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
九州肝研究会非B非C肝癌ワーキンググループ 九州肝癌研究会

研究：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

研究要旨：近年増加している非B非C肝細胞癌（肝癌）の発癌原因を明らかにするため、非B非C肝癌症例を対象としてその背景肝の病理形態学的検討を行った。非B非C肝癌の背景肝において線維化と炎症の程度は全体的に軽度であったが肝線維化に対して(1)HBc抗体(2)アルコール歴(3)糖尿病歴（耐糖能障害）は相加的因子である可能性が示唆された。HBVの既感染やアルコールの影響がない場合には発癌に関して糖尿病をはじめとする代謝疾患を含めたNASHの関与する可能性があげられる。また非B非C肝において発癌に関与する酸化ストレスの原因（アルコール、糖尿病、NASH、その他）を特定することは困難である。炎症や線維化の程度の乏しい非B非C肝臓においても発癌が認められることから高頻度に認められた潜在性HBV感染の関与する可能性も考慮する必要あり、その病理形態学的指標としてLarge cell changeの有無が参考となるかもしれない。

A. 研究目的

近年HBsAg陰性、HCVAb陰性の肝癌症例（非B非C型肝炎）の増加傾向が指摘される様になり、診断と治療の両面から肝発癌における要因の解析が必要とされるようになってきた。非B非C型肝炎患者における発癌の要因についてはB型肝炎ウイルスの既感染（HBs抗原陰性、HBs抗体、HBe抗体陽性を含む）、B型およびC型肝炎ウイルス以外の肝炎ウイルス感染症、

日本住血吸虫を含む寄生虫感染症、アルコール性肝障害、代謝性疾患（糖尿病、高脂血症、肥満などを含むメタボリック症候群やNASHなど）、酸化ストレス、自己免疫性肝炎、胆汁性肝硬変などの他に様々な要因が指摘されているが未だ不明な点も多い。

そこで、非B非C肝細胞癌（肝癌）症例を対象としてその背景肝の病理形態学的検討を行い肝発癌の要因の解明を目的とする。

B. 研究方法

(I) 九州肝癌研究会の会員施設において原発性肝癌（肝細胞癌、肝内胆管癌、混合型肝癌、その他を含む）の診断および治療のために採取された肝生検組織や肝切除組織のうち「非 B 非 C 肝癌の発癌要因解析のための九州肝癌研究会ワーキンググループ」にエントリーされた症例の中から肝細胞癌（肝癌）症例で背景肝組織の十分な病理学的検討が可能なものを材料とした。

(対象 I)：肝癌症例で病理形態学的に検討可能な症例のうちアルコール歴、糖代謝異常の有無、HBc 抗体の有無の記載があるものは 129 例である。この 129 例を対照として背景肝組織について以下の項目について病理形態的な評価を行った。

- (1) 炎症の程度 (Ludwig 分類：0-8 の 9 段階)
- (2) 線維化の程度 (Ludwig 分類：0-4 の 5 段階)
- (3) 実質肝細胞の変化の程度 (軽度：5%未満、中等度：5%以上-30%未満、高度：30%以上)
 - (a) 脂肪化
 - (b) 肝細胞腫大
 - (c) マロリー体
 - (d) 糖原核
 - (e) 脂肪肉芽腫
 - (f) 肝細胞の好酸性変化 (oxphlic change)
 - (g) 鉄沈着
 - (h) Large Cell Change(LCC)

(対象 II) 久留米大学で 1996 年～2004 年の間に切除された非 B 非 C 肝癌 39 例の非癌部肝組織を材料として鉄染色（ベルリン青）と 80HdG, 4HNE, MnSOD に対する抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。

(対象 III) 久留米大学で 1997 年～2008 年切除

された非 B 非 C 肝癌 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)

検討した標本は、採取された各施設で研究に使用可能な症例を送って頂いており、こちらで個人を特定する事もできないため倫理面に関して問題ないと思われる。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いる。

C. 研究結果 (I)

1. HBc(+)症例は 61/129(46.9%), AL(+)症例は 76/129(58.9%), DM(+)症例は 57/129(44.2%)であった。
2. 非 B 非 C 症例 (129 例) のうち HBc(-),AL(-)症例は 32 例 (24.8%) であり,さらに DM(-)症例は 15 例 (11.6%) であった。

図 1 129 症例の内訳を示す。

	AL(+)		AL(-)		Total	
	40	21	21	6		
HBc(+)	DM(+) M:15 ■ F:1 ■ (B)	DM(-) M:23 ■ F:1 ■ (F)	DM(+) M:4○ F:3○ (D)	DM(-) M:8○ F:6○ (E)	61	(A)st:1.0±0.8 (B)st:2.1±1.4 (C)st:1.8±1.1 (D)st:1.9±1.1 (E)st:1.8±1.2 (F)st:1.8±1.5
HBc(-)	DM(+) M:17 ■ F:0 ■ (C)	DM(-) M:18 ■ F:1 ■	DM(+) M:9 F:8○○○	DM(-) M:9 F:6○ (A)	68	Stage (A)(B):P<0.02 (A)(C):P<0.03 (A)(D):P<0.05 (A)(E):P<0.05 (A)(F):P=0.062
Total	76	42	53	11	129	

AL:alcohol, HBc:HBc抗体 DM:糖代謝異常
○:NASH ■:ALD M:男性, F:女性

図の略字の説明

HBc 抗体あり:HBc(+),HBc 抗体なし:HBc(-),
アルコール歴あり:AL(+),アルコール歴なし:
AL(-),糖代謝異常あり:DM(+),糖代謝異常な

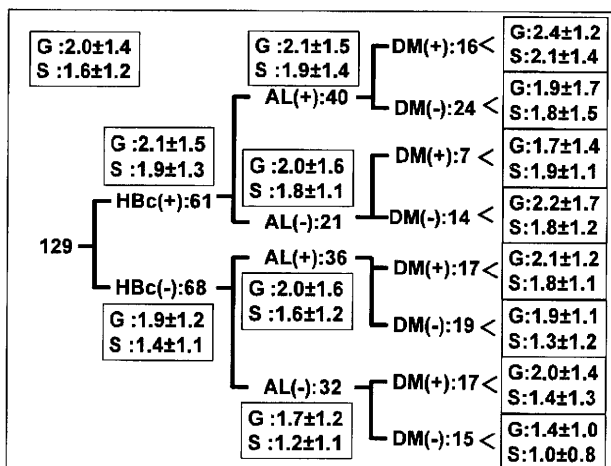
し : DM(-)、G:Grade score、S:Stage score

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

ALD: Alcoholic liver disease

3. HBc(-),AL(-)の32は男女比が9:7であり一般的な肝癌と比べて高齢者、女性に多い傾向があった。
4. HBc(-), AL(-):32症例中4例(12.5%)で病理学的にNASHの像を認めた。この4例はすべて女性で3例はDM(+)であった。またHBc(+), AL(-)21例中4例(19%)にもNASHの像を認め合計8/53(15.1%)で病理学的にNASHの像を認めた。
5. AL(+):76例中16例(21.1%)で病理学的にALDの像を認めた。全例が男性であった。
6. 129例全体の炎症や線維化の程度の平均はGrade:2.0±1.4, Stage:1.6±1.2といずれも低値であった。HBc(-), AL(-), DM(-)症例はgrade:1.4±1.0, stage:1.0±0.8でHBc(+),AL(-),DM(-)症例;grade:2.2±1.7, stage:1.8±1.2、HBc(-), AL(+), DM(-)症例;grade:1.9±1.1, stage:1.3±1.2、HBc(-), AL(-), DM(+)症例;grade:2.0±1.4, stage:1.4±1.3と比較するといずれもより軽度の傾向にあった(図2)。
7. 鉄沈着はHBc(+),AL(+)40例中23例(57.5%)、HBc(+),AL(-)21例中9例(42.9%)、HBc(-),AL(+)36例中16例(44.4%)、HBc(-),AL(-)32例中9例(28.1%)に認められた。
8. LCCはHBc(+),61例中52例(85.2%)、HBc(-),68例中44例(64.7%)に認められた。

図2 129症例のgradeとstageを示す。



研究結果(II)

(1) 39例の臨床背景

男性:女性=32:7, 年齢:55-84歳(平均67.9歳)。HBcAb(+):5例、HBcAb(-):8例、不明:26例。飲酒歴あり:26例、高血圧歴あり:14例、糖尿病歴あり:13例。

(2) 鉄染色

鉄沈着なし:13例(33%)、鉄沈着あり(軽-中等度):16例(41%)、鉄沈着あり(高度):10例(26%)。

(3) 免疫組織化学

(a) 80HDGの結果

- ・小葉全体に発現する症例(2+):14例
- ・門脈域周囲あるいは中心静脈周囲に発現する症例(1+):14例
- ・全体的にほとんど発現しない症例(-):17例。

(b) 4HNEの結果

門脈域周囲および中心静脈周囲を中心として強弱はあるが全体的に発現していた。

(c) MnSODの結果

門脈域周囲に散在性に認められた。

E. 結論

非 B 非 C 肝癌の発癌にアルコール性肝障害、糖尿病を含む代謝性疾患を背景とした NASH、HBV の潜在性感染等の病態が関与する可能性が推察されるが、他の病因の可能性も考慮し今後更に詳細な検討を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1) 中島収、他:非 B 非 C 肝細胞癌(肝癌)の背景肝における発癌要因解析のための病理形態学的検討.日本肝癌研究会:ワークショップ. 大阪国際会議場.2010 年

。

G. 知的所得権の所得状況

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)
総合分担研究報告書(平成20年度～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:横須賀収・千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 教授

研究協力者:今関文夫・千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 准教授

研究課題:非B非C型肝炎細胞癌における HBV DNA の検討

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、千葉大学医学部消化器内科の非B非C型肝炎硬変患者73例(肝癌8例を含む)の血清および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。非B非C型肝炎硬変における血中 HBV DNA 陽性率は肝発癌例 4/8 (50%)、非発癌例 23/65 (35%) で有意差はなく($p=0.33$)、血中 HBV DNA 量は $1.8\sim 3.4 \log \text{ copy/ml}$ と低値であった。非B非C型肝炎細胞癌における肝組織中 HBV DNA 陽性率は、癌部 15/20 (75%)、非癌部 16/20 (80%) と高率であった。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。非B非C型肝炎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。

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

2008年までに千葉大学医学部附属病院消化器内科に通院した肝硬変患者505例(男285例、女220例、平均年齢 58.1 ± 10.3 歳)のうち、非B非C型肝炎硬変は87例(17%)であった。このうち血清が保存されていた73例について、肝発癌8例と非発癌65例を比較検討した。

また、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、血中および肝癌組織(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

(1)肝発癌例と非発癌例における血中 HBV DNA 陽性率の比較

非 B 非 C 型肝硬変における血中 HBV DNA 陽性率は、肝発癌 8 例中 1 例は surface、core、X 領域すべてが陽性、3 例は X 領域のみ陽性であった。非発癌 65 例では、3 か所の PCR 陽性は 1 例、2 か所陽性が 9 例、1 か所のみが 13 例で、surface、core、X 領域の PCR でどれか 1 か所が陽性的場合に HBV DNA 陽性とする、肝発癌例 4/8 (50%)、HBV DNA 量は 1.8~2.8 log copy/ml (median 2.4)、非発癌例 23/65 (35%)、1.8~3.4 log copy/ml (median 2.6) で 2 群間に有意差はなかった ($p=0.33$)。成因別にみると、自己免疫性肝炎が 11/18 (61%)陽性で、その他の肝硬変より有意に陽性率が高かった ($p=0.02$)。

(2) 非 B 非 C 型肝細胞癌患者における血中および肝組織における HBV DNA 陽性率

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、どれか 1 か所が陽性的場合に 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。

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 Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Nov;17(6):898-903.
8. Ishibashi H, Maruyama H, Takahashi M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Assessment of hepatic fibrosis by analysis of the dynamic behaviour of microbubbles during contrast ultrasonography. *Liver Int*. 2010 Oct;30(9):1355-63.
9. Yasui S, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Oda S, Nakano M, Yokosuka O. Clinicopathological features of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol*. 2010 Sep 7. [Epub ahead of print]
10. Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Müller V, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon- α . *Virology*. 2010 Sep 3;7:212.
11. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology*. 2010 Sep;52(3):1111-23.
12. Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J Viral Hepat*. 2010 Sep;17(9):618-23.
13. Maruyama H, Okugawa H, Kobayashi S, Yoshizumi H, Yokosuka O. Pre-treatment hemodynamic features involved with long-term survival of cirrhotic patients after embolization of gastric fundal varices. *Eur J Radiol*. 2010 Aug;75(2):e32-7.
14. Imada H, Kato H, Yasuda S, Yamada S, Yanagi T, Kishimoto R, Kandatsu S, Mizoe JE, Kamada T, Yokosuka O, Tsujii H. Comparison of efficacy and toxicity of short-course carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma depending on

- their proximity to the porta hepatis. *Radiother Oncol.* 2010 Aug;96(2):231-5.
15. Imada H, Kato H, Yasuda S, Yamada S, Yanagi T, Hara R, Kishimoto R, Kandatsu S, Minohara S, Mizoe JE, Kamada T, Yokosuka O, Tsujii H. Compensatory enlargement of the liver after treatment of hepatocellular carcinoma with carbon ion radiotherapy - relation to prognosis and liver function. *Radiother Oncol.* 2010 Aug;96(2):236-42.
 16. Maruyama H, Takahashi M, Ishibashi H, Okabe S, Yoshikawa M, Yokosuka O. Changes in tumor vascularity precede microbubble contrast accumulation deficit in the process of dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol.* 2010 Jul;75(1):e102-6.
 17. Maruyama H, Ishihara T, Ishii H, Tsuyuguchi T, Yoshikawa M, Matsutani S, Yokosuka O. Blood flow parameters in the short gastric vein and splenic vein on Doppler ultrasound reflect gastric variceal bleeding. *Eur J Radiol.* 2010 Jul;75(1):e41-5.
 18. Maruyama H, Okugawa H, Ishibashi H, Takahashi M, Kobayashi S, Yoshizumi H, Yokosuka O. Carbon dioxide-based portography: an alternative to conventional imaging with the use of iodinated contrast medium. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Jun;25(6):1111-6.
 19. Aoki R, Chiba T, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, Iwama A. The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J Hepatol.* 2010 Jun;52(6):854-63.
 20. Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine. *Hepatol Res.* 2010 Apr 1;40(4):415-23.
 21. Maruyama H, Okabe S, Ishihara T, Tsuyuguchi T, Yoshikawa M, Matsutani S, Yokosuka O. Long-term effect of endoscopic injection therapy with combined cyanoacrylate and ethanol for gastric fundal varices in relation to portal hemodynamics. *Abdom Imaging.* 2010 Feb;35(1):8-14.
 22. Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol.* 2010 Jan;52(1):72-8.
 23. Ito K, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Bekku D, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(2):243-9.
 24. Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett.* 2009 Dec 28;286(2):145-53.
 25. Okugawa H, Maruyama H, Kobayashi S, Yoshizumi H, Matsutani S, Yokosuka O. Therapeutic effect of balloon-occluded