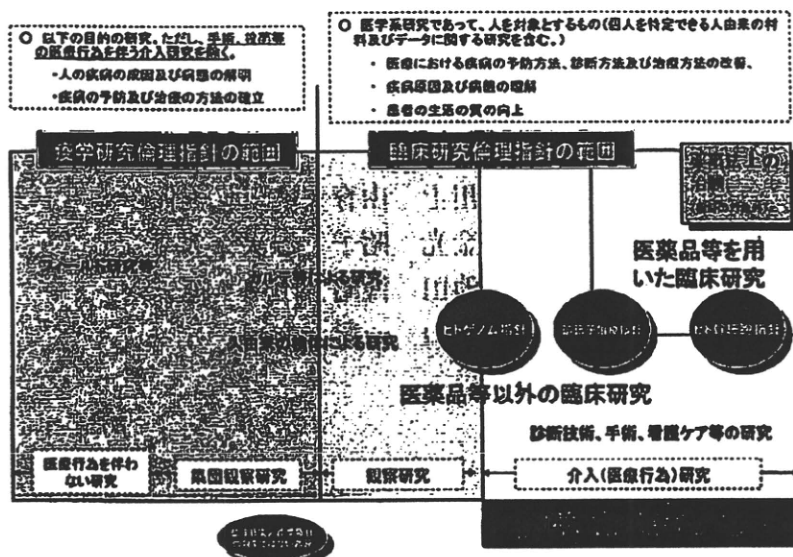




厚生労働省資料 www.mhlw.go.jp/shingi/2008/04/dl/s0423-10g.pdf

図 1 臨床研究からみた各指針の範囲のイメージ。

表 2 倫理委員会に付議不要の研究

・あらかじめ指名する者が倫理審査委員会への付議を必要としないと判断した研究
① ア～エ全ての要件を満たす研究
ア 他の機関で連絡可能匿名化された情報の収集、無記名調査、個人情報を取り扱わないもの
イ 人体から採取された試料などを用いないもの
ウ 観察研究であって、人体への負担を伴わないもの
エ 被験者の意思に回答が委ねられている調査で、質問内容により被験者の心理的苦痛をもたらすことが想定されないもの
② 所属する機関内の診療情報を用いて、専ら集計、単純な統計処理などを行う研究
・次に項の規定を含む契約に基づき、データの集計または統計処理のみを受託する場合
ア データの安全管理、イ 守秘義務

表 3 迅速審査が可能な研究

研究計画の軽微な変更
共同研究で既に主たる研究機関で倫理審査委員会の承認を受けた臨床研究
被験者に対して最小限の危険を超える危険を含まない臨床研究計画

ケート調査や単施設のカルテ調査が該当する。迅速審査可能な臨床研究はほかの施設で承認済みの多施設共同研究が該当する。

広島大学病院では、研究者は簡便化したフローチャート(図 2)を参照にどの倫理指針に該当するか判断し、迷う場合は臨床研究部へ相談する。判断

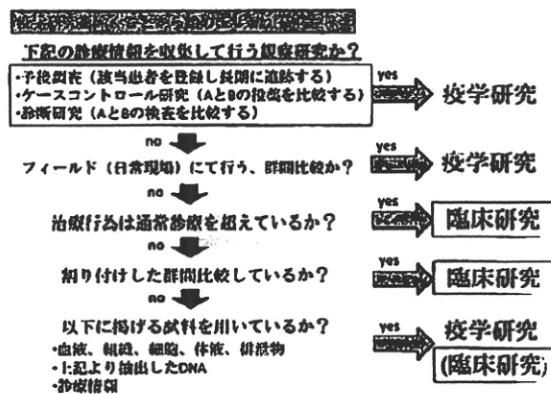


図 2 対応指針へのフローチャート
(広島大学病院版)

の相違がないように、最終的には該当する倫理指針を臨床研究部で判別している。

倫理指針によって求められる内容は異なるため、該当する倫理指針を判断することは重要である。すべての臨床研究を臨床研究指針に適用してはいけな。例えば疫学研究指針に該当する研究であれば、臨床研究補償保険や研究計画の事前公開は義務ではない。不要な責務を研究者に押しつけ研究の妨げとなれば本末転倒である。

Ⅱ. 「臨床研究に関する倫理指針」の改正の要点

あらたに課された責務の中で、研究者に大きく関わる改正点を記載した。その詳細やほかの改正点に

については局長通知⁴⁾や新旧対照表⁵⁾を参照いただきたい。

1) 教育受講義務【第2 1(6)】、【第2 3(12)】

研究者は臨床研究に関する倫理やその他必要な知識について教育を受け、臨床研究機関の長はその教育機会を確保する必要がある。講習内容については、局長通知⁴⁾にインターネットを利用した e-learning のサイトが参考として記載されている。その一つ厚生労働省研究班の臨床研究教育サイト Introduction to Clinical Research web⁶⁾ (以下 ICRweb と略す) は倫理以外にも臨床研究を実施する際に必要な最低限の知識を得ることを目的としたサイトである。このサイトでは登録すればいつでもインターネット上のテキストを利用して無料で学習できる。初級編の受講後に、インターネット上の総合テストで 80% 以上正解すると、研究代表者の名前で修了証が発行される。

広島大学病院臨床研究部では、①臨床研究セミナー受講 (研究者全員)、② e-learning: ICRweb⁶⁾ 初級編の修了証提出 (研究者 1 名以上) を義務づけた。①臨床研究セミナーは、昨年 4 月、5 月に複数回実施し約 1,000 人が受講した。本年度も継続的に開催している。このセミナーを受講していないと、広島大学病院では臨床研究には原則参加できない。一方、② e-learning を受講することで臨床研究の知識を得た研究者を 1 名以上加えて臨床研究を遂行することができる。

2) 健康被害に対する補償【第2 2(1)】、【第3 2(1)】

研究者にとって負担の大きい改正点である。健康被害の補償のために医薬品・医療機器を評価する介入研究は「保険その他必要な措置」を講じることが臨床研究指針に明記された。そのため大手保険会社数社が「補償金」を担保する臨床研究補償保険を取り扱い始めた。補償措置については各保険会社で判断し発動する。なお、この項で説明する補償は賠償とは異なり、日本医師会などの医師賠償責任保険では賄えないことには注意いただきたい。

具体的には図 3 にまとめた。まず、医薬品・医療機器を評価する介入研究では、各保険会社に臨床研究補償保険の見積を原則依頼し加入する。しかし、補償保険を設定できない場合は、次善策として「医療費」(治療にかかった費用のうち、被験者が支払った自己負担分)あるいは「医療手当」(医療費以外の

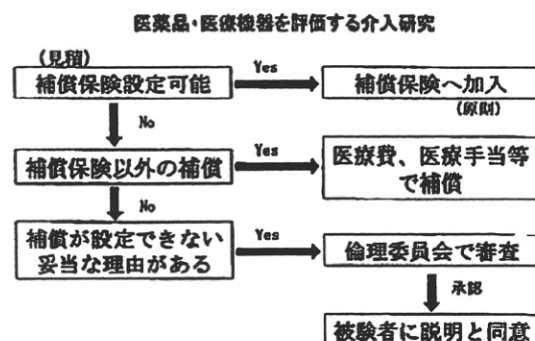


図 3 臨床研究における補償の方策

負担に対して支払う定額の補償)を支給する補償措置を講じる。それらも不可能な場合は、補償が困難である理由を付して倫理審査委員会で審査を受け、被験者に補償がない旨を説明し同意を得ることとなる。例えば、補償保険対象外である抗癌剤や血液製剤などは保険の設定ができない。その際は「医療費」や「医療手当」を準備することを考慮するが、健康被害の発生が多いため経済的側面から研究実施の支障となり、補償の設定が困難である。

広島大学病院では、抗癌剤や免疫抑制剤のような医薬品副作用被害救済制度⁷⁾の対象除外医薬品⁸⁾に該当する場合は、補償保険の見積を依頼していない。それ以外の医薬品、医療機器を評価するすべての介入研究では 4 社の損保会社へ見積を依頼する。保険設定されれば各研究責任者が保険会社を選択し保険金を支払い加入する。上記の手続きは臨床研究部で支援している。

倫理指針改正後、補償保険見積の件数も蓄積されてきた。広島大学病院での経験では、1 研究あたり約 3 万円～260 万円、1 症例あたり約 900 円～10 万円と研究内容、保険会社によって大きく異なる。各保険会社でばらつきはあるが、保険適応内の内服薬の臨床研究であれば 1 症例あたり 1,000 円前後に落ち着きつつある。

その他、臨床研究補償保険に関して、研究者に留意していただきたい点を以下に記す。

- ・指針上「保険その他必要な措置」を要するのは、医薬品、医療機器を評価する介入研究であり、医療技術 (手術など) は義務ではない。
- ・医薬品医療機器総合機構の副作用被害救済制度⁷⁾で補償される医薬品であっても、介入研究であれば臨床研究補償保険などの補償措置を講ずる。
- ・多施設共同臨床研究では、すべての研究施設が原

則同じ補償内容となる (研究責任施設で共同研究施設の保険もまとめて加入することが可能)。

3) 研究計画の事前公開【第 2 2 (5)】、【第 2 3 (13)】

医学研究の倫理的原則であるヘルシンキ宣言⁹⁾で「すべての臨床試験は、最初の被験者を募集する前に、一般的にアクセス可能なデータベースに登録されなければならない」と事前公開を求めている。また、JAMA, The Lancet や New England Journal of Medicine など主要医学雑誌が加盟する医学雑誌編集者国際委員会が、臨床研究の実施と報告の透明性を高めるため、2004 年に臨床試験計画を公的なウェブサイトに登録し公開することを提唱した。ほかの医学雑誌もこの声明を支持し、試験開始前に公開していないと論文を受理しない雑誌が増えている。

このような経緯を経て今回の改正で、侵襲性を有する介入試験は臨床研究開始前に、国立大学附属病院長会議 (UMIN)、日本医薬情報センター (JAPIC) または日本医師会 (JMACCT) が設置したデータベースのいずれかに登録し公開することを課せられた。英語および日本語の記載が必要である臨床研究計画の登録は複雑であるが、倫理委員会承認後から臨床研究開始前の短い期間に公開する必要がある。

広島大学病院では、研究者は倫理委員会申請前に臨床研究計画を UMIN 臨床試験登録¹⁰⁾ (UMIN-CTR) へ仮登録を行う。仮登録とは、臨床研究計画を登録できるが非公開であり、内容の変更が可能な状態である。仮登録することで倫理委員会承認後すぐに公開することができる。臨床研究部では登録方法が示されているウェブサイト^{11), 12)}を提示し、仮登録の支援や確認をしている。

4) 重篤な有害事象・不具合の報告

有害事象の定義を表 4 に示した。重篤な有害事象などの報告については、以前の倫理指針でも規定されていたがさらに厳密になった。図 4 へ対応をまとめた。重篤な有害事象や不具合を知った場合には臨床研究機関の長に直ちに通知し【第 2 2 (8)】、臨床研究機関の長は速やかに対応する【第 2 3 (8)】。また、侵襲性のある介入で予期しない重篤な有害事象や不具合は厚生労働大臣に報告する【第 2 3 (9)】。多施設共同研究では共同研究施設にも周知する【第 2 2 (10)】【第 2 3 (8)】。以上の対応を、研究者や研究施設が把握し対応する必要がある。

広島大学病院では、重篤な有害事象の報告書を作

表 4 有害事象の定義

有害事象	被験者に生じたあらゆる好ましくない診療上のできごと 医薬品との因果関係の有無は問わない
重篤な有害事象 (直ちに報告)	有害事象のうち下記に該当するもの ・死にいたるもの ・生命を脅かすもの ・治療のため入院または入院期間の延長が必要なもの ・永続的または顕著な障害・機能不全に陥るもの ・先天異常を来すもの
予期しない重篤な有害事象 (厚生労働大臣に報告)	重篤な有害事象のうち、添付文書などを参考に判断

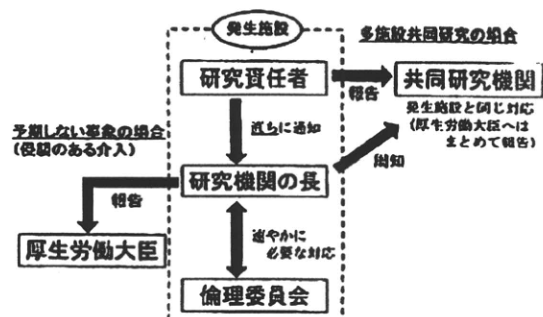


図 4 重篤な有害事象・不具合の発生状況

成し、研究者に直ちに報告するよう臨床研究セミナーで啓発した。有害事象の発生を把握できるのは研究者しかいないため、有害事象報告は自主性に任せることとなるが、臨床研究部で年に 1 回いくつかの臨床研究を点検し調査する予定である。なお、実施中の臨床研究がこの指針に適合しているか点検、評価することも臨床研究機関の長の責務として新たに記載されている【第 2 3 (10)】。

5) 臨床研究の進捗状況・終了の報告【第 2 2 (9)】

臨床研究の進捗状況や有害事象の発生状況などを年に 1 回臨床研究機関の長に報告することが規定された。

広島大学病院では、終了した臨床研究は研究結果の概要とともに報告される。また、臨床研究部では実施中の臨床研究を年度末に調査している。

6) 利益相反の管理

利益相反は、数年前に抗インフルエンザ薬の国の副作用調査で、調査委員が関係する企業から寄附金

を受けていたことで、マスコミに取り上げられ注目された。臨床研究はしばしば企業や財団からの寄附金などで実施される。医学研究の発展には企業との連携が必要で、国もその産学連携を推奨している。一方で、産学連携を進めた場合、患者利益のために実施されるはずの臨床研究が、企業の利益優先のために公正に行われない可能性がある。このように患者と企業や研究者との間に利害の衝突がある状態を「利益相反」という。透明性、信頼性の高い臨床研究のためには、利益相反を適切に管理する必要がある。

臨床研究指針では、利害の衝突について被験者に説明することが求められ【第 4 1 (1)】、「細則」にはガイドラインおよび指針に留意することが記載されている。例えば「臨床研究の利益相反ポリシー策定に関するガイドライン¹³⁾」では、利益相反に関する文書化された「利益相反ポリシー」を策定し管理体制の構築を求めている。

広島大学病院では上記のガイドラインに則り、「広島大学臨床研究に係る利益相反管理に関する規則」および「広島大学における臨床研究に係る利益相反ポリシー」を策定した。また、弁護士、公認会計士の外部有識者も含めた臨床研究利益相反委員会を立ち上げた。臨床研究実施者は、臨床研究計画ごとに株式や受託研究、寄附金などの状況を記載した自己申告書をその委員会に提出し審査および助言を受ける。利益相反委員会はその結果を当該倫理委員会に報告する。以上の手続きを経て適正に管理するよう努めている。

Ⅲ. 広島大学病院での臨床研究指針への対応

臨床研究指針のさまざまな責務を遵守するために、臨床研究部では図 5 の流れに従い支援している。広

島大学病院が研究代表施設で臨床研究を実施する場合は、臨床研究部 HP¹⁴⁾ 上に掲載している見本を参照に実施計画書、同意文書などの申請書類が作成される。申請書類提出後は臨床研究部で内容を精査し、臨床研究の代表者と 30 分～1 時間程度の対面助言を「コンサルト」と称して行っている。コンサルトは、臨床研究部で医師、CRC (Clinical Research Coordinator)、データマネージャー、統計担当者のチームを組んで、臨床研究の代表者に対面で協議している。主な内容は、実施計画書の改善や臨床研究倫理指針遵守の助言であり、研究の支援が目的である。コンサルトの後には実施計画書を確定し臨床研究補償保険の見積を依頼する。このような手続きのため書類提出から倫理委員会まで 2～3 カ月要することが多いが、倫理委員会では円滑に審査される。

コンサルトでしばしば問題となるのが多施設共同研究である。その問題点をいくつか記す。

- ・すべての施設で同一の臨床研究を行うはずであるが、施設によって実施計画書の内容が異なっている。
- ・看護ケアや栄養指導、理学療法の臨床研究では臨床研究指針に則っていない。
- ・倫理委員会に付議を要しないようなアンケート調査にもさまざまな責務を課す施設がある。
- ・疫学研究指針に該当する観察研究にも補償保険などの不要な責務を課す施設がある。
- ・臨床研究補償保険が必要であるのに研究代表施設で加入していない。

このような場合、臨床研究部ではその施設へ研究者を通じて問い合わせている。多施設共同研究に参加する施設や研究者は倫理指針の内容を十分把握しないと混乱を招くこととなる。

最 後 に

今回の臨床研究指針の改正で、研究者や医療施設の負担が増大したことから、臨床研究の萎縮につながるという意見がある。一方で、欧米では既に自主臨床試験も治験と同様に、臨床研究指針よりも厳格な GCP 基準で施行されていることから、今回の改正は海外の基準に近づいただけという意見もある。今後、臨床研究は多国間で実施されることが多くなるため、近い将来に海外と同様な GCP 基準となる可能性も否定できない。臨床研究指針の見直しは 5 年ごとであるが、倫理の遵守は被験者の保護だけでなく

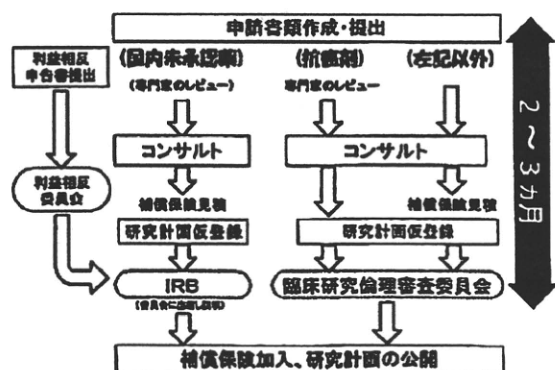


図 5 広島大学病院での臨床研究申請後の流れ

研究者の立場を守ることにもなるため、まずはこの臨床研究指針への対応が望まれる。

文 献

- 1) 厚生労働省：臨床研究に関する倫理指針
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf>
- 2) 厚生労働省：医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令
http://www.pmda.go.jp/ich/e/e6_97_3_27.htm
- 3) 厚生労働省：疫学研究に関する倫理指針
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/ekigaku/0504sisin.html>
- 4) 臨床研究に関する倫理指針等について（局長通知）
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shikou.pdf>
- 5) 臨床研究に関する倫理指針（新旧対照表）
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/07/dl/s0723-5f.pdf>
- 6) 国立がんセンター：ICRweb
<http://www.icrweb.jp/icr/>
- 7) 医薬品医療機器総合機構：医薬品副作用被害救済制度
<http://www.pmda.go.jp/kenkouhigai/help.html>
- 8) 医薬品医療機器総合機構：医薬品副作用被害救済制度の対象除外医薬品
<http://www.pmda.go.jp/kenkouhigai/help/taisyuu.html>
- 9) 日本医師会：ヘルシンキ宣言
http://www.med.or.jp/wma/helsinki08_j.html
- 10) 大学病院医療情報ネットワーク UMIN-CTR
<http://www.umin.ac.jp/ctr/index-j.htm>
- 11) UMIN-CTR への登録手順の概略
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/05/dl/s0522-3f.pdf>
- 12) UMIN 臨床試験登録（例）
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/05/dl/s0522-3g.pdf>
- 13) 臨床研究の利益相反ポリシー策定に関するガイドライン
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/06/dl/s0628-16h.pdf>
- 14) 広島大学病院：臨床研究部 HP
http://home.hiroshima-u.ac.jp/hugcp/doctor/clinical_manual_new.html

（受付 2010-8-30）

[座談会] ウイルス肝炎

肝炎ウイルス感染の現状と新しい治療法

肝炎ウイルス感染の現状／肝炎治療の現状／肝炎の新しい治療法

■出席者■（発言順）

（司会）井廻道夫 いまわり みちお：昭和大学医学部内科学講座 消化器内科学部門
 田中純子 たなか じゅんこ：広島大学大学院医歯薬学総合研究科 疫学・疾病制御学
 熊田博光 くまだ ひろみつ：虎の門病院 肝臓内科
 小池和彦 こいけ かずひこ：東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学



左から 小池和彦・井廻道夫・熊田博光・田中純子の各氏

2010年5月31日（月）・東京

肝炎ウイルス感染の現状

■疫学調査から

井廻 日常診療におけるウイルス肝炎の主な治療対象は、B型およびC型の慢性ウイルス肝炎ですので、本日はそれらを中心にお話をうかがいます。

田中純子先生、肝炎ウイルス感染の現状と今後の予想について、お願いしたいと思います。

田中 現状については、感染率や感染者数の話になると思います。もし仮に、日本人約1億2千万人を採血して調べることができれば、感染率や地域差は明らかになります。しかし、現実的には、ある集団における感染率などの値から日本全体の値を推測することになります。

現在、把握可能な感染率としては2つあります。1つは、輸血用血液の安全性確保のために行われている日本赤十字社のスクリーニング検査により得られた資料です。もう1つは、老人保健法により住民健診受診者を対象に2002年から行われた肝炎ウイルス検査の成績です。

前者の資料、すなわち、1995～2000年の初回供血者約380万人の資料から明らかになったことは、C型肝炎ウイルス（HCV）抗体陽性率は、年齢が若い集団では低く、年齢が高い集団では高い値を示すということです。地域別にみると、HCV抗体陽性率が高いのは西日本を中心とした地域ですが、いずれの地域でも年齢が高くなるに従い高いHCV抗体陽性率を示すという傾向が認められています。一方、後者、住民健診による約800万人の成績を解析すると、年



井廻道夫 氏

齢別にみた HCV キャリア率については供血者集団と同様の傾向が認められます。

B 型肝炎ウイルス (HBV) についても同様に、初回供血者集団の年齢と地域別 HBV キャリア率、HBs 抗原陽性率をみると、1945 年生まれ、2005 年時点で 60 歳あたりをピークとし、その前後でやや低く、年齢が低くなるとより低い値を示しました。いずれの地域にも同様の傾向がみられています。ただ、B 型のキャリア率には地域差があつて、北海道地域と九州地域でやや高い値を示します。

初回供血者集団と肝炎ウイルス検診受診者集団の、2 つの大規模集団から年齢と地域別の感染率について、同傾向の結果が得られましたので、日本全体集団においてもほぼ同様であることが推測されます。

井廻 B 型は 120 万～150 万人、C 型が 150 万～200 万人と言われていて、かなり幅が広いのですが、患者さんを含めるといかがでしょうか。

田中 キャリア数の推計値に患者さんの数を含めることはなかなか困難です。通常、献血をする人は、自覚症状がなく、自分は健康と思っている人が多いと思います。その人たちが、「あなたは肝炎ウイルスに感染していました」と通知を受けるわけですから、献血者集団における

感染率は、自覚症状がないまま社会に潜在している率と考えられます。1995～2000 年の初回供血者のデータをもとに推計した場合、自覚症状がないまま社会に潜在しているキャリアと思われる数は、15～64 歳の年齢層では、B 型で約 97 万人、C 型で約 88 万人となりました。井廻先生がおっしゃった数字は、15～64 歳の年齢層の、上下の年齢層のキャリア数と患者数を含めたものと思います。

患者数を含めるとなると、医療機関での外来受診者、入院患者などを加える必要があります。

患者数を知るには患者調査を利用する方法があります。患者調査は、無作為抽出された病院、一般診療所などにおいて、1 年の決められた数日のうち 1 日を選び、入院と外来の患者数を調査するものです。この日に得られた入院と外来患者数と、疾患ごとに計算した平均診療間隔と、決められた数値 (調整係数) をもとに総患者数が算出されます。たとえば、慢性肝炎では平均診療間隔が何日、肺癌では何日というようにして、総患者数を推計します。実態とどの程度合致しているかについての厳密な信頼性の評価は行われていません。

井廻 たしかに全例の登録ではありませんね。そこを勘案して、さまざまな人がいろいろと推計していますが、明らかなのは年齢別のキャリア率だけということですね。

田中 2000～2005 年の初回供血者の資料を用いて再推計したところ、特に、C 型のキャリア率は低下しています。1995 年以降、手術時など検査の機会が増加したり、住民健診が実施されたりしたことで、感染していることがわかり、その人たちは献血には行かないと考えられます。患者さん以外の、自覚症状がないまま社会に潜在しているキャリアは以前の推計値より少なくなっていると思います。

井廻 今後の予想は、いかがでしょうか。

田中 今後のキャリア数の予想は、新規感染率

(新規発生率)をみないとわかりません。現在、わかっているのは、一般集団と考えられる献血者集団の新規感染率と、ハイリスク集団のひとつとされる透析医療施設での新規感染率です。2つの集団での HCV の新規感染率は、 10^2 倍違います。ハイリスク集団と比べ、一般、供血者集団の新規感染率は C 型も B 型も低い値です。
井廻 将来的には減っていくだろうと、予想できますか。

田中 一般集団では、減少しそうです。ですが、ハイリスク集団では引き続き感染予防対策は必要ですし、欧米型タイプ genotype A の B 型肝炎ウイルスでは、感染後の慢性化率が高いと言われていることから、新規感染動向の疫学的観察や把握は今後も継続していく必要があると思っています。

■一基幹病院から

井廻 B 型の新規患者は、熊田博光先生、虎の門病院は多いですね。

熊田 当院で新規患者が多かった最大の理由は、家族採血を徹底的に行ったからです。B 型患者の平均では、家族を調べると 1.8 倍の人がキャリアであることがわかりました。ただ、あくまでも推定ですが、虎の門病院は約 5500 人で、全国の約 0.5%と言われている。単純に 200 倍すると、患者とキャリアを合わせて約 110 万人という計算になります。

井廻 C 型では、どうなりますか。

熊田 C 型肝炎の患者さんはかなり散在しています。虎の門病院は全国の約 0.3%と推定すると、7000 人の 300 倍、約 210 万人となります。

井廻 新規の患者さんはどうですか。

熊田 B 型について注目すべきは、新規の genotype A の急性肝炎が急増しました。その話が伝わったせいか、このところ genotype A の急性肝炎が少し減っている印象があります。それ以外の B 型の genotype は、これまでの家系で



田中純子 氏

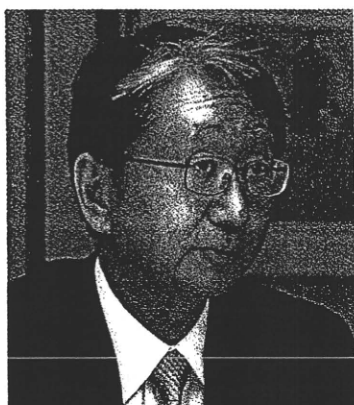
フォローしていた人の知り合いや親戚などで増加しているだけで、それほど増えているとは思えません。

井廻 C 型は、血液製剤の検査により急減しました。残りのリスクは、針など、使い捨てすべき器具を不正再利用することなどですね。

熊田 C 型で多いのは慢性腎炎の系統が多く、散発的に現れるのが何かの医療行為を受けた可能性のある人です。エビデンスはありませんが、HCV 抗体がマイナスで何もなかった人が、不衛生な手術などから感染することが次に多くなってくると思います。

田中 男女別に新規感染率をみると、有意差はありませんが、C 型については、50 代、60 代の女性にやや高い傾向がありました。どういうルートで新規感染するのかということには、疑問をもちました。

井廻 広い意味での医療行為を受けた、ということでしょうか。以前、眉の刺青から感染した女性を経験しました。



小池和彦 氏

肝炎治療の現状

■セロコンバージョンへの配慮

井廻 B型肝炎の場合、大多数はセロコンバージョンして慢性肝炎、肝硬変という道をたどりません。それでも10～15%は慢性化してしまうことがあります。そういう人々に対する治療の現状を、小池和彦先生のほうからご説明いただけますか。

小池 B型の慢性感染を念頭に置き、その治療についてお話しします。B型肝炎ウイルスがC型肝炎ウイルスと決定的に異なるのは、一度感染すると排除できないことです。

また、治療では、セロコンバージョン、つまり自然にウイルスが減り、安定化して無症候性キャリアとなる人が多いことに留意する必要があります。この率は80～90%とされています。言い換えれば、約15%の人は慢性肝炎が持続しますが、残りの人は、抗ウイルス薬などを使用しなくても自然に落ち着くわけです。ですから、治療が不要な人には治療をしないということが前提になります。

薬物治療において、今まではインターフェロン(IFN)という非特異的な抗ウイルス薬しか使用できませんでしたが、この数年間で特異的

な抗ウイルス薬が使えるようになりました。最近、C型も含めてDAA(directly acting antivirals)とよばれるようになりましたが、日本ではB型肝炎に対して3種類の逆転写酵素阻害薬が使用できます。ラミブジンが最初で、次にアデホビル、それからエンテカビルが出ました。ラミブジンは、劇症肝炎や肝硬変で今まで救えなかった患者を救えるようになり、非常に意義がある薬剤でしたが、耐性をつくりやすいという難点があります。エンテカビルが、この3薬のなかでは抗ウイルス効果が高く、かつ耐性が比較的できにくいという理由から、現状では第一選択薬と考えられています。

ただ、長期使用は、今のところせいぜい5年までです。10年、20年と使った場合にどうなるか。耐性が徐々に出てくるとは思いますが、未知の領域であると言えます。

井廻 ラミブジンは核酸アナログのL体なので、ヒトが利用できないため、催奇形性はないとされています。アデホビルもエンテカビルも、同様に考えてよろしいでしょうか。

小池 催奇形性は、エンテカビルではまだ不明です。動物実験では大丈夫だとされましたが、ラミブジンほどには歴史がありません。

■有効性の個人差

井廻 薬剤の有効性には個人差がありますが、そのあたりをご説明いただけますか。

熊田 ひと昔前までは、e抗原が消えてe抗体にセロコンバージョンして、かつALT正常が持続すれば、治療目標を達成できたとされていました。日本には、かつては2タイプ、今ではgenotypeのBが2種類ありますが、Bのタイプは自然にe抗原が消えやすく、全体の2割を占めています。一方、genotype Cは、Bと比較してセロコンバージョンしにくいです。海外種であるgenotype Aもセロコンバージョン率が低いとされています。

ところが、肝臓癌をみると、約7割はe抗原陰性で、e抗原陽性の肝臓癌は3割に過ぎません。そうすると、e抗原が消えただけでは不十分だということになり、マーカーとしてDNAポリメラーゼが登場してきました。現在、感度の良いものがHBV DNAで、Real Time PCR法です。最近3つの要素、e抗原が陰性化すること、AST、ALTが正常化すること、HBV DNAが低値で5 log以下であることが達成できれば、進行が止まると考えられています。その状態が治療目標となっています。

井廻 e抗原と、HBV DNA値は必ずしも並行しないということですか。

熊田 ええ、必ずしも並行しません。たしかに、e抗原陽性のほうがHBV DNAは多いし、e抗原陰性のほうがHBV DNAは少ないのですが、なかにはe抗原陰性でもHBV DNAが高い人がいて、予後が非常に悪いことが知られています。

男女別でみると、genotype Bは女性のほうが明らかに多いです。性差の大きな原因のひとつは出産です。出産後、e抗原からe抗体にセロコンバージョンする例が多数みられること、月経の状況によってホルモンバランスの崩れが起こる人がセロコンバージョンしやすいことが、以前から言われています。さらに、栄養状態が良い人ほどセロコンバージョンしやすいことがわかっています。e抗原からe抗体に変わる年齢は、先進国ほど早いことが知られています。

井廻 B型肝炎ウイルスが自然に減少しない人については、エンテカビルの使用で、ほとんどコントロールできるのでしょうか。

熊田 現時点のわが国のデータで明らかになっているのは3年目までで、耐性株が出る頻度は1~2%、3%以下です。その頻度はラミブジンもアデホビルも3年目以降に増加しますから、3剤のなかではエンテカビルが最も低いという理由から第一選択薬になっています。今後、4



熊田博光 氏

年目、5年目、さらに10年といったデータをきちんと観察しなければいけません。

井廻 エンテカビルにも耐性が出てきた場合を想定して、新しい治療戦略を用意しておかなければいけませんね。

熊田 いま世界で使われ日本で使用されていないのはテノホビルなので、新しい治療戦略となる可能性があります。ただ、日本ではすでにHIVの治療薬になっています。少数例の多剤耐性、つまりラミブジン、アデホビル、エンテカビルの耐性株が出た人にテノホビルを使うと、現状では非常に有効です。交叉耐性で説明すると、その3剤すべてに変異が起きても、テノホビルは変異の場所が異なっています。今のところ、テノホビルが有効なことは、少数例ですが、報告されています。

井廻 テノホビルを、日本で使われているということですか。

熊田 当院では、核酸アナログが1500例程度に使われていますが、その3剤でどうにもならないというのはたった2例でした。この2例がテノホビルの使用で治まっていますから、そう多くはありません。

井廻 HIVのようにカクテル、初めから多剤併用を行う必要はないのでしょうか。

小池 B型肝炎ウイルスは非常にシンプルなウ

イルスで、ターゲットになるところは逆転写酵素くらいしかありません。そのため、カクテルで、プロテアーゼ阻害薬などの機序の違うものを組み合わせることができないのです。

井廻 そうですか。ポリメラーゼ阻害薬しかないのですね。あとは免疫療法ですか。

小池 ペグ IFN が使えるようになると、どういう位置付けになりますか。

熊田 現在、ペグ IFN α -2a の治験が行われていて、その結果をみると、従来の IFN と治療効果にそれほど差がありませんでした。ただ、期間が1年になると、治療効果は従来の6か月よりもはるかに良いことがはっきりしてきます。将来的には、使い勝手の良いペグ IFN を1年間使うことが、IFN 療法のメインになるだろうと思います。

井廻 今後は若年者、そして e 抗原陽性例、e 抗体陽性例の両方にペグ IFN が使えるようになると、そのメリットは大きいですね。

■個人差の評価

井廻 C 型肝炎のほうはいかがでしょうか。

熊田 IFN は 1992 年 2 月に保険適応になり、C 型肝炎と思われる人はほとんど治癒が可能だとされましたが、その時点で治癒は 30% 程度で、残りの 70% が治りませんでした。

治りやすいかどうかは、日本ではグループ 1 型が治りにくく、2 型が治りやすいことがわかっています。さらにウイルス量が多い人は治りにくく、少ない人は治りやすいことが判明しました。その結果、治りにくい人はグループ 1 のウイルス量が多い人で、それ以外の患者が IFN 単独で治療が行われたという実態があります。

2004 年にリバビリン併用療法と、ペグ IFN とリバビリンの併用療法が使用できるようになりました。そこで難治性の 1 型高ウイルス量に対して、ペグ IFN とリバビリンの 48 週間投与

が、日本のスタンダード、そして世界のスタンダードになりました。2009 年ころから 72 週行くと、さらに有効なことが明らかになっています。医療費助成も含めて、日本では高ウイルス量にはペグ IFN とリバビリンの併用、低ウイルス量には IFN 単独というのが、現状の治療法だと思います。

小池 最近のゲノムワイド関連解析によりある遺伝子がみつき、話がかなり変わりました。歴史的には、ウイルスの遺伝子型 1 と 2 で大きく違ってきます。日本の場合、1 が 7 割、2 が 3 割です。2 型のほうは、現状の治療法で 9 割近い人のウイルスの排除ができます。1 型の場合、低ウイルス量までいくと、100k です。

熊田 100k、5 log 以下ですね。

小池 5 log 以下ですと、やはり同様の 9 割近い排除率がありますが、問題は残った 1 型の高ウイルス量の人たちをどう治療するか、どういう人たちが効きやすいか。それらが、いまの解析の焦点になっています。

宿主側因子としては年齢、性別、つまり若い人ほど効きやすく、男性のほうが効きやすいことがわかっています。そして、肝組織の線維化の進んでいる人には効きにくく、軽い人には効きやすいことが明らかになっています。

ウイルス側の因子としては、山梨大学の榎本信幸先生が発見された IFN 感受性遺伝子 (HCV RNA 1b NS5A ISDR) と、熊田先生の HCV コア遺伝子変異 (コドン 70 および 91 番変異) などが知られていて、それぞれ特徴があります。NS5A ISDR は治療が有効な人を、コア遺伝子変異 70 は治療が無効な人を選び出せるという利点があります。

最近では、インターロイキン (IL)-28B という IFN λ の近傍遺伝子の遺伝子多型 (SNPs) によって、効きにくさを選別できます。SNPs でメジャーなタイプとマイナーなタイプとを分けると、メジャーなタイプはかなり有効だけれども、

マイナーなタイプは治療抵抗性です。

幸い日本の場合には、IL-28B について、だいたい 8 割がメジャーなタイプのほうで、効きやすいタイプのほうが多いのです。

また、IL-28B によりマイナーなタイプで効きにくいと判定された人のなかで、さらにコア遺伝子 70 番変異により効きやすいタイプかどうかをみると、両方とも効きにくいタイプとされた人では治療効果がきわめて低いことが、明らかになりつつあります。

肝炎の新しい治療法

井廻 問題は、種々の因子がわかってくると、それを乗り越え治療成績を上げる方法を考えなければならないということです。次の治療法として、どういうものがあるのでしょうか。

熊田 それは、ペグ IFN とリバビリンの併用療法を超えるにはどうしたらよいかということになり、最も早く登場すると思われるのがプロテアーゼ阻害薬系で、数種類あります。なかでもテラプレビルが、世界では 2010 年 4 月に、日本では 9 月に治験が終わります。初使用の人では 75% の人が治り、ペグ IFN とリバビリンで再燃した人では 90% が治癒します。まったくウイルス反応がなかった人でも、30~35% の人が 24 週、これまでの 1 年~1 年半ではなくて、半年の治療期間で治癒が見込めるとのことです。

そのほかに海外では、NS5A 阻害薬、ポリメラーゼ阻害薬などが治験を終了あるいは治験中です。今後、これらが次々と世に出てくると思われます。

井廻 その場合、効果の個人差はどうなるのでしょうか。

熊田 ペグ IFN とリバビリン、ポリメラーゼ阻害薬の 3 剤併用療法でみてみると、IL-28 のメ

ジャーアレル、つまり、治りやすいほうの人は約 9 割が治ります。一方、治りにくい人でも、30~40% が治ってきます。ただ、治りにくいマイナーアレルのほうで、なおかつコア 70 番に変異があり治りにくいタイプの 2 つが集まると、きわめて悪く、10% しか治りません。

治療がどんどん進歩していくに従って、治りやすい人はより治りやすくなります。治りにくい 1 群だけが残る、今度はそれに対してどうするかという議論になります。今の IFN α 、IFN β では、IL-28 のマイナーアレルのところはある程度限界があるのではないか、そうすると IFN λ という、新しいところをターゲットにした IFN が必要になってくるのではないかと思います。

井廻 ペグ IFN・リバビリンなしの、それこそ先ほどの DAA だけの治療法の可能性というのはどうでしょうか。

熊田 可能性は残されていると思います。実際に、NS3 阻害薬と NS5A の阻害薬の治験が、海外、日本で開始されています。

ただ海外は、残念ながら 2 つの会社が始まりましたが、これら 2 剤だけでは 3~4 割ではないかと予測され、特にマイナーアレルのほうが多い場所では 2 剤だけでは十分な治療効果が得られないだろうという中間報告が出されたため、海外は内服薬どうしの治験を中止して、3 剤、4 剤という方向に流れています。日本はマイナーアレルが少ないので、2 剤の治験が続行されています。

井廻 日本では、マイナーアレルが少ないから、2 剤でいける可能性はありますね。

熊田 海外と日本では、将来、治療法が異なる可能性があります。

田中 また、日本の場合、高齢者のキャリア数が多いため、問題になりますね。

熊田 日本は、特に高齢者をどう治療するかということが課題になっています。なんとか内服

でいければという期待があります。まだパイロット試験の段階なのでわかりませんが、パイロットを20例やっているのは、ペグIFN・リバビリン無効例と、ペグIFN・リバビリンが対象にならない人、つまり高齢者なのです。そういう人たちへの治験を実施していますが、結果はまだ予想できません。

井廻 本日は、B型肝炎とC型肝炎のウイルス感染の現状をお話いただきました。今後、患者数は少なくなると思われますが、治療しなければいけない患者さんは依然として多数残っているという状況です。

B型肝炎に関しては、治療しなくてはならない人には抗ウイルス薬の使用が必要となりま

す。ただし、長期に使用しなければなりませんので、今後出てくるIFNとの組み合わせにより、治療を途中でやめても、完全な駆除はできないまでも、ウイルス量が増えないような状況にもっていけるかどうかは課題となります。

C型肝炎に関しては、一部どうしても治療抵抗性の人が残ってしまいます。今後さらに抗ウイルス薬が出てきて、効きやすいタイプの人ほとんど100%治療できるかもしれませんが、残りの人たちをどう治療していくかというのは今後の課題ではないかと思います。有効な薬剤が開発されることを期待したいと思います。本日はありがとうございました。

Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus

Takashi Kumada · Hidenori Toyoda · Seiki Kiriyaama · Makoto Tanikawa · Yasuhiro Hisanaga · Akira Kanamori · Toshifumi Tada · Junko Tanaka · Hiroshi Yoshizawa

Received: 9 August 2010 / Accepted: 22 October 2010
© Springer 2010

Abstract

Background Increases in tumor markers are sometimes seen in patients with chronic liver disease without hepatocellular carcinoma (HCC). The aim of this study was to determine the relationship between the levels of three tumor markers [alpha-fetoprotein (AFP), *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP (AFP-L3%), and des-γ-carboxy prothrombin (DCP)] and hepatic carcinogenesis to identify hepatitis C virus (HCV) carriers at high risk for cancer development.

Methods A total of 623 consecutive HCV carriers with follow-up periods of >3 years were included. The average integration values were calculated from biochemical tests, and tumor markers, including AFP, AFP-L3%, and DCP, and factors associated with the cumulative incidence of HCC were analyzed.

Results HCC developed in 120 (19.3%) of the 623 patients. Age >65 years [adjusted relative risk, 2.303 (95% confidence interval, 1.551–3.418), $P < 0.001$], low platelet count [3.086 (1.997–4.768), $P < 0.001$], high aspartate aminotransferase value [3.001 (1.373–6.562), $P < 0.001$], high AFP level [≥ 10 , <20 ng/mL: 2.814 (1.686–4.697),

$P < 0.001$; ≥ 20 ng/mL: 3.405 (2.087–5.557), $P < 0.001$] compared to <10 ng/mL, and high AFP-L3% level [≥ 5 , <10%: 2.494 (1.291–4.816), $P = 0.007$; ≥ 10 %, 3.555 (1.609–7.858), $P < 0.001$] compared to <5% were significantly associated with an increased incidence of HCC on multivariate analysis.

Conclusions Increased AFP or AFP-L3% levels were significantly associated with an increased incidence of HCC. Among HCV carriers, patients with ≥ 10 ng/mL AFP or patients with ≥ 5 % AFP-L3% are at very high risk for the development of HCC even if AFP is less than 20 ng/mL or AFP-L3% is less than 10%, which are the most commonly reported cutoff values.

Keywords Alpha-fetoprotein (AFP) · *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP · Hepatic regeneration · Necroinflammatory activity · Hepatocarcinogenesis

Introduction

Serum alpha-fetoprotein (AFP) is a widely used marker for hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. However, serum AFP levels are increased in patients with liver diseases other than HCC, including viral hepatitis [2–4], with a prevalence of 10–42% [2, 5–7]. Increases in AFP are a marker of hepatic regeneration following hepatocyte destruction in viral hepatitis [8]. However, the pathogenesis and clinical significance of this phenomenon remain unclear.

The *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP (AFP-L3%) and des-γ-carboxy prothrombin (DCP) are also markers for HCC [9–12]. Available data suggest that these tumor markers are more highly specific for HCC than AFP alone [9]. However, there are no reports examining the prognostic value of these markers in hepatocarcinogenesis.

T. Kumada (✉) · H. Toyoda · S. Kiriyaama · M. Tanikawa · Y. Hisanaga · A. Kanamori · T. Tada
Department of Gastroenterology,
Ogaki Municipal Hospital, 4-86,
Minaminokawa-cho, Ogaki, Gifu 503-8052, Japan
e-mail: hosp3@omh.ogaki.gifu.jp

J. Tanaka · H. Yoshizawa
Department of Epidemiology,
Infectious Disease Control and Prevention,
Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, Hiroshima, Japan

Results of biochemical tests, including tumor markers, can fluctuate for a given patient and can vary between different patients, and repeated measurements over time may provide a more accurate picture of disease development or progression. The arithmetic mean value is often used to assess biochemical parameters over time, but this value can be greatly affected by the interval between measurements such that a short period of very high values can inappropriately skew the mean. We have previously argued that the average integration value is more meaningful than the arithmetic mean value for the purposes of monitoring disease progression [13, 14].

The aim of this study was to determine the relationship between three tumor markers (AFP, AFP-L3%, and DCP) to better identify hepatitis C virus (HCV) carriers at high risk for the development of HCC. Of note, we used the average integration values of these parameters in our analysis.

Patients, materials, and methods

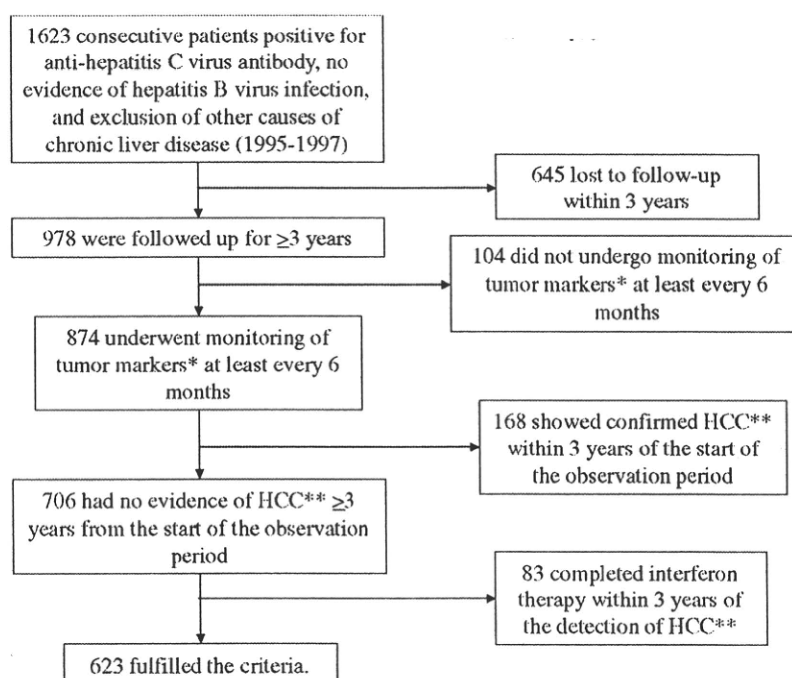
Patient selection

A total of 1623 consecutive patients positive for anti-HCV antibody visiting the Department of Gastroenterology at Ogaki Municipal Hospital during the period January 1995 to December 1997 were considered for enrollment. The present study cohort included the following criteria for enrollment: (1) positive for anti-HCV antibody by second-

or third-generation enzyme-linked immunosorbent assay and detectable HCV RNA for at least 6 months; (2) no evidence of positivity for hepatitis B surface antigen; (3) exclusion of other causes of chronic liver disease (i.e., alcohol consumption lower than 80 g/day, no history of hepatotoxic drug use, and negative tests for autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, hemochromatosis, and Wilson's disease); (4) follow-up period greater than 3 years; (5) measurement of AFP, AFP-L3%, and DCP at least every 6 months; (6) no evidence of HCC for at least 3 years from the start of the observation periods; and (7) interferon (IFN) therapy completed greater than 3 years before the detection of HCC in patients who received IFN therapy. A total of 623 patients fulfilled these criteria (Fig. 1).

Fibrosis was histologically evaluated in 187 of the 623 patients and staged according to Desmet et al. [15] as follows: F0, no fibrosis; F1, mild fibrosis; F2, moderate fibrosis; F3, severe fibrosis; and F4, cirrhosis. The remaining 436 patients were evaluated by ultrasound (US) findings and biochemical tests. The diagnosis of cirrhosis was made according to typical US findings, e.g., superficial nodularity, a coarse parenchymal echo pattern, and signs of portal hypertension (splenomegaly >120 mm, dilated portal vein diameter >12 mm, patent collateral veins, or ascites) [16–18]. In this study patients who did not satisfy these criteria were classified as having chronic hepatitis. Four hundred and sixty-three patients were diagnosed with chronic hepatitis and 160 patients with cirrhosis.

Fig. 1 Schematic flowchart of enrolled patients. *Serum alpha-fetoprotein (AFP), *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP (AFP-L3%), and des- γ -carboxy prothrombin (DCP). **Hepatocellular carcinoma (HCC)



All patients were followed up at our hospital at least twice a year. During each follow-up examination, platelet count, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transpeptidase (γ -GTP), total bilirubin, cholinesterase, alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), albumin, total cholesterol, AFP, AFP-L3%, and DCP were measured. Platelet count and ALT, AST, γ -GTP, total bilirubin, cholinesterase, ALP, LDH, albumin, total cholesterol, AFP, AFP-L3%, and DCP values were expressed as average integration values [13, 14]. Briefly, using ALT as an example, the area of a trapezoid is calculated by multiplying the sum of two ALT values by one-half of the interval between the measurements. This value is then divided by the observation period to obtain the average integration value, and this technique provides a better representation of values over time when there are extremes of high and low values [14, 16]. In patients who developed HCC during the observation period, AFP, AFP-L3%, and DCP values obtained at least 1 year before the diagnosis of HCC were assessed. Serum AFP concentration was determined with a commercially available kit. AFP-L3% was measured by lectin-affinity electrophoresis and antibody-affinity blotting with the AFP Differentiation Kit L (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) [10]. DCP was measured with a DCP reagent (Picolumi PIVKA-II; Eisai, Tokyo, Japan) [11]. Cutoff levels for AFP, AFP-L3%, and DCP were set at 20 ng/mL, 10%, and 40 mAU/mL, respectively, according to previous reports [10–12]. HCV genotype and quantification of HCV RNA (Amplicor 2; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) were determined in 513 cases. All patients underwent imaging modalities (US, computed tomography [CT], or magnetic resonance imaging [MRI]), every 3 months in patients with cirrhosis and every 6 months in patients with chronic hepatitis.

The diagnoses of HCC were confirmed by histologic examination of resected hepatic tumors or US-guided needle biopsy specimens. When biopsy of the tumor was contraindicated, the HCC diagnosis was made using clinical criteria and imaging findings obtained from B-mode US, CT angiography, or MRI [19, 20]. HCC was histologically diagnosed in 46 patients, and in the remaining 74 patients, the diagnosis was made based on clinical criteria [19, 20]. All tumors were 3 cm or less in maximum diameter, and there were 3 nodules or less on diagnosis.

One hundred eighty-nine patients received IFN therapy. Patients were classified into three groups according to the type of response to IFN therapy: sustained virologic response (SVR), defined as the absence of serum HCV RNA at 6 months after IFN therapy; the non-SVR group, defined as the presence of serum HCV RNA at 6 months after IFN therapy; and the no IFN therapy group.

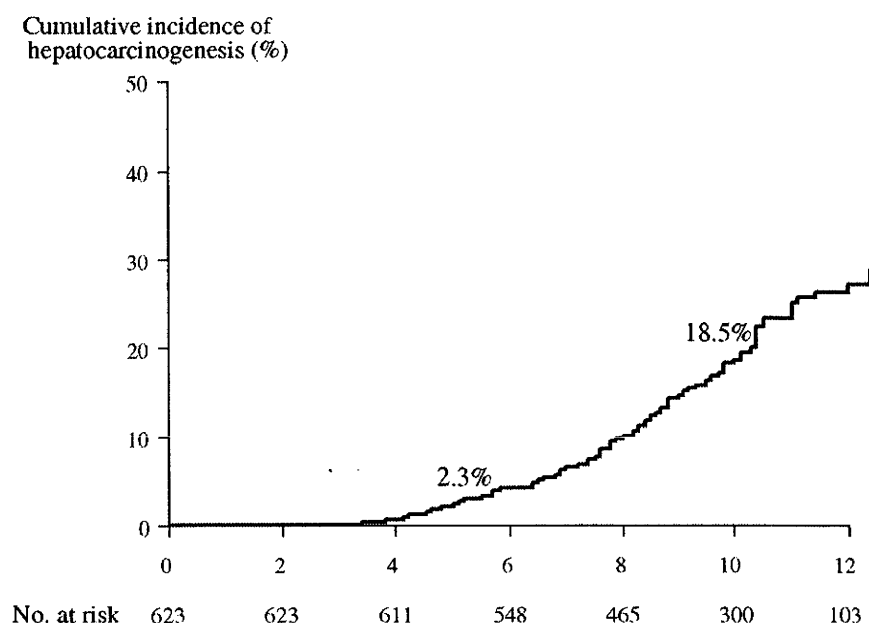
Patients were classified into three groups for each of the tumor markers according to the average integration values of AFP, AFP-L3%, and DCP: A1, <10 ng/mL ($n = 452$); A2, ≥ 10 , <20 ng/mL ($n = 80$); and A3, ≥ 20 ng/mL ($n = 91$); L1, <5% ($n = 588$); L2, ≥ 5 , <10% ($n = 18$); and L3, $\geq 10\%$ ($n = 17$); and D1, <20 mAU/mL ($n = 379$); D2, ≥ 20 , <40 mAU/mL ($n = 170$); and D3, ≥ 40 mAU/mL ($n = 51$), respectively.

The present study ended on 31 December 2008 or the date of identification of HCC occurrence. The median follow-up period was 9.0 years (range 3.0–13.0 years). The total number of blood examinations was 25,721, and the median number of blood examinations was 23 (range 6–105) per subject.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Statistical Program for Social Science (SPSS ver.17.0 for Windows; SPSS Japan, Tokyo, Japan). Continuous variables are shown as medians (ranges). The Mann–Whitney *U*-test was used for continuous variables, and Fisher's exact test was used for categorical variables. Actuarial analysis of the cumulative incidence of hepatocarcinogenesis was performed by the Kaplan–Meier method, and differences were tested by the log-rank test. The Bonferroni correction was performed for multiple comparisons. The Cox proportional hazards model and forward selection method were used to estimate the relative risk of HCC development associated with age (≤ 65 or > 65 years), sex (female or male), body mass index (BMI ≤ 25.0 or > 25.0 kg/m²), HCV genotype (type 1 or type 2), viral concentration (≤ 100 or > 100 KIU/mL), platelet count ($< 12.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ or $\geq 12.0 \times 10^4/\text{mm}^3$), ALT (≤ 35 or > 35 IU/mL), AST (≤ 40 or > 40 IU/mL), total bilirubin (≤ 1.2 or > 1.2 mg/dL), γ -GTP (≤ 56 or > 56 IU/mL), ALP (≤ 338 or > 338 IU/mL), cholinesterase (< 431 or ≥ 431 IU/mL), LDH (≤ 250 or > 250 IU/mL), albumin (< 3.5 or ≥ 3.5 g/dL), total cholesterol (< 130 or ≥ 130 mg/dL), cirrhosis (presence or absence), and IFN treatment (no therapy, non-SVR, or SVR) for univariate and multivariate analyses. We used the lower or upper limit of the reference values at our institute as cutoff values for platelet count, ALT, AST, total bilirubin, γ -GTP, ALP, cholinesterase, LDH, albumin, and total cholesterol levels. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

The study protocol was approved by the Ethics Committee at Ogaki Municipal Hospital in January 2009 and the study was performed in compliance with the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from each patient for analyzing patient records and images.

Fig. 2 Overall cumulative incidence rate of HCC**Table 1** Patient characteristics

Age (years)	61 (26–84)
Sex (F/M)	265/358
BMI (kg/m ²)	22.5 (12.0–34.9)
HCV genotype (type 1/type 2)	356/157
Viral concentration (KIU/mL)	270 (0.5–6300)
AFP (ng/mL)	4.8 (0.8–341.5)
AFP-L3 (%)	0.1 (0.0–32.5)
DCP (mAU/mL)	18.1 (8.5–99.6)
Platelets ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	14.8 (3.0–33.9)
ALT (IU/L)	46.4 (10.1–340.4)
AST (IU/L)	48.5 (13.3–168.9)
γ -GTP (IU/L)	37.6 (9.9–2207)
Total bilirubin (mg/dL)	0.6 (0.2–2.7)
ALP (IU/L)	276.4 (86.8–845.5)
Cholinesterase (IU/L)	242.9 (38.8–545.30)
LDH (IU/L)	196.4 (118.4–650.1)
Albumin (g/dL)	4.0 (2.4–4.9)
Total cholesterol (mg/dL)	155.8 (77.9–264.1)
Fibrosis (F0/F1/F2/F3/F4) ^a	32/73/56/24/2
Cirrhosis (present/absent)	160/463
IFN therapy (none/non-SVR/SVR)	434/146/43

Continuous variables are quoted as medians (ranges)

BMI body mass index, HCV hepatitis C virus, AFP alpha-fetoprotein, AFP-L3 *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP, DCP des- γ -carboxy prothrombin, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, GTP gamma glutamyl transpeptidase, ALP alkaline phosphatase, LDH lactate dehydrogenase, IFN interferon, SVR sustained virologic response

^a Staging of chronic hepatitis according to Desmet et al. [15]

Results

HCC developed in 120 (19.3%) of the 623 patients. The 5- and 10-year cumulative incidences of HCC were 2.3 and 18.5%, respectively (Fig. 2). Demographic and medical data for the 623 patients are summarized in Table 1.

Factors associated with the incidence of hepatic carcinogenesis on univariate analysis

Factors associated with the incidence of HCC are listed in Table 2. Age ≥ 65 years, high AFP level, high AFP-L3% level, high DCP level, low platelet count, high ALT level, high AST level, high LDH level, high ALP level, low cholinesterase level, low albumin level, presence of cirrhosis, and response to IFN therapy were significantly associated with the development of HCC on univariate analysis.

The 5-, 7-, and 10-year cumulative incidences of HCC were 1.1, 2.1, and 7.5% in group A1; 2.6, 9.6, and 42.1% in group A2; and 6.6, 18.3, and 50.0% in group A3, respectively, and the cumulative incidence of HCC differed significantly between groups A1 and A2 and groups A1 and A3 (Fig. 3). The 5-, 7-, and 10-year cumulative incidences of HCC were 1.4, 4.6, and 15.6% in group L1; 19.6, 39.7, and 73.6% in group L2; and 12.5, 25.0, and 56.7% in group L3, respectively, and the cumulative incidence of HCC differed significantly between groups L1 and L2 and groups L1 and L3 (Fig. 4). The 5-, 7-, and 10-year cumulative incidences of HCC were 0.5, 4.6, and

Table 2 Factors associated with hepatocarcinogenesis (univariate analysis)

	Crude hazard ratio (95% CI)	P
Age (years)		
≤65	1	
>65	2.318 (1.580–3.400)	<0.001
AFP (ng/mL)		
A1; <10	1	
A2; ≥10, <20	6.061 (3.768–9.750)	<0.001
A3; ≥20	8.985 (5.874–13.744)	<0.001
AFP-L3 (%)		
L1; <5	1	
L2; ≥5, <10	8.032 (4.388–14.700)	<0.001
L3; ≥10	3.781 (1.838–7.778)	<0.001
DCP (mAU/mL)		
D1; <20	1	
D2; ≥20, <40	1.209 (0.788–1.855)	0.385
D3; ≥40	4.535 (2.840–7.241)	<0.001
Platelets ($\times 10^4/\text{mm}^3$)		
≥12.0	1	
<12.0	5.887 (3.982–8.702)	<0.001
ALT (IU/L)		
≤35	1	
>35	2.632 (1.574–4.400)	<0.001
AST (IU/L)		
≤40	1	
>40	8.120 (4.115–16.024)	<0.001
LDH (IU/L)		
≤250	1	
>250	1.970 (1.249–3.106)	<0.001
ALP (IU/L)		
≤338	1	
>338	2.509 (1.724–3.650)	<0.001
Cholinesterase (IU/L)		
>431	1	
≤431	3.288 (2.209–4.893)	<0.001
Albumin (g/dL)		
≥3.5	1	
<3.5	3.948 (2.635–5.917)	<0.001
Cirrhosis		
Absent	1	
Present	3.474 (2.413–5.002)	<0.001
IFN therapy		
No therapy	1	
Non-SVR	0.312 (0.180–0.539)	<0.001
SVR	0.215 (0.075–0.620)	0.004

Continuous variables are quoted as medians (ranges)

CI confidence interval, AFP alpha-fetoprotein, AFP-L3 *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP, DCP des-γ-carboxy prothrombin, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, LDH lactate dehydrogenase, ALP alkaline phosphatase, IFN interferon, SVR sustained virologic response

14.8% in group D1; 1.8, 4.3, and 16.3% in group D2; and 10.0, 25.0, and 48.2% in group D3, respectively, and the cumulative incidence of HCC differed significantly

between groups D1 and D3 and groups D2 and D3 (Fig. 5).

Factors associated with the incidence of hepatic carcinogenesis on multivariate analysis

Factors associated with the incidence of HCC as analyzed by the Cox proportional hazards model and the forward selection method are listed in Table 3. Age >65 years, low platelet count, high AST level, high AFP level, and high AFP-L3% level were significantly associated with the incidence of HCC. Factors associated with the incidence of HCC were analyzed in patients with chronic hepatitis and cirrhosis (Table 4). High age, low platelet count, high AST level, and high AFP level were significantly associated with the incidence of HCC in chronic hepatitis, and male sex, high age, low platelet count, high AFP level, and high AFP-L3% level were significantly associated with the incidence of HCC in cirrhosis. Factors associated with the incidence of HCC were analyzed in patients with and without IFN treatment (Table 5). Male sex, low platelet count, low cholinesterase level, and high AFP level were significantly associated with the incidence of HCC in patients with IFN therapy and male sex, high age, low platelet count, high AFP level, and high AFP-L3% level were significantly associated with the incidence of HCC in patients without IFN therapy.

Discussion

Advances in US, CT, and MRI have allowed for the more frequent and earlier detection of small HCC tumors less than 2 cm in diameter during the routine follow-up of patients with chronic liver disease [21–23]. However, the performance and resolution of the imaging device, the skills of individual operators, and the diagnostic acumen of the interpreting radiologist all affect the early detection of HCC. AFP, AFP-L3%, and DCP levels have been used as prognostic markers rather than diagnostic markers for HCC [9]. However, the detection rate of small HCC tumors with these markers is low; AFP-L3% and DCP have low sensitivity, and AFP has low specificity. Sassa et al. [12] reported detection rates of 22.6 and 48.4% for AFP-L3% and DCP, respectively, in patients with small HCC tumors. It is currently thought that serum markers are useful for follow-up after HCC therapy in patients with high tumor marker levels before treatment [24].

We have previously reported that the average integration value of ALT correlates with the cumulative incidence of hepatocarcinogenesis, even within the normal range [13, 14]. In the present study, the average integration value of AFP was not selected as a factor associated with the

Fig. 3 Incidence of HCC according to the average integration value of AFP. The cumulative incidence of HCC differed significantly between groups A1 (<10 ng/mL) and A2 (≥ 10 , <20 ng/mL) and groups A1 and A3 (≥ 20 ng/mL)

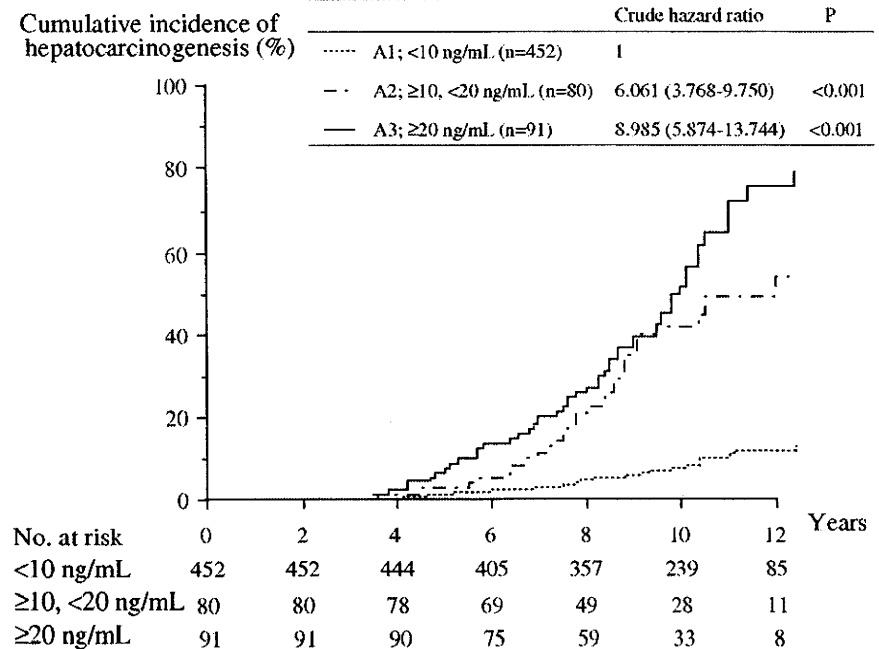
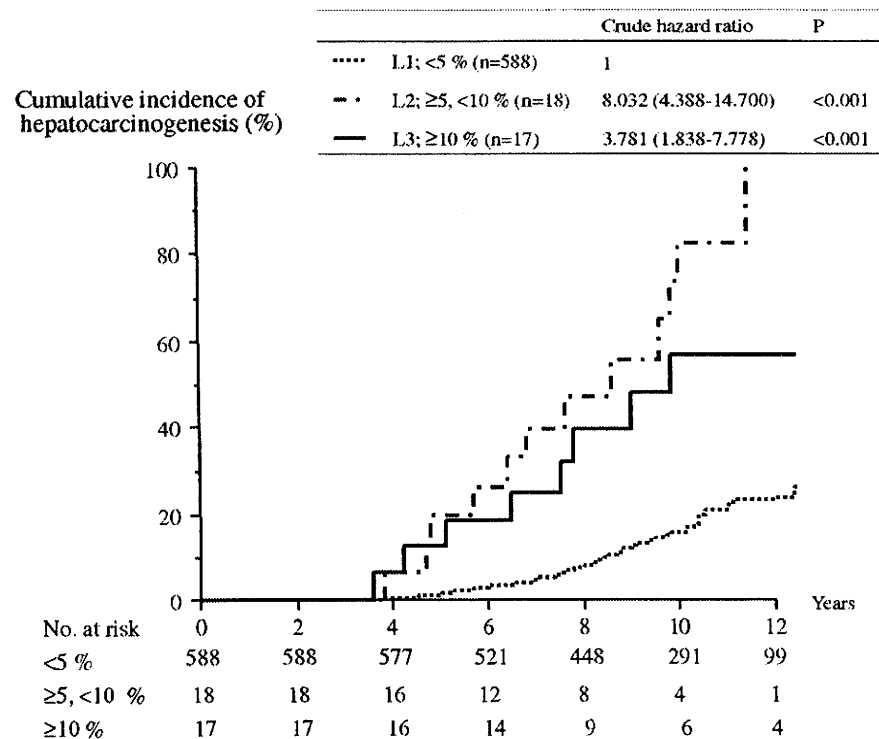


Fig. 4 Incidence of HCC according to the average integration value of AFP-L3%. The cumulative incidence of HCC differed significantly between groups L1 (<5%) and L2 (≥ 5 , <10%) and groups L1 and L3 ($\geq 10\%$)



incidence of HCC on multivariate analysis. AFP production is thought to be increased in response to injury, possibly due to increased hepatocyte turnover, in patients with HCV who do not have HCC [25]. In contrast, increased ALT levels are correlated with hepatocellular necrosis but not with hepatocyte proliferation. This difference may at

least partially explain the absence of correlation between ALT and AFP levels.

The multivariate analysis in our series was carried out to minimize the influence of confounding factors, and 5 factors were selected by the forward selection method. Age >65 years, low platelet count, high AST value, high AFP

Fig. 5 Incidence of HCC according to the average integration value of DCP. The cumulative incidence of HCC differed significantly between groups D1 (<20 mAU/mL) and D3 (≥40 mAU/mL) and groups D2 (≥20, <40 mAU/mL) and groups D2 and D3

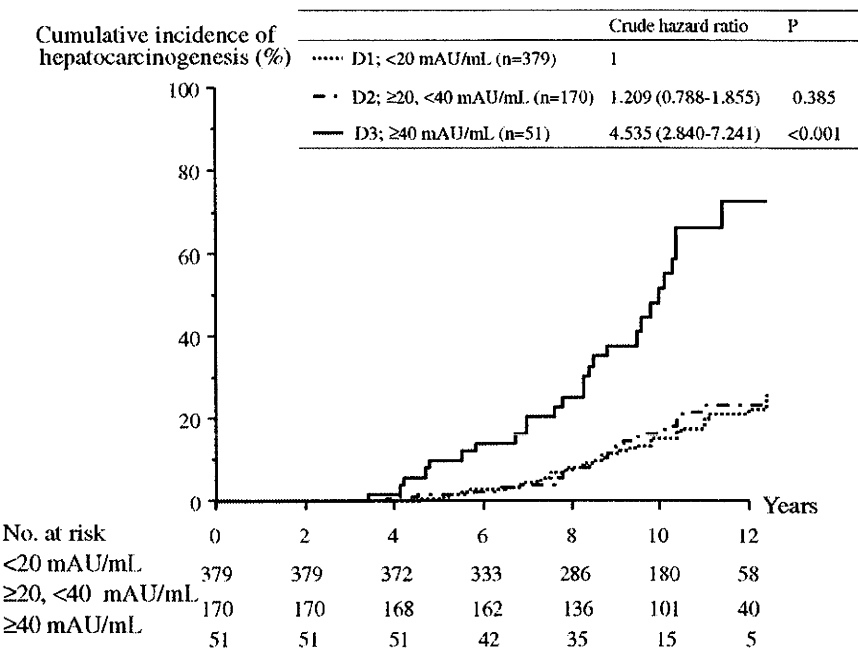


Table 3 Factors associated with hepatocarcinogenesis (multivariate analysis)

	Adjusted hazard ratio (95% CI)	P
Age (years)		
≤65	1	
>65	2.303 (1.551–3.418)	<0.001
Platelets (×10 ⁴ /mm ³)		
≥12.0	1	
<12.0	3.086 (1.997–4.768)	<0.001
AST (IU/L)		
≤40	1	
>40	3.001 (1.373–6.562)	0.006
AFP (ng/mL)		
A1; <10	1	
A2; ≥10, <20	2.814 (1.686–4.697)	<0.001
A3; ≥20	3.405 (2.087–5.557)	<0.001
AFP-L3 (%)		
L1; <5	1	
L2; ≥5, <10	2.494 (1.291–4.816)	0.007
L3; ≥10	3.555 (1.609–7.858)	0.002

AST aspartate aminotransferase, AFP alpha-fetoprotein, AFP-L3 *Leishman-Donovan* agglutinin-reactive fraction of AFP

level, and high AFP-L3% level were significantly associated with hepatic carcinogenesis in our multivariate analysis, but serum ALT level was not a risk factor for developing HCC. Ikeda et al. [26] reported that the cumulative incidence of HCC increased significantly in cirrhotic patients with an AFP level ≥10 ng/mL compared to those with an AFP level

<10 ng/mL, and the adjusted risk ratio was 15.788 in HCV patients. They speculated that AFP is a marker of disease activity or severity and cellular regeneration, and it acts as a better predictor of HCC with viral etiology of cirrhosis. As an index of hepatic regeneration, the AFP level better represents the risk of hepatic carcinogenesis than an index of liver injury (e.g., ALT level). In addition to AFP, AFP-L3% was identified as a factor predicting the development of HCC, and this is a specific marker for the existence of HCC. Therefore, elevations in AFP-L3% may reflect an occult cancer that is undetectable with current imaging modalities. More intensive surveillance is needed for patients such as those who fulfill the criteria of groups L2 and L3 in our series, although these groups were very small in size. However, similar to other laboratory values, as high AFP-L3% values may be associated with severe liver damage, it is necessary to interpret these values carefully. DCP is well known to be also a specific marker of HCC. DCP is more closely related to tumor size than AFP and AFP-L3% [27]. Therefore, it is thought that these were the reasons that DCP was not selected as a predictive marker for HCC in our multivariate analysis.

Among the other risk factors we identified for the development of HCC, a low platelet count stands out. The platelet count is a useful marker for the diagnosis of cirrhosis [28], and cirrhosis is an established risk factor for HCC in HCV carriers [26, 28–30]. Taken together with our other findings, the low platelet count suggests that HCC develops in patients with progressive or advanced liver disease. We additionally used ultrasound (US) to distinguish cirrhotic patients from non-cirrhotic patients [16–18]. The presence of cirrhosis on US was strongly associated with an increased