

Fig. 3. Cumulative development rate of malignancies other than HCC (A) in total HCV patients treated with IFN therapy and based on the difference of (B) age, (C) smoking index, (D) diabetic state, and (E) mean HbA1c level during follow-up in T2DM patients.

on three factors of age, smoking index, and T2DM for the development of each malignancy other than HCC by using Cox regression analysis. Aging

enhanced carcinogenesis of stomach, colon, lung, prostate, breast, and pancreas with statistical significance. Smoking enhanced lung cancer and colorectal cancer

Table 4. Predictive Factors for Development of Malignancies Other than HCC

Variables	Univariate Analysis		Cox-Regression Analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age, years (per 10)	2.23 (1.88-2.65)	< 0.001	2.19 (1.84-2.62)	<0.001
Sex, male/female	1.06 (0.79-1.40)	0.759		
BMI, ≥22/<22	0.97 (0.75-1.24)	0.767		
T2DM, 1/	2.56 (1.76-3.72)	<0.001	1.70 (1.14-2.53)	0.008
Hypertension, +/-	2.33 (1.70-3.18)	<0.001		
Smoking index, ≥20/<20*	2.74 (2.06-3.65)	<0.001	1.89 (1.41-2.53)	<0.001
TAI, kg, ≥200/<200*	1.77 (1.33-2.37)	<0.001		
AST, IU/L, ≥34/<34	0.89 (0.65-1.20)	0.412		
ALT, IU/L, ≥36/<36	0.98 (0.72-1.34)	0.891		
GGT, IU/L, ≥109/<109	1.26 (0.79-2.01)	0.350		
Albumin, g/dL, <3.9/≥3.9	1.41 (0.90-2.04)	0.145		
Triglyceride, mg/dL, ≥100/<100	1.28 (1.03-1.60)	0.030		
Total cholesterol, mg/dL, <150/≥150	1.10 (0.82-1.46)	0.548		
Platelet count, × 10 ⁴ /mm ³ , <15/≥15	1.39 (1.02-1.91)	0.038		
Histological diagnosis, LC/non-LC	1.77 (1.13-2.75)	0.012		
Combination of ribavirin, +/-	0.66 (0.44-0.97)	0.034		
Type of IFN, α/β	1.05 (0.75-1.47)	0.789		
Total dose of IFN, MU, ≥500/<500	1.31 (0.96-1.77)	0.084		
HCV genotype, 1/2	1.30 (0.80-2.93)	0.432		
HCV RNA, log IU/mL, ≥5/<5	0.89 (0.50-1.23)	0.612		
Efficacy, non-SVR/SVR	0.85 (0.64-1.12)	0.232		

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase.

*Smoking index is defined as packs per day × year. TAI and smoking index indicate the sum before and after first consultation.

Table 5. Impact Based on Age, Smoking Index, and Diabetes for Development of Malignancies Other than HCC

Malignancy	Age, Years (per 10)		Smoking Index, ≥ 20 / <20		Diabetes, +/-	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Gastric cancer (n = 36)	2.48 (1.62-3.78)	<0.001	1.69 (0.83-3.43)	0.146	2.29 (0.95-5.52)	0.065
Colorectal cancer (n = 35)	1.91 (1.28-2.86)	0.002	2.27 (1.13-4.58)	0.022	1.78 (0.68-4.66)	0.240
Lung cancer (n = 20)	2.33 (1.35-4.01)	0.002	2.90 (1.25-6.74)	0.013	1.53 (0.45-5.24)	0.496
Prostatic cancer (n = 16)	2.84 (1.32-6.13)	0.008	1.89 (0.88-3.15)	0.266	0.71 (0.09-5.47)	0.735
Breast cancer (n = 15)	2.86 (1.30-6.29)	0.009	1.29 (0.17-10.19)	0.808	1.20 (0.16-9.39)	0.859
Malignant lymphoma (n = 19)	2.21 (1.26-3.88)	0.006	1.25 (0.44-3.56)	0.671	1.39 (0.32-6.12)	0.663
Pancreatic cancer (n = 12)	3.32 (1.44-7.65)	0.005	1.41 (0.45-4.82)	0.578	3.75 (1.02-13.88)	0.046

with statistical significance. In addition, T2DM enhanced the pancreatic cancer with statistical significance and tended to enhance the gastric cancer.

Discussion

This study describes the development incidence of HCC or malignancies other than HCC after the termination of IFN therapy in HCV patients. Patients at Toranomon Hospital comprised mainly government employees, office workers, and business persons. Most patients were regularly recommended to undergo annual multiphasic health screening examinations. In the present study, patients who had undergone annual multiphasic health screening examinations were enrolled. The strengths of the present study are a prolonged follow-up in the large numbers of patients included.

The present study shows several findings with regard to the development incidence and predictive factors for total malignancies after IFN therapy for HCV patients. First, the 10-year cumulative rates of HCC after IFN therapy was determined to be 7.1% in 3,869 patients with chronic hepatitis and 37.7% in 433 patients with cirrhosis using the Kaplan-Meier method. Our previous studies showed via retrospective analysis that the 10-year cumulative rates of HCC were 12.4% for 456 patients with chronic hepatitis and 53.2% for 349 patients with cirrhosis.^{7,23} Although patient selection bias for IFN treatment versus no treatment had been noted in the previous studies, the results suggest the possibility that IFN therapy reduces the development of HCC in HCV patients. Several historical data in Japan suggest that IFN therapy reduces the development of HCC in HCV patients.²⁴⁻²⁶

Second, HCC occurred with statistical significance when the following characteristics were present: non-SVR, advanced age, cirrhosis, TAI of ≥ 200 kg, male sex, and T2DM. T2DM caused a 1.73-fold enhancement in HCC development. Several authors have

reported an increased risk of HCC among patients with the following characteristics: non-SVR, cirrhosis, male sex, advanced age, and T2DM.²⁴⁻²⁸ Our results show that physicians in charge of aged male patients with non-SVR, advanced fibrosis, TAI of ≥ 200 kg, and T2DM should pay attention to the development of HCC after IFN therapy. In addition, maintaining a mean HbA1c level of $<7.0\%$ during follow-up reduced the development of HCC. This result indicates that stringent control of T2DM is important for protecting the development of HCC.

Third, the development rate of HCC per 1,000 person years was about 1.55 in 1,751 patients with chronic hepatitis at baseline and SVR. In these patients, the risk factors associated with HCC were advanced age, male sex, TAI, and T2DM. We compared the HCC development rate in patients with chronic hepatitis at baseline and SVR to the general population. A total of 5,253 individuals without HCV antibody and hepatitis B surface antigen, who underwent annual multiphasic health screening examinations in our hospital were evaluated as controls. Individuals with either of the following criteria were excluded: (1) illness that could seriously reduce their life expectancy or (2) history of carcinogenesis. They were selected by matching 3:1 with patients who had chronic hepatitis at baseline and SVR for age, sex, T2DM, and follow-up periods. In control individuals, the mean age was 51.7 years; the prevalence (number) of male patients was 61.8% (3,246); the prevalence (number) of T2DM patients was 4.2% (222); the mean follow-up period was 8.0 years. The number of development of HCC in control individuals was only five. This result suggests that the development rate of HCC in patients with chronic hepatitis at baseline and SVR is higher than that in the general population.

Fourth, HCC accounted for 33.3% in SVR patients and 73.6% in non-SVR patients. According to Matsuda et al.,²⁹ the outbreak of malignancies in the Japanese male population was observed in the following order in 2005: gastric cancer 20.4% > colon

cancer 16.0% > lung cancer 15.4% > prostate cancer 10.9% > HCC 7.4%. On the other hand, the outbreak of malignancies in the Japanese female population was observed in the following order in 2005: breast cancer 18.0% > colon cancer 16.2% > gastric cancer 13.6% > lung cancer 9.3% > uterine cancer 6.8%. Our results show that HCC is the most common cause of malignancy, not only in the non-SVR group but also in the SVR group.

Finally, malignancies other than HCC occurred with statistical significance when patients were of advanced age, were smokers, and had T2DM. Our result indicates that smoking enhances lung cancer and colorectal cancer. Many authors have reported that smoking is a direct cause of cancers of the oral cavity, esophagus, stomach, pancreas, larynx, lung, bladder, kidney, and colon.^{30,31} In addition, the present study indicates that T2DM enhances pancreatic cancer with statistical significance and tends to enhance gastric cancer. T2DM showed up to about 1.7-fold increase in development of malignancies other than HCC. A recent meta-analysis of cohort studies have revealed that diabetic patients increase risk of pancreatic cancer, HCC, bladder cancer, non-Hodgkin's lymphoma, colorectal cancer, and breast cancer.³²⁻³⁹

Although the role of T2DM in carcinogenesis remains speculative, the following possible mechanisms have been reported: (1) hyperglycemia increases malignancy risk via increasing oxidative stress and/or activating the rennin-angiotensin system⁴⁰; (2) insulin resistance increases malignancy risk via down-regulation of serine/threonine kinase II to adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway⁴¹; (3) reduced insulin secretion increases malignancy risk via down-regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c with consequent up-regulation of insulin-like growth factor.⁴²

T2DM is increasing dramatically worldwide over the past decades.⁸ It is estimated that about 7 million people are affected by diabetes mellitus in Japan. Approximately 8%-10% of adults in Japan have T2DM. The risk factors associated with T2DM include family history, age, sex, obesity, smoking, physical activity, and HCV.⁴³⁻⁴⁶ In the near future, T2DM will be increasing in HCV-positive patients.

This study is limited in that it was a retrospective cohort trial. Another limitation is that patients were treated with different types of antiviral therapy for different durations. In addition, T2DM patients were treated with different types of drugs during follow-up. Finally, our cohort contains Japanese subjects only. On the other hand, the strengths of the present study are a

long-term follow-up in the large numbers of patients included.

In conclusion, T2DM causes an approximately 1.7-fold enhancement in the development of HCC and malignancies other than HCC after IFN therapy. Additionally, in T2DM patients, maintaining a mean HbA1c level of <7.0% during follow-up reduced the development of HCC.

Acknowledgment: We thanks Thomas Hughes for editorial assistance.

References

1. Kiyosawa K, Furuta S. Review of hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:383-391.
2. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
3. Colombo M, Kuo G, Choo QL, Donato MF, Del Ninno E, Tommasini MA, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989;2:1006-1008.
4. Hasan F, Jeffers LJ, De Medina M, Reddy KR, Parker T, Schiff ER, et al. Hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *HEPATOLOGY* 1990;12:589-591.
5. Kew MC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Hepatitis C virus antibodies in southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1990;335:873-874.
6. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993;328:1797-1801.
7. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *HEPATOLOGY* 1993;18:47-53.
8. Waki K, Noda M, Sasaki S, Matsumura Y, Takahashi Y, Isogawa A, et al.; JPHC Study Group. Alcohol consumption and other risk factors for self-reported diabetes among middle-aged Japanese: a population-based prospective study in the JPHC study cohort I. *Diabet Med* 2005;22:323-331.
9. Yasuda K. Early gastric cancer: diagnosis, treatment techniques and outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:839-845.
10. Van Gossum A. Guidelines for colorectal cancer screening a puzzle of tests and strategies. *Acta Clin Belg* 2010;65:433-436.
11. Currie GP, Kennedy AM, Denison AR. Tools used in the diagnosis and staging of lung cancer: what's old and what's new? *QJM* 2009;102:443-448.
12. Maresh EL, Mah V, Alavi M, Horvath S, Bagryanova L, Liebeskind ES, et al. Differential expression of anterior gradient gene AGR2 in prostate cancer. *BMC Cancer* 2010;10:680.
13. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Eng J Med* 2003;348:1625-1638.
14. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361-1392.
15. Cascinu S, Falconi M, Valentini V, Jelic S; ESMO Guidelines Working Group. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl. 5):v55-v58.
16. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33(Suppl. 1):S62-S69.

17. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *HEPATOLOGY* 1994;19:13-18.
18. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Sheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *HEPATOLOGY* 1994;19:1513-1520.
19. Fleming TR, Harrington DP, O'Brien PC. Designs for group sequential tests. *Control Clin Trials* 1984;5:348-361.
20. Harrington DP, Fleming TR. A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika* 1983;62:205-209.
21. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation for incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
22. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972;34:248-275.
23. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, K Chayama, Y Suzuki, M Kobayashi, et al. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *HEPATOLOGY* 1999;29:1124-1130.
24. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. *HEPATOLOGY* 1998;2:1394-1402.
25. Imai Y, Kawata S, Tamura S, Yabuuchi I, Noda S, Inada M, et al. Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group. *Ann Intern Med* 1998;129:94-99.
26. Yoshida H, Arakawa Y, Sara M, Nishiguchi S, Ya M, Fujiyama S, et al. Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis patients. *Gastroenterology* 2002;123:483-491.
27. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *HEPATOLOGY* 2008;47:1856-1862.
28. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *HEPATOLOGY* 2010;52:518-527.
29. Matsuda T, Marugame T, Kamo KI, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. The Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2005: based on data from 12 population-based cancer registries in the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41:139-147.
30. Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* 1997;17:1-60.
31. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008;300:2765-2778.
32. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A metaanalysis. *JAMA* 1995;273:1605-1609.
33. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369-380.
34. Larsson SC, Orsini N, Brismar K, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 2006;49:2819-2823.
35. Mitri J, Castillo J, Pittas AG. Diabetes and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a metaanalysis of observational studies. *Diabetes Care* 2008;31:2391-2397.
36. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a metaanalysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1679-1687.
37. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am J Clin Nutr* 2007;86:836S-842S.
38. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a metaanalysis. *Int J Cancer* 2007;121:856-862.
39. Hsing AW, Gao Y-T, Chua S, Deng J, Stanczyk FZ. Insulin resistance and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:67-71.
40. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;10:745-759.
41. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:563-575.
42. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-340.
43. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, et al. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *HEPATOLOGY* 2003;38:50-56.
44. Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. *Liver Int* 2008;28:355-362.
45. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, et al. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2009;49:739-744.
46. Thuluvath PJ, John PR. Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:438-441.

<特別寄稿>

核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012

—厚生労働省「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」の報告—

田中 榮司^{1)*} 松本 晶博¹⁾ 鈴木 義之²⁾ 小林万利子²⁾ 田中 靖人³⁾
 新海 登³⁾ 髭 修平⁴⁾ 八橋 弘⁵⁾ 長岡 進矢⁵⁾ 茶山 一彰⁶⁾
 柘植 雅貴⁶⁾ 横須賀 収⁷⁾ 今関 文夫⁷⁾ 西口 修平⁸⁾ 齋藤 正紀⁸⁾
 藤原 圭⁹⁾ 鳥居 信之¹⁰⁾ 平松 直樹¹¹⁾ 狩野 吉康¹²⁾

索引用語： 核酸アナログ薬 治療中止 B型肝炎 肝炎再燃
 HBV cccDNA

はじめに

近年 B 型肝炎の治療に導入された核酸アナログ薬は HBV の増殖を強力に抑制するため、多くの症例で血中 HBV DNA 量は速やかに低下し ALT 値の正常化がもたらされる¹⁾。さらに、組織学的な改善が得られ肝発癌率が低下することや^{2,3)}、経口薬で副作用も少ないことから臨床的に広く使用されている。しかし、核酸アナログ薬を使用してもウイルスを完全に排除することは困難であり、本治療薬には耐性株の出現や治療中止に伴う肝炎の再燃が問題点として残されている⁴⁾。この原因の一つとして、血中の HBV DNA 量が低下しても、HBV

複製の起源となる肝細胞核内の HBV cccDNA 量はほとんど減らず、これが長期に残存することが挙げられている⁵⁾。

B 型肝炎の核酸アナログ薬治療において、同薬の中止はしばしば肝炎の再燃を伴うため、安易な中止はすべきでないとされている。しかし、中止後、いつ頃どの様な形で肝炎が再燃するかは必ずしも明らかにされてはいない。また、中止後に肝炎が再燃しない症例や再燃しても軽度で最終的に安定化する症例も少なからず存在するが、この様な症例を効率よく見分ける方法も確立されていない。

我々は、厚生労働省の科学研究費により「B 型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」(平成 21 年度～23 年度)を行い、治療中止後の経過の特徴や肝炎再燃の定義、さらには再燃率の予測を検討した。本稿では、この研究成果を元に「核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012」をまとめたので報告する (Table I)。本指針は必ずしも核酸アナログ薬の中止を推奨するものではなく、様々な理由により中止を検討する必要がある場合の参考になるよう定めた。

I. 本指針の目指すもの

本指針は、核酸アナログ薬の中止を検討する際に、中止成功の可能性が高い症例や逆に治療を継続すべき症例を明らかにすること、さらに、中止後の経過観察

- 1) 信州大学医学部消化器内科
- 2) 虎の門病院肝臓内科
- 3) 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学
- 4) 北海道大学大学院医学研究科消化器内科
- 5) 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター
- 6) 広島大学大学院分子病態制御内科学
- 7) 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学
- 8) 兵庫医科大学肝胆臓内科
- 9) 名古屋第二赤十字病院消化器内科
- 10) 東京女子医科大学消化器内科
- 11) 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学
- 12) 札幌厚生病院消化器科

*Corresponding author: etanaka@shinshu-u.ac.jp

利益相反申告 横須賀収、田中靖人、西口修平、茶山一彰⇒ Bristol-Myers 株式会社

<受付日2012年2月1日><採択日2012年2月18日>

Table 1 核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012

I. 本指針の目指すもの

B 型慢性肝炎の核酸アナログ薬治療において、同薬の中止により drug free を目指すことは重要な治療目標の一つである。しかし、同薬の中止によりしばしば肝炎が再燃し、時に重症化することがある。このため、中止に際してはその危険性に十分配慮する必要がある。

核酸アナログ薬治療は HBs 抗原の陰性化を目標とするが、必ずしも容易ではない。このため、HBs 抗原が陰性化しなくても治療の中止を考慮する場合がある。本指針は、このような状況下で核酸アナログ薬を中止し、最終的に非活動性キャリアの状態 (ALT < 30 IU/L かつ血中 HBV DNA < 4.0 log copies/ml) に落ち着くことを目標として作成した。

核酸アナログ薬の中止と継続のどちらが生命予後や肝発癌に対して有利かは現在のところ明らかではない。このため、本指針は様々な理由により中止を検討する必要がある場合の参考になるよう定めた。この際、中止成功の可能性が高い症例を見いだすことや逆に治療を継続すべき症例を明らかにすること、さらに、中止後の経過観察の指標を設定することにより、核酸アナログ薬中止に伴うリスクを極力回避することを目指した。

II. 肝炎再燃に伴う重症化のリスクを回避するための必要条件

重症化のリスクをあらかじめ想定し、これを回避するため、以下を中止の必要条件とした。

1. 核酸アナログ薬中止後には肝炎再燃が高頻度に見られ、時に重症化する危険性があることを主治医、患者共に十分理解している。
2. 中止後の経過観察が可能であり、再燃しても適切な対処が可能である。
(専門医が関与することが推奨される。)
3. 肝線維化が軽度で肝予備能が良好であり、肝炎が再燃した場合でも重症化しにくい症例である。
(肝硬変やこれに近い線維化の進行した慢性肝炎の症例では中止すべきでない。)

III. HBV 増殖能の評価と再燃のリスクを低下させるための条件

1. 核酸アナログ薬中止の必要条件

HBV 増殖能が高い症例では中止後の再燃はほぼ必発である。このような症例で中止を行わないことが肝要であり、このための必要条件を以下に示す。

◇中止時、血中 HBV DNA (リアルタイム PCR 法) が陰性。
◇中止時、血中 HBe 抗原が陰性。

2. 核酸アナログ薬治療期間の条件

核酸アナログ薬治療期間が短いと再燃しやすいため、以下の条件を満たすことが望ましい。

◇核酸アナログ薬投与開始後 2 年以上経過している。

3. ウイルス抗原量のスコア化による再燃の危険性の評価

中止の必要条件 (中止時 HBV DNA 陰性かつ HBe 抗原陰性) を満たす症例について、中止時の HBs 抗原量と HB コア関連抗原量をスコア化し、合計スコアから再燃のリスクを以下の 3 群に分けて予測することが可能である。この予測リスクを参考に中止の可否を決定することにより再燃のリスクを低下させることを目指す。

1.9 log IU/ml 未満 (80 IU/ml 未満)	0	3.0 log U/ml 未満	0
1.9 ~ 2.9 log IU/ml (80 ~ 800 IU/ml)	1	3.0 ~ 4.0 log U/ml	1
2.9 log IU/ml 以上 (800 IU/ml 以上)	2	4.0 log U/ml 以上	2

低リスク群	0	30-90%	中止を考慮しても良い群。ただし、低リスク群でも肝炎再燃症例が存在するため、再燃に対する注意は必須である。
中リスク群	1-2	約 50%	状況によって中止を考慮しても良い群。この群では、中止の条件や方法を今後さらに検討する必要がある。
高リスク群	3-4	10-20%	治療の継続が推奨される群。ただし、35 歳未満では中止成功例が比較的高く 30-40% である。

Table 1 核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012

IV. 中止後の経過観察方法と再治療開始の条件

1. 核酸アナログ薬中止後は定期的に HBV DNA (リアルタイム PCR 法) と ALT を測定し、HBV の再増殖とこれに伴う肝炎再燃に注意を払う。
2. 中止後の再燃は、中止直後から 1 年以内が多く、その後徐々に減少し、3 年目以降はまれになる。このため、特に中止直後は再燃に対する注意が必要である。具体的には、中止後 16 週までは 2 週毎、その後は 4 週毎の血液検査による経過観察が望ましい。
3. 中止が成功し、最終的に非活動性キャリア状態に落ち着く症例においても、約 2/3 では一過性の ALT または HBV DNA の異常値が出現する。このため、中止後の経過観察で ALT または HBV DNA の異常値が出現しても、軽度の上昇であれば再治療を行わずに経過をみるのが可能である。ただし、以下の条件では、最終的に非活動性キャリア状態に落ち着く可能性は低く、核酸アナログ薬による再治療を考慮する。

◇中止後 ALT \geq 80 IU/L または HBV DNA \geq 5.8 log copies/ml となる場合

V. 注意点と今後の課題

1. 患者の状況は個々に異なる。また、中止の目的や意義も個々に異なるため、実際に中止するか否かの判断は、これらの条件を考慮し主治医が行う。また、中止を考慮する場合は肝臓専門医に相談することが推奨される。
2. 核酸アナログ薬中止後に肝炎が再燃し再投与した場合、中止しなかった場合と比較し核酸アナログ薬耐性株の出現頻度が増加するか否かについては不明である。
3. HBV キャリアでは非活動性キャリア期 (HBV DNA が 4.0 log copy/ml 未満かつ ALT が 30 IU/L 未満) となってもまれに肝炎の再燃がみられるので、中止に成功してもキャリアとしての経過観察は継続する必要がある。また、肝発痛に関しても同様に経過観察が必要である。
4. 今後の検討課題としては、核酸アナログ薬中止基準の精度をさらに高めること、本指針で用いた基準を前向き検討で検証すること、インターフェロン併用によるシークエンシャル療法で核酸アナログ薬を積極的に中止しようとする方法の検討などが挙げられる。

の指標を設定することにより、核酸アナログ薬中止に伴うリスクを極力回避することを目指して作成した (Table 1-I)。ここでの中止成功は、最終的に非活動性キャリアの状態、すなわち ALT が 30 IU/L 未満かつ血中 HBV DNA が 4.0 log copies/ml 未満に落ち着くこととした。この基準は日本の B 型慢性肝炎治療ガイドラインに準拠して設定したが、このような非活動性キャリア状態になると肝病変の進行はなく発癌率も低下することが知られており⁶⁷⁾、適切なものと考えられる。

II. 肝炎再燃に伴う重症化のリスクを回避するための必要条件

現状では、核酸アナログ薬中止後の肝炎再燃を十分な確率で予測することはできない。このため、重症化の危険性⁶⁸⁾が存在することを想定し、重症化防止のための必要条件を設定した (Table 1-II)。肝炎再燃や重症化の危険性を主治医と患者が共に理解していること、さらに、中止後の経過観察体制があり、再燃しても適切な対処が可能であることは当然の条件と考えられる。また、肝硬変やこれに近い線維化の進行した慢性肝炎症例では重症化しやすいこと、さらには将来的に発癌

の危険性が高いことを考慮すると、現状では安易に中止すべきでないと判断した。

III. HBV 増殖能の評価と再燃のリスクを低下させるための条件

これまででも、核酸アナログ薬中止時に HBV DNA が十分低下しない症例または HBe 抗原陽性の症例では中止後に肝炎が高率再燃することが経験されていたが、本研究班の検討でもこれが科学的に確認された⁹⁾。肝炎再燃を予測する HBV DNA 量の cut-off 値は ROC 解析で 3.0 log copies/ml であり、これ以上の症例ではほとんど全例が 1 年以内に再燃したのに対し、3.0 log copies/ml 未満の症例では長期に安定化する症例が 30% 近く存在した。さらに、HBV DNA 量が 3.0 log copies/ml 未満の症例に限った場合、HBe 抗原陽性例は 1 年以内に 90% 以上が再燃したのに対し、HBe 抗原陰性例では長期に安定化する症例が少なからず存在した。この結果から、HBV DNA 量の十分な低下と HBe 抗原の陰性化は中止の必要条件として設定した。ここで、HBV DNA 量の十分な低下の基準値については、実際の指針では 3.0 log copies/ml 未満ではなく、安全を考慮してリアルタイム

PCR 法で陰性であることとした。

明らかに中止後の肝炎再燃が予測される症例、すなわち、核酸アナログ薬中止時に HBV DNA 量が 3.0 log copies/ml 以上または HBe 抗原陽性の症例を除いて中止後の肝炎再燃と関連する因子をさらに解析すると、核酸アナログ薬治療期間、中止時 HBs 抗原量、中止時 HB コア関連抗原量が有意な因子として算出された⁹⁾。治療期間の cut-off 値は 16 カ月と算出されたため、本指針では余裕をもって 2 年以上経過していることが望ましいとの条件を設定した。

中止時の HBs 抗原量と HB コア関連抗原量については、ROC 解析の結果からそれぞれ 2 つの cut-off 値の存在が示唆され、HBs 抗原量は 1.9 と 2.9 log IU/ml、HB コア関連抗原量は 3.0 と 4.0 log U/ml であった⁹⁾。この事から、Table 1-III に示す如く HBs 抗原量と HB コア関連抗原量をスコア化し、総スコアから低リスク群、中リスク群、高リスク群の 3 群を設定した。それぞれの予測成功率は低リスク群が 80~90%、中リスク群が約 50%、高リスク群が 10~20% であった。各群の中で肝炎再燃と関連する因子をさらに検討すると、低リスク群と中リスク群では新しい因子はなかったが、高リスク群では年齢が有意な因子であった。すなわち、予測成功率が 10~20% と低い高リスク群であっても、年齢が 35 歳未満ではこの成功率がやや高く 30~40% であった。

以上の如く、治療期間やウイルスマーカーの結果から核酸アナログ薬中止後の経過を予測することが可能であり、治療中止を計画する際の指標となると考えられた。近年、HBs 抗原量の測定は新しいマーカーとして注目されており、インターフェロン治療効果の予測などに有用なことが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。一方、HB コア関連抗原量は核酸アナログ薬使用下においても肝細胞核内の HBV cccDNA 量を反映することが報告され¹²⁾¹³⁾、この量が中止後の肝炎再燃と関連することはこれまでも報告されていた¹⁵⁾¹⁶⁾。今回、これらの抗原量の組み合わせが中止の指針作成に有用であった点は興味深い⁹⁾。

IV. 中止後の経過観察方法と再治療開始の条件

核酸アナログ薬中止後の経過観察は、定期的に HBV DNA 量 (リアルタイム PCR 法) と ALT 値を測定することにより行う。中止後の再燃は、中止直後から 1 年以内が多く、その後徐々に減少し、3 年目以降はまれになることが今回の研究で明らかになった⁹⁾。このため、

特に中止直後は再燃に対する注意が必要であると判断した。具体的には、中止後 16 週までは 2 週毎、その後は 4 週毎の血液検査による経過観察が望ましいとした。

肝炎再燃をどのように定義し、中止後の経過観察をどのように行うかは本指針の要点の一つである。最終的に非活動性キャリア状態に落ち着く症例においても、約 2/3 では一過性の ALT または HBV DNA の異常値が出現する。このため、中止後の経過観察で ALT または HBV DNA の異常値が出現しても、軽度の上昇であれば再治療を行わずに経過をみるのが可能である。しかし、どこまでなら経過をみて良いのかの基準はこれまで明らかにされていない。この点を明らかにするため我々は、核酸アナログ薬中止後の ALT 値と HBV DNA 量の推移を平均値と最高値で評価した。この結果、両者とも平均値と最高値の間にきわめて強い相関があることが明らかになった⁹⁾。ROC 解析の結果より、平均 ALT 値の 30 IU/L は最高 ALT 値の 79 IU/L に、一方、平均 HBV DNA 量の 4.0 log copies/ml は最高 HBV DNA 量の 5.7 log copies/ml に相当することが明らかになった。すなわち、中止後に ALT 値が 80 IU/L 以上になる場合は平均値が 30 IU/L を超える可能性が高く、最終的に中止成功の基準を満足しないことが予測される。同様に、中止後の HBV DNA 量が 5.8 log copies/ml 以上となる場合は平均値が 4.0 log copies/ml を超える可能性が高く、中止成功の基準を満足しないことが予測される。これらの結果より、中止後に ALT 値が 80 IU/L 以上、または HBV DNA 量が 5.8 log copies/ml 以上となる場合は最終的に非活動性キャリア状態に落ち着く可能性は低く、核酸アナログ薬による再治療を考慮するとする条件を設けた。この条件設定により、より効率的で具体的な中止が可能になると考えられる。安全を考慮し、主治医の判断でこの基準をより厳しく設定することは可能である。逆に、この基準を緩く設定することも可能であるが、その場合は漫然と経過観察は行わず、何らかの方針を立てて対処することが望ましい。

V. 注意点と今後の課題

核酸アナログ薬中止の指針についてはこれまで包括的なものではなく、その意味で本指針は初めてのものとも言える。しかし、多くは後向きな検討データを基に作成したものであり、まだ不明な点も多く残されている。そのため、注意点や今後の課題を一つの項目としてまとめた (Table 1-V)。本指針では核酸アナログ薬の中止に関する判断材料を提供したが、実際に中止す

るかは否かの判断は主治医が行うべきと考える。それは、核酸アナログ薬を継続した場合と中止した場合の長期の予後が必ずしも明らかになっていないことが大きな要因であり、患者の希望と主治医の判断が優先されると考えられる。

中止が成功しなかった場合、核酸アナログ薬を再投与することが選択肢の一つとなる。しかし、この場合、継続投与した場合と比較して耐性株出現率が高くなるか否かについては明らかになっておらず、この点は患者に同意を得ておく必要があると考えられる。

今後の検討課題としては、中止後の肝炎再燃の予測精度を向上させることが一つである。このためには新しい因子の検討が必要であり、候補としては、より高感度な HBV DNA 量の測定、HBV RNA 量の測定¹⁷⁾¹⁸⁾、HBV 遺伝子型、HBV 遺伝子変異の検出などが挙げられている。また、今回の指針は後ろ向き研究で作成された基準であり、今後、前向き検討でこれを検証する必要がある。さらに、インターフェロン併用によるシーケンシャル治療で核酸アナログ薬を積極的に中止しようとする方法も今後の重要な検討課題と考えられる。

おわりに

核酸アナログ薬が日本で使用可能になって12年目になるが、本格的な中止の指針作成は今回が最初である。難しい課題であるが、第一歩を踏み出さないことにはその次はない。すなわち、本指針はまだ十分とは言えないが、少なくとも、今後より良いものを作るための出発点になることが期待される。

謝辞：本指針の作成は、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（平成21年度～23年度）の助成金により行った。

文 献

- 1) Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132: 1574—1585
- 2) Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521—1531
- 3) Matsumoto A, Tanaka E, Rokuhara A, et al. Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: A multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatology* 2005; 32: 173—184
- 4) Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254—265
- 5) Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750—1758
- 6) Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678—686
- 7) Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65—73
- 8) Lim SG, Wai CT, Rajnakova A, et al. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut* 2002; 51: 597—599
- 9) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, et al. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012; 42: 139—149
- 10) Chan HL, Wong VW, Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462—1468
- 11) Moucari R, Lada O, Marcellin P. Chronic hepatitis B: back to the future with HBsAg. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 633—636
- 12) Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2009; 81: 27—33
- 13) Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa E, et al. Hepatitis B core-related antigen assay is useful for monitoring the antiviral effects of nucleoside analogue therapy. *Intervirology* 2008; 51(suppl 1): 3—6
- 14) Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, et al. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol* 2007;

- 45: 3942—3947
- 15) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, et al. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepato Res* 2007; 37: 661—666
- 16) Shinkai N, Tanaka Y, Orito E, et al. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen as predicting factor for relapse after cessation of lamivudine therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Hepato Res* 2006; 36: 272—276
- 17) Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, et al. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. *J Gastroenterol* 2006; 41: 785—790
- 18) Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga H, et al. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007; 45: 1179—1186

Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B (2012)

Eiji Tanaka^{1)*}, Akihiro Matsumoto¹⁾, Yoshiyuki Suzuki²⁾, Mariko Kobayashi²⁾, Yasuhito Tanaka³⁾, Noboru Shinkai³⁾, Shuhei Hige⁴⁾, Hiroshi Yatsuhashi⁵⁾, Shinya Nagaoka⁵⁾, Kazuaki Chayama⁶⁾, Masataka Tsuge⁶⁾, Osamu Yokosuka⁷⁾, Fumio Imazeki⁷⁾, Shuhei Nishiguchi⁸⁾, Masaki Saito⁹⁾, Kei Fujiwara⁹⁾, Nobuyuki Torii¹⁰⁾, Naoki Hiramatsu¹¹⁾, Yoshiyasu Karino¹²⁾

Key words: nucleos(t)ide analogue discontinuation of treatment hepatitis B
hepatitis relapse HBV cccDNA

Kanzo 2012; 53: 237—242

- 1) Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine
- 2) Department of Hepatology, Toranomon Hospital
- 3) Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
- 4) Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University
- 5) The Clinical Research Center, NHO Nagasaki Medical Center
- 6) Programs for Biomedical Research, Division of Frontier Medical Science, Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University
- 7) Department of Medicine and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Chiba University
- 8) Division of Hepatobiliary and Pancreatic Diseases, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine
- 9) Gastroenterology Section, Nagoya Daini Red Cross Hospital
- 10) Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Tokyo Women's Medical University
- 11) Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine
- 12) Department of Gastroenterology, Sapporo Kosei General Hospital

*Corresponding author: etanaka@shinshu-u.ac.jp

<短 報>

ミリプラチン動注化学療法を併用したラジオ波凝固療法

今井 則博*	池田 健次	瀬古 裕也	原 祐
大野 敦司	松本 直樹	川村 祐介	保坂 哲也
小林 正宏	斎藤 聡	瀬崎ひとみ	芥田 憲夫
鈴木 文孝	鈴木 義之	荒瀬 康司	熊田 博光

緒言：これまでに肝細胞癌に対するラジオ波凝固療法（以下 RFA）の壊死巣の拡大のため、肝動脈バルーン閉塞併用、肝動脈化学塞栓術併用での RFA が開発されている。腫瘍、非腫瘍部の動脈血流を遮断する事により、血流による冷却効果を減弱し、より大きな壊死巣が得られるとされている^{1)~3)}。

第三世代白金製剤であるミリプラチンは肝動注により、腫瘍へのリピオドールの滞留と共に抗腫瘍効果を示すため、RFA 前に併用する事により、局所において腫瘍の残存する可能性を減らし、局所再発率を減少できうと考えられる。またリピオドールの動注により、動脈血流が一時的に遮断される為、血流による冷却効果が減弱し、より大きな壊死巣が得られると考えられる。

今回我々は、肝細胞癌に対してミリプラチン肝動注を併用し RFA を施行した症例を対象として、院内研究審査委員会での承認を受け、Retrospective にその有効性を検討した。

対象と方法：2010年1月より2012年1月の間、当院にて肝細胞癌に対してミリプラチン肝動注を併用し RFA を施行した11例（男性6例、女性5例）を対象とした。年齢（中央値）は77歳（59-84歳）、Child-Pughは5点：10例、6点：1例、Stage I：1例、Stage II：8例、Stage III：2例、腫瘍径（中央値）は24mm（14-43mm）、腫瘍数は単発8例、多発3例、55%（6例/11例）は再治療例であった。全症例において十分なインフォームドコンセント、書面での同意の元、ミリプラチン肝動注を併用し RFA を施行した。

治療方法として、血管造影にて標的病変の栄養血管を同定し、マイクロカテーテルを挿入。超音波ガイド下に RFA 電極を穿刺後、マイクロカテーテルよりミリプラチンを動注し、栄養血管での動脈血流の停滞が得られていることが確認出来る時点までミリプラチン動注を施行した。動注直後より RFA 凝固を施行した（Fig.）。

ミリプラチン投与量（中央値）は60mg（20-60mg）、リピオドール投与量（中央値）は3ml（1-3ml）であった。RFA 電極には展開針を用いた。Boston Scientific社 LeVeen Super slim ニードル[®] 3.0cm 3例、Angio Dynamics社 RITA Starburst[®] model 70（3cm）6例、model 90（5cm）2例であり、凝固方法として LeVeen 針は4段階展開にて、RITA 針は model 70 では2段階展開、model 90 では4段階展開にて凝固を施行した。治療効果として治療1週間後のダイナミック CT において壊死巣を評価し、以後3-4カ月毎に局所再発、他部位再発の評価を行った。

結果：（1）全症例において一回の RFA にて標的病変に対しての十分な margin を伴う類円形の壊死巣が得られた（Table）。壊死巣の最大直径中央値は42mm（35-80mm）であり、最小直径中央値は34mm（32-60mm）であった。電極の最大展開直径と比較し最大直径で1.4倍（中央値）、最小直径で1.1倍（中央値）の壊死巣拡大が得られた。また腫瘍へのリピオドール沈着により margin の評価が容易であった。

（2）治療後の観察期間（中央値）は12カ月（3-25）であり、観察期間中に RFA 部位の局所再発を認めなかった。11例中3例に他部位での再発を認めたが、RFA 部位と同重区域での再発は認められなかった。

（3）全症例において重篤な副作用を認めず、追加治療、入院期間の延長を要する腹水増加、肝不全を認めなかった。治療前、治療1月後の Child-Pugh スコアにも変化を認めなかった。また再治療のため血管造影を

虎の門病院肝臓センター

*Corresponding author: norihiro.imai@gmail.com

利益相反申告 熊田博光、池田健次⇒大日本住友製薬（株）

<受付日2012年3月13日><採択日2012年4月5日>

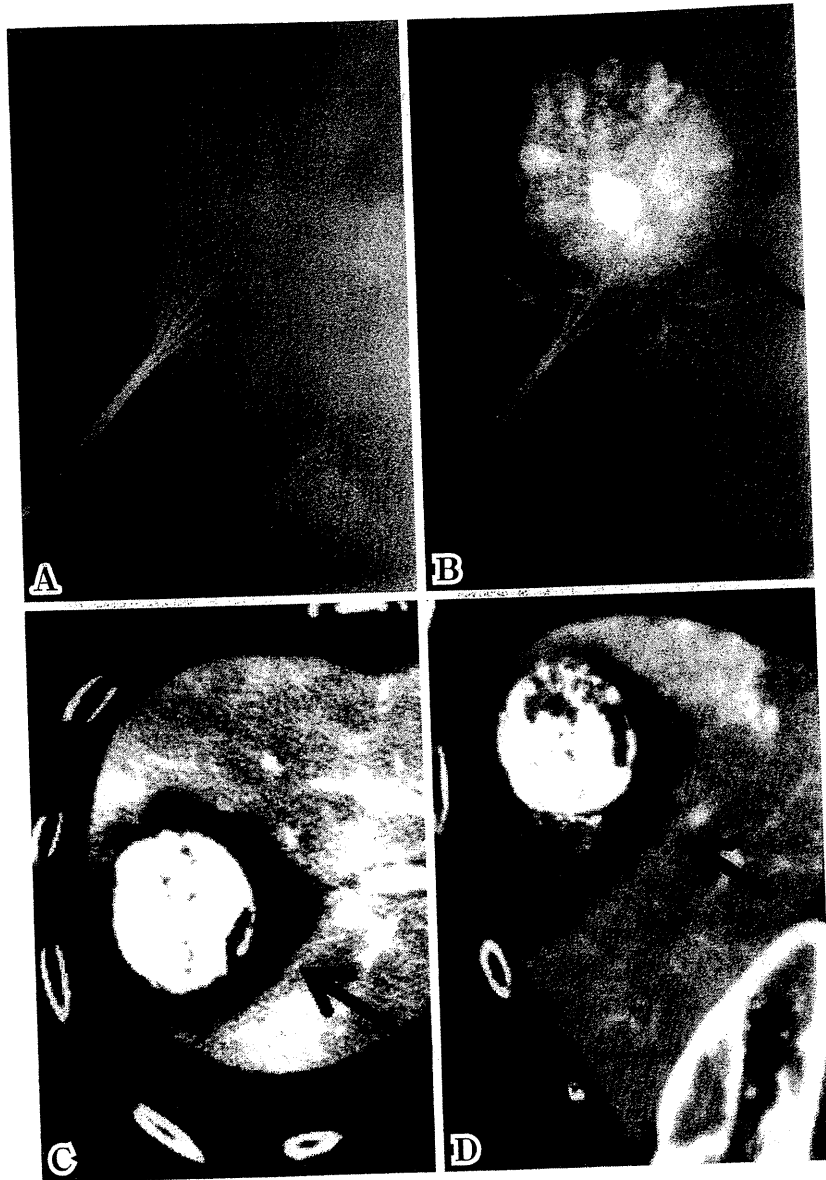


Fig. Patient No. 10

Immediately after transcatheter arterial chemotherapy using miriplatin 60 mg/lipiodol 3 ml from right hepatic artery, we performed radiofrequency ablation using RITA starburst model 90 (5 cm). (A, B) The greatest long-axis and short-axis dimensions of the area coagulated after the combination therapy were 80 mm and 60 mm, respectively. (C, D)

行った3例では動脈狭窄、動脈閉塞、動脈門脈シャント形成、肝葉萎縮などの血管障害を認めなかった。

考察：RFAは、経皮的・局所麻酔下の非侵襲治療であり、治療においては標的病変の全周囲に5mm以上の安全域を確保する事が望ましいとされている。実臨床においては1回のRFAでは十分な壊死巣が得られず、追加治療が必要になる症例が少なくない。その原因と

して壊死範囲の予測が難しく、不整形で小さな壊死範囲となってしまうことが考えられている。一度のRFAで、丸く大きな壊死巣が得られると、在院日数・経済的負担の軽減につながり、身体的侵襲の増加にともなう個人の苦痛が減少すると考えられる。

ミリプラチンは脂溶性白金製剤として白金成分の徐放性と共に、全身循環への移行が微量である事が示されており、血管障害の副作用を認めず、投与による重

Table Profiles of patients treated with transcatheter arterial infusion chemotherapy using Miriplatin and radiofrequency ablation

Patient No.	Gender	Age (years)	Site	Size (mm)	RFA Device	Miriplatin dosage (mg/ml)	Injection artery	Child-Pugh score (before/after)	Diameter of necrotic area (mm)	Local recurrence (month)	Same subsegment recurrence (month)	Other recurrence (month)
1	Male	59	S3	21	Super slim 30	40/2	PHA	5/5	35*32	-	-	-
2	Male	60	S8	14	Super slim 30	60/3	RHA	5/5	39*33	-	-	-
3	Female	74	S4	22	Super slim 30	60/3	RHA	5/5	36*30	-	-	+
4	Male	81	S8	28	RITA Model 70	60/3	RHA	5/5	44*38	-	-	-
5	Female	84	S8	25	RITA Model 70	40/2	RHA	5/5	42*38	-	-	+
6	Male	65	S6	20	RITA Model 70	60/3	RHA	5/5	38*34	-	-	-
7	Female	77	S8	24	RITA Model 70	20/1	RHA	5/5	42*32	-	-	-
8	Female	75	S8	25	RITA Model 70	60/3	RHA	5/5	45*44	-	-	-
9	Male	78	S6	22	RITA Model 70	24/1.2	RHA	5/5	50*34	-	-	-
10	Female	80	S8	43	RITA Model 90	60/3	RHA	5/5	80*60	-	-	+
11	Male	82	S7	35	RITA Model 90	60/3	RHA	6/6	58*48	-	-	-

Super slim 30; Boston Scientific LeVeon Super slim needle[®] 3.0 cm

RITA Model 70, Model 90; Angio Dynamics RITA Starburst needle[®] model 70 (3.0 cm), model 90 (5 cm)

Child-Pugh score were measured before and 1 month after combination therapy.

篤な副作用は少ないとされているが⁴⁾⁵⁾、局所治療との併用効果についての報告はない。今回の検討において、凝固域は類円形に最大直径で約 1.4 倍、最小直径で約 1.1 倍の凝固域拡大が得られており、ミリプラチン動注による動脈血流の遮断効果と考えられた。治療効果の評価においては、腫瘍へのリピオドール貯留により、壊死範囲と腫瘍の境界が明瞭となり、術後の安全域の評価が容易となると考えられる。また観察期間中に同亜区域内の再発を認めず、ミリプラチン動注により微小な娘結節への抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

RFA にミリプラチン肝動注を併用する事により、一回の治療で良好な壊死範囲が得られ、局所治療効果を高め再発を減らす事ができると考えられる。

索引用語：ミリプラチン、肝細胞癌、ラジオ波凝固療法

文献：1) Yamasaki T, Kurokawa F, Shirahashi H, et al. Cancer 2002; 95: 2353—2360 2) De Baere T, Bessoud B, Dromain C, et al. Am J Roentgenol 2002; 178: 53—59 3) Kobayashi M, Ikeda K, Kawamura Y, et al. Liver Int 2007; 27 (3): 353—359 4) Okusaka T, Okada S, Nakanishi T, et al. New Drugs 2004; 22: 169—176 5) Imai N, Ikeda K, Seko Y, et al. Oncology 2011; 80: 188—194

英文要旨

**Combination therapy with transcatheter arterial
infusion chemotherapy using miriplatin and
percutaneous radiofrequency ablation for
hepatocellular carcinoma**

Norihiro Imai*, Kenji Ikeda, Yuya Seko, Tasuku Hara,
Atsushi Ohno, Naoki Matsumoto, Yusuke Kawamura,
Tetsuya Hosaka, Masahiro Kobayashi, Satoshi Saitoh,
Hitomi Sezaki, Norio Akuta, Fumitaka Suzuki,
Yoshiyuki Suzuki, Yasuji Arase,
Hiromitsu Kumada

Miriplatin is a platinum complex developed to treat hepatocellular carcinoma (HCC) via administration into the hepatic artery as a sustained-release suspension in iodized oil. We retrospectively evaluated the efficacy of combination therapy with transcatheter arterial infusion chemotherapy using miriplatin and percutaneous radiofrequency ablation for HCC in 11 patients. Immediately after transcatheter arterial infusion chemotherapy using miriplatin, we performed radiofrequency ablation. The greatest long-axis and short-axis dimensions of the area coagulated after combination therapy were 42 mm (35-80 mm) and 34 mm (32-60 mm), respectively. During follow-up (median 12 months), there was no recurrence from the same subsegment. No serious adverse events were observed. These results suggested that using the combination therapy, it is possible to finish one treatment session for patient with HCC.

Key words: miriplatin, hepatocellular carcinoma,
radiofrequency ablation

_____ *Kanzo* 2012; 53: 351—354

Department of Hepatology, Toranomon Hospital

*Corresponding author: norihiro.imai@gmail.com

<短 報>

高齢者 C 型慢性肝炎に対するテラプレビル 1500 mg 減量投与のパイロット・スタディ

原 祐^{1)*} 芥田 憲夫¹⁾ 福島 泰斗¹⁾ 瀬古 裕也¹⁾ 川村 祐介¹⁾
 瀬崎ひとみ¹⁾ 保坂 哲也¹⁾ 小林 正宏¹⁾ 斎藤 聡¹⁾ 鈴木 義之¹⁾
 鈴木 文孝¹⁾ 荒瀬 康司¹⁾ 池田 健次¹⁾ 小林万利子²⁾ 熊田 博光¹⁾

はじめに：Telaprevir (TVR)/Peginterferon (PEG)/Ribavirin (RBV) の三剤併用療法は治療期間も短く、高い治癒率が期待される反面、貧血、皮膚障害といった問題点を伴っている^{1)~4)}。我が国の高齢化社会に伴い、C 型肝炎患者も高齢化してきており、高齢者における三剤併用療法のより安全かつ効果的な投与方法が検討されるべきである。

対象と方法：当院において三剤併用療法 (TVR12 週/PEG+RBV24 週) を導入した genotype1b・高ウイルス量 (≥ 5.0 LogIU/ml) の 66 歳以上の慢性肝炎症例で、治療開始後 12 週間以上経過した 21 例についての経時的なウイルス陰性化率、ヘモグロビン値 (Hb) の推移について検討した。なおウイルス陰性は、COBAS-TaqManPCR[®]法にて検出せずと定義した。

結果：患者背景は年齢中央値 68 歳 (66-73 歳)、男性/女性 = 12/9 例、初回/再治療 = 4/17 例、Core aa70/91 置換 double wild/non-double wild = 7/14 例、IL28B

rs8099917 TT/non-TT = 13/8 例、HCV-RNA 中央値 6.5 LogIU/mL (5.1-7.3 LogIU/mL)、WBC 中央値 4000 /mm³ (2900-7300 /mm³)、Hb 中央値 13.9 g/dl (12.5-16.1 g/dl)、血小板中央値 15.2×10^4 /mm³ ($10.2-21.4 \times 10^4$ /mm³) であった。治療は TVR2250/1500 mg = 4/17 例で開始し、TVR1500 mg 群の中で RBV のみ開始時から減量した症例が 8 例、PEG と RBV 両剤を開始時から減量した症例が 5 例存在した。薬物投与量は主治医の判断で決定し、TVR 2250 mg は 1 日 3 回投与 (1 回 750 mg)、TVR 1500 mg は 1 日 2 回投与 (1 回 750 mg) とした。なお PEG と RBV は体重あたりの投与量を通常量とした。TVR 治療継続例における HCV RNA 陰性化率は 1 週/2 週/4 週/8 週/12 週 = 14% (3/21 例) /33% (7/21 例) /85% (17/20 例) /100% (19/19 例) /100% (16/16 例) であり、TVR 投与量別では 2250 mg/1500 mg = 1 週 : 0(0/4 例) /18% (3/17 例)、2 週 : 25% (1/4 例) /35% (6/17 例)、4 週 : 75% (3/4 例) /88% (14/16 例)、8 週 : 100% (4/4 例) /100% (15/15 例)、12 週 : 100% (2/2 例) /100% (14/14 例) であった。TVR1500 mg 群も 8 週以降で HCV RNA 陰性化率 100% を達成した。TVR 中止に至った副作用の内訳は皮膚症状/貧血/食欲不振 = 2/2/1 例の計 5 例で、TVR2250 mg 群の 50% (2/4 例) に対して、1500 mg 群では 18% (3/17 例) であった。なお TVR のみ中止した 2 例は、RBV 併用療法は継続しており 12 週の時点で HCV RNA 陰性化を維持出来ていた (Table)。治療継続例における経過中の Hb 減少量中央値は、1 週/2 週/4 週/8 週/12 週 = 0.2/1.6/2.7/3.3/3.3 g/dl であった。TVR 投与量別に見た Hb 減少量中央値は 2250 mg/1500 mg = 1 週 (0.6/0.2 g/dl)、2 週 (3.4/1.5 g/dl)、4 週 (4.2/2.5 g/dl)、8 週 (4.6/3.2 g/dl)、12 週 (6.4/3.1 g/dl) であり、2 週以降は 2250 mg 群は 1500 mg 群と比較して有意に減少していた (Mann-Whitney U-test) (Fig.)。

1) 虎の門病院肝臓センター

2) 虎の門病院肝臓研究室

*Corresponding author: nottask_tasuku@yahoo.co.jp

\$ 利益相反申告：芥田 憲夫 (株) エスアールエル
熊田 博光 (株) エスアールエル、

MSD (株)、プリストル・マイヤーズ (株)、田辺三菱製薬 (株)、(株)ファーマインターナショナル、大日本住友製薬 (株)、電通サンドラー・アンド・ハネシー (株)

<受付日 2012 年 7 月 5 日> <採択日 2012 年 8 月 16 日>

Table Profile at the start of triple therapy of telaprevir with peginterferon and ribavirin, and treatment response.

Case	Age (yr)	Sex	TVR dose (mg)	*Reduction of RBV (mg)	*Reduction of PEG-IFN (μg)	IL28B rs8099917	Core aa70	Previous response	HCV RNA (LogIU/ml)	1W	2W	4W	8W	12W	side effect
1	69	M	1500	-400	-20	TT	Wild	non response	6.3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
2	69	M	1500	-400	-20	TT	Wild	non response	7.3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
3	73	M	1500	-400	-20	TT	Wild	relapse	7.0	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
4	68	F	1500	-200	-20	TG	Mut	non response	7.0	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
5	68	M	1500	-200	-20	TT	Wild	relapse	6.6	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
6	70	M	1500	-400	0	TT	Wild	relapse	6.0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
7	69	F	1500	-200	0	TG	Mut	relapse	6.7	(+)	(+)	(-)			Skin rash
8	67	F	1500	-200	0	TT	Mut	naïve	6.3	(+)	(-)	(-)	(-)		Anemia
9	67	F	1500	-200	0	TG	Wild	relapse	5.6	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
10	69	F	1500	-200	0	TT	Wild	relapse	6.9	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
11	66	M	1500	-200	0	TG	Mut	naïve	5.8	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
12	67	F	1500	200	0	TT	Wild	relapse	6.9	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
13	69	F	1500	-200	0	TT	Wild	non response	7.3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
14	68	M	1500	0	0	TT	Wild	relapse	7.0	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
15	68	M	1500	0	0	TT	Wild	non response	5.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
16	69	F	1500	0	0	TG	Mut	relapse	5.1	(-)	(-)				Anemia
17	69	F	1500	0	0	TG	Mut	non response	6.8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
18	66	M	2250	0	-20	TT	Mut	relapse	7.0	(+)	(+)	(+)	(-)		Asitia
19	68	M	2250	0	0	TT	Wild	naïve	6.6	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
20	66	M	2250	0	0	TG	Mut	relapse	6.4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
21	68	M	2250	0	0	GG	Mut	naïve	5.3	(+)	(-)	(-)	(-)		Skin rash

Case 8, 18: TVR was discontinued due to side effect, but RBV combination therapy was continued.

Case 7, 16, 21: Triple therapy was discontinued due to side effect.

*The reduction dose at the start of treatment was indicated, in comparison to the standard dose of PEG-IFN and RBV adjusted according to body weight.

TVR = telaprevir PEG-IFN = peginterferon RBV = ribavirin Mut = mutant

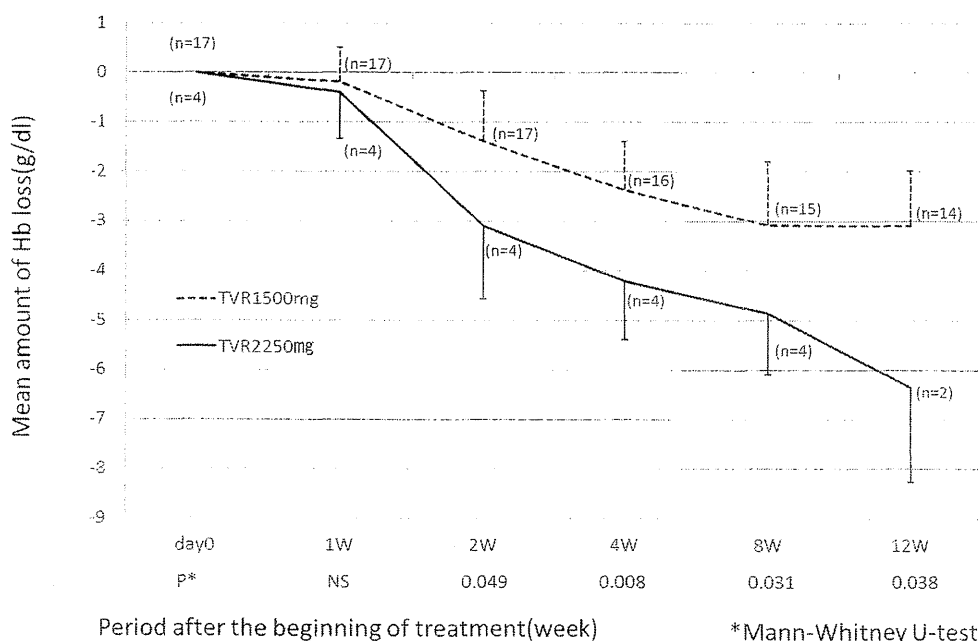


Fig. Loss of hemoglobin in the patients who received telaprevir, peginterferon and ribavirin triple treatment during 12 weeks.

考察：66 歳以上の高齢者において，TVR 1500 mg 減量投与は 2250 mg と比較して貧血の副作用を軽減することが出来た。今回の結果から，TVR 1500 mg 減量投与は高齢化社会における安全かつ効果的な抗ウイルス療法の一選択肢になり得ることが示唆された。今回の成績は，あくまで少数例による治療開始後 12 週間までの成績であるため，より多数例での最終的な SVR 率も含めた検討が今後必要である。

索引用語：テラプレビル，高齢者，HCV

文献：1) Kumada H, Toyota J, Okanoue T, et al. *J Hepatol* 2012; 56: 78—84 2) Havashi N, Okanoue T, Tsubouchi H, et al. *J Viral Hepat* 2012; 19: 134—142 3) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. *Hepatology* 2010; 52: 421—429 4) Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, et al. *Hepatology* 2011; 53: 415—421

英文要旨

A pilot study of triple therapy with telaprevir 1500 mg, peginterferon and ribavirin for elderly HCV patients

Tasuku Hara^{1)*}, Norio Akuta¹⁾, Taito Fukushima¹⁾, Yuya Seko¹⁾, Yusuke Kawamura¹⁾, Hitomi Sezaki¹⁾, Tetsuya Hosaka¹⁾, Masahiro Kobayashi¹⁾, Satoshi Saito¹⁾, Yoshiyuki Suzuki¹⁾, Fumitaka Suzuki¹⁾, Yasuji Arase¹⁾, Kenji Ikeda¹⁾, Mariko Kobayashi²⁾, Hiromitsu Kumada¹⁾

We evaluated the triple therapy with telaprevir (TVR) 1500 mg, peginterferon and ribavirin treatment during 12 weeks on-treatment for elderly patients with chronic hepatitis infected HCV genotype 1b. 17 patients received triple therapy with TVR 1500 mg, and the other 4 patients received TVR 2250 mg. HCV-RNA negative rates in TVR 1500 mg could be achieved 100% after 8 weeks. Furthermore, decreases of hemoglobin levels in TVR 1500 mg were significantly milder than those in TVR 2250 mg. These results suggest that triple therapy with TVR 1500 mg might be one of safety and useful treatment regimens for elderly HCV patients.

Key words: telaprevir, HCV, elderly patients

Kanzo 2012; 53: 624—626

- 1) Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, JAPAN
- 2) Liver Research Laboratory, Toranomon Hospital, Tokyo, JAPAN

*Corresponding author: nottask_tasuku@yahoo.co.jp

Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle

C. Nelson Hayes^{1,2,3,9}, Sakura Akamatsu^{1,2,3,9}, Masataka Tsuge^{3,4}, Daiki Miki^{1,2,3}, Rie Akiyama^{1,2,3}, Hiromi Abe^{1,2}, Hidenori Ochi^{1,2,3}, Nobuhiko Hiraga^{1,2,3}, Michio Imamura^{1,2,3}, Shoichi Takahashi^{1,2}, Hiroshi Aikata^{1,3}, Tomokazu Kawaoka^{1,2,3}, Yoshiiku Kawakami^{1,2,3}, Waka Ohishi^{3,5}, Kazuaki Chayama^{1,2,3*}

1 Department of Gastroenterology and Metabolism, Applied Life Sciences, Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, **2** Laboratory for Digestive Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Hiroshima, Japan, **3** Liver Research Project Center, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, **4** Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, **5** Department of Clinical Studies, Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan

Abstract

Disease-specific serum miRNA profiles may serve as biomarkers and might reveal potential new avenues for therapy. An HBV-specific serum miRNA profile associated with HBV surface antigen (HBsAg) particles has recently been reported, and AGO2 and miRNAs have been shown to be stably associated with HBsAg in serum. We identified HBV-associated serum miRNAs using the Toray 3D array system in 10 healthy controls and 10 patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. 19 selected miRNAs were then measured by quantitative RT-PCR in 248 chronic HBV patients and 22 healthy controls. MiRNA expression in serum versus liver tissue was also compared using biopsy samples. To examine the role of AGO2 during the HBV life cycle, we analyzed intracellular co-localization of AGO2 and HBV core (HBcAg) and surface (HBsAg) antigens using immunocytochemistry and proximity ligation assays in stably transfected HepG2 cells. The effect of AGO2 ablation on viral replication was assessed using siRNA. Several miRNAs, including miR-122, miR-22, and miR-99a, were up-regulated at least 1.5 fold ($P < 2E-08$) in serum of HBV-infected patients. AGO2 and HBcAg were found to physically interact and co-localize in the ER and other subcellular compartments. HBsAg was also found to co-localize with AGO2 and was detected in multiple subcellular compartments. Conversely, HBx localized non-specifically in the nucleus and cytoplasm, and no interaction between AGO2 and HBx was detected. siRNA ablation of AGO2 suppressed production of HBV DNA and HBsAg antigen in the supernatant.

Conclusion: These results suggest that AGO2 and HBV-specific miRNAs might play a role in the HBV life cycle.

Citation: Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, et al. (2012) Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. PLoS ONE 7(10): e47490. doi:10.1371/journal.pone.0047490

Editor: Sang-Hoon Ahn, Yonsei University College of Medicine, Republic of Korea

Received: July 2, 2012; **Accepted:** September 11, 2012; **Published:** October 16, 2012

Copyright: © 2012 Hayes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by Grants-in-Aid for scientific research and development from the Ministry of Health, Labor and Welfare and Ministry of Education Culture Sports Science and Technology, Government of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: chayama@hiroshima-u.ac.jp

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is a partially double-stranded DNA virus in the Hepadnaviridae family [1]. New therapies are urgently needed for the 350 million chronically infected individuals who face a significantly elevated lifetime risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2,3]. Recent insight into the role of non-coding RNAs in the liver has highlighted potential applications of microRNAs (miRNAs) in HBV diagnosis and treatment [4,5,6,7,8,9].

MiRNAs are a class of short non-coding RNAs involved in post-transcriptional gene regulation of multiple pathways [10]. In contrast to messenger RNAs, exosome-free extracellular miRNAs may be nuclease-resistant and remain in circulation for long periods of time by being stably bound to AGO2, a component of the RNA-induced silencing complex [11]. The origin and function of these extracellular miRNAs is unclear, but they may serve as

biomarkers for liver injury and cancer [4]. Elucidating the function of hepatic miRNAs in HBV infection is important in the development of strategies to eradicate the virus and assess the risk of HCC. A number of miRNAs have been shown to be up- or down-regulated in HBV infection [4,12,13]. Noting that the defective hepatitis delta virus co-opts HBsAg subviral particles for export, Novellino et al. hypothesized that HBsAg subviral particles might also sequester miRNAs from the liver [5]. Using HBsAg immunoprecipitation, they identified a set of liver-specific and immune regulatory AGO2-bound miRNAs associated with HBsAg.

These reports suggest that AGO2 and a specific subset of miRNAs may participate in HBV replication, either as part of a host anti-HBV defense or as viral strategy to exploit or evade the RISC machinery. In this study, we examined serum miRNA expression in chronic HBV and healthy individuals and found a specific subset of miRNAs that are over-expressed in HBV-positive

patients and in which miR-122 was strongly up-regulated. To determine whether components of the miRNA system are associated with other HBV components, we performed subcellular localization experiments with viral proteins and AGO2.

Materials and Methods

Study Subjects

We performed a series of experiments to compare miRNA profiles of healthy and HBV-infected individuals in serum and liver tissue. All patients had chronic hepatitis B and agreed to provide blood samples for a viral hepatitis study. Patient profiles are shown in Table 1. Histopathological diagnosis was made according to the criteria of Desmet et al. [14]. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, and all patients provided written informed consent. This study was approved a priori by the ethical committee of Hiroshima University.

miRNA Expression Levels in Serum

miRNA expression in serum samples was measured using the Toray Industries miRNA analysis system, in which serum miRNA samples were hybridized to 3D-Gene human miRNA ver12.1 chips containing 900 miRNAs (Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan). MiRNA gene expression data were scaled by global normalization, and differential expression was analyzed using the limma package in the R statistical framework. Serum was collected from 20 patients with high HBV DNA and HBsAg levels and with either high (>42 IU/l) or low (≤ 42 IU/l) ALT levels. Serum from the 10 low ALT patients was analyzed as a mixture, whereas serum from each of the 10 high ALT patients was analyzed both separately and as a mixture. For comparison with healthy controls we collected separate mixtures of serum from 10 healthy females and 12 healthy males. Serum samples from each healthy female were also measured separately. All healthy controls were negative

for HBsAg, HBeAg, and HCV Ab. For comparison with miRNA expression in hepatocytes, miRNA expression was measured in non-tumor biopsy tissue from an HBV-infected patient and compared to non-cancerous liver tissue samples from two patients without HBV or HCV infection.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction miRNA Analysis

Using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) we measured the expression of 19 miRNAs in serum from 248 patients with chronic HBV infection and from 10 healthy females and 12 healthy males. Circulating microRNA was extracted from 300 μ l of serum samples using the mirVana PARIS Kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 80 μ l of nuclease free water and reverse transcribed using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan). *Caenorhabditis elegans* miR-238 (cel-miR-238) was spiked to each sample as a control for extraction and amplification steps. The reaction mixture contained 5 μ l of RNA solution, 2 μ l of 10 \times reverse transcription buffer, 0.2 μ l of 100 mM dNTP mixture, 4 μ l of 5 \times RT primer, 0.25 μ l of RNase inhibitor and 7.22 μ l of nuclease free water in a total volume of 20 μ l. The reaction was performed at 16 $^{\circ}$ C for 30 min followed by 42 $^{\circ}$ C for 30 min. The reaction was terminated by heating the solution at 85 $^{\circ}$ C for 5 min. MiRNAs were amplified using primers and probes provided by Applied Biosystems using TaqMan MicroRNA assays according to the manufacturer's instructions. The reaction mixture contained 12.5 μ l of 2 \times Universal PCR Master Mix, 1.25 μ l of 20 \times TaqMan Assay solution, 1 μ l of reverse transcription product and 10.25 μ l of nuclease free water in a total volume of 25 μ l. Amplification conditions were 95 $^{\circ}$ C for 10 min followed by 50 denaturing cycles for 15 sec at 95 $^{\circ}$ C and annealing and extension for 60 sec at 60 $^{\circ}$ C in an ABI7300 thermal cycler. For the cel-miR-238 assay, a dilution series using chemically synthesized miRNA was used to generate a standard curve that permitted absolute quantification of molecules.

Pathway Analysis

Target genes of differentially expressed miRNAs were predicted based on agreement among three miRNA prediction tools, miRanda, miRBase, and TargetScan. Gene Set Enrichment Analysis (<http://www.broadinstitute.org/gsea>) was used to identify significantly over-represented gene ontology (GO) terms among the predicted targets.

Plasmid Construction

The construction of wild-type HBV 1.4 genome length, pTRE-HB-wt, was described previously [15]. We used pTRE2 vector without pTet-off vector and doxycycline because a sufficient amount of HBV transcript was produced from internal HBV promoters, and transcription from the pTRE2 promoter is negligible under these conditions. The nucleotide sequence of the HBV genome that we cloned into plasmids pTRE-HB-wt was deposited into GenBank under accession number AB206817.

Cell Culture

HepG2 cells, derived from a human hepatoma cell line, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum at 37 $^{\circ}$ C and under 5% CO₂. For the production of stably transfected cell lines, HepG2 cells were transfected with 20 μ g of the plasmid pTRE-HB-wt by calcium precipitation and the transfected cells were selected with

Table 1. Clinical characteristics of chronic hepatitis B virus patients (n = 248).

Factor	Value
Age	44 (15–76)
Sex (male/female)	169/77
Alanine aminotransferase (IU/l)	56 (10–1867)
Aspartate aminotransferase (IU/l)	43.5 (15–982)
HBV DNA (IU/ml)	6.3 (1.8–9.1)
Liver fibrosis (1/2/3/4)	69/102/46/26
Necroinflammatory activity (0/1/2/3/4)	1/70/127/45/0
γ -glutamyl transpeptidase (IU/l)	43 (9–459)
Alpha-fetoprotein (μ g/l)	6.15 (0–9400)
Promthrombin time (s)	93 (0–146)
Albumin (g/dl)	4.4 (0–5.2)
Platelets ($\times 10^4$ /mm ³)	16.75 (1–36)
HBsAg (IU/l)	2765 (0.05–239000)
HBeAg (–/+)	115/127
HBeAb (–/+)	113/128

Continuous variables are shown as median and range, and categorical variables are shown as counts.

Fibrosis and necroinflammatory activity were scored according to the criteria of Desmet et al. [14].

doi:10.1371/journal.pone.0047490.t001

400 µg/ml hygromycin-included DMEM. Sixty colonies were isolated, and clones that were positive for both HBs and HBe antigens were selected. Finally, one cell line named T23 was selected and used for further experiments. T23 cells continuously produced more than 6 log copies/ml of HBV DNA in supernatant over more than 12 months (data not shown).

Immunocytochemistry

Co-localization between AGO2 and several HBV proteins (HBc, HBs, and HBx) was analyzed using immunocytochemistry, followed by cellular localization assays using antibodies targeting various sub-cellular compartments. HepG2 or T23 cells were seeded in 2-well chamber plates and harvested 48 hours after seeding. The cells were washed with PBS and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde. After fixation, the cells were stained with several primary antibodies (Table S1). The bound antibodies were detected with an Alexa 488-conjugated antibody against rabbit IgG (1:2000) or Alexa 568-conjugated antibody against mouse IgG (1:2000), respectively (Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were counterstained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector laboratories, Burlingame, CA). The stained cells were examined with a Fluoview FV10i microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

In situ Proximity Ligation Assay

We used proximity ligation assays (PLA) to determine whether AGO2 and HBc physically interact. PLA is a recent method to detect protein-protein interactions using protein-DNA conjugates that can be detected using fluorescence microscopy [16]. PLA improves on traditional immunoassays by directly detecting even weak or transient protein interactions [16]. HepG2 and T23 cells were seeded in 2-well chamber plates and harvested 48 hours after seeding. The cells were washed with PBS and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde. After fixation, the cells were stained with primary antibodies. The primary antibodies used are listed in Table S1. After overnight incubation with primary antibody at 4°C, PLA was performed using Duolink II PLA probe anti-rabbit plus and anti-mouse minus and Duolink II Detection Reagents Orange (Olink, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's protocol. Nuclei were counterstained with DAPI. Imaging was performed using a Fluoview FV10i microscope.

Analysis of Supernatant HBV Production by RNA Interference Against AGO2

To investigate the necessity of AGO2 for HBV production, we performed RNA interference assay using T23 cells that are HepG2 cells stably transfected with the plasmid pTRE-HB-wt. We used Silencer Select Pre-designed siRNA small interfering RNA targeting *AGO2* (#s25932, Ambion, Austin, TX) and Silencer Select Negative Control #1 siRNA for control (Ambion). T23 cells were transfected with one of the siRNA oligonucleotides (10 nM) using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. To examine the knockdown effect of siRNAs against *AGO2* by real-time quantitative RT-PCR, T23 cells transfected with siRNAs were harvested 72 hours after transfection. Total RNA was isolated using the QuickGene RNA cultured cell kit S (Fujifilm, Tokyo, Japan). One µg of each RNA sample was reverse transcribed with the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen). First-strand complementary DNA (cDNA) was amplified with specific primers for the coding sequence of *AGO2*. The primers were as follows: forward, 5'-CCAGCATACTACGCTCACCT-3'; reverse, 5'-CAGAGTGTCTTGGTGAACCTG-3'. We quantified *AGO2*

mRNA with EXPRESS SYBR Green ER qPCR Supermix Universal (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Amplification and detection were performed using the Mx3000P Multiplex quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, CA). Results were normalized to the transcript levels of the housekeeping reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Three to seven days after transfection, the culture media were collected to examine HBV production in supernatant. HBs antigen was measured quantitatively using the Abbott chemiluminescence immunoassay kit (Abbott Japan, Tokyo, Japan). HBV DNA levels were determined by Cobas TaqMan HBV standardized real-time PCR assay (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Results are expressed in log₁₀ international units/ml. We also evaluated viability of cells using the Cell Counting kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) at 3, 5 and 7 days after transfection, according to the manufacturer's instructions. All assays were performed in triplicate, and the results are expressed as mean ± SD.

Statistical Analysis

All analyses were performed using the R statistical package (<http://www.r-project.org>). Continuous variables are reported using the median and range. Moderated t statistics or Mann Whitney U tests were used to detect significant associations, as appropriate, and P-values were adjusted for multiple testing based on the false discovery rate.

Results

MiRNA Microarray Results

We performed miRNA microarray analysis to identify HBV-associated differences in serum miRNA profiles between 10 chronic HBV patients and 10 healthy controls (Fig. S1). 26 miRNAs with an absolute log fold change greater than 1.5 were found to be significantly ($P_{FDR} < 0.05$) up-regulated in serum of HBV patients, and 8 miRNAs were significantly down-regulated (Table 2). MiR-122, miR-22, and miR-99a levels were the most strongly up-regulated in serum of HBV-infected patients, and levels of miR-575, miR-125a-3p, and miR-4294 were the most down-regulated. We also examined miRNAs associated with presence of HBe antigen or HBe antibody, but no miRNAs were significant following correction for multiple testing (data not shown).

Analysis of Serum Sample Mixtures from HBV-infected Patients and Healthy Controls

In addition to individual serum samples, we also examined 4 pooled serum samples as follows: 10 healthy males, 10 healthy females, 10 HBV patients with low ALT levels, and 10 HBV patients with high ALT levels (Fig. S2). In agreement with results from individual analysis, miR-122 and miR-99 levels were significantly higher in serum from HBV serum samples compared to healthy control samples (Table 2). Corresponding results with a log change greater than 1.5 were found for several other miRNAs, including miR-22, miR-642b, miR-125b (up-regulated) and miR-575 and miR-4294 (down-regulated), but results were not significant following correction for multiple testing in the mixture samples due to the small number of samples compared.

RT-PCR Analysis

Serum levels of 19 miRNAs were analyzed using quantitative RT-PCR analysis of 250 chronic HBV patients and 20 healthy controls. Several miRNAs (miR-122, miR-22, miR-99a, miR-720, miR-125b, and miR-1275) were significantly up-regulated in