

## JOURNAL OF HEPATOLOGY

**Table 3. Factors associated with progression to hepatocellular carcinoma among propensity-matched patients (Cox proportional hazard model).**

		Adjusted hazard ratio (95% CI)	p value
Age (yr)	≤40	1	0.015
	>40	4.36 (1.33-14.29)	
Treatment	no NA	1	0.002
	NA	0.28 (0.13-0.62)	
BCP	wild-type	1	0.012
	mutant-type	12.74 (1.74-93.11)	
HBcrAg (log <sub>10</sub> U/ml)	≤3.0	1	0.036
	>3.0	2.77 (1.07-7.17)	
γ-GTP (IU/L)	≤56	1	0.001
	>56	2.76 (1.49-5.12)	

NA, nucleos(t)ide analogue; BCP, basal core promoter; HBcrAg, hepatitis B core-related antigen; γ-GTP, gamma glutamyl transpeptidase.

higher ALT levels, elevated AFP levels, and presence of cirrhosis are factors associated with the development of cirrhosis and HCC [17,18]. Platelet count is a useful surrogate marker for the diagnosis of cirrhosis [37]. All subjects were not histologically diagnosed in this study. Therefore, we selected platelet count as a marker of hepatic fibrosis instead of cirrhosis. An elevated ALT level indicates the presence of active disease, and persistently elevated AFP levels are a reflection of an enhanced regenerative state in the liver [16]. In the REVEAL study, a high HBV DNA load was associated with an increased rate of HCC development [17]. A direct correlation was observed between baseline HBV DNA levels and the incidence of HCC, independent of serum ALT concentration. In a model that integrated baseline and follow-up HBV DNA levels, the cumulative incidence of HCC ranged from 1.3% in patients with undetectable levels of HBV DNA to 14.9% in patients with HBV DNA levels greater than or equal to 10<sup>6</sup> copies/ml. Therefore, we have selected factors, such as age, sex, HBeAg serostatus, HBV DNA concentration, platelet count, and ALT for propensity matching.

Although the exact mechanisms of hepatocarcinogenesis by HBV remain unclear, two mechanisms have been proposed [38,39]. One mechanism involves chronic necroinflammation of hepatocytes, cellular injury, and hepatocyte regeneration [40]. The other mechanism involves the direct carcinogenicity of HBV through chromosomal integration [41]. Complete and sus-

tained viral suppression by NA might block both pathways and prevent the development of HCC. It is well known that the rate of HCC is significantly higher in patients with virological breakthrough or no response. In our study, when virological or biochemical breakthrough was observed and the YMDD mutation was detected in patients on lamivudine, adefovir dipivoxil was immediately added. In patients with cirrhosis, especially in the decompensated stage, sustained viral response on NA therapy was not necessarily associated with a preventative effect against the development of HCC, even though the incidence was lower than in a group not on NA [14]. It is not surprising that viral suppression decreased but did not eliminate the risk of HCC, because HBV DNA may have already integrated into the host genome before the initiation of therapy and may have resulted in genomic alternations, chromosomal instability, or both [42,43].

It is reported that patients with HBV genotype C infection have higher HBV DNA levels, higher frequency of pre-S deletions, higher prevalence of BCP T1762/A1764 mutations, and significantly higher chances of developing HCC [16,44-46]. In our study, T1762/A1764 mutations were observed in 158 (80.2%) out of 197 patients and were associated with a higher risk of developing HCC (adjusted hazard ratio, 12.740 [95% CI 1.743-93.108]), independent of NA therapy. However, the BCP T1762/A1764 mutations were detected in HCC patients from Asia and Africa, where HBV genotype C infection is predominant [16].

HBcrAg is a new HBV marker that reflects HBV load and corresponds to HBV DNA levels [21]. HBcrAg is comprised of HBV core antigen (HBcAg) and HBeAg; both are products of the pre-core/core gene and share the first 149 amino acids of HBcAg. The HBcrAg assay measures HBcAg and HBeAg simultaneously by using monoclonal antibodies that recognize both denatured HBcAg and HBeAg [47]. Serum HBcrAg concentration is well correlated with intrahepatic levels of covalently closed circular DNA (cccDNA) [48]. It is reported that HBcrAg is a useful marker for guiding cessation of NA therapy and evaluation of disease activity [21,49]. In our study, elevated serum HBcrAg concentration was associated with a higher risk of developing HCC (adjusted hazard ratio, 2.767 [95% CI 1.067-7.172]). This is the first report demonstrating a relationship between HBcrAg and HCC.

The present study has several limitations. The retrospective design might have introduced an unintended bias. The propensity matching method was adopted to reduce the confounding effects of covariates. Characteristics of patients who did or did not receive NA therapy were similar except for HBcrAg concentration.

**Table 4. Average integration values of various parameters in patients who did or did not receive NA therapy.**

	NA group (n = 117)	Non-NA group (n = 117)	p value
Platelet count (x10 <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> )	17.0 (3.3-37.2)	14.8 (3.3-296)	0.0060
ALT (IU/ml)	28.2 (8.5-88.9)	39.1 (12.2-737.5)	<0.0001
γ-GTP (IU/L)	27.0 (10.9-267.6)	36.2 (9.5-269.7)	0.0427
Total bilirubin (mg/dl)	0.7 (0.3-2.0)	0.7 (0.3-2.6)	0.1554
ALP (IU/L)	242.7 (113.5-1028.8)	265.2 (140.5-1247.6)	0.0127
Albumin (g/dl)	4.4 (3.0-5.0)	4.0 (2.4-4.8)	<0.0001
Alpha-fetoprotein (ng/ml)	2.2 (0.8-106.0)	4.5 (0.9-723.8)	<0.0001
HBV DNA (log <sub>10</sub> copies/ml)	2.5 (2.1-8.9)	4.6 (2.1-9.3)	<0.0001

NA, nucleos(t)ide analogue; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, gamma glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; HBV, hepatitis B virus.

## Research Article

However, the non-NA group included many historical cases when NA therapy was not yet available. In addition, the HBV DNA assay used between 1998 and 2007 was not the most sensitive one.

In conclusion, NA therapy reduces the risk of HCC compared with untreated controls. Higher serum HBcAg levels and BCP mutations are associated with development of HCC, independent of NA therapy.

### Financial support

This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Hepatitis) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

### Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

### References

- EASL Jury. EASL international consensus conference on hepatitis B, 13–14 September, 2002, Geneva, Switzerland, Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003;38:533–540.
- Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942–1956.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129–1133.
- Szmunes W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 1978;24:40–69.
- Rustgi VK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987;16:545–551.
- Kiyosawa K, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Gad A, et al. Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology* 2004;127:S17–S26.
- Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004;351:1521–1531.
- Shamliyan TA, MacDonald R, Shaikat A, Taylor BC, Yuan JM, Johnson JR, et al. Antiviral therapy for adults with chronic hepatitis B: a systematic review for a national institutes of health consensus development conference. *Ann Intern Med* 2009;150:111–124.
- Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36:687–696.
- Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999;30:567–572.
- Nguyen MH, Keeffe EB. Chronic hepatitis B: early viral suppression and long-term outcomes of therapy with oral nucleos(t)ides. *J Viral Hepat* 2009;16:149–155.
- Papathodoridis GV, Dimou E, Dimakopoulos K, Manolakopoulos S, Rapti I, Kitis G, et al. Outcome of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analog therapy starting with lamivudine. *Hepatology* 2005;42:121–129.
- Yuen MF, Seto WK, Chow DH, Tsui K, Wong DK, Ngai VW, et al. Long-term lamivudine therapy reduces the risk of long-term complications of chronic hepatitis B infection even in patients without advanced disease. *Antivir Ther* 2007;12:1295–1303.
- Eun JR, Lee HJ, Kim TN, Lee KS. Risk assessment for the development of hepatocellular carcinoma: according to on-treatment viral response during long-term lamivudine therapy in hepatitis B virus-related liver disease. *J Hepatol* 2010;53:118–125.
- Joffe MM, Rosenbaum PR. Invited commentary: propensity scores. *Am J Epidemiol* 1999;150:327–333.
- Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int* 2009;29:100–107.
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;4:65–73.
- Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, et al. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005;54:1610–1614.
- Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection who have normal alanine aminotransferase values. *J Med Virol* 2010;82:539–545.
- Austin PC. Some methods of propensity-score matching had superior performance to others: results of an empirical investigation and Monte Carlo simulations. *Biom J* 2009;51:171–184.
- Kato H, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Gish RG, Usuda S, et al. Determination of hepatitis B virus genotype G by polymerase chain reaction with hemi-nested primers. *J Virol Methods* 2001;98:153–159.
- Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:1901–1906.
- Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, Mizokami M, Fung J, Yuen MF. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol* 2007;45:3942–3947.
- Liu CJ, Kao JH, Lai MY, Chen PJ, Chen DS. Evolution of precore/core promoter mutations in hepatitis B carriers with hepatitis B e antigen seroreversion. *J Med Virol* 2004;74:237–245.
- Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998–1002.
- Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Relation between incidence of hepatic carcinogenesis and integration value of alanine aminotransferase in patients with hepatitis C virus infection. *Gut* 2007;56:738–739.
- Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C carriers with normal alanine aminotransferase levels. *J Hepatol* 2009;50:729–735.
- Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res* 2008;38:37–51.
- Shen L, Li JQ, Zeng MD, Lu LG, Fan ST, Bao H. Correlation between ultrasonographic and pathologic diagnosis of liver fibrosis due to chronic virus hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006;28:1292–1295.
- Iacobellis A, Fusilli S, Mangia A, Clemente R, Festa V, Giacobbe A, et al. Ultrasonographic and biochemical parameters in the non-invasive evaluation of liver fibrosis in hepatitis C virus chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:769–774.
- Caturelli E, Castellano I, Fusilli S, Palminteri B, Niro GA, del Vecchio-Blanco C, et al. Coarse nodular US pattern in hepatic cirrhosis: risk for hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2003;226:691–697.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–1022.
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009;50:661–662.
- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:227–242.
- Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008;2:263–283.
- Greenland S. Basic methods for sensitivity analysis of biases. *Int J Epidemiol* 1996;25:1107–1116.
- Lu SN, Wang JH, Liu SL, Hung CH, Chen CH, Tung HD, et al. Thrombocytopenia as a surrogate for cirrhosis and a marker for the identification of patients at high-risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006;107:2212–2222.
- Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* 2000;10:211–231.
- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62:529–537.
- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145–1156.
- Moradpour D, Wands JR. The molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 1994;1:17–31.

## JOURNAL OF HEPATOLOGY

- [42] Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, Kew MC. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. *N Engl J Med* 1981;305:1067-1073.
- [43] Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;120:1763-1773.
- [44] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334.
- [45] Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007;27:1356-1363.
- [46] Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, et al. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J Gastroenterol* 2011;46:117-124.
- [47] Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. *J Clin Microbiol* 2002;40:439-445.
- [48] Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, Kumada H. 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.
- [49] Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsuhashi H, Nagaoka S, et al. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res* 2007;37:661-666.
- [50] Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.

ウイルス肝炎と肝癌の撲滅を目指した実地診療のすすめかた

## C型肝炎はどのように日本で蔓延し肝癌をもたらしたのか—肝癌抑制の実地診療のすすめかた—

田中純子

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 疫学・疾病制御学/たなか・じゅんこ

### はじめに

ウイルス性肝炎の病因ウイルスの一つであるC型肝炎ウイルス(HCV)は1989年になってHCV遺伝子の一部がクローニングされた、肝炎ウイルスの中では新しいウイルスである。その後、世界中で急速にその測定系の開発と普及が推進された。

World Health Organization (WHO) は、HCV関連抗体検査が輸血用血液のスクリーニングとして広く導入されはじめる1992年以前には、世界中の輸血後肝炎の主な原因はHCVであり、特にアメリカにおける輸血後肝炎の90%はHCVによるものであったことを報告<sup>1)</sup>している。1990年代に入ると、肝炎ウイルスの検査や調査などが広く行われ、徐々に社会におけるC型肝炎ウイルスの感染状況が明らかとなってきた。

C型肝炎ウイルスは、HCVに感染しているヒトの血液に感受性のある個体が曝露することにより感染が起こる。HCVに感染すると、約30%は一過性の感染で治癒するが、約70%が持続感染状態(キャリア化)になるといわれている。したがって、特定の集団の中で、感染リスクの高い行為が繰り返されるとその集団におけるHCVキャリアの累積が起こり、HCVキャリア率がきわめて高くなる可能性があると考えられる。

世界全体ではHCVキャリア率は平均約2%、毎年300~400万人が新規にHCVに感染し、

HCVに持続感染している人は約1.5億人と試算<sup>2)</sup>され、年間35万人以上がHCV関連の疾患で死亡していると推定されている。

本稿では、わが国におけるC型肝炎ウイルスによる感染状況を示すとともに、輸血後肝炎発生率、HCV新規感染率、HCVキャリア数の状況、対策について述べてみたい。

### 肝癌死亡とその成因—日本と世界の状況—

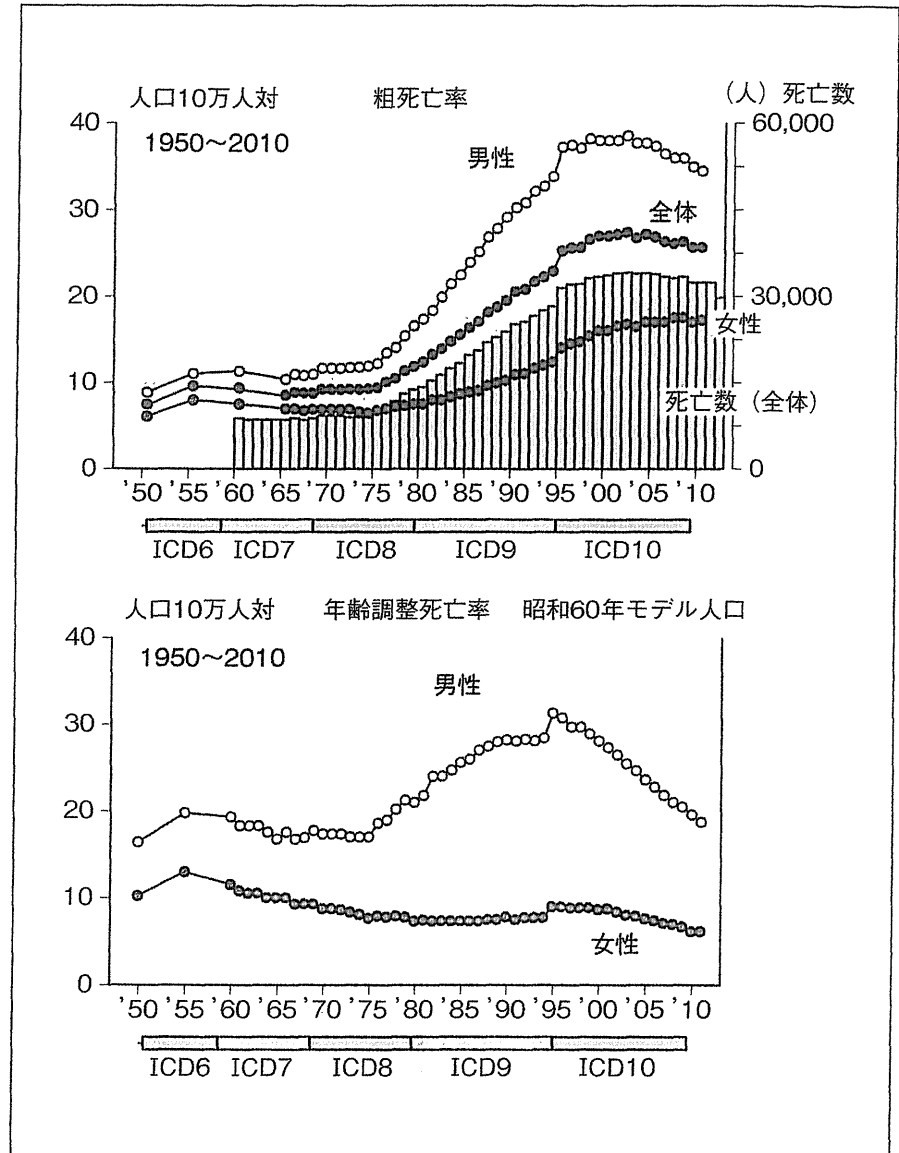
わが国における死因は、1981年以降ほぼ30年にわたり悪性新生物が第1位を占めている。最新(2011年)の人口動態統計資料によると総死亡数1,253,066人のうち、1位：悪性新生物357,305人(28.5%)、2位：心疾患194,926人(15.6%)、3位：肺炎124,749人(10.0%)、4位脳血管疾患123,867人(9.9%)となり、脳血管疾患と肺炎の順位が入れ替わった。

悪性新生物による死亡を部位別にみると、「肝」(肝および肝内胆管)の悪性新生物による死亡は、前年に比べやや減少し3.2万人(男性20,972人、女性10,903人)であったが、依然として部位別にみた同死亡数の上位から4番目(肺7.0万人、胃5.0万人、大腸4.5万人)に位置している。

わが国の肝癌による死亡の年次推移を図1に示す。1950年代はじめから1970年代半ばまでは人口10万人あたり10人前後(死亡実数は1万人以下)であった死亡数は、その後増加し、2002年に人口10万対27.5のピークを示した後、

- 1992年以前には、世界中の輸血後肝炎の主な原因はHCVであり、特にアメリカにおける輸血後肝炎の90%はHCVによるものであった。
- 世界全体ではHCVキャリア率は平均約2%、毎年300~400万人が新規にHCVに感染し、HCVに持続感染している人は約1.5億人。
- わが国の肝癌による死亡数：男性の肝癌死亡は女性の約2倍の高値を示すが、2002年以後、男性では減少傾向が、女性では依然として微増状態。
- 肝癌死亡の年齢調整死亡率は、男女とも減少傾向。

図1 わが国における肝癌による死亡の推移



若干の減少あるいは横ばい状態を保っている。男性の肝癌死亡は女性の約2倍の高値を示すが、2002年以後、男性では減少傾向が、女性では依然として微増状態にある。一方、1985年モデル人口を基準集団とした年齢調整死亡率の年次推移をみると、1995年にICD10への移

行に伴う段差増があるものの、男女とも減少傾向が認められる。他の癌と同様に治療の進歩に伴う延命効果や肝癌リスク集団の減少などが考えられる。

なお、国立がん研究センターの資料(がん対策情報センター癌情報サービス)によると、

- B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因する肝癌の死亡割合は1980年代から現在に至るまで10万人対3~4人と増減なくほぼ一定の値を示している。
- 現在でも肝癌死亡の約7割がHCVの持続感染に起因している。
- 1998年以降、非B非C型に由来する肝癌による死亡の割合が肝癌の10~15%を占める。

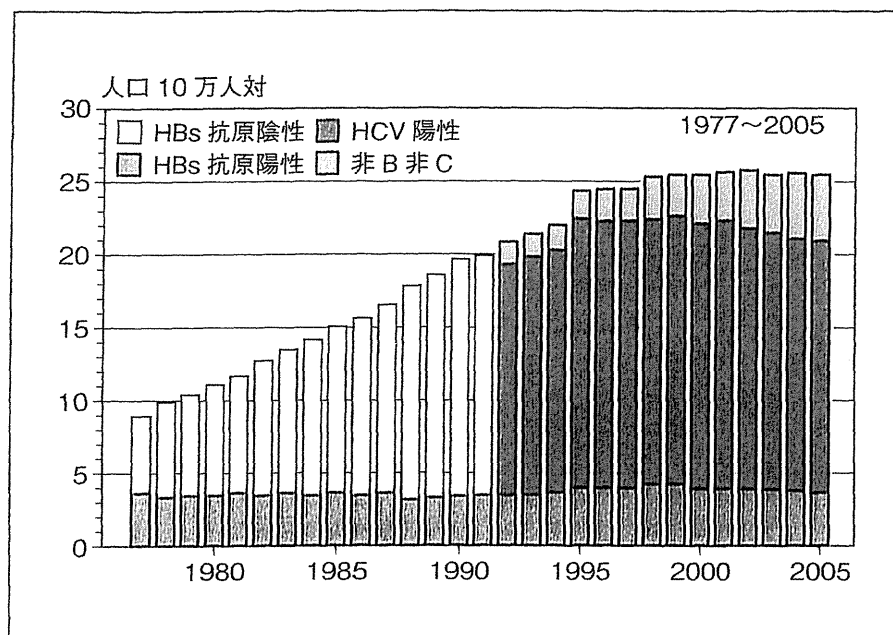


図2 成因別にみた肝細胞癌死亡の推移—推計値—  
(厚生労働省大臣官房統計情報部：人口動態統計全国原発性肝癌追跡調査報告より推計)

2005年の肝癌罹患者数は男性では28,729人、女性では13,465人、計約4.2万人と、肝癌実死亡数よりもやや多い値を示している。男性は女性の2倍多い肝癌罹患(発生)がみられ、この傾向は世界においても同様である<sup>3)</sup>。

次に、病因ウイルス別にみた肝癌死亡の推移について、2年に一度の大規模調査を行ってきた日本肝癌研究会の調査成績(1982~2009)と人口動態統計資料を用いて推定したものを示す(図2)。

B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因する肝癌の死亡割合は1980年代から現在に至るまで10万人対3~4人と増減なくほぼ一定の値を示している。一方、1970年代から2000年代にかけて肝癌による死亡が増加した原因は非A非B型によるものと考えられるが、HCV

感染の診断が可能となった1992年以降、そのほとんどがHCVの持続感染によるものであることがみてとれる。すなわち、現在でも肝癌死亡の約7割がHCVの持続感染に起因していることがわかる。また、1998年以降、非B非C型に由来する肝癌による死亡の割合が肝癌の10~15%を占め徐々に増加傾向にあり、その原因についてはnon-alcoholic steatohepatitis (NASH)との関連も示唆されている<sup>4,5)</sup>。

### 肝癌死亡の地理的分布

肝癌(肝および肝内胆管の悪性新生物)による死亡の地理的分布状況および経年推移の把握を目的として、厚生労働省疫学研究班では、指定統計調査票の使用の承認を得て、肝癌標準化死亡比 Standard Mortality Ratio (SMR, Bayes 推

- 2001～2005年では、西日本地域を中心に標準化死亡比の高い地域が認められており、特に中国・四国・九州地域の肝癌死亡が高い傾向がある。
- わが国では地域と時期により異なった肝癌死亡の変遷が観察される。
- 1975年代以後、肝癌死亡の増加がみられたのはHCVの持続感染に起因する肝癌が増加したことが原因であると推測できる。

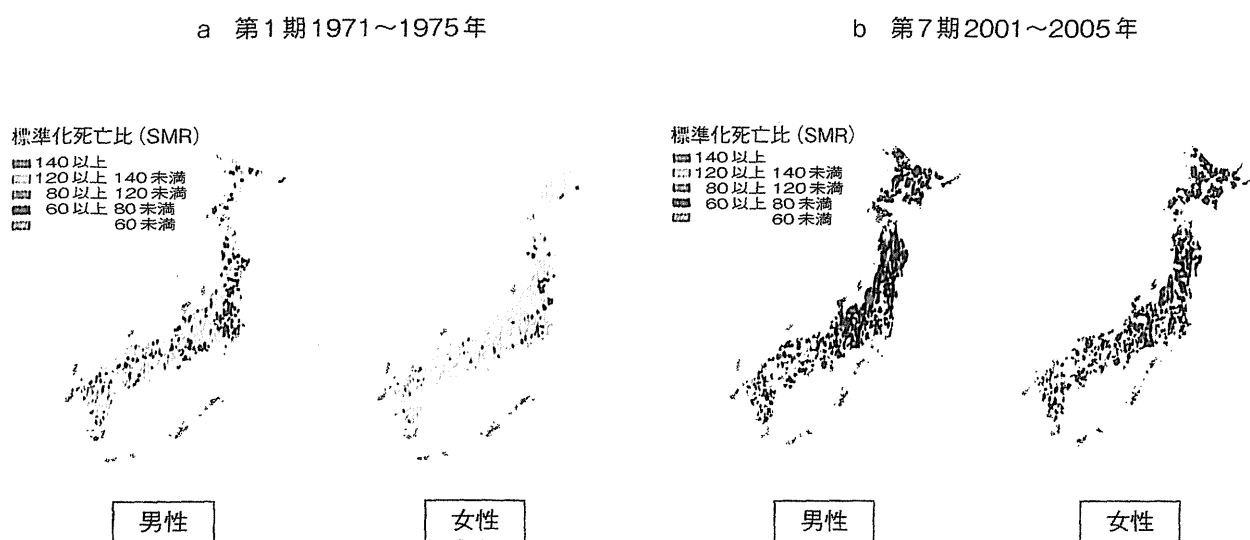


図3 市町村別にみた肝癌年齢調整死亡比(Bayesian method)の経年推移

量による)を1971年から2005年までの7期別に算出している。図3に、第1期1971～1975年、第7期2001～2005年について男女別に示す。

肝癌標準化死亡比は全国平均を100として市町村別にその高低を示しているが、1971～1975年(第1期)では肝癌死亡の顕著な地域差認められない。この時期は、図1および図2参考にすると、肝癌死亡は人口10万人あたり10程度と低く、その成因はHBVの持続感染に起因するものが約4割と多くを占めているとわかる。一方、2001～2005年(第7期)は、西日本地域を中心に標準化死亡比の高い地域が認められており、特に中国・四国・九州地域の肝癌死亡が高い傾向がある。この時期の

肝癌死亡は人口10万人あたり27程度と高く、HBVの持続感染に起因するものが約1.5割すなわちHCVの持続感染に起因するものが約7割と多いことがわかる。

このようにわが国では地域と時期により異なった肝癌死亡の変遷が観察され、1975年代以後、肝癌死亡の増加がみられたのはHCVの持続感染に起因する肝癌が増加したことが原因であると推測することができる。

### 一般集団におけるC型肝炎ウイルス感染状況

一般集団におけるC型肝炎ウイルスの感染状況を把握するため、2000年以後に得られた二

- 40歳以下の年齢集団のHCVキャリア率は初回供血者集団を元に、40歳以上の年齢集団のHCVキャリア率は節目検診受診者集団の資料を元に算出。
- HCVキャリア率は、8地域ともに高年齢層において高い値を示す。

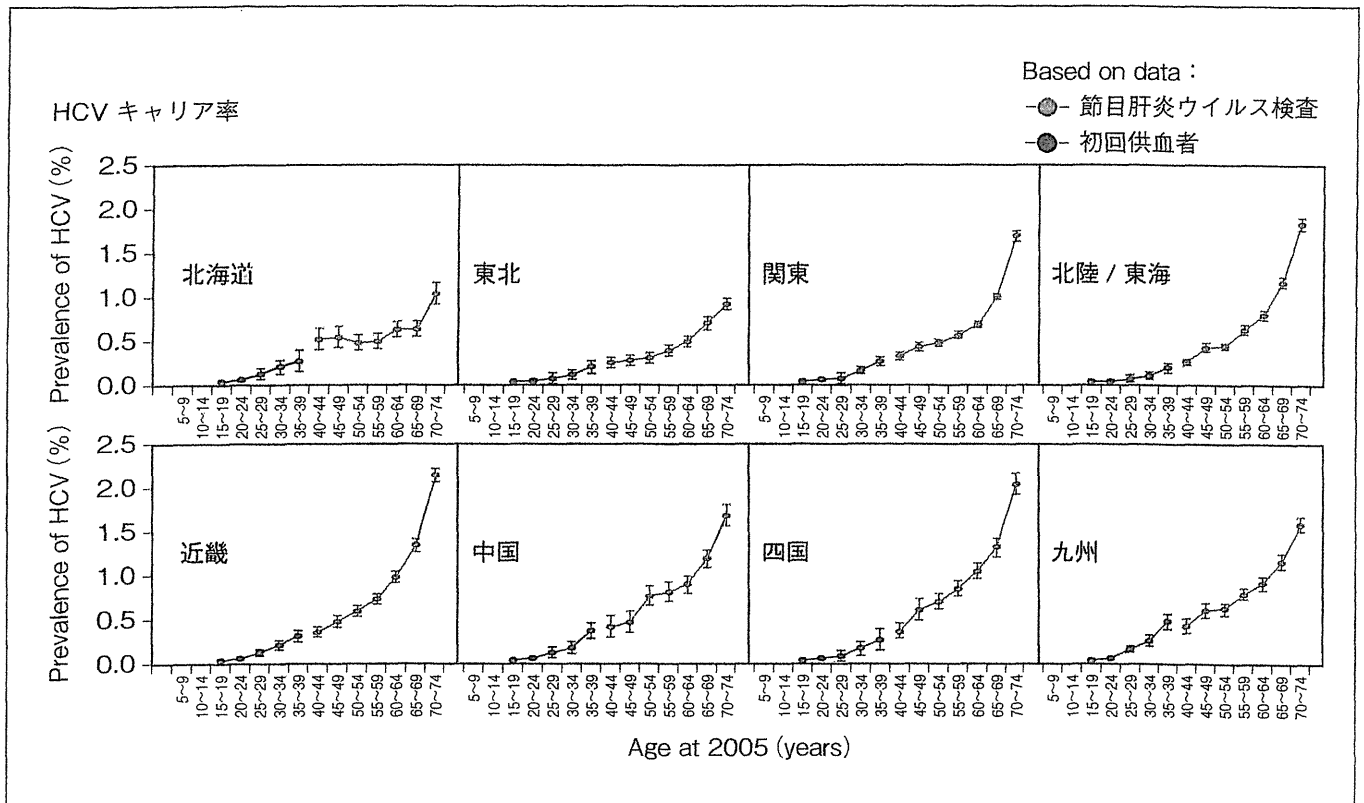


図4 8地域別年齢階級別に見たHCVキャリア率  
(文献6)より引用)

つの大規模集団の特性を考慮して算出・推計した8地域別5歳刻みの年齢階級別に見た肝炎ウイルスキャリア率(HCVキャリア率)を示す<sup>6)</sup>(図4)。

二つの大規模集団とは、日本赤十字血液センターにおける2001年から2006年の6年間の初回供血者3,748,422人、もう一つは、2002年から5ヵ年計画で実施された肝炎ウイルス検診の節目検診受診者のうち、HCV検診受診者6,304,276人である。

日本赤十字血液センターの献血時のスクリー

ニング検査は、輸血用血液の安全性確保のために行われるものであり、全国一律の基準、同一の試薬を用いて精度を維持し判定されている。また、節目・節目外検診は、老人保健法の住民検診に組み込まれた形で、公的補助により肝炎ウイルス検査(C型肝炎ウイルス検査、B型肝炎ウイルス検査)が行われたものであり、全国統一の検査手順に従って判定されたものである。図4に示した40歳以下の年齢集団のHCVキャリア率は初回供血者集団の資料を元に、また、40歳以上の年齢集団のHCVキャリア率は、



- 1992年以前には、HCV感染の主な感染経路は輸血によるものであった。
- 現在では輸血に伴うHCV感染はほぼ駆逐されたといえる状況。
- 地域によってHCVの新規感染率の多寡には相違がある可能性が示唆される。

節目検診受診者集団の資料を元に算出している。

HCVキャリア率は、8地域ともに高年齢層において高い値を示すが、特に、肝発癌年齢と考えられる60歳以上の高年齢集団では関東以西の地域、すなわち近畿、中国、四国の地域では約2%と、北海道や東北地域の1%程度と比較して特に高い値を示しており、前項で示した肝発癌死亡の高い地域と合致していることがわかる。

### 輸血後肝炎発生率の推移について

HCV感染の経路は、HCVに感染している血液や血液製剤、臓器の提供を受けること、HCVに汚染された注射筒や針を用いて点滴など処置をされること、静注の覚醒剤を用いることなどであるとWHOにより指摘されている。冒頭に記述したように、HCV抗体検査が輸血用血液のスクリーニングとして導入・普及しはじめる1992年以前には、HCV感染の主な感染経路は輸血によるものであったことが容易に推察される。

わが国の輸血後肝炎発生率の推移を示す(図5)。1960年代半ばまで、全受血者の50%以上に発生していた輸血後肝炎は売血から献血制度に切り替えが完了した1968年には16.2%までに減少し、その後各種スクリーニング検査の導入により1990年までには全血の2~3%にみられるにすぎない状態にまで改善されている。さらに、世界に先がけて導入されたHCV抗体測定系(第一世代)に続き、1992年には感度、特異度ともにすぐれた第二世代のHCV抗

体測定系が導入され、1999年にはNATが開始されたことにより、現在では輸血に伴うHCV感染はほぼ駆逐されたといえる状況となっている。この40数年の間に、HCVの主な感染経路であった輸血による感染は急激に減少・ほぼ消滅したといえる。

### HCVの新規感染率について

HCVの新規発生の有無に関する前向き調査を行った成績を(表1)に示す。

広島県赤十字血液センターにおける1994年から2004年までの供血者418,269人(総献血本数1,409,465本)を対象として、期間内に複数回献血をした218,797人のうち、新たなHCV感染が確認されたのは16例であり、新規発生率は10万人年あたり1.86人(95%CI:1.06~3.01人)<sup>7)</sup>であった。この成績は、1992年から3年間の観察期間で行った同様の調査<sup>8)</sup>(1.8/10万人年、95%CI:0.4~5.2人)とほぼ同等の値であった。性別にみると統計学的な有意差は認められていないが、女性(2.77人/10万人年)は男性(1.08人/10万人年)よりやや高い値を示していた。大阪の供血者集団を対象とした1990年代前半の調査では、広島の同集団と比較してやや高い値を示しており、地域によってHCVの新規感染率の多寡には相違がある可能性が示唆されている。

一方、観血的処置を頻回に受ける血液透析患者を対象とした多施設前向き調査を行った成績<sup>9)</sup>では、3ヵ月以上の観察が可能であった

- 現在のわが国の一般集団においては HCV 感染の新規発生はごくまれ。
- 血液を介する感染の可能性のある集団などにおける新規発生のリスクは  $10^2$  倍程度高い。

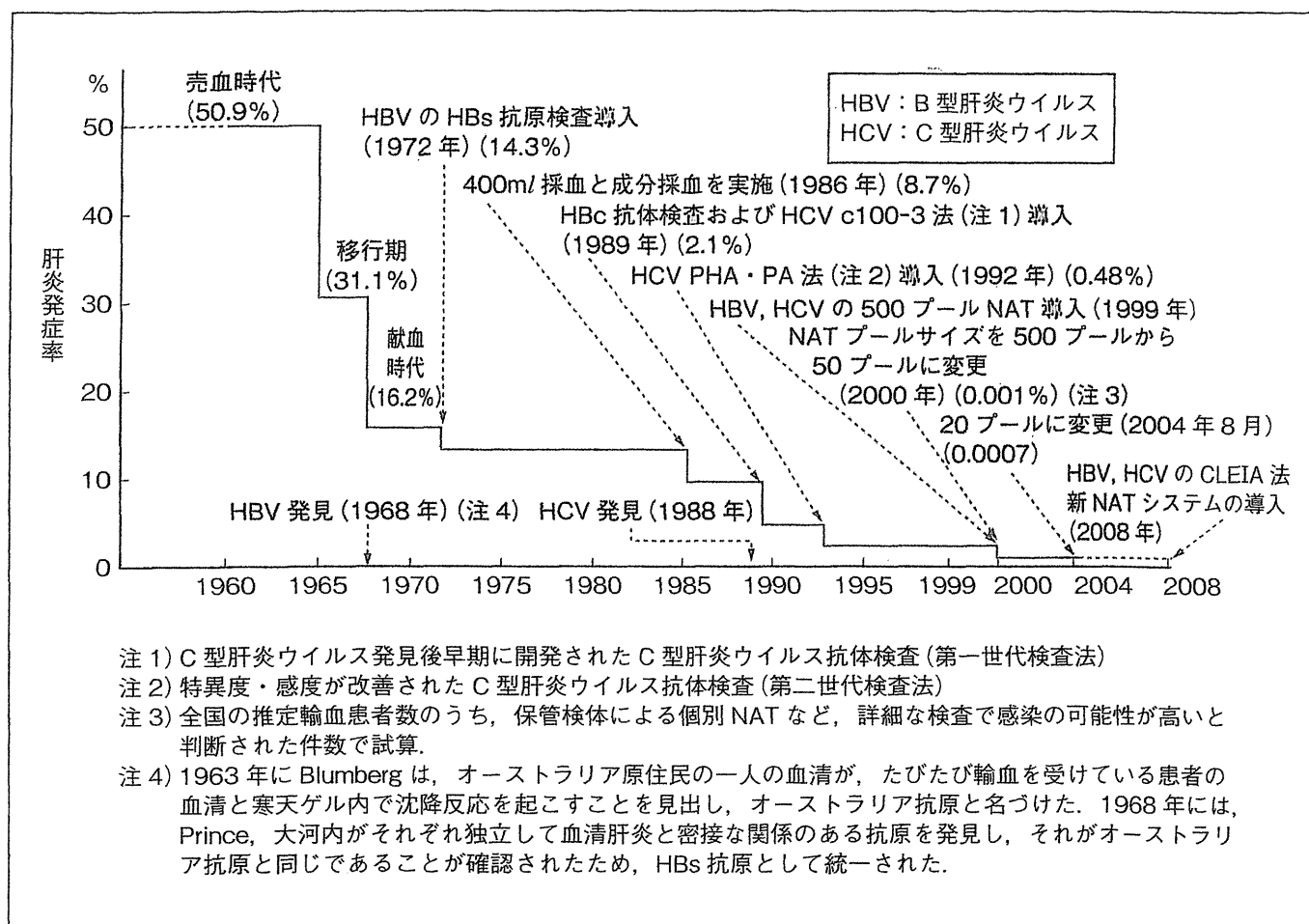


図5 日本における輸血後肝炎発症率の推移

(「日本赤十字社輸血後肝炎の防止に関する特定研究班」研究報告書(1993.4~1996.3)一部改変を基に厚生労働省作成)

2,114人中HCVキャリアの新規発生数は16例であり、HCV新規感染率は3.3人/1,000人年(95% CI: 1.7~4.9人)であった。

これらの成績は、現在のわが国の一般集団においてはHCV感染の新規発生はごくまれである一方、血液を介する感染の可能性のある集団などにおける新規発生のリスクは $10^2$ 倍程度高いことが示されていることから、引き続き

HCV感染防止対策は重要であるといえる。

## HCVキャリア数の把握

HCV持続感染者(HCVキャリア)がどのくらいの規模で社会に存在するのかについて人数規模や地域年齢偏在を把握することは、社会に対して疾病が与える規模(burden)を測るうえでも、また、対策を講じるうえでも重要である。

- 検診などで陽性と判定されても、医療機関を受診する割合が低いことが現時点の問題点。
- 「感染を知らないまま潜在している HCV キャリア」に対して積極的に肝炎ウイルス検査を推進することが重要であるが、検査後「陽性」と判定された場合、肝臓専門医による診断と医療機関への継続受診が重要。
- マルコフの過程モデルによる推定では、治療介入を行わない場合、男性では 50 歳、女性では 60 歳を過ぎるころから肝発癌率が上昇する。

表 1 HCV 感染の新規発生率(1988～2004)

	対象者	新規感染例	観察人年	新規感染率(95% CI)
● 供血者【広島】 1992～1995	114,266	3	168,726	1.8/10 万人年 (0.4～5.2/10 万人年)
1994～2004	218,797	16	861,842	1.9/10 万人年 (1.1～3.0/10 万人年)
● 供血者【大阪】 1992～1997	448,020 ※抗体陽転	59	1,095,668	5.4/10 万人年 (4.1～7.0/10 万人年)
● 定期健康診断受診者【広島】 1992～1995	3,079	3	5,786	0/10 万人年 (0～0.6/10 万人年)
● 障害者・老人福祉施設入所者【静岡】 1988～1992	678	0	2,712	0/10 万人年 (0～1.3/10 万人年)
● 血液透析施設【広島】 1999～2003	2,114	16	4,893	3.3/1,000 人年 (1.7～4.9/1,000 人年)

しかし、肝炎ウイルスに感染している人のほとんどは自覚症状がない、肝臓の状態が進行しても自覚症状が現れにくい、という特性を持っているため、なかなか肝病態別の数を把握することはむずかしい。

既述した二つの大規模集団から得られた年齢階級別肝炎ウイルスキャリア率を用いて、肝炎ウイルスキャリア数の推計を行ったところ、2005 年時点の全年齢層において、HCV キャリア数は 807,903 人(95% CI: 68.0～97.4 万人)と算出<sup>6)</sup>される。この値は、初回供血者集団および肝炎ウイルス検診受診者集団におけるキャリア率からの推計値であることから、自身が「感染を知らないまま潜在しているキャリア」の

推計数に相当している。

「感染を知らないまま潜在しているキャリア」に対しては、積極的に肝炎ウイルス検査を推進することが重要であると同時に、検査後に陽性と判定された場合の医療機関受診へのシエマを構築することも大事である。検診などで陽性と判定されても、医療機関を受診する割合が低いことが現時点の問題点として指摘<sup>10)</sup>されている。

献血を契機に偶然に発見された HCV キャリアのうち医療機関へ受診した 1,019 例(平均年齢 45.3 歳)の初診時の肝病態の内訳<sup>11)</sup>をみると、肝病態が慢性肝炎以降に進展していたのは肝癌症例も含み 54% と半数を超えていたこと、また、治療介入を行わない場合には、マルコフ過

- 若い世代における HCV キャリア率は低い値を示す。
- 「肝炎対策基本法」を基盤としてすでに感染しているキャリアへの対策が積極的に進められている。

程モデルにより推定<sup>12)</sup>すると、男性では 50 歳、女性では 60 歳を過ぎるころから肝発癌率が上昇しはじめ、60 歳時点の男性の約 10%、女性の 7~8% が肝癌へ、また、70 歳時点の男性の約 38%、女性の約 20% が肝癌に進展すると考えられたことから、検査後に陽性と判定された場合には医療機関受診と継続受診が必須であるといえる。

## 肝炎・肝癌対策について

社会生活全般における肝炎ウイルス感染の発生要因が徐々に減少し、若い世代における HCV キャリア率は低い値を示すに至っているが、「肝炎対策基本法」(2009 年 12 月)を基盤として、すでに感染しているキャリアへの対策、具体的には、肝炎ウイルス検査の推進、肝疾患診療ネットワークの構築、新規治療法の開発に加え、肝炎患者の経済的負担の軽減や抗ウイルス療法の受療推進のための医療費助成制度等の事業などが積極的に進められている。

わが国では、世界に先がけて肝炎ウイルス持続感染者の規模の把握や治療を含めた肝炎・肝癌対策が実施されてきたが、これまで行ってきた肝炎ウイルス感染の動向調査・感染防止対策を継続しつつ、肝炎ウイルスキャリアが適切な時期に適切な治療が受けることができるよう、さらに対策を推進することが求められている。

## 文 献

1) World Health Organization : Hepatitis C. (Global

- alert and Prevention, 2002)
- 2) World Health Organization : Hepatitis C. (Fact sheet N164. Updated June 2011 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>))
  - 3) International Agency for Research on Cancer (IARC) : Liver Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008, GLOBOCAN 2008
  - 4) Hashimoto, E. et al. : Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis : Growing evidence of an epidemic? *Hepatol Res* **42** (1) : 1-14, 2012
  - 5) Okanoue, T. et al. : Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* **26** (suppl 1) : 153-162, 2011
  - 6) Tanaka, J. et al. : Total numbers of undiagnosed carriers of hepatitis C and B viruses in Japan estimated by age- and area-specific prevalence on the national scale. *Intervirology* **54** (4) : 185-195, 2011
  - 7) Tanaka, J. et al. : Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. *Intervirology* **51** : 33-41, 2008
  - 8) Sasaki, F. et al. : Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. *J Epidemiol* **61** : 182-194, 1994
  - 9) Kumagai, J. et al. : Hepatitis C virus infection in 2,744 hemodialysis patients followed regularly at nine centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003. *J Med Virol* **76** : 498-502, 2005
  - 10) 海嶋照美ほか : 広島県の肝炎対策について. 平成 22 年度 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 肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入対策に関する研究報告書, p.54-56, 2011
  - 11) Mizui, M. et al. : Liver disease in hepatitis C virus carriers identified at blood donation and their outcomes with or without interferon treatment : Study on 1019 carriers followed for 5-10 years. *Hepatol Res* **37** : 994-1001, 2007
  - 12) Tanaka, J. et al. : Natural histories of hepatitis C virus infection in men and women simulated by the Markov model. *J Med Virol* **70** : 378-386, 2003

## 岡山県における肝炎ウイルス検診陽性者の医療機関受診等に関する追跡調査

仁科 惣治<sup>1)</sup>、栗原 淳子<sup>2)</sup>、則安 俊昭<sup>2)</sup>、糸島 達也<sup>3)</sup>、山本 和秀<sup>4)</sup>、  
田中 純子<sup>5)</sup>、日野 啓輔<sup>1)</sup>

- 1) 川崎医科大学 肝胆膵内科学
- 2) 岡山県保健福祉部健康推進課
- 3) 岡山県医師会 (岡山済生会総合病院)
- 4) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学
- 5) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 疫学・疾病制御学

### 緒言:

平成 14 年から 18 年までの 5 年間に老人保健法に基づく保健事業として 40 歳から 70 歳までの受診対象者に対して 5 歳刻みで節目検診が行われ、また節目検診の対象者とならないが肝炎ウイルス感染の可能性が高い者（過去に肝機能異常を指摘されたことのある者、広範な外科的処置を受けたことのある者又は妊娠・分娩時に多量に出血したことのある者であって定期的に肝機能検査を受けていない者、基本健康診査の結果、ALT (GPT) 値により要指導とされた者）に対して節目外検診が行われた。これらの検診により新たな肝炎ウイルス感染者が見いだされたが、その後の医療機関受診状況や肝炎に対する治療状況については、岡山県が平成 17 年度に市町村の協力の下で調査を行って以来、実態が把握されていないのが現状であった。田中らは「広島県における検診結果」として広島県 12 市町において聞き取り調査を行い、平成 21 年度報告書に報告している<sup>5)</sup>。それによると、HBV キャリアにおいては、回答率を考慮した医療機関受診率 48%、把握されている HBV キャリア 709 名中 440 名から回答があった(回答率 62.1%)。また、HCV キャリアにおいては、回答率を考慮した医療機関受診率 65%、把握されている HCV キャリア 630 名中 439 名から回答があった(回答率 69.7%)。また、医療機関受診率に関しては、HBV キャリアにおいては「現在受診中」が 62%、「以前受診した」が 15%、「受診していない」が 23%

であり、HCV キャリアにおいては「現在受診中」が 80%、「以前受診した」が 13%、「受診していない」が 7%にすぎなかった。

そこで、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「肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入に関する研究」の一環として、岡山県における平成 14 年度から 18 年度までの節目・節目外検診で新たに見いだされた肝炎ウイルス感染者について、その後の医療機関受診状況や肝炎に対する治療状況を把握する目的でアンケートによる追跡調査を行ったので報告する。

#### 対象と方法:

対象は岡山県において平成 14 年度から 18 年度までの検診（節目・節目外）で肝炎ウイルス感染が判明した 2,566 人（B 型 974 人、C 型 1,592 人）のうち、調査可能であった 24 市町村において既に追跡調査等が行われていた肝炎ウイルス感染者を除いた 1,352 人（52.7%）（B 型 549 人、C 型 803 人）であった。調査用紙は各市町村より直接肝炎ウイルス陽性者へ郵送され、また一部の市町村（笠岡市 58 人、勝央町 11 人）においては保健師が直接聞き取り調査を行った。回答後の調査用紙は肝炎ウイルス陽性者から匿名の形で本研究の事務局である川崎医科大学肝胆膵内科学研究室へ直接郵送された。

アンケートは以下の項目について調査を行った。1. 在住市町村。2. 陽性と通知されたのは B 型肝炎ウイルス（HBV）か C 型肝炎ウイルス（HCV）か。3. 性別と年齢。4. 「肝炎ウイルス感染の可能性が高い」と通知を受けて医療機関を受診したか否か。5. 受診していない場合その理由。6-1. 受診した場合は受診先がかかりつけ医か専門医療機関か。6-2. 受診先での診断名。7. 現在も通院を継続しているか否か。8. 通院を中止した場合はその理由。9. 治療を受けている場合は主な内容。

#### 結果:

調査を行った 1,352 人のうち 716 人（53%）より回答が得られた。このうち 11 人は既にウイルス性慢性肝炎として医療機関に通院していながら検診を受けており、8 人は調査用紙の返送はあったものの無回答であり、1 人は肝炎ウイル

ス陰性という回答であったため、この20人を除外した696人を分析対象とした。肝炎ウイルス別ではB型が243人、C型が429人、B型とC型の重複感染が3人、B型、C型の区別がないのが21人であった。平均年齢と性別（男/女）はB型が66.6歳（77/166）、C型が72.1歳（142/287）であった。この検診は老人保健法に基づく健康診査の一環であることから、一般的な肝炎ウイルスキャリアに比べて年齢層が高い集団であると考えられた。

医療機関受診率はアンケートに対する回答があった中で解析すると85%（211+397/716）であったが、調査表の回答者ではなく、調査表送付者に対する割合で算出したところ、B型が38.4%（211/549）、C型が49.4%（397/803）であった。したがって調査表の回答がなかった肝炎ウイルス陽性者はすべて受診していないと見なした数値である。「検診結果通知後受診しなかった」という回答者についてその理由を見てみると、「必要がないと思った」「肝機能に異常がない」「高齢である」「自覚症状がない」などの回答があった。受診したと答えたものの中の医療機関の受診先については、かかりつけ医の占める割合がB型で118人/211人（56%）、C型で162人/397人（41%）であった。受診時の診断名はB型では211人中、肝機能異常なし、あるいは軽度異常程度が82.5%、慢性肝炎が11.4%、肝硬変・肝細胞癌が0.6%、残りの5.5%は不明であったのに対し、C型では397人中、肝機能異常なし、あるいは軽度異常程度が56.9%、慢性肝炎が26.2%、肝硬変・肝細胞癌が5.5%、残りの11.4%は不明であり、C型はB型に比べて比較的進行した肝疾患を診断される割合が高かった。

医療機関受診者のその後の通院継続の有無については、B型が53.1%（129/211）、C型が73.4%（314/397）の割合で通院を継続していた。通院を継続している場合の受療内容は、B型129人中の12.4%が核酸アナログ製剤の投与を受けており、C型314人中の23.3%がインターフェロン治療を受けていた。

通院を中止した理由では、「担当医から通院しなくてよいと言われた」というのが最も多く、B型の通院中断者82人のうち71.8%、C型の通院中断者83人のうち57%を占めた。

#### 考察：

今回岡山県で平成14年度から18年度にかけて行われた肝炎ウイルス検診の陽性者に対する追跡調査を行ったが、B型陽性者とC型陽性者では多少病態が異なるた

め、医療機関での診断名の割合が異なっていた。無症候性キャリアの割合が高い B 型では肝機能異常なし、あるいは軽度異常程度が 82.5%を占めており、またこの影響なのか医療機関通院継続率も C 型に比べて低かった。田中らは「広島県における検診結果」として広島県 12 市町において聞き取り調査を行い、平成 21 年度報告書に報告している<sup>1)</sup>。HBV キャリアにおいては、回答率を考慮した医療機関受診率 48%、把握されている HBV キャリア 709 名中 440 名から回答があった(回答率 62.1%)。また、HCV キャリアにおいては、回答率を考慮した医療機関受診率 65%、把握されている HCV キャリア 630 名中 439 名から回答があった(回答率 69.7%)。それによると医療機関受診率に関しては、HBV キャリアにおいては「現在受診中」が 62%、「以前受診した」が 15%、「受診していない」が 23%であった。一方 HCV キャリアにおいては「現在受診中」が 80%と高く、「以前受診した」が 13%、「受診していない」は 7%にすぎなかった。B 型陽性者の通院中断の理由として、担当医から「通院しなくてもよい」と言われた割合が 71.8%認められた点も今後の課題と考えられる。したがって、抗ウイルス療法が適切に行われていない可能性もあり、ウイルス肝炎治療のガイドラインに準じた治療の啓発をさらに推進する必要があると考えられた。現在、B 型肝炎ウイルス感染者の肝発癌危険因子はウイルス量(HBV-DNA)であることが明らかにされているので<sup>2)</sup>、トランスアミナーゼの値でフォローを中断するようなことは慎むべきであり、こうした点は肝臓専門医以外の医師にもっと広く啓発していく必要があると考えられる。

わが国の肝癌患者は高齢化が進んでおり、岡山県も例外ではない。今回の調査においてもアンケート回答者の平均年齢は高齢であった。肝炎ウイルス陽性の高齢者は肝癌の高危険群であり<sup>3-5)</sup>、医療機関での経過観察あるいは治療が極めて重要である。これを実現するためには全県的な肝炎ウイルス陽性者の把握とともに地域に密接した保健活動を行政も含めてさらに推進していく必要がある。

## 結論：

岡山県において平成 14 年度から 18 年度に実施された肝炎ウイルス検診(節目・節目外検診)で見出された陽性者について、その後の医療機関受診状況や受療状況を把握する目的で追跡調査を行った。肝炎ウイルス検診陽性者に対する医療機関への受診勧告や通院継続率の引き上げなどが今後の更なる課題と考えられた。



#### 参考文献：

- 1) 報告書：田中純子、他：平成 21 年度 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 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究 研究報告書, 2010; 11-14
- 2) Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. JAMA 2006; 295: 65-67
- 3) Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, et al. Hepatology 1999; 29: 1124-1130
- 4) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al. Hepatology 1998; 27: 1394-1402
- 5) Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al. Gastroenterology 2012; 142: 1140-1149

#### 英文要旨

A follow-up survey of hepatitis virus carriers after notification of their infection in Okayama prefecture

Sohji Nishina<sup>1)</sup>, Junko Kurihara<sup>2)</sup>, Toshiaki Noriyasu<sup>2)</sup>, Tatsuya Itoshima<sup>3)</sup>, Kazuhide Yamamoto<sup>4)</sup>, Junko Tanaka<sup>5)</sup>, Keisuke Hino<sup>1)</sup>

In Okayama prefecture we investigated by questionnaires whether hepatitis B virus (HBV) (n=549) or hepatitis C virus (HCV) carriers (n=803) consulted a doctor after they had been informed of their infection at their initial checkup for viral hepatitis between 2002 and 2006. The ratio of patients who consulted a doctor after notification of infection was 38.4% (211/549) of HBV carriers and 49.4% (397/803) of HCV carriers, respectively. Among those patients, 53.1% of HBV carriers and 73.4% of HCV carriers were on follow care at the start of this investigation. These results indicated a need to establish a more effective follow up system for hepatitis virus carriers following notification at the initial medical checkup.

Key words : virus hepatitis, medical checkup, follow-up survey

- 1) Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical School
- 2) Public Health Policy Division, Department of Health and Social Welfare, Okayama Prefectural Government
- 3) Okayama Prefectural Medical Association (Okayama Saiseikai General Hospital)
- 4) Department of Gastroenterology and Hepatology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences
- 5) Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Hiroshima University, Institute of Biomedical and Health Sciences

# Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease

Yoshiki Murakami<sup>1\*</sup>, Hidenori Toyoda<sup>2</sup>, Toshihito Tanahashi<sup>3</sup>, Junko Tanaka<sup>4</sup>, Takashi Kumada<sup>2</sup>, Yusuke Yoshioka<sup>5</sup>, Nobuyoshi Kosaka<sup>5</sup>, Takahiro Ochiya<sup>5</sup>, Y-h Taguchi<sup>6</sup>

**1** Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan, **2** Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Japan, **3** Department of Medical Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan, **4** Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan, **5** Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan, **6** Department of Physics, Chuo University, Tokyo, Japan

## Abstract

**Background:** miRNAs circulating in the blood in a cell-free form have been acknowledged for their potential as readily accessible disease markers. Presently, histological examination is the golden standard for diagnosing and grading liver disease, therefore non-invasive options are desirable. Here, we investigated if miRNA expression profile in exosome rich fractionated serum could be useful for determining the disease parameters in patients with chronic hepatitis C (CHC).

**Methodology:** Exosome rich fractionated RNA was extracted from the serum of 64 CHC and 24 controls with normal liver (NL). Extracted RNA was subjected to miRNA profiling by microarray and real-time qPCR analysis. The miRNA expression profiles from 4 chronic hepatitis B (CHB) and 12 non alcoholic steatohepatitis (NASH) patients were also established. The resulting miRNA expression was compared to the stage or grade of CHC determined by blood examination and histological inspection.

**Principal Findings:** miRNAs implicated in chronic liver disease and inflammation showed expression profiles that differed from those in NL and varied among the types and grades of liver diseases. Using the expression patterns of nine miRNAs, we classified CHC and NL with 96.59% accuracy. Additionally, we could link miRNA expression pattern with liver fibrosis stage and grade of liver inflammation in CHC. In particular, the miRNA expression pattern for early fibrotic stage differed greatly from that observed in high inflammation grades.

**Conclusions:** We demonstrated that miRNA expression pattern in exosome rich fractionated serum shows a high potential as a biomarker for diagnosing the grade and stage of liver diseases.

**Citation:** Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, et al. (2012) Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease. PLoS ONE 7(10): e48366. doi:10.1371/journal.pone.0048366

**Editor:** Xiao-Ping Miao, MOE Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, China

**Received:** May 17, 2012; **Accepted:** September 24, 2012; **Published:** October 31, 2012

**Copyright:** © 2012 Murakami 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:** Y.M, J.T, and T.K. were financially supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H22-general-008) and Y.M, J.T, T.K, and Y.T. received Grants-in-Aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (22590727). 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: m2079633@med.osaka-cu.ac.jp

## Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a gene family that is evolutionarily conserved and have important roles in the control of many biological processes, such as cellular development, differentiation, proliferation, apoptosis, and metabolism [1]. Aberrant expression of miRNAs in liver tissue has been implicated in the progression of liver fibrosis, and hepatocarcinogenesis [2,3,4]. Recently, two independent groups showed that miR-122 plays a critical role in the maintenance of liver homeostasis and anti-tumor formation [5,6].

Exosome in one of the endoplasmic reticulum carries mRNAs and miRNAs [7]. Recently, it has become clear that exosome perform intercellular signaling through miRNA. miRNAs are released through a ceramide-dependent secretory machinery and are then transferred and become functional in the recipient cells

[8]. In a prior study using human blood and cultured cells, several miRNAs were selectively packaged into microvesicle (MV) and actively secreted [9]. In another study, miRNAs originating from EBV was transported by exosome and then participated in the immune response of host cells [10]. In HCC cells as well, this type of exosome-mediated miRNA transfer is an important mechanism of intercellular communication [11].

It has also become clear that exosome can adjust to immune function, control infection or carry the virus itself. Exosomes of T, B and dendritic immune cells contain a repertoire of miRNAs that differ from that of their parent cells [12,13]. Exosomes released from nasopharyngeal carcinoma cells harboring latent EBV were shown to contain LMP1, signal transduction molecules, and virus-encoded miRNAs [14]. Retroviruses evade adaptive immune responses by using nonviral or host exosome biogenesis pathways to form infectious particles and as a mode of infection [15].

Recent evidence has shown that the expression patterns of serum or plasma miRNAs are altered in several diseases, in particular heart disease, sepsis, malignancies, and autoimmune diseases (reviewed in [16]). Discoveries such as this is encouraging and has propelled further research leading to the hypothesis that circulating miRNAs are detectable in serum and plasma in a form sufficiently stable to serve as biomarkers [17,18]. One such example is that tumour-associated miRNAs were found in the serum of diffuse large B-cell lymphoma patients [19]. In other examples, serum levels of miR-34a and miR-122 were associated with histological disease severity in patients with CHC or non-alcoholic fatty-liver disease (NAFLD) [20]. In fact, the serum level of miR-122 strongly correlates with serum ALT activity and with necro-inflammatory activity in patients with CHC and elevated ALT levels. However, there seems to be no significant correlation between fibrosis stage and functional capacity of the liver [21]. The expression levels of miR-122 and miR-194 correlated negatively with age in patients with CHB and HBV associated acute-on-chronic liver failure [22]. The expression level of miR-122 in serum was found to be closely related to non drug-induced acute liver injury [23]. Based on the above, it comes as no surprise that recently, the expression profile from extracellular miRNA is being used clinically to diagnose various diseases.

Here, in order to obtain data with high resolution that is reproducible, we extracted MVs from serum using exoquick and then performed a comprehensive microarray analysis. We attempted to diagnose HCV infection, and ascertain the degree of liver inflammation and fibrosis stage using exosome-rich fractionated miRNA. In short, we investigate if serum-derived miRNAs had the potential to serve as non-invasive bio-markers for various liver diseases.

## Results

### Reproducible Gene-analysis Using Microarray

In microarray experiments, serum analysis is comparatively easy; however, the downside is that the accuracy and reproducibility of the results are usually not satisfactory. To circumvent this drawback, we devised a procedure that would give us higher accuracy and reproducibility. Serum samples from NL subjects were prepared and divided into two groups; for the first, RNA was extracted using exoquick treated serum, and in the second, RNA was extracted from total serum. Next, miRNA expression was analyzed using Agilent miRNA microarray. The above procedure was performed independently twice (Fig. 1A). We compared the miRNA expression pattern among the four microarray results (Fig. 1B) and found that miRNA expression analysis using exoquick was the more reliable and reproducible (Fig. 1C).

Exosome from normal human prostatic cell lines PNT-2, was yielded by the conventional ultra-centrifugation method [8]. We prepared serums with and without exoquick treatment and performed immunoblot analysis with anti-CD63 (Fig. 1D). Bands of the expected relative sizes were detected with exoquick. We designated RNA extracted using exoquick treated serum as exosome-rich fractionated RNA.

### Unique Expression Pattern of miRNA in CHC

We attempted to diagnose CHC using the miRNA expression pattern found in the peripheral blood samples from 64 CHC and 24 NL. The expression of nine miRNAs (miR-1225-5p, miR-1275, miR-638, miR-762, miR-320c, miR-451, miR-1974, miR-1207-5p, and miR-1246) allowed us to categorize patients as CHC or NL with 96.59% accuracy (Fig. 2, 3 Table 1 and Table S1). As shown in Fig. 2C, CHC and NL were well differentiated due to

their distinct miRNA expression patterns. The expression pattern of 12 miRNAs led to the distinction of CHC, CHB, NASH, and NL with 87.50% accuracy (Fig. 4, S1A, and Table S1). The accuracy of determining whether samples were CHC or CHB, CHC or NASH, CHB or NASH was 98.35%, 97.37%, and 87.50%, respectively. The accuracy of judging whether samples were NL or CHB, NL or NASH, was 89.29% and 88.89%, respectively (Fig. 3, S1B and Table S1). Unlike CHC and NL, there were relatively fewer analyses done of CHB and NASH (due to a small sample size), therefore, we used “*in silico*” resampling to overcome any possible bias. With “*in silico*” we found that it was highly reproducible to determine with high accuracy whether samples were CHC, CHB, NASH, or NL, CHC or CHB, CHC or NASH, CHC or NL, CHB or NASH, CHB or NL, or finally NASH or NL (Fig. S2 to S8 and Supporting Information).

In order to validate our above-mentioned classifications, we prepared a separate independent sample consisting of 31 CHC, 16 CHB, and 8 NASH. We established miRNA expression patterns using microarray for each of these chronic liver disease groups. We tried to discriminate among the classifications in the independent cohort using the semi-supervised learning method [24] based only on the labels in the original sample group and the selected miRNAs shown in Table S1. The accuracy of judging whether samples were CHB or CHC, CHC or NASH, CHB or NASH, was 74.47%, 87.18%, and 79.19%, respectively (Fig. S9, Table 1, and Supporting Information). During the process of obtaining these results, we noticed that different versions of the Feature Extraction (FE) Software provided slightly different results, however it was not possible to fully unify these versions of FE. This may explain the relatively lower performance of the independent group compared with the original samples that mostly used the same FE Software versions.

### miRNA Expression Correlates with the Grade of Liver Inflammation

The grade of inflammation for CHC patients was ascertained by liver histological examination, and then samples were divided into four groups A0, A1, A2, and A3 based on their fibrosis stage. miRNA expression profiles were then established for CHC according to each of their inflammation grade. From the four groups (A0 to A3), a combination of six arbitrary pairs is possible. miRNAs which had significant differential expression in five or more of the six pairs were extracted ( $p < 0.05$ ). Five miRNAs (miR-1914\*, miR-193a-5p, miR-22, miR-659, and miR-711) had expression levels that increased as the severity of liver inflammation progressed. On the other hand, the expression levels of nine miRNAs (miR-1274b, miR-197, miR-1974, miR-21, miR-34a, miR-451, miR-548d-5p, miR-760, and miR-767-3p) significantly decreased with the progression of liver inflammation (Fig. 5, S10 and Table S2).

### The Grade of Liver Fibrosis Corresponded with the Expression Level of miRNAs

As previously noted, CHC samples were divided into F0, F1, F2, and F3 based on patients' fibrotic stage. From these four fibrotic groups, a combination of six arbitrary pairs were possible. miRNAs that had significant differential expression in all six pairs were extracted ( $p < 0.05$ ). The expression levels of two miRNAs (miR-483-5p and miR-671-5p) significantly increased the higher the fibrotic stage and the expression level of 14 miRNAs (let-7a, miR-106b, miR-1274a, miR-130b, miR-140-3p, miR-151-3p, miR-181a, miR-19b, miR-21, miR-24, miR-375, miR-548l, miR-93, and miR-941) became progres-