

**Fig. 6** (a) Sucrose gradient analysis of the culture media of Huh7 cells that had been co-transfected with wild-type HBV/G and the CMV-HBV/A2-core plasmid. It was subjected to ultracentrifugation through a 10–60% (w/w) sucrose density gradient. Density of each fraction is shown as a line with diamond symbols. Fractions were diluted 10-fold and tested for HBsAg (●) (IU/mL), HBcrAg (▲) (KU/mL) and HBV DNA (□) ( $10^4$  copies/mL). (b) Sucrose gradient analysis of culture supernatant obtained from the cells that were subjected to CMV-HBV/A2/core montransfection using the same protocol. (c) Western blot analysis for HBV core protein was probed by anti-HBc antibody. HBV/G/core and HBV/A2/core were obtained from cell lysates that were transfected with the wild-type HBV/G clone and the wild-type HBV/A2 clone, respectively. The 'HBV/G + CMV-HBV/A2/core' was obtained from sucrose high-density fraction 22 (Fig. 6a) that had been co-transfected with wild-type HBV/G and the CMV-HBV/A2-core plasmid by means of immunoprecipitation using anti-HBs-coated magnetic beads.

enough for viral replication because the core promoter of HBV/G was not capable of generating sufficient amounts of core protein to enhance HBV replication. As well, an HBV/

G/A2-CP construct containing the HBV/A core promoter region in the context of the wild-type HBV/G genome did not enhance replication, even though its core protein

production was significantly increased (Figs 5a,b). Although it was previously reported that the 36-nt insertion of the HBV/G core gene was required for both efficient core protein expression and HBV/G replication [13], in this study, the discrepancy between viral replication and core production of the HBV/G/A2-CP clone might indicate insufficient virion assembly due to the larger core protein of HBV/G (12-aa unique insertion). *Trans*-complementation experiments carried out by Gutelius *et al.* [14] demonstrated an association between enhanced core protein level and reduced replication capacity only when the core and polymerase proteins are expressed from the same RNA template. Thus, it was indicated that HBV/G itself could not replicate sufficiently due to a defect in its core protein and/or the core promoter of HBV/G.

Finally, we investigated whether HBV/G utilises the core protein of HBV/A2 for virion packaging. Dane particles obtained from the culture supernatants of cells that had been co-transfected with HBV/G and CMV-HBV/A2/core were assessed by Western blotting, and it was found that the Dane particles of HBV/G contained HBV/A core proteins. Thus, it was implied that HBV/G replication is enhanced by the core protein of HBV/A because it is more suitable for virion packaging than its own core protein, suggesting that the core protein of HBV/A is a key element enhancing the replication of HBV/G during co-infection. Interestingly, our experiments demonstrated that there were large differences in core protein expression among the CMV-core constructs of different genotypes, despite the fact that all of the CMV-core constructs had the same CMV promoter (Fig. 4b). In a previous report, it was speculated that the core protein binds to its own mRNA to influence

protein translation [13]. For example, dihydrofolate reductase protein has been found to downregulate its own translation by binding to cognate mRNA [27,28]. Therefore, we predict that the core protein of HBV/A2 enhances HBV/G replication by affecting viral promoters or transcription in addition to its role in virion packaging.

In conclusion, enhanced replication of HBV/G requires the HBV/A2 core protein during co-infection with HBV/A2. Our findings provide a possible explanation that the core protein of HBV/A2 is more suitable for virion packaging rather than that of HBV/G, and the replication of HBV/G occurs at a very low level, which may be due to defects in its core protein functions and/or core promoter activity. Further experiments are warranted to clarify the detailed roles of the enhanced HBV/G replication by co-infection with the other genotype and the clinical manifestation of HBV/G infection.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported, in part, by a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. We thank Ms H. Nagamura of Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan, for doing serological assays.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

#### REFERENCES

- 1 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(7): 395–403. Epub 2002/07/20.
- 2 Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2011; 16(8): 1169–1186. Epub 2011/12/14.
- 3 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastroewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y *et al.* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575–2583. Epub 1988/10/01.
- 4 Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198(2): 489–503. Epub 1994/02/01.
- 5 Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K *et al.* Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001; 34(3): 590–594. Epub 2001/08/30.
- 6 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF *et al.* A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81(Pt 1): 67–74. Epub 2000/01/21.
- 7 Kato H, Orito E, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F *et al.* Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G. *Hepatology* 2002; 35(4): 922–929. Epub 2002/03/27.
- 8 Osiowy C, Gordon D, Borlang J, Giles E, Villeneuve JP. Hepatitis B virus genotype G epidemiology and co-infection with genotype A in Canada. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 12): 3009–3015. Epub 2008/11/15.
- 9 Suwannakarn K, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Abe K, Poovorawan Y. A novel recombinant of hepatitis B virus genotypes G and C isolated from a Thai patient with hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt 11): 3027–3030. Epub 2005/10/18.
- 10 Sanchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of Mexican

- patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology* 2007; 50(1): 9–15. Epub 2006/12/14.
- 11 Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatema-tsu K *et al.* Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfectd with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes. *Virology* 2008; 376(2): 408–415. Epub 2008/05/14.
  - 12 Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R *et al.* Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002; 76(12): 6131–6137. Epub 2002/05/22.
  - 13 Li K, Zoulim F, Pichoud C, Kwei K, Villet S, Wands J *et al.* Critical role of the 36-nucleotide insertion in hepatitis B virus genotype G in core protein expression, genome replication, and virion secretion. *J Virol* 2007; 81(17): 9202–9215. Epub 2007/06/15.
  - 14 Gutelius D, Li J, Wands J, Tong S. Characterization of the pleiotropic effects of the genotype G-specific 36-nucleotide insertion in the context of other hepatitis B virus genotypes. *J Virol* 2011; 85(24): 13278–13289. Epub 2011/10/14.
  - 15 Sugiyama M, Tanaka Y, Sakamoto T, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S *et al.* Early dynamics of hepatitis B virus in chimeric mice carrying human hepatocytes monoinfected or coinfectd with genotype G. *Hepatology* 2007; 45(4): 929–937. Epub 2007/03/30.
  - 16 Lacombe K, Massari V, Girard PM, Serfaty L, Gozlan J, Pialoux G *et al.* Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *AIDS* 2006; 20(3): 419–427. Epub 2006/01/28.
  - 17 Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK *et al.* Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 2006; 44(4): 915–924. Epub 2006/09/29.
  - 18 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(3): 1059–1063. Epub 1991/02/01.
  - 19 Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F *et al.* The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2005; 79(9): 5548–5556. Epub 2005/04/14.
  - 20 Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* 1993; 67(6): 3254–3263. Epub 1993/06/01.
  - 21 Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S *et al.* Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 44(2): 326–334. Epub 2006/07/28.
  - 22 Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S *et al.* Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 21713–21719. Epub 2005/04/09.
  - 23 Fujiwara K, Tanaka Y, Paulon E, Orito E, Sugiyama M, Ito K *et al.* Novel type of hepatitis B virus mutation: replacement mutation involving a hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B virus genotype E. *J Virol* 2005; 79(22): 14404–14410. Epub 2005/10/29.
  - 24 Orchard S, Martens L, Tasman J, Binz PA, Albar JP, Hermjakob H. 6th HUPO Annual World Congress – Proteomics Standards Initiative Workshop 6–10 October 2007, Seoul, Korea. *Proteomics* 2008; 8(7): 1331–1333. Epub 2008/03/05.
  - 25 Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology* 2010; 40(1): 14–30. Epub 2010/02/17.
  - 26 Osiowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5473–5477. Epub 2003/12/10.
  - 27 Chu E, Takimoto CH, Voeller D, Grem JL, Allegra CJ. Specific binding of human dihydrofolate reductase protein to dihydrofolate reductase messenger RNA in vitro. *Biochemistry* 1993; 32(18): 4756–4760. Epub 1993/05/11.
  - 28 Ercikan-Abali EA, Banerjee D, Waltham MC, Skacel N, Scotto KW, Bertino JR. Dihydrofolate reductase protein inhibits its own translation by binding to dihydrofolate reductase mRNA sequences within the coding region. *Biochemistry* 1997; 36(40): 12317–12322. Epub 1997/10/07.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Data S1.** Plasmid construct of HBV/G.

Fibroscan<sup>®</sup>による線維化診断と発癌予測

吉岡 健太郎\* 橋本 千樹\* 川部 直人\*  
原田 雅生\* 西川 徹\* 市野 直浩\*  
刑部 恵介\*

索引用語：肝硬度，肝線維化，ウイルス性肝炎

## 1 はじめに

肝線維化 stage 診断の gold standard は肝生検である。しかし肝生検は疼痛や出血のリスクを伴う侵襲的な検査であり，費用も高く繰り返し行うことは難しい。またサンプリングエラーやサンプル量が不十分なために，正確性が問題になることもある。さらに病理診断の主観性や半定量性の問題もある。そこで近年肝線維化の非侵襲的な評価法として肝硬度測定 (liver stiffness measurement ; LSM) の臨床応用が進んでいる。

肝硬度測定法としては Transient elastography (TE; Fibroscan)，acoustic radiation force impulse (ARFI)，real-time tissue elastography (RTE) などがある。これらによる肝硬度測定はウイルス性肝炎や脂肪肝炎において良好な線維化 stage 診断能を有し，抗ウイルス療法開始時期の判断，治療効果の予測，治療効果の評価，肝炎の自然経過の評価，

肝発癌予測などに有用である<sup>1)</sup>。

本稿では Fibroscan<sup>®</sup> による線維化診断と肝発癌予測について述べる。Fibroscan<sup>®</sup> は最近保険収載されたので，今後より多くの施設で活用されると考えられる。

2 Fibroscan<sup>®</sup>による肝硬度測定法

2003年にフランスのEchosens社がFibroscan<sup>®</sup>を発表した(図1)。この装置は体表から肝臓にせん断波を送り，超音波でせん断波を追跡し，肝臓内での伝播速度を測定して肝硬度を算出する。せん断波の伝播速度は組織の硬度に比例し，組織が硬いほどせん断波はより速く伝播する。肝硬度の測定値はキロパスカル(kPa)で表示される(図2)。手技としては，超音波装置と振動子を備えたプローブを肋間の体表面にあてボタンを押すのみであるが，その際MモードとAモードのイメージを参考にして，少なくとも6cmの厚さがあり(測定は2.5～4.5cmの範囲で行わ

Kentaro YOSHIOKA *et al* : Fibroscan for assessment of fibrosis stage and risk of hepatocellular carcinoma

\*藤田保健衛生大学肝胆膵内科 [〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98]

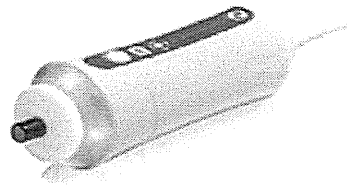
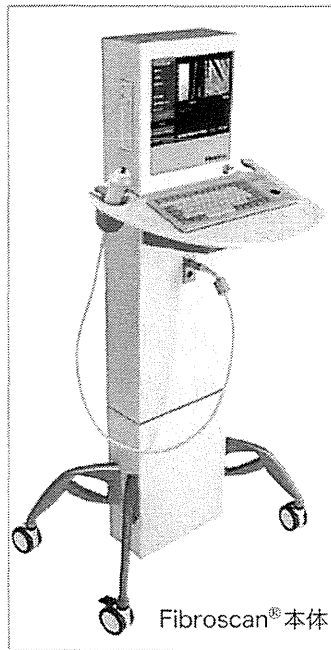
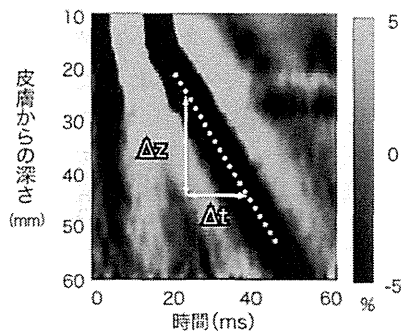


図1



- せん断波の伝播速度Vsを超音波で計測する  
 $V_s \text{ [m/sec]} = \Delta Z / \Delta t$
- 軟部組織の硬度E  
 $E \text{ [Pa]} = 3\rho V_s^2$

Fibroscan®のディスプレイと肝硬度測定例

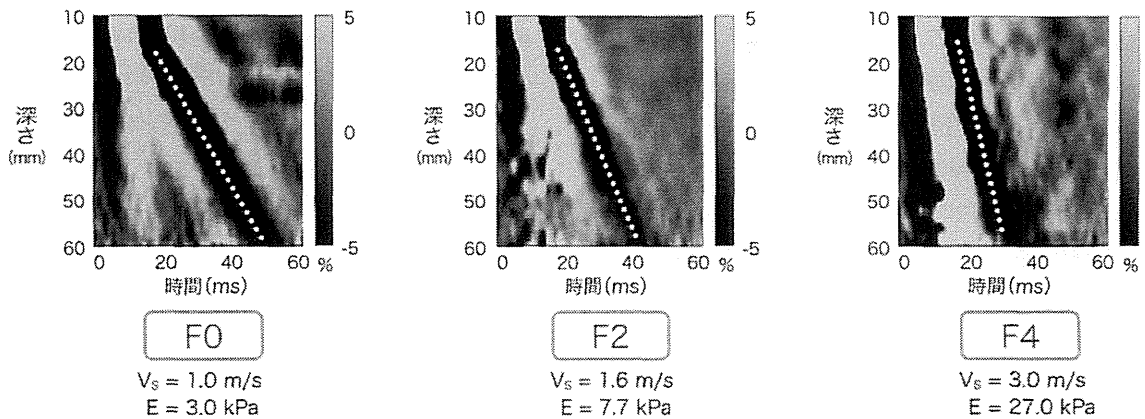


図2 Fibroscan®のディスプレイと肝硬度の計算法

表1 肝線維化 stage 診断のための肝硬度 cut off 値

	F2以上	F3以上	F4
Cut off value (kPa)	7.1	9.6	11.6
Positive Predictive Value (%)	86.0	72.5	41.5
Negative Predictive Value (%)	73.6	92.7	98.2
Sensitivity (%)	80.8	87.7	91.7
Specificity (%)	80.3	82.4	78.0
Positive Likelihood Ratio	4.1	5.0	4.2
Diagnostic Accuracy (%)	80.6	84.2	80.0

れる), 大きな脈管構造がない肝臓のうえにプローブを置く必要がある。10回測定して評価し, ディスプレイには測定中央値が自動的に表示される。

Fibroscan®の利点は, ①非侵襲的で無痛性, ②結果がすぐに出る(1回30秒以内), ③再現性が高い, ④検査範囲が肝臓全体の約1/500の範囲と大きい(肝生検の検体は約1/50,000), ⑤経時的にフォローアップできる, などである。一方弱点としては, ①腹水がある症例(せん断波は液体を通過しない), ②皮下脂肪が厚い症例, ③肋間の狭い症例, ④肝萎縮の高度な症例, などでは再現性が低下したり, 測定不能となることがある。

### 3 Fibroscan®による線維化stage診断

Friedrich-RustらはFibroscan®の肝硬度測定による肝線維化stage診断に関する複数の論文のmeta-analysisを報告している<sup>2)</sup>。F2以上の線維化を判定するためのcut-off値7.65 kPa (AUROC: 0.84), F4は13.01 kPa (AUROC: 0.94)であった。われわれの検討ではF2以上の線維化を判定するためのcut-off値7.1 kPa, F3以上は9.6 kPa, F4は11.6 kPaであった(表1)。

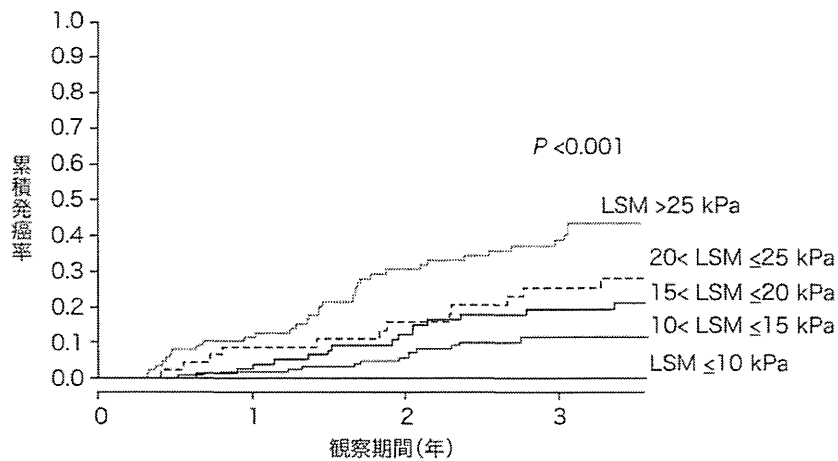
このようにFibroscan®の線維化stage診断の精度は良好である。しかし肝硬度から推定される線維化stageは肝生検の病理診断と完

全に一致するわけではない。Ichinoらの検討ではF2以上のAUROCは0.88, 感度81%, 特異度80%であったが, 肝生検でF2と判明した42例中17例(40%)はFibroscan®での肝硬度はF0-1に相当する値であった<sup>3)</sup>。

肝硬度による肝線維化stage診断と肝生検による肝線維化stageの相違については数多くの報告がある。急性肝炎の急性期には肝硬度は肝硬変に匹敵するほど高値となるが, 肝炎が軽快すると, 正常値になる。またHBVやHCVによる慢性肝炎では, ALT値が上昇している患者では, 抗ウイルス治療後や自然経過によってALT値が正常化した患者に比べて, 同一の線維化stageであっても肝硬度が高い。これは肝硬度が肝線維化だけでなく炎症の程度にも影響されることを示している。このように炎症に起因して肝硬度が過大に評価されることがあるので, ALT値の上昇している患者では, 肝硬度から肝線維化stageを評価するとき, 実際の肝線維化stageがもっと低い可能性があることを念頭に置いておくことが必要である。

### 4 Fibroscan®による抗ウイルス療法の治療効果判定

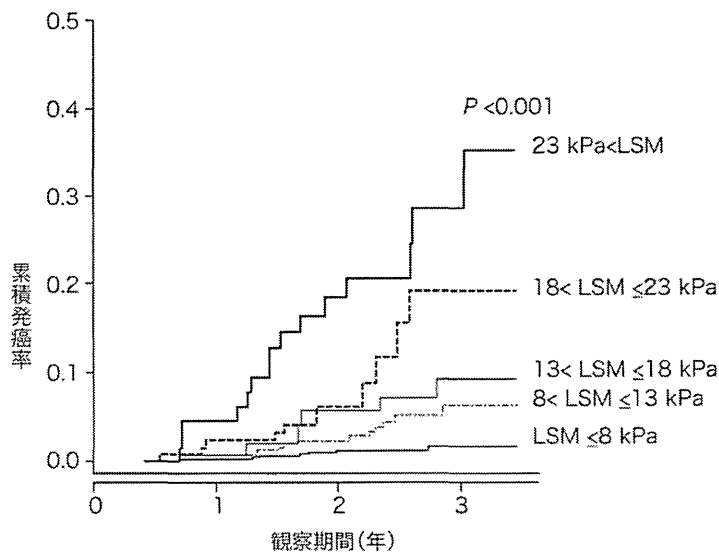
慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果は, ALT値やウイルス消失だけでなく, 肝線維化stageの改善の有無についても評価す



肝硬度	累積発癌率			年間発癌率
	1年	2年	3年	
LSM<10	0.4%	0.4%	0.4%	0.1%
10.1<LSM<15	1.4%	5.5%	11.7%	2.9%
15.1<LSM<20	3.8%	12.0%	19.2%	5.0%
20.1<LSM<25	8.7%	15.7%	25.2%	8.3%
25<LSM	11.5%	30.4%	38.5%	14.4%

Matsuzaki R, et al : Hepatology 2009より改変

図3 C型肝炎における肝硬度と発癌の関係



肝硬度	累積発癌率			年間発癌率
	1年	2年	3年	
LSM<8	0.17%	1.12%	1.58%	0.54%
8<LSM<13	1.05%	2.51%	6.28%	1.75%
13<LSM<18	2.33%	5.63%	8.77%	2.94%
18<LSM<23	0%	7.86%	19.07%	7.04%
23<LSM	4.48%	16.80%	24.76%	9.80%

Jung KS, et al : Hepatology 2011より改変

図4 B型肝炎における肝硬度と発癌の関係

べきである。

Arimaらは、IFN治療を受けた145例のC型慢性肝炎患者で治療前、治療終了時、治療終了1年後、2年後に肝硬度を報告している。SVR患者では、治療前[8.0 (5.0~11.9)]と比べて治療終了時[5.4(4.0~8.6)], 1年後[5.3 (4.2~7.6)], 2年後[5.3 (4.1~6.3)]に肝硬度は有意に低下しており、治療前や治療終了時と比べて2年後の肝硬度も有意に低下していた<sup>4)</sup>。

またOsakabeらは核酸アナログ製剤で治療を受けた29例のHBV感染患者で肝硬度変化を報告している。平均512日の観察期間で抗ウイルス療法により肝硬度が12.9 (6.2~17.9) kPa から6.6 (4.4~10.3) kPaへ有意な低下を認めている<sup>5)</sup>。

このように、慢性肝炎に対する抗ウイルス療法により肝硬度の低下がみられたとする報告が多数あり、ウイルス性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果判定のための肝硬度測定の有用性は確立されてきている。

抗ウイルス療法による肝硬度の低下は、初期には肝線維化の改善よりむしろ炎症の改善によるものであるとする報告もある。しかし肝生検で肝硬変例と診断された症例でも抗ウイルス療法により肝硬変に相当する肝硬度値から正常値に低下する症例も観察されている。これらの症例の肝硬度の低下は炎症の改善のみでは説明できず、肝線維化の改善を反映していると考えられる。

## 5 Fibroscan<sup>®</sup>による肝発癌予測

MasuzakiらはC型肝炎患者の肝硬度と肝発癌率の関係を検討している。866人を3年間経過観察し、77人に肝癌の発生を認めた。観察開始時の肝硬度によって層別化し、肝硬度が高いほどその後の肝発癌率が高いことを

報告している(図3)<sup>6)</sup>。多変量解析でも年齢、性別、アルブミン値とともに肝発癌に独立して関与する因子であることが明らかにされた。

またJungらはB型肝炎患者において肝硬度と肝発癌率の関係を報告している(図4)<sup>7)</sup>。1,130人を中央値31カ月経過観察し、57人に肝癌の発生を認めた。多変量解析では年齢、性別、飲酒量、アルブミン値、e抗原陽性とともに関与する因子であることが明らかにされた。

肝硬度は肝線維化stageと相関することから、肝硬度が高いほど、stageが進行しており、肝発癌率が高いのは当然のことと思われる。しかし肝硬変に相当する高い肝硬度を示す患者の中での検討でも、肝硬度が高いほど肝発癌率が高いことが示されている。これにより肝発癌リスクの高い患者をさらに識別することができ、臨床現場で有用と思われる。

## 6 おわりに

Fibroscan<sup>®</sup>による線維化診断と肝発癌予測が可能となった。これまでは線維化マーカーや血小板数、画像診断により肝硬変が診断され、肝発癌予測がされてきた。Fibroscan<sup>®</sup>は簡便に高い精度で肝発癌を予測できる。保険収載され、多くの施設で使われるようになれば、これまで見逃されていた肝発癌リスクの高い症例が多く発見され、肝癌の早期診断に結びつくものと期待される。

## 文 献

- 1) Yoshioka K, Hashimoto S : Can non-invasive assessment of liver fibrosis replace liver biopsy? *Hepatol Res* 42 : 233-240, 2012
- 2) Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S et al : Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 134 : 960-974, 2008
- 3) Ichino N, Osakabe K, Nishikawa T et al : A



- new index for non-invasive assessment of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 16 : 4809–4816, 2010
- 4) Arima Y, Kawabe N, Hashimoto S et al : Reduction of liver stiffness by interferon treatment in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 40 : 383–392, 2010
- 5) Osakabe K, Ichino N, Nishikawa T et al : Reduction of liver stiffness by antiviral therapy in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 46 : 1324–1334, 2011
- 6) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H et al : Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 49 : 1954–1961, 2009
- 7) Jung KS, Kim SU, Ahn SH et al : Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan) . *Hepatology* 53 : 885–894, 2011

\* \* \*

8

## C型慢性肝炎における肝線維化推定と抗ウイルス治療

川部 直人\* 橋本 千樹\* 原田 雅生\*  
有馬 裕子\* 西川 徹\* 吉岡健太郎\*

**Key words:** Fibroscan(ファイブロスキャン), 肝硬度, C型慢性肝炎, 肝線維化, 抗ウイルス療法

### 要旨

肝線維化の評価方法として非侵襲的な画像診断を用いて肝硬度(liver stiffness; LS)を測定する方法が臨床応用されている。transient elastography (TE; Fibroscan), acoustic radiation force impulse (ARFI), real-time tissue elastography (RTE)などが広く検証されており, C型慢性肝炎において線維化 stage の評価にはきわめて良好な診断能を有している。肝硬度は肝生検での線維化 stage と完全に一致するわけではなく, 炎症や脂肪化, 肝内圧などの他の因子が肝硬度に影響を及ぼす可能性もある。しかし, 治療開始時期の判断, 治療効果予測, 治療効果の評価, 肝炎の自然経過など, 非侵襲的な肝線維化測定によってC型慢性肝炎の抗ウイルス療法に有用な臨床情報を得ることが可能である。

の決定や治療効果の評価において重要な因子であるとともに, 予後予測においても欠かすことのできない因子である。治療効果の評価のためには, 治療後に繰り返し肝線維化を評価する必要があるが, 肝線維化評価の gold standard である肝生検は侵襲的で高コストであるため, 同一患者に繰り返し施行することは臨床的には困難である。またサンプリングエラーや不十分なサンプル, 病理診断の主観性や半定量性のため, その正確さが問題になることもある。

非侵襲的な肝線維化の推定方法として生化学検査や線維化マーカーのほかに, 画像診断を用いて肝硬度(liver stiffness; LS)を測定するさまざまな機器が登場してきており, なかでも transient elastography (TE; Fibroscan), acoustic radiation force impulse (ARFI), real-time tissue elastography (RTE)については多くの検証が行われている。また TE は最近日本でも保険収載されたため, 今後より多くの施設で活用されることが考えられる。

この稿ではC型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法において, TE を中心に非侵襲的な肝線維化推定法が果たす役割について概説する。

### はじめに

慢性肝疾患においては肝病態の進行あるいは重症化は肝線維化の進展と相関しており, とくにC型慢性肝炎に関しては肝線維化の進展とともに肝細胞癌の発症率が増加することが知られている。そのため肝線維化進展度は治療方針

\*藤田保健衛生大学肝胆膵内科  
(〒470-1192 愛知県豊明市春掛町田楽ヶ窪1-98)

## I. 画像診断による非侵襲的肝線維化推定法

この項のポイント

- Transient elastography (TE: Fibroscan), acoustic radiation force impulse (ARFI), real-time tissue elastography (RTE) などが臨床応用されている。

### 1. TE (図1)

肝臓の硬度(弾性度)は肝線維化と正の相関があるとされ、肝硬度を測定する TE (Fibroscan<sup>®</sup>) が 2003 年にフランスの Echosens 社から発表され、いち早く臨床応用された<sup>1)</sup>。この装置は体表から肝臓に低周波弾性波を送り、その肝臓内での伝播速度を超音波により測定して肝硬度を算出する。弾性波の伝わる速度は組織の硬度に依存し、組織が硬いほど弾性波はより速く伝播する。肝硬度の測定値はキロパスカル (kPa) で表示される。

手技としては、超音波装置と振動子を備えたプローブを肋間の体表面に当てボタンを押すのみであるが、その際 M モードと A モードイ

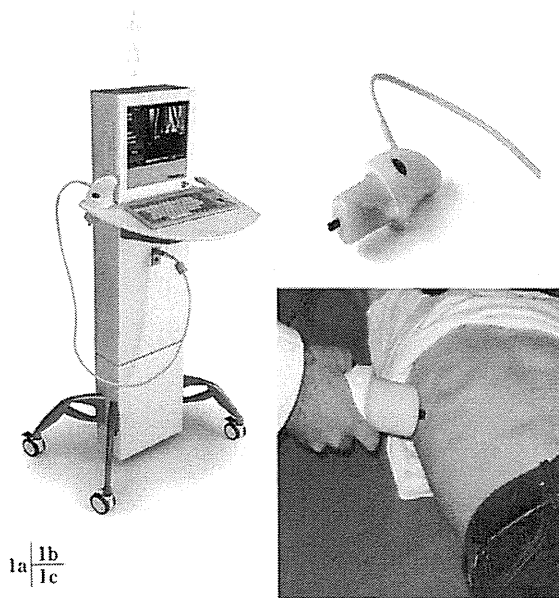


図1 Transient elastography (Fibroscan)

- a : Fibroscan 502
- b : プローブ
- c : 測定法

メージを参考にして、少なくとも 6 cm の厚さがあり (測定は 2.5~4.5 cm の範囲で行われる)、大きな脈管構造がない肝臓の上にプローブを置く必要がある。理想的には 10 回測定して評価するが、ディスプレイには測定中央値が自動的に表示される。

このように Fibroscan は、① 非侵襲的で無痛性、② 結果がすぐに出る (1 回 30 秒以内)、③ 再現性が高い、④ 検査範囲が肝臓全体の約 1/500 の範囲と大きい (肝生検の検体は約 1/50,000)、⑤ 経時的にフォローアップできる、などの利点がある。ただし、① 腹水がある症例 (弾性波は液体を通過しない)、② 皮下脂肪が高度な症例 (BMI (body mass index) の高い症例)、③ 肋間の狭い症例、④ 肝萎縮の高度な症例、などでは再現性が低下したり、測定不能となることがあるため注意が必要である。

肝生検による肝線維化評価システムと肝硬度の相関については数多くの報告があるが<sup>1)~3)</sup>、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染患者のうち抗ウイルス治療後や自然経過によって ALT 値が正常化している患者では、同一の線維化 stage であっても ALT 値が異常である患者に比べて肝硬度が低いという報告がある<sup>3)</sup>。これは肝硬度が肝線維化だけでなく炎症の程度にも影響されることを示している。

### 2. ARFI (図2)

最近では、超音波装置に肝硬度測定法が搭載された機器が実用化されてきている。ARFI は持田シーメンス社の ACUSON<sup>®</sup> S2000 に搭載された測定法で、取束超音波パルスの音響放射圧を用いて組織が変形する際に生じる剪断弾性波の伝播速度を算出する方法である。剪断弾性波の伝播速度は velocity of shear wave ; Vs (m/s) で示され、硬い組織では速く、軟らかい組織では遅くなる。この装置の利点は超音波画像を見ながら測定ができることと、腹水があっ

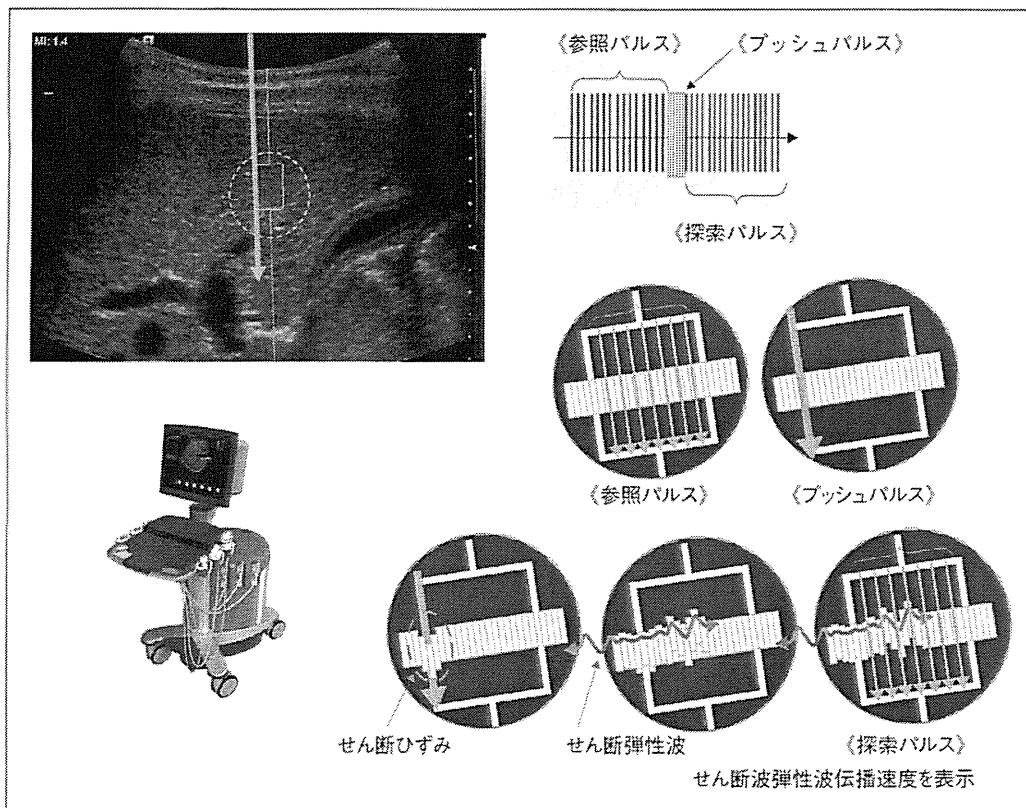


図2 ARFIの原理

でも測定できることで、肝右葉が小さな症例でも測定可能なことから、その有用性が多数報告されてきている。

### 3. RTE

RTEは日立メディコが開発し超音波装置に搭載した肝線維化測定法であり、組織の歪みから相対的な硬さをカラー表示する装置である。このカラー画像のまだら度を解析ツールで数値化し、関心領域の硬さを算出するという方法である。これはTEやARFIとは技術的に異なった測定手段であり、肥満患者や腹水の存在下でも測定可能という利点がある。

### 4. その他

ほかに、東芝メディカルのacoustical structure quantification (ASQ)、キャノンのshear

wave elastographyなど超音波装置に付随した肝線維化測定機能が続々と臨床応用されてきており、それらの評価も今後報告されていくと考えられる。また、拡散強調MRI(diffusion-weighted MRI)やMR elastographyなど、MRIを用いた肝線維化測定法も報告されているが、超音波と比べると簡便性や経済性において劣ることは否定できない。

## II. 抗ウイルス療法開始時期の判断

この項のポイント

- 肝硬度(LS)測定による肝線維化推定はC型肝炎の抗ウイルス療法の適応判定に有用である。

C型慢性肝炎においては、F2以上の線維化の存在が抗ウイルス療法開始の目安となる<sup>4)</sup>。TEの肝線維化 staging に関する meta-analysis では、F2以上の線維化を判定するための

AUROC は 0.68~1.0, mean 0.84 (95% CI 0.82~0.86), adjusted AUROC 0.91, cut-off 値 7.65 kPa と報告している<sup>5)</sup>. Friedrich-Rust らは 134 例の慢性肝疾患で F2 以上の線維化判定の AUROC は RTE 0.69, TE 0.84, FibroTest 0.85 と報告しており<sup>6)</sup>, Koizumi らは 70 例の C 型慢性肝炎で RTE を用いて elastic ratio を計算し, F2 以上の線維化判定の AUROC 0.89, cut-off 値 2.73 と報告している<sup>7)</sup>. RTE は有望な検査法であるが, 弾性値の計算法が報告者によって異なっているため, 今後それらを統一していくことが実地臨床での普及には必要と思われる.

Friedrich-Rust らは 86 例の慢性ウイルス性肝炎で F2 以上の線維化判定の AUROC は ARFI 0.82, TE 0.84, FibroTest 0.82, cut-off 値は ARFI 1.37 m/s, TE 6.3 kPa と報告している<sup>8)</sup>. また, ARFI に関しては, Takahashi らは HCV 感染者を主とした 55 例で F2 以上の線維化判定の AUROC 0.94, cut-off 値 1.34 m/s と報告しており<sup>9)</sup>, Fierbinteanu-Braticевичi らは HCV 患者 74 例で同じく AUROC 0.902, cut-off 値 1.215 m/s と報告している<sup>10)</sup>.

TE, ARFI, RTE とともに線維化診断の精度は非常に良好であるが, 推定される線維化診断は肝生検の病理診断と完全に一致するわけではない. Ichino らの検討でも AUROC は 0.88, 感度 81%, 特異度 80% であったが, 肝生検で F2 と判明した 42 例中 17 例(40%)は TE での肝硬度は F0~1 に相当する値であった<sup>11)</sup>. しかし, TE と biomarker の組み合わせで線維化診断の精度が向上したという報告もあり, 検査データや臨床所見と組み合わせて利用することによって肝硬度測定は抗ウイルス療法の適応判定に有用な情報になると考えられる<sup>11),12)</sup>.

### Ⅲ. 抗ウイルス療法の治療効果予測

#### この項のポイント

- 治療効果予測因子としての肝生検による肝線維化 stage は, 肝硬度で代用できる可能性がある.

C 型慢性肝炎のペグインターフェロン(PEG-IFN) + リバビリルン(RBV)併用療法において, 肝線維化 stage は重要な治療効果予測因子である. Poynard らは PEG-IFN + RBV で再治療された 1,459 例の C 型慢性肝炎で単変量および多変量解析を行い, FibroTest を用いた推定肝線維化 stage, 肝生検による肝線維化 stage, genotype 2/3, ウイルス量, 前治療 relapse, 前治療が PEG-IFN でないことの六つが sustained virological response(SVR)の予測因子であったと報告しており, FibroTest は肝生検に代わる非侵襲的な SVR の予測因子になりうると結論づけている<sup>13)</sup>.

われわれは IFN + RBV 併用療法を受けた 1 型の C 型慢性肝炎 88 例において多変量解析を行ったところ, 性別(P=0.0012)と TE による LS(P=0.0214)が SVR の独立した予測因子であった<sup>14)</sup>.

以上から, C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果予測を目的とした肝生検は, FibroTest や TE による肝硬度で代用できると考えられる.

### Ⅳ. 抗ウイルス療法の治療効果の評価

#### この項のポイント

- 肝硬度測定は繰り返し行うことができ, 抗ウイルス療法の治療効果判定にも有用である.

C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果は, ALT 値やウイルス消失の有無だけでなく, 肝線維化 stage の改善の有無についても評価すべきである.

Ogawa らは PEG-IFN + RBV 治療を受けた 145 例の C 型肝炎患者を TE で評価したところ, SVR 患者は non-SVR 患者に比べて, 治療

終了時の肝硬度が有意に低下(P=0.0127)しており、その48週後(P<0.0001)、96週後(P<0.0001)でも有意に低下していたと報告している<sup>15)</sup>。また non-SVR 患者のなかでは、biochemical responder (BR) 患者は non-BR 患者に比べて治療終了時(P=0.0270)、48週後(P<0.0001)、96週後(P<0.0001)とも肝硬度が有意に低下していた<sup>15)</sup>。

Arima らは、IFN±RBV 治療を受けた145例のC型慢性肝炎患者で治療前、治療終了時、治療終了1年後、2年後にTEを評価した<sup>16)</sup>。SVR 患者93例と relapser 28例では、治療前と比べて治療終了時(P<0.0001, P=0.0023)、1年後(P<0.0001, P=0.0204)とも肝硬度は有意に低下しており、SVR 患者では治療前(P<

0.0001)や治療終了時(P=0.0034)と比べて2年後の肝硬度も有意に低下していた(図3)、と報告している<sup>16)</sup>。また、治療前の肝硬度から cut-off 値(表)に基づいて推定される肝線維化 stage(推定 stage)がF3以上の67人の患者のうち、最終測定時に推定 stage が2段階以上の改善した症例は SVR 例で37例中29例(78%)、relapser 例で17例中10例(59%)、NVR 例で13例中2例(15%)みられた。推定 stage の2段階以上の改善に関与する因子について検討したところ、治療前の肝線維化 stage が低いこと、ヒアルロン酸値が低いこと、IFN 治療期間が長いこと、治療効果が SVR あるいは relapser であること、ALT が高いことが有意に関与していた。

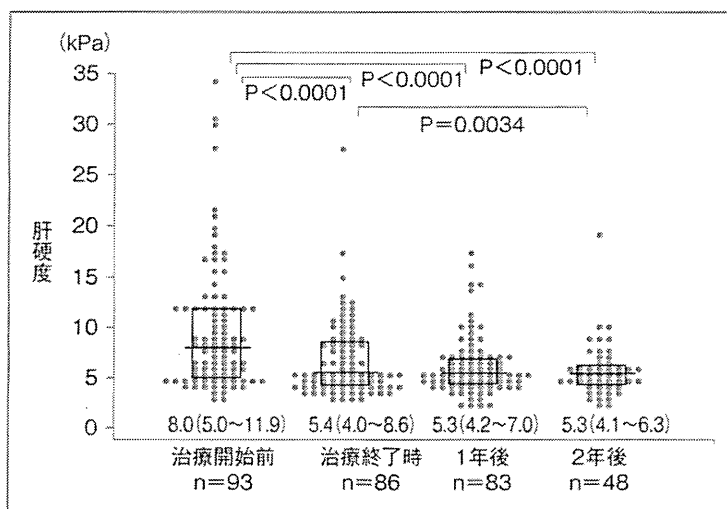


図3 C型慢性肝炎に対するIFN治療SVR例の肝硬度の低下

表 肝線維化 stage 診断のための肝硬度 cut-off 値(C型慢性肝炎)

	F2以上	F3以上	F4
cut off value (kPa)	7.1	9.6	11.6
positive predictive value (%)	86.0	72.5	41.5
negative predictive value (%)	73.6	92.7	98.2
sensitivity (%)	80.8	87.7	91.7
specificity (%)	80.3	82.4	78.0
positive likelihood ratio	4.1	5.0	4.2
diagnostic accuracy (%)	80.6	84.2	80.0

Wangらは、IFNを用いた治療を受けた144例(SVR 95例, non-SVR 49例)についてTEで肝硬度を測定し、SVR患者では有意な肝硬度の低下(median 0.6,  $P < 0.001$ )を認め、non-SVR患者では肝硬度の上昇(median 0.8,  $P = 0.557$ )を認めた、と報告している<sup>17)</sup>。また、SVR患者では初回の肝硬度が高いことが速やかな肝硬度低下の予測因子であったが、一方で治療前の線維化進展、高いBMIなどはLS低下が遅いことの予測因子であったとしている。

これらの報告から、C型慢性肝炎の治療において肝硬度を測定することにより、肝線維化の改善だけでなく、肝線維化の改善に影響を及ぼす因子についても評価することが可能であるといえる。

また、C型肝炎ばかりでなく、B型肝炎でも抗ウイルス療法時の肝硬度の変化に関する報告がみられる。

Osakabeらは核酸アナログ製剤で治療を受けた29例のHBV感染患者でTEによる肝硬度を測定し、その変化を調べたところ、平均512日(366~728日)の観察期間で抗ウイルス療法により肝硬度が12.9(6.2~17.9)kPaから6.6(4.4~10.3)kPaへ有意な低下を認めた( $P < 0.0001$ )、と報告している<sup>18)</sup>。また肝硬度から推定される肝線維化stage(推定stage)が治療前にF3~4であった19例のうち11例(58%)で、肝硬度の最終測定値の推定stageが2段階以上の低下を認め、ヒアルロン酸の低下率が推定stageの2段階以上の低下と相関していた( $P = 0.0039$ )、とも報告している。

また、Enomotoらは慢性HBV感染患者50例でTEによる肝硬度を測定し、エンテカビル治療を受けた患者の肝硬度は12カ月の治療で11.2(7.0~15.2)kPaから7.8(5.1~11.9)kPaに有意に低下した( $P = 0.0090$ )と報告している<sup>19)</sup>。

このように、B型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤による抗ウイルス療法でも肝硬度の低下がみられたとする報告が複数あり、C型肝炎

に限らずウイルス性肝炎の抗ウイルス療法においてTEの有用性は確立されてきているといえる。こうした背景もあってTEは日本でも保険収載され、今後より多くの施設で実地臨床に活用されるものと考えられる。

抗ウイルス療法による治療中や治療後に、治療効果を確認するために肝生検を繰り返すことは困難である一方で、抗ウイルス療法の治療効果が一定ではないため、治療への反応が良い症例か悪い症例かを予測することや、治療効果に影響を及ぼす因子を調べておくことは重要である。非侵襲的な肝硬度測定は繰り返し行うことができ、抗ウイルス療法の際に有用な情報を得られることは間違いない。

ただし、治療効果の評価についてここで引用した文献中のTEの結果は、肝生検で確認されているものはごく一部の症例のみであり、肝生検との十分な比較検討がされていない点がこれらの研究の限界でもある。

## V. ウイルス性肝炎の自然経過の評価

この項のポイント

- ウイルス性肝炎の経過観察中に肝線維化の進行を検出するためにもTEは有用である。

一方で、抗ウイルス療法が行われない場合にはウイルス性肝炎の肝線維化は徐々に進行していくことが知られているが、それを非侵襲的な肝硬度測定で検証した大規模な研究は現時点ではみられない。

Arimaらは、IFN治療を受けていない35例の慢性HCV感染患者で平均656(360~922)日の間隔をおいて測定したTEによる肝硬度は、1回目の測定値〔10.5(5.8~15.3)kPa〕と2回目の測定値〔12.2(6.3~16.8)kPa〕でやや上昇しているものの有意な変化は認めなかったと報告している<sup>16)</sup>。

Osakabeらは抗ウイルス療法を受けていない52例のHBV感染患者で平均422(358~709)

日の間隔をおいて測定した TE による肝硬度は、6.1(3.9~8.5)kPa から 6.3(4.4~9.7)kPa と上昇する傾向(P=0.0682)がみられたと報告している<sup>18)</sup>。また、抗ウイルス療法を受けなかった症例では、初回の肝硬度測定時の推定 stage が F0~3 であった 50 例のうち 11 例(22%)で推定 stage が上昇したのに対して、初回の推定 stage が F2~4 であった 20 例中 8 例(40%)で推定 stage が改善しており、推定 stage 上昇に因する因子は初回測定時の血中アルブミン濃度であったとも報告している。

これらの報告で、自然経過例の肝硬度が有意な上昇を認めなかった理由としては、研究対象となった症例には軽度の肝障害しか認められなかったために抗ウイルス療法が必要とされなかったということが原因であると考えられる。また、自然経過例でさらに長期的な観察ができれば、肝硬度が徐々に上昇していく経過を追跡できる可能性もあると思われる。慢性ウイルス性肝炎のフォローアップの際には、肝線維化の進行している患者を検出するために TE は有用であると考えられる。

## おわりに

TE, ARFI, RTE とも肝線維化 stage の評価にはきわめて良好な診断能を有しているが、炎症の程度や脂肪化、鉄の沈着など肝生検における線維化以外の所見は得られない。線維化についても、肝生検と完全に一致するわけではなく、炎症や脂肪化、肝内圧<sup>20)</sup>といった他の因子が肝硬度に影響を及ぼす可能性もある。しかし、この稿で述べてきたように、治療開始時期の判断や治療効果予測、治療効果の評価や肝炎の自然経過など、非侵襲的な肝線維化測定によって C 型慢性肝炎の抗ウイルス療法に有用な臨床情報を得ることが可能である。最近になって炎症や脂肪化、鉄の沈着なども非侵襲的に評価する方

法が発達してきており、近い将来、非侵襲的な診断法が肝生検にとって代わる可能性もあると考えられる。

## 文 献

- 1) Sandrin, L., Fourquet, B., Hasquenoph, J. M., et al. : Transient elastography : a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med. Biol.* 29 ; 1705-1713, 2003
- 2) Nitta, Y., Kawabe, N., Hashimoto, S., et al. : Liver stiffness measured by transient elastography correlates with fibrosis area in liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* 39 ; 675-684, 2009
- 3) Yoshioka, K., Kawabe, N. and Hashimoto, S. : Transient elastography : Applications and limitations. *Hepatol. Res.* 38 ; 1063-1068, 2008
- 4) Kumada, H., Okanoue, T., Onji, M., et al. : Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis C virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol. Res.* 40 ; 8-13, 2010
- 5) Friedrich-Rust, M., Ong, M. F., Martens, S., et al. : Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis : a meta-analysis. *Gastroenterology* 134 ; 960-974, 2008
- 6) Friedrich-Rust, M., Schwarz, A., Ong, M., et al. : Real-time tissue elastography versus FibroScan for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease. *Ultraschall Med.* 30 ; 478-484, 2009
- 7) Koizumi, Y., Hirooka, M., Kisaka, Y., et al. : Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C : noninvasive diagnosis by means of real-time tissue elastography—establishment of the method for measurement. *Radiology* 258 ; 610-617, 2011
- 8) Friedrich-Rust, M., Wunder, K., Kriener, S., et al. : Liver fibrosis in viral hepatitis : noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. *Radiology* 252 ; 595-604, 2009
- 9) Takahashi, H., Ono, N., Eguchi, Y., et al. : Evaluation of acoustic radiation force impulse elastography for fibrosis staging of chronic liver disease : a pilot study. *Liver Int.* 30 ; 538-545, 2009
- 10) Fierbinteanu-Braticevici, C., Andronescu, D.,



- Usvat, R., et al. : Acoustic radiation force imaging sonoelastography for noninvasive staging of liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* 15 ; 5525-5532, 2009
- 11) Ichino, N., Osakabe, K., Nishikawa, T., et al. : A new index for non-invasive assessment of liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* 16 ; 4809-4816, 2010
- 12) Boursier, J., Vergniol, J., Sawadogo, A., et al. : The combination of a blood test and Fibroscan improves the non-invasive diagnosis of liver fibrosis. *Liver Int.* 29 ; 1507-1515, 2009
- 13) Poynard, T., Munteanu, M., Colombo, M., et al. : FibroTest is an independent predictor of virologic response in chronic hepatitis C patients retreated with pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in the EPIC (3) program. *J. Hepatol.* 54 ; 227-235, 2011
- 14) Yoshioka, K. and Hashimoto, S. : Can non-invasive assessment of liver fibrosis replace liver biopsy? *Hepatol. Res.* 42 ; 233-240, 2012
- 15) Ogawa, E., Furusyo, N., Toyoda, K., et al. : The longitudinal quantitative assessment by transient elastography of chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *Antiviral Res.* 83 ; 127-134, 2009
- 16) Arima, Y., Kawabe, N., Hashimoto, S., et al. : Reduction of liver stiffness by interferon treatment in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* 40 ; 383-392, 2010
- 17) Wang, J. H., Changchien, C. S., Hung, C. H., et al. : Liver stiffness decrease after effective antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C : Longitudinal study using FibroScan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 ; 964-969, 2010
- 18) Osakabe, K., Ichino, N., Nishikawa, T., et al. : Reduction of liver stiffness by antiviral therapy in chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol.* 46 ; 1324-1334, 2011
- 19) Enomoto, M., Mori, M., Ogawa, T., et al. : Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B : Regression of liver stiffness during entecavir therapy.

*Hepatol. Res.* 40 ; 853-861, 2010

- 20) Harata, M., Hashimoto, S., Kawabe, N., et al. : Liver stiffness in extrahepatic cholestasis correlates positively with bilirubin and negatively with alanine aminotransferase. *Hepatol. Res.* 41 ; 423-429, 2011

### Summary

#### Liver Stiffness for Assessment of Fibrosis Stage in Chronic Hepatitis C

Naoto Kawabe\*, Senju Hashimoto\*,  
Masao Harata\*, Yuko Arima\*,  
Toru Nishikawa\* and Kentaro Yoshioka\*

Transient elastography (TE ; Fibroscan), acoustic radiation force impulse (ARFI) and real-time tissue elastography (RTE) are methods for measuring liver stiffness (LS). These methods produce very good or excellent diagnostic accuracy for the assessment of liver fibrosis stage due to chronic hepatitis C. These non-invasive methods for the assessment of liver fibrosis stage do not provide information on inflammatory activity, steatosis, iron deposition or other findings derived from liver biopsies. They do not give us an estimation completely corresponding to that of liver biopsies or fibrosis stage. In addition, the value of LS may be affected by factors other than fibrosis stage, for example, inflammatory activity, steatosis and intrahepatic pressure. However, these non-invasive methods for the assessment of liver fibrosis stage provide us with useful clinical information similar to that liver biopsies can provide. This information includes the appropriate time to initiate antiviral therapy, prediction of response to antiviral therapy, evaluation of effects of antiviral therapy, and assessment of the natural course of chronic hepatitis C.

**Key words :** transient elastography (Fibroscan), liver stiffness, chronic hepatitis C, liver fibrosis, antiviral therapy

\*Department of Liver, Biliary Tract and Pancreas Diseases, Fujita Health University School of Medicine, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-shi, Aichi 470-1192, Japan

**Review Article**

# Can non-invasive assessment of liver fibrosis replace liver biopsy?

Kentaro Yoshioka and Senju Hashimoto

*Department of Liver, Biliary Tract and Pancreas Diseases, Fujita Health University, Aichi, Japan*

Transient elastography, acoustic radiation force impulse and real-time elastography are the methods with very good or excellent diagnostic accuracy for the assessment of liver fibrosis stage. They do not provide the information on inflammatory activity, steatosis, iron deposition or other findings derived from liver biopsy. Even on account of fibrosis stage, these non-invasive methods do not give us the estimation completely corresponding to that of liver biopsy. However they provide us useful clinical information that liver biopsy has been providing us, such as appropriate time to start antiviral therapy, prediction of response to antiviral

therapy, evaluation of effects of antiviral therapy, assessment of natural course of hepatitis and estimation of prognosis of hepatitis. Recently non-invasive methods for assessment of inflammatory activity, steatosis and iron deposition in the liver have been developed. Thus in the near future, non-invasive methods will replace liver biopsy.

**Key words:** acoustic radiation force impulse, fibrosis stage, inflammatory activity, liver stiffness, real-time elastography, transient elastography

**INTRODUCTION**

**N**ON-INVASIVE ASSESSMENT OF liver fibrosis has been one of major objectives in the society of hepatologists for a long time. Routine laboratory tests, serum markers of fibrosis<sup>1–7</sup> and apparatuses for measuring liver stiffness (LS) have been tested. The apparatuses include transient elastography (TE),<sup>8,9</sup> acoustic radiation force impulse (ARFI),<sup>10</sup> real-time elastography,<sup>11</sup> and magnetic resonance imaging (MRI).<sup>12</sup>

Liver biopsy is the gold standard for the assessment of fibrosis stage in chronic viral hepatitis. However, liver biopsy is an invasive and expensive procedure, and its accuracy is sometimes questionable because of sampling errors, inadequate specimens and the subjectivity of diagnosis.<sup>13,14</sup>

Infections of hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are world-wide problems and cause the need of a great number of liver biopsies mainly for

assessment of fibrosis stage and inflammatory activity, which sometimes cause serious complications. Thus the replacement of liver biopsies with non-invasive methods is an important subject to be dealt with as soon as possible.

In this article, we review the manuscripts that applied non-invasive methods to estimate fibrosis stages for the five different clinical aims in the replacement of liver biopsies. These aims include the determination of appropriate time to start antiviral therapy, prediction of response to antiviral therapy, evaluation of effects of antiviral therapy, assessment of natural course of hepatitis and estimation of prognosis of hepatitis. We will discuss whether non-invasive methods can replace liver biopsies for these aims.

We discuss the three methods that have been often reported; TE, ARFI imaging, and real-time elastography. Algorithm of serum fibrosis markers such as FibroTest<sup>2</sup> will be also described. There have been published a lot of manuscripts on non-invasive methods, and we selected the manuscripts that seem to us to be important in discussing whether non-invasive methods can replace liver biopsies.

Transient elastography measures LS with the use of an apparatus, FibroScan (EchoSens, Paris, France).<sup>8</sup> FibroScan is equipped with a probe including an

Correspondence: Dr Kentaro Yoshioka, Department of Liver, Biliary Tract and Pancreas Diseases, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan. Email: kyoshiok@fujita-hu.ac.jp  
 Received 29 August 2011; revision 28 September 2011; accepted 11 October 2011.

ultrasonic transducer and a vibrator. A vibration of mild amplitude and low frequency is transmitted from the vibrator placed on the body surface toward the liver through the intercostal space. The vibration induces an elastic shear wave that propagates through the liver tissue. The pulse-echo ultrasound acquisitions follow the propagation of the shear wave and determine its velocity. The velocity is directly related to tissue stiffness; the harder the tissue, the faster the shear wave propagates. LS is calculated from velocity and expressed in kilopascal (kPa).

Acoustic radiation force impulse imaging is a radiation force-based imaging method that is provided with conventional B-mode ultrasonography (Siemens Acuson S2000, Siemens AG, Germany).<sup>10</sup> In ARFI imaging, an initial ultrasonic pulse is transmitted at diagnostic intensity levels to obtain a baseline signal for later comparison. A short-duration, high-intensity acoustic pushing pulse is transmitted from the probe, and cause shear wave in the liver. A series of diagnostic intensity pulses are used to quantitate shear wave velocity ( $V_s$ ; m/s). The velocity of the shear wave depends on LS.

Real-time elastography is an imaging technique that can reveal the physical property of tissue using conventional ultrasound probes; the Hitachi EUB-8500 and EUB-900 machines (Hitachi Medical Systems, Tokyo, Japan).<sup>11</sup> The region of interest is divided up in to 30 000 finite elements before compression. During the compression by the probe or heart beats, the displacement of each element is measured. In hard tissue, the amount of displacement is low, whereas in soft tissue, the amount of displacement is high. The calculation of tissue elasticity distribution is performed in real time, and the results are displayed as color-coded images with the conventional B-mode image in the background. In this way, a large number of summarizing variables were obtained to characterize elastography. The final score was based on 10 summarizing variables selected from them to obtain high reproducibility. The variables selected for the final score differ among the investigators.

#### APPROPRIATE TIME TO START ANTIVIRAL THERAPY: DIAGNOSIS OF SIGNIFICANT FIBROSIS (F> OR =2)

**I**N CHRONIC VIRAL hepatitis, the presence of significant fibrosis (F> or =2) indicates the need of antiviral therapies both in chronic hepatitis B and in chronic hepatitis C.<sup>15,16</sup>

A meta-analysis of the performance of TE for staging of liver fibrosis demonstrated that the area under the

receiver operating characteristic curve (AUROC) for significant fibrosis ranged 0.68–1.0 among different studies with a mean of 0.84 (95% confidence intervals [CI], 0.82–0.86) and an adjusted AUROC of 0.91 and that the optimal cut-off value for the significant fibrosis suggested from the summary ROC techniques was 7.65 kilopascals (kPa).<sup>17</sup>

We published a review article on the investigations of TE for assessment of fibrosis stages and presented the summary table.<sup>18</sup> Thus we do not show the table in the present article.

Friedrich-Rust *et al.* studied 134 patients with chronic liver diseases and reported that the AUROC for the diagnosis of significant fibrosis of real-time elastography, TE and FibroTest was 0.69, 0.84 and 0.85, respectively.<sup>19</sup>

Koizumi measured LS with real-time tissue elastography in 70 patients with chronic hepatitis C.<sup>20</sup> The elastic ratio (ratio of the value in the intrahepatic venous small vessels divided by the value in the hepatic parenchyma) was calculated. The cut-off value and AUROC for significant fibrosis were 2.73 and 0.89, respectively.

Although real-time elastography is a hopeful non-invasive method, the calculations of elastic value differ among the investigators. Thus we think it is inappropriate to present the summary table.

Friedrich-Rust *et al.* studied 86 patients with chronic viral hepatitis and reported that the AUROC for the diagnosis of significant fibrosis of ARFI, TE, and FibroTest was 0.82, 0.84, and 0.82, respectively.<sup>10</sup> The cut-off values for significant fibrosis of ARFI and TE were 1.37 m/s (sensitivity 68.5%, specificity 92.6%) and 6.3 kPa (sensitivity 83.3%, specificity 74.1%), respectively.

Takahashi *et al.*<sup>21</sup> studied 55 patients mainly consisting of people with HCV by ARFI. The AUROC and cut-off value of the  $V_s$  for significant fibrosis were 0.94 (95% CI, 0.87–0.99) and 1.34 m/s (sensitivity 91.4%, specificity 80%).

Fierbinteanu-Braticevici<sup>22</sup> studied 74 patients with HCV by ARFI. The AUROC and cut-off value of  $V_s$  for significant fibrosis were 0.902 (95% CI, 0.831–0.972,  $P < 0.001$ ) and 1.215 m/s (sensitivity 100%, specificity 71%).

The summary of investigations of ARFI for assessment of significant fibrosis is shown in Table 1.<sup>10,21–29</sup>

Generally the diagnostic accuracy of test with AUROC of 0.7–0.8 was considered as good, that of 0.8–0.9 as very good, and that of 0.9–1.0 as excellent. The diagnostic accuracy of TE, ARFI and real-time elastography for significant fibrosis is very good or excellent. They do not give us the estimation completely corresponding to that of liver biopsy; in our study (AUROC 0.88; sensitivity 81%;

Table 1 Summary of investigations of acoustic radiation force impulse for assessment of liver fibrosis

Author (year) reference	Disease	Number of patients	System of fibrosis staging	Fibrosis stage									
				F> or =1		F> or =2		F> or =3		F> or =4			
				Cut-off value (m/s)	AUROC	Cut-off value (m/s)	AUROC	Cut-off value (m/s)	AUROC	Cut-off value (m/s)	AUROC	Cut-off value (m/s)	AUROC
Friedrich-Rust (2009) <sup>10</sup>	Chronic viral hepatitis	86	Metavir	1.37	0.82	1.45	0.91	1.75	0.91				
Lupson (2009) <sup>23</sup>	HCV	112	Metavir	1.19	0.725	1.61	0.9	2	0.936				
Takahashi (2009) <sup>21</sup>	Chronic liver disease	55	Metavir	1.34	0.94	1.44	0.94	1.8	0.96				
Fierbinteanu-Braticевич (2009) <sup>22</sup>	HCV	74	Metavir	1.185	0.902	1.54	0.993	1.94	0.993				
Sporea (2011) <sup>27</sup>	Chronic liver disease	76	Metavir	1.4	0.747								
Grgurevic (2011) <sup>28</sup>	Chronic liver disease	38	Ishak										
Sporea (2010) <sup>24</sup>	Chronic viral hepatitis	71	Metavir	1.33	0.649								
Toshima (2011) <sup>25</sup>	Chronic liver disease	79	Scheuer	1.45	0.81	1.69	0.85	1.79	0.87				
Piscaglia (2011) <sup>29</sup>	Chronic liver disease	90		1.52									
Ebinuma (2011) <sup>26</sup>	Chronic viral hepatitis	59	Metavir	1.4	0.905	1.53	0.923	1.88	0.941				

AUROC, area under the receiver operating characteristic curve; HCV, hepatitis C virus.

specificity 80%), 17 of 42 patients with biopsy proven F2 (40%) had LS by TE corresponding to F0-1.<sup>30</sup> However, they are still useful for determining the indication of antiviral therapies, if we use them in combination with laboratory tests and other clinical data. The combination of TE and biomarkers is being studied to improve the diagnostic accuracy of significant fibrosis.<sup>30,31</sup>

**PREDICTION OF RESPONSE TO ANTIVIRAL THERAPY**

FIBROSIS STAGE IS an important predictor for response to combination therapy of pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin for chronic hepatitis C. Hayashi *et al.* reported that the factors related to sustained virological response (SVR) on multivariate analysis were single nucleotide polymorphism (SNP) of interleukin 28B (IL28B) ( $P = 0.0001$ ), fibrosis ( $P = 0.0111$ ) and mutations in the core region70 ( $P = 0.0267$ ) and IFN sensitivity determining region (ISDR) of HCV genome ( $P = 0.0408$ ).<sup>32</sup>

Poynard *et al.* studied the predictive factors for SVR in 1459 patients with chronic hepatitis C retreated with PEG-IFN alfa-2b plus weight-based ribavirin. Uni- (UV) and multi-variable (MV) analyses were performed. Five baseline factors were associated ( $P < 0.001$ ) with SVR in UV and MV analyses (odds ratio: UV/MV): fibrosis stage estimated using FibroTest (4.5/5.9) or biopsy (1.5/1.6), genotype 2/3 (4.5/5.1), viral load (1.5/1.3), prior relapse (1.6/1.6), previous treatment with non-PEG-IFN (2.6/2.0). Poynard *et al.* concluded that FibroTest at baseline is a possible non-invasive alternative to biopsy for the prediction of SVR, in patients with previous failures and advanced fibrosis, retreated with PEG-IFN alfa-2b and ribavirin.<sup>33</sup>

We have studied the predictive factors for SVR in 88 patients with chronic hepatitis C genotype 1 treated with combination of IFN and ribavirin and found that gender ( $\beta = 1.6$ ,  $P = 0.0012$ ) and LS by TE ( $\beta = -0.1$ ,  $P = 0.0214$ ) are independent predictive factors by multivariate analysis (manuscript in preparation).

Thus FibroTest and LS by TE can substitute liver biopsy for the purpose of predicting response to antiviral therapy in chronic hepatitis C.

**EVALUATION OF EFFECTS OF ANTIVIRAL THERAPY**

THE OUTCOME OF antiviral therapy should be assessed not only by ALT levels or viral loads but