

4-2 肝細胞癌以外の肝腫瘍典型例

造影超音波診断 (症例編)

熊田 卓¹⁾, 豊田秀徳¹⁾, 多田俊史¹⁾, 金森 明¹⁾, 竹島賢治²⁾, 乙部克彦²⁾

¹⁾大垣市民病院 消化器内科 ²⁾大垣市民病院 診療検査科

はじめに

第2世代の超音波造影剤ソナゾイド[®]での造影超音波検査が可能となり、血管相、後血管相(クッパー相)ともに安定した画像が得られるようになった。肝腫瘍の超音波診断基準は、1988年に日本超音波医学会医用超音波診断基準に関する委員会で作成されて以来、20年以

上改訂されていなかった。今回、第2世代の超音波造影剤が出現したのを機会に、2005年に「肝腫瘍の超音波診断基準(1988/11/30)の改訂」小委員会が立ちあげられた。肝腫瘍の質的診断のためのBモード所見の改定に加え、ドプラ所見、造影超音波所見が新設された。2010年の「超音波医学」2月号に「肝腫瘍の超音波診断基準(案)」が発表されている(表1)¹⁾。

表1 造影超音波による肝腫瘍の質的診断

主分類	細分類	血管相 (vascular phase)		後血管相 (post vascular phase)	付加所見
		動脈(優位)相 (arterial [predominant] phase)	門脈(優位)相 (portal [predominant] phase)		
肝細胞癌	結節型 (2cm以下)	造影剤が流入する場合もあるが血管として描出される本数は少ない	肝実質と同程度もしくは低下して造影される	肝実質に比して軽度低下もしくは低下	動脈(優位)相で濃染しない症例もある
	結節型 (2cmを超える)	バスケットパターン、血管増生、不整な流入血管、肝実質に比し強い濃染	肝実質に比し低下して造影される、非造影部位の存在	欠損もしくは不完全な欠損	後血管相で点状のシグナルが残存することあり
	塊状型	バスケットパターン、血管増生、不整な流入血管、肝実質に比し強く不均一な濃染	肝実質と低下して造影される、非造影部位が存在	欠損もしくは不完全な欠損、腫瘍の輪郭は不整	染影される腫瘍塞栓の描出されることあり
肝内胆管癌 (胆管細胞癌)	辺縁に血管影、辺縁のリング状濃染	腫瘍辺縁のリング状濃染、肝実質に比して低下して造影される	明瞭な欠損もしくは不完全な欠損	中央を突き抜ける線状の血管を認めることもある、全く染影されない場合もあり	
転移性肝腫瘍	腫瘍内の点状の血管影、辺縁のリング状濃染	腫瘍辺縁のリング状濃染、肝実質に比して低下して造影される	明瞭な欠損、腫瘍の輪郭は不整	血管増生のある転移性肝腫瘍は動脈(優位)相の所見は肝細胞癌に類似する	
肝細胞腺腫	境界から中央に向かって細かな血管が流入する、血管増生、肝実質に比し軽度の濃染	肝実質に比し造影される	同等もしくは不完全な欠損	出血・壊死を伴う場合は非造影部位を生じる	
肝血管腫	辺縁から中央に向かって濃染され始める、辺縁が点状もしくは斑状に濃染される	辺縁が斑状に濃染される、中央へ濃染が進み、中心部は造影されないことが多い	肝実質と同等、一部造影されない場合あり(血栓、線維化など)	小さなものでは急速に中央に向かって濃染される場合もある	
限局性結節性過形成 (FNH)	spoke-wheel pattern、中央から外側に向かってきわめて短時間で肝実質より濃染	肝実質より濃染、造影の低下する部分もある(中心癆痕)	造影は肝実質と同等、造影の低下する部分もある(中心癆痕)		

(文献1より)

表2 Enhancement (E) patterns of benign focal liver lesions

Tumor entity	Arterial phase	PV phase	Delayed phase
Haemangioma			
Typical features	peripheral-nodular E, no central E	partial/complete centripetal filling	complete E
Additional features	small lesion: complete, rapid centripetal E, rim enhancement		non-enhancing areas
FNH			
Typical features	hyper-enhancing, complete, early	hyper-enhancing	iso/hyper-enhancing
Additional features	spoke wheel arteries, centrifugal filling, feeding artery	hypo-enhancing central scar	hypo-enhancing central scar
Focal fatty sparing			
Typical features	iso-enhancing	iso-enhancing	iso-enhancing
Focal fatty change			
Typical features	iso-enhancing	iso-enhancing	iso-enhancing
Regenerating nodule			
Typical features	iso-enhancing	iso-enhancing	iso-enhancing
Other features	hypo-enhancing		
Simple cyst			
Typical features	non-enhancing	non-enhancing	non-enhancing
Adenoma			
Typical features	hyper-enhancing, complete	iso-enhancing	iso-enhancing
Additional features	non-enhancing areas	hyper-enhancing non-enhancing areas	non-enhancing areas
Abscess			
Typical features	rim E, no central E	hyper-iso-enhancing rim, no central E	hypo-enhancing rim, no central E
Additional features	enhanced septa hyper-enhanced liver segment	hypo-enhancing rim enhanced septa hyper-enhanced liver segment	

(文献2より)

本稿では、この診断基準の取り決めに従い、動脈優位相(血管イメージと灌流イメージ)、門脈優位相、後血管相(後血管イメージ)の画像所見を、肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)以外の肝腫瘍、肝内胆管癌(胆管細胞癌)、転移性肝腫瘍、肝細胞腺腫、肝血管腫、限局性結節性過形成(focal nodular hyperplasia: FNH)、その他の肝腫瘍について典型例を中心に画像所見を示しながら記載する。なお、後血管イメージはクッパーイメージ(Kupffer image)との呼称で使用されることが多いが、本基準ではエビデンスが十分でないとの見地から「注」にのみ記載されている。しかし、きわめてよく使用されている呼称のため、本稿では「後血管相(クッパーイメージ)」という表現を用いていることに留意していただきたい。

一方、2008年にEFSUMB(ヨーロッパ超音波医学会)から出された「Guidelines and Good Clinical Practice Recommendation for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS)-Update 2008」を表2、3に示した²⁾。表2は良性疾患として肝血管腫、FNH、限局性低脂肪化域(focal

fatty sparing)、限局性脂肪変性(focal fatty change)、再生結節(regenerating nodule)、単純嚢胞(simple cyst)、肝細胞腺腫(adenoma)、肝膿瘍(abscess)の8腫瘍につき典型的所見と付加所見が時相別に記載されている。表3は悪性疾患としてHCC(肝硬変合併例と非合併例)、血管に乏しい転移性肝腫瘍(hypovascular Mets)、血管に富む転移性肝腫瘍(hypervascular Mets)、嚢胞性転移性肝腫瘍(cystic metastasis)、胆管細胞癌(cholangiocarcinoma)の5腫瘍について、同様に典型的所見と付加所見が時相別に記載されている。

ここで注意が必要なのは、EFSUMBではSonoVue[®]、Optison[®]、Luminy[®]などの細胞外液性の造影剤(一部クッパー細胞に取り込まれるとの報告もある)が使用されているため、わが国で使用されているソナゾイドと時相別の所見が異なることである。EFSUMBでは時相として動脈相(arterial phase、造影剤注入後10~20秒から始まり25~35秒まで)、門脈-静脈相(portal-venous phase、30~45秒で始まり120秒まで)、後期相(late phase、120秒からバブルの消失する約240~360秒ま

表3 Enhancement (E) patterns of malignant focal liver lesions

Tumor entity	Arterial phase	PV phase	Delayed phase
HCC			
Typical features (in cirrhosis)	hyper-enhancing, complete non-enhancing areas	iso-, hypo-enhancing non-enhancing areas	hypo/iso-enhancing
Additional features	basket pattern/chaotic vessels		
Atypical features	enhancing tumor thrombus in PV and/or HV		
HCC in non cirrhotic liver	non-enhancing lesion	non-enhancing lesion	non-enhancing lesion
	hyper-enhancing	hypo/non enhancing	hypo/non enhancing
Hypovascular Mets			
Typical features	rim E	hypo-enhancing	hypo/non enhancing
Additional features	complete E, non-enhancing areas	non-enhancing areas	
Hypervascular Mets			
Typical features	hyper-enhancing, complete	hypo-enhancing	hypo/non enhancing
Additional features	chaotic vessels		
Cystic metastasis			
Typical features	hyper-enhancing nodular/rim component	hypo-enhancing	hypo-enhancing
Cholangiocarcinoma			
Typical features	rim E	hypo/non enhancing	hypo/non enhancing
Additional features	non-enhancing		

(文献2より)

で、表3ではdelayed phaseとの表現があるが文中ではその使い分けの説明がなくlate phaseと同義語と思われる)と時間を表示して分類されている。これに対しわが国の診断基準では、時相は時間で規定するのではなくパブルの主たる存在部位から、動脈優位相 (arterial predominant phase), 門脈優位相 (portal predominant phase), 後血管相 (post vascular phase) に分けている。このあたりの違いを十分に注意して所見を読む必要がある。とくに、後血管相は血管内の造影剤濃度が十分に低下し、造影剤による血管の造影効果が失われた時相 (造影剤注入後おおよそ10分以降とされている) と定義されており、EFSUMBのlate phaseとはまったくの別所見である。ソナゾイドは現時点ではわが国でしか認可されておらず、後血管相 (クーパーイメージ) はわが国のみで得られる画像といえる。今後、造影超音波について議論するためには、時相の呼称、定義は世界での統一が急務と思われる。

1. 肝内胆管癌 (胆管細胞癌)

肝内胆管癌には、肉眼分類型として腫瘤形成型 (mass forming type), 胆管浸潤型 (periductal infiltrating type), 胆管内発育型 (intraductal growth type) の3基本型がある。原則として病巣の最大面での性状で判断する。2種以上の肉眼分類型をもつ場合は、優勢な (面積のより大

なる) 分類型を先に記載して「+」記号で併記する³⁾。

図1は、肝内胆管癌腫瘍形成型の症例である。Bモードでは境界不明瞭な不整形のやや低エコーの腫瘍を認める。動脈優位相では辺縁に血管影を認め、中央を突き抜ける線状の血管影を認める。門脈優位相では一部に染影が持続し、線維性の結合織の存在をうかがわせる。後血管相 (クーパーイメージ) は境界明瞭な欠損を認めた。CTも同様の所見で、平衡相で腫瘍に造影剤の停滞を認めた。典型的な所見と考えられる。

図2は、末梢胆管の拡張を伴った例である。Bモードは図1と同様に境界不明瞭な不整形のやや低エコーの腫瘍である。胆管浸潤もあると推定される。腫瘍の中央を突き抜ける線状の血管影も認める。hypovascularな腫瘍で、肝動脈造影下CT (CTHA) でも確認できる。後血管相 (クーパーイメージ) で境界明瞭な欠損像を認め、これが実際の腫瘍と考えられる。経動脈性門脈造影下CT (CTAP) では、左外側域に門脈血流は到達せず、同部位での腫瘍の門脈への浸潤がもっとも考えられる。

原発性肝癌取扱い規約では、細胆管細胞癌 (cholangiolocellular carcinoma) が一つの疾患として記載されている⁴⁾。肉眼的には肝内胆管癌に類似するが、約半数は慢性肝炎あるいは肝硬変を合併する。造影超音波所見の報告は少ないが、肝内胆管癌腫瘍形成型がリング状濃染を示すのに対し、細胆管細胞癌では全体が染影されることが多く、wash outも遷延することが多い⁵⁾。また、転移

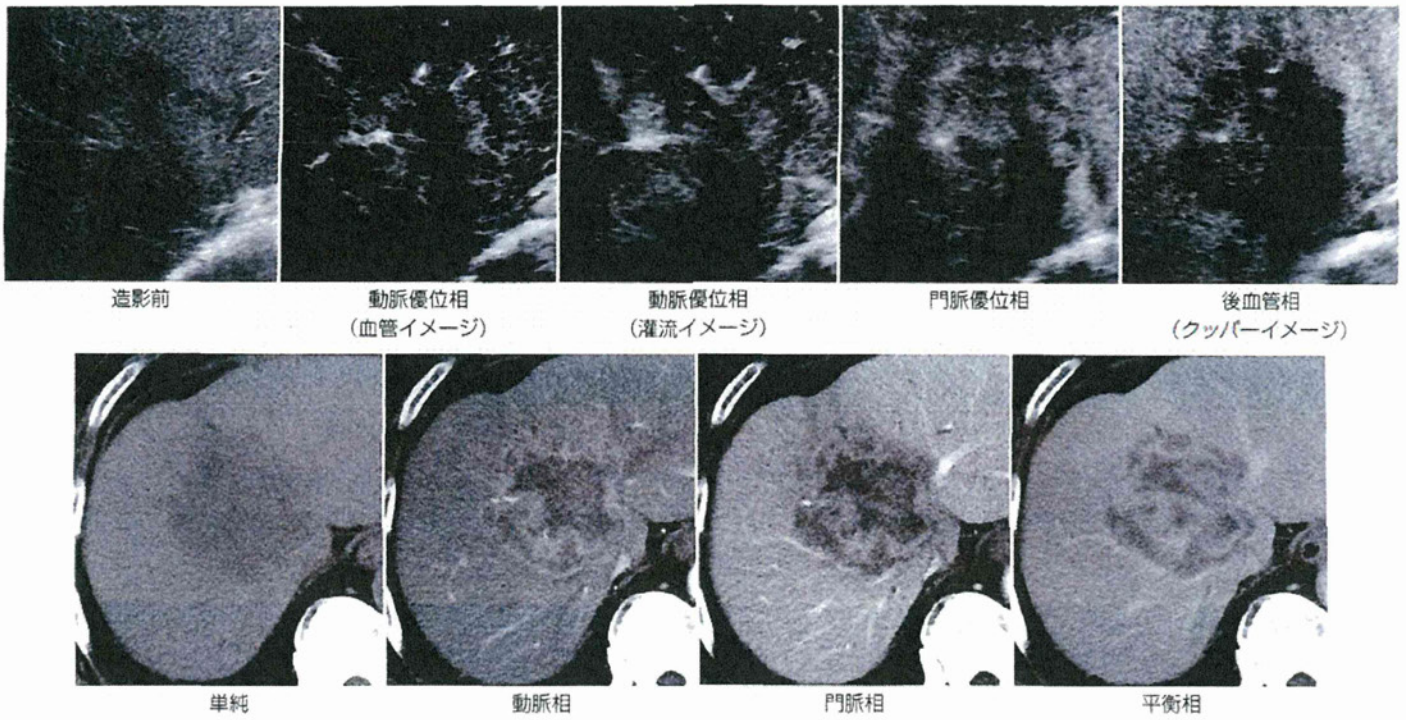


図1 肝内胆管癌（腫瘍形成型）
上段は造影超音波、下段はダイナミックCTを示す。

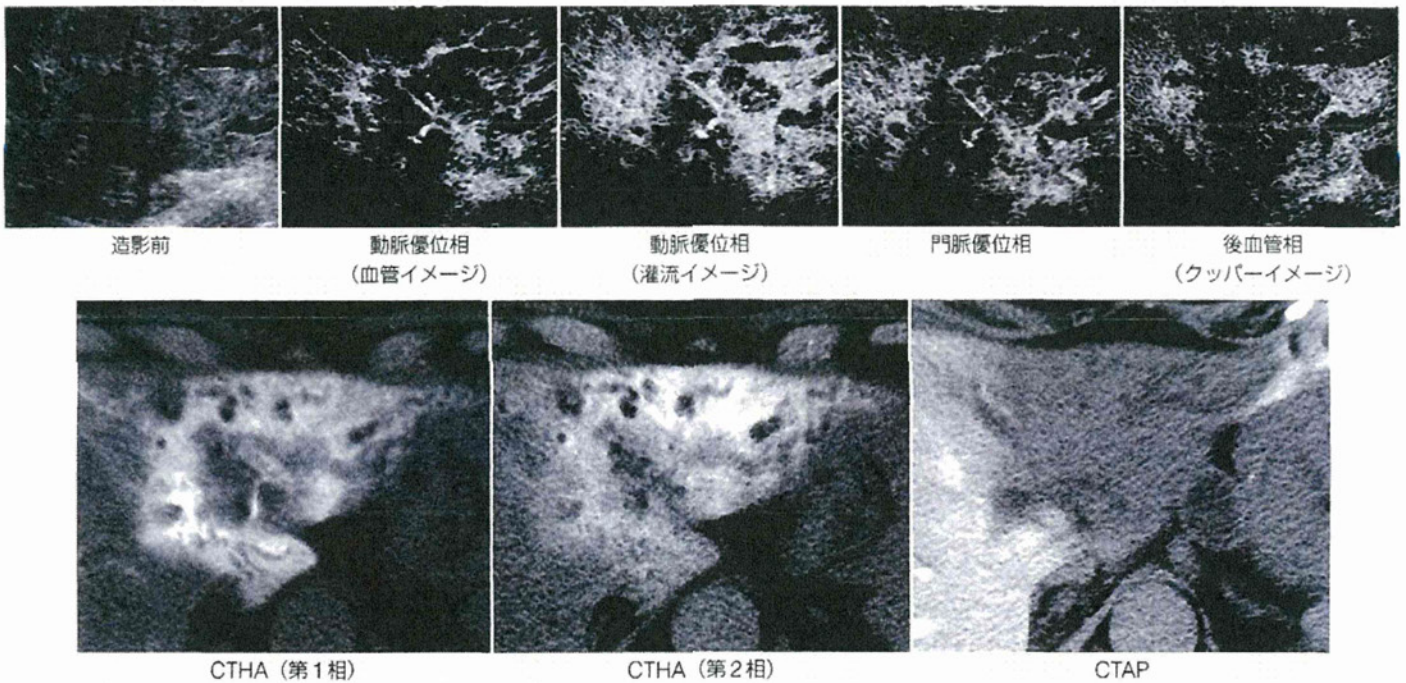


図2 肝内胆管癌（腫瘍形成型+胆管浸潤型）
上段は造影超音波、下段は血管造影下CTを示す。CTHA：CT during hepatic arteriography, CTAP：CT during arterial portography。

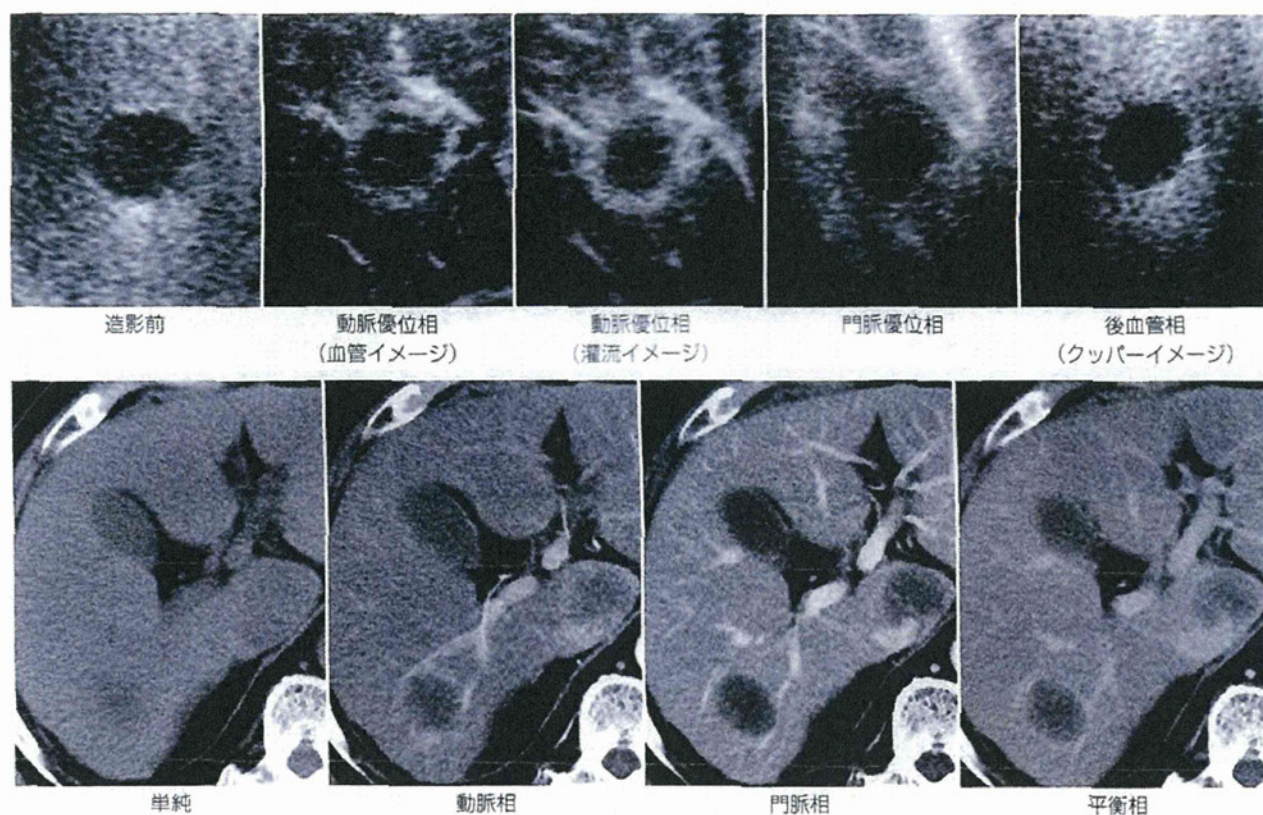


図3 転移性肝腫瘍（胃癌肝転移）

上段は造影超音波、下段はダイナミックCTを示す。

性肝腫瘍との鑑別が困難な症例も多数認め、これらは原発巣検索による除外診断となる。

2. 転移性肝腫瘍

肝臓は、門脈と動脈の二重支配を受け血流が豊富なため、肺に次いで転移性癌の好発部位である。消化管からの腺癌の転移が大部分を占め、基本的には腫瘍辺縁に細胞成分が、中心部には凝固・壊死が主体に分布する層構造をとる。

したがって、造影所見は腫瘍の辺縁のみ早期濃染される、いわゆるリング状濃染（ring-enhancement）を呈しやすい（図3）。リング状濃染の機序として、①腫瘍自体の辺縁の細胞成分の濃染、②腫瘍の圧排に起因する広義の動門脈シャント（AP shunt）、線維間質の増生、炎症、血管新生などによる周囲の非癌部肝組織の濃染が考えられている。消化管の腺癌からの転移は乏血性であることが多く、②の機序によるリング状濃染が主体と考えられる⁶⁾。一方、カルチノイド、GIST（gastrointestinal

stromal tumor）の一部などはもともと多血性のため転移巣でも血流が豊富となるが、wash outは早い。

転移性肝腫瘍の所見から原発巣を予測することは困難である。胃や大腸などの消化管の粘液産生腫瘍からの転移では石灰化をきたすことがある。胃癌は大腸癌よりも多血性である印象である。嚢胞性肝転移の場合は、卵巣癌や粘液産生嚢胞腺癌など嚢胞性腫瘍からの転移の可能性が高い。膵管癌は一般的に、2cm前後の大きさの摘った結節が肝全体に均一に分布することが多い。また、膵管癌は末梢門脈枝の微小腫瘍栓やグリソン鞘へ浸潤すると考えられており、楔状の濃染像として認められることがある⁷⁾。ときにはこの所見のため腫瘍が見逃される場合もある。後血管相（クーパーイメージ）が有用となる。胆嚢癌では胆嚢床部に集簇する特徴がある。乳癌では微小な結節が密に分布し腫瘍として捉えられないことがあり、同様に後血管相（クーパーイメージ）が有用である。

図3に転移性肝腫瘍（胃癌肝転移）の典型例を示す。動脈優位相でリング状濃染を示し、門脈優位相でwash outされ、後血管相（クーパーイメージ）では境

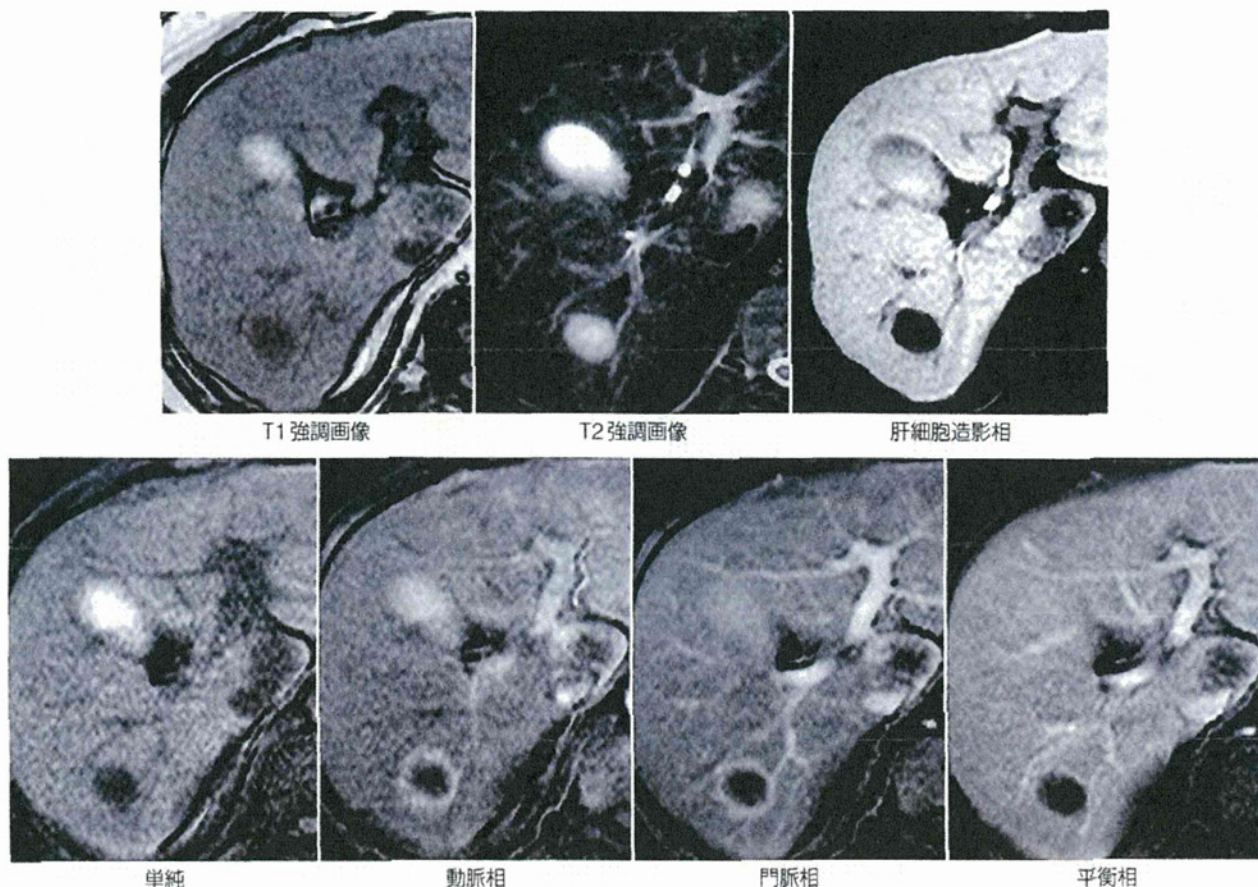


図4 転移性肝腫瘍 (胃癌肝転移)
Gd-EOB-DTPA造影MRI。下段はダイナミックMRIを示す。

界明瞭な欠損を示す。図3下段のダイナミックCTおよび図4下段のダイナミックMRIでも同様の所見を示している。図4上段右のGd-EOB-DTPA (gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid) 造影MRI肝細胞造影相では境界明瞭な欠損像として描出されている。

図5は肺の小細胞癌肝転移像である。上段の造影超音波の動脈優位相灌流イメージではほぼ腫瘍全体の濃染像を認めるが、下段のダイナミックMRI動脈相ではリング状濃染を示している。造影超音波の時間分解能が優れていることが確認される。

図6は悪性黒色腫の肝転移である。上段は工藤らによって提唱された defect re-perfusion imagingで、ソナゾイドの安定した後血管相 (クッパーイメージ) に造影剤の再注入で血管相を重ね合わせた画像である⁸⁾。後血管相 (クッパーイメージ) ではじめて検出された結節の血流を評価する方法であり、超音波造影剤を再注入するこ

とで、結節が濃染され血管に富む転移性肝腫瘍であることがわかる。下段は高音圧の超音波送信を行いスキャンボリューム内のパブルを一掃して、再度、再灌流を観察した replenishment method である⁹⁾。病変の血行動態を繰り返し観察することができて有用で、同様に血管に富む転移性肝腫瘍であることがわかる。

3. 肝細胞腺腫

肝細胞腺腫はわが国ではまれな腫瘍で、肝細胞癌、FNHとの鑑別が重要な腫瘍である。後述するFNHとは異なって動脈優位相血管イメージで、腫瘍境界から取り囲むように内部に細かい血管が流入するのが特徴である (図7下段)^{10,11)}。一方、門脈優位相での輝度の低下は約半数に認め、3分の1に造影が持続するとされる¹¹⁾。後血管相 (クッパーイメージ) の報告は少ないが、同等もしくは不完全欠損とされている¹¹⁾。

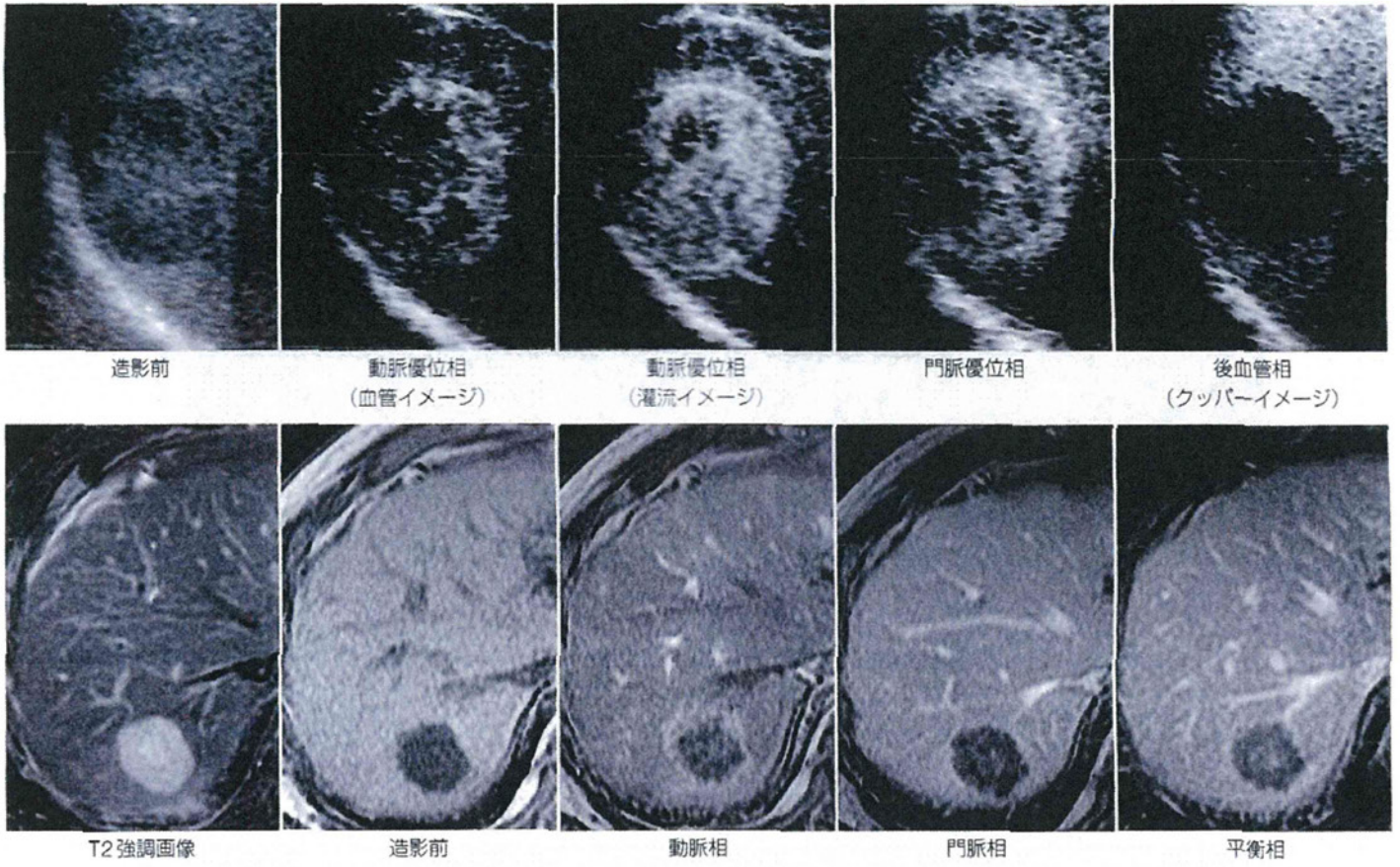


図5 転移性肝腫瘍（肺小細胞癌肝転移）
上段は造影超音波、下段はダイナミックMRIを示す。

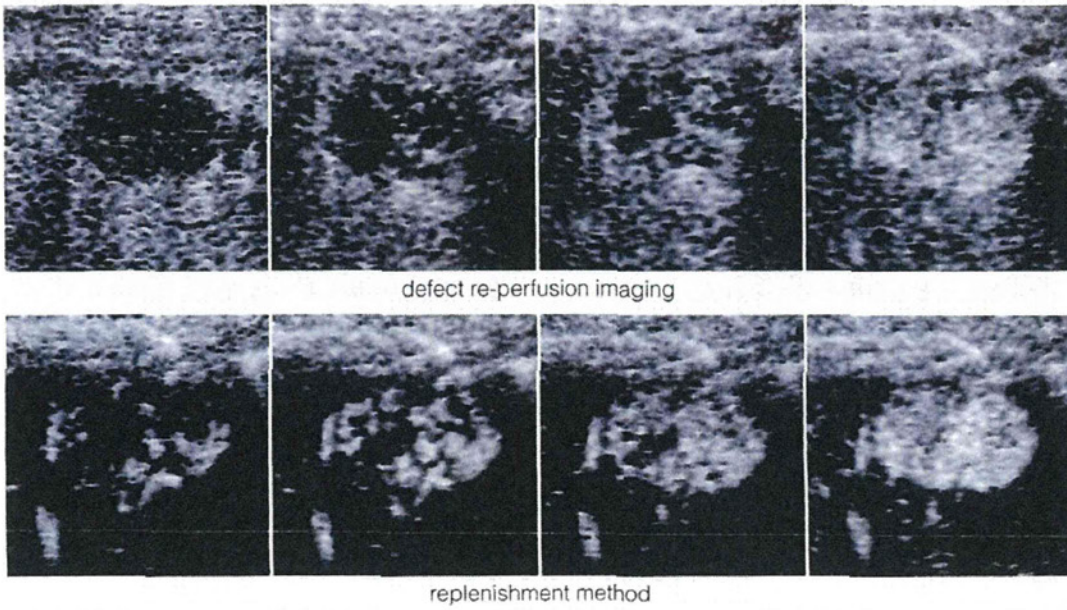


図6 転移性肝腫瘍（悪性黒色腫肝転移）
造影超音波でdefect re-perfusion imaging（上段）とreplenishment method（下段）を示す。

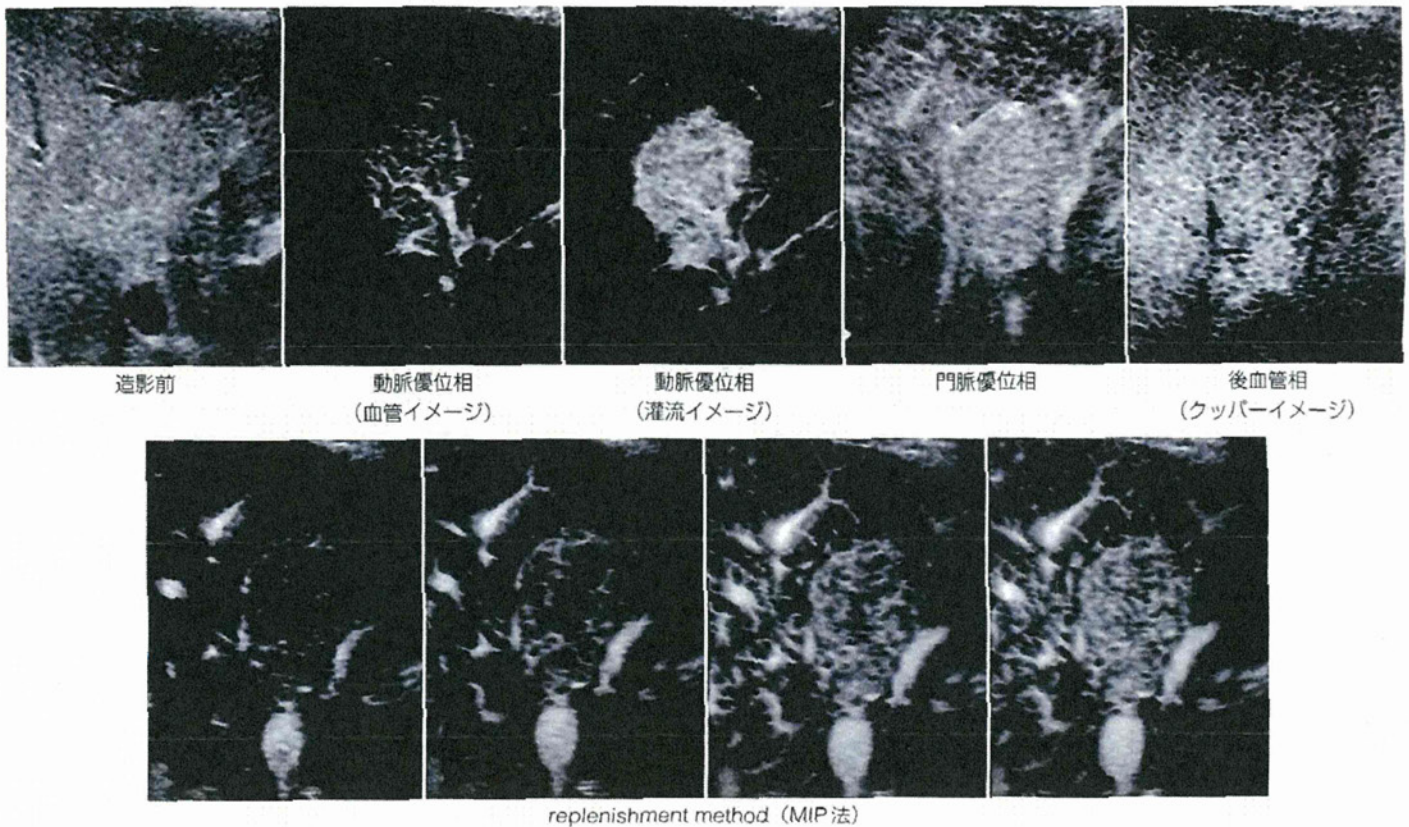


図7 肝細胞腺腫

上段は造影超音波、下段は造影超音波の maximum intensity projection (MIP) 法を示す。

図7は肝細胞腺腫の造影超音波像である。上段の門脈優位相は肝実質部と同等の輝度で造影が持続し、後血管相(クッパーイメージ)でも肝実質と同程度の輝度を示している。下段のMIP法では腫瘍境界から血管の流入する像がとらえられている。図8の上段のダイナミックCTでは門脈相まで濃染が持続し、平衡相ではwash outを認める。下段のGd-EOB-DTPA造影MRIでは同様に門脈相まで濃染が持続しており、肝細胞造影相では造影剤の取り込みを認めている。肝細胞腺腫の特徴的な所見である血管イメージをとらえるためには、時間分解能のよい造影超音波がもっとも有用と考えられる。

4. 肝血管腫

肝血管腫はきわめて特徴的な画像を示し、造影超音波で90%以上で確定診断が得られ、MRI、CTなどの他の画像診断の必要性は減少した。すなわち、動脈優位相では辺縁から中央に向かって濃染され始め、辺縁が点状

もしくは斑状に濃染される(centripetal enhancement, peripheral-nodular enhancement)。門脈優位相では中央へ濃染が進み、中心部は造影されないことが多い(partial/complete centripetal filling)。後血管相(クッパーイメージ)では肝実質と同等、一部造影されない部位も認める。一部流速の早い肝血管腫では動脈優位相で濃染するが、門脈優位相で濃染が持続して肝実質より高いことから鑑別可能である¹³⁾。

図9は典型的な肝血管腫である。上段の造影超音波動脈優位相では腫瘍は辺縁から中央に向かって濃染され始め、辺縁が点状もしくは斑状に造影されている。門脈優位相では中心部を残してほぼ全体が濃染され、後血管相(クッパーイメージ)では一部輝度が落ちてきている。下段のダイナミックCTもほぼ同様の所見であった。

図10はいわゆる high-flow hemangioma の症例である。動脈優位相では速やかに腫瘍全体が染まり、門脈優位相では濃染が持続している。後血管相(クッパーイメージ)では肝実質部より低輝度となっている。下段のT2強調

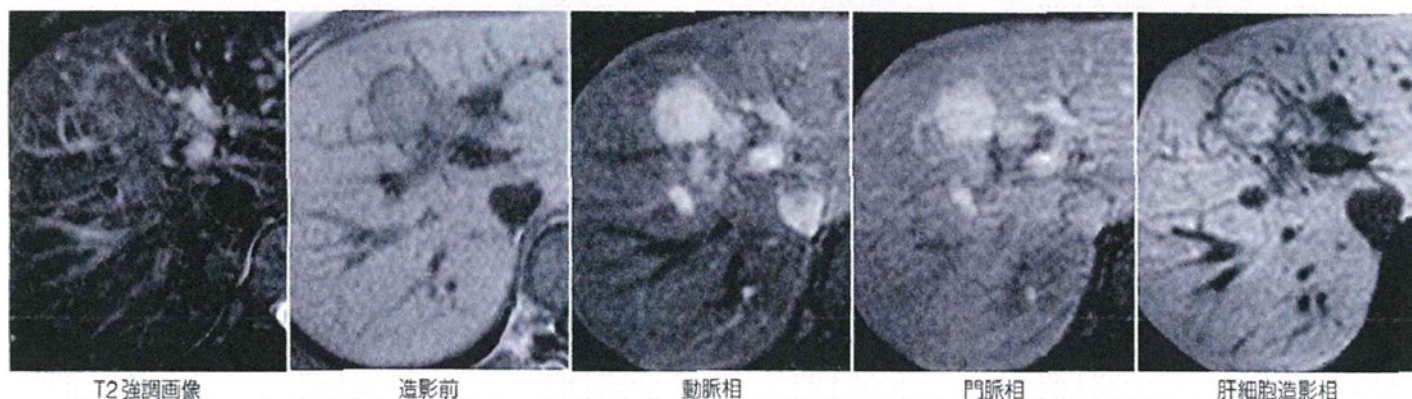
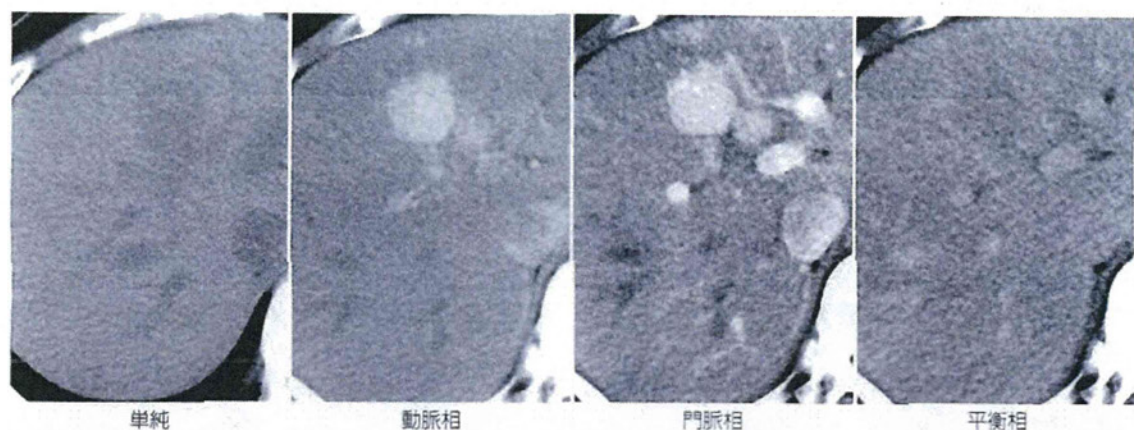


図8 肝細胞腺腫

上段はダイナミックCT，下段はGd-EOB-DTPA造影MRIのT2強調画像，ダイナミックMRI，肝細胞造影相を示す。

画像では著明な高信号を示し，ダイナミックMRIでは動脈相では濃染し，平衡相まで染影が持続し，肝細胞造影相では低信号となっている．門脈相での染影の持続が診断の決め手となる．

図11も典型的な肝血管腫の超音波像である．上段の造影超音波では腫瘍辺縁が強く染まっており，fill-inはあまり顕著ではない．下段のMIP法ではその動態がより詳細に評価できる．図12は同症例のMRI像である．上段のT2強調画像では著明な高信号で，肝細胞造影相では低信号である．下段のダイナミックMRIでは辺縁から斑状に濃染され，平衡相まで持続しており典型的な肝血管腫の所見である．

5. 限局性結節性過形成 (FNH)

非硬変肝にみられる腫瘍性病変で，血管奇形などに伴い肝細胞が過形成となったものと考えられている．典型例では中心部に星芒状瘢痕 (central stellate scar) と呼

ばれる動脈に富む線維性組織があり，ここから動脈を伴って隔壁様の構造が結節内に放射状に伸びる．したがって，造影超音波の動脈優位相は中心から辺縁に放射状に広がる血流を示し，短時間で濃染する．門脈優位相でも濃染が持続し，後血管相 (クーパーイメージ) では肝実質と同等もしくは高輝度となる．従来使用されてきた「車軸様血管」は，車軸は方向性を示していないことから不相当と判断し，日本超音波医学会「医用超音波用語集」から削除され，スポークホイールパターン (spoke-wheel pattern) が採用されていることに留意していただきたい．

図13は典型的なFNH症例である．造影超音波の動脈優位相 (血管イメージ) では中心から放射状に広がる血管が描出され，門脈優位相では染影が持続し，後血管相 (クーパーイメージ) では肝実質より高輝度で中心瘢痕に一致する部位に欠損を認めた．下段のMIP法ではより詳細に血管構築が評価できる．図14はMRI像である．上段のT2強調画像では一部高信号で，肝細胞造影相で

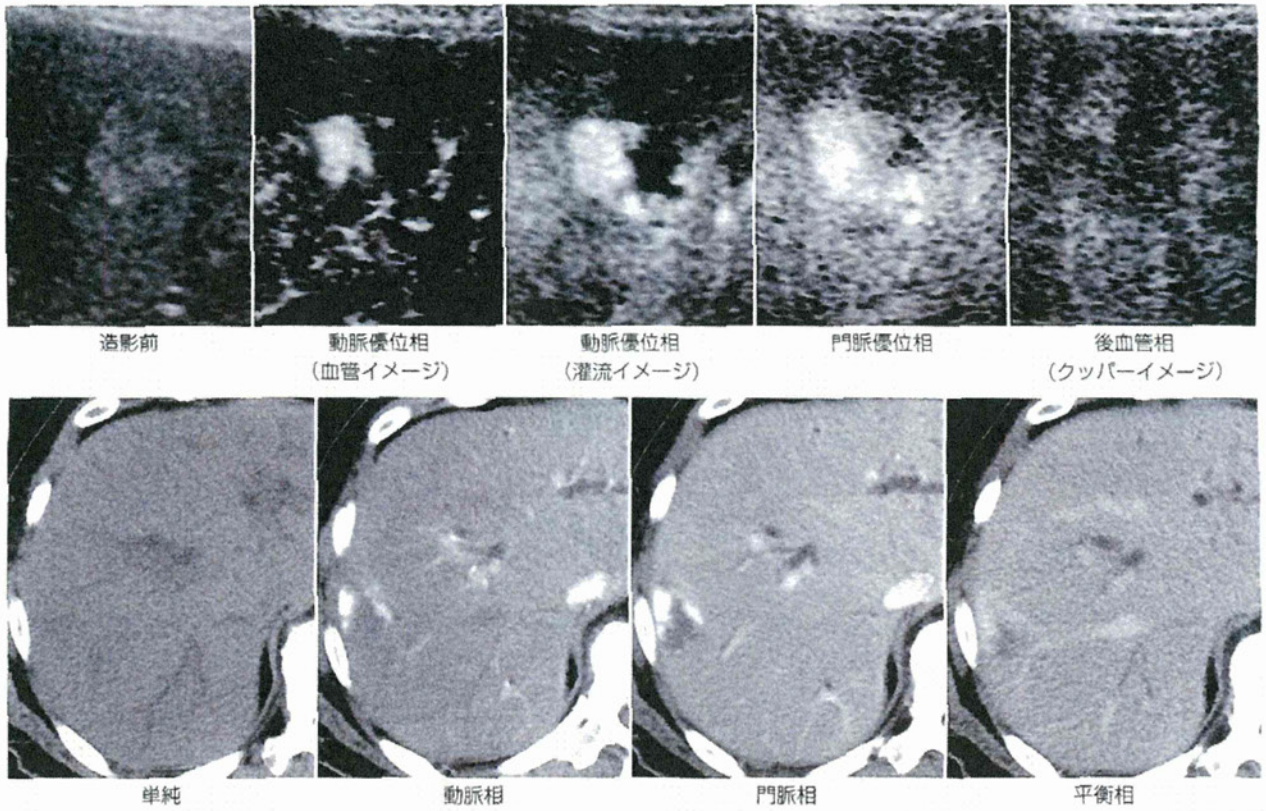


図9 肝血管腫

上段は造影超音波，下段はダイナミックCTを示す。

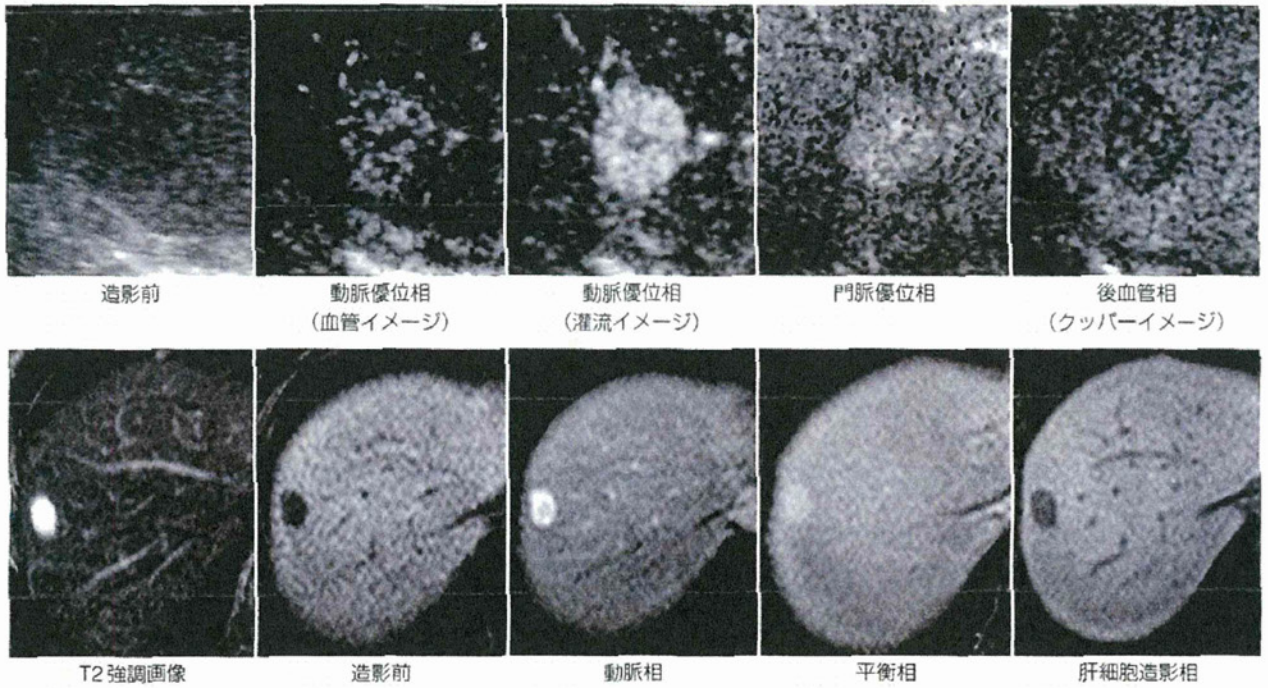


図10 肝血管腫 (high-flow hemangioma)

上段は造影超音波，下段はGd-EOB-DTPA造影MRIのT2強調画像，ダイナミックMRI，肝細胞造影相を示す。

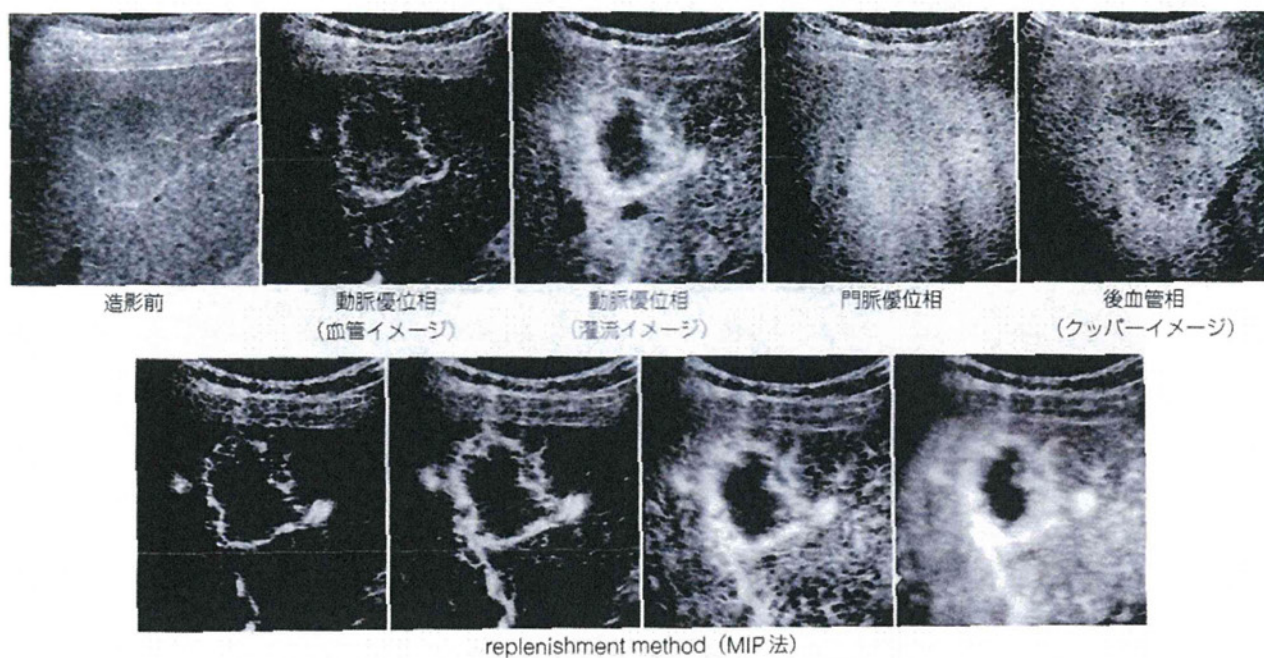


図11 肝血管腫
 上段は造影超音波、下段は造影超音波のMIP法を示す。

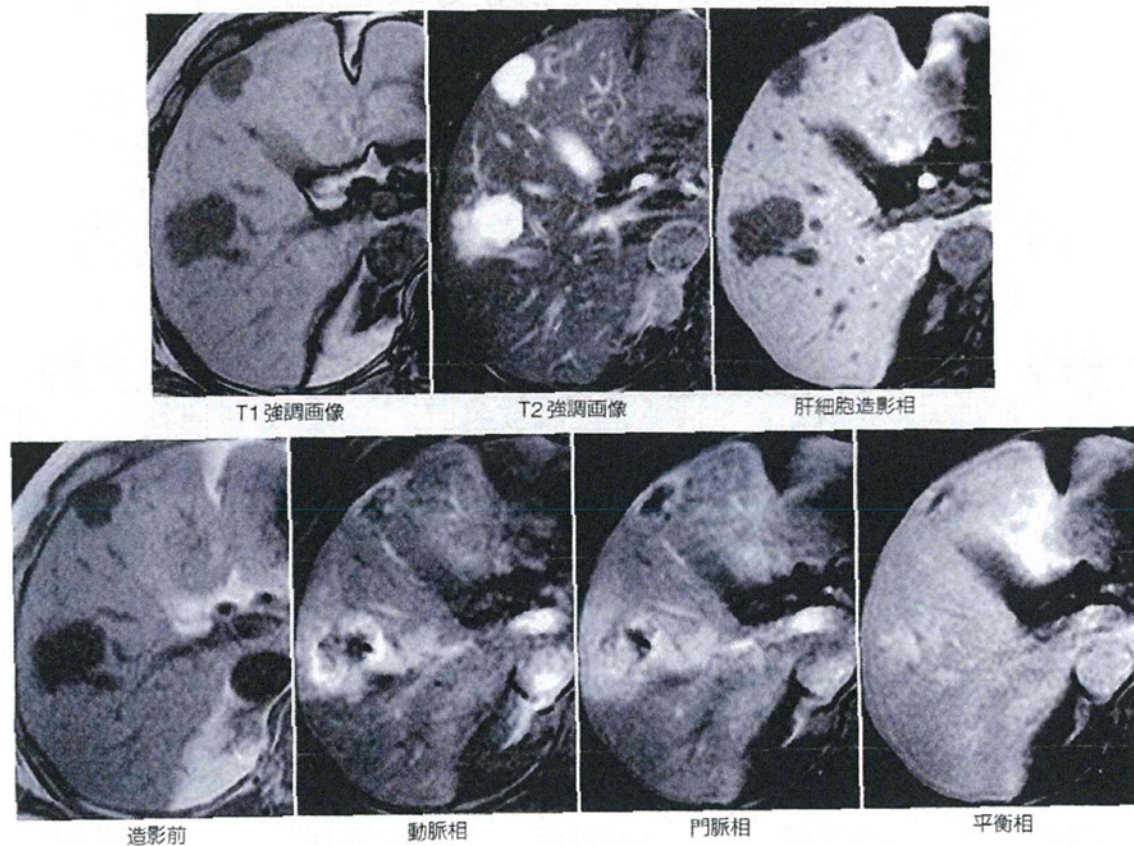


図12 肝血管腫
 Gd-EOB-DTPA 造影MRI。下段はダイナミックMRIを示す。

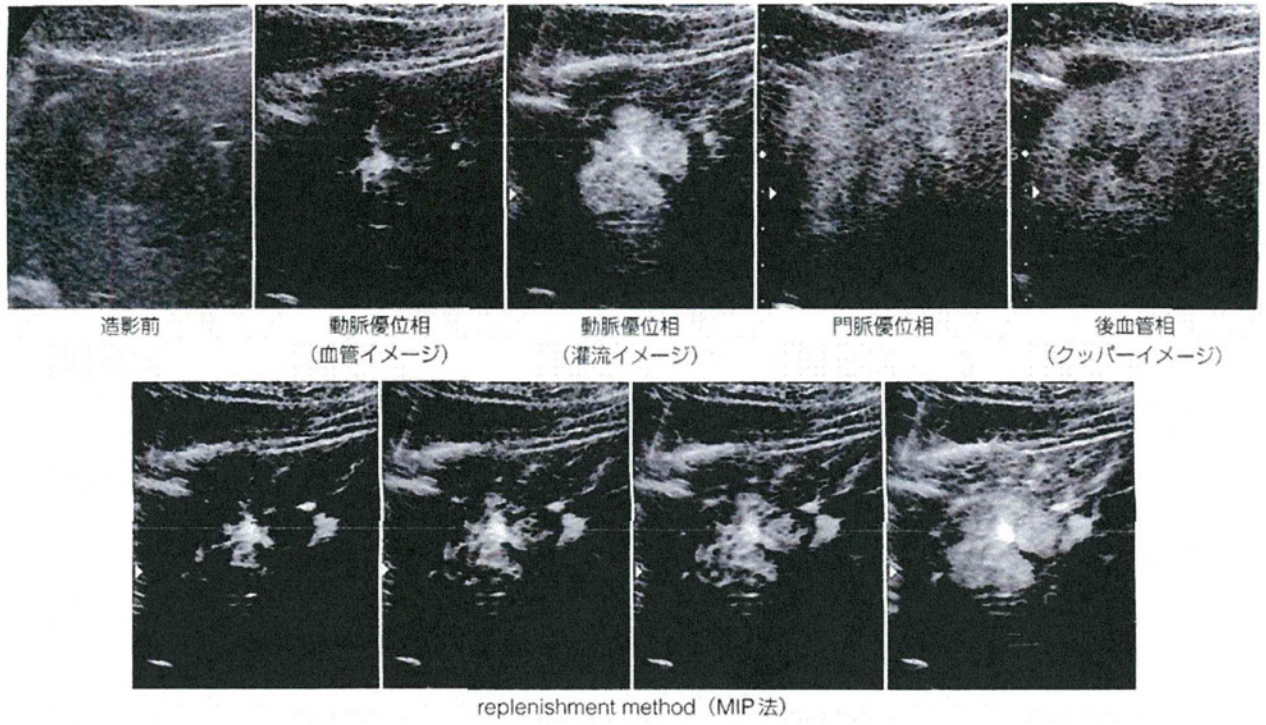


図13 限局性結節性過形成 (FNH)
上段は造影超音波、下段は造影超音波のMIP法を示す。

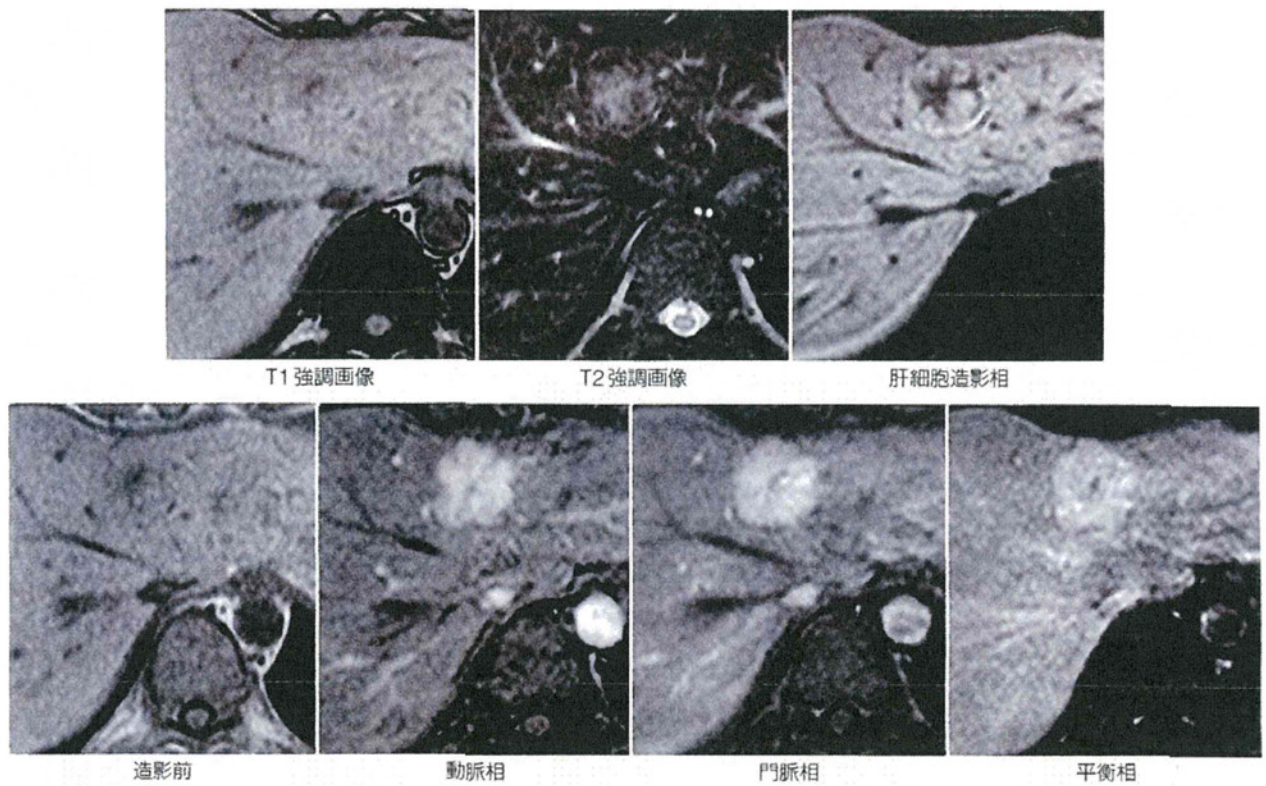


図14 限局性結節性過形成 (FNH)
Gd-EOB-DTPA造影MRI。下段はダイナミックMRIを示す。

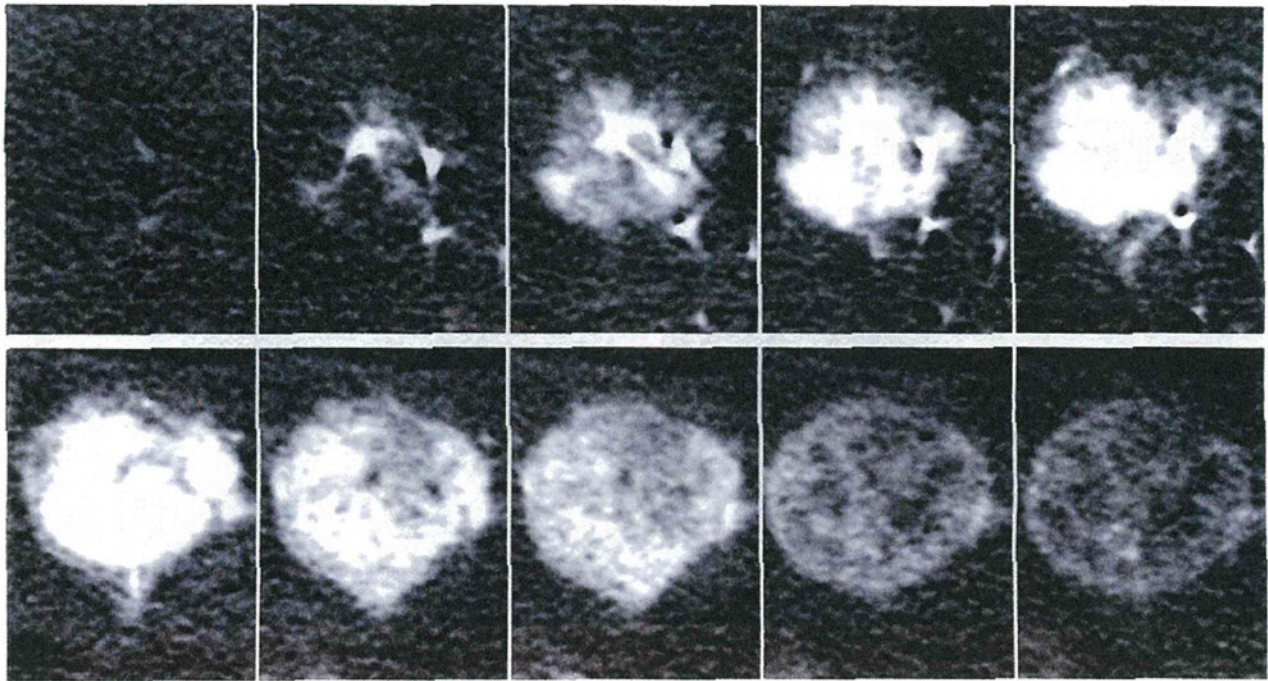
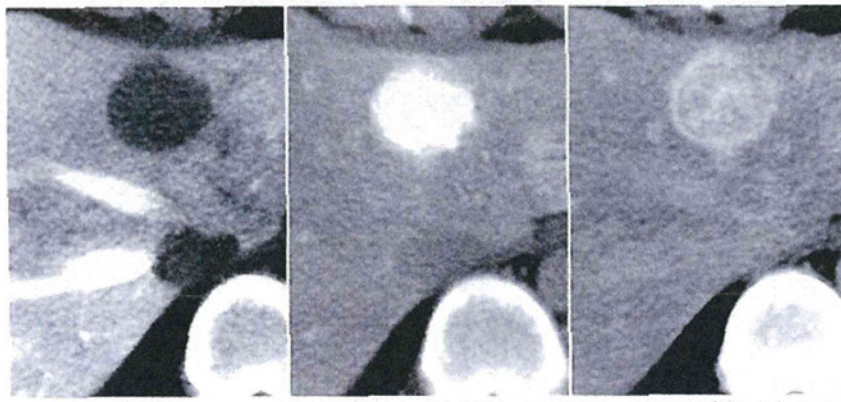


図15 限局性結節性過形成 (FNH)
single slice CTHA を示す。



CTAP

CTHA (第1相)

CTHA (第2相)

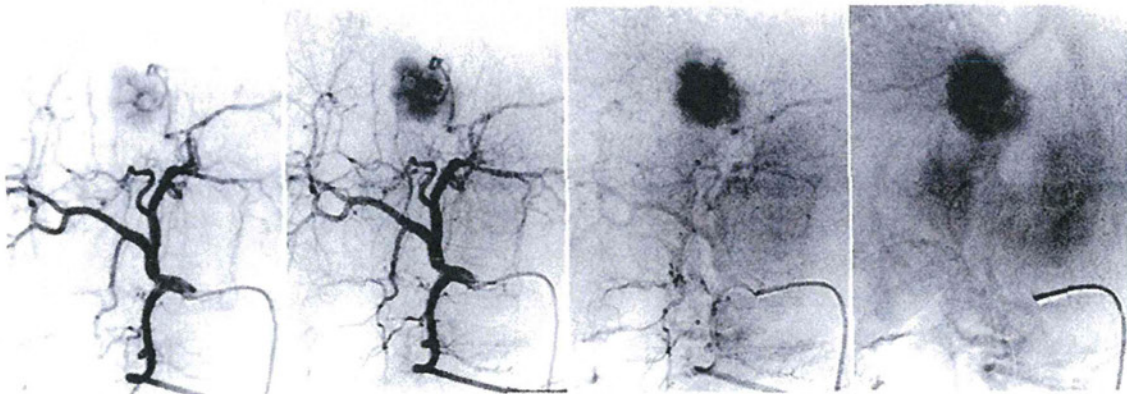


図16 限局性結節性過形成 (FNH)
上段は血管造影下CT, 下段は血管造影を示す。

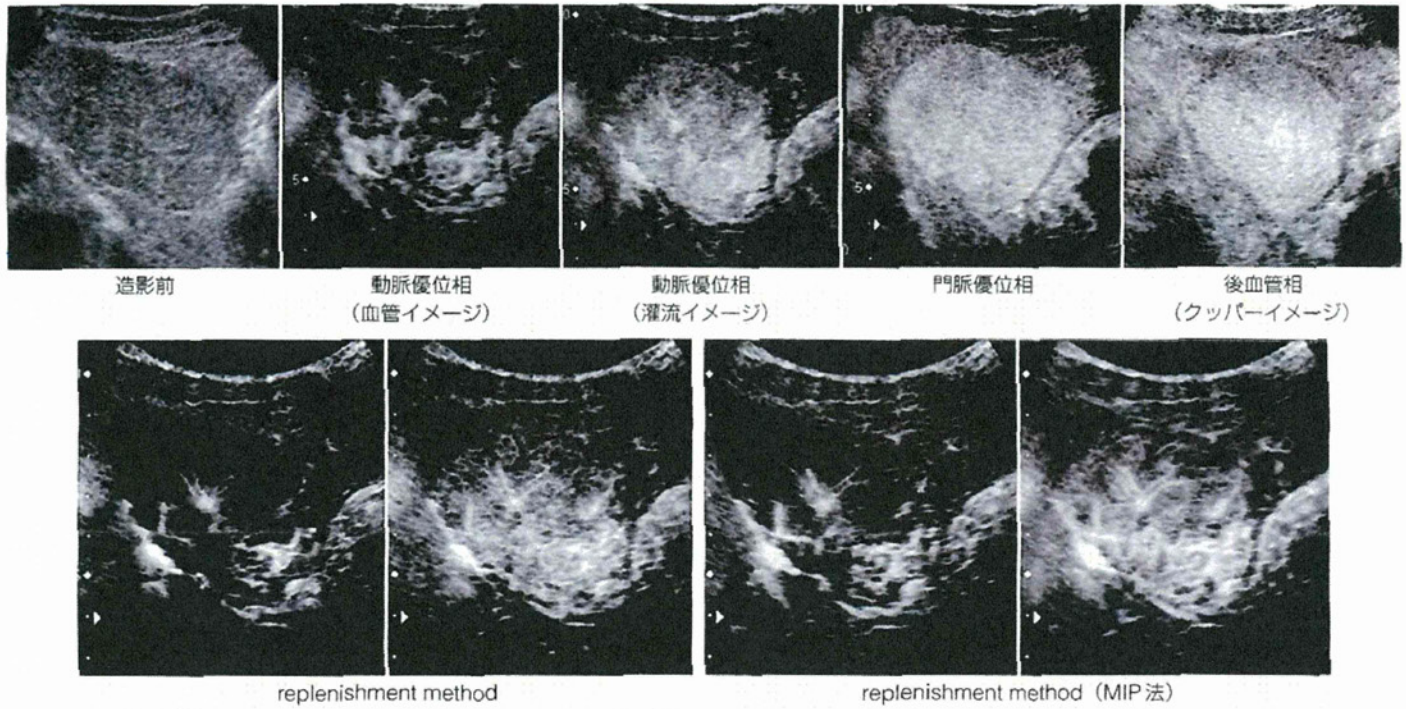


図17 限局性結節性過形成 (FNH)

上段は造影超音波、下段は造影超音波のreplenishment methodおよびMIP法を示す。

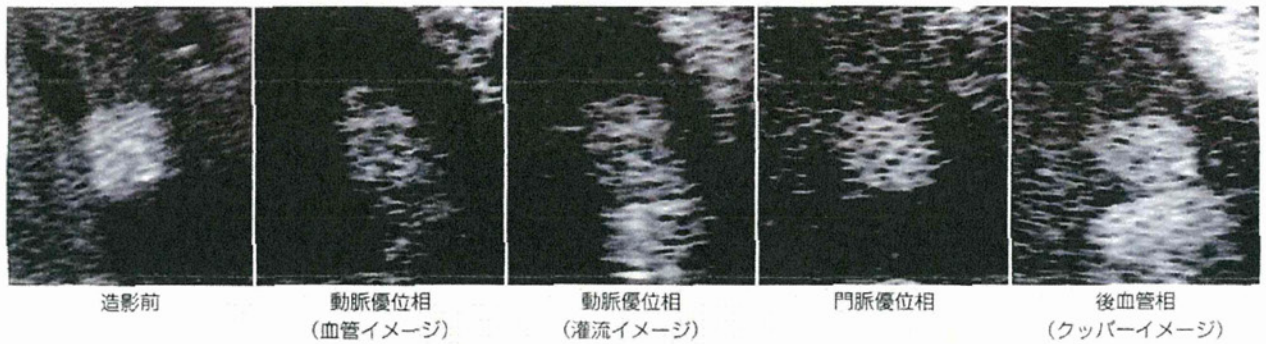


図18 血管筋脂肪腫

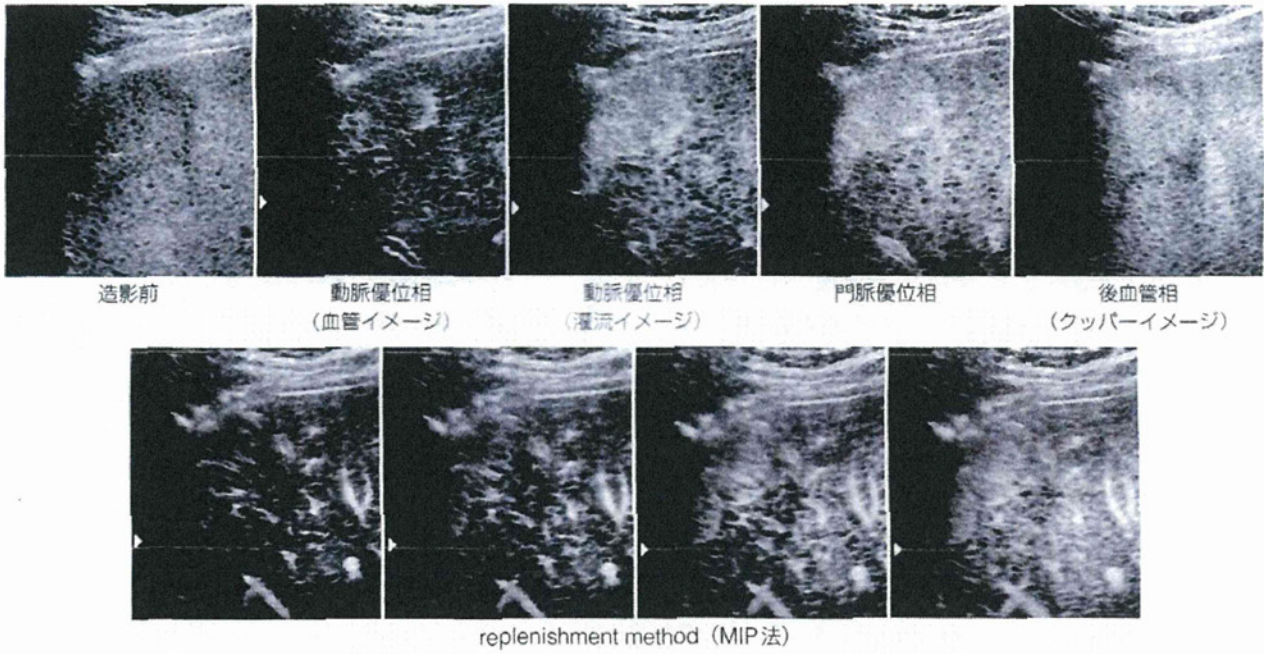
は腫瘍は造影剤を取り込んでいるが、中心瘢痕に一致して低信号域を認める。下段のダイナミックMRIでは、腫瘍は早期から濃染し平衡相まで持続している。図15はsingle slice CTHAである。腫瘍の中心から放射状に伸びていく血管が描出されている。図16上段のCTAPでは欠損を示し、CTHAでは濃染を示している。下段は血管造影像であるが、中央から放射状に広がる血管が描出されている。造影超音波は時間分解能が良く、血管構築をもっとも鮮明に描出できている。

図17もFNHの症例で、上段の造影超音波の動脈優

位相では2つの中心瘢痕があるようにみえるが、下段のMIP法でそれが確認された。

6. その他の腫瘍

血管筋脂肪腫 (angiomyolipoma: AML) は肝のまれな良性腫瘍の一つである。文字通り血管、筋および脂肪の3成分からなる腫瘍で、それぞれの3成分が20%以上の割合で混合されている場合が通常である。図18に典型例を示した。Bモード画像は高エコーを示し、動脈優



replenishment method (MIP法)
図19 脾症 (splenosis)
 上段は造影超音波, 下段は造影超音波のMIP法を示す.

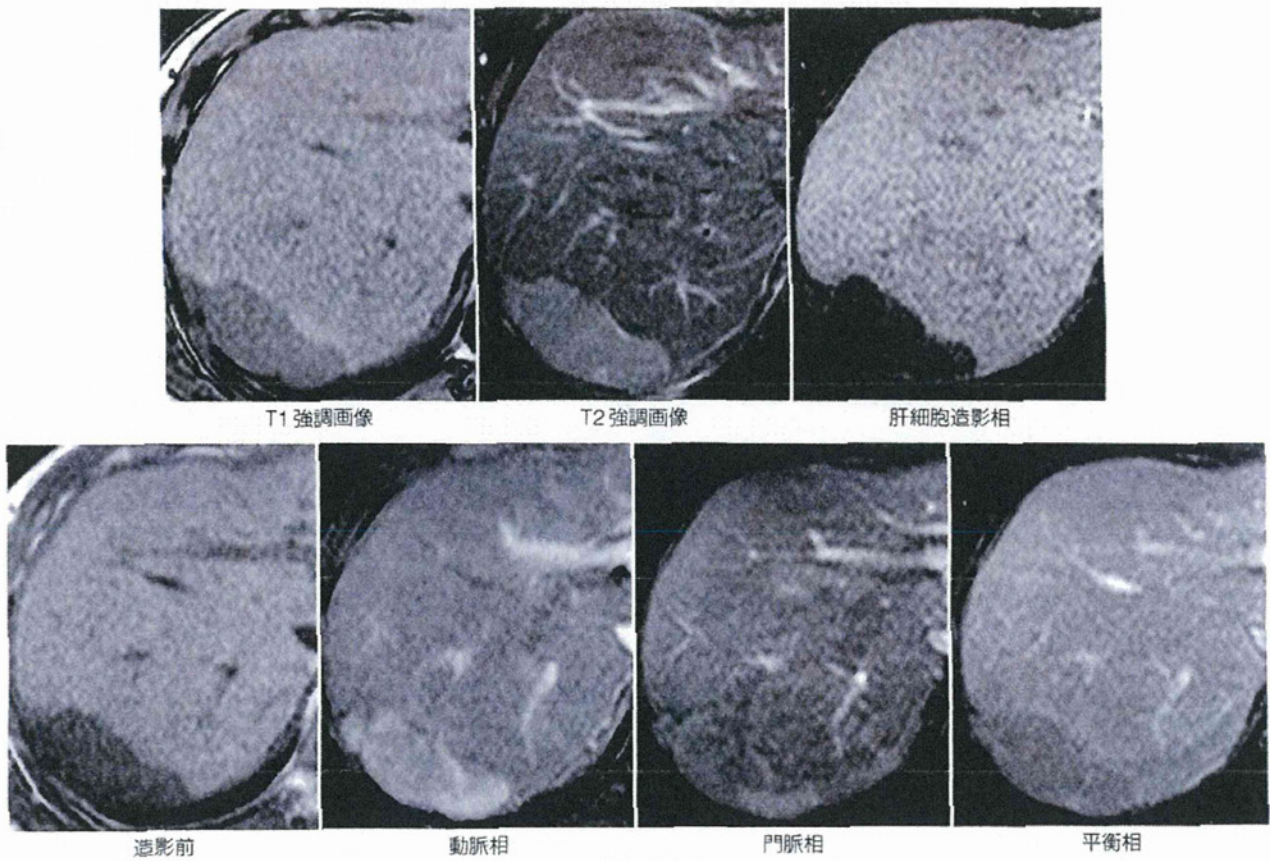


図20 脾症 (splenosis)
 Gd-EOB-DTPA 造影MRI. 下段はダイナミックMRIを示す.

位相で濃染している。

脾症 (splenosis) は、脾摘や脾破裂に伴い播種した脾組織が腹膜に付着して無茎性に発育したもので、ときとして肝腫瘍との鑑別が必要となる。図19は右葉表面にある脾症で、肝腫瘍との鑑別が困難である。しかし、上段の後血管相 (クーパーイメージ) で腫瘍の部分は濃染している。ソナゾイドは肝臓より脾臓により多くトラップされると報告されており、高輝度に描出されたと考えられる。下段replenishment methodによるMIP法では腫瘍血管などは認めない。図20のMRI像では、上段のT2強調画像ではやや高信号を、肝細胞造影相では低信号を示している。ダイナミックMRIの動脈相では腫瘍が濃染されているようにみえる。

■ 参考文献

- 1) 日本超音波医学会用語・診断基準委員会：肝腫瘍の超音波診断基準(案)。超音波医学, 37(2): 157~166, 2010.
- 2) EFSUMB Study Group, et al.: Guidelines and Good Clinical Practice Recommendation for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS)-Update 2008. *Ultraschall Med.*, 29(1): 28~44, 2008
- 3) 日本肝癌研究会編：臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約 (2009年6月) 第5版補訂版, 17~18, 金原出版, 2009.
- 4) 日本肝癌研究会編：臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約 (2009年6月) 第5版補訂版, 48, 金原出版, 2009.
- 5) 斎藤明子：超音波検査による細胆管癌の診断。肝細胞癌治療における局所再発の抑制と safety/surgical margin の必要性—画像による解析—。混合型肝癌, 細胆管脂肪癌, 硬化型肝細胞癌 (scirrhous) の病理と画像診断の考え方。高安賢一監修, 59~61, メディカルトリビューン, 2009.
- 6) Semelka, R.C., et al.: Perilesional enhancement of hepatic metastases: correlation between MR imaging and histopathologic findings—initial observations. *Radiology*, 215: 89~94, 2000.
- 7) Gabata, T., et al.: Imaging diagnosis of hepatic metastases of pancreatic carcinomas: significance of transient wedge-shaped contrast enhancement mimicking arteriportal shunt. *Abdom. Imaging*, 33: 425~427, 2008.
- 8) 工藤正俊, 畑中綱世, 鄭浩柄, 他: 肝細胞癌治療支援における Sonazoid 造影エコー法の新技術の提唱: Defect Reperfusion Imaging の有用性。肝臓, 48: 299~301, 2007.
- 9) 森安史典, 飯島尋子: 微小気泡造影剤を使った造影超音波診断の現状と展望。映像情報 Medical, 38: 570~578, 2006.
- 10) Dietrich, C.F., et al.: Differentiation of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma by contrast-enhanced ultrasound. *Br. J. Radiol.*, 78: 704~707, 2005.
- 11) Kim, T.K., et al.: Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: differentiation with low-mechanical-index contrast-enhanced sonography. *Am. J. Roentgenol.*, 190: 58~66, 2008.
- 12) Huppertz, A., et al.: Enhancement of focal liver lesions at gadoteric acid-enhanced MR imaging: correlation with histopathologic findings and spiral CT—initial observations. *Radiology*, 234: 468~478, 2005.
- 13) Dietrich, C.F., et al.: Contrast-enhanced ultrasound of histologically proven liver hemangiomas. *Hepatology*, 45: 1139~1145, 2007.

Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean

Nao Nishida^{1,2*}, Hiromi Sawai², Kentaro Matsuura³, Masaya Sugiyama¹, Sang Hoon Ahn⁴, Jun Yong Park⁴, Shuhei Hige⁵, Jong-Hon Kang⁶, Kazuyuki Suzuki⁷, Masayuki Kurosaki⁸, Yasuhiro Asahina⁸, Satoshi Mochida⁹, Masaaki Watanabe¹⁰, Eiji Tanaka¹¹, Masao Honda¹², Shuichi Kaneko¹², Etsuro Orito¹³, Yoshito Itoh¹⁴, Eiji Mita¹⁵, Akihiro Tamori¹⁶, Yoshikazu Murawaki¹⁷, Yoichi Hiasa¹⁸, Isao Sakaida¹⁹, Masaaki Korenaga²⁰, Keisuke Hino²⁰, Tatsuya Ide²¹, Minae Kawashima², Yoriko Mawatari^{1,2}, Megumi Sageshima², Yuko Ogasawara², Asako Koike²², Namiki Izumi⁸, Kwang-Hyub Han⁴, Yasuhito Tanaka³, Katsushi Tokunaga², Masashi Mizokami¹

1 Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Chiba, Japan, **2** Department of Human Genetics, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, **3** Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Aichi, Japan, **4** Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea, **5** Department of Internal Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan, **6** Department of Internal Medicine, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo, Japan, **7** Department of Gastroenterology and Hepatology, Iwate Medical University, Morioka, Japan, **8** Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo, Japan, **9** Division of Gastroenterology and Hepatology, Saitama Medical University, Saitama, Japan, **10** Department of Gastroenterology, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara, Kanagawa, Japan, **11** Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan, **12** Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa, Japan, **13** Department of Gastroenterology, Nagoya Daini Red Cross Hospital, Nagoya, Japan, **14** Molecular Gastroenterology and Hepatology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, **15** Department of Gastroenterology and Hepatology, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka, Japan, **16** Department of Hepatology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **17** Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan, **18** Department of Gastroenterology and Metabolism, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan, **19** Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi, Japan, **20** Division of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical College, Kurashiki, Japan, **21** Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan, **22** Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., Kokubunji, Tokyo, Japan

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection can lead to serious liver diseases, including liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC); however, about 85–90% of infected individuals become inactive carriers with sustained biochemical remission and very low risk of LC or HCC. To identify host genetic factors contributing to HBV clearance, we conducted genome-wide association studies (GWAS) and replication analysis using samples from HBV carriers and spontaneously HBV-resolved Japanese and Korean individuals. Association analysis in the Japanese and Korean data identified the *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes with $P_{meta} = 1.89 \times 10^{-12}$ for rs3077 and $P_{meta} = 9.69 \times 10^{-10}$ for rs9277542. We also found that the *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes were significantly associated with protective effects against chronic hepatitis B (CHB) in Japanese, Korean and other Asian populations, including Chinese and Thai individuals ($P_{meta} = 4.40 \times 10^{-19}$ for rs3077 and $P_{meta} = 1.28 \times 10^{-15}$ for rs9277542). These results suggest that the associations between the *HLA-DP* locus and the protective effects against persistent HBV infection and with clearance of HBV were replicated widely in East Asian populations; however, there are no reports of GWAS in Caucasian or African populations. Based on the GWAS in this study, there were no significant SNPs associated with HCC development. To clarify the pathogenesis of CHB and the mechanisms of HBV clearance, further studies are necessary, including functional analyses of the HLA-DP molecule.

Citation: Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, et al. (2012) Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. PLoS ONE 7(6): e39175. doi:10.1371/journal.pone.0039175

Editor: Anand S. Mehta, Drexel University College of Medicine, United States of America

Received: February 1, 2012; **Accepted:** May 16, 2012; **Published:** June 21, 2012

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

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (H22-kanen-005, H23-kanen-005), the Japan Science and Technology Agency (09038024), and the Miyakawa Memorial Research Foundation. Partial support by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (22710191) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology is also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: AK is an employee of the Central Research Laboratory, Hitachi Ltd. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: nishida-75@umin.ac.jp

Introduction

Overall, one-third of the world's population (2.2 billion) is infected with hepatitis B virus (HBV), and about 15% of these are chronic carriers. About 75% of the chronic carriers live in the east-south Asia and east pacific area, and there are 1.3–1.5 million chronic carriers living in Japan [1]. Of chronic carriers, 10–15% develop liver cirrhosis (LC), liver failure and hepatocellular carcinoma (HCC), and the remaining individuals eventually achieve a state of nonreplicative infection, resulting in hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative and hepatitis B core antibody (anti-HBc) positive, i.e. HBV-resolved individuals [2–3]. In Japan, although the major route of HBV transmission was perinatal transmission and horizontal transmission in early childhood, infant HBV carriers have successfully been reduced since 1986 through a selective vaccination policy by the Japanese government [4–7]. However, the prevalence of HBV genotype A in acute HBV (AHB) infection has increased markedly since 2000, reaching approximately 52% in 2008 due to the lack of a universal HB vaccination, and around 10% of AHB cases could be persistent infection [8–9]. Viral factors, as well as host factors, are thought to be associated with persistent HB infection.

In 2009, significant associations between chronic hepatitis B (CHB) and a region including *HLA-DPA1* and *HLA-DPBI* were identified using 786 Japanese individuals having CHB and 2,201 control individuals through a two-stage genome-wide association study (GWAS) [10]. The same group was also subjected to a second GWAS using a total of 2,667 Japanese persistent HBV infection cases and 6,496 controls, which confirmed significant associations between the *HLA-DP* locus and CHB, in addition to associations with another two SNPs located in the genetic region including the *HLA-DQ* gene [11]. The associations between *HLA-DP* variants with HBV infection were replicated in other Asian populations, including Thai and Han Chinese individuals [10,12–13]. With regard to HBV clearance, the association between the human leukocyte antigen (HLA) class II allele and clearance of HBV was confirmed by the candidate gene approach in African, Caucasian and Asian populations [14–18]. However, in a previous GWAS using samples of Japanese CHB and control individuals, the clinical data on HBV exposure in the control individuals were unknown, and this may have led to bias. Moreover, there have been no reports of GWAS using samples from HBV carriers and HBV-resolved individuals to identify host genetic factors associated with HBV clearance other than HLA class II molecules.

Here, we performed a GWAS using samples from Japanese HBV carriers, healthy controls and spontaneously HBV-resolved individuals in order to confirm or identify the host genetic factors related to CHB and viral clearance. In the subsequent replication analysis, we validated the associated SNPs in the GWAS using two independent sets of Japanese and Korean individuals. In our study, healthy controls were randomly selected with clinically no evidence of HBV exposure, therefore, HBV-resolved individuals were prepared to clearly identify the host genetic factors related with CHB or HBV clearance.

Results

Protective Effects Against Chronic Hepatitis B in Japanese and Korean Individuals

In this study, we conducted a GWAS using samples from 181 Japanese HBV carriers (including asymptomatic carriers (ASC), CHB cases, LC cases and HCC cases, based on the criteria described in Materials and Methods) and 184 healthy controls in

order to identify the host genetic factors related to progression of CHB. All samples were genotyped using a genome-wide SNP typing array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 for 900 K SNPs). Figure 1a shows a genome-wide view of the single point association data based on allele frequencies using the SNPs that met the following filtering criteria: (i) SNP call rate $\geq 95\%$; (ii) minor allele frequency (MAF) $\geq 1\%$ for HBV carriers and healthy controls; and (iii) no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) $P \geq 0.001$ in healthy controls. We identified significant associations of protective effects against CHB with two SNPs (rs3077 and rs9277542) using the allele frequency model, both of which are located in the 3' UTR of *HLA-DPA1* and in the sixth exon of *HLA-DPBI*, respectively (rs3077, $P = 1.14 \times 10^{-7}$, and rs9277542, $P = 5.32 \times 10^{-8}$, respectively). The association for rs9277542 reached a genome-wide level of significance in the GWAS panel (Bonferroni criterion $P < 8.36 \times 10^{-8}$ (0.05/597,789)).

In order to validate the results of GWAS, a total of 32 SNPs, including the associated two SNPs (rs3077 and rs9277542), were selected for replication in two independent sets of HBV carriers and healthy controls (replication-1:256 Japanese HBV carriers and 236 Japanese healthy controls; and replication-2:344 Korean HBV carriers and 151 Korean healthy controls; Table 1). The associations for the original significant SNP (rs9277542) and marginal SNP (rs3077) on GWAS were replicated in both replication sets [replication-1 (Japanese); rs3077, $P = 2.70 \times 10^{-8}$, OR = 0.48 and rs9277542, $P = 3.33 \times 10^{-6}$, OR = 0.54; replication-2 (Korean); rs3077, $P = 2.08 \times 10^{-6}$, OR = 0.47 and rs9277542, $P = 8.29 \times 10^{-5}$, OR = 0.54, Table 2]. We conducted meta-analysis to combine these studies using the DerSimonian Laird method (random effects model) to incorporate variation among studies. As shown in Table 2, the odds ratios were quite similar across the three studies (GWAS and two replication studies) and no heterogeneity was observed ($P_{het} = 0.80$ for rs3077 and 0.40 for rs9277542). P_{meta} values were 4.40×10^{-19} for rs3077 (OR = 0.46, 95% confidence interval (CI) = 0.39–0.54), and 1.28×10^{-15} for rs9277542 (OR = 0.50, 95% CI = 0.43–0.60). Among the remaining 30 SNPs in the replication study, 27 SNPs were successfully genotyped by the DigiTag2 assay with SNP call rate $\geq 95\%$ and HWE p -value ≥ 0.01 . Two SNPs (rs9276431 and rs7768538), located in the genetic region including the *HLA-DQ* gene, were marginally replicated in the two sets of HBV carriers and healthy controls with Mantel-Haenszel P values of 2.80×10^{-7} (OR = 0.56, 95% CI = 0.45–0.70) and 1.09×10^{-7} (OR = 0.53, 95% CI = 0.42–0.67), respectively, when using additive, two-tailed Cochran Mantel-Haenszel (CMH) fixed-effects model with no evidence of heterogeneity ($P_{het} = 0.67$ for rs9276431 and 0.70 for rs7768538) (Table S1).

Meta-analysis using the random effects model across 6 independent studies, including 5 additional published data, showed $P_{meta} = 3.94 \times 10^{-45}$, OR = 0.55 for rs3077, $P_{meta} = 1.74 \times 10^{-21}$, OR = 0.61 for rs9277535 and $P_{meta} = 1.69 \times 10^{-15}$, OR = 0.51 for rs9277542, with the SNP rs9277535 being located about 4-kb upstream from rs9277542 and showing strong linkage disequilibrium of $r^2 = 0.955$ on the HapMap JPT (Table S2). As shown in Table S2, the odds ratio was very similar among the 6 studies, and heterogeneity was negligible with $P_{het} > 0.01$.

Moreover, based on GWAS using samples from 94 chronic HBV carriers with LC or HCC and 87 chronic HBV carriers without LC and HCC, we found no significant SNPs associated with CHB progression (Figure S1).

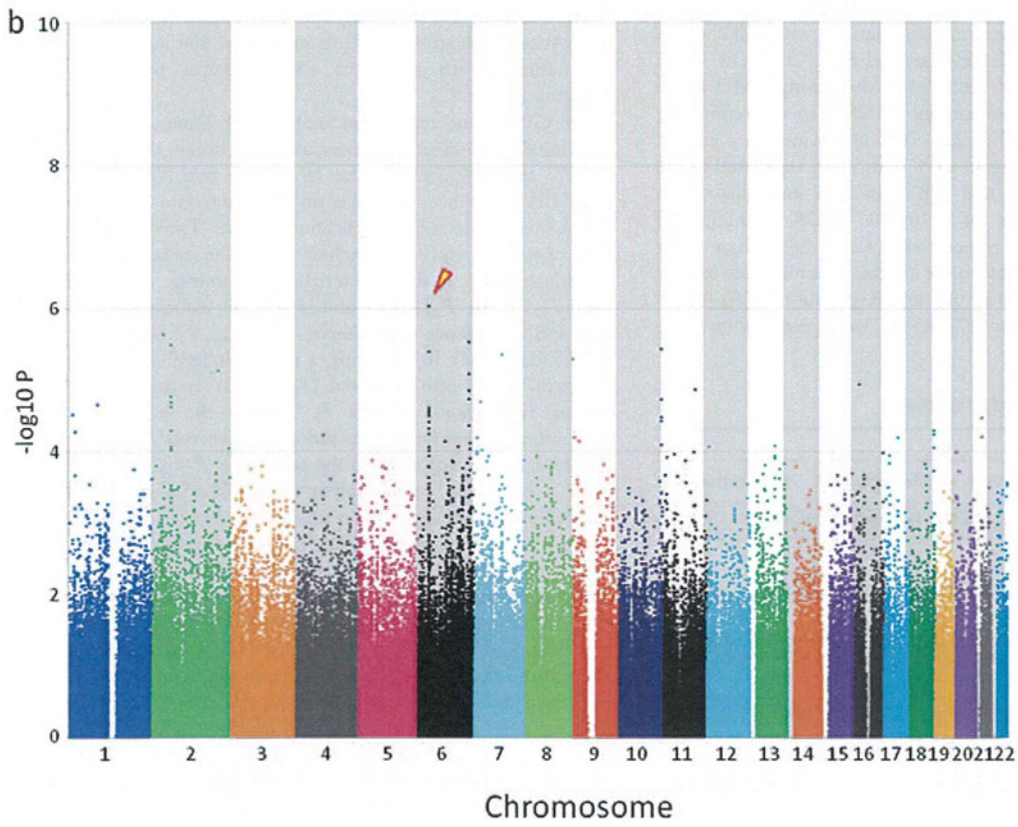
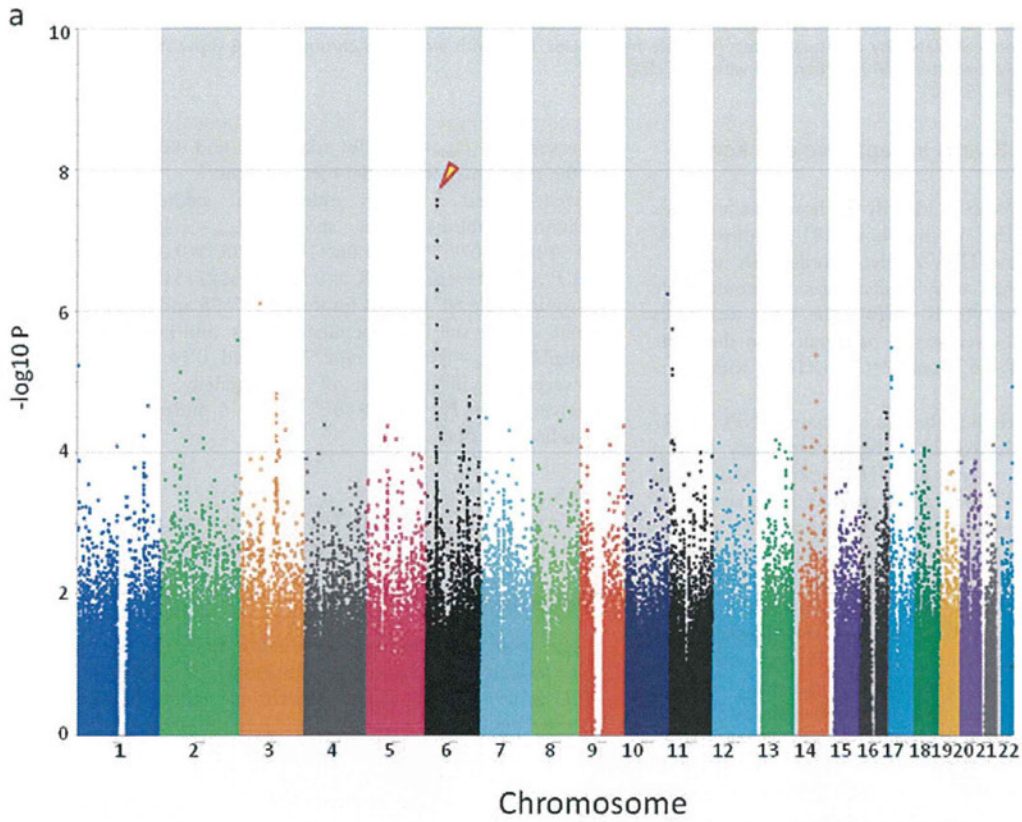


Figure 1. Results of genome-wide association studies. a) HBV carriers and healthy controls, and b) HBV carriers and HBV-resolved individuals were compared. *P* values were calculated by chi-squared test for allele frequencies. Dots with arrows on chromosome 6 show strong associations with protective effects against persistent HB infection and with HBV clearance.
doi:10.1371/journal.pone.0039175.g001

Clearance of Hepatitis B virus in Japanese and Korean Individuals

We also conducted a GWAS to identify the host genetic factors related to clearance of HBV in the above 181 Japanese HBV carriers and 185 Japanese HBV-resolved individuals using a genome-wide SNP typing array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 for 900 K SNPs). The same two SNPs (rs3077 and rs9277542) showed strong associations in the allele frequency model ($P = 9.24 \times 10^{-7}$ and $P = 3.15 \times 10^{-5}$) with clearance of HBV (Figure 1b).

The above 32 SNPs, including the two associated SNPs (rs3077 and rs9277542), were selected for a replication study in two independent sets of HBV carriers and HBV resolved individuals (replication-1:256 Japanese HBV carriers and 150 Japanese HBV resolved individuals; and replication-2:344 Korean HBV carriers and 106 Korean HBV resolved individuals; Table 1). All 32 SNPs were genotyped using the DigiTag2 assay and 29 of 32 SNPs were successfully genotyped (Table S3). The associations of the original SNPs were replicated in both replication sets [replication-1 (Japanese): rs3077, $P = 3.32 \times 10^{-2}$, OR = 0.72 and rs9277542, $P = 1.25 \times 10^{-2}$, OR = 0.68; replication-2 (Korean): rs3077, $P = 2.35 \times 10^{-7}$, OR = 0.41 and rs9277542, $P = 4.97 \times 10^{-6}$, OR = 0.46; Table 3]. Meta-analysis using random effects model showed $P_{meta} = 1.56 \times 10^{-4}$ for rs3077 (OR = 0.51, 95% CI = 0.36–0.72), and 5.91×10^{-7} for rs9277542 (OR = 0.55, 95% CI = 0.43–0.69). While there was evidence of heterogeneity between these studies for rs3077 ($P_{het} = 0.03$) and no evidence for rs9277542 ($P_{het} = 0.19$), significant associations with HBV clearance were observed with Mantel-Haenszel $P_{meta} = 3.28 \times 10^{-12}$ for rs3077 and 1.42×10^{-10} for rs9277542, when using CMH fixed-effects model. Among the remaining 27 SNPs in the replication study, two SNPs (rs9276431 and rs7768538), located in a genetic region including *HLA-DQ* gene, were marginally replicated in the two sets of HBV carriers and HBV resolved individuals with Mantel-Haenszel *P* values of 2.10×10^{-5} (OR = 0.59) and 1.10×10^{-5} (OR = 0.56), respectively (Table S3), when using CMH fixed-effect model. Due to the existing heterogeneity among three groups (GWAS, Replication-1 and Replication-2) ($P_{het} = 0.03$ for rs9276431 and 0.04 for rs7768538), weak associations were

observed with $P_{meta} = 0.03$ for rs9276431 and 0.02 for rs7768538 by the random effects model meta-analysis.

Meta-analysis across 6 independent studies, including 5 additional published data, showed $P_{meta} = 1.48 \times 10^{-9}$, OR = 0.60 for rs3077, $P_{meta} = 1.08 \times 10^{-17}$, OR = 0.66 for rs9277535 and $P_{meta} = 5.14 \times 10^{-5}$, OR = 0.55 for rs9277542 (Table S4). As shown in Table S4, the OR for the rs9277535 and rs9277542 were similar among the 6 independent studies, and heterogeneity was negligible ($P_{het} = 0.03$ for rs9277535 and 0.14 for rs9277542). However, significant level of heterogeneity for rs3077 was observed with $P_{het} = 9.57 \times 10^{-6}$ across 5 independent studies, including our study.

URLs

The results of the present GWAS are registered at a public database: https://gwas.lifesciencedb.jp/cgi-bin/gwasdb/gwas_top.cgi.

Discussion

The recent genome-wide association study showed that the SNPs located in a genetic region including *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes were associated with chronic HBV infection in the Japanese and Thai population [10,11]. In this study, we confirmed a significant association between SNPs (rs3077 and rs9277542) located in the same genetic region as *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* and protective effects against CHB in Korean and Japanese individuals. Meta-analysis using the random effects model across 6 independent studies including our study suggested that, widely in East Asian populations, variants in antigen binding sites of *HLA-DP* contribute to protective effects against persistent HBV infection (Table S2).

On GWAS and replication analysis with Japanese and Korean individuals, we identified associations between the same SNPs (rs3077 and rs9277542) in the *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes and HBV clearance; however, no new candidate SNPs from the GWAS were detected on replication analysis (Table S3). When the data of reference#18 was excluded from the meta-analysis across 6 independent studies, heterogeneity among 4 studies was estimated to be $P_{het} = 0.15$ and significant association of rs3077 with HBV clearance was observed with $P_{meta} = 5.88 \times 10^{-24}$, OR = 0.56 (Table S4). In our study, a negligible level of heterogeneity for rs3077 was also observed ($P_{het} = 0.03$) on meta-analysis by adding replication-1 (Table 3). Despite the heterogeneity in replication-1, a marginal association was observed for rs3077 with the same downward trend in the odds ratio ($P = 3.32 \times 10^{-2}$, OR = 0.72). Moreover, meta-analysis using GWAS and replication-2 showed significant association of $P_{meta} = 1.89 \times 10^{-12}$, OR = 0.43 for rs3077 with no evidence of heterogeneity ($P_{het} = 0.75$). Although the reason why heterogeneity was observed in replication-1 is unclear, one possible reason is the clinical heterogeneity due to different kits being used for antibody testing. The associations of *HLA-DPA1*/*-DPB1* with CHB and HBV clearance showed the same level of significance in the comparison of HBV patients with HBV resolved individuals (OR = 0.43 for rs3077 and 0.49 for rs9277542) as the one with healthy controls (OR = 0.46 for rs3077 and 0.50 for rs9277542), when the replication-1 was excluded in the analysis (Table 2 and Table 3). The results of meta-analysis across 6 independent studies including our study also showed the same or slightly weaker associations in the

Table 1. Number of study samples.

		GWAS	Replication-1	Replication-2
population		Japanese	Japanese	Korean
HBV carriers	Total	181	256	344
	IC	20	94	–
	CH	67	101	177
	LC	3	10	–
	HCC	91	51	167
Healthy controls	184	236	151	
Resolved individuals	185	150	106	

Abbreviation: IC, Inactive Carrier; CH, Chronic Hepatitis; LC, Liver Cirrhosis; HCC, Hepatocellular Carcinoma.

doi:10.1371/journal.pone.0039175.t001