

I. HBV とその感染症の基礎

かわらず HBV の既往感染者である。このような症例では、HBV は肝内に潜伏感染していることから、何らかの要因により宿主の免疫能が低下することで HBV 再増殖に伴う肝炎の再燃、*de novo* B 型肝炎を発症する。*de novo* B 型肝炎を発症する可能性のある患者をスクリーニングする検査法は HBc 抗体である。

4) IgM-HBc 抗体

IgM-HBc 抗体は HBV 感染初期に約半年間陽性となることから、B 型急性肝炎の診断に有用である。HBV キャリアの急性増悪でも、しばしば陽性となるも概してその値は低い。測定レンジが広い IgM-HBc 抗体測定系(クリア法)を用いるとその抗体価により、この 2 つの病態を 90 %以上の精度で鑑別することが可能である。なお、B 型慢性肝炎急性増悪例(抗体価低値)と B 型急性肝炎(抗体価高値)の鑑別のポイントとなる IgM 型 HBc 抗体価は、クリア法で 10.0 とかなり高い数値である点には注意すべきである¹⁾(図 3)。

5) HBe 抗原

HBe 抗原は、HBV の芯(コア)の部分にあたる抗原の性質をもった蛋白である。これは容易に血中に出てくることから測定が安易であり、HBV の量をそのまま反映する。HBe 抗原陽性例は、HBV が盛んに増殖していることを意味し、感染力が高いことを示す。HBe 抗原陽性の母親から出生した児は、HBIG(高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン)と HB ワクチンによる感染防御処置を実施しない場合には約 90 %の確率で感染が成立し、HBV キャリア化する。また ALT 値持続正常の HBe 抗原陽性のキャリアは、将来、肝炎が発症することを前提に経過をみる必要がある。ALT 異常を示す HBe 抗原陽性の慢性肝炎患者では、肝炎の活動性が高まっていることを示している。自然経過で HBe 抗原が陰性化すると約 80 %の症例で肝炎は鎮静化に向かう。

6) HBe 抗体

HBe 抗原に対する抗体である。B 型慢性肝炎の肝炎時期には、HBe 抗原と HBe 抗体は相互に連動しながら変化を示し、HBe 抗原量が低下すると HBe 抗体価が上昇し、逆に HBe 抗原量が上昇すると HBe 抗体価は低下する。多くの症例では、HBe 抗原が消失して HBe 抗体陽性となると血中 HBV DNA 量も低

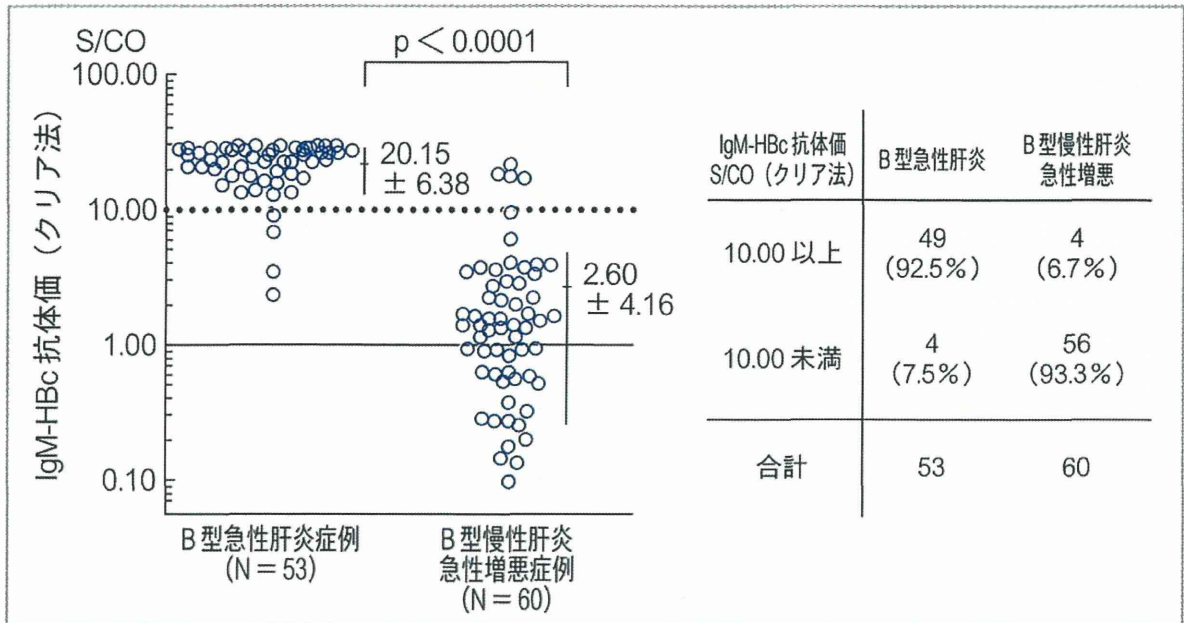


図3 B型急性肝炎症例とB型慢性肝炎急性増悪症例とのIgM-HBc抗体価(クリア法)での比較

IgM-HBc 抗体価 (クリア法) で 10.00 以上は急性肝炎, 未満では B 型慢性肝炎急性増悪の可能性が高い。

(文献 1 より)

下して HBV の増殖力は低下した状態となる。しかし, HBe 抗体陽性でも, プレコア領域, コアプロモーター領域に遺伝子変異をもつ HBe 抗原非産生変異株の増殖による肝炎, いわゆる HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎の場合には, HBe 抗原は陰性でも HBV 増殖は持続し活動性肝炎を示すことから注意を要する。

7) HBV DNA 量

B 型慢性肝炎の病態は, 血液中 HBV DNA 量の変化と密接に関係する。HBV DNA 量の増加に伴って, ALT 値の上昇がみられ肝炎の悪化がしばしばみられる。また一方, HBV DNA の量の減少とともに ALT 値の低下, 肝炎の鎮静化が認められる。HBe 抗原量も HBV DNA 量と同様にウイルス増殖を示すマーカーだが, HBe 抗原の一部は HBe 抗体と免疫複合体を形成しながら血液中に存在すること, また最近, HBV DNA 遺伝子変異により HBe 抗原陰性にもかかわらずウイルス増殖の活発な症例が少なからず認められることから, HBe 抗原に比較して HBV DNA は他の因子に作用されない安定した HBV 増殖

I. HBV とその感染症の基礎

マーカーと考えられている。

B 型慢性肝炎の診断基準には、HBe 抗原－抗体系の測定結果に加えて、HBV DNA 量を基準とする。HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎では HBV DNA 量 6.0 log copies/mL 以上を示すことが多く、一方、HBe 抗原陰性非活動性キャリアでは HBV DNA 量 4.0 log copies/mL 未満を示すことが多い。

8) HBV コア関連抗原

HBV コア関連抗原は、HBe 抗原、HBc 抗原、p22cr 抗原をまとめて測定する系である。肝細胞内の cccDNA 量を反映することが確認されており、HBs 抗原量と同様に、核酸アナログ薬の中止の目安となる指標となっている。

9) HBV 遺伝子型

HBV 遺伝子型 (genotype) は、大きくは A タイプから J タイプに 10 種類の HBV 遺伝子型 (genotype A ~ genotype J) に分類される。Orito ら²⁾によると、わが国の HBV キャリアの HBV 遺伝子型の頻度は、genotype A 1.7%、genotype B 12%、genotype C 85% であり、C タイプが多数を占める。HBV 遺伝子型の国内分布には片寄りがあり、genotype C は日本全体に分布するが、genotype B は東北地方、沖縄において頻度が高い。HBV 遺伝子型は病態にも関係し、genotype B に比較して genotype C では治療薬物の反応性が低く、肝硬変、肝癌に進展しやすいことが確認されている。genotype A は欧米やアフリカの HBV キャリアに広くみられる HBV 遺伝子型であり、わが国には本来存在しないタイプであったが、2000 年以後、国内の B 型急性肝炎成人例で genotype A 感染例が増加し問題となっている³⁾。genotype A は成人感染例の 10% で持続感染、キャリア化することが知られている。

10) HBV 遺伝子変異 (プレコア領域, コアプロモーター領域の遺伝子変異)

HBV は通常の DNA ウイルスとは異なり、ウイルス増殖に際し RNA から DNA へのレトロウイルス様の逆転写の過程を介している。そのため、DNA ウイルスでありながら HBV では高率に遺伝子変異が生じると考えられている。

HBV 遺伝子のプレコア、コアプロモーター変異の有無については、保険診療上の測定が可能となっている。B 型急性肝炎の重症度と HBV 遺伝子のプレコ

アないしコアプロモーター領域の遺伝子変異の間には密接な関係がみられ、これらの領域にいずれかの変異がある場合には、ない場合に比較して5～6倍、劇症化、重症化しやすいことから、これらの遺伝子変異はB型急性肝炎の重症化の予測に用いられる⁴⁾。

また、HBs抗原陽性でALT値が500以上の値を示し、B型急性肝炎とB型慢性肝炎急性増悪の判断に迷った場合、B型急性肝炎例では、プレコアないしコアプロモーター領域の遺伝子変異はともに野生型であることが多いのに対し、B型慢性肝炎急性増悪例では、これらの領域にいずれかの変異がある場合が多いことも参考になる⁵⁾(表3)。

2 血液生化学検査

1) AST (GOT), ALT (GPT)

AST(GOT), ALT(GPT)は肝細胞中に多く含まれる酵素である。これらは、肝細胞の変性・壊死に伴い逸脱し、血中で上昇するため、慢性肝炎の診断、肝炎活動性の評価、治療効果判定などに用いられる。AST, ALTの基準値の上限

表3 HBV 遺伝子変異パターンとB型急性肝炎症例, B型慢性肝炎急性増悪の鑑別

HBV 遺伝子変異パターン		B型急性肝炎 (N = 36)	B型慢性肝炎 急性増悪 (N = 36)
コアプロモーター 領域 (nt1762, nt1764)	プレコア領域 (nt1896)		
野生型	野生型	29 (91%)	3 (9%)
野生型	変異型	5 (29%)	12 (71%)
変異型	野生型	0 (0%)	4 (100%)
変異型	変異型	2 (11%)	17 (89%)

遺伝子変異パターンが、コアプロモーター、プレコア領域ともに野生型では急性肝炎、ともに変異型では慢性肝炎急性増悪である可能性が高い。

(文献4のデータより筆者作成)

I. HBV とその感染症の基礎

はともに 30 ~ 40 IU/L の範囲である。

C 型慢性肝炎では 100 IU/L 以下の範囲内で数年にわたって持続的に軽度の異常値を示す場合が多いものの、B 型肝炎では数カ月間周期で 500 IU/L 以上の値を示すことがある。慢性肝炎では一般的に AST/ALT 比は 1 以下 (AST < ALT) だが、肝硬変に進展すると 1 以上 (AST > ALT) を示すことが多い。

2) ALP, γ -GTP

基準値は ALP が 115 ~ 359 IU/L, γ -GTP が男性 70 IU/L 以下, 女性 30 IU/L 以下である。ALP, γ -GTP は胆道系酵素で、胆石や胆のう炎、膵炎、胆管癌、膵臓癌などでも上昇するが、原発性胆汁性肝硬変症や、胆汁うっ滞型の薬物性肝障害などの明らかな胆管の閉塞病変がなくとも、細胆管レベルでの障害薬物性閉塞性黄疸、肝細胞障害でも上昇し、軽度、ないし中等度の異常値を示す。

3) アルブミン値, コレステロール値, プロトロンビン時間 (PT)

基準値はアルブミンが 4.0 ~ 5.0 g/dL, コレステロールが 150 ~ 219 mg/dL, プロトロンビン時間 (PT) は 80 ~ 130 % である。これらは肝臓で合成される物質であることから、肝予備能の指標として用いられる。アルブミンは血中半減期が長く (数週)、肝硬変などによる慢性肝不全の評価に用いられる。プロトロンビンは血中半減期が短く (数時間) リアルタイムに鋭敏に変化するため、慢性肝炎の急性増悪を含む急性肝不全の評価に有用である。但し、ワルファリン服用時ないしビタミン K 欠乏症時には PT % が低下する点は記憶にとどめられたい。

4) 血清ビリルビン値

基準値は 0.3 ~ 1.2 mg/dL である。網内系で老廃赤血球のヘモグロビンが分解され非抱合型 (間接) ビリルビンが産生される。非抱合型ビリルビンはアルブミンと結合し肝に運ばれ、グルクロン酸抱合を受け、抱合型 (直接) ビリルビンとなって毛細胆管から胆管、十二指腸へ排出される。

肝細胞障害で黄疸が出現する場合は一般に直接型ビリルビンが優位となる。慢性肝炎の急性増悪や肝硬変で血清ビリルビンが上昇する場合は肝不全状態を示唆する。

5) 血小板数

血小板数は、肝線維化進展度と比例する。C型慢性肝炎では血小板数 15万/mm³以下は線維化が進展した慢性肝炎、10万/mm³以下は肝硬変である確率が高くなる。B型慢性肝炎では血小板数 15万/mm³以下で肝硬変進展例が珍しくない。

3 画像診断

肝疾患の画像診断，病態の把握には，腹部超音波検査，腹部 CT 検査，腹部 MRI 検査等がよく用いられる。後者 2 つの検査法は，造影剤の副作用，検査コストがかかることなどから主に肝腫瘍の診断に用いられる。肝疾患全般のスクリーニング検査法には，副作用がなく頻回に検査することが可能なことから，腹部超音波検査が頻用される。

4 肝生検，病理診断

肝生検とは，肝臓に針を穿刺して肝組織の一部を採取して組織学的に検索する方法をいう。現在では各種画像診断法の発達により，非侵襲的に肝疾患の診断，病態を把握することが可能となったが，種々の検査所見より得られた情報でも確診のつかない肝疾患の鑑別診断や，経過観察および予後判定の時に施行される。自己免疫性肝炎，原発性胆汁性肝硬変症，非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH)などは，肝生検所見が各疾患の診断基準となっている。1990年代のC型慢性肝炎に対するインターフェロン治療導入前には，肝生検が必須であったが，現在では必須ではなくなっている。

慢性肝炎に対する肝の病理組織学的検討は，診断のみならず，線維化や壊死・炎症所見，脂肪沈着や鉄蓄積の程度の把握に有用である。慢性肝炎の肝組織所見は，線維化所見と壊死・炎症所見に分けて評価することが一般に行われている。新犬山分類 (1996年)では前者を F0～F4に，後者を A0～A3に分類している⁶⁾ (図4)。 サイドメモ5

I. HBV とその感染症の基礎

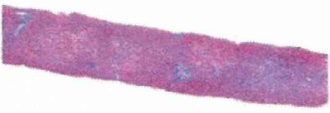





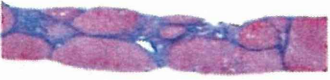

肝線維化進展度	肝生検所見	肝表面	腹腔鏡所見
F0～1		平滑	
F2		軽度不整	
F3		高度不整	
F4 (肝硬変)		結節	

図4 肝生検所見と腹腔鏡所見

肝生検で得られた肝線維化進展度 (Azan 染色で青色に染色) と、腹腔鏡で観察した肝表面像を対比した。

(筆者提供)

サイドメモ5

新犬山分類 (1996 年)

新犬山分類(1996)では、慢性肝炎の組織所見を下記のように、線維化所見(F0～F4)と壊死・炎症所見(A0～A3)を個別に評価し、F1 A2, F4 A2, のように併記して表示する。

F0: 線維化なし

F1: 門脈域の線維性拡大

F2: 線維性架橋形成

F3: 小葉のひずみを伴う線維性架橋形成

F4: 肝硬変

A0: 壊死・炎症所見なし

A1: 軽度の壊死・炎症所見

A2: 中等度の壊死・炎症所見

A3: 高度の壊死・炎症所見

▶ ここがポイント!

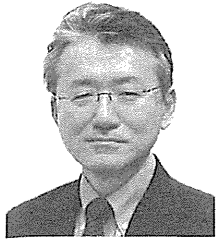
- ・ HBV の一過性感染例 (HBs 抗原陰性かつ HBc 抗体陽性例) の肝細胞内には, HBV 増殖の鋳型となる cccDNA の形で HBV が潜伏持続感染していると考えられる。
- ・ *de novo* B 型肝炎を発症する可能性のある患者をスクリーニングする検査法は HBc 抗体である。
- ・ プロトロンビンは血中半減期が短く (数時間) リアルタイムに鋭敏に変化するため, 慢性肝炎の急性増悪を含む急性肝不全の評価に有用である。

— 文 献 —

- 1) 中尾留美子, 八橋 弘, 明時正志ほか: B 型急性肝炎と HBV キャリア急性増悪の CLIA 法 IgM-HBc 抗体価による判別. 肝臓 47 : 279-282, 2006.
- 2) Orito E, Ichida T, Sakugawa H, *et al* : Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34 : 590-594, 2001.
- 3) Tamada Y, Tatsunashi H, Masaki H, *et al* : Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. *Gut* 61 : 765-773, 2012.
- 4) Aritomi T, Yatsunashi H, Fujino T, *et al* : Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 13 (11) : 1125-1132, 1998.
- 5) Kusumoto K, Yatsunashi H, Nakao R, *et al* : Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 23 (5) : 790-793, 2008.
- 6) 市田文弘, 小俣政男, 辻 孝夫ほか: 慢性肝炎の肝組織診断基準—新犬山分類. 第 19 回犬山シンポジウム, 中外医学社, 東京, 1996, p183-188.

PegIFNとHBs抗原量

PegIFN and HBs antigen level



八橋 弘

Hiroshi YATSUNAMI

国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

◎諸外国では2005年にB型慢性肝炎に対するペグインターフェロン(PegIFN)製剤の使用が許可され、多くの患者に対して治療が行われてきたが、2011年、日本においてもB型肝炎に対するPegIFN製剤の使用が許可された。PegIFN製剤を用いた治療では、核酸アナログ製剤に比較するとその治療効果は20~30%と確実ではないものの、通常は1年投与で治療を終了しdrug freeになれること、HBs抗原消失率がコントロール群に比較して高い点などの長所がある。一般的に、IFN治療例では核酸アナログ製剤治療例に比較してHBs抗原量の低下量の幅が大きいことが多くの論文で示されている。核酸アナログ製剤ではおもにB型肝炎ウイルス(HBV)の逆転写のプロセスを抑制して抗ウイルス効果を発揮しているのに対し、IFN治療は抗ウイルス効果に加えて免疫増強効果も有している。それぞれの薬剤の作用機序の違いが、HBs抗原量の反応性の違いに反映されていると考えられている。また、PegIFN治療前後のHBs抗原量のモニタリングは、本治療法の治療効果予測に有用であることが報告されている。



ペグインターフェロン(PegIFN), HBs抗原量, HBs抗原消失

B型肝炎に対する治療薬としての核酸アナログ製剤は2000年以後、わが国ではラミブジン(LMV)、アデホビル(ADV)、エンテカビル(ETV)の順にその使用が許可され、現在50,000人以上のB型慢性肝炎患者に対して、これらの核酸アナログ製剤が投与されている。35歳以上のB型慢性肝炎患者は一般的には自然治癒しがたいことが明らかとなっており、核酸アナログ製剤はこれらの対象者においても確実な抗ウイルス効果を発揮し、肝炎の沈静化効果が明らかな薬剤である^{1,2)}。とくにETVは初回投与例での薬剤耐性出現の頻度が5年間投与でも1%前後と低いことから³⁾、35歳以上でかつ自然治癒しがたいと判断したB型慢性肝炎症例での治療薬の第一選択薬剤となっている。核酸アナログ製剤の問題点は、治療中止時期が明確でなく、安易に中止すると肝炎の再燃が高率にみられること、また通常は数年間に及ぶ長期投与が必要なことである²⁾。

一方、諸外国では2005年にB型慢性肝炎に対

するPegIFN製剤の使用が許可され、多くの患者に対して治療が行われている⁴⁻⁷⁾。PegIFN製剤を用いた治療では、核酸アナログ製剤に比較するとその治療効果は20~30%と確実ではないものの、通常は1年投与で治療を終了しdrug freeになれること、HBs抗原消失率がコントロール群に比較して高い点などの長所がある⁸⁾。2011年、日本においてもB型肝炎に対するPegIFN製剤の使用が許可された。今後、日本においてもどのようなB型慢性肝炎患者に対してPegIFN製剤治療を用いるのか関心が高まっている。

B型肝炎の抗ウイルス療法中のモニタリング、ウイルスマーカーに関しては2000年以後、核酸アナログ製剤が広く使用されるようになり、HBV-DNA量の推移がその後の治療効果、薬剤耐性の出現と密接に関連することから、HBV-DNA量の測定が重視されてきた²⁾。しかし、諸外国では2005年以後PegIFN製剤が広く使用されるようになり、治療中のモニタリングとしてはHBV-

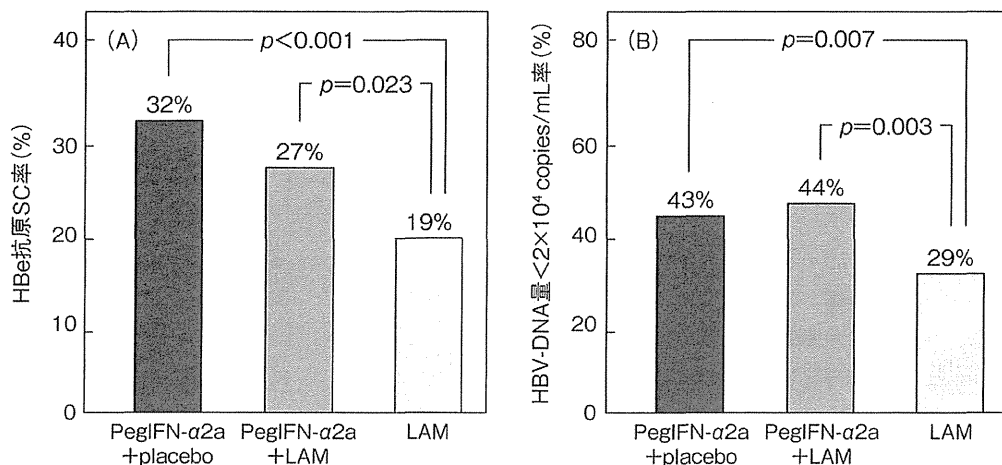


図 1 B型慢性肝炎に対するPegIFN-α2a第Ⅲ相試験成績

A: HBe 抗原陽性慢性肝炎 ($n=814$) の治療後 24 週の HBe 抗原 SC 率⁶⁾.

B: HBe 抗原陰性慢性肝炎 ($n=637$) の治療後 24 週の HBV-DNA 量 $< 2 \times 10^4 \text{ copies/mL}$ 率⁷⁾.

DNA 量よりも HBs 抗原量の変化が有用であるという報告が最近 2~3 年の間に集積されるようになった⁸⁾.

いままで、核酸アナログ製剤を用いての治療が主流であったわが国においては、HBs 抗原検査結果の評価は陽性か陰性化かの定性的な評価が主体であり、HBs 抗原量という定量的評価はほとんど行われていない。HBs 抗原量という以前から存在するウイルスマーカーが、なぜ今注目されるようになったのか、本稿では最近の論文を紹介しながら、B 型慢性肝炎の自然経過を含めて、PegIFN 製剤を用いた治療での HBs 抗原量測定の意味について概説する。

● B型肝炎に対するPegIFNの治療効果

PegIFN は、従来の IFN に polyethyleneglycol (PEG) を付加して血中半減期を大幅に延長させた薬剤であり、IFN-α2a に分子量 40 kDa の PEG を付加した PegIFN-α2a (Pegasys[®]) と IFN-α2b に 12kDa の PEG を付加した PegIFN-α2b (Pegintron[®]) がある。付加された PEG の分子量が大きいほど吸収が緩徐となり、クリアランスが低下し、半減期が延長する。それぞれの有効血中濃度は、PegIFN-α2a が約 160 時間、PegIFN-α2b が約 80 時間維持する。

B 型肝炎に対する PegIFN のおもな臨床試験成績を紹介する。Cooksley らは第Ⅱ相試験として

HBe 抗原陽性症例への PegIFN-α2a と従来型 IFN-α2a の 24 週間投与の比較を行い、HBe 抗原セロコンバージョン率 (HBe 抗原-SC 率) がそれぞれ 32% と 25% で PEG 群において有意に高いことを報告した⁴⁾。

PegIFN-α2a の第Ⅲ相試験は、HBe 抗原陽性、陰性例をそれぞれ、PegIFN 単独投与群、LMV 単独群、両者併用群の 3 群に区分して、48 週間投与で行われた^{6,7)}。HBe 抗原陽性例を対象とした試験での HBe 抗原-SC 率は、単独群 (32%) および併用群 (27%) では LAM 単独群 (19%) と比較し有意に高い値を示した (図 1)。また、PegIFN 単独群と併用群ではそれぞれ約 3% の頻度で HBs 抗原のセロコンバージョンが認められたが、LAM 群ではみられなかったという⁶⁾。HBe 抗原陰性例を対象とした試験では PegIFN 単独群の ALT 値の正常化率は 59%、HBV-DNA 量 20,000 copies/mL 未満の頻度は 43% であり、LAM 単独での 29% に比較し有意に高い値を示したという⁷⁾。

これらの成績をまとめると、① PegIFN 単独群と PegIFN と LAM の併用群では治療効果の差はなく、両者の併用による治療効果の改善は期待できないこと、② HBe 抗原陽性例に対する PegIFN 治療の VR、BR 率はそれぞれ約 30% と約 40% で、HBe 抗原陰性例に対する VR、BR 率は約 40% と約 60% であること、③ VR と BR をともに満たす combined-response による効果判定では、HBe 抗

表 1 B型慢性肝炎の自然経過におけるHBs抗原量とHBV DNA量の推移

Hbe 抗原の状態	Immune tolerance phase	Immune clearance phase	Immune control/ inactive carrier	Reactivated HBeAg-negative disease	参考文献
	HBe 抗原陽性/ HBe 抗体陰性	HBe 抗原陽性/ HBe 抗体陰性	HBe 抗原陰性/ HBe 抗体陽性	HBe 抗原陰性/ HBe 抗体陽性	
HBs 抗原量 (log ₁₀ IU/mL)	5.0	3.0~4.0	1.5~2.2	2.5~3.0	10)
	4.5	4.0	2.9	3.4	12)
	5.0	4.4	3.1	4.0	11)
HBV-DNA 量 (log ₁₀ IU/mL)	7.5~8.5	6.0~7.0	1.0~2.4	3.9~4.6	10)
	8.2	8.0	<2.6	5.0	12)
	8.0	7.5	2.5	5.5	11)
HBs 抗原/ HBV-DNA 比 (log IU/mL)	0.6~0.8	0.5~0.7	0.7	0.6~1.0	10)
	0.5	0.5	1.0	0.6	12)
	0.6	0.6	1.2	0.7	11)

原陽性例では 23%，HBe 抗原陰性例では 38% であることが示唆された。

数年に及ぶ長期投与が必要な核酸アナログ製剤に比較すると、PegIFN の最大の特徴は原則 1 年間の治療期間で治療を終了すること、また HBe 抗原-SC 率は 30% であり、核酸アナログ製剤の 1 年投与時点で SC 率が 20% 台にとどまっているのに比べて比較的高い値を示している点、また HBs 抗原陰性例も少ない頻度ながらも認めている点にある。

HBs 抗原の消失の意義

HBs 抗原の消失は B 型慢性肝炎の治癒または免疫学的にも本疾患がよくコントロールされていることを意味しており、肝硬変などが存在しない場合には予後がよいことが示されている¹²⁾。B 型慢性肝炎患者での自然経過での HBs 抗原消失率は一般的に低く、1% 前後と報告されており、とくに若年の患者ではさらに低いことが明らかとなっている。

HBs 抗原消失率は、IFN 治療によって増強されることが近年、報告されている。欧米の患者での検討では IFN 治療によって 0.72% (コントロール群) から 2.25% に、アジアの患者での検討では 0.07% から 0.43% に増加したという⁹⁾。

HBs 抗原の消失を論じるうえで、最近注目されている HBV マーカーとして HBs 抗原量がある。HBV-DNA 量はウイルス増殖の指標であるが、HBs 抗原量は肝細胞の cccDNA 量や宿主ゲノム

に組み込まれた HBV の量を反映すると考えられている⁸⁾。

HBV キャリアの自然経過における HBs 抗原量と HBV-DNA 量の推移

HBV キャリアの自然経過はおもに 4 つの時相に分けて考えられている。それぞれの時相での HBs 抗原量、HBV-DNA 量、HBs 抗原量/HBV-DNA 量の比をまとめたものが表 1 である⁸⁾。ALT 持続正常で肝炎の活動性のない immune tolerance 期には、HBs 抗原量、HBV-DNA 量ともに高い状態で持続するが、immune clearance 期にはともに低下しはじめ、HBe 抗原抗体のセロコンバージョン後の immune control/inactive carrier 期には、ALT 持続正常化とともに、その後も HBs 抗原量はゆっくりと低下しつづける。Immune control/inactive carrier 期の HBs 抗原量/HBV-DNA 量の比は、HBe 抗原抗体のセロコンバージョン時の HBV-DNA 量の低下が顕著なことから高くなることが特徴である⁸⁾。

68 例の HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎患者を中央値で 8 年間観察した香港からの報告では、観察期間中に HBs 抗原量の緩徐な低下が認められ、観察開始時点と最終時点で、1 log₁₀ IU/mL の低下がみられた 22 例では、うち 8 例において HBs 抗原が消失したという¹⁰⁾。

ヨーロッパからの報告でも、HBs 抗原消失例での immune control/inactive carrier 期の HBs 抗原消失例と非消失例での HBs 抗原量の年間の減衰

表 2 抗ウイルス治療前後のHBs抗原量の低下

IFN/PegIFN		PegIFN と核酸アナログ製剤	核酸アナログ製剤	コメント	参考文献
HBe 抗原陽性慢性肝炎	PegIFN : -0.8 log ₁₀ IU/mL	+LAM : -1.1 log ₁₀ IU/mL	LAM : -0.4 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点	19)
	PegIFN : -0.87 log ₁₀ IU/mL	+LAM : -1.46 log ₁₀ IU/mL		治療前と治療 48 週時点 (p=0.04)	20)
	PegIFN : -0.4 log ₁₀ IU/mL	+LdT : -1.3 log ₁₀ IU/mL	LdT : -0.4 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点	21)
			ETV : -0.4 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点 (p<0.001)	22)
	PegIFN : -0.9 log ₁₀ IU/mL		ETV : -0.4 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点 (p>0.05)	23)
			LdT : -0.5 log ₁₀ IU/mL LdT : -0.8 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点 治療前と治療 3 年時点	24)
			TDF : -0.3 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点	25)
HBe 抗原陰性慢性肝炎	IFN : 129 IU/mL/month		LAM : 13.2 IU/mL/month	(p=0.032)	16)
	PegIFN : -0.71 log ₁₀ IU/mL	+LAM : -0.67 log ₁₀ IU/mL	LAM : -0.02 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点	26)
	PegIFN : -0.75 log ₁₀ IU/mL	+LAM : -0.6 log ₁₀ IU/mL	LAM : -0.1 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点	27)
	PegIFN : -0.6 log ₁₀ IU/mL		ETV : +0.1 log ₁₀ IU/mL	治療前と治療 48 週時点 (p<0.001)	23)

PegIFN : ペグインターフェロン, LAM : ラミブジン, LdT : テルブジン, ETV : エンテカビル, TDF : テノホビル.

の程度は、前者で 0.28~0.29 log₁₀ IU/mL/yr, 後者で 0.054~0.058 log₁₀ IU/mL/yr と有意な差が認められたという^{12,13)}.

Immune control/inactive carrier 期の HBV-DNA 量の値については議論があり, 真の inactive carrier 例と, 後に再活性化を示す inactive carrier, すなわち HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎に進展する例を鑑別する方法として, HBs 抗原量として 2,000 IU/mL, HBV-DNA 量として 2,000 IU/mL を cut-off 値とする提案が行われており, その正診率は 94~100%であったという^{13,14)}. Immune control/inactive carrier 期にあっても, この値以上を示す場合には将来, 再活性化, すなわち HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎に進展する可能性を考慮すべきといわれている⁸⁾.

PegIFN治療中のHBs抗原量の推移

HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎に対する IFN 治療

において, HBs 抗原量の評価・モニタリングが治療効果の判定に有用であることがはじめて報告されたのは 1994 年である¹⁵⁾. IFN 治療中の HBs 抗原量の有意な低下は IFN 治療後の HBe 抗原抗体のセロコンバージョンと有意に関連することが示されていたが, その当時は HBs 抗原量を正確に評価する測定法が普及しなかったこともあり, その後, HBs 抗原量は注目されずに年月が過ぎていった⁸⁾. その一方で, 2000 年前後の核酸アナログ製剤の普及とともに, 抗ウイルス効果の指標として, また肝癌発生のリスクマーカーとしても有用な HBV-DNA 量が注目を集めるようになった.

しかし, 2007 年に HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎やまた HBV/HDV 重複感染者の治療中の指標として, HBs 抗原量の評価・モニタリングが有用であることが報告され^{16,17)}, また B 型肝炎に対する PegIFN 治療が普及するにつれて, ふたたび HBs 抗原量が注目を集めるようになった. とくに HBs

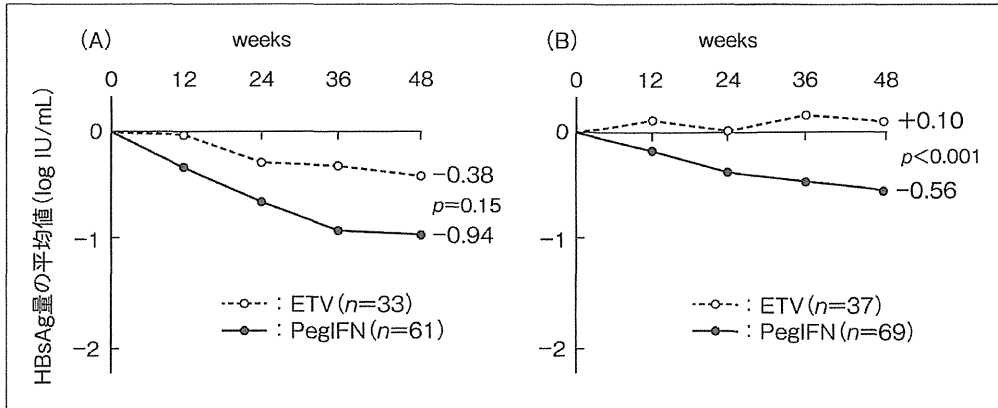


図 2 PegIFNは、ETVよりもHBsAg量を低下させる²³⁾
A : HBeAg 陽性例, B : HBeAg 陰性例.

抗原の消失を予測するうえで、HBs 抗原量のモニタリングが有用であり、IFN 治療著効例では約5.4年後、LAM 維持療法治療例では約10.6年後にHBs 抗原が消失することが報告されている^{17,18)}。

一般的に、IFN 治療例では核酸アナログ製剤治療例に比較してHBs 抗原量の低下量の幅が大きいことが多くの論文で示されている。それをまとめたものが表2であり¹⁹⁻²⁷⁾、そのことを示したもっとも代表的な図が図2である。核酸アナログ製剤ではおもにHBVの逆転写のプロセスを抑制して抗ウイルス効果を発揮しているのに対し、IFN 治療は抗ウイルス効果に加えて免疫増強効果も有している。それぞれの薬剤の作用機序の違いがHBs 抗原量の反応性の違いに反映されていると考えられている。

HBs抗原定量による PegIFN治療効果予測

PegIFN 治療の効果は、HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎で約30%、HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎で約20%と報告されている。PegIFN 治療前後のHBs 抗原量のモニタリングは、本治療法の最終的な治療効果予測に有用であることが報告されている。

1. HBe抗原陽性B型慢性肝炎

PegIFN- α 2b を用いて52週間治療を行ったHBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎202例に対するヨーロッパでの検討では、HBs 抗原量の低下の幅がレスポンドとそれ以外では52週の時点で3.3 vs. 0.7 log₁₀ IU/mL、78週の時点で3.4 vs. 0.35 log₁₀

IU/mL ($p < 0.001$)の違いがみられたという。また、治療12週までのHBs 抗原量の低下が、レスポンドの予測や治療後3年目のHBs 抗原の消失の予測に有用であると報告している²⁰⁾。

同じくPegIFN- α 2b を用いて32~48週間治療を行ったHBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎92例に対する香港での検討でも、治療6カ月目のHBs 抗原量が300 IU/mL未満に低下すること、また治療6カ月間でHBs 抗原量の低下の幅が1 log₁₀ IU/mL以上であった例では治療効果が良好で治療効果予測に有用であったと報告している²⁸⁾。

Piratvisurhらは、PegIFN- α 2aを用いた治療12週目のHBs 抗原量が1,500 IU/mL未満に低下した例では、治療終了6カ月の時点で57%の症例でHBe 抗原抗体のセロコンバージョンが生じ、これらの症例の18%においてHBs 抗原が消失したと報告した²⁹⁾。

2. HBe抗原陰性B型慢性肝炎

HBe 抗原陰性 B 型慢性肝炎に対するPegIFN 治療の効果予測に治療前HBs 抗原量は関係しないことから、治療効果の予測ができないことが報告されている^{26,30,31)}。しかし、治療中のHBs 抗原量の減衰の程度を評価することは治療効果予測に有用であり、著効例では48週時点で 2.1 ± 1.2 log₁₀ IU/mL低下し、また、早期治療効果予測の指標としては12週時点で0.5 log₁₀ IU/mL低下、24週時点で1.0 log₁₀ IU/mL低下の反応性が治療効果予測率(PPV)として、それぞれ89%と92%であったと報告している³⁰⁾。また、治療12週の時点での

HBs 抗原量として 10%以上の減少率を示した者の治療終了 1 年後の著効率は 47%, 5 年後の HBs 抗原消失率 23%と報告されている²⁷⁾。その一方で, PegIFN 治療中の HBV-DNA 量の推移は著効例と再燃例の間に差がないことが確認されている³⁰⁾。

文献

- 1) Liaw, Y. F. and Chu, C. M.: *Lancet*, **373** : 582-592, 2009.
- 2) Lok, A. S. and McMahon, B. J.: *Hepatology*, **50** : 661-662, 2009.
- 3) Tenney, D. J. et al.: *Hepatology*, **49** : 1503-1514, 2009.
- 4) Cooksley, W. G. et al.: *J. Viral Hepat.*, **10** : 298-305, 2003.
- 5) Chan, H. L. et al.: *Ann. Intern. Med.*, **142** : 240-250, 2005.
- 6) Lau, G. K. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **352** : 2682-2695, 2005.
- 7) Marcellin, P. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **351** : 1206-1217, 2004.
- 8) Liaw, Y. F.: *Hepatology*, **53** : 2121-2129, 2011.
- 9) Chu, C. M. and Liaw, Y. F.: *Antivir. Ther.*, **15** : 133-143, 2010.
- 10) Chan, H. L. et al.: *Hepatology*, **52** : 1232-1241, 2010.
- 11) Nguyen, T. et al.: *J. Hepatol.*, **52** : 508-513, 2010.
- 12) Jaroszewicz, J. et al.: *J. Hepatol.*, **52** : 514-522, 2010.
- 13) Brunetto, M. R. et al.: *Gastroenterology*, **139** : 483-490, 2010.
- 14) Martinot-Peignoux, M. et al.: *Hepatology*, **52** : 992 A, 2010.(abstract)
- 15) Janssen, H. L. et al.: *Antiviral. Res.*, **23** : 251-257, 1994.
- 16) Manesis, E. K. et al.: *Antivir. Ther.*, **12** : 381-388, 2007.
- 17) Manesis, E. K. et al.: *Antivir. Ther.*, **12** : 73-82, 2007.
- 18) Wiegand, J. et al.: *Antivir. Ther.*, **13** : 547-554, 2008.
- 19) Lau, G. K. et al.: *Hepatology*, **48**(Suppl.) : 714 A, 2008.(abstract)
- 20) Sonneveld, M. J. et al.: *Hepatology*, **52** : 1251-1257, 2010.
- 21) Marcellin, P. et al.: *J. Hepatol.*, **52**(Suppl. 1) : S6-S7, 2010.
- 22) Jung, Y. K. et al.: *J. Clin. Gastroenterol.*, **44** : 653-657, 2010.
- 23) Reijnders, J. G. P. et al.: *J. Hepatol.*, **54** : 449-454, 2011.
- 24) Wursthorn, K. et al.: *Hepatology*, **52** : 1611-1620, 2010.
- 25) Gane, E. et al.: *J. Hepatol.*, **52**(Suppl. 1) : S388, 2010.
- 26) Brunetto, M. R. et al.: *Hepatology*, **49** : 1141-1150, 2009.
- 27) Marcellin, P. et al.: *Hepatol. Int.*, **4** : 151, 2010.
- 28) Chan, H. L. et al.: *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **32** : 1323-1331, 2010.
- 29) Piratvisuth, T. et al.: *Hepatol. Int.*, **4** : 152, 2010.
- 30) Moucari, R. et al.: *Hepatology*, **49** : 1151-1157, 2009.
- 31) Rijckborst, V. et al.: *Hepatology*, **52** : 454-461, 2010.

* * *

Effect of occult hepatitis B virus infection on the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection

MASAHITO NAKANO¹, TAKUMI KAWAGUCHI^{1,2}, SHINGO NAKAMOTO³,
ATSUSHI KAWAGUCHI⁴, TATSUO KANDA³, FUMIO IMAZEKI^{3,5}, RYOKO KUROMATSU¹,
SHUJI SUMIE¹, MANABU SATANI¹, SHINGO YAMADA¹, TAKUJI TORIMURA^{1,6},
TATSUYUKI KAKUMA⁷, OSAMU YOKOSUKA³ and MICHIO SATA^{1,2}

¹Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine;

²Department of Digestive Disease Information & Research, Kurume University School of Medicine, Kurume;

³Department of Gastroenterology and Nephrology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba;

⁴Biostatistics Center, Kurume University, Kurume; ⁵Safety and Health Organization, Chiba University, Chiba;

⁶Liver Cancer Research Division, Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University;

⁷Department of Biostatistics, Kurume University Graduate School of Medicine, Kurume, Japan

Received June 22, 2013; Accepted August 2, 2013

DOI: 10.3892/or.2013.2700

Abstract. Although overt hepatitis B virus (HBV) infection promotes the onset of hepatocellular carcinoma (HCC) in hepatitis C virus (HCV)-infected patients, the effect of occult HBV infection remains unclear. The aim of this study was to investigate the effect of occult HBV infection on the early-onset of HCC in HCV-infected patients. A total of 173 HCC patients with HCV infection were enrolled and classified into 2 groups according to the median age of HCC onset: the early-onset group (n=91; 61.1±5.6 years) and the late-onset group (n=82; 73.8±3.7 years). Independent factors associated with the early-onset of HCC were assessed by multivariate analysis. In the overall analysis, independent risk factors for the early-onset of HCC were the white blood cell count and

alanine aminotransferase level, but not the presence of HBV DNA. In a stratification analysis according to albumin levels of ≥ 3.5 g/dl, the presence of HBV DNA was a significant independent risk factor for the early-onset of HCC (OR 145.18, 95% CI 1.38-15296.61, P=0.036), whereas the presence of antibodies against hepatitis B core antigen was not found to be a risk factor. The presence of HBV DNA was not a risk factor for the early-onset of HCC in the overall analysis. However, its presence was an independent factor for the early-onset of HCC in HCV-infected patients with an albumin level of ≥ 3.5 g/dl. Thus, occult HBV infection may accelerate hepatocarcinogenesis in HCV-infected patients with relatively low carcinogenic potential.

Correspondence to: Dr Takumi Kawaguchi, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan
E-mail: takumi@med.kurume-u.ac.jp

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HBV, hepatitis B virus; HBsAg, hepatitis B surface antigen; BMI, body mass index; WBC, white blood cell; HbA1c, hemoglobin A1c; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AFP, α -fetoprotein; DCP, des- γ -carboxy prothrombin; HOMA, homeostasis model assessment; APRI, AST to platelet ratio index; AUROC, area under the receiver operating characteristic curve analysis; MAPK, mitogen activated protein kinase

Key words: latent HBV infection, hepatoma, liver cancer, oncogenesis, white blood cell

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide. It ranks third in men and fifth in women as the cause of death from malignancies in Japan (1). Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is the major cause of HCC and accounts for ~60-70% of HCC cases in Japan (2). In addition to hepatic inflammation and subsequent fibrosis, various other factors including aging, obesity and diabetes mellitus are involved in the hepatocarcinogenesis in HCV-infected patients (3-5).

Co-infection of HCV with hepatitis B virus (HBV) is thought to synergistically increase the development of HCC (6). The status of HBV infection is evaluated by the presence of hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibodies against hepatitis B core antigen (HBcAb), and HBV DNA. In some cases, HBV DNA can be detected in the serum or liver tissue of patients who are negative for HBsAg, a condition referred to as 'occult HBV infection' (7,8). In Japan, the prevalence of occult HBV infection in HCV-infected patients is reported

Table I. Nucleotide positions and sequences of TaqMan PCR primers and probes.

Primer/Probe	Sequence	Position
S-sense	TGTACAAAACCTTCGGACGGAAA	442-464
S-antisense	TGCGAAAGCCCAGGATGATG	485-504
S-probe	CTGCACTTGTATTCCC	465-480
C-sense	ACTGTGGTTTCACATTTCTGTCTT	2072-2096
C-antisense	GGCATTGGTGGTCTGTAAAGC	2163-2183
C-probe	CCCACTCCAAAAGAC	2132-2147
X-sense	CTACTGTTCAAGCCTCCAAGCT	1729-1750
X-antisense	GCTCCAAATTCTTTATACGGGTCAATG	1778-1804
X-probe	AAGCCACCCAAGGCAC	1751-1766

Nucleotide positions are based on the sequence of hepatitis B virus subtype adr4 (GenBank accession no. X01587) (29).

to be between 37.7% and 90% (9-11). Occult HBV infection is associated with a poor response to interferon therapy for chronic hepatitis C (12,13) and is also known to accelerate the progression of liver fibrosis, resulting in cirrhosis in patients with HCV infection (9,14,15). Several previous studies have examined the impact of occult HBV infection on the development of HCC in HCV-infected patients, but no clear conclusions have emerged (14,16,17). Moreover, the effects of occult HBV infection on the early-onset of HCC have not been investigated in HCV-infected patients.

Albumin is produced by hepatocytes, and the level of serum albumin is used to evaluate hepatic function (18). Albumin plays a significant role in maintaining colloid osmotic pressure and transports drugs and endogenous substances including bilirubin and unesterified free fatty acids (19). In addition, albumin exerts antioxidative properties (19), and hypoalbuminemia has been shown to be an independent risk factor for mortality among residents of a hyperendemic area of HCV infection in Japan (20). A serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl is an independent predictor of survival in HCC patients (21,22) and in cirrhotic patients with a serum albumin levels of < 3.5 g/dl, branched-chain amino acids increase serum albumin levels and subsequently suppress hepatocarcinogenesis (23,24). Thus, the serum albumin level is an important factor in hepatocarcinogenesis.

The aim of this study is to investigate the impact of occult HBV infection on the early-onset of HCC in HCV-infected patients. We also performed a stratification analysis according to the serum albumin level.

Subjects and methods

Subjects. We conducted a retrospective study to investigate the effect of the presence of HBV DNA on the early-onset of HCC in HCV-infected patients. Between 1995 and 2011, 325 patients underwent hepatic resection at the Kurume University Hospital. The inclusion criteria were histologically proven HCC, a positive result for serum anti-HCV, and a negative result for serum HBsAg. Exclusion criteria were the presence of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and hemochromatosis, no test results for serum HBV DNA, and a histological diagnosis of combined hepatocellular and

cholangiocellular carcinoma. Although 214 patients met the inclusion criteria, 41 patients had to be excluded because of one or more of these reasons. The remaining 173 HCC patients with HCV infection were therefore enrolled in this study and classified into 2 groups according to the median age of HCC onset: the early-onset group ($n=91$; 61.1 ± 5.6 years) and the late-onset group ($n=82$; 73.8 ± 3.7 years).

The study protocol was approved by the institutional review board, and informed consent for participation in the study was obtained from each subject. None of the subjects were institutionalized.

Data collection. Demographic data were collected at the time of hepatic resection including age, gender, and alcohol intake. Body mass index (BMI) was calculated as body weight in kilograms divided by the square of height in meters (kg/m^2).

Venous blood samples were taken in the morning after a 12-h overnight fast. The presence of serum anti-HCV, HBsAg, and HbCAb was tested using standard clinical methods (Department of Clinical Laboratory, Kurume University Hospital). Blood platelet count, white blood cell (WBC) count, prothrombin time %, plasma glucose levels; hemoglobin A1c (HbA1c) levels, and serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin, total bilirubin, insulin, α -fetoprotein (AFP), and des- γ -carboxy prothrombin (DCP) were also measured using standard clinical methods. Insulin resistance was evaluated on the basis of fasting levels of plasma glucose and insulin, according to the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), as previously described (25).

The stage of hepatic fibrosis was assessed using the AST-to-platelet ratio index (APRI), which is calculated as the serum AST level (U/l)/upper limit of normal AST (U/l) $\times 100$ /platelet count ($\times 10^4/\text{ml}$). Patients with APRI values of ≤ 1.5 were diagnosed as having chronic hepatitis, and patients with APRI values > 1.5 were diagnosed as having liver cirrhosis, as previously described (26). The degree of liver cirrhosis was categorized according to the Child-Pugh classification (27). Diabetes mellitus was diagnosed on the basis of fasting blood glucose levels > 126 mg/dl or HbA1c levels $> 6.5\%$, in accordance with the Diagnostic Criteria for

Table II. Differences in the clinical characteristics between the early-onset and late-onset groups.

Variable	Reference value	Early-onset	Late-onset	P
Number of patients		91	82	
Age (years)		61.1±5.6	73.8±3.7	<0.001
AFP (ng/ml)	<8.7	1876±12163	769±3246	0.588
DCP (mAU/ml)	<40	1083±4120	1071±3845	0.378
Maximal HCC size (mm)	N/A	30.4±19.6	33.2±16.2	0.055
Gender (female/male)	N/A	23/68	20/62	0.893
BMI (kg/m ²)	18.5-22.0	23.6±3.6	22.4±3.2	0.045
Daily alcohol intake (none/0-60 g/>60 g)	N/A	21/42/14	23/36/10	0.676
Platelet count (x10 ⁴ /mm ³)	13-36	13.8±5.4	13.5±4.6	0.988
WBC count (/mm ³)	4000-9000	5009±1526	4420±1210	0.012
AST (U/l)	13-33	56.2±29.5	52.8±27.2	0.412
ALT (U/l)	6-30	62.2±40.9	51.7±31.7	0.104
Albumin (g/dl)	4.0-5.0	3.87±0.45	3.85±0.38	0.520
Prothrombin time (%)	70-130	90.0±11.2	91.7±12.2	0.272
Total bilirubin (mg/dl)	0.3-1.2	0.84±0.35	0.79±0.29	0.346
Chronic hepatitis/Child-Pugh class A/Child-Pugh class B	N/A	40/49/2	36/44/2	0.994
Complication of diabetes mellitus (yes/no)	N/A	30/61	20/62	0.214
Fasting blood glucose (mg/dl)	80-109	119±39	107±31	0.060
Insulin (μU/ml)	5-20	13.1±10.4	9.8±8.0	0.014
HOMA-IR	<2.5	3.05±2.47	2.11±1.03	0.622
HbA1c (%)	4.6-6.2	5.77±0.88	5.50±0.78	0.053
HBcAb positive/negative	N/A	49/42	50/32	0.344
HBV DNA positive/negative	N/A	6/85	3/79	0.385

Values are expressed as the mean ± SE. AFP, α-fetoprotein; DCP, des-γ-carboxy prothrombin; HCC, hepatocellular carcinoma; BMI, body mass index; WBC, white blood cell; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; HbA1c, hemoglobin A1c; HBcAb, antibody for hepatitis B core antigen; HBV, hepatitis B virus; N/A, not applicable.

Diabetes Mellitus of the Japan Diabetes Society (28), or the use of antidiabetic agents.

Nucleic acid extraction from serum. Total nucleic acid was extracted from 300 μl of plasma using a commercially available kit (High Pure Viral Nucleic Acid kit; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. The extracted nucleic acid was eluted in 25 μl of elution buffer.

PCR for HBV DNA. Serum HBV DNA was analyzed for the presence of HBs, HBc, and HBx (S, C and X) regions using TaqMan real-time PCR according to the manufacturer's instructions (TaqMan Fast Universal PCR Master mix; Applied Biosystems, Tokyo, Japan). The oligonucleotide primers and probes that were optimized for the HBV subtype adr4 (29) were specific for the S, X and C region sequences are listed in Table I. The full-length HBV DNA (GenBank accession no. X01587) (29) was used as an internal standard in the quantitative real-time detection PCR. We used 8 μl of nucleic acid-containing serum in our study for better sensitivity. The limit of sensitivity of our TaqMan Real-time PCR methods was 4.5 copies/well, and the detection limit of our tests was 45 copies/ml (1.7 log copies/ml). A real-time PCR assay (COBAS TaqMan HBV Auto; Roche Diagnostics) was

also performed to detect the core region of HBV DNA (limit of quantification, 1.8 log copies/ml). The presence of HBV DNA was defined as any positivity of S, X or C region.

Statistical analysis. Data are expressed as the absolute value or the mean ± SD. Differences between the early-onset and late-onset groups were analyzed using the Mann-Whitney U test. A logistic regression model with the Firth's correction 30 was used for multivariate stepwise analysis to identify independent variables associated with the early-onset of HCC, as previously described (31,32). All P-values were 2-tailed, and a level of <0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were conducted using SAS version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) or R packages version 2.15.2 (URL <http://www.R-project.org/>).

Results

Univariate analysis between the early-onset and late-onset groups. AFP levels, DCP levels, and maximal HCC size did not differ between the early-onset and late-onset groups (Table II). Furthermore, although BMI, WBC count, and serum insulin levels were significantly higher in the early-onset group than in the late-onset group, there were no significant differences

Table III. Multivariate stepwise analysis for factors associated with the early-onset of hepatocellular carcinoma.

	Unit	Odds ratio	95% CI	P
HbA1c	1	1.37	0.91-2.07	0.136
BMI	1	1.08	0.98-1.19	0.133
ALT	10	1.10	1.00-1.21	0.045
DCP	20	0.99	0.98-1.00	0.091
WBC count	1000	1.35	1.06-1.73	0.014

All P-values were 2-tailed, and a level of <0.05 was considered statistically significant. HbA1c, hemoglobin A1c; BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; DCP, des- γ -carboxy prothrombin; WBC, white blood cell.

in the daily alcohol intake, platelet count, prothrombin time, Child-Pugh classification, presence of diabetes mellitus as a comorbidity, fasting blood glucose level, HOMA-IR value, HbA1c levels, and the serum levels of AST, ALT, albumin, and

total bilirubin (Table II). The presence of HBcAb and HBV DNA did not differ either between the early-onset and late-onset groups (Table II).

Multivariate stepwise analysis for early-onset of HCC. Multivariate stepwise analysis showed that the serum ALT level and WBC count were independent risk factors for the early-onset of HCC (OR 1.10; 95% CI 1.00-1.21; P=0.045 and OR 1.35; 95% CI 1.06-1.73; P=0.014, respectively; Table III), but not the presence of HBcAb or HBV DNA.

Stratification analysis according to serum albumin level. Differences in the clinical characteristics between patients with the albumin level of ≥ 3.5 g/dl and <3.5 g/dl were summarized in Table IV. There were no significant differences in AFP levels, DCP levels, and maximal HCC size between the albumin level of ≥ 3.5 g/dl and <3.5 g/dl groups (Table IV). In the albumin level of ≥ 3.5 g/dl group, a significant elevation was seen in platelet count, prothrombin time and the number of patients with chronic hepatitis and a significant depletion was seen in AST level than in the albumin level of <3.5 g/dl group. However, other biochemical parameters and the

Table IV. Differences in the clinical characteristics between patients with the albumin level of ≥ 3.5 g/dl and <3.5 g/dl.

Variable	Reference value	Albumin level of		P
		≥ 3.5 g/dl	<3.5 g/dl	
Number of patients		138	35	
Age (years)		67.8 \pm 8.1	67.9 \pm 6.7	0.895
AFP (ng/ml)	<8.7	786 \pm 3219	3262 \pm 18195	0.248
DCP (mAU/ml)	<40	854 \pm 3269	1961 \pm 5977	0.306
Maximal HCC size (mm)	N/A	30.6 \pm 15.9	36.8 \pm 23.8	0.171
Gender (female/male)	N/A	35/103	8/27	0.759
BMI (kg/m ²)	18.5-22.0	23.0 \pm 3.5	23.0 \pm 3.4	0.918
Daily alcohol intake (none/0-60 g/>60 g)	N/A	21/58/38	3/20/6	0.172
Platelet count (x10 ⁴ /mm ³)	13-36	14.3 \pm 4.9	11.3 \pm 4.8	0.001
WBC count (/mm ³)	4000-9000	4798 \pm 1395	4291 \pm 1331	0.052
AST (U/l)	13-33	51.2 \pm 26.2	67.1 \pm 32.6	0.001
ALT (U/l)	6-30	54.9 \pm 37.4	63.4 \pm 32.7	0.057
Albumin (g/dl)	4.0-5.0	4.02 \pm 0.28	3.23 \pm 0.20	<0.001
Prothrombin time (%)	70-130	91.6 \pm 12.0	88.0 \pm 10.0	0.038
Total bilirubin (mg/dl)	0.3-1.2	0.82 \pm 0.34	0.80 \pm 0.28	0.822
Chronic hepatitis/Child-Pugh class A/Child-Pugh class B	N/A	69/69/0	7/24/4	<0.001
Complication of diabetes mellitus (yes/no)	N/A	38/100	12/23	0.431
Fasting blood glucose (mg/dl)	80-109	112 \pm 37	121 \pm 49	0.694
Insulin (μ U/ml)	5-20	10.1 \pm 6.4	17.6 \pm 16.3	0.063
HOMA-IR	<2.5	3.12 \pm 3.87	4.23 \pm 2.23	0.315
HbA1c (%)	4.6-6.2	5.61 \pm 0.79	5.68 \pm 1.04	0.905
HBcAb positive/negative	N/A	75/63	24/11	0.129
HBV DNA positive/negative	N/A	6/132	3/32	0.315

Values are expressed as the mean \pm SE. AFP, α -fetoprotein; DCP, des- γ -carboxy prothrombin; HCC, hepatocellular carcinoma; BMI, body mass index; WBC, white blood cell; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; HbA1c, hemoglobin A1c; HBcAb, antibody for hepatitis B core antigen; HBV, hepatitis B virus; N/A, not applicable.

Table V. Multivariate stepwise analysis for factors associated with the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl.

	Unit	Odds ratio	95% CI	P
HBcAb	Positive	0.59	0.27-1.26	0.169
HBV DNA	Positive	145.18	1.38-15296.61	0.036
Prothrombin time	10	0.76	0.54-1.08	0.109
ALT	10	1.08	0.97-1.21	0.145
Albumin	0.1	1.17	1.01-1.36	0.036
DCP	20	0.99	0.98-1.00	0.037
Platelet count	1	0.92	0.84-1.02	0.107
WBC count	1000	1.64	1.15-2.35	0.006

All P-values were 2-tailed, and a level of <0.05 was considered statistically significant. HBcAb, antibody for hepatitis B core antigen; HBV, hepatitis B virus; ALT, alanine aminotransferase; DCP, des- γ -carboxy prothrombin; WBC, white blood cell.

Table VI. Multivariate stepwise analysis for factors associated with the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with a serum albumin level of <3.5 g/dl.

	Unit	Odds ratio	95% CI	P
HbA1c	1	1.83	0.75-4.47	0.183
HBV DNA	Positive	0.00	0.00-2.96	0.093
AFP	20	1.39	1.01-1.93	0.045

All P-values were 2-tailed, and a level of <0.05 was considered statistically significant. HbA1c, hemoglobin A1c; HBV, hepatitis B virus; AFP, α -fetoprotein.

presence of HBcAb and HBV DNA did not differ between the albumin level of ≥ 3.5 g/dl and <3.5 g/dl groups (Table IV).

In patients with a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl, the WBC count and serum levels of albumin and DCP were identified as independent factors associated with the early-onset of HCC (OR 1.64; 95% CI 1.15-2.35; $P=0.006$, OR 1.17; 95% CI 1.01-1.36; $P=0.036$, and OR 0.99; 95% CI 0.98-1.00; $P=0.037$, respectively; Table V). Although the presence of HBcAb was not found to be a significant risk factor for the early-onset of HCC, the presence of HBV DNA was identified as a significant independent risk factor associated with the early-onset of HCC (OR 145.18; 95% CI 1.38-15296.61; $P=0.036$; Table VI).

In patients with a serum albumin level of <3.5 g/dl, the serum AFP level was the only significant risk factor found to be associated with the early-onset of HCC (Table V). The presence of HBcAb and HBV DNA was not found to be a significant risk factor for the early-onset of HCC.

Discussion

In the overall analysis, the presence of HBV DNA in serum was not identified as a risk factor for the early-onset of HCC in HCV-infected patients. However, a stratification analysis according to a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl revealed that the presence of HBV DNA was an independent factor for the

early-onset of HCC. These findings suggest that occult HBV infection may accelerate hepatocarcinogenesis in HCV-infected patients with a relatively low carcinogenic potential.

Although co-infection of HCV and HBV is thought to synergistically increase the risk of HCC (6), the overall analysis in this study showed that occult HBV infection was not significantly associated with the early-onset of HCC in HCV-infected patients. Similarly, several studies conducted in Asia have also failed to show any significant effect of occult HBV infection in these patients (33-35). Recently, Lok *et al* (36) performed a nested case-control study using a large number of patients enrolled in the HALT-C cohort and reported no significant difference in the prevalence of occult HBV infection between HCC and non-HCC patients with HCV infection. Taken together, these results suggest that occult HBV infection may not be an intensive promoter of HCC development in the presence of a potent carcinogenic factor such as HCV infection.

In contrast with these previous studies and with our own findings for all patients, a stratification analysis according to a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl showed that occult HBV infection was an independent risk factor for the early-onset of HCC. In patients with occult HBV infection, it is unclear whether a presence of HBV DNA is due to full-length HBV DNA replicated from covalently closed circular DNA in hepatocytes or fragmented HBV DNA integrated into the hepatocyte genome. However, the *HBx* gene is frequently integrated into cellular genes in HCC (37). The *HBx* protein upregulates the expression of proto-oncogenes including *c-jun*, *c-fos* and *c-myc*, all of which can promote hepatocarcinogenesis (38,39). In addition, albumin plays a crucial role in the development of various diseases, as it is a major antioxidant (19). In cirrhotic patients with a serum albumin level of <3.5 g/dl, branched-chain amino acids increase serum albumin levels, and this subsequently suppresses hepatocarcinogenesis (23,24). In this study, we found a significant association between occult HBV infection and the early-onset of HCC in patients with a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl, but not in patients with a serum albumin level of <3.5 g/dl. Taken together, these findings suggest that HBV DNA may promote hepatocarcinogenesis in HCV-infected patients with relatively low carcinogenic potential.

Although we designed this study to investigate the effect of HBV DNA on the early-onset of HCC in HCV-infected patients, we found instead that an elevated WBC count is an independent risk factor for the early-onset of HCC in HCV-infected patients. An elevated WBC count may reflect the consequences or underlying pathogenesis of the early-onset of HCC. One possible explanation is aging, because the WBC count declines in old age (40). Alternatively, an elevated WBC count still within the reference range is known to be associated with the development of various malignancies including gastric, colorectal, endometrial and lung cancers (41,42). The WBC count is a well-validated biomarker of inflammation. Chronic inflammation is a possible risk factor for hepatocarcinogenesis as it leads to the activation of receptors for chemokine and advanced glycation-end products (43,44). Another inflammation marker, C-reactive protein, is reported to be a diagnostic and prognostic marker of HCC (45,46). Taken together, these findings suggest that inflammation may promote the early-onset of HCC in HCV-infected patients.

A limitation of this study is that there were only a small number of HBV DNA-positive patients. Previous studies regarding occult HBV infection had a similar limitation (33,47,48). Since occult HBV infection is not frequently seen in HCV-infected patients with HCC, a multicenter study is needed to confirm our findings.

In conclusion, the presence of HBV DNA in serum was not a risk factor for the early-onset of HCC in HCV-infected patients. However, a stratification analysis based on a serum albumin level of ≥ 3.5 g/dl revealed that presence of HBV DNA in serum was an independent risk factor for the early-onset of HCC. These findings suggest that occult HBV infection may accelerate hepatocarcinogenesis in HCV-infected patients with relatively low carcinogenic potential.

Acknowledgements

This study was supported, in part, by Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Hepatitis from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Kiyosawa K, Umemura T, Ichijo T, *et al*: Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology* 127: S17-S26, 2004.
- Taura N, Fukushima N, Yastuhashi H, *et al*: The incidence of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C infection decreased in Kyushu area. *Med Sci Monit* 17: PH7-PH11, 2011.
- Koike K: Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 33: 145-150, 2005.
- Kawaguchi T and Sata M: Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance: therapeutic strategies for insulin sensitization. *World J Gastroenterol* 16: 1943-52, 2010.
- Sumie S, Kawaguchi T, Kuromatsu R, *et al*: Total and high molecular weight adiponectin and hepatocellular carcinoma with HCV infection. *PLoS One* 6: e26840, 2011.
- Wu Q and Liu Q: Do hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infections increase hepatocellular carcinoma occurrence through synergistically modulating lipogenic gene expression? *Hepatol Res* 42: 733-740, 2012.
- Torbenson M and Thomas DL: Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2: 479-486, 2002.
- Blackard JT, Martin CM, Sengupta S and Forrester J: Limited infection with occult hepatitis B virus in drug users in the USA. *Hepatol Res* 43: 413-417, 2013.
- Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, Osuga T and Takada S: Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients. *J Med Virol* 54: 249-255, 1998.
- Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, *et al*: Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol* 58: 201-207, 1999.
- Nirei K, Kaneko M, Moriyama M and Arakawa Y: The clinical features of chronic hepatitis C are not affected by the coexistence of hepatitis B virus DNA in patients negative for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 43: 95-101, 2000.
- Mrani S, Chemin I, Menouar K, *et al*: Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J Med Virol* 79: 1075-1081, 2007.
- Berberova M, Mendizova A, Popchristova E, Krastev N and Genov J: Disease and treatment outcome in chronic active hepatitis C with occult HBV infection. *Hepatogastroenterology* 50: 2009-2012, 2003.
- Squadrito G, Pollicino T, Cacciola I, *et al*: Occult hepatitis B virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 106: 1326-1330, 2006.
- Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME and Raimondo G: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 341: 22-26, 1999.
- Hasegawa I, Orito E, Tanaka Y, *et al*: Impact of occult hepatitis B virus infection on efficacy and prognosis of interferon-alpha therapy for patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 25: 247-253, 2005.
- Ikeda K, Marusawa H, Osaki Y, *et al*: Antibody to hepatitis B core antigen and risk for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Intern Med* 146: 649-656, 2007.
- Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR and Sata M: Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology* 54: 1063-1070, 2011.
- Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Abe M, Koga H and Sata M: Quick and simple method for increasing the reduced albumin fraction in human serum albumin preparations by using stronger neo-minophagen C. *Hepatol Res* 41: 1120-1125, 2011.
- Nagao Y and Sata M: Serum albumin and mortality risk in a hyperendemic area of HCV infection in Japan. *Virol J* 7: 375, 2010.
- Pacella CM, Francica G, Di Lascio FM, *et al*: Long-term outcome of cirrhotic patients with early hepatocellular carcinoma treated with ultrasound-guided percutaneous laser ablation: a retrospective analysis. *J Clin Oncol* 27: 2615-2621, 2009.
- Nishikawa H, Osaki Y, Iguchi E, *et al*: Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: the relationship between a new grading system for the ablative margin and clinical outcomes. *J Gastroenterol* 48: 951-965, 2013.
- Muto Y, Sato S, Watanabe A, *et al*: Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3: 705-713, 2005.
- Muto Y, Sato S, Watanabe A, *et al*: Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 35: 204-214, 2006.
- Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, *et al*: Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 165: 1499-1508, 2004.
- Ito M, Kawaguchi T, Taniguchi E, *et al*: Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 244-251, 2008.
- Pascal JP and Cales P: Propranolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. *N Engl J Med* 317: 856-861, 1987.
- The Committee of Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus: Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Japan Diab Soc* 53: 450-467, 2010 (In Japanese).
- Fujiyama A, Miyahara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N and Matsubara K: Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 11: 4601-4610, 1983.
- Firth D: Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 80: 27-38, 1993.