

Prolactin is an anterior pituitary hormone that functions in lactation and pregnancy. Prolactin has been also shown to be an extra-pituitary hormone produced and secreted by immune-mediated cells, and is involved in maintaining the function of the immune-system [Gala, 1991; Leite De Moraes et al., 1995; Ben-Jonathan et al., 1996; Matera, 1996]. In addition, prolactin receptors are expressed on many immune-mediated cells, including T cells, B cells, macrophages, and natural killer (NK) cells [Pellegrini et al., 1992; Dardenne et al., 1994; Leite De Moraes et al., 1995]. Prolactin acts as a cytokine to support the growth and activity of many immune-mediated cells in both a paracrine and an autocrine manner [Sabharwal et al., 1992; Dardenne et al., 1994; Leite De Moraes et al., 1995; Matera, 1996; Yu-Lee, 1997]. Prolactin signaling through the receptor induces the expression of a number of genes involved in immune cell function, and thereby enhances NK cell function, activates interferon regulatory factor-1 (IRF-1) and interacts with or generates interleukin-2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN- γ) [Matera, 1997]. In the T cells, IRF-1 is transcribed by the prolactin-signaling with an activation of Janus kinase 2, and it subsequently forms a homocomplex and translocates into the nucleus with the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) by tyrosine phosphorylation. IRF-1 facilitates IFN- γ transcription, and leads to proliferation and activation of T cells [Yu-Lee et al., 1998; Yu-Lee, 2002]. Thus prolactin is capable of modulating the immune reaction through its signaling.

As prolactin plays a significant role in the regulation of cellular immune responses, it might have an etiological role in infectious diseases including HCV infection. In fact, it has been reported that the serum levels of prolactin increase during the course of several infectious diseases such as blastomycosis [Arora et al., 1979] and biharzial hepatosplenomegaly [Abdel Rahman et al., 1989]. Studies on human immunodeficiency virus (HIV) infection have shown that chronically HIV-infected men have higher serum prolactin levels than healthy men, and that approximately 20% of HIV-infected men have higher serum prolactin levels than the reference level [Croxon et al., 1989; Graef et al., 1994; Montero et al., 2001; Parra et al., 2001; Collazos et al., 2002; Leanos-Miranda and Contreras-Hernandez, 2002]. Recent studies have shown an association of higher serum prolactin levels in patients with chronic HCV infection compared with healthy controls [Durazzo et al., 2006; Hofny et al., 2011]. Sousa et al. [2011] have also demonstrated that hyperprolactinemia was found in 10.1% of hepatitis C patients examined. Although hyperprolactinemia was not associated with autoimmunity in HCV carriers [Sousa et al., 2011], it may be involved in extra-hepatic manifestation in aspect of reproduction in men because the abnormality of hormonal parameters such as serum levels of estradiol as well as that of prolactin have a possibility in

impairment of the spermatic function [Durazzo et al., 2006; Hofny et al., 2011]. The association of prolactin with HCV infection is worth for further investigation in larger samples of subjects.

In this study, the levels of serum prolactin were analyzed using the samples collected from the residents recruited in the HCV cohort study [Ishibashi et al., 1996; Watanabe et al., 2003; Saito et al., 2004]. The quantitative assay for *prolactin* mRNA expression was established, and the mRNA expression of *prolactin* was investigated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy subjects experimentally stimulated by HCV in vitro. In this article, the association of prolactin induction with HCV infection is reported.

METHODS

Subjects and Serum Samples for Measuring Prolactin Levels

Subjects were recruited from the residents living in an HCV-endemic area where we have continued HCV-related cohort study since 1990 [Ishibashi et al., 1996; Watanabe et al., 2003; Saito et al., 2004]. The study was approved by the institutional ethics committee, and written informed consent was obtained from all the subjects examined. A large-scale search of serologic testing for HCV infection in 675 adult individuals (286 men and 389 women) was conducted previously in this area [Saito et al., 2004]. Briefly, the survey revealed that 277/675 (41.0%) of subjects were positive for anti-HCV antibody. After excluding subjects with a history of antiviral therapy using interferon, or those positive for hepatitis B surface antigen, 238 (35.3%) subjects (87 men and 151 women) were positive for anti-HCV antibody. Of these, 232 subjects (83 men and 149 women, median age: 68.0 year, interquartile range: 63.0–73.0 year) whose samples were kept well under -80°C were assayed for serum prolactin levels. Serum prolactin levels were also measured in sera of age-matched, 65 healthy subjects (26 men and 39 women, median age: 66.0 year, interquartile range: 59.5–72.0 year) negative for anti-HCV antibody with normal blood biochemistry parameters living in the same area. In the present study, subjects with the factors known to influence the serum prolactin level, that is, having a history of renal failure or medication with dopaminergic or antidopaminergic drugs, steroids or protease inhibitors, were excluded.

Laboratory Measurements

Anti-HCV antibody and serum HCV RNA status were examined by an enzyme immunoassay kit (HCV EIAII Abbott; Abbott Japan, Tokyo) and a qualitative HCV RNA detection kit (Amplicor HCV v2.0; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan), respectively. HCV typing was carried out by a PCR-based genotyping assay using type-specific primers, as described previously

[Watanabe et al., 2003]. Hepatitis B surface antigen was examined using an enzyme immunoassay kit (HBsAg Dainapac; Dainabot, Tokyo, Japan). The serum prolactin level was measured using a chemiluminescence's immunoassay kit (Architect prolactin; Dainabot, Tokyo, Japan). The upper limit of the reference prolactin level was based on the levels of the Japanese general population provided by the Japanese laboratory, SRL Inc., Tokyo, Japan; the reference levels of male and female were 12.7 ng/ml and 30.5 ng/ml, respectively.

Measurement of Prolactin mRNA Expression in PBMCs Stimulated by Infectious HCV Particles

Preparation of HCV viral stock. To generate HCV viral particles, the HCV replicon system that consists of pFL-J6/JFH-1 and Huh7.5 cell line was utilized [Lindenbach et al., 2005]. Briefly, 10 µg of transcribed full-length FL-J6/JFH-1 RNA was electroporated into 1×10^7 Huh7.5 cells under the condition described by Zhong et al. [2005]. Cells were plated in complete DMEM (Dulbecco's modified eagle medium; Invitrogen) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) and 5% non-essential amino acid (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) for overnight incubation. Then the transfected cells were transferred to complete DMEM in T75 flask and cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were passages every 3 days; HCV-RNA and HCV core protein presented in their corresponding supernatants were monitored by the real-time PCR, and radio immunoassay, respectively. Supernatant collected at day 21 after HCV-RNA transfection, containing the highest level of HCV-RNA (5,100 KIU/ml) and HCV core protein (80,000 fmol/L), was aliquoted for storage at -80°C.

PBMC separation and culture. Fresh PBMCs were separated from whole blood drawn from 11 healthy donors including five men and six women by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque PLUS as describe above. PBMCs were washed with PBS twice, and suspended in RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 10 mM Hepes, and 10% heat-inactivated FBS at a concentration of 2.0×10^6 /ml. PBMCs were subsequently incubated with the above collected FL-J6/JFH-1 supernatant at a concentration of 500 KIU/ml of HCV RNA and cultured in Falcon polystyrene 6-well plates at 37°C. PBMCs cultured with a control medium without FL-J6/JFH-1 supernatant were used as controls.

Detection of prolactin mRNA in PBMCs stimulated by HCV in vitro. To assess prolactin mRNA expression in PBMCs from the healthy donors after stimulation by HCV in vitro, the above PBMCs were harvested at 36 hr after culturing with or without FL-J6/JFH-1 supernatant containing HCV, and then washed three times with PBS. The total RNA was extracted from PBMCs by using RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) according to the manu-

facturer's instructions. To avoid amplification of contaminating genomic DNA, total RNA was treated with 10 units of RNase-free DNase (QIAGEN) for 30 min, and stored at -80°C until analysis. The integrity and purity of total RNA was verified spectrophotometrically. Expression of prolactin mRNA was analyzed using a TaqMan real-time PCR method (LightCycler) according to the manufacturer's recommendations (Roche Diagnostics). Briefly, the cDNA was synthesized from 600 ng of total RNA by using a commercial Superscript First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen Japan, Tokyo). For prolactin mRNA quantification, 2 µl of cDNA sample was subjected to 45 rounds of real-time PCR cycling (pre-incubating at 95°C for 10 min, amplifying at 95°C for 10 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 3 sec, and cooling at 40°C for 30 sec). The real-time PCR was performed in a final volume of 20 µl in a LightCycler 2.0 detection system (Roche) using the TaqMan Gene Expression Assay for human prolactin (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). A five-point standard curve (0.02–200 ng of total RNA from Jurkat cells) was used to estimate the initial amounts of prolactin mRNA present in each sample. Finally, the relative amounts of prolactin mRNA were calculated according to the method described by Bookout AL [Bookout and Mangeldorf, 2003] after normalization to the house-keeping gene, hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase (HGPRT) (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Fisher's exact test and Mann-Whitney *U*-test. Differences at values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Serum Prolactin Levels in Residents Endemic for HCV Infection

Serum prolactin levels were significantly higher in the HCV-infected subjects (median: 7.5 ng/ml, interquartile range: 5.7–10.9 ng/ml) than in the controls (median: 5.6 ng/ml, interquartile range: 4.4–8.3 ng/ml) ($P < 0.01$) (Fig. 1). Serum prolactin levels were significantly higher in the male subjects positive for anti-HCV antibody (median: 8.0 ng/ml, interquartile range: 5.9–11.8 ng/ml) than in the controls (median: 4.8 ng/ml, interquartile range: 4.2–5.9 ng/ml) ($P < 0.001$), but they were not significantly different between the female subjects positive for anti-HCV antibody (median: 7.3 ng/ml, interquartile range: 5.6–10.5 ng/ml) and the controls (median: 6.4 ng/ml, interquartile range: 5.3–9.8 ng/ml) (Fig. 2). The rate of elevated serum prolactin higher than the upper limits of the reference level was significantly higher in the male subjects positive for anti-HCV antibody (15/83, 18.1%) than in the controls (0/26, 0%) ($P < 0.02$), but in female it was not significantly different between the subjects positive for anti-HCV

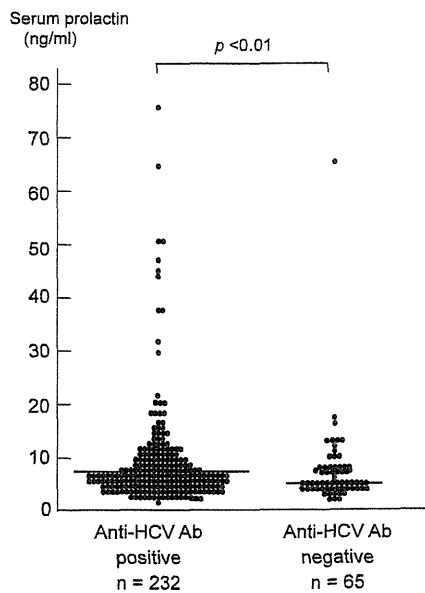


Fig. 1. Serum prolactin levels in residents living in HCV-endemic area. Serum prolactin levels were significantly higher in anti-HCV antibody-positive residents than those negative for it (median: 7.5 ng/ml vs. 5.6 ng/ml, $P < 0.01$). Mann-Whitney U -test.

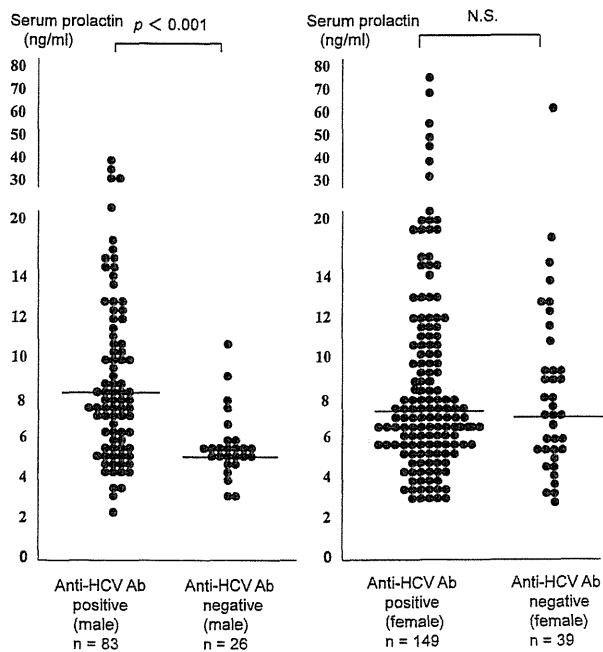


Fig. 2. Serum prolactin levels in male and female residents. Serum prolactin levels were significantly higher in the HCV-infected male than in the controls (median: 8.0 ng/ml vs. 4.8 ng/ml, $P < 0.001$), but they were not significantly different between the HCV-infected female and the controls (median: 7.3 ng/ml vs. 6.4 ng/ml, NS). Mann-Whitney U -test.

antibody (5/149, 3.4%) and the controls (1/39, 2.6%) (Table I).

Serum Prolactin Levels and HCV Genotypes

The 232 residents positive for anti-HCV antibody were classified into those with HCV viremia (184/232, 79%) and those without HCV viremia who were eliminated viremia in the course of infection (48/232, 21%). Thus the 184 subjects of 232 residents in whom the serum HCV RNA was amplified were genotyped. The number of genotype 1 (1b) and genotype 2 (2a/2b) were 77 and 107 (12/95), respectively. There were no subjects infected with genotype 3 or 4. Characteristics of the subjects were shown in Table II. Serum prolactin levels were not significantly different between the HCV genotype 1-infected subjects and genotype 2-infected subjects in both male and female (male: median: 8.2 ng/ml, interquartile range: 5.8–10.4 ng/ml versus median: 6.9 ng/ml, interquartile range: 5.7–11.0 ng/ml, female: median: 7.5 ng/ml, interquartile range: 5.6–10.3 ng/ml versus median: 7.1 ng/ml, interquartile range: 5.6–10.5 ng/ml; genotype 1 versus genotype 2).

Induction of Prolactin mRNA in Human PBMCs in Non-HCV Infected, Healthy Subjects After HCV Stimulation In Vitro

To analyze the induction of *prolactin* mRNA in immune cells, PBMCs were isolated from eleven healthy donors negative for anti-HCV antibody. PBMCs were stimulated with HCV produced in vitro. After incubation for 36 hr with the supernatant cultured with FL-J6/JFH-1 in which HCV RNA and HCV core protein were produced 5,100 KIU/ml and 80,000 fmol/L, respectively, the induction of *prolactin* mRNA in PBMCs was detected in all five male subjects and two of four female subjects before menopause, its mRNA levels being 1.18–4.99 \times higher than that in PBMCs cultured with the control supernatant without HCV. But, the induction of *prolactin* mRNA in PBMCs was not detected in two females after the menopause (Table III). No correlation between serum prolactin level and *prolactin* mRNA expression in PBMCs was found.

DISCUSSION

Prolactin has a potential role in immunity to various infectious diseases. In this study, higher serum prolactin levels were observed in HCV-infected individuals than in healthy, uninfected individuals. Serum prolactin levels were significantly higher in male subjects positive for anti-HCV antibody than those negative for it and the rate of elevated serum prolactin higher than the upper limits of the reference level in HCV-infected men being 18.1%, although no significant differences were found in females' subjects. Since the anterior pituitary is the

TABLE I. Characteristics of Analyzed Residents Endemic for HCV Infection

	Anti-HCV antibody positive	Anti-HCV antibody negative	Test	P
No. of cases	232	65		
Gender				
M/F	83/149	26/39	a	NS
Age (yrs), median (interquartile range)				
Total	68.0 (63.0–73.0)	66.0 (59.5–72.0)	b	NS
Male	68.0 (62.0–72.0)	58.5 (50.8–74.3)	b	NS
Female	68.0 (63.0–73.0)	67.0 (64.0–72.0)	b	NS
ALT (IU/L), median (interquartile range)				
Total	28.0 (19.0–42.3)	16.0 (14.0–21.0)	b	<0.001
Male	31.0 (21.0–59.0)	19.5 (16.0–26.0)	b	<0.001
Female	25.0 (18.0–37.0)	16.0 (14.0–19.0)	b	<0.001
Prevalence of elevated prolactin levels ^a (%)				
Total	20/232 (8.6)	3/65 (4.6)	a	NS
Male	15/83 (18.1)	0/26 (0)	a	<0.02
Female	5/149 (3.4)	1/39 (2.6)	a	NS

a; Fisher's exact test b; Mann–Whitney *U* test NS; no significance.

^aThe upper limits of prolactin are 12.7 ng/ml in male and 30.5 ng/ml in female.

major source of prolactin and its major target organ is the mammary glands, prolactin secretion are largely influenced by the mammary glands. In general, the range of serum prolactin levels is much higher in female than in male, and thus the differences based on the responses to infection would not be

discriminated in female subjects. Thus the prolactin studies of many infectious diseases [Croxxson et al., 1989; Graef et al., 1994; Montero et al., 2001; Parra et al., 2001; Collazos et al., 2002; Leanos-Miranda and Contreras-Hernandez, 2002] had been selected for the male subjects.

TABLE II. HCV Genotypes and Serum Prolactin Levels in HCV-Infected Subjects

	Genotype 1	Genotype 2	Test	P
No. of cases	77	107		
Gender				
M/F	25/52	42/65	a	NS
Age (yrs), median (interquartile range)				
Male	70.0 (65.5–74.0)	67.0 (57.8–74.3)	b	NS
Female	69.5 (63.0–74.0)	68.0 (61.5–72.0)	b	NS
ALT (IU/l), median (interquartile range)				
Male	47.0 (29.5–59.5)	33.0 (23.0–72.5)	b	NS
Female	33.5 (22.0–52.0)	27.0 (18.5–35.5)	b	<0.05
Prolactin (ng/ml), median (interquartile range)				
Male	8.2 (5.8–10.4)	6.9 (5.7–11.0)	b	NS
Female	7.5 (5.6–10.3)	7.1 (5.6–10.5)	b	NS

a, Fisher's exact test; b, Mann–Whitney *U* test NS; not significant.

TABLE III. Prolactin mRNA Induction in PBMCs of Healthy Subjects After Stimulation by HCV In Vitro

Volunteer no.	Gender (M/F) ^a	ALT (IU/L)	Anti-HCV antibody	Prolactin mRNA		
				HCV stimulation ^b	Control ^b	Ratio
1	M	12	—	0.87	0.36	2.38
2	M	6	—	0.12	0.02	4.99
3	M	30	—	0.01	0.00	2.51
4	M	18	—	0.03	0.01	2.53
5	M	30	—	0.08	0.07	1.18
6	F1	17	—	0.57	0.42	1.37
7	F1	13	—	0.15	0.11	1.30
8	F1	17	—	0.05	0.05	0.88
9	F1	28	—	0.15	0.59	0.25
10	F2	30	—	0.06	0.18	0.32
11	F2	20	—	0.03	0.05	0.63

^aM, male, F1, female before menopause, F2, female after menopause.

^bProlactin mRNA/HGPRT mRNA (ratio). The ratio is rounded to two decimal places.

Recently, some studies showed that hyperprolactinemia was found in patients with chronic hepatitis C as a part of abnormality of hormone parameters [Durazzo et al., 2006; Hofny et al., 2011] or with an association of hyperferritinemia [Sousa et al., 2011]. The etiological importance of prolactin in the immune response to HCV infection has not been elucidated. Prolactin is known to be produced and secreted from extra-pituitary sources such as human PBMCs and human T and B lymphocytes, and such cells have prolactin receptors on their surface [Pellegrini et al., 1992; Sabharwal et al., 1992; Dardenne et al., 1994; Ben-Jonathan et al., 1996; Matera, 1997]. Thus an association of prolactin with HCV immunity has been postulated. To date, there is still no evidence that prolactin is produced and secreted by lymphoid cells in patients with HCV infection. This study showed for the first time that the induction of *prolactin* mRNA occurred in the cells stimulated by HCV in vitro. Also higher levels of serum prolactin found in HCV-infected male subjects have suggested an association of prolactin induction with HCV infection. To ascertain these findings, further studies are needed to investigate the synthesis and secretion of prolactin by immune-mediated cells from HCV-infected subjects.

Components of the HCV-specific immune response have a wide variety, and one of the most important in relation to chronic hepatitis is considered to be cytotoxic T cell (CTL)-mediated immunity with a cytokine profile induced by a Th1-dominated T helper cell response [Mizukoshi and Rehermann, 2001]. Prolactin signaling through its receptor on lymphoid cells induces the expression of a number of genes involved in cellular immune responses associated with CTL proliferation and activation [Matera, 1997]. Prolactin has been shown to induce IL-2 receptors and simultaneously promote IL-2 release in rat lymphocytes [Clevenger et al., 1990a,b; Viselli et al., 1991] and to enhance the release of IFN- γ in human peripheral whole blood after stimulation with either phytohemagglutinin or lipopolysaccharide [Brand et al., 2001; Breidhardt et al., 2002]. Prolactin acts also as an antagonist of transforming growth factor (TGF)-beta [Richards et al., 1998], which is produced by NK cells and has an inhibitory effect on lymphocytes to suppress Th1-associated cell-mediated immunity [Mizukoshi and Rehermann, 2001]. The role of prolactin in the immune response to HCV infection is unknown. Several clinical studies on HIV infection have shown that HIV-infected men with secondary infections show higher serum prolactin levels than asymptomatic HIV carriers, and that the two groups differ in their lymphocyte phenotype distribution [Montero et al., 2001; Parra et al., 2001]. Prolactin induction in patients with secondary infection of HIV carriers may represent an adaptive immune mechanism of the infected host to stimulate higher possible cellular immune response [Parra et al., 2004]. Prolactin induction in case of HCV infection may represent

such a mechanism of the HCV-infected host to induce an effective immune response to HCV.

A study has shown that infection with HCV genotype 3 was associated with hyperprolactinemia [Sousa et al., 2011]. There were no correlations between serum prolactin levels and infection with HCV genotype 1 or 2. Since there is few patients infected with HCV genotype 3 or 4 in Japan, there are limitations to this study. A further study is needed to make clear an association of serum prolactin levels and HCV genotypes worldwide.

HCV infection shows a variety of clinical courses in infected individuals. Both serum prolactin levels and *prolactin* mRNA in PBMCs stimulated by HCV in vitro showed various expression levels. The host genetic factors such as gender, age, hormonal secretion might relate to the difference in prolactin levels among individuals. In addition, the several genetic variations of the genes related to the prolactin signaling, including STAT5A, TGF-beta and its superfamily that influence the downstream part of the IL-2 induction cascade have been shown in HCV-infected subjects [Saito et al., 2004; Kimura et al., 2006]. Further studies are needed to elucidate how prolactin is involved in the clinical course of HCV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Rice (The Rockefeller University, New York, NY) for the gift of pFL-J6/JFH-1 replicon system to LS.

REFERENCES

- Abdel Rahman MM, Askalany AH, el-Sadek SM, el-Kady MA. 1989. Prolactin imbalance as a result of bilharzial hepatosplenomegaly. *J Egypt Soc Parasitol* 19:507-513.
- Arora NS, Oblinger MJ, Feldman PS. 1979. Chronic pleural blastomycosis with hyperprolactinemia, galactorrhea, and amenorrhea. *Am Rev Respir Dis* 120:451-455.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-669.
- Bookout AL, Mangeldorf DJ. 2003. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 1:e012.
- Brand JM, Schmucker P, Breidhardt T, Kirchner H. 2001. Upregulation of IFN-gamma and soluble interleukin-2 receptor release and altered serum cortisol and prolactin concentration during general anesthesia. *J Interferon Cytokine Res* 21:793-796.
- Breidhardt T, Frohn C, Luhm J, Kirchner H, Brand JM. 2002. Prolactin induces enhanced interferon gamma release in peripheral whole blood after stimulation with either PHA or LPS. *Immunobiology* 206:424-431.
- Clevenger CV, Sillman AL, Prystowsky MB. 1990a. Interleukin-2 driven nuclear translocation of prolactin in cloned T-lymphocytes. *Endocrinology* 127:3151-3159.
- Clevenger CV, Russell DH, Appasamy PM, Prystowsky MB. 1990b. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6460-6464.
- Cohen J. 1999. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 285: 26-30.
- Collazos J, Ibana S, Martinez E, Mayo J. 2002. Serum prolactin concentrations in patients infected with human immunodeficiency virus. *HIV Clin Trials* 3:133-138.
- Croxxon TS, Chapman WE, Miller LK, Levit CD, Senie R, Zumoff B. 1989. Changes in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in

- human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *J Clin Endocrinol Metab* 68:317–321.
- Dardenne M, de Moraes Mdo C, Kelly PA, Gagnerault MC. 1994. Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytometry. *Endocrinology* 134:2008–2014.
- Di Bisceglie AM. 2000. Natural history of hepatitis C: Its impact on clinical management. *Hepatology* 31:1014–1018.
- Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C, Bertagna A, Faga E, Biroli G, Manieri C, Bo S, Pagano G. 2006. Alterations of seminal and hormonal parameters: An extrahepatic manifestation of HCV infection? *World J Gastroenterol* 12:3073–3076.
- Gala RR. 1991. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:513–527.
- Graef AS, Gonzalez SS, Baca VR, Ramirez MI, Daza LB, Blanco FF, Ortiz OA, Lavalle CM. 1994. High serum prolactin levels in asymptomatic HIV-infected patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 72:390–393.
- Hofny ER, Ali ME, Taha EA, Nafeh HM, Sayed DS, Abdel-Azeem HG, Abdou EF, Kamal GM, Mostafa T. 2011. Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil Steril* 95:2557–2559.
- Ishibashi M, Shinzawa H, Kubiki M, Tshuchida H, Takahashi T. 1996. Prevalence of inhabitants with anti-hepatitis C virus antibody in an area following an acute hepatitis C epidemic: Age- and are-related features. *J Epidemiol* 6:1–7.
- Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. 2006. Association of transforming growth factor- β 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 193:1371–1374.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, Alter HJ. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12:671–675.
- Leanos-Miranda A, Contreras-Hernandez I. 2002. Antiprolactin autoantibodies are associated with hyperprolactinemic status in men infected with human immunodeficiency virus. *Endocrine* 19:139–146.
- Leite De Moraes MC, Touraine P, Gagnerault MC, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. 1995. Prolactin receptors and the immune system. *Ann Endocrinol* 56:567–570.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623–626.
- Matera L. 1996. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci* 59:599–614.
- Matera L. 1997. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 4:171–180.
- Mizukoshi E, Rehmann B. 2001. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 36:799–808.
- Montero A, Bottasso OA, Luraghi MR, Giovannoni AG, Sen L. 2001. Association between high serum prolactin levels and concomitant infections in HIV-infected patients. *Hum Immunol* 62:191–196.
- Parra A, Ramirez-Paredo J, Larrea F, Perez-Romano B, Cabrera V, Torres I, Reyes-Nunez V, Ruiz-Arguelles G, Ruiz-Arguelles A. 2001. Serum prolactin is associated with apoptosis in men with human immunodeficiency virus infection. *Immunol Cell Biol* 79:285–290.
- Parra A, Reyes-Teran G, Ramirez-Peredo J, Jacquemin B, Quiroz V, Cardenas M, Garcia-Sancho MC, Larrea F. 2004. Differences in nocturnal basal and rhythmic prolactin secretion in untreated compared to treated HIV-infected men are associated with CD4+ T-lymphocytes. *Immunol Cell Biol* 82:24–31.
- Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. 1992. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol Endocrinol* 6:1023–1031.
- Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, McPherson JM. 1998. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol* 184:85–91.
- Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelly KW, Malarkey WB. 1992. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: An autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7713–7716.
- Saito T, Ji G, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ishii K, Matsuura T, Inageda K, Muramatsu M, Kawata S. 2004. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 317:335–341.
- Sousa GM, Oliveira RC, Pereira MM, Paraná R, Sousa-Atta ML, Atta AM. 2011. Autoimmunity in hepatitis C virus carriers: Involvement of ferritin and prolactin. *Autoimmun Rev* 10:210–213.
- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. 1991. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 129:983–990.
- Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, Kawata S. 2003. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J Med Virol* 71:56–61.
- Yu-Lee LY. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215:35–52.
- Yu-Lee LY, Luo G, Book ML, Morris SM. 1998. Lactogenic hormone signal transduction. *Biol Reprod* 58:295–301.
- Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 57:435–455.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9294–9299.

<症例報告>

アポ型 ALT により ALT が異常低値を示した C 型慢性肝炎に対して
抗ウイルス療法を行った 1 例

奥本 和夫* 齋藤 貴史 勝見 智大 富田 恭子 佐藤智佳子
阿藤 里佳 西瀬 雄子 渡辺 久剛 上野 義之

要旨：症例は 65 歳の男性。近医にて HCV 抗体陽性を指摘され、精査加療目的に当院へ入院となった。初診時より alanine aminotransferase (ALT) 値は 2 U/L と極度に低値であったが、肝組織所見は A1/F2 で慢性肝炎であった。ビタミン B6 の補酵素であるピリドキサルリン酸 (PALP) 添加にて ALT を測定したところ 32 U/L であり、アポ型の ALT を呈していると考えられた。本症例に対し、ゲノタイプ 2a 型低ウイルス量であるためペグインターフェロン (Peg-IFN) α 2a 製剤を投与したところ、投与開始後 1 週目には HCV RNA は検出感度以下となり、12 週間の投与により著効となった。ALT にはアポ型、ホロ型があり本邦における測定系ではアポ型は測定されない。本症例において ALT が低値を呈した原因は、ALT がアポ型を呈していたためと考えられた。アポ型 ALT が優位で、ALT が極度に低値を示していたが、Peg-IFN α 2a 投与により著効となった C 型慢性肝炎の 1 例を報告した。

索引用語： alanine aminotransferase アポ型 ALT C 型慢性肝炎
pyridoxal phosphate ペグインターフェロン α 2a

はじめに

C 型慢性肝炎の活動性を示す一つの指標として、alanine aminotransferase (ALT) 値が用いられる。ALT が基準値以内の患者に対しての治療方針として、厚生労働省難治性肝炎治療研究班によるガイドラインでは、ALT 値 30 U/L 以下、血小板 15 万/ μ L 以上であれば 2-4 カ月ごとに血清 ALT 値をフォローし、ALT 異常を呈した時点で抗ウイルス療法を考慮することが、推奨されている¹⁾。ALT は肝炎の炎症程度を表す有用な指標の一つであり、その上限値は施設によって異なるが、下限値についての検討は少ない。時に、ALT が下限値以下の症例を経験するが、測定法の影響を受けている可能性がある。今回我々は ALT が 2 U/L と極度に低値で経過をみていた稀な C 型慢性肝炎に対して、ペグインターフェロン (Peg-IFN) α 2a 製剤を投与し著効となった症例を経験したので報告する。

症 例

患者：65 歳男性。
主訴：インターフェロン導入目的。
既往歴：58 歳より糖尿病で経過観察（内服なし）。
生活歴：輸血歴なし。
飲酒歴：機会飲酒。
現病歴：1998 年より HCV 抗体陽性を指摘されていたが、1 年 1 回の採血検査で経過観察されていた。2008 年 9 月、当科外来紹介、精査加療目的に 2009 年 3 月に入院となった。

入院時検査成績 (Table 1)：HCV 抗体は陽性、ゲノタイプ 2a 型であり、HCV RNA は 4.3 LogIU/mL で、血小板は 12.5 万/ μ L であった。alanine aminotransferase (ALT) は 2 U/L と極度に低値を示していた。腹部 CT 検査では、肝形態に異常を認めず、肝硬変の所見も認めなかった (Fig. 1)。肝生検では、門脈域の線維化と炎症細胞の浸潤を認め、A1/F2 の肝組織所見であった (Fig. 2)。

入院後経過 (Fig. 3)：ALT は 2 U/L と極度に低値であったが、肝生検により慢性肝炎の所見を認めたため、Peg-IFN α 2a 週 1 回 180 μ g を投与開始した。治療

山形大学医学部消化器内科

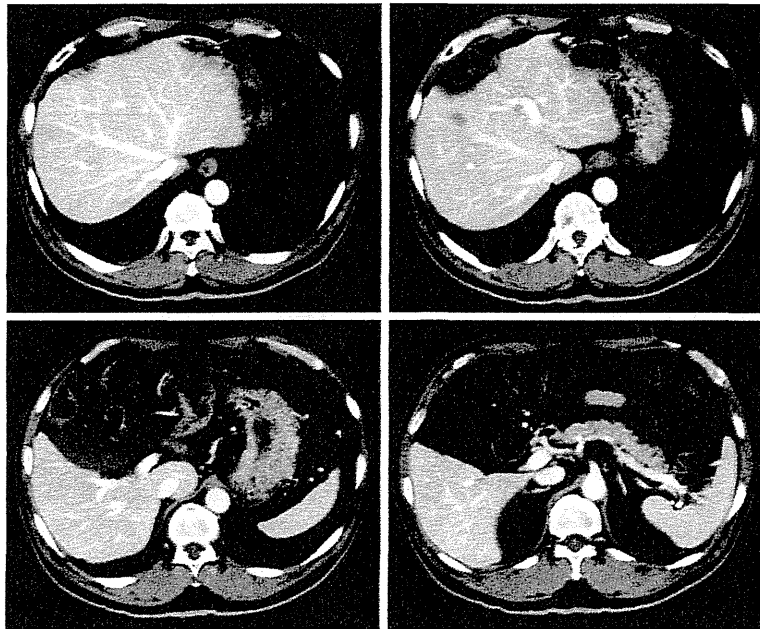
*Corresponding author:

okumoto@med.id.yamagata-u.ac.jp

<受付日 2013 年 4 月 2 日><採択日 2013 年 5 月 20 日>

Table 1 Laboratory data on admission

TP	8.1 g/dL	TCho	160 mg/dL
Alb	4.5 g/dL	TG	103 mg/dL
T.Bil	0.9 mg/dL	FBS	150 mg/dL
AST	31 U/L	HbA1c	7.2 %
ALT	2 U/L		
LDH	217 U/L	AFP	3.2 ng/mL
ALP	100 U/L	PIVKA II	10 mAU/mL
γ GTP	78 U/L		
WBC	$4.61 \times 10^3 /\mu\text{L}$	HBsAg	(-)
(Neu)	$2.39 \times 10^3 /\mu\text{L}$	HCV Ab	(+)
Hb	14.6 g/dl	HCV genotype	2a
Plt	$12.5 \times 10^4 /\mu\text{L}$	HCV RNA	4.3 LogIU/mL
PT	119 %		
BUN	14 mg/dL	ICGR15	7 %
Crea	0.79 mg/dL		
Na	140 mEq/L	Pyridoxamine	<0.2 ng/mL (<0.6)
K	3.9 mEq/L	Pyridoxal	13.4 ng/mL (6.0-40.0)
Cl	104 mEq/L	Pyridoxine	<3.0 ng/mL (<3.0)

**Fig. 1** abdominal CT

開始後の1週目には HCV RNA は検出感度以下となった。治療開始後12週の時点で、食欲不振、うつ症状が出現し、本人の希望にて治療を中止となった。その後

も HCV RNA は検出感度以下が24週間以上持続し、著効となった。ALT 低値を呈した原因として、ビタミン B6 欠乏症を考え、ビタミン B6 の測定を行ったが、ピ

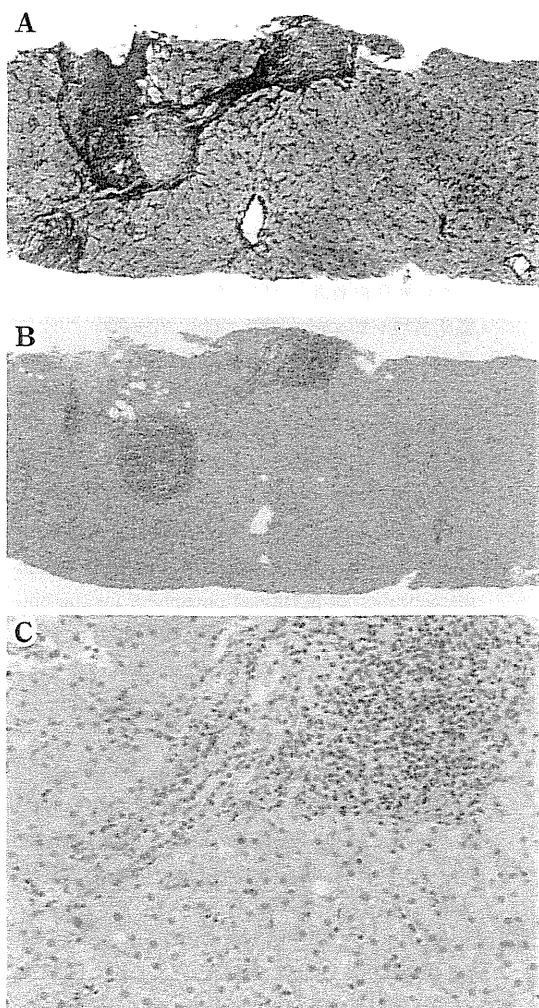


Fig. 2 Liver biopsy specimen shows AI F2
(A) Gitter staining×40 (B) HE staining×40 (C) HE staining×100

リドキサミン, ピリドキサール, ピリドキシンはいずれも正常範囲内であった(Table 1)。また, 日本モニター株式会社(東京, 日本)製測定試薬を用いて, ビタミン B6 の補酵素であるピリドキサールリン酸 (PALP) 添加 (27 mM/L) にて, 血清を再測定したところ, aspartate aminotransferase (AST) は 58 U/L (PALP 非添加で 31 U/L), ALT は 32 U/L (PALP 非添加で 2 U/L) であり, 本症例の AST, ALT はアポ型を呈していたため, これらは通常の測定法では低値を示したものと考えられた。

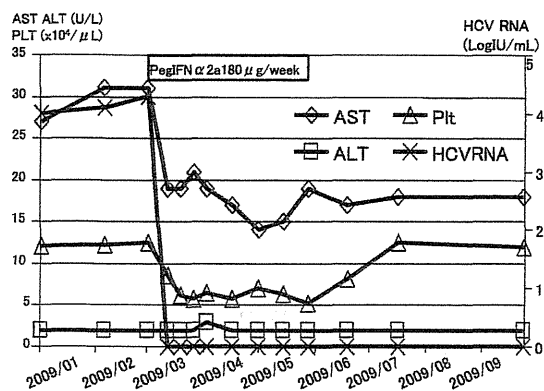


Fig. 3 Clinical course

考 察

AST や ALT は, その活性発現にビタミン B6 の補酵素である PALP を必要とする酵素である²⁾³⁾. AST, ALT には血中においては PALP と結合しているホロ型と結合していないアポ型が存在する. PALP 添加測定試薬系ではホロ型とアポ型の両者が同時に測定されるが, 無添加試薬系ではホロ型のみが測定される. 国際臨床化学連合 (IFCC) 勧告法はアポ型をホロ化するために測定系への PALP 添加を推奨しているが, 本邦で主に用いられている日本臨床化学会 (JCSS) 勧告法では PALP 無添加の試薬系であり, アポ型は測定されない反応系である⁴⁾⁵⁾. 一般にアポ型酵素の血清中割合は 10% 程度とされている⁶⁾が, ビタミン B6 欠乏症, 人工透析, アルコール性肝障害などではその割合が増加することが知られており, その臨床的意義については不明な点が多い⁶⁾⁷⁾. 既報では健康者 190 例中 15 例 (7.9%) に解離がみられ⁵⁾, 心筋梗塞や腎移植においても解離することが報告されている⁸⁾⁹⁾.

ビタミン B6 欠乏では, アポ型が増加し, ALT が低値となるが, 本症例においては血清中のビタミン B6 の測定を行ったところ, 正常範囲内であった. 本症例ではアポ型を呈した AST, ALT の割合が多かったため, 通常の測定方法では低値を呈したと考えられた. *in vitro* での PALP 添加で ALT は上昇しており, 生体内では結合しない ALT が *in vitro* で結合するためと考えられたが, その機序は不明である. 免疫グロブリン結合 AST の症例報告もあり¹⁰⁾, 免疫グロブリンの結合によって立体障害が生じ, PALP 結合部位に変化が生じて解離を生じる可能性が示唆されている. 本症例でアポ型を呈した理由は不明であるが, ALT がアポ型を呈する理

由として, AST, ALT の PALP の結合部位や遺伝要因による可能性もあり, 今後, 検討の余地があると思われる。

ALT が基準値以内でも慢性肝炎を呈している例は多く^{11)~13)}, 血小板が低下している症例に対してはインターフェロンによる抗ウイルス治療が推奨されている。また, ALT は測定法で値が異なることがあり, 実際より低値となることがあり, 注意を要する。本症例も前医では ALT が基準値以内の症例として経過をみられていたが, 肝組織検査では慢性肝炎(A1/F2)の所見であった。血小板は 15 万/ μ L 以下に低下しており, HCV ゲノタイプ 2a 型低ウイルス量で抗ウイルス効果が期待できる症例であったため, Peg-IFN α 2a 製剤を使用し, 最終的に著効となった。各施設間において, ALT 値の基準値の上限には格差があるが, その下限についての報告はない。稀ではあるが, 本症例のように ALT が 2 U/L と極度に低値を示す症例もみられ, その原因として ALT がアポ型を呈していることが考えられる。そのような症例に対しては PALP 添加による測定で実測値が測定され得ることがあるため, ALT が極度に低値を示す症例には PALP 添加による測定により, アポ型のみ ALT の存在を確認してみる必要があると考えられた。

結 語

ルーチンの血液検査法にて極度に ALT が低値を示したが, 組織学的に慢性肝炎を確認し抗ウイルス療法が奏功した C 型慢性肝炎の 1 例を報告した。ALT 値の上昇が PALP 添加により確認でき, ALT が極度に低値を示した原因としてアポ型を呈するためと考えられた。

謝辞: 本症例報告に際し, ご指導を終始頂きました, 兵庫県立西宮病院院長, 河田純男先生に感謝いたします。本研究の一部は, 厚生労働科学研究費補助金の助成を受けた。

文 献

- 1) 芥田憲夫, 熊田博光. ウイルス性肝炎の最新治療 C 型肝炎治療のガイドライン. 日本消化器病学会雑誌 2008 ; 105 : 186—190
- 2) 大久保昭行. 「臨床検査ガイド」文光堂, 1990, p223—227
- 3) 大野秀樹, 藤野 糺, 原田正純. 水俣病認定者におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アミノザイムの分画定量とピリドキサルリン酸. 北海道公衆衛生学雑誌 1988 ; 1 : 75—78
- 4) 小谷一夫, 前川真人, 菅野剛史. 日本臨床化学会 (JSCC) 常用基準法に基づいた aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) 比の再設定 Karmen 法から JSCC 常用基準法への変更に伴う肝疾患評価基準の変化. 日本消化器病学会雑誌 1994 ; 91 : 154—161
- 5) 米田孝司. 最新 酵素・アミノザイム検査 測定法とその臨床的意義 AST (GOT), ALT (GPT). 臨床病理レビュー 2001 ; 116 : 72—80
- 6) 横沢牧子, 中嶋英治, 福山はる, 他. 血清 AST, ALT 活性におけるアポ型, ホロ型の臨床的意義. 山形医学検査 1995 ; 2 : 2—6
- 7) 山内昭浩, 青木哲雄. ALT 活性測定用血清検体の保存条件に関する検討 (第 2 報) -20°C 保存における失活の原因. 医学検査 1996 ; 45 : 896—89
- 8) Lacour B, Vassault A, Degos F, et al. In vitro supplementation of pyridoxal phosphate for the optimisation of the determination of the catalytic activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in kidney transplant patients. Clin Chim Acta 1982; 120: 1—12
- 9) Gressner AM, Sittel D. Plasma pyridoxal 5'-phosphate concentrations in relation to apo-aminotransferase levels in normal, uraemic, and post-myocardial infarct sera. J Clin Chem Clin Biochem 1985; 10: 631—636
- 10) 天川 勉. アポ化を伴った AST anomaly の 1 例. 生物物理化学 1998 ; 32 : 5
- 11) Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Dysfunction of Immune Systems and Host Genetic Factors in Hepatitis C Virus Infection with Persistent Normal ALT. Hepat Res Treat 2011; 7:13216
- 12) Park JJ, Park JY, Kim do Y, et al. Prediction of significant fibrosis in chronic hepatitis C patients with normal ALT. Hepatogastroenterology 2011; 58: 1321—1327
- 13) Sanai FM, Helmy A, Dale C, et al. Updated thresholds for alanine aminotransferase do not exclude significant histological disease in chronic hepatitis C. Liver Int 2011; 31: 1039—1046

本論文内容に関連する著者の利益相反: なし

A case of chronic hepatitis C showing an extremely low level of ALT by the presence of Apo-type ALT who received the antiviral therapy

Kazuo Okumoto*, Takafumi Saito, Tomohiro Katsumi,
Kyoko Tomita, Chikako Sato, Rika Aso,
Yuko Nishise, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno

A sixty-five-year old man, who suffered from chronic hepatitis C, was admitted to our hospital. The serum ALT level was extremely low showing 2 (U/L). The liver biopsy demonstrated chronic hepatitis with mild inflammation and fibrosis (A1/F2). The serum level of ALT became 36 U/L after addition of pyridoxal phosphate to the assay, this indicated that the ALT of this patient represented an Apo-type one which could not be detected by the current assay system in Japan. The patient received administration of pegylated interferon- α 2a for 12 weeks, and a sustained virological response was achieved. We have to pay attention to the patients of chronic hepatitis C showing an extremely low level of ALT, because they may have Apo-type ALT that is not measured in the routine assay in Japan.

Key words: alanine aminotransferase Apo-type ALT chronic hepatitis C
pyridoxal phosphate pegylated interferon- α 2a

Kanzo 2013; 54: 543—547

Department of Gastroenterology, Yamagata University Faculty of Medicine

*Corresponding author: okumoto@med.id.yamagata-u.ac.jp

B型肝炎の自然予後（無治療住民検診での長期予後）

渡辺久剛* 上野義之*

索引用語：B型肝炎，自然予後，住民コホート，HBs抗原自然消失，肝癌

1 はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)感染症は、非感染例に比べ明らかに肝発癌リスクが高く、わが国では肝癌リスクの第2位、アジア全体では第1位を占めている。日本赤十字社の初回献血者から推定した、本邦におけるHBV感染者数は、Tanakaらの報告によれば15～65歳において967,753名(95% CI: 806,760～1,128,745)、内訳は男性571,210名(95% CI: 479,267～663,152)、女性396,543名(95% CI: 327,494～465,593)と見積もられている²⁾。しかしながらHBVによる肝病態進展や肝発癌機序についてはいまだ不明な点が多く、その解明にはまず、本邦におけるB型肝炎の自然予後がどのようなものかを質の高いコホートで解析・検証する必要がある。これまで、キャリアにおける肝発癌関連因子としていくつかのウイルス側、宿主側因子などが報告されているものの、これらはcross-sectional studyあるいは病院患者コホートなどの限られた集団で検討されたものがほとんどである。

HCV感染と異なり、無症候性キャリア(ASC)が多く潜在するHBV感染は、無治療で経過を追った場合の肝発癌の頻度やHBs抗原自然消失、非感染者との生命予後に差異があるかどうかなど、感染に伴う自然予後の把握が難しい。

そこで本稿では、主に住民を対象としたコホート研究でこれまで明らかにされているB型肝炎の自然予後について、国内外の論文をもとに紹介したい。

2 アジアにおけるB型肝炎自然予後

Kusakabe, Mizokamiらは住民コホートを用いて、本邦におけるHBV単独感染者のHCC発生と関連するリスク因子を前向きコホートで解析している³⁾。このコホートは、多目的コホート研究(JPHC研究^{4,5)})の一環で、全国6保健所管内に住む40～69歳の男女19,393人を平成17年まで(平均観察12.7年)に追跡した調査結果に基づくものであり、期間中110例の肝発癌を認めた。このうち13例がHBV単独感染例(図1)、78例がHCV単

Hisayoshi WATANABE et al : Long-term clinical outcomes in patients with hepatitis B: natural history population-based cohort studies

*山形大学消化器内科学 [〒990-9585 山形県山形市飯田西 2-2-2]

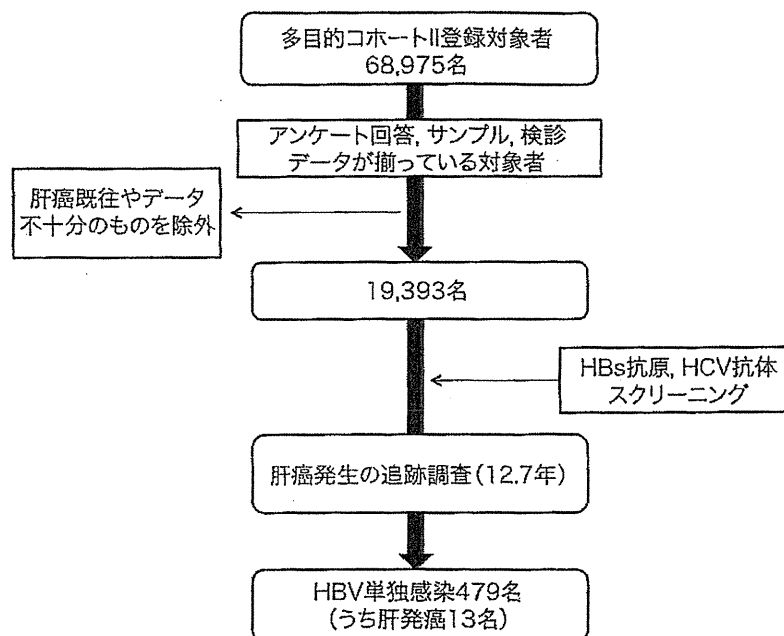


図1 コホート概要(文献3より引用改変)

表1 発癌例と非発癌例の比較(文献3より引用改変)

	HCC (n = 13)	Non-HCC (n = 466)	P
年齢	58.8 ± 6.3	55.1 ± 8.5	NS
男性	11 (85%)	209 (45%)	<0.005
BMI	22.3 ± 2.9	23.4 ± 3.0	NS
アルコール多量摂取	0	36 (8%) 92 (20%)	NS
喫煙	7 (54%)		<0.005
ALT (IU/L)	44.7 ± 30.0	23.8 ± 20.4	<0.005
γ-GTP (IU/L)	31.7 ± 16.2	23.2 ± 25.2	NS
HBe抗原陽性	3 (23%)	14 (3%)	<0.005
HBcr抗原 (kU/mL)	39,276 ± 121,639	6,486 ± 47,987	<0.005
HBcr抗原陽性	7 (54%)	99 (21%)	<0.005
HBV DNA (log copies/mL)	6.1	4.1	<0.005
HBV DNA ≥ 5 log copies	6 (46%)	39 (8%)	<0.005
Genotype B	4 (31%)	264 (57%)	NS
Genotype C	9 (69%)	202 (43%)	NS
C1653T	6 (46%)	116/421 (28%)	NS
T1753V	6 (46%)	78/421 (19%)	<0.005
A1762T/G1764A	11 (87%)	142/421 (34%)	<0.005
G1896A	11 (87%)	348/421 (83%)	NS

独感染例, 2例がHBV・HCV共感染例, 17例が非B非C例であった. HBV単独感染者における肝臓(HCC)例, 非肝臓(Non-HCC)

例の背景を比較すると, 男性, 喫煙者の割合, ALT値, HBe抗原陽性, HBcr抗原陽性, HBV DNA値がHCC群において有意に高く,

表2 HBV, HCV感染状況による肝発癌ハザード比(文献8より一部改変)

感染状態	対象	人年	HCC例	ハザード比(95% CI)
HBs抗原(-)/HCV抗体(-)	5,744	53,504	16	1.0 (reference)
HBs抗原(+)/HCV抗体(-)	335	2,981	15	17.1 (8.4~34.8)
HBs抗原(-)/HCV抗体(+)	360	3,731	12	10.4 (4.9~22.1)
HBs抗原(+)/HCV抗体(+)	14	133	3	115.0 (32.5~407.3)

表3 HBs抗原陰性化例の臨床背景の比較(文献9より一部改変)

	HBs抗原陰性化あり (n=20)	HBs抗原陰性化なし (n=81)	P
年齢(歳)	56	50	0.038
男性	8 (40%)	36 (44%)	> 0.2
肝硬変合併	4 (20%)	15 (18%)	1.0
ALT (IU/L)	26	35	0.057
HBV genotype (A:B:C:不明)	0: 2: 18: 0	3: 7: 69: 2	> 0.2
HBe抗原	3 (15%)	35 (43%)	0.02
HBs抗原 (Log IU/mL)	1.7	3.3	< 0.001
HBcr抗原 (Log U/mL)	3.0	4.7	< 0.001
HBV DNA (log copies/mL)	3.0	5.7	< 0.001

core promotor二重変異(A1762T/G1764A)の頻度も高かった(表1).

さらにCox比例ハザードモデルにて肝発癌リスク因子を解析すると, core promotor二重変異のみが独立したHCCリスク因子であった(ハザード比7.05, 95% CI 1.03-48.12, $P=0.046$). 患者コホートをを用いたCore promotor二重変異とHCC発生リスクに関してはこれまでいくつか報告されてきたが^{6,7)}, この研究は本邦における住民ベースのHBV感染者のHCC発生リスクを調べた初めての大規模前向きコホート研究である. 住民コホートという性格上, ほとんどの対象者はHBV健常キャリアと推定されるが, サンプル数をさらに増やした前向き研究が期待される.

韓国ではHBV高浸淫地域におけるHBV/HCV共感染例のHCCリスクについて報告がある⁸⁾. 6,694人を平均9.4年追跡し(63,170人

年), 50例の発癌を認めている. HBV単独感染によるHCCハザード比は17.1 (95% CI: 7.3-24.4), HCV単独感染によるHCCハザード比は10.4 (95% CI: 4.9-22.1)であり, HBV/HCV共感染によるHCCハザード比は115.0 (95% CI: 32.5-407.3)であった(表2).

一方, 住民コホートではないものの, 無治療のHBVキャリアの自然史についてHBs抗原量の長期経過の観点から報告がある⁹⁾. Matsumotoらによると, 1999年~2009年まで101例のHBVキャリアのHBs抗原量を追跡したところ, 20例でHBs抗原が陰性化し(2.1%), その陰性化は高齢と低ウイルス複製状態と関連していた(表3).

さらに韓国のAhnらは, 病院コホートではあるが無治療のHBVキャリア432名のHBs抗原自然消失に関し, 組織学的比較も加えて報告している¹⁰⁾. 19.6カ月の観察の間, 9.5%にあたる49名でHBs抗原が自然消失した.

表4 Cox比例ハザードモデルによる肝硬変進展に影響する因子の解析(文献11より一部改変)

因子	30歳未満			30歳以上		
	リスク比	95% CI	P	リスク比	95% CI	P
男性/女性	0	—	0.972	0	0.000~3.993	0.969
HBe抗原						
陽性	1	0.028~6.469	0.538	1	0.185~3.250	0.727
陰性	2.36			1.29		
線維化						
Mild - Moderate	1	0.080~1.030	0.053	1	0.296~3.238	0.972
Severe	10.87			1.02		
Genotype						
B	1	0.019~2.883	0.258	1	0.033~0.916	0.039
C	4.24			5.75		

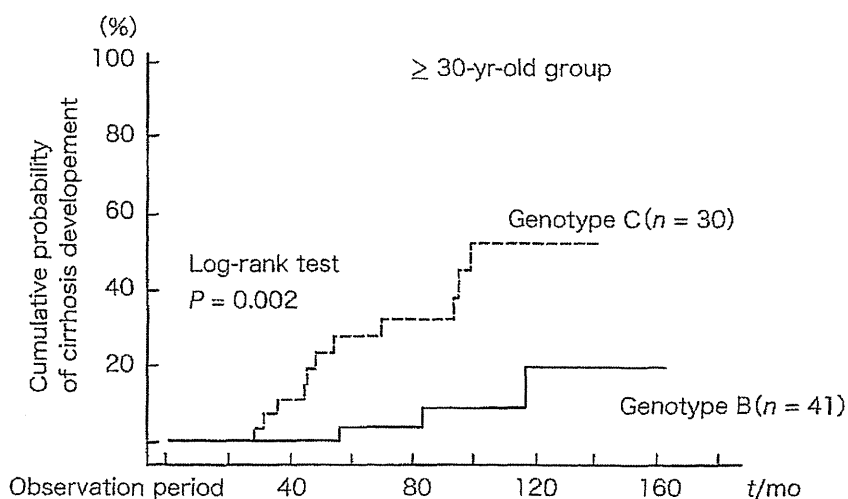


図2 30歳以上のHBV感染者における, genotypeによる肝硬変進展リスク(文献11より引用)

このうち15例においてHBs抗原消失前後で肝生検を施行したところ, 血中のHBs抗原が陰性化しているにも関わらず, 15例全例で肝組織中にHBV DNAが検出された。また肝組織中の壊死炎症反応は有意に改善されていたが($P < 0.0001$), 肝線維化は有意なレベルまで改善されておらず($P = 0.072$), 2例ではむしろ悪化していた。また観察期間中, 肝発癌はHBs抗原消失49例中5例(10.2%)において認められ, 肝硬変合併, 周産期の感染, 30年以上の長期間の感染歴, がリスク因子であったとされている。このことはHBs抗原消失後も肝線維化進展や肝発癌のリスクが

あることを示すものであり, HBs抗原消失後のマネージメントに関する診療ガイドライン策定の必要性をうかがわせるものである。

HBV genotypeが肝硬変の進展にどのように影響するのか, genotype B感染が多い沖縄県から genotype Cとの比較検討が報告されている¹¹⁾。それによると, B型慢性肝炎121例において, 30歳未満では有意なLCへの進展予測因子は認めなかったが, 30歳以上になると genotype Cであることが有意な予測因子となっていた(表4, 図2)。特にHBe抗原陽性例では予後不良であることから, 抗ウイルス治療の適応を考えるうえで示唆する所

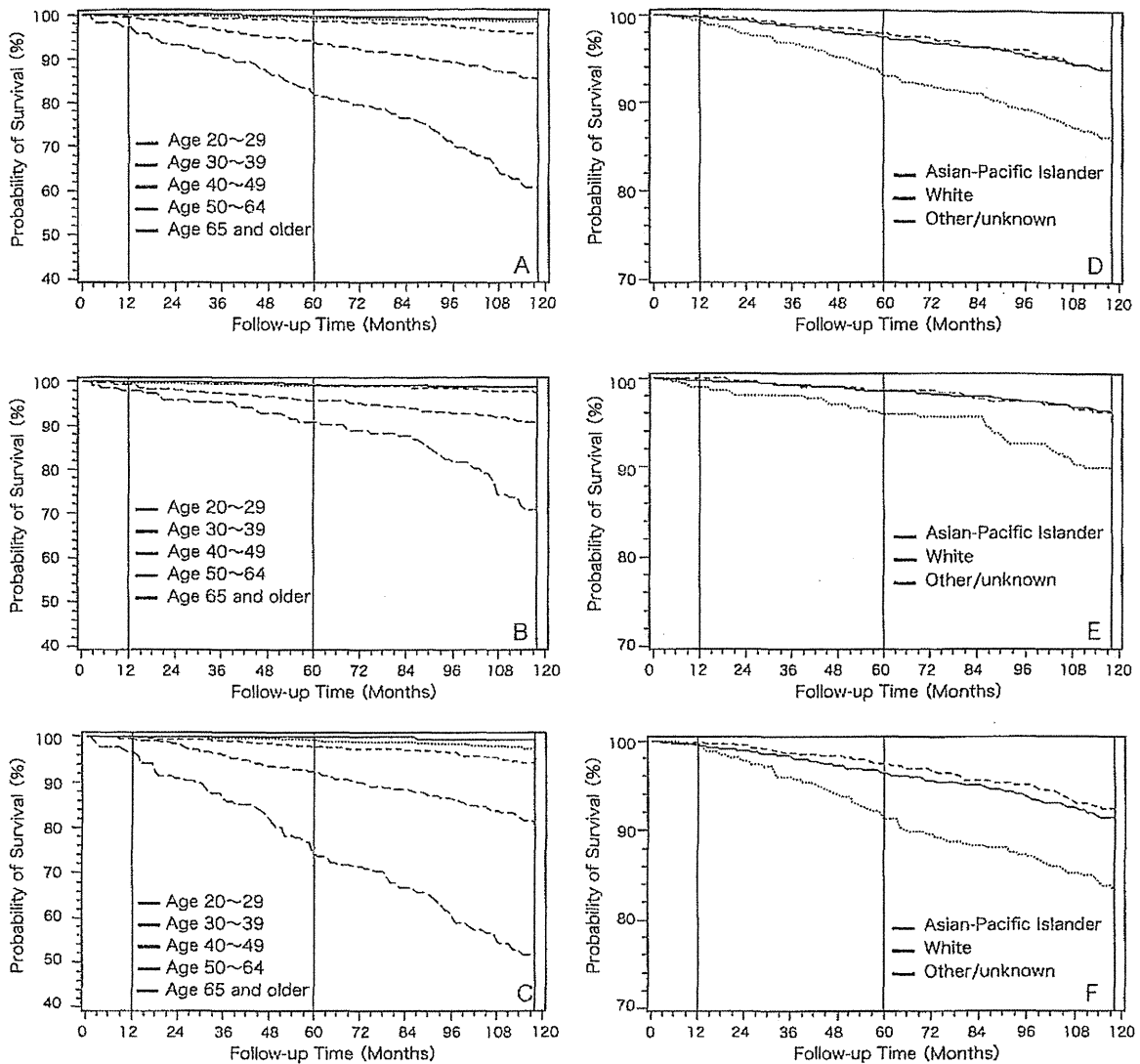


図3 性別・年齢別HBV関連生存率

死亡率は年齢に伴い増加し、特に女性に比し男性で死亡率が高い。またHBV関連死亡率はアジア太平洋家系のほうが白人よりも高い。(文献12より引用)

見と思われる。

3 米国におけるB型肝炎自然予後

欧米の論文では無治療の住民を対象としたB型肝炎予後に関する報告は少ないが、米国では、HBs抗原陽性であった一過性感染例を除く未治療の6,689人を対象にした10年間の追跡で、HBV関連死を含む総死因調査を行っている¹²⁾。人種の内訳は、68.3%はアジア太平洋出身、11.8%は白人であった。10年間の総死亡率は男性(8.9%)が女性(4.1%)より高

く、またHBV関連死も女性(1.2%)に比し男性(4.8%)で高率であった(図3)。死亡率は年齢とともに高くなり、40歳以上の総死亡のうち40%はHBV関連死であった。多変量解析ではHBV関連死に最も影響する因子は男女ともに年齢であった(表5)。米国においてもB型肝炎はHBV感染者の死因の40%を占めていることが明らかとなり、年齢とともにそのリスクが高くなることから、HBVキャリアの囲い込みを今後どうしていくのか注目される。

表5 HBV関連死亡因子(多変量解析)(文献12より一部改変)

予測因子	全体(6,657)			女性(3,237)			男性(3,420)		
	死亡数	HR (95% CI)	P	死亡数	HR (95% CI)	P	死亡数	HR (95% CI)	P
女性	37	0.3 (0.2~0.4)	<0.01	N/A			N/A		
初診年齢									
0~39歳	11	referent		2	referent		9	referent	
40~64歳	129	8.5 (4.6~15.8)	<0.01	24	11.4 (2.7~48.5)	<0.01	105	7.8 (3.9-15.5)	<0.01
65歳以上	48	36.7 (18.7~71.9)	<0.01	11	50 (10.7~233.7)	<0.01	37	34.4 (16.3-72.6)	<0.01
人種									
アジア太平洋	127	0.9 (0.6~1.4)	0.72	30	3.2 (0.8~13.5)	0.12	97	0.8 (0.5-1.2)	0.23
白人	36	referent		2	referent		34	referent	
その他	25	0.8 (0.5~1.3)	0.31	5	2.2 (0.4~11.1)	0.36	20	0.7 (0.4-1.2)	0.17

4 Community-based cohortからみたB型肝炎の長期予後の検討 (上五島コホート)

本邦には、地域住民を対象としたB型肝炎コホート研究が現在も行われている地域がある。長崎県上五島は、長崎県の西方にある五島列島の北部に位置し、離島という閉鎖的な環境により住民の異動が比較的少なく最終転帰が把握しやすいこと、また人口がおよそ2.5万人と、コホート研究として比較的取り扱いやすい地域である。

上五島病院の白濱, 国立長崎医療センター・臨床研究センターの山崎, 八橋らは、1978年より上五島地区全住民を対象にHBs抗原スクリーニングを行っており、これまでにB型肝炎の長期予後に関するさまざまな検討を行っている。これらは本稿のテーマにふさわしい疫学研究と考えられるので、著者の許可をいただき、ここでその概要について、①肝硬変・肝癌罹患、②HBe抗体と肝機能からみた臨床的治癒率、③HBs抗原自然消失、そして④同地区一般住民と比較したHBV感染住民の生命予後、に関する研究成果を紹介させていただく(personal communication)¹³⁾。

1. 上五島の感染予防対策

上五島地区の平成10年~14年の肝癌標準化死亡比は男215, 女149と極めて高く、HBs抗原は1978年から、HCV抗体は1990年からスクリーニングが開始された。

B型肝炎に対してはHBVキャリアの撲滅をめざし、1978年スクリーニングと同時に母児間感染ブロックも開始した。当初はHBVグロブリン、1980年からはHBVワクチンを導入した。その結果1980年代出生者のHBs抗原陽性率は0.5%と激減し、1990年以降の出生者からHBs抗原陽性者はいまだ確

認されず、ほぼ撲滅状態となった。

2. 肝硬変・肝癌罹患ハザード比

2008年までに延べ34,517名が受診し、HBs抗原陽性1,474名(4.3% ; genotype C = 92%)のうち、解析可能であったHBs抗原陽性持続感染者1,045例を最終対象としている。平均観察期間は18.5年(最長で33.8年)、男性605例(58%)、年齢中央値44歳(0.6~95歳)であった。

一般住民をコントロールとしたB型関連肝疾患ハザード比をみると、HBe抗原陽性肝硬変(LC) : 0.138 (95% CI 0.089-0.215), HBe抗原陰性LC : 0.249 (95% CI 0.152-0.408), HBe抗原陽性慢性肝炎(CH) : 0.378 (95% CI 0.214-0.668), HBe抗原陽性ASC : 0.372 (95% CI 0.147-0.943), HBe抗原陰性CH : 0.393 (95% CI 0.213-0.726), HBe抗原陰性ASC : 0.827 (95% CI 0.669-1.021)であった。

3. HBe抗体と肝機能からみた臨床的治癒

HBe抗体陽転・肝機能正常に至る臨床的治癒率を検討したところ、観察開始時20歳未満群では年率4%であったが、35歳までに累積100%の治癒となった。またこれら臨床的治癒例におけるHBs抗原自然消失率は年率1%であった。一方、35歳時HBe抗原陽性群では臨床的治癒率は年率1%であり、また治癒に至ってもその半数が肝硬変に進展していた。このことから20歳未満HBe抗原陽性キャリアへの治療介入は不要であるものの、35歳以上でHBe抗原陽性例では積極的な治療介入の必要性が示唆される結果となった。

4. HBs抗原自然消失と肝発癌

一方、初診時HBe抗原陰性ASC群において、観察開始から20年ほど経過すると136例(22.6%)にHBs抗原消失を認め、この群におけるHBs抗原累積消失率は20年で27.2%であった。HBs抗原が自然消失した全175例に

おける平均10年間の肝発癌は3例に認め、うち2例はHCV重感染例であり、HBV単独感染例は1例であった。

5. 一般住民と比較したHBVキャリアの生命予後

興味深いことに、HBe抗原陰性ASCの生存率は一般住民に比し観察開始から20年までは低いものの、それ以降はキャリアと一般住民の間で差がなかった。また肝疾患関連死の割合は一般住民群1.1%に対し、HBV持続感染群では33.8%と有意に高かった。

さらに、HBs抗原消失175例の累積生存率を算出し一般住民に対するハザード比を求めると、注目すべきことに死亡リスク比は同等であった。このことから、地域住民コホートからみると、B型肝炎は非活動期の無症候性キャリアに至っても一般住民より生命予後は不良だが、HBs抗原が消失した場合、一般住民の生命予後と同等にまで改善することがわかった。

このコホートは本邦におけるB型肝炎自然史を知り得る極めて貴重なものであり、B型肝炎の目指すべき治療目標はHBs抗原消失であることを示唆するものである。さらなる追跡結果の集積が日本の医療施策に反映されることを期待している。

5

C型肝炎多発地域におけるHBV, HCV感染状況

一方、本邦には地域住民のHCV抗体陽性率が10%を超える、いわゆるHCV感染高浸淫地域がいくつか知られている。このような地域でHBVとHCV感染状況を比較することは、双方の感染経路の違いを考えるうえで重要なことである。

新澤らは¹⁴⁾1991年~1993年の3年間に就学年齢以上の住民7,292人に対し行ったHCV

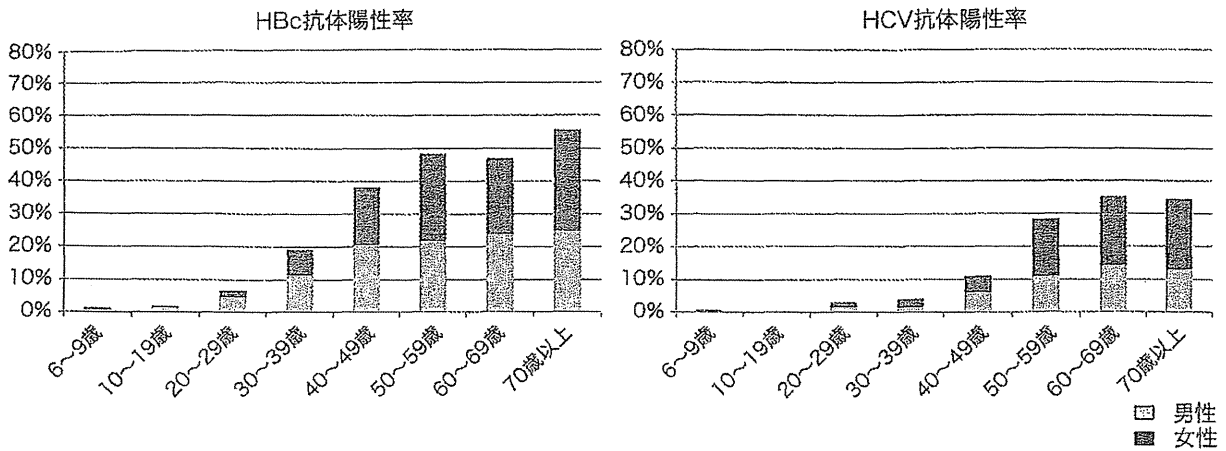


図4 性別・年齢階層別HBc抗体・HCV抗体陽性率(文献14より改変)

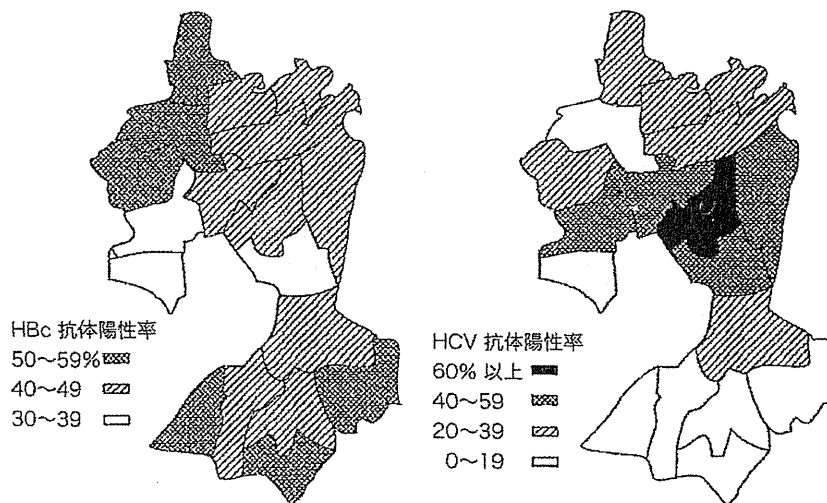


図5 地域別HBc抗体, HCV抗体陽性率(文献14より引用)

高浸淫地域における住民検診で、検診に応じた4,425人(受診率60.7%)を対象に、HBV, HCV感染状況を比較検討した。なお住民検診の性格上、現在あるいは過去のHBV感染を問わず、HBc抗体陽性者をHBV感染者としている。

性別・年齢階層別にHBs抗原, HBc抗体陽性率をみると、ともに男性で陽性率が高かったが、HCV抗体陽性率は女性で高かった。HBs抗原陽性率は6~9歳で0.4%, 10~19歳で0.6%, 20~29歳で0.5%, 30~39歳で2.7%, 40~49歳で2.9%, 50~59歳

で2.9%, 60~69歳で2.8%, 70歳以上で2.5%であった。すなわち20歳代までの若年では0.5%前後であったが、30歳代以上では2.5%以上の陽性率であった。またHBc抗体陽性率は20歳代まで緩やかに上昇し、30歳代からは急峻な上昇を示す一方、HCV抗体陽性率は30歳代まで段階的にわずかに上昇し、40歳代以降、急峻な上昇を示した(図4)。以上より、HBV感染者のピークはHCV感染者よりも10歳若年であり、男性に感染者が多いことが明らかとなった。

本地域集落別のHCV感染率(HCV抗体陽

性)とHBV感染率(HBc抗体陽性)を調べると(図5), HCV抗体陽性率は同心円状に陽性率の推移を認め, 明らかな集積性がみられたのに対し, HBc抗体陽性率はそのような集積性はみられなかった. この地域はHCV抗体陽性率が18.7%, HBc抗体陽性率は33.4%であるが, 地域内陽性率の比較からは, HBVとHCV感染が共通の感染経路によるものではない可能性が示唆された.

6 おわりに

B型肝炎自然予後に関し, 国内外の住民コホートから得られた知見の一部を紹介した. 無治療キャリアからの肝発癌, HBs抗原自然消失, そして生命予後に与える影響など, その機序を含め今後明らかにしなければならない点が多いが, そのためにも自然史を理解するためのさらなるエビデンスの集積が欠かせないと思われる. ここで紹介した自然予後に関わる知見はいずれもウイルス側あるいは疾患因子であるが, 今後住民コホートを用いたHBVキャリアのGWASあるいは次世代シーケンサーによる宿主因子解析が進められれば, 患者コホートデータとあわせ, B型肝炎自然史に影響するkey molecule (s)がみいだされることが大いに期待される.

文 献

- 1) Beasley RP, Hwang LY, Lin CC et al : Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2 : 1129-1133, 1981
- 2) Tanaka J, Kumagai J, Katayama K et al : Sex- and Age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirology* 47 : 32-40, 2004
- 3) Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M et al : A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J Gastroenterol* 46 : 117-124, 2011
- 4) Tsugane S, Sobue T : Baseline survey of JPHC study-design and participation rate. *Japan Public Health Center-based Prospective Study on Cancer and Cardiovascular Diseases. J Epidemiol* 2001; 11: S24-29.
- 5) Inoue M, Yoshimi I, Sobue T et al : Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *J Natl Cancer Inst* 97 : 293-300, 2005
- 6) Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ et al : HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 103 : 2254-2262, 2008
- 7) Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY et al : Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 50 : 80-88, 2009
- 8) Oh JK, Shin HR, Lim MK et al : Multiplicative synergistic risk of hepatocellular carcinoma development among hepatitis B and C co-infected subjects in HBV endemic area: a community-based cohort study. *BMC Cancer* 12 : 452, 2012
- 9) Matsumoto A, Tanaka E, Morita S et al : Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. *J Gastroenterol* 47 : 1006-1013, 2012
- 10) Ahn SH, Park YN, Park JY et al : Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *J Hepatol* 42 : 188-194, 2005
- 11) Maeshiro T, Arakaki S, Watanabe T et al : Different natural courses of chronic hepatitis B with genotypes B and C after the fourth decade of life. *World J Gastroenterol* 13 : 4560-4565, 2007
- 12) Szpakowski JL, Tucker LY : Causes of death in patients with hepatitis B: a natural history cohort study in the United States. *Hepatology* 2012; in press
- 13) 山崎一美 : 全C型肝炎症例の最終転帰とインターフェロン治療介入のインパクト.HCV感染のnatural courseを探る : わが国におけるコホート研究 河田純男監修, 佐田通夫, 新澤陽英, 斎藤貴史編集 pp33-38, 2010
- 14) 新澤陽英, 石橋正道, 他 : C型肝炎多発地域におけるHBV, HCV感染状況の比較検討. ウイルス性肝炎, 日本臨床増刊号 53 : 337-341, 1995