

朝比奈 当時、RIG-I分子が同定されて、これがRNAウイルスの細胞内センサーとして働き、RNAウイルスに対する自然免疫排除機構の入り口の分子として報告されました。そして、C型肝炎ウイルス感染もこのRIG-Iにより認識され、C型肝炎ウイルスの排除には、RIG-Iを中心とした自然免疫機構がかかわっていることが次第にわかって来ました。さらに、C型肝炎ウイルスも宿主自然免疫に対してRIG-I/IPS-1系を標的として、巧みに逃避していることがわかり、この自然免疫系は宿主にとっても、そしてC型肝炎ウイルスにとっても、鍵となる非常に重要なシステムだと思うに至りました。そして、この宿主自然免疫の状態が治療効果と何らかの関連があるのではないかと考え、研究を進めて参りました。

すなわち、インターフェロンの治療効果には個人差がありますが、なぜ個人差があるのが当時不明でした。その理由が自然免疫を調べることで解明できるのではないかと考えたのです。

実は、最初はRIG-Iの発現が高い人ほどウイルス排除が効率的に行われていると思って研究を始めましたが、結果はまったく逆で、自然免疫系の分子が高く発現している症例の方がウイルス排除が起こりにくいという結果になってしまいました。当初、その結果をよく理解できなかったのですが、治療としてインターフェロンを投与した場合に、自然免疫系の遺伝子の発現がどうなっているかを経時的にみてみますと、最初から自然免疫系遺伝子の発現が高い症例は、外因性のインターフェロンに対して反応が悪いことがわかり、それが治療効果を不良にしていることと関係があると、今は考えております。

齋藤 効く、効かないはインターフェロン治療との関連と理解してよろしいですか。

朝比奈 はい。インターフェロンに対する反応性と思っています。



最近の問題点と今後の見通し

齋藤 次に、読者がもっとも知りたいと思われるウイルス性肝炎の最近の問題点と今後の見通しについて、B型肝炎のワクチンの問題を含めてお話しいただけますか。

1 B型肝炎—genotype

正木 最近のB型肝炎は欧米型のgenotype Aeがかなり入ってきていることが一つの問題点です。われわれは国立病院機構の肝疾患ネットワークに所属していますが、経時的にB型肝炎を監視していると、2000年以降、genotype Aeの比率が上昇し、一時は50%を超えました。このところ40%ぐらいに減ってきてはいますが、genotype Aeがかなり海外から日本に入ってきています。

先ほど申しましたように、慢性化率がgenotype B, Cに比べて高い。これについては諸説ありましたが、genotype Aeは急性肝炎を起こしますが、反応が少し弱いがために慢性化することがあって、自然排除されるまでの時間がかかる。したがって、慢性化の判断を半年でするより、12カ月ぐらいかけないと慢性化うんぬんはいえないことが最近の知見でわかってきました。そのような基準で考えると、7~8%が慢性化するのではないかと報告されています。

STIを介して海外からわが国へ入ってくるgenotype Aeには、ワクチンという強力な対抗策があるわけですが、残念ながら日本ではそれが採用されていないことが大きな問題です。

これについては、米国をはじめ先進国では1991~1992年ぐらいからuniversal vaccinationが提唱され、導入されてきました。それによってB型肝炎が激減したという疫学的なデータが出ています。

『JAMA』(9月4日号)には、台湾での30年にわたるuniversal vaccinationの効果として、特に若年層の肝細胞癌(HCC)の発症が9割方抑えられている、という論文が出ていました。そういう長期的な効果もあります。

日本では乳幼児期の水平感染が比較的少ないですから、すべてそれにならう必要はないかもしれませんが、先進国の中で取り残されている状況は何とかしなければいけないと思います。

これについては過去にも厚労科研究班の科研費で費用対効果の検討がなされました。現在、年間100万人の新生児に3回のワクチン接種をすると136億円かかりますが、生産性損失や各病態間の移行確率を見直して、その辺の評価をもう一度、厚労科研究班でやり直しています。universal vaccinationの導入は日本肝臓学会でも常々国へお願いしているところですが、これは学会としてもさらに進めるべき課題です。

2 B型肝炎—再活性化

正木 二つ目の問題点は、B型肝炎は先ほども述べたようにcccDNAがからみませんが、s抗体、HBc抗体が陽性になってもウイルスが肝内に残存している可能性がわ

かってきました。「再活性化(reactivation)」ともいわれますが、日本消化器病学会、日本肝臓学会以外の医療者が診療されている患者さんにもそれに関係する病態があることがわかってきました。

特に脳死肝移植、あるいは生体肝移植後、そのようなものがあらわになって劇症化します。京都大学では生体肝移植例での再活性化を1998年に報告されています。

その他、血液疾患での化学療法、あるいは造血幹細胞移植、リウマチ疾患などに対する分子標的薬で、頻度は異なりますが、再活性化が起こってきています。

齋藤 先生ご自身は経験がございますか。

正木 固形癌ですが、大腸癌の後に劇症化した例がありました。

齋藤 朝比奈先生はいかがですか。

朝比奈 他の科の症例ですが、やはり固形癌の化学療法後に再活性化した症例を経験しています。

正木 血液疾患では昔からそのような症例がありました。昔は報告して良かったのですが、今は訴えられる時代です。しかし、そのような病態が測定方法の進歩によってわかってきていますから、日本肝臓学会や日本消化器病学会は他科の先生方を啓発する必要があります。

齋藤 免疫抑制を行う時はどのような検査をすべきでしょうか。

正木 2009年に坪内博仁先生(鹿児島大学)がガイドラインを出されていますので、これは周知されているところだと思います。やはり治療を考える前に、s抗原があるのかなのか。ないとしたら、s抗体、あるいはHBc抗体はどうかを最初に調べる。その次のステップとして、リアルタイムPCR法を用いて、HBV-DNAの量を必要に応じて調べないといけません。

s抗原が存在する例について治療する場合は、最初から核酸アナログを投与しないとけないと明記されています。

s抗体、あるいはHBc抗体だけが陽性の症例については、HBV-DNAを測定して、検出された場合は核酸アナログを使っていく。HBV-DNAが検出されなくても頻回に一「1~3カ月ごとに」と書いてあったかと思いますが、測定することでHBV-DNAが陽性化するようであれば、速やかに使うというガイドラインが打ち出されています。

先ほど申したリウマチ疾患などでの再活性化は、ガイドラインにのっとってエンテカビルを早期投与することで抑えられるというデータが厚労科研究班から出ていますので、やはり適切なガイドラインだろうと思います。これを逸脱して訴えられたケースが最近ありましたので、さらに周知する必要があります。

3 C型肝炎—DDAs(direct-acting antiviral agents)

齋藤 朝比奈先生、C型肝炎はDAAsによる治療でそろそろなくなるのではないかと聞いていますが、その辺のお話をお願いします。

朝比奈 C型肝炎の最近の話題はやはりDAAs製剤の開発の進歩による、治療成績の飛躍的な向上だと思います。今、DAAs製剤で使えるのは第一世代のプロテアーゼ阻害薬といわれるテラプレビルですが、これに引き続いてたくさんの薬剤が開発されてきています。

第一世代プロテアーゼ阻害薬に引き続いて、第二世代のプロテアーゼ阻害薬であるシメプレビルが本年中に保険適用になると思われます。シメプレビルは、第一世代のテラプレビルに比べて副作用が少なく、安全性のプロファイルが非常に良好なので、おそらく薬剤アドヒアランスがきちんと確保できるようになるため、さらなる治療成績の向上と、テラプレビルが使えなかった人にまで治療ができるようになるのではないかと期待されています。

また、プロテアーゼ阻害薬以外にも他のクラスの DAAs 製剤がたくさん開発されてきています。たとえば、ウイルスが複製する時に必要な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを阻害する NS5B ポリメラーゼ阻害薬や、NS5A の複合体を阻害する NS5A 阻害薬も臨床応用が近いと思います。

さらに、第二世代プロテアーゼ阻害薬と NS5A 阻害薬を組み合わせる経口 2 剤のみによる治療法の開発も進んでおり、インターフェロンを使わないため非常に画期的な治療法です。このインターフェロンを使わない治療の開発は現在日本がもっとも先行しています。

わが国の第 II 相試験における、プロテアーゼ阻害薬と NS5A 阻害薬による経口 2 剤併用療法の治療成績は、以前インターフェロンがまったく効かなかった患者さんに対しても 91% の著効率が得られたと報告されていますので、非常に期待できます。

この他にも、NS5B 阻害薬と NS5A 阻害薬を組み合わせたインターフェロンを用いない治療の開発も進んでいるようで、こちらも大変期待されています。

DAAs 製剤の組み合わせによる治療は、これまでインターフェロンが使えなかった人や、あるいはインターフェロンが効かない、たとえば IL28B SNP がマイナータイプの人にも治療効果が期待できますので、C 型肝炎ウイルスは将来かなりのパーセンテージで駆除できるようになると思います。



ただ、C型肝炎がこの世から完全になくなるかという点、私は必ずしも話はそんなに簡単ではないと思います。なぜなら、DAAs製剤には耐性ウイルスの問題があります。耐性変異による多剤耐性ウイルスの出現などによって治療がうまくいかない症例とか、薬剤相互作用(drug drug interaction ; DDI)の問題で治療がうまくいかない症例も必ず出てくると危惧されます。ですから、DAAs製剤の開発のみでC型肝炎が完全に終息するというわけにはいかないと思います。

4 C型肝炎—ワクチン

齋藤 ワクチンはいかがですか。

朝比奈 感染症の歴史をみると、抗ウイルス薬だけでウイルスが完全に撲滅されたウイルス感染症はありません。細菌感染症もそうですし、結核もそうだと思います。ただ、ワクチンを使ったウイルス感染症対策は、たとえば天然痘がそうですが、完全に制圧できています。したがって、C型肝炎においてもワクチンの開発は非常に望まれるところです。

先ほど申し上げましたように、C型肝炎ウイルスは中和抗体のエピトープの部分に高率に変異を起こしますので、中和抗体を誘導するワクチンの開発はそう簡単ではありません。ただわが国でも、たとえば国立感染症研究所を中心とした、高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発などが進んでいますので、近い将来、おそらくC型肝炎に対しても効果的なワクチンができてくると私は思っています。

齋藤 B型肝炎についても慢性肝炎にワクチンを使ってウイルスが減ったというデータがあるようですが、慢性肝炎の患者さんに対してワクチンは効果があると考えられますか。

正木 HBs エピトープに対するワクチンでの樹状細胞機能の活性化は、今まで日本で試みられた臨床的なトライアルでは、最終的にはあまり奏功していません。

最近では、HBsのエピトープとHBcのエピトープをミックスしたキメラワクチンを使うことによって、樹状細胞機能の活性化が非常に得られたとの報告があります。東南アジアでは核酸アナログが比較的安価に出回っていますが、耐性ウイルス出現のリスクのある核酸アナログや大変高価なインターフェロンはなかなか使いにくい。ネーザル(鼻孔用)スプレーで投与できるキメラワクチンのフェーズ3がバングラデシュなどでやられています。

キメラワクチンを繰り返すことでHBV-DNAを排除できるのかわかりませんが、ウイルス量を抑える道はかなり開けていて、海外では大いに期待されています。

朝比奈 C型肝炎でも、慢性肝炎に対してワクチンを併用して治療効果を上げるといった治療法も、一つの方法として出てくるかもしれませんね。

5 HIV重複感染

齋藤 B型肝炎とHIVとの重複感染でかなり病態が進行して重症化することがありますが、HIVとの重複感染で気をつけなければいけないことは何でしょうか。

正木 私どもの病院にはHIVの専門家がいる、かなりのHIV患者さんを見ています。やはりSTIであるHIVと同時にHBVも一緒に入っている患者さんが5~8%ぐら

いおられると聞いています。

われわれが持っている核酸アナログは、HIVを抑えると同時にHBVも抑える薬ですから、うまく使わないと互いに耐性をつくってしまうことがあります。

HIV・HBV重複感染のガイドラインはすでに出ています。HIVについては現在、承認申請中のテノホビルという薬がHBVもHIVも抑えますから、テノホビルとエムトリシタビンの併用がかなり有効です。HIVを治療する必要がないHBVの場合には、あえて核酸アナログ製剤を使ってHIVの耐性をつくらずに、インターフェロンを使います。

先生方も重複感染の患者さんの肝障害をごらんになる機会があると思いますが、HAART (highly active anti-retroviral therapy) 療法のメニューに、ダイレクトに肝障害を起こす薬があります。あるいはHIVの治療をすることでCD4が上がって、免疫が賦活化されることでHBVに対する、いわゆる免疫の再構築現象をみることがあります。

それを鑑別するのは非常に難しいというか、ためらうことがあります。やはり、われわれとHIVの専門家がディスカッションしながら、はっきりさせていく点が残っている病態だと思います。

HIVで免疫抑制状態にあると、HCVもかなり早く線維化がプログレッションするのは既知の事実です。特に血友病でHIV・HCV重複感染の患者さんは30歳ぐらいで肝硬変になって、肝移植に回る症例もあります。HCVは特に免疫状態と線維化の進展が密接につながっています。

朝比奈 HCVとHIVとの共感染例は非常に治しにくいです。今後、DAAsが出てきて、それらの患者さんをどの程度治せるかが一つのポイントになってくると思います。抗HIV薬との薬剤相互作用がポイントですね。

正木 DAAsの量というか、HAART療法の薬とのDDIは特に難しい領域ですから、専門家同士のディスカッションが必要です。

齋藤 C型肝炎は、肝移植後の免疫抑制状態での再発はかなり厳しいものがありますね。

正木 そうですね。胆汁うっ滞型肝炎になると再移植が必要になることもあります。最近、京都大学では移植後に3剤を積極的に使っているようですが、そこに新規のDAAsが入ってくると思います。

朝比奈 移植後の抗ウイルス療法ということでは、DDI、すなわち免疫抑制薬とDAAsとの相性が今後、重要になってきます。

齋藤 ウイルスの制御は免疫なしには語れません。これからウイルスにダイレクトに効く薬が出てくれば、B型肝炎でもcccDNAを排除できるかもしれません。C型肝炎の場合はおそらくワクチンが一つのキーになると思います。なくなりそうだといいつつも、なかなかなくならないと考えてよろしいでしょうか。

6 キャリアの発掘

正木 われわれがみている慢性肝炎の患者さんには適切な治療を実施できていますが、実はキャリアはまだみつかっていないというか、検診を受けない方が多いという

現実があります。日本ではB型肝炎のキャリアが110～140万人、C型肝炎は190～230万人、合計350万人との推定があり、その半分はまだ自身の感染を知らないでいます。

広島大学の田中純子先生の推計では、B型肝炎は90万人、C型肝炎は80万人で、合計170万人のキャリアが自身の感染を知らないでいるとのこと。そのような方を発掘して、適切な治療に向けていかなければいけません。

ホスト側の因子、特にB型肝炎のホスト側の因子としてHLA-DPのA1、B1の組み合わせによってはプロテクティブ、あるいはリスクとなるハプロタイプがわかってきましたので、それを調べることで、全員治療をする必要があるのか、あるいはその一部で良いのかある程度の見極めができる時代が来るかもしれません。

そのような知見をどんどん投入すれば、十把ひとからげにやろうとするとクリアできない問題も、何とかするという期待が持てると思います。

朝比奈 スクリーニング検査を受けないから自分が感染状態であるということがわかっていない、あるいは陽性とわかって抗ウイルス療法が必要なのに、適切な医療を受けていない方がたくさんいらっしゃいます。そのような方をきちんと診断し、治療方針を決めて、適切な治療介入をしていくことが大事です。

C型肝炎についていえば、治療法が劇的に変わり治療成績が飛躍的に向上していますし、副作用も少なくなっています。以前治療を受けたが効かなかった、あるいは専門医を受診して治療適用がないといわれた人も、新たに治療適用になったり、改めて治療したりすると、今まで治療を受けていなかった人より効くこともあります。患者さんの拾い上げとともに、感染がすでにわかっている人も今一度専門医に行って、治療方針の検討がなされるべきだと思います。

齋藤 今後、医療機関にかかっていない方の発掘とともに、さらに新たな治療が望まれているのがB型肝炎、C型肝炎の現状だと思います。

まだまだ話は尽きませんが、時間がまいりました。本日はお忙しいところ、ありがとうございました。

[2013年9月20日(金)収録]

原因不明の HBV 再活性化を 疑う高齡 2 症例

平嶋 昇[†] 小林慶子 高橋宏尚 喜田裕一* 久野剛史* 横井美咲*
斎藤雅之* 龍華庸光* 都築智之* 島田昌明* 岩瀬弘明*

IRYO Vol. 67 No. 2 (70-78) 2013

要旨

症例 1 は 80 歳，女性。2008 年から肺アスペルギルス症にて呼吸器内科で治療中，初めて肝障害を指摘され紹介となった。2011 年 10 月 2 日 AST193U/l, ALT180U/l, HBs 抗原陽性，HCV 抗体陰性，HBe 抗原 1579 S/CO, HBe 抗体陰性，HBV DNA 7.9 Log コピー/ml, HBc 抗体 10.18 S/CO, IgM-HBc 抗体 0.76 S/CO であった。11 月 8 日よりエンテカビル 0.5mg を投与開始した。Genotype B であった。症例 2 は 74 歳，男性。パーキンソン病にて神経内科で治療中初めて HBs 抗原陽性の肝障害を指摘され紹介となった。2012 年 1 月 2 日 AST134U/l, ALT188U/l, HCV 抗体陰性，HBe 抗原 1.82 S/CO, HBe 抗体陰性，HBV DNA > 9.0 log コピー/ml, HBc 抗体 9.38 S/CO, IgM-HBc 抗体 0.19 S/CO であった。1 月 3 日よりエンテカビル 0.5 mg を投与開始した。Genotype C であった。2 症例ともに，①過去の採血で HBc 抗体・HBs 抗体は測定されていないが HBs 抗原陰性であったこと②肝障害発生時に HBs 抗原・HBV DNA 陽性，HBc 抗体陽性，IgM-HBc 抗体陰性より HBV 再活性化を起こしたと判断した。2 症例ともに免疫療法や化学療法は行っておらず，HIV 抗体は陰性，CD4/8 は正常であった。高齢者で誘因がはっきりしないが HBV 再活性化を起こした疑いが強いと考えられる 2 症例を経験し注意が必要と考えられた。

キーワード HBV 再活性化，原因不明，高齡，エンテカビル

はじめに

最近，免疫療法や化学療法の進歩によってその使用頻度が増え，肝機能正常の非活動性 B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアのみならず HBs 抗原が消失した既感染者から HBV の再増殖が起こり肝炎が惹起される病態は HBV 再活性化 (reactivation) と呼ばれて注目されている。HBV 再活性化の多くは

血液悪性腫瘍にステロイドを含む抗癌剤やリツキシマブを使用した場合¹⁾²⁾や自己免疫疾患にステロイドやリツキシマブを使用する³⁾⁴⁾など宿主免疫能が低下した場合に発症する。今回われわれは，免疫療法や化学療法といった明らかな原因が無いにも関わらず HBV 再活性化を起こした疑いが強いと思われる高齡 2 症例を経験したので報告する。

国立病院機構東名古屋病院 消化器科，*国立病院機構名古屋医療センター 消化器科 †医師
別刷請求先：平嶋 昇 国立病院機構東名古屋病院 消化器内科 〒465-8620 名古屋市名東区梅森坂 5-102
(平成 24 年 8 月 22 日受付，平成 24 年 11 月 7 日受理)

Re'activation of Hepatitis B Virus of Unknown Reason was Suspected in Two Elder Cases
Noboru Hirashima, Yoshiko Kobayashi, Hironao Takahashi, Yuichi Kida*, Tuyoshi Kuno*, Misaki Yoko*, Masayuki Saitoh*, Yosimitsu Rhuge*, Tomoyuki Tsuzuki*, Masaaki Shimada* and Hiroaki Iwase*, National Hospital Organization, Higashi Nagoya hospital, *National Hospital Organization, Nagoya Medical Center
Key Words: HBV reactivation, unknown reason, elder cases, entecavir

表1 症例1 消化器内科初診時検査成績 (2011年10月2X日)
HBV再活性化を起こした疑いが強いと考えられた

Hematology		EB EA-VCA IgM	< 10 (陰性)
WBC	6700/μl	EB EA-VC IgG	80 (陽性)
Neutro	74.2%	HCV Ab	0.1 C.O.I. (陰性)
Lympho	16.4%	HIV Ab	(-)
CD 4/8	1.1	Blood chemistry	
RBC	378 × 10 ⁴ / μl	TP	7.6 g/dl
Hb	10.1 g/dl	Alb	3.1 g/dl
PLT	29.5 / μl	T.Bil	0.94mg/dl
Coagulation		AST	193 U/l
PT	116 %	ALT	180 U/l
Viral markers		ALP	614 U/l
IgM-HA Ab	0.28 S/CO (陰性)	γ GTP	64 U/l
HBsAg	2670 IU/ml (陽性)	BUN	16 mg/dl
HBsAb	0.8 mIU/ml (陰性)	Cr	0.51 mg/dl
HBcAb	10.18 S/CO (陽性)	Amy	106 IU/l
IgM-HBcAb	0.76 S/CO (陰性)	T.chol	187 mg/dl
HBeAg	1579 S/CO (陽性)	BS	108 mg/dl
HBeAb	0% (陰性)	IgG	2227mg/dl
HBV DNA	7.9 logコピー/ml (陽性)	IgA	501mg/dl
HBV Genotype	B	IgM	114mg/dl
HBV pre-core	wild	抗ミトコンドリア抗体	<20倍
HBV core promoter	wild	抗核抗体	<40倍
CM IgM	0.35 (陰性)	AFP	3.7 ng/dl
CM IgG	9.6		

症 例

症例1：80歳，女性

主訴：肝障害

既往歴：2008年から肺アスペルギルス症にて東名古屋病院呼吸器内科で治療中

家族歴：特記なし

生活歴：喫煙・飲酒せず

現病歴：肺アスペルギルス症に対し，抗真菌剤アンホテリシンB・イトリゾールを適宜使用して日常生活に支障はない状態であった。高血圧に対しロサルタン・バルサルタン・アムロジピンを内服していた。2007年9月の採血ではHBs抗原陰性であった。2002年10月以降ASTおよびALTは正

常であったが，2011年9月1X日AST71U/l，ALT66U/lと初めて肝障害を指摘され消化器科紹介となる。

2011年9月1X日現症：身長145cm，体重40kg，血圧112/76mmHg，脈拍60/min・整，意識清明，貧血・黄疸なし，腹水・浮腫なし。

経過：10月2X日消化器科初診時検査成績は，AST 193U/l（正常範囲：13-33U/D，ALT180U/l（6-27U/l）と肝機能は9月1X日より上昇し，HBs抗原は2670IU/ml（<0.05IU/ml）と陽性化していた。HBe抗原1579 S/CO（<1.0 S/CO）陽性，HBe抗体陰性，HBV DNA7.9 logコピー/ml（<2.1logコピー/ml）と高値を示した。HBc抗体は10.18 S/CO（<1.0 S/CO）と強陽性であった

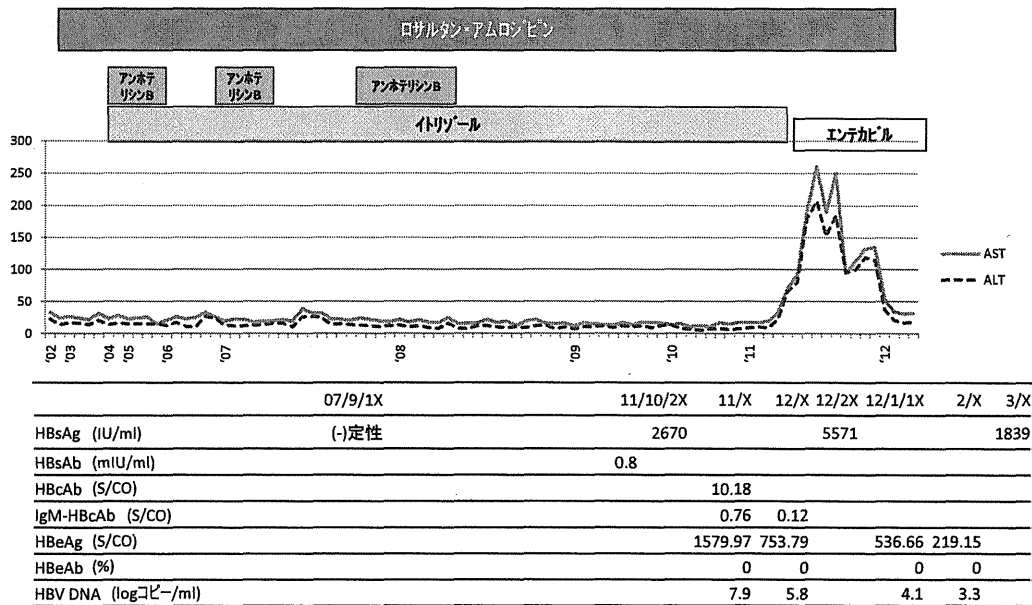


図1 症例1経過

肺アスペルギルス症に対し抗真菌剤アンホテリシンB・イトリゾールを間欠的に使用していた。高血圧に対しロサルタン・バルサルタン・アムロジピンを内服していた。エンテカビル0.5mgを投与開始しHBV DNAは減少しAST, ALTは正常化した。IgM・HBc抗体は2011年11月と12月の2回測定したが陰性であった。

が、IgM-HBc抗体は0.76 S/CO (<1.0 S/CO)と陰性であった。GenotypeはB, HBV pre-coreはwild, HBV core promoterはwildであった。HCV抗体は陰性、サイトメガロウイルスCMIgMおよびEB EA-VCAIgMは陰性であった。HIV抗体は陰性、CD4/8は正常であった(表1)。IgM-HBc抗体を再検したが0.12 S/COと陰性であったため急性B型肝炎は考えにくく、過去の採血でHBc抗体-HBs抗体は測定されていないもののHBs抗原陰性であったこと、発生時のHBc抗体は強陽性であったことから、HBV再活性化を起こした可能性が強いと判断して11月2日よりエンテカビル0.5mgを投与開始した。HBV DNAは漸減し、2012年3月2日AST31U/l, ALT17U/lと正常化した(図1)。2011年12月X日の腹部CT検査では肝硬変・肝細胞癌の所見を認めなかった(図2c)。しかし、2012年3月1X日肺炎・心不全で他界した。

症例2: 74歳, 男性

既往歴: パーキンソン病にて東名古屋病院神経内科で治療中,

家族歴: 特記なし

生活歴: 喫煙・飲酒せず

現病歴: パーキンソン病に対し、2007年11月1X日から抗パーキンソン病剤

レボドopa・ドロキシドopa・アマンタジン・プラミベキソルで治療開始され、2010年12月X日からソミサドを追加され車椅子使用し要介護の状態であった。2010年10月1X日から前立腺肥大治療にタムスロシン、過活動性膀胱にソリフェナシンが開始された。2009年9月と2011年5月の採血ではHBs抗原陰性であった。2007年9月以降ASTおよびALTは正常であったが、2012年1月X日、初めて肝障害AST34U/l, ALT31U/lとHBs抗原陽性を指摘され当科紹介となった。

2012年1月X日現症: 身長150cm, 体重43kg, 血圧110/70mmHg, 脈拍62/min・整, 意識清明, 貧血・黄疸なし, 腹水・浮腫なし。

経過: 2012年1月2X日消化器科初診時検査成績は、AST134U/l, ALT188U/lと肝機能は1月X日より上昇し、HBs抗原は36970 IU/mlと陽性、HBe抗原は1.82 S/CO弱陽性、HBe抗体は27.4%と陰性、HBV DNA>9.0logコピー/mlと高値を示

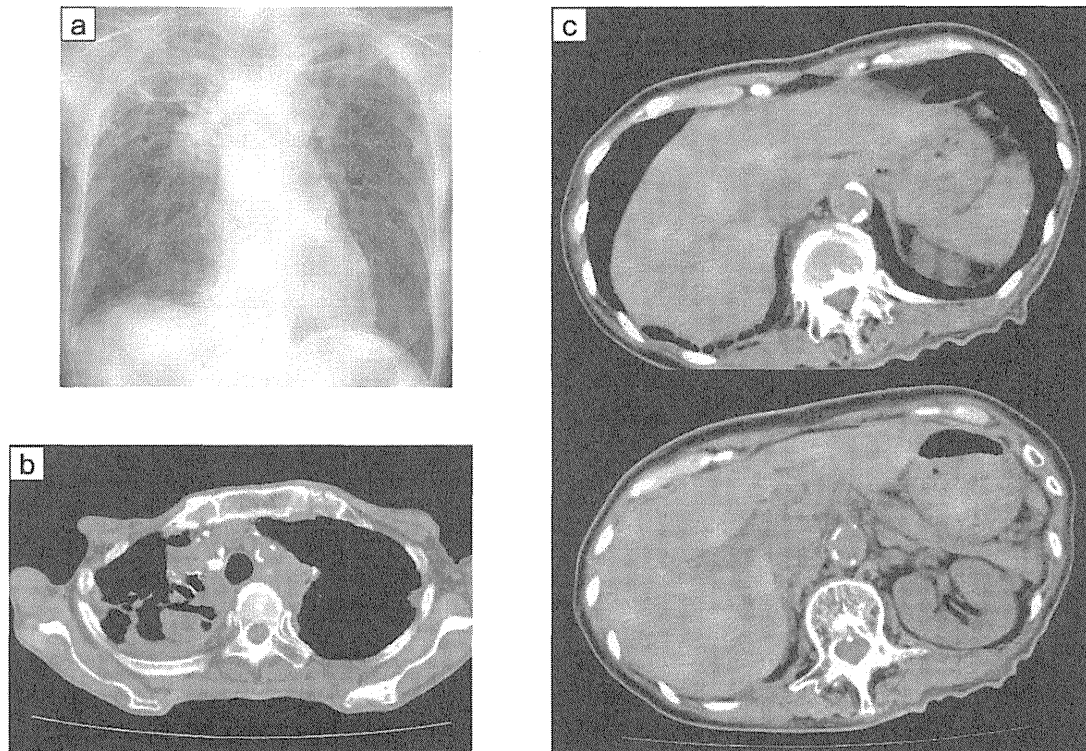


図2

- a. 症例12010/9/2X 胸部 X線写真 右上肺野に浸潤影を認めるが変化を認めない
 b. 症例12010/9/2X 胸部 CT 右上肺野に浸潤影を認める
 c. 症例12012/9/2X 腹部 CT 肝硬変・肝細胞癌の所見を認めなかった

した。HBc 抗体は9.38 S/CO と強陽性、IgM-HBc 抗体は0.19 S/CO と陰性であった。Genotype は C、HBV pre-core は mutant、HBV core promoter は wild であった。HCV 抗体は陰性、サイトメガロウイルス CMIgM および EBEB-A-VCAIgM は陰性であった。HIV 抗体は陰性、CD 4/8 は正常であった (表 2)。

IgM-HBc 抗体を再検したが0.10 S/CO と陰性であったため急性 B 型肝炎は考えにくく、過去の採血で HBc 抗体・HBs 抗体は測定されていないものの HBs 抗原陰性であったこと、発生時の HBc 抗体は強陽性であったことから、HBV 再活性化を起こした可能性が強いと判断して 1 月 3 日よりエンテカビル 0.5mg を投与開始した。HBV DNA は漸減し、2012 年 4 月 2 日 AST20U/l、ALT26U/l と正常化した (図 3)。2012 年 1 月 2 日の腹部 CT 検査では肝硬変・肝細胞癌の所見を認めなかった (図 4 a)。2012 年 5 月、原因不明の間質性肺炎を合併したが軽快した (図 4 b, c)。

考 案

HBs 抗原が陽性の急性肝障害は急性 B 型肝炎の初感染と HBV キャリアの急性増悪を鑑別する必要があるが、IgM-HBc 抗体の測定が有用であるとされている⁵⁾⁶⁾。無症候性 HBV キャリアの急性増悪時でも IgM-HBc 抗体価は軽度上昇することが多く、従来の EIA 法では両者の鑑別は困難な場合も報告されていた⁷⁾。

最近、化学発光免疫測定法 (CLIA 法) が開発され、両者の鑑別の正診率が改善された⁸⁾。2 症例ともに CLIA 法で測定した IgM-HBc 抗体が陰性であり、また約 1 カ月置いて再検しても陰性であったことより、急性 B 型肝炎は否定的と考えられた。

成人で HBV に始めて感染すると急性肝炎が起き、通常は 1 - 3 カ月で軽快する。

HBs 抗原は陰性化し HBs 抗体が陽性となる。HBc 抗体は感染 1 カ月後から陽性となり長期にわたり陽性が続く。このように HBs 抗原陰性かつ、

表2 症例2 消化器内科初診時検査成績 (2012年1月2X日)
HBV再活性化を起こした疑いが強いと考えられた

Hematology		EB EA-VCA IgM	<10 (陰性)
WBC	5200/ μ l	EB EA-VC IgG	80 (陽性)
Neutro	74.1%	HCV Ab	0.1 C.O.I. (陰性)
Lympho	16.4%	HIV Ab	(-)
CD 4/8	1.2	Blood chemistry	
RBC	$403 \times 10^4 / \mu$ l	TP	6.7 g/dl
Hb	13.2 g/dl	Alb	3.9 g/dl
PLT	$28.8 \times 10^4 / \mu$ l	T.Bil	1.08mg/dl
Coagulation		AST	134 U/l
PT	122 %	ALT	188 U/l
Viral markers		ALP	496 U/l
HBsAg	36970 IU/ml (陽性)	γ GTP	42 U/l
HBsAb	1.1 mIU/ml (陰性)	BUN	12 mg/dl
HBcAb	9.38 S/CO (陽性)	Cr	0.62 mg/dl
IgM-HBcAb	0.19 S/CO (陰性)	Amy	168 IU/l
HBeAg	1.82S/CO (陽性)	T.chol	161 mg/dl
HBeAb	27.4% (陰性)	BS	95 mg/dl
HBV DNA	>9.0 log コピー/ml (陽性)	IgG	1340mg/dl
HBV Genotype	C	IgA	234mg/dl
HBV pre-core	mutant	IgM	94mg/dl
HBV core promoter	wild	AFP	1.2 ng/dl
CM IgM	0.35 (陰性)		
CM IgG	11.9 (陽性)		

HBc抗体陽性またはHBs抗体陽性の状態をHBV既感染と呼ぶ。既感染でもHBVはcovalently closed circular DNA (cccDNA)として肝細胞核内に残ることが最近判ってきた⁹⁾¹⁰⁾。HBc抗体陽性またはHBs抗体陽性の既感染者が免疫低下によりHBV再活性化を起こすことはdenovoB型肝炎とも呼ばれている¹¹⁾¹²⁾。HBs抗原陰性であるが、血液または肝臓内にHBVが検出される状態はOccult HBV infectionと呼ばれるが、HBc抗体またはHBs抗体が陽性とされている¹¹⁾。

2症例ともに過去の採血でHBc抗体およびHBs抗体は測定されていないため、HBVの過去の感染があったかは不明である。症例1は2007年9月の採血ではHBs抗原陰性であったが測定法はEIAであった。症例2は2009年9月と2011年5月の採血ではHBs抗原陰性であったがいずれもCLIA法での測

定であった。

EIA法はCLIA法よる感度が劣るため、症例1では非常に低力価のHBs抗原陽性状態は否定できないものの、2症例ともに以前のHBs抗原は陰性であった。

肝炎発症時2症例共にHBs抗体は陰性であったが、HBc抗体は症例1 10.18 S/CO、症例2 9.38 S/COと高力価陽性であり、HBV既感染状態にあったと推測される。B型肝炎ウイルスに初感染し回復した場合、HBs抗体価は徐々に低下し感度以下になることもあるが、IgG型HBc抗体価は生涯陽性のことが多いとされる¹³⁾¹⁴⁾。IgM-HBc抗体陰性より急性B型肝炎は否定的と考えられるので、HBs抗原が消失した既感染状態からHBV再活性化を起こしde novoB型肝炎も発症した疑いが強いと考えた。

HBV再活性化による肝炎対策はガイドライン¹⁵⁾

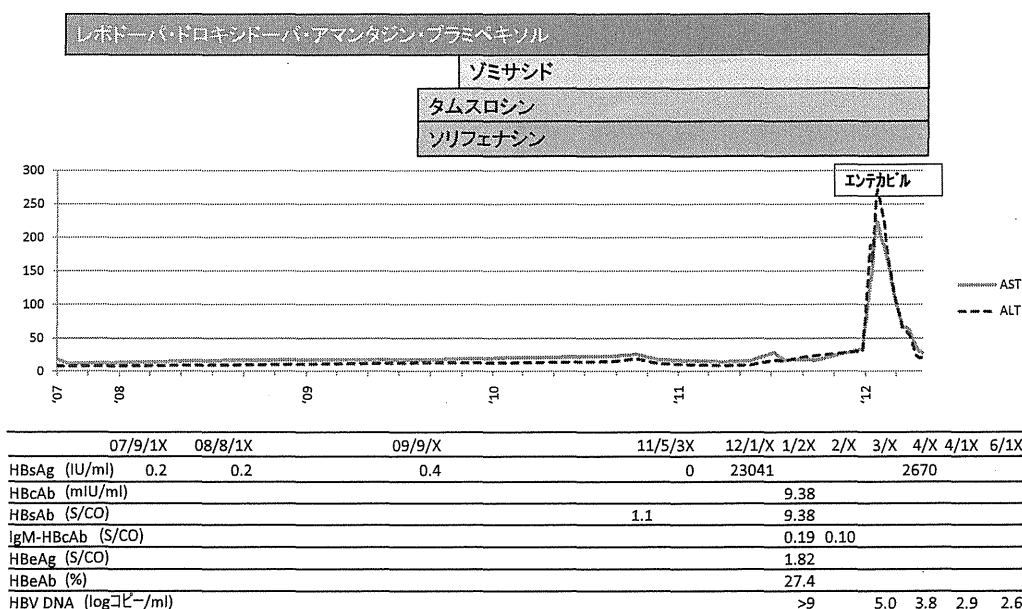


図3 症例2経過

パーキンソン病に対し抗パーキンソン病剤レボドーパ・ドロキシドーパ・アマンタジン・プラミベキソル・ソミサシド投与されていた。前立腺肥大治療にタムスロシン，過活動性膀胱にソリフェナシンが投与されていた。エンテカビル0.5mgを投与開始しHBV DNAは減少しAST，ALTは正常化した。IgM-HBc抗体は2012年1月と2月の2回測定したが陰性であった。

が作成されており，定期的に血中のHBV DNAを測定し，HBV再活性化認められた時点でエンテカビルを投与する方法が提案されている。HBV再活性化を起こした場合重症化することが多いと報告されているが，われわれの2症例ともにエンテカビル0.5mgを投与開始しHBV DNAは減少し肝機能は正常化した。症例1はGenotypeBで5 pre-core・core promoter共にwildであったが，症例2はGenotypeCでpromoterがmutantであった。pre-coreまたはcore promoterがmutantの場合，reactivationにより肝炎が発症すると劇症化しやすいため注意が必要とされる¹⁶⁾¹⁷⁾が肝機能は正常化した。

HBV再活性化の多くは血液悪性腫瘍にステロイドを含む抗癌剤やリツキシマブを使用した場合¹²⁾や自己免疫疾患にステロイドやリツキシマブを使用する³⁾⁴⁾など宿主免疫能が低下した場合に発症するとされている。症例1は肺アスペルギルス症に対し抗真菌剤と降圧剤を内服していた。症例2はパーキンソン病に対し抗パーキンソン病剤と前立腺肥大治療剤タムスロシンと過活動性膀胱治療剤ソリフェナシンが使用されていた。いずれの薬剤も免疫に影響するという報告は認められず薬剤によるHBV再活性化

は考えにくかった。

症例1は肺アスペルギルス症の基礎疾患が存在した。肺アスペルギルス症は500/ μ l以下の好中球減少症や免疫抑制剤内服がハイリスク患者とされる¹⁸⁾が，いずれにも該当しない。肺アスペルギルス症が存在すること自体が何らかの免疫低下状態にあることを推測させる。症例2はパーキンソン病の基礎疾患が存在した。パーキンソン病に明らかな免疫異常の指摘はないが，無動や栄養摂取低下などにより免疫能低下状態に陥りやすいことは容易に推測される¹⁹⁾。また，軽快したものの原因不明の間質性肺炎を合併したことも何らかの免疫低下状態にあったことを推察させる。2症例ともにエンテカビル0.5mgを投与開始しHBV DNAは減少し肝機能は正常化しているので肝予備能低下にともなう免疫低下も考えにくい。また，HIV抗体は陰性，免疫低下の指標とされるCD4/8は正常であった。症例1は肺アスペルギルス症を合併した80歳，症例2はノドーキンソン病を合併した74歳という免疫能低下をきたしやすい基礎疾患を合併した高齢者である以外に，HBV再活性化を起こす誘因は不明であった。

今回我々は，免疫療法や化学療法といった明らか

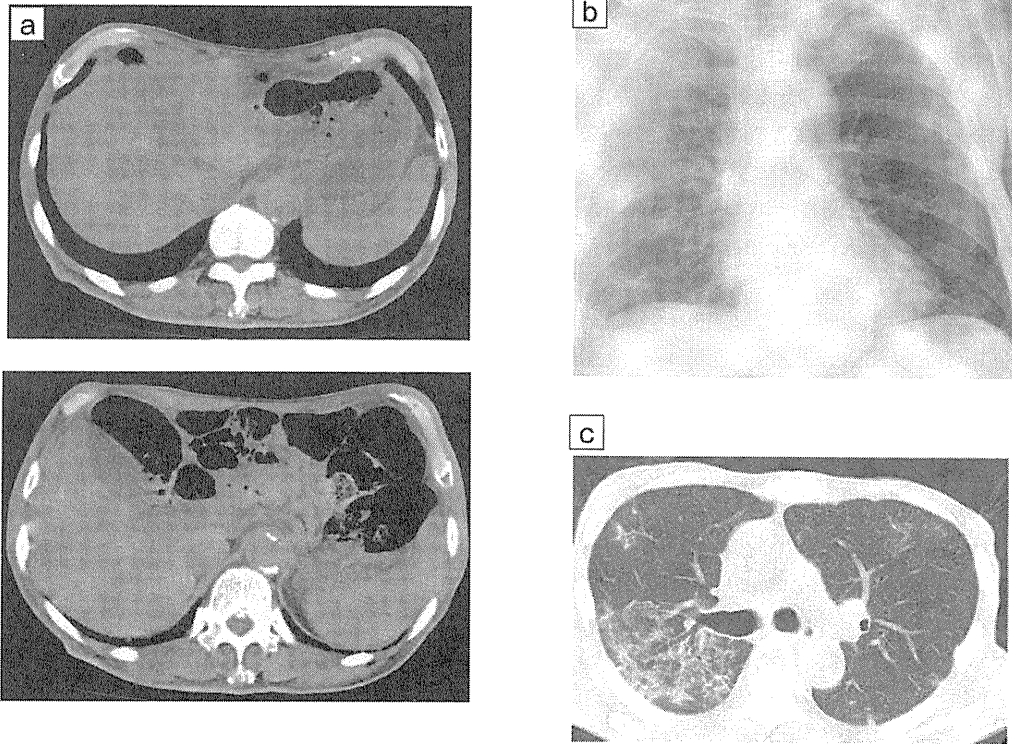


図4 症例2

- a. 2012/1/2X 腹部 CT 肝硬変・肝細胞癌の所見を認めない
 b. 2012/5/X 胸部 X線写真 右肺野にスリガラス様陰影を認める
 c. 2012/5/X 胸部 CT 右肺野に間質性肺炎像を認める

な原因が無いにも関わらず HBV 再活性化を起こした疑いが強いと思われる高齢 2 症例を経験した。このような症例報告は過去に認められていない。日本では 2600 万人が HBV に感染したことかあると推測されている²⁰⁾。日本は高齢化が進行中であり、高齢化を基礎にした HBV 再活性化を起こすことがあるとすれば今後大きな問題になると思われ、同様の症例の積み重ねがきわめて重要と思われた。

【文献】

1) Wands JR, Chura CM, Roll FJ et al. Serial studies of patients of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology* 1975 ; 68 : 105-12.
 2) Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis

Binapatient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 68-9.

3) Rostoker G, Rosenbaum J, Ben Maadi A et al. Re-activation of hepatitis B virus by corticosteroids in case of idiopathic nephritic syndrome. *Nephron* 1990 ; 56 : 224.
 4) Esteve M, Saro C, Gonzalez-Huix F et al. Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patient : need for prophylaxis. *Gut* 2004 ; 53 : 1363-65.
 5) 小池和彦, 飯野四郎, 倉井清彦. 健常者および肝疾患における IgM 型 HBc 抗体の測定-RIA 法と EIA 法による検討. *肝・胆・膵* 1984 ; 8 : 715-21
 6) 福田善弘, 瀬古修二, 小東克次. B 型急性肝炎における血中 IgM HBc 抗体測定の有用性の検討. *肝・胆・膵* 1984 ; 9 : 453-62.
 7) 小池和彦, 飯野四郎, 倉井清彦. B 型慢性肝疾患における IgM 型 HBc 抗体 Transaminase 動揺例で

- の経時的測定を検討. 肝臓 1984 ; 25 : 1385-93
- 8) 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 2006 ; 47 : 279-82.
 - 9) Fong TL, DiBisceglie AM, Gerber MA et al. Persistence of hepatitis B virus DNA in the liver after loss of HBs Ag in chronic hepatitis B. Hepatology 1993 ; 18 : 1313-18.
 - 10) Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S et al. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. J Clin Invest 1994 ; 93 : 230-9.
 - 11) Raimondo G, PoUicino T, Cacciola et al. Occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2007 ; 46 : 160-70.
 - 12) Kawatani T, Suou T, Tajima F et al. Incidence of hepatitis virus infection et al. and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. Eur J Hematol 2001 ; 67 : 45-50.
 - 13) Lander JJ, Ganem D, Varmus HE et al. Anti-core antibody screening of transfused blood. Vox Sang 1987 ; 34 : 77-80.
 - 14) Chau KH, Salfeld J, Cohen RJ et al. Serodiagnosis of recent hepatitis B infection by IgM class anti-HBc. Hepatology 1983 ; 3 : 142-9.
 - 15) 坪内博仁, 熊田博光, 清澤研道ほか. 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策-厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告. 肝臓 2009 ; 50 : 38-42.
 - 16) Omata M, Ehata T, Yokosuka et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J Med 1991 ; 324 : 1699-704.
 - 17) Dai MS, Lu JJ, Chen YC et al. Reactivation of precore mutant hepatitis B virus in chemotherapy-related patients. Cancer 2001 ; 92 : 2927-32
 - 18) 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン作成委員会・深在性真菌症の診断・治療ガイドライン. 呼吸 2007 ; 41 : 8-9.
 - 19) 日本神経学会治療ガイドライン パーキンソン病ガイドライン作成小委員会・日本神経学会治療ガイドライン パーキンソン病治療ガイドライン. 臨神経学 2002 ; 42 : 421-94.
 - 20) Mericanl, Guan R, Amarapuka D et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. J Gastroenterol Hepatol 2000 ; 15 : 1356-61.

Re'activation of Hepatitis B Virus of Unknown Reason was Suspected in Two

Noboru Hirashima, Yoshiko Kobayashi, Hironao Takahashi, Yuichi Kida,
Tuyoshi Kuno, Misaki Yoko, Masayuki Saitoh, Yosimitsu Rhuge,
Tomoyuki Tsuzuki, Masaaki Shimada and Hiroaki Iwase

Abstract

Case 1 was 80-year-old female, treated with pulmonary aspergillosis. She was admitted the treatment of HBs antigen-positive hep atop athy. On October 16, 2011, laboratory test showed following : AST 193 U/l, ALT 180 U/L HBe antigen 1579 S/CO, HBe antibody 0, HBV DNA 7.9 log copies/ml, HBc antibody 10.18 S/CO, IgM-HBc antibody 0.76 S/CO and HBV genotype B. Case 2 was 74-year-old male, treated with Parkinson's disease. He was admitted f ;) r the treatment of HBs antigen-positive hep atop athy. On January 20, 2012, laboratory test showed following : AST 134 U/l, ALT 188 U/L HBe antigen 1.82 S/CO, HBe antibody 0, HBV DNA >9.0 log copies/ml, HBc antibody 9.38 S/CO, IgM-HBc antibody 0.19 S/CO and Genotype C. In both two cases HBc antibody and HBs antibody were not tested for the past years. But, we considered that HBV reactivation occurred and administered Entecavir. The reason of HBV reactivation was not unknown.

ORIGINAL ARTICLE

Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease

Hisamitsu Miyaaki¹, Tatsuki Ichikawa¹, Yasuhiro Kamo¹, Naota Taura¹, Takuya Honda¹, Hidetaka Shibata¹, Maddalena Milazzo², Francesca Fornari², Laura Gramantieri², Luigi Bolondi² and Kazuhiko Nakao¹

¹ Department of Gastroenterology and Hepatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

² Center for Applied Biomedical Research (CRBA), S. Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna, Italy

Keywords

fibrosis – micro RNA-122 – NAFLD – steatosis

Correspondence

Hisamitsu Miyaaki, MD, Department of Gastroenterology and Hepatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan
Tel: +81-958-19-7267
Fax: +81-958-19-7267
e-mail: miyaaki-hi@umin.ac.jp

Received 3 June 2013

Accepted 1 December 2013

DOI:10.1111/liv.12429

Abstract

Background & Aims: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is believed to be a type of metabolic syndrome. MicroRNA-122 (miR-122) is the most abundant microRNA in the liver and is an important factor for the metabolism of glucose and lipids. In the present study, we examined the correlation between the hepatic and serum miR-122 expression levels and the clinicopathological factors of patients with NAFLD. **Methods:** We extracted the total RNA, along with preserved miRNAs, from liver biopsy samples of 67 patients with NAFLD. In 52 of these 67 patients, the total RNA was extracted from serum. The miR-122 that was obtained by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction was quantified using TaqMan MicroRNA assays. **Results:** A significant correlation was detected between serum and hepatic miR-122 expression (correlation coefficient, 0.461; $P = 0.005$). Patients with mild steatosis (<33%) showed significantly lower levels of hepatic miR-122 compared with patients with severe steatosis (>33%) (hepatic miR-122: mild/severe = $2.158 \pm 1.786/4.836 \pm 7.506$, $P = 0.0473$; serum miR-122: mild/severe = $0.002 \pm 0.005/0.007 \pm 0.001$, $P = 0.0491$). Moreover, hepatic and serum miR-122 levels were significantly higher in patients with mild fibrosis than in those with severe fibrosis (hepatic miR-122: mild/severe = $5.201 \pm 7.275/2.394 \pm 1.547$, $P = 0.0087$; serum miR-122: mild/severe = $0.008 \pm 0.011/0.002 \pm 0.004$, $P = 0.0191$). **Conclusions:** We found that the hepatic and serum miR-122 levels were associated with hepatic steatosis and fibrosis. The serum miR-122 level can be a useful predictive marker of liver fibrosis in patients with NAFLD.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common causes of chronic liver disease worldwide (1–8). NAFLD is considered to represent the hepatic manifestation of metabolic syndrome. In Japan, an increase in the incidence of metabolic syndrome has led to an increase in the prevalence of NAFLD (5). NAFLD was traditionally considered as a relatively benign liver disease. However, some patients with NAFLD progress to liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (8–13). Therefore, the precise diagnosis and staging of NAFLD patients is clinically important. Liver biopsy is the gold standard for the evaluation of NAFLD patients in terms of staging. However, liver biopsy is an invasive technique, and the identification of non-invasive biomarkers is required.

Micro-RNAs (miRNAs) are endogenous, small, non-coding RNAs of approximately 21–22 nucleotides that have important gene regulatory functions in animals and plants. miRNAs bind to the messenger RNAs of protein coding genes to direct their post-transcriptional

repression (14–16). miRNAs have been reported to play important roles in cell proliferation (17) and apoptosis (18), lymphocyte development (19), and adipocyte differentiation (20). Several recent studies have indicated that miRNAs play important roles in metabolism and metabolic diseases (21–23). MicroRNA-122 (miR-122) is the most abundant miRNA in the liver, and it regulates metabolic pathways, including cholesterol biosynthesis, fatty acid synthesis and oxidation (22, 23).

Recently, extracellular miRNAs were detected in serum, plasma and other body fluids. These circulating miRNAs have been reported to be predictive biomarkers for various cancers and in liver diseases (24, 25). However, the significance of miR-122 expression in the serum and liver of NAFLD patients has not been studied in detail.

In the present study, we analysed the relationship between the clinicopathological features and the expression of miR-122 in the serum and liver of NAFLD patients.

Patients and methods

Patient groups

In this study, we examined consecutive NAFLD patients who visited the Department of Gastroenterology and Hepatology at Nagasaki University Hospital. The patients who exhibited positive results for hepatitis B virus surface antigen or hepatitis C virus antibody, or those showing evidence of inherited, autoimmune, cholestatic or drug-induced liver disease were excluded using clinical, laboratory, imaging and histological criteria. In addition, patients with a history of current or past excessive alcohol intake, as defined by an average daily consumption of more than 20 g of alcohol, were excluded from the study.

Non-alcoholic fatty liver disease was diagnosed by percutaneous liver biopsy and ultrasonography. Liver biopsy specimens were fixed in 10% formalin, cut to a thickness of 4 μ m and subjected to haematoxylin–eosin and Azan–Mallory staining. Steatosis was classified as mild (>30%) or severe (30%). Inflammation was scored on a scale of 0–9 according to the standards proposed by the Non-alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (26). Fibrosis staging was performed using a five-grade scale as follows: F0, no fibrosis; F1, pericellular fibrosis in zone 3; F2, pericellular fibrosis in zone 3 with periportal fibrosis; F3, bridging fibrosis; and F4, cirrhosis defined as mild fibrosis (F0 or F1) and severe fibrosis (>F1).

miRNA extraction and quantification

RNA was extracted from a total of 67 liver biopsy specimens. Total RNA, including the miRNA, was isolated from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver biopsy specimens using the Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. In 52 of 67 patients, total RNA, along with preserved miRNAs, was extracted from 400 μ L of serum using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Synthetic miR-39 was added to serum samples prior to RNA extraction as an internal control.

The miR-122 obtained by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction was quantified using TaqMan MicroRNA assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. miR-122 expression was calculated by the relative standard curve method and normalized to RNU6 expression in the liver and cell-miR39 expression in the serum.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analysed by the Student's *t*-test for comparison of paired data. Correlations were analysed using the Spearman rank correlation coefficient. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The characteristic of this study population are shown in Table 1.

Correlation between hepatic and serum miR-122 expression and clinical factors

No significant correlations were observed between clinical factors and the expression of hepatic (Table 2) or serum (Table 3) miR-122. However, a significant correlation was observed between the serum and hepatic miR-122 expression levels (Fig. 1).

Correlation between hepatic miR-122 level and the pathological findings of NAFLD patients

Patients with mild steatosis (<33%) showed significantly lower levels of hepatic miR-122 than patients with severe steatosis (>33%) (mild/severe = $2.158 \pm 1.786/4.836 \pm 7.506$; *P* = 0.0473). No significant correlation between serum miR-122 level and the NAFLD activity score (NAS) was observed. In contrast, hepatic miR-122 level showed a significant negative correlation with the fibrosis stage [correlation coefficient: -0.292 (-0.497 to -0.056); *P* = 0.0161] (Table 2). Moreover, hepatic miR-122 expression was significantly higher in patients with no or mild fibrosis than in those with severe fibrosis (mild/severe = $5.201 \pm 7.275/2.394 \pm 1.547$; *P* = 0.0087) (Fig. 2).

Correlation between serum miR-122 level and the pathological findings of NAFLD patients

Patients with mild steatosis (<33%) showed significantly lower levels of serum miR-122 than patients with severe steatosis (>33%) (mild/severe = $0.002 \pm 0.005/0.007 \pm 0.001$; *P* = 0.0491). No significant correlation was

Table 1. Clinical characteristics of liver samples (67 cases)

Patient age (years)	51.8 \pm 17.4
Male:female	27:40
BMI	28.5 \pm 4.2
Type 2 diabetes	46 cases
AST (IU/L)	71.7 \pm 42.4
ALT (IU/L)	102.7 \pm 64.1
ALP (IU/L)	286.3 \pm 117.3
γ -GTP (IU/L)	103.6 \pm 121.6
T-cho (mg/dl)	195.1 \pm 45.4
TG (mg/dl)	144.7 \pm 60.1
Plt ($10^4/mm^3$)	21.7 \pm 7.4
FBS (mg/dl)	115.7 \pm 41.4
HbA1c (%)	6.7 \pm 2.0

γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; FBS, free blood sugar; HbA1c, glyco haemoglobin A1c; Plt, platelet; T-cho, total cholesterol; TG, triglyceride.

Table 2. Relation between hepatic microRNA-122 level and clinical factors

	Correlation coefficient	P-value
Age	0.025 (−0.216 to 0.264)	0.8385
BMI	−0.107 (−0.342 to 0.141)	0.3984
AST	−0.142 (−0.369 to 0.102)	0.2541
ALT	−0.042 (−0.279 to 0.201)	0.7390
ALP	−0.072 (−0.307 to 0.142)	0.5657
γ-GTP	−0.082 (−0.318 to 0.163)	0.5125
T-cho	0.054 (−0.199 to 0.300)	0.6785
TG	0.125 (−0.119 to 0.354)	0.3152
Plt	0.123 (−0.121 to 0.352)	0.3422
FBS	0.224 (−0.034 to 0.454)	0.0878
HbA1c	0.250 (−0.017 to 0.483)	0.0660
NAS	0.053 (−0.190 to 0.289)	0.6732
Fibrosis	−0.292 (−0.497 to −0.056)	0.0161

γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; FBS, free blood sugar; HbA1c, glyco haemoglobin A1c; NAS, NAFLD activity score; Plt, platelet; T-cho, total cholesterol; TG, triglyceride.

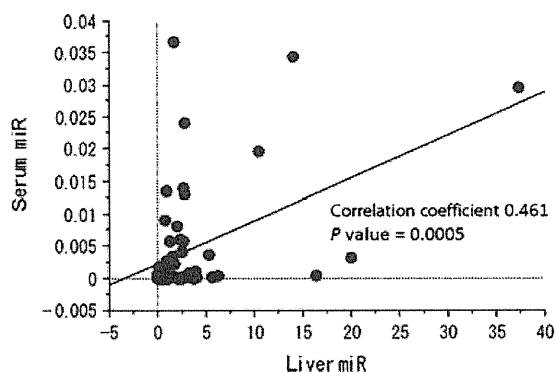
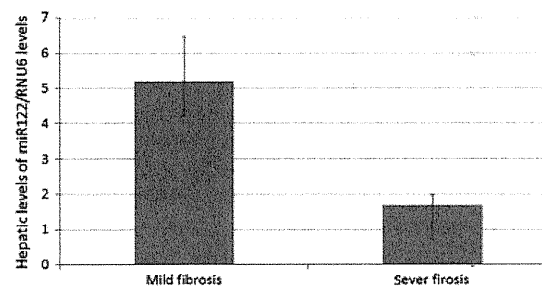
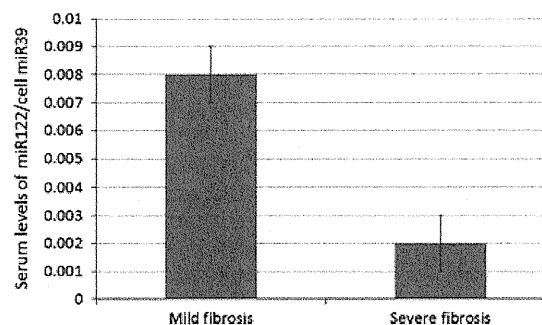
Table 3. Relation between serum microRNA-122 level and clinical factors

	Correlation coefficient	P-value
Age	−0.183 (−0.434 to 0.095)	0.1959
BMI	−0.042 (−0.314 to 0.236)	0.7708
AST (IU/L)	−0.049 (−0.317 to 0.386)	0.7340
ALT (IU/L)	0.126 (−0.152 to 0.136)	0.3750
ALP (IU/L)	−0.143 (−0.400 to 0.136)	0.3146
γ-GTP (IU/L)	−0.125 (−0.387 to 0.156)	0.3849
T-cho	0.089 (−0.194 to 0.358)	0.5420
TG	−0.061 (−0.329 to 0.215)	0.6667
Plt	−0.035 (−0.305 to 0.240)	0.8044
FBS	0.212 (−0.087 to 0.476)	0.1626
HbA1c	0.114 (−0.193 to 0.401)	0.4695
NAS	0.138 (−0.140 to 0.396)	0.3312
Fibrosis	−0.316 (−0.543 to 0.048)	0.0218

γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; FBS, free blood sugar; HbA1c, glyco haemoglobin A1c; NAS, NAFLD activity score; Plt, platelet; T-cho, total cholesterol; TG, triglyceride.

detected between serum miR-122 levels and the NAS. Serum miR-122 expression in the liver showed a significant inverse correlation with fibrosis stage [correlation coefficient: −0.316 (−0.543 to 0.048); $P = 0.0218$] (Table 3). Moreover, serum miR-122 levels were significantly higher in patients with mild fibrosis than in those with severe fibrosis (mild/severe = $0.008 \pm 0.011/0.002 \pm 0.004$; $P = 0.0191$) (Fig. 3).

To compare the ability of the blood tests to predict the fibrotic stage, we constructed receiver operating

**Fig. 1.** Correlation between liver and serum miR-122 levels. The serum miR-122 levels were significantly correlated with hepatic miR-122 levels (Spearman correlation coefficient: 0.461; $P = 0.0005$).**Fig. 2.** Correlation between hepatic miR-122 level and the fibrosis stage. Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test ($P = 0.0087$).**Fig. 3.** Correlation between serum miR-122 level and the fibrosis stage. Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test ($P = 0.0191$).

characteristics (ROC) curves for serum miR-122, hyaluronic acid and type IV collagen; the area under the ROC curves for miR-122, hyaluronic acid and type IV collagen were 0.82, 0.74 and 0.72, respectively (Fig. 4).

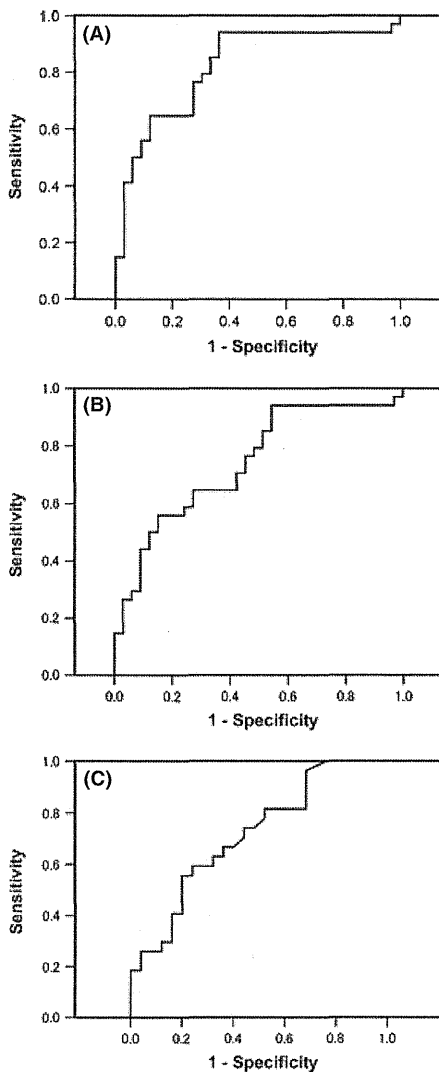


Fig. 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve for serum miR-122, hyaluronic acid and Type IV collagen. The area under the ROC curve for serum miR-122 (A), hyaluronic acid (B) and type IV collagen (C) are 0.82, 0.74 and 0.72, respectively.

Discussion

Recent studies have indicated the value of the miR-122 level as a predictive factor of liver disease (27–30). The progression of NAFLD is associated with visceral fat deposition and insulin resistance. miR-122 is a key factor of lipid metabolism (23, 24). In the present study, patients with severe fat deposition showed high miR-122 expression levels in the liver. The role of miR-122 in lipid metabolism has been demonstrated *in vitro* and *in vivo*. In *in vitro* studies using HEP G2 cells, silencing of miR-122 led to the upregulation of the expression of lipid metabolism genes such as fatty acid synthase (FAS), 3-

hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and sterol binding element binding protein (SREBP), whereas overexpression of miR-122 led to a significant decrease in the levels of these genes (31). In *in vivo* studies, inhibition of miR-122 expression in mice led to the promotion of hepatic fatty acid (FA) oxidation, decreased FA levels, and decreased liver steatosis (23). Thus, these results support our finding that the expression of miR-122 is correlated with liver steatosis.

However, the liver and serum miR-122 levels did not correlate with the NAS and alanine aminotransferase levels. Several recent studies showed that the miR-122 level is associated with liver inflammation (27–29), which was not observed in the present study. However, the previous studies included patients with other liver diseases such as viral hepatitis. In the present study, most of patients had mild inflammation, which may contribute to the lack of a significant difference in miR-122 expression. Moreover, the NAS—established as a scoring system for NAFLD—evaluates not only inflammation but also steatosis. Thus, this discrepancy could be attributed to the different categories of liver disease included in each study.

In the present study, liver miR-122 levels significantly correlated with the liver fibrosis stage. This result is in agreement with those of previous studies, which reported a decrease in liver miR-122 levels at the later stage of fibrosis in patients with liver disease (27–29). Persistent liver injury results in liver cell death, loss of hepatic cells and the accumulation of extracellular matrix. Moreover, the liver miR-122 levels did not correlate with the NAS, which was reflected the inflammation grade of the NAFLD patients. However, hepatocytes are the main source of miR-122. Thus, the progression of liver fibrosis results in the replacement of hepatocytes by extracellular matrix, and thus leads to a decrease in the levels of hepatic miR-122.

Recently, Li *et al.* reported that miR-122 suppressed collagen maturation in hepatic stellate cells and inhibited the proliferation of activated hepatic stellate cells (32). Therefore, decreased miR-122 expression appears to lead to increased collagen maturation and extracellular matrix production, which is consistent with the present results.

In the present study, decreased serum miR-122 levels were detected in association with mild steatosis and advanced fibrosis stage. These results are similar to those noted for hepatic miR-122 expression. Moreover, serum miR-122 expression was well-correlated with hepatic miR-122 expression, which suggests that the miR-122 released from hepatic cells enters into the bloodstream.

The evaluation of liver fibrosis is important to predict the prognosis of patients with NAFLD. Follow-up liver biopsies or repeat liver stiffness assessment is currently necessary to assess liver fibrosis. However, these methods have some limitations. Liver biopsy is an invasive technique and is associated with certain complications