

- tology Single Topic Conference : Liver Failure : Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September, 2007, Iwate, Japan) : S72-S75
- 21) Terai S, Sakaida I : Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011 ; 18 : 23-25
  - 22) Kim JK, Park YN, Kim JS, et al : Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010 ; 19 : 1237-1246
  - 23) Saito T, Okumoto K, Haga H, et al : Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev* 2011 ; 20 : 1503-1510
  - 24) Peng L, Xie DY, Lin BL, et al : Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B : Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 2011 ; 54 : 820-828
  - 25) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al : Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007 ; 13 : 1067-1073
  - 26) Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al : Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007 ; 10 : 459-466
  - 27) Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al : Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007 ; 13 : 3359-3363
  - 28) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al : Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease : a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010 ; 22 : 33-42
  - 29) Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al : Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection : a phase I-II clinical trial : *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009 ; 21 : 1199-1205
  - 30) Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, et al : Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011 ; 23 : 936-941

# 自己骨髄細胞を用いた 肝修復再生療法の現状

高見 太郎・寺井 崇二・坂井田 功

現在でも非代償性肝硬変症の根治療法は肝移植であるが、慢性的ドナー不足、手術侵襲や免疫拒絶などの諸問題は依然として解決されていない。一方、2000年にTheiseらが「男性ドナーから骨髄移植を受けた女性剖検例において、慢性炎症があった肝臓および消化管組織内にY染色体陽性細胞を確認した」と報告したことから、骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された。これ以降、肝臓の再生治療・細胞療法に使用する細胞源として骨髄(幹)細胞が注目され、世界中で基礎・臨床研究が進められている<sup>1)</sup>。

## 基礎研究：骨髄細胞投与・ 肝硬変マウスモデル

われわれは骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価マウスモデル「green fluorescent protein(GFP)/carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>)モデル：GFP/CCl<sub>4</sub>モデル」を確立し、四塩化炭素腹腔内反復投与により誘導した肝硬変マウスに同種同系GFP陽性骨髄細胞を末梢静脈(尾静脈)投与した。その結果、投与骨髄細胞が門脈域周囲の肝線維に沿って生着しmatrix metalloproteinase(MMP)9などのコラゲナーゼを産生することで既存の肝線維の溶解に働き、肝合成能・肝線維化・生命予後を有意に改善させることを

報告した<sup>2)</sup>。また、骨髄細胞投与は肝発癌には抑制的に作用することがマウス高発癌肝硬変モデルで確認された<sup>3)</sup>。

## 臨床研究：自己骨髄細胞投与 療法

マウス基礎研究成果を基盤に2003年11月から、「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(autologous bone marrow cell infusion therapy：ABMi therapy、全身麻酔下に自己骨髄液を約400 ml採取し、洗浄濃縮後に点滴投与する方法)」の臨床研究を開始した。骨髄細胞投与後6カ月間経過観察が可能であった症例については、投与6カ月後の血清アルブミン値、総蛋白値やChild-Pughスコアは有意に改善していた<sup>4)</sup>。さらに15カ月間経過観察可能であった9例でも同様の改善効果を認めた。また、多施設臨床研究も開始し、B型肝硬変症を対象としたABMi療法では血清アルブミン値の上昇やChild-Pughスコアの改善を確認した。そのメカニズムとして、経時的な肝生検からhepatic progenitor cell(HPC)を活性化させる可能性が示唆された。さらにアルコール性肝硬変症に対するABMi療法でもその有効性と安全性が報告されるなど、自己骨髄細胞を用いた肝修復再生治療の安全性および有効性が再確認された。

たかみ たらう・てらい しゅうじ・さかいだ いさお：山口大学医学部消化器病態内科学 ☎ 755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1

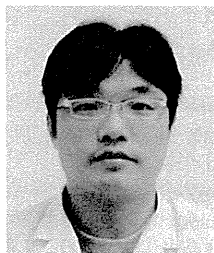
今後は、ABMi療法を推進していくことはもちろんのこと、現状では全身麻酔可能例に適応が限定されているため、局所麻酔下に採取した少量の骨髄液から肝線維化・肝機能改善効果のある細胞を分離培養し、これを投与する低侵襲な治療法の開発も行い、肝移植に替わる治療法へと発展させていく。

#### 文献

- 1) Takami T, et al : Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012 Mar 3. [Epub ahead of print]
- 2) Sakaida I, et al : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 : 1304-1311, 2004
- 3) Maeda M, et al : Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 27(Suppl 2) : 104-111, 2012
- 4) Terai S, et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24 : 2292-2298, 2006

# 自己骨髄細胞投与による肝修復再生療法

Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis



高見太郎(写真) 坂井田 功

Taro TAKAMI<sup>1</sup> and Isao SAKAIDA<sup>2</sup>

山口大学医学部附属病院検査部<sup>1</sup>, 同大学院医学系研究科消化器病態内科学<sup>2</sup>

◎非代償性肝硬変に対する根治療法は肝移植であるが、慢性的ドナー不足、手術侵襲や免疫拒絶などの諸問題はいぜんとして解決されていない。これまでに臨床研究としての肝再生療法は、G-CSFで誘導した自己末梢血CD34陽性細胞の経肝動脈投与、CD133陽性単核球細胞の経門脈投与や、自己骨髄間葉系幹細胞投与による細胞療法などが報告され、一部の症例では改善が報告されている。著者らもマウス基礎研究により自己骨髄細胞投与により肝線維化および肝機能を改善させることを報告し、その成果を基盤として2003年11月から、肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)の臨床研究を開始し、肝機能改善・修復効果を確認し報告してきた。さらに、国内外からABMi療法の安全性および有効性が追試報告されるなど、自己骨髄由来細胞を用いた肝硬変に対する再生治療の有効性が強く示唆された。今後はより低侵襲な骨髄由来培養細胞を用いた新たな治療法の開発も行っていく。



骨髄細胞, ABMi療法, マトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)

最近のインターフェロン(IFN)療法の進歩や新規抗ウイルス剤の開発により、B型またはC型肝炎ウイルスによる進行した肝硬変でなければ、多くの症例でウイルスの排除や鎮静化が可能となり、その後の肝硬変や肝癌といった重篤な病態への進展を防ぐことができるようになった。さらに、C型肝炎ウイルス排除を目的としたIFN治療やB型肝炎ウイルスに対する核酸アナログ製剤治療にかかる医療費に対しても公費助成されるなど、国の肝炎対策事業の整備も進んでいる。

しかし、すでに進行した肝硬変にはIFNの適応はなく、非代償性肝硬変をはじめとする重症肝疾患の現時点における根治療法は肝移植(生体肝移植あるいは脳死肝移植)であることに変わりはない。2010年7月には改正脳死臓器移植法が施行され、「本人が拒否していないかぎり家族(遺族)の同意で臓器提供ができる」ことになったが、いぜんとして慢性的ドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶や医療経済面などの諸問題は解決されておらず、対症療法のみで対応せざるをえない症例が多い。

したがって、肝硬変に対する新たな再生治療・細胞療法の開発が求められている。

2000年にTheiseらが、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性患者の剖検例において慢性炎症が

サイド  
メモ

## 肝線維化

慢性的に壊死炎症～再生が繰り返される病態では障害部は完全には再生されないため、線維組織により置換され、最終的には偽小葉を形成した肝硬変へと進展する。慢性炎症環境下では肝内在性マクローファージ(Kupffer細胞)などから炎症性サイトカインが多く産生され、肝星細胞(伊東細胞)は活性化し筋線維芽細胞様へと形質転換する。活性化した肝星細胞は細胞外基質であるコラーゲン産生を増加し、その一方で、線維分解系のコラゲナーゼであるmatrix metalloproteinases(MMPs)はその抑制因子であるtissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMP)により阻害され、結果、線維産生が優位となる。

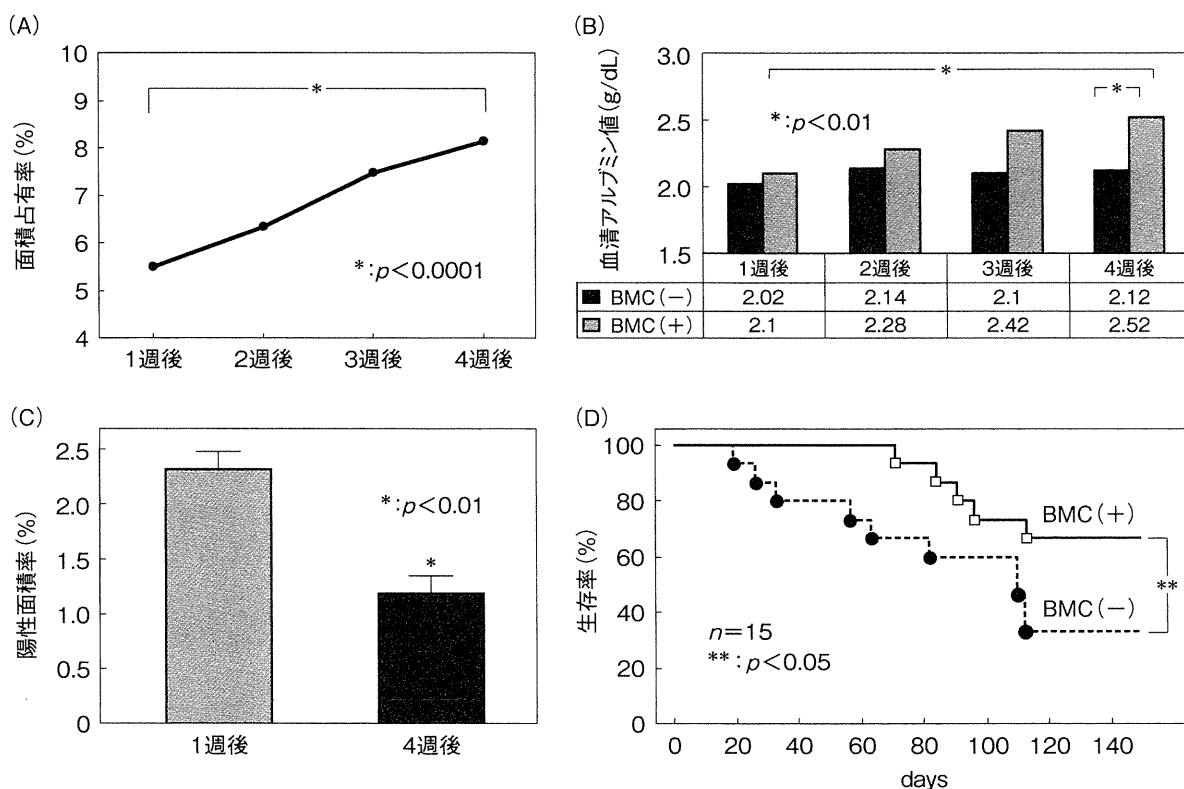


図 1 マウスGFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおける自己骨髄細胞投与の効果

- A: 投与骨髄細胞の慢性障害肝への生着をGFP陽性細胞の面積占有率で評価したところ、経時的に増加していた。
- B: 骨髄細胞投与後のレシピエントマウスにおける血清アルブミン値を測定した。骨髄細胞投与群であるBMC(+)において血清アルブミン値は漸増しており、肝合成能の改善効果を認めた。
- C: 骨髄細胞投与後の肝線維化をシリウスレッド染色で評価した。骨髄細胞投与により肝線維は有意に改善された。
- D: 骨髄細胞投与マウスにおいて生存率は有意に改善された。

あった肝および消化管組織内にY染色体陽性細胞を確認したと報告したことから、骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された<sup>1)</sup>。これ以降、肝の再生治療・細胞療法に使用する細胞源として骨髄(幹)細胞が注目され、世界中で基礎・臨床研究が進められている<sup>2-5)</sup>。

これまでの肝再生療法の臨床研究としては、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を使ったものでは、G-CSFで誘導した自己末梢血CD34陽性細胞を門脈または肝動脈から投与したところ血清アルブミン値が上昇したとのGordonらの報告<sup>6)</sup>、アルコール性肝硬変症に対するG-CSF投与が肝前駆細胞の増殖を促進させたとのSpahrらの報告や<sup>7)</sup>、Child-Pughスコアを改善させたとのPaiらの報告<sup>8)</sup>、またHanらによるB型肝硬変症に対するG-CSF投与の報告がある<sup>9)</sup>。しかし、G-CSF投与により健常人でも脾破裂を

起こしたとの報告があることから、脾腫を伴う肝硬変症例へのG-CSF投与には注意が必要である<sup>10)</sup>。またドイツからは、肝悪性腫瘍切除術後の残肝に自己CD133陽性細胞を経門脈投与する細胞療法の有効性が報告されている<sup>11,12)</sup>。

著者らも、骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価マウスモデル、Green fluorescent protein (GFP)/carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)モデル(以下、GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)を確立し、これまでに、慢性炎症という環境下においてドナー由来の骨髄細胞が門脈域周囲の線維に沿って生着し、マトリックスメタロプロテナーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)2および9などのコラゲナーゼを産生することで既存の肝線維を溶解し、肝合成能、肝線維化、生命予後を有意に改善させることを報告してきた<sup>13-16)</sup>。

さらに、2003年11月からは、これらの基礎研

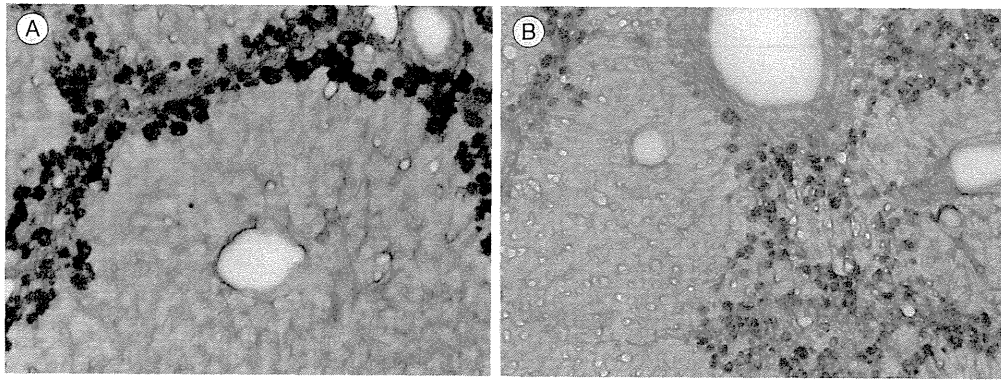


図 2 マウスGFP/CCl<sub>4</sub>モデルの肝線維化と投与骨髄細胞の局在

- A：骨髄細胞投与2週後の肝線維をシリウスレッド染色(赤色)で、投与骨髄細胞の局在を GFP 免疫染色(黒色)で評価したもの。肝線維束に沿って投与骨髄細胞が生着している。  
 B：骨髄細胞投与4週後、肝線維束のなかに生着した投与骨髄細胞が確認でき、肝線維の沈着量も減少している。

究成果を基盤に、肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (autologous bone marrow cell infusion therapy: ABMi 療法) の臨床研究を開始し<sup>17)</sup>、2005 年からは多施設臨床研究を開始している<sup>18,19)</sup>。2011 年には非代償性 B 型肝硬変を対象とした ABMi 療法が血清アルブミン値や Child-Pugh スコアを改善させたとの報告が Kim らによりなされ、そのメカニズムとして、経時的な肝生検から hepatic progenitor cell (HPC) を活性化させる可能性が示唆された<sup>20)</sup>。さらに、アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法の有効性と安全性が齊藤らにより報告された<sup>21)</sup>。このように自己骨髄由来細胞を用いた肝硬変に対する肝修復再生治療の有効性が強く示唆されている。

本稿では著者らのこれまでの基礎研究状況、ABMi 療法の現状と展望について述べる。

### ● 基礎研究——マウス骨髄細胞投与肝硬変モデル (GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)

著者らは四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) による肝細胞直接障害モデルを用いて基礎研究を進めてきた。著者らが開発したマウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの特徴は以下である<sup>13,15)</sup>。

- ① CCl<sub>4</sub>の反復投与により慢性肝障害環境下にあること
- ② 骨髄細胞投与後も CCl<sub>4</sub>投与を継続し、この炎症環境を維持すること
- ③ 自家骨髄細胞投与を想定して同種同系の

GFP トランスジェニックマウスをドナーとしたこと

本モデルでは、6 週齢の C57BL/6 マウスに CCl<sub>4</sub> (1.0 mL/kg) を 4 週間 (計 8 回) 腹腔内反復投与することで慢性肝障害 (肝硬変) 状態とし、これをレシピエントとした。これに同種同系 GFP トランスジェニックマウス大腿骨から分離した全骨髄細胞を洗浄後に末梢静脈である尾静脈から投与した。この後も CCl<sub>4</sub>投与は同様に継続したうえで、経時的に肝機能改善効果を評価した。

骨髄細胞を投与することにより血清アルブミン値の改善 (図 1-B)<sup>13)</sup>、生存率の有意な上昇 (図 1-D)、さらにはシリウスレッド染色で評価した肝線維の減少 (図 1-C) が認められた<sup>14)</sup>。また、投与した骨髄細胞は肝障害がないマウス肝には生着しないものの、CCl<sub>4</sub>による持続肝障害環境下で投与した骨髄細胞は投与後 1 日目から門脈域周囲の線維に沿って生着し、さらに週を追うごとに既存の線維のなかにも観察された (図 2)<sup>14)</sup>。またこの過程で、障害肝に生着した骨髄由来 GFP 陽性細胞が MMP2 および 9 などのコラゲナーゼを産生し、肝線維の溶解に働くことを確認した<sup>14)</sup>。

これらの基礎研究結果から、慢性肝障害環境下に自己骨髄細胞を末梢静脈から投与することにより、レシピエントの肝合成能・肝線維化さらには生命予後までも改善させたと考えられた。さらにその後の検討により、本過程に参与する因子として線維芽細胞増殖因子 (FGF) が重要な働きをす

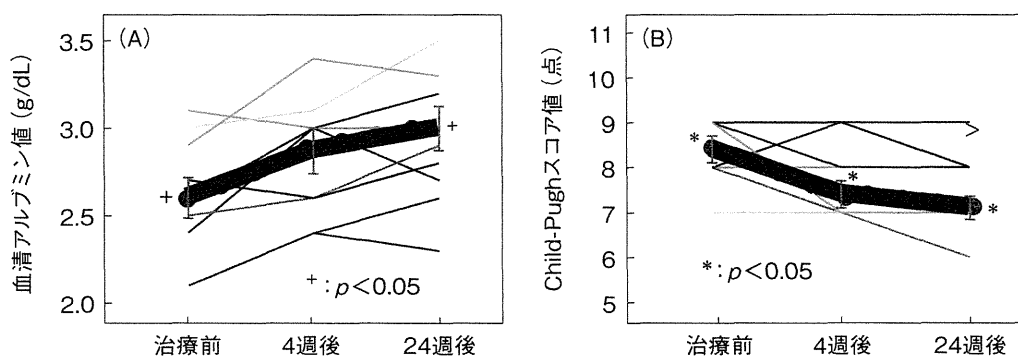


図3 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)における肝機能改善<sup>17)</sup>

ABMi療法の治療効果を血清アルブミン値(A)とChild-Pughスコア値(B)で評価したところ、治療後6カ月において有意に血清アルブミン値は増加し、肝機能も改善されていた。いずれも太い実線が平均値。

ることも明らかとなった<sup>22)</sup>。

### 臨床研究——肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)

前述のマウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの基礎研究を基盤として、2003年11月よりヒト臨床研究である“肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(autologous bone marrow cell infusion therapy: ABMi療法)”を開始した。この臨床研究の適応条件などの詳細は以下である。

#### 1. 対象疾患

対象疾患は非代償性肝硬変症である。

#### 2. 治療適応基準

- ① 総ビリルビン値は 3.0 mg/dL 以下
- ② 血小板数は  $5.0 \times 10^{10}/L$  以上
- ③ 食道胃静脈瘤のコントロールは良好
- ④ 心肺機能が良好で重篤な併存疾患を認めない
- ⑤ CTやMRIなどの画像診断で肝細胞癌が存在しない

#### 3. プロトコール

全身麻酔下に自己骨髄細胞を400 mL採取する。採取した骨髄液は濃縮洗浄し、さらにその骨髄液はGMPグレード設備が完備された再生・細胞療法センターでSOP(Standard Operating Procedures)に準じて骨髄単核球細胞を精製濃縮し、採取同日に患者本人の末梢静脈から点滴投与する。細胞投与後は6カ月間経過観察を行い、血液生化学検査、肝組織検査(肝生検)、腹部超音波検

査や腹部CT検査により安全性および有効性の評価を行う。また、経過観察中は内服薬剤、抗ウイルス剤などの変更は行わない。

#### 4. 結果

骨髄細胞投与後6カ月間経過観察可能であった症例については、投与6カ月後の血清アルブミン値、総蛋白値やChild-Pughスコアは有意に改善していた<sup>17)</sup>。さらに、15カ月間経過観察可能であった9例でも同様の改善効果を認めた(図3)。2011年12月現在、山口大学で19症例を経験しているが、とくに問題となる有害事象の発生はなかった<sup>18,19)</sup>。

さらに、著者らが開発したこのABMi療法はアルコール性肝硬変を対象に山形大学で実施(山口大学チーム共同)、さらにはB型肝炎を対象に延世大学(韓国)でも実施され、それぞれ安全性および有効性が確認され、報告された<sup>20,21)</sup>。このように多施設臨床研究の結果、ABMi療法および自己骨髄細胞を用いた治療の安全性や効果が再確認された。

### おわりに

肝硬変に対する骨髄(幹)細胞を用いた再生治療・細胞療法の報告は著者らのABMi療法だけでなく、肝移植待機例10例に対して腸骨から採取した自己骨髄細胞を肝動脈から投与し血清アルブミン値の上昇と血清ビリルビン値の低下を認めたとのLyraらの報告<sup>23)</sup>、さらには培養自己間葉系幹細胞投与により肝機能が改善したとの報告<sup>24,25)</sup>な

どがある。また、PengらはB型肝硬変を対象とした自己骨髄細胞投与療法の長期観察で、肝細胞癌の発生は細胞投与群で低い傾向であったと報告しており興味深い<sup>26)</sup>。しかし一方で、培養自己間葉系幹細胞を肝動脈から投与する phase I 臨床研究において、造影剤投与が原因と考えられる腎不全による死亡例があったことを、Mohamadnejadらは報告している<sup>27)</sup>。このことは治療適応基準を明確にすることはもちろん、より侵襲の少ない治療法の開発が必要であることを示唆している。

今後、ABMi療法の有効性をより明確にするために randomized controlled study が必要になると考えている。またその一方で、骨髄細胞群から治療効果を有する細胞を同定し、その作用機構を明らかにすることも重要である。少量の骨髄液から肝再生・修復作用を有する細胞を分離培養し再投与することができれば、全身麻酔下に骨髄液を採取する必要がなくなるため、適応は拡大し、さらには凍結保存した培養細胞を分割投与することも不可能ではない。したがって、今後は低侵襲な骨髄由来培養細胞を用いたあらたな治療法の開発も推進していく。

## 文献

- 1) Theise, N. D. et al.: *Hepatology*, **32** : 11-16, 2000.
- 2) Houlihan, D. D. and Newsome, P. N.: *Gastroenterology*, **135** : 438-450, 2008.
- 3) Gilchrist, E. S. and Plevris, J. N.: *Liver Transpl.*, **16** : 118-129, 2010.
- 4) Stutchfield, B. M. et al.: *Liver Transpl.*, **16** : 827-836, 2010.
- 5) Souza, B. S. et al.: *Cell Transplant.*, **18** : 1261-1279, 2009.
- 6) Gordon, M. Y. et al.: *Stem Cells*, **24** : 1822-1830, 2006.
- 7) Spahr, L. et al.: *Hepatology*, **48** : 221-229, 2008.
- 8) Pai, M. et al.: *Am. J. Gastroenterol.*, **103** : 1952-1958, 2008.
- 9) Han, Y. et al.: *Cytotherapy*, **10** : 390-396, 2008.
- 10) Falzetti, F. et al.: *Lancet*, **353** : 555, 1999.
- 11) am Esch, J. S. 2nd. et al.: *Stem Cells*, **23** : 463-470, 2005.
- 12) Furst, G. et al.: *Radiology*, **243** : 171-179, 2007.
- 13) Terai, S. et al.: *J. Biochem.*, **134** : 551-558, 2003.
- 14) Sakaida, I. et al.: *Hepatology*, **40** : 1304-1311, 2004.
- 15) Terai, S. et al.: *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **12** : 203-207, 2005.
- 16) Takami, T. et al.: *J. Pharmacol. Sci.*, **115** : 274-278, 2011.
- 17) Terai, S. et al.: *Stem Cells*, **24** : 2292-2298, 2006.
- 18) Terai, S. and Sakaida, I.: *Hepatol. Res.*, **38** : S72-S75, 2008.
- 19) Terai, S. and Sakaida, I.: *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, **18** : 23-25, 2011.
- 20) Kim, J. K. et al.: *Cell Transplant.*, **19** : 1237-1246, 2010.
- 21) Saito, T. et al.: *Stem. Cells Dev.*, **20** : 1503-1510, 2011.
- 22) Ishikawa, T. et al.: *Cell Tissue Res.*, **323** : 221-231, 2006.
- 23) Lyra, A. C. et al.: *World J. Gastroenterol.*, **13** : 1067-1073, 2007.
- 24) Mohamadnejad, M. et al.: *Arch. Iran Med.*, **10** : 459-466, 2007.
- 25) Kharaziha, P. et al.: *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **21** : 1199-1205, 2009.
- 26) Peng, L. et al.: *Hepatology*, 2011, May 23.[Epub ahead of print]
- 27) Mohamadnejad, M. et al.: *World J. Gastroenterol.*, **13** : 3359-3363, 2007.

\* \* \*



## マウス肝硬変高発癌モデルにおける自己骨髄細胞投与の影響

前田 雅喜\* 高見 太郎\* 藤澤 浩一\*\*  
山本 直樹\*\*\* 寺井 崇二\* 坂井田 功\*

## 1 はじめに

非代償性肝硬変症は、その根本的な治療方法は肝移植しかないのが現状である。しかしながら、日本における肝移植はドナー不足、手術侵襲や医療費用など多くの課題を抱えている。

一方、われわれはマウスモデル系(マウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)にて慢性炎症という環境下において、末梢静脈から投与した自己骨髄細胞が門脈域周囲の線維に沿って生着し matrix metalloproteinase (MMP) -9などを産生することで既存の肝線維の溶解に働き、肝合成能・肝線維化・生命予後を有意に改善させることを報告してきた<sup>1~4)</sup>。そしてこれらの基礎研究成果を基盤にして2003年11月より、臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(Autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy)を開始し<sup>5)</sup>、さらに2005年からの多施設共同臨床研究でも、その有効性と安全性を報告してきた<sup>6,7)</sup>。

これまで既存の癌に自己骨髄細胞を投与してその影響を評価した論文はいくつかあるものの<sup>8,9)</sup>、自己骨髄細胞投与 (ABMi)が肝発癌を促進させるか否かは明確ではなかった。そのためわれわれは、ABMi療法をCTなどの画像検査で肝細胞癌の合併を認めない肝硬変症患者に限定して行ってきた。しかし肝硬変症自体の発癌リスクは高く、特にC型肝硬変の発癌率は年率約7%であることは広く知られているなど<sup>10~12)</sup>、ABMiが肝硬変症

の肝発癌にどのような影響を与えるかを評価することは極めて重要である。

そこで今回われわれは、マウス肝硬変高発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)を新たに作成し、このモデル系に同種同系GFP陽性骨髄細胞を頻回に投与することで、ABMiが肝発癌に与える影響について検討した。

## 2 方法

1. マウス肝硬変高発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)の作成

生後2週雄C57BL/6マウス腹腔内にN-nitrosodiethylamine (DEN)を単回投与し、さらにDEN投与後1カ月からCarbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)を週2回腹腔内反復投与し、マウス肝硬変高発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)を作成し、これをコントロール群(n=17)とした。また、DEN投与後2カ月目から2週間ごとに同種同系マウスGFP陽性骨髄単核球細胞(1×10<sup>6</sup>個)を尾静脈から計5回投与し、これを骨髄群(n=23)とした(図1)。

## 2. 肝発癌の評価方法

マウス肝硬変高発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)のDEN投与後4.5カ月時点の肝発癌動態を、組織学的にfociおよび腫瘍(腺腫+肝細胞癌)の発生率、個数と大きさで評価した。肝線維化はシリウスレッド染色にて40倍の倍率にてランダムに3視野を取り、それぞれの線維面積を測定することで評価した。免疫染色は、免疫ペルオキシダーゼ法にて行った。抗体は、GFP蛋白: rabbit anti-GFP antibody (A11122, Invitrogen)・200倍希釈, AFP蛋白: goat anti-AFP antibody (SC8108, Santa cruz biotechnology)・250倍希釈,

\* 山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学

\*\* 同 大学院医学系研究科附属修復医学教育研究センター

\*\*\* 同 大学教育機構 保健管理センター

コントロール群(n=17)



骨髄群(n=23)

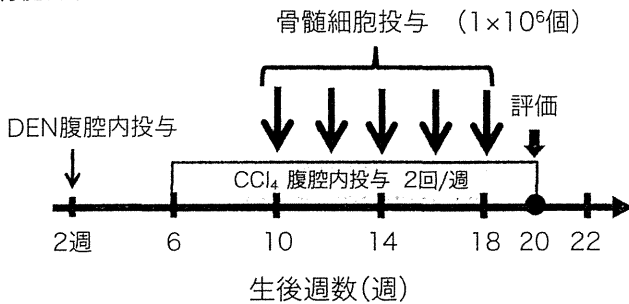


図1 マウス肝硬変高発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)

生後2週雄C57BL/6マウス腹腔内にN-nitrosodiethylamineを単回投与し、さらにDEN投与後1カ月からCarbon tetrachlorideを週2回腹腔内反復投与し、マウス肝硬変高発癌モデル(DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)とした。これにDEN投与後2カ月目から2週間毎に同種同系マウスGFP陽性骨髄単核球細胞(1×10<sup>6</sup>個)を尾静脈から計5回投与し、組織学的にfociおよび腫瘍(腺腫+肝細胞癌)の発生率、個数と大きさを評価した。

SOD3蛋白：rabbit anti-SOD3 antibody (ab81144, Abcam)・100倍希釈、Nrf2蛋白：rabbit anti-Nrf2 antibody (ab31163, Abcam)・100倍希釈で使用した。また、蛍光二重染色でSOD3蛋白：goat anti-SOD3 antibody (SC3222, Santa cruz biotechnology)を用いた。

### 3. 肝8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の定量

マウス肝の8-OHdG測定には、8-OHdG ELISA Assay Kitを用いた。すべてのサンプルにおいて3回の測定を行った。

### 4. 肝superoxide dismutase (SOD)活性の測定

マウス肝のSOD活性測定には、SOD Assay Kitを用いた。すべてのサンプルにおいて3回の測定を行った。

### 5. 有意差検定

スチューデントのt検定で行った。p値が0.05以下を有意差ありとした。

## 3 結果

### 1. 肝硬変高発癌マウスにおける頻回の骨髄細胞投与は肝発癌を抑制した

DEN投与後2カ月のマウス肝では、肝内にはfociや腫瘍は認めなかった。このまだ発癌はしていないが高発癌状態である段階から骨髄細胞の投与を開始した。肝発癌動態を組織学的に評価したDEN投与後4.5カ月では、コントロール群(Ctrl)、骨髄群の両群において肝内にfociや腫瘍である腺腫、肝細胞癌を認めた(図2)。さらに、組織学的にfociおよび腫瘍と判断した病変においてAFP免疫染色を行い、病変部でAFPが陽性になることを確認した。肝発癌動態は、発生率、個数、大きさの3因子で評価した。結果、DEN投与後4.5カ月のマウス肝において、fociの発生率は骨髄群において有意に低下しており[Ctrl, 12/17=70.1%；骨髄群, 4/23=17.4%； $p=0.0004<0.001$ ]、また発生数も骨髄群で有意に低下していた[Ctrl, 2.01/cm<sup>2</sup>；骨髄群, 0.61/cm<sup>2</sup>； $p=0.003<0.01$ ]。一方、大きさに関しては両群間で差は認めなかった[Ctrl, 0.51 mm<sup>2</sup>；骨髄群, 0.28 mm<sup>2</sup>； $p=0.35$ ]。また、腫瘍に関してもDEN投与後4.5カ月のマウス肝において、発生率[Ctrl, 11/17=64.7%；骨髄群, 7/23=30.4%； $p=0.03<0.05$ ]、個数[Ctrl, 2.07/cm<sup>2</sup>；骨髄群, 0.62/cm<sup>2</sup>； $p=0.006<0.01$ ]ともに骨髄群で有意に低下していた。なお、大きさに関しては、両群間で差を認めなかった[Ctrl, 4.70 mm<sup>2</sup>；骨髄群, 3.50 mm<sup>2</sup>； $p=0.43$ ]。これらの結果から、肝硬変高発癌マウスにおいてABMiは肝発癌を促進させないばかりではなく、有意に肝発癌を抑制することが示された。

### 2. 投与骨髄細胞の多くは背景肝の線維束に沿って生着していた

投与骨髄細胞の硬変肝における局在を、GFP免疫染色にて評価した。GFP陽性投与骨髄細胞は、背景肝の線維部に沿って生着していたが、腫瘍部には明らかなGFP陽性細胞は認めなかった。

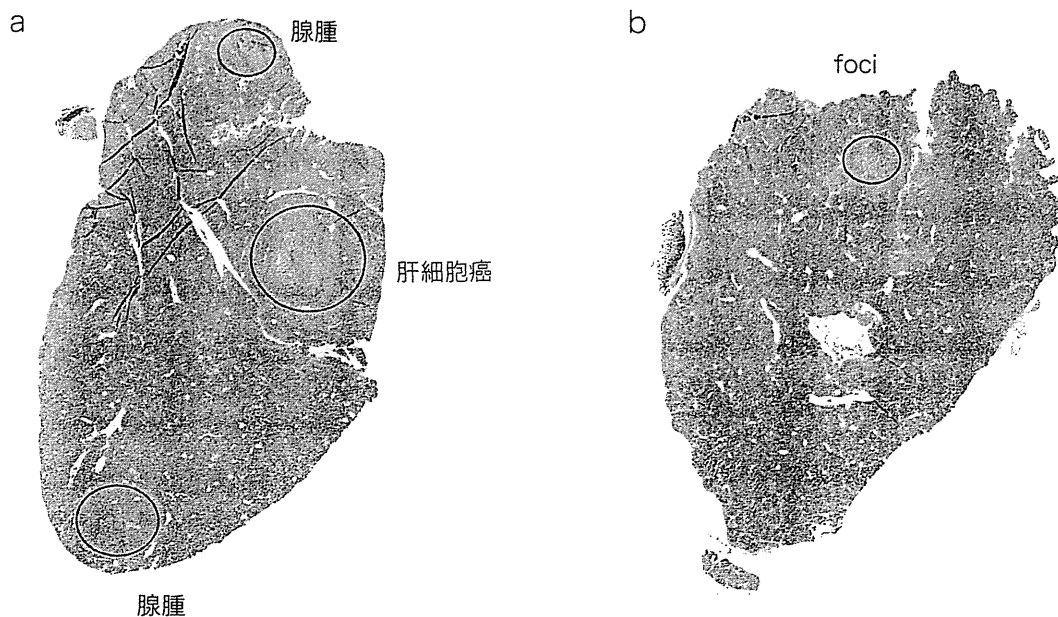


図2 N-nitrosodiethylamine 投与後4.5カ月のマウス肝組織

a: コントロール群 b: 骨髄群

DEN 投与後4.5カ月では組織学的に foci や腫瘍(腺腫+肝細胞癌)を認める(H&E 染色, 40倍の撮影画像を合成処理したもの).

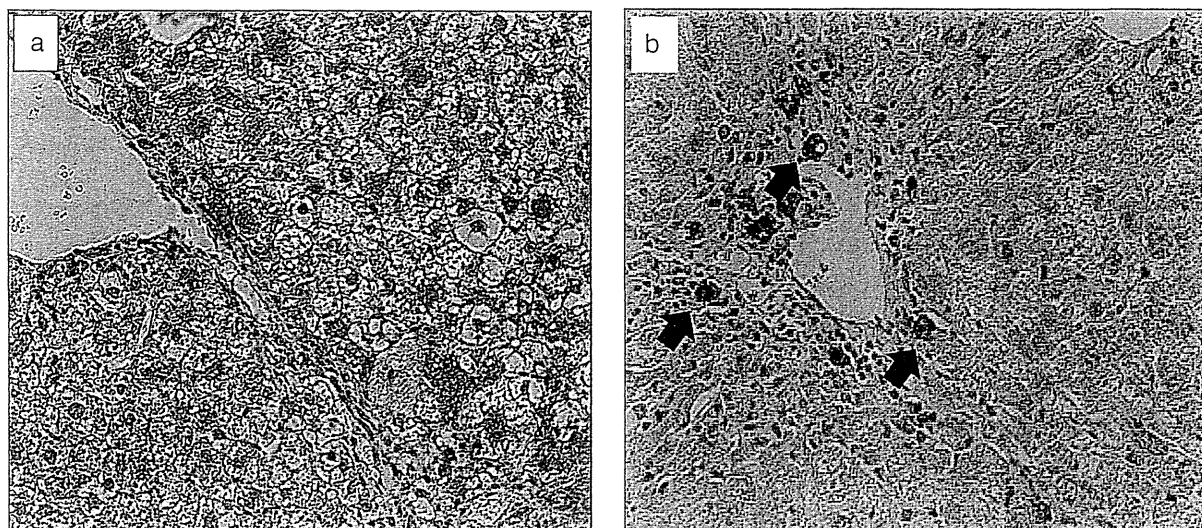


図3 N-nitrosodiethylamine 投与後4.5カ月の背景肝における Nrf2 蛋白の核内移行

a: コントロール群 b: 骨髄群 (Nrf2 抗体による免疫染色, ×200)

骨髄群において核内での Nrf2 発現を多く認めた(矢印)

また, GFP 陽性細胞由来の腫瘍形成は認めなかった.

### 3. 骨髄群において肝線維化は抑制されていた

肝線維化をシリウスレッド染色陽性面積で評価したが, われわれがこれまで報告してきた GFP/ $\text{CCl}_4$  モデルと同様に, 骨髄群で有意に肝線維化は抑制されていた [ $p=0.03<0.05$ ].

### 4. 骨髄群において肝内の酸化ストレスは制御されていた

肝内での酸化ストレスを評価するために, DNAの酸化ストレスマーカーである肝組織中の 8-OHdG 量を ELISA 法で評価したところ, 骨髄群で有意に低値であった [ $p=0.005<0.01$ ]. また, 抗酸化酵素のひとつである SOD 活性は骨髄群で有

意に高かった [ $p < 0.05$ ]. 加えて, SODの分画の1つである細胞外分泌型SOD3蛋白を免疫染色で評価したところ, 骨髓群の背景肝において多くのSOD3陽性細胞を認めた. さらに, SOD3とGFPとの蛍光二重染色では, SOD3陽性となる細胞の多くがGFP共陽性となることを確認した. 次に, 酸化ストレスを制御する転写因子であるNrf2蛋白の核内移行を免疫染色で評価したところ, 骨髓群の背景肝で多くのNrf2蛋白の核内移行を認めた(図3). これらの結果から, 投与した骨髓細胞が直接的にSOD3を分泌することで肝内のSOD活性は高く維持され, その結果として, 肝内での酸化ストレスが持続的に抑制された可能性が示唆された.

## 4 考察

骨髓細胞に存在する細胞の中には, さまざまな細胞に分化する能力をもつ細胞の存在が知られている<sup>13~16)</sup>. 骨髓細胞は腸骨などから比較的簡単に採取することが可能で, また自己由来細胞を用いれば免疫拒絶反応などの懸念がないため, 近年はさまざまな分野において骨髓細胞を用いた新しい再生療法の開発が進められている<sup>17~20)</sup>.

骨髓細胞と癌との関係性については, これまでに動物モデル実験で骨髓細胞が炎症性サイトカインの働きを抑制することにより癌細胞の増殖を抑えたという報告がある<sup>21~23)</sup>. しかしその一方で, 骨髓細胞が炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)6を分泌することにより癌の進展を促進させたという報告や<sup>24, 25)</sup>, 骨髓細胞は癌には影響を与えなかったとの報告もある<sup>9, 26)</sup>など, 一定の見解は得られていないのが現状である. そこで今回われわれは, ABMiの肝発癌に与える影響を評価した.

その結果, 骨髓群ではコントロール群と比較して, 前癌性病変であるfociと腫瘍ともにその発生率, 個数は有意に抑制されていることを確認した. 近年, Liang Pらは, B型肝硬変症患者に対するABMi後の長期経過観察で, 有意差はないものの骨髓群で肝細胞癌の発生率が低い傾向であったことを報告している<sup>27)</sup>. 今回のわれわれのマウスモ

デルにおいては, ABMiは肝発癌を促進させないばかりではなく, 肝発癌を有意に抑制した. これらの結果から, 投与した骨髓細胞が肝硬変高発癌環境下において積極的に肝発癌の抑制に寄与している可能性が考えられた.

さらに, 投与した骨髓細胞はこれまでのわれわれのマウスGFP/ $\text{CCl}_4$ モデルで報告してきたのと同様に肝線維束に沿って生着しており<sup>3)</sup>, 投与した骨髓細胞由来の腫瘍形成は確認されなかった. 加えて, 骨髓群マウス肝に形成されたfociおよび腫瘍はDEN単回投与による肝発癌モデルで観察されるfociおよび腫瘍と同様<sup>28, 29)</sup>にAFP陽性であった. これらの結果は, 高発癌環境下においても投与骨髓細胞自身が癌化することは極めて稀であることを示しており, 肝硬変高発癌状態へのABMiの安全性を示す1つのエビデンスであると考える.

次に, このようなABMiが肝発癌を抑制した現象のメカニズム解析を行った. 骨髓群はコントロール群と比較し有意な線維化の改善を認めた. C型肝炎では肝線維化が進行につれて肝発癌率は上昇することは広く知られており<sup>30)</sup>, ABMiによる肝線維化の抑制が肝発癌抑制にも寄与している可能性がある.

また, 酸化ストレスの上昇が肝発癌を促進させることは, C型肝炎などでも多くの報告がある<sup>31)</sup>. 今回の骨髓群で肝8-OHdG量は有意に低値であったことから, ABMiにより肝内の酸化ストレスを持続的に抑制したことが, 肝発癌抑制に寄与した可能性が考えられた.

さらに, これら肝内での酸化ストレスを抑制させた要因の検討を行ったところ, 骨髓群で肝内のSOD活性の上昇や多くのNrf2蛋白の核内移行を確認することができた. したがって, ABMiはこれら抗酸化ストレス作用のある因子を活性化させ, 肝内での酸化ストレスを抑えることにより肝発癌を抑制したと考えた.

続いて, Kevinらは, ABMiによりSOD3の上昇がみられたと報告している<sup>32)</sup>ことから, SODの発現についての検討を行ったところ, SOD3の発現増加を認め, そのSOD3陽性細胞の多くが

GFP共陽であったことから、投与した骨髄細胞自身がSOD3 蛋白を分泌し、その結果肝内の酸化ストレスを直接的に抑制している可能性が考えられた。

以上、今回のわれわれの研究によって高発癌肝硬変症へのABMiは肝発癌を抑制することが明らかとなった。今後、さらなる発癌抑制メカニズムの解析は必要であるが、自己骨髄細胞による肝線維化の抑制と肝内での酸化ストレス制御が発癌抑制に重要であることが示唆された。また今回の知見は、肝移植以外に根治療法がなかった非代償性肝硬変症に対するABMi療法を推進していくうえで安全性の根拠となるだけでなく、肝発癌を抑制させる新規治療法のひとつになる可能性が示された。

#### 文献

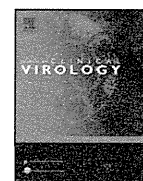
- 1) Takami T, Terai S, Sakaida I : Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Current state and future prospects for our liver regeneration therapy using autologous bone marrow cells for decompensated liver cirrhosis patients. *J Pharmacol Sci* 115 : 274–278, 2011
- 2) Terai S, Sakaida I, Nishina H et al : Lesson from the GFP/CCl4 model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12 : 203–207, 2005
- 3) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N et al : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 : 1304–1311, 2004
- 4) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N et al : An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 134 : 551–558, 2003
- 5) Terai S, Ishikawa T, Omori K et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24 : 2292–2298, 2006
- 6) Terai S, Sakaida I : Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18 : 23–25, 2011
- 7) Terai S, Sakaida I : Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res* 38 : S72–S75, 2008
- 8) Lazennec G, Jorgensen C : Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26 : 1387–1394, 2008
- 9) Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al : Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449 : 557–563, 2007
- 10) Donato F, Boffetta P, Puoti M : A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 75 : 347–354, 1998
- 11) Castells L, Vargas V, Gonzalez A et al : Long interval between HCV infection and development of hepatocellular carcinoma. *Liver* 15 : 159–163, 1995
- 12) Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG et al : Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 14 : 969–974, 1991
- 13) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701–705, 2001
- 14) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 : 11–16, 2000
- 15) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143–147, 1999
- 16) Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 : 71–74, 1997
- 17) McTaggart SJ, Atkinson K : Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 12 : 44–52, 2007
- 18) Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I et al : Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81 : 1390–1397, 2006
- 19) Bunnell BA, Deng W, Robinson CM et al : Potential application for mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. *Can J Physiol Pharmacol* 83 : 529–539, 2005
- 20) El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR : Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev* 13 : 463–472, 2004
- 21) Pisati F, Belicchi M, Acerbi F et al : Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. *Cancer Res* 67 : 3054–3063,

- 2007
- 22) Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C et al : Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 75 : 248–255, 2003
- 23) Maestroni GJ, Hertens E, Galli P : Factor (s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci* 55 : 663–667, 1999
- 24) Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW et al : Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *Faseb J* 21 : 3763–3770, 2007
- 25) Zhu W, Xu W, Jiang R et al : Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 80 : 267–274, 2006
- 26) Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M et al : Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 67 : 6304–6313, 2007
- 27) Peng L, Xie DY, Lin BL et al : Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 54 : 820–828, 2011
- 28) Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K et al : Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 67 : 9844–9851, 2007
- 29) Koen H, Pugh TD, Nychka D et al : Presence of alpha-fetoprotein-positive cells in hepatocellular foci and microcarcinomas induced by single injections of diethylnitrosamine in infant mice. *Cancer Res* 43 : 702–708, 1983
- 30) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med* 131 : 174–181, 1999
- 31) Moriya K, Nakagawa K, Santa T et al : Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 61 : 4365–4370, 2001
- 32) Kemp K, Hares K, Mallam E et al : Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. *J Neurochem* 114 : 1569–1580, 2010

\*

\*

\*



## Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis

Jun Inoue<sup>a</sup>, Yoshiyuki Ueno<sup>a,\*</sup>, Kaori Kawamura<sup>b</sup>, Takeshi Yamamoto<sup>c</sup>, Yutaka Mano<sup>d</sup>, Masahito Miura<sup>e</sup>, Tomoo Kobayashi<sup>f</sup>, Hirofumi Niitsuma<sup>a</sup>, Yasuteru Kondo<sup>a</sup>, Eiji Kakazu<sup>a</sup>, Masashi Ninomiya<sup>a</sup>, Osamu Kimura<sup>a</sup>, Noriyuki Obara<sup>g</sup>, Naoki Kawagishi<sup>h</sup>, Yoshitaka Kinouchi<sup>a</sup>, Tooru Shimosegawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

<sup>b</sup> Tohoku University School of Health Sciences, Sendai, Japan

<sup>c</sup> Department of Gastroenterology, Tohoku Kosei-Nenkin Hospital, Sendai, Japan

<sup>d</sup> Department of Gastroenterology, Sendai Medical Center, Sendai, Japan

<sup>e</sup> Department of Gastroenterology, South Miyagi Medical Center, Miyagi, Japan

<sup>f</sup> Department of Hepatology, Tohoku Rosai Hospital, Sendai, Japan

<sup>g</sup> Department of Gastroenterology, Iwate Prefectural Central Hospital, Morioka, Japan

<sup>h</sup> Division of Advanced Surgical Science and Technology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 February 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 20 June 2012

#### Keywords:

HBV

FHB

Genotype

T1961V

C1962D

### ABSTRACT

**Background:** The viral factors of hepatitis B virus (HBV), such as genotypes and mutations, were reported to affect the development of fulminant hepatitis B (FHB), but the mechanism is still unclear.

**Objectives:** To investigate HBV mutations associated with FHB, especially in the subgenotype B1/Bj HBV (HBV/B1), which are known to cause FHB frequently in Japan.

**Study design:** A total of 96 serum samples from acute self-limited hepatitis B (AHB) patients and 13 samples from FHB patients were used for full-genome/partial sequencing. A total of 107 chronic infection patients with HBV were also examined for the distribution of mutants.

**Results:** In the analysis of full-genome sequences of HBV/B1 (FHB,  $n = 11$ ; non-FHB,  $n = 35$ ) including those from the databases, mutations at nt 1961 [T1961V (not T)] and nt 1962 [C1962D (not C)], which change S21 in the core protein, were found more frequently in FHB than in non-FHB (100% vs. 20%, 55% vs. 3%, respectively). When our FHB and AHB samples were compared, T1961V and C1962D were significantly more frequent in FHB than in AHB, both in the overall analysis (46% vs. 6%, 39% vs. 3%, respectively) and in HBV/B1 (100% vs. 29%, 100% vs. 14%, respectively). A newly developed PCR system detecting T1961V showed that HBV/B1 and low viral load were independent factors for the mutation among chronic infection patients.

**Conclusions:** T1961V/C1962D mutations were found frequently in FHB, especially in HBV/B1. The resulting S21 substitution in the core protein may play important roles in the development of FHB.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Background

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most common viral diseases affecting humans. HBV causes a spectrum of liver

diseases such as acute hepatitis, chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.<sup>1</sup> Patients with acute HBV infection sometimes develop fulminant hepatitis B (FHB). The survival rate of FHB patients is still low<sup>2</sup> and they require careful management including liver transplantation.<sup>3</sup>

HBV contains a small (3.2 kb), circular, partially double-stranded DNA genome.<sup>1</sup> Based on the genomic variability noted among HBV isolates, HBV sequences have been classified into at least 8 genotypes (A–H), and recently, additional 2 genotypes (I and J) were proposed tentatively.<sup>4,5</sup> The genotypes/subgenotypes of HBV have been known to affect the disease outcome.<sup>6–8</sup> As for FHB, the subgenotype B1/Bj HBV (HBV/B1) was reported to be more often associated than subgenotypes B2/Ba, genotype A, and genotype

**Abbreviations:** AHB, acute self-limited hepatitis B; CTL, cytotoxic T lymphocyte; FHB, fulminant hepatitis B; HBV, hepatitis B virus; HBV/B1, subgenotype B1/Bj HBV; HBV/C2, subgenotype C2/Ce HBV; SSP, sequence-specific primer.

\* Corresponding author at: Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō, Aobaku, Sendai 980-8574, Japan.

Tel.: +81 22 717 7171; fax: +81 22 717 7177.

E-mail addresses: [yueno@med.tohoku.ac.jp](mailto:yueno@med.tohoku.ac.jp), [y-ueno@med.id.yamagata-u.ac.jp](mailto:y-ueno@med.id.yamagata-u.ac.jp) (Y. Ueno).

C.<sup>6,9</sup> Although HBV genotypes are classified by a sequence divergence of more than 8% in the entire genome,<sup>10</sup> little is known about which region or nucleotide substitutions of the genome are responsible for the disease outcome differences among genotypes.

Several mutations in the precore region such as G1896A,<sup>6,9,11–15</sup> which makes a stop codon and abrogates HBeAg, and those in the core promoter such as double mutations of A1762T/G1764A<sup>6,9,16</sup> were reported to be associated with FHB. Also, T1753V [A, C or G (not T)],<sup>14</sup> T1754V,<sup>14</sup> G1899A,<sup>9</sup> and A2339G<sup>9</sup> were found in FHB patients more frequently than in AHB patients. Some of them were described as having the ability to enhance the replication capacity of HBV in vitro.<sup>6,17–19</sup> Recently, we reported that insertions/deletions in the precore region, which cause a frameshift of the precore protein and abrogates HBeAg, was found frequently in FHB patients with HBV/B1 and enhanced the replication capacity of HBV in vitro.<sup>15</sup> However, some conflicting results have been described<sup>20,21</sup> and it is considered that there are still unknown mechanisms in regard to the pathogenesis of FHB.

## 2. Objectives

Here we studied HBV mutations that were associated with FHB by analyzing full-genome sequences. Next, additional patients with acute and chronic HBV infection were analyzed for clarifying prevalence of mutations.

## 3. Study design

### 3.1. Serum samples

A total of 109 serum samples from patients with acute HBV infection including 13 FHB patients and a total of 107 serum samples from patients with chronic HBV infection were obtained from March 1998 to August 2011 in Tohoku University Hospital and other 5 hospitals in the same area. The diagnosis of acute infection was made based on the detection of high-titered immunoglobulin M anti-hepatitis core without any history of prior liver diseases. There were no acute infection patients who retained HBsAg for more than 6 months. The diagnosis of fulminant hepatitis was made based on a slightly modified definition in Inuyama Symposium (Aichi, Japan, 1981) of the original definition<sup>22</sup>: coma grade II or higher, and a prothrombin time of less than 40% developing within 8 weeks after the onset.

### 3.2. Amplification of HBV sequences and determination of genotypes

To determine the full-genome sequences of HBV, serum samples from 10 of 13 FHB patients were used. Because the sample volume of the remaining 3 samples was relatively small, they were used only for partial sequencing. Additionally, a serum sample from HBV carrier who developed FHB was studied only for full-genome comparison. The same samples that were used for full-genome sequencing in this study had been used also in a previous report to determine only partial sequences.<sup>15</sup> Amplification of the entire HBV genome was performed by methods essentially similar to those described previously.<sup>23</sup> To amplify the 548-nt sequence in the core promoter/precore/core region [nt 1719–2266 (excluding primer sequences), the nucleotide numbers are in accordance with an HBV/B1 isolate of 3215 nt (D00329)], the DNA solution was subjected to nested PCR. The first round PCR was carried out with primers B053 (Table S1) and B055, and the second round was carried out with primers B054 and B052. The amplification products were sequenced on both strands directly using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit on an ABI PRISM 3100 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The AHB/FHB samples used for partial sequencing had never used in the previous study.

For patients with chronic HBV infection, an HBsAg subtype EIA kit (Institute of Immunology, Tokyo, Japan) was used to determine the genotypes of HBV. Only genotype B samples were subjected to direct sequencing for subgenotyping.

### 3.3. PCR with sequence-specific primers detecting the mutation at nt 1961

To detect mutations at nt 1961 (T1961V) rapidly without the sequencing analysis, a PCR system with sequence-specific primers (SSP) was newly developed in this study. Because the sequences around nt 1961 were relatively conserved, two opposite primers, B050 and B051, whose 3' ends are located at nt 1961 could be designed. B050 can anneal only with T1961V mutants to make 349 bp products. B051 can detect sequences without T1961V and make 208 bp products. The DNA solution was subjected to PCR with primers 8 pmol of B049, B051, and B052, and 64 pmol of B050, and AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems) in 20  $\mu$ l reaction. The PCR was carried out for 40 cycles (95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, 72 °C for 60 s). If both 208 bp and 349 bp products were amplified, the HBV was considered to have the mix type mutations at nt 1961.

### 3.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Fisher's exact probability test or the chi-square test for comparison of proportions between two groups and Mann–Whitney *U* test for comparison of continuous variables between two groups. Multivariate analyses were performed with a logistic regression model using SPSS Statistics 19 (IBM, Armonk, NY).

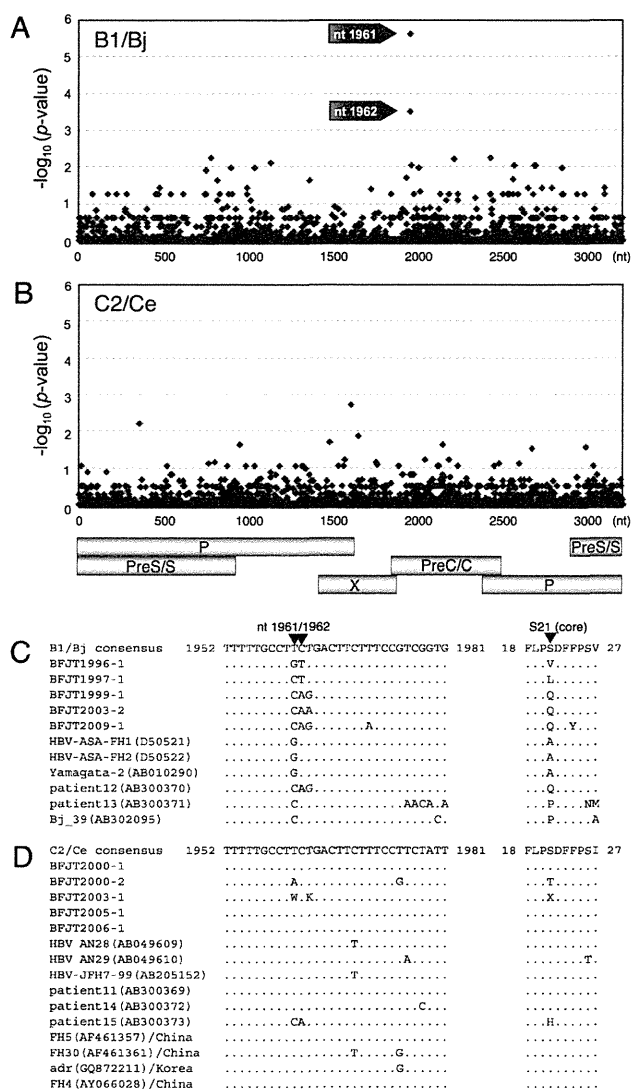
## 4. Results

### 4.1. Full-genome comparative analysis of HBV

Of 10 full-genome sequences from FHB patients, 4 sequences were revealed to belong to HBV/B1 and 5 sequences were subgenotype C2/Ce (HBV/C2), and one sequence was subgenotype B2/Ba. A sequence from an HBV carrier who developed FHB (BFJT2009-1) was HBV/B1. A phylogenetic tree was constructed based on the full-genome sequences of genotype A–J HBV (Fig. S1) and the sequence data have been assigned to the GenBank/EMBL/DDBJ with the accession numbers AB642091–AB642101.

In August 2011, a total of 41 full-genome sequences of HBV/B1 could be retrieved from Hepatitis Virus Database<sup>24</sup> and GenBank/EMBL/DDBJ. Of them, 6 were obtained from FHB patients, and 35 were others including chronically infected patients. First, a consensus sequence of HBV/B1 was deduced from the 35 non-FHB strains. Then the numbers of nucleotide mutations, which were different from the consensus sequence, in all of the 3215 nt of the HBV/B1 genome were compared between FHB ( $n = 11$ , including 5 sequences determined in this study) and non-FHB. When the *p*-values of mutations were calculated in each nucleotide, only nt 1961 and 1962 had lower *p*-values than  $1.0 \times 10^{-3}$  (Fig. 1A). The full-genome sequences of HBV/C2 were also compared between FHB ( $n = 15$ , including 5 sequences determined in this study) and non-FHB ( $n = 35$ ) in the same way (Fig. 1B). However, such a low *p*-value was not found in the HBV/C2 strains. Table S2 shows the nucleotides that had lower *p*-values than  $1.0 \times 10^{-2}$ . The partial nucleotide sequences of HBV/B1 around nt 1961/1962 are shown in Fig. 1C. All of the 11 FHB strains had the mutation at nt 1961 and 6 strains had the mutation at nt 1962. Although the mutations at nt





**Fig. 1.** Comparison of HBV full-genome sequences between FHB and non-FHB. (A) Comparison of HBV/B1 between FHB ( $n = 11$ ) and non-FHB ( $n = 35$ ). The frequencies of mutations at each nucleotide were analyzed, and the reciprocal numbers of  $p$  values were plotted. (B) Comparison of HBV/C2 between FHB ( $n = 15$ ) and non-FHB ( $n = 35$ ). (C) Partial nucleotide sequences of HBV/B1 around nt 1961/1962 and deduced amino acid sequences of FHB strains. The consensus sequences deduced from non-FHB sequences are indicated at the top. (D) Sequences of HBV/C2. W (nucleotide), T or A; X (amino acid), S or T.

1961/1962 were minor in HBV/C2 (Fig. 1D), 3/15 (20%) of FHB and 2/35 (6%) of non-FHB had the mutations. These mutations could change the amino acid of S21 in the core protein (Fig. 1C and D), which is located in an HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope of HbcAg18–27.<sup>25</sup>

**4.2. Distribution of S21 substitution among patients with HBV acute infection**

Next we compared partial sequences containing nt 1961/1962 using our acute self-limited hepatitis B (AHB,  $n = 96$ ) and FHB ( $n = 13$ ) samples. The clinical characteristics of FHB/AHB patients are shown in Table 1. Consistent with previous reports,<sup>6,9</sup> the HBeAg positive rate was significantly lower in FHB patients. As reported previously from Japan, HBV/C2 was most prevalent

**Table 1**  
Clinical characteristics of patients with FHB and AHB in this study.

	FHB ( $n = 13$ ) <sup>a</sup>	AHB ( $n = 96$ ) <sup>a</sup>	$p$ -Value
Age	45.2 ± 16.0	32.5 ± 13.1	0.004
Male	11 (84.6)	59 (61.5)	0.088
HBeAg positive	1 (7.7)	61 (67.8)	<0.0005
Peak T. Bil (mg/dl) <sup>b</sup>	15.1 ± 8.8	9.0 ± 9.0	0.096
Peak AST (IU/l) <sup>b</sup>	4663 ± 3786	1451 ± 1686	0.074
Peak ALT (IU/l) <sup>b</sup>	4841 ± 3850	2350 ± 1735	0.300
Lowest PT (%) <sup>b</sup>	19.7 ± 11.6	73.7 ± 23.8	<0.0005
HBV DNA (log copies/ml) <sup>c</sup>	6.7 ± 2.2	6.7 ± 1.9	0.954
HBV subgenotype			
A2/Ae	0 (0)	19 (19.8)	0.070
B1/Bj	4 (30.8)	14 (14.6)	0.141
B2/Ba	2 (15.4)	5 (5.2)	0.196
B7	0 (0)	1 (1.0)	0.238
C1/Cs	0 (0)	3 (3.1)	0.681
C2/Ce	7 (53.8)	54 (56.3)	0.680
Therapy			
Liver transplantation	3 (23.1)	0 (0)	0.001
Nucleoside analog <sup>d</sup>	4 (38.5)	9 (9.4)	0.048
Deceased	6 (46.2)	0 (0)	<0.0001

T. Bil, total bilirubin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; PT, prothrombin time.

<sup>a</sup> Values are expressed as the mean ± standard deviation or numbers of patients (%).

<sup>b</sup> Data of 28 patients could not be obtained.

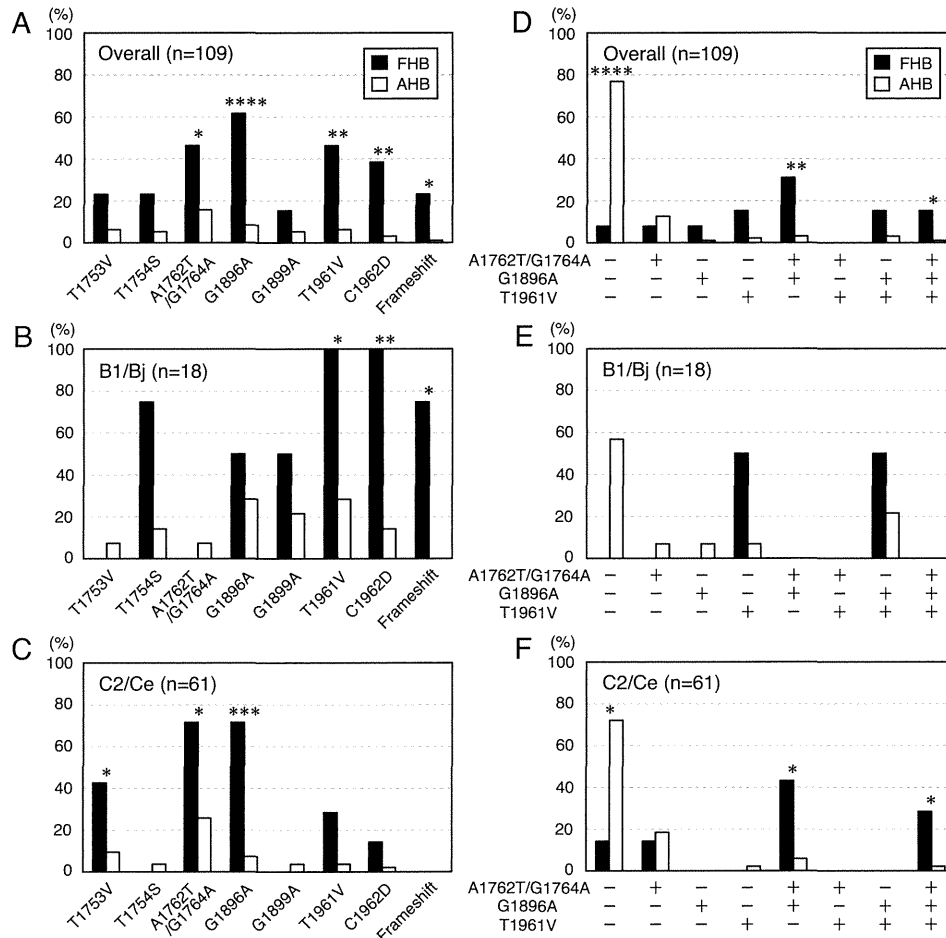
<sup>c</sup> Data of 8 patients could not be obtained.

<sup>d</sup> Lamivudine or entecavir was used.

(61/109, 56%). HBV/B1 was found more frequently (18/109, 17%) than the reports of all Japan (7%)<sup>26</sup> and was reported to be a characteristic of northeast Japan.<sup>7,15</sup>

Besides the mutations at nt 1961 and 1962, several mutations that were reported to be associated with FHB<sup>6,9,11–14,16</sup> were compared. The frameshift insertions/deletions in the precore region that we reported recently<sup>15</sup> were also included. In the overall analysis, the mutations of G1896A, T1961V, and C1962D [A, G or T (not C)] were found much more frequently in FHB patients than in AHB patients (62% vs. 8%,  $p = 3.0 \times 10^{-5}$ ; 46% vs. 6%,  $p = 5.4 \times 10^{-4}$ ; 39% vs. 3%,  $p = 5.1 \times 10^{-4}$ , respectively) (Fig. 2A). The mutations of A1762T/T1764A and the precore frameshift were significantly more frequent in patients with FHB (48% vs. 16%,  $p = 0.018$ ; 23% vs. 1%,  $p = 0.0051$ ), as well. Notably, when HBV/B1 isolates were compared, the frequencies of only T1961V, C1962D, and the precore frameshift were significantly different (100% vs. 29%,  $p = 0.023$ ; 100% vs. 14%,  $p = 0.0049$ ; 75% vs. 7%  $p = 0.019$ ) (Fig. 2B). In the analysis of HBV/C2 isolates, G1896A (71% vs. 7%,  $p = 3.9 \times 10^{-4}$ ), A1762T/G1764A (71% vs. 26%,  $p = 0.026$ ), and T1753V (43% vs. 9%,  $p = 0.042$ ) were significantly more frequent in FHB patients (Fig. 2C), different from HBV/B1.

Additionally, we analyzed the T1961V frequency in combination with the major mutations G1896A and A1762T/G1764A. In the overall analysis, the frequency of isolates without these mutations was significantly higher in AHB than FHB (77% vs. 8%,  $p = 1.8 \times 10^{-6}$ ) (Fig. 2D). The combinations of A1762T/G1764A and G1896A, and all three mutations were found more frequently in FHB patients than in AHB patients (31% vs. 3%,  $p = 0.0036$ ; 15% vs. 1%,  $p = 0.037$ , respectively). When analyzed separately 2 subgenotypes, the distribution of combination pattern in FHB patients was quite different (Fig. 2E and F). Whereas T1961V was present alone (50%) or with G1896A (50%) in HBV/B1, all HBV/C2 isolates with T1961V had both A1762T/G1764A and G1896A. Because the all HBV/B1 isolates only with T1961V had the precore frameshift, which abrogates HBeAg like as G1896A,<sup>15</sup> T1961V seemed to be related to HBeAg-defective strains.



**Fig. 2.** Comparison of mutations between FHB and AHB in the core promoter/precure/core region. Besides T1961V and C1962D, several mutations that had been reported to be associated with FHB were also included. (A) Comparison of the overall HBV sequences between FHB ( $n = 13$ ) and AHB ( $n = 96$ ). (B) Comparison of HBV/B1 between FHB ( $n = 4$ ) and AHB ( $n = 14$ ). (C) Comparison of HBV/C2 between FHB ( $n = 7$ ) and AHB ( $n = 54$ ). D = A, G or T (not C); S = C or G; V = A, C or G (not T); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ; \*\*\*\* $p < 0.00005$ .

#### 4.3. Distribution of T1961V in chronically HBV-infected patients

A PCR system with SSP was established in this study to detect T1961V more easily (Fig. 3). Using the PCR system, the frequency of T1961V was evaluated using 107 chronically HBV-infected patients [mean age,  $50.6 \pm 13.8$ ; male, 73 (68.2%); HBeAg positive, 49 (45.8%); mean ALT (IU/l),  $142.9 \pm 177.7$ ; mean HBV DNA (log copies/ml),  $6.4 \pm 1.7$ ; liver cirrhosis, 27 (25.2%); hepatocellular carcinoma, 20 (18.7%)]. Of them, 103 (96%) could be determined to be a wild type or a mutant at nt 1961. The remaining 4 patients showed only 512 bp products. Sequencing analysis showed that HBV of the 4 patients had minor mutations within the B051-annealing site and no mutation at nt 1961. In total, 18/107 (17%) patients had T1961V mutants including the mixed type (Table 2). Of note, the frequency of T1961V including the mixed type was significantly higher in HBeAg-negative patients than in HBeAg-positive patients (29% vs. 2%,  $p = 1.7 \times 10^{-4}$ ). Patients with low HBV DNA levels ( $< 6.6$  log copies/ml) in the serum had T1961V mutants more frequently than those with high levels (31% vs. 4%,  $p = 1.8 \times 10^{-4}$ ). Although patients treated with nucleos(t)ide analogs had T1961V mutants frequently, it may be a result from the fact that HBeAg-negative patients with low HBV DNA are rarely treated with nucleos(t)ide analogs. When the HBV genotypes were

compared, the T1961V mutants were detected more frequently in HBV/B1 than in the others (41% vs. 11%,  $p = 0.002$ ). HLA-A2 positivity, which was detected as described previously,<sup>27,28</sup> was not associated with the mutation significantly. A multivariate analysis showed that the HBV/B1 (odds ratio 7.635,  $p = 0.006$ ) and HBV DNA levels (odds ratio 0.548,  $p = 0.009$ ) were independent factors for the T1961V mutation.

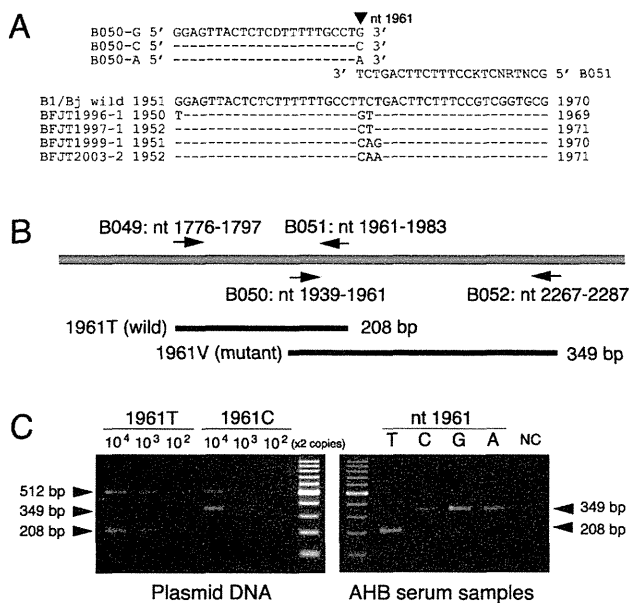
#### 5. Discussion

In this study, we found first that the S21 substitution in the core protein due to T1961V ( $\pm$ C1962D) was associated with FHB, especially in HBV/B1. Because the first stage analysis of HBV full-genome sequences included HBV strains from chronically infected patients in the databases, mutations that were common in chronic infection such as G1896A<sup>29</sup> and A1762T/G1764A<sup>30</sup> were not detected. In the analysis, only mutations at nt 1961 and 1962 in HBV/B1 were picked up with lower  $p$ -values than  $1.0 \times 10^{-3}$ , and we could confirm that these mutations were more frequent in FHB patients in the second stage analysis of our acutely infected patients. Therefore, the rapid examination of T1961V by PCR with SSP in this study was considered to be useful to predict the development of FHB in acutely infected patients.

**Table 2**  
Distribution of the mutation at nt 1961 among HBV chronically infected patients detected by PCR with SSP.

	n	Wild type (%)	Mixed type (%)	Mutant (%)	p-Value <sup>a</sup>
Overall	107	89(83.2)	6(5.6)	12(11.2)	
Age (years)					0.245
<53	56	49(87.5)	1(1.8)	6(10.7)	
≥53	51	40(78.4)	5(9.8)	6(11.8)	
HBeAg					<0.0005
Positive	49	48(98.0)	0(0)	1(2.0)	
Negative	58	41(70.7)	6(10.3)	11(19.0)	
HBV DNA (log copies/ml)					<0.0005
<6.6	52	36(69.2)	6(11.5)	10(19.2)	
≥6.6	55	53(96.4)	0(0)	2(3.6)	
Liver cirrhosis					0.496
Present	27	22(81.5)	3(11.1)	2(7.4)	
Absent	80	67(83.8)	3(3.8)	10(12.5)	
Hepatocellular carcinoma					0.083
Present	20	14(70.0)	4(20.0)	2(10.0)	
Absent	87	75(86.2)	2(2.3)	10(11.5)	
Treatment					0.049
Nucleos(t)ide analog <sup>b</sup>	24	23(95.8)	0(0)	1(4.2)	
Naïve	83	66(79.5)	6(7.2)	11(13.3)	
Genotypes					
A	4	3(75.0)	1(25.0)	0(0)	
B	25	16(64.0)	4(16.0)	5(20.0)	0.006 <sup>c</sup>
B1/Bj	22	13(59.1)	4(18.2)	5(22.7)	0.002 <sup>c</sup>
B2/Ba	3	3(100)	0(0)	0(0)	
C	78	70(89.7)	1(1.3)	7(9.0)	
HLA-A2					0.056
Positive	32	30(93.8)	0(0)	2(6.3)	
Negative	36	29(80.6)	2(5.6)	5(13.9)	

<sup>a</sup> Wild type vs. mixed type and mutant.  
<sup>b</sup> Twenty patients were treated with lamivudine, and 4 patients were treated with combination of lamivudine and adefovir dipivoxil. They were treated for more than 3 months.  
<sup>c</sup> Genotype B or subgenotype B1/Bj vs. others.



**Fig. 3.** Schema of the PCR with SSP established to detect the S21 mutation. (A) Primer sequences used in the PCR and corresponding sequences of the HBV/B1 wild type and 4 HBV/B1 FHB strains. Because the S21 mutants always had T1961V in our analysis, SSP was designed to anneal with either T1961V mutant or wild type. (B) Schema of the positions of primers used in the PCR, and the size of the resulting PCR products. T1961V mutants were distinguished by the difference of amplified products (wild type, 208 bp; mutant, 349 bp). (C) Patterns of the electrophoresis of the PCR products. The left panel shows the products amplified from the plasmid DNA with 1961T and 1961C of 2.0 × 10<sup>4</sup> to 2.0 × 10<sup>2</sup> copies, and the right panel shows the products amplified from DNA of AHB patient sera whose partial HBV sequences including nt 1961 were determined. The 512 bp products amplified by primers of B049 and B052 were not necessarily detected.

nt 1961–1963 of HBV encodes S21 in the core protein, which is located within an HLA-A2 restricted CTL epitope of HBcAg18–27,<sup>25</sup> and T1961V ± C1962D changes S21 to various amino acids. Interestingly, this mutant epitope had been suggested to act as T-cell receptor antagonist leading to inhibition of the CTL response to the wild type CTL epitope,<sup>31</sup> and the S21 substitution was considered to be a CTL escape mutation.<sup>32</sup> However, of our 3 FHB patients whose HLA-A types were known, 2 patients with S21 substitution did not have HLA-A2 (data not shown). Therefore the pathogenesis might not be necessarily due to the immune escape. Also, in patients with chronic infection, there were several HLA-A2-negative patients with T1961V mutants. The association between S21 substitution and HLA types has to be clarified further both in acutely infected patients and in chronically infected patients.

Because this study was limited by the small number of FHB patients and the cross-sectional nature, causal relationship could not be established well. While it is possible that S21 substitution predisposes acute infection patients to FHB, immune pressure during active hepatitis can also induce mutations. The latter possibility is less likely because of the short duration from infection, but further mechanistic study is needed to address the issue.

Through HBeAg seroconversion, which is an important event in chronic HBV infection, the HBV specific CTL repertoire develops, and mutations in the core gene increase.<sup>33</sup> It was reported that the S21 substitution was more frequent in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with low levels of HBV DNA than in those with high levels of HBV DNA,<sup>32</sup> which is concordant with our results. A study from New Zealand reported that, in the core protein, S21 was one of the amino acids under significant positive selection pressure.<sup>34</sup> These data suggested that the S21 substitution favors the persistence of HBV in the late stage of the natural course of HBV chronic infection, despite the developed immunity.

In conclusion, the S21 substitution in the core protein due to T1961V ± C1962D was found more frequently in FHB patients,

especially those with HBV/B1, than in AHB patients or chronically infected patients. This finding may give an insight into the mechanism of FHB and may be useful to predict the development of FHB in acute HBV infection.

### Funding

This work was supported by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (assignment no. 22790627) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and grants from Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

### Competing interests

None.

### Ethical approval

Not required.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.06.011>.

### References

- Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009;**49**(5):S13–21.
- Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: a perspective from Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;**26**(Suppl 1):65–71.
- Hoofnagle JH, Carithers Jr RL, Shapiro C, Ascher N. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 1995;**21**(1):240–52.
- Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samouny B, Thammavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis* 2008;**14**(11):1777–80.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 2009;**83**(20):10538–47.
- Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006;**44**(2):326–34.
- Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009;**47**(5):1476–83.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;**118**(3):554–9.
- Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, et al. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatology* 2009;**49**(7):648–56.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastroewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;**69**(Pt 10):2575–83.
- Kosaka Y, Takase K, Kojima M, Shimizu M, Inoue K, Yoshihara M, et al. Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 1991;**100**(4):1087–94.
- Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991;**324**(24):1705–9.
- Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991;**324**(24):1699–704.
- Imamura T, Yokosuka O, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, et al. Distribution of hepatitis B viral genotypes and mutations in the core promoter and precore regions in acute forms of liver disease in patients from Chiba, Japan. *Gut* 2003;**52**(11):1630–7.
- Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, et al. Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *J Infect Dis* 2011;**204**(7):1017–25.
- Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995;**122**(4):241–8.
- Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, Blum HE, Liang TJ. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol* 1994;**68**(3):1651–9.
- Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996;**98**(10):2268–76.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology* 2007;**365**(2):285–91.
- Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, et al. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol* 2003;**77**(12):6601–12.
- Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J Gen Virol* 2008;**89**(Pt 4):901–9.
- Trey C, Lipworth L, Chalmers TC, Davidson CS, Gottlieb LS, Popper H, et al. Fulminant hepatic failure. Presumable contribution to halothane. *N Engl J Med* 1968;**279**(15):798–801.
- Inoue J, Ueno Y, Kogure T, Nagasaki F, Kimura O, Obara N, et al. Analysis of the full-length genome of hepatitis B virus in the serum and cerebrospinal fluid of a patient with acute hepatitis B and transverse myelitis. *J Clin Virol* 2008;**41**(4):301–4.
- Shin IT, Tanaka Y, Tateno Y, Mizokami M. Development and public release of a comprehensive hepatitis virus database. *Hepatology* 2008;**48**(3):234–43.
- Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, et al. Lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991;**174**(6):1565–70.
- Sugauchi F, Orito E, Ohno T, Tanaka Y, Ozasa A, Kang JH, et al. Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatology* 2006;**43**(2):107–14.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;**46**(5):355–67.
- Kinouchi Y, Matsumoto K, Negoro K, Takagi S, Takahashi S, Hiwatashi N, et al. Hla-B genotype in Japanese patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003;**46**(10 Suppl.):S10–4.
- Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990;**64**(3):1298–303.
- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshihara M, Moriyama K, et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994;**68**(12):8102–10.
- Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, De Carli M, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994;**369**(6479):407–10.
- Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Shahraz S, Norder H, Alavian SM, Noorinayer B, et al. CTL escape mutations of core protein are more frequent in strains of HBeAg negative patients with low levels of HBV DNA. *J Clin Virol* 2009;**46**(3):259–64.
- Akarca US, Lok AS. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* 1995;**22**(1):50–60.
- Abbott WC, Tsai P, Leung E, Trevarton A, Ofanoa M, Hornell J, et al. Associations between HLA class I alleles and escape mutations in the hepatitis B virus core gene in New Zealand-resident Tongans. *J Virol* 2010;**84**(1):621–9.