

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

B型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性
キャリアの長期予後に関する検討

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横須賀 收

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告			
	研究代表者報告:平成26年度の研究成果の纏め	(横須賀 収)	-----	1
II.	分担研究報告			
	非活動性キャリアにおけるHBVマーカーによるウイルス活動性の評価	(髭 修平)	-----	
	ゲノタイプB浸淫地域でのHBe抗体陽性患者の長期予後	(上野 義之)	-----	
	B型肝炎症例における新規線維化マーカーM2BPGiの意義	(田中 榮司)	-----	
	HBe抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討	(新海 登)	-----	
	当院におけるHBs抗原消失例の検討	(柘植 雅貴)	-----	
	e抗体陽性無症候性キャリアにおける肝硬度のs抗原陰性化と肝発癌への関与についての検討	(吉岡健太郎)	-----	
	HBs抗原量と肝病態	(八橋 弘)	-----	
	HBe抗体陽性キャリアの肝発癌の検討	(井戸 章雄)	-----	
	愛媛県におけるHBV genotype D持続感染者の現状	(阿部 雅則)	-----	
	HBV関連肝癌における臨床的特徴の年次推移	(佐田 通夫)	-----	
	B型肝炎の再活性化と免疫病態に関する臨床的研究	(中本 安成)	-----	
	非活動性キャリアと肝機能異常症例についての比較	(西口 修平)	-----	
	ALT正常HBe抗原陰性例の長期予後	(泉 並木)	-----	
	HBe抗体陽性キャリアーの肝発癌、生命予後に関する検討	(今関 文夫)	-----	
	HBV増殖メカニズムに関する検討	(白澤 浩)	-----	
	e抗体陽性無症候性キャリアに於ける HBV ゲノム解析	(岡本 宏明)	-----	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----		
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----		

B型肝炎ウイルスe抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究代表者：横須賀 収 千葉大学

研究要旨：本研究では、HBeAb陽性かつ肝機能正常のキャリアの予後を中心に検討した。(1)前向き研究として、日本肝臓学会ガイドラインの非活動性キャリアの診断基準を満たした358例を前向き研究の対象とした。平均観察期間1,025日において、死亡、発癌、核酸アナログの使用はいずれも0例(0%)であった。ALT基準逸脱35例(9.8%)、HBV DNA基準逸脱34例(9.5%)、両方の基準を逸脱する例は1例(0.3%)のみであった。(2)肝疾患診療拠点連携病院のようなHigh Volume Centerと地域基幹病院に通院中の肝機能正常HBeAb陽性キャリアを比較検討したところ(それぞれ314、165症例)基幹病院症例の方が、拠点病院症例より、Genotype Cが有意に少なく、また有意にHBsAg量が少ないことが示された。(3)初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用していた例を除いた発癌症例78例の内、20例(25.6%)で、ALT、HBVDNA正常であった。この20例の多くは、肝線維化進行例であり、また、HBVキャリアとしてフォローされていない症例が37%にみられた。

A. 研究目的

2013年に日本肝臓学会は、HBeAg陰性の非活動キャリア(IC)の定義を新たに提唱した。また、HBVキャリアの長期的な治療目標を、HBs抗原の消失とした。非活動性キャリアは、以前は臨床的治癒とも考えられていた。しかし、発癌のリスクや肝炎の再燃のリスクがあることから、実際の臨床の現場では、非活動性キャリアであっても、定期的な血液検査や画像検査を行っていることが多く、これらの患者のフォローアップの方法に対しての明確な指標はない。欧米と本邦では、人種的な差異、HBV Genotypeの差、肥満症例数など、同じHBVキャリアといえども、その背景因子は大きく異なり、本邦における予後調査は必要なものであるが、これまで、非活動性キャリアに対する全国的な大規模な検討はなされたことはなく、本邦における調査が必要であり、研究目的とする。また、安定したと考えられる非活動性キャリアからの肝炎の再燃のメカニズムを明らかにするため、HBVと宿主との関係性を示す基礎研究の推進も目的とする。

B. 研究方法

本研究の目的達成のために、臨床研究と基礎研究を行った。本年度は、特に前向き研究を集中的に解析した。

(1)全国14施設および千葉大学関連施設に現在通院中のHBeAb陽性HBVキャリアのうち、2011年の時点で2年連続してALT 30 IU/L以下の症例は880例登録されている。このうち、日本肝臓学会ガイドラインのICの診断基準(HBe抗原陰性の非活動キャリアは、1年以上の観察期間うち3回以上の血液検査において、HBe抗原陰性、ALT値30 IU/L以下、HBV DNA 4 log copies/ml未満の3条件すべてを満たす症例)を満たした358例を前向き研究の対象とした。主解析項目は、ALT、HBVDNA値の基準逸脱とした。副評価項目を、死亡、発癌、核酸アナログの使用の有無とした。

(2)肝疾患診療連携拠点病院が指定され、肝疾患の診療レベルの向上を図り、患者側にも大きなメリットが得られる制度の策定がなされている。本研究班に参加している施設のほとんどはこの肝疾患診療連携拠点病

院（以下、拠点病院）である。一方で、これら拠点病院にて診療を受けるHBVキャリアは、特殊な病態を呈しているために拠点病院に通院している可能性がある。そこで、千葉大学関連施設である地域医療の基幹病院と拠点病院におけるHBVキャリアに差異があるかについて比較検討した。

(3)HBeAb 陽性かつ肝機能正常例では、一般的にはその予後は良好とされている。一方で、肝細胞癌がみられた症例では、その背景肝機能は様々である。2000-2014 年にかけて千葉大学附属病院で初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用例を除いたHBV関連発癌症例78例の背景肝機能とその特徴について明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究は、千葉大学大学院医学研究院生命倫理委員会で研究内容の審査を受け、研究の施行について、承認を受けている。臨床研究の登録を行った（UMIN000009185）。

C. 研究結果

研究代表者（横須賀 収）

前向き研究：日本肝臓学会ガイドラインのICの診断基準を満たした358例を前向き研究の対象とした。主解析項目は、ALT、HBVDNA値の基準逸脱とした。副評価項目を、死亡、発癌、核酸アナログの使用の有無とした。平均観察期間 1,025 ± 235 日、平均年齢 57.1 ± 13.3 歳。死亡、発癌、核酸アナログの使用はいずれも0例（0%）であった。ALT 基準逸脱 35 例（9.8%）、HBV DNA 基準逸脱 34 例（9.5%）、両方の基準を逸脱する例は1例（0.3%）のみであった。ALT 基準逸脱、HBV DNA 基準逸脱、いずれかの基準逸脱の累積を示す（図1a 1b 1c）。平均観察期間 1000 日間で、約20%が基準逸脱がみられた。ALT、HBVDNA値の推移を図2a 2b に示す。ALT値は基準逸脱例は多くみられるが、その変動は限定的である。

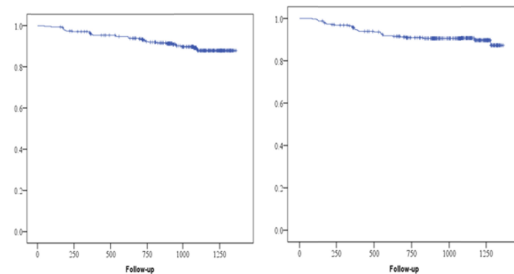


図 1 (a) ALT30IU/L 以下 (b) HBV DNA 4LC/ml 未満

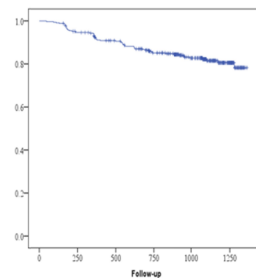


図 1 (c) ALT30IU/L 以下かつ HBV DNA 4LC/ml 未満

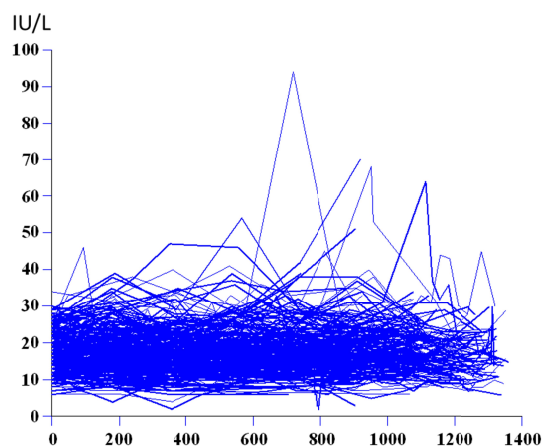


図 2 (a) IC 症例における ALT の推移

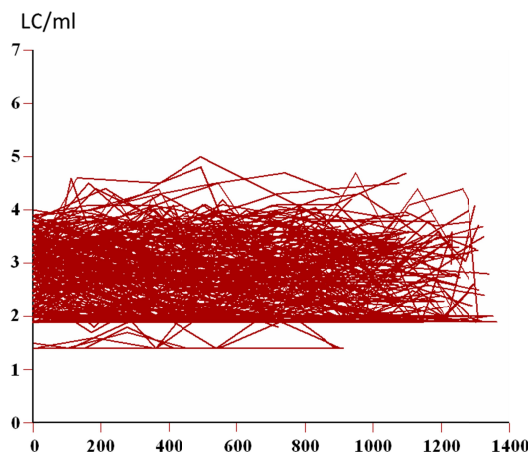


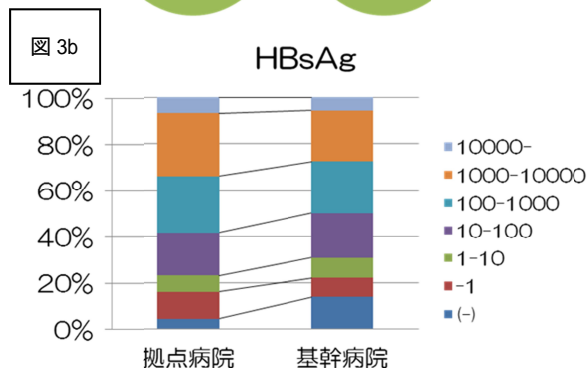
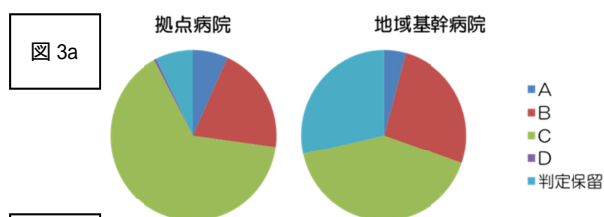
図 2 (b) IC 症例における HBVDNA の推移

いずれかの基準逸脱が起こる予測因子について、COXの比例ハザードモデルによる解析を行った(表1)

	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Hazard Ratio (95%CI)	p	Hazard Ratio (95%CI)	p
Age	0.98 (0.96-0.99)	0.008	0.98 (0.95-1.00)	0.088
Sex Female	0.89 (0.53-1.48)	n.s.		
BMI	1.05 (0.98-1.12)	n.s.		
HBV-DNA	1.61(1.21-2.14)	0.001	1.90 (1.18-3.07)	0.009
AST	1.00 (0.95-1.05)	n.s.		
ALT	1.10 (1.06-1.15)	<0.001	1.11 (1.05-1.18)	<0.001
ALP	1.00 (1.00-1.00)	n.s.		
G-GTP	1.01 (1.00-1.02)	0.015	1.01 (1.00-1.02)	0.019
PLT	0.99 (0.94-1.03)	n.s.		
Genotype C	1.30 (0.69-2.45)	n.s.		
AFP	0.96 (0.84-1.10)	n.s.		
HBsAg (log)	1.34 (1.12-1.60)	0.001	1.22 (0.92-1.62)	0.171

多変量解析では、ALT値、HBV DNA値、g-GTP値がその予測因子として挙げられた。単変量解析で因子としてあがった、HBsAg量はLog rank検定で有意差を示した。

HBeAb陽性肝機能正常例を対象とし、本研究班に参加した分担研究者のなかで関東、東海地区の4施設に通院中の症例と、同じく関東、東海地区の地域基幹病院に通院中の症例について、その背景について比較検討した。肝疾患診療拠点連携病院症例314例(4施設、平均年齢54.6歳)、基幹病院症例165症例(8施設、59.7歳)。結果として、基幹病院での症例は、Genotype Bが有意に多くみられた(図3a)。



また、HBsAg量についても、基幹病院症例

の方が、拠点病院症例より、有意にHBsAg量が少ないことが示された(図3b)。

2000-2014年 千葉大学附属病院で初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用していた例を除いた発癌症例78例の内、20例(25.6%)で、ALT、HBVDNA正常であった。この20例の半数以上は、血小板数が15万/ μ Lであることから、その多くは、肝線維化進行例であった。また、HBVキャリアとしてフォローされていない症例が37%にみられた。

分担研究者(髭 修平)

HBe抗原陰性、HBV DNA量低値、ALT持続正常を示す非活動性キャリアにおける症例のHBV DNA再上昇と関連するHBVマーカーの特徴につき検討した。HBs抗原、HBcr抗原が高値の例、HBs抗原/HBV DNA比が高値の例では再燃の可能性が高い傾向を示し、これら血清HBVマーカーの再燃予測に関する有用性が示された。

分担研究者(上野義之)

HBe抗原陰性化と糖鎖マーカーM2BPGiについて着目し、HBV genotypeとの関連も含め検討した。(1)ジェノタイプB型高浸淫地域におけるHBe抗体陽性キャリアのHBs抗原陰性化率は、全体で11%(平均観察期間7.2年)であった。(2)HBs抗原陰性化は、初診時高齢、HBV genotype、初診時HBs抗原量が関連していた。(3)M2BPGiはe抗体陽性キャリアにおいてFIB-4とよく関連した。

分担研究者(田中榮司)

肝生検が施行されたB型肝炎患者54例を対象として、肝生検F値とM2BPGi値の関連を検討した。

M2BPGi値は、肝生検F値、FIB4値、血小板値と相関がみられたが、その相関は弱かった。M2BPGi値は、同じF値でも男性で女性に比較して低く出る傾向がみられた。このため、男性のM2BPGi値を1.8倍して補正し、この補正M2BPGi値とF値間ではより良好な相関がみられた。

分担研究者（新海 登）

HBe 抗体陽性無症候性キャリアでの発癌率 (1/198 0.5%) は HBe 抗体陽性慢性肝炎 (7/123 5.7%)、HBe 抗体陽性肝硬変 (19/42 45%) に比べて、低率であった。肝癌のリスク因子においては Kaplan-Meier 解析では、男性、年齢 47 才以上、LC、Plt 15.2 万以下、HBV DNA 5.8 log copies/ml 以上、AFP 8ng/ml 以上、Fib-4 index 1.5 以上の群で肝発癌が有意に高かった。

分担研究者（柘植 雅貴）

HBV genotype C 持続感染 667 例について、経過中の HBsAg 陰性化と臨床的背景との相関について解析した。経過中の HBsAg 陰性化を 29 例 (4.3%) に認めた。HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な HBsAg 陰性化に寄与する因子として抽出されたが (P=0.005、P=0.018)、治療因子は抽出されなかった。治療介入例のみで解析したところ、インターフェロン療法を行った症例において HBsAg 累積陰性化率が高い傾向を認めた。

分担研究者（吉岡健太郎）

HBe 抗体陽性無症候性キャリアの肝硬度について検討した報告はない。本研究では HBe 抗体陽性の無症候性キャリア 108 例について、HBs 抗原陰性化と肝発癌に關与する因子を検討した。HBs 抗原陰性化には、ヒアルロン酸高値、男性、 γ -GTP 高値が關与しており、肝発癌には白血球数低値が關与していることが明らかとなった。肝線維化の非侵襲的評価法である肝硬度測定法である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) は単変量解析では、肝発癌との關係が示されたが、多変量解析では選択されなかった。

分担研究者（八橋 弘）

2012 年 4 月～2013 年 7 月に当科を受診した HBV 持続感染例 312 例において血中 HBsAg 量に寄与する有意因子を重回帰分析 stepwise selection により最終モデルを算

出、血中 HBVDNA 量 ($\beta = -0.852$, $p < 0.001$)、HBeAg (negative=0, positive=1) ($\beta = -0.357$, $p < 0.001$)、年齢 ($\beta = -0.164$, $p < 0.001$)、血小板数 (/103) ($\beta = 0.104$, $p < 0.001$) であった (調整済 $R^2 = 0.53$)。HBe seroconversion 後の B 型肝炎において HBs 抗原量は、加齢とともに低下するが、線維化進展例はより低値を示すと考えられた。

分担研究者（井戸章雄）

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性キャリア症例 290 例で、経過観察期間中に 7 例 (2.4%) が死亡し、うち 4 例 (1.4%) が肝疾患関連死であった。13 例 (4.2%) に肝細胞癌が発生し、累積発癌率は 5 年で 2.9%、10 年で 6.9% であった。発癌に關わる因子は、経過観察開始時に年齢 55 歳以上 ($p = 0.018$, HR 7.818, 95%CI 1.426-42.876)、AFP 5.0 ng/mL 以上 ($p = 0.044$, HR 20.564, 95%CI 1.081-391.286) であった。

分担研究者（阿部雅則）

1970 年代に愛媛県で流行した HBV genotype D の持続感染者の現状について調査した。HBV genotype D 持続感染者 44 名。このうち約 7 割は HBe 抗体陽性非活動性キャリア、約 3 割が慢性肝炎であった。今後、感染期間の長期化、高齢化による肝硬変への進展と肝細胞癌発生を含めて長期的に経過をみていく必要がある。

分担研究者（佐田通夫）

2000 年から 2012 年に当院で初回治療を行った HBV 関連肝癌患者 156 名を対象とし、後ろ向きにデータを収集した。HBV 関連肝癌患者数は減少していないが ($P = 0.9921$)、NA 内服例からの発癌が増加していた ($P < 0.05$)。NA 内服例の肝発癌に寄与する因子は NA 開始時に線維化進展例であり、血小板数が 12.7 万未満の症例に有意に多く肝発癌を認めた。NA 非内服例では肝硬変患者の割合は有意に減少したが ($P < 0.05$)、65 歳以上の高齢者が増加 ($P = 0.0468$) していた。

分担研究者（中本安成）

R-CHOP・CHOP 療法が施行された血液悪性疾患症例における治療前後の免疫抑制状況を、健常症例と比較した。寛解時の IL-17、IL-1、G-CSF、IFN- γ の有意な抑制が認められたため、HBV 再活性化には CD4 + T 細胞の関与が示唆された。また、HBV 既往感染症例から HBV 再活性化群と非再活性化群を抽出し、HLA class II 領域の複数の SNP に対する genotype assay により両群を比較・検討し、rs9277535 が HBV 再活性化の宿主因子である可能性が示された。

分担研究者（西口修平）

HBe 抗体陽性かつ HBV-DNA 低値例を対象に ALT 上昇例と正常例とで肝組織所見および各種臨床データの比較を行った。ALT 上昇例には、組織学的に肝組織の脂肪化とそれに関連する検査値（BMI・HOMA-R・フェリチン）の異常が認められた。HBV-DNA 低値の HBe 抗体陽性者で ALT 上昇を来している例では、線維化を生じる脂肪性肝炎を合併して自然経過に影響する可能性があると考えられた。

分担研究者（泉 並木）

対象は 2008 年 4 月から 2013 年 9 月までに当院を受診した HBe 抗原陰性、かつ初回 ALT 施設基準値内の 4 ~ 43 IU/L の 155 例、自然経過での ALT 上昇と HBs 抗原陰性化を検討した。経過中の ALT 上昇は 26 例、HBs 抗原陰性化は 14 例(9%)にみられた。ALT 上昇に關与する因子は ALT 30IU/L 以下と HBs 抗原量が 100 IU/ml 以上が有意であった。HBs 抗原陰性化は、50 歳以上、HBs 抗原 100 IU/mL 未滿、非活動性キャリアで高率に達成されていた。HBs 抗原陰性化には 1 年間の HBs 抗原減少速度が 0.19 log/年の場合に感度 94%、特異度 93%であった。

分担研究者（今関文夫）

HBe 抗体陽性キャリア 198 例を観察開始 1 年間の HBV DNA 量、ALT 値により A 群

(N=68): HBV DNA < 4 log copies (LC)/ml、ALT \leq 30 IU/l、B 群(N=31): HBV DNA < 4 LC/ml、ALT > 30 IU/l、C 群(N=35): HBV DNA \geq 4 LC/ml、ALT \leq 30 IU/l、D 群(N=64): HBV DNA \geq 4 LC/ml、ALT > 30 IU/l の 4 群に分け中央値 7.6 年(1.2 ~ 9.1 年)後向きに調査した。肝発癌は A 群から 1 例、C 群から 2 例、D 群から 6 例で、C 群と D 群の各 1 例を除いてすべて肝硬変であった。死亡例 9 は B 群 1 例(肝硬変症例)、D 群 1 例(肝癌症例)で、死因は各々消化管出血と癌死であった。

分担研究者（白澤 浩）

HBV 増殖メカニズムに関する in vitro の検討として、エピジェネティック修飾因子阻害剤のウイルス増殖に与える影響について、キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞単層培養系を用いて HBV を感染、エピジェネティック標的薬剤のスクリーニングを行った。薬剤の HBV 産生に対する影響を解析し候補薬剤を得た。

分担研究者（岡本宏明）

HBV のクローンの増殖能を、1.3 倍ゲノム長の HBV construct を作製し、肝癌由来樹立細胞株にトランスフェクトして、ELISA, real-time PCR, Southern blotting, Northern blotting 等により解析した。無症候性キャリア由来の HBV 株の in vitro での増殖能は劇症肝炎由来の株より低いことが確かめられた。これには、無症候性キャリア由来株では同じ precore 変異株でありながら、劇症肝炎株に比べ pregenome RNA を含む 3.5 kb mRNA の転写量が少ないこと、さらに core promoter や precore 以外のゲノム領域の変異が寄与していることが示唆された。

D. 考察

昨年、日本肝臓学会は、HBV 診療ガイドラインにおいて、HBeAb 陽性で肝機能が正常の症例を、“非活動性キャリア”とし、その診断基準を提唱した。この基準は、欧米からの報告を基に定義されたものと考え

られ、国内における有用性などの検討はなされていない。本研究では、この肝臓学会の定義に基づいて、ICを定義し、その予後を検討した。358 症例で、平均観察期間は約 1000 日程度とやや短期間の検討ではあるが、一例も死亡例、発癌例、核酸アナログ開始例はみられなかった。多くの症例は、良好な予後であったと言える。一方、ALT(30 IU/L 以下)とHBV DNA(4.0LC/ml 未満)の基準を逸脱する例は、それぞれ10%程度、いずれかの基準逸脱例は20%程度となり、ICの基準を満たし続けることはやや困難であると考えられた。ALT、HBV DNA 両者の基準を逸脱する例は1例のみであり、いわゆる肝炎の再燃は、あまりみられないことが示された。ALT基準逸脱例も、全例100IU/L以下であり、重篤な肝障害とはいえない状態であった。基準逸脱の予測因子としては、当然ではあるが、ALT値、HBV DNA量が挙げられた。またG-GTP値も予測因子として指摘されており、その理由については今後の検討課題としたい。

肝疾患診療連携拠点病院が全国に整備され、国内のHBV研究報告は、これら拠点病院からの報告が多い。一方、これら拠点病院は、過去に重篤な肝炎を起こした既往がある症例や家族内に肝細胞癌が多くみられる症例など、特殊なHBVキャリアが集積されている可能性があった。本研究では、HBV関連マーカーを中心に、拠点病院といわゆる地域の基幹病院での比較検討を行った。結果として、地域の拠点病院では、Genotype Cが少なく、HBsAg量が低値の症例が有意に多くみられた。このことは、いわゆるHigh Volume Centerである拠点病院に通院中のHBVキャリアは、他の一般病院と比べて、治療抵抗性といわれるGenotype Cが多く、最終的な治療目標であるHBsAgの消失はまだ望めない症例が多数をしめるのが現状といえる。わが国のHBVキャリアに対する施策は、これらHigh Volume Centerからの研究報告を基に策定されてきており、今後、これら病院間の差を認識した上で、HBVキャリアの臨

床経過についての理解を進めなければならない。一方、発がんについては、ALT値、HBV DNA量上は正常と考えられるキャリアからも発がんがみられた。しかし、その多くは肝線維化が進行した例であり、肝線維化の評価もHBVキャリアの予後の判断には重要と考えられた。

E. 結論

肝臓学会が定めるHBeAg陰性非活動性キャリアの予後は概ね良好であった。しかし、観察期間が平均1000日程度と短いため、さらなる長期的な評価が必要と考えられる。また、これまで国内のHBVキャリア診療の中心を担ってきた肝疾患診療連携拠点病院と地域の基幹病院に通院中のHBVキャリアでは、HBVマーカーの観点から有意な差を認めた。今回は検討しなかったが、さらに中小の医療機関では、その差異は大きくなると思われる。発がんについては、肝線維化に留意した評価が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci* 15: 21455-21467, 2014.
2. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. *World J Gastroenterol* 20(23):7197-7206, 2014.
3. Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M,

Yokosuka O. Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance. Hepatology 2015 (in press).

4. 新井誠人、神田達郎、今関文夫、横須賀收(2014) 本邦における HBe 抗体陽性無症候性キャリアの実態 消化器内科 58(2):207-212.
5. 新井誠人、横須賀收(2015)【B型肝炎】核酸アナログ製剤の効果と実際の臨床 18(1):33-37.

2. 学会発表

- (1)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) HBe 抗原陰性非活動性キャリアにおける、HBs 抗原消失を目指した治療適応 第 50 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 肝臓 55 巻 Suppl.(1) A42
- (2)神田達郎、島田紀朋、厚川正則、篠崎正美、三上繁、中本晋吾、新井誠人、今関文夫、坪田昭人、横須賀收(2014) B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法 開始直前 HBe 抗原からみた治療効果の検討 第 50 回日本肝臓学会総会 肝臓 55 巻 Suppl.(1) A247
- (3)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) HBV 関連発癌の現状と効率的な発癌サーベイランスの検討 第 18 回日本肝臓学会大会 肝臓 55 巻 Suppl.(2) A509
- (4)太和田暁之、千葉哲博、横須賀收(2014) 核酸アナログ製剤投与中の慢性 B 型肝炎疾患症例における発癌予測スコアリングシステムの有用性の検証 第 40 回日本肝臓学会東部会 肝臓 55 巻 Suppl.(3) A726
- (5)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) 当院における多剤耐性 HBV キャリアの検討 肝臓 55 巻 Suppl.(2) A730
- (6)Y. Haga, T. Kanda, R. Sasaki, M.

Nakamura, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. mRNAs expression profiles of MAPKs and their related genes in human hepatoma cell lines with integrated HBV DNA fragments. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-13

- (7)M. Nakamura, T. Kanda, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. MicroRNA-122 negatively regulates the production of inflammatory cytokines and chemokines in human hepatic stellate cells. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-16
- (8)R. Sasaki, S. Nakamoto, T. Kanda, Y. Haga, X. Jiang, M. Nakamura, O. Yokosuka. Analysis of epigenetic control of HBV replication by epigenetics compound library. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-18
- (9)T. Kanda, S. Wu, S. Nakamoto, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, M. Nakamura, O. Yokosuka. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-19
- (10) Arai M, Kanda T, Imazeki F, Yokosuka O. Different Dynamics of HBV Related Antigen during Entecavir Treatment. APASL(2015)

G. 知的所得権の出願・登録状況

発明の名称：肝がん肝細胞阻害剤
出願日：平成24年10月10日
出願番号：特願2012-224722

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：髭 修平・札幌厚生病院第 3 消化器内科・主任部長

分担研究課題：非活動性キャリアにおける HBV マーカーによるウイルス活動性の評価

研究要旨： 肝細胞内の HBV レベルを反映する血清マーカーとして、HBs 抗原、HB コア関連抗原、HBV DNA 量などが知られているが、HBV 持続感染の自然経過における病期の違いにより上記 HBV マーカーの相互関連が変わる可能性が示されている。本研究では、HBe 抗原陰性、HBV DNA 量低値、ALT 持続正常を示す非活動性キャリアにおける症例の HBV DNA 再上昇と関連する HBV マーカーの特徴につき検討した。非活動性キャリア症例のなかで、HBs 抗原、HBcr 抗原が高値の例、HBs 抗原/HBV DNA 比が高値の例では再燃の可能性が高い傾向を示し、これら血清 HBV マーカーの再燃予測に関する有用性が示された。

A. 研究目的

HBV 持続感染者において、HBe 抗原が陰性化し HBe 抗体が陽転した症例には、HBV DNA 低値、ALT 正常で推移する非活動性キャリアの状態と、HBV DNA が高値のままで ALT 変動を伴う活動性肝炎の状態とがあるが、実際には、単回の検査で両者を判別する指標は明らかにされていない。HBV の活動性や増幅度には、肝細胞内の HBV cccDNA のレベルが関連しているが、血清中の HBs 抗原、あるいは HB コア関連 (HBcr) 抗原は肝内 cccDNA レベルを反映する HBV マーカーと考えられている。これらの血清中 HBV マーカーの中で、HBV DNA は HBV の replication を、HBs 抗原は replication とともに肝細胞内での transcription、translation の程度を反映すると考えられているが、病期により変化し、HBe 抗原陰性期には各マーカーの相関性が低下するとの報告もみられる。

今回の研究では、HBe 抗原陰性、非活動性キ

ャリアのウイルス活動性について、血清 HBV マーカー相互の関連性、HBs 抗原/HBV DNA 比の有用性を検討する。

B. 研究方法

HBe 抗原陰性症例のうち、HBV DNA < 4.0 LC/mL、ALT 30 IU/L で 1 年以上の経過観察を施行されている無治療例 62 例、HBV DNA 4.0 LC/mL で entecavir を投与された症例の治療開始時評価分 128 例、の 2 群を対象とし、以下の項目に付き検討した。なお、今回の解析においては、個人が特定できないよう配慮した。

(I) 上記対象 群における、経過観察中の HBV DNA 再上昇 (4.0 LC/mL) 率

(II) 上記の HBs 抗原、HBcr 抗原、 \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比毎のサブ解析

(III) 群 群症例の HBV DNA 量と HBs 抗原の相関性

(IV) 非活動性キャリアの HBV DNA 再上昇と \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比

C. 研究結果

(I) HBe 抗原陰性非活動性キャリアからの HBV DNA 再上昇

群における、観察開始後 1、2、3 年後の累積 HBV DNA 上昇 (4.0 LC/mL) 率は、9.8%、15.1%、21.1%であった。

(II) HBe 抗原陰性非活動性キャリアの HBV マーカーレベル別の HBV DNA 再上昇

HBV マーカーのレベル別の 1/2/3 年後の累積 HBV DNA 上昇率を示す。

i) \log_{10} HBsAg : 2.0 未満例 (3.7/3.7/3.7%)
2.0-3.0 例 (6.7/13.3/13.3%) 3.0 以上例
(20.8/38.9/525.5%)

ii) HBcr 抗原 : 3.0 未満 (6.2/8.5/11.0%) 3.0 以上例 (26.7/35.8/61.5%)

iii) \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比 : 0.5 未満例 (0/0/0%)、0.5-1.0 例 (12.0/16.2/16.2%)、1.0 以上例 (15.3/26.6/46.6%)

(III) HBV DNA 量と HBs 抗原の関連性

HBV DNA 量と HBs 抗原レベルは、全体としては相関しており、HBe 抗原陽性例では両者が高値の傾向にある。HBe 抗原陰性/entecavir 投与例の HBV DNA 量は中～高値であるが、HBs 抗原レベルの分布幅は大きくなる。非活動性キャリアのレベル ($\text{HBV DNA 量} < 4.0 \text{ LC/mL}$) の HBs 抗原分布はさらに拡大し、 $-1.0 \log \sim 4 \log$ 台までの症例を認める。

HBV DNA 量が 4.0 LC/mL 未満のキャリア例で、 4.0 以上に再上昇する症例の HBs 抗原レベルは $2.0 \log \sim 4 \log$ 台と高めに分布していた。

(IV) 非活動性キャリア例の \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比と HBV DNA 再上昇

HBe 抗原陰性例中、HBV DNA 低値 ($< 4.0 \text{ LC/mL}$) の非活動性キャリアと HBV DNA 高値 (4.0 LC/mL) の entecavir 投与例における

\log_{10} HBsAg/HBV DNA 比と年齢の分布をみると、entecavir 投与例では 30～70 歳代までのいずれの年代も \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比は 0.5 前後に分布していた。一方、非活動性キャリア例では、30～40 歳代では比は高め、50 歳代以降は低値への移行例を認めた。再上昇例では \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比が高めの傾向を示した。

非活動性キャリアの \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比により 3 群に分け、低値群 (比が 0.50 未満)、中間群 (0.50-1.00)、高値群 (1.00 以上) とした場合の経過中 HBV DNA 再上昇率は、それぞれ、0% (0/17)、12.5% (3/24)、38.1% (8/21) と \log_{10} HBsAg/HBV DNA 比と相関していた。比の高値群では若年、HBs 抗原高値、HBcr 抗原 3.0 などの傾向を認めた。

D. 考察

HBV 持続感染者の血清 HBV マーカーである HBs 抗原、HBcr 抗原、HBV DNA 量などは、無治療時には肝細胞内の HBV cccDNA を反映すると考えられているが、その相関性は病期により変化し、HBe 抗原陰性期では各マーカーの相関性が低下するとの報告もみられる。HBV の複製には、HBV ccDNA を鋳型とした複製と翻訳 (蛋白合成) が関与するが、HBV DNA は前者を、HBs 抗原や HBcr 抗原は後者も含め活動性を反映するマーカーと考えられる。HBV 持続感染の自然経過の時期により HBV の複製状態が異なる可能性があり、前述の HBV マーカーの相互関連も変化する可能性がある。

一方、HBs 抗原と HBcr 関連抗原は、ともに HBV の翻訳過程を反映するマーカーではあるが、必ずしも同レベルの定量値にならないことも多い。HBs 抗原蛋白は肝細胞内 cccDNA 由来の mRNA を鋳型とした翻訳が主要な産生経路であ

るが、その他に viral integration 由来で放出されるものもある。また、加齢とともに低下傾向を示す事も知られている。血清中 HBV DNA 量は、無治療の場合は肝細胞内 HBV レベルと相関すると考えられており、HBs 抗原と HBV DNA の量的関係を比として表した場合に、病期の違いを反映し異なる比が示される可能性がある。

そこで、今回の研究では、HBe 抗原陰性の非活動性キャリアにおいて、特に HBV DNA 再上昇予測に有用なマーカーの検討を行った。非活動性キャリアでは HBV DNA 量は 4.0 LC/mL 未満を維持するが、ウイルス量再上昇を認める症例では、HBs 抗原、HBcr 抗原が高めの傾向を示し、HBsAg/HBV DNA 比も高値であった。

HBsAg/HBV DNA 比は、entecavir 投与を必要とした肝炎症例では年齢に無関係に 0.5 前後を中心とした値を示した。一方、非活動性キャリアでは比が高値を示す例が多い傾向を認めるが、比の高値例は HBs 抗原や HBcr 抗原が高値で HBV DNA の再上昇をきたしやすい傾向を認めた。

欧米からは、HBsAg/HBV DNA 比は、免疫寛容期、免疫活動期、HBe 抗原陰性肝炎期の症例ではほぼ同レベル(それぞれ、0.55、0.55、0.64)であるが、低増殖期の症例では 1.05 と高値傾向を示すとの報告があり、高値例に非活動性症例が多いことを示している。本研究の成績では、比の高値例に再燃例が多い傾向を認めており、必ずしも同様の結果とならない。しかし、実際に核酸アナログ投与を必要とする活動性肝炎症例の比は高値を示しておらず、一定の特徴を有する集団であることが窺えた。

E. 結論

HBe 抗原陰性、HBV DNA 量 4.0 LC/mL 未満、

ALT 正常値の非活動性キャリアにおける HBV DNA 再上昇は、3年で約 20%の例に認めた。再上昇には、HBs 抗原、HBcr 抗原レベルと関連し、それぞれ、2.0 log 未満、3.0 未満の症例における再上昇は稀であった。非活動性キャリアにおける HBsAg/HBV DNA 比は症例間差が大きく、高値例は、若年、HBcr 抗原陽性例に多く、増殖力の低い例は少数であった。HBsAg/HBV DNA 比低値例は HBs 抗原が低値であり、安定化例が多かった。

非活動性キャリアにおける HBsAg/HBV DNA 比の検討は、HBV 活動性評価に有用である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. PLoS One. 2014 in press.

2) 髭修平、中島知明、小関至、狩野吉康、豊田成司. 核酸アナログ治療の最前線と今後の展望. 内科 2014; 113: 689-692

3) 髭修平、小関至、狩野吉康、豊田成司. ラ

ミブジン、アデホビル治療の成績と多剤耐性ウイルス. 医学と薬学 2014; 71: 1171-1178

2. 学会発表

- 1) S. Hige, I. Ozeki, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Evaluation of liver fibrosis and prediction of hepatic carcinogenesis for patients with chronic hepatitis B by a unique glycoprotein: Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP). The Liver Meeting[□] 2014, Boston, 2014.
 - 2) S. Hige, I. Ozeki, M. Yamaguchi, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Risk of hepatocellular carcinoma for hepatitis B patients with nucleoside analogues by the estimation of fibrosis index at the start of the treatment. The 11th JSH single topic conference, Hiroshima, 2014.
 - 3) I. Ozeki, T. Nakajima, S. Hige, Y. Karino, J. Toyota. Analysis of hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels using the Lumipulse HBsAg-HQ assay in hepatitis B virus carriers with HBsAg seroclearance according to the Abbott ARCHITECT assay. The Liver Meeting[□] 2014, Boston, 2014.
 - 4) S. Hige, I. Ozeki, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Estimation of hepatocellular carcinoma for patients with HBV infection by HBs antigen and FIB-4 index. The 4th International Kyoto Liver Symposium, Kyoto, 2014.
 - 5) 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. 新規糖鎖マーカーM2BP による慢性肝疾患の線維化評価の有用性. 第40回日本肝臓学会東部会, 東京, 2014.
 - 6) 髭修平, 小関至, 狩野吉康. 核酸アナログ投与例における線維化と肝発癌. JDDW 2014, 神戸, 2014.
 - 7) 小関至, 山口将功, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 大村卓味, 佐藤隆啓, 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. アーキテクトで HBs 抗原陰性に至った HBV 症例のルミパルス HBs-HQ を用いた解析. JDDW 2014, 神戸, 2014.
 - 8) 髭修平, 小関至, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 佐藤隆啓, 大村卓味, 狩野吉康, 豊田成司. FIB-4index および HBs 抗原による HBV 陽性例の肝発癌評価. 第50回日本肝臓学会総会, 東京, 2014.
 - 9) 小関至, 中島知明, 髭修平, 木村睦海, 荒川智宏, 桑田靖昭, 大村卓味, 佐藤隆啓, 狩野吉康, 豊田成司. 高ウイルス量 B 型慢性肝炎に対する治療前の薬剤耐性の有無別 Entecavir の治療成績. 第50回日本肝臓学会総会, 東京, 2014.
 - 10) 中島知明, 山口将功, 木村睦海, 荒川智宏, 桑田靖昭, 小関至, 佐藤隆啓, 大村卓味, 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. 肝硬変の成因別実態 –最近10年間における変化–. 第50回日本肝臓学会総会, 東京, 2014.
- H. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者： 上野 義之（山形大学医学部内科学第二講座 教授）

分担研究課題：ゲノタイプ B 浸淫地域での HBe 抗体陽性患者の長期予後

研究要旨：

HBe抗体陽性無症候性キャリア例における臨床予後について臨床的なパラメーターのうち2点（HBs抗原陰性化と糖鎖マーカーM2BPGi）について着目し、HBV genotypeとの関連も含め検討した。結果は

(1) ジェノタイプB型高浸淫地域におけるHBe抗体陽性キャリアのHBs抗原陰性化率は、全体で11%（平均観察期間7.2年）であった。

(2) HBs抗原陰性化は、初診時高齢、HBV genotype、初診時HBs抗原量が関連していた。

(3) M2BPGiはe抗体陽性キャリアにおいてFIB-4とよく相関し、その推移はHBs抗原陰性化を予測するマーカーとなる可能性があるか、今後症例数を増やして検討する必要がある。

以上より、HBVキャリアの長期成績については以前の研究に比して、より観察期間が長期化したためHBs抗体の陰性化などこれまでの一般的なキャリアの長期予後と相違を生じている可能性もあり、ゲノタイプなどについてもその多様性を考慮した全国的な検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

当班研究において HBe 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後を検討するために、平成 24 年度は本学附属病院通院中の HBs 抗原患者のデータベース作成を行った。これまでの後ろ向きコホート研究から、当地域が全国有数の HBV ジェノタイプ B の高感染地域であることを報告してきたが、本年度は HBe 抗体陽性無症候性キャリア例における臨床予後について臨床的なパラメーターのうち 2 点（HBs 抗原陰性化と糖鎖マーカー M2BPGi）について着目し、HBV genotype との関連も含め検討した。

B. 研究方法

1987 年から 2011 年まで、HBs 抗原陽

性 B 型肝炎ウイルスキャリアは 645 名（平均年齢 61.0 歳、男性 / 女性 = 420 / 225）であった。これらの症例について 2011 年を起点とし、臨床診断、HBV 関連マーカー、肝機能検査値、抗ウイルス治療状況、肝発癌実態を調査し、データベース化作業を行った。

次に核酸アナログ製剤が保険適用となった 2000 年を境に、前後 10 年に分け、ジェノタイプが測定可能であった症例について、HBs 抗原陽性 B 型慢性肝疾患における各ジェノタイプ別感染頻度の変遷を比較した。

さらに HBe 抗体陽性例について、ジェノタイプと肝病態との関連を HBe 抗原陽性

例と比較検討した。

また、HBs 抗体の陰性化についてもデータベース城のパラメーターとの関連を統計学的に検討した。

さらに近年我が国で開発された肝線維化の指標となる糖鎖マーカー-M2BPGi についても検討を加えた

(倫理面への配慮)

本厚生労働省班研究の分担研究については、山形大学医学部倫理委員会からの承認を得て行った。

C. 研究結果

HBs 抗原陰性化を検討できた e 抗体陽性無症候性患者 (ASC) 患者は 106 例であり、うち 11 例で陰性化を認めた。全体 106 例のうちゲノタイプ B は 67 例であり残り 19 例がゲノタイプ C であった。ゲノタイプ別に陰性化率を検討するとゲノタイプ B では 3%、ゲノタイプ C では 37% に陰性化を認めた。ただし、ゲノタイプ B では 52% が HBs 抗原の値が低下しつつあり今後さらに低下して陰性化する例が増える可能性があった。(ゲノタイプ C では 21%)

HBs 抗原の累積陰性化率は観察 99 例で (平均観察期間 7.7 年) 陰性化までの期間は平均 11.5 年であった。初診時年齢、性別、肝機能値、初診時 HBs 抗原、HB コア関連抗原、HBV-DNA、さらに初診時 FIB-4 index など多変量解析を行なったが、初診時 HBs 抗原のみが統計学的に有意な因子として検出された。

D. 考察

これまでキャリアの長期予後については一般的にゲノタイプ B が予後が良いと一般的に考えられていた。しかし、本検討では観察期間が長期化するにつれてゲノタイプ C でも HBs 抗原の陰性化例を認めており、また前年度までの検討で観察期間が長期化する例で肝細胞癌の発症をゲノタイプ B で

も認めていたことより既存の概念が正しいかも一度検証する必要があると考えられた。

E. 結論

(1) ジェノタイプ B 型高浸淫地域における HBe 抗体陽性キャリアの HBs 抗原陰性化率は、全体で 11% (平均観察期間 7.2 年) であった。

(2) HBs 抗原陰性化は、初診時高年齢、HBV genotype、初診時 HBs 抗原量が関連していた。

(3) M2BPGi は e 抗体陽性キャリアにおいて FIB-4 とよく相関し、その推移は HBs 抗原陰性化を予測するマーカーとなる可能性があるか、今後症例数を増やして検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ninomiya M., Ueno Y., Shimosegawa T. Application of deep sequence technology in hepatology. *Hepatol Research* 2014;44(2):141-8.

2. 渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 奥本 和夫, 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 河田 純男, 上野 義之. B 型肝炎ウイルスジェノタイプ B 高感染地域における感染実態の変遷と核酸アナログ治療例におけるジェノタイプの臨床的意義. *消化器内科*, 58: 213-9, 2014.

2. 学会発表

1. 三浦 雅人, 上野 義之, 下瀬川 徹. HBe 抗体陽性無症候性キャリアの自然経過に関する検討. 日本肝臓学会第 50 回総会 東京, H26 年 5 月 29-30 日

2. 渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 上野 義之. HBV 遺伝子型からみた自然経過観察例および核酸アナログ治療例の HBs 抗原陰性化と肝発癌予後. 日本肝臓学会第 50 回総会 東京, H26 年 5 月 29-30 日

3. 渡辺 久剛, 斎藤 貴史, 上野 義

之. 肝疾患診療における医療連携の在り方
本県における肝炎対策の現状と課題をふま
えた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築
と肝疾患診療連携体制. 日本肝臓学会第
50回総会 東京、H26年5月29-30日

1. 三浦 雅人, 上野 義之, 下瀬川
徹. HBe 抗体陽性無症候性キャリアの自然
経過に関する検討. 日本肝臓学会第 50 回総
会 東京、H26年5月29-30日

2. 渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 上野
義之. HBV 遺伝子型からみた自然経過観察
例および核酸アナログ治療例の HBs 抗原陰
性化と肝発癌予後. 日本肝臓学会第 50 回
総会 東京、H26年5月29-30日

3. 渡辺 久剛, 斎藤 貴史, 上野 義

之. 肝疾患診療における医療連携の在り方
本県における肝炎対策の現状と課題をふま
えた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築
と肝疾患診療連携体制. 日本肝臓学会第
50回総会 東京、H26年5月29-30日

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究分担者：田中榮司 信州大学医学部内科学第二講座 教授
研究協力者：松本晶博 信州大学医学部附属病院肝疾患相談センター 准教授
梅村武司 信州大学医学部内科学第二講座 准教授
山田 雪 信州大学医学部内科学第二講座 大学院生

分担研究課題：B 型肝炎症例における新規線維化マーカー M2BPGi の意義

研究要旨：

B 型肝炎ではウイルスの活動性が低下し非活動性キャリアになると予後は良いことが知られている。しかし、このような症例でも肝線維化進行例は発癌率があまり低下しない。肝生検は肝線維化評価の標準であるが、安全性などの問題がありこれに代わる肝線維化マーカーが開発されてきた。M2BPGi はその中の一つであるが、糖鎖構造変化を反映するマーカーであり、ユニークなものである。

肝生検が施行された B 型肝炎患者 54 例を対象として、肝生検 F 値と M2BPGi 値の関連を検討した。さらに、肝線維化マーカーとして用いられている、血小板数、APRI、FIB4 index、GTP 値との関連も検討した。

M2BPGi 値は、肝生検 F 値、FIB4 値、血小板値と相関がみられたが、その相関は弱かった。F 値が高くなるにつれ M2BPGi 値が高くなる傾向はみられたが、C 型肝炎での成績と比較すると、その傾向は明らかに弱かった。M2BPGi 値は、同じ F 値でも男性で女性に比較して低く出る傾向がみられた。このため、男性の M2BPGi 値を 1.8 倍して補正を行った。この補正 M2BPGi 値と F 値間ではより良好な相関がみられた。さらに、補正 M2BPGi 値と他の線維化マーカーとの相関もより良好となった。

M2BPGi 値は B 型肝炎の線維化マーカーとして有用である。しかし、その使用に際し、男性の値は 1.8 倍して補正が必要である。

A. 研究目的

M2BPGi は肝臓で産生される 1 酸性糖蛋白質上の糖鎖構造変化を反映するマーカーであり、肝線維化の進展を非侵襲的に検査しうる。これまで主に、C 型肝炎症例を対象として線維化との関連が検討されてきたが、B 型肝炎での検討報告は少ない。今回、肝生検を施行した B 型肝炎症例を対象に M2BPGi と肝線維化との関連を検討した。

B. 研究方法

対象は肝生検が施行された B 型肝炎患者 54 例であり、臨床的背景は表 1 に示した。また、肝生検所見の grade と stage の分布を表 2 に示した。

M2BPGi はシスメックス社製キットで測定し、測定結果は COI で表示した。

他の肝線維化マーカーとして、肝生検 F 値に加え、血小板数、APRI (AST/血小板比)、FIB4 index (年齢 [歳] x AST [IU/L] / 血小板数 [10⁹/L] x ALT [IU/L])、GTP 値を使用した。

(倫理面への配慮)

診療上、通常行われる採血検査で余った血清を使用しており患者への負担は少ない。また、本研究は本学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

表 3 に各線維化マーカー間の相関を示した。M2BPGi 値は、肝生検 F 値および FIB4 値と有意

に相関がみられ、血小板値とも弱い相関傾向がみられた。

図1に線維化ステージ別にみたM2BPGi値の分布を示す。F値が高くなるにつれM2BPGi値が高くなる傾向があるが、C型肝炎での成績に比較するとその傾向は明らかに弱い。これを、さらに男女別に比較したのが図2であるが、F値とM2BPGi値の相関は女性で強く男性で弱い傾向がみられた。

M2BPGi値は、同じF値でも男性で女性に比較して低く出る傾向がみられた。このため、男性のM2BPGi値を1.8倍して補正を行った。この補正M2BPGi値とF値との相関を男女別にみたのが図3であり、男女とも線維化進行に伴い補正M2BPGi値は上昇する傾向がみられた。さらに、これを男女一緒にして表示したのが図4であり、F値と補正M2BPGi値は補正前に比較してさらに良好な相関がみられた。表4は補正したM2BPGi値と他の線維化マーカーとの相関を検討した成績であるが、いずれも補正前に比較し相関はより良好になっていた。

表1 対象症例の背景 (n=54)

年齢 (歳) *	49 (24 - 77)
性別 (男 : 女)	29 : 25
AST (IU/L) *	39 (1 - 332)
ALT (IU/L) *	48 (5 - 610)
-GTP (IU/L) *	33 (12 - 172)
Plt (万/ μ l) *	16.0 (8.0 - 40.7)
APRI *	0.85 (0.20 - 7.05)
FIB4 *	1.5 (0.1 - 5.2)
M2BPGi (COI) *	1.12 (0.38 - 5.34)

* 中央値 (範囲)

表2 対象症例の肝生検所見 (n=54)

Grade		
A 0	11	(20%)
A 1	18	(33%)
A 2	23	(43%)
A 3	2	(4%)
Stage		
F 0	3	(6%)
F 1	19	(35%)
F 2	17	(31%)
F 3	10	(19%)
F 4	5	(9%)

データは症例数 (%)

表3 各種線維化マーカーとの相関 (n=54)

		F	M2BPGi	-GTP	Plt.	APRI	FIB4
F	r	1	<u>0.308</u>	0.211	-0.177	0.136	0.186
	p	.	<u>0.021</u>	0.112	0.183	0.307	0.169
M2BPGi	r		1	0.059	-0.258	0.218	<u>0.317</u>
	p		.	0.664	0.055	0.107	<u>0.020</u>
-GTP	r			1	0.028	<u>0.331</u>	0.079
	p			.	0.834	<u>0.011</u>	0.564
Plt.	r				1	<u>-0.545</u>	<u>-0.665</u>
	p				.	<u><0.01</u>	<u><0.01</u>
APRI	r					1	<u>0.649</u>
	p					.	<u><0.01</u>

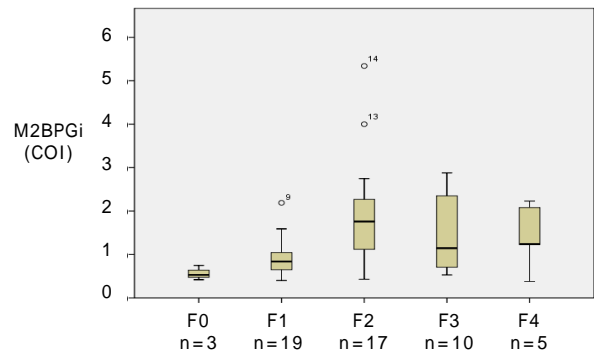


図1 線維化ステージ別にみたM2BPGi値の分布 (n=54)

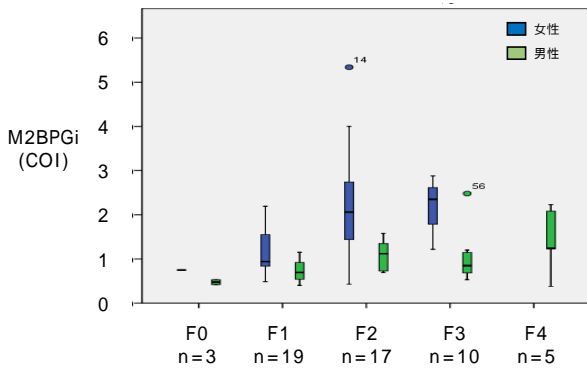


図2 性別、線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布 (n=54)

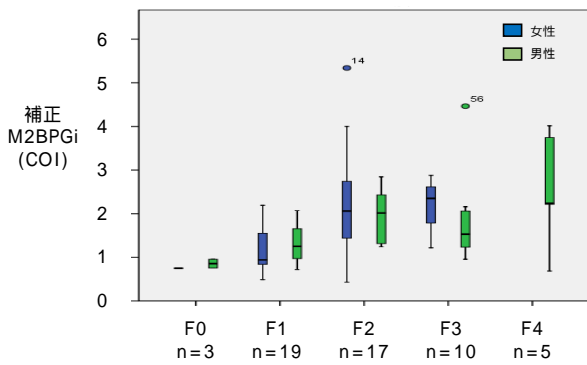


図3 性別、線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布。男性においてM2BPGi値を補正 (x1.8) した場合の成績 (n=54)

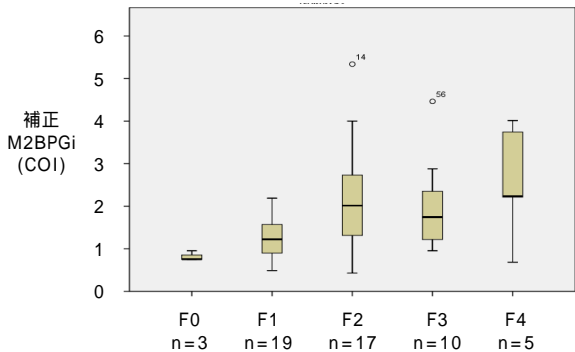


図4 線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布。男性においてM2BPGi値を補正 (x1.8) した場合の成績 (n=54)

表4 男性で補正したM2BPGi値と各種線維化マーカーとの相関 (n=54)

	M2BPGi	F	g-GTP	Plt	APRI	FIB4
補正M2BPGi	r	0.876	0.440	0.074	-0.301	0.285
	p	<0.001	0.001	0.596	0.027	0.037

D. 考察

B型肝炎ではウイルスの活動性が低下し非活動性キャリアになると予後は良いことが知られている。しかし、このような症例でも肝線維

化進行例は発癌率が比較的高く、必ずしも安全とは言えない。肝生検は肝線維化評価の標準であるが、検査には危険性も伴い入院が必要なことから煩雑な検査と言える。そこで、肝生検に代わる肝線維化マーカーが開発されてきた。M2BPGiはその中の一つであるが、糖鎖構造変化を反映するマーカーであり、肝線維化マーカーとしてはこれまでにないユニークなものである。これまで、M2BPGiの有用性は主にC型肝炎で検討され、極めて有用であることが報告されているが、B型肝炎での報告は少ないため今回の検討を行った。

今回、F値とM2BPGi値の相関は、B型肝炎ではC型肝炎に比較して明らかに弱いことが明らかになった。この原因について解析したところ、M2BPGiの値に性差あることが明らかになった。すなわち、男性は女性に比較してM2BPGi値が低く出る傾向がみられた。そこで、この差(1.8倍)を補正した補正M2BPGi値で検討したところ、F値との間でさらに良い相関がみられた。

今回の検討から、B型肝炎でM2BPGi値を線維化マーカーとして使用する場合、性別による補正が必要であることが明らかになった。今後、補正M2BPGi値と予後との関連を検討することが必要である。

E. 結論

1. M2BPGi値はB型肝炎の線維化マーカーとして有用であるが、男性での値は1.8倍する補正が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
執筆中
2. 学会発表
発表予定

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：名古屋市立大学・医学研究科・新海登
分担研究課題：HBe 抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討

研究要旨：HBe抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクを検討した。HBe抗体陽性無症候性キャリアでの発癌率(1/198 0.5%)はHBe抗体陽性慢性肝炎(7/123 5.7%)、HBe抗体陽性肝硬変(19/42 45%)にくらべて、低率であった。肝癌のリスク因子においてはKaplan-Meier解析では、男性、年齢47才以上、LC、Plt 15.2万以下、HBV DNA 5.8 log copies/ml以上、AFP 8ng/ml以上、Fib-4 index1.5以上の群で肝発癌が有意に高かった。また、核酸アナログ(NA)内服をしているHBe抗原陰性の慢性肝炎、肝硬変症例に限定して肝発癌リスクを検討すると、Kaplan-Meier解析で、男性、年齢47才以上、LC、AFP 11ng/ml以上の群で、肝発癌が有意に高かった。

A. 研究目的

本研究班での対象となるB型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアを含む、HBe 抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討をした。

B. 研究方法

1981年7月から2014年9月までに当院を受診したB型慢性肝疾患患者1057人のうちHCV、HIV、HDVの共感染と化学療法例を除き、1年以上観察し得たHBe抗原陰性患者は363人(M/F 192/171, 年齢 49.1±13.1, Genotype: A/B/C/E/undetermined/NT 12/40/210/1/1/18/43, ALT 29 (4-273) U/L, Plt 18.8±6.1×10⁴/μL, HBV DNA 4.3±1.7 log copies/ml, HBcrAg 4.3±1.4 log U copies/ml, HBsAg 1357.9 IU/ml (<0.05-85475), 従来型 IFN 治療歴(+/-) 37/326, 糖尿病の合併(+/-) 22/341, アルコール多飲(+/-) 16/347, NA投与(+/-) 83/280)における肝発癌のリスク因子を検討した。

(倫理面への配慮)

データ測定のために患者から書面上で同意書を所得の上、血清サンプルを得て測定した。

C. 研究結果

観察期間 46(12-248)ヶ月で 27 例に肝発癌がみられた。

ASC (無症候性キャリア)、CH(慢性肝炎)、LC(肝硬変)の3群に分けて発癌率をみると、ASCは138例中1例に肝発癌が見られたが、CH(123例中7例)、肝硬変(42例中19例)に比べて優位に発癌率は低かった。

また、LCでは核酸アナログ(NA)を内服している症例においても発癌が見られていた。

(図1)

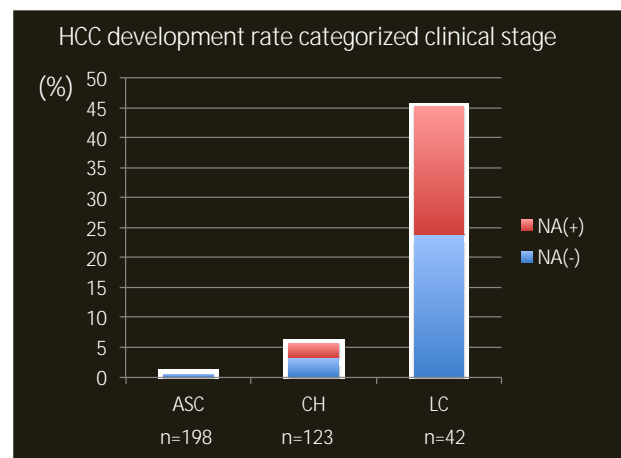


図 1 臨床病期別の発癌率

肝癌群 (n=27) と非肝癌群 (n=336) の 2 群間における、年齢、ALT、性別、Genotype、ALT、病態、Plt、HBsAg、HBcrAg、AFP、アルコール多飲、糖尿病の合併、従来型インターフェロン投与歴、Fib-4 index について比較した結果、肝癌群では有意に男性が多く (81% vs. 51%, $p=0.0020$)、高齢 (56.7 ± 10.6 vs. 48.4 ± 13.1 , $p=0.0012$)、LC が多く (70.3% vs. 6.8%, $p < .0001$)、Plt 低値 (12.8 ± 6.2 vs. $19.3 \pm 5.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $p < .0001$)、HBV DNA 高値 (5.8 ± 1.5 vs. 4.2 ± 1.6 log copies/ml, $p < .0001$)、AFP 高値 (24.5 vs. 3.2 ng/ml, $p < .0001$)、Fib-4 index 高値 (5.6 ± 5.5 vs. 1.9 ± 1.8 , $p < .0001$) であった。有意差はないが HBcrAg は肝癌群に高い傾向があった (5.3 ± 2.1 vs. 4.2 ± 1.2 log U/ml, $p=0.1343$)。Kaplan-Meier 解析では、男性、年齢 47 才以上、LC、Plt 15.2 万以下、HBV DNA 5.8 log copies/ml 以上、AFP 8ng/ml 以上、Fib-4 index 1.5 以上の群で肝発癌が有意に高かった。(図 2, 3, 4)

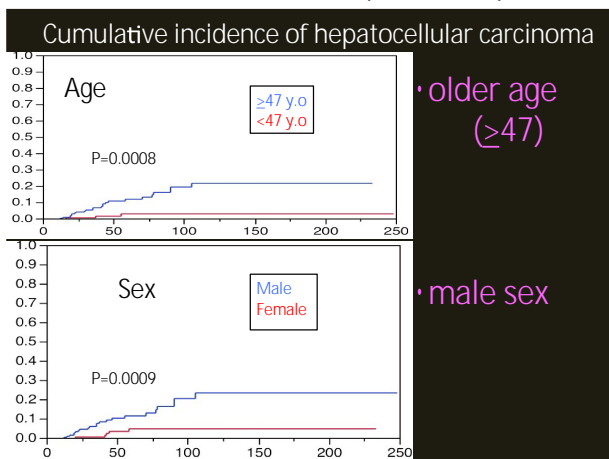


図 2

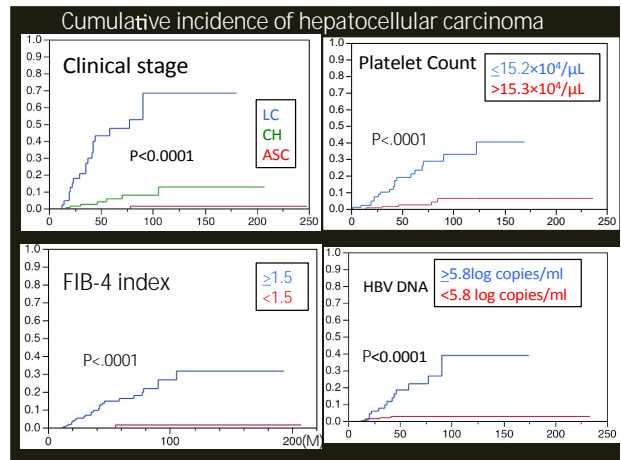


図 3

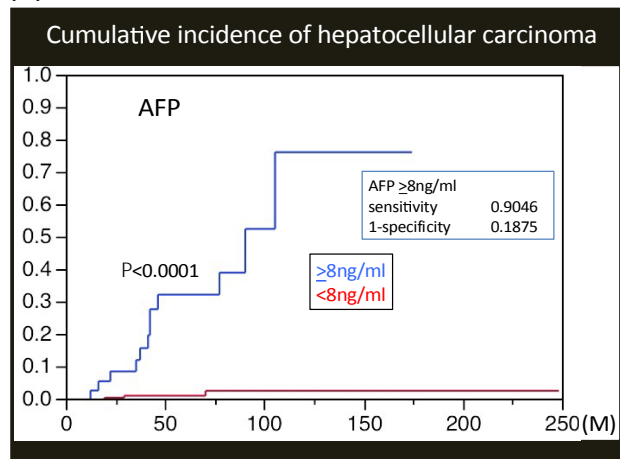


図 4

次に NA 内服をしている HBe 抗原陰性の慢性肝炎、肝硬変症例に限定して肝発癌リスクを検討した。対象は 83 例で、12 例が NA 内服中に肝発癌を認めた。NA 内服肝癌群 (n=12) と NA 内服非肝癌群 (n=71) の 2 群を比較した結果、NA 内服肝癌群では有意に男性が多く (83% vs. 52%, $p=0.0436$)、高齢 (53.6 ± 6.9 vs. 48.6 ± 10.3 , $p=0.0803$)、LC が多く (75% vs. 7%, $p < .0001$)、Plt 低値 (10.4 ± 5.1 vs. $17.3 \pm 6.1 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $p=0.0021$)、AFP 高値 (24.6 vs. 4 ng/ml, $p=0.0005$)、NA 内服後 1 年後の AFP 高値 (7 vs. 3.2 ng/ml, $p=0.0003$)、Fib-4 index 高値 (7.3 ± 5.5 vs. 2.7 ± 2.4 , $p=0.0002$) であった。Kaplan-Meier 解析では、男性、年齢 47 才以上、LC、AFP 11ng/ml 以上の群で、肝発癌が有意に高かった。(図

5,6)

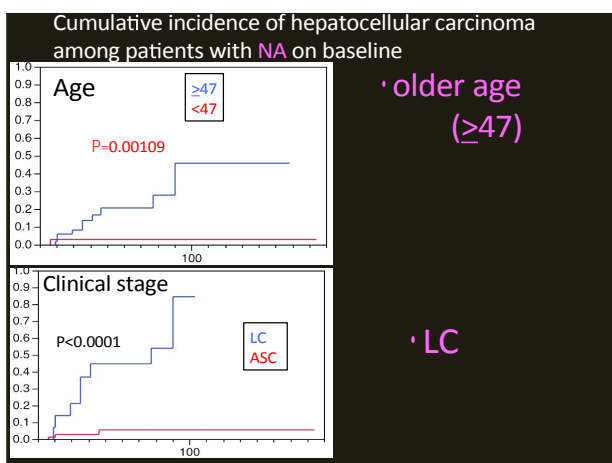


図 5

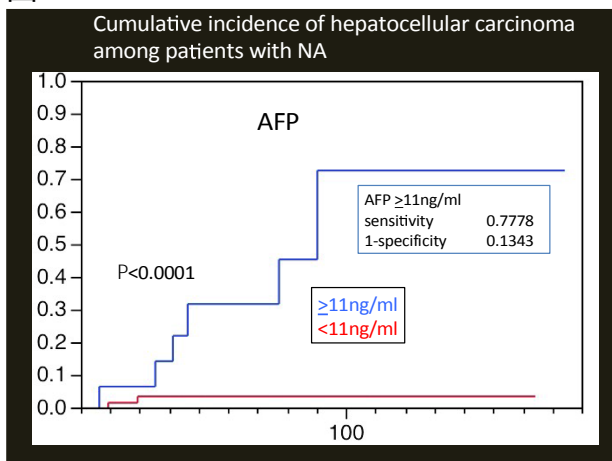


図 6

D. 考察

ASC の症例からは肝発癌は極めて希であった。ASC からの 1 例の発癌症例に関しては特異的なデータはなかったが、ASC からの発癌は低頻度なため、複数の施設で症例を集め検討する必要があると思われた。

E. 結論

肝硬変や慢性肝炎の症例から殆ど肝癌が出現していた。NA 投与においても発癌が見られるため、特に高齢男性、肝硬変、Plt 低値、AFP 高値、Fib-4 index 高値の症例を中心に慎重な観察が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ著効例における
肝発癌リスクの検討

新海登¹⁾ 松浦健太郎¹⁾ 田中靖人²⁾

1)名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器代謝内科学

2)名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

第 50 回日本肝臓学会総会

2014 年 5 月 30 日 東京

HBe 抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討

新海登¹⁾ 飯尾悦子¹⁾ 田中靖人²⁾

1)名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器代謝内科学

2)名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

第18回肝臓学会大会

2014年10月23日

High alpha-fetoprotein is risk factor of hepatocellular carcinoma in hepatitis B patients with good efficacy of nucleoside analogues therapy

Noboru Shinkai^{1, 2}, Etsuko Iio^{1, 2}, Tsunamasa Watanabe¹, Kentaro Matsuura², Kei Fujiwara², Shunsuke Nojiri², Yasuhito Tanaka^{1*}

1Departments of Virology & Liver unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601;

**2Department of Gastoloenterology and
Metabolism, Nagoya City University
Graduate School of Medical Sciences,
Nagoya** AASLD 2014 Boston, MA
2014.11.11

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：氏名 柘植雅貴 所属 広島大学自然科学研究支援開発センター・助教

分担研究課題：当院における HBsAg 消失例の検討

研究要旨：B型慢性肝疾患の治療長期目標は、HBsAgの消失とされているが、経過中にHBsAg消失を予測することは困難である。本検討では、HBV genotype C持続感染667例について、経過中のHBsAg陰性化と臨床的背景との相関について解析した。経過中のHBsAg陰性化を29例（4.3%）に認めた。HBsAg陰性化に寄与する因子を多変量解析にて検討した結果、HBeAg陰性、HCC非合併が有意な因子として抽出されたが（ $P=0.005$ 、 $P=0.018$ ）、治療因子は抽出されなかった。治療介入例と非介入例で臨床背景に差が認められたため、治療介入例のみで解析したところ、インターフェロン療法を行った症例においてHBsAg累積陰性化率が高い傾向を認めた。B型慢性肝疾患のコントロールは改善しているものの、現行の抗ウイルス療法による十分なHBsAg陰性化は得られておらず、より効果的な治療法の構築が期待される。

A. 研究目的

HBV 無症候性キャリアの中には、経過中に肝炎を発症し、治療介入が必要となる症例も散見される。しかしながら、治療介入が必要となる症例を早期に見出すための指標は確立されておらず、B 型慢性肝疾患診療における課題の一つである。

日本肝臓学会から示されている B 型肝炎治療ガイドラインでは、B 型慢性肝疾患の治療長期目標を HBsAg 消失とされているが、B 型慢性肝疾患の病態・経過は多岐にわたっており、自然経過や治療経過における将来的な HBsAg 消失を予測することは困難である。

昨年度に行った HBsAg 消失に寄与する因子の解析から、HBsAg 消失には HBV genotype が強く関与している可能性が示されたことから、本検討では、HBV genotype C 感染例に絞り、経過中の HBsAg 陰性化に寄与する因子を解析した。

B. 研究方法

対象は、当院に通院中の HBV キャリア 1,746 例のうち、HBV genotype C 持続感染を認めた 667 例。経過中に HBs 抗原の消失が認

められた 29 例について、臨床背景および特徴を解析した。

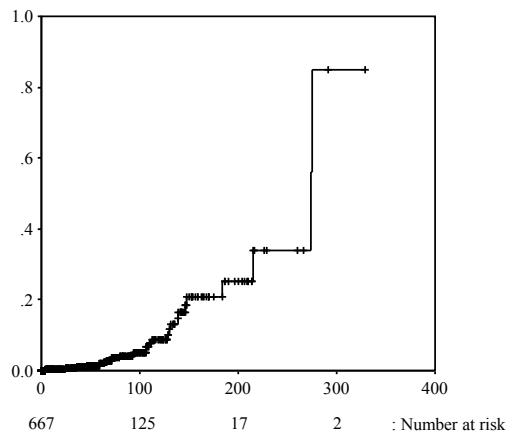
（倫理面への配慮）

患者血清保存ならびに B 型肝炎ウイルス関連マーカーの測定に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている（第疫-726 号）。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。

C. 研究結果

HBV genotype C 持続感染 667 例における HBsAg 陰性化例は 29 例（4.3%）に認めた。これら 29 例の HBsAg 陰性化時の年齢中央値は 54 歳で、男性が 20 例を占めた。そこで、全症例を用いて HBsAg の累積陰性化率を検討したところ、5 年 1.8%、10 年 8.4%、15 年 18.9% であり、年率 0.8~1.2% だった（図 1）。臨床背景を元に、HBsAg 陰性化に寄与する因子について、統計学的解析を行った。単変量解析では、年齢、AST 値、HBeAg 陰性、肝硬変非合併、肝癌非合併が有意な因子として抽出され、多変量解析の結果、HBeAg 陰性、

図1 . HBsAgの累積陰性化率 (N=667)



HCC 非合併が有意な因子として抽出されたが (P=0.005、P=0.018) 治療因子は抽出されなかった (表1)。

表1 . HBsAg消失に關する因子の検討

Factors	単変量	多変量	
	P value	P value	HR (95% CI)
性別 (男 vs 女)	0.9398		
年齢 (55歳未満 vs 55歳以上)	0.0475		
AST (40未満 vs 40以上)	0.0442		
ALT (42未満 vs 42以上)	0.2831		
PLT (18万未満 vs 18万以上)	0.1637		
HBV DNA (5.0 Log未満 vs 5.0 Log以上)	0.4903		
HBeAg (無 vs 有)	0.0022	0.005	0.241 (0.090 - 0.649)
LC (無 vs 有)	0.0287		
HCC (無 vs 有)	0.0012	0.018	0.161 (0.036 - 0.730)
線維化別 (F1,2 vs F3,4)	0.8060		
Treatment (none/NA/IFN/NA+IFN)	0.3695		

ここまでの結果から、治療介入による因子が抽出されなかったが、その理由として、臨床背景が異なる可能性が考えられた。そこで、治療介入例・非介入例に分けて解析を行った。治療非介入 218 例では、いずれの臨床背景においても有意な差が認められず、自然経過に

表2 . 治療介入例におけるHBs抗原陰性化に關する因子

Factors	Category	(HBV genotype C, N=449)		P value
		HBs抗原陰性化例 (n=19)	HBs抗原非陰性化例 (n=430)	
観察開始時の年齢 (歳)	60未満 / 以上	14 / 5	282 / 148	0.777
性別	男性 / 女性	13 / 6	295 / 135	1.00
HBe抗原	陽性 / 陰性	5 / 14	182 / 221	0.018
HBV DNA (Log/ml)	5未満 / 5以上	7 / 12	147 / 260	1.00
AST (IU/L)	33未満 / 以上	11 / 8	168 / 247	0.201
ALT (IU/L)	42未満 / 以上	9 / 10	160 / 255	0.476
Platelet (x10 ⁴ /μl)	18未満 / 以上	9 / 10	273 / 141	0.137
肝硬変	無 / 有	17 / 1	289 / 120	0.030
肝細胞癌	無 / 有	17 / 1	270 / 159	0.003
核酸アナログ治療	単独治療 / その他	7 / 12	252 / 178	0.094
インターフェロン治療	単独治療 / その他	7 / 12	56 / 374	0.010

における HBsAg 陰性化の予測因子は抽出できなかった。一方、治療介入 449 例における解析では、HBeAg 陰性であること、インターフェロン単独療法歴があることが、有意な因子として抽出された (表2)。

D. 考察

本研究では、HBV genotype C 感染例における HBsAg 陰性化について解析を行った。全解析対象症例における HBsAg の累積陰性化率は年率 0.8 ~ 1.2% であり、Chunらによる報告 (JAMA, 2007) とほぼ同程度であった。

次に、HBsAg 陰性化を臨床背景から予測することを目的として HBsAg 陰性化に寄与する因子について統計学的解析を行ったところ、HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な因子として抽出された (P=0.005、P=0.018)。HBsAg が陰性化するためには HBeAg のセロコンバージョンが生じていることが必要であり、HBeAg 陰性化は必須条件を考えられる。一方、HCC 非合併については、HCC 発症に伴い、予後が増悪し、十分な経過観察ができなくなることが、原因と考えられた。いずれにしてもここまでの解析において、治療因子は抽出されておらず、治療介入により十分な HBsAg 陰性化率の向上が得られているとは言い難い結果であった。ただし、治療因子が抽出されない原因の一つとして、治療介入の有無により、患者の臨床背景が異なる可能性が考えられた。

そこで、治療介入した 449 例における HBsAg 陰性化に寄与する因子を解析した。その結果、単変量解析ではあるが、HBeAg 陰性化に加え、インターフェロン介入が因子として抽出され、インターフェロンによる生体内の免疫賦活化が長期予後に關与している可能性が示唆された。

以上の結果から、HBsAg 陰性化に寄与する因子が抽出されたものの、いずれの因子も将来的な HBsAg 陰性化を予測するには十分なものとは言えず、今後、HBsAg 陰性化予測のための新たなバイオマーカーの探索が必要と考えられた。

E. 結論

HBV genotype C 持続感染例における HBsAg 陰性化について解析を行った。HBsAg の陰性化率は年率 0.8 ~ 1.2% と既報とほぼ同等であった。HBsAg 陰性化に寄与する因子として HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な独立因子として抽出されたが、HBsAg 陰性化を予測するバイオマーカーとしては十分とは言えず、今後、新たなバイオマーカーを探索していく必要がある。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清および臨床検査成績を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Yatsunami H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*, 2015, in press.
- 2) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect*, 2014, in press.
- 3) Fujino H., Kimura T., Aikata H., Miyaki D., Kawaoka T., Kan H., Fukuhara T., Kobayashi T., Naeshiro N., Honda Y., Tsuge M., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Takahashi S., Yoshimatsu R., Yamagami T., Kenjo M., Nagata Y., Awai K. and Chayama K., Role of 3-D conformal radiotherapy for major portal vein tumor thrombosis combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2014, in press.
- 4) Naeshiro N., Aikata H., Kakizawa H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Ohno A., Miyaki D., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Takahashi S., Awai K. and Chayama K., Long-term outcome of patients with gastric varices treated by balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol Hepatol* 29(5): 1035-42, 2014.
- 5) Kohno T., Tsuge M., Murakami E., Hiraga N., Abe H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K., Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat*, 2014 in press.
- 6) Huang Y.W., Takahashi S., Tsuge M., Chen C.L., Wang T.C., Abe H., Hu J.T., Chen D.S., Yang S.S., Chayama K. and Kao J.H., On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*, 2014, in press.
- 7) Naeshiro N., Aikata H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Ochi H. and Chayama K., Efficacy and safety of the anticoagulant drug, danaparoid sodium, in the treatment of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*, 2014, in press.
- 6) Honda Y., Takahashi S., Zhang Y., Ono A., Murakami E., Shi N., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M., Hiraga N., Abe H., Ochi H., Imamura M., Aikata H. and Chayama K., The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, in press.
- 7) 柘植雅貴、茶山一彰「B型肝炎に対する抗ウイルス療法」Annual Review 消化器 2014、中外医学社、104-111、2014
- 8) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変

化」消化器内科 58(2)、科学評論社、
231-238、2014

- 9) 柘植雅貴、茶山一彰「テノホビル治療 (naïve 例と核酸アナログ治療抵抗例 に対する成績)」医学と薬学 vol.71、
自然科学社、1185-1190、2014
- 10) 柘植雅貴、茶山一彰「差分解説・B 型慢性肝炎診療における HBs 抗原測定」日本医事新報 No.4703、日本医事 新報社、58、2014

2.学会発表

- 1) 柘植雅貴、村上英介、平賀伸彦、三木 大樹、今村道雄、越智秀典、茶山一彰 「HBV 薬剤耐性変異株に対する核酸 アナログの抗ウイルス効果」第 51 回 日本臨床分子医学会 ポスター
- 2) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰「核酸ア ナログ投与症例における HBsAg 低下 に寄与する因子の検討」第 100 回日本 消化器病学会総会 ワークショップ
- 4) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「核酸 アナログ投与による HBV 感染ヒト肝 細胞内の免疫応答の変化」第 50 回日 本肝臓学会総会 シンポジウム
- 5) 村上英介、柘植雅貴、藤野初江、菅宏 美、福原崇之、小林知樹、本田洋士、 中原隆志、苗代典昭、大野敦司、宮木 大輔、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、 平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由 育、相方浩、茶山一彰「当院における HBs 抗原陰性化例の解析」第 50 回日 本肝臓学会総会 一般演題
- 6) 村上英介、柘植雅貴、茶山一彰「B 型 慢性肝疾患に対する核酸アナログ治 療成績と肝発癌に関する検討」第 18 回日本肝臓学会大会 シンポジウム
- 7) 榎木慶一、柘植雅貴、菅宏美、藤野初 江、小林知樹、福原崇之、苗代典昭、 本田洋士、宮木大輔、村上英介、河岡 友和、平松憲、今村道雄、川上由育、 兵庫秀幸、相方浩、茶山一彰「HBV genotype C における HBsAg 陰性化に 関する検討」第 18 回日本肝臓学会大

会 ポスター

- 8) Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「Nucleotide analogue improves interferon responsiveness in HBV-infected human hepatocytes」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 9) Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takuro Uchida, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスタ
ー
- 10) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Satoshi Yoshimi, Eisuke Murakami, Takashi Nakahara, Atsushi Ono, Tomokazu Kawaoka, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama, 「A novel humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of HBV and HCV infections」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスタ
ー
- 11) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decreases with cell density in primary cultured hepatocytes」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスタ
ー
- 12) Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ono, Sakura Akamatsu, Takashi,

Nakahara, Noriaki Seki, Eisuke Murakami, Yizhou Zhang, Takuro, Uchida, Yohji Honda, Keiichi Masaki, Hiromi Kan, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Michiaki Kubo, Kazuaki Chayama 「Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター

13) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama 「Establishment of a mouse model of acute hepatitis B by activation of human cytotoxic T lymphocytes」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター

14) Hiromi Abe, Tetsushi Sakuma, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Takashi Yamamoto, Kazuaki Chayama 「Analysis of the effect on HBV life cycle by HBV genome editing using TALEN and CRISPR/Cas9 systems」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター

15) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama 「Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients.」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター

16) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Kei

Morio, Masahiro Hatooka, Keiichi Masaki, Takayuki Fukuhara, Tomoki Kobayashi, Noriaki Naeshiro, Yoji Honda, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Akira Hiramatsu, Michio Imamura, Hiroshi Aikata and Kazuaki Chayama 「Analysis of clinical factors relating to the seroclearance of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B virus infection」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター

17) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection leads to activation of interferon-stimulated genes in primary cultured human hepatocytes, but infection efficiency decreases monotonically with decreasing cell density」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究分担者：吉岡健太郎・藤田保健衛生大学 肝胆膵内科・教授

分担研究課題：e 抗体陽性無症候性キャリアにおける肝硬度の s 抗原陰性化と肝発癌への関与についての検討

研究要旨：HBe 抗体陽性の無症候性 B 型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの大部分は治療を受けず、経過観察もされず放置されている。HBs 抗原が陰性化する症例がある一方、少数ながらも発癌する症例がある。HBe 抗体陽性無症候性キャリアの肝硬度について検討した報告はない。本研究では HBe 抗体陽性の無症候性キャリア 108 例について、HBs 抗原陰性化と肝発癌に關与する因子を肝硬度を含めて検討した。HBs 抗原陰性化には、ヒアルロン酸高値、男性、 γ -GTP 高値が關与しており、肝発癌には白血球数低値が關与していることが明らかとなった。肝線維化の非侵襲的評価法である肝硬度測定法である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)は単変量解析では、肝発癌との関係が示されたが、多変量解析では選択されなかった。症例数が少ないので、今後症例を増やして検討する必要がある。

A. 研究目的

HBe 抗体陽性の無症候性 B 型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの大部分は治療を受けず、経過観察もされず放置されている。

しかし Liaw らは、HBV キャリアからの肝癌の発症の 64%が HBe 抗体陽性患者から起こることを報告している（Liaw YF, et al. J Med Virol 1984;13:385）。また HBe 抗体陽性の無症候性キャリアからも少数ではあるが肝癌を発症する。

HBV キャリアからの肝発癌の予測因子として、Lee らは年齢、性別、genotype、HBe 抗原の状態、ALT 値、HBs 抗原量、HBVDNA 量が重要であることを報告している（Lee MH, et al. Hepatology 2013;58:546）。HBe 抗体陽性無症候性キャリアからの肝発癌のリスク因子を検討した報告はない。

Transient elastography (TE)および Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)を用いた肝硬度測定は、超音波により直接肝臓の硬さを評価する技術であり、肝線維化 stage の評価に有用な方法として確立されつつある。HBe 抗体陽性の無症候性キャリアにおいて、侵襲的な肝生検により肝線維化 stage 評価を行うことは困難であるが、TE、ARFI を用いて肝硬度を測定することにより、非侵襲的に肝線維化 stage 評価を行うことは可能である。

本研究では HBe 抗体陽性の無症候性キャリアの HBs 抗原陰性化と肝発癌に關与する因子を肝硬度を含めて検討した。

B. 研究方法

（1）対象及び方法

藤田保健衛生大学病院肝胆膵内科に 2008

年1月から2012年12月までに通院しているHBe抗体陽性無症候性キャリア108例を対象とした。HBs抗原陰性化、肝発癌に肝硬度を含めた各種検査成績が関連するかどうかを検討した。

TEの測定はFibroscan (Echosens)を用いて行った。ARFIの測定は、シーメンス・ジャパン株式会社製超音波診断装置ACUSON S2000を用いて行った。両者とも右肋間走査にて計10回行い、中央値を測定値(kPa、Vs ; m/sec)として用いた。

(倫理面への配慮)

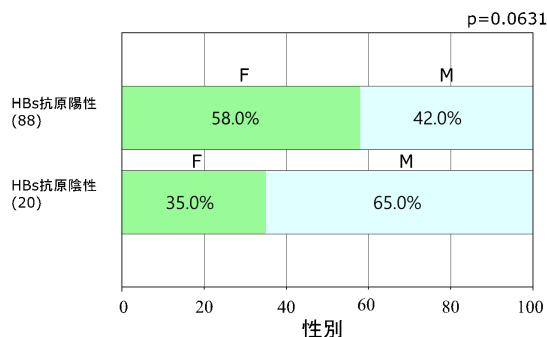
本研究では医療保険の適応が認められている範囲で治療が行われた。ARFIとFibroscanは非侵襲的に肝硬度を測定でき、患者に苦痛や健康被害をきたすものではない。また患者の個人情報の守秘については十分な注意を払った。

C. 研究結果

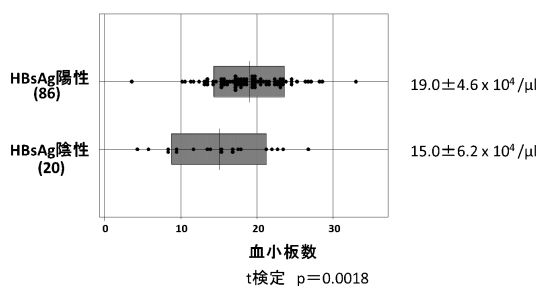
(1) HBs抗原陰性化に關与する因子

HBs抗原陰性化した20例は、陰性化していない88例に比較して、単変量解析にてHBs抗原陰性化には、性別、年齢、USでの肝硬変の有無、 γ -GTP値、ALP値、血小板数、ヒアルロン酸値が関連していた。肝硬度はHBs抗原陰性化と関連していなかった。性別、年齢、USでの肝硬変の有無、 γ -GTP値、ALP値、血小板数、ヒアルロン酸値について多変量解析をするとヒアルロン酸値($p=0.0041$)、性別($p=0.0442$)、 γ -GTP値($p=0.0986$)が選択された。

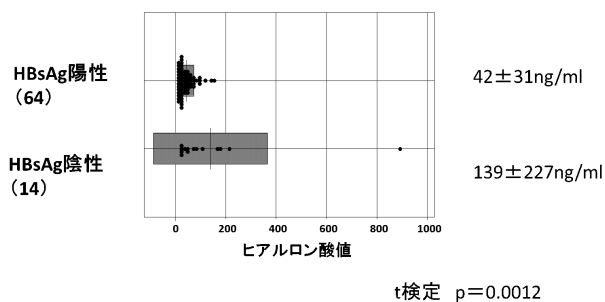
HBs抗原陰性化と性別との関係



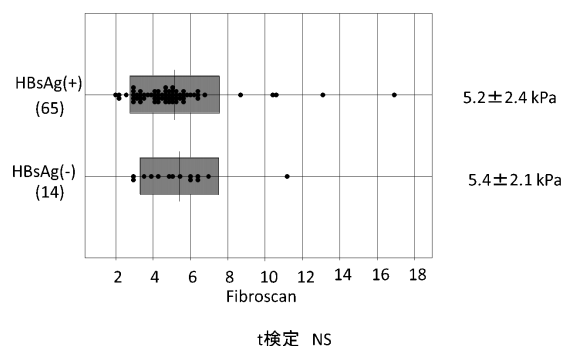
HBs抗原陰性化と血小板数との関係



HBs抗原陰性化とヒアルロン酸との関係



HBs抗原陰性化と肝硬度との関係



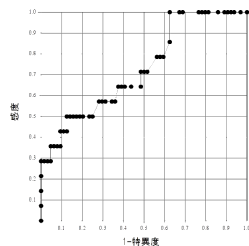
HBs抗原陰性化と関連する因子の多変量解析

性別、年齢、USでの肝硬変の有無、 γ -GTP値、ALP値、血小板数、ヒアルロン酸値について検討した。

	P	Odds ratio	95% CI
ヒアルロン酸	0.0041	1.02	1.01 ~ 1.04
性別 (男)	0.0442	4.50	1.04 ~ 19.50
γ -GTP	0.0986	0.98	0.96 ~ 1.00

HBs抗原陰性化とヒアルロン酸との関係 ROC解析

HBsAg陽性
Cutoff値 76ng/ml
AUROC 0.730
Sensitivity 0.500
Specificity 0.875
Positive predictive value 0.467
Negative predictive value 0.889
Likelihood ratio 4.0
Odds ratio 7.0

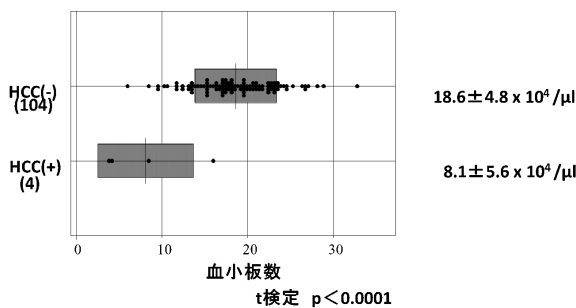


HBs抗原陰性化に関するヒアルロン酸のカットオフ値は76ng/mLであった。

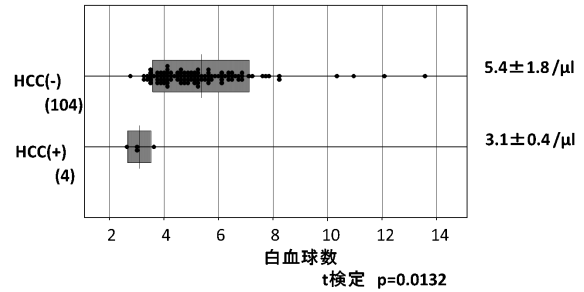
(2)肝発癌に關与する因子

肝発癌した症例は4例しかなかった。単変量解析にてARFI、USでの肝硬変の有無、ALP値、白血球数、血小板数、HBVコア関連抗原、HBe抗体が関連していた。多変量解析をすると白血球数のみが選択された(p=0.0112)。

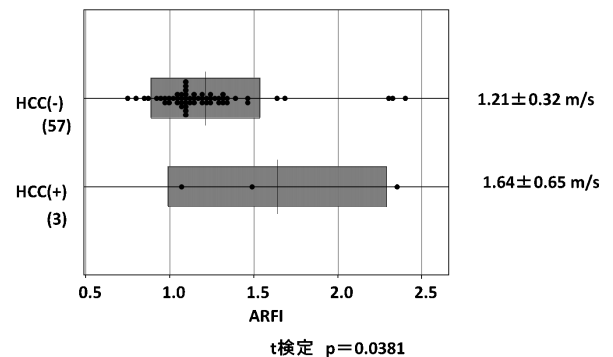
肝癌と血小板数との関係



肝癌と白血球数との関係



肝癌と肝硬度との関係



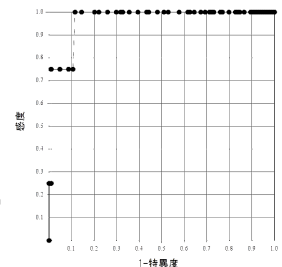
肝癌と関連する因子の多変量解析

ARFI、USでの肝硬変の有無、ALP値、白血球数、血小板数、HBVコア関連抗原、Hbe抗体について検討した。

	P	Odds ratio	95% CI
白血球数	0.0124	0.0112	0.0003 ~ 0.3781

肝癌の有無とWBCとの関係 ROC解析

肝癌あり
Cutoff値 3800/μl
AUROC 0.968
Sensitivity 1.000
Specificity 0.885
Positive predictive value 0.250
Negative predictive value 1.000
Likelihood ratio 8.7

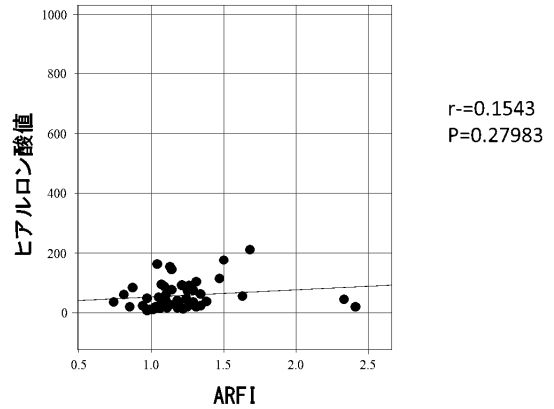


肝発癌に関する白血球数のカットオフ値は 3800/ μ L であった。

(3) 肝硬度の検討

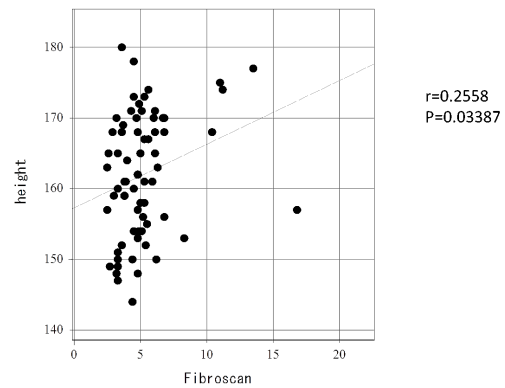
ARFI は体重($r = 0.3376$ 、 $p=0.00834$)、BMI($r=0.3376$ 、 $p=0.00441$)と相関していたが、血小板やヒアルロン酸とは相関しなかった。Fibroscan は身長($r = 0.2558$ 、 $p=0.03387$)、体重($r = 0.2306$ 、 $p=0.05478$)、AST($r = 0.2086$ 、 $p=0.06163$)、血小板($r = -0.2076$ 、 $p=0.06294$)、GTP($r = 0.2645$ 、 $p=0.01701$)と相関していたが、ヒアルロン酸とは相関しなかった。ARFI と Fibiroscan は非常に強い相関を示した($r=0.7322$ 、 $p<0.00001$)。

ARFIとヒアルロン酸値の関係

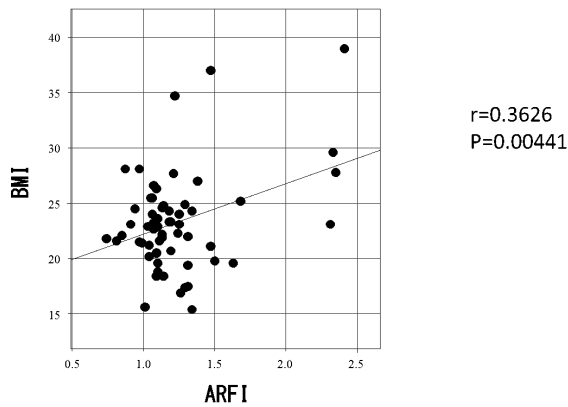


D.

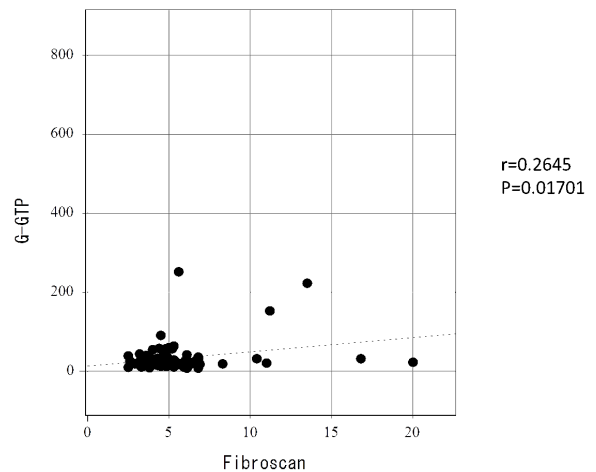
Fibroscanと身長の間



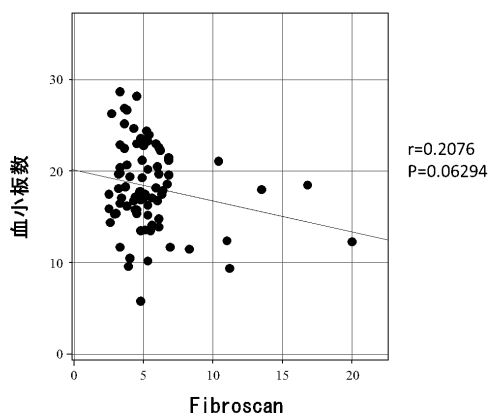
ARFIとBMIの間



FibroscanとγGTP値の間



Fibroscanと血小板数の関係



考察

108例のHBe抗体陽性無症候性キャリアの検討において、単変量解析にてHBs抗原陰性化には、性別、年齢、USでの肝硬変の有無、 γ -GTP値、ALP値、血小板数、ヒアルロン酸値が関連しており、多変量解析ではヒアルロン酸値、性別、 γ -GTP値が選択された。男性や線維化が進行した症例においてHBs抗原が陰性化しやすいと考えられた。

肝発癌した症例は4例しかなかったので、十分な解析は困難であった。しかしその中での検討では、「肝発癌には単変量解析にてARFI、USでの肝硬変の有無、ALP値、白血球数、血小板数、HBVコア関連抗原、HBe抗体が関連しており、多変量解析では白血球数のみが選択された。

ヒアルロン酸も白血球数ともに肝線維化と関係している因子であるが、肝線維化と関係していると考えられるARFIは肝発癌とのみ関係していた。

ARFIは体重、BMIと、Fibroscanは身長、体重、AST、血小板、GTPと関連していたが、両者ともヒアルロン酸と有意な相関は示さなかった。ARFIとFibroscanは

非常に強く相関していた。

E. 結論

HBe抗体陽性の無症候性キャリアでは、男性、ヒアルロン酸高値例でHBs抗原陰性化が期待できるが、白血球数が少ないほど肝発癌のリスクが高いため注意深い経過観察が必要である。

発癌症例が少ないので、今後症例を増やして検討する必要がある。

HBe抗体陽性の無症候性キャリアでは非侵襲的肝線維化評価法であるARFIとFibroscanはお互いに強く相関していたが、ヒアルロン酸とは相関していなかった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakaoka K, Hashimoto S, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Takagawa Y, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Nishikawa T, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K. PNPLA3 I148M associations with liver carcinogenesis in Japanese chronic hepatitis C patients. SpringerPlus. 2015;4(1):83
2. Yoshioka K, Hashimoto S, Kawabe N. Measurement of liver stiffness as a non-invasive method for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2015;45(2):142-51
3. Ichino N, Osakabe K, Sugimoto K, Suzuki K, Yamada H, Takai H, Sugiyama H, Yuki take J, Inoue T, Ohashi K, Hata

- H, Hamajima N, Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Yoshioka K. The NAFLD Index: A Simple and Accurate Screening Tool for the Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Rinsho Byori*. 2015;63(1):32-43
4. Honda T, Ishigami M, Masuda H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Katano Y, Goto H. Effect of peginterferon alfa-2b and ribavirin on hepatocellular carcinoma prevention in older patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(2):321-8
 5. Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B polymorphism and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with interferon responsiveness. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(1):178-83
 6. Shakado S, Sakisaka S, Okanoue T, Chayama K, Izumi N, Toyoda J, Tanaka E, Ido A, Takehara T, Yoshioka K, Hiasa Y, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Kumada H. Interleukin 28B polymorphism predicts interferon plus ribavirin treatment outcome in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis: A multicenter retrospective study in Japan. *Hepatol Res*. 2014;44(9):983-92
 7. Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Mizuno Y, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Takagawa Y, Ohki M, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K. Factors correlating with acoustic radiation force impulse elastography in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1289-97
 8. 川部直人、吉岡健太郎 . エラストグラフィ . 榎本信幸、竹原徹郎、持田智編、*Hepatology Practice Vol.3 C型肝炎の診療を極める 基本から最前線まで*、文光堂 東京 2014:73-79
 9. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、福井愛子、吉岡健太郎 . C型肝炎治療困難例に対する瀉血療法、IFN-療法、脾摘/PSE 後の Peg-IFN 療法の検討 . *消化器内科* 2014;58(3):405-412
 10. 吉岡健太郎 . 急性肝炎 ; *臨床雑誌内科* 6 増大号 2014; 113(6):1074-5
 11. 吉岡健太郎 . ChallengeQUIZ 貴方も名医 ; *CLINIC magazine* 2014;540(6):37,68-9
 12. 高川友花、川部直人、橋本千樹、原田雅生、村尾道人、新田佳史、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、吉岡健太郎 . C型肝炎硬変に合併した多発肝 MALT リンパ腫の1例 . *肝臓* 2014;55(5):274-283
2. 学会発表
 1. Kawabe N, Osakabe K, Hashimoto S, Murao M, Nitta Y, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Ohki M, Takagawa Y, Kurashita T, Matsuo E, Takamura N, Fukui A, Nshikawa T, Ichino N,

- Yoshioka K. Effect of antiviral treatment on liver stiffness and its correlation to hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B. AASLD The Liver Meeting 2014; Boston, MA /Hynes Convention Center 2014 Nov.7-11. Hepatology 2014; 60(suppl):1112A.
2. Takagawa Y, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Osakabe K, Ichino N, Hashimoto S, Yoshioka K. Factors associated with HBsAg clearance in HBeAb-positive patients with persistently normal ALT levels. The 11th JSH Single Topic Conference; HIROSHIMA November 20-21, 2014 Program & Abstract Book p94
 3. 福井愛子、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、水野裕子、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、半谷眞七子、亀井浩行、吉岡健太郎 . BCAA 顆粒製剤のみでは効果不十分な肝硬変における肝不全用経口栄養剤の LES 追加投与の有用性 . 第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会 ; 大阪国際会議場 . 2014/1/11-12 日本病態栄養学会会誌 2014;17(suppl):S116
 4. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . 肝細胞癌に対するシスプラチン動注療法を併用した TACE による肝内異所性再発の抑制 ; 第 100 回日本消化器病学会総会 ; 東京国際フォーラム 2014/4/23~26 日本消化器病学会雑誌 2014(suppl):A275
 5. 中岡和徳、高川友花、大城昌史、菅敏樹、水野裕子、嶋崎宏明、中野卓二、新田佳史、村尾道人、原田雅生、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 . C 型慢性肝炎患者における PNPLA3 遺伝子の肝線維化、発癌に対する影響 - ARFI による検討 ; 第 100 回日本消化器病学会総会 ; 東京国際フォーラム 2014/4/23~26 日本消化器病学会雑誌 2014(suppl):A306
 6. 刑部恵介、市野直浩、西川徹、加藤美穂、杉山博子、青山和佳奈、柴田亜委、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 . B 型慢性肝炎の肝硬度に及ぼす抗ウイルス療法の影響と肝発癌との関係についての検討 . JSUM2014 日本超音波医学会第 87 回学術集会 ; パシフィコ横浜 2014/5/9~11 Jpn J Med Ultrasonics 2014;41(suppl)S601
 7. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、福井愛子、吉岡健太郎 . 治療困難な C 型肝炎に対する IFN- 療法、脾摘後の PEG-IFN 療法、瀉血療法の検討 ; 第 50 回日本肝臓学会総会 ; ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓:2014;55(suppl. 1):A121
 8. 嶋崎宏明、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、西川徹、吉岡健太郎 . NAFLD における PNPLA3 の SNP と ARFI による Vs 値との関係 ; 第 50 回日本肝臓学会総会 ; ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓 :2014;55(suppl. 1):A363
 9. 村尾道人、川部直人、吉岡健太郎 , C 型肝炎に対するペグインターフェロン +

リバビリン併用療法後の発癌に關与する因子の検討；第 50 回日本肝臓学会總會；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓：2014;55(suppl. 1):A446

10. 福井愛子、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . 非アルコール性脂肪性肝疾患患者におけるビタミン E 投与の有用性～肝硬度測定値の改善効果を含めた検討～；第 50 回日本肝臓学会總會；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓：2014;55(suppl. 1):A453
11. 川部直人、橋本千樹、刑部恵介、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、倉下貴光、高村知希、松尾恵美、西川徹、市野直浩、吉岡健太郎 . 肝硬度測定による B 型慢性肝炎の肝発癌予測と核酸アナログ治療効果の検討；JDDW2014 第 18 回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓：2014;55(suppl. 2):A594
12. 村尾道人、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、中野卓二、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . C 型肝炎に対するペ

グインターフェロン・リバビリン併用療法後の経過と発癌について；JDDW2014 第 18 回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓：2014;55(suppl. 2):A652

13. 菅敏樹、斎藤恵美、高村知希、倉下貴光、高川友花、大城昌史、中岡和徳、水野裕子、嶋崎宏明、中野卓二、村尾道人、新田佳史、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 . 当院における C 型慢性肝炎に対する Telaprevir および Simeprevir を用いた 3 剤併用療法の使用経験；JDDW2014 第 18 回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓：2014;55(suppl. 2):A667
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 4. 特許取得
なし
 5. 実用新案登録
なし
 6. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年報告分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究分担者：八橋 弘・国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長
分担研究課題：HBs 抗原量と肝病態

研究要旨：HBV 持続感染症例における HBs 抗原量と肝病態について検討した。2012 年 4 月～2013 年 7 月に当科を受診した HBV 持続感染例のうち、肝臓合併と既往がなく、抗ウイルス療法中の症例を除外した 312 例を対象とした。HBsAg 量の測定は CLIA 法を用いた。年齢中央値 54.7 才（15～87 才）男性 151 例（48.4%）、HBsAg 量中央値 1019.9U/mL（～938.24U/mL）、HBVDNA 量中央値 3.0 logcopy/mL（～9.4）、HBe 抗原陽性 39 例（12.5%）、ALT 中央値 20IU/mL（2～533IU/mL）、血小板数中央値 18.9 万（3.1～62.0）。全例 312 例において血中 HBsAg 量に寄与する有意因子を重回帰分析 stepwise selection により最終モデルを算出、血中 HBVDNA 量（ $\beta=0.852$, $p<0.001$ ）、HBeAg (negative=0, positive=1)（ $\beta=-0.357$, $p<0.001$ ）、年齢（ $\beta=-0.164$, $p<0.001$ ）、血小板数(/103)（ $\beta=0.104$, $p<0.001$ ）であった（調整済 $R^2 = 0.53$ ）。HBsAg / HBVDNA 比を用いて HBeAg(+)期と HBeAg(-)期を比較したところ、HBeAg(+)期は 0.55 ± 0.08 (SD)であり、年齢、血小板数、HBeAg 値に影響されず、ほぼ一定の値を維持した。HBeAg(-)期になると 0.89 ± 0.53 (SD)に有意に上昇（ $p<0.01$ ）した。HBeAg(-)期の HBs 抗原量は、加齢とともに減少するが、血小板値が低値である症例ほどより低値であった。（結論）HBeAg 陽性期では、HBVDNA 量の減衰度に相応しながら HBsAg 量は低値を示す。しかし HBeAg 陰性化すると、HBVDNA 量に相応した HBs 抗原量の低下はみられず、一時下げ止まる。しかし年齢が高いほど、そして血小板数が低いほど HBs 抗原量は低値を示した。HBe seroconversion 後の B 型肝炎において HBs 抗原量は、加齢とともに低下するが、線維化が進展例はより低値を示すと考えられた。

共同研究者

山崎 一美 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター・肝臓内科

A. 研究目的

近年 B 型持続感染症例において、HBs 抗原量が肝がん発症のリスクマーカーとして有用性について注目されている。われわれは HBs 抗原量と肝病態の関連について検討した。

B. 研究方法

2012年4月から2013年3月の期間、国立病院機構長崎医療センター・肝臓内科の受診患者のうち、HBV持続感染例において肝細胞癌の既往がなく、抗ウイルス療法を投与中の症例を除外した312例を対象とした。HBs抗原量は CLIA法にて測定した。

312例の患者背景を以下に示す。年齢中央値54.7才（15～87才）男性151例（48.4%）

HBs 抗原量中央値 1014.44U/mL（～93824 U/mL）、HBVDNA量3.2 logcopy/mL（～9.4）、HBe 抗原陰性 273 例（87.5%）、AST 中央値 22IU/mL（11～546IU/mL）、ALT 中央値 20IU/mL（2～533IU/mL）、血小板中央値 18.9 万（3.1万～62万）、FIB-4 index 中央値 1.4（0.3～17.6）、他の肝疾患の合併 11 例（3.5%）、IFN 治療歴 34 例（10.9%）であった。

C. 研究結果

1) HBs 抗原と各因子との相関(単変量解析)
HBs 抗原と HBVDNA 量には正の相関を認めた（ $r=0.664$, $p<0.001$ ）。FIB-4 index と HBs 抗原量には負の相関関係を認めた（ $r=0.304$, $p<0.001$ ）。年齢と HBs 抗原には負の相関関係

を認めた($r=0.424, p<0.001$)、女性の Log_{10} (HBs抗原量)は女性2.77、男性2.35で女性が有意に高値であった($p=0.034$)。

2) HBs 抗原量に寄与する因子(重回帰分析・ステップワイズ法)

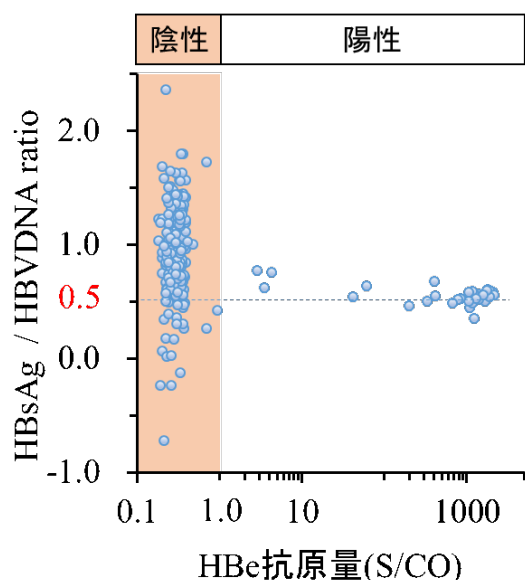
HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した(表1)。HBs 抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、年齢が高く、HBe 抗原陽性で、男性であった。なかでも HBVDNA 量をもっとも影響する因子であった。

(表1) HBs 抗原量の独立寄与因子(全例)

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.862	<0.001
HBeAg (negative: 0, positive: 1)	0.529	-0.357	<0.001
age		-0.164	<0.001
Plt		0.104	0.010
AST		-1.944	0.053
ALT		-1.909	0.057
sex (female: 0, male: 1)		-1.765	0.079
IFN, BCP, PC, Other liver disease			>0.1

3) HBe 抗原量と HBs 抗原量対 HBVDNA 量比

(図1) HBe 抗原量と HBs 抗原量対 HBVDNA 量比の関係



HBe 抗原量が 1.0 以上の陽性のとき、HBe 抗原量がどの値を示しても HBsAg/HBVDNA

量比は 0.5 ~ 0.6 の値であった。ところが、HBe 抗原量が 1.0 未満の陰性になると、HBsAg/HBVDNA 量比は 0.0 ~ 1.6 の範囲に広く散布するが、主には比は 0.5 より高い値に散布した。

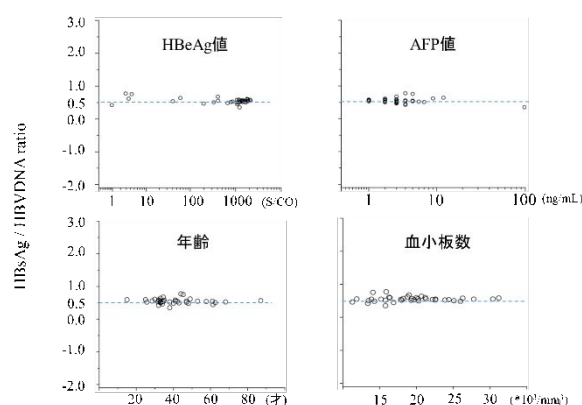
4) HBe 抗原陽性時の HBs 抗原量

HBe 抗原陽性期の HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した(表2)。HBs 抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、AFP 低値で HBe 抗原低値であった。HBVDNA 量をもっとも影響する因子であった。

(表2) HBe 抗原陽性時の HBs 抗原量の独立寄与因子

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.385	0.003
AFP	0.709	-0.467	<0.001
HBeAg (continuous variables)		0.327	0.008
AST, ALT, sex, IFN, BCP, PC, Other liver disease			>0.1

(図2) HBe 抗原陽性時の HBsAg/HBVDNA 比と HBe 抗原・AFP 値・年齢・血小板数



HBe 抗原陽性時における HBsAg/HBVDNA 比は、HBe 抗原量、AFP 値、年齢、血小板数がどの値であっても 0.5 ~ 0.6 を示していた。

5) HBe 抗原陰性時の HBs 抗原量

(表3) HBe 抗原陰性時の HBs 抗原量の独立寄与因子

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.583	< 0.001
age	0.458	- 0.173	< 0.001
Platelet		0.116	0.011
sex (female: 0, male: 1)		- 0.176	0.080
IFN, BCP, PC, AST, ALT, AFP, Other liver disease			> 0.1

HBe 抗原陰性期の HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した(表 3)。HBs 抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、高齢で血小板数が低値であった。

D. 考察

HBs 抗原量は、B 型肝炎症例の病態評価のための重要なマーカーとなっている。血中 HBs 抗原量は HBV の増殖状態を反映しやすく、発癌リスクマーカーとなる可能性が示唆されている。しかし HBs 抗原量の規定因子を検討した解析は少ない。本研究では、核酸アナログを導入していない症例を対象とすることで、自然経過での HBs 抗原量を明らかにすることを目的とした。

HBs 抗原量にもっとも寄与する因子は HBVDNA 量であった。特に HBe 抗原陽性時期における HBs 抗原量は HBVDNA 量でほぼ規定されていた。

一方、HBe 抗原陰性時期においても HBVDNA 量が規定因子の一つになるが、その影響は弱くなる。年齢と血小板数の 2 因子が寄与してくる。加齢とともに HBs 抗原量は低下し、血小板数が低下すると HBs 抗原量は低値を示す。血小板数は肝線維化を反映していることもあり、線維化進展によって HBs 抗原量が低下することを示唆しているかもし

れない。線維化進展のない HBe 抗原陰性キャリア (low replicative 期) において血中 HBs 抗原量が多いと発癌リスクを負うことが報告されているが、肝硬変症例においても HBs 抗原量が低下することもあり、基礎肝病態をよく診断したうえで、HBs 抗原量を評価しなければならないと考える。

E. 結論

HBs 抗原量は、HBVDNA 量に最も反映しているが、年齢、肝線維化、HBe 抗原にも影響を受けている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Bae SK, [Yatsushashi H](#), Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H. Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(10):E267-72.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容について特にありません。

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
平成 26 年度分担研究報告書

B型肝炎ウイルスe抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者: 分担研究者 井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻
人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学 教授

分担研究課題: HBe 抗体陽性キャリアの肝発癌の検討

研究要旨: HBe 抗体陽性 HBV キャリアの長期予後を明らかにするために、HBe 抗体陽性 B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアの実態とその発癌率、また発癌例の特徴について解析した。対象は 1988 年から 2013 年までに当院および当科関連施設を受診し、1 年以上経過観察が可能であった、肝細胞癌の既往歴のない、B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性キャリア症例 290 例で、年齢の中央値は 55 歳(4~85)で、男性 143 例(49.3%)、肝細胞癌合併 19 例(6.6%)であった。また、観察期間の中央値は 71.6 ヶ月(12.8~311.0)で、経過観察期間中に 7 例(2.4%)が死亡し、うち 4 例(1.4%)が肝疾患関連死であった。経過観察開始時に肝細胞癌非合併例 284 例中 13 例(4.2%)に肝細胞癌が発生し、発癌までの期間の中央値は 69.4 ヶ月(5-311)で、累積発癌率は 5 年で 2.9%、10 年で 6.9%、15 年で 14.1%であった。発癌に関わる因子について多変量解析を施行(n=225)し、経過観察開始時に年齢 55 歳以上(p=0.018, HR 7.818, 95%CI 1.426-42.876)、AFP 5.0 ng/mL 以上(p=0.044, HR 20.564, 95%CI 1.081-391.286)が発癌に関連する有意な因子であった。核酸アナログ投与例 44 例の解析では、12 例(27.3%)が経過中に発癌し、AFP 5.0 ng/mL(p=0.018)、Fib-4 index 2.0 以上(p=0.001)で累積発癌率が高かった。HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの発癌は低率であったが、高齢で AFP 5.0ng/mL 以上、線維化進展例では、発癌リスクが高く、厳重な経過観察が必要であると考えられた。

共同研究者

馬渡誠一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

消化器疾患・生活習慣病学 助教

森内昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

HGF 組織修復・再生医療学 特任講師

宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

消化器疾患・生活習慣病学 准教授

玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

肝疾患相談センター 特任講師

小田耕平 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

消化器疾患・生活習慣病学

A. 研究目的

HBe 抗体陽性の無症候性キャリアの予後は良好とされている一方、HBe 抗原が抗体にセロコンバージョンしても血中 HBV DNA 量が十分低下せず慢性肝炎が持続する場合や、いったん非活動性キャリアとなった後に肝炎の再活性化が起こる場合がある。このような肝炎は HBe 抗原非産生 HBV 変異株によって惹起され、肝硬変や肝癌に進行しやすいことが報告されている。近年、核酸アナログ製剤が登場し、HBV-DNA は高率に抑制され、予後の改善が得られ、発癌も抑制されるとの報告が散見される。しかし、HBe 抗体陽性 HBV キャリアの長期予後や発癌に関連する因子についてその詳細は明らかにされていない。そこで本研究では当院および当

科関連施設における HBe 抗体陽性 HBV キャリアの実態とその発癌率、また発癌例の特徴について解析した。

B. 研究方法

1988年から2013年までに当科を受診し、1年以上経過観察が可能であった、肝細胞癌の既往歴のない、HBe 抗体陽性キャリア症例 290 例について、以下の検討を行った。

1. 患者背景

2. 累積発癌率

3. 肝発癌に関連する因子の検討

4. 核酸アナログ投与例における肝発癌に関連する因子の検討

5. HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌例の検討

統計解析については、二乗検定、マン・ホイットニーの U 検定、ログランク検定、cox 比例ハザードモデルを用いて行った。

(倫理面への配慮)

当院で定めた倫理規定等を遵守し、個人情報の漏洩防止に関しては、連結可能匿名化を行うとともに個人識別情報を厳重に管理・保管し、被験者のプライバシーの保護に関しては万全を期して、研究を行った。

C. 研究結果

1. 患者背景

HBe 抗体陽性キャリア症例 290 例の年齢の中央値は 55 歳 (4~85) で、男性 143 例 (49.3%)、肝細胞癌合併 19 例 (6.6%) で、6 例は経過観察開始時に肝細胞癌を認めていた。また、観察期間の中央値は 71.6 ヶ月 (12.8~311.0) で、7 例 (2.4%) が死亡し、うち 4 例 (1.4%) が肝疾患関連死であった。経過観察開始時に肝細胞癌非合併例 284 例中、核酸アナログ投与例は 44 例 (15.5%)

で、経過観察中に 12 例 (27.3%) に肝細胞癌を認めた。一方、核酸アナログ非投与例 240 例中、経過観察中に肝細胞癌を認めた症例は 1 例 (0.4%) のみであった。

2. 累積発癌率

経過観察開始時に肝細胞癌非合併例 284 例中 13 例 (4.2%) に肝細胞癌が発生していた。発癌までの期間の中央値は 69.4 ヶ月 (5-311) で、累積発癌率は 5 年 2.9%、10 年 6.9%、15 年 14.1% であった。ALT 別の累積発癌率は、ALT < 30 IU/L で 5 年 0%、10 年、15 年 4.5% に対し、ALT ≥ 30 IU/L では、5 年 7.0%、10 年 11.4%、15 年 21.7% と有意に高かった (p=0.001)。また、HBV DNA 別の累積発癌率は、HBV DNA < 4.0 LC/mL で 5 年、10 年、15 年いずれも 0.7% に対し、HBV DNA ≥ 4.0 LC/mL では 5 年 5.3%、10 年 12.5%、15 年 29.4% と有意に高かった (p=0.008)。

3. 肝発癌に関連する因子の検討

Kaplan-Meyer 法を用いて肝発癌に関連する背景因子を検討した。HBV-DNA ≥ 4.0 LC/mL (p=0.008)、ALT ≥ 35 IU/L (p<0.001)、血小板 < 12 万 /μL (p<0.001)、血清アルブミン値 < 4.1 g/dL (p=0.027)、AFP ≥ 5.0 ng/mL (p<0.001)、核酸アナログ投与歴あり (p<0.001) で有意に累積発癌率が高かった。これらの因子に年齢、性別を加えて、Cox 比例ハザードモデルにて多変量解析を施行し (n=225)、経過観察開始時に年齢 55 歳以上 (p=0.018、HR 7.818、95%CI 1.426-42.876)、AFP 5.0 ng/mL 以上 (p=0.044、HR 20.564、95%CI 1.081-391.286) が、発癌に関連する有意な因子であった。

4. 核酸アナログ投与例における肝発癌に関連する因子の検討

核酸アナログ投与 44 例の解析では、経過観察中 12 例 (27.3%) に発癌がみられた。Kaplan meier 法による

検討で、AFP 5.0 ng/mL (p=0.018)、Fib-4 index 2.0 以上 (p=0.001) で有意に累積発癌率が高かった。

5. HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌例の検討

核酸アナログ非投与 240 例中、ALT<30 かつ HBV-DNA 4.0LC/mL からの発癌例はなかった。また、経過観察開始時に肝細胞癌を認めた 6 例中 1 例が発癌時 ALT 16 IU/L、HBV-DNA 3.3 LC/mL の非活動性キャリアの状態であった。

D. 考察

HBe 抗体陽性 HBV キャリア 290 例について検討した。肝細胞癌非合併例の検討で、累積発癌率は 5 年 2.9%、10 年 6.9%、15 年 14.1%であった。これまでの報告と同様に、HBV DNA 量が多く、ALT 値の高値例で累積発癌率が高かったが、多変量解析では年齢 55 歳以上、AFP 5.0 ng/mL 以上が発癌に寄与する因子であった。多変量解析で、HBV DNA 量や ALT 値が発癌に寄与する因子として抽出されなかった原因として、近年、核酸アナログ製剤が登場し、経過中にウイルス量の減少や肝炎の沈静化が得られ、発癌が抑制されたことが理由の一つと考えられる。しかし、核酸アナログ投与例で 27.3%が発癌し、AFP 5.0 ng/mL (p=0.018)、Fib-4 index 2.0 以上 (p=0.001) で有意に累積発癌率が高かったことから、線維化進展例は発癌のリスクが高いと思われる。

HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌については、今回の長期経過観察例の中には認めなかったが、経過観察開始時に肝細胞癌を認めた 6 例中 1 例に認めており、非活動性キャリアにおいても定期的な経過観察が必要と思われる。

E. 結論

HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの発癌は低率と

思われたが、HBe 抗体陽性キャリアのうち、核酸アナログ投与の有無にかかわらず、高齢で AFP 5.0ng/mL 以上、線維化進展例では、発癌リスクが高く、嚴重な経過観察が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- (1) Mawatari S, Uto H, Moriuchi A, Tabu K, Muromachi K, Tabu E, Oda K, Imanaka D, Oshige A, Nakazawa J, Kumagai K, Tamai T, Okamoto H, Tsubouchi H, Ido A. Horizontal transmission of de novo hepatitis B between spouses: A case report. Hepatol Res. 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12422. [Epub ahead of print]
- (2) Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H. Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. J Med Virol. 2014 ;86:1877-85.

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：阿部雅則 愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学 准教授

分担研究課題：愛媛県における HBV genotype D 持続感染者の現状

研究要旨:1970 年代に愛媛県で流行した HBV genotype D の持続感染者の現状について調査した。対象は愛媛大学医学部附属病院、愛媛県立中央病院に通院中の HBV genotype D 持続感染者 44 名。このうち約 7 割は HBe 抗体陽性非活動性キャリア、約 3 割が慢性肝炎であった。今後、感染期間の長期化、高齢化による肝硬変への進展と肝細胞癌発生を含めて長期的に経過をみていく必要がある。

共同研究者
道堯浩二郎 愛媛県立中央病院消化器病センター・センター長
日浅陽一 愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学・教授

1970 年代が 79.5%を占めていた。臨床像としては、HBe 抗体陽性非活動性キャリアが 29 例（70.5%）と最も多く、HBe 抗原陽性無症候性キャリアは 2 例であった。13 例（29.5%）は慢性肝炎であり、そのうち 6 例は核酸アナログ製剤の治療を受けていた。

A. 研究目的

愛媛県で 1970 年代に流行した Gianotti 病は HBV genotype D が原因であり、その genotype D はロシア由来の外来種であることを報告してきた。流行から約 40 年経過しており、持続感染者の現状を調査する目的で研究を行った。

B. 研究方法

- 1) 現在の愛媛県における genotype D の持続感染者数について検診データを用いて推測した。
- 2) 愛媛大学医学部附属病院、愛媛県立中央病院で外来通院中の HBV genotype D 持続感染者 44 名の臨床像を解析した。

C. 研究結果

- 1) 愛媛県における現在の感染者数は約 700 - 800 名と推定された。
- 2) HBV genotype D 持続感染者の出生年は

D. 考察

外来性 genotype である HBV genotype D は、四国西北部に 1900 年頃に侵入して定着拡散したと推察されている。HBV genotype D は 1970 年代に乳幼児に急速に拡散し、1990 年頃より性感染による急性、劇症肝炎が散発性に発生した。現在、1970 年代の感染者が出産年齢に達しており、母子感染に対しても注意が必要である。

以前の調査と同様に、HBV genotype D 持続感染者の臨床像は HBe 抗体陽性非活動性キャリアの割合が高かったが、慢性肝炎の症例も存在する。現在までに肝硬変、肝細胞癌へと進行した症例はみられないが、今後感染期間の長期化、高齢化による肝硬変への進展と肝細胞癌発生を含めて長期的に経過をみていく必要がある。

E. 結論

愛媛県には現在 700 - 800 名の HBV genotype D 持続感染者が存在していると推測された。その多くは HBe 抗体陽性非活動性キャリアであるが、長期経過、予後についてはさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Michitaka K, Hiraoka A, Tokumoto Y, Ninomiya K, Ninomiya T, Horiike N, Abe M, Hiasa Y. Clinical features of adult patients with acute hepatitis B virus infection progressing to chronic infection. *Int J Hepatol* 2014: 358206, 2014.

2) Watanabe T, Tokumoto Y, Hirooka M, Koizumi Y, Tada F, Ochi H, Abe M, Kumagi T, Ikeda Y, Matsuura B, Takada K, Hiasa Y. An HBV-HIV co-infected patient treated with tenofovir-based therapy who achieved HBs antigen/antibody seroconversion. *Intern Med* 53: 1343-1346, 2014.

2. 学会発表

1) 渡辺崇夫、徳本良雄、多田藤政、越智裕紀、小泉洋平、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一。当院における B 型肝炎に対するエンテカビル長期投与の治療効果 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月、東京

2) 道堯浩二郎、平岡淳、藤方理恵、今井一平、城藤幸一、小黒邦彦、鶴岡隆志、徳本良雄、阿部雅則、日浅陽一。B 型肝炎ウイルス genotype B とヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の分布と共感染に関する検討 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月、東京

3) 多田藤政、阿部雅則、渡辺崇夫、越智裕紀、小泉洋平、徳本良雄、廣岡昌史、道堯

浩二郎、日浅陽一。HBe 抗原陰性 HBV ジェノタイプ D 無症候性キャリアの臨床的特徴について 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月、神戸

4) 渡辺崇夫、高田清式、徳本良雄、越智裕紀、小泉洋平、多田藤政、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一 当院の HIV 陽性者における HBV 共感染の現状 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月、神戸

5) Akbar SMF, Abe M, Hiasa Y, Chen S. Myeloid-derived suppressor cells, a new entity, capable of regulating antigen-specific and T-cell based immunity in chronic HBV infection. The 11th JSH Single Topic Conference 2014 年 11 月、広島

6) Watanabe T, Takada K, Tada F, Imai Y, Koizumi Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y. Frequent hepatitis B virus infection in HIV patients: the need to examine HBV markers in HIV patients. The 11th JSH Single Topic Conference 2014 年 11 月、広島

7) Tokumoto Y, Watanabe T, Joko K, Michitaka K, Imai Y, Koizumi Y, Tada F, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y. Treatment effects of long-term entecavir for patients with chronic hepatitis B. The 11th JSH Single Topic Conference 2014 年 11 月、広島

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：中本 安成 福井大学医学部内科学(2)領域 教授

分担研究課題：B 型肝炎の再活性化と免疫病態に関する臨床的研究

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）再活性化リスクの高い、R-CHOP・CHOP療法が施行された血液悪性疾患症例における治療前後の免疫抑制状況を、多項目のサイトカインを測定し、健常症例と比較することで検討した。寛解時のIL-17、IL-1、G-CSF、IFN- γ の有意な抑制が認められたため、血液疾患におけるHBV再活性化にはCD4⁺T細胞の関与が示唆された。また、長期に免疫抑制・化学療法が施行されたHBV既往感染症例からHBV再活性化群と非再活性化群を抽出し、HLA class II領域の複数のSNPに対するgenotype assayにより両群を比較・検討した。再活性化群ではrs9277535においてAA genotypeの割合が高く、非再活性化群の大部分がGG genotypeだったことから、rs9277535がHBV再活性化の宿主因子である可能性が示された。

A. 研究目的

免疫抑制・化学療法に伴うB型肝炎ウイルス（HBV）再活性化の機序について、未だ十分に解明されていない点が多い。これまでの検討により、血液悪性疾患治療においてHBV再活性化率が高いことが示唆された。また、免疫抑制療法施行中に変動する血清サイトカイン動態がHBV再活性化に関与すると想定し、マルチプレックスアッセイ法による多項目のサイトカイン測定系を導入・確立してきた。さらには、HBV再活性化の宿主因子としてHLA class II領域のSNPが係わる可能性に注目した。今回、HBV再活性化リスクが高い血液悪性疾患の化学療法における免疫抑制の程度を、健常者との血清サイトカイン比較により検討した。また、HBV再活性化症例に特徴的なHLA class II領域のSNPの有無を解析した。

B. 研究方法

2013年1月から2014年2月までに

当院でR-CHOP療法またはCHOP療法により寛解が得られた悪性リンパ腫症例5例について、細胞性免疫・液性免疫・自然免疫の指標となる27項目のサイトカイン・ケモカインの治療経過における変動をBio-PlexTM Suspension Array System [Bio-Rad社]を用いて測定し、大腸腺腫に対する内視鏡的切除術が予定されている20例の対照と比較・検討した。

また、当院において免疫抑制・化学療法が施行され、48週以上の経過観察が可能なHBV既往感染症例から、HBV再活性化群(9例)と非再活性化群(10例)を抽出し、B型肝炎やC型肝炎等でのgenotypeによる対応遺伝子発現の変化が文献的に確認されているHLA class II領域の24個のSNPsに対し、GENECUBE^R [TOYOBO社]を用いたgenotype assayを施行し、両群の相違を比較・検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分注意した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

1) 化学療法で寛解した悪性リンパ腫5例において、寛解時点での血清 IL-17 / IL-1 / G-CSF / IFN- γ の平均値はそれぞれ 123.1 / 3.7 / 96.0 / 194.1pg/ml であり、対照群の値(IL-17 / IL-1 / G-CSF / IFN- γ =158.2 / 6.8 / 146.2 / 306.5pg/ml)に比べて有意に低値だった ($p < 0.05$)。他のサイトカイン・ケモカインにおいて、治療前後での有意な産生低下や対照群との相違はみられなかった。

2) HBV 再活性化群 (9 例) と非再活性化群 (10 例) の HLA class II 領域の SNPs を解析した結果、rs977535 のアデニン (A) とグアニン (G) の比率は両群で異なり、非再活性化群では有意に A の割合が高かった (再活性化群 14/18 [77.8%] vs. 非再活性化群 7/20 [35.0%], $p=0.042$)。その他の 23 個の SNPs において、両群で有意な差はみられなかった。

3) rs977535 の genotype assay において、HBV 再活性化群は AA genotype (55.6%) が多い一方で、非再活性化群の大部分が GG genotype (55.6%) だった。

D. 考察

今回、平成 24 年度の分担研究で HBV 再活性化のリスクが高いと考えられた、血液悪性疾患に対する R-CHOP・CHOP 療法施行例におけるサイトカインプロファイルを、免疫動態の異常がないと考えられる、大腸ポリープ切除予定の症例と比較・検討した。その結

果、血液悪性疾患では寛解時点で対照群に比べて、血清 IL-17、IL-1、G-CSF、IFN- γ の有意な低下が認められた。これらのサイトカインは、CD4⁺T 細胞やそこから分化した Th1・Th2・Th17、また CD4⁺T 細胞への抗原提示能を有するマクロファージから産生されることから、R-CHOP・CHOP 療法における免疫抑制には、CD4⁺T 細胞の機能低下が係わると考えられた。血液悪性疾患症例では治療終了後に HBV が再活性化し、*de-novo* 肝炎を発症する症例が報告されている。そのため、R-CHOP・CHOP 療法に伴う HBV 再活性化には、治療による CD4⁺T 細胞の機能低下と、治療終了後の宿主免疫機能の回復が関与していることが示唆された。

CD4⁺T 細胞に関連する免疫応答の起点として、HLA class II 分子が HBV 再活性化に関連すると想定される。事実、HBV 排除や B 型肝炎発症に関連する、複数の HLA class II 遺伝子領域の一塩基多型 (SNP) が報告されている。こうした知見から、HBV 再活性化に関連した HLA class II 領域の SNP が存在する可能性に注目し、長期間の免疫抑制・化学療法が施行された HBV 再活性化群と非再活性化群において genotype assay を施行した。その結果、HLA class II 領域の SNP の一つである rs9277535 において、AA genotype と HBV 再活性化との関連が示唆された。rs9277535 は、GG genotype が HBV 持続感染に相関していると報告されている。

今回の結果は (risk genotype が異なるなど、矛盾した点があるものの) rs9277535 が HBV 関連疾患の発症に関与する SNP である可能性を支持するものであり、また HBV 再活性化への係わりも示唆された。

B 型肝炎再活性化の病態解明に対す

る免疫学的なアプローチにおいて、免疫抑制・化学療法におけるサイトカインプロファイルの長期的な解析の他に、宿主の遺伝子的背景の解析も加えた包括的な検討が必要であると考えられた。

E. 結論

血液悪性疾患に伴うHBV再活性化には、治療によるCD4⁺T細胞の機能低下が関与する可能性があると考えられた。また、HLA class II領域のSNPであるrs9277535がHBV再活性化の宿主因子であることが示唆された。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. *Mol. Clin. Oncol.* 2: 1028-1034, 2014 (査読あり)
- 2) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46: 497-504, 2014 (査読あり)
- 3) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S:

Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 60: 1674-1685, 2014 (査読あり)

- 4) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 347-356, 2014 (査読あり)
 - 5) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 21: 346-353, 2014 (査読あり)
- ##### 2. 学会発表
- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.
 - 2) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4⁺ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma

- without Antigen Priming. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 3) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 4) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：西口修平 兵庫医科大学内科学 肝胆膵科 教授

分担研究課題：非活動性キャリアと肝機能異常症例についての比較

研究要旨：HB e 抗体陽性患者かつ HBV-DNA が低値の場合には、本来無症候性キャリアとして経過するはずであるが、時に ALT 値の異常を示す症例が見受けられる。このような症例では HBV 感染以外の要素による肝障害の可能性が考えられる。今回は HBe 抗体陽性かつ HBV-DNA 低値例を対象に ALT 上昇例と正常例とで肝組織所見および各種臨床データの比較を行った。ALT 上昇例には、組織学的に肝組織の脂肪化とそれに関連する検査値（BMI・HOMA-R・フェリチン）の異常が認められた。脂肪肝での線維化進展予測の診断スコアである NAFIC score が高値を示す症例が高率であ

共同研究者

榎本平之 兵庫医科大学 肝胆膵科 講師

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの予後は一般に良好と考えられてきたが、近年では HBV-DNA の上昇と肝機能障害を生じ、肝の線維化が進行してゆく症例があることが判明している。一方で e 抗体陽性患者かつ HBV-DNA が低値の場合には、本来無症候性キャリアとして経過するはずであるが、時に ALT 値の異常を示す症例が見受けられる。このような症例では HBV 感染以外の原因に起因する ALT の異常がもたらされている可能性があり、HB e 抗体陽性無症候性キャリアの自然経過に影響を与えている可能性がある。

今回 HBV-DNA 低値の e 抗体陽性患者の

うちで、ALT 値が正常値（30 以下）の症例と異常値（31 以上）の症例に関し、肝組織像や HBV マーカーを含めて昨年に引き続き比較を行った。

B. 研究方法

兵庫医科大学で 2007 年以降に肝生検を施行した B 型慢性肝炎患者 197 例のうち、核酸アナログ製剤による治療歴のない HBe 抗体陽性の 72 例をまず選定した。そのうち HBV-DNA が低値の症例（5 Log copies/mL 以下）について、ALT 値が正常値（30 以下）の群と異常値（31 以上）の群とに分類し、その背景因子を検討した。また脂肪化の程度を含めた組織学的検討を行なった。また進行性の脂肪性肝疾患を診断する指標とし

て報告された NAFIC score についても検討を行った。なお肝生検時に測定されていない項目に関しては保存血液を用いて測定しているが、本研究は倫理委員会の審査・承認を受けた研究の一環として行われており、全症例から血液および組織の検体の研究利用への同意を得ている。

C. 研究結果

昨年度の報告で示したように、肝生検を行った B 型慢性肝炎患者 197 例のうち、核酸アナログ製剤の治療歴のない HBe 抗体陽性者は 72 例であったが、そのうち HBV-DNA が低値の症例は (5 Log copies/mL 以下) 44 例であり、そのうち ALT 値が正常値 (30 以下) の例は 28 例、異常値 (31 以上) の例は 14 例であった。これらの症例について検討を行った (図 1)。

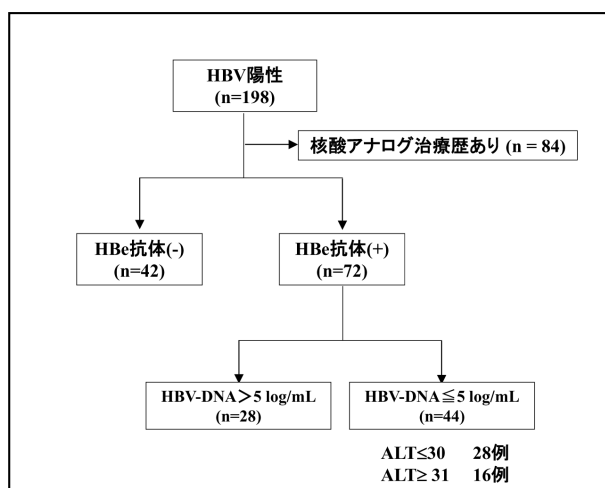


図 1 : 肝生検施行 B 型慢性肝炎例

これら 2 群についての比較を示す (表 1)。

	ALT 31以上 (n=16)	ALT 31未満 (n=28)	P-value
年齢	48.4 ± 10.6	50.3 ± 11.2	NS
性別(Male/Female)	11 / 5	14 / 14	NS
HBV-DNA(Log/mL)	3.18 ± 1.11	3.06 ± 0.91	NS
飲酒歴(なし/機会/常習)	7 / 6 / 3	13 / 5 / 10	NS
HBs抗原量 (IU/mL)	1267 (183-14200)	2991 (6.4- 36575)	NS
HBe抗原量 (3.0未満/3.0-4.0/4.0以上)	11 / 3 / 1	21 / 4 / 3	NS
AST (IU/L)	36.5 (22-157)	22.5 (15-37)	< 0.01
ALT (IU/L)	41.5 (31-251)	21 (8-30)	< 0.01
γ-GTP (IU/L)	36 (12-159)	21 (7-73)	< 0.05
ALP (IU/L)	178.5 (106-377)	192.5 (71-282)	NS
総ビリルビン (mg/dL)	0.8 (0.2-2.1)	0.75 (0.4-2.2)	NS
アルブミン (g/dL)	4.13 ± 0.45	4.01 ± 0.33	NS
血小板(x10 ⁹ /mm ³)	17.3 ± 3.8	19.7 ± 4.0	NS
Prothrombin time (%)	87.4 ± 10.1	92.1 ± 11.8	NS
F0-I/F2/F3/F4	13 / 1 / 1 / 1	17 / 9 / 2 / 0	NS
A0-1/A2/A3	11 / 5 / 0	27 / 1 / 0	< 0.05
脂肪化(なし/軽/中/高)	12 / 3 / 1	26 / 1 / 1	0.09
BMI	24.8 ± 5.3	22.5 ± 3.2	< 0.05
HOMA-R	1.75 (0.63-8.78)	1.15 (0.45-2.74)	< 0.05
フェリチン	159 (7.3-685.0)	75.4 (2.5-231.0)	< 0.01

表 1 : HBe 抗体陽性かつ HBV-DNA 低値症例における臨床背景の比較

ALT 値の相違を反映して、AST・ALT・γ-GTP は、ALT 異常値群が有意に高値であった。一方で年齢や性別には 2 群間で有意な差はなく、また肝予備能を反映する総ビリルビン・アルブミン・プロトロンビン時間・血小板数にも有意な差は認められなかった。

組織学的検討では ALT 値の相違を反映して ALT 異常値群で有意に炎症所見である A 因子が高値であったが、HBV 関連マーカーについては HBV-DNA 量以外に HBs 抗原量や HBe 抗原量にも有意な差はなく、ALT 値の差異に関する原因として HBV 自体の関与は低いと考えられた。

肝炎ウイルス以外に起因する肝障害で最も頻度の高い疾患は、代謝異常を背景に発症する脂肪肝である。そこで組織学的に肝の脂肪化の程度について頻用される NAS

(NAFLD Activity Score)に基づき、Grade 0 (<5%), Grade 1 (5-33%), Grade 2 (>33%-66%), Grade 3 (>66%) に分類して脂肪化の程度を評価したところ、Grade 2 以上の脂肪化を呈する症例の割合は、ALT31 以上の群では、ALT30 以下の群に比して有意に高率であった($P<0.05$) (図 3)。

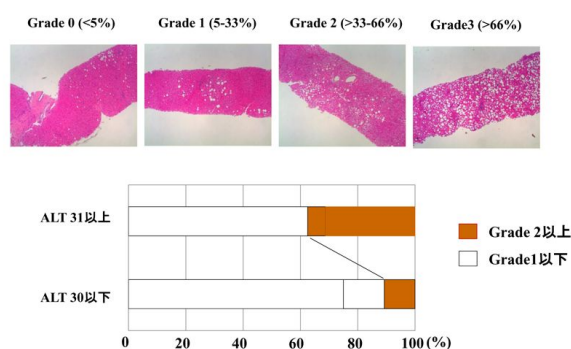


図 2 : HBe 抗体陽性症例と肝脂肪化

そこで肝の脂肪化に関連する代謝関連の臨床データについて検討したところ ALT 上昇例では BMI、HOMA-R が有意に高値であり、また血清フェリチン値にも有意な上昇が認められた (図 3)。

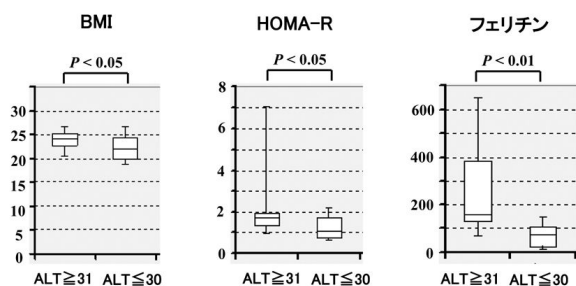


図 3 : HBe 抗体陽性症例と代謝関連検査値

これらの結果から HBe 抗体陽性かつ血中 HBV-DNA 量が 5 Log copies/mL 以下にもかかわらず ALT 上昇を来している症例では肥満、インスリン抵抗性、鉄の過剰蓄積といった代謝異常の存在が疑われた。

脂肪肝には線維化が進行して予後に影響するタイプと、予後への影響の少ないタイプが存在する。本来これらの鑑別は炎症や線維化の存在などに基づき組織学的になされるべきであるが、HBV 感染の関与がある場合には容易ではない。そこで日本人の NAFLD を対象にして、代謝異常を指標に進行性の脂肪性肝疾患を診断する指標として報告された NAFIC score を用いて検討した。

NAFIC score は代謝異常 (フェリチンが男性で 300ng/mL 以上、女性で 200ng/mL 以上の場合 1 点、IRI が 10 IU/mL 以上で 1 点) と肝線維化の存在 (型コラーゲン 7S が 5ng/mL 以上で 2 点) を指標にするスコアリングである。進行性の経過をとる脂肪肝の診断能について、NAFIC score で Score1 以上では感度 88%、特異度 43%、陽性的中率 66%、陰性的中率 75%、一方で Score 2 以上では感度 67%、特異度 87%、陽性的中率 85%、陰性的中率 64%と報告されている。NAFIC score2 以上の症例の割合は、ALT 31 以上の群では ALT30 以下の群に比して有意に高値を示した (図 4)。

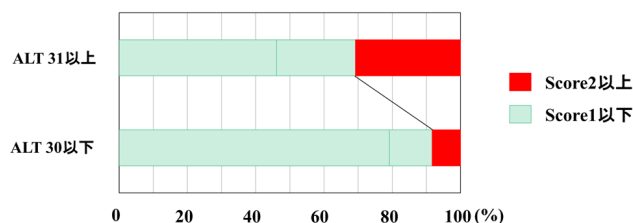


図4：HBe抗体陽性症例のNAFICスコア

しかしながら線維化についてはHBVの影響があるため、代謝異常であるフェリチンとIRIの2項目のみでのスコア計算を行った。するとScore1以上（陽性的中率66%）の症例の割合は、ALT31以上の群ではALT30以下の群に比して高値であった（図5）。

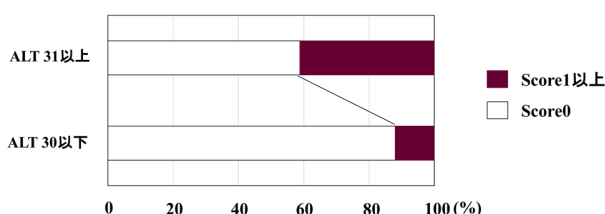


図7：HBe抗体陽性症例におけるNAFICスコア項目の代謝異常

これらの結果から、HBe抗体陽性かつ低ウイルス量症例でありながらALT上昇を来している症例の一部には、代謝異常に伴う進行性の脂肪肝が併存している可能性が考えられた。

D. 考察

HBV-DNA量が低値のHBe抗体陽性者では通常はALT値が低値（30以下）を示して、HBe抗体陽性キャリアとなる。しかしながら実際にはHBV-DNAが低値でありながらALT値が異常値（31以上）を示す例がしばしば見受けられる。このような症例では、HBV感染以外の要因による肝障害によってHBe抗体陽性無症候性キャリアの自然経過が影響される可能性があると思われる。そこでわれわれはきHBV-DNA低値のHBe抗体陽性患者のうちで、ALT値が正常値（30以下）の症例と異常値（31以上）の症例に関し、肝組織像やHBVマーカーを含めて比較を行った。

HBV関連マーカーについてはHBV-DNA量以外にHBs抗原量やHBcr抗原量にも差がなく、ALT値の差異に関する原因としてHBV自体の直接的関与は低いと考えられた。

一方今回の肝組織検体を用いた検討では、脂肪化の程度が強い（Grade2以上）症例が、ALT異常例では有意に高い頻度で認められた。さらに肝組織の脂肪化との関連が報告されているような代謝関連因子についての比較ではBMI、HOMA-Rに有意な差を認め、また血清フェリチン値にも有意な差が認められた。これらの結果から、HBe抗体陽性症例のうち、HBV-DNA低値にもかかわらずALT異常を来している症例では、肝の脂肪化とそれに伴うインスリン

抵抗性や鉄の蓄積といった代謝異常が影響している可能性が考えられた。

肝組織の脂肪化と代謝異常については、これまでも非アルコール性脂肪性肝炎や HCV 感染者で良く知られている。しかしながら HBV 感染者においては肝組織の脂肪化についての検討は少ない。最近 HBV 感染者における ALT 上昇の一因として脂肪肝の関与が報告された。しかしながら HBV 感染が存在するため、肝線維化進展における脂肪化の寄与の程度を確定することは困難である。今回の検討からは、ALT 上昇例では組織学的な脂肪化の存在と、組織に依存しない非侵襲的な診断スコアである NAFIC score 高値を示す症例が高率であった。したがって HBV-DNA 低値の HBe 抗体陽性者において、ALT 上昇例では進行性の経過をとる脂肪肝の合併が自然経過に影響する可能性があると考えられた。

E. 結論

HBe 抗体陽性かつ HBV-DNA 低値例を対象に ALT 上昇例と正常例とで肝組織所見および検査値の比較を行った。ALT 上昇例には、肝組織の脂肪化とそれに関連する検査値 (BMI・HOMA-R・フェリチン) の異常が認められた。HBV-DNA 低値の HBe 抗体陽性者で ALT 上昇を来している例では、進行性の脂肪肝を合併して自然経過に影響

する可能性があると考えられた。HBV 感染者における肝脂肪化やそれに付随した代謝異常の検討や報告は少ないため、今後さらに臨床的な意義付けを行っていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Nishikawa H, Enomoto H, Saito M, Aizawa N, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, Kim SR, Hongo Y, Jyomura H, Nishida N, Kudo M, Osaki Y, Nishiguchi S. Treatment Response and Tolerability in Elderly Patients with Chronic Hepatitis C: Subgroup Analysis in ReGIT-J Study. *J Virol Antivir Res* 2014;3:2
2. Aizawa N, Enomoto H, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2014; 49:1253-63.
3. Ikeda N, Imanishi H, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Yamamoto S, Hirota S, Kudo M, Arai S, Nishiguchi S. Nationwide survey in Japan regarding splenectomy/partial splenic embolization for interferon treatment targeting hepatitis

C virus-related chronic liver disease in patients with low platelet count. *Hepatol Res.* 2014; 44:829-36.

4. Enomoto H, Inoue S, Matsuhisa A, Nishiguchi S. Dignosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis and an In Situ Hybridization Approach to Detect an “Unidentified“ Pathogen. *Int J Hepatol.* 2014; 2014: 634617
5. Takashima T, Enomoto H, Ninomiya T, Kim SR, Okushin H, Sugano M, Imoto S, Yano Y, Ooka T, Seo Y, Kasugai H, Muramatsu A, Jomura H, Shimomura S, Shindo M, Nakamura H, Aizawa N, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Hepatitis C virus relapse was suppressed by long-term self-injection of low-dose interferon in patients with chronic hepatitis C after pegylated interferon plus ribavirin treatment. *Hepatol Res.* 2014; 44: 597-607.
6. Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Hirota S, Fujimoto J, Nishiguchi S. New malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the Sonazoid contrast agent for ultrasonography. *J Gastroenterol.* 2014; 49:755-63.
7. Enomoto H, Aizawa N, Nakamura H, Sakai

Y,Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Aoki T, Yuri Y, Yoh K, Hasahimoto K, Ishii A, Takashima T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, and Nishiguchi S. An Increased Ratio of Glycated Albumin to HbA1c Is Associated with the Degree of Liver Fibrosis in Hepatitis B Virus-Positive Patients. 2014; 2014: 351396.

8. Nishiguchi S, Sakai Y, Kuboki M, Tsunematsu S, Urano Y, Sakamoto W, Tsuda Y, Steinmann G, Omata M. Safety and efficacy of faldaprevir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin in Japanese patients with chronic genotype-1 hepatitis C infection. *Liver Int.* 2014; 34:78-88.

学会発表

1. Enomoto H., Tsujimura T., Honda M., Nakano C., Hasegawa K., Takata R., Aoki T. Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Sakai Y., Aizawa N., Ikeda N., Iwata Y., Tanaka H., Saito M., Kaneko S., Iijima H., Nishiguchi S. The pivotal role of anti-angiogenic activity in the in vivo antitumor effects of type I interferon. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014
2. Aizawa N., Nakano C., Hasegawa K., Takata R., Aoki T., Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Sakai Y., Ikeda N., Tanaka

H., Iwata Y., Enomoto H., Saito M., Iijima H., Iimuro Y., Fujimoto J., Nishiguchi S. Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the hepatocarcinogenesis. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

3. Aoki T., Nishiguchi S., Nakano C., Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Aizawa N., Sakai Y., Ikeda N., Tanaka H., Iwata Y., Enomoto H., Saito M., Fujimoto J., Hirota S., Iijima H. Retrospective Cohort study for liver carcinogenesis prediction using VF map score: Virtual Touch Quantification (VTQ), Fasting blood glucose (FBG), male, age, platelet. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014
4. Nakano C., Iijima H., Aoki T., Hashimoto K., Yoshida M., Ishii A., Takashima T., Aizawa N., Ikeda N., Tanaka H., Enomoto H., Saito M., Hirota S., Nishiguchi S. Factors influencing liver stiffness in chronic liver disease. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

5. 石井昭生、榎本平之、高嶋智之、西口 修平、ペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬の三剤併用療法の治療効果と抗インターフェロン中和抗体の影響に関する検討(シンポジウム2: ウイルス性肝炎治療の実際と工夫) 日本消化器病学会近畿支部第101回例会、大阪、2014

6. 高嶋智之、榎本平之、西口 修平、ペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬3剤併用療法の成績と抗IFN中和抗体の効果に関する検討(パネルディスカッション1: C型肝炎治療の新展開と到達点)、第18回日本肝臓学会大会(JDDW2013)、神戸、2014

7. 榎本平之、斎藤正紀、西口 修平、HBV陽性者における肝脂肪化と代謝マーカーの検討における肝脂肪化と代謝マーカーの検討(ワークショップ8: 生活習慣と肝病態の変遷: 明日の肝臓病学に向けて)、第18回日本肝臓学会大会(JDDW2014)、神戸、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

B型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長・消化器科部長

分担研究課題：ALT 正常 HBe 抗原陰性例の長期予後

研究要旨：ALT正常でHBe抗原陰性者からHBウイルスの再活性化が生じ、慢性肝炎が持続して肝硬変や肝臓に至る症例があり、経過観察してよい例と治療すべき例について肝生検を行わずに判別することが重要である。一般的検査によって非活動性キャリアと判断できる判別方法を解析した。対象は2008年4月から2013年9月までに当院を受診したHBe抗原陰性、かつ初回ALT施設基準値内の4～43 IU/Lの155例を対象とし、自然経過でのALT上昇とHBs抗原陰性化を検討した。経過中のALT上昇は26例、HBs抗原陰性化は14例(9%)にみられた。ALT上昇に關与する因子はALT 30IU/L以下とHBs抗原量が100 IU/ml以上が有意であった。HBs抗原100 IU/ml未満かつALT 30IU/L以下が1年持続すれば、ALT上昇は極めてまれで、これに合致する例が全体の25%であった。これらの症例を経過観察し、HBs抗原陰性化を解析した。HBs抗原陰性化は5年 5.1%、10年 18.7%にみられた。HBs抗原陰性化は、50歳以下の5年1.5%に比較して、50歳以上では5年8.3%で有意に高かった(p=0.0296)。またHBs抗原陰性化にはHBVDNA 4.0 log copies/ml未満でALT値が持続的に30 IU/L以下の場合には有意に高率であった。また、HBs抗原陰性化には初回HBs抗原 100 IU/mLの例で13.6%にみられ有意に高率であった。したがって、HBe抗原陰性例では50歳以上、HBs抗原100 IU/mL未満、非活動性キャリアで高率に達成されていた。HBs抗原陰性化には1年間のHBs抗原減少速度が0.19 log/年の場合に感度94%、特異度93%であった。これらの組み合わせによって、治療介入が必要でないHBe抗原陰性例が見極められる。

A. 研究目的

初診時 HBe 抗原陰性の B 型肝炎キャリアのうち経過観察してもよい症例と肝硬変や肝臓に進行する症例がある。肝生検を行わないでこれを判別できることが重要である。初診時に ALT が正常である症例について、自然経過で ALT 値が上昇する症例の特徴と HBs 抗原が陰性化する例の特徴を解析した。また、経過観察して HBs 抗原の低下速度を検討し、治療介入が必要でない HBe 抗原陰性例の特徴について解析した。

B. 研究方法

対象は 2008 年 4 月から 2013 年 9 月までに当院を受診した HBe 抗原陰性、かつ初回 ALT 43 IU/L 以下の 155 例で、抗ウイルス療法を施行していない例を対象とした。平均年齢は 51.7 歳、ゲノタイプは A 8 例、B 42 例、C 76 例、D 1 例、F 2 例であった。肝発癌がみ

られた症例はなかった。経過観察中 ALT が 43 IU/L の異常値に上昇した例は 26 例(16%)にみられ、HBs 抗原陰性化は 14 例(9%)にみられた。検討 2 として、自然経過での HBs 抗原陰性化に關与する因子を解析した。年齢、HBVDNA 量と HBs 抗原の観察時と経過中の低下率について解析した。これらの解析から、初診時の簡便な検査によって治療介入が必要でない症例の特徴を把握することを目的とした。

（倫理面への配慮）

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行

した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

自然経過で ALT が 43 IU/L に上昇した症例としない症例の背景を比較すると、経過観察開始時の ALT 値と HBs 抗原量に有意差がみられた(表 1)。

	ALT上昇 (n=26)	ALT上昇無し (n=129)	P値
年齢	48.3±15.3	52.4±13.1	0.16
性別 M (%)	61.5%(16/26)	44%(58/129)	0.12
AST (IU/L)	24.7±5.4	22.7±4.9	0.07
ALT (IU/L)	25.3±7.6	19.4±6.7	0.0001
Platelet (10 ⁴ /μL)	20.5±4.9	20.9±4.8	0.69
HBsAg (IU/mL) ≥100	84%(22/26)	67%(87/129)	0.08
HBV DNA (log cp/mL) ≥4.0	34%(9/26)	32%(42/129)	0.84
AFP	3.7±2.3	3.4±2.0	0.60
Genotype C	56%(13/23)	59%(63/106)	0.80
BCP mutant	44%(8/18)	53%(52/98)	0.50
PC mutant	75%(15/20)	84%(80/95)	0.34

観察開始時の ALT 値が 30 IU/L 以下であった場合には ALT 上昇は少なく、また 1 年間の経過観察で ALT 30 IU/L が持続した場合には、その後 ALT が上昇する例は 7.5% で有意差がみられた(表 2)。

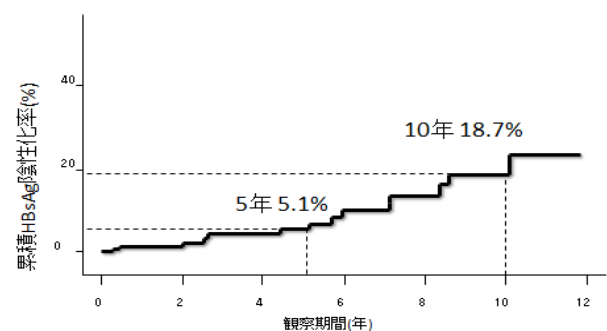
観察開始時 ALT値	ALT上昇頻度	P value
Baseline ≤ 30 vs 31-43	13.6% vs 46.7% (19/140) (7/15)	0.001
Baseline~1年間 ≤ 30 vs 31-43	7.5% vs 47.2% (9/119) (17/36)	<0.0001

これに HBs 抗原量を加えて解析すると、ALT 30 IU/L 以下で HBs 抗原が 100 IU/mL の場

合には、ALT 上昇する例は 2.5% であった。そこで、観察開始時から 1 年間の ALT 30 IU/L 以下かつ HBs 抗原 100 IU/mL 未満の例では、それ以外の例に比較して有意に ALT の上昇の頻度が低く(表 3)、治療介入の必要がない症例を把握できた。これらの症例は全体の 25% を占めていた。

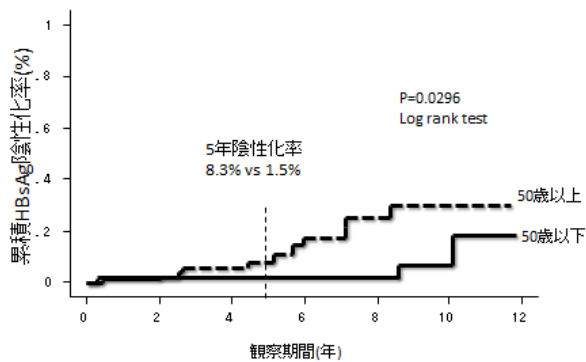
Baseline ALT & HBs抗原量	ALT上昇頻度	
Baseline~1年間ALT ≤ 30 & HBsAg < 100	2.5% (1/39)	p=0.005
Others	21.5% (25/116)	

次に初診時 ALT が基準値内の HBe 抗原陰性例について、累積 HBs 抗原陰性化について解析した。累積 HBs 抗原陰性化は、5 年 5.1%、10 年 18.7% にみられた(図 1)。

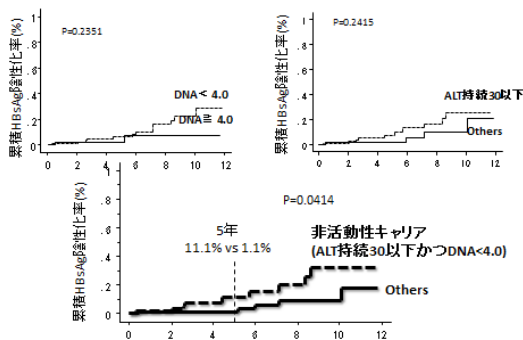


た(図 1)。

年齢別に解析すると、50 歳未満の 5 年 HBs 抗原陰性化 1.5% に比較して 50 歳以上では 8.3% と有意の高率であった(図 2)。



さらに HBVDNA 量別では HBVDNA が 4.0 log copies/ml 未満の例で HBs 抗原が陰性化しやすく、ALT が持続 30 IU/L 以下の例で HBs 抗原が陰性化しやすかった。そこで ALT が持続 30 IU/L かつ HBVDNA 4.0 log copies/ml 未満の例と、それ以外を比較すると前者で 5年のHBs 抗原陰性化が 11.1%であったのに対して、それ以外では 1.1%で、有意差がみられた(図3)。

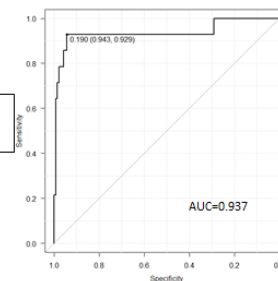


HBs 抗原がもともと 100 IU/mL 未満の例が HBs 抗原が陰性化しやすかったが、HBs 抗原の低下率を解析すると、HBs 抗原減少速度が 0.19 log IU/年以上であった場合に HBs 抗原が陰性化しやすく、ROC 解析によって感度 94%、特異度 93%であった(図4)。

HBs抗原減少速度0.19 log/year

s抗原陰性化に対する
感度94%、特異度93%

減少速度0.19 log/year
≡
1年間でHBs抗原量が65%に減量



D. 考察

HBe 抗原陰性で初診時に血清 ALT が 31 ng/ml の症例では、経過中に HBV の増殖が おこり肝炎が再燃して慢性肝炎が進行し、肝硬変や肝癌を発症する症例がある。そのため、適応がある場合には肝生検を行って 肝癌への進行を防止するための治療が必要 になる症例がある。したがって、初診時 ALT 値が正常であった場合に、予後を予測し肝 生検が必要な症例を見極めることが必要で ある。一方、進行するリスクが少ない症例 では、肝生検を行わずに経過観察をしてい く例もある。そこで、積極的介入が必要で はない症例を、一般検査で判別できる方法 について解析した。

初診時 HBe 抗原陰性で、ALT 値が正常の 例では AFP 値が 4.0ng/ml 未満、かつ血小板 数 16.5 万/μl 以上の場合には慢性肝炎で ある率が極めて低く、経過観察してもよい と考えられる。しかし、どちらか1つを満 たさない場合には肝生検を行うか、慎重な 経過観察が必要であると考えられる。

E. 結論

初診時 ALT 31 IU/L 未満の HBe 抗原陰性 の HBV キャリアでは、血清 AFP 4.0 ng/L 未満かつ血小板数 16.5 万/μl 以上の場合 には、肝生検を行わずに経過観察して可と 考えられる。AFP 値と血小板数が判別に有 用である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H,

Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2013;43:596-604.

(2) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56:602-8.

(3) Kurosaki M, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Izumi N. Serum HBV RNA as a possible marker of HBV replication in the liver during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol* 2013;48:777-8.

(4) 泉並木. ウイルス性肝炎の治療の進歩 *日本内科学会雑誌* 2012;101:2681-2689.

(5) 泉並木 新しい B 型肝炎の治療 *NHK テレビテキスト きょうの健康* 2013.9

P34 ~ 38 NHK 出版 2013/8/21

2. 学会発表

1) 泉 並木: 未治療および前治療無効の C 型慢性肝炎患者における Daclatasvir と Peginterferon Alfa-2b/Ribavirin または Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin との併用 第 48 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 2 金沢 2012.6

2) 泉並木: 肝細胞癌に対する内科的局所治療の進歩 第 48 回日本肝臓学会総会シンポジウム 3 金沢 2012.

3) 黒崎雅之、泉並木 臨床背景の評価に基づく C 型肝炎の治療選択 第 48 回日本肝臓学会総会ワークショップ 7. C 型肝炎治療の新たな展開 S1 0-9 東京 2011.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：(今関文夫・千葉大学総合安全衛生管理機構・教授)

分担研究課題：HBe 抗体陽性キャリアーの肝発癌、生命予後に関する検討

研究要旨：HBe 抗体陽性キャリアの長期予後を HBV DNA 量、ALT 値別に検討した。2002 年から 2005 年に当院消化器内科を受診した HBe 抗体陽性キャリア 198 例を観察開始 1 年間の HBV DNA 量、ALT 値により A 群 (N=68): HBV DNA<4 log copies (LC)/ml、ALT≤30 IU/l、B 群 (N=31): HBV DNA<4 LC/ml、ALT>30 IU/l、C 群 (N=35): HBV DNA≥4 LC/ml、ALT≤30 IU/l、D 群 (N=64): HBV DNA≥4 LC/ml、ALT>30 IU/l の 4 群に分け中央値 7.6 年 (1.2~9.1 年) 後向きに調査した。肝発癌は A 群から 1 例、C 群から 2 例、D 群から 6 例で、C 群と D 群の各 1 例を除いてすべて肝硬変であった。死亡例 9 は B 群 1 例 (肝硬変症例)、D 群 1 例 (肝癌症例) で、死因は各々消化管出血と癌死であった。HBs 抗原陰性化は、A 群 16 例 (24%)、B 群 6 例 (19%)、C 群 4 例 (11%)、D 群 2 例 (3%) で、観察開始時の HBs 抗原量、HBV DNA 量低値が有意な因子であった。核酸アナログ投与例は、A 群 0 例、B 群 0 例、C 群 7 例、D 群 16 例であった。B 群は A 群と比べ観察開始時の BMI が有意に高値であり、肥満に関連した脂肪肝の関与が推察された。A 群 68 例の 1 年以後の経過を見ると HBV DNA<4 LC/ml かつ ALT≤30 IU/l を持続したのは 35 例 (51%) で、HBV DNA≥4 LC/ml に変動した 17 例 (25%) は観察開始時の HBV DNA 量が有意に高値であった。非活動性キャリアと考えられた A 群症例の予後は良好であるが、肝硬変症例を確実に鑑別する必要がある。

A. 研究目的

HBe 抗原陰性非活動性キャリア (IC) は、1 年以上の観察期間のうち 3 回以上の血液検査において、HBe 抗原陰性、ALT≤30 U/l、HBV DNA<4 log copies/ml の 3 条件すべてを満たす症例と日本肝臓学会のガイドラインで定められている。今回、無治療の HBe 抗体陽性キャリアを観察開始 1 年間の HBV DNA 量、ALT 値別に長期経過を検討した。

B. 研究方法

2002 年から 2005 年に当院消化器内科を受診した HBe 抗体陽性キャリアのうち 1 年超経過観察可能であった 198 例を対象とした。観察開始 1 年間の HBV DNA 量、ALT 値により A 群 (N=68): HBV DNA<4 log copies (LC)/ml、ALT≤30 IU/l、

B 群 (N=31): HBV DNA<4 LC/ml、ALT>30 IU/l、C 群 (N=35): HBV DNA≥4 LC/ml、ALT≤30 IU/l、D 群 (N=64): HBV DNA≥4 LC/ml、ALT>30 IU/l の 4 群に分けた。中央値 7.6 年間 (1.2~9.1 年) 後ろ向きに調査し、肝発癌、生命予後、核酸アナログ治療の有無、HBs 抗原陰性化、HBV DNA 量と ALT 値の推移に関して検討した。HBV DNA 定量はアンプリコア法 (log copies/ml)、HBsAg 定量は CLIA 法 (IU/ml; Sysmex 社)、HBcrAg は CLEIA 法 (LogU/ml; 富士レビオ社) にて行った。本研究は後ろ向き観察研究で対象患者に不利益、危険性はなく、千葉大学医学部倫理委員会の承認も得ており、倫理的に問題はない。

C. 研究結果

死亡例は B 群 1 例 (肝硬変症例)、D 群 1 例 肝

癌症例)で、死因は各々消化管出血と癌死であった。

肝発癌9例の内訳は、A群1例、B群0例、C群2例、D群6例で、C群とD群の各1例を除いてすべて肝硬変であった。発癌に寄与する有意な因子は、肝硬変(リスク比 39.019、 $p=0.0058$) AFP値(リスク比 1.046、 $p=0.0322$)であった。

B群はA群と比べ観察開始時のHBV DNA量に差はなく、AST値、ALT値以外にBMI(24.4 vs 21.4, $p=0.02$)、G-GTP値(32 vs 16、 $p<0.0001$)が有意に高値であり、腹部超音波検査施行例ではB群がA群に比べ脂肪肝の割合が有意に高く(45% vs 17%、 $p=0.0093$)肥満に関連した脂肪肝の関与が推察された。

A群とB群の1年以後のHBV DNA量の推移に差はないが、D群はC群に比べHBV DNA量の最大値(≥ 5 LC/ml, 75% vs 31%)、最小値(≥ 4 LC/ml, 37% vs 12%)ともに高値であった。

核酸アナログ投与例は、A群0例、B群0例、C群7例、D群17例であった。

HBs抗原陰性化は、A群16例(24%)、B群6例(19%)、C群4例(11%)、D群2例(3%)に認められ、観察開始時のHBs抗原量、HBV DNA量低値が有意な因子であった。

A群68例の1年以後の経過を見るとHBV DNA <4 LC/mlかつALT ≤ 30 IU/lを持続したのは35例(51%)で、HBV DNA ≥ 4 LC/mlに変動した17例(25%)は観察開始時のHBV DNA量が有意に高値であった(2.6 vs 3.1、 $p=0.0008$)。

D. 考察

千葉大学医学部附属病院消化器内科に通院中のHBe抗体陽性キャリアの長期予後を検討したところ、日本肝臓学会のガイドラインで定められているHBe抗原陰性非活動性キャリアの定義を満たすと考えられたA群68例から肝発癌が1例認められたが肝硬変の症例であった。肝発癌9例中1例を除いて肝硬変であり、その1例は活動性肝炎を有する症例であった。HBV DNA <4 LC/mlかつALT >30 IU/LのB群症例の多くは脂肪肝が原因と考えられ、今後増加する可能性があり注意が必要である。また、この群にも肝硬変が含まれており消化管出血で死亡していることから肝硬変の鑑別は重要である。

E. 結論

HBe抗体陽性非活動性キャリアの予後は良好であるが、肝硬変症例を確実に鑑別する必要がある。

ある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2014;15:21455-21467.
- 2) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2015; 22: 92-100.

2. 学会発表

- 1) 今関文夫、新井誠人、神田達郎、藤原慶一、太和田暁之、横須賀収。HBe抗原陰性非活動性キャリアの長期経過。第100回日本消化器病学会総会(2014年東京)A338

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

分担研究者：白澤浩 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学 教授

分担研究課題：HBV 増殖メカニズムに関する検討

研究要旨：

HBV 増殖メカニズムに関する *in vitro* の検討として、エピジェネティック修飾因子阻害剤のウイルス増殖に与える影響について、キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞単層培養系を用いて HBV を感染、エピジェネティック標的薬剤のスクリーニングを行った。薬剤の HBV 産生に対する影響を解析し候補薬剤を得た。

A. 研究目的

前年度までの結果より cccDNA からのウイルス複製は epigenetic な制御を受けている可能性があることから本年度は HBV 増殖メカニズムに関する *in vitro* の検討としてエピジェネティック修飾因子阻害剤のウイルス増殖に与える影響について解析した。

B. 研究方法

凍結保存ヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植したヒト肝細胞キメラマウス (Tateno et al 2004) より、肝細胞を分離、単層培養した新鮮ヒト肝細胞 (PXB cell) を用いて HBV を感染後薬剤処理し 1 週、2 週およびそれ以降の培養上清中 HBV DNA を測定 (Taqman qPCR)、Control 処理と比較した。

(倫理面への配慮)

該当しない

C. 研究結果

キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系において核酸アナログ製剤、インターフェロン製剤に対する感受性を確認しおよそ 50 種の阻害剤のスクリーニングを行った。そのうちヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が HBV 増殖に影響する薬剤候補として選択された。ウイルスの増殖や蛋白量に与える影響を評価した。ある種の HDAC 阻害剤では核酸アナログ投与下においても HBV 増殖抑制効果を示した。薬剤の細胞障害性を解析し適切な濃度を検討した。

D. 考察

キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞単層培養系は感染効率、再現性が高く HBV 感染に対する多数の薬剤の影響を評価する方法として有用と考えられた。

HBV 増殖におけるエピジェネティックな制御機構の存在が示唆され今後詳細な機序の解明が必要と考えられる。

E. 結論

HBV 増殖はエピジェネティックな制御をうけている可能性が示唆され、治療標的としての可能性について今後更なる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2014 Nov 21;15(11):21455-67. doi: 10.3390/ijms151121455.

(2) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, Shirasawa H, Kiyohara T, Ishii K, Wakita T, Okamoto H, Yokosuka O. Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus. *PLoS One*. 2014 Jul

7;9(7):e101993.

doi:

10.1371/journal.pone.0101993.

(3) Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 21;20(11):2902-12.

2. 学会発表

Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Masato Nakamura Tatsuo Miyamura, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Chiaki Nakaseko, Osamu Yokosuka. Hepatitis B reactivation after hematopoietic stem cell transplantation for hematologic diseases. 23rd Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver (2014)

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成 26 年度分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究協力者：西澤 勉 自治医科大学 感染・免疫学講座 ウイルス学部門・非常勤講師
研究分担者：岡本宏明 自治医科大学 感染・免疫学講座 ウイルス学部門・教授

分担研究課題：e 抗体陽性無症候性キャリアに於ける HBV ゲノム解析

研究要旨：e 抗体陽性無症候性キャリアの病態はよく分かっておらず、その解明を目的として、症例毎に10株の全長ゲノムクローンの塩基配列とそれらの *in vitro*での増殖能を劇症肝炎症例のHBV株と比較することによって、e 抗体陽性無症候性キャリアの特徴を解析した。昨年度、e 抗体陽性無症候性キャリア症例由来のHBVクローンのゲノム解析において、P遺伝子やpreS1/preS2/S遺伝子領域を中心に各種点変異や挿入・欠失変異が多数検出され、劇症肝炎症例由来のHBVに比べ多様性に富んでいることを確認した。本年度は、得られたHBVのクローンの増殖能を、1.3 倍ゲノム長の HBV construct を作製し、肝癌由来樹立細胞株にトランスフェクトして、ELISA, real-time PCR, Southern blotting, Northern blotting等により解析した。その結果、無症候性キャリア由来のHBV株の *in vitro*での増殖能は劇症肝炎由来の株より低いことが確かめられた。これには、無症候性キャリア由来株では同じprecore変異株でありながら、劇症肝炎株に比べpregenome RNAを含む3.5 kb mRNAの転写量が少ないこと、さらにcore promoterやprecore以外のゲノム領域の変異が寄与していることが示唆された。

A. 研究目的

e 抗体陽性無症候性キャリア由来の HBV では挿入や欠失、フレームシフト変異、点変異等による様々な変異株が存在するのに対して、同じ e 抗体陽性でも活動性の場合の HBV は defective な変異が少ないことを報告してきた (Horikita et al. J Med Virol, 44: 96-103, 1994)。しかし、このデータは HBV ゲノムをいくつかの断片に分けて塩基配列を解析することによって得られたものであった。

そこで本研究では、HBV のクローンの全長ゲノムの解析を簡便に行うことができる系と増殖能を比較できる *in vitro*の実験系を確立し、e 抗体陽性無症候性キャリア症例と、対照として劇症肝炎から 10 クローンの全長配列を決定し、増殖能を比較することによって、e 抗体陽性無症候性キャリアの病態をウイルス側から解明することを最終目的とした。

B. 研究方法

本研究で用いた検体は e 抗体陽性の無症候性キャリア症例から得られた 4 検体 (ASC1, ASC2, ASC3, ASC4) で、解析に用いた時点での HBV DNA タイターはそれぞれ 5.4×10^3 、 5.7×10^3 、 3.1×10^5 および 6.5×10^2 copies/ml であった。一方、対照検体として用いた劇症肝炎症例 (FH) のタイターは 1.10×10^{11} copies/ml であった。すべて genotype/subgenotype は C/C2 であった。

平成 25 年度に、e 抗体陽性無症候性キャリア 4 症例から 10 個ずつの HBV クローンを分離し、全長塩基配列を解析した結果、対照とする劇症肝炎症例よりも多様性に富んでいることを確認した。その結果に基づいて *in vitro* 増殖能を解析するために、ASC1 症例から 3 株を、ASC3 症例から 3 株、そして ASC4 症例から 2 株を選んだ。

in vitro で増殖を行うために、各クローンの near-full DNA をもとに HBV の 1.3 倍長ゲノム (nt 1073-3215/1-2067) を構築した。構築は、Hu JL らの方法 (J Virol Methods 161(1):63-9, 2009) と Günther らの方法 (J Virol 69(9): 5437-5444,

1995) を改良して行った。この 1.3 倍長の HBV ゲノムの Hepatoma cell line, HepG2/C3A 細胞 (ATCC CRL-10741) へのトランスフェクションは TransIT-LT1 試薬 (Mirus) を用いて行った。DNA をトランスフェクション後、2 日後に洗浄、4 日目に培地の半量を交換し、6 日目に培養上清を全量採取、RNA 抽出、そして細胞内 HBV 複製中間体解析のための細胞の回収を行った。

細胞上清中の HBV DNA 量は、50 μ l の上清を 5 units の DNase I (TaKaRa Bio) で処理後、核酸抽出キット (SMITEST EX-R&D; G&G Science) で得た DNA を real-time PCR (Hepatology Res 24: 8-7, 2002) に供して決定した。HBV の細胞内複製中間体の検出は、Inoue らの方法 (Virology, 395:202-209, 2009) にしたがって調製した細胞内の HBV DNA を Southern blotting で行った。HBV mRNA の検出は、TRIzol (Life Technologies) を用いて 6 日目の培養細胞から調製した total RNA (1 μ g) を Northern blotting で行った。

(倫理面への配慮)

HBV が由来する検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. HBV クローンの *in vitro* 増殖能

in vitro での増殖能を解析するために用いた ASC1 および ASC3 症例から各 3 クローン、ASC4 症例から 2 クローンと、対照とする劇症肝炎症例から 1 クローン [FH(m/m)] (core promoter mutant: A1762G/G1764A; precore mutant: G1896A) およびその変異株 3 クローン [FH(m/w), FH(w/m), FH(w/w)] は、全て PC mutant (G1896A) であった。

また、各クローンの 1.3 倍長の HBV ゲノムを HepG2/C3A 細胞にトランスフェクトし、4 日と 6 日目の培養上清中に産生された HBV DNA 量 (copies/ml) を調べた。ASC3 由来の 3 クローンおよび ASC4 由来の 2 クローンの HBV 産生量は対照とする FH(m/m) よりも低く、ASC1 由来の 3 クローン [CP wild; PC mutant] は、対照の FH(w/m) 株より著しく低かった。

2. Northern blotting による HBV mRNA の検出

HBV から転写される mRNA を解析するためにトランスフェクション後 6 日目の細胞から total RNA を抽出し、Northern blot 解析を行った結果、3.5 kb, 2.5 kb, 2.1 kb および 0.7 kb の 4 種類の HBV mRNA が検出された。pregenome RNA (pgRNA)

を含む 3.5 kb mRNA の量は、ASC 由来株は何れも FH(m/m) 株よりも低かった。ASC1 由来のクローンでは 3.5 kb mRNA 量は、ASC3 や ASC4 由来のクローンに比べ大きな差はないが、培養上清中に産生される HBV DNA 量は顕著に低かった。

3. Southern blotting による HBV 複製中間体の検出

トランスフェクション後、6 日目の細胞内 core particle-associated HBV DNA を Southern blotting 法で検出した。細胞内 HBV DNA の 3 種の複製中間体、relaxed circular (RC)、double-stranded linear (DL)、そして single-stranded (SS) DNA が明瞭に検出された。ASC3 と ASC4 由来のクローンの細胞内 HBV DNA の総量は対照とする FH(m/m) より低かった。ASC1 由来の 3 クローンでも低値であり、特に 2 クローンでは検出限界以下であった。

D. 考察

本研究において、これまで、低タイターのため全長ゲノムのクローン化が困難とされていた e 抗体陽性無症候性キャリア症例から全長 HBV クローンの単離が可能となり、1.3 倍長のゲノムを構築することにより *in vitro* での増殖能を劇症肝炎株と比較することができた。その結果、e 抗体陽性無症候性キャリア 3 症例から単離された HBV クローンの HepG2/C3A での増殖能は、precore 変異株でありながら予測通り低いことが確かめられた。e 抗体陽性無症候性キャリア由来の HBV 株では pgRNA を含む 3.5 kb mRNA の転写量が低いこと、そして、core promoter や precore 以外のゲノム領域の変異が e 抗体陽性無症候性キャリアでの低ウイルス増殖能に寄与していると考えられた。様々な変異が関わっている可能性が想定されるが、その同定が e 抗体陽性無症候性キャリアの病態をウイルス側から追及するうえで今後の課題として重要である。

E. 結論

同じ precore 変異株 (G1896A) であっても、e 抗体陽性無症候性キャリア症例から単離された HBV クローンの *in vitro* での増殖能は、対照とする劇症肝炎株よりも低いことが確かめられた。これには、3.5 kb mRNA の転写レベルが低いこと、そして core promoter や precore 以外のゲノム領域での変異が寄与していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

- (1) Kamitsukasa H, Iri M, Tanaka A, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Spontaneous reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in patients with resolved or occult HBV infection. J Med Virol 87:589-600,2015
- (2) Mawatari S, Uto H, Moriuchi A, Tabu K, Muromachi K, Tabu E, Oda K, Imanaka D, Oshige A, Nakazawa J, Kumagai K, Tamai T, Okamoto H, Tsubouchi H, Ido A. Horizontal transmission of de novo hepatitis B between spouses: A case report. Hepatol Res oi: 10.1111/hepr.12422. [Epub ahead of print].
- (3) Okamoto D, Nakayama H, Ikeda T, Ikeya S, Nagashima S, Takahashi M, Sugai Y, Okamoto H. Molecular analysis of the interspousal transmission of hepatitis B virus

in two Japanese patients who acquired fulminant hepatitis B after 50 and 49 years of marriage. J Med Virol 86:1851-60, 2014

- (4) 相川達也、杉山弘明、添田敦子、池澤和人、佐藤力、津田文男、上野ちさと、岡本宏明. 水戸地域における B 型肝炎ウイルスの遺伝子型分布の変遷(2001 ~ 2013 年). 肝臓 55(10):626-9, 2014

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柘植雅貴、茶山一彰	B型肝炎に対する抗ウイルス療法	林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹	Annual Review 2014 消化器	中外医学社		2014	104-111
川部直人、吉岡健太郎	イラストグラフィ	榎本信幸、竹原徹郎、持田智	HEPATOLOGY PRACTICE vol 3 C型肝炎の診療を極める 基本から最前線まで	文光堂	東京	2014	73-79
馬渡誠一、宇都浩文、井戸章雄	HCVのウイルス学的特徴	熊田博光、茶山一彰、豊田成司	C型肝炎治療～DAAsで広がる治療対象～	医薬ジャーナル社	大阪	2014	22-31
玉城信治、泉並木	Type インターフェロン	榎本信幸、竹原徹郎、持田智	C型肝炎の診療を極める	文光堂	東京	2014	171-175
黒崎雅之、泉並木	データマイニングによる予後・治療反応予測	榎本信幸、竹原徹郎、持田智	C型肝炎の診療を極める	文光堂	東京	2014	121-129
黒崎雅之、泉並木	肝発癌リスクの評価	田中榮二、竹原徹郎、持田智	B型肝炎の診療を極める	文光堂	東京	2014	152-159

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O.	Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment.	Int J Mol Sci	15	21455-67	2014
Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O.	Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity.	World J Gastroenterol	20	7197-7206	2014
Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O.	Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance.	Hepatology		In press	2014

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, <u>Hige S</u> , Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M.	New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia.	PLoS One	9 • 2	e86449	2014
髭修平、中島知明、小関至、狩野吉康、豊田成司.	核酸アナログ治療の最前線と今後の展望.	内科	113 • 4	689-692	2014
髭修平、小関至、狩野吉康、豊田成司.	ラミブジン、アデホビル治療の成績と多剤耐性ウイルス.	医学と薬学	71 • 7	1171-1178	2014
渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 奥本 和夫, 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 河田 純男, <u>上野 義之</u> .	B型肝炎ウイルスジェノタイプB高感染地域における感染実態の変遷と核酸アナログ治療例におけるジェノタイプの臨床的意義.	消化器内科	58	213-9	2014.
Ninomiya M., <u>Ueno Y.</u> , Shimosegawa T.	Application of deep sequence technology in hepatology.	Hepatol Res	44(2)	141-8.	2014
Matsumoto A, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, <u>Tanaka E</u>	Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B	Hepatol Res	in press		
Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, Komatsu M, <u>Tanaka E</u>	Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion	World J Gastroenterol	21(2)	541-548	2015
<u>Tanaka E</u> , Matsumoto A	Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleoside/nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B	Hepatol Res	44 (1)	1-8	2014
Matsumoto A, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, <u>Tsuge M</u> , Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E.	Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res			in press

Akamatsu S, Hayes CN, <u>Tsuge M</u> , Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K.	Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection.	J Infect				in press
Fujino H., Kimura T., Aikata H., Miyaki D., Kawaoka T., Kan H., Fukuhara T., Kobayashi T., Naeshiro N., Honda Y., <u>Tsuge M</u> , Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Takahashi S., Yoshimatsu R., Yamagami T., Kenjo M., Nagata Y., Awai K. and Chayama K.	Role of 3-D conformal radiotherapy for major portal vein tumor thrombosis combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma.	Hepatol Res				in press
Naeshiro N., Aikata H., Kakizawa H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Ohno A., Miyaki D., Kawaoka T., <u>Tsuge M</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Takahashi S., Awai K. and Chayama K.	Long-term outcome of patients with gastric varices treated by balloon-occluded retrograde transvenous obliteration.	J Gastroenterol Hepatol	29(5)	1035-42	2014	
Kohno T., <u>Tsuge M</u> , Murakami E., Hiraga N., Abe H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K.	Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA.	J Viral Hepat				in press
Huang Y.W., Takahashi S., <u>Tsuge M</u> , Chen C.L., Wang T.C., Abe H., Hu J.T., Chen D.S., Yang S.S., Chayama K. and Kao J.H.	On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy.	Antivir Ther				in press
Naeshiro N., Aikata H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Kawaoka T., <u>Tsuge M</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Ochi H. and Chayama K.	Efficacy and safety of the anticoagulant drug, danaparoid sodium, in the treatment of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis.	Hepatol Res				in press
Honda Y., Takahashi S., Zhang Y., Ono A., Murakami E., Shi N., Kawaoka T., Miki D., <u>Tsuge M</u> , Hiraga N., Abe H., Ochi H., Imamura M., Aikata H. and Chayama K.	The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway.	J Gastroenterol Hepatol				in press
柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰	HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化	消化器内科	58(2)	231-238	2014	
柘植雅貴、茶山一彰	テノホビル治療 (naïve例と核酸アナログ治療抵抗例に対する成績)	医学と薬学	71	1185-1190	2014	
柘植雅貴、茶山一彰	差分解説・B型慢性肝炎診療におけるHBs抗原測定	日本医事新報	4703	58	2014	

Nakaoka K, Hashimoto S, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Takagawa Y, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Nishikawa T, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K.	PNPLA3 I148M associations with liver carcinogenesis in Japanese chronic hepatitis C patients.	SpringerPlus	4(1)	83	2015
Yoshioka K, Hashimoto S, Kawabe N	Measurement of liver stiffness as a non-invasive method for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease	Hepatol Res	45(2)	142-51	2015
Honda T, Ishigami M, Masuda H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Katano Y, Goto H	Effect of peginterferon alfa-2b and ribavirin on hepatocellular carcinoma prevention in older patients with chronic hepatitis C	J Gastroenterol Hepatol	30(2)	321-8	2015
Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H	Effect of peginterferon alfa-2b and ribavirin on hepatocellular carcinoma prevention in older patients with chronic hepatitis C	J Gastroenterol Hepatol	30(1)	178-83	2015
Ichino N, Osakabe K, Sugimoto K, Suzuki K, Yamada H, Takai H, Sugiyama H, Yukitake J, Inoue T, Ohashi K, Hata H, Hamajima N, Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Yoshioka K	The NAFLD Index: A Simple and Accurate Screening Tool for the Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	Rinsho Byori	63(1)	32-43	2015
T. Nishikawa, S. Hashimoto, N. Kawabe, M. Harata, Y. Nitta, M. Murao, T. Nakano, Y. Mizuno, H. Shimazaki, T. Kan, K. Nakaoka, Y. Takagawa, M. Ohki, N. Ichino, K. Osakabe, K. Yoshioka.	Factors correlating with acoustic radiation force impulse elastography in chronic hepatitis C	World J Gastroenterol.	20(5)	1289-1297	2014
Shakado S, Sakisaka S, Okanoue T, Chayama K, Izumi N, Toyoda J, Tanaka E, Ido A, Takehara T, Yoshioka K, Hiasa Y, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Kumada H	Interleukin 28B polymorphism predicts interferon plus ribavirin treatment outcome in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis: A multicenter retrospective study in Japan.	Hepatol Res	44(9)	983-992	2014
Bae SK, Yatsunami H, Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H.	Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club.	Hepatol Res.	44(10)	E267-72.	2014
Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H.	Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan.	J Med Virol.	86(11)	1877-85	2014

Michitaka K, Hiraoka A, Tokumoto Y, Ninomiya K, Ninomiya T, Horiike N, <u>Abe M</u> , Hiasa Y.	Clinical features of adult patients with acute hepatitis B virus infection progressing to chronic infection.	Int J Hepatol	2014	358206	2014
Watanabe T, Tokumoto Y, Hirooka M, Koizumi Y, Tada F, Ochi H, <u>Abe M</u> , Kumagi T, Ikeda Y, Matsuura B, Takada K, Hiasa Y.	An HBV-HIV co-infected patient treated with tenofovir-based therapy who achieved HBs antigen/antibody seroconversion.	Intern Med	53	1343-1346	2014
Kawaguchi T, Kohjima M, Ichikawa T, Seike M, Ide Y, Mizuta T, Honda K, Nakao K, Nakamuta M, <u>Sata M</u> .	The morbidity and associated risk factors of cancer in chronic liver disease patients with diabetes mellitus: a multicenter field survey.	J Gastroenterol			In press
Amano K, Kawaguchi T, Kuromatsu R, Kawaguchi A, Miyajima I, Ide T, Kakuma T, <u>Sata M</u> .	Time trends of clinical characteristics in hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B virus infection: A field survey between 2000 and 2012.	Mol Clin Oncol	2	927-934	2014
Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, Iwasa M, Tokumoto Y, Endo R, Kawamura NH, Shiraki M, Habu D, Tsuruta S, Miwa Y, Kawaguchi A, Kakuma T, Sakai H, Kawada N, Hanai T, Takahashi SI, Kato A, Onji M, Takei Y, Kohgo Y, Seki T, Tamano M, Katayama K, Mine T, <u>Sata M</u> , Moriwaki H, Suzuki K.	Branched-chain amino acids prevent hepatocarcinogenesis and prolong survival of patients with cirrhosis.	Clin Gastroenterol Hepatol	12	1012-1018.e1	2014
Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, <u>Sata M</u> .	Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis.	Hepatol Res	44	837-845	2014
Nakano M, Kawaguchi T, Nakamoto S, Kawaguchi A, Kanda T, Imazeki F, Kuromatsu R, Sumie S, Satani M, Yamada S, Torimura T, Kakuma T, Yokosuka O, <u>Sata M</u> .	Effect of occult hepatitis B virus infection on the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection.	Oncol Rep	30	2049-2055	2013
Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, <u>Nakamoto Y</u>	Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series.	Mol. Clin. Oncol.	2 (6)	1028-1034	2014
Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, <u>Nakamoto Y</u> and Nakatsura T	A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer.	Int. J. Oncol.	46 (2)	497-504	2014

Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, <u>Nakamoto Y</u> , Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S	Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma.	Hepatology	60 (5)	1674-1685	2014
Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, <u>Nakamoto Y</u> , Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S	In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation.	Cancer Immunol. Immunother.	63 (4)	347-356	2014
Kitahara M, Mizukoshi E, <u>Nakamoto Y</u> , Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S	Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	Int. Immunopharmacol.	21 (2)	346-353	2014
Nishikawa H, Enomoto H, Saito M, Aizawa N, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, Kim SR, Hongo Y, Jyomura H, Nishida N, Kudo M, Osaki Y, <u>Nishiguchi S</u> .	Treatment Response and Tolerability in Elderly Patients with Chronic Hepatitis C: Subgroup Analysis in ReGIT-J Study.	J Virol Antivir Res	3	2	2014
Aizawa N, Enomoto H, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, <u>Nishiguchi S</u> .	Thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C.	J Gastroenterol.	49	1253-63.	2014
Ikeda N, Imanishi H, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H., Saito M, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Yamamoto S, Hirota S, Kudo M, Arii S, <u>Nishiguchi S</u> .	A nationwide survey in Japan regarding splenectomy/partial splenic embolization for interferon treatment targeting hepatitis C virus-related chronic liver disease in patients with low platelet count.	Hepatol Res.	44	829-36.	2014
Enomoto H, Inoue S, Matsuhisa A, <u>Nishiguchi S</u> .	Dignosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis and an In Situ Hybridization Approach to Detect an "Unidentified" Pathogen.	Int J Hepatol.	2014	634617	2014
Takashima T, Enomoto H, Ninomiya T, Kim SR, Okushin H, Sugano M, Imoto S, Yano Y, Ooka T, Seo Y, Kasugai H, Muramatsu A, Jomura H, Shimomura S, Shindo M, Nakamura H, Aizawa N, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, <u>Nishiguchi S</u> .	Hepatitis C virus relapse was suppressed by long-term self-injection of low-dose interferon in patients with chronic hepatitis C after pegylated interferon plus ribavirin treatment.	Hepatol Res.	44	597-607	2014
Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N., Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Hirota S, Fujimoto J, <u>Nishiguchi S</u> .	New malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the Sonazoid contrast agent for ultrasonography.	J Gastroenterol.	49	755-63	2014

Enomoto H, Aizawa N, Nakamura H, Sakai Y, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Aoki T, Yuri Y, Yoh K, Hashimoto K, Ishii A, Takashima T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, <u>Nishiguchi S.</u>	An increased ratio of glycosylated albumin to HbA1c is associated with the degree of liver fibrosis in hepatitis B virus-positive patients.	Gastroenterology Research and Practice.				2014, Article ID: 351396
Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, <u>Izumi N.</u>	Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma.	Cancer	In press			2014
Ikeda K, <u>Izumi N.</u> , Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H.	Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrotic markers.	Hepatol Res	In press			2014
Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, <u>Izumi N.</u>	Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res	In press			2014
Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, <u>Izumi N.</u>	Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy.	Hepatol Res	In press			2014
Aoki T, Kokudo N, Matsuyama Y, <u>Izumi N.</u> , Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Makuuchi M	Prognostic Impact of Spontaneous Tumor Rupture in Patients With Hepatocellular Carcinoma: An Analysis of 1160 Cases From a Nationwide Survey.	Ann Surg	In press			2014
Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, <u>Imazeki F.</u> , Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O	Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment.	Int J Mol Sci	15 • 11	21455-67		2014
Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, <u>Imazeki F.</u> , Oda S, Yokosuka O.	Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B.	J Viral Hepat.	22 • 2	92-100		2015
Nakamoto S, Kanda T, Wu S, <u>Shirasawa H.</u> , Yokosuka O.	Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations.	World J Gastroenterol.	21;20(11)	2902-12.		2014

Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, <u>Shirasawa H</u> , Kiyohara T, Ishii K, Wakita T, Okamoto H, Yokosuka O.	Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus.	PLoS One.	7;9(7)	e101993.	2014
Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, <u>Yokosuka O</u>	Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment.	Int J Mol Sci	21;15(11)	21455-67	2014
Kamitsukasa H, Iri M, Tanaka A, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, <u>Okamoto H</u> .	Spontaneous reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in patients with resolved or occult HBV infection.	J Med Virol	doi: 10.1002/jmv.24115. [Epub ahead of print].		2015
Mawatari S, Uto H, Moriuchi A, Tabu K, Muromachi K, Tabu E, Oda K, Imanaka D, Oshige A, Nakazawa J, Kumagai K, Tamai T, <u>Okamoto H</u> , Tsubouchi H, Ido A.	Horizontal transmission of de novo hepatitis B between spouses: A case report.	Hepato Res.	doi: 10.1111/hepr.12422. [Epub ahead of print].		2014
Okamoto D, Nakayama H, Ikeda T, Ikeya S, Nagashima S, Takahashi M, Sugai Y, <u>Okamoto H</u> .	Molecular analysis of the interspousal transmission of hepatitis B virus in two Japanese patients who acquired fulminant hepatitis B after 50 and 49 years of marriage.	J Med Virol	86	1851-60	2014