

感、全身倦怠感、食思不振がみられ、体重の変化で見ると、全例で体重減少がみられ、2/3の症例では5 kg以上、15%の症例では10 kg以上、最大では18.1 kgもの体重減少を認めた。平均体重減少量は6.6 kgであり、治療前の体重の平均10%が低化した。血球系の減少に加え、この強い消耗感が、IFN and/or RBNの減量、中止となっている症例も多く、当初6ヶ月間のプロトコルを完遂できたものは治療例の半数にすぎなかった。著者らは、RBNとともにできるだけ高用量のIFNを導入することを計画したが、今後IFN/RBN併用療法の導入に用いる治療量に関しては一考が必要である。

#### E. 結論

C型慢性肝炎に対するIFN/RBNの併用療法の有効性と問題点を検討した。高用量のIFNとRBNの併用により、投与開始6ヶ月後の時点では予想を上回るHCV RNAの陰性化が得られたが、この陰性化の維持が今後の課題である。また、貧血のみならず、白血球、好中球の減少に加え、著しい体重減少や消耗感がみられ、IFN/RBNの投与量には再考が必要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

IFN/RBNの副作用は、IFN monotherapyに比して高度であり、IFN/RBNの併用療法にあたっては、専門医のcareが必要であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

なし

##### (2) 学会発表

1) 田尻亮輔、俵 章夫、坂本 穰、北村敬利、北原史章、佐藤 公、岡田俊一、赤羽賢浩、藤野雅之：インターフェロン (IFN)、リバビリン併用療法中に急性膵炎をきたしたC型慢性肝炎の1例. 第31回日本消化器病学会甲信越支部例会(新潟, 2001年11月16-17日)

2) 坂本 穰、俵 章夫、北村敬利、岡田俊一、赤羽賢浩：C型慢性肝炎に対するIFN/Ribavirin併用療法の副作用. 第89回日本消化器病学会総会(埼玉, 2003年4月24-25日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. IFN/RBN併用療法の副作用

—血球系の減少—

#### IFN/RBN併用療法の副作用

##### ● 血球系の減少 (対象41例)

	最低値	mean±SD	減少率
白血球数	1390 ~ 4200	2518 ± 712	49.8 ± 10.1 %
好中球数	300 ~ 1900	863 ± 374	65.0 ± 12.7 %
血小板数	5.6 ~ 21.1万	11.4 ± 3.9万	37.1 ± 10.0 %
赤血球数	216 ~ 503万	347 ± 65万	23.5 ± 10.9 %
Hb	7.2 ~ 15.3 g/dl	10.8 ± 1.9 g/dl	24.5 ± 9.1 %

IFN/RBN併用投与例の6ヶ月後抗ウイルス効果と治療前のHCV RNAレベル

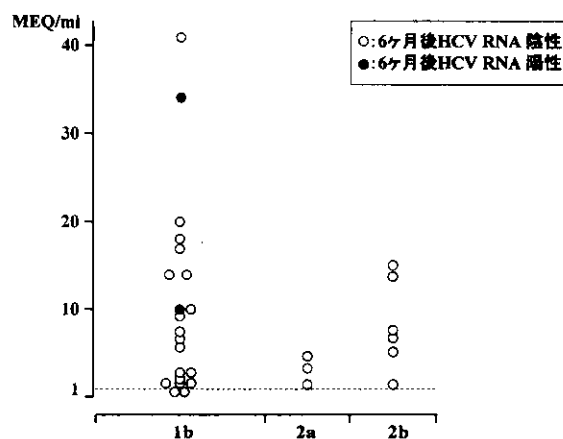


図1. IFN/RBN併用療法の治療効果

—開始6ヶ月後の時点での抗ウイルス効果と治療前HCV RNA量—

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### C型慢性肝炎における抗CD69抗体の検出

研究協力者 四柳 宏 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科 講師

研究要旨：C型慢性肝炎症例における抗CD69抗体の意義について検討した。対象症例はC型慢性肝炎61例、C型肝炎無症候性キャリア16例である。対称群としてB型慢性肝炎47例、自己免疫性肝炎19例についても検討した。C型慢性肝炎患者中24例（39.3%）で抗CD69抗体が検出された。一方無症候性キャリアでは検出されなかった。また、B型慢性肝炎では6例（12.8%）で、自己免疫性肝炎では3例（15.8%）で抗CD69抗体が検出された。  
C型慢性肝炎症例を抗CD69抗体陽性群と陰性群に分けて検討したところ、肝機能・肝組織進展度・ウイルス量・ウイルスサブタイプには両群で差異を認めなかったものの、抗体陽性例にインターフェロン治療無効例が多く認められた。抗CD69抗体は肝炎の発症やインターフェロンを介した感染肝細胞排除に影響を及ぼす可能性が考えられた。

共同研究者	
岡本 菜穂子	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科 助手
加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 助教授
鈴木 通博	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科 講師
飯野 四郎	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科 客員教授

#### A. 研究目的

C型慢性肝炎患者は高率に免疫異常を随伴することが知られている。抗核抗体、抗甲状腺抗体の他にも多種多様な自己抗体が検出されることが知られており、病像を修飾されることが知られている。

CD69はTリンパ球・NK細胞の活性化に伴い出現するマーカーである。肝炎患者の肝内浸潤リンパ球にはCD69が発現することも判明している。CD69に対する抗体はRAなどの自己免疫性炎症性疾患で検出され、病気の活動性に影響を及ぼすことが判明している。従ってC型肝炎患者においても、本抗体が検出された場合、臨床像に何らかの影響を及ぼす可能性がある。

本研究ではCD69抗体の有無が臨床像に及ぼす影響について検討した。

#### B. 対象と治療方法

対象症例はC型慢性肝炎61例（男性43例、女性

18例。平均年齢47.5歳。全例に肝生検を施行）、C型肝炎無症候性キャリア16例（男性3例、女性13例。平均年齢55.8歳）である。対称群としてB型慢性肝炎47例（男性32例、女性15歳。平均年齢37.7歳）、自己免疫性肝炎19例（男性7例、女性12歳。平均年齢50.1歳）についても検討した。

CD69の全長遺伝子（199アミノ酸）をMaltose Binding Proteinとのfusion proteinとしてpMAL Vectorを用いて生成した後、アミロース・レジン・カラムを通して精製した。得られた組み換えCD69蛋白をELISA plate上にコーティングしてEIAの系を構築した。EIAで陽性であった検体についてはウエスタンブロットで陽性を確認した。

#### C. 研究結果：

抗CD69抗体の検出率はC型慢性肝炎61例中24例（39.3%）、B型慢性肝炎47例中6例（12.8%）、自己免疫性肝炎19例中3例（15.8%）であった。C型肝炎無症候性キャリア16例では全例陰性であった。

C型肝炎症例中抗CD69抗体陽性の24例と陰性の37例で臨床的特徴を比較した。肝機能（AST, ALT, albumin, prothrombin time）、血清免疫学的マーカー（CRP, IgG, IgA, IgM, anti-nuclear-antibody, rheumatoid factor, cryoglobulin）には差異は認められなかった。また、HCV-RNA量、HCV

serogroup にも差異は認められなかった。

C型慢性肝炎症例の肝組織所見と抗 CD69 抗体陽性率との関係を (表 1) に示す。組織の進展、肝炎の活動性上昇により、抗 CD69 抗体陽性率は高くなる傾向は認められたが、有意差は認められなかった。

C型慢性肝炎症例中、合計 480MIU の  $\alpha$ -IFN を投与された症例が 54 例あった。この 54 例を抗 CD69 抗体陽性の 20 例と陰性の 34 例に分けて IFN 治療効果を調べた。抗体陽性の 20 例中、Sustained Viral Response (投与終了 24 週後の HCV-RNA 陰性) であったものは 5 例 (25.0%) であったが、抗体陰性の 34 例中 Sustained Viral Response であったものは 26 例 (76.5%) であり、抗体陽性例は治療効果が悪かった (P=0.0002)。

#### D. 考察

C型慢性肝炎において抗 CD69 抗体検出率が有意に高く無症候性 HCV キャリアーでは抗体が検出されなかった。無症候性キャリアが肝炎を発症してくる機序は現在まで不明であるが、我々の成績は発症機序に抗 CD69 抗体の出現が関与している可能性があることを示している。抗 CD69 抗体が肝内の免疫担当細胞を刺激することにより、肝炎が起こってくる可能性が考えられる。この仮説は慢性関節リウマチにおいて抗 CD69 抗体陽性例が陰性例に比較して疾病の活動性が高いという事実と合致する。

抗 CD69 抗体の有無が IFN 治療効果と関連が認められるという事実は非常に興味深い。CD69 は IFN- $\alpha$  投与により、NK 細胞上に発現することが知られている。C型慢性肝炎が治癒するためには、感染肝細胞が排除される必要があり、このためには免疫担当細胞による細胞傷害が惹起される必要があるが、NK(T)細胞は Cytotoxic T cell とともにその役割を担っている。抗 CD69 抗体が出現することで、NK(T)細胞による感染肝細胞排除が阻害されている可能性がある。

#### E. 結論

C型慢性肝炎患者では抗 CD 抗体が症例の約 3分の1に検出された。

本抗体は肝炎の病態・治療効果に影響を及ぼしている可能性がある。

#### 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

Okamoto N, Yotsuyanagi H, Ooka S, Matsui T, Kurokawa M, Suzuki M, Iino S, Nishioka Kato T. Autoantibodies to CD69 in patients with chronic hepatitis type C: A candidate marker for predicting the response to IFN therapy. Intervirology (in press)

##### 2. 学会発表

岡本菜穂子, 大岡正道, 松井利浩, 黒川真奈絵, 加藤智啓, 西岡久寿樹, 四柳宏, 鈴木通博, 飯野四郎. C型慢性肝炎における抗 CD69 抗体の検出. 第 37 回日本肝臓学会講演要旨. 肝臓 (0451-4203)42 巻 Suppl.1 PageA256(2001.05)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容に関しては特になし。

表 1: C型慢性肝炎症例における肝組織所見と抗 CD69 抗体陽性率

Grade * Stage	F1	F2	F3	F4
A1	8/24 (33.3%)	3/9 (33.3%)	0/1	1/1 (100.0%)
A2	3/7 (42.9%)	7/15 (46.7%)	0/0	1/2 (50.0%)
A3	0/0	0/0	0/0	0/0

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### インターフェロン投与によって変動する宿主遺伝子の解析

分担研究者 金子周一 金沢大学大学院医学系研究科消化器内科助教授

研究要旨：C型慢性肝炎例のPBMCの遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法を用いて解析し、健常者とは異なっている事を明らかにした。さらにIFN投与によるPBMCの反応性はIFN治療効果群間で異なっており、治療効果の予測因子となりうる事が示唆された。

#### A. 研究目的

インターフェロン（IFN）は広くC型慢性肝炎の治療に用いられているが、IFNの多様な抗ウイルス作用をはじめ、その生体内に及ぼす影響について十分に解明されていない。宿主の免疫はインターフェロン療法を含めたC型肝炎ウイルス（HCV）の排除に重要な役割を果たすと考えられる。またHCVは肝細胞以外の末梢血単核球（PBMC）に感染する可能性も示唆されている。

そこで今回、我々はC型慢性肝炎例のIFN治療経過におけるPBMCの遺伝子発現の変化をcDNAマイクロアレイ法を用いて包括的に解析した。

#### B. 研究方法

C型慢性肝炎13例及び健常者7例のPBMCを用いた。IFN治療効果の内訳は完全著効（CR）4例、不完全著効（BR）4例、不変（NR）5例で、計40サンプルの解析を行った。IFN投与前、投与開始2-3週後、投与終了6ヶ月後に採取したPBMCよりTotal RNAを抽出し、アンチセンスRNA増幅法を用いてMessenger RNAを増幅した。健常者1例のPBMCを対照サンプルとしてCy3でラベリングし、C型慢性肝炎例および他の健常者6例からのサンプルをCy5でラベリングし、それぞれの遺伝子につきCy5/Cy3を算出した。解析には以前報告したクローンにIFNシグナル伝達遺伝子群を加えた計1305遺伝子からなるアレイスライド、IFN chip ver.1.0（Kanazawa）を用いた。

アレイスライドはScanArray 5000（General Scanning）を用いてスキャンし、QuantArray

（General Scanning）にてイメージデータの解析を行った。さらに、Cluster（Stanford）、TreeView（Stanford）を用いたHierarchical Clusteringと、GeneSpring（Silicon Genetics）によるK-means clustering、Self organizing mapにより、クラスタリングを行った。

血清HCV-RNA量の推移をAmplicore法により測定した。

#### C. 研究結果

IFN投与前において全1305遺伝子を用いたHierarchical clusteringによりC型慢性肝炎群は健常者群から有意に群別された。

またIFN投与前、投与開始2-3週後、投与終了6ヶ月後それぞれにおいて、全1305遺伝子を用いたHierarchical clusteringではHCV serotype、HCV-RNA量、肝炎の活動性、肝線維化の程度、IFN治療効果の因子では有意な群別は認められなかった。しかしIFN投与前において、CR、BR、NR群間で発現パターンの異なる有意な76遺伝子が抽出された。同様に投与開始2-3週間後では29遺伝子、投与終了6ヶ月後では21遺伝子が抽出された。

IFN投与前から投与開始2-3週後に発現比の平均が有意に亢進（1.8倍）した遺伝子数はCR群10遺伝子、BR群31遺伝子、NR群1遺伝子であった。一方発現比の減少（0.6倍）した遺伝子数はCR群16遺伝子、BR群6遺伝子、NR群0遺伝子であった。同様にIFN投与前から投与終了6ヶ月後に発現比の平均が有意に亢進（1.8倍）した遺伝子数はCR群35

遺伝子、BR 群 105 遺伝子、NR 群 0 遺伝子であった。一方発現比の減少 (0.6 倍) した遺伝子数は CR 群 54 遺伝子、BR 群 72 遺伝子、NR 群 1 遺伝子であった。

Self organizing map による遺伝子発現変化の解析から、治療効果による遺伝子発現変化の違いが認められた。CR 群では NR 群に比べ発現変化する遺伝子が多く、投与終了 6 ヶ月後には健常者群の遺伝子発現パターンに似たパターンを示した。

#### D. 考察

IFN 投与前における Hierarchical clustering 解析により C 型慢性肝炎群が健常者群から有意に群別されたことより、C 型慢性肝炎例の PBMC の遺伝子発現は正常とは異なっていた。

また全 1305 遺伝子を用いた Hierarchical clustering において HCV serotype、HCV-RNA 量、肝炎の活動性、肝線維化の程度、IFN 治療効果の因子で有意な群別は認められなかったが、全サンプルを用いた Hierarchical clustering において同一症例の IFN 治療前後のサンプルが近位にクラスタリングされた。

IFN 投与により発現の変動する遺伝子数は、亢進する遺伝子、減弱する遺伝子ともに、CR 群、BR 群において NR 群に比して有意に多く、IFN 投与による PBMC の反応性は IFN 治療効果群間で異なっていた。このことから C 型慢性肝炎例の IFN 治療経過における PBMC の遺伝子発現の変化の解析は治療効果の予測因子となりうる事が示唆された。

#### E. 結論

C 型慢性肝炎例の PBMC の遺伝子発現は正常とは異なっていた。さらに IFN 投与による PBMC の反応性は IFN 治療効果群間で異なっており、治療効果の予測因子となりうる事が示唆された。

#### 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) Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A\*2402 peptide tetramers. J. Med. Virol. (in press)
- 2) Y Nakamoto, S Kaneko, H Fan, T Momoi, H Tsutsui, K Nakanishi, K Kobayashi, T Suda. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. J Exp.Med 198(8): 1105-1111, 2002
- 3) K Masutomi, S Kaneko, M Yasukawa, K Arai, S Murakami, K Kobayashi. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. Oncogene 2002.
- 4) Y Shiota, H Luo, W Qin, S Kaneko, T Yamashita, K Kobayashi, S Murakami. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. J Biol Chem 277: 11149-11155, 2002.
- 5) M Keiji, S Kaneko, K Kobayashi. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. J Hepatol 37: 231-239, 2002
- 6) Y Nakamoto, S Kaneko, K Kobayashi. Increased susceptibility to apoptosis and attenuated Bcl-2 expression in T lymphocytes and monocytes from patients with advanced chronic hepatitis C. J Leukocyte Biol 72: 49-55, 2002
- 7) T Shimazaki, M Honda, S Kaneko, K Kobayashi. Inhibition of Internal Ribosomal Entry Site-Directed Translation of HCV by Recombinant IFN- $\alpha$  Correlates with a Reduced La Protein. Hepatology 35: 199-208, 2002.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### C型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究 B型慢性肝炎に対する6ヶ月間ラミブジン投与例における ALTとHBV DNAの推移

分担研究者 飯野四郎 医療法人社団静山会 清川病院 病院長

研究要旨：人為的に肝炎の急性増悪を引き起こし、自然経過を促進させる従来型のB型慢性肝炎の治療法として、ラミブジン中断療法を試みた。3ヶ月中断療法では投与期間が短すぎると考えられたが、6ヶ月中断療法はHBe抗原陽性例の1/3に効果が認められた。一方、HBe抗体陽性例ではほぼ全例が有効と考えられた。安全性の点でもとくに問題はなかった。対象症例を選べば有望な治療法と考えられた。

共同研究者  
安田清美 医療法人 清川病院 副院長

#### A. 研究目的

多くのB型慢性肝炎は自然経過で肝炎が鎮静化する。従来、自然経過を促進して、肝障害の軽減を図る目的でインターフェロン療法やステロイド離脱療法が行われてきた。そこで、ラミブジンにも同様の肝炎鎮静化促進作用があるかどうかを検討した。

#### B. 研究方法

対象症例は、HBe抗原、HBe抗体にはかかわりなく、HBV DNAが陽性で、数年以上の経過観察にもかかわらずALTの異常が持続するB型慢性肝炎例である。ただし、進展した肝病変を伴う例を除外するために、総ビリルビン2mg/dL以下、ヒアルロン酸110ng/mL以下、血小板12万/ $\mu$ L以上の例を選択対象とした。

ラミブジンは100mg、1日1回3あるいは6ヶ月間投与し中止した。

ラミブジン投与前から投与中止後まで、4週ごとにTMA法によるHBV DNAの測定、血液生化学的検査などを行なった。

治療効果は治療終了6ヶ月後のALT正常化をもって有効、異常をもって無効と判定した。

#### C. 研究結果

##### 1. ラミブジン3ヶ月中断療法。

HBe抗原陽性4例、HBe抗体陽性2例の計6例で検討した。

HBe抗原陽性例ではHBV DNAが陰性化した後1~2ヶ月で中止することとなり、HBV DNA、ALTの推移からみて、効果があるとは考えられなかった。HBe抗体陽性例では2例ではあるがALTは治療後正常化が持続した。しかし、HBV DNAの低下は明らかではなかった。

##### 2. ラミブジン6ヶ月中断療法。

HBe抗原陽性12例、HBe抗体陽性6例の計18例で検討した。

HBe抗原陽性12例におけるALTおよびHBV DNAの推移を図1に示した。

ラミブジン投与中はほぼ全例でALTの正常化をみたが、投与中止後、ほぼ全例でALTの反跳上昇を認めた。1例のみが1,000IU/L以上を示したが、ビリルビンの上昇はなかった。他の11例では500IU/L以下の上昇にとどまり、肝不全の徴候を示した例はなかった。

一方、HBV DNAも投与中はほぼ全例で陰性化し、それが持続した。中止後はほとんどの例で再上昇が認められたが、一部の例では投与前に比して明らかに低値となった。

ラミブジン投与中止6ヶ月後にALTが正常化した

例は4例であり、3例では一過性増悪の後に正常化した。残り1例は途中データが欠失し、急性増悪の有無は知りえなかった。HBV DNAもALTと同様に一過性の上昇の後に明らかに低下した。

一方、投与中止6ヶ月後にALTが正常化しなかった8例では、著しい急性増悪（ALT最高1,200IU/L）を伴った1例とALTが500IU/Lに達した1例を除いて中止後のALTの上昇は明らかではなかった。HBV DNAは全例再上昇し、ほぼ投与前値に戻った。

有効例と無効例の背景因子の比較を表1に示したが、性差を除いて、有意なものはなかった。性差が関係するかどうかはさらに検討する必要がある。

HBe抗体陽性6例のALTとHBV DNAの推移を図2に示した。

ALTは1例で上昇した（その後下降）が、他の例では著しい上昇は認められなかった。HBV DNAの上昇も軽度で、前値より低値を示す傾向が認められた。

#### D. 考察

ラミブジンの長期投与はHBV増殖抑制効果が持続すれば有効な薬剤であるが、1年を超えると高率にラミブジン耐性HBV（YMDD mutant）の出現が問題となる。

今回、自然経過では肝炎が鎮静化しにくい例を対象として、肝炎の鎮静化を促進することを目的にラミブジン中断療法を試みた。

結果として、3ヶ月間投与では投与期間が短すぎて、HBV DNAが陰性化して間もなく中止することになることから、肝炎の経過を変更させる力にはなりえないと判断された。

次に6ヶ月間投与は、YMDD mutantが顕性になるもっとも早い例でも6ヶ月間以上を要することから、mutantによる肝炎の増悪に対する懸念が少なく、効果がみられれば、望ましい治療となりうる可能性がある。

今回の検討でも1/3の例で、中断療法後、ALTの低値下、HBV DNAの低下が見られた。従来からの他の療法と同様に、中断後に適度の肝炎の急性増悪がみられれば効果が得られると考えられた。今後、本療法の繰り返しにより、肝炎鎮静化が促進されるかどうか

かを検討する必要がある。この場合に考えておく必要があることは、この方法の繰り返しによって mutant 誘発時期が早期化しないかどうかという点である。

一方、HBe抗体陽性例では全体としてよい結果が得られた。HBe抗体陽性のB型慢性肝炎に対しては、肝不全誘発の危険性がない限り、積極的に試みるべき治療法と考えられた。

安全性の面で中断後の肝炎の急性増悪から肝不全に至る危険性が考えられたが対象例を絞っていたためか問題症例はなく、安全に完了することができた。

#### E. 結論

B型慢性肝炎に対する6ヶ月間のラミブジン中断療法は、対象症例を限定すれば安全で効果が得られる可能性が高い治療法と考えられた。とくにHBe抗体陽性例で効果的であった。

#### 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) H Yotsuyanagi, K Yasuda, K Moriya, Y Shintani, H Fujie, T Tsutsumi, N Nojiri, T Juji, H Hoshino, K Shimada, K Hino, S Kimura, S Iino, and K Koike : Frequent Presence of HBV in the sera of HbsAg-negative , anti-HBe-positive blood donors.

TRANSFUSION 41; 1093-1099 , 2001

2) E Orito, M Mizokami, H Sakugawa, K Michitake, K Ishikawa, T Ichida, T Okanoue, H Yotsuyanagi, and S Iino, for the japan HBV genotype research group : A Case-Control Study for Clinical and Molecular Biological Differences Between Hepatitis B Viruses of Genotypes B and C. HEPATOLOGY 33: 218-223 , 2001

3) H Yotsuyanagi, K Hino, E Tomita, J Toyoda, K Yasuda, S Iino : Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and



progressive liver injury in chronic hepatitis B.  
Journal of hepatology 37; 355-363, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

表1. Comparison between responders and non-responders

Responder		Non-responder
43±2.9	Age	44±8.7
1:3	Sex (M:F)	7:1
2/4 (50%)	Previous Treatment	6/8 (75%)
187±212	Pretreatment ALT (IU/l)	186±196
6.2±1.6	Pretreatment HBV-DNA (LGE/ml)	7.6±1.1
52.2±21.4	Pretreatment Hyaluronic Acid	46.9±32.2
17.1±2.8	Pretreatment platelet	20.7±6.2

図1. Results of the Study -6 months (1)-  
HBeAg (+)  
12 Cases

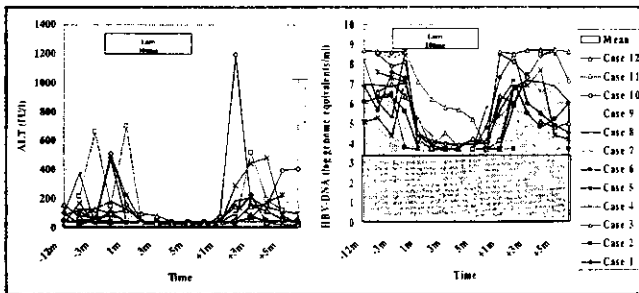
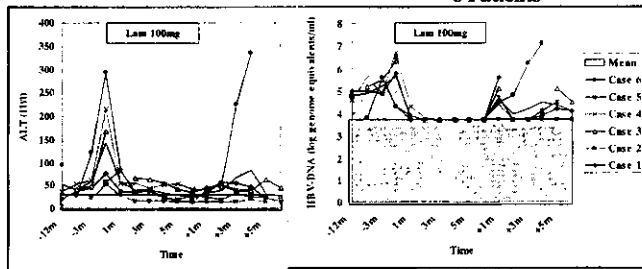


図2. Results of the Study -6 months (4)-  
Anti-HBe (+)  
6 Patients



# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### 「B型慢性肝炎へのラミブジン+HBワクチン併用療法」に関する研究

分担研究者 各務伸一 愛知医科大学消化器内科 教授

研究要旨：B型慢性肝炎患者において、ラミブジン治療へのHBワクチン併用の効果を検討した。HBワクチン併用により、HBV-DNAの陰性化率が高くなる傾向を認め、breakthroughの発現も抑制された。HBワクチン併用の有用性が示唆された。

#### 共同研究者

石川哲也 愛知医科大学消化器内科講師  
奥村明彦 愛知医科大学消化器内科講師

発現率は抑制されていた（単独群 59%、併用群 24%）。ただし、HBeAg<sup>-</sup>群、HBeAg<sup>+</sup>群ともに、LAM 中止後は、ワクチン併用の有無に関わらず、ほぼ全例において肝炎の再燃をみた。

#### A. 研究目的

B型慢性肝炎患者におけるラミブジン（LAM）治療へのHBワクチン併用の効果を検討する。

#### B. 研究方法

対象はB型慢性肝炎患者で、現在までに75例を登録した。登録はHBeAg<sup>+</sup>群（50例）、HBeAg<sup>-</sup>群（25例）に分け、それぞれLAM単独群（単独群）、LAM+HBワクチン併用群（併用群）に振り分けた。単独群はLAM 100 mg/日を内服、併用群においては、LAM内服2ヶ月後より、LAM継続の上、HBs抗原ワクチン（PreSを含む）10 µgを1ヶ月毎に計6回皮下注した。LAM投与は10ヶ月以上を原則とし、LAM投与前後の臨床検査値、ウイルスマーカーの推移、breakthrough（BT）の発現率などに関して検討した。

#### C. 研究結果

現時点で解析可能であった53例（HBeAg<sup>+</sup> 34例、HBeAg<sup>-</sup> 19例）について検討した。HBeAg<sup>-</sup>群ではLAM治療自体に非常に良好に反応し、HBV-DNAも早期に陰性化、単独群（8例）と併用群（11例）との間で差を認めなかった。BTの発現もほとんど見られなかった。一方、HBeAg<sup>+</sup>群では、単独群（26例）に比較し、併用群（24例）でHBV-DNA陰性化の時期が早まる傾向を認め、また、併用群においてBTの

#### D. 考察

B型慢性肝炎へのLAM+HBワクチン併用療法の有用性が示唆された。今後、HBワクチン投与のプロトコルに関して検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

B型慢性肝炎へのLAM治療に関して、HBワクチンは有力な併用療法となり得る。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

当該研究に関するものはなし。

##### 2. 学会発表

「B型慢性肝炎へのラミブジン+HBワクチン併用療法」第38回肝臓学会総会・シンポジウム

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### B 型慢性肝炎患者に対する Lamivudine 治療効果と HBV genotype との関連について

分担研究者 折戸悦朗 名古屋市立大学大学院臨床分子内科 講師

研究要旨：HBV genotype は主に B 型(HBV/B)と C 型(HBV/C)、および Subgroup の Ba 型(HBV/Ba)と Bj 型(HBV/Bj)の B 型慢性肝炎患者において 12 ヶ月間の Lamivudine を投与による治療反応性の差を検討した。HBV/B、C では、HBV/B の方が seroconversion/seronegative 率が高く、HBV DNA も HBV/B で有意に低下していた。しかし HBV/Ba と Bj 間では治療の反応性および耐性株の出現頻度に差は認めなかった。以上のような結果から、genotype B と C では Lamivudine 治療による反応性の違いがあると考えられた。

共同研究者  
加藤孝宣  
名古屋市大大学院臨床分子情報医学  
溝上雅史  
名古屋市大大学院臨床分子情報医学

および direct sequence にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を始めるにあたり、患者への Lamivudine 治療の目的、方法、安全性について十分な説明を行い、理解を得た上で同意を取得して行っている。

#### A. 研究目的

我が国における HBV genotype は主に B 型(HBV/B)と C 型(HBV/C)であり、両者間の治療反応性の差は未だ充分検討されていない。また最近我々は HBV/B には Subgroup の Ba 型(HBV/Ba)と Bj 型(HBV/Bj)があり臨床像が異なることを報告した。そこで今回多施設の協力により、12 ヶ月以上 Lamivudine を投与した B 型慢性肝炎患者を集計し、HBV/Ba、Bj、C 各群の治療反応性の差を検討した。

#### B. 研究方法

12 ヶ月以上 Lamivudine を投与された男性 B 型慢性肝炎患者、HBV/B32 例と HBV/C34 例で検討した。HBV/B と HBV/C は ELISA 法で、HBV/Ba と Bj は PCR-RFLP 法で決定した。治療前、6 ヶ月後、12 ヶ月後に ALT、HBeAg、HBeAb を測定し、ALT の正常化率、再燃および seroconversion/seronegative (SC/SN)率について評価した。また、各ポイントにおける HBV DNA 量を real-time detection PCR (RTD-PCR)にて測定し、ウイルス量の変化、陰性化率についても評価した。また、投与 12 ヶ月後の polymerase YMDD motif の変異株の出現を PCR お

#### C. 研究結果

HBV/Ba は 7 例、HBV/Bj は 25 例であった。各 genotype の平均年齢には差を認めなかった。また治療前の ALT 値は HBV/Ba:165.7 ± 140.8 U/L、HBV/Bj:276.6 ± 307.9 U/L、HBV/C:314.5 ± 302.6 U/L と差を認めなかった。HBeAg 陽性者は HBV/Ba: 3/7(42.9%)、HBV/Bj:4/25(16.0%)、HBV/C:25/34 (3.5%)と、HBV/Bj で最も少なくついで HBV/Ba、HBV/C で最も高率であった。また投与前の HBV DNA 量も HBV/Ba、Bj、C それぞれで 6.94 ± 2.04、6.09 ± 1.95、7.43 ± 1.50 と差を認めなかった。

12 ヶ月間の Lamivudine 投与で平均 ALT 値は HBV/Ba で 32.4 ± 15.5、HBV/Bj で 32.7 ± 24.6、HBV/C で 51.3 ± 112.3 とすべての genotype で低下が認められ、ALT の正常化は Ba、Bj、C それぞれで 5/7 (71.4%)、21/25 (84.0%)、24/34 (70.6%)に認められた。SC/SN 率は Ba、Bj、C それぞれで 2/3 (66.7%)、3/4 (75.0%)、5/25 (20.0%)であり、Ba、Bj と C では有意に Ba、Bj で高率であったが、Ba、Bj 間には差は認めなかった。12 ヶ月間投与後の HBV ウイルス量は Ba で 0.93 ± 1.74、Bj で 1.56 ± 1.50、C で 3.13 ± 2.87

と、Ba、BjとCでは有意にBa、Bjで低値であったが、Ba、Bj間には差は認めなかった。またLamivudine12ヶ月投与時のALT異常者でかつHBV DNA陽性者はBaで1/7(14.3%)、Bjで3/25(12.0%)、Cで7/34(20.6%)と差を認めず、その内でのpolymerase YMDD motifの変異株はBaで0/7(0%)、Bjで1/25(0.4%)、Cで3/34(8.8%)と、その出現率に差を認めなかった。

#### D. 考察

今回の検討ではHBV/B、Cでは、Lamivudine治療12ヶ月でHBV/Bの方がSC/SN率が高く、HBV DNAもHBV/Bで有意に低下していた。しかしHBV/BaとBj間では治療の反応性および耐性株の出現頻度に差は認めなかった。以上のような結果から、genotype BとCではLamivudine治療による反応性の違いがあると考えられた。耐性株の出現頻度やDNAの陰性化率については、さらに感度のよい方法で今後検討していく予定である。また今回の検討ではHBV/Baの数が少なく、また投与期間も12ヶ月間と短いため、さらに多くの症例で、長期に渡る検討が必要と考えられた。

#### 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) Kato H, Orito E, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G. *Hepatology* 35:922-929, 2002.
- 2) Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers, and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatology Research* 22: 37-44, 2002.

3) Sugauchi F, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki T, Hashimoto T, Manabe T, Ueda R, Mizokami M. Liver transplantation associated de novo hepatitis B virus infection: application of molecular evolutionary analysis. *Intervirology* 45:6-10, 2002.

4) Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai C-L, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *Journal of Virology* 76(12):5985-5992, 2002.

5) Kato H, Orito E, Gish GR, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *Journal of Virology* 76(12):6131-6137, 2002.

6) Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, Kato H, Suzuki S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17(6):671-676, 2002.

7) Sugauchi F, Orito E, Kato H, Suzuki S, Kawakita S, Sakamoto Y, Fukushima K, Akiba T, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. *Journal of Medical Virology* 69: 33-40, 2002.

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木誠司、菅内文中、折戸悦朗、長谷川泉、桜井万弓、加藤秀章、田中靖人、飯島祥彦、大野智義、上田龍三、溝上雅史。アビジャン（コートジボアール共和国）におけるB型肝炎ウイルスの遺伝子型分布と分子進化的解析。第38回日本肝

臓学会総会（大阪、平成 14 年 6 月 13,14 日）

2) 桜井万弓、菅内文中、折戸悦朗、長谷川泉、鈴木誠司、加藤秀章、田中靖人、飯島祥彦、大野智義、上田龍三、溝上雅史. ハワイにおける B 型肝炎ウイルス genotype 分布とコアプロモーター・プレコア変異の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会（大阪、平成 14 年 6 月 13,14 日）

3) 長谷川泉、菅内文中、折戸悦朗、桜井万弓、鈴木誠司、加藤秀章、田中靖人、飯島祥彦、大野智義、上田龍三、溝上雅史. 南アフリカ共和国における HBV genotype の分布と系統解析. 第 38 回日本肝臓学会総会（大阪、平成 14 年 6 月 13,14 日）

4) Hasegawa I, Orito E, Tanaka Y, Hirashima N, Sakakibara K, Ohno T, Suguchi F, Suzuki S, Sakurai M, Fujiwara K, Ozasa T, Ueda R, Mizokami M. Impact of occult hepatitis B virus infection on efficacy and prognosis of interferon alpha therapy for patients with chronic hepatitis C virus infection. The 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (Boston, USA, Nov 1-5, 2002)

5) 加藤秀章、折戸悦朗、菅内文中、鈴木誠司、桜井万弓、長谷川泉、上田龍三、田中靖人、溝上雅史. Genotype-specific probe assay を用いた B 型肝炎ウイルスの遺伝子型分類の検討. 第 6 回 日本肝臓学会大会、(横浜、平成 14 年 10 月 24、25 日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### C型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究

### B型肝炎ウイルスと樹状細胞

主任研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：HBV transgenic mouse において HBs 抗原でパルスした樹状細胞投与を行なった。健常マウス脾臓より樹状細胞を採取し、HBs 抗原と2日間培養し、得られた HBs 抗原パルス樹状細胞を HBV transgenic mouse に2回、2週間隔で腹腔内投与した。HBs 抗原は全例で早期に陰性化し、HBs 抗体の出現をみた。対照の HB ワクチン群では、78%で HBs 抗原が樹状細胞の T 細胞増殖能 (allogenic MLR) は、未パルス樹状細胞に比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高かった。以上より、HBs 抗原でパルスした樹状細胞療法は HBV transgenic mouse において有用であった。

#### 共同研究者

堀地典生

愛媛大学医学部第三内科 助教授

SM Fazle Akbar

愛媛大学医学部第三内科 助手

#### B型肝炎ウイルスと樹状細胞

##### A. 研究目的

B型慢性肝炎では樹状細胞の機能が低下していることを報告し、樹状細胞内に HBV-DNA 及び HBV-RNA が存在することを in situ hybridization 法で証明した。更に、B型慢性肝炎に対し HB ワクチンを投与し、樹状細胞の機能回復とともに HBe 抗原より抗体への seroconversion を高率にみた。しかし、効果が30歳未満の若年者に限られていた点と、投与回数が12回と多い点が問題点であった。そこで、治療効果を高め、投与回数を減少させるため、HBs 抗原でパルスした樹状細胞投与を HBV transgenic mouse において行った。

##### B. 研究方法

対象は、HBV transgenic mouse 13匹。健常 C57/BL6 マウス脾臓より Steinman-Inaba の方法で  $1 \times 10^6$  個の樹状細胞を採取した。HBs 抗原（大阪大学微生物研究所、 $100 \mu\text{g}$ ）と2日間培養し、得られた HBs 抗原パルス樹状細胞 ( $200 \mu\text{l}$ ) を2回、2週間隔で HBV transgenic mouse に腹腔内投与

した。対照群は、Complete Freund's Adjuvant (CFA) 含有 HBs 抗原ワクチン ( $10 \mu\text{g}$ ) を2週に1回、12回投与群 (39匹)、CFA ( $200 \mu\text{l}$ ) を1ヶ月に1回、12回投与群 (25匹)、未治療群 (28匹) である。HBs 抗原、HBs 抗体を EIA 法で測定した。HBs 抗原パルス施行及び未施行の健常マウス脾臓由来樹状細胞において T 細胞増殖能 (allogenic MLR) を測定した。

##### C. 研究成果

HBs 抗原パルス樹状細胞群において、HBs 抗原は4週目で13匹全て陰性化した。4週目より HBs 抗体の持続陽性化をみた。ALT の上昇はみられなかった。肝組織像も肝炎像をみなかった。HB ワクチン群では、15ヶ月後、31匹 (78%) で HBs 抗原が陰性化した。CFA 群及び未治療群では HBs 抗原の陰性化をみず、HBs 抗原化も減少しなかった。HBs 抗原パルス樹状細胞の allogenic MLR は、未パルス樹状細胞に比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高かった。HBs 抗原パルス樹状細胞表面における MHC class II、CD86 の表出及び培養上清中の IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  もパルス未施行樹状細胞に比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高かった。

##### D. 考察

B型慢性肝炎に対し、HB ワクチンを投与し、樹状

細胞の機能回復とともに HBs 抗原より抗体への seroconversion を高率にみたことを報告した。しかし HB ワクチンを 12 回という多数投与回数を必要とし、また HBs 抗原消失には至らなかった。今回、HBV transgenic mouse において、HBs 抗原でパルスした樹状細胞を 2 回投与することで 4 週目という早期に HBs 抗原が消失し、HBs 抗体出現をみた。本効果発現は、従来の HB ワクチン投与に比べ、早期にみられた。その機序としては、樹状細胞の活性化が示唆された。本療法は肝炎を起こさず安全であった。今後、HB ワクチンの no responder、免疫抑制剤投与患者における B 型肝炎予防、及び B 型慢性肝炎例に対する治療といったヒトへの臨床応用が考えられる。

#### E. 結論

HBV transgenic mouse において HBs 抗原でパルスした樹状細胞投与を行い、以下の成績を得た。

1. HBs 抗原は全例で早期に陰性化し、HBs 抗体の出現をみた。
2. HBs 抗原パルス樹状細胞の T 細胞増殖能 (allogenic MLR) は、パルス未施行樹状細胞に比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高かった。

以上より、HBs 抗原でパルスした樹状細胞療法は HBV transgenic mouse において有用であった。

F. 健康保険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) S Arima, SMF Akbar, K Michitaka, N Horiike, S Nuriya, M Kohara, M Onji ; Impaired function of antigen - presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B : Localization of HBV - DNA and HBV - RNA in blood DC by in situ hybridization. Int J Mol Med 11 : 169-174, 2003

- 2) N Horiike, SMF Akbar, T Ninomiya, M Abe, K Michitaka, M Onji : Activation and maturation of antigen - presenting dendritic cells during vaccine therapy in patients with chronic hepatitis due to hepatitis B virus. Hepatology Research 23 : 38-47, 2002.

#### 2. 学会発表

- 1) SM Fazle Akbar, S Furukawa, M Abe, K Michitaka, Y Chen, N Horiike, M Onji. Productive , therapeutic effect and mechanism of action of a vaccine containing antigen - pulsed dendritic cells for therapy of chronic hepatitis B virus infection. 53th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease (Nov, 1-5, 2002, Boston)

#### H. 知的財産権の出願登録状況

今回の研究内容については特になし。

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### HBV コア関連抗原測定系の臨床的有用性

分担研究者 清澤研道 信州大学医学部第二内科 教授

研究要旨：我々のグループが新しく開発した HBcr 抗原測定系の臨床的有用性を検討した。HBcr 抗原量と TMA 法で測定した HBV DNA 量は有意で正の相関を示した。ウイルス血症の検出率は HBcr 抗原測定法（87.5%）が TMA 法（82.4%）に比較し優れていた（ $P=0.019$ ）。定量域も、HBcr 抗原測定法が TMA 法に比較し広い傾向がみられた。HBcr 抗原量と HBV DNA 量は、抗ウイルス剤非投与下では平行して推移したのに対し、投与下では HBV DNA 量の低下に比較し HBcr 抗原量の低下は遅い傾向がみられた。HBcr 抗原測定系は EIA 系であるため安価で簡便である。さらに、定量性や感度も優れており、臨床的に有用な HBV ウイルス量の定量系と考えられる。

#### 共同研究者

田中榮司 信州大学第二内科 助教授  
松本晶博 信州大学第二内科 助手

#### A. 研究目的

B 型慢性肝炎治療における新しい抗ウイルス剤が登場により、HBV ウイルス量の測定がより重要となった。HBV ウイルス量は治療効果の予測やモニタリングに必須であり、以前より感度が高く定量域の広い測定系が要求されている。今回、我々のグループが新しく開発した HBcr 抗原測定系の臨床的有用性を検討したので報告する。

#### B. 研究方法

B 型慢性肝炎 76 例より得られた 216 血清検体、抗ウイルス剤を用いず経過観察した B 型慢性肝炎 4 例のシリーズ血清、および Lamivudine 治療を行った B 型慢性肝炎 6 例のシリーズ血清を対象とした。

血清中 Hepatitis B core related 抗原（HBcr 抗原）の測定は化学発光 EIA（CLEIA）法により行った。測定原理は以下の如くである。血清検体 0.1 ml を用い、まず、界面活性剤等を含む前処理液を加え静置する。この過程により HBV ビリオンからエンベロープをはずし、コア粒子をコア抗原に分解し、さらにコア抗原をリニア抗原とする。同時に血清中の HBe 抗原も前処理によりリニア抗原とする。前処理検体はサンドイッチ CLEIA 法により検出するが、この時 HBe

抗原と HBe 抗原に共通するリニアエピトープに対するモノクローナル抗体を用いる。測定された HBcr 抗原量は U/mL で表示し、 $3 \log \text{U/mL}$  を検出限界とした。

血清中 HBV DNA 量は市販のキットを用い、TMA 法により測定した。HBV DNA 量の測定範囲は  $3.7 - 8.7 \log \text{copies/mL}$  であった。

ウイルス量の相関に関する統計解析は Spearman rank correlation にて行った。

（倫理面への配慮）

血清検体の採取、保存、およびウイルスマーカー測定に関しては患者より文書による同意を得て行った。

#### C. 研究結果

B 型慢性肝炎 76 例より得られた 216 血清検体について HBcr 抗原量と HBV DNA 量の両方を測定し、両者の相関を検討した。図 1 では、両ウイルス量に正の相関関係が認められた。統計学的解析では、HBe 抗原陽性検体（ $r=0.847$ ,  $P < 0.001$ ）、陰性検体（ $r=0.632$ ,  $P < 0.001$ ）ともに有意な相関であった。ウイルス血症の検出率は HBcr 抗原が 87.5%（189/216）、TMA 法で測定した HBV DNA が 82.4%（178/216）であり、前者で有意に高率であった（ $P=0.019$ , McNemar test）。

抗ウイルス剤非投与下での HBcr 抗原量と HBV DNA 量の推移を、B 型慢性肝炎 4 例より得られたシ



リーズ血清で検討した。基本的に両マーカーは平行して推移しており、HBcr 抗原量は HBV DNA 量を反映していると考えられた。

ラミブジン投与下での HBcr 抗原量と HBV DNA 量の推移は B 型慢性肝炎 6 例について検討した。ラミブジン投与開始以前は、両ウイルス量は平行して推移した。これに対し、投与開始後は、6 例全例で HBV DNA 量が速やかに低下したのに対し HBcr 抗原量の低下は緩徐であった。

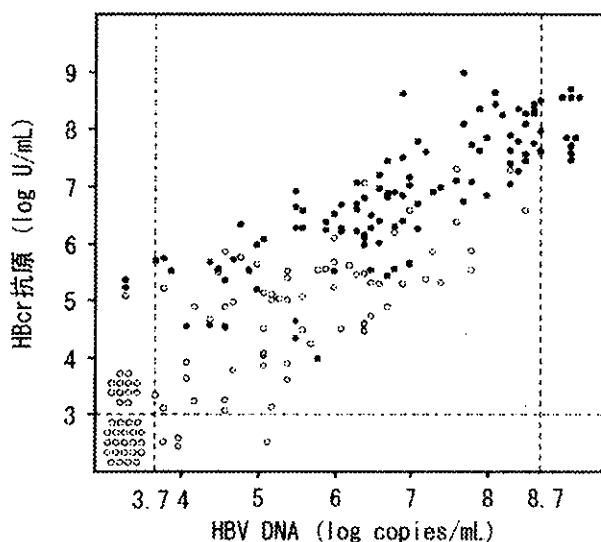


図1: HBcr 抗原量と HBV DNA 量の相関  
● HBe 抗原陽性、○ HBe 抗原陰性

#### D. 考察

B 型慢性肝炎では、自然経過でウイルス量は大きく変化し、ウイルス量は予後と良く相関することが知られている。一方、ラミブジンなどの切れ味のよい高ウイルス剤の登場により、ウイルス量の測定は治療効果の予測やモニターに欠くことのできないものとなった。このため、今回の検討では、我々が新しく開発した HBcr 抗原測定法の基本性能と臨床応用の可能性について検討した。

TMA による HBV DNA 測定法は、現在臨床で一番良く使用されている HBV 定量法の一つである。このため、今回の検討では HBV 定量法の標準として TMA 法を用いた。HBcr 抗原量は TMA 法で測定した HBV DNA 量と良い相関を示し、HBcr 抗原量はウイルス量を反映していると考えられた。自然経過で、HBcr

抗原量と HBV DNA 量が平行して推移したことは、この反映を裏付けている。ウイルス血症の検出率は TMA 法より有意に良好であり、HBcr 抗原法は検出感度も優れていた。定量域についても、TMA 法では 8.7 log copies/mL 以上の領域では定量性がなかったが、HBcr 抗原法はこの領域でも定量性がみとめられた。すなわち、HBcr 抗原測定法は TMA による HBV DNA 測定法に比較し、感度、定量域とも優れていた。

ラミブジン治療下での HBcr 抗原量と HBV DNA 量の推移の乖離は興味深い。ラミブジンは DNA ポリメラーゼの阻害剤であり、HBV の複製は阻害しても、転写や翻訳は阻害しない。このため、HBV の完全粒子の生産が阻害されても、肝からゲノムを含まない粒子が放出されれば上記の乖離は説明可能である。この点については今後の検討課題である。

#### E. 結論

HBcr 抗原測定系は EIA 系であるため、PCR 法を用いる TMA 法に比較し安価で簡便である。さらに、定量性や感度も優れており、臨床的に有用な HBV ウイルス量の定量系と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Maki N. A sensitive enzyme-immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen and its correlation to virus load. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 439-445.
- 2) Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A, Kimura T, Yamaura T, Orii K, Yagi S, Maki M, and Kiyosawa K. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. *J Viral Hepatitis* (in press).

## 2. 学会発表

- 1) 六波羅明紀、木村達治、折井幸司、松本晶博、八木慎太郎、楨昇、田中榮司、清澤研道。高感度HBV コア関連蛋白測定法によるラミブジン治療中におけるウイルス量の評価とその臨床的有用性。第38回日本肝臓学会総会（大阪、2002年6月13-14日）
- 2) 六波羅明紀、田中榮司、清澤研道。[ワークショップ13] B型慢性肝炎のラミブジン療法におけるウイルス量低下の効果予測因子の検討。第6回日本肝臓学会大会/DDW-Japan2002（横浜、2002年10月24-25日）
- 3) 六波羅明紀、田中榮司、清澤研道。[シンポジウム：遺伝子変異からみたB型肝炎の治療と予後] B型慢性肝炎のラミブジン療法におけるウイルス量低下の効果予測因子の検討。第34回日本肝臓学会東部会（筑波、2002年11月29-30日）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし

# 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（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### E 型肝炎に関する血清疫学的検討

分担研究者 赤羽賢浩 山梨大学医学部第 1 内科助教授

研究要旨：従来先進国では専ら輸入肝炎と考えられていた E 型肝炎が、わが国でも東日本を中心に散発発生例が少なからず存在し、しかも日本土着の HEV 株の感染によることが明らかにされている。また、組換え型 baculovirus を用いた HEV 抗原の発現系が確立され、血清中の IgG 型、IgM 型 HEV 抗体の測定系もより確実なものになったことから、今回急性ウイルス肝炎症例と一般住民を対象に、HEV 抗体を検索した。その結果、E 型肝炎では、IgM 型 HEV 抗体は 3-4 ヶ月で陰性化した。IgG 型 HEV 抗体は発症 2 週間で上昇し、少なくとも 1 年以上高値を持続した。また、A 型肝炎の一部では、IgG 型 HEV 抗体が中等度高値を示したが、これは急性肝炎に伴う液性抗体の産生亢進を反映するものと考えられた。一般健常人の 9% に IgG 型 HEV 抗体が検出され、約 10% 弱の健常人は HEV の感染既往を有すると考えられた。男性は女性の約 2.5 倍の保有率を示したが、年齢分布、職業に一定の傾向なく、HAV 抗体保有とも関連はみられなかった。zoonosis を含め感染経路の解明が今後の課題と考えられた。

#### 共同研究者

岡田俊一	山梨大学医学部第 1 内科	講師
坂本 稔	山梨大学医学部第 1 内科	助手
内藤成子	山梨大学医学部第 1 内科	研究生
岡本宏明	自治医科大学予防生態・分子ウイルス研究部	助教授

#### B. 研究方法

検索対象（Ⅰ）は、自験の急性ウイルス肝炎 152 例である。A 型肝炎 58 例、B 型急性肝炎 47 例、臨床的に非 A、B、C 型の急性ウイルス肝炎と診断した 47 例であり、その入院時血清につき、HEV 関連マーカーを測定した。対象（Ⅱ）は山梨県在住の一般健常人と考えられる人間ドック受診者 1176 例である。男性 558 名、女性 618 名。39 才以下 52 名、40 才代 366 名、50 才代 403 名、60 才代 337 名、70 才以上 18 名である。

IgG 型 HEV 抗体、IgM 型 HEV 抗体は Mizuo らの報告（J. Clin Microbiol 40: 3209-3218, 2002）に従い、baculovirus を用いて発現させた HEV genotype IV の ORF2 抗原を用いて ELISA により測定した。また、HEV RNA の検出も同報告に従い nested PCR により検出した。HAV 抗体は市販の HAT-EIA(デンカ生研)を用いて測定した。

#### （倫理面への配慮）

今回の検討は全て保存血清を用いて測定した。また、測定結果等は研究活動のみに使用する様、最大の配慮をした。

#### A. 研究目的

従来、E 型肝炎は熱帯、亜熱帯地方の風土病で、先進国では専ら輸入感染症として経験されるに過ぎないと考えられていた。しかし、2001 年東京での発生例をきっかけに検討が進み、わが国でも北海道、東北地方を中心に散発性の E 型肝炎が少なからず存在し、しかもわが国土着の HEV 株による感染であることが明らかにされた。

更に、従来の HEV 抗体の測定は合成ペプチドを用いた測定系が用いられており、感度、特異性に課題を残していたが、近年、baculovirus を用い昆虫細胞に HEV 抗原を発現させると、立体構造をもつ中空粒子が産生されることから、IgM 型、IgG 型 HEV 抗体の測定系がより確実なものになった。そこで今回、自験の急性ウイルス肝炎症例と、一般住民を対象に HEV 抗体を検索し、E 型肝炎ウイルスの感染実態を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 急性ウイルス肝炎における HEV 抗体の検出

非 A, B, C 型急性ウイルス肝炎 47 例中 2 例の初診時血清に IgG 型 HEV 抗体を検出した。この 2 例のみが IgM 型 HEV 抗体陽性で、同時に HEV RNA も検出された。この 2 例の経時血清の検討から、発症から 2~4 週間血清中に HEV RNA が検出されること、IgM 型 HEV 抗体は初診時から高力価に検出され、3~4 ヶ月で陰性化すること、IgG 型 HEV 抗体は、初診時から陽性であるが、2 週間後から高力価を示し、少なくとも 1 年間は著しい高値を維持することが明らかになった (図 1)。

A 型肝炎 58 例中 6 例 (10%)、B 型急性肝炎 47 例中 5 例 (11%) の急性期血清からも IgG 型 HEV 抗体が検出されたが、その中で A 型肝炎の急性期血清 3 例は、OD<sub>450</sub> 値が 2.00 前後の中等度高値の IgG 型 HEV 抗体を示した。3 例はいずれも IgM 型 HEV 抗体陰性であった。そこで、この中等度高値の IgG 型 HEV 抗体の特異性を確認する目的で、精製 HEV ORF2 抗原、baculovirus 非感染の蚕蛹磨砕液、HEV ORF2 を組み換えない baculovirus を感染させた蚕蛹磨砕液を用いて吸収試験を行った。その結果 3 例の A 型肝炎急性期血清は、精製 HEV 抗原のみで吸収され、後 2 者では吸収されず、IgG 型 HEV 抗体は HEV 抗原に特異的と考えられた。更に、IgG 型 HEV 抗体が中等度高値を示した A 型肝炎 3 例の経時血清の検討では、1 例だけではあるが、A 型肝炎の入院後に IgG 型 HEV 抗体価の上昇がみられていることや、3 例の中等度高値の IgG 型 HEV 抗体価は 3 ヶ月後には 1/2~2/3 に、6 ヶ月後には 1/3 に、1 年後には 1/4 にと、急激に低下がみられることが明らかになった。しかし、最終観察時点でも IgG 型 HEV 抗体は陽性のままであった。

### 2. 一般健康人における IgG 型 HEV 抗体の検出

人間ドック受診者 1176 名中 108 名 (9.2%) に IgG 型 HEV 抗体を検出した。OD<sub>450</sub> 値が 1.00 を示すものは 11 名 (1.3%) であり、OD<sub>450</sub> 値が 0.50 (cut off 値の約 2.5 倍) 以下を示すものが 63 名で、比較低力価の HEV 抗体を保有するものが抗体陽性者の約 6 割に達した。

HEV 抗体陽性者 108 名と陰性者 1068 名の比較を表 1 に示した。平均年齢、職業に差はなく、HBs 抗原、HCV 抗体の保有、ALT の異常にも差異を認めなかったが、著明な性差が認められ、男性は 13.3%、女性は 5.5% に IgG 型 HEV 抗体の保有を認めた。年齢別の HEV 抗体保有率を検討すると、HEV 抗体保有率は各年代間に有意差はなく、いずれの年代でも男性が女性の 2 倍の HEV 抗体保有率を示した (図 2)。また、HAV 抗体は HEV 抗体陽性者と性、年齢を概ねマッチさせた HEV 抗体陰性者 108 名について測定したが、両群間に有意差を認めなかった。HAV 抗体は両群とも加齢とともに上昇し、性差は認められなかった。

## D. 考察

従来、わが国では専ら輸入感染症と考えられていた E 型肝炎は、北海道、東北地方を中心に、東日本での散発例の報告が多いが、関東甲信越でも少数例が存在した。顕性な肝炎を示した 2 例の検討から、IgM 型 HEV 抗体は発症時から高値を示し、3~4 ヶ月で陰性化し、IgG 型 HEV 抗体は発症 2 週間位から著しい高値を示し、1 年以上は高値を持続した。不顕性感染での抗体の動態を調べることは、かなり困難であると考えられるが、流行地での検討や動物感染実験が示唆を与えてくれる可能性がある。

今回の検討では、一部の A 型肝炎症例では IgG 型 HEV 抗体が、中等度の高値を示す可能性が示唆された。一部の A 型肝炎症例で検出された中等度高値の IgG 型 HEV 抗体の特異性は吸収試験から証明できたと考えられるが、A 型肝炎の入院後に IgG 型 HEV 抗体価の上昇がみられる症例があることや、中等度高値を示した IgG 型 HEV 抗体価が 1 年余りの経過で 1/4 のレベルに低下してしまう事から、少なくとも A 型肝炎の一部では、急性肝炎の経過で IgG 型 HEV 抗体が上昇し、その後速やかに低下を示す可能性があるものと考えられた。その詳細な機序は不明であるが、A 型肝炎では非特異的な IgM のみならず IgG も上昇することが知られており、A 型肝炎に伴う液性抗体産生の亢進を反映するものと考えられたが、何故一部の症例のみでその様な現象がみられるのかは全く不明で