

DNA が存在することが明らかにされた¹⁸⁾。そして、近年になって、Torbensohnらは、HBsAgは陰性であるが、血清あるいは肝組織におけるHBV DNAが陽性である状態を、occult HBVと定義した¹⁹⁾。occult HBV感染に関しては、移植後のような、高度の免疫抑制状態など、特殊な状況下では実際に問題になりうるが、通常の臨床において、どのような意義を有するかに関しては、研究者間で考えも異なっている。occult HBV感染患者のHBV DNA量は定性的なPCRで捉えられる程度の低ウイルス量であるため、occult HBV感染の診断には、高感度のPCRアッセイが必要であり、コンタミネーション（偽陽性）を除外することも重要である。

B型急性肝炎から回復した後に、occult HBV感染となり、長年にわたり続くことがある²⁰⁾。

また、occult HBV感染は、B型慢性肝疾患患者において、血清中のHBsAgが自然経過で消失する場合、あるいは、抗ウイルス療法によって消失した後などにみられる場合がある。さらに、非B非C型肝癌患者およびHCV感染患者においても高頻度にoccult HBV感染が報告されている^{21,22)}。我々のXおよびS遺伝子領域のprimerを用いた検討では、非B非C型肝癌において、HBcAb陽性群では21例中5例（24%）、HBcAb陰性群では21例中2例（9.5%）にHBV DNAを検出した（表1）。また、HBsAg消失例では、9例中4例（44%）がHBV DNA陽性で、陽性例のうち2例ではHBsAg消失後に発癌した（表2）。

このような、極少量のウイルスの臨床的意義についてはよく議論をされるところであるが、occult HBVが臓器移植、輸血、血液透析などを

表1 非B非C型肝癌症例におけるHBV DNA陽性例

症例	年齢	性別	anti-HBs	anti-HBc (×1)	組織	HBV DNA	
						X gene	S gene
1	66	M	-	-	LC	+	-
2	54	F	+	-	LC	+	+
3	75	M	-	100%	CH	+	+
4	79	M	-	95%	LC	+	+
5	55	F	-	90%	LC	+	+
6	82	F	+	83%	CH	+	-
7	82	F	+	61%	LC	+	+

表2 HBsAg消失例におけるHBV DNAの検出

症例	年齢	性別	* genotype	anti-HBc (×200)	組織	HBV DNA	
						X gene	S gene
1	47	M	C	23%	CH	+	+
2	56	F	C	83%	CH	-	-
3	58	M	ND	80%	CH	-	-
4	62	M	B	61%	CH	-	-
5	44	F	C	40%	CH	-	-
6	48	M	C	16%	CH	+	-
7	57	M	F	72%	CH	-	-
8**	71	F	ND	89%	CH	+	-
9**	55	M	ND	48%	LC	+	-

* HBs抗原消失前の血清

** HBs抗原消失後に発癌した症例

通してHBV感染の危険をもっていること, 原因不明の肝疾患の原因となりうること, 肝癌の原因となりうること²³⁾などから, 臨床的に重要な問題であるとする考えもある。非B非C型肝炎におけるoccult HBVの関与についても, 今後, 高感度で, 特異的で, 定量的な, HBV DNAの検出を行い, HBV DNAの複製レベルでの検討と病態との関連について前向きに調べていくことが解明の手がかりになると思われる。

文献

- 1) Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3401-5.
- 2) Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564-9.
- 3) Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996; 48: 60-7.
- 4) Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-8.
- 5) 茶山一彰, 荒瀬康治, 斎藤 聡, 他. 非A, 非B, 非C型肝炎患者におけるTTVの検出と臨床的特徴-HGV RNA陽性例と両者陰性例との比較. *肝臓* 1998; 39: 475-6.
- 6) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-7.
- 7) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998; 10: 1-16.
- 8) Viazov S, Ross RS, Niel C, et al. Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. *J Gen Virol* 1998; 79: 3085-9.
- 9) Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, et al. A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. *J Med Virol* 1999; 57: 264-8.
- 10) Okamoto H, Kato N, Iizuka H, et al. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1999; 57: 252-8.
- 11) 茶山一彰. 非A-非G型肝炎患者におけるTTVの検出率と臨床的特徴. *日本臨牀* 1999; 57: 1295-9.
- 12) Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3177-82.
- 13) Primi D, Fiordalisi G, Mantero JL, et al. Identification of SENV genotypes. International patent number WO0028039 (international application published under the patent cooperation treaty). Internet address: <http://ep.espacenet.com/>.
- 14) Tanaka Y, Primi D, Wang RY, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis* 2001; 183: 359-67.
- 15) Umemura T, Yeo AE, Sottini A, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 2001; 33: 1303-11.
- 16) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, et al. Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3140-5.
- 17) Mikuni M, Moriyama M, Tanaka N, et al. SEN virus infection dose not affect the progression of non-A to -E liver disease. *J Med Virol* 2002; 67: 624-9.
- 18) Uemoto S, Sugiyama K, Marusawa H, et al. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. *Transplantation* 1998; 65: 494-9.
- 19) Torbenson M, Thomas DL. Occult HBV. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86.
- 20) Lorient MA, Marcellin P, Bismuth E, et al. Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and the liver after spontaneous or therapeutically induced HBeAg to anti-HBe or HBsAg to anti-HBs seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992; 15: 32-6.
- 21) Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, et al. Polymerase

chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1990; 323: 80-5.

22) Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al. Occult

hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341: 22-6.

23) Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9: 243-57.

I. C型肝炎ウイルス(HCV)

HCV-RNA 検出検査法

HCV-RNA 定性的測定法

Detection of hepatitis C virus RNA

大石和佳 茶山一彰

Key words : HCV-RNA, RT-nested PCR, 5' 非翻訳領域, ホットスタート

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)感染によって引き起こされるC型肝炎の診断は、①HCVに感染した宿主が産生するHCV抗体を測定する方法、②コア抗原を測定する方法、③HCV-RNAを測定する方法などがある。HCV抗体は、測定レンジが広い方法で高力価陽性であればウイルス血症を伴っていると判定することができるが、測定レンジが狭い方法を用いた場合、抗体が陽性であっても、HCV-RNAが陰性で、自然治癒した過去の感染と考えられる例が3割程度含まれる。ウイルス血症の確認には、高感度化されたコア抗原の検出でもおよそ可能であるが、この測定法の感度は、定量法の25kIU/ml程度に相当¹⁾し、微量なウイルスの検出には十分ではない。reverse transcription(RT)-PCR法は、HCV-RNAを検出する最も高感度の方法であり^{2,3)}、目的に応じて定性法と定量法に使い分けられる。

定性法は、定量法より検出感度が良く、①HCV抗体中～低力価の場合の既往感染とHCVキャリアの鑑別、②急性C型肝炎の早期診断、③インターフェロン(IFN)治療の効果判定などに有用である。本稿では、HCV-RNA定性的測定法について、RT-nested PCR法を中心に解説

する。

1. RT-nested PCR法の原理

RT-nested PCR法は、RTによりRNAから合成されたcDNAを用いて、2段階のPCRでDNAの増幅を行うものであり、single copyの微量なDNAでもアガロースゲル電気泳動で検出できるほどの感度を有している。また、4種類のプライマーを用いることにより、特異性も向上し、非特異反応と見誤る恐れもほとんどない。

2. RT-nested PCR法の実際

a. 血清からのRNAの抽出・調製

HCV-RNAはコア蛋白と結合し、膜蛋白に包まれているため、まずグアニジン処理によりそれぞれの蛋白を溶解し変性させたうえで、フェノール/クロロホルム抽出を行い、十分に除蛋白したRNAを調製する。

(1) 被検血清100 μ lに4M塩酸グアニジン/25mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)/0.5%サルコシル/0.1M 2-メルカプトエタノール400 μ lを加え、室温で30分攪拌する。

(2) 次に、フェノール/クロロホルム(1:1)500 μ lを加え、十分攪拌、遠心し水溶液層を取る操作を2回繰り返す。

(3) クロロホルム500 μ lを加え攪拌、遠心し

Waka Ohishi, Kazuaki Chayama: Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座分子病態制御内科学

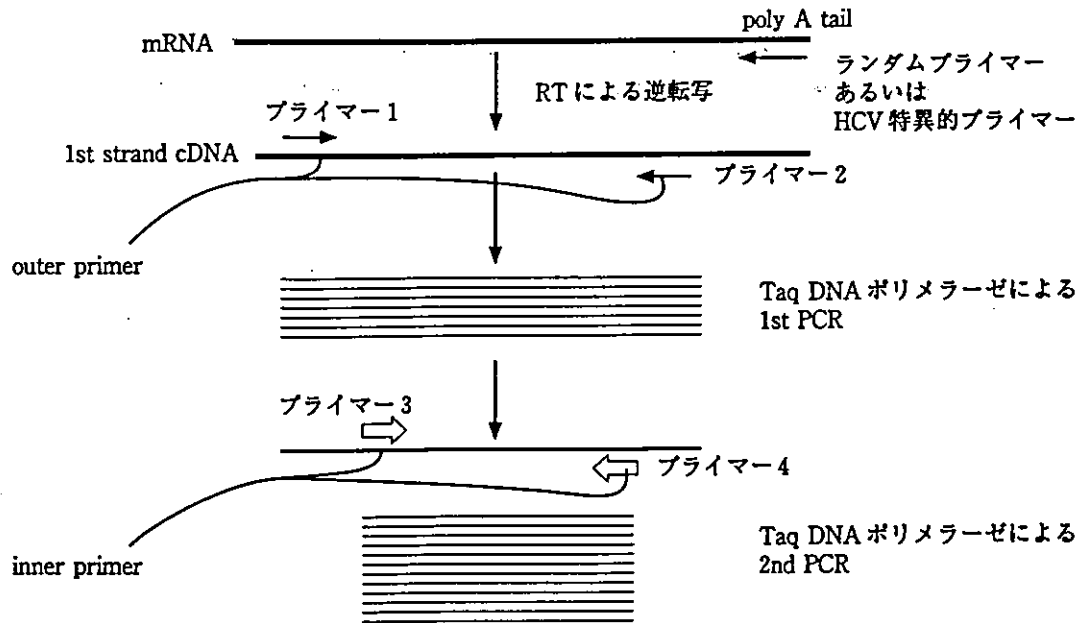


図1 RT-nested PCR法の原理

水溶液層を取る。

(4) 水溶液層に3M酢酸ナトリウムを水溶液層の1/10量, 99.5%エタノールを2.5倍量, 少量のグリコーゲンを加え, -80℃で10分間冷却した後, 12,000rpmで20分間遠心し, RNAを沈殿させる。

(5) 上清をアスピレーターで吸引し, ペレットを70%エタノール, 99.5%エタノールでリンスし, ペレットを乾燥させた後, RNase inhibitor溶液9μl(RNA mix)に溶解する。

最近では, 簡便でかつ短時間に高い回収率で抽出するRNA抽出用試薬も多く市販されている。

b. 逆転写反応によるcDNA合成

HCV-RNAはRNaseによって分解されやすいため, 上記の方法で得られたRNAを鋳型としてまず逆転写反応を行う。逆転写反応にはランダムプライマー, あるいはHCV特異的プライマー(表1のprimer 2)を用いて1st strand cDNAを合成する(図1)。

1) 試薬

- ・プライマー: random primer: 0.6 μg/μl あるいは, primer 2: 50 μM
- ・0.1M DTT
- ・×5 reaction buffer

表1 HCV-RNAの検出に用いるプライマー

primer	塩基配列(5'→3')	nucleotide
1(1st)	cct gtg agg aac tac tgt c	32-50
2(1st)	caa cac tac tcg gct agc agt c	233-254
3(2nd)	ttc acg cag aaa gcg tct agc	51-71
4(2nd)	ttt atc caa gaa agg acc c	176-194

- ・ MMLV H⁻ reverse transcriptase (100 U/μl)
- ・ 10mM dNTP mixture
- ・ RNase inhibitor (118 U/μl)

2) cDNA合成

RNA mix	9 μl
×5 reaction buffer	4 μl
MMLV H ⁻ reverse transcriptase	1 μl
10mM dNTP mixture	2 μl
0.1M DTT	2 μl
プライマー	2 μl
RNase inhibitor	0.2 μl
total volume	20.2 μl

↓
30℃で10分間, 42℃で60分間保温
↓
-20℃で保存

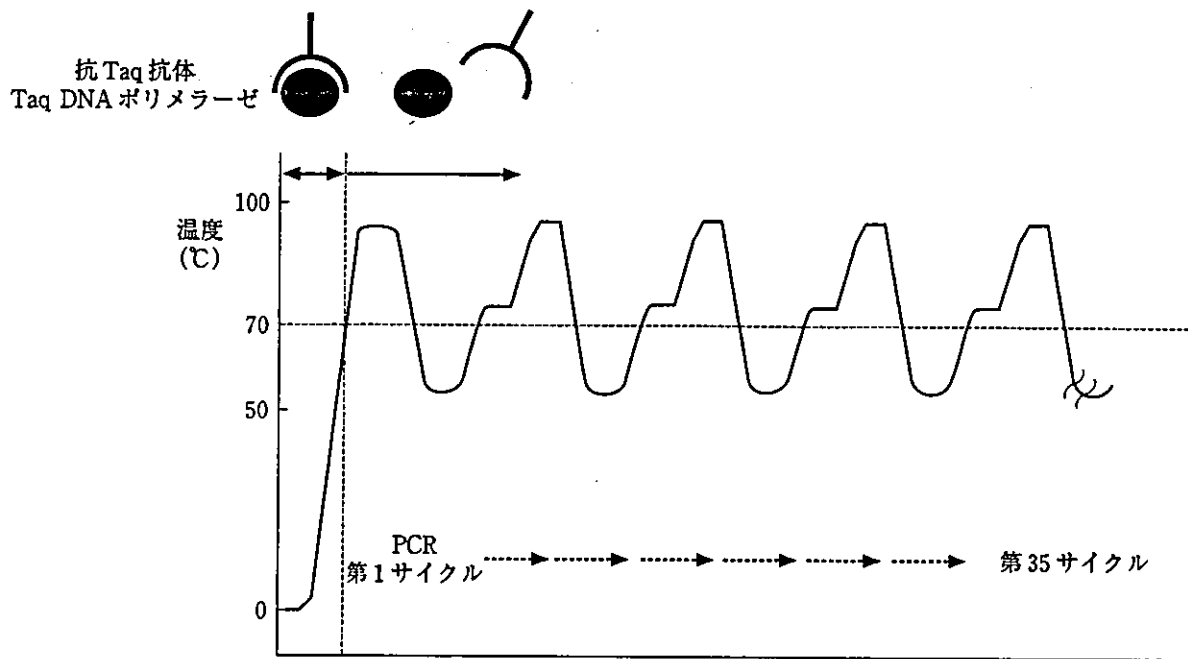


図2 モノクローナル抗体を用いたホットスタートPCR

c. ホットスタートによる nested PCR 法

PCRは、特定の塩基配列に相補的になるように作製されたプライマーを使用して特定のDNA断片を増幅する方法であるが、プライマーの類似配列によるミスプライミングのため標的配列の増幅とともに非特異的な増幅が起こることがある。この非特異的PCR産物の混じった1st PCR産物を鋳型にして、その内部に設定したプライマーを使用した2nd PCRを行うことで、非特異的増幅の中から標的配列のみを特異的に拾い出すことが可能になる。更にPCRを2段階にすることで、PCRの増幅回数を増やすこと、Taq DNAポリメラーゼの失活やプライマー、dNTPの枯渇などによる増幅効率の低下を防ぐことが可能になる。

更に、著者らの施設では、1st PCRにおいて、プライマーと鋳型DNAの非特異的な2本鎖ハイブリッドの形成、プライマーダイマー(プライマー2量体)形成による増幅効率の低下を起こさないためにモノクローナル抗体を用いたホットスタート法を行っている(図2)。PCRでの非特異的な増幅の多くは、反応液を氷中で調製し、サーマルサイクラーにセットした後、反応温度がdenature温度に達するまでにDNAポリ

メラーゼによる合成反応がスタートして生ずるミスプライミングが原因である。図2に示すように、モノクローナル抗体(抗Taq抗体)は、70°C以下でTaq DNAポリメラーゼに結合しその活性を阻害してPCRの第1サイクルにおけるミスアニーリングを防ぐことが可能である。そして、この抗Taq抗体は70°C以上で失活するため、第1サイクルの変性ステップで完全に不活化され、その後のTaq DNAポリメラーゼの反応を阻害しない。ほかに、高温で活性化される耐熱性DNAポリメラーゼを用いるホットスタート法もある。

PCR反応において最も重要なポイントは、プライマーの設定である。通常、高度に塩基配列が保存された5'非翻訳領域(5'-untranslated region: UTR)に設定するが、genotypeによってある程度の変異が認められるため、これらの変異部位を避けてプライマーを設定する必要がある(表1)。nested PCRは、図1に示すように、outer primerで増幅される標的配列の内側に、inner primerを設定し、1st PCRで増えた生成物を新たな鋳型として2nd PCRを行う。

1) First PCR(1 反応)

cDNA	1.0 μ l
primer 1 (10 μ M)	1.0 μ l
primer 2 (10 μ M)	1.0 μ l
×10 PCR buffer (15 mM MgCl ₂)	2.0 μ l
2.5 mM dNTP mixture	1.6 μ l
抗 Taq 抗体・Taq DNA ポリメラーゼ 混合液	0.32 μ l
滅菌蒸留水	13.08 μ l
total volume	20.0 μ l

PCR サイクルは 94°C で 5 分間の熱変性後、変性 94°C, 30 秒, アニーリング 55°C, 1.5 分, 伸長反応 72°C, 1 分を 35 サイクル繰り返す, 72°C, 7 分の伸長反応を追加し, 4°C で保存する。

2) Second PCR(1 反応)

上記反応液 1 μ l を用いて 2nd PCR を行う。

1st PCR DNA	1.0 μ l
primer 3 (10 μ M)	1.0 μ l
primer 4 (10 μ M)	1.0 μ l
×10 PCR buffer (15 mM MgCl ₂)	2.0 μ l
2.5 mM dNTP mixture	1.6 μ l
抗 Taq 抗体・Taq DNA ポリメラーゼ 混合液	0.32 μ l
滅菌蒸留水	13.08 μ l
total volume	20.0 μ l

1st PCR と同様の PCR サイクルで 2nd PCR 反応を行う。

3) アガロースゲル電気泳動

5-10 μ l の PCR 反応液を電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により, 2nd PCR で 144 bp のバンドが検出される。また, 検体中の HCV-RNA 量が多い場合, 1st PCR の反応産物でも 223 bp のバンドが検出される。

3. RT-nested PCR 法の問題点

HCV-RNA は実験者の唾液や汗に存在している RNase によって容易に分解されてしまうので, 取り扱いには十分な注意を要する。また, 血清の凍結・融解の繰り返しによっても HCV-RNA の検出性が低下するので, 保存は必要なだけ幾つかに分注しておくのが望ましい。

また, PCR 法の大きな問題にコンタミネーシ

ョンがある。上述のように, RT-nested PCR 法は極めて高感度の HCV-RNA 検出法であり, 血清 100 μ l に数十個のウイルスが存在すれば検出可能である。PCR 産物のごくわずかであっても測定系に混入すると陰性検体も陽性になってしまうため, DNA が存在する所と, 存在しない所を明確に区別する必要がある。一般的に, PCR 法による検査を行っている実験室では検体調製と PCR 産物の検出を別の部屋で行うなどの工夫が必要である。また, 従来血清からの RNA 抽出・調製は煩雑であったが, 最近の簡便な RNA 抽出用試薬を用いることで, コンタミネーションもかなり回避できるようになった。

4. アンプリコア HCV-RNA 定性法

現在最も汎用されている迅速かつ簡便な HCV-RNA 定性法で, 10²-10³ copies/ml と高い感度を有するが, 定量性はない。この RT-PCR 法は, 逆転写反応と PCR 反応のために用いる耐熱性酵素に Tth DNA ポリメラーゼ⁵⁾ を使用し, 逆転写反応と PCR 反応を同一のチューブ内で行うので, クロスコンタミネーションの危険性が回避できる。更に, 基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて逆転写・増幅反応を行うため, 増幅された DNA が新たなサンプルに混入しても, ウラシル N-グリコシラーゼ (UNG) が作用し分解除去する。こうして, 増幅 DNA のコンタミネーションによって起こる誤測定を最小限にすることができる⁶⁾。

被検血清より HCV-RNA 抽出を行い, 逆転写反応により HCV-RNA から cDNA の合成を行う。PCR 法による cDNA の増幅を行い, DNA プローブと増幅 DNA とのハイブリダイゼーションを行う。発色反応を行い, 吸光度を測定し, 増幅 DNA の検出を行う。

5. HCV-RNA 定性的測定法の臨床的有用性

HCV-RNA 定性法の臨床応用で最も重要な点は, HCV キャリアか否かの最終確認である。HCV 抗体が低力価の場合は既往感染のことが

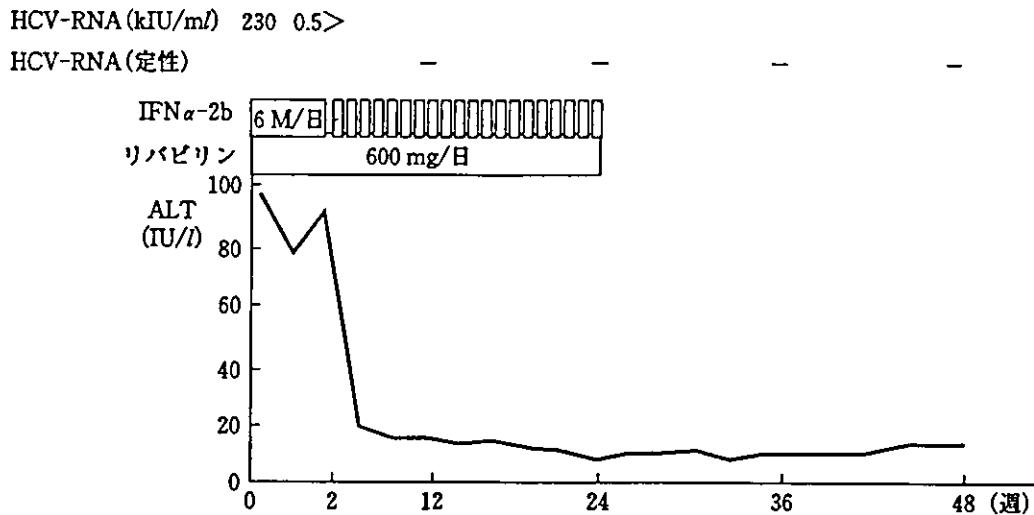


図3 IFN+リバビリン併用療法が著効したC型慢性肝炎症例

多く、検出感度の高いHCV-RNA定性検査を行う。HCV-RNAが陰性であれば、既往感染の可能性が高い。また、急性C型肝炎においてもHCV抗体の陽性化には感染後通常1-3カ月を要するため(ウインドウ期)、この時期にはHCV-RNA定性検査が有用である。

また、IFNの治療中および治療後のモニタリングとしても臨床的有用性が認められている。図3に、IFN+リバビリン療法を行って著効であった症例のHCV-RNAの経時的な測定結果を示した。RT-PCR法によるHCV-RNAの検出は、抗ウイルス療法による‘治療’の判定に用いられており、この症例のように治療中から治療終了6カ月後まで陰性が持続していれば、HCV

は排除されたと考えてまず間違いない。しかし、抗ウイルス療法中にHCV-RNAが陰性になっても、治療後に再陽性化する症例も多くみられることから、検出限界があるため、HCV-RNAが検出されなくても体内にはごく少量のHCVが存在することを否定できない⁷⁾。

おわりに

C型肝炎の診断・治療に重要な役割を果たしているHCV-RNA定性的測定法について原理、実際、問題点、臨床的有用性などについて概説した。これらのことを理解したうえで、基礎研究から日常診療まで幅広く応用されることが期待される。

■ 文 献

- 1) 熊田博光: C型肝炎肝疾患治療指標としてのHCVコア抗原定量値の適用. 医学と薬学 49: 603-608, 2003.
- 2) Garson JA, et al: Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by “nested” polymerase chain reaction and prediction of infectivity. Lancet 335: 1419-1422, 1990.
- 3) Okamoto H, et al: Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. Jpn J Exp Med 60: 215-222, 1990.
- 4) Garson JA, et al: Hepatitis C viraemia rebound after “successful” interferon therapy in patients with chronic non-A, non-B hepatitis. J Med Virol 37: 210-214, 1992.
- 5) Myers TW, Gelfand DH: Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. Biochemistry 30: 7661-7666, 1991.
- 6) Longo MC, et al: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93: 125-128, 1990.
- 7) Chayama K, et al: Effect of interferon administration on hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis type C. Hepatology 13: 1040-1043, 1991.

○ ウイルス性肝炎の臨床

B型慢性肝炎に対するラミブジン療法

—その問題点と対策—

大石和佳*1 茶山一彰*2

要 旨

近年、ラミブジン治療は、B型肝炎のさまざまな病態に広く行われるようになってきた。そして、ラミブジン耐性ウイルス出現による肝炎再燃に対する治療は、患者の予後を左右すると言っても過言ではない。新たな種々の核酸アナログも次々と登場してきたが、今後も耐性ウイルスの問題を念頭に置いて、より適切な治療選択を良いタイミングで行っていくことが重要である。

はじめに

近年、ラミブジンによるB型肝炎の治療では、HBV DNAの減少、血液生化学所見や肝組織の炎症所見の改善などが認められている¹⁾。しかしながら5～6ヵ月の治療後にラミブジン耐性ウイルス(YMDD変異株)が出現し、HBV DNAの再増殖、いわゆるブレイクスルーが起こって肝炎が再燃することが問題となっている。このYMDD変異株の出現率は、治療期間が長くなるにつれて増大することが知られており²⁾、ラミブジンをどのような症例に投与すべきか、ラミブジンの中止は可能か否か、そしてブレイクスルー後

の肝炎再燃に対する治療の選択やタイミングについてなど、検討すべき問題点が多く残されている。本稿では我々の経験した症例を中心に、種々の病態に対するラミブジン療法、YMDD変異株の出現率、ブレイクスルー後の肝炎再燃に対する治療法と、新たな核酸アナログであるアデフォビルの治療効果などを含めて解説する。

ラミブジンをどのような症例に投与すべきか？

ラミブジン投与の対象となるのは、HBe抗原が陽性あるいは陰性にかかわらず、B型慢性肝炎でHBV DNAが陽性、ALT値が異常の症例である。キャリアから肝炎発症後間もない症例では、組織学的にも進行していない場合が多く、HBV DNAが高値で、HBe抗原陽性例が多い。HBV DNAが高値でHBe抗原陽性例では特に早期に変異株の出現が予測されるため、ラミブジン投与を積

*1 (財)放射線影響研究所 臨床研究部

*2 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
分子病態制御内科学 教授

キーワード：B型慢性肝炎，ラミブジン，
YMDD変異株，インターフェロン，
アデフォビル

極的には勧められない⁹⁴⁾。したがってそのような比較的若年の症例においては、ラミブジンよりむしろインターフェロン (IFN) 治療を考慮したほうが良いと思われる。しかし慢性肝炎の中でも、組織学的に進行し (新犬山分類 F₂A₂ 以上)、トランスアミナーゼの高値が持続して明らかに肝硬変への進行が示唆される症例では、積極的にラミブジンを使用して進行を阻止する必要がある。また HBe 抗体陽性例で、HBV DNA の増殖を繰り返す組織学的な進行が示唆される症例においても、ラミブジンは良い適応であると考えられる。

また、B型急性肝炎および慢性肝炎の重症化例、B型劇症肝炎に対してラミブジンを投与することは、有効な治療法であると考えられる。劇症肝炎は半数近くが死亡する重篤な疾患であり、このような高度の肝細胞障害に対してラミブジンが十分な抗ウイルス効果を発揮するまでに1~2ヵ月を要する症例もあることから、可及的早期に投与することが必要であると考えられる。重症化あるいは劇症化の目安は、プロトロンビン (PT) 活性度の高度の低下、肝細胞増殖因子 (HGF) の高値である。また、肝不全への移行が懸念される肝硬変に対しても、肝炎の鎮静化、肝予備能の向上の目的でラミブジンは有効であると考えられる。予後不良な非代償性肝硬変に対しても、肝不全を改善させて短期的な延命効果をもたらすことが報告されている⁹⁵⁾。ただし、肝硬変へのラミブジン投与はブレイクスルー後の肝炎再燃が重症化した場合に致命的になることがあるため、YMDD 変異株の出現により一層注意を払い、経過観察することが重要である。

さらに最近ではラミブジン治療を、肝移植を要するB型肝炎症例の移植後再感染予防のために移植数ヵ月前から行う、あるいは悪性腫瘍に対し化学療法を行うことにより生じる

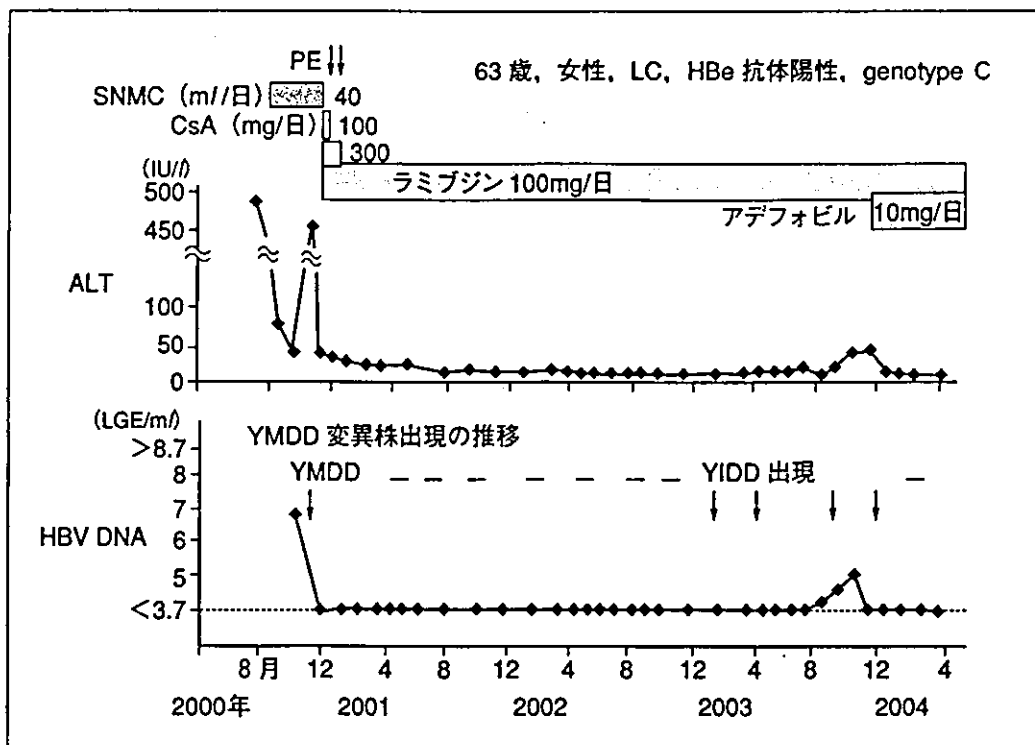
HBV の再活性化予防のために併用するなどして、良好な治療効果が報告されている⁹⁶⁾。ただし、現在ラミブジンは慢性肝炎のみが保険適応となっている。

ラミブジンの中止は可能であるか？

ラミブジンは、内服を中断・中止すると肝炎の再燃を来す可能性があり、中止するタイミングが非常に難しい。特に、YMDD 変異株が出現し、肝炎の増悪が起きているからといってすぐに中止すると、ラミブジンで抑えられていた野生株の増殖を惹起する可能性があり危険であるため、中止すべきではない。それに対し、近年 YMDD 変異株出現後のラミブジンの継続は有益性がないことを示唆する報告も散見されるようになってきたが⁹⁷⁾、いまだコンセンサスは得られていない。一般的に、ラミブジンを中止するためには HBV 関連ウイルスマーカーの測定による嚴重な経過観察が必要であり、慢性肝炎例では、HBe 抗原陽性患者の場合 seroconversion が6ヵ月以上持続すること、HBe 抗原陰性患者の場合 HBs 抗原の消失あるいは ALT の正常化を伴う HBV DNA の陰性化が6ヵ月以上持続することが、中止の目安とされている。しかし、HBs 抗原が消失した場合には中止を検討しても良いが、その他の場合には、肝細胞に残存する少数のウイルスによる肝炎の再燃を回避するために、基本的に中止すべきではないと思われる。

実際に我々は、ラミブジンの投与期間が1年未満の短期例と1年以上の長期例に分けて、IFN を併用しながらラミブジンの中止を試みたが、いずれも高率に肝炎が再燃した。幸い、これらの中止例では重症化せず、我々の開発した YMDD 変異株の超高感度検出系を用いても¹⁰⁾¹¹⁾ 変異株は検出されておらず、ラミブジン再投与による治療効果は良好であった。

図1 B型肝炎重症化にラミブジンとシクロスポリンAで救命後、長期投与により耐性株が出現、アデフォビル投与により経過良好な症例



SNMC：強力ネオミノファーゲンC[®]、CsA：シクロスポリンA
他の略語：巻末の「今月の略語」参照

ラミブジン耐性ウイルスに対する治療対策

我が国でB型肝炎に対して最も多くラミブジンの長期投与が行われている虎の門病院¹²⁾のYMDD変異株の出現率は、投与1年目で19.7%、2年目で32.2%、3年目で43.8%、5年目で62.5%と、ラミブジンの投与期間に応じて高率になり、肝炎の再燃率の増加も確認されている。実際に、当施設および関連施設においてラミブジンの投与を行った84例のうちYMDD変異株出現例は24例で、HBe抗原陽性は75%、出現率は投与1年目で15%、2年目で25%、3年目で29%であり、症例の背景による差が見られるものの、大体年率10~15%程度で増加していると考えられる。またYMDD変異株は、HBe抗原陽性例のほうがHBe抗体陽性例より早く出現するものの、長期投与に伴い出現率は等しくなることが知られている¹³⁾。

YMDD変異株出現例では肝炎の再燃を起こす可能性が高いが、トランスアミナーゼの上昇が一過性のもの、持続するもの、軽度~ほぼ正常のものまでさまざまである。肝炎が再燃した場合には、強力ネオミノファーゲンC[®]やIFNの24週間投与などの既存療法を併用し、ウイルスの増殖抑制や肝炎の鎮静化を行う。我々は、IFNを2~4週間の連日投与後、20~22週間の間欠投与を行っているが、24週間投与での有効率は決して高いものではない。最近、ラミブジンの投与によりYMDD変異株が出現した非代償性肝硬変などに対して、アデフォビルの投与が個人輸入により可能になったが、おそらく近々保険適応になるとと思われる。

実際に我々は、YMDD変異株の出現により肝炎が増悪し、IFNを投与するも効かなかった症例、肝不全が懸念された症例など10例で、アデフォビルの投与を行っている。

図1は、B型肝炎の重症化によりラミブジンとシクロスポリンAで救命し得た既往のある肝硬変の症例である。ラミブジン投与開始より2年2ヵ月目に初めて、超高感度検出系¹⁰⁾¹¹⁾でYMDD変異株が検出されたが、HBV DNAはTMA法で検出感度未満、トランスアミナーゼの上昇も6ヵ月間全く見られなかった。HBV DNAの再上昇、トランスアミナーゼの上昇に注意しながら経過観察を行い、YMDD変異株の検出から約10ヵ月目、HBV DNA、トランスアミナーゼの軽度上昇した直後、速やかにアデフォビルの併用投与を開始し、重症化も免れ、現在経過良好である。

これらのことから、YMDD変異株出現例に対して、トランスアミナーゼがしばらく正常であっても油断せず、HBV DNAやトランスアミナーゼの推移に細心の注意を払い、経過観察をする必要がある。そして、肝予備能など病態を考慮し、従来の治療不応例や重症化が予測される症例では、可及的早期にアデフォビルの投与を導入する必要があると考えられる。

おわりに

近年、ラミブジン治療がさまざまな病態のB型肝炎に広く行われるようになり、耐性ウイルス出現に対し、従来の肝底護薬やIFNのみでは対処が困難である症例が出てきた。そこで、新たな核酸アナログであるアデフォビルが用いられるようになり、耐性ウイルスの治療にも新たな展開が見えてきた。さらに種々の核酸アナログも登場してきており、今後も耐性ウイルスの問題を念頭に置いて治療を行っていかねばならないであろう。そして、これらの耐性獲得のメカニズムを明らかにすることが、B型肝炎の治療の問題を克服する手掛かりになると思われる。

文 献

- 1) Chayama K, et al: Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 27: 1711-1716, 1998.
- 2) Liaw YF, et al: Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 119: 172-180, 2000.
- 3) Lau DT, et al: Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 32: 828-834, 2000.
- 4) Nafa S, et al: Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 32: 1078-1088, 2000.
- 5) Lee HC, et al: Lamivudine therapy for decompensated liver cirrhosis related to hepatitis B virus infection. *Intervirology* 46: 388-393, 2003.
- 6) Manolakopoulos S, et al: Clinical course of lamivudine monotherapy in patients with decompensated cirrhosis due to HBeAg negative chronic HBV infection. *Am J Gastroenterol* 99: 57-63, 2004.
- 7) Di Paolo D, et al: Low-dose hepatitis B immunoglobulin given "on demand" in combination with lamivudine: a highly cost-effective approach to prevent recurrent hepatitis B virus infection in the long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation* 77: 1203-1208, 2004.
- 8) Idilman R, et al: Lamivudine prophylaxis for prevention of chemotherapy-induced hepatitis B virus reactivation in hepatitis B virus carriers with malignancies. *J Viral Hepat* 11: 141-147, 2004.
- 9) Liaw YF, et al: No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* 9: 257-262, 2004.
- 10) Ohishi W, et al: Rare quasispecies in the YMDD motif of hepatitis B virus detected by polymerase chain reaction with peptide nucleic acid

- clamping. *Intervirology* 46: 355-361, 2003.
- 11) Ohishi W, et al: Identification of rare polymerase variants of hepatitis B virus using a two-stage PCR with peptide nucleic acid clamping. *J Med Virol* 72: 558-565, 2004.
- 12) 熊田博光: B型肝炎に対するラミブジン投与例の YMDD mutant の出現と消失について. B型肝炎の新しい展開 (犬山シンポジウム記録刊行会編), p95-99. アークメディア, 東京, 2001.
- 13) Suzuki F, et al: Mutations of polymerase, pre-core and core promoter gene in hepatitis B virus during 5-year lamivudine therapy. *J Hepatol* 37: 824-830, 2002.

Lamivudine Therapy for Chronic Hepatitis B

Waka Ohishi¹, Kazuaki Chayama²

¹ Department of Clinical Studies, Radiation Effects Research Foundation

² Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

<短 報>

アーキテクトによる HBc 抗体価測定 of 臨床的有用性に関する検討

大石 和佳* 森 奈美 柘植 雅貴 高木慎太郎 丁 守哲 平賀 伸彦
 児玉 英章 平松 憲 脇 浩司 白川 寛夫 相方 浩 今村 道雄
 高石 英樹 高橋 祥一 神安 雅哉 茶山 一彰

目的：HBc 抗体は、B 型肝炎ウイルス (HBV) のコア抗原に対する抗体で、HBV に感染後、最も早期に出現するとされている抗体である。特に、IgG HBc 抗体の高力価・低力価による識別は、持続感染と一過性感染を判別するのに有用とされてきた¹⁾。HBc 抗体の測定法としては、PHA 法、RIA 法、EIA 法などが知られているが、今回、我々は、全自動化学発光免疫測定システム、アーキテクトアナライザーの専用試薬である HBc 抗体測定キット「アーキテクト・HBc (CLIA 法)」(ダイナポット社、東京) の有用性について検討したので報告する。

対象と方法：1) 2000 年 9 月から 2003 年 2 月の間に当科で採取された、B 型慢性肝疾患患者 24 例の凍結保存検体 48 検体を対象とした。24 例は、全例、ラミブジン投与を行っており、ラミブジン治療前の 19 検体とラミブジン治療中(投与期間 1 年-1 年 6 か月)の 29 検体について HBc 抗体価を測定した。測定系は「アーキテクト・HBc」と、比較対照として、従来の RIA 法の「HBc 抗体・リアキット」(ダイナポット社、東京)を用いた。アーキテクトの原倍と 200 倍希釈検体に対し、RIA 法の 200 倍希釈検体を用いて測定し、高力価と低力価の比較評価を行った。

2) 次に、1999 年から 2003 年の間に当科で採取された、B 型肝炎疾患患者 96 例の凍結保存検体 96 検体を対象とした。内訳は、慢性肝疾患 91 例(ラミブジン治療前 39 例、インターフェロン治療前 4 例)、肝細胞癌 5 例であった。測定系は、「アーキテクト・HBc」と、比較対照として、「ルミパルス II HBc Ab (CLEIA 法)」(富士レビオ社、東京)、「エクルーシス Anti-HBc (ECL-LA 法)」(ロシュ・ダイアグノスティックス社、東京)を用いた。それぞれの方法において、原倍と 200 倍希釈検体を用いて測定し、HBV キャリアの判別能を比較評価した。

成績：1) ラミブジン治療の介入がある B 型慢性肝疾患の原倍検体を用いたアーキテクトによる測定では、高力価を示したのは 41 検体 (85.4%)、200 倍希釈検体では、29 検体 (60.4%) であった。低力価を示した症例の中で、ラミブジン治療中であった検体は、原倍で 7 検体中 3 検体 (43%)、200 倍希釈で 19 検体中 19 検体 (100%) であった。RIA 法

(×200) との判定一致率は、アーキテクトの原倍検体で 48 検体中 26 検体 (54.2%) と低かったが、200 倍希釈検体では、48 検体中 44 検体 (91.7%) と良好な一致率を示した (表 1)。

2) B 型慢性肝疾患症例において、アーキテクトの原倍検体では高力価が 96 例中 69 例 (71.9%)、200 倍希釈検体では、74 例 (77.1%) であった。RIA 法 (×200) によく相関するとされているルミパルスの 200 倍希釈検体では、抑制率 90% 以上が 89 例 (92.7%) であった。それに対し、エクルーシスでは、原倍および 200 倍希釈検体において全例で強陽性を示した (表 2)。

考察：日本人の成人で HBV に感染した場合、ほとんどの場合、急性感染となり、持続化することなく治癒するが、欧米では約 2-10% 持続化すると言われている。一過性感染の場合、IgM HBc 抗体は潜伏期の時期から陽性となり、回復期にかけて IgG HBc 抗体へとクラススイッチする。持続性感染に至らず治癒した場合には、IgG HBc 抗体は、徐々に低下し、消失までには長期を要するため、生涯陽性である一過性感染者も多い。従来、我々が用いてきた RIA 法では、200 倍希釈検体で IgG HBc 抗体が 90% 以上の高力価を呈する場合には、HBV キャリアと診断してほとんどの場合問題ないとされていた。このことは、HBs 抗原が陰性を示す HBV 変異株の場合、あるいは HBs 抗原が低力価の場合、キャリアの診断において特に重要と考えられてきた²⁾。

今回、ラミブジン治療中の患者において、アーキテクトの 200 倍希釈検体では、高率に低力価を示しており、その傾向は RIA 法にも認められた。我々が、長年にわたって診療に用いてきた RIA 法の 200 倍希釈と、アーキテクトの 200 倍希釈検体の判定一致率は 91.7% と良好ではあったが、ラミブジンの介入により低力価になるような感度、特異性が果たして HBV キャリアの判別にも有用であるか否かは検討を要する。我々は、ラミブジン治療中に HBe 抗体が低下した症例を経験し報告した³⁾。それらの症例では、高率に HBc 抗体価が低力価となっており、この結果を、ラミブジンの強力な抗ウイルス効果によってウイルス量が著明に減少し抗原刺激が低下したため、宿主の抗体産生も低下して生じたものと判断した。

次に、アーキテクトの HBV キャリアの判別能について検討を行ったところ、治療の介入のない慢性 B 型肝炎患者に対する HBc 抗体の測定では、原倍検体では高力価が 71.9%、200 倍希釈検体で 77.1% といずれも不良であり、

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学
 (*現 放射線影響研究所臨床研究部)

<受付日 2004 年 6 月 28 日> <採択日 2004 年 7 月 21 日>

表1 アーキテクトによる HBc 抗体測定における RIA 法との比較

		アーキテクト・HBc(CLIA 法)			
		原倍(×1)		200倍希釈(×200)	
		高力価 (10.0以上)	低力価 (1.00-9.99)	高力価 (10.0以上)	低力価 (1.00-9.99)
HBc 抗体・ リアキット (RIA 法) (×200)	高力価 (90%以上)	26	7	29	4
	低力価 (90%未満)	15	0	0	15

RIA 法(×200)との判定一致率

N=48

原倍: 26/48=54.2%, 200倍希釈: 44/48=91.7%

表2 アーキテクト・HBc とルミパルス II HBc Ab, エクルーシス Anti-HBc の
HBV キャリア判別能の比較

		アーキテクト・HBc(CLIA 法)				
		原倍(×1)		200倍希釈(×200)		
		高力価 (10.0以上)	低力価 (1.00-9.99)	高力価 (10.0以上)	低力価 (1.00-9.99)	
ルミパルス II HBc Ab (CLEIA 法) (×200)	高力価 (90%以上)	63	26	73	16	
	低力価 (90%未満)	6	1	1	6	
エクルーシス Anti-HBc (ECL-LA 法)	(×1)	強陽性(0.1-0.0)	69	27	74	22
		陽性~弱陽性 (0.1付近-0.7付近)	0	0	0	0
	(×200)	強陽性(0.1-0.0)	69	27	74	22
		陽性~弱陽性 (0.1付近-0.7付近)	0	0	0	0

1) ルミパルス(×200)との判定一致率

N=96

原倍: 64/96=66.7%, 200倍希釈: 79/96=82.3%

2) エクルーシス(×1, ×200)との判定一致率

原倍: 69/96=71.9%, 200倍希釈: 74/96=77.1%

HBV キャリアの判別には適さないと考えられた。特に、HBe 抗原/抗体が陰性/陽性、HBV DNA が TMA 法や PCR 法で検出感度未満の低ウイルス量が長期にわたり持続している無症候性キャリア症例において判別が困難であった。

今回の検討では、アーキテクトの 200 倍希釈検体において他法との判定一致率が比較的高かったものの十分でなく、他法より HBV キャリア判別能は劣っていると考えられた。今後、一過性感染患者症例を含め、HBV キャリアの判別

能についてさらなる検討が必要と考えられた。

索引用語: B 型慢性肝炎, HBc 抗体, ラミブジン
文献: 1) Kobayashi M, Chayama K, Arase Y, et al: J Gastroenterol 35: 753-757, 2000 2) Gutierrez C, Devesa M, Loureiro CL, et al: J Med Virol 73: 200-207, 2004 3) 木村そのこ, 大石和佳, 川上由育, 他: 肝臓 44: 369-370, 2003

日本臨牀

増刊号

ウイルス性肝炎



広島大学 医・内科学1

00090636

20040811

日本臨牀 / 日本臨牀社 [編]

<00471852>

[62] 増刊8 ウィルス -61.62(1-8)



a 2 0 1 0 5 3 9 4 a

—基礎・臨床研究の進歩—

- B型肝炎ウイルス (HBV)
- D型肝炎ウイルス (HDV)
- A型肝炎ウイルス (HAV)
- E型肝炎ウイルス (HEV)
- TTV (トークテノウィルス)
- G型肝炎ウイルス (GBV-C/HGV)
- SENウイルス (SEN-V)

株式会社 日本臨牀社

II. B型肝炎ウイルス(HBV)

関連検査法 血中HBVマーカー検査法

HBc抗体(IgM・HBc抗体, IgA・HBc抗体を含む)

Detection of hepatitis B core antibody(including IgM and IgA class antibodies)

柘植雅貴 茶山一彰

Key words : 急性肝炎, 慢性肝炎, 急性増悪

はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)のC遺伝子領域は, 183アミノ酸残基をコードしており, この情報をもとにcore蛋白(HBc抗原)が産生される。通常, HBc抗原は血清中の蛋白と結合しているため, 他のHBV関連抗原であるHBs抗原, HBe抗原とは異なり, 直接検出することは行われていない。しかし, HBc抗原基を認識するHBc抗体は, HBVの既往感染あるいは持続感染のマーカーとして臨床的に重要視されており¹⁻³⁾, HBV感染初期から陽性となり, 通常の抗体と同様, 経過とともにIgMからIgGへとクラススイッチされる。B型急性肝炎ではIgG HBc抗体は治癒後徐々に低下するのに対し, 持続感染では高値陽性となり, 持続感染の診断に重要である。IgM HBc抗体は, B型急性肝炎の診断に有用であるが, B型慢性肝炎の急性増悪の際にも, ときに陽性となるため, IgM HBc抗体陽性時には慎重な鑑別診断が必要となる。

輸血用血液をスクリーニングする際, 供血者の血液検査においてHBs抗原が陰性であるにもかかわらず, HBV-DNAが陽性である場合が存在する。このため, スクリーニングにはHBc抗体を測定している。

また, 近年ではHBc抗体陽性ドナーからの

移植問題もあり, 本稿では, IgM, IgA, IgG各クラスのHBc抗体とHBc抗体に関する最近の知見について解説する。

1. IgM HBc抗体

IgM HBc抗体は, HBV一過性感染では感染初期から血清中に出現し, 2カ月から数年の間に陰性化するのが一般的である。このためHBs抗原が消失した後もHBV感染を証明することができ, HBs抗原が早期に消失した症例においても感染診断が可能である(図1)。このため, B型急性肝炎の診断には最も良い指標といえる。

一方, HBV持続感染の場合(図2), トランスアミナーゼ正常である無症候性キャリアでは陽性となることはまれであるが, B型慢性肝炎の急性増悪期には陽性を示すことがある。図3に1症例を示す。この症例は慢性肝炎にて経過観察中トランスアミナーゼの上昇を認め, IgM HBc抗体陽転, その後肝炎は沈静化しIgM HBc抗体は陰性化した。このように急性増悪期のみをみるとB型急性肝炎を疑うような症例もあり, 慢性, 急性肝炎の鑑別が重要になる。両者を鑑別するには, HBs抗原のtiterを経過観察し, titerが低下していくものは急性肝炎, 低下しないものは慢性肝炎と診断することができる。

Masataka Tsuge, Kazuaki Chayama: Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学

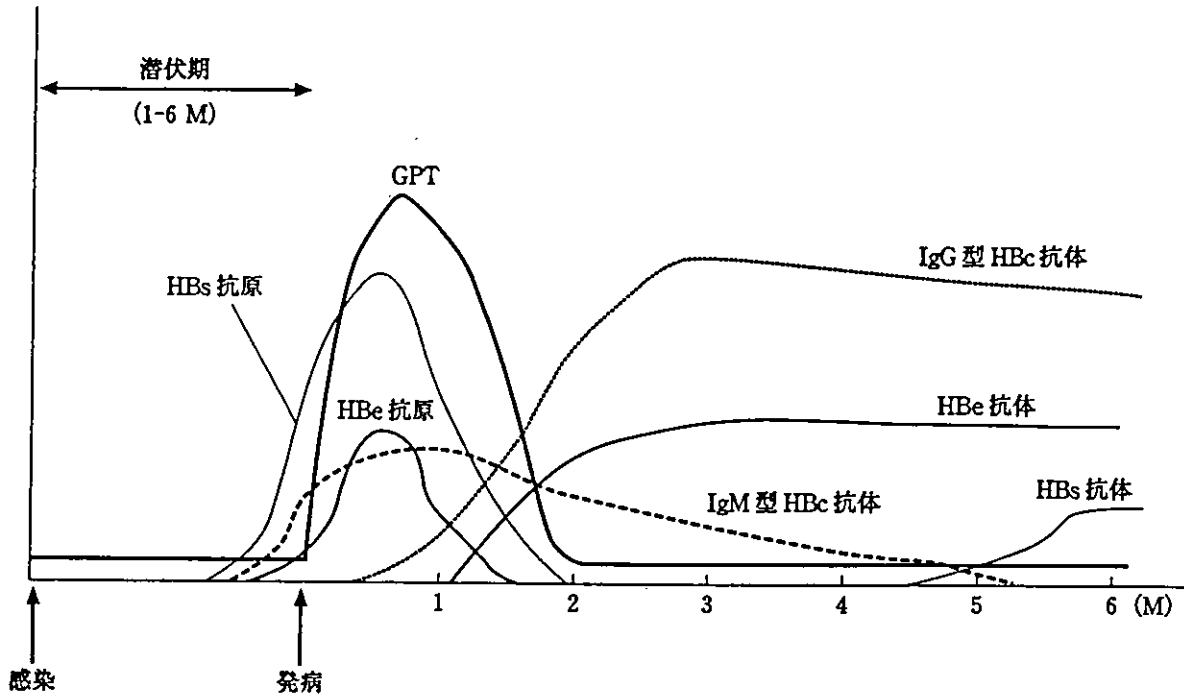


図1 B型急性肝炎ウイルスマーカーの推移

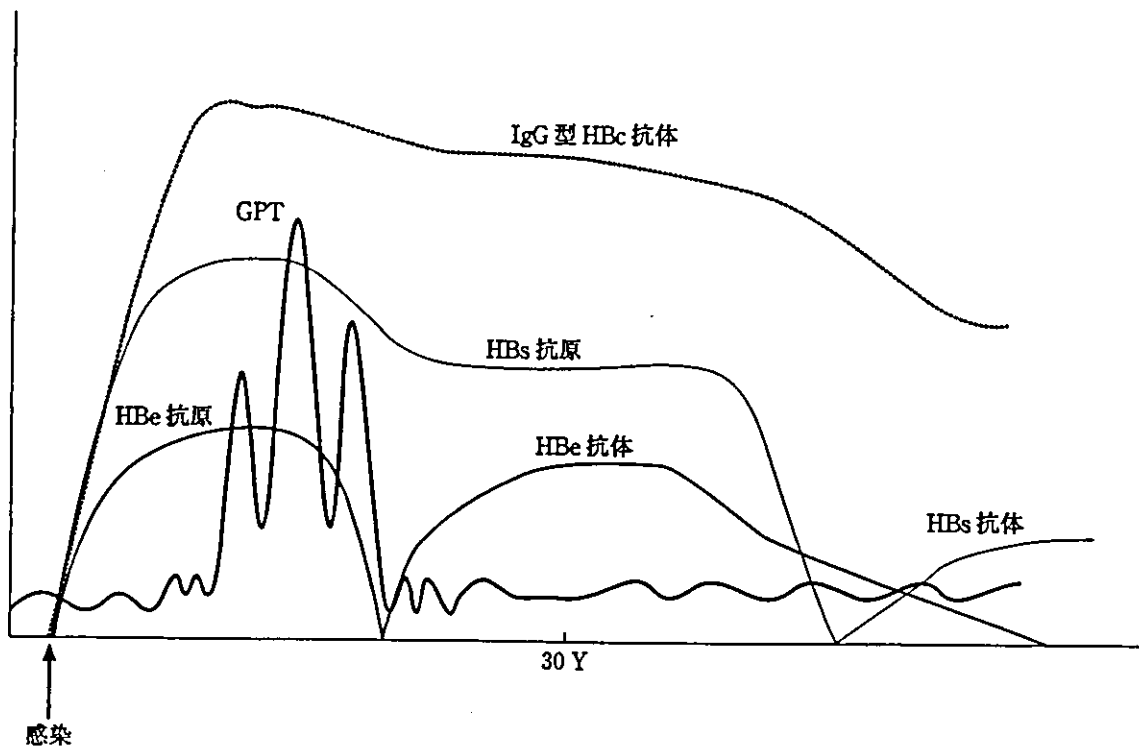


図2 B型慢性肝炎ウイルスマーカーの推移

2. IgG HBc 抗体

HBVに感染するとHBc抗体は感染初期からIgMクラスが出現するが、その後回復期になる

とIgGクラスへとクラススイッチする。一過性感染の場合、IgG HBc抗体は治療後徐々に減少していくが、消失までには長期を要するため生涯陽性のままであることも多い。

HBV-DNA (TMA)	<3.7	4.6 4.8	<3.7 <3.7 <3.7 <3.7	<3.7
IgM HBc 抗体	(-)	(+)	(-)	(-)

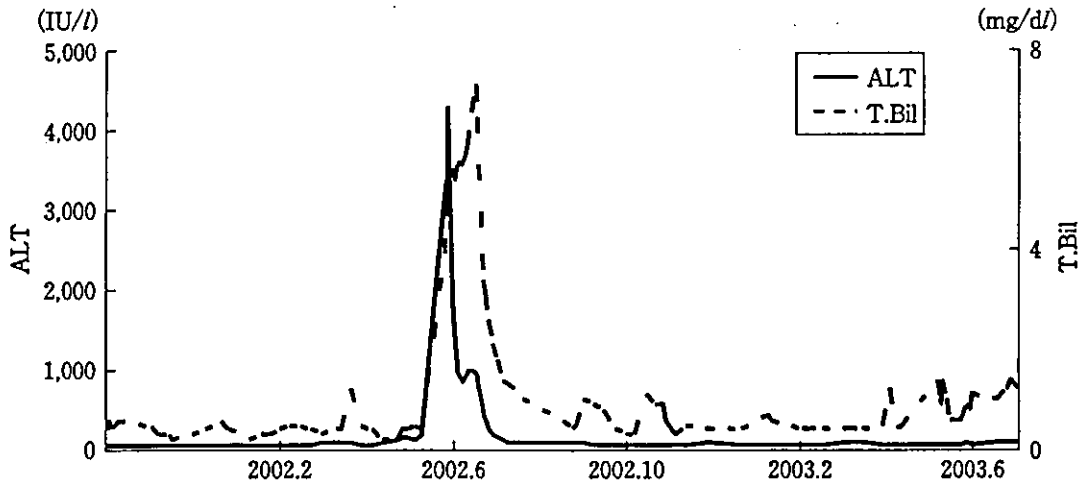


図3 B型慢性肝炎急性増悪に伴うIgM HBc 抗体陽転化例
 B型慢性肝炎にて経過観察中、ALT、T.Bilの急激な上昇を認め、IgM HBc 抗体も陽転。肝機能改善後、速やかにIgM HBc 抗体は消失した。

これに対し、HBV持続感染の場合、IgG HBc 抗体は高値陽性であることが多い。RIA法で測定した場合、200倍希釈した血清で抑制率90.0%以上の高抗体価はHBV持続感染と診断してもまず問題は無い。ASC例、トランスアミナーゼ異常である慢性肝炎例ともに高抗体価を呈する。これは、HBs抗原の陰性化あるいは極めて低力価で検出不能である持続感染例においても診断に有用であるといえる。

3. IgA HBc 抗体

IgA HBc 抗体は、抗IgAモノクローナル抗体などを用いて測定されている。Nomuraらによると、急性肝炎例では全例、ASC例では11%、慢性非活動性肝炎例では41%、慢性活動性肝炎例では94%が陽性であると報告している⁹。つまり、一過性感染、持続感染のいずれにおいても陽性を呈する。

IgA HBc 抗体の変動は一過性感染ではIgM HBc 抗体と類似の変動を示し、約3カ月で陰性化する⁹。また、持続感染ではIgG HBc 抗体と類似の変動を示し、慢性活動性肝炎例では高抗体価が長期間持続する⁹。

このように、一過性感染、持続感染いずれに

おいても高抗体価を呈し、キャリア例では抗体陽性率が低いことから診断には不適であると考えられるが、肝機能異常によく相関し、肝病変の進行に伴い高頻度、高力価に検出され、肝炎が沈静化すると速やかに抗体価は低下するとの報告もある⁹。このことから、IgA HBc 抗体は肝病変の活動性、肝障害度の指標として有用と考えられる。

4. HBc 抗体の最近の話題

以前より、HBs抗原陰性、HBc抗体陽性で血清、肝組織においてHBV-DNA陽性の症例が存在することは知られていた⁷⁻¹⁰。Grohらによると、HBc抗体以外のHBV関連マーカーはいずれも陰性である血清パターンを示す肝障害症例の約10%にHBV-DNAが検出されたとされている¹⁰。その後、2003年にFadelらはHBc抗体陽性379例中155例(40.9%)がHBs抗原陰性でHBc抗体のみ陽性であり、このうちnested PCRでHBV-DNAが陽性であったのは151例中6例(4%)でウイルス量はアンプリコアモニタ法の測定限界以下であったと報告している¹⁰。

更に、我が国でも1998年に肝移植においてもHBs抗原陰性、HBc抗体陽性ドナーからの

移植で、レシピエントに HBV 感染が生じたと報告され¹³⁾、その後も同様の感染が確認されていることから、HBs 抗原陰性、HBc 抗体陽性の血清、肝組織に感染性の残存した HBV 粒子が存在していることが確認されている。現在では、このような肝移植に対し HB ワクチン、免疫グロブリン製剤の使用による予防が試みられている¹⁴⁾。

近年、C 型慢性肝炎を伴った肝癌患者に HBV 関連ウイルス抗体陽性者が存在することが確認され、このような患者における HBV の関与が考えられている。Marusawa らによると、C 型慢性肝炎を伴った肝癌患者の 24.1% が HBV 関連マーカーのうち HBc 抗体のみ陽性であり¹⁵⁾、また Tamori らの報告によると non-B、non-C の肝癌患者 21 例において肝細胞から HBV 関連 transcript が 8 例に検出されており¹⁶⁾、HBV の潜在感染が発癌に関与していると考えられている。当科でも 1988-2003 年に HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性の肝癌症例 42 例において HBV の関与を検討したところ、HBc 抗体の陽性は 21 例 (50%) であり、そのうち血清 HBV-DNA が陽性だったのは 5 例 (12%) と健常者の肝癌発生率と

比較し高率であり、HBV の潜在感染が肝癌発生に関与している可能性もあると考えられた。

このように、HBV-DNA の検出能が高まるに従い、HBc 抗体のみ陽性である患者血清、肝組織より HBV-DNA が検出され、より HBV の肝発癌への関与が強く考えられるようになっていく。

おわりに

HBc 抗体は、IgM、IgG クラスの測定による急性、慢性肝炎の鑑別、IgA クラスの測定による肝障害への相関が示唆されて以降、HBs 抗原陰性、HBc 抗体陽性例からの HBV-DNA の存在とその感染性が示され、non-B、non-C 肝癌患者における HBc 抗体陽性者の存在と発癌における HBV の関与が示唆されている。一方、これらは依然として肝細胞からの HBV-DNA の排除と肝発癌予防に関しては発展途上であることを示唆しているといえる。今後、ラミブジンに続くヌクレオシドアナログの開発、siRNA などの臨床応用による HBV-DNA の肝細胞からの排除と発癌予防に期待したい。

■ 文 献

- 1) Chau KH, et al: Serodiagnosis of recent hepatitis B infection by IgM class anti-HBc. *Hepatology* 3: 142-149, 1983.
- 2) Cohen BJ: The IgM antibody response to the core antigen of hepatitis B virus. *J Med Virol* 3: 141-149, 1978.
- 3) Kryger P, et al: Presence and meaning of anti-HBc IgM as determined by ELISA in patients with acute type B hepatitis and healthy HBs Ag carriers. *Hepatology* 1: 233-237, 1991.
- 4) Nomura H, et al: Immunoglobulin A antibody against hepatitis B core antigen in the acute and persistent infection with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 89: 1109-1113, 1985.
- 5) 菅 充生ほか: IgA 型 HBc 抗体の検出とその臨床的意義. *肝臓* 23: 9-14, 1982.
- 6) 鍵本清一ほか: 小児期の HBV 持続感染における IgA 型 HBc 抗体の意義. *肝臓* 33: 585-590, 1992.
- 7) Brechot C, et al: Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 312: 270-276, 1985.
- 8) Paterlini P, et al: Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancer from patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 323: 80-85, 1990.
- 9) Fong TL, et al: Persistence of hepatitis B viral DNA in the liver after loss of HBsAg in chronic hepatitis B. *Hepatology* 18: 1313-1318, 1993.
- 10) Kuhns M, et al: Serum and liver hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B after sustained loss of surface antigen. *Gastroenterology* 103: 1649-1656, 1992.
- 11) Grob P, et al: Serological pattern 'anti-HBc alone'. *J Med Virol* 62: 450-455, 2000.
- 12) Fadel A, et al: The significance of 'anti-HBc only' in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol*