

Table 1 Patients' characteristics at the start of lamivudine treatment

Total	<i>n</i> = 15
Age median (range)	36 (23–59)
Sex	
Male	11 (73.3%)
Female	4 (26.7%)
Background liver disease	
Chronic hepatitis	13 (86.7%)
Cirrhosis	2 (13.3%)
Knodell's Histologic Activity Index (<i>n</i> = 10)	
Necroinflammatory score	6.9 ± 3.1
Fibrosis score	1.9 ± 1.3
HBeAg positive	14 (93.3%)
ALT	407 ± 439 (IU/L)
HBV-DNA	7.7 ± 1.3 (LGE/mL)

Age is expressed as median (range) and values of Knodell's Histologic Activity Index and ALT and HBV-DNA are expressed as mean ± SD.

Laboratory testing

Serum ALT levels and HBe antigen, anti-HBe and serum HBV-DNA levels were checked biweekly or at least once a month. HBe antigen and anti-HBe levels were determined using radioimmunoassay kits (Abbot, North Chicago, IL, USA), and serum HBV-DNA levels were measured using transcription-mediated amplification (TMA) assay kits (Chugai Diagnostic Science Co., Ltd, Tokyo, Japan).

Sequencing of the polymerase region

DNA was extracted from 200 µL of serum of each patient by using a QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). Five microlitres of DNA template was mixed with 12.5 µL of PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.4 µM of sense and antisense primers, and 5.5 µM nuclease-free water for amplification by PCR. The sense primer for PCR was 5'-TGGCTATCGCTGGATGTGTCT-3' and the antisense primer was 5'-TTGTTCAGTGGTTCTAGGGC-3'. The conditions of polymerase chain reaction (PCR) were as follows: 94 °C for 2 min for the initial incubation, 94 °C for 30 s for denaturing, 57 °C for 30 s for annealing, 72 °C for 1 min for extension for 35 cycles, and a final extension step of 72 °C for 5 min. The DNA product was purified by using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). The PCR products were reacted by using an ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the sequence primer of 5'-CCCTCATGTTGCTGTACAAAACCT-3'. Then sequence reaction products were purified by using a DyeEx Spin Kit (Qiagen) and sequenced by using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems). We checked two motifs of the HBV polymerase region, the leucine-leucine-alanine-glutamine (LLAQ) motif from codon rt179 to codon rt182 in domain B of the polymerase region, and the tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) motif from codon rt203 to codon rt206 in domain C. Emergence of lamivudine-resistant mutations was defined as detection of LLAQ and/or YMDD motif mutations. Sequencing of the polymerase region was performed at intervals of 2 weeks to 3 months partly retrospectively, and serial changes in mutation patterns of the HBV polymerase region were observed. In this study, the first mutation was defined as any mutation in the polymerase region detected for the first time and the second or further mutations were defined when new patterns of mutations emerged after previous mutations.

Statistical analysis

Mann-Whitney's *U*-test was used to compare the periods to the emergence of mutations, and Student's *t*-test was used to compare serum ALT and HBV-DNA levels. All *P*-values were two-sided, and *P* < 0.05 was considered to be statistically significant. All serum HBV-DNA levels less than the limit of detection (<3.7 LGE/mL) were analysed as being 3.7 LGE/mL, and levels above the upper limit of detection (more than 8.8 LGE/mL) were analysed as being 8.8 LGE/mL.

RESULTS

Patients

We observed biochemical and virological changes, including patterns of mutations in the polymerase region, in those 15 lamivudine-resistant patients. Baseline characteristics of the patients at the start of lamivudine treatment are shown in Table 1. The 15 patients included 11 males and four females with a median age of 36 years (range: 23–59). Liver biopsies were performed in 10 patients. In those 10 patients, the necroinflammatory score of hepatitis was 6.9 ± 3.1 (mean ± SD) and the fibrosis score was 1.9 ± 1.3 in the Knodell's Histologic Activity Index [10]. HBe antigen was positive in 14 (93.3%) of the 15 patients. The mean serum ALT level and mean serum HBV-DNA level in the 15 patients were 407 ± 439 IU/L and 7.7 ± 1.3 log genome equivalent (LGE)/mL, respectively. The median follow-up periods were 35 months (range: 27–50 months) from the start of lamivudine treatment and 29 months (range: 4–42 months) after the emergence of lamivudine-resistant mutations.

Period to the emergence of mutations

The median period from the start of lamivudine therapy to emergence of mutations was 16 months (range: 5–34). The

median period was 22 months (range: 12–30 months) in patients with HBV-DNA levels <7.7 LGE/mL (mean serum HBV-DNA level of 15 patients at the start of lamivudine therapy), and it was 15 months (range: 7–18) in patients with higher levels. Patients with higher serum HBV-DNA levels developed mutations more rapidly ($P = 0.0056$).

Patterns of mutation in the HBV polymerase region

Mutation patterns of the polymerase region changed serially (Table 2). The median number of changes in mutation pattern during the follow-up period was 2 (range: 1–4). In nine (60.0%) of the 15 patients, the first mutation pattern was wild type in domain B and YIDD (rtM204I) in domain C. The first mutation patterns of the LLAQ motif in domain B were LMAQ (rtL180M) in five patients (83.3%) and LLTQ (rtA181T) in one patient (16.7%), and those of the YMDD motif in domain C were YIDD (rtM204I) in 10 patients (76.9%) and YVDD (rtM204V) in three patients (23.1%). Only four patients (26.7%) showed liver dysfunction at the time of the appearance of the first mutations. In 10 patients, further mutations appeared in the polymerase region 7 months (range: 1–27 months) after the appearance of the first mutations, and exacerbation of liver dysfunction occurred in eight (80.0%) of the 10 patients. Second or further mutations occurred in domain B and/or domain C, and each mutation caused exacerbation of liver dysfunction. In most cases, mutation with substitution of only rtM204I appeared at first, and mutation with rtL180M/M204I and then mutation with

rtL180M/M204V subsequently emerged. Further mutations of the polymerase region caused worse clinical outcomes (Table 3).

Serum ALT and HBV-DNA levels

Exacerbation of liver dysfunction was observed frequently. Serum ALT levels remained within the normal range in only one patient (6.7%), and they were lower than 100 IU/L in five patients (33.3%), 100–500 IU/L in four patients (26.7%), and exceeded 500 IU/L in five patients (33.3%). The median period from the emergence of mutations to the start of exacerbation of liver dysfunction was 4 months (range: 2–10), and the peak serum ALT level was 367.8 ± 385.8 IU/L (mean \pm SD). The peak serum ALT level after the appearance of the first mutations was 191.8 ± 281.6 IU/L and that after the appearance of the second mutations was 570.6 ± 390.3 IU/L, exacerbation of liver dysfunction being significantly more

Table 3 Patterns of mutations in the polymerase region and exacerbation of liver dysfunction

Domain C: wild	→	YIDD	→	YIDD	→	YVDD
Domain B: wild		wild		LMAQ		LMAQ
<i>n</i>		12		3		10
Exacerbation of liver dysfunction (ALT >200 IU/L)		4 (33.3%)		2 (66.7%)		7 (70.0%)

case	First mutation	Second mutation	Third mutation	Fourth mutation	Follow-up period (months)
1	LLAQ YIDD*	LMAQ YVDD*			42
2	LLTQ YMDD	LMTQ YVDD	LMAQ YVDD		36
3	LLAQ YIDD				35
4	LLAQ YIDD	LMAQ YIDD*	LLAQ YIDD		33
5	LLAQ YIDD	LMAQ YVDD*	LLAQ YIDD		32
6	LLAQ YIDD*	LMAQ YIDD*	LMAQ YMDD†	LMAQ YVDD*	31
7	LMAQ YVDD				29
8	LLAQ YIDD†	LLAQ YMDD	VLAQ YMDD		26
9	LMAQ YIDD	LMAQ YVDD†			24
10	LLAQ YIDD				19
11	LLAQ YIDD				19
12	LLAQ YIDD	LMAQ YVDD*			17
13	LMAQ YVDD	LLAQ YIDD*			13
14	LMAQ YVDD†				11
15	LMAQ YMDD	LMAQ YVDD†			8

Liver dysfunction: ALT >500 IU/L; †Exacerbation of: ALT >200 IU/L. Values with '' and '†' mean that the mutations were accompanied with exacerbation of liver dysfunction. Values with '†' mean ALT levels of 200–500 IU/L and '*' mean more than 500 IU/L.

Table 2 Mutation patterns of the HBV polymerase region

severe after the appearance of second mutations ($P = 0.0096$).

The mean serum HBV-DNA level was 5.00 ± 0.39 LGE/mL (mean \pm SE) at the first detection of mutations. The peak value of serum HBV-DNA levels was 6.27 ± 0.59 LGE/mL after the appearance of the first mutations, and it increased further after the appearance of the second mutations, peaking at 7.18 ± 0.54 LGE/mL (Fig. 1).

Clinical course

The clinical courses of 11 patients who did not use other antiviral drugs such as interferon (IFN) or new nucleoside analogues after the emergence of mutations were observed. The median follow-up period was 30 months (range: 8–42). Serum ALT levels remained within the normal range in only one patient and normalized in five patients after temporary worsening. In two patients, seroconversion of HBe antigen to anti-HBe occurred after temporary worsening of liver function, and serum HBV-DNA levels were decreased to undetectable levels. However, the exacerbation of liver dysfunction continued in five patients.

Four patients with severe breakthrough hepatitis were treated with IFN, and the median follow-up period for those patients was 6.5 months (range: 3–14). Six million units of IFN-beta was administered everyday for the first 4 weeks and thereafter three times a week for 20 weeks. Serum ALT levels were normalized in three patients, and serum HBV-DNA levels decreased to undetectable levels in two patients. One of the three patients who had HBe antigen before IFN treatment achieved seroconversion.

DISCUSSION

Lamivudine is a nucleoside analogue that suppresses replication of HBV by inhibiting the viral RNA-dependent DNA

polymerase. It has been reported that resistance to lamivudine often develops after 6 months of treatment [11,12]. Mutations occur in the polymerase region of HBV-DNA, and HBV becomes resistant to lamivudine. There have been many reports on mutations in the polymerase region and viral resistance, most of them focusing on the YMDD motif from codon rt203 of domain C and the LLAQ motif from codon rt179 of domain B of the HBV polymerase region [13–16]. In this study, we observed changes in serum ALT and HBV-DNA levels, HBe antigen, and anti-HBe in relation to serial changes in mutation patterns of the HBV polymerase region for a median period of 29 months after the emergence of mutations.

Serum HBV-DNA levels increased as soon as the first mutation occurred in the polymerase region, indicating that monitoring of serum HBV-DNA levels is important and that serum HBV-DNA level can be used as a predictive factor for the appearance of mutations as reported previously [17]. On the contrary, increases in serum ALT levels were delayed and ALT level peaked at a median of 4 months after the emergence of mutations. It has been reported that biochemical breakthrough phenomena are usually observed several months after the first detection of strains resistant to lamivudine [18,19]. This time lag is thought to be due to the duration until the occurrence of second or further mutations in the polymerase region.

In our series, rtL179V, rtL180M and rtA181T mutations were observed in domain B, and rtM204I and rtM204V mutations were observed in domain C. These mutations are almost the same as those reported previously [20,21]. In most cases, a mutation with only rtM204I appeared at first, and rtL180M/M204I mutations and then rtL180M/M204V mutations appeared subsequently in the polymerase region. Exacerbation of liver dysfunction at the time of appearance of the first HBV mutations occurred in only 26.7% of our patients. However, when further mutations appeared in 10 patients (66.7%) a median of 7 months after the appearance

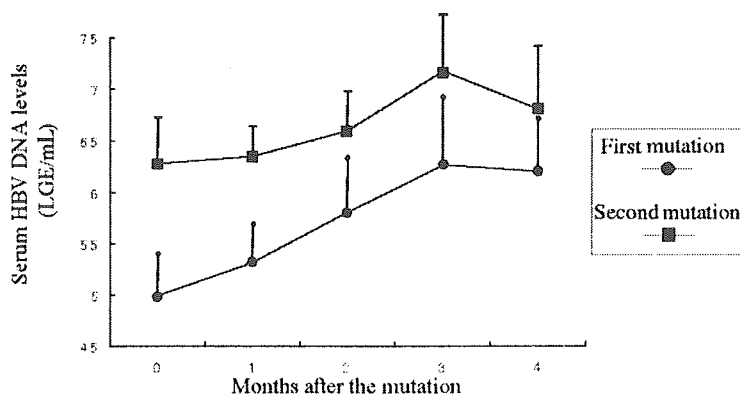


Fig. 1 Changes of serum HBV-DNA levels after the emergence of mutations. The changes of serum HBV DNA levels after the first mutations to the second were shown by closed circles and after the second mutations to the third by closed squares. Serum HBV-DNA levels were measured by TMA assay. Vertical bars mean standard errors.

No. evaluated

First mutation	15	15	14	12	11
Second mutation	10	10	9	8	7

of first mutations, worsening of liver impairment occurred in 80.0% of the patients. Further mutations resulted in worsening of clinical courses. Although mutations of the YMDD motif in domain C have stronger effects on resistance to lamivudine than those of the LLAQ motif in domain B, it has been reported that single C-domain mutants have markedly decreased abilities of replication [22–24] and that B-domain mutation rtL180M rescues the defective replication competence of domain C mutants [25,26]. In another study, the effect of the addition of rtL180M mutation was examined by using a three-dimensional homology model of the catalytic core of HBV, and it was also shown that the rtM204V mutant is more resistant to lamivudine than the rtM204I mutant and that rtL180M substitution makes each mutant more resistant to lamivudine *in vitro* [27]. These results explain our finding that exacerbation of liver dysfunction occurred more frequently in cases with further mutations because rtM204V and/or rtL180M mutations were detected more frequently in our series when further mutations occurred in the polymerase region. Although small amounts of HBV mutants could not be detected because of the detection limit of direct sequencing, our results showed the significant correlation between accumulation of mutations and exacerbation of liver dysfunction. Direct sequencing was a useful method to detect mutations in the polymerase region clinically. But it is more effective to detect especially second or further mutations by more sensitive methods such as peptide nucleic acid mediated PCR clamping [28,29] because these mutations frequently caused severe liver dysfunction.

Exacerbation of liver dysfunction occurred without increase in serum HBV-DNA level after the emergence of mutations in some of our patients, indicating that some other factors may also lead to exacerbation of liver dysfunction. The polymerase gene of HBV overlaps with the surface antigen gene, and mutations in the polymerase region result in a change in the relevant amino acid of the surface antigen. It is possible that changes in the amino acid of the surface antigen may induce exacerbation of liver dysfunction.

In 11 patients, antiviral drugs other than lamivudine were not used. Fatal cases after discontinuation of lamivudine treatment have been reported [30], and it has been reported that lamivudine still suppresses the replication of wild-type HBV-DNA after the emergence of mutations [11,31]. We therefore continued lamivudine treatment after the appearance of lamivudine-resistant mutations. Serum ALT levels were normalized in six patients, and two of those six patients achieved seroconversion after temporary worsening. Thus, good clinical courses following temporary worsening were observed in some cases, indicating that observation without using other antiviral drugs is one of choices for patients with breakthrough hepatitis. However, exacerbation of liver dysfunction continued in five of our patients, and HBe antigen reappeared in two of them who had anti-HBe before the

emergence of mutations. It has been reported that breakthrough hepatitis can be fatal in patients with advanced liver disease [32]. Patients with continuous liver dysfunction after emergence of mutations and patients with advanced liver disease should therefore be treated with new antiviral drugs such as adefovir dipivoxil.

Although the follow-up period was short, a good clinical response to IFN in patients with breakthrough hepatitis was obtained. Suzuki *et al.* [33] reported that IFN therapy was effective for lamivudine-resistant HBV mutants and that it may induce virological and clinical improvement accompanied by seroconversion. Although IFN has some side-effects and it is difficult to use for cirrhotic patients, it is one of the treatment options for breakthrough hepatitis. However, it has also been reported that serum HBV-DNA levels increased again and that hepatitis recurred after reducing the dose of IFN [33]. Indeed, hepatitis recurred after cessation of IFN treatment in one of our patients. Care should therefore be taken in reducing the dose of IFN or terminating IFN treatment.

CONCLUSIONS

Exacerbation of liver dysfunction was observed frequently after the emergence of mutations in the HBV polymerase region. In most cases, the mutation pattern was a substitution of only rtM204I at first, and rtL180M/M204I mutations and then rtL180M/M204V mutations subsequently appeared. Exacerbation of liver dysfunction became more severe as more mutations occurred in the polymerase region. These results suggest that monitoring the patterns of mutation of the polymerase gene is useful when using lamivudine for treatment of HBV.

In some cases, serum ALT levels were normalized and seroconversion was achieved after temporary worsening of liver impairment, indicating that treatment is not necessarily required for all cases after the appearance of lamivudine-resistant mutations.

REFERENCES

- 1 Lai CL, Chien RN, Leung NW *et al.* A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61–68.
- 2 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL *et al.* Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256–1263.
- 3 Leung NW, Lai CL, Chang TT *et al.* on behalf of the Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527–1532.
- 4 Da Silva LC, Pinho JR, Sitnik R, Da Fonseca LE, Carrilho FJ. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2001; 36: 476–485.

- 5 Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G *et al.* Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999; 29: 889–896.
- 6 Lau DT, Khokhar MF, Doo E *et al.* Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828–834.
- 7 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ *et al.* Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 800–807.
- 8 Marcellin P, Chang TT, Lim SG *et al.* Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808–816.
- 9 Levine S, Hernandez D, Yamanaka G *et al.* Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2525–2532.
- 10 Knodell RG, Ishak KG, Black WC *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431–435.
- 11 Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M *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* 1998; 27: 1711–1716.
- 12 Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 1997; 26: 1393–1395.
- 13 Ling R, Mutimer D, Ahmed M *et al.* Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711–713.
- 14 Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714–717.
- 15 Gutfreund KS, Williams M, George R *et al.* Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000; 33: 469–475.
- 16 Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y *et al.* Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999; 103: 1635–1640.
- 17 Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, Hadziyannis SJ. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 2002; 36: 219–226.
- 18 Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaloannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 847–851.
- 19 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567–572.
- 20 Papatheodoridis GV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1618–1628. Review.
- 21 Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm SW, Osterhaus AD. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998; 177: 1382–1385.
- 22 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW *et al.* Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670–1677.
- 23 Fu L, Cheng YC. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1567–1572.
- 24 Ling R, Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J Gen Virol* 1999; 80: 601–606.
- 25 Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 31: 1318–1326.
- 26 Ono SK, Kato N, Shiratori Y *et al.* The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001; 107: 449–455.
- 27 Das K, Xiong X, Yang H *et al.* Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and entecavir. *J Virology* 2001; 75: 4771–4779.
- 28 Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5332–5336.
- 29 Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y *et al.* Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 259–265.
- 30 Lim SG, Wai CT, Rajnakova A, Kajiji T, Guan R. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut* 2002; 51: 597–599.
- 31 Lok AS, McMahon BJ. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225–1241.
- 32 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 366–369.
- 33 Suzuki F, Tsubota A, Akuta N *et al.* Interferon for treatment of breakthrough infection with hepatitis B virus mutants developing during long-term lamivudine therapy. *J Gastroenterol* 2002; 37: 922–927.

症例報告

HIV・HCV 重複感染の治療経過中、急速に致死的肝不全を来した
血友病 A の 1 例

曾我部 進¹⁾, 橋野 聡¹⁾, 小野澤真弘¹⁾
 守田 玲菜¹⁾, 太宰 昌佳¹⁾, 夏井坂光輝¹⁾
 小野 雄司¹⁾, 泉山 康¹⁾, 中馬 誠¹⁾
 近藤 健¹⁾, 髭 修平¹⁾, 大野 稔子¹⁾
 渡部 恵子¹⁾, 石津 明洋²⁾, 浅香 正博¹⁾

¹⁾ 北海道大学病院第三内科

²⁾ 北海道大学医学部第一病理教室

目的: 本邦では血液製剤由来の HIV 患者のほとんどが HCV にも重複感染しているが、HAART と抗 HCV 薬のリバビリン併用にて時に重篤な乳酸アシドーシス (LA) が生じることがある。今回、HAART 施行中にリバビリンを併用した経過中に LA を契機に致死的肝不全を来した 1 例を経験したので、本症例の剖検所見に文献的考察を加えて報告する。

症例: 症例は 35 歳男性。血友病 A に対し使用した血液製剤で HIV・HCV に感染した。1990 年より抗 HIV 療法を開始し、薬剤変更を経て 2003 年 1 月より d4T+ddI+PI (RTV+LPV) で治療していた。同年 9 月より HCV に対し IFN α +リバビリンにて加療開始したが、10 月に LA を発症した。投薬中止しメイロン投与等対症療法を施行したが、肝不全が進行し、11 月に永眠された。

結論: 本症例では LA 発症を契機に急速な致死的肝不全を来したわけであるが、その原因としては、① LA それ自体、② IFN・リバビリン併用療法の副作用、③ HCV による代償性肝硬変から非代償性肝硬変への急速な進展、の 3 点が考えられた。

キーワード: HIV 感染症, HCV 感染症, リバビリン, 乳酸アシドーシス, ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI)

日本エイズ学会誌 7 : 37-42, 2005

緒言

HIV 感染患者では、HCV に重複感染している例が多く、特に血友病患者においては、本邦で実に 98.4% にも上る¹⁾。Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) によって HIV 感染者の AIDS 発症が抑制され、生命予後が延長するのに伴い、HCV 感染症が生命予後規定因子として重要になってきた。一方、HAART のヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の副作用の一つとして乳酸アシドーシス (LA) があるが、抗 HCV 治療としてリバビリンを併用したのちに LA が生じたとの報告があり、特に NRTI の中でもジダノシン (ddI), サニルブジン (d4T) との併用で頻度が高いとされている^{2,3)}。今回我々は HIV・HCV の重複感染に対し、HAART 施行中にリバビリンを

投与したのちに LA を契機に致死的肝不全を来した血友病 A の 1 例を経験したので、その臨床経過に剖検結果と文献的考察を加えて報告する。

症例

症例: 35 歳, 男性

主訴: 全身倦怠感, 嘔気, 腹部不快感

現病歴: 小児期より血友病 A に対し凝固因子補充療法施行され、中学生時に非 A 非 B 型肝炎との診断を受けたが、肝障害は軽度で、以後特別な治療は施行されなかった。その後 18 歳時に HIV 感染が判明した。1990 年に CD4 陽性リンパ球数の 50/ μ l までの低下と同時に帯状疱疹を発症し、ジドブジン (AZT)+ddI の投与を開始した。その後は CD4 陽性リンパ球数、臨床症状ともに安定していたが、服薬コンプライアンスの問題から、2001 年に AZT+ラミブジン (3TC)+ネルフィナビル (NFV) に変更した。この時点までは、GOT, GPT は 20~40 IU/l 程度で明らかな肝障害の進行は認められなかった。2002 年に CD4 陽性リンパ

著者連絡先: 橋野 聡 (〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学病院第三内科)
 Fax : 011-706-7867

2004 年 7 月 23 日受付; 2004 年 12 月 15 日受理

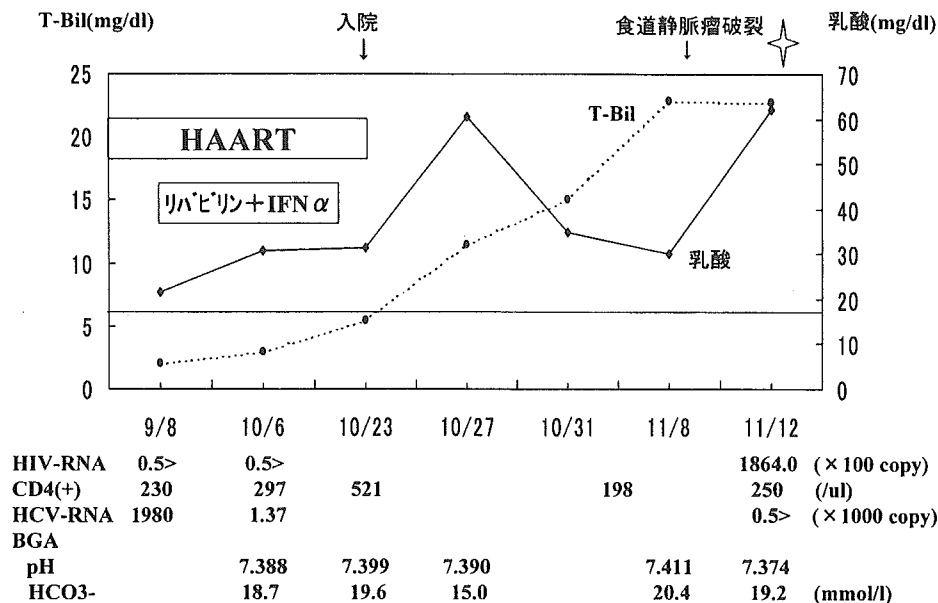


図 1 臨床経過

球数が 65/μl, HIV-RNA 量 30,000 copy/ml となり, AZT, 3TC に高度耐性, NFV に軽度耐性が生じていたため, 2003 年 1 月に d4T+ddI+ロピナビル/リトナビル (LPV/RTV) に変更した。この時点でも GOT, GPT は 20~50 IU/l 程度であったが, 胆道系酵素 (γ-GTP 76~150 IU/l), ビリルビンの軽度上昇 (T-Bil 1.1~1.5 mg/dl), ChE の軽度低下 (170~229 IU/l) がみられていた。

肝臓に関しては, 2003 年 9 月の時点で, CT 上肝脾腫を認め, Child Pugh score では, score7, gradeB (alb 3.0g/dl : 2点, T-Bil 1.5mg/dl : 1点, 脳症・腹水なし各 1点, %PT 63.8% : 2点), ICGr15 32.8% と軽度の肝障害を認めたが, 完成された肝硬変ではないと診断した。また, 肝癌・日和見感染もなく, CD4 陽性リンパ球数も 200/μl 以上あり (9 月 8 日 : 230/μl), リバビリン+インターフェロン α (IFNα) 療法の開始基準を満たしていたため, 患者から同意を取得したのち, HCV に対し, リバビリン+IFNα 投与開始した⁴⁾。投与スケジュールは, リバビリン 400mg/day を経口で 24 週間, IFNα600 MIU/day を皮下注で, 最初の 2 週間が 6 days/week で後半 22 週間が 3 days/week の計 24 週間投与する予定であったが, 投与前は 10 万/μl 前後であった血小板数が 9 月 13 日には 4.8 万/μl と低下したため, リバビリンはそのまま継続したが, IFNα を 3 days/week に減量した。

10 月中旬より全身倦怠感・嘔気が生じ, LA を認めた (血中乳酸 30.8 mg/dl)。その時点では HCV に対する治療よりも HIV に対する治療が優先すると考え, まず 10 月 15

日にリバビリンと IFNα を中止し, 外来にて経過観察されていたが, 症状悪化がみられたため 10 月 23 日当科入院となった。

入院時身体所見 : 意識清明。栄養状態不良。結膜貧血 (-), 黄疸 (+)。胸部異常無し。腹部やや膨隆で波動 (+), 肝は右肋骨弓下に 1 横指触れるが, 脾は触れず。下肢浮腫なし。皮膚はやや乾燥し, 右膝関節には軽度拘縮を認め, 右下肢に軽度の知覚低下を認めた。

検査所見 (表 1) : 入院時の検査所見では, 直接型優位のビリルビン, トランスアミラーゼの上昇, アルブミンの低下を認め, 乳酸値は 31.2 mg/ml と高値であった。動脈血ガス分析では pH は 7.399 であったが, pO₂ 108.3 mmHg と上昇, pCO₂ 32.3 mmHg, HCO₃⁻ 19.6 mmol/l, BE -3.9 mmol/l と低下を認め, 代謝性アシドーシスと呼吸性代償の所見がみられた。入院直前の検査では, HIV-1 RNA 量は 50> copy/ml, HCV RNA 量は 1,370 copy/ml (9 月 8 日のリバビリン開始前は 1,980,000 copy/ml) であり, 入院時の CD4 陽性リンパ球数は 521/μl と, HIV に関しては良好なコントロールが得られ, HCV に関しても RNA 量の減少が見られていた。

画像所見 : 腹部超音波検査・CT では, 多量の腹水貯留と肝萎縮, 脾腫を認めたが, 脂肪肝・門脈塞栓などの所見は認められなかった。

入院後経過 : 入院時, 有症候性の LA がみられており, 原因としては NRTI とリバビリンが考えられた。そのためリバビリンは入院 8 日前より中止した。また, それに伴い,

表 1 入院時臨床検査所見

Hematological data		Others		
WBC	7300/ μ l	BUN	18 mg/dl	urinalysis
RBC	359×10^4 / μ l	S-Cre	1.0 mg/dl	OB (-)
Hb	13.1 g/dl	UA	6.3 mg/dl	sugar (+)
Ht	38.6%	Na	131 mEq/l	protein (+)
Plt	12.1×10^4 / μ l	K	4.2 mEq/l	ketone body (-)
		Cl	99 mEq/l	
TP	6.5 g/dl	Ca	7.5 mg/dl	Stool
Alb	2.2 g/dl	CRP	0.93 mg/dl	B (+)
T-Bil	5.4 mg/dl			O (+)
GOT	111 IU/l	HCV-Ab	(+)	L (-)
GPT	68 IU/l	HCV-RNA	1.37 k copy	
LDH	477 IU/l	(2003.9月治療前: 1980 k copy)		BGA
ALP	589 IU/l	HCV-genotype	2b	pH 7.399
ChE	48 IU/l	HIV-1 RNA		pO ₂ 108.3 mmHg
		CD4	521/ μ l	pCO ₂ 32.3 mmHg
		CD4/8	0.91	HCO ₃ ⁻ 19.6 mmol/l
		Lactic acid	31.2 mg/dl	BE -3.9 mmol/l
		(正常値 3.0~17.0)		

IFN α についても単剤で肝障害の副作用が20%程度で生じるとされていることと、LAの原因とは考えにくかったものの全身状態を考えるとその時点ではHCVに対する治療は一旦中止し、全身状態の改善を最優先とすることとしたため、IFN α についてもリバビリンと同時に中止とした。また、リバビリン+IFN α 中止後も症状改善が認められなかったため、入院日にはHAART薬剤(ddI+d4TとLPV/RTV)も中止した。アシドーシスに対して7%炭酸水素ナトリウム、肝機能障害に対して肝庇護剤、経口摂取低下に対し末梢静脈栄養を開始した。入院時より低アルブミン血症があり、入院後も腹水の増加と浮腫認めため、第3病日より3日間にわたりアルブミン製剤の投与を行った。第5病日には右鎖骨下より中心静脈カテーテルを挿入し、肝障害用アミノ酸輸液を含めた中心静脈栄養を開始した。総ビリルビン値の上昇と血清蛋白の低下が進行し、アルブミン製剤・新鮮凍結血漿の投与、肝庇護剤投与を継続したが、第18病日に総ビリルビンは22.8 mg/dl、第20病日に血清総蛋白は5.4 g/dlに達し、腹水増加を認めた。一方、動脈血ガス分析ではpHは7.400 \pm 0.1、HCO₃⁻は20 \pm 5 mmol/lの範囲で推移し、極端なアシドーシス進行はみられなかった。血中乳酸値は第5病日に93.8 mg/dl、第20病日に62.2 mg/dlと極端な高値を示したが、入院中は概ね30~60 mg/dlの間で推移していた。

2003年9月に施行した上部消化管内視鏡検査ではLi

F0-1 Cb RC (-)の食道静脈瘤が確認されていたが、第18病日に大量吐血がみられ、緊急上部内視鏡施行したところ、食道静脈瘤(Li F2 Cb RC(++))より出血があり、内視鏡的静脈瘤結紮術(EVL)を施行した。胃内には出血源は無く、十二指腸には潰瘍からの出血と、露出血管(出血しておらず)が多数みられ、それらに対してもEVLを施行した。

翌第19病日にEVL施行後の止血確認目的で再び上部消化管内視鏡施行したところ先日EVL施行した部位に関しては止血されていたが、十二指腸の肛側に凝血塊を認められ、同部位からの出血が疑われた。

その後、PPF・赤血球輸血・ドパミン投与を行ったが、全身状態の改善は得られず、循環不全により第21病日未明に永眠された。第21病日のHIV-1 RNA定量は186,400 copy/ml、HCV RNA定量では<500 copy/mlと、HAART中止に伴うHIV-RNA量の増加は見られたが、抗HCV療法に伴うHCV-RNA量の減少は継続していた。

家族の承諾のもとに施行された剖検では、6,500 mlの腹水と、左右約200 mlの胸水が認められた。肝臓重量は1,530 gで、表面は凹凸不整、辺縁は鈍となっていたが、肉眼的な脂肪肝は認められず、肝細胞癌も認められなかった。食道には静脈瘤があり、脾腫と副脾も認めた。肝の病理組織学的所見としては、広範な肝細胞の壊死・脱落像と肝線維化を認め、肝硬変の所見であった。門脈域へのリン

パ球を中心とした炎症細胞浸潤も認められたが、肝小葉内への炎症細胞の浸潤は認められなかった。また、Sudan III 染色において肝細胞におけるびまん性の小滴性脂肪沈着が確認され、LA による肝障害の所見として矛盾しなかった。その他には、肝内胆管の胆汁塞栓が認められた。

脾は炎症細胞の浸潤と脾細胞の壊死に加え脾石・出血を認め、脾炎の所見であった。

腎は表面凹凸が著明で、皮質萎縮性の変化が生じ、組織学的には巣状糸球体硬化の所見が見られ、HIV 感染者でよく見られる AIDS 関連腎症の所見であった。

以上、病理所見からは、肝小葉内へのリンパ球の浸潤が殆ど認められなかったことから、HCV による肝炎・肝硬変の急激な増悪は、肝不全進行の原因としては可能性が低いと考えられた。一方、LA と胆汁うっ滞型の薬剤性肝障害は、病理所見には矛盾しないと考えられた。脾に関しては、LA で脾炎を生じることがあるとされており、LA の所見として矛盾は無かった。腎は巣状糸球体硬化の所見が強く、腎機能の低下を介しリバビリンなどの腎排泄型薬剤の濃度上昇を引き起こしていた可能性も考えられた。

考 察

1990 年代前半より、HIV に対して HAART を施行した例において、LA が報告されるようになり、その原因薬剤としては NRTI の ddI, d4T が多く、頻度としては 0.1~0.2% といわれている^{5,6)}。その機序としては、NRTI のミトコンドリア DNA polymerase γ に対する高い親和性によるミトコンドリア障害が考えられている⁷⁾。臨床的には、腹痛、嘔気、嘔吐、呼吸困難、体重減少、肝腫大などの症状を呈し、ミトコンドリア障害による細胞の好氣的解糖系の障害に伴う乳酸の増加とアシドーシスがみられ、最終的には肝不全、脾炎、呼吸不全、筋壊死などを生じ、死亡するケースもまれではない（死亡率は 48% であったとする報告がある^{5,8)}。HAART 施行中の LA 発症については現在までに多数の報告がある。危険因子については、前述の ddI, d4T の他には、女性の相対危険率が 2.5 倍であるという報告もあるが、その他の危険因子については明らかになっていない⁸⁾。

LA の治療法としては、原因薬剤の速やかな中止と、炭酸水素ナトリウム投与によるアシドーシスの補正、サイアミン・L-アセチルカルチニン投与によるミトコンドリア毒性の軽減などがあるが、いずれにしても対症療法であり、50% 程度という高い死亡率を考えると早期診断が最も重要である。しかし、HAART 施行中の患者においては 20% 程度の症例で無症候性高乳酸血症をきたすことが知られており、臨床症状と動脈血ガス分析によるアシドーシ

スの有無、そして LA で特徴的とされる肝脂肪変性を肝生検によって確認することが重要とされているが、肝生検に関しては、HIV 感染患者に血友病患者が多く、LA 発症時点で血小板数、凝固能などの数値が悪化していることも考えられ、本症例のように施行が困難な例も多いと推測される。

HIV 感染患者では HCV にも重複感染している例が多く、HAART により AIDS の発症が抑制され、HIV 感染者の生命予後が延長するのに伴い、HCV 感染症が生命予後規定因子として重要になってきた。重複感染例においては、HCV-RNA 量高値・HCV envelope 変異増加による IFN 耐性の増強・治療の副作用が強く出やすいなどの理由により、治療奏率が低い、肝硬変への進展が早く死亡率が高い、といった問題点がある⁹⁾。治療としては本邦では数年前より IFN とリバビリンの併用療法が施行されており、奏率は 20~30% (HIV 陽性例) で、HCV 単独感染例に比較して明らかに低い⁹⁾。

2001 年に、ddI と d4T を含む HAART 施行中の 15 例の患者の HCV に対し IFN とリバビリンを投与したところ、2 例に LA を発症したとする報告があり、以降、現在までに 36 例以上の報告がある^{3,9)}。その機序としては、リバビリンが 5'-ヌクレオチダーゼによる ddIno から ddIMP への変換過程におけるリン酸化に関与する IMP レベルの上昇を引き起こし、その結果、活性体への変換を促進することによりミトコンドリア毒性を増強するためと考えられている。IFN に関しては、LA 発症に何らかの影響を与えているとする報告は見られない¹⁰⁾。リバビリン併用投与での LA 発生率は、HAART 単独施行時に比し高率の 1.9% であるという報告もある²⁾。HAART に IFN とリバビリンを併用した際に生じる LA に関しても、HAART 単独施行時と同様に、原因薬剤の速やかな中止と対症療法しか現時点では有効な治療法はない。HAART と IFN+リバビリン併用療法施行時の LA の死亡率に関しては、25% という値が報告されており、前述の HAART 単独施行時の LA における死亡率 (50% 程度) と比し一見低いように感じるが、HAART と IFN+リバビリン併用療法施行時の LA 死亡率に関する報告には LA まで至らない高乳酸血症も死亡率の母数に含まれたものであり、その点を考慮する必要がある¹¹⁾。死亡率について直接比較した研究は現在のところないが、一般的には死亡率は HAART 単独施行時に比して同等かそれ以上であると考えべきである⁵⁾。

本症例は、これまで長期の良好な HIV のコントロールが困難な状況であったが、2003 年 9 月の時点で HIV-RNA 量のコントロールと CD4 陽性リンパ球数の維持が得られていたため、進行しつつあった慢性 C 型肝炎に対し 2003 年 9 月より IFN α とリバビリンにより治療を開始した。治

療開始時点では完成された肝硬変ではないと診断し、また、上部内視鏡検査では食道静脈瘤を認めたもののRC(-)であった。その後、IFNとリバビリン併用療法開始後1か月で前述の臨床症状と肝機能の急激な悪化を認め、結局は数か月足らずでの食道静脈瘤の悪化・破裂による循環不全と肝不全により死亡した。その原因としては、①HAARTとリバビリン併用によるLA、②プロテアーゼ阻害薬であるLPV/RTV、もしくはNRTIによる直接的な薬剤性肝障害、③慢性C型肝炎の急激な悪化、が考えられた。臨床症状はIFNとリバビリン投与後から生じたものであり、検査所見はLAとして矛盾しなかった。また、病理所見からは、LAに特徴的とされる肝の脂肪変性の所見が認められた^{3,5,9)}。一方、薬剤性肝障害に特徴的な好酸球の肝小葉への浸潤などの所見は認められなかった。また、慢性C型肝炎における肝小葉へのリンパ球浸潤は認められず、第21病日にはHCV-RNA量が検出限界以下になっていることもあり、肝不全悪化の直接的原因としては否定であった。以上より、本症例ではNRTIとリバビリンの併用によりLAが生じ、肝障害悪化がみられた可能性が高いと考えられたが、ミトコンドリア障害を直接的には証明できず、薬剤性肝障害を含めた他の原因を完全には否定できなかった。

結 語

HIV・HCV重複感染例においてHAART+IFN+リバビリン併用療法における治療経過中にLAを契機とした致死的肝障害を来した血友病Aの1例を経験し、その原因としては、HAARTとリバビリンの併用療法が最も考えられた。

文 献

- 1) 安岡彰 : C型肝炎合併症例での治療. 総合臨牀 50 : 2747-2752, 2001.
- 2) Perronne C, Carrat F, Banisadr F, Morand P, Lunel F, Rosental E, *et al* : ANRS HCO2-RIBAVIC : a randomized controlled trial of pegylated-interferon alfa-2b plus ribavirin vs interferon alfa-2b plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C in HIV co-infected patients. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, September, 2002, abstract H-1083.
- 3) Lafeuillade A, Hittinger G, Chadapaud S : Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. *Lancet* 2001, 357 : 280-281, 2001.
- 4) 厚生労働省エイズ治療薬研究班 : HCV+HIVあるいはHCV併発血友病患者に対するインターフェロン α -2bとリバビリン併用投与による治療研究. 2003.
- 5) Bonnet F, Bonarek M, Abridj A, Mercie P, Dupon M, Gemain MC, Malvy D, Bernard N, Pellegrin JL, Morlat P, Beylot J : Severe lactic acidosis in HIV-infected patients treated with nucleosidic reverse transcriptase analogs : a report of 9 cases. *Rev Med Interne* 24 : 6-11, 2003.
- 6) Fortgang IS, Belitsos PC, Chaisson RE, Moore RD : Hepatomegaly and steatosis in HIV-infected patients receiving nucleoside analog antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 90 : 1433-1436, 1995.
- 7) Cote HC, Brumme ZL, Craib KJ, Alexander CS, Wynhoven B, Ting L, Wong H, Harris M, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV, Montaner JS : Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 14 ; 346 (11) : 811-820, 2002.
- 8) Arenas-Pinto A, Grant AD, Edwards S, Weller IV : Lactic acidosis in HIV infected patients : a systematic review of published cases. *Sex Transm Infect* 79 (4) : 340-343, 2003.
- 9) Brau N : Update on chronic hepatitis C in HIV/HCV-coinfected patients : viral interactions and therapy. *AIDS* 17 : 2279-2290, 2003.
- 10) Balzarini J, Lee CK, Herdewijn P, De Clercq E : Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2', 3'-dideoxyinosine against human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 32 : 21509-21514, 1991.
- 11) Conference Reports for NATAP. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections Boston, Mass, Feb 10-14, 2003.

Fatal Hepatic Failure in a Hemophilia A Patient with HIV/HCV Co-infection

Susumu SOGABE¹⁾, Satoshi HASHINO¹⁾, Masahiro ONOZAWA¹⁾, Rena MORITA¹⁾,
Masayoshi DAZAI¹⁾, Mitsuteru NATSUISAKA¹⁾, Yuji ONO¹⁾,
Koh IZUMIYAMA¹⁾, Makoto CHUMA¹⁾, Takeshi KONDO¹⁾, Shuhei HIGE¹⁾,
Toshiko OHNO¹⁾, Keiko WATABE¹⁾, Akihiro ISHIZU²⁾ and Masahiro ASAKA¹⁾

¹⁾ Third Department of Internal Medicine, Hokkaido University Hospital

²⁾ First Department of Pathology, Hokkaido University, School of Medicine

Objective : In Japan, most people who have infection with HIV also have infection with HCV caused by administration of coagulation factor products. Fatal lactic acidosis rarely occurs in patients with HIV/HCV co-infection while using both HAART drugs and ribavirin. We experienced a patient with fatal hepatic failure following lactic acidosis after the use of both HAART drugs and ribavirin. We report this rare case with discussion of the results of postmortem examination.

Case Report : A 35-year-old man infected with HIV and HCV after administration of blood products for hemophilia A was started on anti-retroviral therapy for HIV in 1990. He was treated with d4T+ddI+PI (RTV+LPV) from January 2003 after several changes of anti-retroviral drugs. From September 2003, IFN α and ribavirin were also administered for treatment of HCV hepatitis. Symptoms of lactic acidosis initially appeared in October. Although the above-described medication was stopped and treatment for lactic acidosis, including intravenous administration of sodium bicarbonate, was started immediately, hepatic insufficiency rapidly progressed and he died in November 2003.

Conclusion : In this case, rapidly progressing hepatic insufficiency was induced by lactic acidosis. We concluded that hepatic failure was possibly caused by lactic acidosis, side effects of combined therapy with IFN α and ribavirin, and rapid progression to non-compensative liver cirrhosis from HCV hepatitis.

Key words : HIV infection, HCV infection, ribavirin, lactic acidosis, NRTI

B 型慢性肝炎の治療に伴うウイルスマーカーの変動

髭 修平* 中馬 誠* 山本 洋一*
夏井坂光輝* 中西 満* 浅香 正博*

はじめに

B 型慢性肝炎の自然経過は、個人間の差が大きく、病期進展の予想や治療の必要性の判断に関しても画一的でないため、治療の選択やそのタイミングも、検討の必要がある。B 型肝炎の治療に関しては、インターフェロン以外に、2000 年 11 月からラミブジンの投与が可能となったが、耐性株の出現と、それに併発する肝炎再燃が問題点としてあげられてきた。しかし、2004 年 12 月からは、ラミブジン耐性株を有する症例にアデホビルの併用も可能となり、治療の選択肢が増えてきた。

本稿では、B 型慢性肝炎で種々の治療を行った症例を基に、B 型肝炎のデータの読み方と治療の選択に関する検討を示す。

I. 症 例

症例は 36 歳の男性。約 10 年前から B 型慢

性肝炎の指摘を受けていた(当時、海外で仕事をしており、ラミブジン治療を勧められたという)。1 年前から肝機能障害が増強し、ALT が 1,000 IU/l 以上となり、ウイルス学的にも改善を認めないことから、1999 年 3 月に当科を紹介されて初診した。家族歴は、母親と弟が B 型慢性肝炎である。

II. 治療経過概略(図 1)

1999 年 3 月からラミブジンの投与を開始(図 1 ①)し、治療後に HBV-DNA 量の減少、ALT の低下を示し、良好な抗ウイルス効果を認めた(図 1 ②)。しかし、セロコンバージョンが得られないため投与を継続していたところ、17 カ月後から HBV-DNA 量の再上昇傾向を認め、ALT も 24 カ月後に 110 IU/l まで上昇した(図 1 ③)。そのまま経過観察を継続し ALT は 40~80 IU/l 程度で推移していたが、33 カ月後から急性増悪を認めた(図 1 ④)ため、ラミブジン継続下に強力ネオミノファーゲン

Key words : B 型慢性肝炎, ラミブジン, アデホビル, HBV ポリメラーゼ領域変異

Shuhei Hige/Makoto Chuma/Youichi Yamamoto/Mitsuteru Natsuizaka/Mitsuru Nakanishi
Masahiro Asaka

*北海道大学大学院医学研究科消化器内科学(〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

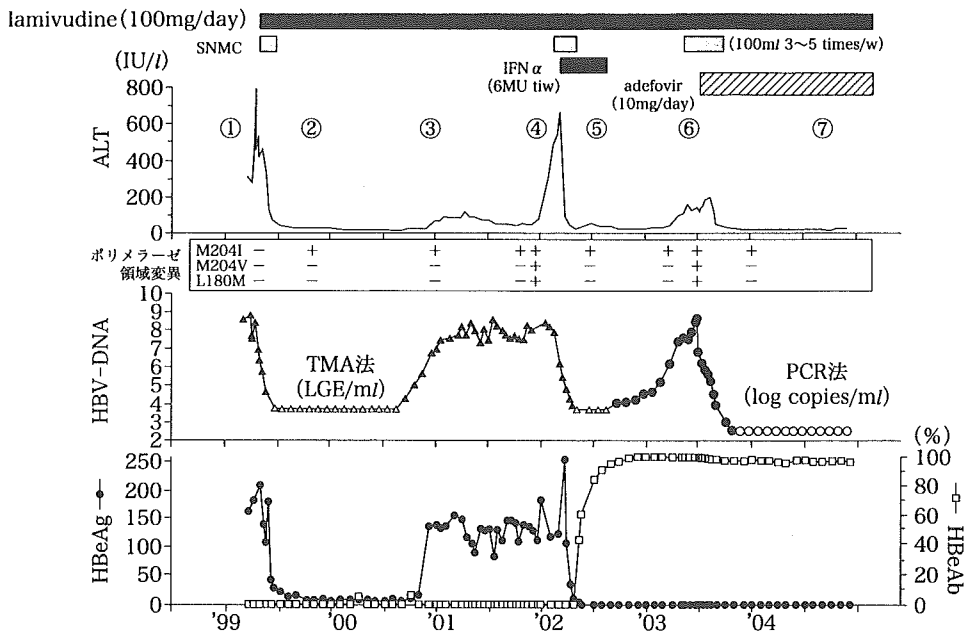


図1 臨床経過

図中の①～⑦は本文を参照。HBV-DNA量の測定法は経過中にTMA法からPCR法に変更している。TMA法、PCR法とも図中白抜き(△, ○)は、測定感度以下を示している。

C®の点滴を開始し、さらに、35カ月後からインターフェロンα600万単位を週3回で24週間投与した(図1⑤)。39カ月後にはセロコンバージョンを認め、ALTも10IU/l台にまで改善した。しかし、その後、HBe抗体陽性のままでHBV-DNA量の再上昇を示したため、51カ月後からアデホビルの併用を開始した(図1⑥)。その後は、ウイルス学的にも生化学的にも良好な経過で、併用開始18カ月後の現時点まで再燃は認めていない(図1⑦)。

III. 考 案

1. HBe抗原陽性活動性肝炎の治療法の選択
初診時の段階(図1①)では、前医での検査成績で、ALTが高値のまま変動していること、ウイルス量も多めで、HBe抗原陽性/HBe抗体陰性で変化がないことと、さらに患者年齢を

考慮すると、経過観察のみでHBe抗原/抗体のセロコンバージョンを期待することは容易ではない可能性が高いと思われたため、本症例では、ラミブジン100mg/日の連日内服投与を開始した。

わが国の肝臓学会による慢性肝炎の治療ガイド¹⁾では、HBe抗原陽性活動性肝炎の場合には、年齢・炎症の強さを考慮して治療の必要性を判断し、ウイルス量や肝組織所見を参考にし、治療法を選択するよう示している。

2. ラミブジンの治療効果と耐性株の出現

本症例では、ラミブジン投与後、ウイルス量やHBe抗原価は速やかに減少したが、HBe抗原は陰性化せずに低値安定状態となり、HBe抗体も陰性のまま推移し、セロコンバージョンに達することができなかった。

HBe抗原陽性慢性肝炎に対するラミブジン

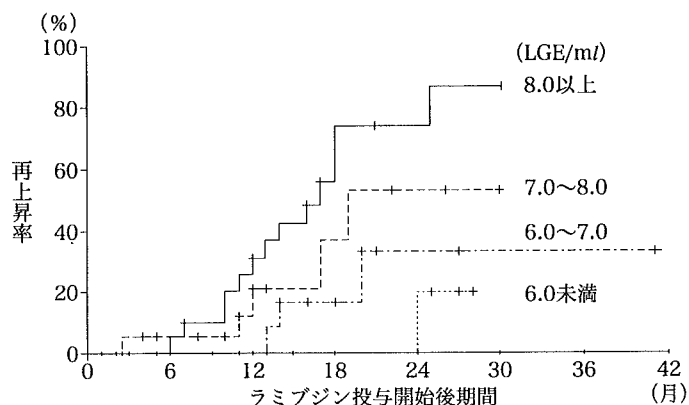


図2 ラミブジン投与開始時のHBV-DNA量と治療経過中のHBV-DNA再上昇率

投与後のセロコンバージョンは、投与開始後6か月以内に認める例が多く、1年を超えてから認める例は少ない。HBe抗原陽性例のラミブジン投与期間はセロコンバージョンを目標に設定するため、このような場合には、治療の長期継続が必要であり、後述する耐性株出現のリスクを考慮した場合のジレンマとなる。ラミブジン耐性株の出現は、投与開始時点のHBe抗原/抗体の別やウイルス量の多寡が、出現率や出現時期に有意に影響していた²⁾(図2)。

このような耐性株出現を避けるために、ラミブジンに免疫賦活作用を有する薬剤(インターフェロン、HBワクチンなど)の併用が検討されている。また、比較的若年で肝線維化の高度ではない症例に対しては、意図的にラミブジンを中止し、リバウンド後の再投与によりセロコンバージョンを獲得する方法も検討可能であると思われる³⁾。

3. HBVポリメラーゼ領域の変異株

治療開始後1年半を過ぎてから、HBV-DNA量およびHBe抗原の再上昇傾向がみられたため(図1③)、HBVポリメラーゼ領域の変異について測定したところ、C領域のYMDDモチーフにYIDD変異を認めた。そ

こで、遡って測定してみたところ、投与開始6か月の時点ですでにYIDD変異株が出現していることが判明した(図1②)。ウイルス量は8.0LGE/ml以上まで増加し、ALTも110IU/lまで上昇したが、それ以上の肝炎増悪を認めなかったため、抗ウイルス治療の追加は行わずに慎重な経過観察のみとした。

ラミブジン投与中に、このような耐性株の出現を認めることはまれではない。耐性株出現後の肝障害の増悪はbreakthrough hepatitisと呼ばれているが、耐性株の出現直後に悪化する例ばかりではない。

4. 変異株出現の機序

ラミブジン投与により惹起されやすい変異には、HBVポリメラーゼ領域中のC領域内にあるYMDDモチーフのほか、B領域内のLLAQモチーフの変異も知られている。前者では、YIDD(M204I)あるいはYVDD(M204V)が、後者ではLMAQ(L180M)がおもな変異株である。

われわれの検討では、まず、YIDD変異株が出現し、その後にLMAQ株およびYVDD株の出現を認めることが多い。ALTが200IU/l以上を示す肝炎増悪発現率は、YIDD変

異株単独の場合には30%程度であったが、LMAQ株あるいはYVDD株が出現した場合には70%程度に上昇した⁴⁾。本症例においても、図1で、YMDD→YIDD変異の②や③の時点での肝障害は強くはなかったが、YVDD株やLMAQ株の出現を認めた④の時点で急性増悪を示した。

変異株検出に関して、臨床検査としての測定は困難であり、通常はHBV-DNA量の再上昇から推測することになるが、上述したパターンがあることを理解し、ウイルス量や生化学的検査値の推移を評価・予測する必要がある。

また、経過中にHBV-DNA量が再上昇を示した場合には、変異株の出現を念頭に慎重な経過観察が必要であるが、耐性株の検出が早急な抗ウイルス治療追加の必要性を意味するとは限らないことも考慮して方針を決定すべきである。

5. breakthrough hepatitis 後のセロコンバージョン

本症例では、耐性株出現後に起こったbreakthrough hepatitisにインターフェロンの併用を行い、治療中にセロコンバージョンを得ることができた(図1⑤)。

ラミブジンなどの核酸アナログ投与中にHBV変異で臨床的に問題となるのはポリメラーゼ領域における変異であり、HBe抗原/抗体のセロコンバージョンに関連があるprecore領域あるいはcore/promoter領域の変異とは

別個に評価が必要である。すなわち、ラミブジン耐性株が出現しても、それを契機にB型慢性肝炎の治療目標の一つであるセロコンバージョンを起こし、肝炎の鎮静化が得られる症例が存在することも念頭に置く必要がある。本症例では、さらに、インターフェロンを追加併用したことも有用であったと思われる。

6. ラミブジン耐性例に対するアデホビルの併用

本症例では、ラミブジン投与51カ月後からアデホビルの併用を開始したところ、良好な反応を示しており(図1⑥)、併用18カ月目までにウイルスの再上昇は認めていない。

自験例では、腎機能障害のない症例への1日10mg連日投与において、重篤な副作用は認めておらず、ウイルス学的・生化学的にも有効性が示されている。ラミブジン耐性例に対するアデホビル併用開始1カ月間のALTおよびHBV-DNA量の変化では、とくにウイルス量の減少が良好で、2log強の減少を認めた(表)。その後も良好なウイルス量の減少を示し、低値で維持されている(図3)。また、ラミブジン耐性株におけるLMAQ(L180M)変異の有無は、アデホビルの抗ウイルス効果に差を示さず、肝癌細胞株を用いたHBVへの抗ウイルス効果の報告⁵⁾と同様、アデホビルがラミブジン耐性株に広く有効であることが示された。

HBVポリメラーゼ領域の塩基配列を測定すると、経過中に新たなアミノ酸変異の出現を認

表 ラミブジン耐性例へのアデホビル併用開始1カ月後のALTおよびHBV-DNA量の変化

	n	ALT			HBV-DNA (log copies/ml)		
		開始時(IU/l)	1カ月後(IU/l)	変化率(%)	開始時	1カ月後	変化量
慢性肝炎	5	204±143	166±143	-19.5±38.4	7.14±1.40	4.58±0.92	-2.56±0.90
肝硬変	4	55±20	51±31	-5.1±50.7	8.00±0.83	6.12±0.53	-1.87±0.30
肝移植後	3	109±72	103±54	0.8±27.3	6.66±1.02	4.20±1.44	-2.46±1.84

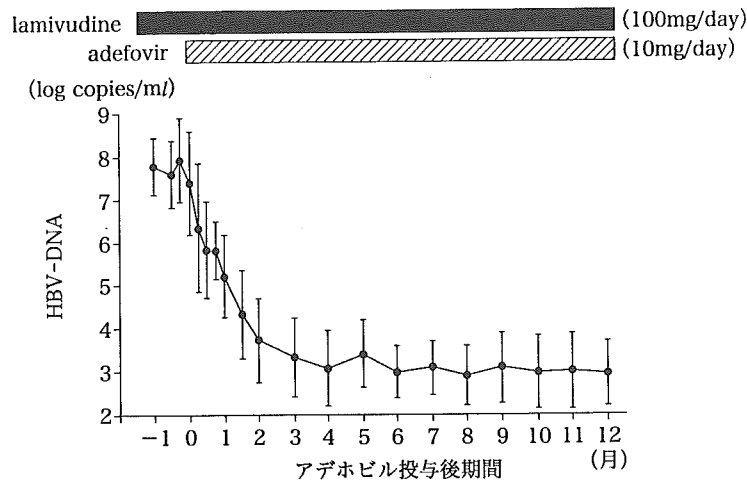


図3 ラミブジン耐性例へのアデホビル併用後のHBV-DNA量の経時的变化

める症例もあるが、一定の変異パターンはなく、肝炎の再燃を生じた例も現在までは認めない。

おわりに

本症例は、肝炎活動性が続き、抗ウイルス治療後にも再燃を繰り返したが、ラミブジン、インターフェロンの長期(6カ月)投与、アデホビルの投与と、その時点ごとに、わが国で保険診療が新たに可能となった治療法の恩恵を受けて安定化が得られた症例である。

HBVはいろいろな領域で変異を起こし、自然経過の変化や治療の反応性などに関連している。B型肝炎の治療方針の決定には、HBVに関するウイルスマーカーや生化学検査の所見や経時的变化をもとに、タイミングを含めた検討が必要である。

文 献

- 1) 日本肝臓学会編：B型肝炎の治療：慢性肝炎の治療ガイド。11-19, 文光堂, 東京, 2004
- 2) 松嶋 喬, 髭 修平：B型慢性肝炎に対するラミブジン療法の適応と投与期間の検討。犬山シンポジウム記録刊行会編：第23回犬山シンポジウム B型・C型肝炎治療の新たな展開。20-26, アークメディア, 東京, 2002
- 3) 髭 修平：ラミブジン投与と中止後に肝炎の再燃を起こし、ラミブジン再投与により改善した症例。谷川久一監：B型慢性肝炎・肝硬変治療症例集—抗ウイルス薬/ラミブジン・アデホビルピボキシル。40-42, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2004
- 4) Natsuizaka, M., Hige, S., Ono, Y., et al. : Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutation in the hepatitis B virus polymerase region. J. Viral. Hepatol. (in press)
- 5) Ono, S. K., Kato, N., Shiratori, Y., et al. : The polymerase L 528 M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. J. Clin. Invest. 107 ; 449-455, 2001

B型肝炎ウイルスの precore および core promoter 領域の変異と臨床的意義

髭 修平* 小原 俊央* 中西 満*
小川 浩司* 中馬 誠* 浅香 正博*

はじめに

B型慢性肝炎の経過や治療の評価の際に、従来から HBe 抗原/HBe 抗体の血清マーカーが指標となり、一般的には、e 抗原/e 抗体が陽性/陰性の状態から陰性/陽性の状態へ変化(セロコンバージョン)することが肝炎安定化の目安とされてきた。その後、e 抗体陽性にもかかわらず HBV-DNA 量は比較的高値を持続し肝炎の状態が継続する症例が多く認められ、B 型肝炎ウイルス(HBV)遺伝子のなかの precore (pre-C)領域、あるいは、core promoter(CP)領域の変異が関連することが明らかになった¹⁾。近年、B 型肝炎に対する新しい治療として、核酸アナログであるラミブジン治療が広く行われてきているが、本領域の変異がラミブジン耐性ウイルスの増幅に影響を及ぼしたり²⁾、治療効果に関連すると報告されてきている³⁾。

本稿では、pre-C あるいは CP に関連する検査の評価を、われわれの成績を基に解説する。

I. HBe 抗原/抗体セロコンバージョンと pre-C および CP 領域の変異

HBe 抗原蛋白は、pre-C および C 領域にまたがる 212 アミノ酸からなる HBe 抗原前駆体蛋白の両端がそれぞれ切断されて分泌されるが、この HBe 抗原の産生停止あるいは抑制は、おもに以下の二つの機序が関与していると考えられている。

① pre-C 領域の 83 番目(nt 1896)あるいは 86 番目(nt 1899)の塩基に変異が生じ、停止コドンに置換されると、HBe 抗原前駆体蛋白への翻訳が中断され、結果的に HBe 抗原分泌が停止する。

② pre-C や C 領域の上流に位置する CP 領域は pre-C mRNA や pregenomic mRNA の転写調節に関連すると考えられているが、この領域の変異が pre-C mRNA の転写を抑制し、HBe 抗原蛋白産生を低下させる。とくに、1762 番目と 1764 番目の塩基の変異が高頻度に認められている⁴⁾。

Key words : B型肝炎ウイルス, precore 領域, core promoter 領域, ラミブジン

Shuhei Hige/Toshio Kohara/Mitsuru Nakanishi/Koji Ogawa/Makoto Chuma/Masahiro Asaka

*北海道大学大学院医学研究科消化器内科学(〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目)

以上の機序により、結果として、同部位のセロコンバージョンが生じる。

II. pre-C および CP 変異の検出法

現在、保険適用を有する測定用キットとして、pre-C 変異測定には enzyme linked mini-sequence assay (ELMA) 法があり、1896 番目の遺伝子変異について、野生型と変異型の混合比率を示すことができる。CP 領域変異測定には enzyme linked specific probe assay (ELSPA) 法があり、野生型・変異型・混合型に分別して検出できる。今回の検討において、ELMA 法による pre-C 領域の変異は、野生型/変異型の混合比率の高いほうを優位型と判定して解析した。

このほかの変異の検出法としては、direct sequence 法がある。われわれの検討では、pre-C 領域に関しては ELMA 法のほうが変異株検出率が高かった。CP 領域の変異検出に関しては、direct sequence 法のほうがやや検出率が高く、上述した 2 カ所以外の変異も検出することが可能であった⁵⁾。簡便であること、pre-C 領域の変異を半定量的に評価可能であることから、本測定キットは有用と考えられた。

III. pre-C および CP 領域の臨床的検討

1. HBe 抗原/e 抗体との関連

当科に通院中の B 型慢性肝疾患患者のうち、HBe 抗原/e 抗体の陽性または陰性が明らかであるもの(±判定例を除く)、pre-C および CP の変異に関して検出可能であった 196 例を対象とした。

HBe 抗原/e 抗体と ELMA 法による pre-C 領域の変異結果を比較すると、HBe 抗原陽性

73 例中 60 例(82.2%)が pre-C 野生型優位、HBe 抗体陽性 114 例中 68 例(59.6%)が pre-C 変異型優位であった。128 例(68.4%)は HBe 抗原/抗体系で pre-C 領域変異の予測が可能であったが、約 30%の例は血清マーカーと pre-C 領域の変異パターンは一致していなかった。「HBe 抗原陽性/e 抗体陰性」例では、大部分が pre-C 野生型で、「HBe 抗原陰性/e 抗体陽性」例では、① pre-C 変異型優位(50.9%)、② pre-C は野生型だが CP 領域が変異型(26.3%)の 2 群が多数を占めた。HBe 抗原陰性/e 抗体陽性にもかかわらず pre-C、CP 領域とも野生型のものが 11 例(9.6%)みられたが、これらは全例 HBV-DNA 量は低値であった。したがって、pre-C 領域の変異は HBe 抗原/e 抗体測定結果からは必ずしも推定できないことが示されている。

2. 肝炎の経過との関連

肝炎の病期を、①肝機能障害を経過中にまったく認めない「無症候性キャリア(ASC)」群、②慢性肝炎群、③肝硬変群とし、さらに、(a)最近 1~2 年以上 ALT 値の上昇を認めない「鎮静化」症例と、(b) ALT 異常を認める「活動性」症例に群別して、pre-C および CP 変異パターンを検討した(図 1)。ASC 以外の HBe 抗原陽性例は活動性を認め、HBe 抗体陽性例が活動例と鎮静例に分類された。

pre-C 領域の変異は、HBe 抗原陽性の ASC では変異を認めなかったが、肝炎期症例では、野生型優位例の比率は、肝炎から肝硬変への進展、あるいは、HBe 抗原陽性から e 抗体陽性への変化に伴い低下した。CP 領域の変異も、HBe 抗原陽性の ASC では変異を認めなかったが、肝炎期に進んだ症例の多くが変異型優位の状態であった。

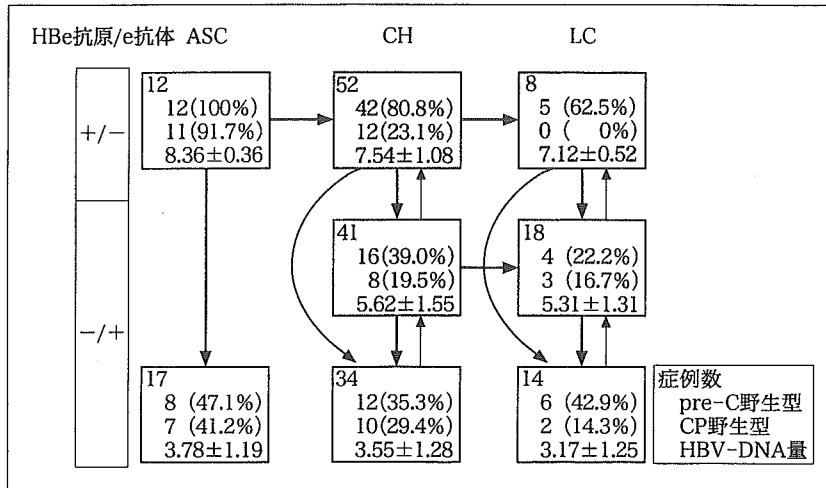


図1 HBV キャリアの経過と pre-C および CP 領域の変異
 ASC：無症候性キャリア，CH：慢性肝炎，LC：肝硬変
 枠内が灰色で示された群は，ALT 異常を認める「活動性」症例を示す。枠内に表示された数値は，右下凡例を参照。HBV-DNA 量は log copies/mL，平均±標準偏差を表示。

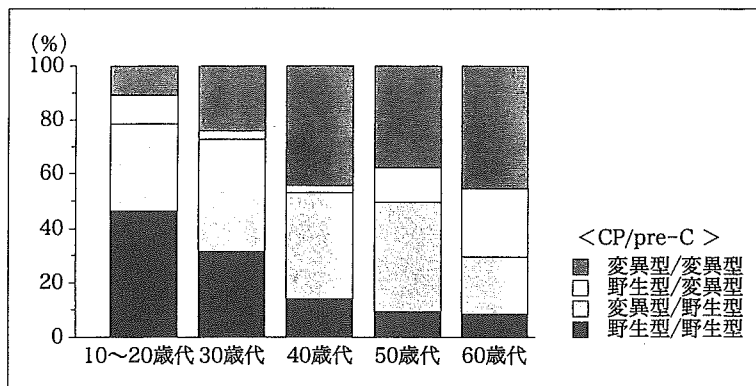


図2 年代別の CP および pre-C 変異パターン

3. pre-C および CP 変異パターンの経過

年代別の pre-C および CP 変異は，10 歳代，20 歳代の若年層では pre-C/CP 両領域とも野生型の例が半数近くを占めていた(図2)。その後，変異型の比率が高まる傾向を認めたが，40 歳代以降では，両領域とも野生型あるいは変異型の割合には著明な変動を認めない。すなわち，30 歳代までにこれらの領域に変化を起こし，以後は変異パターンが大きく変わらないこ

とを示している。このことは，B 型肝炎の経過において，35 歳前後までを自然なセロコンバージョンが期待できる年齢と考えられていることにも合致する。

4. ラミブジン治療前後の変化

HBe 抗原/e 抗体パターンに変化を認めない抗ウイルス治療未施行の B 型慢性肝炎患 52 例を対象として，最近 1 年間の pre-C および CP

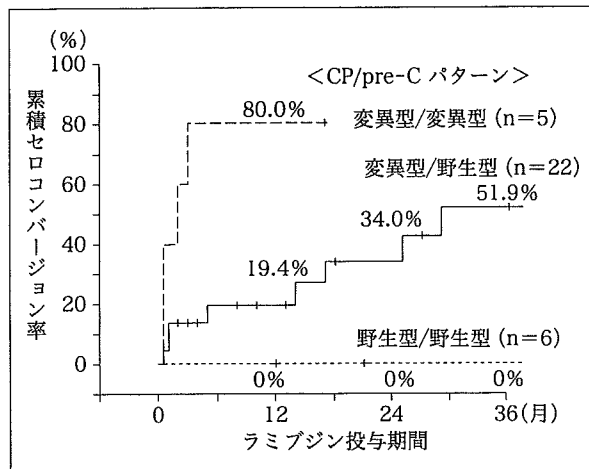


図3 ラミブジン投与後の累積セロコンバージョン率
各群のセロコンバージョン率には有意差を認める
(Log rank, $p < 0.001$).

領域の変異パターンの変化を検討した。pre-C領域で野生型の比率が増加したのは5例(9.6%)にすぎず、30例(57.7%)は減少した。また、50ポイント以上の変化を示した例を5例(9.6%)、30~50ポイントの変化を示した例を14例(26.9%)認め、1年間に30ポイント以上の変化を示した症例は36.5%であった。CP領域は、3例のみに混合型から変異型への変化を認めた。

次に、ラミブジン治療例18例について、治療開始時と1年後でのpre-CおよびCP変異パターンを検討した。pre-C領域の1年間の変化率が30ポイント以上を示したのは3例(16.7%)のみで、上記の自然経過観察例より低率であった。このことは、両群の背景因子が異なっていることに起因すると推測されるが、1年間のラミブジン投与でpre-CおよびCP領域の変異が促進される可能性は低いと思われた。

5. pre-CおよびCP変異とラミブジン治療効果

HBe抗原が陽性の33例におけるラミブジン

治療後の累積セロコンバージョン率を図3に示す。CP/pre-C変異パターンが変異型/変異型を示す例では開始1年後に80.0%と高率にセロコンバージョンを示し、また、変異型/野生型の例では19.4%であった。一方、野生型/野生型のパターンを示す6例でセロコンバージョンまで到達した例はなく、うち5例では、経過中にYMDD領域の変異が出現した。したがって、治療前にpre-CとCPの両領域に変異が認められない症例に対するラミブジン単独投与は慎重にすべきであると考えられた。反対に、HBe抗原が陽性にもかかわらず両領域が変異型を示すものについては、高い治療効果が期待できる。

6. ラミブジン治療後の耐性株の出現

ラミブジン投与開始前にpre-CおよびCP領域の変異を測定した症例の、ラミブジン耐性株の出現について検討した(図4)。対象は60例で、HBe抗原陽性34例、e抗体陽性26例であった。pre-C領域が野生型の症例のなかで、治療開始1年後のラミブジン耐性出現率