

肝炎急性増悪について述べたい。

B型急性肝炎の診断

ここでは、母児感染を除く、成人期以降の水平感染による初感染について述べる。今日では医療従事者の針刺し事故や血液汚染を除けば、性行為を介して感染するいわゆる性行為感染症 (STD) が大部分である¹⁾。輸血による感染はスクリーニング検査の確立された現在はほぼ皆無だが、一部で occult HBV による感染血が検査をすり抜けて感染を起す例が報告されている。慢性化率は2~10%と言われ、高齢者や免疫状態の悪い患者に多い。潜伏期間は1~6ヵ月と幅がある。

診断には血清学的検査が最も有効である。HBV の抗原抗体系にはB型肝炎ウイルス表面 (HBs) 抗原, HBs 抗体, B型肝炎ウイルスコア (HBc) 抗原, HBc 抗体, B型肝炎ウイルス e (HBe) 抗原, HBe 抗体, がある (表1)²⁾。

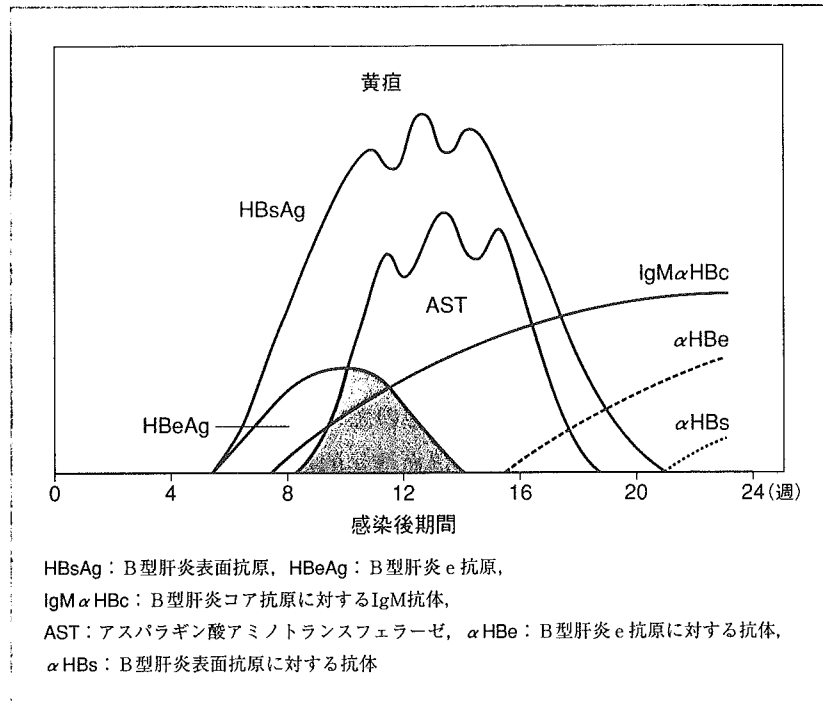
HBs 抗原は血清トランスアミナーゼ値の上昇に先立ち、感染後約6週で血中に現れ、発病後、3ヵ月までには通常消失する (図1)。6ヵ月以上持続する場合は慢性化を考える。HBs 抗体は回復期と中和抗体を意味する。HBc 抗原は抹消血中には認められない。HBc 抗体にはIgM型とIgG型がある。高力価IgM型HBc抗体の存在は感染初期を意味し、B型急性肝炎の診断となる。IgG型HBc抗体はB型慢性肝炎もしくは既往感染を意味する。HBe 抗原の存在はウイル

ス産生が盛んで感染力が高いことを意味する。急性肝炎時もHBs 抗原とほぼ同時期に一過性に増加し早期に消失する。HBe 抗体は急性肝炎の回復期もしくは持続感染を意味する。急性肝炎でHBe 抗体が出現すれば、完全に回復する可能性が高い。B型急性肝炎の診断にはHBs 抗原陽性, IgM型HBc抗体強陽性が有用である。なお、IgM型HBc抗体はB型慢性肝

表1 B型肝炎ウイルスマーカーの血清学的意義

| マーカー | 意義 |
|-----------|------------------------------------------|
| HBs 抗原 | 急性あるいは慢性B型肝炎 |
| IgM型HBc抗体 | 急性B型肝炎 (高力価) 慢性B型肝炎 (低力価) |
| IgG型HBc抗体 | B型肝炎既往感染 (HBs 抗原陰性) 慢性B型肝炎 (HBs 抗原陽性) |
| HBs 抗体 | B型肝炎に対する中和抗体 |
| HBe 抗原 | 急性B型肝炎, 続けば持続感染状態 |
| HBe 抗体 | 回復期または持続感染状態 |
| HBV-DNA | 持続感染状態 |

図1 急性B型肝炎の経過



炎の急性増悪時にも弱陽性を示すことがあるが、その場合は IgG 型 HBc 抗体が 200 倍希釈でも高力価であり、両者の鑑別が可能である。

血中 HBV-DNA の検出はウイルス増殖の最も鋭敏な指標であり、血清トランスアミナーゼ値ともよく相関する。血清トランスアミナーゼ値は現在の肝炎の程度を知る最も有用なマーカーとなる。多峰性に変動を繰り返す場合は慢性化に注意が必要である。

B型急性肝炎では感染の鎮静化とともに陰性化する。しかし、肝細胞内には、一過性感染後も HBV-DNA が検出され、肝炎鎮静後も肝内からは完全にウイルスが消失していないことを当院では報告している³⁾。

劇症化率はB型急性肝炎全体で約2%と推定される。しかし、プロトロンビン時間が40%未満のいわゆる重症型の急性肝炎では約30%が、肝性脳症Ⅱ度以上を合併し劇症肝炎に進展する⁴⁾。劇症化の予測には、厚生労働省の研究班による予知式⁵⁾と、与芝らの予知式⁶⁾がよく用いられる(表2)。双方の式で算出される劇症化確率はしばしば異なるため、複数の式を用いて予後を判断するべきである。

表2 急性肝炎重症型の劇症化予知式

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 与芝の式 |
| $\lambda = \text{logit}(P) = -0.89 + 1.74 \times \text{成因} + 0.056 \times \text{T. Bil (mg/dl)} - 0.014 \times \text{ChE (IU/L)}$ |
| 成因: HAV または HBV 初感染 1, その他 2 |
| 研究班の式 |
| $\lambda = \text{logit}(P) = -2.7469 + 0.0914 \times (\text{年齢}) + 0.1255 \times \text{T. Bil (mg/dl)} - 0.1534 \times \text{PT (\%)}$ |
| 劇症化確率 (p) = $1 / (1 + e^{-\lambda})$ |

B型急性肝炎の治療

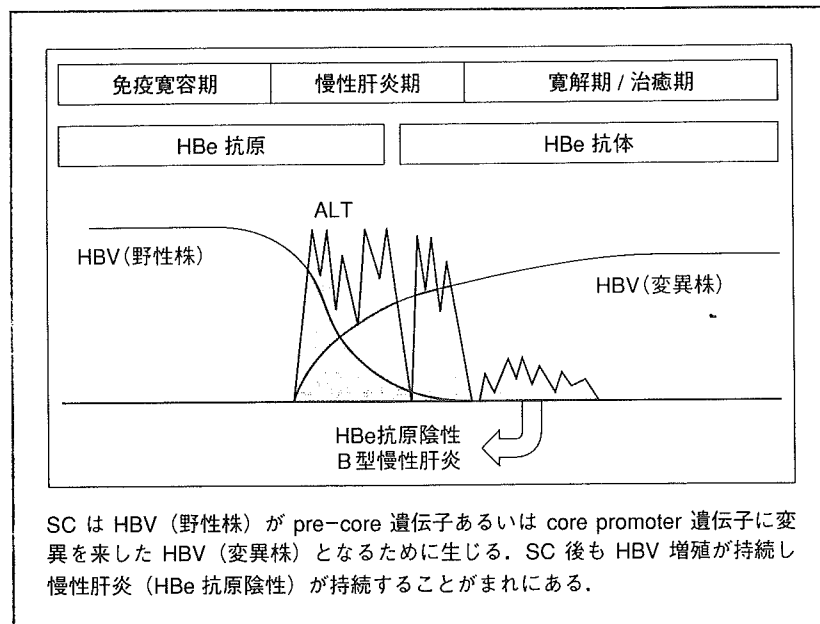
多くの場合3ヵ月以内に肝炎は鎮静化するので、入院による安静と食事療法の対処療法のみで根治可能である。食事は高タンパク、高カロリーが基本であるが、栄養過多による脂肪肝に注意が必要である。食欲低下を認める場合はビタミン剤を添加した補液が行われる。当院では全身倦怠感や食欲不振などの自覚症状の消失、血清トランスアミナーゼ値 100 IU/L 未満、血清総ビリルビン値 2.0 mg/dl 未満を退院の目安としている。

B型急性肝炎の中でも、重症化、劇症化を来す症例を数%で認める。血清総ビリルビン値やプロトロンビン時間などの肝予備能に注意しながら、劇症化の予知式⁵⁾⁶⁾などによる予測を行い、早めの対策が救命につながる。抗ウイルス薬のラミブジンをB型急性肝炎に使用し有効との報告⁷⁾もあるが、急性感染では血中のウイルスは早期に消失するため、ラミブジンがこの消失動態に影響するかは、まだ明らかなエビデンスはない。重症化、劇症化時の詳しい治療は劇症肝炎の治療の項に譲る。

B型慢性肝炎急性増悪の診断

B型慢性肝炎や血清トランスアミナーゼ正常のHBキャリアの患者が、急激な血清トランスアミナーゼ値の上昇と、時に肝機能の低下や全身倦怠感を引き起す。これを急性増悪と呼ぶ。その際にHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョンを起すことがある(図2)²⁾。自然経過でのセロコンバージョンは年率10~15%と言われ、インターフェロン(IFN)などの抗ウイルス療法後にみられるこ

図2 HBe 抗原から HBe 抗体へのセロコンバージョン (SC)



ともある。しかし、中には重症化、劇症化を来し、肝不全となる症例を認める。近年、HBe 抗原陰性でも HBV-DNA 陽性の B 型慢性肝炎患者の存在が確認され、これらは HBe 抗原が産生されない pre-core 変異株や core promoter 変異株によることが報告されている⁸⁾。HB キャリアや B 型慢性肝炎からの急性増悪症例で肝不全となり死亡した症例の中には、HBV-DNA が $7.6 \log \text{ copies/ml}$ を超える高ウイルス症例のみならず、今述べた HBe 抗原陰性 HBe 抗体陽性の低ウイルス症例も認められる。したがって、抗原抗体系の血清マーカーのみにとらわれず、血清総ビリルビン値やプロトロンビン時間などの肝予備能を見ながら、重症化や劇症化を防ぐ必要がある。

B 型慢性肝炎急性増悪の治療

急性増悪時の治療目標は ALT の正常化と重症化の防止である。基本的には B 型慢性肝炎の治療すなわち、IFN もしくはラミブジンなどの抗ウイルス薬の使用が中心となる。HB キャリアからの急性増悪例では予後の悪い亜急性型の劇症肝炎に進展する可能性が高く、肝移植も考慮しながらの診療が必要である。HBe 抗体陽性 HB キャリアに、他疾患でステロイドや免疫抑制剤を使用すると、肝炎が増悪する

表3 B型肝炎治療の新しいステージ分類

| HB stage | 0 | I | II | III | IV | V |
|------------------------|------|----------------------------------------|---------------------|-------------|----------|------|
| HBsAg | + | + | + | + | + | -** |
| HBeAg | + | + | + | - | - | - |
| HBV-DNA (copies/ml) | 不問 | $10^{7.6} \leq$ | $10^{7.6} >$ | $10^5 \leq$ | $10^5 >$ | 不問 |
| ALT | 持続正常 | 持続正常以外 | 持続正常以外 | 不問 | 不問 | 不問 |
| 年齢 | 不問 | 若年/高年* (Ia/Ib) | 若年/高年* (IIa/IIb) | 不問 | 不問 | 不問 |
| 発癌リスク | 極めて小 | 小/大 | 小/極めて大 | 極めて大 | 極めて小 | 極めて小 |
| 治療 | 不要 | F ₂ 以上 IFN/IFN+ ラミブジン | IFN/ラミブジン | ラミブジン | 不要 | 不要 |

* : 若年 男性 30 歳未満, 女性 35 歳未満 高年 男性 30 歳以上, 女性 35 歳以上
 ** : HBsAg (+) の時期が確認されていること
 略語 : 巻末の略語集参照

ことがあり, 注意が必要である. 一般にウイルス量の増加が高度な症例では, 肝炎も重症化する例が多いので, 早期より積極的にラミブジンを使用すべきである. いずれにしても, 急性感染同様に, 劇症化の予知式⁵⁾⁶⁾などを用いて, 早めの治療が必要である.

最も重要なのは, 治療開始のタイミングである. 特にラミブジンの開始時期にはさまざまな見解がある. プロトロンビン時間が 40% をきるような重症例での早期使用は当然であるが, HB キャリアからの急性増悪と慢性肝炎からの急性増悪では異なった基準を設けるべきとの意見もある⁹⁾. すなわち, ラミブジンの有効性の検討結果から, HB キャリアからの急性増悪例ではプロトロンビン時間が 60% 未満, 慢性肝炎からの急性増悪例では総ビリルビン値が 5 mg/dl 以上で速やかにラミブジンを投与すべきと考えられる.

ラミブジン長期投与例においてみられる耐性株出現による breakthrough hepatitis が原因の急性増悪例では他の抗ウイルス薬の併用が試みられる. 我が国では 2004 年 12 月より, アデホビルが保険適用となり, ラミブジン投与中に HBV の持続的な再増殖を伴う肝機能異常が確認された症例で, ラミブジンとの併用治療が可能となった. また, entecavir など, 他の抗ウイルス薬の開発も進んでおり, 今後

の臨床への応用が期待される。

当院の加藤ら¹⁰⁾は年齢やウイルス量によって、B型肝炎治療のステージ分類(表3)を作成し、治療法の選択に使用している。HBs抗原、HBe抗原、HBV-DNA、ALT、年齢によってステージングを行い、発がんリスクを考慮して、ラミブジン、IFNなどの治療の適否を示している。しかし、これらは新たな抗ウイルス薬が使用可能になるまでの暫定的な治療選択であり、今後、選択肢が広がる可能性が十分考えられる。

おわりに

B型肝炎では、その多くが一過性感染で、無治療にて軽快する。まれに重症化や劇症化を引き起す。B型肝炎慢性増悪では、セロコンバージョンなど、一過性の悪化で改善する場合もあるが、一部に重症化や劇症化を起す症例を認める。どちらも治療の最大の目的は重症化や劇症化を未然に防ぎ、肝不全を引き起さないことである。そして、不幸にして、肝不全となったときには、肝移植を含めた集学的治療を行うことが重要である。今後、新たな抗ウイルス薬の開発により、B型肝炎に対する治療法は大きく変化する可能性が考えられる。

伊与田賢也・結城暢一・山本佳司
加藤 道夫

文 献

- 1) 正木尚彦, 他: A型・B型肝炎. 消化器疾患最新の治療 2003-2004: p289-293, 南江堂, 東京, 2004.
- 2) 今関文夫 訳: B型肝炎ウイルス. “シャーロック” 肝臓病学 第11版, p246-254. 西村書店, 新潟, 2004.
- 3) Yuki N, et al: Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 37 (5): 1172-1179, 2003.
- 4) 鈴木一幸, 他: 急性肝炎重症型の子知と病態に関する研究. 厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班平成12年度研究報告書, p32-35, 2001.
- 5) Yoshida M, et al: Accurate prediction of fulminant hepatic failure in severe acute viral hepatitis: multicenter study. *J Gastroenterol* 37 (11): 916-921, 2002.
- 6) 鈴木一幸, 他: 急性肝炎重症型の劇症化予知に関する prospective study. 厚生科学研究補助金特定疾患対策研究事業 難治性の肝疾患に関する研究 平成13年度総括・分担研

- 究報告書, p104-109, 2002.
- 7) Kondili L A, et al: The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases). *J Viral Hepat* 11 (5): 427-431, 2004.
 - 8) Okamoto H, et al: Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 64 (3): 1298-1303, 1990.
 - 9) 持田 智, 他: B型急性肝炎治療法の最新動向. ウイルス性肝炎 (下) 日本臨床 増刊 62 (Suppl 8): 248-252, 2004.
 - 10) 加藤道夫, 他: HBV マーカーと発癌リスクよりみた HBV キャリアのステージ分類. *肝臓* 45 (11): 581-588, 2004.

B型慢性肝炎の病態をどう把握し、治療方針を立てるか？

加藤道夫

国立病院機構大阪医療センター消化器科/かとう・みちお

はじめに●

B型肝炎ウイルス(HBV)キャリアはHBe抗原陽性無症候性キャリアから慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌あるいは臨床的治癒とされているHBe抗体陽性無症候性キャリアまでさまざまな病態が存在する。そして、その経過もさまざまであるが、大別すると肝硬変、肝細胞癌に進行する群と臨床的治癒の状態に落ち着く群に2分される。これらHBVキャリアのそれぞれが現在どの病期にいるのか、発癌リスクはどの程度であるのか、積極的な治療の必要性はあるのか、そしてあるならどのような治療を選択すべきかという問いに対処するため、われわれはHBVキャリアのステージ分類を提唱した¹⁾。

HBVキャリアのステージ分類●

1995年11月以降に当院を初診したHBVキャリア207例を対象にHBVキャリアを8ステージに分類した(表1)。対象の性別は男性138例、女性69例で、平均年齢はそれぞれ44.3±13.4歳、42.8±15.6歳であった。

HBステージ0：HBs抗原陽性、HBe抗原陽性、ALT正常値持続のいわゆる無症候性キャリアの

状態。

HBステージI：HBs抗原陽性、HBe抗原陽性、ALT異常値(持続正常以外)でHBV-DNA量が $10^{7.6}$ copies/mL以上の高ウイルス群。若年例(男性：30歳未満、女性：35歳未満)をステージIa、高年例(男性：30歳以上、女性：35歳以上)をステージIbとする。

HBステージII：HBs抗原陽性、HBe抗原陽性、ALT異常値(持続正常以外)でHBV-DNA量が $10^{7.6}$ copies/mL未満の低ウイルス群。若年例をステージIIa、高年例をステージIIbとする。

HBステージIII：HBs抗原陽性、HBe抗原陰性、HBV-DNA 10^5 copies/mL以上のプレコア変異株の増殖が持続していると考えられる群である。

HBステージIV：HBs抗原陽性、HBe抗原陰性、HBV-DNA 10^5 copies/mL未満のいわゆる臨床的治癒の状態である。

HBステージV：HBキャリア(HBs抗原陽性の時期が確認されている例)でHBs抗原が消失した状態である。

各ステージの例数、性別、平均年齢、ALT値、血小板数および発癌率は表2に示す。HBe抗原

表1 HBVキャリアのステージ分類

| HBステージ | 0 | I | II | III | IV | V |
|------------------------|-------|-------------------|---------------------|-------------|----------|-------|
| HBsAg | + | + | + | + | + | -** |
| HBeAg | + | + | + | - | - | - |
| HBV-DNA (copies/mL) | 不問 | $10^{7.6} \leq$ | $10^{7.6} >$ | $10^5 \leq$ | $10^5 >$ | 不問 |
| ALT | 持続正常 | 持続正常以外 | 持続正常以外 | 不問 | 不問 | 不問 |
| 年齢 | 不問 | 若年/高年* (Ia/Ib) | 若年/高年* (IIa/IIb) | 不問 | 不問 | 不問 |
| 発癌リスク | きわめて小 | 小/大 | 小/きわめて大 | きわめて大 | きわめて小 | きわめて小 |

*若年：男性30歳未満、女性35歳未満
高年：男性30歳以上、女性35歳以上

** HBsAg(+)の時期が確認されていること

- 臨床的治癒コースはステージ Ia から IIa となり, 速やかにステージ IV に移行する.
- 病態進展コースはステージ Ia から Ib, IIb と進行し, III までは到達するが IV には至らない.
- ステージ III とステージ IV は時間的経過の差ではなくて, 病態の異なる集団である.

表 2 各 HB ステージの背景因子と発癌率

| HB ステージ | 0 | Ia | Ib | IIa | IIb | III | IV |
|------------------------------|------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-------------------|-----------------|
| 例数(%) | 9 (4.3) | 23 (11.1) | 44 (21.3) | 10 (4.8) | 31 (15.0) | 49 (23.7) | 41 (19.8) |
| 性別 (男性/女性) | 3/6 | 16/7 | 32/12 | 4/6 | 24/7 | 38/11 ** | 21/20 ** |
| 年齢(歳) | 34.4 ± 9.1 | 25.5 ± 3.4 | 44.8 ± 11.0 | 24.0 ± 2.5 | 48.5 ± 9.8 | 53.1 ± 9.7 ** | 45.6 ± 15.7 ** |
| ALT (IU/L) | 17.7 ± 4.4 | 129.0 ± 101.4 | 193.6 ± 204.2 | 105.6 ± 80.3 | 130.5 ± 194.2 | 117.2 ± 112.3 *** | 41.0 ± 39.7 *** |
| 血小板数 (× 10 ⁴) | 20.4 ± 4.2 | 20.1 ± 3.6 | 16.5 ± 6.2 | 18.1 ± 4.3 | 15.4 ± 7.9 | 14.4 ± 5.9 *** | 19.3 ± 7.5 *** |
| 初診時発癌 (-/+) | 9/0 | 23/0 | 44/0 | 9/1 | 24/6 | 39/10 | 35/6 |
| 初診後発癌例 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 9 | 1 |
| 発癌率(%) | 0 | 0 | 6.8 | 0 | 16.7 | 23.1 * | 2.9 * |

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

陰性期のステージ III とステージ IV を比較すると, 平均年齢はステージ IV が有意(p<0.01)に若年齢であり, 性別は女性は有意(p<0.01)にステージ III 例で少数であった。また, ALT 値はステージ IV が有意(p<0.001)に低値であった。ステージ III とステージ IV はステージ III からステージ IV へと移行するという時間的経過の差ではなくて, 病態の異なる集団と考えられる。HBV キャリアの大多数が歩む臨床的治癒の状態へのコースはステージ Ia からステージ IIa となり, その後短期間ステージ III を経由した後速やかにステージ IV に移行するものと考えられる。そしてステージ IV が長期間続いた後 HBs 抗原が消失し, ステージ V となる。一方, 肝硬変進展・肝癌発癌ハイリスク群はステージ Ia からステージ Ib, ステージ IIb と進行し, HBe 抗原が陰性化してステージ III までは到達するが HBV の増殖は持続し, ステージ IV に至ることはない(図 1)。臨床的治癒コースの各ステージにおける初診時の血小板数と発癌リスクは, ステージ 0, Ia,

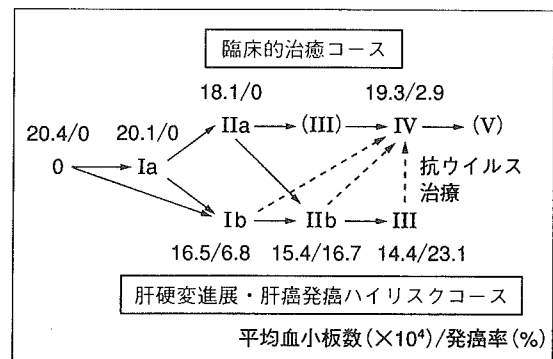


図 1 HBV キャリアの経過(臨床的治癒コースと肝硬変進展・肝癌発癌ハイリスクコース)

IIa および IV でそれぞれ 20.4 万, 0%, 20.1 万, 0%, 18.1 万, 0% および 19.3 万, 2.9% とほとんど変化を認めないが, 肝硬変進展・肝癌発癌ハイリスクコースにあたるステージ Ib, IIb および III ではそれぞれ 16.5 万, 6.8%, 15.4 万, 16.7% および 14.4 万, 23.1% とステージの移行に従っての血小板数の低下と発癌率の増加が認められ, ステージ Ib, IIb および III のキャリアに対する抗ウイルス治療の必要性が強く示唆される。

- ステージ Ib, IIb および III は肝硬変進展・肝癌発癌のハイリスクコースである。
- ステージ III では CP, Pre C 両領域ともに変異型が有意に高率である。
- ステージ IV では両領域で野生型の残存率が高く、ウイルス量の減少による HBe 抗原消失と考えられる。

肝癌発癌例, 肝予備能低下例と

HB ステージ分類●

各ステージ別の発癌率はステージ 0 0%, ステージ Ia 0%, ステージ Ib 6.8% (3/44), ステージ IIa 0%, ステージ IIb 16.7% (4/24), ステージ III 23.1% (9/39), ステージ IV 2.9% (1/35)であった。ステージ Ib, ステージ IIb およびステージ III は B 型肝炎発癌のハイリスク群で積極的に抗ウイルス治療を行う必要がある。また全発癌例(初診時発癌例を含む)における性別および発癌確認時の年齢, ALT 値についてみると, 性差は, 男性 24.6% (138 例中 34 例), 女性 10.1% (69 例中 7 例)と男性で有意に発癌率が高率($p < 0.02$)であった。発癌例の年齢分布は 50 歳代が 55.0%と最も多く, 60 歳代, 40 歳代がそれぞれ 17.5%, 15.0%で 40 歳未満は 25 歳と 35 歳の 2 例のみであった。また, 発癌確認時の ALT 値は 30IU/L 未満が 6 例(15.0%), 40IU/L 未満 12 例(30.0%)および 50IU/L 未満 19 例(47.5%)と ALT 低値例が約半数を占めた。

また, 初診時血小板数 10 万未満例を肝予備能低下例とすると, 各ステージ別の肝予備能低下例の割合はステージ 0 0%, ステージ Ia 4.3% (1/23), ステージ Ib 13.6% (6/44), ステージ IIa 0%, ステージ IIb 25.8% (8/31), ステージ III 26.5% (13/49), ステージ IV 7.3% (3/41)であった。発癌例と同様にステージ Ib, ステージ IIb およびステージ III において肝予備能低下例が高率に認められた。

プレコア, コアプロモーター変異と

HB ステージ分類●

対象 207 例中 111 例においてプレコア(PreC)およびコアプロモーター(CP)変異について検討した。各ステージにおける野生型の割合は PreC

領域, CP 領域でそれぞれ, ステージ 0 100%, 75.0%, ステージ Ia 66.7%, 33.3%, ステージ Ib 65.2%, 34.8%, ステージ IIa 42.9%, 14.3%, ステージ IIb 53.3%, 13.3%, ステージ III 3.7%, 7.4%, ステージ IV 37.5%, 31.8%であった。HBe 抗原陰性期でもステージ III とステージ IV では様相が異なり, PreC 領域では野生型と変異型がステージ III ではそれぞれ 1 例, 15 例であるが, ステージ IV では 9 例, 12 例とステージ III で変異型が有意($p < 0.05$)に高率であった。また, CP 領域でも野生型と変異型を比較すると, ステージ III ではそれぞれ 2 例, 25 例であるが, ステージ IV では 7 例, 13 例とステージ III で PreC 領域と同様, 変異型が有意($p < 0.05$)に高率であった。PreC 領域と CP 領域のいずれかが野生株である率はステージ III ではわずか 11.1% (3/27)であったが, ステージ IV では 52.0% (13/25)と過半数を占めた。臨床的治癒期と考えられるステージ IV では両領域で野生型の残存率が高く, ウイルス量の減少によって HBe 抗原が消失した例が多いことを示す成績と考えられる。

HBV genotype と病態との関連●

HBV は分子進化学の発展により A 型から H 型までの 8 種の genotype に分類されている。Orito らのわが国における genotype 分布の解析²⁾によると, 沖縄と東北地方には genotype B が多く, それ以外の地域では genotype C が大半を占めており, わが国全体の比率としては genotype B が 12.2%, genotype C が 84.7%であった。genotype B は genotype C に比し予後良好と考えられており, PreC 領域と CP 領域の変異の有無についての検討でも, 変異型は genotype B の 16% に比し genotype C では 58%と genotype C で有意に高率と報告されている³⁾。当院で無作為に抽

ステージ Ib では若年齢を過ぎても HBV-DNA 量高値が持続し、抗ウイルス薬治療が必要である。
ステージ IIb 全例とステージ III の ALT 異常男性例は抗ウイルス治療の絶対適応である。
ステージ III の発癌数は全ステージ中最大で、ALT の正異に関係なく発癌例がみられる。

出した B 型慢性肝疾患 60 例中 56 例 (93.3%) は genotype C であり、その他は genotype A, B, F および B+C が 1 例ずつであった。大阪でも B 型慢性肝疾患の大半は genotype C であり、前述の PreC, CP 変異とステージ分類との関係も genotype C のキャリアにおける成績と考えられるが、genotype B のキャリアでは変異型が有意に低値とのことで、HBe 抗原陰性期でのステージ III の比率がきわめて低率ではないかと推察される。

HB ステージ分類と抗ウイルス治療の必要性●

ステージ Ia はステージ 0 の無症候性キャリアが肝炎期に移行した状態のすべての HB キャリアが通過する高ウイルスのステージであり、発癌リスクがきわめてまれで通常は抗ウイルス治療の必要はない。しかし、組織学的に線維化ステージが F2 以上に進行している例は早期に肝硬変に進展する可能性があり、抗ウイルス治療の適応と考えられる。ALT 値が高値を持続する例は通常 HBV-DNA 量が減少しステージ IIa となるが、ステージ IIa からは若年発症の B 型肝癌例があり、ALT 値持続高値例は抗ウイルス治療の適応となる。Ia, IIa とも薬剤としては若年で免疫応答が良好であるのでインターフェロン (IFN) が第一選択となると考える。ステージ Ib は若年齢を過ぎても HBV-DNA 量の高値が持続する群で、発癌リスクはステージ IIb よりは低頻度であるがリスク大で抗ウイルス治療の必要がある。Suzuki ら⁴⁾ は多変量解析によって、高ウイルス群であることが YMDD 変異株出現に最も寄与する因子であることを報告しており、ラミブジン (ゼフィックス[®]) 単独での治療効果の持続は困難で、エンテカビルなどの抗ウイルス効果の強い薬剤あるいは併用治療が適応になると考えられる。ステージ

IIb は発癌リスクがきわめて大で抗ウイルス治療の絶対適応である。薬剤はラミブジンなどの核酸アナログ単独あるいは IFN, HB ワクチンとの併用の選択が考えられる。ステージ III の発癌数は全ステージ中最大で ALT 値の正異に関係なく発癌例がみられる。受診キャリア中の頻度も最大で、全例に対して治療が必要かどうかは今後の検討課題と考えられるが、少なくとも ALT 値異常の特に男性例は絶対適応であろう。薬剤は高年例が大半を占め、ラミブジンの治療効果が良好で YMDD 変異株の出現も低率であるため、現在のところラミブジンが第一選択であり、YMDD 変異株出現例にはアデホビル (ヘプセラ[®]) などの他の核酸アナログの併用あるいは切り替えて対応できると考えられる。ステージ IV はいわゆる臨床的治癒といわれる病態で、抗ウイルス治療の最終目標である。まれに発癌例を認めるが、治療の対象にはならない。ステージ V も非 B 非 C 肝癌におけるオカルト B 型肝癌の問題も残るが抗ウイルス治療の対象にはならないと考えられる。

おわりに●

B 型肝癌発癌抑止のためには、HBV キャリアがどの病期にいるかを診断することが肝要である。われわれが提唱したこの HB ステージ分類はその診断に有用と考える。治療適応例には早期に適切な抗ウイルス治療を開始し、発癌例を 1 名でも減少させたいと考えている。

文 献

- 1) 加藤道夫, 伊与田賢也, 結城暢一ほか: HB マーカーと発癌リスクよりみた HBV キャリアのステージ分類—適切な抗ウイルス治療の選択に向けて—。肝臓 45: 581-588, 2004
- 2) Orito, E., Ichida, T., Sakugawa, H. et al.: Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV

-
- infection in Japan. *Hepatology* 34 : 590-594, 2001
- 3) Orito, E., Mizokami, M., Sakugawa, H. et al. : A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 33 : 218-223, 2001
- 4) Suzuki, F., Tsubota, A., Arase, Y. et al. : Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 46 : 182-189, 2003

Rare Quasispecies in the YMDD Motif of Hepatitis B Virus Detected by Polymerase Chain Reaction with Peptide Nucleic Acid Clamping

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, Hiroshima, Japan

Key Words

Hepatitis B e antigen · Hepatitis B virus · Lamivudine · Peptide nucleic acid · YMDD mutant

Abstract

The emergence of drug-resistant mutants of hepatitis B virus (HBV) is a serious problem during antiviral therapy of patients with chronic hepatitis B. Lamivudine-resistant mutants with a mutation in the YMDD motif of reverse transcriptase of HBV emerge in approximately one half of the treated patients within 5 years. To date, the detection of YMDD mutants by polymerase chain reaction (PCR) with peptide nucleic acid (PNA) clamping is most sensitive. In this study, the performance of this method was evaluated in various clinical settings. The PCR-PNA method was able to detect the emergence of YMDD mutants 2–3 months earlier than the previously developed method involving restriction fragment length polymorphism. Further, rare quasispecies were detected by PCR-PNA in patients with chronic hepatitis B who were positive for hepatitis B e antigen (HBeAg). Many previously unrecognized mutants, such as those with YLDD and YMED, were found in them. Although precise sequence analyses of 10 patients identified YVDD and YIDD

sequences in 6 of them, only 1 patient had a typical YVDD sequence that was identical with that in the reported lamivudine-resistant strain. All HBV mutants with the YIDD sequence accompanied stop codon(s) in the overlapping envelope (S) gene, suggesting that these strains would have no relevance as regards the emergence of lamivudine resistance. These results suggest that it would be difficult to detect lamivudine-resistant mutants before the therapy and that they would have a greater ability to evade the attack of antiviral drugs by frequent nucleotide substitutions than previously expected.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

Infection with hepatitis B virus (HBV) is a serious healthcare problem worldwide. Only interferon, lamivudine representing (–)-β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and famciclovir standing for 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-yl)ethyl]-1,3-propanediol diacetate have been approved for the treatment of chronic hepatitis B. Lamivudine reduces HBV DNA loads to almost undetectable levels in most patients who receive it and reduces inflammatory

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
 E-Mail karger@karger.ch
 www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
 0142-5526/03/4606-0355\$19.50/0

Accessible online at
 www.karger.com/ol

Kazuaki Chayama, MD
 Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science
 Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences
 Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553 (Japan)
 Tel. +81 82 231 5180, Fax +81 82 233 6120, E-Mail chayama@hiroshima-u.ac.jp

activity in the liver [1–5], along with marked biochemical and histological improvements. However, HBV mutants resistant to lamivudine have appeared in some patients during their treatment with this drug [6–10]. An increase in virus load during therapy is seen, reflecting a viral breakthrough that often brings about biochemical flares-ups of liver enzymes. Such lamivudine-resistant mutants have a characteristic mutation converting the 552nd amino acid for methionine, in the YMDD motif of reverse transcriptase, to isoleucine (YIDD mutant) [11–13] or valine (YVDD mutant) [11, 13]. An additional amino acid substitution (L528M) is often identified along with the YVDD mutant. A mutant with both these mutations has been reported to have the strongest drug resistance [14–16].

A method has been developed by us for detecting lamivudine-resistant HBV mutants [8]. It is based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of HBV DNA sequences amplified by polymerase chain reaction (PCR), and can detect the emergence of such mutants a few months before virological breakthroughs. By means of this RFLP method, the takeover of lamivudine-resistant mutants by the wild-type HBV was found to occur after the withdrawal of lamivudine [8]. No lamivudine-resistant mutants were detected, however, in any patients before they were placed on lamivudine, which might be due to the sensitivity of this method, which is not high enough for detecting mutants in low concentrations. To further explore the possibility of there being drug-resistant mutants even before the commencement of therapy, we have developed a more sensitive method for detecting rare mutants amongst a vast majority of the wild-type HBV [17].

The method involved PCR with peptide nucleic acid (PNA) clamping [18–20], and could detect 10^2 copies of YMDD mutants in the presence of 10^6 copies of the wild-type HBV [17]. By means of this PCR-PNA method, YMDD mutants were detected in 1 of the 62 (1.6%) serum samples from patients with acute or chronic HBV infection positive for antibody to hepatitis B e antigen (anti-HBe) in serum who had not received lamivudine [17]. In addition, many YMDD mutants were found that had not been reported before [17]. In the present study, the analysis for YMDD mutants was conducted in serum samples from hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive patients, and many rare mutants were identified, some of which have not been documented previously.

Materials and Methods

Serum Samples

A total of 85 serum samples from 72 adult Japanese patients with HBV infection were studied, of whom 10 (14%) were positive for HBeAg and 62 (86%) for the corresponding antibody (anti-HBe) in serum. Lamivudine was given to 3 of the 10 (30%) HBeAg-positive patients and 19 of the 62 (31%) anti-HBe-positive patients. All serum samples were stored frozen at -80° until molecular biological examinations. All patients were negative for serum markers of hepatitis C virus (HCV) or human immunodeficiency virus type 1 infection.

Serological Markers of HBV Infection

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was determined by enzyme immunoassay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), and HBeAg as well as anti-HBe by radioimmunoassay (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Ill., USA). HBV DNA was determined by transcription-mediated amplification and hybridization-protection assay (Chugai Diagnostics, Tokyo, Japan), and the results were expressed as log genome equivalents (LGE) per milliliter. The lower detection limit of this assay is 3.7 LGE/ml, which is equivalent to 5,000 copies/ml. The activity of HBV DNA polymerase was determined by a radioassay (Perkin Elmer, Boston, Mass., USA) that has a lower detection limit of 30 cpm. The antibody against HCV (anti-HCV) was tested for by the third-generation enzyme immunoassay (Roche Diagnostics).

Detection of YMDD Mutants by PCR with PNA Clamping

HBV DNA was extracted from 100 μ l of serum by SMITEST (Genome Science Laboratories, Tokyo, Japan) and was dissolved in 20 μ l of H_2O . The first-round of PCR was performed with an outer primer set (PLF1: 5'-GGT ATG TTG CCC GTT TGT CC-3' and BR123: 5'-TTC CAA TTA CAT ATC CCA T-3') and a second-round PCR with an inner primer set (PLF2: 5'-CCT ATG GGA GTG GGC CTC AG-3' and PLR2: 5'-CCA ATT ACA TAT CCC ATG AAG TTA ACG GA-3'). The PNA used was an 18-mer (PNA 532: H₂N-CAC ATC ATC CAT ATA ACT-CON₂H) that exactly matches the original YMDD sequence (Fig. 1). The PNA-mediated PCR clamping method was optimized by changing the annealing temperature of PNA from 68 to 75 $^\circ$, and the PNA concentration from 1.25 to 10 μ M. The optimized PCR with PNA clamping was performed in a total volume of 25 μ l, consisting of a reaction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl and 15 mM MgCl₂], 0.2 mM each of dNTPs, 1 μ l of the DNA solution, 12.5 pmol each of primers, 150 pmol PNA 532 and 1 U Taq DNA polymerase (GeneAmp, Wako Pure Chemicals, Tokyo) along with 0.2 μ g of anti-Taq high (Toyobo, Osaka, Japan). The optimized amplification conditions included initial denaturation at 95 $^\circ$ for 4 min and 25 cycles of amplification (denaturation at 95 $^\circ$ for 45 s, PNA annealing at 73 $^\circ$ for 2 min, annealing and extension of primer at 63 $^\circ$ for 30 s), followed by the final extension at 63 $^\circ$ for 7 min. YVDD and YIDD mutants were detected by primer sets, PLF2 and TMApall: 5'-CAG ACT TGG CCC CCA ATA CCA CAT COT GCA-3' as well as YNSsp1: 5'-TTT CCC CCA CTG TTT GGC TTTC AGT AAT AT-3' and BR109: 5'-AAG GGA GTA GCC CCA ACG TT-3', as described previously [8]. YVDD and YIDD mutants can be detected after they had been digested by restriction enzyme *Afu*44I (Toyobo, Osaka, Japan) and *Ssp*I (Takara Shuzo, Otsu, Japan), respectively (Fig. 1). The error rate of the Taq DNA polymerase was estimated to be 1.76×10^{-5} per site when amplifying about 10^2 copies of plasmid under the same conditions as above and cloning and sequencing [17].

Fig. 1. The experimental design. PNA is an 18-mer oligonucleotide of antiparallel polarity, and exactly matches the YMDD sequence. The amplified HBV DNA sequences from YVDD mutants only become sensitive to digestion with *Afu44I* by a change from GAT to CAC triplet. Consequently, the amplified HBV DNA sequences from YIDD mutants alone become sensitive to digestion with *SspI* by a change from TAT to AAT triplet. Sequence positions are in accord with those of Ono et al. [23].

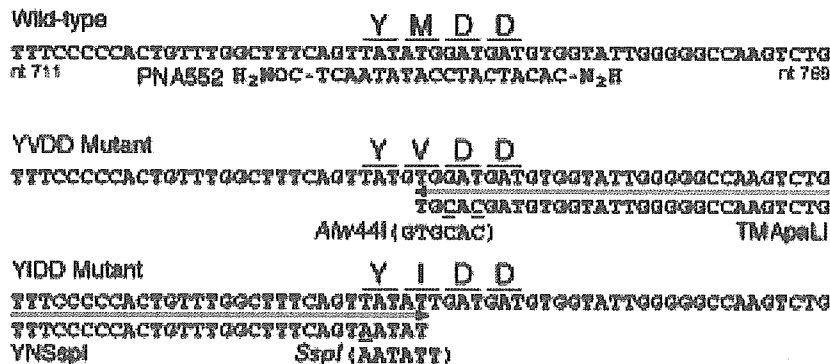
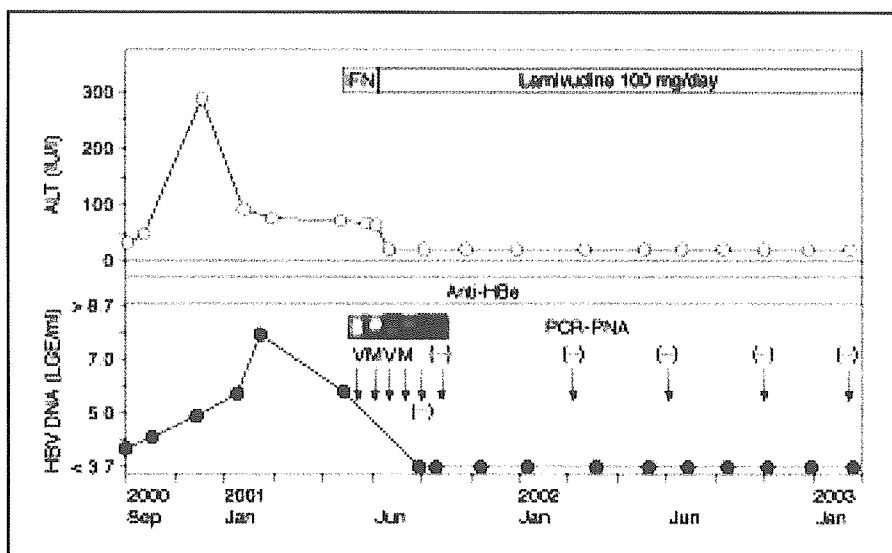


Fig. 2. Clinical and virological course of an anti-HBe-positive patient with chronic hepatitis B who possessed the YVDD mutant before the start of lamivudine therapy. The YVDD mutant was detected by PCR-PNA [17] in 2 of 4 serum samples obtained before lamivudine therapy. The patient responded to lamivudine completely. IFN = Interferon; V = YVDD mutant; M = wild-type with YMDD motif.



Cloning and Sequencing Rare YMDD Mutants

Products (1 µl) of the second-round of PNA-PCR were subjected to PCR with primers PLF2 and BR109 for 35 cycles (94° for 1 min; 58° for 1 min; 72° for 1.5 min) after initial denaturation at 94° for 4 min and followed by the final extension at 72° for 7 min. Amplicons were purified by electrophoresis on 2% (wt/vol) agarose gel and cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, Wis., USA) with the standard method, and then transformed into *Escherichia coli* JM 109 (Takara Shuzo, Otsu, Japan). Sequencing was performed in the ABI PLISMTM 310NT Genetic analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) with Big Dye terminator version 3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Independent clones from 10 patients, including 5 with HBeAg positive and 5 with anti-HBe, were sequenced for analysis.

Results

Detection of YMDD Mutants in a Patient before the Start of Lamivudine Therapy

Only 1 of 72 patients (1.4%) tested positive for YVDD mutants before they received lamivudine therapy. The detection of YMDD mutants was comparatively infrequent as in our previous study in which they were found in only 1 of the 62 (1.6%) patients with chronic hepatitis B with anti-HBe in serum [17]. It was much less, however, than the detection by others [21, 22] of YMDD mutants in patients before the commencement of lamivudine. The single patient in the present study was positive for anti-HBe and responded completely to lamivudine without any breakthroughs as illustrated in figure 2. When HBV DNA was extracted from serial frozen serum samples and analyzed, YVDD mutants were detected only twice; lami-

Fig. 3. Nucleotide and amino acid sequences of clones from a patient including the YMDD motif, a clone having a YMDD sequence. The sequence of clone 1 with YVDD mutation was the same as that reported with lamivudine-resistant YVDD mutants. The YIDD sequence in clone 2, however, was different from the reported lamivudine-resistant YIDD mutant in that it possessed TAT ATA in place of TAT and ATT. These substitutions induce a TAG stop codon in the overlapping envelope gene (shown by an asterisk). Other variants, such as YRDD and YMDN, were also found in this patient (data not shown).

| | PNA | | |
|----------|----------------------------------------------|--|-----|
| (V00027) | TGTTTGGCTTTCAGTATATGCGATATGCGATTGCGGCGCCAAAG | | pol |
| | C L A F S Y M D D V V L G A K | | HBs |
| | V W L S V I W M M W Y W G P S | | |
| Clone 1 | TGTTTGGCTTTCAGTATATGCGATATGCGATTGCGGCGCCAAA | | pol |
| | C L A F S Y V D D V V L G A K | | HBs |
| | V W L S V M W M M W Y W G R W | | |
| Clone 2 | TGTTTGGCTTTCAGTATATGCGATATGCGATTGCGGCGCCAAA | | pol |
| | C L A F S Y I D D V I L G A K | | HBs |
| | V W L S V I * M M * Y W G R W | | |
| Clone 3 | TGTTTGGCTTTCAGTATATGCGATATGCGATTGCGGCGCGAAG | | pol |
| | C L A F S Y R D D V V L G A K | | HBs |
| | V W L S V I G M M W Y W G R S | | |
| Clone 4 | TGTTTGGCTTTCAGTATATGCGATATGCGATTGCGGCGCCAAAG | | pol |
| | C L A F S Y M D N V V L G A K | | HBs |
| | V W L S V I W M M W Y W G R S | | |

vudine suppressed HBV very well in this patient. The patient was negative for HBV DNA by PCR during therapy, and he experienced no breakthroughs (fig. 2).

To confirm the presence of YVDD mutants, HBV DNA clones were propagated from his pretreatment sera and sequenced. Many unusual mutants with mutations in the YMDD motif were recovered. Only 1 of the 43 (2%) clones had the YVDD sequence. The wild-type sequence (YMDD) was detected in 6 of the 43 clones (14%). Notably, 26 of these 43 clones (61%) possessed a stop codon in the overlapping envelope (S) gene. None of the 16 clones that had been obtained by PCR without PNA clamping disclosed any nucleotide mutations or amino acid substitutions in the YMDD motif (table 1, fig. 3). Only a few mutations were detected in the sequences where PNA does not anneal.

Detection of YMDD Mutants in a Patient with Chronic Hepatitis B Who Rebounded after the Withdrawal of Lamivudine

Serial serum samples from 1 patient who rebounded after the withdrawal of lamivudine therapy were examined. The activity of HBV-DNA polymerase started to increase soon after the patient was taken off lamivudine (fig. 4). Both YIDD and YVDD mutants were detected with the RFLP method [8] while he was receiving lamivudine. However, the YIDD mutant was detected about 2 months earlier with PCR with PNA clamping than with the RFLP method. After the withdrawal of lamivudine, both YIDD and YVDD mutants became undetectable

Table 1. Amino acid sequences of YMDD variants in HBV DNA clones from a patient before lamivudine therapy tested with or without PNA

| Mutation | With PNA (n = 43) | Without PNA (n = 16) |
|----------|----------------------|-------------------------|
| YMDD | 6 (14) | 16 (100) |
| YVDD | 1 (2) | 0 |
| YIDD | 13 (30) ^a | 0 |
| YRDD | 3 (7) | 0 |
| YMDN | 10 (23) ^b | 0 |
| YIND | 3 (7) ^a | 0 |
| YINN | 7 (16) ^a | 0 |

Figures in parentheses represent percentage.

^a Created a stop codon in the overlapping envelope (S) gene in the YMDD motif.

^b Included the three clones with a stop codon in the overlapping envelope gene.

with the RFLP method, but they were still detectable with PCR with PNA clamping immediately after the rebound. Neither of these mutants, however, was detectable by either detection method 3 years thereafter. These results indicate that PCR with PNA clamping is useful for monitoring the appearance and disappearance of YMDD mutants during and after lamivudine therapy.

Fig. 4. Clinical and virological course of an HBeAg-positive patient with chronic hepatitis B who developed YMDD mutants during lamivudine therapy. The results of detecting YMDD mutants with the RFLP method of Chayama et al. [8] without PNA clamping and the PCR with PNA clamping [17] are compared. SNMC = Stronger Neo-Minophagen C (Minophagen Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan); M = wild type with YMDD motif; I = YIDD mutant; V = YVDD mutant.

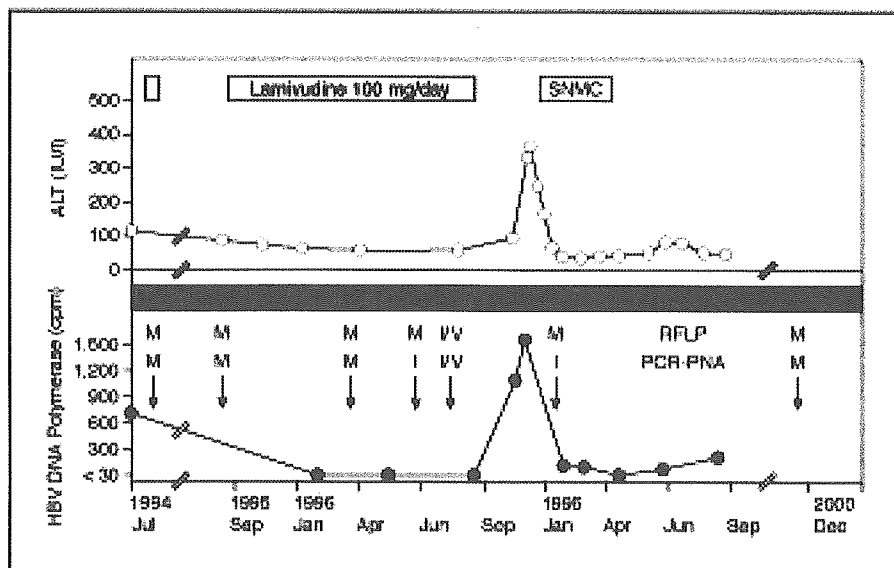


Table 2. Amino acid sequences of YMDD variants in HBV DNA clones from nine patients who tested negative for them by PCR with PNA clamping before or without lamivudine therapy

| | Clone | YMDD | YIDD | YVDD | YLDD | YMDN | YMND | YMNN | YMED | YMHD | YIND | YINN |
|------------------------|-------|----------|---------------------|-------|--------|--------|---------------------|---------------------|-------|-------|---------------------|---------------------|
| Anti-HBe | | | | | | | | | | | | |
| Patient 1 | 10 | 4 (40) | 2 (20) ^a | 0 | 0 | 0 | 3 (30) ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (10) ^a |
| Patient 2 | 10 | 0 | 5 (50) ^a | 0 | 0 | 0 | 3 (30) ^a | 1 (10) ^a | 0 | 0 | 0 | 1 (10) ^a |
| Patient 3 ^b | 11 | 10 (91) | 0 | 0 | 0 | 1 (9) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Patient 4 | 10 | 10 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HBeAg | | | | | | | | | | | | |
| Patient 5 | 11 | 9 (82) | 0 | 0 | 1 (9) | 0 | 0 | 0 | 1 (9) | 0 | 0 | 0 |
| Patient 6 | 11 | 3 (27) | 8 (72) ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Patient 7 | 11 | 5 (45) | 0 | 1 (9) | 0 | 2 (18) | 2 (18) ^a | 0 | 0 | 1 (9) | 0 | 0 |
| Patient 8 | 10 | 2 (20) | 3 (30) ^a | 0 | 0 | 0 | 3 (30) ^a | 0 | 0 | 0 | 2 (20) ^a | 0 |
| Patient 9 ^c | 11 | 1 (9) | 3 (27) ^a | 0 | 3 (27) | 1 (9) | 0 | 1 (9) ^a | 0 | 0 | 1 (9) ^a | 1 (9) ^a |
| Total | 95 | 44 (47) | 21 (22) | 1 (1) | 4 (4) | 4 (4) | 11 (12) | 2 (2) | 1 (1) | 1 (1) | 3 (3) | 3 (3) |

Figures in parentheses represent percentage.

^a Created a stop codon in the overlapping envelope (S) gene.

^b Developed viral breakthrough after 21 months on lamivudine.

^c Developed viral breakthrough after 7 months on lamivudine.

Detection of YMDD Mutants in Patients with Chronic Hepatitis B

Although the YVDD mutant was detected in only 1 of 72 patients with PCR-PNA and restriction enzyme digestion analyses, we went on to analyze quasispecies of HBV in this region in 9 additional patients by cloning and sequencing. Multiple clones from 4 patients with anti-

HBe and 5 with HBeAg were examined for YMDD mutants. Only 1 patient, who tested positive for anti-HBe in serum, did not exhibit YMDD mutants (patient 4 in table 2). However, their YMDD clones had a unique nucleotide sequence (TAC ATG GAT GAT); the biological relevance of these substitutions is unknown.

YIDD sequences were detected in 5 patients, with the incidence of YIDD mutants in 60% of the 10 patients examined (including the patient positive for YVDD mutant). However, all these YIDD sequences were different from the typical lamivudine-resistant strain (TAT ATT GAT GAT) and they all possessed a stop codon in the overlapping envelope (S) gene (clone 2 in fig. 3). This suggests that these clones with YIDD mutation would represent defective that were unrelated to typical lamivudine resistance.

Discussion

Although lamivudine is effective in suppressing viral replication and lowering alanine aminotransferase levels in serum [1-5], a frequent emergence of YMDD mutants detracts enormously from its effects [6-10]. It is not known, however, if such mutants exist before the therapy. In an attempt to detect YMDD mutants, we previously developed a PCR-based RFLP method that can sensitively identify YVDD and YIDD mutants [8]. The RFLP method is not sensitive, however, in detecting a minor population of YMDD mutants that coexist with the vast majority of the wild-type HBV without mutations in the YMDD motif. Only 10^3 copies of YMDD mutants were detected when mixed with 10^4 copies of the wild-type HBV, even when wild-type sequences were digested by restriction enzyme in the products of the first-round PCR. Hence the sensitivity was not sufficient for detecting very small amounts of mutants that exist among overwhelming numbers of the wild-type virus. We developed, therefore, a more sensitive detection method of mutants by using PCR with PNA clamping [17].

Although the PCR-PNA method could detect YMDD mutants 10- to 100-fold more sensitively than the previous PCR-RFLP method [17], such mutants were not detected in sera from patients before the start of lamivudine, even though they later developed a viral breakthrough within 1 year on lamivudine (patient 9 in table 2). This suggests that it would be very difficult to detect YMDD mutants before the commencement of therapy by increasing the sensitivity of the methods. It does need to be pointed out that the patients who tested positive for YVDD mutant did not develop a breakthrough during at least 23 months and showed a good response to the therapy. This suggests that the YMDD mutant detected in our patient might have been an incompetent virus that would have a mutation in the other part of the genome not analyzed so far. Combined, these observations suggest that

increasing the sensitivity of the assay per se would be inappropriate for detecting mutants before therapy. Different approaches should be considered in selecting patients suitable for antiviral treatments.

Previous studies have found YMDD mutants in pre-treatment sera from the patients who tested positive for anti-HBe [17, 21, 22]. The detection goes along with the fact that HBV sequences with multiple substitutions exist in the patients who are mounting active immune responses against HBV with anti-HBe immune responses. In fact, 5 patients with HBeAg were found to harbor many YMDD mutants in the present study. This suggests that mutants would not be exclusive for the patients who are under immune pressure against HBV with anti-HBe in serum. Many mutants identified in this study and a previous study [17] underscore the production of a number of mutants during viral genome synthesis. Only a part of these mutants might be able to survive and produce their progeny and evolve under the immunological pressure. Further study should be directed to gain a full profile of rare quasispecies of HBV mutants, which would help understand the mechanism for the emergence of drug-resistant HBV mutants. Detection of rare quasispecies by PCR with PNA clamping will be a useful tool in monitoring for YMDD mutants arising before and after lamivudine therapy.

Acknowledgments

This work was carried out at the Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Hiroshima University. We thank Eiko Okutani, Chiemi Nagachi, Kiyomi Toyota for their excellent technical assistance, and Yutaka Fujii for helpful comments. This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

References

- Lai CL, Ching CK, Tang AK, Li E, Young J, Hill A, Wong BC, Dent J, Wu PC: Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers: A placebo-controlled trial. *Hepatology* 1997;25:241-244.
- Nevens F, Main J, Honkoop P, Tyrrell DL, Barber J, Sullivan MT, Fevery J, De Man RA, Thomas HC: Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: A six-month randomized dose-ranging study. *Gastroenterology* 1997;113:1258-1263.
- Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Haan HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA: Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;341:1256-1263.
- Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Tsubota A, Kobayashi M, Koike M, Ogawa N, Tanikawa K: Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1999;30:743-748.
- Liew YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DT, Ng KY, Chen RN, Dent J, Roman L, Edmundo S, Lai CL: Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;119:172-180.
- 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.
- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD: Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998;27:1670-1677.
- Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike M, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Muraishi N, Ikeda K, Kamada H: 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.
- Liew YF, Chen RN, Yen 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.
- Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Lau KH, Yoshida H, Carrilho FJ, Omata M: Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999;103:1635-1640.
- Ling R, Mulimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ: Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-713.
- Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Ban VG, Knutson NM, Tyrrell DL: Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996;24:714-717.
- Barilolomew MM, Jensen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Buzzardahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA: Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-22.
- Xiong X, Flores C, Yang H, Taale JJ, Gibbs CS: Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998;28:1669-1673.
- Grafreund KS, Williams M, George R, Bain VG, Ma MM, Yoshida EM, Villeneuve JP, Fischer KP, Tyrrell DL: Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000;33:469-475.
- Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schanzel RF, Carrilho FJ, Omata M: The polymerase I528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001;107:449-455.
- Ohishi W, Shirakawa H, Kawakami Y, Kimura S, Kamiyama M, Tazuma S, Nakamichi T, Chayama K: Identification of rare polymerase variants of hepatitis B virus using two-stage PCR with peptide nucleic acid clamping. *J Med Virol*, in press.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991;254:1497-1500.
- Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993;365:566-568.
- Zhong S, Nguyen NY, Eggertson TE: Detection of apolipoprotein B mRNA editing by peptide nucleic acid mediated PCR clamping. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:311-313.
- Kobayashi S, Ide T, Sata M: Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001;34:584-586.
- Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Murita A, Toyama T, Minami M: 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.
- Ono Y, Onda H, Satada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioke K: The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA: subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1747-1757.

Identification of Rare Polymerase Variants of Hepatitis B Virus Using a Two-Stage PCR With Peptide Nucleic Acid Clamping

Waka Ohishi, Hiroo Shirakawa, Yoshiiku Kawakami, Sonoko Kimura, Masaya Kamiyasu, Susumu Tazuma, Toshio Nakanishi, and Kazuaki Chayama*

Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

Emergence of lamivudine-resistant variants, with amino acid substitutions in the Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) motif of hepatitis B virus (HBV) reverse transcriptase, is a serious problem in antiviral therapy. Presence of YMDD motif variants in patients who had never been treated with lamivudine has been reported recently. However, no analysis of nucleotide and amino acid sequences of these variants has been performed. In the present study, using polymerase chain reaction (PCR) with peptide nucleic acid (PNA) clamping, we detected many new variants, such as Tyr-Arg-Asp-Asp (YRDD), Tyr-Met-Asp-Asn (YMDN). Many of them had stop codon(s) in overlapping HBs gene. Although the biological activity of these HBV polymerase variants remains to be determined, our results showed that numerous quasispecies are created during virus replication. A typical lamivudine-resistant Tyr-Val-Asp-Asp (YVDD) variant was detected in only one of 62 (1.6%) anti-HBe patients with HBV infection before administration of lamivudine. This variant did not have the L528M mutation, which is often associated with YVDD variants, and lamivudine therapy in this patient suppressed HBV replication. Thus, care should be taken when interpreting the results of detection of YMDD variants, especially when the sensitivity of the assay is very high. Amplification of rare variants by PCR with PNA seems a useful tool to examine the emergence of drug-resistant variants as well as naturally occurring mutants, such as the hepatitis B e antigen (HBeAg) stop codon and vaccine escape mutants. Examination of rare variants should enhance the understanding of the mechanism for emergence of drug-resistant HBV variants and help in developing strategies for new antiviral drugs. *J. Med. Virol.* 72:558–565, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B virus; peptide nucleic acid; lamivudine; quasispecies; YMDD variant

INTRODUCTION

Chronic viral infections are serious health problems worldwide. Antiviral therapy using nucleotide analogs is effective in reducing viral load and disease activity. Lamivudine, (–)-β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) and famciclovir, 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-yl) ethyl]-1,3-propanediol diacetate have been shown to reduce hepatitis B virus (HBV) DNA load and reduce inflammatory activity in the liver [Honkoop et al., 1997a; Lai et al., 1997, 1998; Nevens et al., 1997; Dienstag et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Liaw et al., 2000] although their effects on patient survival have not yet been determined.

The emergence of drug-resistant variants is one of the most serious problems associated with antiviral therapy. Lamivudine is the most widely used anti-HBV drug worldwide. It is known to inhibit both HBV and human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase [Honkoop et al., 1997a; Lai et al., 1997, 1998; Nevens et al., 1997; Dienstag et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Liaw et al., 2000]. Although the initial effect of the drug is excellent in suppressing HBV replication and reducing alanine aminotransferase activity, the emergence

*Correspondence to: Prof. Kazuaki Chayama, Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan.
E-mail: chayama@hiroshima-u.ac.jp

Accepted 25 November 2003

DOI 10.1002/jmv.20026

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)