

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

PKR によるペグインターフェロンによる抗 HCV 作用の評価と、腹腔鏡下摘脾後治療の試み

分担研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：ペグインターフェロンによる抗 HCV 療法は標準的な治療法となったが、その治療効果を左右する key molecule として PKR に注目した。インターフェロン(IFN)投与後末梢血 T cell を単離し PKR mRNA を定量したところ、ウイルスが 12 週以内に消失する群では 13 週以降に消失する群に比べて投与後の PKR mRNA が増加しており、PKR の重要性が確認されるとともに治療効果の予測になりうる可能性が示唆された。また、IFN 導入が困難な血小板数低下症例において腹腔鏡下摘脾術を施行し、全例でペグインターフェロン治療の導入が可能であった。腹腔鏡による摘脾術は比較的侵襲が少なく、IFN 導入の一助となりうると思われる。

### 共同研究者

|       |                    |
|-------|--------------------|
| 日浅陽一  | 愛媛大学医学部第三内科 助手     |
| 小西一郎  | 愛媛大学医学部統合医科学講座 助手  |
| 道堯浩二郎 | 愛媛大学医学部光学医療診療部 助教授 |
| 堀池典生  | 愛媛大学医学部第三内科 助教授    |

### A. 研究目的

ペグインターフェロン治療による抗ウイルス治療は HCV 排除の標準的な治療法となりつつある。インターフェロン(IFN)により誘導される interferon stimulating gene (ISG)の中で抗 HCV 作用の key molecule として Protein kinase R (PKR)が注目されるが、PKR による抗 HCV 作用が IFN の著効に寄与するかどうかについては否定的な報告もある。我々は in vitro の HCV 増殖系で IFN の抗 HCV 効果における PKR の重要性について報告している。IFN 治療における PKR の役割を検討するため、ペグインターフェロン治療中の HCV 患者から末梢血 T リンパ球を単離し、PKR mRNA 発現量の経時的変化とインターフェロン治療効果の関係を比較した。またインターフェロン治療が難しい血小板減少例に対して比較的侵襲の少ない腹腔鏡下摘脾術を施行して、IFN 治療の導入を試みた。

### B. 研究方法

ペグインターフェロン投与前、および投与後 4 時間、8 時間、12 時間、1 週後、2 週後にヘパリン加採血してリンパ球を回収した。IFN 投与により cell population 変化の影響を除外するため、T cell を MACS により単離し、均一な細胞集団でペグインターフェロン投与後の PKR mRNA 発現量の経時的変化を real-time RT-PCR で定量し検討した。IFN 投与後 12 週で HCV-RNA が陰性化した early virological response (EVR) のみられた症例と、13 週以降に HCV-RNA が陰性化した 2 群に分けて検討した。Housekeeping gene として GAPDH mRNA を定量し、PKR mRNA/GAPDH mRNA コピー比で評価した。

血小板数低下症例の 5 例に対して、腹腔鏡下で摘脾術を施行しペグインターフェロン+リバビリン併用療法を導入した。両群の摘脾前後の血球系の変化、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法後の血球系の変化について検討した。

### C. 研究成果

ペグインターフェロン治療後の末梢血 T cell における PKR mRNA 量の検討では、IFN 投与後 4 時間から 2 週後にかけて EVR の得られた群では EVR 陰性群に比べて PKR mRNA が低い傾向があり、特

に投与後 8 時間後、12 時間後で PKR mRNA/GAPDH mRNA 比は有意に低かった ( $p < 0.05$  by Mann-Whitney U-test)。ペグインターフェロン治療による抗HCV効果が得られる症例群ではIFNによりPKR mRNAの発現が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。

腹腔鏡下摘脾術を施行した摘脾例は非摘脾例と比較して血小板数の中央値が 6.4 v.s. 12.0 万/ $\mu$ l、アルブミン値 3.1 v.s. 3.9 g/dl、プロトロンビン時間 76.2 v.s. 100.3 %と線維化の進行した症例が多かったが、性別、年齢、白血球数、好中球数、ヘモグロビン値に差はみられなかった。5 例のうち 1 例で術後胸水貯留があったが自然に消退した。他の症例では特に合併症はみられなかった。摘脾後の血球系の変化は、白血球総数、血小板数は増加した ( $p < 0.05$ ) が、好中球数には差がみられなかった。ヘモグロビン値も差がみられなかった。全例 1 型高ウイルスでありペグインターフェロン+リバビリン併用療法を導入可能であった。摘脾例、非摘脾例の IFN 投与開始 4 週目における血球系の変化は、白血球数、好中球数、ヘモグロビン値の変化に差はみられなかった。

#### D. 考察

ペグインターフェロン治療後の末梢血 T cell における PKR mRNA は増加し、その発現程度は IFN 投与後のウイルス消失時期に関係した。IFN 治療後 12 週以内でウイルスが消失した EVR 症例群では 13 週以降に消失した非 EVR 群に比べて PKR mRNA の発現がより強くみられたことから、IFN による HCV 排除に PKR が重要な役割を果たしており、また治療効果の予測にも有用である可能性が示唆された。

また血小板減少症例に腹腔鏡下摘脾術を施行した症例では、全例でペグインターフェロン+リバビリン併用療法が可能であった。線維化の進行した血小板減少症例において、摘脾術により IFN 総投与量の増加および治療効果の改善が見込まれる。腹腔鏡下摘脾術は、開腹による摘脾術に比べて侵襲が少なく、抗ウイルス療法導入のための一助と

なりうると期待される。

#### E. 結論

インターフェロンによる HCV 排除に PKR は key molecule であり、抗ウイルス効果の予測に有用な指標となりうる可能性がある。また、インターフェロン導入の難しい血小板減少症例に対して腹腔鏡による摘脾術は、比較的侵襲が少なく、IFN 治療導入の有用な手段となる可能性がある。

#### F. 健康保険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hiasa Y, Blackard JT, Lin W, Kamegaya Y, Horiike N, Onji M, Schmidt EV, Chung RT. Cell-based models of sustained, interferon-sensitive hepatitis C virus genotype 1 replication. *J Virol Methods* 132:195-203, 2006.

Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis* 192:258-265, 2005.

##### 2. 学会発表

1) 日浅陽一、徳本良雄、小西一郎、眞柴寿枝、世良俊樹、道堯浩二郎、堀池典生、恩地森一. 肝細胞由来HCV複製系におけるインターフェロンとリバビリンによるインターロイキン-8産生亢進とHCV発現阻害. 第41回日本肝臓学会総会 (2005.5.16-17 大阪府大阪市)

2) 日浅陽一、徳本良雄、堀池典生. PKRによるC型肝炎ウイルス増殖制御. 第9回日本肝臓学会大会 (2005.10.5-6 兵庫県神戸市)

3) Hiasa Y, Tokumoto Y, Konishi I, Sera T,

Michitaka K, Horiike N, Chung RT, Onji M.  
Expression of HCV is regulated by PKR.  
12<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis  
C Virus and Related Viruses.  
(2005.10.2-10.6 Montreal, Canada)

- 4) Tokumoto Y, Hiasa Y, Konishi I, Sera T,  
Michitaka K, Horiike N, Chung RT, Onji M.  
Expression of HCV is regulated by PKR.  
56<sup>th</sup> Annual Meeting of the American  
Association for the Study of Liver Diseases.  
(2005.11.11-11.15 San Francisco, CA, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### 血小板低下をともなう C 型肝炎に対する部分的脾動脈塞栓術（PSE）併用 IFN 療法の有用性について

分担研究者 清家正隆 大分大学医学部 消化器内科助手

研究要旨：血小板低下を来たした C 型肝炎例では、ウイルス排除を目指すインターフェロン（IFN）療法は、減量や中止を余儀なくされる。そこで血小板低下を来たした C 型肝炎 30 例において部分的脾動脈塞栓療法（PSE）を行い、効果と安全性を検討した。平均年齢は  $63 \pm 1.4$ 。男性 16 名、女性 14 名。平均観察期間 24 ヶ月。この中で PSE 後 15 例は IFN、11 例は RFA、2 例は low-dose FP を行い、1 例は経過観察した。PSE 後血小板を 10 万以上にするためには、PSE 前の血小板数は 4 万以上必要であった。PSE 後、発熱、腹痛が生じたが、鎮痛剤や解熱剤でコントロール可能であった。PSE 後 IFN を導入した 15 例のうち、8 例で効果判定可能であった。SVR、BR、NR はそれぞれ 37.5%、25.0%、37.5% であった。IFN 減量例は 15 例中 6 例（40%）で、1 例抑うつで中止した。血小板低下症例では PSE 後 2 週間前後で IFN 導入が可能であった。

#### 分担者氏名

姫野克郎、高橋祐幸、森 哲  
大分大学医学部消化器内科

#### A. 研究目的

C 型肝炎では進展すると脾機能亢進を来し、血小板数が低下する。血小板数が低下した例では、インターフェロン療法の完遂が困難であり、減量や中止を余儀なくされる。そこで血小板低下を来した例に部分的脾動脈塞栓療法（以下 PSE）を行い、血小板数を回復させ、IFN 投与を行った。PSE の安全性と効果を示し、PSE 併用 IFN の有用性を検討した。

#### B. 研究方法

PSE はマイクロカテーテルを脾動脈末梢に挿入し、コイルまたはスポンゼルで脾臓を 50-70% 塞栓した。PSE を行った 30 症例の血小板の推移と安全性を検討した。次に IFN を投与した 15 例でその効果を検討した。

#### C. 研究結果

PSE 後 2 週間で血小板は約 2 倍から 2.5 倍に上昇した。発熱は必発で、腹痛を伴う例も多いが、解熱剤や鎮痛剤でコントロール可能であった。PSE 後血小板数が 10 万以上得るためには、PSE 前の血小板は 4 万以上必要であった。PSE 後 2 週間で IFN 導入が可能であった。IFN は 15 例に投与した。平均年齢は 61 歳。男性 9 例女性 6 例。1 型は 10 例、2 型は 3 例。不明が 2 例であった。10 例は高ウイルス量、5 例は低ウイルス量の症例であった。初回投与は 7 例、再投与は 8 例であった。投与方法は IFN 単独が 5 例、併用は 10 例であった。効果判定は 8 例に行った。SVR は 8 例中 3 例で、BR は 8 例中 2 例。NR は 8 例中 3 例であった。IFN の減量は 6 例（40%）で、中止例は 1 例であった。

#### D 考察

血小板低下を伴った C 型肝炎では進行例が多く、肝炎の治療とともに肝癌の治療を必要とすることが多い。肝炎に対する IFN 治療、特にペグイ

インターフェロンを用いる場合、血小板数により減量や中止基準が設けられているため、血小板数が低値であると治療継続に制約が生じる。また、肝癌の治療においても血小板数が5万以下になると血小板輸血を併用し局所療法を行う必要があり、さらに再発予防のためのIFNも必要となる。そのため血小板低下を伴う進行したC型肝炎では、肝炎・肝癌治療の統合が必要で、PSEは欠かせない手技となっている。今回IFN治療のため用いたPSE症例と肝癌治療に用いたPSE症例を分析し安全性とその効果を検討した。その結果、PSE後2週間前後で血小板数は回復し、IFNを安全に導入できた。

15例のPSE後IFN投与例の検討で中止例は1例のみで、減量も40%にすぎず、投与継続が可能であった。

今後脾臓摘出後のIFNの投与例との違いを検討する必要がある。今回の検討ではPSE前の血小板数が4万以下ではPSE後十分な血小板増加が得られなかった。

## E. 結論

血小板低下を伴ったC型肝炎の症例では、PSEが有用であり、PSE後2週間後にIFNを安全に導入できることが示唆された。

## F.健康危険情報

特記すべきことなし。

## G.研究発表

### 1.論文発表

なし

### 2.学会発表

森 哲、清家正隆、山下勉：部分的脾動脈塞栓療法（PSE）を併用した肝細胞癌（HCC）治療の成績．第41回日本肝癌研究会、幕張、2005.6.2

本田浩一、秦順子、清家正隆：部分的脾動脈塞栓療法後のインターフェロン治療についての検討．第86回日本消化器病学会九州支部例会.2005.11.18

## H.知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### B 型慢性肝炎 Lamivudine 治療中の HBcrAg 測定の意義

分担研究者 清澤 研道 信州大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：B 型肝炎の抗ウイルス剤であるラミブジン治療における耐性株予測と治療中止基準の検討を行った。新たな B 型肝炎ウイルス測定法である HBV 関連抗原測定法を開発し、HBV DNA と比較した。

当科において、B 型慢性肝炎に対し LAM を 1 年以上投与した 41 例（男：女=31：10 例、平均年齢 52 歳、観察期間中央値 39 ヶ月）の耐性株出現率は 13/41 (32%) であり、耐性株出現時期の中央値は 17 (8.3・55.3) ヶ月であった。ラミブジンの耐性株出現率は年率 12% であった。HBV DNA はラミブジン治療開始後速やかに減少し、それに対し、コア関連抗原は徐々に低下した。治療開始 6 ヶ月目で HBV DNA が陽性であった 5 例中 4 例は耐性株が出現していたが、耐性株の出現した残りの 8 例は HBV DNA が測定感度以下となっていた ( $p=0.01$ )。それに対し、コア関連抗原が 6 ヶ月目で 4.5 logU/mL 未満になった 13 例中 12 例からは耐性株の出現は見られなかった ( $p=0.05$ )。HBV DNA は耐性株出現の、HBV コア関連抗原は非出現の予測に有用であると思われた。

#### 共同研究者

田中榮司 信州大学医学部消化器科 助教授  
松本晶博 信州大学医学部消化器科 助手

#### A. 研究目的

B 型肝炎のラミブジンによる治療では投与開始と共に速やかに HBV DNA が減少し、ALT の改善がみられ、肝の線維化が改善されていく。しかしながら、長期投与により高率にラミブジン耐性株が出現し、HBV DNA の再上昇と肝炎の再燃が見られ、時に重症化し死亡する例も見られる。したがって、耐性株の出現を予測する事は临床上極めて重要である。しかしながら、耐性株出現を予測することは難しく、HBV DNA の治療に対する反応性を見るだけでは不十分であった。我々は新しい B 型肝炎ウイルスの測定法であるコア関連抗原測定法を開発し、その耐性株出現に対する有用性を検討した。

#### B. 研究方法

1992 年以降にラミブジン治療を開始し、1 年以上経過観察し得た B 型慢性肝炎患者 41 例（男

性 31 例、女性 10 例、平均年齢 52 歳）を対象とした。観察期間中央値は 39 (19 - 62) ヶ月であった。間歇投与を行った 3 例を除いては、ラミブジンは 100mg/day をほぼ毎日内服した。間歇投与例については、一旦ラミブジン投与を中止し、HBV DNA の上昇および ALT の再燃が観察されたところでラミブジンの投与を再開した。各症例について定期的に肝機能検、HBe 抗原、HBe 抗体および HBV DNA (PCR 法または TMA 法) を測定した。また、経時的に保存された血清を用いて HBV コア関連抗原を測定した。

HBV コア関連抗原は患者血清 100  $\mu$ l を用い、前処置液にて HBe 抗原、HBc 抗原を変成させリニアエピトープに変換し、共通の補足プローブと検出プローブを用いて CLEIA 法にて測定をおこなった。

(倫理面への配慮)

血清の採取および HBV コア関連抗原の測定については各患者より文章にて了承を得ている。

C. 研究結果

観察期間中にラミブジン耐性株が出現したのは41例中13例(32%)であった。年率では約12%と従来の報告とほぼ同率であった。耐性株出現までの期間の中央値は17(8.3-55.3)ヵ月であった。耐性株出現群と非出現群について、ラミブジン投与後のHBV DNAの変化を比べてみると、耐性株非出現群では投与開始後速やかにHBV DNAは低下し、投与開始6ヵ月目では全例PCR法で測定感度以下(<2.6 log copies/mL)となっていた。耐性株出現群では13例中5例(38.5%)でHBV DNAが陽性であったが、残りの8例では開始後速やかにHBV DNAが減少し測定感度以下となっていた。それに対し、HBV コア関連抗原では投与開始後徐々に低下し、耐性株非出現例では28例中10例(35.7%)で6ヵ月目に4.5 log U/mL未満となっていた。耐性株出現例では13例中12例で4.5 logU/mL以上であった。

耐性株の出現率をKaplan Meier法 Log-Rank testにて検討すると、HBV DNAでは6ヵ月後のHBV DNAが2.6 log copies/mL以上の群で2年後の耐性株出現率は80%、未満の群で22%であり、両者には有意差を認めた(p<0.01)(図1)。HBV コア関連抗原では6ヵ月後のHBV コア関連抗原が4.5 logU/mL以上の群で2年後の耐性株出現率が40%、未満の群で0%であり、やはり両者には有意差を認めた(p=0.05)(図2)。6ヵ月目のコア関連抗原が5.5 log U/mL未満で耐性株が出現した1例は治療開始時のHBe抗原陰性、HBe抗体陽性であり、耐性株出現時期は治療開始55ヵ月後であった。

図1. ラミブジン投与開始後6ヵ月目のHBV DNA量と耐性株出現率(Kaplan-Meier法)

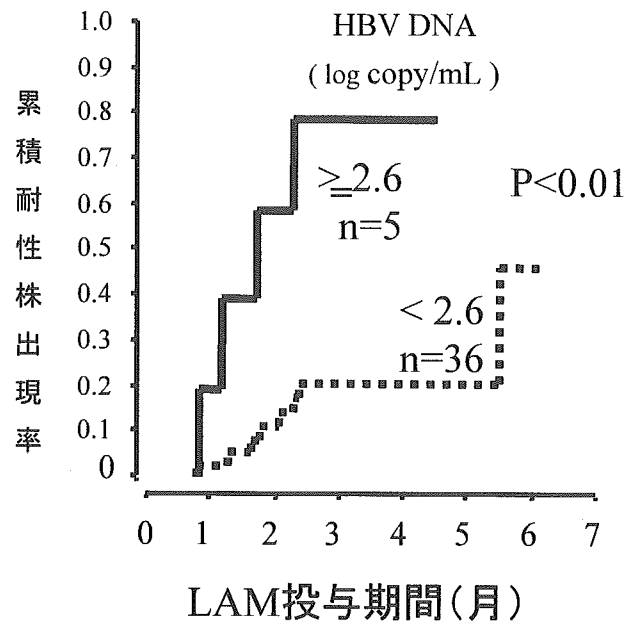
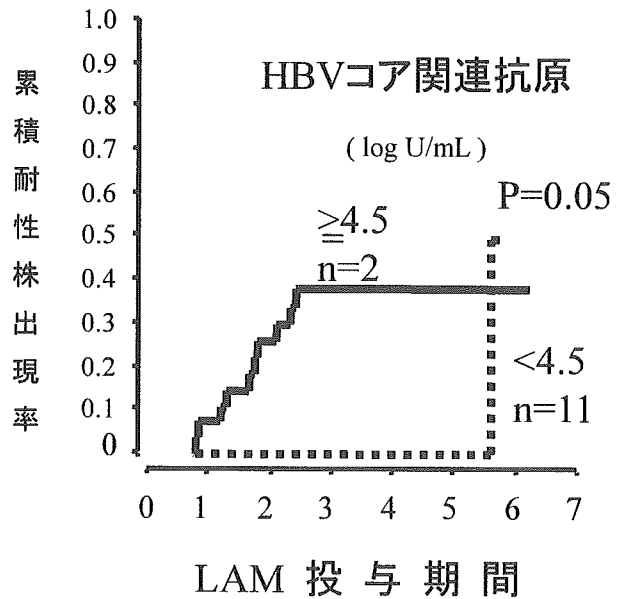


図2. ラミブジン投与開始後6ヵ月目のHBVコア関連抗原量と耐性株出現率(Kaplan-Meier法)



#### D. 考察

B 型慢性肝炎に対するラミブジン治療はこれまでの B 型慢性肝炎に対する治療を一変させた。経口で、副作用も少ないため、肝硬変末期で、肝不全が進行し他の治療が難しい症例でも比較的 safely に治療導入でき、HBV DNA を低下させ、ALT を改善することによって肝予備能を改善させ、肝不全症状や肝線維化を改善することができる。しかしながら、長期に投与すると高率に耐性株が出現し、肝炎が再燃して、中には生命的に危険になる症例も見られる。それ故、耐性株の出現を予測することはラミブジン治療において重要な問題である。

従来、ラミブジンの耐性株出現予測には治療開始前の ALT 値や治療中の HBV DNA の変化を見ることが重要であった。しかしながら、いずれも単独では不十分であり、新たな指標が求められていた。

これまで我々は、新たな B 型肝炎ウイルス測定計として HBV コア関連抗原測定法を開発し、その臨床的有用性を検討してきた。2003 年に行われた多施設共同の 66 例(平均投与期間 14.4 ヶ月)の検討では、HBV コア関連抗原量が治療開始 6 ヶ月後の時点で 5000 u/mL 未満の群で有意に耐性株出現が少なかった( $p=0.023$ )。また、HBV DNA が治療開始後 6 ヶ月の時点で PCR 法で陽性の群で耐性株出現が多かった( $p=0.004$ )。

今回は、当科で 1 年以上の投与が観察し得た 41 例(観察期間中央値 39 ヶ月)について同様の解析を行った所、ほぼ前回の結果と同じ結果がえられた。このことより、ラミブジン治療中の HBV DNA の推移を見ることは耐性株が出現しやすい例を抽出するのに優れており、HBV コア関連抗原は耐性株の出にくい症例を抽出するのに優れていると思われた。

#### E. 結論

HBV コア関連抗原測定法は B 型肝炎ラミブジン治療における耐性株非出現の予測に有用である。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

松本晶博、田中榮司、清澤研道： B 型肝炎の長期ラミブジン治療における問題点と対策。DDW 2005、京都、2005 年 10 月。

##### 2. 論文発表

1. Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *liver Int.* 2006; 26: 90 - 96.

2. Misawa N, Matsumoto A, Tanaka E, Rokuhara A, Yoshizawa K, Umemura T, Maki N, Kimura T, Kiyosawa K. Patients with and without loss of hepatitis B virus DNA after hepatitis B e antigen seroconversion have different virological characteristics. *J Med Virol.* 2006;78(1):68-73.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容についてはなし



# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### B型慢性肝炎に対する Lamivudine 中止の工夫に関する研究

分担研究者 西口修平 兵庫医科大学・内科（肝胆膵科） 教授

**研究要旨:** B型慢性肝炎においてラミブジンにより臨床的寛解が得られた場合の適切な投与中止時期と、ラミブジンを短期に中止するための IFN 併用の意義について検討した。対象は B 型慢性肝炎 65 例であり、43 例 (HBe 抗原陽性 18 例) ではラミブジンを 14~48 ヶ月投与し、寛解が得られた症例を 1 年後中止する群と 2 年後中止する群に振り分けた (ラミブジン単独継続群)。残りの 22 例 (全例 HBe 抗原陽性) ではラミブジンを 3~9 ヶ月投与した後、1 ヶ月間 IFN 6MU を併用して中止し、その後 IFN を 5 ヶ月間単独で投与した (IFN 併用中止群)。ラミブジン単独継続群のうち HBe 抗原陽性例で寛解が得られたのは 1 例のみで、1 年後に投与を中止したが、その 7 ヶ月後に再燃した。HBe 抗原陰性例では 25 例中 16 例 (64%) で寛解が得られ、1 年後に中止した 10 例では 8 例で再燃のためラミブジンを再開したが、2 年後中止例で再燃したのは 6 例中 3 例であった。IFN 併用中止群においてラミブジン投与中に HBV DNA が陰性化したのは 11 例 (50%) で、耐性株の出現は見られなかった。IFN 終了時に HBV DNA が陰性であった 4 例 (18%) では、全例が seroconversion し現在まで肝機能正常を維持している。ラミブジンにより寛解が得られた場合、少なくとも 2 年間の継続投与が必要と考えた。ラミブジン中止時に IFN を併用することは breakthrough を防ぐことと、IFN による seroconversion の可能性を考えると有効な方法であった。

#### 共同研究者

榎本 大 大阪市立大学肝胆膵内科病院講師  
田守昭博 大阪市立大学肝胆膵内科講師  
塩見 進 大阪市立大学 核医学 教授

残りの 22 例 (全例 HBe 抗原陽性、38±11 歳) では、ラミブジンを 3~9 ヶ月単独投与した後、1 ヶ月間 IFN-β 6MU を併用して中止し、その後 IFN-β を 5 ヶ月間単独で投与した (IFN 併用中止群)。

(倫理面への配慮)

本研究の目的、方法、患者の個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、文書にて同意を得た。

#### C. 研究結果

(1) ラミブジン単独継続群のうち HBe 抗原陽性例では 18 例中 12 例 (67%) に耐性株の出現を認め、臨床的寛解が得られた症例は 1 例のみであった。寛解例では 1 年後にラミブジンを中止したが、その 7 ヶ月後に肝炎の再燃のため再投与した。HBe 抗原陰性例では 25 例中 6 例 (24%) で変異株が出現したが、16 例 (64%) で寛解が得られラミブジンを中止することが出来た。1 年後に中止した 10 例では 8 例でその後再燃のためラミブジンを再開したが、2 年後中止例で再燃したのは 6 例中 3 例であり有意差を認めなかった (図 1)。

#### A. 研究目的

B型慢性肝炎に対してラミブジンで臨床的寛解が得られた場合、肝炎の再燃を防ぐため少なくとも 6 ヶ月以上投与を継続することが推奨されている。一方、ラミブジンは長期投与することにより耐性株が出現することが問題となっている。そこで本研究ではラミブジンにより臨床的寛解が得られた症例における適切な投与中止時期と、耐性株出現前にラミブジンを短期に中止するための IFN 併用の意義について検討した。

#### B. 研究方法

対象はラミブジンを投与した B 型慢性肝炎 65 例。(1) 43 例 (HBe 抗原陽性 18 例、平均 48±11 歳) では、ラミブジンを 14~48 ヶ月継続投与し (ラミブジン単独継続群)、臨床的寛解 (HBe 抗原陰性、HBV DNA [TMA] 陰性、ALT 正常) が得られた症例を 1 年後に中止する群と 2 年後に中止する群に無作為に振り分けた。(2)

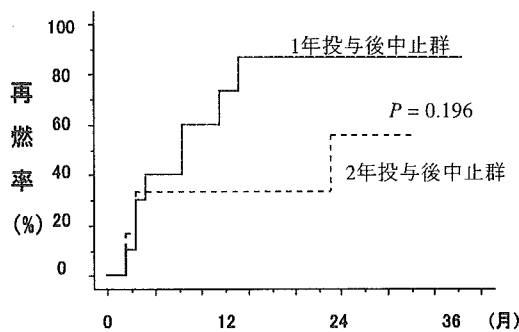


図 1. ラミブジン中止後の再燃率の比較

(2) IFN 併用中止群においてラミブジン投与中に HBV DNA が陰性化したのは 11 例(50%)で、全例において耐性株は見られなかった。IFN 終了時に HBV DNA が陰性であったのは 4 例(18%)であり、全例が seroconversion し、IFN 終了後も肝機能正常を維持している(図 2)。

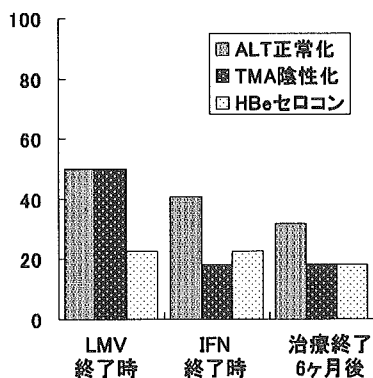


図 2. ラミブジン-IFN 併用療法の奏効率

#### D. 考察

HBe 抗原陽性例ではラミブジンを長期投与しても寛解率は低く、耐性株の出現率も高い。我々の検討でも HBe 抗原の SC の後、ラミブジンが中止できた症例は 1 例しかなく、その症例もラミブジン中止後早期に肝炎が再燃した。変異株の出現が予想される状況で、ラミブジン投与を続けることは望ましくないが、ラミブジンの中止により致命的な肝不全化が引き起こされた報告もある。そこで既報 (Serfaty L, et al. *Hepatology* 2001)を参考に、いわゆるラミブジン

-IFN sequential therapy を行った。その結果、短期間のラミブジン投与と IFN を併用した中止により、耐性株の出現もなく安全にラミブジンを中止することが可能であった。このような短期投与であれば、ラミブジンが躊躇される若年者にも投与可能であり、HBe 抗原の seroconversion の効果も期待でき、有効な方法であると思われた。

HBe 抗原陰性例ではラミブジンの有効性が高く、耐性株の出現率も低い。ところが臨床的寛解が得られても、1 年程度で治療を中断すると高率に再燃することが報告されている (Huang YH, et al. *J Viral Hepat* 2004)。我々の検討でも臨床的寛解が得られた後、1 年で投与中止した場合には比較的早期に肝炎が再燃した。これに対し 2 年で投与中止した場合の肝炎の再発率は若干低かったが有意差は認めなかった。

#### E. 結論

ラミブジンにより臨床的寛解が得られた場合、1 年後に中止した場合の再燃率は高く、少なくとも 2 年間の継続投与が必要と考えた。特に若年者においてラミブジンを中止する意義は大きく、その際に IFN を併用することは breakthrough を防ぐことと、IFN による seroconversion の可能性を考えると有効な方法であると思われた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

河本まどか、木岡清英、西口修平。シンポジウム「B型慢性肝炎の病態別の抗ウイルス療法の現状と今後の課題」において、ラミブジン中止後の再燃に及ぼすラミブジン投与期間と IFN 併用の有効性に関する検討を発表した。第 91 回日本消化器病学会総会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容に関しては特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### YMDD motif に変異のない B 型肝炎ウイルスの新たな lamivudine 耐性株の検出

分担研究者 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科

研究要旨：B 型慢性肝炎に対する lamivudine 治療は大変効果的である一方、長期投与による YMDD 変異株の出現が問題である。今回我々は YMDD motif に変異のない lamivudine 耐性 genome を検出し、polymerase RT 領域 B domain のアミノ酸変異が耐性に関与していることを *in vitro*, *in vivo* で証明した。またこのアミノ酸変異の検出系を確立し、検討をおこなった。

共同研究者  
高橋祥一 広島大学医歯薬学総合研究科

#### A. 研究目的

B 型慢性肝炎の治療に lamivudine は重要な役割を担っているが、一方長期投与による lamivudine 耐性株の出現が問題となっている。耐性株のほとんどは HBV polymerase の reverse transcriptase (RT) 領域の YMDD motif に変異を認める。しかし今回我々は、B 型慢性肝炎患者で lamivudine 投与中にウイルス再増殖および肝炎の再燃を認めた症例から、YMDD motif に変異のない新規 lamivudine 耐性 HBV genome を検出したため、これについて *in vitro*, *in vivo* での検討を行った。

#### B. 研究方法

- (1) 患者血清より HBV-DNA を抽出し、direct sequence 法を用いて、HBV polymerase 領域のアミノ酸変異を同定した。
- (2) 1.4 倍長の lamivudine 耐性 HBV genome を挿入した HBV 産生 plasmid を作成した。さらにこの plasmid をもとに野生型の HBV genome を作成した。これらを HepG2 細胞に transient transfection し、lamivudine, adefovir, entecavir に対する感受性を評価した。
- (3) ヒト肝細胞キメラマウスに、野生株 HBV 患者血清と、lamivudine 耐性患者血清を投与し、

持続感染を確認後、lamivudine 30mg/kg/day を投与し、HBV ウイルス量の変化を比較した。

(4) 本研究にて明らかになった lamivudine 耐性に関与するアミノ酸変異を、PCR-RFLP 法にて検出する方法を確立し、当院にて lamivudine による virological breakthrough が出現した 40 症例について検討した。

#### C. 研究結果

- (1) lamivudine 耐性獲得前後の HBV polymerase のアミノ酸比較にて、spacer 領域に 1ヶ所、reverse transcriptase (RT) 領域の B domain に 1ヶ所、計 2ヶ所のアミノ酸変異を認め、YMDD motif には変異を認めなかった。また、B domain に認められたアミノ酸変異に伴う HBsAg のアミノ酸変異は、過去に報告のない新しい変異であった。
- (2) *in vitro* において lamivudine 感受性を IC<sub>50</sub> で評価した。野生株、spacer 領域のアミノ酸変異のみ、RT 領域の B domain のアミノ酸変異のみ、spacer、B domain どちらも変異ありの 4 種類の HBV 産生株で検討し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.19, 0.23, 0.58, 0.57 ( $\mu$ M) を示した。以上より、RT 領域の B domain のアミノ酸変異は、野生株と比べ 3 倍の lamivudine 耐性を示したが、spacer 領域のアミノ酸変異は lamivudine 耐性に関与していないことが証明

された。Laboratory strain を用いた *in vitro* study においても同様の結果であった。一方、この変異株は、adefovir, entecavir に対して、野生株と同等のウイルス増殖抑制効果を認めた。

また前述の 4 種類の HBV 産生株を用いて、ウイルス複製能を評価したが、各アミノ酸変異による影響は認められなかった。

(3) 野生株 HBV 患者血清と、lamivudine 耐性患者血清をキメラマウス各 2 匹ずつに投与した。2 群とも、高い HBV-DNA 量を伴う持続感染を確認した。また、持続感染マウス血清より HBV-DNA を抽出し、2 群とも投与血清と sequence が一致していることを確認した。すなわち、lamivudine 耐性患者血清投与群において、マウスの体内で増殖した HBV phenotype は lamivudine 耐性 genome と一致していた。患者血清投与 12 週もしくは 13 週より lamivudine を経口投与し、投与 6 週後の HBV-DNA 量の変化は野生株群で  $-2.8$  log copies/ml(mean)、lamivudine 耐性群で  $-0.39$  log copies/ml(mean)であり、lamivudine 耐性群で明らかにウイルス量の変化が少なかった。

(4) PCR-RFLP 法をにて RT 領域の B domain のアミノ酸変異を検出する方法を確立した。当院にて lamivudine による virological breakthrough が出現した 40 症例について検討したが、明らかに変異を検出しえた症例が 1 例、また野生株と混在した症例が 4 例認められた。

#### D. 考察

今回我々は YMDD motif に変異のない新規 lamivudine 耐性 HBV genome を検出し、*in vitro* study にて RT 領域の B domain のアミノ酸変異により 3 倍の lamivudine 耐性を獲得することを証明した。

またキメラマウスを用いた *in vivo* study においても lamivudine 耐性を証明することができた。

Lamivudine 耐性とこのアミノ酸変異との関連については以前 Yeh らにより報告されている。しかし彼らの症例は YMDD 変異株出現後の経過中にこのアミノ酸変異が出現しており、また B

domain のアミノ酸変異に伴う HBsAg のアミノ酸変異は我々のものと異なっていた。

今回我々が lamivudine 耐性として同定した B domain のアミノ酸変異は、過去に famocycovir, adefovir においても耐性との関与が指摘されており、多剤耐性に関与する重要なアミノ酸変異である可能性がある。今後、各種核酸アナログ投与症例において、このアミノ酸変異も念頭にいれ注意を払っていく必要があると考える。

#### E. 結論

今回我々は、B 型慢性肝炎患者で lamivudine 投与中にウイルス再増殖および肝炎の再燃を認めた症例から、YMDD motif に変異のない新規 lamivudine 耐性 HBV genome を検出し、*in vitro* study にて耐性に関与するアミノ酸変異を同定した。Lamivudine 投与中にウイルス再上昇を認めたときは、YMDD motif 以外の変異もあることを念頭におき、治療を行っていく必要がある。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1) Hiromi Yatsuji, Chiemi Noguchi, Nobuhiko Hiraga, Nami Mori, Masataka Tsuge, Michio Imamura, Kazuaki Chayama et al.

Emergence of a novel lamivudine-resistant mutant with no amino acid substitution in the YMDD motif. (in submission)

2) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, et al.

Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance.

3) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C,

Yoshizato K.

Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus.

4) Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, Ohishi W, Hyogo H, Nomura S, Chayama K.

Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver.

5) Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, Chayama K.

G to A hypermutation of hepatitis B virus.

6) Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H.

Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats.

G. 知的財産権の出願・登録情報

今回の研究内容については特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### HBV genotype D の愛媛県における拡散についての検討

分担研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨： HBV genotype D の拡散防止対策の必要性の有無を検討するため、愛媛県における HBV genotype D (HBV/D) の拡散状況について検討した。HBV/D 塩基配列からの分子疫学的な解析により、HBV/D は約 100 年前に愛媛に侵入し、1970 年頃に急速に拡散したことが判明し、日露戦争を契機にロシアから侵入し定着したと推察された。出生年は 1970 年代が最多で、1980 年以降にも少数ながら感染者が存在した。また、愛媛県を東部、中部、西南部に分けて HBV 持続感染者に占める地区別の HBV/D の頻度を調べると、それぞれ約 1%、10%、1%であった。以上より、愛媛県の HBV/D は約 100 年前に愛媛県中部に侵入して 1970 年頃に急速に拡散し、その後も時間的、地域的にゆるやかに拡散していることが推察され、HBV/D の拡散防止対策の検討が必要と考えられた。

#### 共同研究者

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| 道堯浩二郎 | 愛媛大学医学部光学医療診療部<br>助教授 |
| 松浦可奈  | 愛媛大学医学部第三内科 医員        |
| 日浅陽一  | 愛媛大学医学部第三内科 助手        |
| 堀池典生  | 愛媛大学医学部第三内科 助教授       |
| 田中靖人  | 名古屋市立大学臨床分子情報医学<br>講師 |
| 溝上雅史  | 名古屋市立大学臨床分子情報医学<br>教授 |

侵入時期と併せてその由来を推定した。更に、genotype 別の出生年を調べ、出生年別の頻度が分子疫学的に計算された拡散時期と一致するか否かを検討した。

#### 2 空間的拡散状況の検討

愛媛県在住の HBV キャリ 516 例を対象として HBV genotype を調べ、愛媛県を東部（東予）、中部（中予）、南西部（南予）の 3 地区に分けて地区別の genotype 頻度を検討することで、空間的拡散状況の解析を試みた。

ゲノタイプと塩基配列の解析にあたり、対象者に説明の上、同意を得るとともに、個人情報の遺漏がないよう注意して研究ならびにデータの保管を行った。

#### A. 研究目的

愛媛県において本邦では稀な HBV genotype D (HBV/D) が侵淫していることが明らかにされているが、その由来および拡散傾向の程度は明らかでない。HBV/D の拡散防止対策の必要性の有無を検討するため、愛媛県における HBV/D の拡散状況を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1 時間的拡散状況の検討

愛媛の HBV/D 感染者 19 例より 20 株（同一人より 19 年の間隔で採取された 2 株を含む）の全塩基配列を調べ、変異速度を計算し、coalescent analysis により分子疫学的に侵入時期と拡散時期を検討した。また、データベースに登録された世界各地の HBV/D 配列を含めた分子系統樹を作成し、

#### C. 研究結果

##### 1 時間的拡散状況

塩基配列は、19 株が 3182 塩基、1 株が 3194 塩基で、サブタイプはすべて ayw3 であった。分子系統樹では、20 株は cluster を形成し、データベースに登録された HBV 株の中では、ロシアと北ヨーロッパからの HBV に類縁株がみられた。変異速度は  $5.4 \times 10^{-5}$  /塩基/年と算出され、cluster を形成

した系統樹の起点は約 100 年前と計算された。また、人口統計学的モデルでの解析により、拡散開始は 1940 年台、急速な拡散は 1970 年台と算定された。出生年は、HBV/D で 1970 年台に集中していたが、他のゲノタイプでは偏りはなかった。

## 2 空間的拡散状況

愛媛県のゲノタイプ別頻度は A-D の順に 1.7%、4.5%、88.0%、5.8% であった。HBV/D の地域別頻度は、東予 1/117 (0.8%)、中予 28/258 (10.9%)、南予 1/132 (0.8%) であり、HBV/D 感染者の大部分は中予に在住していたが、少数は東予、南予にも在住していた。東予、南予在住の 2 名は小児期に中予に在住しており、転居した例であった。

## D. 考察

愛媛の HBV/D は、*coalescent analysis* により系統樹の起点が約 100 年前であること、また分子系統樹にてロシア、北ヨーロッパ株に近縁の関係に位置することが判明し、当地域の歴史を重ねて考察すると、日露戦争に関連した人の移動が HBV/D 侵入の要因で、愛媛の HBV/D はロシア由来と推定された。HBV/D 感染者の出生年が 1970 年台に集中していたことは、分子疫学的解析で算出された拡散時期が正しいことを裏付ける結果であった。なお、愛媛県中部で subtype ayw の HBV による Gianotti 病が流行した 1970 年台は、HBV/D が急速に拡散したと算定された時期と一致していた。以上より、北四国の HBV/D は約 100 年前に侵入し、1970 年台に急速に拡散したこと、その由来はロシアからであることが推察された。出生年の検討で、1980 年台出生の HBV/D 感染者は 1970 年台に比べると減少しているものの、少数みられたことから、1980 年以降もゆるやかながら拡散傾向が続いていることが示唆された。

また、地域的には、HBV/D 感染者の大部分は中予に在住するものの、他地区にも存在することから、地域的にも拡散していることが判明した。

## E. 結論

1 愛媛の HBV genotype D は約 100 年前に日露戦争を契機に侵入し、1970 年頃に急速に拡散したことが推定された。

2 genotype D 感染者の大部分は愛媛県の中予に在住するが、転居などにより他地区にも少数拡散していることが確認された。

以上より、HBV genotype D は 1970 年代に急速に拡散し、以後も急速ではないものの、キャリア数はゆるやかに増加し、地域的にもゆるやかに拡散していることが推察され、感染防止対策の検討が必要と考えられた。

## F. (分担研究のため、記載せず)

## G. 研究発表

### 1 論文発表

1) Michitaka K, Tanaka Y, Horiike N, Duong TN, Chen Y, Matsuura K, Mizokami M, Onji M. Tracing the history of hepatitis B virus genotype D in western Japan. *J Med Virol* 2006; 78:44-52.

### 2 学会発表

1) 松浦可奈、道堯浩二郎、Tran Nhu Duong、他 HBV genotype D の地理的拡散状況に関する検討 第 41 回日本肝臓学会総会 2005 年 6 月

2) 松浦可奈、道堯浩二郎、堀池典生 当地域における HBV genotype D の変遷について 第 9 回日本肝臓学会大会 2005 年 10 月

## H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### B 型慢性肝炎に対するラミブジン治療効果および YMDD 変異株出現頻度と HBV genotype との関係についての研究

分担研究者 折戸悦朗 名古屋市立大学大学院臨床分子内科講師

研究要旨：B 型慢性肝炎患者に対して抗ウイルス剤であるラミブジンはきわめて有効な治療法であるが、その治療効果と HBV genotype との関連性については不明である。今回 HBV genotype Ba, Bj, C の各 3 群について、年齢性別をマッチさせたケースコントロールスタディを行い、その影響について検討した。その結果、治療効果については各 genotype 間で差はみられず、多変量解析では治療前の ALT が高値である例や、HBe 抗原が陰性の症例で有意に高い治療効果が得られていた。一方、耐性株である YMDD 変異株の出現頻度をみると、有意に genotype C 型に高頻度に変異株の出現を見た。以上より、ラミブジン治療に対する影響は、ウイルスを抑える側の抗ウイルス効果に対しては genotype の影響は見られず、耐性株の出現頻度に有意差が認められた。

#### 共同研究者

菅内文中 名市大大学院臨床分子内科助手  
田中靖人 名市大大学院臨床分子情報医学講師

コントロールスタディを行い、治療効果、YMDD 変異株の出現にどのような影響を与えるかを検討した。

#### A. 研究目的

B 型慢性肝炎患者は、その感染している HBV genotype によって予後が異なり、またインターフェロン治療では治療効果が異なることが報告されている。現在、中高年の B 型慢性肝炎患者に対し、強力な抗ウイルス剤としてラミブジンが広く使われている。しかしラミブジンもすべての患者に有効ではなく、また年率 10 数%程度の頻度でラミブジン耐性株である YMDD 変異株が出現し、その後の治療効果を低下させる原因となっている。したがって治療前および治療中にその効果や耐性化の検討を行いながら治療方針を決定していく必要がある。ラミブジン治療効果と関連する治療前因子としては、年齢、性別、ALT 値や HBe 抗原などが指摘されているが、HBV genotype との関連については、未だ明確な検討はなされていない。今回 HBV genotype Ba (HBV/Ba), HBV/Bj, HBV/C の各群において、治療成績に大きく影響を与える年齢と性別をマッチさせたケースコン

#### B. 研究方法

##### (1) 対象症例

B型慢性肝炎患者に対しラミブジン1日100mgを2年間投与された日本人および中国人122例の患者の内、HBV/Bj, HBV/Ba, HBV/Cの各群で年齢、性別をマッチさせたそれぞれ18例、15例、34例の計67例で検討を行った。

##### (2) 方法

ラミブジン治療開始前および投与後2年後のALT、HBV DNA レベル、HBe 抗原、1896 pre-C 変異、1762/1764 core promoter 変異、YMDD 変異の出現について検討した。HBV DNA レベルは real-time PCR 法にて行った。検出感度は 100copies/ml。PC 変異、CP 変異、YMDD 変異は direct sequence 法にて検討した。HBV genotype については、RFPL 法にて判定した。結果については、単変量解析、およびロジスティック多変量解析にて統計解析した。



## C. 研究結果

### (1) ラミブジン治療効果と HBV genotype との関係

各 genotype 群でラミブジンの治療効果を比較したところ、HBV/Bj 群で 61.1%、HBV/Ba 群で 40.0%、HBV/C 群で 38.2%と HBV/Bj 群でやや高い傾向は見られたものの統計学的には有意な差を認めなかった。これを HBe 抗原陽性、陰性に分けて検討しても、HBV genotype と有効性との間には関連は見られなかった。しかし、genotype とは関係なく HBe 抗原との関連を見ると、HBe 抗原陽性例では陰性例に比し、有意に治療効果が低いことが示された。一方、PC 変異、CP 変異と治療効果との関係は見られなかった。

ロジスティック解析による全症例の解析では、ラミブジン治療効果と有意に関連する治療前因子は ALT200 以上と HBe 抗原であった。

### (2) ラミブジン耐性変異株の出現率と HBV genotype との関係

ラミブジン耐性株である YMDD 変異株の出現率を検討したところ、HBV/Bj 群では 27.8%、HBV/Ba 群では 13.3%、HBV/C 群では 50.0%と HBV/C 群において有意に YMDD 変異株の出現率の上昇がみられた。またこの傾向は HBe 抗原陽性例で特に顕著であった。ブレークスルー肝炎の頻度については、いずれの群も 1 例から 5 例程度しか見られなかったため有意差は認めなかった。

ロジスティック解析による全症例の解析で YMDD 変異株出現率と有意に関連する因子は、HBV genotype だけであった。

## D. 考察

B 型慢性肝炎患者に対し、抗ウイルス剤であるラミブジンが広く使われており、その有効性がしめされている。しかし ALT の正常化や血中 HBV DNA が感度以下となるような十分な効果が得られる症例は約半分であり、それ以外の例では ALT や HBV DNA を抑制するものの十分な効果を発揮できていない。さらにラミブジンを長期に使用すると YMDD 耐性変異株が出現して著しくその治療効果が低下する。したがってラミブジン治療をおこなう場合、その治療効果や耐性化の

予測を行って適応を決めていくことは臨床上重要となる。

今まで HBV genotype とラミブジン治療効果との関係はいろいろな報告が出ているが、関連ありとする報告とないとする報告があり、未だに一定の結論が出ていない。今回我々は、B 型慢性肝炎患者の抗ウイルス治療効果を比較する上で、もっとも大きな影響を与える因子である年齢と性別をマッチさせたケースコントロールスタディを行うことによって、HBV genotype とラミブジン治療効果、あるいは耐性株の出現率がどのように関連するかを検討した。その結果、ラミブジン治療効果と HBV genotype には有意な関連が見られず、むしろ HBe 抗原の有無や治療前 ALT 値が大きな影響を与えることが示された。Westland ら(Hepatology 2003)の報告では、ラミブジンと同等の強い抗ウイルス効果を発揮するアデフォビル治療において、その治療効果に対して、genotype、人種、HBe 抗原の有無などはなんら影響を与えなかったと報告している。これは、ラミブジンやアデフォビルなどのように強力な抗ウイルス効果が発揮されると、こういった背景因子の違いに関係なく抑制されてしまうという可能性が考えられる。

一方で、ラミブジンによる治療中に発生してくる YMDD 変異株による耐性化については、HBV/C の患者で有意に高い出現率が認められ、より活発な増殖力のあるウイルスのタイプで YMDD 変異がより起きやすい可能性が考えられた。HBV genotype とラミブジン耐性化については、Zollner ら(Hepatology 2004)はドイツ人の症例で HBV/A 群と HBV/D 群で有意に YMDD 変異の出現率が異なることを報告しており、アジアで広がっている HBV/B や HBV/C 以外の例でも同様に耐性化の出現率が違うことが示されている。

今回は、年齢性別を一致させたケースコントロールスタディで検討を行ったが、特に HBV/Ba、HBV/Bj のラミブジン治療症例の数が少なく、必ずしも十分な検討とは言えなかった。今後さらに症例を増加させた大規模な検討での確認が必要と考えられた。

## E. 結論

B 型慢性肝炎患者に対し、2 年間のラミブジン治療にてその治療効果と YMDD 変異株の出現頻度に

ついて HBV genotype との関連性について、年齢性別をマッチさせたケースコントロールスタディで検討した。ラミブジン治療有効性は genotype との関連は見られなかったが、YMDD 変異株出現率については HBV/C 症例で有意に高頻度に見られた。

B 型慢性肝疾患患者に対するラミブジン治療においても、HBV genotype ごとの対応が重要であることが示された。

F. 健康危険情報  
特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Orito E, Sugauchi F, Yanaka Y, Ichida T, Sata M, Tanaka E, Okanoue T, Sakugawa H, Watanabe H, Miyakawa H, Nishiguchi S, Kumada H, Ueda R, Mizokami M. :Differences of hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B virus genotypes of Ba, Bj or C in Japan. *Intervirol* 48: 239-245, 2005.

2) Tanaka Y, Orito E, Yuen MF, Mukaide M, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Sakamoto T, Kurbanov F, Lai CL, Mizokami M. :Two subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotype C: A novel subtyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *Hepatol Res* 2005.

3) 折戸悦朗、溝上雅史. B 型慢性肝炎の病態と治療—特に HBV genotype との関連について—  
*日本消化器病学会雑誌* 102(6): 665-672, 2005.

### 2. 学会発表

1) 伊藤清顕、田中靖人、小笹貴士、藤原圭、杉原寛治、大野智義、折戸悦朗、上田龍三、溝上雅史.

HBV genotype C における core promoter 領域の変異と肝病態との関係. 第 41 回日本肝臓学会総会、大阪、平成 17 年 6 月 16 日

2) Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Ito K, Orito E, Chayama K, Yoshizawa H, Mizokami M. Difference of viral replication and protein production by hepatitis B virus genotypes using replication model in vitro and in vivo.

The 56th Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, USA, Nov 11-15, 2005.

3) Ito K, Tanaka Y, Fujiwara K, Orito E, Kato M, Asahina Y, Tokita H, Yuen MF, Lai CL, Acharya S, Gish R, Mizokami M. T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection.

The 56th Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, USA, Nov 11-15, 2005.

4) 新海登、田中靖人、折戸悦朗、坂本知行、菅内文中、日下部篤宣、伊藤清顕、長谷川泉、大野智義、上田龍三、溝上雅史. 新しい HBV コア関連抗原測定は慢性 B 型ウイルス感染患者のラミブジン単独療法中止後の non-relapse を予測する  
第 36 回日本肝臓学会西部会、鈴鹿市、平成 17 年 11 月 26 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

## 分担研究報告書

### B 型急性肝炎不顕性感染の実態

分担研究者 四柳 宏 東京大学医学部附属病院感染制御部特任講師

研究要旨：化学発光免疫測定法で HBs 抗原低力価陽性と判定される症例の臨床的・ウイルス学的特徴について調べた。一過性感染と臨床的に診断された 38 例の HBV DNA 量は低レベルであり、多くの症例が肝機能は正常のまま推移した。HBs 抗原以外の HBV 関連マーカーは陰性のまま HBs 抗原は自然消退した。臨床症状の出ない不顕性感染は B 型急性一過性感染の 7-8 割を占めるものと推測された。

#### A. 研究目的

化学発光免疫測定法（CLIA 法）は簡便かつ高感度な HBs 抗原測定系で、従来検出困難であった HBs 抗原低力価陽性例の存在を明らかとした。

本検討は、HBs 抗原低力価陽性の B 型急性一過性感染の臨床像を明らかにすることを目標とした。

#### B. 研究方法

2004 年 1 月から 2005 年 6 月の間に聖マリアンナ医科大学附属病院を受診し、CLIA 法で HBs 抗原陽性かつ力価が Cut off Index で 30 未満の 116 例（男性 78 例、女性 38 例）の中で以前に HBs 抗原陰性が確認されている、または短期経過中に HBs 抗原の陰性化が確認された 38 例（男性 26 例、女性 12 例 平均年齢 47.0±19.4 歳）を対象とした。

HBs 抗原は CLIA 法で測定した。HBV Genotype は、HBV ジェノタイプ判定キット（ゲノムサイエンス研究所）にて測定し、判定困難な症例は血清から HBV 遺伝子の preS1 領域（nt2902-3091）の PCR 産物の塩基配列を決定し判定した。

#### C. 研究結果

##### (1) 一過性感染群の構成

一過性感染群 38 例の内訳は①検診、入院時、術前スクリーニング等で以前に HBs 抗原陰性であることが確認されている 14 例、②過去の HBs 抗

原は不明であるが、速やかに HBs 抗原が陰性化した 24 例（うち、2 例は HBs 抗体が陽性化し、1 例は HBe 抗体及び HBc 抗体が陽性化）であった。また、これら 38 例全例で HBs 抗原は陰性化した。

##### (2) 一過性感染群の概略

一過性感染群 38 例における HBs 抗原価は 5.2±1.1 (Cut off Index) であった。ALT 値は平均 29.8±30.3 (IU/L) であった。血小板値は 23.4±63.5 (×10<sup>3</sup>/mm<sup>4</sup>) であった。また、HBs 抗原陽性と判明してから陰性化を確認するまでの平均期間は、平均 87.5±103.5 日（7-365 日）であった。

##### (3) 一過性感染群における ALT

一過性感染群 38 例中 9 例（24%）で、経過中に ALT の変動が認められたが、HBV 関連マーカーの変動はなく、HBV が肝障害の原因である可能性は低いと考えられた。

##### (4) 一過性感染群における感染の原因

一過性感染群 38 例中 10 例（26%）で、感染の原因の推定が可能であった。うち 1 例では HBV キャリアとの性交渉歴があったが、残り 9 例はいずれも医療行為（手術・分娩・侵襲性検査・鍼灸）を受けており、こうした医療行為が感染の原因である可能性が考えられた。

##### (5) 一過性感染群の長期経過観察結果

一過性感染群 38 例中 8 例（21%）で 6 ヶ月以上の長期経過観察が可能であった。8 例中 3 例で HBs 抗原が陽性と判明した時点で肝障害が認めら

れたが、HBc 抗体は陽転化しなかった。これら 8 例全例で、6 ヶ月から 1 年の経過観察期間中、HBs 抗体、HBc 抗体はいずれも陰性のままであった。これら 8 例の HBV DNA 量はいずれも TMA 法で 3.7LGE/mL 未満であった。HBV Genotype は 4 例で決定可能 (A・B・B・C) であった。

#### (6) 一過性感染群のウイルス学的解析

一過性感染群 38 例中 14 例で HBV Genotype の決定が可能であり、A 2 例、B 3 例、C 9 例であった。

また、38 例中 24 例で RTD-PCR 法 (プライマーは X 領域に設定) による HBV DNA の定量を行ったが、9 例で測定可能であったのみで残り 15 例では検出感度未満であった。また、9 例の HBV DNA 量は中央値 8000copy/mL と低レベルであった。

#### (7) 急性感染例中の不顕性例の割合

今回の検討時期に有症の B 型急性肝炎と診断されたのは 14 例であり、急性感染例中の不顕性例の割合は 73% であった。

### D. 考察

B 型急性一過性感染例のうちで臨床的に急性肝炎の症状を呈する例は約 3 割と言われていたが、その実態の詳細は不明であった。今回の検討は、大学病院での検討であること、来院した症例のすべてを調べていない点で正確に不顕性感染の実態を捉えているとは言えないが、病院で行われたすべての HBs 抗原検査の結果をもとにしたものであり、不顕性感染の実態の概要をつかむことが可能であると考えられる。今回の検討では不顕性感染の割合は 73% である。従って急性一過性感染例の 7-8 割は不顕性例と推定できる。

不顕性感染例の多くは HBV DNA 量が低く、結果的に肝細胞障害の程度が軽いものと考えられ

た。感染経路としては、医療行為が疑わしい例が大半を占めた。今回の調査はカルテをさかのぼって感染の原因を推測したものであり、多くの患者では感染の原因・経路は不明であった。特に STD に関しては問診を行わなければ不明のままである。いずれにしても、手術・分娩・侵襲性検査・鍼灸などの実施にあたっては HBV へ感染する可能性を考え、細心の注意を払う必要がある。

不顕性感染例の多くは IgM-HBc 抗体、HBc 抗体が出現せず、血清学的に B 型急性肝炎と診断できない。肝細胞の破壊の程度が軽く、ヌクレオキャプシドが免疫系に認識されないことが原因と推定される。

不顕性感染例の中に Genotype A に感染している例が見られた。若年男性を中心として STD (同性間・不特定異性間) としての B 型急性肝炎が増えている事実を反映するものであり、今後とも注意が必要である。

### E. 結論

B 型急性一過性感染例の 7 割以上は無症状のまますなわち不顕性感染として推移する。感染したウイルス量は低く、肝炎の程度は軽く、HBs 抗原以外のウイルスマーカーは陰性のまま経過する。

### F. 健康危険情報

なし

#### 1. 論文発表

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし