

C症例において生命予後を有意に改善させることが証明された。さらに経過観察中にHCCが発生した例においても、ラミブジン投与例では肝予備能が改善しHCC治療が可能であった例が多い。これらの症例の中にはChild分類Cの症例にラミブジンを投与し、Child Aに改善した後HCCが発生し、根治的肝切除術が可能であった例が含まれている⁸⁾。将来の発癌時の治療を可能にさせる意味からもラミブジン治療は有効と考えられた。Breakthrough肝炎においては4例のうち2例が肝不全で死亡し、いずれもウイルス量の多い症例であった。予備能が悪く、ウイルス量の多い症例ではラミブジンの投与は慎重にする必要がある。以上より慢性肝炎のみならず、肝硬変患者へのラミブジンの投与は発癌抑制および担癌例での予後改善に有用であると思われた。

文 献

- 1) 恩地森一, 山内雄介, 道堯浩二郎: GPTの変動とB型・C型肝炎の自然経過. G型肝炎, 肝炎ウイルス重感染, B型およびC型肝炎, 犬山シンポジウム記録刊行会編, 中外医学社, 1998, pp130-133
- 2) Ohkoshi S, Norio O, Ichida T: The long-term clinical

outcome of 1-year treatment of chronic hepatitis B with lamivudine-5years observation. *Hepatol Res* 27: 13-17, 2003

- 3) Hiraoka A, Michitaka K, Onji M et al: Efficacy of lamivudine therapy for decompensated liver cirrhosis due to hepatitis B virus with or without hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 13: 1159-1163, 2005
- 4) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y et al: Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by hepatitis B virus -A pilot study. *Cancer* 82: 827, 1998
- 5) Lok ASF: Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: 303-309, 2004
- 6) Yun-Fan Liaw, Joseph J.Y.Sung, Wan Cheng Chow et al: Lamivudine for Patients with Chronic Hepatitis B and Advanced Liver Disease. *N Engl J Med* 351: 1521-1531, 2004
- 7) Matsumoto A, Tanaka E, Tanikawa K et al: Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: A multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatology Research* 32: 173-184, 2005
- 8) Nakanishi S, Michitaka K, Onji M: Decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis successfully treated with lamivudine allowing surgery for hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 42: 416-420, 2003

* * *

B型慢性肝炎に対するラミブジン治療調査報告 —2005—

清澤 研道* 松本 晶博* 田中 榮司* 犬山肝炎研究グループ

はじめに

B型肝炎に対するラミブジンを中心とした核酸類似薬とペグインターフェロンの長期治療は生化学的、ウイルス学的有用性はいくつかの大規模比較試験により確認されている¹⁻⁶⁾。一方、長期にわたる肝病態の推移についてどうなるかは関心のあるところである。肝不全状態が改善し、生存期間が延長するという報告が最近みられるようになった。また肝細胞癌の発生を抑制するか否かも大きな関心事である。Liawら⁵⁾の報告によれば有意に肝発癌を抑制するという。2003年犬山シンポジウムで筆者は日本における現状につき調査を命ぜられた。その結果、短期間の経過調査ではあるがラミブジン治療は肝発癌を抑制していた。その概略については第24回犬山シンポジウム記録に報告し、詳細な解析結果をMatsumoto⁷⁾が報告した。しかし、さらに期間を延長した有用性につき調査をすべきであるという意見があり、今回2回目の調査を行うこととなった。

I. 対象と方法

2003年の第1回本調査に参加した犬山肝炎研究グループ各施設に調査を依頼した。参加施設は以下のとおりである。秋田大学、山形大学、千葉大学、デルタクリニック、慶應義塾大学、虎の門病

院、東京慈恵会医科大学、日本大学、山梨大学、信州大学、新潟大学、済生会新潟第二病院、名古屋市立大学、愛知医科大学、岐阜大学、金沢大学、京都府立医科大学、大阪大学、近畿大学、岡山大学、川崎医科大学、広島大学、山口大学、香川医科大学、愛媛大学、高知医科大学、久留米大学、熊本大学、宮崎医科大学、独立行政法人国立病院長崎医療センター。

調査期間2003年調査時登録した症例の追跡調査で2004年12月までとした。

調査項目は、主として、①ラミブジン治療の有無と期間、②肝癌発生の有無とその時期、③肝癌発生時のウイルス学的事項、である。表1に今回の調査項目につき示した。

II. 結果

1. 調査対象例の確定

調査収集症例総数は3,038人であった。そのうちデータ欠落により253人が除外され、解析対象例は2,820人である。このうちラミブジン治療例は679人、非治療例は2,141人である。

2. ラミブジン治療群と非治療群の背景因子の比較

表2に背景因子、肝組織所見およびHBVマーカーの比較を示した。治療群では高齢者が多く、肝機能は低下、血小板数の減少がみられた。肝組織所見では線維化の程度が進行し、HBVマーカーではHBe抗原陽性率が高い。HBV genotypeは

*信州大学医学部内科学教室（消化器内科）

表1 追加調査項目

| | 記載数字 |
|--|-----------------------|
| 4) 肝細胞癌発生 | |
| M: 発生の有無 | なし1, あり2 |
| N: 発生の時期 (西暦年) | 西暦年をそのまま記載 |
| 5) 肝細胞癌発生時検査 | |
| O: HBeAg/HBeAb | HBeAg1, HBeAb2, 両者陰性3 |
| P: ALB (g/dl) | 数値を記載 |
| Q: AST (U/L) | 数値を記載 |
| R: ALT (U/L) | 数値を記載 |
| S: 血小板数 (×103/mm ³) | 数値を記載 |
| T: HBVDNA量 (方法を記入) | 数値を記載 |
| 6) 肝細胞癌非発生者の最終観察時検査 | |
| U: 検査年 (西暦年) | |
| V: HBeAg/HBeAb | HBeAg1, HBeAb2, 両者陰性3 |
| W: ALB (g/dl) | |
| X: AST (U/L) | |
| Y: ALT (U/L) | |
| Z: 血小板数 (×103/mm ³) | |
| AA: HBVDNA量 (方法を記入) | |
| 7) 前回調査後の治療歴 | |
| AB: lamivudine 治療の有無 | なし1, あり2 |
| AC: ありの場合開始年 | |
| AD: 治療期間 (月) | |
| AE: IFN 治療歴の有無 | なし1, あり2 |
| AF: ありの場合開始年 (西暦年) | |
| AG: 治療期間 (月) | |
| AH: Adefovir 治療歴の有無 | なし1, あり2 |
| AI: ありの場合開始年 (西暦年) | |
| AJ: 治療期間 (月) | |
| AK: Entecavir 治療歴の有無 | なし1, あり2 |
| AL: ありの場合開始年 (西暦年) | |
| AM: 治療期間 (月) | |
| 8) HBVジェノタイプ | |
| A: 1, Ba: 2, Bj: 3, Ba, Bjか不明のB: 4, C: 5, D: 6 | |

判明しているものは治療群で110人, 非治療群で332人であるが分布に偏りはなかった。

3. 肝細胞癌発生率

肝細胞癌発生は治療群で37人(5.4%), 非治療群で270人(12.6%)であった。両群における発癌年齢はラミブジン治療群が平均60.3歳と非治療群の平均54.8歳より有意に高齢であった。肝細胞癌発生率はラミブジン治療群で0.44%/人/年で

非治療群は1.65%/人/年であった。

4. ラミブジン治療群における肝細胞癌発生例と非発生例の背景因子の比較

ラミブジン治療群における肝細胞癌発生37例と非発生例の642例の背景因子の比較で有意な相違があったものは生検時年齢, 観察期間, アルブミン値, ALT値, 血小板数であった(表3)。

表2 ラミブジン治療群と非治療群の背景因子の比較

| 因子 | ラミブジン治療群 N=679 | ラミブジン非治療群 N=2,141 | P |
|----------------|-------------------|----------------------|--------|
| 男性 | 76 % | 75 % | ns |
| 肝生検時平均年齢 (歳) | 42.0 ± 12.0 | 38.0 ± 12.2 | <0.001 |
| 観察期間 (年) | 4.5 ± 2.3 | 7.7 ± 5.9 | <0.001 |
| 生化学検査 | | | |
| アルブミン (g/dl) | 5.0 ± 0.5 | 5.0 ± 0.5 | ns |
| AST | 70 ± 84 | 55 ± 78 | <0.001 |
| ALT | 117 ± 129 | 91 ± 89 | <0.001 |
| 血小板 | 16.3 ± 5.1 | 17.6 ± 6.0 | <0.001 |
| 肝組織 | | | |
| Grade A0 | 14 | 82 | 0.003 |
| A1 | 197 | 639 | |
| A2 | 299 | 993 | |
| A3 | 147 | 393 | |
| Stage F0 | 13 | 48 | 0.307 |
| F1 | 206 | 713 | |
| F2 | 170 | 530 | |
| F3 | 181 | 491 | |
| F4 | 72 | 333 | |
| HBV マーカー | | | |
| HBeAg (%) | 65.2 | 52.1 | <0.001 |
| HBV genotype A | 5 | 11 | ns |
| B | 22 | 27 | |
| C | 261 | 244 | |
| その他 | 2 | 2 | |

5. Cox 比例ハザードモデルによる累積肝細胞癌発生率

ラミブジン治療群 (N=490) と非治療群 (N=2,336) の累積肝細胞癌発生率を Cox 比例ハザードモデルで検討したのが図1である。ラミブジン治療群が有意に低率である (P<0.001)。有意因子では男性、高齢、ラミブジン非治療、低アルブミン値、高 ALT 値、低血小板数、高線維化であった。

6. Matched case control study によるラミブジン治療群と非治療群の肝細胞癌発生率の比較

性、肝生検時年齢、家族歴、血清アルブミン値、血小板数、肝組織線維化 (F-stage) を propensity

score によりマッチさせラミブジン治療群と非治療群の肝細胞癌発生率の比較を Kaplan-Meier 法により示したのが図2である。有意差をもって治療群の発癌が抑制されている (Log Rank test P<0.001)。ラミブジン治療者では平均3.4年の観察で肝細胞癌発生率は0.9%/人/年であるが、非治療群では平均6.9年の観察で4.9%/人/年であった。

Ⅲ. 考 察

ラミブジンを中心とした抗ウイルス療法が肝炎の進行を阻止し、肝不全をある程度予防できることがいくつかの研究から明らかになった¹⁻⁶⁾。肝細胞癌への予防になるかについては、Liaw ら⁵⁾

表3 ラミブジン治療中の肝細胞癌発生例と非発生例の背景因子の比較

| 因子 | 肝細胞癌発生例 N=37 | 肝細胞癌非発生例 N=642 | P |
|----------------|-----------------|-------------------|--------|
| 男性 | 84 % | 76 % | ns |
| 肝生検時平均年齢 (歳) | 47 | 42 | 0.001 |
| 観察期間 (年) | 72.4 ± 13.6 | 60.1 ± 11.7 | <0.001 |
| 生化学検査 | | | |
| アルブミン (g/dl) | 3.8 ± 0.6 | 4.1 ± 0.5 | <0.001 |
| AST | 76 ± 108 | 70 ± 143 | ns |
| ALT | 116 ± 113 | 1918 ± 230 | ns |
| 血小板 | 13.4 ± 2.2 | 16.4 ± 5.2 | <0.001 |
| 肝組織 | | | |
| Grade A0 | 2 | 12 | ns |
| A1 | 6 | 191 | |
| A2 | 18 | 281 | |
| A3 | 9 | 138 | |
| Stage F0 | 1 | 12 | ns |
| F1 | 6 | 200 | |
| F2 | 9 | 161 | |
| F3 | 12 | 169 | |
| F4 | 9 | 92 | |
| HBV マーカー | | | |
| HBeAg (%) | 55.9 | 65.7 | ns |
| HBV genotype A | 0 | 11 | ns |
| B | 0 | 22 | |
| C | 20 | 241 | |
| その他 | 0 | 2 | |

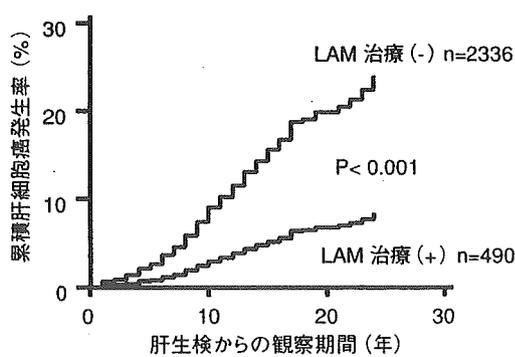


図1 ラミブジン治療群と非治療群の累積肝細胞癌発生率 (Cox 比例ハザードモデル)

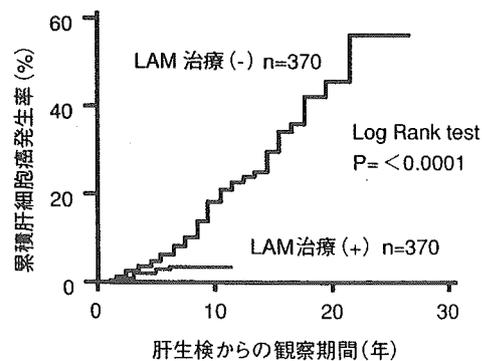


図2 Matched case control study によるラミブジン治療群と非治療群の肝細胞癌発生率の比較

の prospective な研究から明らかにされた。この報告では、肝細胞癌発生頻度はラミブジン治療群では 436 例中 17 例 (3.9%) であるのに対し、非治

療(プラセボ)群では 215 例中 16 例 (7.4%) である。一方、2003 年の第 24 回本シンポジウムでの調査結果を報告した Matsumoto ら⁷⁾ の報告では、

表4 Coxの比例ハザードモデルによる肝細胞癌発生に関わる有意因子

| 因子 | カテゴリー | ハザード比 (95% CI) | P |
|--------------|-------|-------------------|--------|
| 性 | 女 | 1 | |
| | 男 | 1.74 (1.29~2.36) | <0.001 |
| 生検時年齢 (歳) | <40 | 1 | |
| | 40-59 | 2.95 (2.20~3.97) | <0.001 |
| | >60 | 7.18 (4.83~10.65) | <0.001 |
| ラミブジン治療 | なし | 1 | |
| | あり | 0.51 (0.36~0.74) | <0.001 |
| アルブミン | <4.0 | 1 | |
| | >4.0 | 0.68 (0.51~0.89) | 0.005 |
| ALT | <30 | 1 | |
| | >30 | 2.29 (1.45~3.61) | <0.001 |
| 血小板 | >15万 | 1 | |
| | <15万 | 1.91 (1.44~2.54) | <0.001 |
| 肝線維化 | F0,1 | 1 | |
| | F2,3 | 1.91 (1.32~2.77) | 0.001 |
| | F4 | 2.99 (2.02~4.43) | <0.001 |

ラミブジン治療群では平均2.7年の観察で肝細胞癌発生率は0.4%/人/年であるが、非治療群では平均5.3年の観察で2.5%/人/年と有意に発癌が抑制されていた。

今回の調査の目的は観察期間を延長することにより、発癌状況がより客観的に評価することにある。最も、信頼性のあるデータは性、肝生検時年齢、家族歴、血清アルブミン値、血小板数、肝組織線維化(F-stage)をpropensity scoreによりマッチさせラミブジン治療群と非治療群の肝細胞癌発生率の比較である。図3に示したように、今回の検討でも明らかにラミブジン治療群で有意に肝発癌が抑制された。肝細胞癌発生率をみるとラミブジン治療者では平均3.4年の観察で0.9%/人/年であるが、非治療群では平均6.9年の観察で4.9%/人/年と前述した値よりさらに顕著な差がみられた。このことはprospectiveな外国の研究で得られた成績同様、日本人におけるretrospectiveな調査でもラミブジン治療の有用性が明らかにされたといえる。

この成績からいえることは、肝発癌を長期にわたって抑制するにはラミブジンの長期投与が望ま

れる。しかしラミブジンの長期投与にはYokosuka⁹⁾が述べているようにいくつかの問題がある。中でも重要なのはラミブジン抵抗性ウイルスの出現であり、また中断後の肝障害の出現である。アデフォビルやエンテカビルの登場はラミブジンの弱点を補うものとして期待される。今後、どのような症例でラミブジンが有効か、あるいは効果が少ないかを明らかにし、適応を決める必要がある。今回のデータをさらに詳細に解析したい。

文 献

- 1) Janssen HLA et al : Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 365 : 123-129, 2005
- 2) Lau GKK et al : Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *NEJM* 352 : 2682-2695, 2005
- 3) Marcelline P et al : Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *NEJM* 351 : 1206-1217, 2004
- 4) Hadziyannis SJ et al : Long-term therapy with adefovir divoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis

- B. NEJM 352 : 2673-2681, 2005
- 5) Liaw YF et al : Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver diseases. NEJM 351 : 1521, 2004
 - 6) Papatheodordis GV et al : Outcome of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B on long-term nucleotide analog therapy starting with lamivudine. Hepatology 42 : 121, 2005
 - 7) Matsumoto A et al : Efficacy of lamivudine for preventing HCC in CH-B: a multicenter retrospective study of 2795 patients. Hepatol Res : 2005
Lamivudine effectively reduces the incidence of HCC in patients with chronic hepatitis B
 - 8) Yokosuka O : Prevention of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. Hepatol Res 32 : 141-143, 2005

*

*

*

1. 樹状細胞によるC型肝炎における肝発癌予防

林 紀夫* 巽 智秀* 考藤 達哉* 竹原 徹朗*

はじめに

わが国において肝癌による死亡率が急増しており、肝癌の約8割はC型肝炎による肝硬変を基盤に発生する。肝癌死を減らすためには慢性肝炎から肝硬変への進展を抑制することが肝要であり、そのためにはC型肝炎ウイルス(HCV)の排除を目指す必要がある。HCV排除には免疫系の賦活が重要であるが、生体において樹状細胞(DC)やマクロファージといった抗原提示細胞は、免疫細胞の活性化や機能調節を行うことで、ウイルスに対する初期および獲得免疫応答の制御を行っている。本研究ではC型肝炎におけるDC機能の評価とDCを用いた肝発癌予防への知見について述べたい。

I. C型肝炎におけるDC機能

DCは生体において最も強力な抗原提示細胞であり、ナイーブT細胞を刺激できる唯一の細胞である。DCは生体内の局在によってその分化・成熟度が異なる。骨髄から血液中に動員されたDC前駆細胞は、生体内の各臓器に広く分布し、ウイルス、細菌感染などの刺激を受けたDCは、分化成熟シグナルが入る。その結果、成熟したDCは二次リンパ組織に移動しそこでT細胞、NK細胞、NKT細胞などの免疫担当細胞との相互作用によ

り免疫応答を誘導すると考えられている。ヒトDCではその系統によりミエロイドDC(Myeloid DC; MDC)とプラズマサイトイドDC(Plasmacytoid DC; PDC)のサブセットに分類される。MDCはLPSやCD40リガンドによる刺激を受けるとIL-12やTNF- α などのサイトカインを産生し、PDCはウイルス感染に際し多量のI型インターフェロン(IFN)を産生する。われわれはC型肝炎末梢血単球から誘導したDCは、アロT細胞刺激能やIL-12産生能が非感染者に比べて低下していることを既に報告している¹⁾。

しかし、末梢血単球から*in vitro*で誘導したDCによる解析ではC型肝炎における実際の生体の状況を反映しているのかという疑問が生じることから、末梢血中に存在するMDC、PDCを直接分離し機能解析を行った²⁾。まず末梢血中のDCサブセットの頻度・数を検討した。末梢血単核球の中でLineageマーカー(CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)が陰性でHLA-DR陽性の細胞をDCとし、さらにCD11cとCD123の染色性でMDCとPDCを同定した。末梢血単核球での頻度から各DCサブセットの絶対数を計算し、HCV感染群と非感染群とで比較した。またHCV感染者をALT正常キャリア群(ASC群)とALT異常を伴う肝炎群(CH群)と分けて比較した(図1)。DC総数、MDC、PDCいずれもCH群では非感染群より低下していたが、ASC群は非感染群と同等であった。また、MDCからのIL-12産生能、PDCからの

*大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

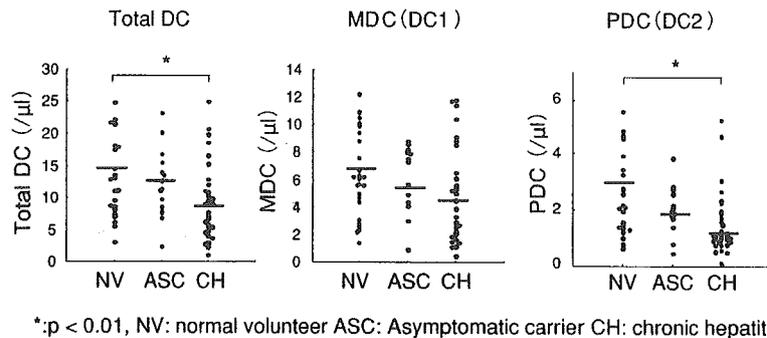


図1 C型慢性肝炎患者におけるDC数

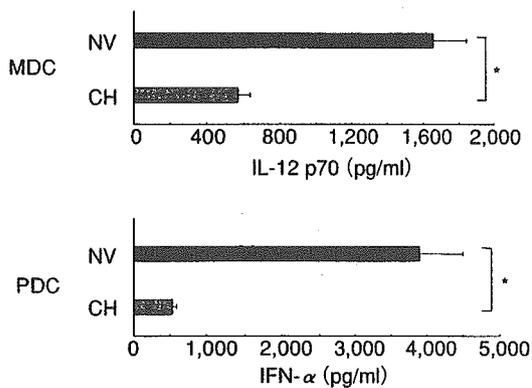


図2 DCサブセットのサイトカイン産生能の比較

IFN- α 産生能を比較すると、いずれも非感染群に比較してCH群では低下していた(図2)。HCVの排除にはHCV特異的CTLの誘導が必要であるが、CTLの誘導にはTh1有義の免疫環境が重要であることが明らかになっている。MDCとナイーブCD4T細胞を共培養し、その後のT細胞のサイトカイン産生能を検討すると、非感染者のMDCはIFN- γ を産生するTh1細胞を強く誘導したのに対し、C型肝炎患者のMDCはTh1誘導能が非感染者に比べ著しく低下していた。一方、PDCとナイーブCD4T細胞を共培養すると、C型肝炎患者PDCは非感染者DCに比較してIL-10産生細胞を多く誘導することが明らかになり、C型肝炎患者ではCTL誘導がされにくく、このことがHCV持続感染の機序の一端であると考えられ

た。今後DCサブセットの機能をさらに解析し、C型肝炎患者DCの機能低下、IFN- α への反応性の低下のメカニズムを明らかにすることで、DCを標的としたC型肝炎に対する免疫療法が可能になると考えている。

II. C型肝炎におけるNK細胞とNK細胞レセプターの解析

NK細胞はもともとトランスフォームした細胞に対する非特異的な細胞障害活性をもとに定義された細胞集団である。NK細胞による細胞障害機序についてはMHC class I発現を低下あるいは欠損した細胞を傷害するという事象が知られていた。その分子機構に関しては近年NK細胞に発現している抑制性レセプター群が次々に同定され、これらが正常細胞に構成的に発現しているMHC class Iを認識することにより、一般にNK活性は抑制されているが、腫瘍細胞のようにMHC class Iの発現が低下した細胞では、その抑制が解除され細胞障害活性を示すと考えられている。KIRやCD94/NKG2Aは、ヒトにおける代表的な抑制性レセプターである。さらにより近年になってNK細胞には活性化レセプターNKG2Dの存在が明らかになった(図3)。NKG2DはほぼすべてのNK細胞に発現していることと、そのリガンドがMICA/Bであることが同定されたことで特に注目されている。MICAおよびMICBはともに43 kDaの蛋白で、細胞膜上に発現する糖タンパク質である。MICA/Bは消化管上皮細胞や一部の胸腺細胞

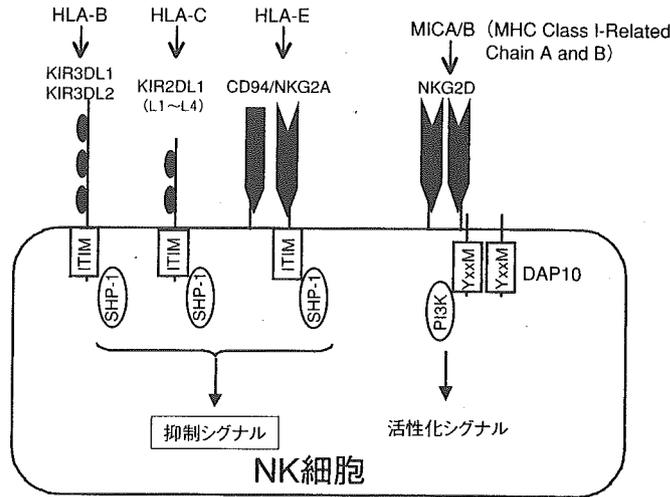
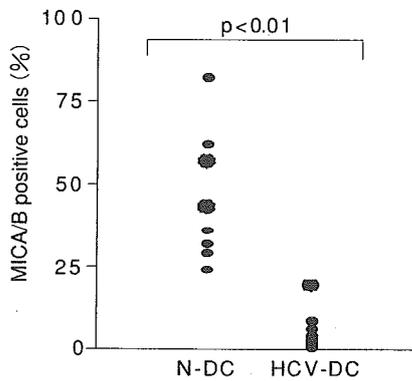


図3 NK細胞の活性化メカニズム



N-DC: DC derived from normal volunteer
HCV-DC: DC derived from patients infected with Hepatitis C virus

図4 HCV感染者におけるIFN α 刺激後樹状細胞のMICA/Bの発現

を除いては正常細胞には発現しておらず、ストレスを受けた細胞やトランスフォームした上皮細胞で発現が誘導されると考えられている。

われわれはC型肝炎患者末梢血単核球よりDCを誘導し、IFN- α で24時間刺激後、DC上のMICA/Bの発現を解析した³⁾(図4)。C型肝炎患者DC上のMICA/Bの発現は、健常者DCに比べて有意に低下していた。IFN- α 刺激DCとNK細胞を24時間混合培養ののちに、NK活性を比較すると健常者のDCではNK活性が増加するが、HCV感染者DCではNK活性が全く認められなかったこ

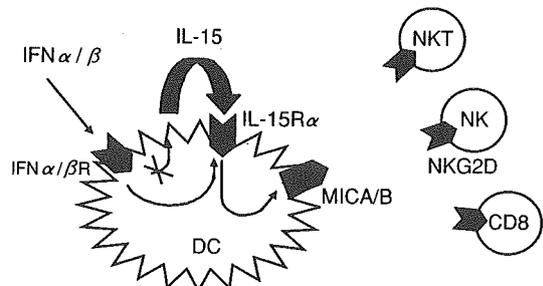


図5 IFNによるMICA/B発現におけるIL-15の役割

とから、C型肝炎患者DC上のMICA/Bの発現低下がこれに起因する可能性を明らかにした。DC機能は種々のサイトカインによって制御されている。DCにおけるMICA/Bの発現誘導を多くのサイトカインを用いて検討したが、健常者においてはIFN- α/β 以外にIL-15に同様の作用が認められた。しかしながらHCV感染者DCではI型IFN刺激ではMICA/Bの発現は誘導されなかったが、IL-15では発現誘導が起こり、I型IFNの下流のシグナルとしてIL-15が重要な役割を果たしていることを明らかにした(図5)。一方、C型肝炎患者NK細胞におけるNK細胞レセプターの発現の解析を行った⁴⁾。KIRファミリーのKIR2DL1/DS1, KIR2DL2.3/2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1いずれも健常者との有意差を認めなかった。これに対しレクチンタイプの抑制性レセプターであるCD94お

よびNKG2AはC型肝炎患者NK細胞にて発現が有意に亢進していた。同じくレクチンタイプの活性化レセプターNKG2Dは両群間で発現に差を認めなかった。C型肝炎患者、健常者における肝細胞に対するNK細胞認識機構の相違にCD94/NKG2A抑制性レセプターが果たす役割を明らかにするために、NK細胞と肝細胞の共培養時に抗NKG2A抗体を添加し、NK活性を検討した。C型肝炎患者NK細胞は、健常者NK細胞に比して、肝癌細胞に対する細胞障害活性が低いのみならず、培養上清中のIL-10やTGF- β の産生が増大していた。これらは抗NKG2A抗体の添加によって健常人NK細胞との差がなくなったことから、C型肝炎ではCD94/NKG2A発現亢進により、リガンド陽性肝細胞を認識し、NK細胞障害活性の低下、抑制性サイトカインの産生亢進を惹起することを明らかにした。

Ⅲ. C型肝炎における免疫ネットワーク

DCや傷害を受けた上皮細胞に発現するMICA/BはNKG2Dを介してNK細胞あるいはNKT細胞を活性化する。また、MICA/BはCD8陽性T細胞に対して副刺激活性がある。DCおよび一部の上皮細胞(肝細胞など)に発現しているCD1dはNKT細胞を活性化する。NKT細胞の活性化は、詳細なメカニズムは不明であるがNK細胞の活性化を誘導する。このようなDC、NKT細胞、NK細胞の活性化はその後のT細胞の応答性に影響を与える。従来獲得免疫応答の形成に関しては、抗原提示細胞による抗原の捕捉と提示を中心に解析されてきたが、獲得免疫の強さとTh1/Th2バランスは初期先天免疫応答により、よりダイナミックな調整を受けていることが明らかになっている(図6)。

Ⅳ. DCによる肝癌治療

日本における死因の第1位は癌による死亡であるが、その中でも肝癌、大腸癌による死亡は今後増加が予想されている。現在までこれら消化器癌に対して手術療法、放射線療法、化学療法などさ

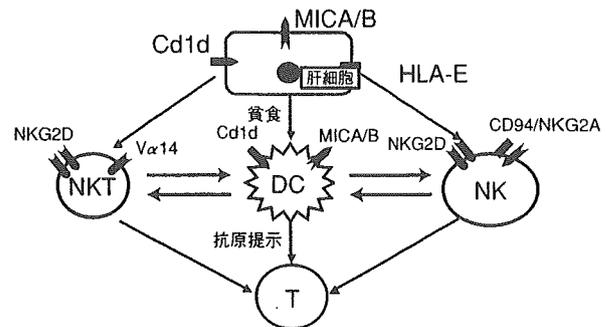


図6 免疫応答のネットワーク

まざまな治療法が集学的に行われ、その予後は改善してきているが、依然再発症例も多く、新たな癌治療法の確立は急務である。免疫学の進歩によって次世代の治療法として免疫療法が期待されている。現在では一部の癌抗原が同定され、癌抗原由来のペプチドを用いた癌治療が可能となっている。また生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)を用いた癌免疫療法が検討され、現在多くの癌において臨床試験が開始されているが、今のところ期待されたほどの結果は報告されていない。この原因として臨床応用の対象となる進行癌では全身の免疫反応がTh2系あるいはTr/Th3系のような抑制された状況にあることや、進行癌ではDC機能が、健常人に比して有意に低下していることが一因であることが示されている。

われわれはTh1系サイトカインであるIL-12に注目し、IL-12投与とDCによる癌ワクチンの併用効果を検討した。マウス肝癌細胞をマウス皮下に接種後、肝癌細胞lysateをパルスしたDCによるワクチンと、IL-12による腹腔内投与を行い、その抗腫瘍効果を検討した(図7)。マウス皮下肝癌腫瘍の形成はDCのみでも抑制されたが、IL-12の併用によってより強い抗腫瘍効果を示し、治療を受けたマウス脾リンパ球の肝癌細胞に対する細胞傷害活性は、DCワクチンとIL-12の併用にてより増大することを明らかにした⁵⁾。以上の結果はDCワクチンのより効果的な臨床応用を示唆する結果である。

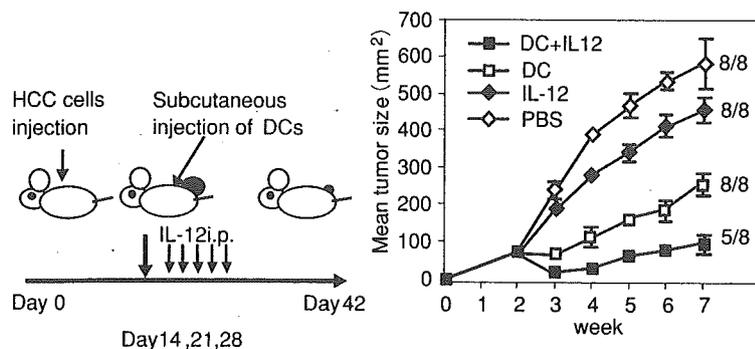


図7 肝癌 lysate をパルスした DC による癌ワクチン

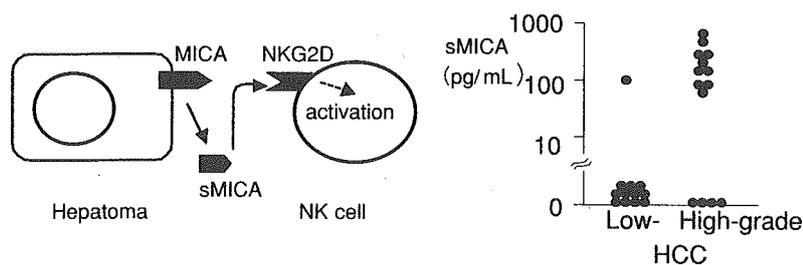


図8 進展した肝細胞癌では sMICA が血清中に分泌され、これにより NK 細胞の NKG2D が internalization し、NK 細胞の活性が抑制される。

V. 可溶性 MICA による NK 細胞活性化の抑制

DC 上の MICA 分子は NK 細胞活性化に重要な役割を果たしているが、最近血清中に可溶性 MICA が存在することが明らかになり、これが NK 細胞上の NKG2D と結合し、NK 細胞の活性化を抑制することが示された。われわれは血清中可溶性 MICA を肝細胞癌患者で測定した。可溶性 MICA は肝細胞癌患者、特に進行がん患者において増大しており、進行がん組織より産生されることが示唆された(図8)。さらに可溶性 MICA の増大は NK 細胞による DC 活性化を抑制することを明らかにした⁶⁾。これらのことは可溶性 MICA が肝癌の進行によって担癌患者の免疫環境に抑制的に働くことを示唆するものであった。

まとめ

C 型肝炎での DC 機能解析, NK 細胞活性化機構, 肝癌の DC による癌免疫治療の基礎的検討におけるわれわれの知見に関して述べてきた。従来免疫

応答は抗原提示細胞を中心とした獲得免疫応答の形成を中心に解析されてきたが、十分な獲得免疫を得るためには自然免疫系の活性化が必須であることが明らかになってきており、今後は自然免疫系の解析とともに、自然免疫と獲得免疫へのネットワークをより詳細に解析することが必要となってきた。C 型肝炎においても、その病態を明らかにするために、より詳細な解析が望まれており、将来的にはより効果的な治療法の開発につながることを期待している。

文 献

- 1) Kanto T, Hayashi N, Takehara T et al : Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from chronic hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162 : 5584-5591, 1999
- 2) Kanto T, Inoue M, Miyatake H et al : Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190 : 1919-1926, 2004
- 3) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al :

- Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171 : 5423–5429, 2003
- 4) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al : Negative regulation of NK cell activity by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173 : 6072–6081, 2004
- 5) Tatsumi T, Takehara T, Kanto T et al : Administration of interleukin 12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61 : 7563–7567, 2001
- 6) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al : Impairment of natural killer cell and dendritic cell function by the soluble forms of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005 (in press)

* * *

2. C型慢性肝疾患における抗ウイルス療法と肝庇護療法による肝発癌の予防

山田剛太郎* 戸川 三省* 新山 豪一* 川中 美和*

はじめに

C型慢性肝疾患における抗ウイルス療法としてインターフェロン(IFN)治療が保険承認されて10数年が経過した。しかしながら、2001年までの10年間はIFN単独療法のみであったためgenotype 1b型の高ウイルス量の症例では著効例(SVR)は10%以下と少なく、大半が無効例(NR)のまま経過した。一方、過去10数年間のうちにC型慢性肝炎の患者は急速に高齢化し、NR例の多くは60歳以上となっている。

1999年の第21回犬山シンポジウムで演者らは「C型慢性肝炎におけるIFN治療の長期予後と効果不十分例の対策」について発表した¹⁾。1989年4月～1994年3月の間にIFN治療を実施し、治療効果が不十分な症例に対してその後5年間追跡できた症例をもとに、肝庇護療法によるALTの改善と肝癌発生の抑制について検討した。その際の結論はNR, PRの症例ではその後の肝庇護療法が重要で、特に線維化ステージF3症例ではALTを80 IU以下に維持することにより、発癌率を低下させ、長期的な予後の改善が期待できるものと推測した。Tarao²⁾は当時、すでに肝庇護療法によるALTの抑制が肝発癌の予防に有用であることを論文発表していたが、まさに彼らの成績を支持するデータであった。

2001年12月以降にはIFN・Ribavirin(Rib)の併用療法、2002年2月からはIFNの長期投与、さらにPEG-IFNが認可され、従来のIFN単独療法でSVRとならなかった症例についても肝発癌のhigh risk症例を中心に発癌抑制を期待してIFNの再投与を実施している。

前回の発表から5年が経過したが、その間に追跡症例からも発癌症例が急増し、一部はALTの落ち着いた症例からも発癌が認められている。今回改めて、IFN治療効果が不十分であった症例について10年間の長期予後を観察できた症例をもとに肝庇護療法とIFNの再投与が肝発癌の予防に役立っているかどうかについて検討した。

I. 対象と方法

対象はC型慢性肝炎にて1989年4月～1995年3月にIFN治療を実施した症例で、治療効果不十分のため、不完全著効(ICR)、有効(PR)、無効(NR)と判定された症例で、その後10年間、治療経過を観察できた症例である。全例、IFN治療前に肝生検を実施し、肝組織診断は改めて新犬山分類のstagingとgradingで診断した。

1995年4月～2000年3月までの前半の5年間を観察できた症例は127例、さらに2000年4月～2004年3月までの後半の5年間を観察できた症例は107例である。

10年間の経過観察は治療として肝庇護療法(SNMC, UDCA)ないしはIFNの再投与の有無、

*川崎医科大学附属川崎病院肝臓消化器病センター内科

表1 背景因子：肝発癌例と非発癌例の比較

| | total | HCC (+) | HCC (-) | P-value |
|---------------------------|-------------|------------|-------------|---------|
| N | 107 | 39 | 68 | |
| 年齢 | 59.9 ± 9.7 | 63.8 ± 6.5 | 57.6 ± 10.6 | <0.01 |
| 性別 (M/F) | 48/59 | 19/20 | 29/39 | NS |
| 飲酒歴 (有/無) | 14/92 | 7/32 | 7/60 | NS |
| 輸血歴 (有/無) | 37/69 | 16/23 | 21/46 | NS |
| 家族歴 (有/無) | 15/91 | 3/36 | 12/55 | NS |
| Fibrosis (F1/F2/F3/F4) | 23/21/50/13 | 1/2/26/10 | 22/19/24/3 | <0.0001 |
| Activity (A1/A2/A3) | 29/46/27 | 3/19/14 | 26/27/13 | 0.0012 |
| 血小板数 | 14.3 ± 5.3 | 11.2 ± 4.1 | 16.1 ± 5.1 | <0.01 |
| Serotype (1型/2型/不明) | 86/13/8 | 31/4/4 | 55/9/4 | NS |
| 治療効果 (ICR/PR/NR) | 19/36/52 | 2/12/25 | 17/24/27 | 0.0076 |

臨床経過としてALTの変動, HCV-RNAの陰性化, 肝発癌の有無について検討した。

ALT (IU)の変動は前回の方法に準じ¹⁾, ALTの年平均値を求め, 高度上昇(H), 中程度上昇(M), 軽度上昇(L)に分け, さらに肝発癌例では発癌までの期間, 非発癌例では過去10年間, Hが主体ならALT高値型, Mが主体ならALT中値型, Lが主体ならALT低値型に分類した。

II. 成績

1. 背景因子

107例の観察開始時(1995年4月)の平均年齢は59.9歳と高齢で, 男女比は48/59と女性が多い。肝生検の線維化診断はF3が50例と最も多い。Serotypeは1型が86例と大半を占め, しかも100 KIU以上の高値例が多い。1994年までのIFNの治療効果はICR/PR/NR=18/36/52とNR, PR例が多い。10年間の経過観察中に39例が肝発癌をきたしたが, 発癌例と非発癌例の比較では年齢, 肝生検の線維化stageと炎症のactivity, 血小板数, IFN治療効果で差を認めた(表1)。しかし, 1995~1999年の5年間に発癌をきたした14例と2000~2004年の5年間に発癌した25例の背景因子に

は有意の差は認められなかった。

10年間の累積肝発癌率はF1~2では極めて低いに対して, F3では高く, 特に後半の5年間で発癌率が急速に高まっている(図1)。

2. 10年間のALTの変動型と肝発癌

IFN治療後, ALTの中程度ないしは高度上昇例に対してはほとんど全例で肝臓用剤(SNMC, UDCA)による治療を実施し, さらに32例ではIFNの再投与を実施した。これら治療によって2例でHCV-RNA陰性化し, 41%がALT低値型を示したが, 残りの症例は, ALT高値型(22%)ないしはALT中値型(37%)であった。肝線維化ステージごとにALT型別に肝発癌率を1995~1999年と2000~2004年に分けて検討した。F3症例では1995~1999年の5年間の肝発癌発生率は前回の検討と同様にALT高値型では33%程度に比して, 中, 低値型では極めて少なかった。一方, 2000~2004年の5年間ではALT高値型のみでなく, 中値型で59%, 低値型も30%と多数の癌発生が観察された(表2)。ロジステック回帰モデルを用いた肝発癌に寄与する因子の検討でも1995~2004年の10年間ではALTの変動型はなお, 有意な因子であったが, 後半5年間(2000~2004年)

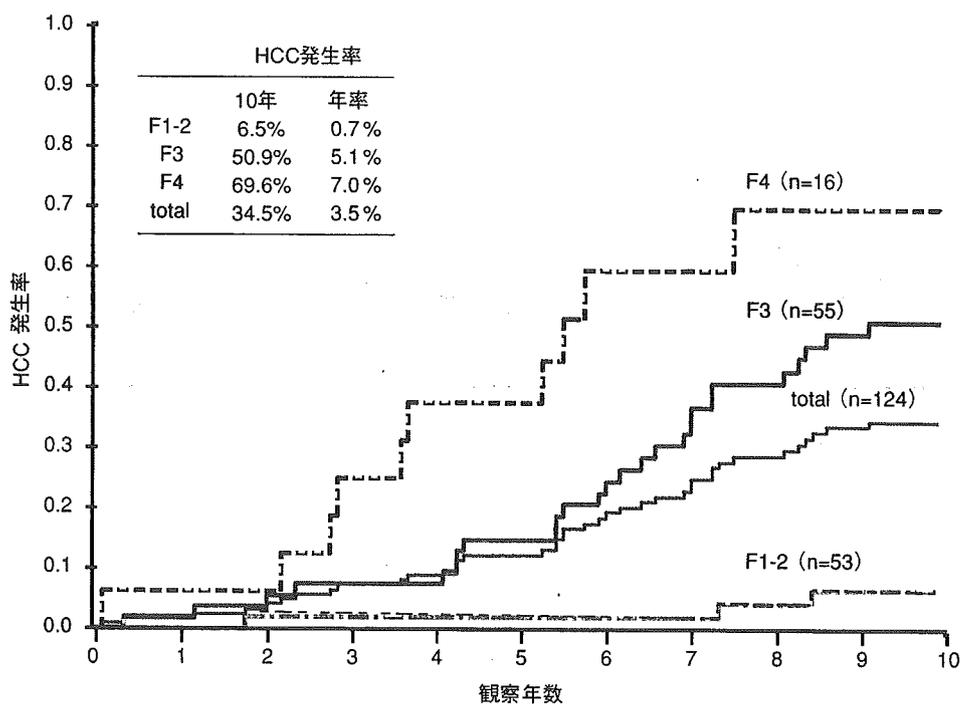


図1 肝線維化Stage別累積肝発癌率 (Kaplan-Meier法)

表2 F3症例におけるALT変動型別のHCC発生率
—1995～1999年と2000～2004年の比較—

| | ALT変動型 | HCC発生率 | |
|----|--------|---------------|--------------|
| | | 1995～1999年 | 2000～2004年 |
| F3 | L | 20/21 (95.2%) | 0/21 (0%) |
| | M | 22/22 (100%) | 3/22 (13.6%) |
| | H | 12/12 (100%) | 4/12 (33.3%) |

では有意差は失われた。

F3症例のうち、この10年間にIFN再投与を受けた症例での肝発癌率は16.7% (2/12)と、再投与を受けていない症例での発癌率54.8% (17/31)に比較して有意に少ない(表3)。

Ⅲ. 考察およびまとめ

C型慢性肝炎の抗ウイルス療法もPEG-IFNの単独療法、さらにPEG-IFNとRibの併用療法による保険診療が認可され、症例に応じたテーラーメイドな治療が可能な時代を迎えている。しかし、従来のIFN療法で無効であった多くの1b型の高

表3 F3症例のIFN再投与例と非再投与例におけるHCC発生率 (2000～2004年)

| ALT | IFN再投与率 | HCC発生率 | |
|-------|---------|--------------|---------------|
| | | IFN再投与(+) | IFN再投与(-) |
| L | 3/20 | 1/3 (33.3%) | 5/17 (29.4%) |
| M | 6/17 | 1/6 (16.7%) | 9/11 (81.8%) |
| H | 3/6 | 0/3 (0%) | 3/3 (100%) |
| Total | | 2/12 (16.6%) | 17/31 (54.8%) |

ウイルス量患者は肝庇護療法を主体に治療してきたが、現在では65歳以上の高齢者が多く、併用

療法の恩恵を受けることの難しい症例が増加している。

1999年にIFN治療後5年を経過した症例をもとに、肝庇護療法による肝発癌抑制効果を検討し、発癌リスクの高いF3症例では肝庇護療法によりALTを80 IU以下に維持することによって長期予後の改善が期待されることを報告した。しかしながら、今回、これらF3症例のさらに5年間の追跡調査では、ALT中値型のみでなく、年平均ALT 40 IU以下の低値型でも30%に発癌が認められた。

したがって、線維化の進展したF3症例では肝庇護療法によって炎症を抑制し、肝発癌を遅らせることはできるが、長期的には肝発癌を阻止することは難しいものと推測された。一方、IFNの再投与例では肝発癌の頻度は明らかに少なく、発癌

抑制効果が期待されるが、全体の症例数が少なく、また、再投与例の多くは長期投与が認可された2002年以降の投与であり、今後さらに長期予後を観察する必要がある。高齢化した肝発癌ハイリスク群に対する発癌抑制療法として肝庇護療法に加えて、新たな治療法の確立が待たれる。

文 献

- 1) 山田剛太郎, 新山豪一, 川中美和: C型慢性肝炎におけるIFN治療の長期予後と効果不十分例の対策. 犬山シンポジウム記録刊行会編, 中外医学社, 1999, pp195-201
- 2) Tarao K et al: Significance of hepatocellular proliferation in the development of hepato-cellular carcinoma from anti-hepatitis C virus-positive cirrhotic patients. *Cancer* 73: 1149-1154, 1994

* * *

Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies

Norio Akuta* and Hiromitsu Kumada

Department of Gastroenterology, Toranomon Hospital, 2-2-2 Toranomon, Minato-ku, Tokyo, 105-0001, Japan

Hepatitis B virus (HBV) has been classified into eight genotypes (A–H) based on genome sequence divergence. Genotypes of HBV have distinct geographical distributions, and two genotypes account for most HBV worldwide. Hepatitis B e antigen expression lasts longer and liver disease is more severe with graver outcomes in carriers of genotype C than B in Asia. Accumulating lines of evidence indicate a better response to interferon and lamivudine in patients with chronic hepatitis B who are infected with genotype B rather than C. The therapeutic response may differ, however, in patients infected with HBV of the same genotype. For example, the response to lamivudine is poorer in patients infected with subtype Ba, which contains a recombination with genotype C, than in those with subtype Bj without such a recombination. Influence of genotypes on therapeutic response needs to be examined in patients infected with the other genotypes, particularly in those with genotype A or D infection.

Keywords: chronic hepatitis, genotypes, hepatitis B e antigen, hepatitis B virus, interferon, lamivudine

Introduction

Worldwide, 350 million people are estimated to be persistently infected with hepatitis B virus (HBV),¹ and three-quarters of these people reside in Asia. The morbidity and mortality of persistent HBV infection are a major public health concern. More than one million deaths every year are due to end-stage HBV liver disease, such as decompensated liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The carrier state of HBV is established mainly through mother-to-baby infection in Japan, where the prevalence of hepatitis B surface antigen carriage (HBsAg) in the general population used to be less than 2%, while horizontal transmission during infancy plays an additional role in the other countries in Asia and accounts for most persistent infections in Africa where HBsAg prevailed in >8% of the general population during the past. Although much less efficient, horizontal transmission can lead to persistent HBV infection in Western countries through sexual contact and illicit intravenous drug use. Individuals with persistent HBV infection need to be identified early and receive efficient antiviral therapy in order to prevent the development of serious liver disease.

Genotypes of HBV

The response to antiviral therapy in HBV infection is influenced by many host and viral factors. Recently, HBV genotypes have attracted increasing attention since they influence the activity

and outcome of HBV-associated chronic liver disease, as well as the response to antiviral therapies. In 1988, four genotypes of HBV (A–D) were proposed based on sequence divergence of >8% in the entire HBV genome, which consists of approximately 3200 base pairs.² Later, an additional four genotypes (E–H) were identified by the same criteria.^{3–5} HBV genotypes have distinct geographical distributions,⁶ and the full picture awaits further epidemiological surveys in many as yet unexamined countries. Overall, genotype A prevails in Northwest Europe, sub-Saharan Africa, India and the United States, B and C are frequent in Southeast Asia, Japan and Oceania, and D is common in the Mediterranean countries. Genotype E is restricted to Africa, and F is found mainly in Central and South America. The distribution of genotypes G and H is yet to be determined. Since persistent HBV infection is frequent in Asia, genotypes B and C prevailing there have been studied most extensively with their clinical and therapeutic differences unfolding rapidly. Differences between genotypes A and D prevailing in Western countries, India and the United States, also, are increasingly coming to the fore.

Clinical manifestations of persistent HBV infection with distinct genotypes

Prospective, case-controlled and cross-sectional studies predominantly but not entirely indicate that the severity and outcome of chronic hepatitis B are more serious in patients infected with

*Corresponding author. Tel: +81-44-877-5111; Fax: +81-44-860-1623; E-mail: akuta-gi@umin.ac.jp

genotype C compared with B.⁷⁻¹⁰ Liver cirrhosis and HCC are more frequent in carriers of genotype C than B.^{7,11-13} Very recently, chronic liver disease was detected more frequently in Japanese individuals infected with genotype C than D [221/350 (63%) compared with 6/38 (16%), $P < 0.001$].¹⁴

The synthesis of hepatitis B e antigen (HBeAg) is regulated at both translational and transcriptional levels.¹⁵ Mutations to create stop codons in the precore region, typified by the G-to-A mutation at nucleotide (nt) 1896 (G1896A), shut down the translation of HBeAg completely. The double mutation in the core promoter, A-to-T at nt 1762 and G-to-A at nt 1764 (A1762T/G1764A), interferes with the proper transcription of HBeAg precursor, thereby downregulating the synthesis of HBeAg. The precore stop codon mutation (G1896A) is detected more frequently in persons infected with genotype B than C; it is inhibited in those with genotype A, because it destabilizes the encapsidation signal.¹⁶ In remarkable contrast, the core promoter double mutation (A1762T/G1764A) is more common in those with genotype C than B. Overall, the ramifications of this are that the seroconversion to the loss of HBeAg takes longer in individuals infected with genotype C than B, and is accompanied by the development of severe liver disease.

Sugauchi *et al.*¹⁷ reported two subtypes of genotype B, one of which possesses a recombination with genotype C over the precore region plus core gene (subtype Ba) while the other does not (subtype Bj). The distribution of subtype Bj is restricted to Japan (hence the 'j' for Japan), in contrast to subtype Ba found in all Asian countries other than Japan ('a' for Asia, therefore). Since HBeAg and the double mutation in the core promoter (A1762T/G1764A) are significantly more frequent in carriers of subtype Ba than Bj,¹⁸ subtypes of genotype B may influence the clinical outcome and the response to antiviral therapies for chronic hepatitis B.

To a lesser extent, clinical differences between genotype A and D infections have been reported from Europe, where these genotypes are frequent. HBV infection is contracted in adulthood in these countries, principally through sexual contacts and illicit drug use, and HBV infection is more likely to persist in persons infected with genotype A rather than D or the other genotypes.¹⁹ These findings stand at variance with those of Sanchez-Tapias *et al.*²⁰ who found sustained biochemical remission and clearance of HBV DNA to be more frequent in infection with genotype A than genotype D (log-rank, 14.2, $P = 0.002$) or genotype F (log-rank, 4.2, $P = 0.03$); the rate of HBsAg clearance was also found to be higher in genotype A compared with D infection (log-rank, 4.06, $P = 0.03$). Likewise in a comparison between 60 and 63 patients in India infected with HBV genotype A or D, respectively, genotype D was significantly associated with severe liver disease (61% compared with 30%, $P < 0.05$) and tended to be more frequent in those with HCC below 40 years of age (63% compared with 44%, $P = 0.06$).²¹ Clinical differences amongst HBV genotypes manifest themselves in the distribution of acute and chronic liver disease in those who visit hospitals. In our Toranomon Hospital in metropolitan Tokyo, 57 adult patients with acute hepatitis B and 1077 with chronic hepatitis B were admitted during the same period.²² The distribution of genotypes were: genotype A (acute, 22.8% versus chronic, 1.9%; $P < 0.00001$); B (14.0% versus 9.4%); C (43.9% versus 87.7%, $P = 0.004$); D (1.8% versus 0.2%); F (1.8% versus 0.2%); and untypeable (15.8% versus 0.6%, $P = 0.001$).

Influence of HBV genotype on the response to antiviral therapy

Until lamivudine was developed for clinical use, interferon had remained the sole practical antiviral for chronic hepatitis B, ever since initial clinical trials by Hoofnagle and colleagues^{23,24} in the mid-1980s. The response to interferon, judged by the loss of HBeAg from serum, is achieved in at most 20% of treated patients.²⁵ Moreover, Asian patients who have acquired the HBV carrier state at birth or in early infancy respond to interferon more poorly than Caucasian patients who contracted it in adulthood.²⁶ To make matters even worse, patients with chronic hepatitis B positive for anti-HBe antibodies are much less responsive to interferon than those with serum HBeAg.²⁷ Limited experience indicates that HBV genotypes make a difference in the response to interferon in patients with chronic hepatitis B.

Zhang *et al.* compared the response between 10 patients with genotype A infection and 21 patients with genotype D or E infection.²⁸ Since all patients they studied were positive for anti-HBe antibodies, the negative influence of genotype A on seroconversion to anti-HBe was excluded. They found the response to interferon was higher in patients infected with genotype A compared with D or E (70% versus 40%, $P = 0.001$).²⁸ Likewise, Kao *et al.*²⁹ reported the response to interferon to be higher in patients infected with genotype B rather than C [13/32 (41%) versus 4/26 (15%), $P = 0.045$]. More recently, Wai *et al.*³⁰ compared the response between patients randomized to interferon or placebo. They found the response was better in patients with genotype B than C infection who were allocated to interferon treatment [12/31 (39%) versus 7/42 (17%), $P = 0.034$]; the response rate did not differ in those who received placebo.

Lamivudine [(−)-β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] is a nucleoside analogue with a potent antiviral activity. Since its approval in 1998, lamivudine has gained wide popularity for the treatment of chronic hepatitis B due to high efficacy with minimal untoward effects.³¹⁻³⁵ We believe in continued lamivudine treatment for patients with or without serum HBeAg,³⁶⁻³⁹ and have accumulated experience with 286 patients including seven who have received lamivudine for 7 years or longer.⁴⁰ HBV genotype also makes a difference in the response to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. Among the 16 patients who had received lamivudine for 3 years or longer, the virological response with the loss of HBV DNA detectable by non-amplified method was achieved in two of the three (67%) patients infected with genotype B and in seven of the 13 (54%) patients infected with genotype C.

Kao *et al.*⁴¹ reported on the response to lamivudine in patients treated for 6–30 months infected with genotype B compared with C [3/13 (23%) versus 2/18 (11%), no significant differences]. They found resistance to lamivudine in two (15%) patients with genotype B and in four (22%) with genotype C. Chien *et al.*⁴² reported that the sustained response to lamivudine was much higher in patients infected with genotype B compared with genotype C [38/62 (61%) versus 5/20 (20%), $P = 0.009$]. We monitored 213 patients on continued lamivudine treatment for drug-resistant HBV variants for mutations in the tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) motif in the viral DNA polymerase/reverse transcriptase.⁴³ The emergence of YMDD mutants was no different amongst patients infected with genotype A, B or C. However, YMDD mutants developed significantly more frequently in patients infected with subtype Ba

than B_j during 2 years on lamivudine [3/4 (75%) versus 1/14 (7%), $P < 0.05$]. Severe acute exacerbation of hepatitis occurred in four of the 185 (2%) patients with genotype C along with the emergence of YMDD mutants, but in none of the 28 patients with the other genotypes. In patients with chronic hepatitis B in Germany, risk of lamivudine resistance was significantly higher in carriers of HBsAg of serotype adw than ayw [7/13 (54%) versus 1/13 (8%), $P = 0.03$];⁴⁴ serotype adw corresponded to genotype A and ayw to D.⁴⁵

Conclusion

HBV genotypes influence the severity of liver disease and response to interferon and lamivudine. They are also expected to influence the response to adefovir dipivoxil, which has recently been approved for treatment of chronic hepatitis B,⁴⁶ as well as the emergence of resistant mutants;⁴⁷ although as yet no differences have been observed in the response to adefovir dipivoxil in relation to HBV genotypes.⁴⁸ Should poor responses to a given antiviral be predicted in patients infected with HBV of certain genotypes, they can be directed to the other therapeutic options to spare the cost and burden of treatment. In evaluating the association of HBV genotypes with the response to antiviral therapies, however, it needs to be taken into account that patients visiting hospitals are biased for severe liver disease. Moreover, once full-blown disease develops, it would become refractory to any antiviral treatments. Thus, genotype differences may be attenuated in patients with severe liver disease seen in hospitals,^{49,50} probably due to exclusion of patients with less severe disease who can still benefit from treatments. This view would be supported by different distributions of genotypes B (12% and 54%, respectively) and C (84% and 47%) between patients visiting hospitals and individuals found with HBV infection at routine check-ups in the same district of Japan.^{51,52} Therefore, in evaluating the influence of HBV genotypes on response to antiviral therapies, one has to keep in mind not only patients with liver disease who visit hospitals, but also those who have not and who may benefit from early treatment.

References

- Lee, W. M. (1997). Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine* **337**, 1733–45.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H. *et al.* (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* **69**, 2575–83.
- Norder, H., Courouce, A. M. & Magnius, L. O. (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* **198**, 489–503.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C. *et al.* (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* **81**, 67–74.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. *et al.* (2002). Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology* **83**, 2059–73.
- Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2003). Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* **46**, 329–38.
- Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. *et al.* (2000). Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **118**, 554–9.
- Orito, E., Mizokami, M., Sakugawa, H. *et al.* (2001). A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. *Hepatology* **33**, 218–23.
- Chu, C. J., Hussain, M. & Lok, A. S. (2002). Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* **122**, 1756–62.
- Nakayoshi, T., Maeshiro, T., Nakasone, H. *et al.* (2003). Difference in prognosis between patients infected with hepatitis B virus with genotype B and those with genotype C in the Okinawa Islands: a prospective study. *Journal of Medical Virology* **70**, 350–4.
- Tsubota, A., Arase, Y., Ren, F. *et al.* (2001). Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *Journal of Medical Virology* **65**, 257–65.
- Fujie, H., Moriya, K., Shintani, Y. *et al.* (2001). Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* **120**, 1564–5.
- Lee, C. M., Chen, C. H., Lu, S. N. *et al.* (2003). Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **38**, 95–101.
- Duong, T. N., Horiike, N., Michitaka, K. *et al.* (2004). Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *Journal of Medical Virology* **72**, 551–7.
- Miyakawa, Y., Okamoto, H. & Mayumi, M. (1997). The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative infections. *Journal of Viral Hepatitis* **4**, 1–8.
- Li, J. S., Tong, S. P., Wen, Y. M. *et al.* (1993). Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *Journal of Virology* **67**, 5402–10.
- Sugauchi, F., Orito, E., Ichida, T. *et al.* (2002). Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *Journal of Virology* **76**, 5985–92.
- Sugauchi, F., Orito, E., Ichida, T. *et al.* (2003). Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* **124**, 925–32.
- Mayerat, C., Mantegani, A. & Frei, P. C. (1999). Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *Journal of Viral Hepatitis* **6**, 299–304.
- Sanchez-Tapias, J. M., Costa, J., Mas, A. *et al.* (2002). Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* **123**, 1848–56.
- Thakur, V., Guptan, R. C., Kazim, S. N. *et al.* (2002). Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **17**, 165–70.
- Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K. *et al.* (2002). Viral genotypes and response to interferon in patients with acute prolonged hepatitis B virus infection of adulthood in Japan. *Journal of Medical Virology* **68**, 522–8.
- Dooley, J. S., Davis, G. L., Peters, M. *et al.* (1986). Pilot study of recombinant human alpha-interferon for chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* **90**, 150–7.
- Hoofnagle, J. H., Peters, M., Mullen, K. D. *et al.* (1988). Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **95**, 1318–25.
- Wong, D. K., Cheung, A. M., O'Rourke, K. *et al.* (1993). Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* **119**, 312–23.
- Liaw, Y. F., Leung, N., Guan, R. *et al.* (2003). Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: an update. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **18**, 239–45.