

た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 2006;44:326-334.
2. 髭 修平. ペグ化インターフェロン. 肝臓病の最新治療 先端医療技術研究所 2006: 34-39.

2. 学会発表

- 1) 髭修平、中馬誠、浅香正博. HBe 抗原陽性慢性肝炎の C P/PreC 変異と抗ウイルス療法. 第 92 回日本消化器病学会総会、北九州市、2006
- 2) 小原俊央、髭修平、中西満、小川浩司、山本洋一、夏井坂光輝、中馬誠、浅香正博、永坂敦. HBe 抗原陽性慢性肝炎に対するインターフェロン・ラミブジン併用療法. 第 92 回日本消化器病学会総会、北九州市、2006
- 3) 小川浩司、小原俊央、夏井坂光輝、山本洋一、中西満、中馬誠、髭修平、浅香正博. C 型慢性肝炎症例への

リバビリン投与における血小板数増加. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都市、2006

- 4) 中西満、小原俊央、山本洋一、夏井坂光輝、小川浩司、中馬誠、髭修平、浅香正博. JIS スコアを用いたウイルス別の肝細胞癌の予後予測. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都市、2006
- 5) 中馬誠、髭修平、白土博樹. 高度脈管腫瘍栓を伴う進行肝臓癌に対する動態追跡照射併用肝動注療法の有用性. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都市、2006
- 6) 中馬誠、髭修平、浅香正博. Vitamin K2 の肝細胞癌における再発抑制と肝硬変からの発癌抑制に関する検討. 第 10 回日本肝臓学会大会、札幌市、2006
- 7) 中西満、中馬誠、髭修平、佐賀啓良、内田多久実、西研、渡辺雅男、宮城島拓人、狩野吉康、川村直之、高木智史、目黒高志、永坂敦、山本義也、國枝保幸、館山美樹、熊谷研一. PEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用療法初期のウイルス動態による治療反応性. 第 10 回日本肝臓学会大会、札幌市、2006
- 8) 山本洋一、髭修平、莊拓也、夏井坂光輝、小川浩司、中西満、中馬誠、吉田繁、浅香正博. MGB プローブ法による HBV 変異株の定量. 第 10 回日本肝臓学会大会、札幌市、2006
- 9) 莊拓也、髭修平、夏井坂光輝、中西満、加畑馨、中馬誠、近藤健、太

田秀一、橋野聡、渡部恵子、大野稔子、浅香正博、田中淳司、今村雅寛、藤本勝也、佐藤典宏、小池隆夫、HIV/HCV 重複感染例に対する抗 HCV 療法の現状. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京都、2006

ルス療法：IFN・LAM 併用療法の有用性. 第 36 回日本肝臓学会東部会、東京都、2006

10) 中西満、髭修平、夏井坂光輝、山本洋一、中馬誠、佐賀啓良、内田多久実、西研、渡辺雅男、宮城島拓人、狩野吉康、工藤峰生、鈴木岳、目黒高志、永坂敦、成瀬宏仁、國枝保幸、館山美樹、紺野潤、姜貞憲、浅香正博. C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法個別化のためのチェックポイント. 第 36 回日本肝臓学会東部会、東京都、2006

G. 知的所有権の取得状況
該当なし

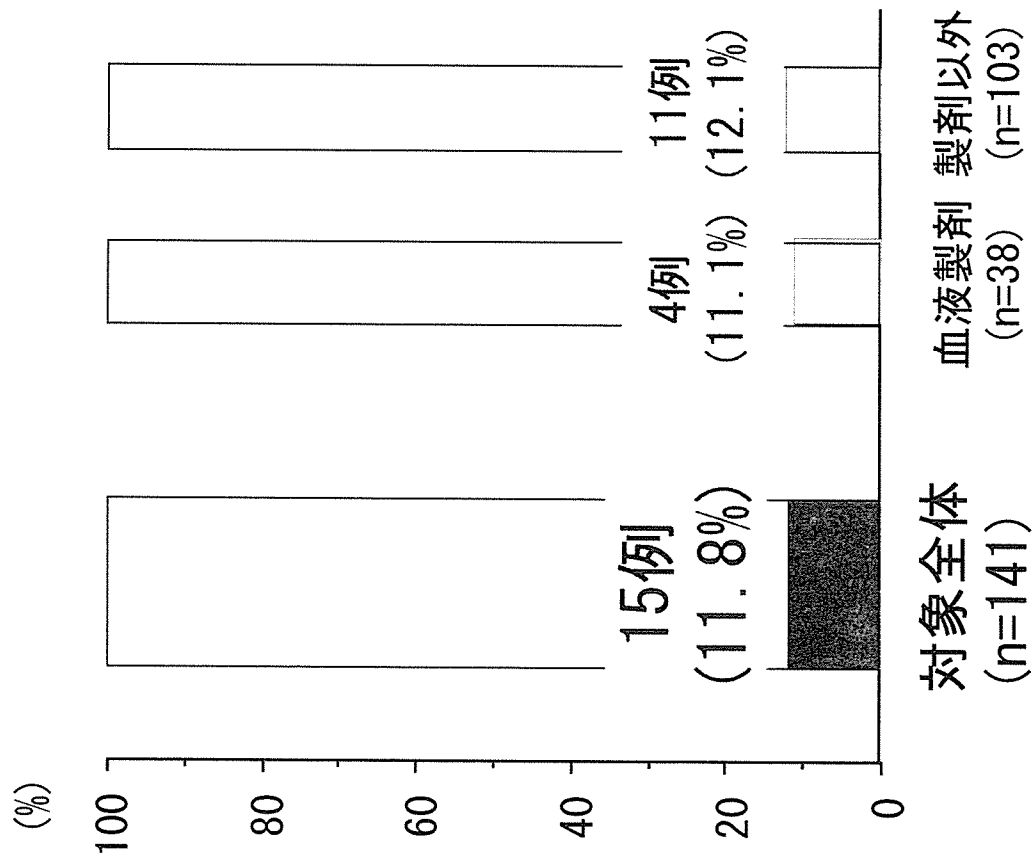
11) 山本洋一、髭修平、荘拓也、夏井坂光輝、中西満、中馬誠、浅香正博. Peptide nucleic acid clumping と Minor groove binder プローブ併用による HBV-DNA の定量. 第 36 回日本肝臓学会東部会、東京都、2006

12) 荘拓也、髭修平、夏井坂光輝、中西満、中馬誠、近藤健、太田秀一、橋野聡、浅香正博、今村雅寛、藤本勝也. HIV/HCV 重複感染例に対する抗 HCV 療法の現状. 第 36 回日本肝臓学会東部会、東京都、2006

13) 中馬誠、髭修平、中西満、夏井坂光輝、山本洋一、小原俊央、荘拓也、永坂敦、浅香正博. HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する抗ウイ

図1. HIVと肝炎ウイルスの重複

HIV/HBV



HIV/HCV

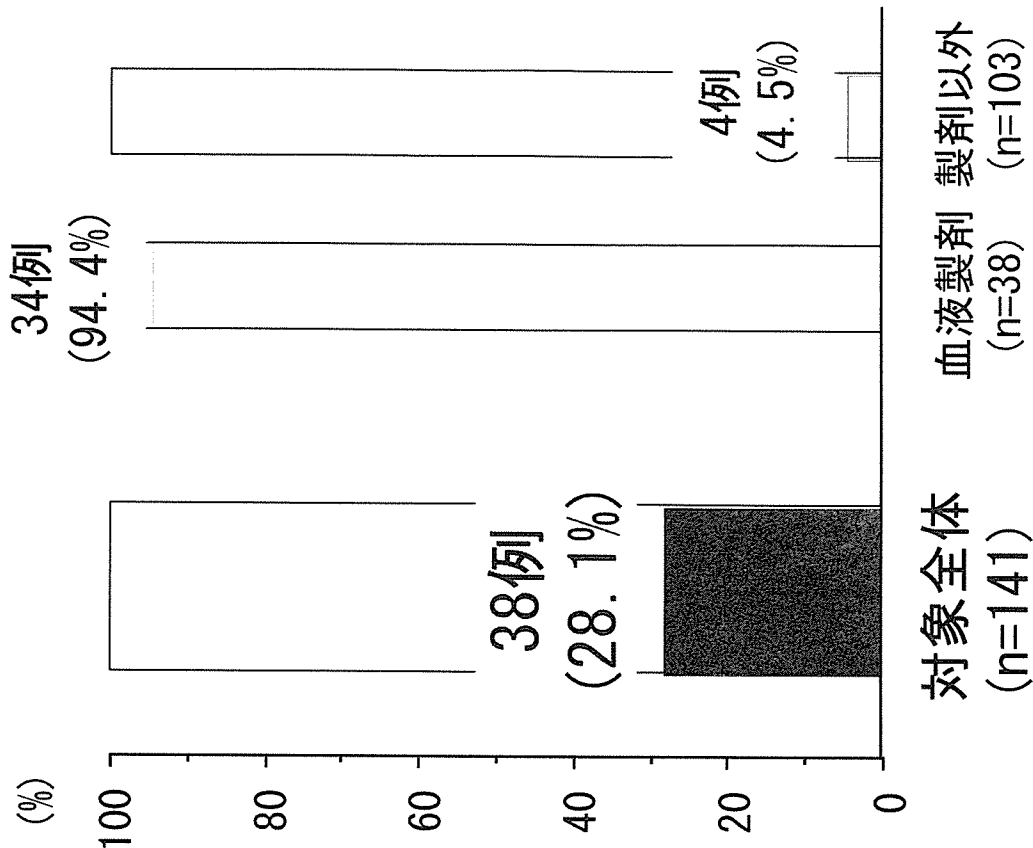


表1. HIV/HBV重複感染例の肝炎ウイルスマーカー

HIV感染	HBV感染予想経路	HBs抗原	HBs抗体	HBe抗原	HBe抗体	HBV-DNA量 (PCR法)	PC変異	CP変異	HBV genotype	HCV抗体
製剤	乳幼児期感染	635.5	0	<1.0	96.3	<2.6				-
製剤	乳幼児期感染	145.1	0	<1.0	93.2	<2.6	感度以下	感度以下		+
製剤	乳幼児期感染 (製剤?)	60.0	0.3	14.1	<5					-
製剤		+								+
二次	キャリア?	174.9	0	>300	<50	>3800 #	100/0	wild	D	+
homo	水平感染 (急性期)	86.5	0	47.2	<5	5.8	100/0	wild	C	-
homo	水平感染 (急性期)	381.4	0	282.1	<60	6.3	100/0	wild	Ae	-
homo	水平感染 (急性期)	209.6	0	294.9	<60	9.2	100/0	wild	Ae	-
homo	水平感染	220.2	0	221.5	<50	>4700 #			Ae	-
homo	水平感染	223.6	0	201.4	<60	9.2	80/20	wild	Ae	-
homo	水平感染	232.9	0	273.2	<60	8.6	100/0	wild	Ae	-
homo	水平感染	371.6	0	247.1	<60	8.6	100/0	wild	Ae	-
homo	水平感染	353.9	0	262.1	<60	8.7	100/0	感度以下	H	-
homo	水平感染	389.0	0	220.0	<60	9.5	100/0	感度以下	H	-
hetero	乳幼児期感染	321.8	0	<1.0	96.6	<0.70 #				-

(#: b-DNA法)

HIV感染症に合併する各種疾病に関する研究

分担研究報告書

HIV感染者における急性B型肝炎の転帰—非HIV感染者との比較—

分担研究者 正木 尚彦 国立国際医療センター 消化器科
 共同研究者 酒匂 赤人 国立国際医療センター 消化器科
 菊池 嘉 同 エイズ治療・研究開発センター
 岡 慎一 同 エイズ治療・研究開発センター

研究要旨：2002年～2006年に当センターエイズ治療・研究開発センターおよび消化器科を受診した急性B型肝炎患者を対象として、ウイルス学的ならびに臨床的検討を行った。HIV感染者13例（全例男性：33±8歳）と非HIV感染者36例（男性31例/女性5例：36±12歳）を対比すると、ゲノタイプはHIV群：A5例（83%）/H1例、非HIV群：A15例（44%）/B7例/C11例/E1例で、いずれの群でもゲノタイプAが最も多かった。感染経路はHIV群：ホモセクシュアル11例（85%）/ヘテロセクシュアル1例/バイセクシュアル1例、非HIV群：ホモセクシュアル7例/ヘテロセクシュアル20例（56%）/バイセクシュアル1例/その他8例と、大差がみられた。HIV群における入院時CD4数（/ μ l）は323±141[180～631]であった。入院時HBeAg量はHIV群：216±156、非HIV群：147±325と前者で有意に高値で（ $P=0.012$ ）、HBV DNA量（logcopy/ml）もHIV群：7.0±1.4、非HIV群：5.9±1.7と前者で高値の傾向を認めたが（ $P=0.066$ ）、肝障害の程度に関しては、ALT最高値（U/L）：HIV群1,894±1,078；非HIV群2,604±1,526、総ビリルビン最高値（mg/dl）：HIV群5.4±5.5、非HIV群8.3±5.9と、前者でむしろ軽い傾向を認めた（ $P=0.067$ 、 $P=0.098$ ）。長期間追跡可能であった症例における慢性化率はHIV群22%（2/9：ゲノタイプAとH）、非HIV群0%（0/26）と前者でより高率であった（ $P=0.083$ ）。以上から、急性B型肝炎におけるゲノタイプAの関与がHIV群、非HIV群ともに急増していること（特にHIV群では大半を占め、ホモセクシュアルによること）、非HIV群に比べてHIV群ではHBV DNA量が多いにもかかわらず、肝障害の程度は軽度にとどまり、その反面、慢性化例が多いことが判明した。

A. 研究の背景と目的

従来、本邦におけるB型肝炎ウイルス関連肝疾患で検出されるゲノタイプはBとC（Cが大部分）であり、成人発症の急性B型肝炎では慢性化することは稀とされてきた。しかし、近年、特に都市部の同性愛者においてゲノタイプAによる急性B型肝炎が増えてきており、その10%程度を占めるとす

る報告が多い。ゲノタイプAは北西ヨーロッパ、北米、中央アフリカで多く見られ、成人初感染例でも約10%が持続感染して慢性肝炎になるといわれており、本邦においても重大な問題となっている。

今年度の分担研究では、HIV感染者および非感染者における急性B型肝炎に関して、感染経路、ゲノタイプ、臨床経過などに相

違がみられるかどうか、特に慢性化の実態について検討することを目的とした。

B. 研究方法

2002年1月から2006年12月までに当センター消化器科およびエイズ治療・研究開発センターを受診した急性B型肝炎患者49例（HIV群13例、非HIV群36例）について、retrospectiveにカルテ等の調査を行い、背景因子や臨床経過について検討した。研究の趣旨、ならびに解析に際しては個人が特定できないよう十分に配慮した。

C. 研究結果

1) 患者の背景因子（表1）：平均年齢は両群とも30歳代前半で差はなかった。性別はHIV群では全例男性で、非HIV群においても大多数が男性であった。感染経路は非HIV群の8例（その他2例、不明6例）を除いて、すべて性交渉関連であった。しかし、その内訳は、HIV群ではホモセクシュアルが85%であったのに対して、非HIV群ではヘテロセクシュアルが56%を占め、性交渉パターンに大差がみられた。尚、HIV群における急性B型肝炎発症時のCD4数の平均値は $323/\mu\text{l}$ と軽度の低下例が多く、そのためHAART内服患者は5例（38%）と少なかった。また、B型肝炎ウイルスの増殖に影響を与えうる3TC内服については、過去の内服歴を3例、および肝炎発症時の内服を2例に認めた。

2) 肝機能検査値と入院時ウイルス学的検査値の比較（表2）：HIV群では非HIV群に比べて、入院時のHBV DNA量が多い傾向（10倍以上）を認め、HBeAg量は明らか

に高値であった。一方、経過中のALT・T-Bilの最高値は非HIV群の方がより高値であった。尚、劇症化例はHIV群にはなく、非HIV群において1例のみ（2.8%）存在した。これらの結果は、HIV群における免疫能低下のためにB型肝炎ウイルスがより活発に増殖するにもかかわらず、宿主の免疫応答が不十分であるために急性肝炎の程度としてはむしろ軽くなることを示唆する。

3) 感染経路とゲノタイプとの関連（表3）：ゲノタイプはHIV群で6例、非HIV群で34例検索しえた。HIV群ではゲノタイプA5例（83%）、H1例、非HIV群ではゲノタイプA15例（44%）、B7例、C11例、E1例と両群ともにゲノタイプAが最も多かった。感染経路とゲノタイプの関連をみると、ホモセクシュアルではHIV群11例のうち検索しえた6例中5例がゲノタイプA、非HIV群7例のうち検索しえた6例全例がゲノタイプAであった。両群をまとめるとホモセクシュアル18例のうち検索しえた12例中11例（92%）がゲノタイプAに感染したことになる。一方、ヘテロセクシュアル21例（HIV群1例、非HIV群20例）のうち検索しえた19例におけるゲノタイプの内訳はA6例、B5例、C8例となり、性交渉のパターンでゲノタイプの内訳が全く異なっていることが明らかとなった。

4) 入院後の経過（慢性化を含めて）について（表4）：定期的な追跡調査が可能な症例に限って検討すると、入院日数を含めて各種検査値の正常化までの日数に両群間で差は認められなかった。しかし、HIV群では追跡可能症例9例中2例（22%：ゲノタイプAとH）が慢性化したのに対して、

非 HIV 群では追跡可能症例 26 例全例がウイルスを排除しえた (P=0.083)。この慢性化例についての詳細は別途論文化の予定である。

D. 考察

今回の検討の結果、HIV 感染者では特にホモセクシュアルにより B 型肝炎ウイルス感染、特にゲノタイプ A が拡散している可能性が示唆された。しかし、この傾向は HIV 非感染者においても認められており、ゲノタイプ A の頻度は 44% にも達していた。当センターの立地条件の特殊性が窺われる結果であるが、今後の推移には十分留意すべきであろう。さらなる問題は一過性の感染に終わるか、慢性化するかという点である。すでに述べたように、急性肝炎極期の B 型肝炎ウイルス量は HIV 感染者の方が高いにもかかわらず、免疫能の低下のために肝障害の程度はむしろ軽度で経過し、その結果慢性化率も高いことが示唆された。今回対象とした HIV 感染者の平均 CD4 数は $323/\mu\text{l}$ (180~631) と比較的保たれていたにもかかわらず、慢性化率が 22% (2/9) ときわめて高値であったことから、CD4 数のさらに少ない HIV 感染者において B 型肝炎ウイルス感染が不顕性のまま慢性肝炎に移行していることは十分ありうるものと考えられた。以上の状況を改善するためには、1) 免疫能が保たれている時期における積極的な B 型肝炎ワクチン接種、2) 性交渉の際の感染予防対策 (コンドーム使用)、などが励行されるべきである。

E. 結論

HIV 感染者に対しては B 型肝炎ウイルス感染を予防する対策が早急にとられるべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Masaki N, Imamura M, Kikuchi Y, Oka S. Usefulness of elastometry in evaluating the extents of liver fibrosis in hemophiliacs coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Hepatol Res* 2006;35:135-139.

2. 学会発表

1) 正木尚彦、今村雅俊ほか. HIV/HCV 重複感染血友病患者における肝線維化進展に及ぼす HAART の影響—FibroScan を用いた検討—. 第 92 回日本消化器病学会総会、小倉、2006.

2) 正木尚彦、今村雅俊ほか. C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンの早期ウイルス学的効果予測因子. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006.

3) 正木尚彦、今村雅俊ほか. C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の進歩によるウイルス学的効果予測因子の変遷. DDW-JAPAN 2006 第 10 回日本肝臓学会大会、札幌、2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 患者の背景因子

	HIV 群 (13 例)	非 HIV 群 (36 例)
年 齢	33.2 ± 7.6 歳 [22 - 52]	36.3 ± 12.2 歳 [20 - 64]
性別：男性/女性	13 例 / 0 例	31 例 / 5 例
発症後平均観察期間	890 ± 437 日間	301 ± 306 日間
推定される感染経路 (同性/異性/両性/その他/ 不明)	11 例 / 1 例 / 1 例 / 0 例 / 0 例	7 例 / 20 例 / 1 例 / 2 例 / 6 例
HBV 感染の家族歴あり	0 例	1 例
HIV 感染診断時からの期間	21.9 ± 22.3 ヶ月 [0 - 75]	
HBV 感染時 CD4 数 (/μl)	323.1 ± 140.9 [180 - 631]	
HBV 感染時 HIV RNA 量	26,197 ± 34,853 [$<50 - 1.2 \times 10^5$]	
HBV 感染時の HAART 内服	5 例	
HBV 感染時点の 3TC 内服	2 例	
HBV 感染前の 3TC 内服歴	3 例	

表 2 肝機能検査値と入院時ウイルス学的検査値

	HIV 群 (13 例)	非 HIV 群 (36 例)	p-value
max ALT(U/L)	1,894 ± 1,078	2,604 ± 1,526	0.067
max T-Bil(mg/dl)	5.4 ± 5.5	8.3 ± 5.9	0.098
min PT 活性(%)	73.1 ± 12.2	65.0 ± 18.7	0.213
PT 活性 60% 以下の症例	2 例	9 例	0.386*
劇症化	0 例	1 例	
入院時 HBVDNA(logcopy/ml)	7.0 ± 1.4	5.9 ± 1.7	0.066
入院時 HBsAg	1,850 ± 540	1,538 ± 808	0.13
入院時 HBeAg	216 ± 156	147 ± 325	0.012
入院時 HBsAb	0.2 ± 0.3	30.1 ± 120.6	0.749
入院時 HBeAb	24.4 ± 39.8	48.6 ± 44.6	0.143
入院時 HBcAb-IgG	50.8 ± 30.2	64.2 ± 27.8	0.317
入院時 HBcAb-IgM	3.2 ± 0.9	4.2 ± 2.7	0.646

有意差検定は Mann Whitney U-test (*Fisher's exact test)

表3 感染経路とゲノタイプとの関連

ゲノタイプ	HIV 群				非 HIV 群			
	同性	異性	両性	その他 /不明	同性	異性	両性	その他 /不明
A	5 例				6 例	6 例	1 例	2 例
B						5 例		2 例
C						8 例		3 例
E								1 例
H	1 例							
未検	5 例	1 例	1 例		1 例	1 例		

表4 入院後経過の比較

項目	HIV 群 (13 例)	非 HIV 群 (36 例)	p-value
入院日数	16.3±11.3	23.8±21.4	0.302
HBV DNA 陰性化までの日数	70.4±31.2	72.0±42.4	0.794
HBsAg 陰性化までの日数	99.5±46.2	79.6±57.6	0.356
HBsAb 獲得までの日数	110.8±33.0	148.9±87.9	0.319
ALT 正常化までの日数	56.9±29.0	62.3±27.1	0.376
T-Bil 正常化までの日数	75.5±59.9	57.8±36.3	0.612
3TC の新規投与例	1 例	7 例	0.308
新規 3TC の投与日数	124	120±89	0.857
慢性化 (長期間追跡可能症例)	2 例 (9 例)	0 例 (26 例)	0.083*
1 年後に HBs 抗体を獲得できなかった症例 (長期間追跡可能症例)	2 例 (9 例)	3 例 (21 例)	0.479*

有意差検定は Mann-Whitney *U*-test (*Fisher's exact test)

当院におけるHBV / HIV重複感染例に対する核酸アナログ治療に関する研究

分担研究者 加藤道夫 国立病院機構大阪医療センター 消化器科

研究要旨：HIV感染患者に対する抗HIV療法(HAART)は、感染患者の予後を著しく改善している。しかし、B型肝炎ウイルス感染を伴っている場合は、HAART治療導入の際、免疫再構築のため、重度の肝障害が生じる可能性がある。当院におけるHIV / HBV重複感染例でHAARTを導入した症例におけるB型肝炎治療経過について検討したところ、HIV / HBV重複感染例では抗HBV薬2剤(3TC：ラミブジン、TDF：テノホビル)を含むレジメンが現在のところ、HAART導入時の肝障害に対して有効であると考えられた。しかし、症例数も少なく観察期間も短いため、さらなる経過観察および検討が必要である。

A. 研究目的

HIV/HBV重複感染例では、急速な肝疾患進行がみられ、さらにHAART開始後の肝毒性発現リスクは、基礎に慢性肝炎のある患者の方が、HIV単独感染患者よりも高いとされている。現在のHIV/HBV重複感染例の治療ガイドラインは、抗HIV療法を要するがB型肝炎の治療が必要でない場合、抗HBV薬を温存することを勧めている。しかし重複感染例では、抗HIV療法により肝障害を認める傾向があり、アドヒアランス、副作用の面から抗HBV薬を含むレジメンを選択する場合もある。そこで、当院のHIV/ HBV重複感染例でHAARTを導入した症例におけるB型肝炎治療経過について報告する。

B. 研究方法

平成11年6月から平成17年7月末までの期間に当院を受診したHIV/HBV重複感染・HBsAg陽性のB型慢性肝炎患者のうちHAARTを開始した13例について、抗ウイルス薬の種類、HBV-DNA量の推移、HBVのウイルスマーカー、HBV変異株の有無、CD4値、HIV-RNA量、臨床症状、治療効果などについて検討した。

C. 研究結果

HAART開始時の選択薬として、抗HBV薬1剤(3TC：ラミブジン)を含んでいたのが4例、抗HBV薬2剤(3TC：ラミブジン+TDF:テノホビル)を含んでいたのが7例、抗HBV薬を含まないレジメンは2例であった。このうち11例で、HAART開始後に肝障害を認めた。3TC+TDFを含む例では、HBV-DNA量はすみやかに減少した。垂直感染でHBVが

変異型であった症例でも、TDF+3TCを含むHAARTを開始した際、肝炎の増悪は認めなかった。また、抗HBV薬を含まないHAARTを開始した2例中1例で、肝炎の活動性が高くなり、抗HIV薬の副作用も認めたため、AZT + ddIからTDF+ FTCへ変更した。抗HBV薬として3TCのみを含むレジメン2例では、HBV-DNA量が再上昇し、その後肝障害を認め、1例でTDF+3TCへ変更した。

D. 考察

以上の結果より、TDFの承認後、当院のHIV/HBV重複感染では、抗HBV薬2剤を含むHAARTを選択するようにしている。現時点では著明な肝障害や副作用は認めていないが、症例数も少なく、観察期間も短期であるため、引き続き注意深い経過観察が必要である。平成18年9月からは、B型慢性肝疾患に対して、エンテカビルが保険適応になり、この薬剤はHIVに対する干渉作用がないことから、今後エンテカビル投与後HAART治療といったオプションも加わると考えられ、さらにこれらの治療効果についても確認、検討していく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 熊田博光、豊田成司、後藤賢一郎、井廻道夫、藤原研司、横須賀 収、佐藤信紘、安田清美、泉 並木、市田隆文、本多政夫、小島紘一、

吉岡健太郎、富田栄一、熊田 卓、加藤道夫、吉原治正、下村宏之、山田剛太郎、向坂彰太郎、谷川久一: Genotype1 かつ低ウイルス量、あるいは genotype2 のC型慢性肝炎に対するPEG-インターフェロン α -2b とリバビリン 24 週併用療法の有効性 - インターフェロン α -2b とリバビリン 24 週間併用療法との比較-. 肝胆膵. 2006;52:645-663.

- 2) Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N and Miyoshi E: Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. Int.J.Cancer. 2006;118:2803-2808.
- 3) Hiramatsu N, Oze T, Tsuda N, Kurashige N, Koga K, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Kato M, Yoshihara H, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Ishibashi K, Hayashi N: Should aged patients with chronic hepatitis C be treated with interferon and

- ribavirin combination therapy?.
Hepatol Res.
2006;35:185-189.
- 4) Oze T, Hiramatsu N, Kurashige N, Tsuda N, Yakushijin T, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Kato M, Yoshihara H, Katayama K, Kubota S, Hijioka T, Ishibashi K, Oshita M, Hagiwara H, Haruna Y, Mita E, Tamura S, and Hayashi N: Early decline of hemoglobin correlates with progression of ribavirin-induced hemolytic anemia during interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol. 2006;41:862-872.
- 5) Yuki N, Hijikata Y, Kato M, Kawahara K, Wakasa K: Squamous cell carcinoma as a rare entity of primary liver tumor with grave prognosis. Hepatol Res. 2006;36:322-327.
- 6) 伊与田賢也、泉 裕子、加藤道夫: Peg-IFN+リバビリン併用療法における超早期治療効果予測。消化器科。2006;43:471-477.
- 7) 三田英治、加藤道夫: 薬剤師の慢性肝炎患者さんへの対応 B型肝炎ウイルスに感染していることが判明したのに、様子をみると言われました、薬を使って早く治したいのですが・・・ 薬局。2006;57:3258-3262.
2. 学会発表
- 1) 結城暢一、長岡貴幸、加藤道夫. B型慢性肝炎ラミブジン治療におけるインターフェロン併用効果-治療前 HBV 増殖レベルによる層別解析. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006.
- 2) 結城暢一、松本真治、田所健一、加藤道夫、山口敏和. C 型慢性肝炎肝組織におけるマイナス鎖 HCVRNA 定量の意義. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006.
- 3) 大川和良、竹原徹郎、加藤道夫、金澤禎行、巽 智秀、法水 淳、阪森亮太郎、山口真二郎、植村彰夫、甲賀啓介、平松直樹、考藤達哉、笠原彰紀、林 紀夫. ラミブジン耐性変異 B 型肝炎ウイルスの全塩基配列の検討-耐性変異パターンに影響を及ぼすウイルス領域の同定. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006.
- 4) 小瀬嗣子、平松直樹、倉繁奈緒、尾下正秀、萩原秀紀、三田英治、肱岡泰三、片山和宏、吉原治正、加藤道夫、考藤達哉、竹原徹郎、笠原彰紀、田村信司、林 紀夫. Peg-IFN/Ribavirin 併用療法における Ribavirin 早期減量基準の有用性について-prospective study-. 第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006.
- F. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

HIV感染症に合併する各種疾病に関する研究

分担研究報告書

HBV DNA定量におけるTMA法とPCR法の乖離と変異株出現の予測および抗HBV核酸アナログ耐性株に対する抗HIV核酸アナログの有効性に関する研究

分担研究者 茶山 一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科

共同研究者 高橋 祥一 広島大学大学院医歯薬学総合研究科

藤本 佳史 広島大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨：HBV 核酸定量において TMA 法と PCR 法では核酸アナログ投与開始早期では、しばしば測定値の乖離が見られ、TMA 法では血中 HBVRNA 量も反映するため PCR 法より高値を示しやすい。この HBVRNA 量の多寡により早期の薬剤耐性株出現の予測が可能である。またラミブジンやエンテカビルに対する耐性株出現時の対策として、HBV 産生培養細胞株を用いて他の核酸アナログの薬効評価を行った。アデフォビルとテノホビルはラミブジン耐性株、エンテカビル耐性株に対しても有効であり、臨床応用可能と考えた。

A. 研究目的

HIV/肝炎ウイルス重複感染症は、肝炎ウイルス単独感染に比して、肝炎の進行が比較的早いことが知られている。また HBV 感染症においては HIV/HBV 双方に有効な核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)がある一方で、各々のウイルスに耐性株出現の可能性があり、耐性株の発現を起こしにくいレジメンの検討が重要である。

これまでに本邦で HBV に対して使用可能な NRTI としてはラミブジン(3TC)とアデホビル(ADV)のみであり、Naïve な症例に対しては 3TC しか使用できなかった。3TC は効率に耐性株が出現することが大きな問題点であったが、2006 年になりエンテカビル(ETV)が発売と

なり、3TC と同等の抗ウイルス効果と変異株の出現率の低さから今後 ETV が naïve 症例に対しては第一選択になると考えられている。

しかしながら、すでに 3TC 耐性を有する HBV に対して ETV を投与した場合は、比較的容易に ETV に対しても耐性を獲得することが知られており、今後出現が予想される 3TC/ETV 二重耐性株に対する対応策を立てることが急務である。この対応策としては現在唯一 ADV のみが本邦で認可された有効な NRTI であるが、ADV 不応例に対する選択肢として抗 HBV 活性を持つ抗 HIV 用 NRTI の有用性を検討が必要であ

る。また今日抗 HIV 療法としては HAART (highly active anti-retroviral therapy) と呼ばれる 3 - 4 種の抗ウイルス剤のカクテル療法が主流であり、これにより抗ウイルス剤に対する耐性株の出現が激減している。HBV に対する抗ウイルス療法も、HIV と同様に多剤併用療法を行った方が長期予後はよいかもしれないが、そのためにも使用可能な薬剤の選択肢を増やしておく必要がある。このため今回我々は既存の抗 HIV 剤の抗 HBV 活性を野生株、薬剤耐性株について、培養細胞を用いて検討した。

また以前から HBVDNA の測定には TMA 法 (transcription-mediated amplification 法) と PCR 法 (polymerase chain reaction 法) が用いられているが、NRTI による抗ウイルス療法中に TMA 法による HBVDNA 値と PCR 法による HBVDNA 値に乖離が生じることがある。この原因を PCR, RT-PCR を用いた解析により検討し、さらにこの結果から HBV 薬剤耐性株の出現の予測が可能か否かを検討した。

B. 研究方法

1. HBV DNA 定量における TMA 法と PCR 法の乖離について

① B 型肝炎患者血液中からの核酸抽出：患者血清 100ul から SMITEST Ex R&D (ゲノムサイエンス研究所)を用いて抽出した。②

RT real-time PCR: 抽出した核酸を random primer を用いて逆転写し, real time PCR を行った。

③ real-time PCR: 抽出した核酸を用いて real time PCR を行った。

④ HBVDNA 定量 (TMA 法) ⑤ HBVDNA 定量 (PCR 法) : SRL 社に依頼して検査値を測定した。

2. HBV 核酸アナログ耐性株に対する抗 HIV 核酸アナログの有効性に関する研究

① HBV 産生株の作製 (エンテカビル耐性株の作製) : Entecavir 耐性ウイルス出現後の患者血清より cDNA を抽出し, Direct sequence 法にて HBV full sequence を確認後 pTRE2 vector に 1.4 倍長の HBV-DNA を挿入した (M204V, S202G, L269I の triple mutation あり)。② この ETV 耐性株を鋳型にして point mutation 法でアミノ酸変異を修復し, M204V+L269I および M204V+S202G の double mutation, S202G および M204V の single mutation, mutation のない野生株をそれぞれ作製した。

③ HBV 産生株の細胞への遺伝子導入: HepG2 細胞に対し②で作製した plasmid vector を Transit を用いた transient transfection 法で導入し, 培養上清中に HBV ウイルスを産生させた。④ 薬効評価: HBV 発現 plasmid vector の transfection と同時に 3TC, ADV,

ETV, Tenofovir (TDF)のいずれかを各種濃度で添加した。添加5日後に細胞を回収し、細胞内のHBVDNAを抗HBc抗体で免疫沈降後 real time PCR で定量した。

C. 結果

1. HBV DNA 定量における TMA 法と PCR 法の乖離について

①2004年から2006年にかけて当科にて ETV を投与された慢性 B 型肝炎患者 7 名の HBV DNA 量につき、業者による TMA 法、PCR 法および当研究室における real-time PCR 法、RT real-time PCR 法の 4 つの測定を行い、それぞれの関係について検討した。各々の相関関係を検討したところ、PCR 法と real-time PCR 法、TMA 法と RT real-time PCR 法は相関係数 $r=0.968$, 0.955 と非常に高い相関関係を示した。一方で PCR 法と RT real-time PCR 法、TMA 法と real-time PCR 法は相関を認めなかった。これは PCR 法が細胞内の HBVDNA 量を反映しているのに対し、TMA 法は HBVDNA と HBVRNA の総和を反映しているためと考えられた。実際に RT real-time PCR 法の前にサンプルを RNase 処理すると HBV の測定量は 2 Log 程度減少した。②2001年から2006年にかけて当科にて 3TC を投与された慢性 B 型肝炎患者 36 名の HBV DNA 量を同様に TMA 法、PCR 法および当研究室に

おける real-time PCR 法、RT real-time PCR 法の 4 つの方法で測定し、各々の相関関係について検討した。PCR 法と real-time PCR 法、TMA 法と RT real-time PCR 法は相関係数 $r=0.653$, 0.675 と ETV よりやや低いものの相関関係を認めた。またこれらの患者を、投与1年以内に変異株が出現した群(A)、投与1年以降に変異株が出現した群(B)、変異株が出現しなかった群(C)に分けると A 群で 3TC 投与後早期での HBVRNA 値が有意に高く、3TC 耐性の予測が可能と考えられた。

2. HBV 核酸アナログ耐性株に対する抗 HIV 核酸アナログの有効性に関する研究

①3TC の薬効評価

HBV 野生株, M204V, M204V+S202G +L269I に対して 3TC を投与したが、3TC は野生株のみ感受性を示し、IC50 はそれぞれ $0.09\mu\text{M}$, $>100\mu\text{M}$, $>100\mu\text{M}$ で野生株に対し変異株は 1100 倍以上の耐性を示した。

②ETV の薬効評価

HBV 野生株, S202G, M204V, M204V+L269I, M204V+S202G, M204V+S202G+L269I に対する IC50 はそれぞれ $0.00062\mu\text{M}$, $0.00039\mu\text{M}$, $0.0077\mu\text{M}$, $0.011\mu\text{M}$, $0.047\mu\text{M}$, $0.05\mu\text{M}$ で野生株を 1 とした時の各変異株に対する

ETV の薬効はそれぞれ 0.63, 12, 17, 76, 81 であった。すなわち 1) S202G 単独では ETV 耐性を示さない。2) M204V (3TC 耐性株) は ETV 耐性を示し、さらに S202G が加わるとより強い ETV 耐性を示す。3) L269I は ETV 耐性に関与していない、ことが示された。

③ADV の薬効評価

HBV 野生株, M204V+S202G+L269I に対する IC₅₀ はそれぞれ 0.3uM, 0.3uM であり、ADV は ETV 耐性株に対しても野生株と同等の抗ウイルス効果を認めた。

④TDF の薬効評価

HBV 野生株, M204V, M204V+S202G に対する IC₅₀ はそれぞれ 1.23uM, 1.82uM, 1.37uM であり、野生株に対する効果を 1 としたときの各変異株に対する TDF の薬効はそれぞれ 1.47, 1.11 であり、TDF は 3TC 耐性株, ETV 耐性株に対しても同等の抗ウイルス効果を認めた。

D. 考察

1. HBV DNA 定量における TMA 法と PCR 法の乖離について

TMA 法と PCR 法では NRTI 投与後早期に特に HBVDNA 値の乖離が見られ、多くの症例で TMA 法の値が高値を示した。これは TMA 法では HBV DNA に加えて HBV RNA も定量することに起因することが

示された。HBV の複製時に、宿主の RNA ポリメラーゼにより転写された HBVRNA は HBV コア蛋白内に取り込まれた後、ウイルス由来の逆転写酵素により HBVDNA に変換されるが、NRTI 投与後は逆転写酵素が阻害されるため、感染能を持たない HBVRNA がパッケージされたウイルス粒子が多量に血中に放出されると考えられ、これが TMA 法で高値と捉えられたものと考えられる。

また、ETV, 3TC 投与早期の血清 HBV RNA は肝細胞中の cccDNA に由来すると考えられ、この時点で肝細胞中に cccDNA が多量に存在していると推測される。3TC 投与での YMDD 変異早期出現群では、投与早期の段階で肝細胞中の cccDNA 量が他の二群より多いと推測され、血清 HBV RNA の有意な増加はこれを反映したものと考えられる。

2. HBV 核酸アナログ耐性株に対する抗 HIV 核酸アナログの有効性に関する研究

in vitro における 3TC に対する M204V の耐性獲得、ETV に対する M204V の耐性獲得、さらに M204V+S202G のより高度の耐性獲得は、これまでの報告、治験結果の内容に合致した結果であった。ETV 耐性株に対する ADV

の有用性に関する報告はこれまでに数例の症例報告があり、今回の検討はやはりその結果に合致したものであった。一方で TDF の HBV に対する効果は HIV/HBV 重感染者に対する報告でしばしば見られ、野生株に対する抗 HBV 活性については知られていたが、3TC 耐性株や ETV 耐性株に対する TDF の抗 HBV 活性についてはこれまでに報告がなく、今後の治療の選択肢を増やしたものと考えられる。

臨床では 3TC 投与により M204V/I 変異が出現した症例に対し、ETV の治験が行われ、2年間で約 10%の症例に ETV 耐性株が出現したと報告されている。これらの症例に対しては ADV が投与され、ウイルス量がコントロールされているが、TDF も選択肢の一つとして使用可能と思われる(現在は TDF は HBV に対する保険適応はないが)。また 3TC 耐性が出現した多くの症例に対しては 3TC+ADV の併用療法が行われているが、最近併用療法に対しても薬剤耐性株が出現したとの報告がある。これに対しては ETV の投与が考慮されるものと思われるが、前述のように 3TC 耐性株に対する ETV の単独投与は効率に耐性株を誘導する。たとえば ETV と TDF の併用療法など、抗 HIV 療法と同様に多剤併用療法の選択ということも今後考えられるべきである。

今回は培養細胞株を用いた検討であったが、実際の生体への投与に比して、肝細胞に対する HBV の感染の状況、drug delivery の点などが *in vitro* と *in vivo* では大きく異なり、今回の結果がそのまま B 型慢性肝炎患者に当てはまるかは議論の分かれるところである。当研究室ではヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた HBV 感染モデルマウスを有しており、このモデルを用いて今後 *in vivo* での TDF などの抗 HIV 活性を持つ NRTI の HBV に対する薬効を検討したい。

E. 結論

1. NRTI 投与後早期の HBVDNA 定量における TMA 法と PCR 法との間には乖離が見られ、おもに血中に放出された HBV RNA を反映したものと考えられた。高い HBVRNA 値は早期の 3TC 耐性出現と関連があると思われた。
2. 3TC 耐性株、ETV 耐性株に対して ADV, TDF は有効であった。今後肝炎ウイルス感染モデルを用いて *in vivo* での効果を確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuyoshi Hatakeyama, Chiemi Noguchi, Nobuhiko Hiraga, Nami Mori, Masataka Tsuge, Michio

- Imamura, Shoichi Takahashi, Yoshiiku Kawakami, Yoshifumi Fujimoto, Hidenori Ochi, Hiromi Abe, Toshiro Maekawa, Hiroiku Kawakami, Hiromi Yatsuji, Yasuyuki Aisaka, Hiroshi Kohno, Shiomi Aimitsu, Kazuaki Chayama. Serum HBV-RNA is a Predictor of Early Emergence of YMDD Mutant in Patients Treated with Lamivudine. *Hepatology* 2007 in press.
2. Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol.* 2007;88:432-40.
 3. Ohishi W, Fujiwara S, Suzuki G, Kishi T, Sora M, Matsuura S, Hakoda M, Tatsukawa Y, Yamada M, Chayama K. Feasibility of freeze-dried sera for serological and molecular biological detection of hepatitis B and C viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4593-5.
 4. Hiramatsu A, Gotoh B, Fujii Y, Yoshida T, Chayama K, Sakaguchi T. Suppression of interferon-related promoter activation by hepatitis C virus proteins expressed in cultured cells. *Hiroshima J Med Sci.* 2006;55:71-7.
 5. Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3867-74.
 6. Kohno H, Aimitsu S, Kitamoto M, Aisaka Y, Kawakami H, Chayama K. Prolonged negative HCV-RNA status led to a good outcome in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and super-high viral load. *Intervirology.* 2006;49:362-9.
 7. Arataki K, Kumada H, Toyota K, Ohishi W, Takahashi S, Tazuma S, Chayama K. Evolution of hepatitis C virus quasispecies during ribavirin and interferon-alpha-2b combination therapy and interferon-alpha-2b monotherapy. *Intervirology.* 2006;49:352-61.
 8. 茶山一彰. 名医のわかりやすい肝臓の病気。B型・C型肝炎から肝がんまで。2006。同文書院
 9. 高橋祥一, 茶山一彰. 肝疾患。特

集 内科診療最前線2007-この1年の動向を踏まえて. 内科. 南江堂. 2006;98:967-74.

10. 高橋祥一, 茶山一彰. 薬の知識 バラクルード0.5mg錠(エンテカビル). 臨床消化器内科. 日本メディカルセンター. 2007;22:134-36.

2. 学会発表

1. 野口千笑, 国広華奈, 秋山理恵, 阿部弘美, 八辻寛美, 森 奈美, 平賀信彦, 柘植雅貴, 藤本佳史, 越智秀典, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰. HBVのG to A hypermutationのAPOBEC3G発現による増加. 第40回日本肝臓学会総会、京都市、2006.
2. 今村道雄, 平賀信彦, 茶山一彰. モデルマウスを用いた肝炎ウイルスの分子生物学的検討. 第40回日本肝臓学会総会、京都市、2006.
3. 高橋祥一, 木村俊之, 宇賀公宣, 実藤宏美, 八辻寛美, 高木慎太郎, 平賀信彦, 森 奈美, 児玉英章, 平松憲, 脇 浩司, 丁 守哲, 今村道雄, 白川寛夫, 川上由育, 相方 浩, 茶山一彰, 藤井輝久, 高田 昇. 当院におけるHIV/HCV重複感染の現況. 第40回日本肝臓学会総会、京都市、2006
4. 茶山一彰, 進藤道子, 豊田成司, 藤原研司, 杉原潤一, 林 紀夫, 芹生卓, 小俣政男. 成人B型慢性肝炎患者におけるEntecavirおよびラミブジン経口投与の比較検討—有効性および安全性に関する臨床第2相試験. 第40回日本肝臓学会総会、京都市、2006.
5. 八辻寛美, 野口千笑, 平賀信彦, 森 奈美, 柘植雅貴, 藤本佳史, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰. YMDD motifに変異のないlamivudine耐性HBVgenomeの解析. 第40回日本肝臓学会総会、京都市、2006.
6. 平松 憲, 高橋祥一, 茶山一彰. B型慢性肝炎重症化例に対するラミブジン, サイクロスポリン併用療法の有用性. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.
7. 今村道雄, 平賀信彦, 茶山一彰. モデルマウスを用いた肝炎ウイルスの分子生物学的検討. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.
8. 高橋祥一, 相方 浩, 茶山一彰. C型肝硬変肝移植後の肝炎再発に対するインターフェロン療法の再検討. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.
9. 森 奈美, 高橋祥一, 茶山一彰. B型慢性肝炎に対する治療と新たな問題点. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.
10. 川上由育, 高橋祥一, 茶山一彰. 高齢者における2型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するIFN療法の適応. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.
11. 宇賀公宣, 相方 浩, 茶山一彰. B型肝細胞癌根治後のラミブジン治療. 第10回肝臓総会大会、札幌市、2006.

HIV感染症に合併するB型肝炎の免疫学的研究

分担研究者 中村哲也 東京大学医科学研究所助教授

研究要旨

HIV/HBV重感染者の最良の治療法を確立するために、その臨床経過を検討すると同時に、宿主側のこれら微生物に対する免疫応答を解析した。抗HIV療法を行った12例の重感染者のうち、7例で肝機能障害の出現または増悪がみられたが、その機序を肝酵素やHBV DNA量の推移から断定することは困難であった。細胞質内IFN- γ 、IL2、TNF- α 産生を指標にしたHBV抗原特異的Tリンパ球の同定は、急性B型肝炎症例(HIV陰性例)において可能であった。HAART開始後の肝障害の際にHBV抗原特異的Tリンパ球が検出されるか、またそれが肝障害の機序の鑑別に役立つかについては、症例数を増やして検討する必要がある。

A. 研究目的

HIV感染症では、その感染経路の共通性から高率にB型肝炎の合併(重感染者)が見られる。両疾患はウイルス学的・免疫学的に互いに密接に関連する複雑な病態をとり、重感染者では確立した治療法が存在しないのが現状である。特に、重感染者で抗HIV療法を実施すると、その後の免疫機能の回復期に肝炎の増悪(免疫再構築症候群)が見られることがあり、抗HIV薬の副作用との鑑別に苦慮することがある。そこで本研究では重感染者の臨床経過を検討し、抗ウイルス薬に対するHIV・肝炎ウイルスの反応と、宿主側のこれら微生物に対する免疫学的応答を解析し、最良の治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1. HIV/HBV重感染者の臨床経過調査

医科学研究所附属病院に通院するHIV感染者のうち、抗HIV療法(HAART)を施行したHBs抗原陽性の12症例について診療録の情報をもとに臨床経過を解析した。

2. HBV特異的Tリンパ球の解析

抹消血単核球を各種抗原(タンパク5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ペプチド2 nM)および抗CD28抗体と抗CD49d抗体の存在下に12時間培養し、Fix-permeabilizing solution(Caltago)にて細胞を処理した後、抗CD4、CD8、IFN- γ 、IL2、TNF- α 抗体およびPIで免疫染色を行ない、FACS ariaで6カラー解析を行った。使用した抗原類は、HBs Ag (HyTest)、HBcore Ag (Biodesign)、HBpreS1 (ViroStat)、HBeAg (ViroStat)、CMV lysate (デンカ生研)、PHA