

SUMMARY: To determine the relationship between YMDD mutations and the genotypes of hepatitis B virus during lamivudine treatment. HBV genotypes were determined by nested PCR with six pairs of HBV genotype-specific primers (A to F) in serum specimens from 142 hepatitis B patients receiving lamivudine antiviral therapy. YMDD mutations were detected by fluorescent hybridization bioprobe PCR and melting curve assay (FH-PCR-MC). Among 142 serum specimens, 13 samples were genotype B (9.2%), 125 samples were genotype C (88%), 4 samples were genotype D (2.8%), and 80 YMDD mutations were found. The YMDD mutation rates were 69.2% and 54.4% in genotype B and in genotype C, respectively. There was no significant difference in the YMDD mutation rate between genotypes B and C. 9 genotype B sera with YMDD mutations were found, including 2 YIDD mutations and 7 YVDD (M+V) mutations. Six-eight genotype C sera with YMDD mutations were found, including 34 mutations I(M+I) and 17 mutations V (M+V). There was a significant difference in the YMDD mutation types between genotype B and C. Our results suggested that the YMDD mutation rate was 56.3% in patients treated with lamivudine for 2-4 years. YIDD was the main mutation type. YMDD mutation rate showed no significant difference between HBV type B and C ($P>0.05$), while the YMDD mutation types showed a significant difference between HBV type B and C in Northern China ($\chi^2=4.6, P<0.05$).

INTRODUCTION

Hepatitis B, caused by the hepatitis B Virus (HBV), exists throughout the world and the prevalence is especial high in China. There are approximately 1.2 billion people infected by HBV. Lamivudine is one of the nucleoside medicines. It can improve the condition of chronic hepatitis B patients in terms of the virology, biochemistry and histology. Lamivudine cuts down the HBV DNA levels in patients' sera and can obtain a certain proportion of HBeAg seroconversion (1). Lamivudine has been promoted for hepatitis B treatment, but the patient's condition may deteriorate rapidly after long-term use. The main reason is due to YMDD mutations in the HBV polymerase gene (2). HBV has been classified into eight genotypes (A-H) based on genome sequence divergences. The genotypes of HBV have distinct geographical distributions. Hepatitis B genotypes are associated with virus replication, virus variation, disease prognosis and the choice of drugs (3-7). This study will determine the relationship between the YMDD mutations of hepatitis B virus and HBV genotypes during lamivudine treatment.

MATERIALS AND METHODS

Study population: 142 serum specimens from chronic hepatitis without cirrhosis patients who were hospitalized or being seen in the clinic service in the Infectious Disease Department of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University from 2003 to 2005. All cases were diagnosed according to the Standard of Chinese Virus Hepatitis in 2000, and cases with liver complications caused by other aetiologies or other types of hepatitis virus were excluded infection. 142 patients include 112 men and 30 women, and their ages ranged from 18 to 78. DNA levels of HBV in serum from all patients were more than 10^3 copies/ml. All cases received lamivudine treatment orally, 100mg everyday for 24-48 months, and did not receive other antiviral therapy

during the study. All the patients gave written informed consent. This study was approved by the Harbin Medical University Committee on Clinical Investigation.

Laboratory findings: HBeAg levels in patients sera was measured with euzymelinked immunosorbent assay (ELISA) using the Diagnostic Kit for Hepatitis B e Antigen (PG Biotechnology, China). The HBV DNA levels were tested by real-time fluorimetry PCR with TaqMan probe using the Quantitative Hepatitis B Virus PCR Fluorogence Diagnostic Kit (PG Biotechnology, China).

Nucleic acid extraction: HBV DNA amplification for sequence analysis. HBV DNA was extracted from 100 μ l test sera and 100 μ l DNA extract I (PG Biotechnology, China) were oscillated and mixed well, centrifuged at 13,000 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. The 25 μ l DNA extract II (PG Biotechnology, China) were added, oscillated and mixed well, and centrifuged at 2000 rpm for 10 sec. Then, it was placed in a dry-bathe for 10 min at 100°C, centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, and the supernatant was retained in the stock..

Genotyping of HBV by PCR: HBV genotypes were determined by nested PCR with six pairs of HBV genotype-specific primers (A to F). Vide reference (8).

Detection of YMDD mutation: YMDD was detected by fluorescent hybridization bioprobe PCR and melting curve assay (FH-PCR-MC) using the Quantitative Hepatitis B Virus PCR Fluorogence Diagnostic Kit (PG Biotechnology, China). YMDD mutation type after lamivudine treatment for 2 years was determined and YMDD mutation type was examined every 6 months.

Statistical analysis: Statistical analyses were performed using Adopt SPSS 10.0 software. The rate comparison was made using the chi-square criterion. A difference with a $P < 0.05$ was considered significant. Student's t test and nonparametric test were used compare differences

between groups, where appropriate.

RESULTS

Analysis of HBV genotypes and clinical data: A simple and precise genotyping system based on nested PCR with six pairs was developed for the determination of genotypes of HBV. All 142 samples were genotyped by nested PCR analysis: the majority was genotype C, which accounted for 88%; genotype B accounted for 9.2%; genotype D accounted for only 2.8%. No other genotypes were detected (genotypes A, E, F). No statistically significant differences were observed in mean age, male-to-female ratio, mean serum DNA levels, HBeAg positive and treatment period with genotype B and that genotype C. Genotype D was not included in the statistical analysis because of the low number of cases (Table.1).

Table 1. HBV genotype distribution and characteristics of the patients

Genotype	Cases	Positive rate	Men/women	Age (mean ± SD)	HBVDNA (10 ⁶ mean ± SD)	HBeAg ⁺ /HBeAg ⁻	Treatment period (month)
Genotype B	13	9.2%	10/3	37.9 ± 11	12.9 ± 21.6	9/4	34.2 ± 6.8
Genotype C	125	88%	99/26	38.4 ± 11.9	11.3 ± 24.5	95/30	34.9 ± 6.4
Genotype D	4	2.8%	3/1	38.8 ± 11.1	11.7 ± 19	3/1	34.8 ± 5.6

YMDD mutation rate and YMDD mutation type in 80 HBV sera: FH-PCR-MC in detection of HBV YMDD mutation has high sensitivity and specificity. It is a convenient and rapid, and may be used in YMDD typing. HBV Wild type and Mutation type were detected in 62 and 80 by FH-PCR-MC, respectively. The YMDD mutation rate was 56.3% in the 142 specimens. Among 80 YMDD mutations, 38 YIDD (M+I) mutations (47.5%), 24 YVDD (M+V) mutations (30%) and 18 YIDD+YVDD mutations (22.5%) were found, respectively. Among 80 YMDD mutations,

YIDD mutation rate was higher than YVDD mutation rate. The mutation type was mainly YIDD. The YMDD mutation rates were 69.2% and 54.4% in genotypes B and C. Although the YMDD mutation rate was higher in patients with genotype B than in those with genotype C, there was no statistically significant difference between genotype B and C ($P>0.05$). Genotype D was not included in the statistical analysis because of the low number of cases (Table.2).

Table 2. YMDD mutation rate and YMDD mutation type in 80 HBV sera.

Genotype	n	YIDD	YMDD+YIDD	YVDD	YMDD+YVDD	YIDD+YVDD	YMDD mutation rate
Genotype B	9	2(22.2)	0	6(66.7)	1(11.1)	0	69.2%(9/13)
Genotype C	68	30(44.1)	4(5.9)	15(22.1)	2(2.9)	17(25)	54.4%(68/125)
Genotype D	3	2(66.7)	0	0	0	1(33.3)	75%(3/4)
Total	80	34(42.5)	4(5)	21(26.2)	3(3.8)	18(22.5)	56.3%(80/142)

Relation between HBV YMDD mutation type and genotypes B, C: Among the 68 patients with genotype C, 23 (33.8%) patients were mixed mutation type. Among the 9 patients with genotype B, 1 (11.1%) patient was mixed mutation type. Although the YMDD mixed mutation type rate was higher in patients with genotype C than in those with genotype B, there was no statistically significant difference between genotype B and C ($P>0.05$). Among the 36 patients with YIDD (M+I) mutation types, 2 patients were genotype B, 34 patients were genotype C. Among the 24 patients with YVDD (M+V) mutation types, 7 patients were genotype B, 17 patients were genotype C. The YMDD mutation types (YIDD and YVDD) showed significant differences between genotype B and C ($\chi^2=4.6$, $P<0.05$). Genotype D was not included in the statistical analysis due to the low number of cases (Table.3).

Table 3. Relationship between HBV YMDD mutation type and genotypes B, C

Genotype	n	YIDD (M+ I)	YVDD (M+ V)
Genotype B	9	2 (22.2)	7 (77.8)
Genotype C	51	34 (66.7)	17 (33.3)

DISCUSSION

Lamivudine has been shown to be a potent and nontoxic inhibitor of hepatitis B virus (HBV) replication in chronically infected patients. Long-term lamivudine treatment for chronic hepatitis B virus infection induces the emergence of lamivudine resistant HBV YMDD mutant strains. In the case of YMDD variants, the methionine (M) is substituted with either isoleucine (I), designated as YIDD or valine (V), designated as YVDD (9).

It has been reported that the HBV YMDD mutation rate increases along with the duration of lamivudine therapy. The YMDD mutation rates were 16%-32%, 47%-56% and 69%-75% in the groups of patients administered lamivudine for 1, 2, 3 years, respectively (10). A study from Asia described in that the 1, 2, 3 year YMDD mutation rates were 15%, 38% and 53% after lamivudine therapy (11). The present 142 chronic hepatitis B patients received lamivudine for 2-4 years. The HBV YMDD mutation rate should be 56.3%, based on the previous reports. The mutation type was mainly YIDD. The presence of YIDD motif preceded the exclusive presence of the YVDD motif, we concluded that the YIDD motif could occur as a temporal intermediate (12). It has been reported that YIDD or YVDD motif alone did not shift to the mixed type (YVDD and YIDD) when they were examined 12 months after the detection of mutant virus, in Japan (13). In our study, YMDD mutation type was determined every 6 months for 2 years after lamivudine treatment. Recently we found 2 patients, who were not included in this study, shifted to the mixed type (YIDD and YVDD) (unpublished observation), indicating the shift can occur in a relatively

long period. During the past few years, many investigators have investigated the forecasting factors of drug resistance and mutations, but without reaching a conclusion. Some factors concerned with YMDD mutations, could raise the curative effect of lamivudine. Recently many investigations have concentrated on the time of the YMDD mutation appearance, the mutation type, the YMDD mutation and ALT level, the DNA level, and the rate of HBeAg seroconversion, but no relationship between the mutations of HBV and the HBV genotypes has been reported. The viral genotype that represents the features of natural infection is the result of evolutionary variation of the virus. The HBV genotype has a certain association with the route of virus infection, genetic mutations, and the progression of chronic hepatitis B and the efficacy of antiviral therapies. The genotypes of HBV also have distinct geographical distributions. Genotypes B and C are were only found in those who originated from eastern Asia and Far East including Taiwan (14). In Japan, the great majority of HBV isolates belong to genotype B or C (15). Genotypes B, C are spread dominantly in China while genotypes A, D relatively rare. Genotype B is prevalent in South China and genotype C in North China (16). The clinical prognosis after infection with HBV varies according to the genotype. In the previous study, clearance of HBeAg occurred earlier and more frequently, and development of cirrhosis was less common in patients with genotype B compared with genotype C (15). Genotype C is associated with chronic liver disease, genotype B mostly associated with acute hepatitis in China (17). The present study analyzed 142 sera of chronic hepatitis B in North China. The results showed that genotype C occupied 88%, and genotype B 9.2% and genotype D 2.8%. Genotype C is predominant in patients with chronic liver disease in North China. A study in Japan reported that among 234 patients with chronic hepatitis B infected with genotype A, B, or C and treated with

lamivudine for more than 1 year, the emergence of mutations was not different among genotypes A, B and C by the Kaplan-Meier method. (18). In Japan, it was reported that the emergence rate of lamivudine resistance was independent of the genotype (A, B, and C), after treatment of patients with chronic hepatitis B with various genotypes with lamivudine. In contrast, the emergence rate was significantly higher in the Ba ("a" stands for Asia) subgroup of HBV than in Bj ("j" for Japan) subgroup ($P < 0.05$) (19). In the Hong Kong study, there was no difference in the antiviral response and the rate of development of YMDD mutations in 82 patients with chronic hepatitis B with genotype B and C after 1 year of lamivudine treatment (20). A report on 87 patients receiving lamivudine in Guiyang, results showed that, though genotype B was dominant in that region, there was a higher mutation rate of drug resistance among genotype C cases (21). In another report, 135 chronic hepatitis B patients received lamivudine for 1 year, and the YMDD mutation rate in genotype C cases was higher than that in genotype B cases in Guangdong (22). But Guiyang and Guangdong province located in Southern parts of China. In the present study, 9 YMDD mutations were found in genotype B, and 68 YMDD mutations were found in genotype C. The YMDD mutation rates were 69.2% and 54.4% in genotype B and in genotype C, respectively in North China ($P > 0.05$). It has been reported that the YIDD mutation occurs more frequently in genotype D, while YVDD is more common in genotype A (23). It is suggested that the YMDD mutation type is related to the genotype. But the present study showed that the YVDD mutation occurred more frequently in genotypes B, the YIDD mutation in genotypes C, the YMDD mutation showed significant differences between the HBV genotypes B and C. ($\chi^2 = 4.6$, $P < 0.05$). It has been reported that the replication ability of the YVDD mutant strain might be stronger than that of the YIDD mutant strain (24). The mutation types among different genotypes aren't identical, because

the genotypes are associated with virus replication and virus variation. Because of the small number of cases of genotype D, only HBV genotype B and C were examined in this study. Large-scale prospective studies of each genotype should be conducted in the future to confirm these findings.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Kenji Abe for continuous encouragements and Dr. Shu-Lan Lu for clinical samples. This work was supported by Japan Health Science Foundation, No.0109 and Doctor Foundation of Harbin Medical University.

REFERENCES

1. Suzuki, Y., Kumada, H., Ikeda, K., Chayama, K., Arase, Y., Saitoh, S., Tsubota, A., Kobayashi, M., Koike, M., Ogawa, N. and Tanikawa, K. (1999): Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J. Hepatol.*, 30, 743-748.
2. Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y. and Kidd, A.H. (2002): Genetic variability in hepatitis B viruses. *J. Gen. Virol.*, 83, 1267-1280.
3. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B.H. and Magnius, L.O. (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, 83, 2059-2073.
4. Moriyama, M., Taira, M., Matsumura, H., Aoki, H., Mikuni, M., Kaneko, M., Shioda, A., Iwaguchi, K., Arai, S., Ichijima, S., Iwasaki, H., Tanaka, N., Abe, K. and Arakawa, Y. (2003): Genotype analysis, using PCR with type-specific primers, of hepatitis B virus isolates from

- patients coinfecting with hepatitis delta virus genotype II from Miyako Island, Japan. *Intervirology*, 46, 114-120.
5. Miyakawa, Y. and Mizokami, M. (2003): Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 46, 329-338.
 6. Chu, C.J., Keeffe, E.B., Han, S.H., Perrillo, R.P., Min, A.D., Soldevila-Pico, C., Carey, W., Brown, R.S. Jr., Luketic, V.A., Terrault, N. and Lok, A.S. (2003): Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology*, 125, 444-451.
 7. Yuen, M.F., Sablon, E., Yuan, H.J., Wong, D.K., Hui, C.K., Wong, B.C., Chan, A.O. and Lai, C.L. (2003): Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 37, 562-567.
 8. Naito, H., Hayashi, S. and Abe, K. (2001): Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 362-364.
 9. Moskoviz, D.N., Osiowy, C., Giles, E., Tomlinson, G. and Heathcote, E.J. (2005): Response to long-term lamivudine treatment (up to 5 years) in patients with severe chronic hepatitis B, role of genotype and drug resistance. *J Viral Hepat.*, 12, 398-404.
 10. Atkins, M., Hunt, C.M., Brown, N., Gray, F., Sanathanan, L., Woessner, M., Lai, C.L., Dusheiko, G., Dienstag, J., Wright, T., Bamard, J., Bourne, E. and Condreay, L. (1998): Clinical significance of YMDD mutant hepatitis B virus in a large cohort of lamivudine-treated hepatitis B patients (Abstract). *Hepatology*, 8, 319.
 11. Leung, N.W., Lai, C.L., Chang, T.T., Guan, R., Lee, C.M., Ng, K.Y., Lim, S.G., Wu, P.C.,

- Dent, J.C., Edmundson, S., Condreay, L.D. and Chien, R.N; On behalf of the Asia. (2001):
Hepatitis Lamivudine Study Group. Extended lamivudine treatment in patients with chronic
hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy.
Hepatology, 33, 1527-1532.
12. Niesters, H.G, Honkoop, P., Haagsma, E.B., de Man, R.A., Schalm, S.W. and Osterhaus, A.D.
(1998): Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene
arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis.*, 177, 1382-1385
13. Akuta, N., Suzuki, F., Kobayashi, M., Matsuda, M., Sato, J., Takagi, K., Tsubota, A., Suzuki,
Y., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K. and Kumada, H.
(2003): Virological and biochemical relapse according to YMDD motif mutant type during
long-term lamivudine monotherapy. *J Med Virol.*, 71, 504-510.
14. Kao, J.H., Liu, C.J. and Chen, D.S. (2002): Hepatitis B viral Genotypes and lamivudine
resistance. *J Hepatol.*, 36, 303-304
15. Tomokuni, N., Tatsuji M., Tomofumi, N., Hiroki, N., Hiroshi, S., Fukunori, K., Etsuro, O. and
Masashi, M. (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. *J. of Med Virol*, 70, 350-354.
16. Gu, H.X., Xu, Z.L., Liu, J.Y., Zhong, Z.H., Wang, H.Q., Zhang, S.Y., Li, D., Zhang, H.H. and
Abe, K. (2004): Epidemiology of HBV genotypes by nested PCR with multi-paired primers.
World Chin J Digestol., 12, 1073-1076 (in Chinese).
17. Dong, M. and Zhong, Y.X. (2005): Distribution of hepatitis B virus Genotypes and its clinical
significance. *Chin J Hepatol.*, 13, 56-57 (in Chinese).
18. Suzuki, F., Tsubota, A., Arase, Y., Suzuki, Y., Akuta, N., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi,
M., Saitoh, S., Ikeda, K., Kobayashi, M., Matsuda, M., Satoh, J., Takagi, K. and Kumada, H.
(2003): Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in
chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology*, 46, 182-189.
19. Akuta, N., Suzuki, F., Kobayashi, M., Tsubota, A., Suzuki, Y., Hosaka, T., Someya, T.,

- Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K. and Kumada, H. (2003): The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J. Hepatol*, 38, 315-321.
20. Yuen, M.F., Wong, D.K., Sablon, E., Yuan, H.J., Sum, S.M., Hui, C.K., Chan, A.O., Wang, B.C. and Lai, C.L. (2003): Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir. Ther.*, 8, 531-534.
21. Wang, G.Y., Zhu, W.J. and Yang, X.L. (2005): YMDD mutation of hepatitis B virus and genotyping in Guiyang region. *Chin J Hepatol.*, 13, 193-195 (in Chinese).
22. Zhou, J.L. and Wu, S.P. (2004): Effects of comparison of lamivudine therapy B virus genotype B and C. *Chin J Hepatol.*, 12, 489-490 (in Chinese).
23. Zollner, B., Petersen, J., Puchhammer-Stockl, E., Kletzmayer, J., Sterneck, M., Fischer, L., Schroter, M., Laufs, R. and Feucht, H.H. (2004): Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology*, 39, 42-50.
24. Zhang, X., Liu, C., Gong, Q., Zhang, S., Zhang, D., Lu, Z. and Wang, Y. (2003): Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol.*, 18, 1353-1357.

〔肝炎ウイルス〕

わが国におけるB型急性肝炎の現状

Acute hepatitis B in Japan



山田典栄(写真) 四柳 宏

Norie YAMADA^{1,2} and Hiroshi YOTSUYANAGI²聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科¹，東京大学医学部附属病院感染症内科・感染制御部²

◎わが国における B 型急性肝炎は依然として急性肝炎の約 30% を占める。今日、主要な感染経路として考えられるのは性行為であり、なかでも夫婦間以外の性行為感染症 (sexually transmitted disease : STD) としての B 型急性肝炎が問題となっている。このため欧米に多い遺伝子型である genotype A による B 型急性肝炎が増加している。これまで健康成人における B 型急性肝炎は重症化や劇症化する場合を除いて一過性の経過で治癒すると考えられてきた。しかし、genotype A による B 型急性肝炎は慢性化しやすいといわれており、今後一過性にとどまらない症例が増加することが予測される。啓発および公衆衛生的な対策が必要であると考えられる。

Key word : B型急性肝炎, genotype, 慢性化

これまで健康成人における B 型急性肝炎は、重症化や劇症化する場合を除いて一般的に一過性の経過で治癒する疾患と考えられてきた。しかし近年、遺伝子型の異なる B 型急性肝炎が増加しており、これまで考えられてきた臨床経過とは異なる経過をたどる症例がみられるようになってきた。本稿では最近の日本における B 型急性肝炎の現状や遺伝子型からみた臨床像について述べる。

疫学

1980～2004 年までの 25 年間に肝炎克服緊急対策研究参加ネットワーク施設内で散発性急性肝炎として登録された症例数は 3,873 例であり、そのうち A 型が 1,541 例 (39.8%)、B 型が 1,016 例 (26.2%)、C 型が 327 例 (8.4%)、non ABC 型が 989 例 (25.5%) であった。2004 年に関しては散発性急性肝炎 126 例中 60 例 (47%) と過半数近くが B 型であったと報告された¹⁾。B 型肝炎ウイルスキャリアの数は 1986 年から開始された母子感染防止事業により減少しており、献血者の HBs 抗原陽性率は 0.5% といわれている。また、針刺し事故などの医療行為による感染も院内感染防止対策により減少し

ている。それにもかかわらず、B 型急性肝炎は依然として急性肝炎の約 30% を占め、減少しているとはいえない。

感染経路

今日、主要な感染経路として考えられるのは性行為によるものである。なかでも夫婦間以外の性行為感染症 (sexually transmitted disease : STD) としての B 型急性肝炎が問題となってきている。1992～2001 年の全国における B 型急性肝炎の検討では異性間性交渉が全症例の半数を占め、同性間性交渉によると推定される症例も約 10% (後述する genotype A では 19%) みられた。さらに、異性間性交渉の場合でも約 30% は相手を特定できない不特定異性間性交渉、つまり風俗営業店などでの性交渉の症例であったと報告されている^{2,3)}。

なお、輸血後 B 型急性肝炎は 1991 年以降減少している⁴⁾。これは 1989 年から輸血時スクリーニングとして HBc 抗体および HBs 抗体が導入されたこと、さらに 1999 年から PCR 法によるスクリーニング (nucleic acid test : NAT) が導入されたことによるものと考えられる。

HBV genotype

これまで、HBV の分類は HBV の表面蛋白である S 蛋白上のアミノ酸配列に対する抗原性の相違によって血清型分類がされ、共通抗原である a と、対立抗原である d/y, r/w の組合せから adr, adw, ayr, ayw のサブタイプに分類されていた^{5,6)}。しかしその後、HBV ゲノムの分子系統樹解析から genotype 分類が提唱されるようになった⁷⁾。現在、HBV は A-H 型の 8 つの genotype に分類される⁸⁻¹⁰⁾。全塩基配列を比較して株間に 8% 以上の相違が存在した場合に異なった genotype と定義されている⁷⁾。

わが国の HBV キャリアは、沖縄、東北地方を除いて genotype C が約 95% を占め、genotype A は 2% 前後である^{11,12)}。一方、急性肝炎の場合、前述のような感染経路の変遷により、これまでわが国に多いとされていた遺伝子型とは異なった遺伝子型の HBV 感染が増加している。厚生労働省肝炎等克服緊急対策研究事業の平成 17 年度の報告¹³⁾によると、全国の共同研究施設にて B 型急性肝炎 408 例中 HBV genotype を測定しえた 321 例の genotype の頻度は genotype A 82 例 (26%)、genotype B 37 例 (17%)、genotype C 187 例 (58%)、genotype D 10 例 (3%)、genotype E 1 例 (0.3%)、typing 不能 34 例 (11%) であり、genotype A の症例の割合が多かった。同事業の平成 13 年度の報告⁴⁾では全国の共同研究施設における調査では B 型急性肝炎における genotype A の割合は 9.6% と報告されており、増加傾向であるといえる。Genotype A はおもに北西ヨーロッパ、北アメリカ、中央アフリカに多くみられる¹⁴⁾ことから B 型急性肝炎における genotype A の増加の原因として外国人との性交渉による影響が考えられる。

なお遺伝子型の分類方法はいくつか開発されている。制限酵素切断断片の長さの違いによる多型を用いた RFLP (restriction fragment length polymorphism)¹⁵⁾、genotype 特異的なプライマーを用いて遺伝子を増幅し塩基配列を決定する PCR (polymerase chain reaction)¹⁶⁾、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法¹⁷⁾などがあり、再現性のある結果が得られている。

診断と経過

通常の一過性の経過をとる症例の場合、感染から 1~6 カ月の潜伏期間を経て発症し、初発症状としては全身倦怠感、黄疸、食欲不振を認めることが多い。HBs 抗原の出現後数週間たってから血中 transaminase やビリルビンの上昇がみられる。HBe 抗原は早期に陰性化し、HBe 抗体へと seroconversion する。HBV-DNA は病初期に上昇し、その後しだいに低下する。HBs 抗体は HBs 抗原が消失してから 2~3 カ月後に出現する。しかし、HBs 抗体が出現しない症例が約 1 割存在する。

冒頭でも述べたようにこれまで、健常成人に発症した B 型急性肝炎は劇症化しなければ一過性に治癒し慢性化することはまれであるとされてきた。しかし、genotype A の HBV による B 型急性肝炎が多い欧米では B 型急性肝炎の 10% 前後がキャリア化するといわれている¹⁸⁾。厚生労働省肝炎等克服緊急対策研究班の平成 17 年度の報告¹³⁾においても、B 型急性肝炎 408 例の予後を追跡した結果、治癒した症例は 369 例 (90.4%) であったが、慢性化 (HBs 抗原が 6 カ月以上持続陽性) した症例は 26 例 (6.4%) 存在した。Genotype 別の慢性化の割合は genotype A が 12 例 (14.6%)、genotype B が 2 例 (5.4%)、genotype C が 9 例 (4.8%)、genotype D が 1 例 (10%) であり、genotype A で慢性化率ももっとも高かった。これは、genotype A は genotype B、genotype C と比較し慢性化しやすいというこれまでの報告¹⁹⁻²¹⁾に一致するものであった。

経過中、HBV-DNA・HBsAg の陰性化が遅れる場合は慢性化の可能性もあり、慎重に経過をみる必要がある。

急性肝炎が慢性化する機序として宿主側の要因である HLA との関連が指摘されている²²⁾が、genotype A による感染が慢性化しやすい理由については現時点では不明である。

また、B 型急性肝炎の経過で問題となるのは、重症化、劇症化である。これまで、重症肝炎、劇症肝炎において precore 領域の 1,896 番目の塩基が G から A への変異または core promoter (CP) 領域の 1,762 番目の塩基が A から T への変異と 1,764 番目の塩基が G から A への変異が同時にみられる変異を有することが示されている^{23,24)}。厚生労働省

肝炎等克服緊急対策研究班の平成 17 年度の報告¹³⁾では B 型急性肝炎 408 例中劇症化または移植を行った症例は 13 例であったが、genotype は B または C であり、genotype A による劇症化は認めなかった。これは、genotype B, C では pre C 変異、CP 変異の頻度が高いが、genotype A では頻度が低いことが影響していると考えられる。

このように遺伝子型の相違は単に地理的分布を表すのみならず、臨床経過や治療に対する反応性に差異を見出すことができる。

治療

宿主の免疫反応により HBV の増殖が抑えられウイルス排除が起こるため、抗ウイルス療法を行わなくとも多くの症例が安静のみで改善するが、遷延化、重症化、劇症化が懸念される場合は lamivudine による抗ウイルス療法を開始するのが望ましいと考えられる²⁵⁻²⁷⁾。また、肝炎発症時に急性肝炎例と HBV キャリアからの急性増悪との鑑別が困難な場合がある。HBV キャリアからの急性増悪に対しても lamivudine の有効性が示されており^{27,28)}、HBV キャリアからの急性増悪が否定できない場合も抗ウイルス療法を考慮するのがよいと思われる。

慢性化阻止のために抗ウイルス療法を開始する時期や方法については一定の見解はない。しかし、発症後 8~12 週経過後も HBV-DNA が検出感度以下にならない場合や HBs 抗原が陰性化しない場合は慢性化の可能性があると判断し、抗ウイルス療法を考慮すべきである。

HBV ワクチン

HBV 感染予防には HB ワクチンが用いられている。現在使用されているものは、遺伝子組換え操作により S 領域遺伝子を酵母や培養細胞で発現させ、得られた HBs 抗原蛋白にアジュバントを加え不溶性とした第二世代ワクチンである。これにより宿主に能動的に HBs 抗原に対する感染防御をする HBs 抗体を産生させる。現在市販されているワクチンはわが国で多い genotype C, B に対しては有効である。近年、わが国において増加傾向にある genotype A やその他の genotype の HBV に対して有効であるかどうかの検討は十分になされてい

ない。Genotype A を中心に genotype C, B 以外の HBV 感染の増加を考慮すると現行のワクチンでは感染を防御できない症例が出現する可能性も否定できない。今後ワクチンの有効性に関して検討のうえ、場合によってはワクチンを見直す必要もあると考えられる。

おわりに

B 型急性肝炎は STD として今後増加することが危惧される。これまでわが国では少ないとされていた genotype A による感染が増加することで一過性にとどまらない症例が増加することが予測される。啓発および公衆衛生的な対策が必要であると考えられる。また、積極的に遺伝子型分類を行うことは治療方針を立てる際や予防接種を行ううえで有用であるといえる。

文献

- 1) 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)平成 16 年度報告書. pp.16-22.
- 2) Yotsuyanagi, H. et al. : *J. Med. Virol.*, **77** : 39-46, 2005.
- 3) 四柳 宏 : 肝・胆・膵, **47** : 617-622, 2003.
- 4) 厚生労働省肝炎連絡協議会平成 13 年度報告書. pp.36-37.
- 5) Le Bouvier, G. L. et al. : *J. Infect. Dis.*, **123** : 671-675, 1971.
- 6) Bancroft, W. H. et al. : *J. Immunol.*, **109** : 842-848, 1972.
- 7) Okamoto, H. et al. : *J. Gen. Virol.*, **69** : 2575-2583, 1988.
- 8) Norder, H. et al. : *Virology*, **198** : 489-503, 1994.
- 9) Stuyver, L. et al. : *J. Gen. Virol.*, **81** : 67-74, 2000.
- 10) Arauz-Ruiz, P. et al. : *J. Gen. Virol.*, **83** : 2059-2073, 2002.
- 11) Orito, E. et al. : *Hepatology*, **34** : 590-594, 2001.
- 12) Kobayashi, M. et al. : *J. Med. Virol.*, **68** : 522-528, 2002.
- 13) 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)平成 17 年度報告書. pp.25-30.
- 14) Kao, J. H. : *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **17** : 643-650, 2002.
- 15) Mizokami, M. et al. : *FEBS Lett.*, **450** : 66-71, 1999.
- 16) Naito, H. et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **39** : 362-364, 2001.
- 17) Usuda, S. et al. : *J. Virol. Method.*, **80** : 97-112, 1999.
- 18) Sherlock, S. D. J. : *Disease of the Liver and Biliary System*, 10th ed. Blackwell Scientific Publications, London, 1997, pp.265-392.
- 19) Kikuchi, K. et al. : *Hepatol. Res.*, **17** : 43-55, 2000.
- 20) Kobayashi, M. et al. : *J. Gastroenterol.*, **37** : 35-39, 2002.
- 21) Kobayashi, M. et al. : *J. Gastroenterol.*, **38** : 656-662, 2003.

- 22) Almarri, A. et al. : *Lancet*, **344** : 1194-1195, 1994.
23) Omata, M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **324** : 1699-1704, 1991.
24) Sato, S. et al. : *Ann. Intern. Med.*, **122** : 241-248, 1995.
25) Reshef, R. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **343** : 1123-1124, 2000.
26) Santantonio, T. et al. : *J. Hepatol.*, **30** : 551-553, 1999.
27) Torii, N. et al. : *Hepatology Research.*, **24** : 34-41, 2002.
28) Tsubota, A. et al. : *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **20** : 426-432, 2005.

特集II C型慢性肝炎のPeg-IFN+リバビリン併用療法の現状と新たな展開

Peg-IFN+リバビリン併用療法 における超早期治療効果予測*

伊与田 賢也^{**1)}泉 裕子^{**}加藤 道夫^{**}

Key Words : chronic hepatitis C, pegylated interferon, ribavirin

はじめに

C型慢性肝炎に対するインターフェロン(IFN)治療はこの10年間で大きく進歩した。新しいIFN製剤や投与期間の延長, 併用薬の開発などで治療効果も大幅に向上した。最新のIFN治療として, 2004年12月からPeg-IFN α 2b+リバビリン併用療法が保険適応となり, 週1回のPeg-IFN注射とリバビリンの内服を48週継続することで, ジェノタイプ1bかつ高ウイルス量のいわゆる難治例においても, 治験の成績で約50%の症例で, ウイルス学的著効(sustained virological response; SVR)が期待できる。しかし, 個々の症例でSVRになるかどうかは, 投与を終了するまで不明である。いかに早期に治療効果を予測できるか否かは, 患者負担や医療経済の面からも非常に重要である。

早期治療効果予測の必要性

IFN治療は副作用のみならず, 経済的な面からも患者の負担を大きくしている。C型慢性肝炎における抗ウイルス療法の有効性評価としては,

1997年にNIHがHCV RNA測定に基づく「投与終了6か月以降もウイルスが持続陰性」をSVRと定義し, これが今でも世界的に使用されている。しかし, 昔ながらのこの治療効果判定方法では, 治療終了後6か月が経過するまで, SVRになるかどうか不明であり, 患者はIFN治療を完遂するしかなく, さらに治療後半年も待たないと効果かわからない。医療費の節約や副作用発現の観点からも, 治療中できるだけ早期に効果を予測できれば, 治療の中止や変更が可能となる。このことから, 欧米を中心に今までにいくつかの早期の治療効果予測に対する検討が行われてきた。

とくにIFN投与中のHCV RNA量の変化やウイルス陰性化時期が治療効果と相関することは知られている¹⁾。IFN単独治療が旺盛だった頃から, HCV RNA動態がIFN治療効果と密接に関係するという報告がされてきた²⁾。これはHCVダイナミクスと呼ばれ, 投与開始24時間以内の急激なウイルス量低下を示す1st phase, それに引き続き緩徐にウイルス量が低下する2nd phaseに分けられた。最近ではさらにこの2nd phaseのあとに, 投与開始7~28日までの生体の免疫機構がウイルス排除に関与する3rd phaseの存在が提唱されている³⁾。この3rd phaseがIFN治療のSVRともっと

* A super-early prognosis for the treatment with pegylated interferon plus ribavirin in the patients with chronic hepatitis C.

** Kenya IYODA, M.D., Ph.D., Yuko IZUMI, M.D. & Michio KATO, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター消化器科[〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14]; Department of Gastroenterology, Osaka National Hospital, Osaka 540-0006, JAPAN

¹⁾ 現 医療法人伊与田内科[〒572-0084 寝屋川市香里南之町35-5]; Iyoda Clinic, Neyagawa 572-0084, JAPAN

も関連すると言われている。Peg-IFN+リバビリン併用療法では、Peg-IFN単独療法に比べ、3rd phaseにおけるHCV RNA量低下が大きい。このことが、Peg-IFN+リバビリン併用療法の有効性上昇に関与していると考えられている。

HCV RNA量の変化をもとにした治療効果予測因子としてもっともよく知られているのが、Early virologic response (EVR)である。これは投与開始12週目のHCV RNA量が投与開始前に比べて、2 log以上すなわち100分の1以上低下するか、もしくは投与開始12週目のHCV RNAが陰性化することを指す。Friedら⁴⁾によると、C型慢性肝炎に対してPeg-IFNとリバビリン併用療法を48週投与したところ、EVRになった症例では65% (253/390)でSVRが得られたが、EVRにならなかった症例ではわずか3% (2/63)しかSVRにならなかったと報告している。一方、Davisら⁵⁾も同様の検討を行い、EVRになった症例では72% (273/380)でSVRが得られたものの、EVRにならなかった症例のSVR率は0% (0/98)と報告している。しかし、裏を返せばEVRが得られても、その中の約30%はSVRにならないことになる。すなわちEVRは、SVRに対する感度はきわめて高いが、特異性は低い。そこで、より特異性の高い治療効果予測が求められる。さらにEVRは投与開始12週での治療効果予測であり、最低3か月間のIFN治療が必要である。IFN投与による中期の副作用が主に投与開始1か月目以降より出現することを考えても、より早期の治療効果予測が重要である。

0-2 ratio, 0-4 ratioによる治療効果予測

そこで、われわれは前述のHCVダイナミクスの3rd phaseの考え方を踏まえて、治療開始直後のウイルス減少の割合、すなわち、Peg-IFN+リバビリン併用療法開始2週目または4週目時点でのHCV RNAの変動で、より早期にSVRを予測できないかと考えた。「投与開始2週目のHCV RNA量」を「開始前のHCV RNA量」で割ったものを0-2 ratio、一方、「投与開始4週目のHCV RNA量」を「開始前のHCV RNA量」で割ったものを0-4 ratioとし(図1)、超早期治療効果予測因子としての有用性を検討した⁶⁾。HCV RNA量の測定はハイ

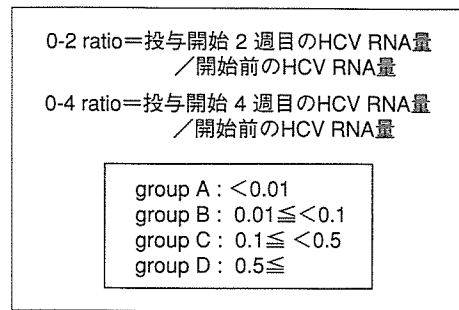


図1 0-2 ratio, 0-4 ratioと各群の割付

レンジPCR法を用いて、5 KIU/mlから5,000 KIU/mlの範囲で測定を行った。また、治療開始後は同時にHCV RNA定性測定も行い、ウイルス陰性化の確認に用いた。

ジェノタイプ1bかつ高ウイルス量(100 KIU/ml以上)のいわゆる難治例に対するPeg-IFN+リバビリン併用療法の治療期間は48週であり、中止例を除いて、同期間の投与を行った。しかし、現時点では治療開始後の経過期間が短いため、48週治療終了後の判定を行える症例が少なく、そのため効果判定は投与開始12週目、24週目のHCV RNA陰性化(定性)を用いて検討を行った。

国立病院機構大阪医療センター消化器科において2004年12月から2005年9月末までにPeg-IFN+リバビリン併用療法を開始し1か月以上経過したC型慢性肝炎181例中、ジェノタイプ1bかつ高ウイルス量のいわゆる難治例で、このうち治療開始直前のHCV RNA量がハイレンジ法で400 KIU/ml以上で解析可能な124例を対象とした。これらを、0-2 ratio, 0-4 ratio別にA~Dの4群に分けて、それぞれの群別に検討した。各群は0-2 ratioまたは0-4 ratioが0.01未満の症例をgroup A, 0.01以上0.1未満をgroup B, 0.1以上0.5未満をgroup C, そして0.5以上をgroup Dとした(図1)。

0-2 ratioがgroup Aの症例であれば 高率にSVRが期待できる

検討した症例のうち、0-2 ratioを測定できた107例は、group Aは27例(34%)、group Bは29例(24%)、group Cは26例(22%)、そしてgroup Dは25例(20%)とほぼ4群均等に分割された。一方、0-4 ratioは、測定できた120例のうち、group

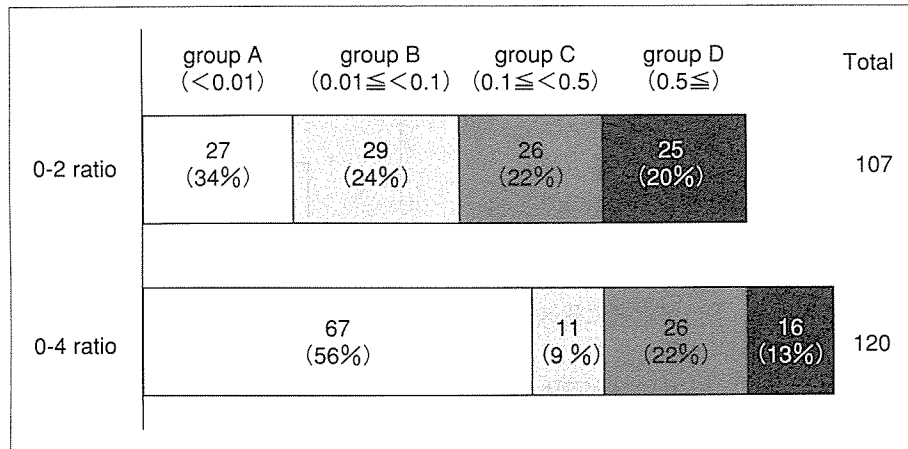


図2 0-2 ratio, 0-4 ratioグループ別の症例数

表1 0-2 ratioグループ別の患者背景

	group A (n=27)	group B (n=29)	group C (n=26)	group D (n=25)
年齢(歳)	53±11	58±10	55±9	54±12
性別(男性:女性)	16:11	18:11	17:9	13:12
体重(kg)	62.2±8.7	60.5±12.1	62.1±14.6	58.9±10.3
ALT(IU/L)	70±42	83±53	77±43	83±63
HCV RNA(KIU/mL)	2616±1319	2763±1398	2442±1387	1653±857
血小板(/μL)	17.8±4.9	15.6±5.4	16.0±6.2	13.2±3.8
新犬山分類(Activity)	1.2±0.6	1.6±0.7	1.0±0.7	1.2±0.4
新犬山分類(Fibrosis)	1.2±0.6	1.8±0.8	1.8±1.0	1.9±0.8
IFN(初回:再投与)	15:10	18:10	14:9	10:13

* P<0.05

Aは67例(56%), group Bは11例(9%), group Cは26例(22%), そしてgroup Dは16例(13%)となった(図2).

0-2 ratioと0-4 ratioそれぞれについて、各群別に症例の背景因子を年齢、性別、体重、治療開始前の血清ALT値、HCV RNA量、血小板数、肝生検を施行した症例では新犬山分類による壊死・炎症の活動性(A0~A3)と線維化(F0~F4)の組織分類、さらにIFN初回投与、再投与の別を比較検討した。0-2 ratioの群別の比較では表1に示すように、group Dで他のgroupに比べてHCV RNA量が少なく、group Aに比べて有意に血小板数が少なく、線維化が進行していた。これは、group

D症例で肝炎が他のgroupに比べて進行しており、それに伴い、ウイルス量が減少していることを示唆している。0-4 ratioの群別の比較でも表2に示すように、group Dで他のgroupに比べてHCV RNA量と血小板数が少なかった。またgroup Dでは初回投与に比べて再投与症例が多かった。Peg-IFN+リバビリン併用療法では従来のIFN単独療法と違い、難治例ではウイルス量とSVRの間に相関はないと言われている⁷⁾⁸⁾。今回の結果でも0-2 ratio, 0-4 ratioともにgroup Aでgroup C, Dに比べて多いことから、このことは裏づけられる。

0-2 ratioについて各群別の12週目、24週目のHCV

表2 0-4 ratioグループ別の患者背景

	group A (n=67)	group B (n=11)	group C (n=26)	group D (n=16)
年齢(歳)	55±10	55±10	54±10	53±13
性別(男性:女性)	42:25	8:3	12:14	10:6
体重(kg)	60.6±10.4	65.7±12.5	57.5±12.9	61.0±12.6
ALT(IU/L)	83±63	91±69	83±58	80±49
HCV RNA(KIU/mL)	2538±1349	3061±1107	2146±1170	1635±926
血小板(/ μ L)	17.2±4.7	14.1±5.4	14.3±6.0	14.0±5.3
新犬山分類(Activity)	1.3±0.7	1.3±0.8	1.1±0.7	1.2±0.4
新犬山分類(Fibrosis)	1.6±0.8	2.0±0.9	2.0±1.0	1.8±0.8
IFN(初回:再投与)	36:25	8:2	14:11	3:9

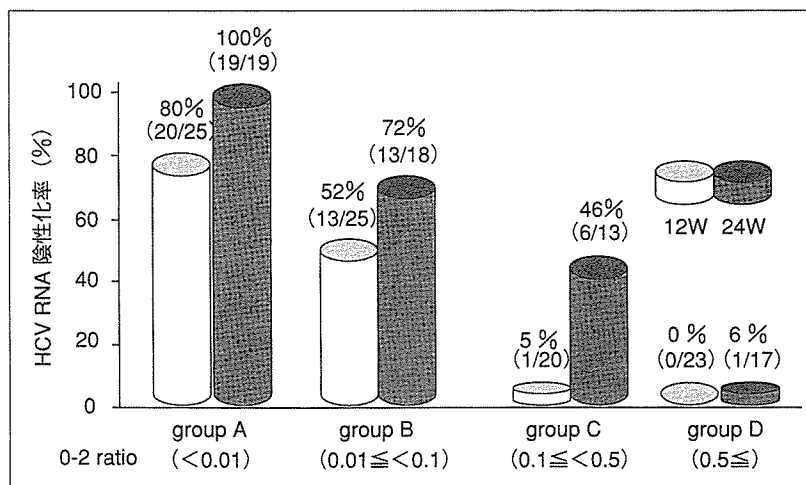
* $P < 0.05$ 

図3 0-2 ratioグループ別のHCV RNA陰性化率

RNA陰性化率を検討した(図3)。その結果、12週目のHCV RNA陰性化率は、group Aは80%(20/25)、group Bは52%(13/25)、group Cは5%(1/20)で、group Dは0%(0/23)あった。さらに24週目のHCV RNA陰性化率は、group Aは100%(19/19)、group Bは72%(13/18)、group Cは46%(6/13)で、group Dは6%(1/17)あった。投与開始12週目、24週目のHCV RNA陰性化症例の多くが、最終的にSVRになることが、今までの報告⁴⁾⁵⁾や治験の成績などから明らかである。このことから、0-2 ratioがgroup Aであれば、24週目までに全例でHCV RNA陰性化を認めており、

高率にSVRが期待できる。他方、0-2 ratioがgroup Dの症例では24週目までにほとんどHCV RNA陰性化が認められず、SVRは期待できない。0-2 ratioを測定することにより、治療開始わずか2週目で、SVRになる症例を高率に選択できる可能性が示された。これはEVRに比べると10週も早い効果判定予測であり、画期的な考え方である。

0-4 ratioがgroup B, C, Dの症例ではSVRは期待できない

0-4 ratioを同様に4群に分けて検討すると(図4)、各群の投与開始12週目のHCV RNA陰性化率は、