

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/HIV重複感染者に対する抗HBV作用薬の投与と耐性ウイルス株の測定

分担研究者 髙 修平 北海道大学病院第三内科・講師

研究要旨

HBV/HIV の重複感染者に対する抗ウイルス治療の中心となる薬剤のひとつである核酸系逆転写酵素阻害薬の使用にあたっては、耐性変異株の出現に対する注意が重要である。本研究では、これまで主として定性的検査で診断・判定されてきた HBV に対するラミブジン耐性株の新規定量測定法を開発した。本測定法により、複数の単塩基変異株が混在した状態でも単一のウイルス株の定量的評価が可能となり、非優勢株の正確な定量、経時的な変異ウイルス量の推移と肝障害の関連などの検討が可能となった。本測定は、変異株が混在する他の核酸量の測定にも応用可能と考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染に B 型肝炎ウイルス (HBV) を重複感染する症例に対する抗ウイルス治療を検討する際の大きな問題点のひとつに薬剤耐性がある。特に、上記の重複感染者に対する核酸系逆転写酵素阻害薬の使用においては、HIV および HBV のそれぞれに対する治療の必要性や耐性出現について慎重な検討が必要である。これらの薬剤耐性ウイルスの定性的検出に関しては、direct sequence 法あるいは検出キットの使用が可能であるが、定量的測定にはさまざまな限界がみられる。本研究では、混在する野生株および変異株の存在下でも、対象株の定量測定が可能となるよう、新規の定量測定法を開発し、臨床的有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 血清サンプル：HBs 抗原陽性の B 型慢性肝疾患患者から血液を採取し、血清として凍結保存した。

2) MGB プローブおよび PNA の設計：HBV-DNA を real-time PCR 法で定量するため、minor groove binder (MGB) を設計した。測定対象領域は HBV ポリメラーゼ領域内 C ドメイン中の YMDD motif (rt203~206) と B ドメイン中の LLAQ motif (rt179~182) とした。YMDD motif からは、rtM204I 株、rtM204V 株を対象としたが、rtM204I 株においては、methionine から置換した isoleucine に対応するコドンが ATC である株と、ATT である株のそれぞれに一致するプローブを設計した。LLAQ motif は野生株と rtL180M 株の 2 株であった。上記の各 MGB プロー

ブに対応する PNA もそれぞれ設計した。

3) 標準用 HBV プラスミドの作成: YMDD motif および LLAQ motif における各野生株・変異株をベクターに組み込み、さらにコンピテントセルに取り込んで形質転換を行った。培養液から分離・精製した HBV プラスミドを調整し標準用サンプルとした。

4) real-time PCR による HBV-DNA 定量: real-time PCR には ABI Real Time PCR System 7300 を使用した。反応液には、測定対象株に相補的な MGB プローブと、対象株以外の非相補的 PNA を反応液に混合した。反応液には、TaqMan Universal PCR Master Mix およびプライマーを調製した。条件は、denature が 95°C で 15 秒、PNA annealing が 71°C で 60 秒、MGB プローブの annealing と extension が 60°C、60 秒で、50 サイクル施行した。

C. 研究結果

1) 相補的 MGB プローブによる単独株の定量性の検討: 対象株を 10 倍毎の段階希釈にて測定した結果、良好な定量性を確認した。測定感度は 3 (logcopies /ml) 程度であった。

2) MGB プローブによる相補株/非相補株混在時の特異的検出性: 複数の株が混在した状態で MGB プローブのみを使用して測定した場合、測定対象株が量的に優勢であれば直線的定量性が維持されていた。一方、対象株が量的に非優勢の場合には量的優勢株とのミスマッチを生じ、正確な定量は困難であった。

3) 複数株混在下の測定限界の検討: 一定濃度の非測定対象株混在下に測定対象株を

10 倍毎に段階希釈し、相補的 MGB プローブと非相補的 PNA を併用した反応液で、対象株の測定限界濃度を検討した。その結果、優勢株の 0.01% までの対象株を定量的に測定可能であった。

4) Lamivudine 耐性出現 B 型肝炎例の経時的検討: lamivudine 内服後に耐性が出現し breakthrough hepatitis を発症した B 型慢性肝疾患患者の血清を用いて、retrospective に YMDD motif および LLAQ motif の経時的推移を定量的に検討した。一部では、HBV-DNA 総量に変化がみられないものの、変異株のパターンの変化が肝障害再燃に関与していた例を認めた。

5) Lamivudine に対する HBV 耐性株を有する HIV/HBV 重複感染者における HBV-DNA 株の経時的変動の測定: lamivudine が抗 HBV 作用薬としては単独で投与され、既に耐性が出現していた症例の HBV 変異株の経時的定量測定が可能であった。

D. 考察

HBV に対する抗ウイルス治療薬として、核酸系逆転写阻害剤が臨床的に有用性を示している。わが国においては 2000 年に lamivudine が、2004 年に adefovir が、2006 年に entecavir が、それぞれ保険適応となった。なかでも、lamivudine は抗 HIV 作用/抗 HBV 作用の両者を有し、治療の key となる薬剤であるが、薬剤耐性を高率に生ずることが知られている。当科における、B 型慢性肝疾患症例における lamivudine の耐性出現率は、1 年で 18.4%、

3年では64.2%にも及ぶ。さらに、耐性株の出現後に肝炎再燃（breakthrough hepatitis）の可能性に留意が必要であるが、ウイルス変異パターンにより肝障害の程度に差異がみられる。したがって、耐性ウイルスの検出や定量的な評価は臨床的にも重要であるが、これまでの多くの耐性ウイルス検出法は限定的であった。ウイルス変異株の定性的検出には、direct sequence法やキット（スマイテスト、INNO-LiPA法）などがあり、定量的検出には amplification refractory mutation system (ARMS) PCR法の報告がある。本研究で開発した PNA-MGB法は新規の定量的検出法であり、特異性・感度ともに臨床応用が可能な方法であることが確認された。

HIV および HBV の両者において、抗ウイルス薬に対する耐性出現は臨床上的の大きな問題点であり、変異ウイルスの定量的測定により、病態増悪の事前予測、治療変更の検討、などに有用性が期待される。

E. 結論

混在する薬剤耐性 HBV 株において特定の変異ウイルスを定量する新規測定法を開発した。本法は臨床的に有用であり、今後、HBV 以外の測定にも応用が可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara K, Kaneko S, Kakumu S, Sata M, Hige S, Tomita E, Mochida S. Double filtration plasmapheresis and interferon combination therapy for

chronic hepatitis C patients with genotype 1 and high viral load. *Hepatology Res.* 2007 ;37:701-710.

2) Higashiyama H, Harabayashi T, Shinohara N, Chuma M, Hige S, Nonomura K. Reactivation of Hepatitis in a Bladder Cancer Patient Receiving Chemotherapy. *Int Urol Nephrol.* 2007;39:461-463.

3) Taguchi H, Sakuhara Y, Hige S, Kitamura K, Osaka Y, Abo D, Uchida D, Sawada A, Kamiyama T, Shimizu T, Shirato H, Miyasaka K. Intercepting radiotherapy using a real-time tumor-tracking radiotherapy system for highly selected patients with hepatocellular carcinoma unresectable with other modalities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 ;69:376-380.

4) 髭 修平. A型・B型急性肝炎. 消化器疾患最新の治療 2007-2008 南光堂 2007 : 271-274.

5) 髭 修平. 腹水大量排液時のアルブミン点滴は意味があるのか？腎機能温存への寄与、また、その至適補充量は？ 臨床に直結する肝・胆・膵疾患治療のエビデンス 文光堂 2007 : 75-77.

6) 髭 修平. 肝細胞癌患者の肝移植適応評価と起因ウイルス. 肝細胞癌と肝移植 アークメディア 2007 : 97-104.

7) 髭修平、荘拓也、山本洋一、中西満、中馬誠、浅香正博. ラミブジン投与 B 型慢性肝炎症例の耐性株出現予測におけるウイルスマーカーの評価. *臨床消化器内科* 2007;22:607-611.

- 8) 髭修平. E型肝炎について知っておくべきこと. *Medicina* 2007;44:923-925.
- 9) 中馬誠、髭修平. 肝炎ウイルスキャリアにおける化学療法や分子標的薬は安全か? *Medical Practice* 2007;24:657-660.
- 10) 髭修平、中西満、中馬誠、山本義也、永坂敦、浅香正博. C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療とHCV抗体価の変動. *臨床消化器内科* 2007;22:1401-1404.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto Y, Hige S, Sho T, Natsuzaka M, Nakanishi M, Yoshida S, Asaka M. The PNA-MGB method, a novel assay, could quantify each HBV mutant against lamivudine in one or more different strains. The 17th conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Kyoto, 2007.
- 2) Yamamoto Y, Hige S, Sho T, Natsuzaka M, Nakanishi M, Yoshida S, Asaka M. Quantification of HBV mutants against lamivudine by the PNA-MGB method during the course of breakthrough hepatitis. The 42th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Barcelona, 2007.
- 3) 山本洋一、髭修平、荘拓也、夏井坂光輝、中西満、中馬誠、吉田繁、浅香正博. PNA-MGB法によるB型肝炎再燃時におけるラミブジン耐性株の定量的検討. 第93回日本消化器病学会総会、青森、2007.
- 4) 中西満、髭修平、夏井坂光輝、山本洋一、中馬誠、目黒高志、佐賀啓良、永坂敦、宮城島拓人、狩野吉康、鈴木岳、工藤峰生、成瀬宏仁、紺野潤、浅香正博. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α 2b+RBV療法の治療延長の検討. 第43回日本肝臓学会総会、東京、2007.
- 5) 山本洋一、髭修平、荘拓也、夏井坂光輝、中西満、中馬誠、吉田繁、浅香正博. PNA-MGB法によるB型肝炎再燃とラミブジン耐性株の定量的・経時的検討. 第43回日本肝臓学会総会、東京、2007.
- 6) 荘拓也、髭修平、山本洋一、夏井坂光輝、中西満、中馬誠、浅香正博. ラミブジン投与B型慢性肝炎患者症例の有効性および耐性出現の予測. 第43回日本肝臓学会総会、東京、2007.
- 7) 中馬誠、山本義也、髭修平. 高度進行肝臓癌に対するIFN併用肝動注療法の病態別検討. 第11回日本肝臓学会大会、神戸、2007.
- 8) 中西満、中馬誠、髭修平. MRI拡散強調画像による肝細胞癌の分化度評価と再発予測における有用性. 第11回日本肝臓学会大会、神戸、2007.
- 9) 山本洋一、髭修平、山本桂子、中西満、中馬誠、吉田繁、浅香正博. PNA-MGB法によるラミブジン耐性株の定量と肝炎再燃の経時的検討. 第11回日本肝臓学会大会、神戸、2007.
- 10) 山本桂子、髭修平、山本洋一、中西満、藤澤文絵、小野澤真弘、加畑馨、中馬誠、近藤健、橋野聡、渡部恵子、大野稔子、浅香正博、田中淳司、今村雅寛、佐藤典宏、小池隆夫. HIV/HBV重複感染者に対する抗HBV作用薬投与の検討. 第21回日本エイズ学会、広島、2007.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

HIV重複B型急性肝炎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

共同研究者 葛下 典由 国立病院機構大阪医療センター 消化器科

三田 英治 国立病院機構大阪医療センター 消化器科

研究要旨：わが国における B 型慢性肝炎の感染経路は母子感染であり、genotype C が大半を占める。一方、成人の B 型急性肝炎の多くは性感染によるものであり、以前は本邦にはほとんど存在しなかった genotype A の感染例が、近年急増している。

劇症化あるいは慢性化を阻止する目的でエンテカビルなどの核酸アナログが投与されているが、HIV 感染者の B 型急性肝炎では、エンテカビルが HIV にも影響を与え、薬剤耐性ウイルスの出現を惹起することがあり、十分注意する必要がある。

A. 研究目的

急性肝炎の一部は劇症化することがあり、劇症化例の約 20%は B 型肝炎ウイルスが原因とされている。従来、本邦の B 型急性肝炎の多くは genotype C もしくは B の水平感染であったため、一部の重症化する症例を除いては、慢性化することなく一過性感染で終息していた。近年欧米型 genotype A による B 型急性肝炎が増加し、慢性化することが問題となっている。当科における最近の B 型急性肝炎の現状を明らかにし、さらに HIV 感染者が B 型急性肝炎を起こした症例も経験したので、それらに対する対応についても検討する。

B. 研究方法

平成 18 年 1 月から平成 19 年 10 月末までの期間に、B 型急性肝炎で当科に入院した、16 例（3 例は HIV 感染者）の背景因子、治療の導入を検討した。

C. 研究結果

B 型急性肝炎 16 例の背景因子は、男性 13 例、女性 3 例で；genotype では A が 7 例（44%）、B が 2 例（12%）、C が 7 例（44%）であった。同性間感染（MSM）6 例中、5 例は genotype A であった。年齢分布は 10 歳代～50 歳代と幅は広がったものの、30 歳以下が 9 例（56%）を占めており、若年化の傾向にあった。3 ヶ月以上経過観察が可能だった 9 例（HIV 感染は含まず）の経過について

1) genotype A は 3 症例で、HIV の感染がないことを確認の上、ラミブジン・エンテカビルなどの核酸アナログの介入を試みた。1 例は入院時に重症肝炎と診断され、ステロイドパルス・インターフェロン・ラミブジン（エンテカビル認可前のため）を導入した。他の 2 例も genotype A と診断後、エンテカビルを投与した。3 例とも投与後早期に HBe のセロコンバージョンが起り、全例 5 ヶ月以内に HBs 抗原も陰性化した。

2) genotype A 以外では、重症肝炎と診断された genotype C の患者に対し、ステロイ

ドパルス・インターフェロン・エンテカビルで治療を開始したところ、すみやかに肝炎は沈静化し、HBs 抗原も陰性化した。残り5例においては、治療は介入せず、診断後5ヶ月までに全例 HBs 抗原は陰性化している。

HIV 感染に B 型急性肝炎を起こし、遷延化が危惧された2例に短期間（3ヶ月以内）エンテカビルを投与した。2例とも早期に HBe はセロコンバージョンし、4ヶ月以内に HBs 抗原も陰性化した（現在まで HBs 抗体は陽性にならず）。エンテカビルを投与しなかった1例においては、トランスアミナーゼのピークは600 (IU/L) 台と低く、黄疸を生じることもなく慢性化した。

D. 考察

現在 HAART の必要のない HIV 感染患者が、B 型急性肝炎を発症した際には、1)治療をせず経過をみる。2)エンテカビルの短期投与を試みる。3)短期間の strong HAART を試みる。などの選択肢があると考えられるが、現在どの選択肢が良いかのコンセンサスはない。今回、我々は遷延化が危惧された2例に対し、エンテカビルを短期間使用し（HIV に対する耐性株の報告の前）、B 型急性肝炎に関しては慢性化することなく、良好な結果を得た。しかし、HIV に対しては耐性株を生じさせる（現在 HIV 耐性株を検索中）危険性があり、今後は重症化・劇症化が危惧される症例以外は投与すべきではないと考えている。HIV 感染がある場合の B 型急性肝炎では genotype A が多く、慢性化は危惧される。しかし、慢性化した場合でも慎重に経過観察し、HAART の治療が必要になった際、抗 HBV 薬2剤(3TC or FTC, TDF)を含む HAART で HIV / HBV の治療を行うといった治療手段もあり、HIV 感染者の B 型

急性肝炎に対しては、安易な核酸アナログの投与はすべきではなく、慎重な経過観察および対応が望まれる。

E. 結論

近年、B 型急性肝炎の感染経路の多くは、性感染によるものであり、常に HIV の感染を念頭に入れた対応が必要である。さらに、HIV 感染者が B 型急性肝炎を発症した場合、安易な核酸アナログの投与は控えるべきであり、今後どのような対応が推奨されるべきか、さらに検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 加藤道夫. HBe 抗原陽性例に対する治療 2007:12,10-13.
- 2) Itose I, Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Oze T, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. J Med Virol. 2007;79:511-521.
- 3) 加藤道夫 診療の秘訣 ペグインターフェロン・リバビリン併用治療抵抗性 C 型慢性肝炎の診療, Moderan Physician 2007;27:1284-1291
- 4) 加藤道夫 私の処方 難治性 C 型慢性肝炎に対する Two-step IFN rebound therapy (TIRT),

- Moderan Physician
2007;27:1284-1291.
- 5) 加藤道夫 B型慢性肝炎に対する
インターフェロン治療 -現況
と今後の展望, 医学のあゆみ
2007;223:153-156.
- 6) Ito K, Tanaka Y, Kato M,
Fujiwara K, Sugauchi F,
Sakamoto T, Shinkai N, Orito E,
Mizokami M. Comparison of
complete sequences of
hepatitis B virus genotype C
between inactive carriers and
hepatocellular carcinoma
patients before and after
seroconversion. J
Gastroenterol
2007;42:837-844.
- 7) Kurashige N, Hiramatsu N,
Ohkawa K, Oze T, Inoue Y,
Kurokawa M, Yakushijin T,
Igura T, Kiso S, Kanto T,
Takehara T, Tamura S, Kasahara
A, Oshita M, Hijioka T,
Katayama K, Yoshihara H,
Hayashi E, Imai Y, Kato M,
Hayashi N. Initial viral
response is the most powerful
predictor of the emergence of
YMDD mutant virus in chronic
hepatitis B patients treated
with lamivudine. Hepatol
Res 2007
- 8) Kanda A, Takehara T, Ohkawa K,
Kato M, Tatsumi T, Miyagi T,
Sakamori R, Yamaguchi S,
Uemura A, Kohga K, Sasakawa A,
Hikita H, Kawamura K, Kanto T,
Hiramatsu N, Hayashi N. Early
emergence of
entecavir-resistant hepatitis
B virus in a patient with
hepatitis B virus/human
immunodeficiency virus
coinfection. Hepatol Res
2007
- 9) 熊田博光、豊田成司、泉並木、
岡上武、伊藤義人、加藤道夫、
飯野四郎, HCV RNA定量
キット コバス TaqMan H
CV「オート」の検討 | コバス
TaqMan HCV「オート」
に関する共同研究?中間報告 |,
医学と薬学 2007;58:595-605.
- 10) Hiramatsu N, Kurashige N, Oze
T, Takehara T, Tamura S,
Kasahara A, Oshita M, Katayama
K, Yoshihara H, Imai Y, Kato M,
Kawata S, Tsubouchi H, Kumada
H, Okanoue T, Kakumu S, Hayashi
N. Early decline of hemoglobin
can predict progression of
hemolytic anemia during
pegylated interferon and
ribavirin combination therapy
in patients with chronic
hepatitis C, Hepatol
Res. 2008;38:52-59.
- 11) Koike K, Kikuchi Y, Kato M,
Takamatsu J, Shintani Y,
Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H,
Moriya K, Yotsuyanagi
H. Prevalence of hepatitis B
virus infection in Japanese
patients with HIV, Hepatol
Res. 2008;38 : 310-314.

2) 学会発表

- 1) 小瀬嗣子、平松直樹、倉繁奈緒、薬師寺崇行、井倉技、木曾真一、尾下正秀、萩原秀紀、三田英治、肱岡泰三、吉原治正、今井康陽、春日井博志、加藤道夫、南雄三、考藤達哉、竹原徹郎、笠原彰紀、田村信司、林紀夫、Genotypel型高ウイルス量以外のC型慢性肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin併用療法の治療成績—多施設(OLF)共同研究—：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 2) 小瀬嗣子、平松直樹、倉繁奈緒、薬師寺崇行、宇山宏和、井倉技、尾下正秀、萩原秀紀、三田英治、伊藤敏文、福井弘幸、吉原治正、井上敦雄、今井康陽、春日井博志、加藤道夫、考藤達哉、竹原徹郎、笠原彰紀、田村信司、林紀夫、難治性C型肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin併用療法におけるウイルス陰性化に及ぼす薬剤 adherence の影響について—多施設(OLF)共同研究—：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 3) 倉繁奈緒、平松直樹、小瀬嗣子、薬師寺崇行、井倉技、木曾真一、考藤達哉、竹原徹郎、田村信司、尾下正秀、萩原秀紀、肱岡泰三、片山和宏、薮内以和夫、吉原治正、林英二郎、今井康陽、加藤道夫、林紀夫、PegIFN/Ribavirin併用療法における血小板の推移についての検討—多施設(OLF)共同研究—：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 4) 黒川三佳、平松直樹、倉繁奈緒、小瀬嗣子、薬師寺崇行、宇山宏和、井倉技、巽智秀、大川和良、竹原徹郎、田村信司、今中和穂、尾下正秀、片山和宏、吉原治正、今井康陽、加藤道夫、林紀夫、肝細胞癌治療後C型肝炎に対するPegIFN/Ribavirin併用療法の治療効果と肝癌再発について：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 5) 倉繁奈緒、平松直樹、大川和良、小瀬嗣子、黒川三佳、薬師寺崇行、宇山宏和、井倉技、木曾真一、考藤達哉、竹原徹郎、田村信司、尾下正秀、肱岡泰三、片山和宏、薮内以和夫、吉原治正、林英二郎、今井康陽、加藤道夫、林紀夫、ラミブジン耐性B型慢性肝疾患に対するアデホビル投与症例の臨床的検討：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 6) 大川和良、竹原徹郎、加藤道夫、巽智秀、阪森亮太郎、山口真二郎、植村彰夫、甲賀啓介、笹川哲、疋田隼人、考藤達哉、平松直樹、林紀夫、ラミブジン耐性B型慢性肝疾患に対するアデホビル追加治療における治療効果を規定するウイルス変異の検討：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 7) 結城暢一、長岡貴幸、加藤道夫、ウイルス感染史よりみたまOccultHBV感染の病態：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007

- 8) 池添世里子、今井康陽、田中英夫、平松直樹、薬師寺崇行、井倉技、尾下正秀、肱岡泰三、片山和宏、藪内以和夫、吉原治正、井上敦雄、春日井博志、加藤道夫、笠原彰紀、竹原徹郎、田村信司、林紀夫、大阪府におけるC型肝炎に発生した肝細胞癌の罹患数の動向と背景因子の検討：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 9) 三田英治、加藤道夫、葛下典由、西出憲史、藤田実、林典子、入江裕子、太田高志、山西村安司、戸高明子、白島伸宏、結城暢一、山本佳司、池田昌弘、Peg- $\text{INF}\alpha$ 2b・リバビリン併用療法の著効率と72週治療の有効性について：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 10) 甲賀啓介、竹原徹郎、疋田隼人、笹川哲、植村彰夫、阪森亮太郎、山口真二郎、巽智秀、大川和良、考藤達哉、平松直樹、加藤道夫、林紀夫、肝癌に対する肝動脈塞栓術後の血清可溶性 MICA と NKG2D 発現の変化：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 11) 金子晃、山田涼子、川口司、山本守敏、巽信之、中間昭弘、石橋一伸、加藤道夫、久保光彦、黄疸を伴う進行したPBCおよびPSC症例に対するbezafibrate療法の試み：第43回日本肝臓学会総会・東京・2007
- 12) 葛下典由、三田英治、林典子、長谷川裕子、太田高志、西出憲史、藤田実、戸高明子、白島伸宏、結城暢一、山本佳司、加藤道夫、池田昌弘、HIV/HBV重複感染例におけるラミブジン、テノホビル併用療法効果：第11回日本肝臓学会大会・神戸・2007
- G 知的所有権の取得状況
対象事項なし

HIV・HBV重感染例に発症した肝細胞癌

分担研究者 四柳 宏 東京大学医学部付属病院感染制御部特任講師

研究要旨：

HIV 感染を合併した B 型慢性肝炎患者に見られる肝細胞癌例を経験した。症例 39 歳の男性患者で HIV は未治療であった。B 型慢性肝炎の経過観察中に肝細胞癌 (HCC) が発見された。CD4 数が $171/\mu\text{L}$ と低く、HAART 導入後に肝切除術が行われた。

本邦においては HIV-HBV の合併感染例に HCC を発症した報告はない。これは、①HIV-HBV の合併感染例の平均年齢が低い、②重感染を起こしてからの経過観察期間が短い、③HAART により診断時の肝機能が保たれている、ことが主な要因と思われる。

しかしながら、診断時に HBV-DNA 量の多い症例の場合、HAART を導入しても約 3 割の症例で HBV の増殖が十分に制御できない。こうした症例は将来肝細胞癌を合併する危険性がある。

A. 研究目的

昨年本研究班で行った全国調査により、本邦の HIV 感染者の 6.3% に HBV 感染の合併があり、その 31.8% に ALT 100IU/L 以上の肝炎を合併していることが明らかになった。HBV-HIV の重感染を起こした場合、HBV 単独感染に比較して肝病変の進展が速いという報告があり、本邦の HBV-HIV 重感染患者の中にも肝硬変、肝細胞癌などの進展した肝病変を有する例が存在するものと考えられる。

本年度の研究班におけるアンケートによれば、HBV-HIV 重感染例中肝細胞癌 (HCC) を合併したのは 1 例

のみであった。この症例をもとに、本邦における HBV-HIV の重感染例に HCC の合併が少ない要因について考察した。

B. 肝細胞癌を合併した症例

症例は 39 歳男性。母、妹が HBV キャリアであり、本人は他院に入院した 26 歳時に HBV キャリアと判明している。この時点で IFN 療法が行われたが無効であり、以後他院で経過観察されてきた。2006 年 5 月のスクリーニング検査で肝 S8 に径 3cm の HCC を指摘され、入院した。しかし HIV 抗体陽性であり、当院に紹介、転院となった。

転院時の血液検査所見では①HBe抗原陽性、HBV-DNA 高値であり、肝炎の活動性が高い、②肝機能は十分保たれており、肝硬変に至っていない、③HCC の腫瘍マーカーは AFP 51ng/dL, PIVKALII 11113 mAU/mL と上昇している、④ HIV-RNA は 5100copy/mL と低く、CD4 は 171/ μ L と低下している、ことが判明した。

5月に直径3cmであったHCCは直径7cmと増大し、早急に外科的切除を要する状況であったが、CD4値が低いことから、HAARTの導入が必要であると判断された。Angio-TAEによってHCCの増殖を2回にわたって抑え、HAART導入後の10月に肝切除術が実施された。

S8の主腫瘍に加え、S6に肝内転移が認められ、この病巣も切除された。病理所見は、Moderately differentiated HCC, single nodular type, eg, fc (+), fc-inf (-), sf (-), s0, vp0, vv0, va0, b0, sm (-)、背景肝組織は Chronic hepatitis, F2A1であった。

C. 班員へのアンケート調査の結果に関して

(1) HBV 感染判明時の血清アルブミン値

HBV 感染判明時の血清アルブミン値(146例)は平均 3.9 ± 0.7 (g/dL) であった。4.0 g/dL 以上の症例は 86例 (59%)、3.5 g/dL 以上 4.0 g/dL 未満の症例は 32例 (22%)、3.0 g/dL

以上 3.5 g/dL 未満の症例は 13例 (9%)、3.0 g/dL 未満の症例は 15例 (10%) であった。平均観察期間 3.9 ± 4.1 (年) を経た後の血清アルブミン値 (83例) は平均 4.1 ± 0.6 (g/dL) であった。4.0 g/dL 以上の症例は 61例 (73%)、3.5 g/dL 以上 4.0 g/dL 未満の症例は 14例 (17%)、3.0 g/dL 以上 3.5 g/dL 未満の症例は 5例 (6%)、3.0 g/dL 未満の症例は 3例 (4%) であった。

(2) HBV 感染判明時の血清ビリルビン値

HBV 感染判明時の血清ビリルビン値 (208例) は平均 1.0 ± 2.2 (mg/dL) であった。1.0 mg/dL 未満の症例は 170例 (82%)、1.0 mg/dL 以上 2.0 g/dL 未満の症例は 21例 (10%)、2.0 g/dL 以上の症例は 17例 (8%) であった。平均観察期間 3.9 ± 4.1 (年) を経た後の血清ビリルビン値 (164例) は平均 1.2 ± 1.1 (mg/dL) であった。1.0 mg/dL 未満の症例は 122例 (70%)、1.0 mg/dL 以上 2.0 g/dL 未満の症例は 26例 (15%)、2.0 g/dL 以上の症例は 26例 (15%) であった

なお、血清ビリルビン値 1.0 mg/dL 未満の 122例中 97例 (80%)、1.0 mg/dL 以上 2.0 g/dL 未満の 26例中 22例 (85%)、2.0 g/dL 以上の 26例中のすべてに HAART が導入されていた。

(3) HBV-DNA の推移に関して

観察開始時/最終観察時における HBV-DNA 値は、高レベル (10^6

copies/mL 以上) →高レベル 41 例 (27%)、高レベル→低レベル (10^6 copies/mL 未満) 61 例 (42%)、低レベル→高レベル 2 例 (1%)、低レベル→低レベル 44 例 (30%)であった。

また、高レベル→高レベル 41 例中 20 例 (49%)、高レベル→低レベル 61 例中 53 例 (87%)、低レベル→高レベル 2 例中 1 例 (50%)、低レベル→低レベル 44 例中 31 例 (70%) に HAART が導入されていた。HBV 陽性判明時に HBV-DNA が高レベルであった症例の約 3 割が HBV-DNA は高レベルのままであった。

D. 考察

本邦においては HIV-HBV の合併感染例に HCC を発症した報告はなく、HCV と異なり、現時点では HBV による HCC が生命予後因子とはなっていないと考えられる。

これは、①HIV-HBV の合併感染例の平均年齢が平均 44.0 ± 9.7 (歳) と低い、②重感染を起こしてからの経過観察期間が平均 3.9 ± 4.1 (年) と短い、ことが大きな要因であるが、加えて、③抗 HBV 作用を有する HAART により診断時の肝機能が保たれている、ことも要因の一つと思われる。

ART 施行当初は抗 HBV 作用を有する抗 HIV 薬は 3TC のみであった。しかも 3TC は HIV のみならず、HBV 耐性も獲得しやすいため、HBV のコントロールも困難なことが多かった。

現在は 3TC に加え、TDF、FTC な

ど抗 HBV 作用を有する抗 HIV 薬の登場により、HBV 感染を合併した HIV 感染症のコントロールの選択肢が広がった。また、抗 HBV 作用を有する核酸アナログとして、Entecavir (ETV)、Telvivudine (TBV, TdT) などが使用され、HBV 感染症のコントロールの選択肢も広がっている。

しかしながら、診断時に HBV-DNA 量の多い症例の場合、HAART を導入しても約 3 割の症例で HBV の増殖が十分に制御できない。慢性肝疾患からの発癌はウイルス増殖と密接に関連していることが判明しており、こうした症例は将来肝細胞癌を合併する危険性がある。

今回 HCC を合併した症例の背景肝は肝硬変ではなく、慢性肝炎であった。B 型慢性肝疾患は背景肝が肝硬変でなくても発癌が起こり得る。しかも若年者に発症した HCC の進行は速いことが多い。HIV-HBV 合併例も HBV 単独感染例同様 HCC の定期的スクリーニングを行い、早期発見、早期治療に努める必要があろう。

E. 結論

HIV-HBV 合併例における肝細胞癌は今後増加すると思われる。HAART や抗 HBV 療法による HBV 増殖のコントロールに加えて、定期的な肝細胞癌スクリーニングが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Ikeda H, Takahashi H, Suzuki M, Kondo S, Kimura K, Koike J, Itoh F. Successful treatment of hepatitis B virus-associated membranous nephropathy with lamivudine. Clin Nephrol. 2006;65:53-56.
- 2) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. Liver Int. 2006;26:90-96.
- 3) Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan. Hepatol Res 2007;37:2-5.
- 4) Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report. World J Gastroenterol 2007;13:964-969.
- 5) Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in the S region of hepatitis B virus in sera from patients with acute hepatitis. Hepatol Res. 2007;37:731-9.
- 6) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. Hepatol Res. 2007;37:661-6.
- 7) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of hepatitis B virus infection in Japanese patients with HIV. Hepatol Res. 2007 (in press).

2. 学会発表

- 1) 四柳宏, 小池和彦. HIV/HBV・HCV

の重複感染について HIV・HBV/HCV の重複感染の本邦における実態：第 21 回日本エイズ学会、広島、2007.

- 2) 四柳宏，新谷良澄，小池和彦．諸感染症に対するワクチン B 型肝炎ウイルス S 領域のアミノ酸変異に関する検討：第 81 回日本感染症学会、京都、2007.
- 3) 山田典栄，四柳宏，三好秀征，堤武也，藤江肇，新谷良澄，森屋恭爾，奥瀬千晃，安田清美，鈴木通博，伊東文生，飯野四郎，小池和彦．B 型慢性肝疾患における B 型肝炎ウイルスコアプロモーター領域、プレコア領域およびコア領域の変異に関する検討 第 43 回日本肝臓学会総会、東京、2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

生体部分肝移植後のC型肝炎に対する治療に関する研究

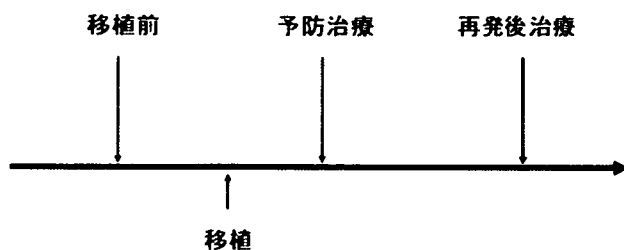
分担研究者 菅原 寧彦 東京大学肝胆膵外科, 人工臓器移植外科准教授

研究要旨

東京大学では、C型肝炎陽性患者の生体部分肝移植後、予防的インターフェロン+リバビリン投与を施行している。1998年6月-2006年12月に生体部分肝移植を施行した患者のうちC型肝炎陽性の97例の治療成績を評価した。年齢は平均で55歳、男性69人女性28人。術前のMELDスコアは平均で18、肝細胞癌合併症例が52例(54%)、HBVとの混合感染が2例、HIVとの混合感染が6例、genotype 1bが71例(77%)であった。術後平均29病日で治療開始した。副作用による中止は28例であった。2007年12月現在、RNA陰性を得られているのは17例、sustained viral response (SVR)症例は15例(38%)である。免疫抑制剤は、タクロリムス+ステロイドを使用した。胆汁鬱滞性肝炎によると考えられる死亡症例は6例であった。予防的抗ウイルス療法がC型肝炎の肝移植後の予後を改善するか、明らかにするにはさらに症例の蓄積を待つ必要がある。

A. 研究目的

肝移植後のC型肝炎再燃は10%の割合で胆汁鬱滞性肝炎を引き起こし、グラフトロスにつながる。また、これに対する再移植の成績も不良とされている。現在、C型肝炎ウイルスに対する治療はインターフェロン+リバビリンが代表的なものであり、東京大学においては、C型肝炎陽性の肝移植患者全例を対象として、術後、予防的抗ウイルス療法を施行している。その効果と安全性について検討した。



B. 研究対象と方法

東京大学で1998年6月-2006年に生体部分肝移植を施行した患者のうちC型肝炎陽性の92例の治療成績を評価した。92例の性別は男性：女性が69：28と男性優位であった。年齢は平均±標準偏差で、55±9.5歳、術前MELDスコアは18±11、肝細胞癌合併症例が52例(54%)、B型肝炎の合併感染が2例、HIV合併感染が5例、C型肝炎ウイルスのgenotypeは、1bが71例(77%)であった。インターフェロン開始後の血球減少を抑制する目的で、2003年12月以降は、C型肝炎陽性症例全例で、移植手術中に脾摘を施行した。

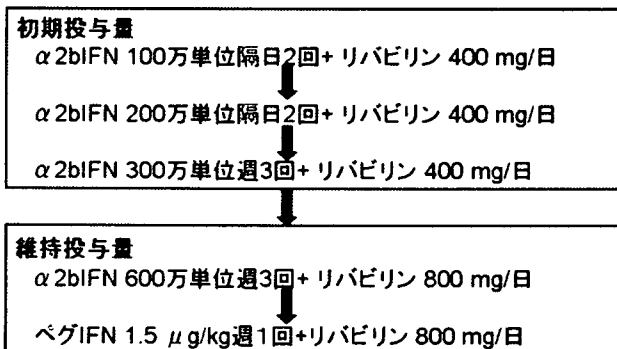
術後の免疫抑制は、HCV陰性症例と同様のプロトコールで、タクロリムス+ステロイドの2剤を基本とし、後者は、3.0 mg/kg

から、半年間で0.05 mg/kgまで減量し、以後この量で継続した。早期離脱は行なっていない。急性拒絶反応の治療は、

- ①ステロイドリサイクル療法、
 - ②Mycophenolate mophetil追加
 - ③Basiliximab (抗CD25モノクローナル抗体)追加
 - ④OKT3
- の順に追加免疫抑制を行った。

インターフェロン+リバビリン療法は、全身状態の改善、血算の改善(白血球 $>4000\text{mm}^3$, ヘモグロビン $>10\text{g/dl}$, 血小板 $>10\text{万}/\text{mm}^3$)をもって、開始基準とした。投与期間は、HCV-RNA陰性化後1年間を目標とし、1年間の陰性を得た後、投与終了し、半年間陰性維持をもって、sustained viral responseと定義した。陰性化の得られない場合は、副作用の発現が見られない限り、投与を継続した。

投与方法は、インターフェロン $\alpha 2b$ を1M単位 \rightarrow 2M単位 \rightarrow 3M単位と隔日に増量していき、リバビリンは400mgで開始した。インターフェロン $\alpha 2b$ 3MU \times 3/week+RBV400mg $2\times$ を初期投与量とし、副作用の発現を見ながら、最大用量インターフェロン $\alpha 2b$ 6M単位 \times 3/week+リバビリン800mg



まで増量、もしくは、ペグインターフェロン1.0-1.5 $\mu\text{g/kg}\times 1/\text{week}$ + リバビリン400-800 mg/dayへの変更を行い、維持した。

レシピエント、ドナー、及び家族には、通常のHCV陽性の移植手術のリスク(大量出血、後出血、胆汁漏、胆管狭窄、拒絶反応、血栓症、感染症、免疫抑制剤の副作用)に加え、C型肝炎の再燃にてグラフト不全に陥る危険が10%程度あり、C型肝炎陰性症例と比べると、術死の危険が高いことも説明、同意を得た上で、生体肝移植を施行し、予防的インターフェロン+リバビリン療法を施行した。

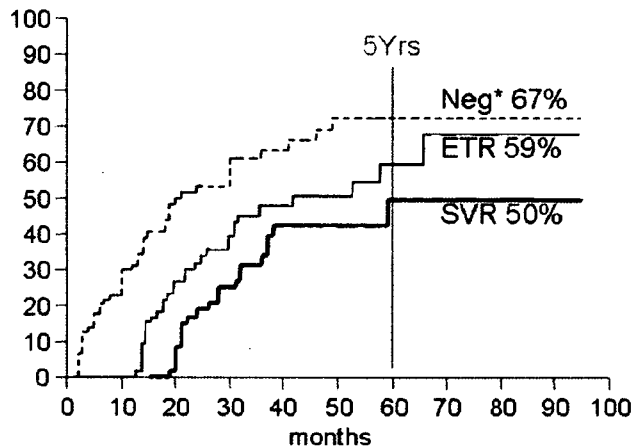
C. 研究結果

予防投与開始は、 29 ± 24 病日であった。2ヶ月以上経過して開始したのは7例(63-130病日)で、投与が遅れた理由は、腎障害3例、敗血症1例、腹腔内膿瘍1例、心不全1例、血栓性微小血管障害1例であった。

術後経過観察期間は 29 ± 18 ヶ月であった。28例で、副作用による治療中止がなされ、その内訳は、拒絶反応やHCV再燃によるグラフト不全が11例、腎障害8例、Depression 4例、血栓性微小血管障害3例、肝癌再発死亡3例、Virus associated hemophagocytotic syndrome 2例、血小板減少2例、網膜症1例であった。このうち、Depressionで中止の3例は、うち1例は、ウイルス陰性化後に中止し、その後sustained viral responseとなった。2例は、後に治療再開し、1例ではsustained viral responseを得ている。RNAの陰性化

が得られたのは、genotype1b 71 例中 11 例、うち 10 例が sustained viral response であった。

Kaplan Meier 曲線では、5 年 sustained viral response 率は 50% であった。



D. 考察

C 型肝炎陽性患者に対する肝移植後の肝炎再燃対策としての、予防的インターフェロン+リバビリン療法は、過去にまとまった報告も少なく、さらに肯定的な報告は当科からの報告を含め、2 報告しか認めてない。

本研究でも、約 1/4 の症例で、副作用による中止を余儀なくされ、全体として、胆汁鬱滞性肝炎にて死亡した症例は 6 例であった。移植時の同時脾摘を行なうことで、血球減少からの回復が早期に得られ、術後 1 ヶ月前後で、投与可能になる、また、治療開始後、血球減少を理由とした治療中止を最小限に抑えることができた。本研究での血小板減少により中止した症例は、同時脾摘を行っていなかった。術後免疫抑制としてのステロイドは、通常通り使用することで、急性拒絶反応の頻度は 21% と、低く抑えられ、また、インターフェロン開始が

拒絶反応の危険因子にもならないことがわかった。

また、特に genotype1b 症例では、1 年以上の長期投与にて始めて RNA 陰性化が得られるものも多く見られ、さらに、これらの症例の中に FCH を発症したものはなかったこと、また、viral response が得られた症例の予後は有意に良好であったことから、たとえ早期に viral response が得られなくとも、長期に投与を続けることが肝炎再燃対策として有効である可能性が示唆された。尤も、白血球数 2000-3000 /mm³、ヘモグロビン 8-10 g/dl 程度の血球減少に対しては、インターフェロン、リバビリンの減量や、G-CSF 投与などで対応しており、こうした対応をしながらも、長期投与を続けることが安全かつ、有効か、さらに症例を重ねて検討する必要がある。

E. 結論

C 型肝炎ウイルス陽性患者に対する予防的抗ウイルス療法は、安全で、肝炎再燃の抑制に有効な治療といえる。副作用による中止を如何に抑えるか、陰性化が得られない症例に長期投与を続けるべきか、は今後さらに検討する必要がある。

F. 研究発表

英文

1. Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M. Histologic eosinophilia as an aid to diagnose acute cellular rejection after living donor liver transplantation.

Clin Transplant. 2007;21(2):214-8.

2. Kishi Y, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Matsui Y, Makuuchi M. Blood eosinophilia after living donor liver transplantation for hepatitis C virus-related cirrhosis. Transplant Proc. 2007 Jun;39(5):1540-3.

G. 知的所有権の取得状況

なし

I エンテカビル単独投与HIV/HBV患者の HIV薬剤耐性変異(M184V)へのHAART導入

II SDA-1株の正常肝臓細胞への感染

分担研究者 服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨: I. HIV/HBV の重感染において HBV 治療薬 (Entecavir) 投与によると思われる HIV の薬剤耐性変異 (M184V) を発見した。II. エイズ患者より分離した HIV 株の一つ (SDA-1) が肝臓由来細胞に感染し増殖することを見いだした。これが HIV/HCV 重感染病態に及ぼす影響を明らかにするために SDA-1 の感染能を検討し、正常肝細胞に感染することを示した。

■ 研究協力者

芦野有悟、鈴木康弘、Haorile(東北大学大学院医学系研究科)

Li Shengwei、臼澤基紀(エイズ予防財団)

A. 研究目的

HIV 感染に伴われた肝炎の治療には困難な点がつきまとう。特に HBV との重感染では HBV の逆転写酵素を標的にした薬剤は HIV への影響がなく、HBV に単独で作用できるか、あるいは両方に作用するかで重感染者への使用を考えなければならない。HIV への影響がある場合には不完全な HIV 治療となり、耐性ウイルスの出現を生ずる可能性がある。ここではその可能性がないといわれていた Entecavir (ETV)により逆転写酵素変異導

入(M184V)が認められ、やむを得ず HAART を導入した例を報告する。(I. HBV 症例)。

並行して、HIV-1 の肝臓細胞への感染実験を行った。末期に肝臓機能障害を示した AIDS 患者から HIV (SDA-1) を分離しその感染と増殖の機構を明らかにしてきた。その結果、SDA-1 が CD4 非依存であることを示した。我々は、SDA-1 が肝臓細胞に感染・増殖して、肝臓機能障害に関与しているのではないかという仮説を立て、SDA-1 が Huh7 などの細胞に感染するかどうかを実験的に検討した。その結果、SDA-1 は Huh7 細胞に感染・増殖し、仮説を支持する証拠を得た (06 年成果)。今年度はより生体に近い環境で