

表 1 B型慢性肝炎の治療ガイドライン(2007 年度版)

	HBV-DNA	≥7 log copies/ml	<7 log copies/ml
35 歳未満	HBe 抗原陽性	IFN 長期間歇	IFN 長期間歇
	HBe 抗原陰性	経過観察 進行例はエンテカビル	経過観察
35 歳以上	HBe 抗原陽性	①エンテカビル ②IFN 長期間歇	エンテカビル
	HBe 抗原陰性	エンテカビル	エンテカビル

表 2 HBVキャリアのステージ分類

HB ステージ	0	I	II	III	IV	V
HBs 抗原	+	+	+	+	+	-**
HBe 抗原	+	+	+	-	-	-
HBV-DNA (copies/ml)	不問	10 ^{7.6} ≤	10 ^{7.6} >	10 ⁵ ≤	10 ⁵ >	不問
ALT	持続正常	持続正常以外	持続正常以外	不問	不問	不問
年齢	不問	若年/高年 (I a/I b)*	若年/高年 (II a/II b)*	不問	不問	不問
発癌リスク	きわめて小	小/大	小/きわめて大	きわめて大	きわめて小	きわめて小
治療	不要	F2 以上 IFN/エンテカビル	IFN/エンテカビル	エンテカビル	不要	不要

* : 若年は男性 30 歳未満, 女性 35 歳未満, 高年は男性 30 歳以上, 女性 35 歳以上.

** : HBs 抗原 (+) の時期が確認されていること.

ステージ III, IV は, HBe 抗原陰性期でステージ III は HBV-DNA 5.0 log copies/ml 以上, ステージ IV は HBV-DNA 5.0 log copies/ml 未満例である. ステージ IV はいわゆる臨床的治癒の状態でおおむね抗ウイルス治療の必要はないが, ステージ III はもともと発癌リスク(「サイドメモ」参照)の高い集団であり, 速やかな治療介入が必要となる. ステージ III で核酸アナログ剤が使用困難な場合, IFN の保険適用がないので, 現在もともと対応に苦慮することが多く, 一刻も早い Peg-IFN の保険適用が望まれる.

これまでのIFN治療成績

わが国の IFN 1 カ月投与成績のまとめ³⁾によると, 投与終了 1 年後, 2 年後の HBe 抗原陰性化率はそれぞれ 29%, 55%, HBe 抗原抗体セロコンバージョン率は 12%, 29% で, 自然経過よりも高率であるとしている. また, 1 カ月投与と 6 カ月投与の国内治療成績の集計³⁾では, 投与終了 6 カ月後の HBe 抗原陰性化率は 4 週投与, 24 週投与でそれぞれ 11%, 28% と長期投与の有効性が確認されている. 1 カ月投与に対する 6 カ月投与の最大の利点は投与期間中に HBe 抗原抗体セロコン

バージョンが生じる可能性が高く, 投与終了後の急性増悪の出現を防止できることである. 欧米でも 6 カ月投与が標準投与方法であるが, Wong ら⁴⁾の

サイドメモ

B型慢性肝炎の肝癌発癌リスク

B 型慢性肝炎例は 50 歳ぐらいまでに, 約 90% が HBe(e) 抗原陽性から e 抗体陽性にセロコンバージョンする. したがって, 高齢者はほとんどの症例が e 抗体陽性の状態である. まだ, e 抗原陽性例が多い 50 歳前後までの肝癌発癌例は, e 抗原陽性例のほうが e 抗原陰性例に比べ有意に高率である. 高齢者では e 抗原陽性例の絶対数が少なく, 発癌例は e 抗体陽性が多数を占める. e 抗体陽性例の発癌は HBV-DNA 量と明らかな関連があり, 4.0~5.0 log copies/ml 以上群は高率に発癌し, それ未満ではきわめて低率であることが明らかになっている. HBV キャリア全体の肝癌発癌リスクは e 抗原持続陽性例, e 抗原陰性 HBV-DNA 高値持続群, e 抗原陰性 HBV-DNA 出沒群の順に高く, e 抗原陰性 HBV-DNA 持続低値になってようやく, 低リスクになると考えられる. HBV-DNA 量の定期的なモニタリングがきわめて重要である.

比較対照試験の集計でも投与終了後6カ月の時点でのHBe抗原陰性化率33%と、自然経過例12%に比べ有意に高率であったとしている。

欧米におけるPeg-IFNおよび

IFN・多剤併用治療成績

Marcellinら⁵⁾は、HBe抗原陰性例に対しPeg-IFN- α 2a単独、ラミブジン(LAM)単独およびPeg-IFN- α 2a・LAM併用群の無作為比較試験(RCT)を行い、Peg-IFN- α 2a単独、Peg-IFN- α 2a・LAM併用群はLAM単独群に比べ、有意にHBV-DNA抑制率が高率であったと報告している。また、Lauら⁶⁾はHBe抗原陽性例に対して同様の検討を行い、Peg-IFN- α 2a群はLAM単独群に比べ有意にHBe抗原陰性化率、HBV-DNA抑制率およびHBs抗原陰性化率が高率で、Peg-IFN- α 2aの有用性を認めている。

Peg-IFN- α 2bについても良好な報告がなされている。すなわち、Janssenら⁷⁾はHBe抗原陽性例に対してPeg-IFN- α 2b単独群とPeg-IFN- α 2b・LAM併用群とのRCTを行い、Peg-IFN- α 2b単独群において投与終了後26週後のHBe抗原陰性化率が36%と良好であり、これは併用群35%に劣っていないことを報告した。また、Chanら⁸⁾はPeg-IFN- α 2b・LAM併用群とLAM単独群とのRCTにて併用群が単独群に比べ、良好なvirological responseが得られ、変異株出現も低率であったとしている。さらに投与3年後においても、併用群は単独群に比べvirological responseを維持すると報告した⁹⁾。Flinkら¹⁰⁾は、標準的なIFNやLAMによる治療が無効であったHBe抗原陽性例に対してPeg-IFN- α 2b単独治療を行い、約1/3の症例で投与終了後26週の時点でHBe抗原の消失を認めている。一方、YMDD変異株出現例に対するPeg-IFN- α 2bの有効性については明らかな見解は示されていない¹¹⁾。アデフォビルとの併用についてはWursthornら¹²⁾がPeg-IFN- α 2bとアデフォビルとの併用によって、HBs抗原の減少を伴う著明なHBV-DNA量と肝内cccDNA量の低下を認めたと報告している。

IFN治療の適応と今後の展望

1986年より母児感染予防事業が施行されて、わが国のHBVキャリア率は激減した。しかし、20歳以上のキャリアはいまだ多数存在し、自然経過で臨床的治癒の状態に至らずに、肝硬変、肝細胞癌に進行する例も存在することはさきに述べた。これらの症例のうち、本人あるいはパートナーが妊娠、出産を望んでいる場合は男女の差なく核酸アナログ剤は使用できない。IFN治療の適応はまさにこれらの症例であり、30~35歳までの若年の間の、HBe抗原からHBe抗体へのセロコンバージョンとHBV-DNA増殖の沈静化が目的となる。これまでの国内外での検討より、効果が期待できる治療前因子として女性、HBV-RNA量低値、投与前ALT高値および組織診断でactivityの高い症例があげられている。とくに、20歳代の女性の治療効果はきわめて良好であるが、女性は妊娠・出産を機に病態が安定化することが多く、IFNを含む抗ウイルス治療介入には慎重を期する必要がある。一方、男性では若年発癌も含めて、B型肝炎細胞癌発癌のリスクは有意に高く、若年でも肝線維化F2以上では積極的にIFN治療を導入する必要があると考えている。

現在、HBe抗原陽性例のみが保険適用であるが、6カ月の長期投与でも十分満足できる成績は得られていない。IFN製剤の投与期間制限がC型慢性肝炎と同様に撤廃されれば、IFN治療の有用性は大きく向上すると考えられるが、現在その動きはない。Peg-IFNの効果は前述のとおり良好であり、現在、Peg-IFN- α 2aの治療が開始されたところであるが、HBe抗原陰性例や48週までの投与期間がデザインされており、より早期の認可が強く望まれる。

文献

- 1) Chen, C. J. et al.: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, **295**: 65-73, 2006.
- 2) 加藤道夫・他: HBVマーカーと発癌リスクよりみたHBVキャリアのステージ分類—適切な抗ウイルス治療の選択に向けて。 *肝臓*, **45**: 581-588, 2004.
- 3) 西口修平: IFN治療。コンセンサス肝疾患2002—診断・治療と病態“B型肝炎治療”(矢野右人監)。日本メディカルセンター, 2002, pp.71-77.

- 4) Wong, D. K. et al. : Effect of α -interferon treatment in patients with hepatitis Be antigen-positive chronic hepatitis B : A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, **119** : 312-323, 1993.
- 5) Marcellin, P. et al. : Peginterferon α -2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*, **351** : 1206-1217, 2004.
- 6) Lau, G. K. K. et al. : Peginterferon α -2a, lamivudine and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*, **352** : 2682-2695, 2005.
- 7) Janssen, H. L. A. et al. : Pegylated interferon α -2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B : a randomised trial. *Lancet*, **365** : 123-129, 2005.
- 8) Chan, H. L. Y. et al. : A randomised, controlled therapy for chronic hepatitis B : comparing pegylated interferon α -2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann. Intern. Med.*, **142** : 240-250, 2005.
- 9) Chan, H. L. Y. et al. : Long-term follow-up of peginterferon and lamivudine combination treatment in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology*, **41** : 1357-1364, 2005.
- 10) Flink, H. J. et al. : Successful treatment with pegylated interferon α -2b of HBeAg-positive HBV non-responders to standard interferon or lamivudine. *Am. J. Gastroenterol.*, **101** : 2523-2529, 2006.
- 11) Leemans, W. F. et al. : The effect of pegylated interferon α on the treatment of lamivudine resistant chronic HBeAg positive hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, **44** : 507-511, 2006.
- 12) Wursthorn, K. et al. : Peginterferon α -2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, **44** : 675-684, 2006.

Comparison of complete sequences of hepatitis B virus genotype C between inactive carriers and hepatocellular carcinoma patients before and after seroconversion

KIYOAKI ITO^{1,2}, YASUHIRO TANAKA¹, MICHIO KATO³, KEI FUJIWARA^{1,2}, FUMINAKA SUGAUCHI², TOMOYUKI SAKAMOTO^{1,2}, NOBORU SHINKAI^{1,2}, ETSURO ORITO², and MASASHI MIZOKAMI¹

¹ Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1Kawasumi, Mizuho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

² Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

³ National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka, Japan

Background. Most patients who acquire chronic hepatitis B virus (HBV) infection by perinatal transmission become inactive carriers (IC) after hepatitis B e (HBe) antigen seroconversion, whereas some patients have persistent abnormal serum transaminase levels and develop hepatocellular carcinoma (HCC) in the anti-HBe-positive phase. The aim of this study was to investigate the HCC-related mutations of HBV. **Methods.** Complete sequences of HBV were examined among eight IC and eight HCC patients infected with HBV genotype C before and after seroconversion. **Results.** The frequency of the T1653 mutation tended to be higher among HCC patients after seroconversion (16.7% vs. 62.5%; $P = 0.086$). The prevalence of a basal core promoter double mutation (T1762/A1764) was high among both IC and HCC patients after seroconversion (83.3% vs. 87.5%; $P = 0.825$). Among the HCC patients, a pre-S deletion mutant was detected in 62.5% patients before seroconversion, and in 37.5% patients after seroconversion. The core deletion mutant was also detected in 50% of HCC patients only before seroconversion. Deletion mutants of the pre-S or core region before seroconversion were significantly associated with HCC patients (0% vs. 62.5%; $P = 0.007$, 0% vs. 50%; $P = 0.021$, respectively). **Conclusions.** Our data showed a significant association of pre-S and core deletion mutants before seroconversion with HCC development. The T1653 mutation after seroconversion was frequently found in HCC patients infected with HBV genotype C. These results suggest that mutations may be predictive factor for development of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma, core deletion, pre-S deletion mutant, T1653 mutation

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer and the third leading cause of cancer-related death in the world, with an estimated annual prevalence of >500000 cases worldwide.¹ It is now accepted that HBV infection has hepatocarcinogenic potential in humans. Several mutations in the HBV genome have been reported to occur during the course of persistent viral infection, and there is increasing evidence of an association between these molecular alterations and the development of end-stage liver disease in patients with HBV infection.^{2–6} Nevertheless, it is still unclear whether a specific mutation or a specific combination of mutations is associated with the development of severe disease, because previous studies focused on only a few mutations such as pre-S deletion, basal core promoter (BCP) double mutation, and precore (PC) mutation. Recently, several lines of evidence have indicated that complex HBV variants with deletions in the pre-S or core region and mutations in the enhancer II region are associated with end-stage liver disease.^{7–9} Both the pre-S and core regions play an essential role in the interaction with immune responses because they contain B- and T-cell epitopes.^{10–12} Pre-S and core deletion mutants with altered epitopes may survive despite the host immune system.

During persistent HBV infection, carriers frequently undergo seroconversion from hepatitis B e antigen (HBeAg) to the corresponding antibody (anti-HBe). Most patients who acquire chronic HBV infection with HBV genotype C (which is the common genotype in East Asian countries) by perinatal transmission become inactive carriers (IC) after seroconversion. A subgroup of patients have persistent abnormal serum transaminase levels and develop HCC in the anti-HBe-positive phase. Because most previous studies examined only a serum sample collected at one time point in each patient,

Received: February 14, 2007 / Accepted: July 31, 2007

Reprint requests to: M. Mizokami

that is, they were cross-sectional studies, the association between different clinical events after seroconversion and specific HBV genomic mutations has not been clearly defined. To investigate this issue, complete HBV sequences were examined in eight IC and eight HCC patients before and after HBeAg seroconversion.

Materials and methods

Serum samples

Serum samples were obtained from 16 patients (eight patients were IC and the other eight were HCC patients) at the Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences and National Hospital Organization Osaka National Hospital before and after seroconversion. Sixteen patients were infected with HBV genotype C. IC were defined as individuals who were hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive with normal alanine aminotransferase (ALT) and α -fetoprotein levels over a 5-year period (with at least 12 evaluations at 3-month intervals) and without the presence of portal hypertension. HCC patients were diagnosed on the basis of results of abdominal ultrasonography, angiography, computed tomography, magnetic resonance imaging, or liver biopsy as well as by their having an elevated serum α -fetoprotein level (>400 ng/ml).

HBV Genotyping

HBV genotypes were determined by the restriction fragment length polymorphism method from the *S* gene sequence amplified by polymerase chain reaction (PCR)¹³ or enzyme immunoassay (EIA) with monoclonal antibodies for distinct epitopes in the pre-S2 region products,¹⁴ with commercial kits (HBV genotype EIA; Institute of Immunology, Tokyo, Japan). The genotypes were also confirmed by a phylogenetic tree analysis.

HBV DNA extraction

Serum samples were stored at -80°C until the assay. DNA was extracted from 100 μl of serum by using QIAamp DNA blood kits (Qiagen, Hilden, Germany).

Determination of the complete nucleotide sequences of HBV/C

The complete nucleotide sequences of 30 HBV/C isolates from 16 patients (HBV DNA in two serum samples from IC after seroconversion could not be amplified) were determined by a method reported previously¹⁵ with a slight modification. In brief, two overlapping fragments of HBV genome were amplified by PCR, and

eight overlapping HBV DNA fragments were amplified further by PCR with nested primers. Amplification was performed in a 96-well cycler (GeneAMP9600; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CA, USA), and the PCR products were electrophoresed in 3.0% (wt/vol) agarose, stained with ethidium bromide, and observed under UV light.³ Standard precautions were taken to avoid contamination during PCR. A negative control serum was also processed and included in each run to ensure specificity. Twelve overlapping HBV DNA fragments thus amplified were sequenced directly with a Prism BigDye kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI 3100 DNA automated sequencer.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with χ -squared and Fisher's exact tests for categorical variables. The Mann-Whitney *U* test was used for continuous variables, as appropriate. Differences were considered to be significant with *P* values <0.05. The statistical analysis software used was Stata software, version 8.0 (Statacorp LP, College Station, TX, USA).

Results

Table 1 compares age, ALT level, platelet count, HBV DNA, and rate of cirrhosis before and after HBeAg seroconversion, as well as age at seroconversion and the intervals between two sampling points for all patients. ALT level, platelet count, HBV DNA, and rate of cirrhosis after seroconversion were significantly higher among HCC patients than in IC.

The alignment of sequences covering the enhancer II and core promoter regions is shown in Fig. 1. We could not amplify HBV DNA in two serum samples from IC because of the small amount of HBV DNA in the samples. The box alpha and basal core promoter contained mutational hot spots, but box beta did not. The frequency of the T1653 mutation tended to be higher among HCC patients after seroconversion [IC vs. HCC: 1/6 (16.7%) vs. 5/8 (62.5%); *P* = 0.086] (Fig. 1 and Table 2), whereas the T1653 mutation did not differ between the two groups before seroconversion [IC vs. HCC: 1/8 (12.5%) vs. 2/8 (25%); *P* = 0.522]. The prevalence of the BCP double mutation was high among both IC and HCC patients after seroconversion [IC vs. HCC: 5/6 (83.3%) vs. 7/8 (87.5%); *P* = 0.825]. The prevalence of S1753 was low among IC and HCC patients before and after seroconversion (Fig. 1 and Table 2). The S1753 mutant was not recognized in the patients who were infected with the T1653 mutation clone. Deletion mutants of the core or pre-S region before seroconversion were significantly associated with HCC patients

Table 1. Comparison of clinical characteristics between IC and HCC patients before and after HBeAg seroconversion

Features	Before seroconversion			After seroconversion		
	Inactive carriers (n = 8)	HCC patients (n = 8)	Differences P value	Inactive carriers (n = 8)	HCC patients (n = 8)	Differences P value
Male, n (%)				4 (50)	7 (87.5)	0.106
Age (years) ^a	31.8 ± 8.4	40.0 ± 10.6	0.246	43.6 ± 10.0	51.6 ± 13.8	0.317
ALT (U/L) ^a	199.6 ± 220.5	234.6 ± 242.2	0.875	20.3 ± 7.2	40.4 ± 16.9	0.009*
Platelet count (×10 ⁴ /mm ³) ^a	17.5 ± 2.0	15.1 ± 4.3	0.268	17.5 ± 3.3	11.5 ± 5.4	0.027*
HBV DNA (LGE/ml) ^a	7.2 ± 0.5	7.2 ± 0.5	0.869	4.3 ± 0.7	5.7 ± 1.2	0.022*
Cirrhosis (%)	0 (0)	2 (25)	0.131	0 (0)	5 (62.5)	0.007*
Age at seroconversion (years)				37.8 ± 8.1	47.3 ± 14.2	0.226
Intervals between two sampling points (years)				11.8 ± 2.9	11.6 ± 4.4	1.0

IC, inactive carriers; HCC, hepatocellular carcinoma; HBeAg, hepatitis B e antigen; ALT, alanine aminotransferase; HBV, hepatitis B virus; LGE, log genome equivalents

* Statistically significant

^a Mean ± SD

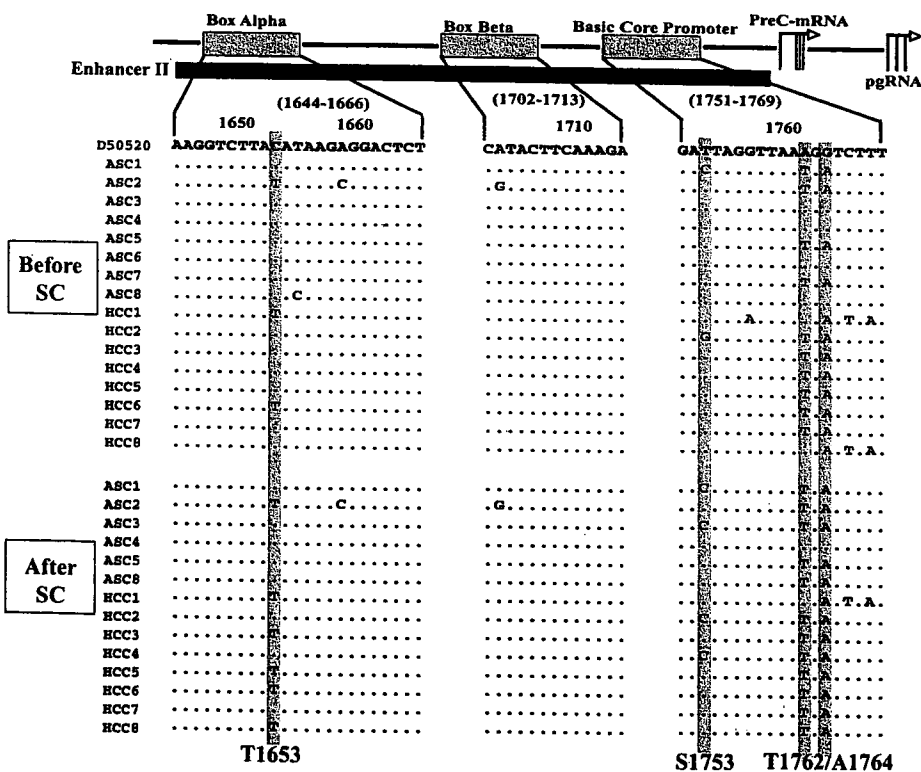


Fig. 1. Nucleotide sequences that cover enhancer II and core promoter regions in inactive carriers (IC) and hepatocellular carcinoma (HCC) patients. The wild-type sequence for genotype C is represented by D50520. Dots indicate nucleotides identical to the wild type. SC, seroconversion

(core deletion mutant: 0/8 [0%] vs. 4/8 [50%]; $P = 0.021$, pre-S deletion mutant 0/8 [0%] vs. 5/8 [62.5%]; $P = 0.007$, respectively) (Table 2).

The pre-S deletion mutant was detected in only one IC as a minor clone (Fig. 2), whereas among HCC patients, deletion mutants (major clones) were detected in five of eight (62.5%) patients before seroconversion, and in three of eight (37.5%) after seroconversion. Only two patients (patients 4 and 5) had pre-S deletion

mutants before and after seroconversion. Two HCC patients (patients 1 and 2) had pre-S deletion mutants only before seroconversion (Fig. 3). Three HCC patients (patients 4–6) before seroconversion and one patient (No. 7) after seroconversion were coinfecting with wild-type virus and pre-S deletion mutants (the deletion mutants were the major clones). Most deletions were identified in the 3' terminus of the pre-S1 region and the 5' terminus of the pre-S2 region.

Table 2. Comparison of HBV mutations between IC and HCC patients before and after HBeAg seroconversion

Features	Before seroconversion			After seroconversion		
	Inactive carriers (n = 8) n (%)	HCC patients (n = 8) n (%)	Differences P Value	Inactive carriers (n = 8) n (%)	HCC patients (n = 8) n (%)	Differences P Value
T1653 mutation	1 (12.5)	2 (25)	0.522	1/6 (16.7)	5/8 (62.5)	0.086
S1753 mutation	1 (12.5)	1 (12.5)	1.0	2/6 (33.3)	2/8 (25)	0.730
A1896 mutation	3 (37.5)	0 (0)	0.055	4/6 (66.7)	3/8 (37.5)	0.280
BCP double mutation	4 (50)	7 (87.5)	0.106	4/6 (66.7)	7/8 (87.5)	0.325
Core deletion Mutant	0 (0)	4 (50)	0.021*	0/6 (0)	0/8 (0)	1.0
Pre-S deletion Mutant	0 (0)	5 (62.5)	0.007*	1/8 (12.5)	3/8 (37.5)	0.248

BCP, basal core promoter
*Statistically significant

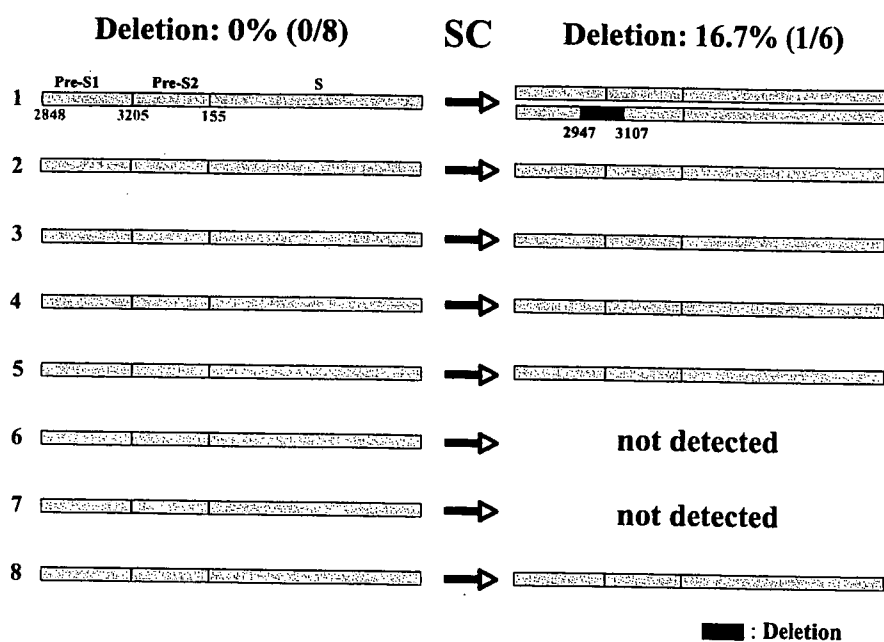


Fig. 2. Pre-S region deletion mutant in IC. The nucleotide sequences of the pre-S1, preS-2 and S are shown as bars. Shading of a bar indicates a deletion region. A pre-S deletion mutant was detected in only one IC after seroconversion as a minor clone (the lower bar shows the minor clone)

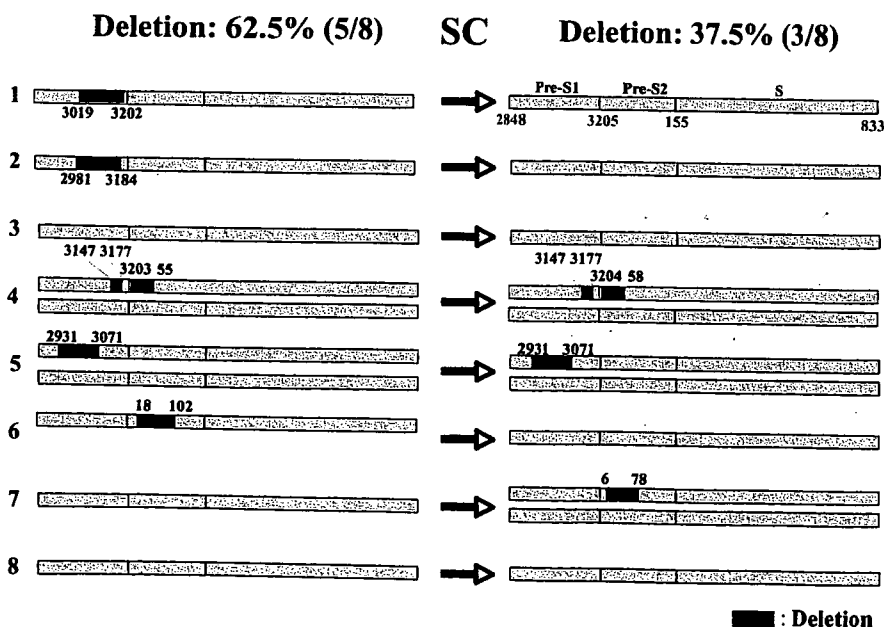


Fig. 3. The pre-S region deletion mutant in HCC patients. Pre-S deletion mutants were identified in five of eight (62.5%) HCC patients before seroconversion as a major clone (upper bars show major clones). Three of five deletion mutants before seroconversion were undetectable after seroconversion. Deletions were often in the C terminus of the pre-S1 domain and in the N terminus of the pre-S2 domain

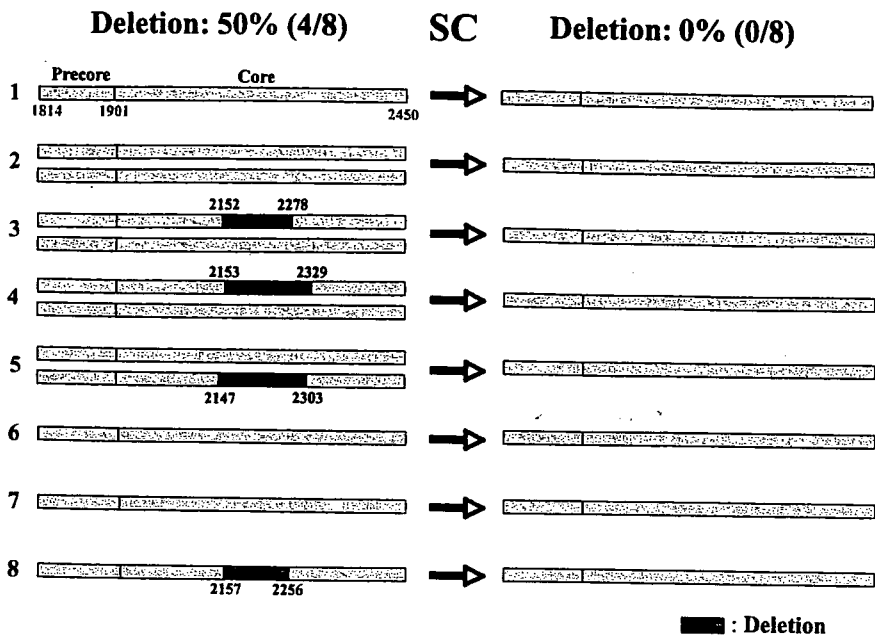


Fig. 4. Precore core region deletion mutant in HCC patients. The nucleotide sequences of precore and core are shown as bars. Core deletion mutants were identified in four of eight (50%) patients, only before seroconversion. All core deletion mutants around the center of the core domain were undetectable after seroconversion

Table 3. Clinical and virological characteristics among IC with HBV genotype C

Patient	Sex	Status of SC	Age (Years)	T1653 mutation	S1753 mutation	A1896 mutation	BCP double mutation	Core deletion mutant	Pre-S deletion mutant
1	M	Before	36	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
		After	45	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
2	M	Before	41	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
		After	55	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	M	Before	31	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
		After	46	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	M	Before	24	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		After	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	M	Before	28	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
		After	35	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
6	M	Before	41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		After	56	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
7	M	Before	36	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
		After	49	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
8	F	Before	17		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		After	29		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

SC, seroconversion

Figure 4 shows the deletion mutants in the precore/core region among HCC patients. Core deletion mutants were detected in four patients with HCC only before seroconversion. Core deletion mutants were identified around the center of the core region in these four patients. Three HCC patients (patients 3–5) before seroconversion were coinfecting with wild-type virus and core deletion mutants. One HCC patient (patient 8) before seroconversion was infected with only the core deletion mutant.

Table 3 summarizes the virological characteristics of IC. We could not amplify HBV DNA in two serum

samples of IC after seroconversion. No IC was infected with the core deletion mutant. The pre-S deletion mutant was identified in only one IC after seroconversion. BCP double mutations and A1896 mutations were identified in four of six (66.7%) IC after seroconversion. Table 4 shows the virological characteristics of HCC patients. The T1653 mutation was negatively correlated with the S1753 mutation in this population. The prevalence of T1762/A1764 was high in HCC patients. Of interest, a core or pre-S deletion mutant was detected in seven of eight (87.5%) HCC patients before seroconversion.

Table 4. Clinical and virological characteristics of HCC patients with HBV genotype C

Patient	Sex	Status of SC	Age (years)	T1653 mutation	S1753 mutation	A1896 mutation	BCP double mutation	Core deletion mutant	Pre-S deletion mutant
1	M	Before	40	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
		After	56	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
2	M	Before	31	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
		After	38	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
3	M	Before	38	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
		After	54	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	M	Before	55	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
		After	72	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
5	M	Before	28	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
		After	34	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
6	M	Before	36	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
		After	44	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
7	M	Before	35	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
		After	46	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
8	F	Before	57	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
		After	69	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

Discussion

Many previous studies have reported that the clinical course of chronic HBV infection may be modified by several specific viral mutations,^{6,16-19} but most studies examined only serum samples collected from each patient at one time point. In this study, we compared viral mutations in IC and HCC patients before and after HBeAg seroconversion. ALT, HBV DNA levels, and rate of cirrhosis were significantly higher among the HCC patients than among IC only after seroconversion. Platelet count was lower among HCC patients than among IC only after seroconversion. Interestingly, even though clinical characteristics did not differ before seroconversion, deletion mutants of the core or pre-S region were significantly more associated with HCC patients than with IC. Core deletion mutants detected before seroconversion become undetectable in serum samples derived from the same patients after seroconversion. As well, pre-S deletion mutants were undetectable in three patients after seroconversion. However, the core and pre-S deletions being undetectable after seroconversion by direct sequencing does not exclude the possibility that they remained as minor clones. Preikschat et al.,⁹ who sequenced cloned HBV genomes, reported the existence of deletion mutants as only minor clones; deletions and insertions in core promoter/enhancer II regions, deletions in the C gene, or deletions in the pre-S region were distributed on individual genomes in various combinations. Although it is unclear why major deletion mutants decreased after seroconversion, both core and pre-S deletion mutants may be predictive factors for HCC at an early stage in chronic HBV carriers.

Recently, Chen et al.⁷ reported that combinations of HBV mutations (deletion in the pre-S region and/or mutations in the BCP and/or PC regions) were strongly associated with liver disease progression; a combination of mutations rather than a single mutation was associated with the development of progressive liver diseases, and pre-S deletion and BCP mutations in particular were significantly associated with the development of progressive liver diseases. In the present study, BCP mutation was identified frequently in HCC patients but also frequently in IC. The combination of a pre-S deletion with other mutants was not significantly associated with the development of HCC, owing to the small sample size in this study.

In our previous case-control study, a BCP double mutation was frequently found in each clinical group (40 IC, 40 chronic hepatitis, and 40 HCC patients), but the frequency of the T1653 mutation was significantly higher among HCC patients than among IC.²⁰ In this study, the T1653 mutation was identified in five of eight (62.5%) HCC patients after seroconversion and in only one of six (16.7%) IC after seroconversion, suggesting that the T1653 mutation is one of the factors promoting HCC development. However, the combination of pre-S or core deletion mutants with the T1653 mutation was not significantly associated with HCC development.

Both pre-S and core regions play an essential role in the immune response interaction because they contain B- and T-cell epitopes. Pre-S deletion and core deletion mutants thus allow escape from the host's immune function. In this study, most pre-S and core deletion regions in the HCC group encompassed B- and T-cell epitopes: most of the pre-S deletions in the 3'-terminus of the pre-S1 region and the 5'-terminus of the pre-S2 region

in HCC patients, and all of the core deletions around the center of the core region in HCC patients. These pre-S and core deletion sites including B- and T-cell epitopes²¹⁻²⁵ were consistent with those reported in previous papers describing patients infected with pre-S and core deletion mutants.^{7,26-28}

Previous studies have shown that pre-S deletion mutants tend to accumulate at the later stage of HBV infection^{3,4,29,30} and have demonstrated a marked decrease in the synthesis and secretion of small surface protein leading to retention of envelope protein and viral particles within hepatocytes, resulting in the ground-glass appearance of hepatocytes.⁴ Recently, Hsieh et al.³¹ identified two types of ground-glass hepatocytes containing two types of mutant L proteins with deletion within the pre-S1 and pre-S2 regions, respectively. They found that these pre-S deletion mutants accumulate in the endoplasmic reticulum (ER), resulting in strong ER stress. They concluded that the pre-S mutation causes ground-glass hepatocytes to induce oxidative DNA damage and mutations in hepatocytes in the late stages of HBV infection.

Yuan et al.²⁸ described the characteristics of a core deletion mutant: (1) Deletion often occurs within core amino acids 80 to 120. It does not usually extend into the partially overlapping polymerase. (2) The exact end points and sizes of deletions vary from variant to variant. (3) Deletions appear to be more often in frame than out of frame. (4) Internal deletions coincide with a potent T-cell epitope, suggesting an immune system escape function for this mutation. In the present study, the features of the core deletion mutant were mostly consistent with these characteristics.

In conclusion, our data showed a significant association of pre-S deletion and core deletion mutants before seroconversion with HCC development. The T1653 mutation after seroconversion was frequently found in HCC patients infected with HBV genotype C. These results suggest that these mutations may be a predictive factor for HCC development.

Acknowledgments. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research C from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (18590741), a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Toyoaki Foundation, and Foundation for Promotion of Cancer Center in Japan.

References

- Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004;23:6329-40.
- Naoumov NV, Schneider R, Grotzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR, et al. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1992;102:538-43.
- Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol* 2003;70:537-44.
- Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, et al. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology* 2001;33:277-86.
- Huy TT, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 2003;41:5449-55.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-34.
- Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130:1153-68.
- Marschenz S, Endres AS, Brinckmann A, Heise T, Kristiansen G, Nurnberg P, et al. Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2006;131:765-80.
- Preikschat P, Gunther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, et al. Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology* 2002;35:466-77.
- Ferrari C, Cavalli A, Penna A, Valli A, Bertolotti A, Pedretti G, et al. Fine specificity of the human T-cell response to the hepatitis B virus preS1 antigen. *Gastroenterology* 1992;103:255-63.
- Kuroki K, Floreani M, Mimms LT, Ganem D. Epitope mapping of the PreS1 domain of the hepatitis B virus large surface protein. *Virology* 1990;176:620-4.
- Milich DR, McLachlan A, Moriarty A, Thornton GB. Immune response to hepatitis B virus core antigen (HBcAg): localization of T cell recognition sites within HBcAg/HBeAg. *J Immunol* 1987;139:1223-31.
- Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999;450:66-71.
- Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, Kidd-Ljunggren K, Holland PV, Miyakawa Y, et al. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. *J Virol Methods* 2000;87:81-9.
- Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, et al. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2001;82:883-92.
- Lin CL, Liao LY, Wang CS, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, et al. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Liver Int* 2005;25:564-70.
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 2003;38:619-28.
- Kajijiya Y, Hamasaki K, Nakata K, Nakagawa Y, Miyazoe S, Takeda Y, et al. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. *J Viral Hepat* 2002;9:149-56.
- Chu CM, Yeh CT, Lee CS, Sheen IS, Liaw YF. Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-anti-HBe seroconversion. *J Clin Microbiol* 2002;40:16-21.
- Ito K, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Fujiwara K, Sugauchi F, et al. T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *Clin Infect Dis* 2006;42:1-7.

21. Maeng CY, Ryu CJ, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ. Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1. *Virology* 2000;270:9-16.
22. Penna A, Bertoletti A, Cavalli A, Valli A, Missale G, Pilli M, et al. Fine specificity of the human T cell response to hepatitis B virus core antigen. *Arch Virol Suppl* 1992;4:23-8.
23. Park JH, Cho EW, Lee YJ, Shin SY, Kim KL. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiol Immunol* 2000;44:703-10.
24. Jung MC, Diepolder HM, Spengler U, Wierenga EA, Zachoval R, Hoffmann RM, et al. Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection. *J Virol* 1995;69:3358-68.
25. Tsai SL, Chen MH, Yeh CT, Chu CM, Lin AN, Chiou FH, et al. Purification and characterization of a naturally processed hepatitis B virus peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 1996;97:577-84.
26. Wakita T, Kakumu S, Shibata M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T, et al. Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991;88:1793-801.
27. Akarca US, Lok AS. Naturally occurring core-gene-defective hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 1995;76 (Pt 7):1821-6.
28. Yuan TT, Lin MH, Qiu SM, Shih C. Functional characterization of naturally occurring variants of human hepatitis B virus containing the core internal deletion mutation. *J Virol* 1998;72:2168-76.
29. Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology* 2002;292:44-58.
30. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsu-moto S, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1994;68:2671-6.
31. Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Chang WW, Lei HY, Lai MD, et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* 2004;25:2023-32.

K. Ito et al.: Sequences of HBV/C between IC and HCC



HCV RNA 定量キット

コバス TaqMan HCV「オート」の検討

—TaqMan HCV「オート」に関する共同研究：中間報告—

熊田 博光¹⁾・豊田 成司²⁾・泉 並木³⁾
 岡上 武⁴⁾・伊藤 義人⁵⁾・加藤 道夫⁶⁾
 飯野 四郎⁷⁾

要 旨

リアルタイム PCR 法の一つである TaqMan PCR 法を増幅・検出原理とする HCV RNA 定量キット、コバス TaqMan HCV「オート」(以下、TaqMan HCV)に関する検討を行った。その結果、TaqMan HCV は、既存 HCV RNA 定量測定法と良好な相関を示し、治療ガイドラインで低/高ウイルス量の境界となる 5.0 Log IU/mL [100 K IU/mL] 付近でほぼ 1 対 1 の相関を示したことにより、TaqMan HCV も同一の基準で判断してよいと考えられた。また、治療中のウイルス量推移パターンも既存 HCV RNA 定量測定法と近似する挙動を示し、さらに長期間の観察が可能であったことが確認され、治療中の経過観察に応用できると考えられた。一方、既存 HCV RNA 定性法と比較したところ、TaqMan HCV のほうが高感度であることが示され、TaqMan HCV で測定を行うことにより、再燃例を低減することが期待できると考えられた。

また、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療法における治療効果予測について TaqMan HCV を用いて検討した結果、HCV dynamics の解析が有効であることが示唆された。

1) 虎の門病院肝臓センター 2) 札幌厚生病院消化器科 3) 武蔵野赤十字病院消化器科 4) 大阪府済生会吹田病院 5) 京都府立医科大学消化器内科学 6) 独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター消化器科 7) 静山会 清川病院肝臓病センター

Evaluation of HCV RNA measurement kit COBAS® TaqMan® HCV「AUTO」—Cooperative study : Interim report

Hiromitsu Kumada *Department of Hepatology, Toranomon Hospital*

Joji Toyota *Division of Gastroenterology, Sapporo Kosei Hospital*

Namiki Izumi *Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital*

Takeshi Okanoue *Osaka Saiseikai Suita Hospital*

Yoshito Itoh *Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine*

Michio Kato *Department of Gastroenterology, National Hospital Organization, Osaka National Hospital*

Shiro Iino *Center for Liver Diseases, Seizankai Kiyokawa Hospital*

Key words : HCV RNA, アンプリコア, TaqMan, リアルタイム PCR

Table 1 採血ポイントと測定項目

採血ポイント	TaqMan HCV 「オート」	アンプリコア 定量	アンプリコア 定性
1. 投与前 [開始前2週以内] (Pre)	○	○	×
2. 投与開始3日目 (3D)	○	○	▲
3. 投与開始7日目 (7D)	○	○	▲
4. 投与開始2週目 (2W)	○	○	▲
5. 投与開始4週目 (4W)	○	○	▲
6. 投与開始8週目 (8W)	○	△	○
7. 投与開始12週目 (12W)	○	△	○
8. 投与開始24週目 (24W)	○	△	○
9. 投与開始48週目 (48W)*	○	△	○
10. 投与終了後6カ月目 (FU6M)	○	△	○

○：必ず測定

×：測定せず

▲：アンプリコア定量 測定下限未満の際に測定

△：アンプリコア定性 陽性の際に測定

*：Gt 2a/2b グループにおいては原則測定せず

はじめに

近年、C型慢性肝炎の原因治療としてリバビリン併用 PEG-IFN 療法が第一選択となり、genotype 1b かつ高ウイルス量症例に対するウイルス駆除率が格段に向上した。その中で HCV RNA 測定は、最適な治療方針や治療期間の決定・変更を判断するマーカーの一つとして、投与前の治療法の選択や投与中の治療効果モニタリングなどの場面で汎用されている¹⁾。

しかしながら、これまでの HCV RNA 測定法は検出感度や測定範囲の面で必ずしも臨床側の要望を十分に満たすものではなく、単位や報告値表現が異なる複数の定量測定法の使い分けを必要としたり、定量測定と定性測定を重複して用いなければならない場合があるなど不便を感じることも少なくない。また、投与終了後に再燃する ETR (end of treatment response) 症例を減らし SVR (sustained virological response) 率を向上させるためには、既存の HCV RNA 定性測定よりもさらに高感度な測定系の

登場が待たれるところである。

このような背景から、われわれは、高い検出感度と広い測定範囲を両立する新しい検査法コバス TaqMan HCV「オート」²⁾³⁾ (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) の基礎的性能を明らかにするとともに臨床的有用性を確認することを目的に、多施設共同による prospective study 形式で臨床評価を開始したので、今回その中間成績を報告する。

I. 対象および方法

1. 対象

平成 18 年 10 月より平成 19 年 4 月までの間に札幌厚生病院, 清川病院, 武蔵野赤十字病院, 虎の門病院, 京都府立医科大学病院, 独立行政法人国立病院機構 大阪医療センターにて、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療法を新規導入する高ウイルス量 (投与前 HCV RNA 量 100 K IU/mL 以上) の C 型慢性肝炎患者を対象とし、インフォームドコンセントを得られた 93 名について、Table 1 に設定されたポイントで採血

Table 2 測定結果の状態により4種の報告パターンがある。測定下限未満 (<1.2 Log IU/mL) となった場合でも、HCV RNA の検出を意味する“HCV 増幅反応シグナル”を検出した場合と検出しなかった場合に区別されて報告される。

	[結果報告例 ①]		[結果報告例 ②]	
	結 果	結 果	結 果	HCV 増幅 反応シグナル
測定範囲の上限を超えた場合	>7.8 Log IU/mL [>6.9×10 ⁷ IU/mL]	>7.8 Log IU/mL [>6.9×10 ⁷ IU/mL]	検 出	
測定範囲内で結果を得た場合	X.X Log IU/mL [X.X×10 ⁿ IU/mL]	X.X Log IU/mL [X.X×10 ⁿ IU/mL]	検 出	
測定範囲の下限未満であるがHCV 増幅反応シグナルは検出した場合	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	検 出	
HCV 増幅反応シグナルを検出しなかった場合	検出せず	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	検出せず	

を行った。採血には血清用真空採血管を用い、採血後6時間以内に遠心分離を行い、測定までの間は-80℃にて凍結保存した。

2. TaqMan HCV 測定法
(リアルタイムPCR法)⁴⁾

測定試薬はコバス TaqMan HCV「オート」を用い、核酸抽出工程は検体前処理装置コバス AmpliPrep、核酸増幅・検出工程は遺伝子解析装置コバス TaqMan、さらに両機を連結するドッキングステーションを用いて、添付文書および操作説明書に従って核酸抽出から増幅・検出まですべての工程を全自動で行った²⁾。測定には1.0 mLの血清を用いる。測定はロシュ・ダイアグノスティックス(東京)で実施した。なお、本法では、結果が測定下限未満となった際、定量値は得られないがHCV RNAを検出している場合は“<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL] 【検出】”，また、HCV RNAが検出されない場合は、【検出せず】と報告される (Table 2)。本法の測定範囲は1.2~7.8 Log IU/mL [15~6.9×10⁷ IU/mL] である。

3. 既存 HCV RNA 測定法

1) アンプリコア HCV 定量法

アンプリコア GT HCV モニター v2.0⁵⁾ (以下、アンプリコア定量:ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京)を用い、エスアールエル(東京)にて委託測定を行った。測定には300 μLの血清を用いるオリジナル法と生食で血清を10倍希釈した試料を300 μLを用いるハイレンジ法⁶⁾を併用し、ハイレンジ法の測定結果が測定下限未満であった場合にオリジナル法の測定結果を採用して集計を行った。それぞれの測定範囲は、ハイレンジ法:3.7~6.7 Log IU/mL [5 K~5,000 K IU/mL], オリジナル法:2.7~5.7 Log IU/mL [0.5 K~500 K IU/mL] である。

2) アンプリコア HCV 定性法

核酸抽出試薬であるアンプリキャップ GT HCV v2.0とアンプリコア HCV v2.0⁷⁾ (以下、アンプリコア定性:ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京)を用い、エスアールエル(東京)にて委託測定を行った。測定には350 μLの血清を用いる。本組み合わせによる検出感度は1.7 Log IU/mL [50 IU/mL] である。

Table 3 投与前患者背景をウイルス陰性化時期別に比較。性別・genotypeは χ^2 検定, 他はすべてt検定を実施した(項目によって測定されていない症例もあるため, n数に満たない場合もあり)。

	全体 (n=93)	4W (n=82)		p	12W (n=70)		p	24W (n=22)		p
	(平均)	RVR (平均)	non RVR (平均)		EVR (平均)	non EVR (平均)		LVR (平均)	non LVR (平均)	
性別 [男/女]	[48/45]	[5/4]	[36/37]	NS	[16/19]	[17/18]	NS	[3/7]	[6/6]	NS
年齢 (歳)	55.5	53.8	55.2	NS	52.3	58.7	NS	57.3	59.1	NS
体重 (kg)	59.1	56.5	59.6	NS	59.6	58.9	NS	55.2	58.6	NS
Genotype [1/2]	[75/18]	[1/8]	[63/10]	<0.001	[28/7]	[32/3]	NS	[10/0]	[12/0]	検定不可
AST (IU/L)	61	55	59	NS	58	61	NS	74	75	NS
ALT (IU/L)	75	84	73	NS	78	68	NS	75	88	NS
γ -GTP (IU/L)	58	37	59	NS	65	47	NS	46	55	NS
T-Bil (mg/dL)	0.8	0.7	0.8	NS	0.7	0.8	NS	0.7	0.9	NS
Alb (g/dL)	3.9	4.1	3.9	NS	4.0	3.8	NS	3.7	3.9	NS
T-Cho (mg/dL)	170	167	171	NS	176	166	NS	158	157	NS
WBC (/ μ L)	4,658	4,678	4,656	NS	4,797	4,489	NS	4,580	4,317	NS
好中球 (/ μ L)	2,357	2,462	2,358	NS	2,704	2,282	NS	2,038	1,939	NS
Hb (g/dL)	14.2	14.1	14.2	NS	14.3	14.0	NS	13.3	14.3	NS
Plt ($\times 10^4$ / μ L)	19.3	19.3	16.6	NS	18.2	15.2	NS	16.3	12.8	NS

4. 集計および統計処理

対象患者の genotype (serogroup) の内訳は, ① genotype 1a : 1 症例, ② genotype 1b : 61 症例, ③ genotype 1b+3a : 1 症例, ④ serogroup 1 : 12 症例, ⑤ genotype 2a : 9 症例, ⑥ genotype 2b : 8 症例, ⑦ serogroup 2 : 1 症例であり, ①~④を Gt 1a/1b グループ, ⑤~⑦を Gt 2a/2b グループとして集計を行った。

また, TaqMan HCV による測定にて投与前開始 4 週目までに【検出せず】となった群を「rapid viral response (以下, RVR)」, 【検出せず】とならなかった群を「non RVR」とし, 以下同様に 5 週目から 12 週目までに【検出せず】となった群を「early viral response (以下, EVR)」, 【検出せず】とならなかった群を「non EVR」に, また 13 週目から 24 週目までに【検出せず】となった群を「late viral response (以下, LVR)」, 【検出せず】とならなかった群を「non LVR」に

それぞれ群別して genotype グループごとに集計を行った。これら各群についての投与前背景因子を Table 3 に示す。

なお, 測定値の比較にはピアソンの相関係数の検定を, 各群の有意差検定においては, 性別および genotype は χ^2 検定, 他はすべて t 検定を用いた。

II. 成 績

1. アンプリコア定量との相関

症例登録された 93 症例において, 各採血ポイントにてアンプリコア定量 (ハイレンジ法またはオリジナル法) が測定された血清 558 例を用い, TaqMan HCV とアンプリコア定量がともに測定範囲内を示した 460 例において, 相関係数は $r=0.973$, 回帰式は $y=1.11x-0.36$ と良好な相関性を示した。また, Gt 1a/1b グループと Gt 2a/2b グループで TaqMan HCV とア

- ▲: アンプリコア定量で測定上限を超えたもの
- ◆: 両測定法とも定量範囲内だったもの
- : アンプリコア定量で測定下限未満であったもの
- ※ アンプリコア定量可能域で TaqMan HCV 「オート」で測定範囲外の例はなし

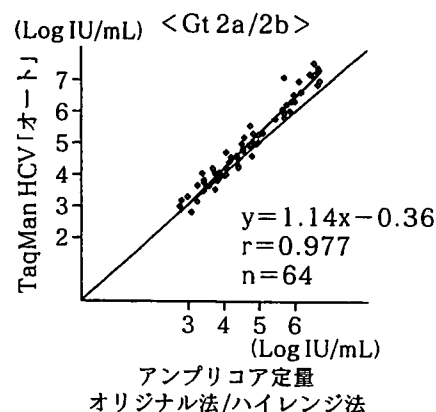
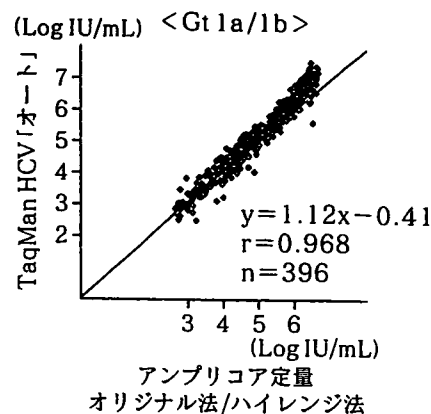
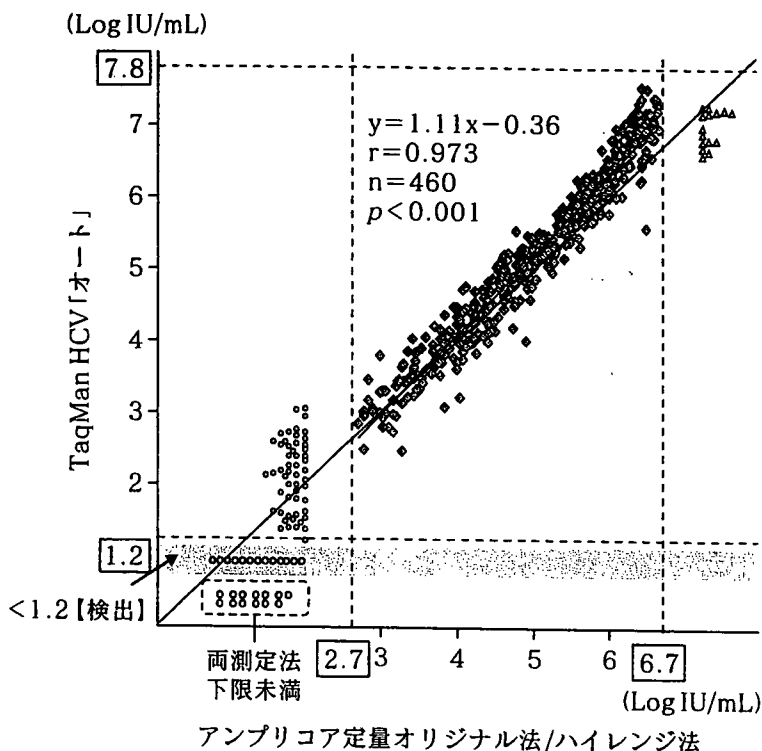


Fig. 1 Gt 1a/1b グループ, Gt 2a/2b グループの患者血清 558 例を用いた TaqMan HCV とアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法 (左) および genotype ごとに区別した場合 (右) の比較。破線は各測定法の測定範囲の上・下限を表す。なおアンプリコア定量のデータは、ハイレンジ法の測定結果が測定下限未満であった場合にオリジナル法の測定結果を採用し、集計した。

ンプリコア定量の相関性をそれぞれ検討したところ、Gt 1a/1b グループ 396 例における相関係数は $r=0.968$ 、回帰式は $y=1.12x-0.41$ 、Gt 2a/2b グループ 64 例における相関係数は $r=0.977$ 、回帰式は $y=1.14x-0.36$ であった。なお、アンプリコア定量 (ハイレンジ法) で測定上限を超えた 15 例はすべて TaqMan HCV では定量値を得られ、またアンプリコア定量 (オリジナル法) で測定下限未満であった 83 例中 69 例が TaqMan HCV で検出された。そのうち 56 例は TaqMan HCV で定量値を得られた (Fig. 1)。

2. アンプリコア定性との比較

症例登録された 93 症例においてアンプリコア定性が測定された 299 例中、TaqMan HCV

で“測定可能”または“ $<1.2 \text{ Log IU/mL}$ 【検出】”, アンプリコア定性で“陽性”と判定されたものが 163 例, TaqMan HCV で【検出せず】, アンプリコア定性で“陰性”と判定されたものが 105 例となり, 一致率は 89.6% であった。乖離した 31 例中 28 例は TaqMan HCV で“測定可能”または“ $<1.2 \text{ Log IU/mL}$ 【検出】”, アンプリコア定性で“陰性”であり, アンプリコア定性に比し TaqMan HCV が高感度であることが確認された (Table 4)。

3. 投与前ウイルス量と RVR, EVR, LVR 達成との関係

治療中止例および投与前検体の欠損例を除く 81 症例を対象とし, TaqMan HCV およびアンプリコア定量の投与前ウイルス量と RVR,

Table 4 (A) 患者血清 299 例における TaqMan HCV とアンプリコア定性との比較。一致率は 89.6% (268/299)。乖離例 31 例中, 28 例 (90%) において TaqMan HCV で検出, アンプリコア定性で陰性であった。また, そのうち次の採血ポイントで測定結果を得ているのは 26 例であるが, 25 例は次の採血ポイントで TaqMan HCV : 検出せず, アンプリコア定性 : 陰性と一致したが, 1 例は TaqMan HCV : 測定または検出, アンプリコア定性 : 陽性であった。
(B) 投与開始から 4W, 8W, 12W, 24W 時点における TaqMan HCV とアンプリコア定性測定結果の比較。いずれの時期においても TaqMan HCV のほうがアンプリコア定性より感度良く HCV RNA が検出された。

A)

(n=299)		TaqMan HCV 「オート」 (測定下限 : 15 IU/mL)	
		測定または検出	検出せず
アンプリコア 定性	(+) (50 IU/mL 以上)	163	3 ^{*1}
	(-) (50 IU/mL 未満)	28 ^{*2}	105

B)

4W (n=48)		TaqMan HCV 「オート」 (検出率 : 81%)		8W (n=91)		TaqMan HCV 「オート」 (検出率 : 75%)	
		検 出 ^{*3}	検出せず			検 出 ^{*3}	検出せず
アンプリコア 定性 (検出率 : 69%)	(+)	33	0	アンプリコア 定性 (検出率 : 64%)	(+)	57	1
	(-)	6	9		(-)	11	22

12W (n=84)		TaqMan HCV 「オート」 (検出率 : 46%)		24W (n=40)		TaqMan HCV 「オート」 (検出率 : 25%)	
		検 出 ^{*3}	検出せず			検 出 ^{*3}	検出せず
アンプリコア 定性 (検出率 : 43%)	(+)	35	1	アンプリコア 定性 (検出率 : 18%)	(+)	7	0
	(-)	4	44		(-)	3	30

*1 : Gt 1a/1b : 3 例

*2 : Gt 1a/1b : 18 例, Gt 2a/2b : 10 例

*3 : 測定値が得られたものも含む。

EVR, LVR 達成との関係について genotype ごとに検討を行った。その結果, 投与前ウイルス量は Gt 2a/2b グループの RVR 達成にのみ両測定法で有意差を認めしたが, その他 EVR や LVR の達成には関与しないことが確認された (Fig. 2)。

4. 平均ウイルス量推移の比較

治療中止例を除く 82 症例を対象とし, 「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の 3 パターンにて, それぞれの採血

ポイントでの平均ウイルス量の推移を genotype ごとに TaqMan HCV とアンプリコア定量で比較を行った。その結果, 各 Gt 1a/1b グループおよび Gt 2a/2b グループともに, TaqMan HCV はアンプリコア定量と近似する推移パターンを示すことが確認された (Fig. 3)。

5. HCV dynamics と RVR, EVR, LVR 達成との関係

治療中止例を除く 82 症例を対象とし,

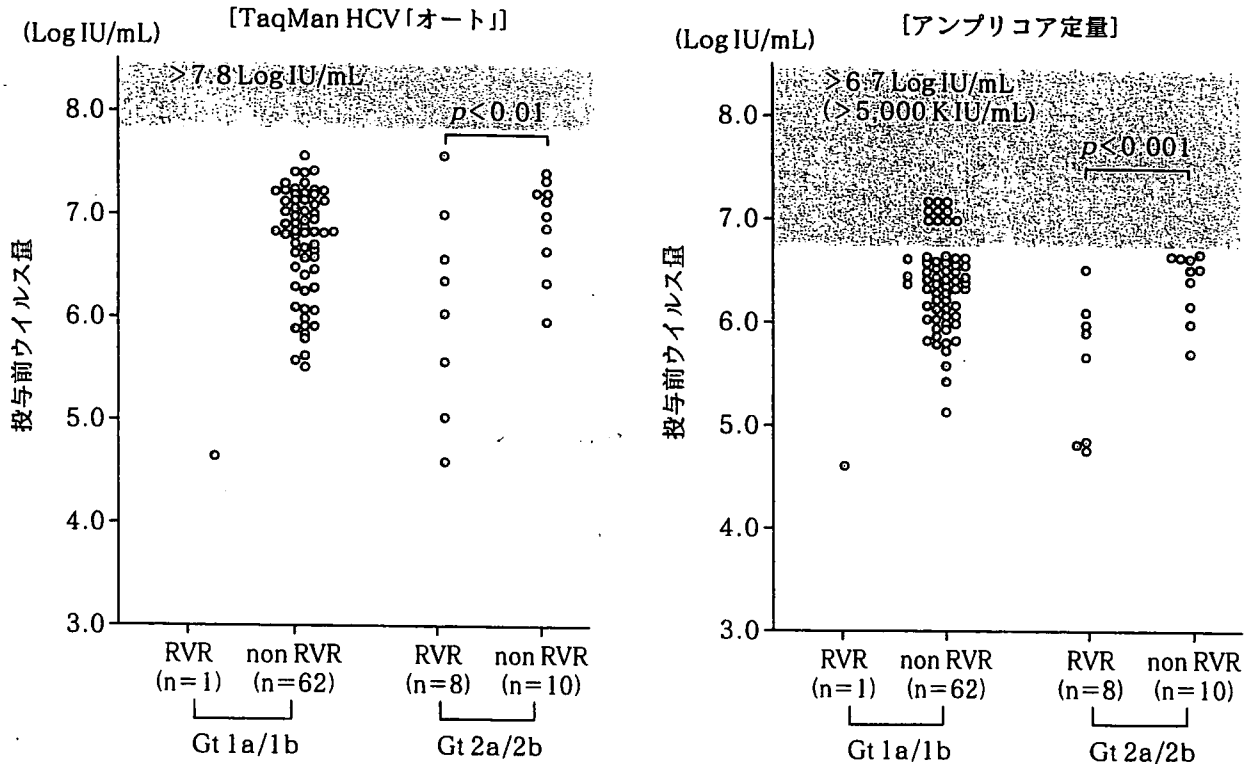


Fig. 2 81 症例を対象とし、「RVR vs non RVR」,「EVR vs non EVR」,「LVR vs non LVR」の3つの集計グループに分け、各群の投与前ウイルス量分布をそれぞれ TaqMan HCV とアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法にて比較したが、Gt 2a/2b グループの RVR 達成以外に有意差は認められなかった。Gt 1a/1b グループの EVR 達成は 1 症例のため、検定不可。網掛けの箇所は各測定法の測定上限を超えている領域であることを表す。

TaqMan HCV における投与前および投与開始初期 4 週目までの 2 点間ウイルス減衰量、計 9 パターン (Pre-3D, Pre-7D, Pre-2W, Pre-4W, 3D-2W, 3D-4W, 7D-2W, 7D-4W, 2W-4W) と RVR, EVR, LVR 達成との関係について genotype ごとに検討を行った。その結果、Gt 1a/1b グループの EVR 達成において、9 パターンすべてで有意差が認められた (Table 5)。

III. 考 察

高感度かつ広範囲な測定レンジを有する TaqMan HCV が上市されることにより、市場では既存 HCV RNA 測定法 (定量および定性) からの切替が促進されることが予測される。このことを鑑み、われわれは TaqMan HCV の基礎的性能および臨床的有用性を明らかにすることを目的に、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療

法症例を対象とした TaqMan HCV の臨床評価を多施設共同による prospective study 形式で実施している。今回は、既存測定法であるアンプリコア定量および定性との比較について、また、TaqMan HCV における投与前～4 週目、5～12 週目、13～24 週目での HCV RNA 消失と、投与前ウイルス量および HCV dynamics⁹⁾ との関連について報告を行った。

アンプリコア定量との相関性の検討においては、測定値が大きく乖離する例は認めず、また genotype グループ間での相関分布にも偏在はなく、極めて良好な相関性を示すことを確認した。データの互換性については、狩野らの報告²⁾と同様に 6.0 Log IU/mL [1,000 K IU/mL] 付近を越えたあたりから TaqMan HCV のほうが若干高値を示すことを確認したが、この傾向はアンプリコア定量の頭打ち現象に原因するものと推定される。一方、本邦の治療ガイドライ

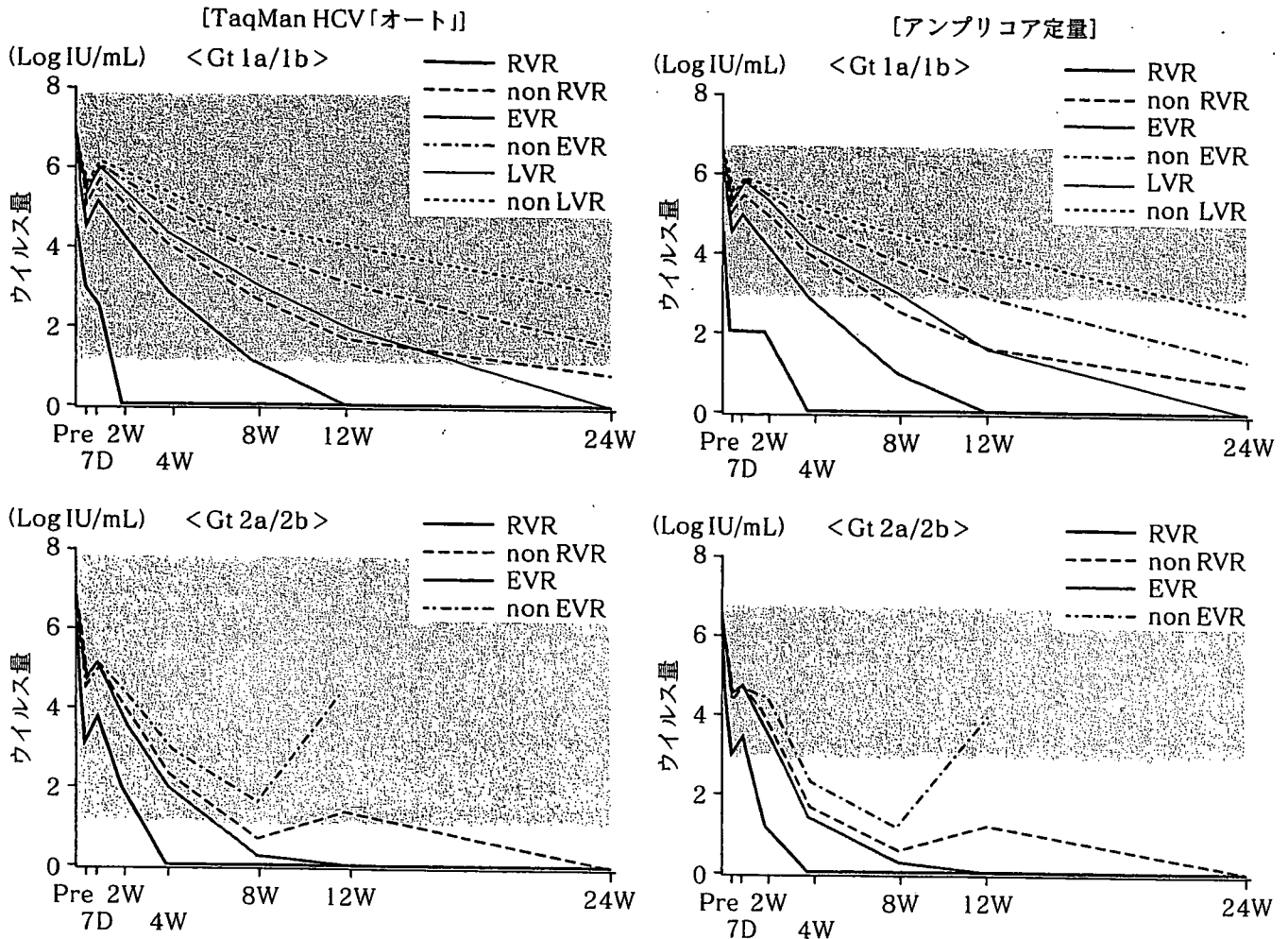


Fig. 3 82症例を対象とし、「RVR vs non RVR」、「EVR vs non EVR」、「LVR vs non LVR」の3グループに分け、それぞれの平均ウイルス量の推移をTaqMan HCVとアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法にて比較した。網掛けの箇所は各測定法の定量測定可能領域であることを表す。各測定法の測定下限未満については、TaqMan HCVで1.2 Log IU/mL [0.015 K IU/mL] 未満で検出したものは1 Log IU/mL [0.01 K IU/mL]、検出せずとなったものは0 IU/mL、アンプリコア定量で2.7 Log [0.5 K] IU/mL 未満でアンプリコア定性で陽性と判定されたものは2 Log IU/mL [0.1 K IU/mL]、陰性判定されたものは0 IU/mLとして集計した。

ン⁹⁾で低/高ウイルス量の境界となる5.0 Log IU/mL [100 K IU/mL] 付近ではほぼ1対1の相関を示したことから、TaqMan HCVの測定値も同一の基準で判断してよいと考えられた。また、リバビリン併用PEG-IFN α 2b投与期間中のTaqMan HCVのウイルス量測定は、アンプリコア定量と近似する推移パターンを示したことから、治療中の経過観察にも応用できることが確認された。なお、およそ10⁶幅のHCV RNA量モニタリングが可能なTaqMan HCVは、ハイレンジ法とオリジナル法の組み合わせ

により10⁴幅のモニタリングが可能となるアンプリコア定量と比較して、より長期間にわたりウイルス量変動を観察することが可能であった。

アンプリコア定性との一致率は89.6% (268/299)であり、乖離例が31例存在した。そのうち、次の採血ポイントの測定結果が明らかになっている26例中25例は次採血ポイントにおいて、TaqMan HCVで【検出せず】、アンプリコア定性で“陰性”と測定結果の一致をみていることから、抗ウイルス治療により血中ウイル

Table 5 82症例を対象とし、「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の3グループに分け、2点の採血ポイント間(計9カ所)におけるウイルス減衰量をTaqMan HCVにて比較。Gt 1a/1bグループではすべての採血ポイント間において、EVRを得られたグループが得られなかったグループと比較して、有意にウイルス減衰量が多かった。

Δウイルス量	Gt 1a/1b			Gt 2a/2b		
	RVR	EVR	LVR	RVR	EVR	LVR
Pre-3D	検定不可	$p < 0.05$	NS	NS	NS	検定不可
Pre-7D		$p < 0.05$	NS	NS	NS	
Pre-2W		$p < 0.05$	NS	NS	NS	
Pre-4W		$p < 0.05$	NS	—	NS	
3D-2W	検定不可	$p < 0.001$	NS	NS	NS	検定不可
3D-4W		$p < 0.01$	$p < 0.05$	—	NS	
7D-2W	検定不可	$p < 0.05$	NS	NS	NS	検定不可
7D-4W		$p < 0.05$	NS	—	NS	
2W-4W	—	$p < 0.05$	NS	—	NS	—

量が消失していく過程で各測定法の検出限界(TaqMan HCV : 1.2 Log IU/mL [15 IU/mL], アンプリコア定性 : 1.7 Log IU/mL [50 IU/mL]) に差し掛かった際に発生する乖離であると推測された。これら乖離例中9割強に相当する28例において、TaqMan HCVで【検出】、アンプリコア定性で“陰性”の結果を得ており、TaqMan HCVがより高感度にHCV RNAを検出することが確認された。Table 4に示すように、すべての採血ポイントにおいてTaqMan HCVの検出率がアンプリコア定性を上回る結果となったが、特に投与開始4週目と8週目でその傾向は顕著であった。Genotype 1b高ウイルス量に対する治療ガイドラインでは、投与開始12週目および24週目のHCV RNA定性の消長が治療方針を決定するcritical pointとなっているが、アンプリコア定性よりも高感度にHCV RNAを検出するTaqMan HCVで測定を行った場合、再燃例の低下が期待できるだろう。小林らは、投与終了時点でアンプリコア定性が陰性で投与終了後HCV RNAの再陽性を認めた症例のうち、約10%でTaqMan HCVにて投与終了時HCV RNA陽性と判定さ

れたと報告している¹⁰⁾。よりの確な治療方針の選択にあたり、高感度となったTaqMan HCVをどのように利用していくかが今後の課題である。

リバビリン併用PEG-IFN α 2b療法における治療効果予測について、投与開始~4週目、5~12週目、13~24週目でHCV RNAが消失するか否かの観点で、TaqMan HCVを用いて投与前ウイルス量の測定とHCV dynamicsの検討を行った。投与前ウイルス量は、IFN単剤療法においては治療効果を規定する独立した因子とされてきたが、genotype 1bかつ高ウイルス量を対象としたリバビリン併用IFN療法においては、治療効果と有意な相関を示さないとする報告が多い¹¹⁾¹²⁾。今回、優れた直線性を有するTaqMan HCVを用いて改めて検証を行ったが、投与前ウイルス量はGt 2a/2bグループにおけるRVR群(4週目のHCV RNA消失)の予測に有意差を認めたのみで、EVR(12週目のHCV RNA消失)群やLVR(24週目のHCV RNA消失)群では有意差を認めなかった。一方、投与開始前および投与開始4週目までの2点間ウイルス減衰量を検討したHCV dynamic