

closely related to SHs; they are small and similar in size,^{28,30} and both express CYP3A1 and 2E1 at a low level.^{28,32} At 3 weeks posttransplantation, the CFPHs were small in size, had a large nucleus-to-cytoplasm ratio, and expressed *bCD44*, but not *bCK19*. At 10 weeks, the cells became bigger, assumed a morphology similar to that of PH-derived cells, and lost their expression of *bCD44*. The expression of *bCYP3A4* was quite low (0.15-fold) among CFPHs compared with that of PHs (data not shown). In addition, the distribution of *bCYP3A4*-expressing CFPHs in the pericentral zone was unique: more than two-thirds of CFPHs did not express CYP3A4. In the case of the *b*-PH-chimeric mice, all PHs in the pericentral zone expressed CYP3A4 (data not shown).

Presently, we lack experimental data to explain the expression of *bCYP3A4* in CFPH-chimeric liver, but CFPHs may require some specific environmental factor(s) for differentiation, which might be absent from mouse liver. Alternatively, some factors that specifically inhibit the differentiation of CFPHs might be present there. CK7-positive *b*-hepatic progenitor cells are present in the livers of uPA/SCID mice transplanted with *b*-postnatal liver-derived PHs,⁶ and these small cells are strongly immunoreactive to pan-cytokeratin with scant cytoplasm. The CFPHs were morphologically similar to these cells at 3 weeks posttransplantation, although we were unable to detect CK7-positive cells in either the PH- or CFPH-transplanted chimeric livers. However, CFPHs were *bCK7*-, *bCK19*-, and *bCD44*-positive, at least until 1 day posttransplantation (data not shown).

We reported previously that uPA/SCID livers were nearly completely replaced with young donor PHs at 10 weeks posttransplantation.⁵ In contrast, the RIs of our CFPH-chimeric mice were <30% at 9 to 10 weeks. CFPHs were rare in the host liver at 3 weeks posttransplantation, whereas several PHs were observed. The lower RIs of the CFPHs might be attributable to their lower engraftment efficiency.

In conclusion, *b*-hepatocytes in immunodeficient, and liver-injured mice are useful for the study of viral hepatitis. Repopulated *b*-hepatocytes are susceptible to infection with HBV⁶⁻⁸ and HCV.^{4,6} Additionally, *b*-hepatocyte-chimeric mice are usually produced by transplanting fresh^{6,7} or cryopreserved hepatocytes,^{4,5} but sources of *b*-hepatocytes are limited. Several studies have reported on liver repopulation by *in vitro*-propagated cells from adult and fetal livers, such as immortalized mouse hepatic stem cells,²⁹ rat SHPCs,³⁴ immortalized *b*-hepatocytes transfected with full-length HBV,³⁵ and fetal *b*-epithelial/hepatic progenitor cells.^{36,37} However, the RIs in these studies were extremely low (less than a few percent). In the present

study, we were able to produce CFPH-chimeric mice with RIs as high as 27%. Thus, CFPHs could be an alternative to *b*-hepatocytes as a source of hepatocytes for transplantation. Moreover, the CFPH-chimeric mice were susceptible to infection with HBV, even though their serum *b*ALB levels were extremely low (10^2 - 10^3 ng/mL). CFPH-chimeric mice will be useful for studying *b*-HBV and for characterizing *b*-hepatic progenitor cells.

Acknowledgment: We thank H. Kohno, Y. Matsumoto, S. Nagai, A. Tachibana, Y. Yoshizane, and Y. Seo for providing technical assistance. We also thank Dr. K. Ohashi (Tokyo Women's Medical University) for helpful discussion and comments during the preparation of this manuscript.

References

- Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263:1149-1152.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;151:1273-1280.
- Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001;7:927-933.
- Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004;165:901-912.
- Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hempinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *HEPATOLOGY* 2005;41: 847-856.
- Dandri M, Burda MR, Török E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *HEPATOLOGY* 2001;33:981-988.
- Tauge M, Hiraga N, Takaiishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *HEPATOLOGY* 2005;42:1046-1054.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Guzelian PS. Biphasic regulation of cytochrome P450 2B1/2 mRNA expression by dexamethasone in primary cultures of adult rat hepatocytes maintained on matrigel. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:1815-1822.
- Arterburn LM, Zurlo J, Yager JD, Overton RM, Heifetz AH. A morphological study of differentiated hepatocytes *in vitro*. *HEPATOLOGY* 1995;22: 175-187.
- Tateno C, Yoshizane K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *Am J Pathol* 1996;149:1593-1605.
- Tateno C, Takai-Kajihara K, Yamasaki C, Sato H, Yoshizane K. Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes *in vitro*. *HEPATOLOGY* 2000;31:65-74.
- Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Katayama S, Kohashi T, et al. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes *in vitro*. *J Hepatol* 2006;44:749-757.
- Hino H, Tateno C, Sato H, Yamasaki C, Katayama S, Kohashi T, et al. A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth poten-

- tial and express their differentiated phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:184-191.
- Kocken JM, de Heer E, Borel Rinkes IH, Sinaasappel M, Terpstra OT, Buijn JA. Blocking of $\alpha 1\beta 1$ integrin strongly improves survival of hepatocytes in allogeneic transplantation. *Lab Invest* 1997;77:19-28.
 - Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubek HD, Drzeniek Z, Helmchen U, et al. CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1996;44:35-41.
 - Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J Hepatol* 2006;45:90-98.
 - Yovchev ML, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *HEPATOLOGY* 2007;45:139-149.
 - Rippon SJ, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B. Cholestatic expression pattern of sinusoidal and canalicular organic anion transport systems in primary cultured rat hepatocytes. *HEPATOLOGY* 2001;33:776-782.
 - Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991;66:245-256.
 - Oinonen T, Lindros KO. Hormonal regulation of the zoned expression of cytochrome P-450 3A in rat liver. *Biochem J* 1995;309:55-61.
 - Sonnier M, Cresteil T. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *Eur J Biochem* 1998;251:893-898.
 - Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990;50:3811-3815.
 - Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* 1993;142:1331-1333.
 - Shafritz DA, Oertel M, Menthena A, Nierhoff D, Dabeva MD. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *HEPATOLOGY* 2006;43(Suppl):89S-98S.
 - Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G45-G54.
 - Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *HEPATOLOGY* 1998;27:433-445.
 - Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 2000;157:771-786.
 - Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, Kremsdorf D, Weiss MC. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8360-8365.
 - Katayama S, Tateno C, Asahara T, Yoshizato K. Size-dependent *in vivo* growth potential of adult rat hepatocytes. *Am J Pathol* 2001;158:97-105.
 - Mitaka T, Mikami M, Sattler GL, Pitot HC, Mochizuki Y. Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *HEPATOLOGY* 1992;16:440-447.
 - Asahina K, Shiokawa M, Ueki T, Yamasaki C, Aratani A, Tateno C, et al. Multiplicative mononuclear small hepatocytes in adult rat liver: their isolation as a homogeneous population and localization to periportal zone. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1160-1167.
 - Yoshizato K. Growth potential of adult hepatocytes in mammals: highly replicative small hepatocytes with liver progenitor-like traits. *Dev Growth Differ* 2007;49:171-184.
 - Gordon GJ, Burtz GM, Grisham JW, Coleman WB. Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats. *Transplantation* 2002;73:1236-1243.
 - Brown JJ, Parashar B, Moshage H, Tanaka KE, Engelhardt D, Rabbani E, et al. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *HEPATOLOGY* 2000;31:173-181.
 - Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 2002;115:2679-2688.
 - Nowak G, Ericzon BG, Nava S, Jalisch M, Westgren M, Sumitran-Holgersson S. Identification of expandable human hepatic progenitors which differentiate into mature hepatic cells *in vivo*. *Gut* 2005;54:972-979.

ウイルス性肝炎：B型肝炎 2 インターフェロン療法

高橋祥一 茶山一彰

たかはし しょういち, ちゃやま かずあき: 広島大学大学院 分子病態制御内科学

B型慢性肝炎ではウイルスの完全な排除が難しいため、HBV DNAの増殖を持続的に抑制していくこと、肝炎を沈静化させて肝病変を改善し、肝硬変や肝がんへの進展を防いでいくことが重要になる。したがって、治療目標は、①HBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョン、②HBV DNAの陰性化、③トランスアミナーゼの正常化、をめざすべきである。近年の核酸アナログ製剤の登場により、B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は確実に進歩しており、上述の目標を容易に達成できるようになったが、一方で核酸アナログ製剤投与中止後の肝炎の再燃や変異株の出現は大きな問題である。したがって日常診療において、いかなる抗ウイルス薬をどのようなタイミングで投与すべきであるかについては依然として多くの問題点が残されており、判断に苦渋する症例も多く存在する。本稿ではB型慢性肝炎に対するインターフェロン (IFN) の治療効果と問題点について述べる。

● HBe抗原陽性例に対するインターフェロン療法

B型慢性肝炎に対するIFN治療の保険適用は厳しく制限され、対象はHBe抗原陽性例で投与期間は連日4週間であったため、効果は決して満足できるものではなかった。わが国では

2000年4月から、HBe抗原陽性、HBV DNAポリメラーゼ陽性のB型慢性肝炎に対し、6ヵ月間までのIFN投与が保険上認められ、治療成績の改善が報告されるようになってきた。

自然経過によるセロコンバージョン (SC) 率は年率8~15%であるが、わが国のIFN4週投与の治療成績では、治療終了1年後、2年後のHBe抗原陰性化 seronegative (SN) 率は29%、55%、SC率は12%、29%であり、自然経過によるSCをやや早めていると考えられる。IFN4週投与と24週投与の比較では、治療6ヵ月後のSN率は4週投与の4%に対し24週投与の26%、SC率は4週投与の4%に対し24週投与の20%と、IFNの長期投与の有効性が報告されている。

IFNの治療効果には、30歳未満の若年者であること、投与前のHBV DNAが低値であること、ALTが高値変動例であること、ALT値が上昇してピークを越えた直後で、HBV DNAが低下傾向の時期にIFN投与を開始することが、良好な治療効果が得られる背景因子としてあげられている。

NiedererらはHBe抗原陽性例103例にIFNを投与し、HBe抗原、HBs抗原の消失を53例(51%)、10例(10%)に認め、非投与群の28.1%、0%に比べ有意に高率であり、さらにHBe抗原の消失により生存率も改善したことを報告し

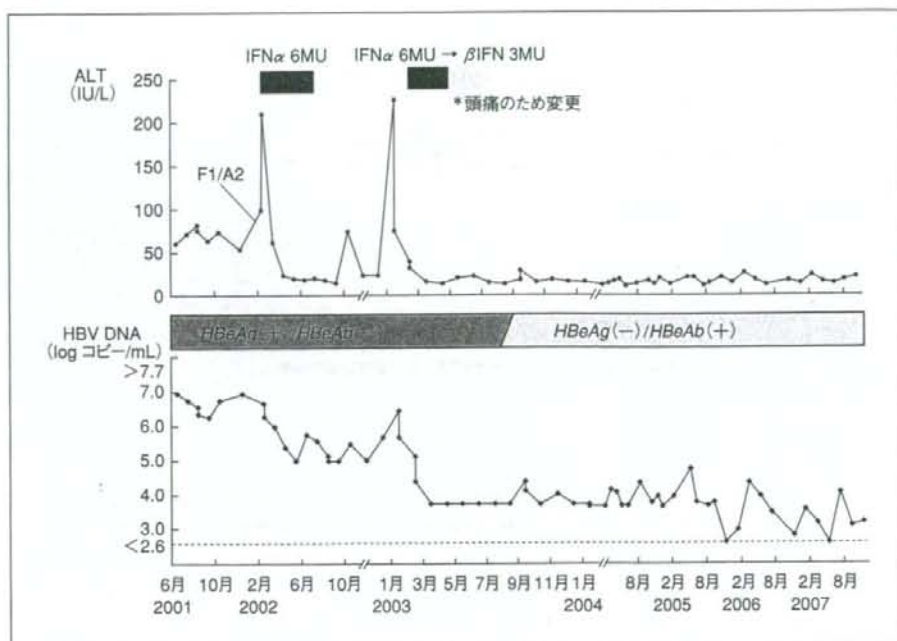


図1 インターフェロン療法を施行したB型慢性肝炎患者(HBe抗原陽性)の治療経過

た¹⁾。さらなる長期投与として、Janssenらは32週間のIFN投与によりHBe抗原の消失を28%に認め、16週間の投与による12%に比べ有意に高率であったことを報告している²⁾。国内の長期投与の報告として、金井らはIFN24週投与によりHBe抗原の消失を24.7%に認めたが、50週投与により35.1%に増加したことより、IFNのさらなる長期投与の有用性を報告している³⁾。しかしIFNの長期投与にもかかわらず、HBe抗原の消失やALTの正常化が得られない症例も多く存在し、HBe抗原陽性例に対するIFN療法はその投与量、投与期間について今後のさらなる検討が必要である。

広島大学医学部附属病院にてIFN療法を施行したHBe抗原陽性のB型慢性肝炎患者の経過を示す(図1)。症例は25歳女性。2001年7月、ALT50~100IU/LとALT高値が持続するため、第1内科を紹介受診した。HBe抗原陽性例でHBVDNA量は7.0logコピー/mLであり、

肝生検を施行したところ、F1/A2の慢性肝炎の所見であった。経過観察中にALTが200IU/Lを超え、急性増悪をみとめたため、ピークを越えたところでIFN療法を開始した。インターフェロンアルファ(IFN α)6MUを週3回、計24週投与したところ、IFN投与開始後ALTは速やかに低下したが、HBeのセロコンバージョンはみとめず、HBVDNA量も5.0logコピー/mL程度までしか下がらなかった。その後経過観察していたが、再度急性増悪をみとめたため、IFN α 6MU投与を開始した。途中で頭痛による副作用で β IFNに変更し、24週間投与した。ALTは投与開始直前から低下し、HBVDNAも4.0logコピー/mL未満に低下した。その後HBe抗原はセロコンバージョンを起こし、ALTは正常化した。HBVDNAも3log前後で推移している状況で、現在外来経過観察中である。

● HBe 抗原陰性例に対するインターフェロン療法

従来、HBe 抗原陰性例に対する IFN の治療成績は、HBe 抗原陽性例に比べ悪いと考えられているが、その有用性も多く報告されている。Lampertico らは HBe 抗原陰性の B 型慢性肝炎に対し、24 ヶ月間 IFN を投与した結果、IFN 投与群では非投与群に比べ、HBV DNA の陰性化率および ALT 値の正常化率が有意に高値であり、さらに肝生検の結果、線維化や炎症の改善が認められたことを報告している⁴⁾。荒瀬らは HBe 抗体陽性で ALT 値が 100 KU 以上を繰り返す B 型慢性肝炎患者 24 例に IFN を 3 ヶ月間投与し、14 例 (58%) で ALT 値の正常化を認めたことを報告している⁵⁾。HBe 抗原陰性の B 型慢性肝炎に対する IFN 療法により、生存率が改善した報告もあり、ALT 高値が持続する症例には、年齢や肝組織の状態をふまえて、IFN 療法を考慮すべきと思われる。しかし、HBe 抗原陰性例では IFN 終了後、ALT 値の再上昇を認めることが多く、このような症例に対して、広島大学第 1 内科では IFN の反復投与により ALT を低値に保っている。

● ペグインターフェロン療法

現在わが国では、B 型慢性肝炎に対してペグインターフェロン (Peg-IFN) 療法が保険適応となっていないが、近年欧米、特にヨーロッパでは B 型慢性肝炎に対して積極的に Peg-IFN 療法が行われ、良好な成績が得られている。Marcellin らは HBe 抗原陰性例に対して Peg-IFN α -2a 単独、ラミブジン単独、Peg-IFN α -2a+ラミブジンの併用療法の 3 とおりの治療法のランダム化比較試験 (RCT) を行った⁶⁾。その結果、ラミブジン単独群に比して、Peg-IFN 単独群と Peg-IFN+ラミブジン併用群は ALT 正常化率、HBV DNA 低下率の両方で有意に良好な結果を得た。ALT の正常化率は、ラミブジン単独群 44%、Peg-IFN α 単独群 59%、Peg-IFN+ラミブジン併用群 60% で、HBV DNA 2 万コピー/mL 未満は、ラミブジン単独群 29%、Peg-IFN α 単独群 43%、Peg-IFN+ラミブジン

併用群 44% であった。

また、Lau らは HBe 抗原陽性例に対して同様に Peg-IFN α -2a 単独、ラミブジン単独、Peg-IFN α -2a+ラミブジンの併用療法の 3 とおりの治療法で 48 週間投与の RCT を行った。その結果ラミブジン単独群に比して、Peg-IFN 単独群と Peg-IFN+ラミブジン併用群は HBe 抗原陰性化率 (ラミブジン単独群 22%、Peg-IFN α 単独群 32%、Peg-IFN+ラミブジン併用群 34%) および HBV DNA 低下率 (HBV DNA 10 万コピー/mL 未満: ラミブジン単独群 19%、Peg-IFN α 単独群 32%、Peg-IFN+ラミブジン併用群 27%) において有意に高率であった⁷⁾。また、Peg-IFN α -2b を用いた報告でも同様の結果が得られている⁸⁾。

HBe 抗原の状況にかかわらず、いずれの検討でも Peg-IFN を使用した群のほうがラミブジン単独群より結果が良く、Peg-IFN 単独群と Peg-IFN+ラミブジン併用群との間で差を認めなかった。したがって、Peg-IFN 単独で十分な結果が得られるというのが結論であった。現在国内でも B 型慢性肝炎に対する Peg-IFN 製剤の臨床試験が行われており、近い将来わが国でも Peg-IFN が使用可能になるとと思われる。

● インターフェロン+ラミブジン併用療法

ラミブジンは細胞質内で強力に HBV の合成を阻害するが、核内に存在する ccc DNA は排除されない。したがって、投与中止により HBV の増殖は再開し、しばしば肝炎の再燃が起こるため、投与の中止は一般的には困難と考えられている。しかし、ラミブジンの長期投与の問題点を考えると、特に若年者においてはその中止が可能なことは大きなメリットである。Serfaty らはラミブジン先行投与後、IFN- α を併用し、ラミブジンを中止したところ、IFN 投与終了 24 週後の HBe 抗原の消失率を 45%、HBV DNA の陰性化率を 57%、ALT 正常化率を 57% に認めたことを報告している⁹⁾。

広島大学第一内科においても、ラミブジン投与中、IFN- α を 4 週併用し、その後ラミブジンを中止し、IFN を単独投与した症例を検討した。

表 1 治療終了後 6 ヶ月における著効率

	IFN 単独療法*	IFN・ ラミブジン 併用療法	ラミブジン 単独中止 療法**
全体	22%(14/64)	24%(11/46)	19%(4/21)
HBe 抗原 陽性例	19%(8/43)	15%(4/26)	13%(1/8)
HBe 抗体 陽性例	29%(6/21)	35%(7/20)	23%(3/13)

*インターフェロン (IFN) 投与期間: 6 ヶ月,

**ラミブジン投与期間: 12 ヶ月, () 内は症例数

IFN 投与終了 6 ヶ月後, HBV DNA 陰性化かつ ALT 正常化率は 28% であり, 併用療法による治療効果の改善ははっきりとは認められなかった (表 1)。しかし, 組織学的に進行していない症例の一部には, IFN 併用によるラミブジン中止後, 良好な経過が得られた症例も存在した。

これらのことより, 若年で組織学的に進行していない症例に対しては, IFN を併用し, ラミブジンを中止することも選択肢のひとつになりうると考えられる。しかし, ラミブジン中止後の肝炎の増悪から死亡した症例も報告されていることから¹⁰⁾, その適応, 方法については慎重な検討が必要であると思われる。

● 予後および発がんに対する影響

B 型慢性肝炎に対する IFN 投与により, 長期予後の改善が得られることが期待される。実際に IFN 療法によって HBe 抗原の陰性化や ALT の正常化, HBV DNA の消失が認められた症例では, 生存率が有意に改善された報告は多くある。Di Marco らは HBe 抗原陽性の B 型慢性肝炎 109 例に対し IFN を投与した結果, 統計学的解析により, 肝硬変の非代償化のリスクが IFN 治療群で 0.311 倍に低下したと報告している¹¹⁾。B 型肝硬変では肝不全のみならず, 肝がんの発がん率およびその進行の早さが大きな問題であり, 日常診療においても初診時すでに治療困難な症例にもしばしば遭遇する。Ikeda らは B 型肝硬変 94 例に対し IFN を長期間投与し, 投与終了 5 年後および 10 年後の肝がん発がん率は 7% および 17% で, 非治療群の 19.6%

および 38% に比べて有意に低率であったことを報告している¹²⁾。また, Lin らは B 型慢性肝炎患者に対する IFN 療法により, HBV DNA の有意な低下のみならず, 肝がん発がん率が 1.5% と非治療群の 12% に比べ有意に低値であり, IFN 治療は累積肝がん発がん率および累積死亡率を有意に低下させたことを報告している¹³⁾。B 型肝硬変の肝がん発がん予防は非常に重要な課題であり, IFN 療法による発がん抑制は今後のさらなる検討を要すると思われる。

● まとめ

IFN 療法は核酸アナログ製剤と比べ, HBV DNA 陰性化率や ALT 正常化率は低いが, 著効例は薬剤中止が可能であり, 耐性株が出ない点, 一部の症例では HBsAg の消失をも期待できる点から, 有利な点があることも忘れてはならない。Peg-IFN 療法ではさらに良好な成績が得られていることから考えて, 今後わが国で Peg-IFN 療法が認可された際に, どの症例に IFN を用い, どの症例に核酸アナログ製剤を使用するべきか, 再度検討しなければならないであろう。

文献

- 1) Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1996; 334: 1422-7.
- 2) Janssen HLA, Gerken G, Carreno V, et al. Interferon alpha for chronic hepatitis B infection: Increased efficacy of prolonged treatment. *Hepatology* 1999; 30: 238-43.
- 3) 金井弘一, 賀古真, 相川達也ほか. B 型慢性肝炎に対するインターフェロン 50 週投与. *肝臓* 2000; 41: 254-61.
- 4) Lampertico P, Del Ninno E, Manzin A, et al. A randomized controlled trial of a 24-month course of interferon alpha 2B in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum. *Hepatology* 1997; 26: 1621-5.
- 5) 荒瀬康司, 熊田博光, 池田健次ほか. Transaminase 値異常を示す e 抗体陽性 B 型慢性肝炎に対するインターフェロン投与の有効性に関する検討. *肝臓* 1999; 31: 504-9.
- 6) Marcellin P, Lau GK, Bsonino F, et al. Peginterferon alpha-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351: 1206-17.
- 7) Lau GK, Piratysuth T, Luo KX, et al. Peginterferon alpha-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-

- positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2682-95.
- 8) Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B : a randomized trial. *Lancet* 2005 ; 365 : 123-9.
- 9) Serfaty L, Loria A, Poupon R. Sequential treatment with lamivudine and interferon monotherapies in patients with chronic hepatitis B not responding to interferon alone : results of a pilot study. *Hepatology* 2001 ; 34 : 573-7.
- 10) Lim SG, Wai CT, Rajnakova A, et al. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut* 2002 ; 51 : 597-9.
- 11) Di Marco V, Lo Iacono O, Camma C, et al. The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999 ; 30 : 257-64.
- 12) Ikeda K, Saitoh S, Kobayashi M, et al. Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus : *Cancer* 1998 ; 82 : 827-35.
- 13) Lin SM, Tai DI, Chien RN, et al. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1999 ; 29 : 971-5.

わが国における最新の治療ガイドライン

高橋 祥一^{*,**} 茶山 一彰^{*}
たかはし しょういち ちやま かずあき

- 初回投与と高ウイルス量症例、再投与例に対してはペグインターフェロン+リバビリン併用療法が治療の基本である。
- インターフェロンの再治療は、ウイルス排除目的の治療か、進展予防（発癌予防）の少量長期療法かを選択すべきである。
- 72週の併用療法長期投与で著効率が高くなる可能性がある。

Key Words C型肝炎、ガイドライン、ペグインターフェロン、リバビリン

C型肝炎に対する治療ガイドラインは新規薬剤の開発にともない毎年改定されているが、現在もっとも新しい平成18年度の厚生労働省 肝炎等克服緊急対策研究事業の研究報告（主任研究者 熊田博光）で示されたC型肝炎の治療ガイドラインを表1に示す。初回投与例で、genotype 1b 高ウイルス症例に対しては、ペグインターフェロン（Peg-IFN）+リバビリンの併用療法が现阶段ではもっとも有効な治療法と考えられている。今回のガイドラインには2004年から行われているPeg-IFN α -2b（ペグイントロン[®]）とリバビリン（レベトール[®]）併用療法の48週投与に加えて、新たにPeg-IFN α -2a（ペガスィス[®]）とリバビリン（コペガス[®]）併用療法の48週投与がガイドラインに収められ、いずれの薬剤も、これまでのIFN療法をはるかに凌駕する良好な

SVR率が得られている。ちなみに国内治験の成績では、1b高ウイルス症例に対するSVR率がPeg-IFN α -2b+リバビリンの48%に対し、Peg-IFN α -2a+リバビリンでは59%であった。若干後者が良いSVR率を呈しているが、これは、治験の症例数が後者で少なかったこと、また海外では前者の成績が良かったという報告もあり、今後の市販後調査の結果が待たれる。

両薬剤ともSVRが得られる重要な因子として48週間の治療の完遂が抽出されている。Peg-IFNあるいはリバビリンを途中で減量しても48週間投与継続した症例は、投与中止した症例に比較して有意に高いSVR率が得られており、適切な薬剤減量の判断が重要になる。薬剤の減量については、添付文章では基準値を下回った場合「Peg-IFN製剤は半量に減量すること」となって

表1 平成18年度C型肝炎の治療ガイドライン（初回投与）

初回投与	genotype 1	genotype 2
高ウイルス量 1 Meq/ml 100 KIU/ml 300 fmol/l 以上	Peg-IFN α -2b : Peg-Intron + Ribavirin (48週間) Peg-IFN α -2a : Pegasys + Ribavirin (48週間)	Peg-IFN α -2b : Peg-Intron + Ribavirin (24週間)
低ウイルス量 1 Meq/ml 100 KIU/ml 300 fmol/l 未満	IFN (24週間) Peg-IFN α -2a : Pegasys (24~48週間)	IFN (8~24週間) Peg-IFN α -2a : Pegasys (24~48週間)

*広島大学大学院 分子病態制御内科学 **広島大学自然科学研究支援開発センター

表2 平成18年度C型肝炎の治療(ガイドラインの補足)

- ① 初回投与の高ウイルス量症例、再投与例ではインターフェロンとリバビリンの併用療法が、治療の基本である。
- ② 高ウイルス量症例、再投与症例でのリバビリンの非適応例ではインターフェロンの長期投与が必要である。
- ③ インターフェロン治療中にHCV RNAの陰性化が得られない症例では、肝機能正常化または発癌予防を目指した治療も検討する。

表3 C型肝炎に対する再治療ガイドライン

インターフェロン再治療の原則：C型肝炎に対してインターフェロンの再治療は初回治療の無効の要因を検討し、治療目的の治療か、進展予防(発癌予防)の少量長期療法を選択すべきである。

いるが、最近の国内学会ではSVRを得るためには予定総投与量の70~80%程度の総投与量が必要である、との報告が散見される。そのためにはPeg-IFNの減量を半量ではなく、1/4減量などのより少ない量の減量で、血球減少が改善すればまた元に戻すなどの、きめ細やかな投薬量管理が必要と思われる。

genotype2の高ウイルス症例に対しては、Peg-IFN α -2bとリバビリンが保険適応となっており、24週間投与で約90%の高いSVR率が得られている。またHCV RNAが100 KIU/ml以下の低ウイルス量症例に対する初回治療ではPeg-IFN+リバビリン併用療法は適応がなく、従来型のIFNの8~24週間投与あるいはPeg-IFN α -2aの24~48週投与が適応である。

再燃例においてのインターフェロン再投与は、前回の治療の無効の要因を検討し、治療目的(ウイルス排除目的)の治療か、進展予防(発癌予防)目的の少量長期療法のいずれかを選択すべきである(表2, 3)。現在のPeg-IFN+リバビリン併用療法以前にIFN(+リバビリン)治療を受けて、いったんHCV RNA陰転化後に再陽転化した症例では、HCVはIFNに感受性を示すが、①投与されたIFNの量が十分でなかった、②投与期間が短かった、③リバビリンの投与を受けてなかった、などの理由でSVRが得られなかったと考えられる。このような症例ではPeg-IFN+リバビリン併用療法48週間投与でSVRが得ら

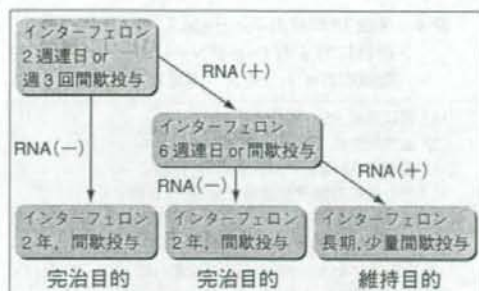


図1 1b型、高ウイルス量のPeg-IFN+リバビリン非適応症例に対するIFN単独長期療法のガイドライン(2006年度)

れる可能性がある。実際に、Peg-IFN α -2b+リバビリン併用療法の国内臨床試験では、再燃群に対する併用療法のSVR率は63%と初回治療群と再投与群を含めた全体のSVR率48%に比して著明に高かった。また再投与例でリバビリンの非適応例ではインターフェロンの長期投与が必要である(図1)。一方で、高齢・腎機能低下・貧血その他の理由でPeg-IFN+リバビリン併用療法の48週完遂が困難であることが予測される症例は、肝炎の進展予防あるいは発癌予防のためのIFN少量長期投与を考慮すべきである。特にウルソデオキシコール酸やグリチルリチン酸製剤による肝庇護療法を行ってもトランスアミナーゼが正常化しない症例で、以前のIFN治療中にはトランスアミナーゼが正常化していた症例はIFNの少量長期投与が強く推奨される。

Peg-IFN α -2b+リバビリンの国内臨床試験の結果では、投与開始後12週までにウイルスが消失した症例では76%でSVRが得られたが、12週から24週の間にHCVが消失した症例では36%のSVR率であった。したがって、これらの比較的遅い時期にHCVが陰転化する症例(LVR: Late viral responder)をどのように治療するかが大きな問題であるが、最近多数の施設で治療期間を延長することによりSVR率を上げる工夫がなされている(表4)。具体的にはEVRが得られなかった症例は72週間に投与期間を延長し、SVR率が10~20%上昇すると最近の学会で報告がある。まだ症例の集積が少なく、最終的な結論

表4 平成18年度の genotype 1, 高ウイルス量症例に対する Peg-IFN+リバビリン併用療法のガイドライン (補足)

- ① 12週以内にRNA陰性化例
48週併用療法でSVRを期待
- ② 13週から24週までにRNA陰性化例
72週の併用療法長期継続でSVRを目指す
- ③ 高齢, 合併症併存, Hb・WBC低値例など通常量での治療では副作用中止が予測される症例
減量開始, あるいは, 早期に減量して(48~72週)完達を目指す
- ④ 24週目でRNA陽性かつALT正常化例
48週の治療継続により長期ALT正常化維持を目指す

は出ていないが, いったんウイルスが陰性化する症例に対しては, 投与期間を延長することによりSVR率の改善が得られると考えられる。以前のIFN単独療法の結果から類推して, Peg-IFN+リバビリン併用療法も治療期間を長くすればするほどSVR率が高くなることが予想される。

平成18年度の厚生労働省 肝炎等克服緊急対策研究事業の研究報告では血清ALT正常C型肝炎例への抗ウイルス治療ガイドラインがまとめられている(分担研究者 岡上 武)。ここでは血清ALT値30IU/l以下と31~40IU/lの2群, また血小板数15万以上と15万未満の2群に分け, 合わせて4群にALT正常者を分別したうえで抗ウイルス治療の適応を決めている。ALT値は肝生検におけるactivityを反映し, ALT値31~40IU/lはその時点における肝内での炎症が少なからず起きていることを示し, 一方血小板数はC型肝炎における肝内の線維化をよく反映し, 血小板数15万未満は肝線維化の進行を示唆するものである(表5)。

① ALT 31~40IU/l, 血小板数15万未満: これは肝内での炎症が持続し, そのため肝線維化も

ある程度以上進行していると考えられる症例で, 慢性肝炎に準じて治療が行われるべきである。② ALT 31~40IU/l, 血小板数15万以上: 肝内での炎症は持続しているが, まだそれほど線維化は進展していないと考えられる症例である。このまま炎症が続けば肝線維化の進行が予想されるため, 現段階で抗ウイルス療法の適応である。③ ALT 30IU/l以下, 血小板数15万未満: 現時点において肝内の炎症はわずかであるが, 長年の炎症の持続により線維化はある程度以上進行した症例と考えられる。可能であれば肝生検を施行し, F2/A2以上の症例に対しては抗ウイルス療法を考慮すべきである。④ ALT 30IU/l以下, 血小板数15万以上: これらの症例は肝内の炎症もごく軽度で, 線維化も進行していないことから現段階では必ずしも抗ウイルス療法が必要ではない。しかし厳重な経過観察が必要であり, 2~4ヵ月ごとに血清ALT値, 血小板数をフォローして, ALT値が異常値になった段階で抗ウイルス療法を考慮すべきである。なお抗ウイルス療法の内容についてはHCVの遺伝子型, ウイルス量, 年齢などを考慮し, 通常のC型肝炎の治療に準じて選択すべきである。

以上近年のC型肝炎治療ガイドラインはやや複雑になってきているが, これは肝炎の進行度, 過去の治療歴に応じたオーダーメイド的な治療を目指して作成されていると考えるべきであろう。新規C型肝炎治療薬の登場はまだ数年先になると予想されるので, 現在治療すべきC型肝炎患者に対してはやはり現状のPeg-IFN+リバビリン療法が当面の第一選択になると思われる。今後さらに集積されるであろう新しい知見をもとに, 個々の患者にマッチしたガイドラインの作成とその遂行が望まれる。

表5 血清ALT正常C型肝炎例への抗ウイルス治療ガイドライン

	血小板数 \geq 15万	血小板数 $<$ 15万
ALT \leq 30IU/l	2~4ヵ月ごとに血清ALT値フォロー, ALT異常を呈した時点で完治の可能性, 発癌リスクを評価し, 抗ウイルス療法を考慮	線維化進展例がかなり存在する。可能なら肝生検を施行し, F2/A2以上の例に抗ウイルス療法を考慮
ALT 31~40IU/l	抗ウイルス療法の適応	慢性肝炎治療に準ずる

遺伝子型, ウイルス量, 年齢などを考慮し, 通常のC型肝炎治療に準じて, 治療法を選択する。

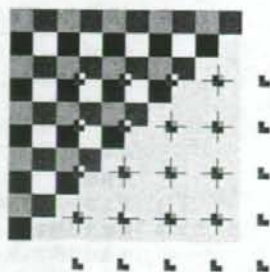
肝臓病の 原因とメカニズム

高橋祥一

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病理制御内科学講師

茶山一彰

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病理制御内科学教授



肝臓は人体最大の化学工場であり、糖質、脂質、タンパク質の貯蔵・代謝、ビリルビン・アンモニア代謝、アルコールを含む薬物代謝、毒性物質の解毒、胆汁酸産生など種々の役割を果たしています。

とくに腸管で吸収された各種栄養成分、薬物、毒物などは、すべて門脈を通して肝臓内に流入するため、肝臓は外来物質に対する大きな関門と考えることができます。したがって、つねに肝臓は病原体や毒性物質に曝露されており、また心臓からの血流量も多いことから、多くの疾患が発症します。本稿では種々の肝疾患をその原因別に分類し、またそれぞれの疾患の肝細胞障害のメカニズムについて概説します。

まず肝疾患の原因については、①感染症、②代謝性疾患、③アルコール性肝障害、④薬物性肝障害、⑤自己免疫性疾患、⑥肝血流障害、⑦肝寄生虫症に分類します(表1)。

そのうえで、疾患の肝細胞障害のメカニズムについて、①原因が直接肝細胞障害性をもつもの、②原因自体でなく宿主側の免疫応答が肝障害をひき起こすもの、③胆汁のうっ滞によるもの、④占拠性病変による肝細胞の置換・圧排によるもの、⑤その他、に分類します(表2)。

感染症

.....

肝臓に限局したびまん性疾患で、もっとも多い疾患がウイルス性肝炎です。現在のところその原因として、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)の5種類が知られています。これらの肝炎ウイルスによる感染は、リンパ球による感染肝細胞の破壊、すなわち肝炎をひき起こします。HAVおよびHEVは急性肝炎をおこしますが、すべて一過性感染です。一方HBVおよびHCV感染は、急性肝炎と慢性肝炎のいずれもおこしえます。またHDVは、HBVの持続感染者においてHBV/HDV重感染のかたちでのみ存在しえます。

肝炎ウイルス感染による肝細胞障害は、おもに宿主側の免疫応答によってひき起こされます。肝細胞に肝炎ウイルスが感染すると、ウイルスタンパクが細胞表面に表出し、それを認識した樹状細胞が細胞障害性Tリンパ球(CTL)を誘導して、感染肝細胞を破壊します。近年の研究によれば、toll-like receptorなどを介した自然免疫の機構もウイルス排除に関与することが知られています。またHAVは直接肝細胞障害性をもつことが示唆されています。

表1 肝臓病の原因別分類

1. 感染症	ウイルス性肝炎, 肝膿瘍, 肝結核, 肝梅毒
2. 代謝性疾患	非アルコール性脂肪肝炎 (NASH), ヘモクロマトーシス, ウイルソン病, アミロイドーシス, ボルフィリン症, α_1 -アンチトリプシン (α_1 -AT) 欠損症, 糖尿病, 体質性黄疸
3. アルコール性肝障害	
4. 薬物性肝障害	中毒性肝障害, 薬物特異体質性肝障害
5. 自己免疫性疾患	自己免疫性肝炎, 原発性胆汁性肝硬変, その他の膠原病
6. 肝血流障害	肝外門脈閉塞症, 特発性門脈圧亢進症, Budd-Chiari 症候群, うっ血肝, ショック肝
7. 肝寄生虫症	日本住血吸虫症, 肝包虫症, 肝吸虫症, 肝絛虫

表2 肝障害のメカニズム別分類

1. 原因が直接肝細胞障害性をもつもの	非アルコール性脂肪肝炎 (NASH), ヘモクロマトーシス, ウイルソン病, ボルフィリン症, α_1 -アンチトリプシン (α_1 -AT) 欠損症, 糖尿病, アルコール性肝障害, 中毒性薬物性肝障害, ショック肝
2. 宿主側の免疫応答が肝障害をひき起こすもの	ウイルス性肝炎, 薬物特異体質性肝障害, 自己免疫性肝炎, SLE, 関節リウマチ, 全身性強皮症, シェーグレン症候群, 日本住血吸虫症
3. 胆汁のうっ滞によるもの	原発性胆汁性肝硬変
4. 占拠性病変による肝細胞の置換・圧排によるもの	肝膿瘍, 肝結核, 肝梅毒, 肝包虫症
5. その他	Budd-Chiari 症候群, うっ血肝

肝炎ウイルス以外の肝細胞特異的親和性のないウイルスによる肝炎として, Epstein-Barr ウイルス (EBV) 肝炎, サイトメガロウイルス (CMV) 肝炎などがあります。これらのウイルスによる肝炎においても, 宿主側の免疫応答によって肝細胞障害がひき起こされます。

肝膿瘍, 肝結核, 肝梅毒は, 細菌, 赤痢アメーバ, 結核菌, 梅毒スピロヘータが血行性, 経胆道性に感染し, 肝内に focal に菌の増殖巣をつくる疾患です。いずれも膿瘍, 結節, 肉芽腫などの占拠性病変を形成し, 圧排性に肝細胞を障害します。

代謝性疾患

.....

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は, 肝臓で合成された過剰な中性脂肪が肝細胞に蓄積することにより生じた単純性脂肪肝に, 酸化ストレス, インスリン抵抗性, 脂質過酸化, 炎症性サイトカインなどが加わることにより生じます。脂肪の蓄積が直接肝細胞障害をひき起こしていると考えられています。

ヘモクロマトーシス, ウイルソン (Wilson) 病は, 遺伝子異常によって, 小腸での過剰な鉄吸収あるいは胆汁中への銅排泄障害により, 肝内に鉄あるいは銅が過剰に蓄積す

ることから生じる肝障害で、いずれの疾患とも最終的には肝硬変にいたります。鉄あるいは銅の過剰な蓄積が直接、肝細胞障害をひきおこしています。

アミロイドーシスは、アミロイド線維が全身の臓器の細胞外に沈着することにより機能障害をおこします。肝アミロイドーシスは肝腫大をおこしますが、肝実質障害をひきおこすことは少ないです。

ポルフィリン症は、おもに肝臓と骨髄で合成されるヘムの合成経路における酵素の先天性欠損症であり、酵素欠損によりヘム合成経路の中間産物の異常蓄積がおこり、多彩な症状が出現します。これら中間産物の蓄積により肝障害をひきおこすもので、直接の肝細胞障害と考えられます。

α_1 -アンチトリプシン (α_1 -AT) 欠損症は、遺伝子異常により血中に分泌されない異常 α_1 -AT が肝臓に蓄積する疾患で、肺気腫、慢性気管支炎、肝障害をひきおこします。肝障害の原因は、過剰に蓄積した異常 α_1 -AT の毒性効果によります (直接の肝細胞障害)。

糖尿病は、グリコーゲン代謝に関する種々の酵素の遺伝的欠損により、肝臓や筋肉にグリコーゲンが病的に蓄積して生じる疾患で、過剰なグリコーゲンが直接的な肝細胞障害作用をもちます。

体質性黄疸は、非抱合型ビリルビン優位となる疾患と抱合型ビリルビン優位となる疾患に大別されます。前者は Crigler-Najjar 症候群 (I 型, II 型) と Gilbert 症候群がありますが、いずれも UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の酵素の欠損または活性低下によります。後者は Dubin-Johnson 症候群と Roter 症候群があり、Dubin-Johnson 症候群は MRP2 酵素の欠損または異常によります。Roter 症候群については原因酵素は見つかっていませんが、いずれにせよ、グルクロン酸抱合後の抱合ビリルビンの輸送障害で肝内にビリルビンが蓄積した状態です。体

質性黄疸では血液中のビリルビン値は高値となりますが、肝障害はおこしません。

アルコール性肝障害

.....

アルコール性肝障害は、非ウイルス性肝疾患のなかでもっとも頻度が高いびまん性肝疾患です。アルコールの長期にわたる過剰摂取に由来する肝障害で、肝細胞障害の原因はアルコールの直接的障害作用によります。アルコール摂取により中性脂肪が過剰に産生され、肝の脂肪化が生じます。エタノールの酸化物であるアセトアルデヒドは直接肝細胞障害作用をもち、消化管のエンドトキシン透過性を高めることから、門脈血のエンドトキシン血症をひきおこします。

薬物性肝障害

.....

薬物性肝障害は、①中毒性肝障害と②薬物特異体質性肝障害の二つに大別されます。中毒性肝障害は薬剤自体による肝細胞障害であり、アセトアミノフェンや四塩化炭素などによるものが有名で、肝障害はすべての人に出現します。一方薬物特異体質性肝障害は、免疫学的機序によるアレルギー性肝障害と遺伝的に異常な薬物代謝が主因である肝障害の二つがあります。いずれも薬物に対する生体の反応が特殊な場合に発症し、服用者のうち少数例でのみみられ、肝毒性を予測することは困難です。

アレルギー性肝障害は宿主の免疫反応が肝障害をひきおこしますが、ほぼすべての薬物性肝障害がこのタイプです。一部の薬剤に対する遺伝的な薬物代謝異常は、その中間産物による直接的な肝細胞障害です。イソニアジド、バルプロ酸、トログリタゾンなどによる肝障害にこのタイプがみられることが知られています。

自己免疫性疾患

自己免疫性肝炎は、免疫機能の異常により、白血球が自己の肝細胞膜を外來抗原と認識し、肝細胞障害をおこす疾患であり、宿主の免疫応答による肝細胞障害と考えられます。

原発性胆汁性肝硬変は、原因は不明ですが、小葉間胆管レベルでの単核球による胆管炎が本疾患の主座で、胆管炎の進行により徐々に胆汁うっ滞がおこり、胆汁うっ滞性の肝硬変となります。もともとの病変の主座は胆管ですが、肝細胞障害は胆汁の直接障害作用によります。

その他の膠原病として、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ、全身性強皮症、シェーグレン症候群などで肝障害を認めることが知られています。いずれも肝障害の程度は軽度で、宿主側の免疫性反応が肝障害性をもつと考えられます。

肝血流障害

肝外門脈閉塞症は、種々の原因により肝外での門脈が閉塞し、門脈圧亢進症が生じる疾患ですが、多くの場合、門脈血は肝門部でももとの門脈周囲に発達した cavernous transformation を介して肝内に流入します。一般に本疾患では門脈圧亢進症はきたしますが、肝実質障害は出現しません。

特発性門脈圧亢進症 (IPH) の本態は類洞前の肝内門脈閉塞であり、原因不明の門脈圧亢進症をきたしますが、多くの場合肝細胞障害をおこしません。

Budd-Chiari 症候群とうっ血肝は類似した病態をとります。Budd-Chiari 症候群は肝静脈の閉塞により、またうっ血肝はうっ血性心不全によって、肝静脈血のうっ滞がおこり、中心静脈の長期のうっ血とそれにひきつづく中心静脈周囲の線維化、中心静脈肝の線維性架橋形成などが出現してきます。

ショック肝は急性循環不全にともない生じる肝障害です。肝細胞は低酸素状態となり、とくに供血路であるグリソン鞘から離れた小葉中心部は肝障害を受けやすくなります。低酸素状態は肝細胞のアポトーシスを誘導し、また血液再循環時は多量のフリーラジカルが産生されるため、肝細胞が障害を受けます。

肝寄生虫症

日本住血吸虫はセルカリア幼生の状態で人体に入り、肝臓に到達した後成熟し、門脈壁に寄生して産卵します。最初は虫卵が血管を閉塞しますが、孵化してミラシジウム幼生になると、アレルギー反応による血管炎をひきおこし、門脈周囲に強い炎症と線維化をもたらします。宿主の免疫応答反応が肝障害性を惹起すると考えられています。

肝包虫症では、虫卵が経口摂取された後、十二指腸で六鉤条虫となり、小腸壁を穿通し、門脈を介して肝臓に到達して寄生します。肝臓に定着した虫卵は嚢胞状となり、嚢胞が外生出芽によってサボテン状に連続した充実性の腫瘤を形成します。肝障害の程度は通常軽度ですが、病変が肝細胞を圧排性に発育し、末期では肝不全にいたります。

肝吸虫症は、メタセルカリア幼生を経口摂取することにより感染し、成虫は胆管枝に寄生します。寄生胆管は胆管周囲炎や虫卵による胆汁うっ滞をおこしますが、顕性黄疸をおこすことはめったにありません。肝吸虫による肝硬変症例はきわめてまれです。

肝絛虫症は、メタセルカリアを経口摂取することにより感染し、腹腔内から肝表面、さらに肝実質から胆管に入って胆管内に寄生します。胆管内に虫卵を産むことにより胆石様症状が出現することがありますが、肝実質障害はほとんどおこしません。

[たかはし・しょういち／消化器内科]
[ちやま・かずあき／消化器内科]

Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B

Shigeru Yoshida¹, Shuhei Hige³, Miyuki Yoshida², Naoki Yamashita², Shin-ichi Fujisawa², Kaori Sato², Tadashi Kitamura², Masaharu Nishimura⁴, Makoto Chuma³, Masahiro Asaka³ and Hitoshi Chiba¹

¹Department of Health Sciences, Hokkaido University School of Medicine, North-12, West-5, Sapporo 060-0812; ²Department of Clinical Laboratory, Hokkaido University Hospital, Sapporo 060-8648; ³Gastroenterology and Hematology Section, Department of Internal Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638; ⁴First Department of Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan
Corresponding author: Dr Shigeru Yoshida. Email: shiyoshi@med.hokudai.ac.jp

Abstract

Background: Lamivudine (LAM)-resistant hepatitis B virus (HBV) with mutations in the polymerase region frequently appears after long-term use of LAM. Several methods allowing detection of mutant strains (YIDD, YVDD) have been reported, but they have no quantitative characteristics. In this study, we explored a unique approach for quantification of each mutant strain.

Methods: A method for detection and quantification of wild and mutant strains was developed using realtime polymerase chain reaction and type-specific minor groove binder (MGB) probes, and tested in patients with chronic hepatitis B before and after additive treatment with adefovir dipivoxil (ADV).

Results: A good correlation was confirmed in HBV DNA quantity obtained between the YMDD-specific MGB probe assay and Amplicor HBV Monitor assay results ($P < 0.001$), linear between 3 and 9 log copies/mL serum. Of 109 samples from patients with chronic hepatitis B tested by both these assays and conventional direct sequencing, 90 (88.2%) showed identical results. The assays successfully detected and quantified a single type of mutant in three of four patients with additive ADV treatment, and also two coexisting mutant types (YIDD and YVDD) in the remaining patient.

Conclusions: Our specific and sensitive method for detection and quantification of HBV DNA with the wild-type YMDD motif and its two mutant forms (YIDD and YVDD) appears to be clinically useful, especially in patients with multiple mutant HBV infections.

Ann Clin Biochem 2008; 45: 59–64. DOI: 10.1258/acb.2007.006219

Introduction

Lamivudine (LAM) was initially synthesized as an anti-human immunodeficiency virus (HIV) drug and was later found to inhibit hepatitis B virus (HBV) proliferation as well as to decrease copy number of HBV DNA and to improve liver function in hepatitis patients. However, in many cases HBV gains tolerance to LAM after long-term use,^{1–3} requiring the use of interferon in addition to conventional hepato-protective drugs.⁴ Recently, another novel nucleoside analogue, adefovir dipivoxil (ADV) was reported to have strong antiviral effects on LAM-resistant mutants.^{5–9} The active centre of reverse transcriptase of LAM-resistant HBV has a lower affinity for LAM than that of wild-type HBV,¹⁰ the most common mutations in

the YMDD motifs in association with tolerance to LAM being YIDD (rtM204I) and YVDD (rtM204V) affecting the tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) motif (amino acid 203–amino acid 206) in domain C of the polymerase region.^{10–12} HBV infection can occur with not only one, but also a mixture of viruses; but the detection and quantification of an individual HBV type is difficult, especially when the viral load differs greatly among the infected virus types.^{13,14} In this study, we have developed a unique approach to measuring mutant HBV by realtime polymerase chain reaction (PCR) using type-specific minor groove binder (MGB) probes, and applied the method to patients with chronic hepatitis B receiving additive treatment with ADV.

Methods

Patients

Four patients with chronic hepatitis B who had been treated with LAM and were later found to have breakthrough hepatitis associated with the appearance of mutated HBV were enrolled in this study. The patients initially received 100 mg of LAM every day, and then were additionally administered 10 mg of ADV once daily. At the beginning of the combination therapy of LAM and ADV, the YMDD motif mutation was found in all four cases; two also featured YIDD and the other two YVDD. The average duration of the combination therapy was 149 days (112–189 days), and the average HBV load at the beginning of the combination therapy was 7.44 log copies/mL (6.74–8.73 log copies/mL). Informed consent for participation in this study was obtained from all patients.

Extraction of hepatitis B virus DNA

Viral DNA was extracted from 200 μ L of serum using a QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Quantification of hepatitis B virus DNA

To measure the quantity of HBV DNA, AMPLICOR™ HBV MONITOR (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) was used. HBV DNA in the samples that exhibited high viral load beyond the upper limit of detection (7.6 log copies/mL) were re-examined by the 100-fold dilution method, which was validated previously.¹⁵ The overall range of our measurements spanned between 2.6 and 9.6 log copies/mL.

Type-specific minor groove binder probe assay

To measure the quantity of the wild-type strain (YMDD) and the two mutant types (YIDD and YVDD), we developed a type-specific TaqMan MGB probe assay. For this purpose, three reaction mixtures, each containing one type-specific probe, were prepared and the quantity of HBV DNA was measured by a realtime PCR method using an external standard. One mixture contained 1 \times Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (0.75 U of Platinum Taq polymerase, 20 mmol/L of Tris-HCl [pH 8.4], 50 mmol/L of KCl, 200 μ mol/L of each dNTP), 0.4 μ mol/L of a sense primer (HBV-MGB2-S: 5'-TCCTATGGGAGTGGGCCTC-3'), 0.4 μ mol/L of an anti-sense primer (HBV-MGB-AS: 5'-GTACAGACTGGCCCC AAWAC-3'), 0.4 μ mol/L of a type-specific TaqMan MGB probe (YMDD: 5'-FAM CTTTCAGTTATATGGATGAT MGB-3', YIDD: 5'-FAM CTTTCAGTTATATGGATGAT MGB-3', YVDD: 5'-FAM TTTTCAGTTATGTTGGATGAT MGB-3') and 4.0 mmol/L MgCl₂. The total volume was adjusted to 25 μ L by adding 5 μ L of a DNA sample (or external standard) and DNase- and RNase-free water. Realtime PCR was performed using a 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min and 95 °C for 2 min for the initial period and then 95 °C for 25 s and

62 °C for 60 s for 45 cycles. Regarding analytical conditions for the 'baseline', three cycles for 'start' and 15 cycles for 'stop' were used. The threshold concentration was designated as 0.005 for both YMDD and YIDD and 0.02 for YVDD. HBV DNA concentrations were presented as log copy numbers in 1 mL of serum (log copies/mL).

External standard

In order to construct three external standards for the three type-specific reactions, PCR products from each of the three strains were obtained using the primer sets of HBV-MGB-2 and HBV-MGB-AS, and then inserted into the pGEM T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Each plasmid was linearized by *SacI* digestion and copy numbers were assessed by absorption spectrophotometry and adjusted to 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 and 2×10^9 copies/mL. Five microlitres of each concentration was added to the reaction mixture as described above.

Amplification of the hepatitis B virus DNA polymerase region by polymerase chain reaction

The YMDD motif was analysed by direct sequencing after amplification of the HBV DNA polymerase region, performed in 25 μ L of a reaction mixture containing 1 \times PCR Master Mix (Promega) (50 U/mL of Taq DNA polymerase in a supplied reaction buffer [pH 8.5], 400 μ mol/L of each dNTP, 3 mmol/L MgCl₂), 0.4 μ mol/L of a sense primer (HBV-1-S: 5'-TGGCTATCGCTGGATGTGTCT-3'), 0.4 μ mol/L of an anti-sense primer (HBV-3-AS: 5'-CGGGC AACGGGTAAGG-3') and 5 μ L of sample DNA. The reaction was performed with a GeneAmp™ 9700 (Applied Biosystems) at 94 °C for 2 min for the initial incubation, 94 °C for 30 s for denaturing, 57 °C for 30 s for annealing, 72 °C for 30 s for extension for 40 cycles and a final extension step of 72 °C for 7 min. The PCR product of 794 bp was confirmed on a 2% agarose gel.

Amplification of the hepatitis B virus DNA polymerase region by nested polymerase chain reaction

When any PCR product was not observed by the above method, nested PCR was performed using 1 μ L of the first PCR product with a sense primer (HBV-5-S: 5'-CCCTC WGTGCTGTACAAAACCT-3') and an anti-sense primer (HBV-1-AS: 5'-AAAGGCATTAAGGCAGGATA-3') under the same conditions as for the first round of PCR. The nested PCR product of 505 bp was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Sequence analysis of the YMDD motif

PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH) before sequence analysis using a BigDye Terminator cycle sequence kit version 3.1 (Applied Biosystems) with HBV-5-S as the sequence primer. After the reaction, the sample was treated with a DyeEX 2.0 Spin kit (QIAGEN GmbH), and was electrophoresed in an ABI PRISM genetic analyzer 310 (Applied

Biosystems). The amino acid sequence was determined with DNA sequencing analysis software version 3.0 (Applied Biosystems). When mixed bases were read on the same position, the nucleotide sequences were determined according to all visible peaks and translated into amino acids.

Results

Linearity

The linearity of HBV DNA quantification by the present method was confirmed by measuring serial dilution of plasmids carrying PCR products of YMDD, YIDD and YVDD strains. The dilution curve was linear between 1.0 and 7.0 log copies for each strain (Figure 1).

Specificity

In order to study the specificity of the YMDD-specific HBV DNA quantification, the three reaction mixtures, each

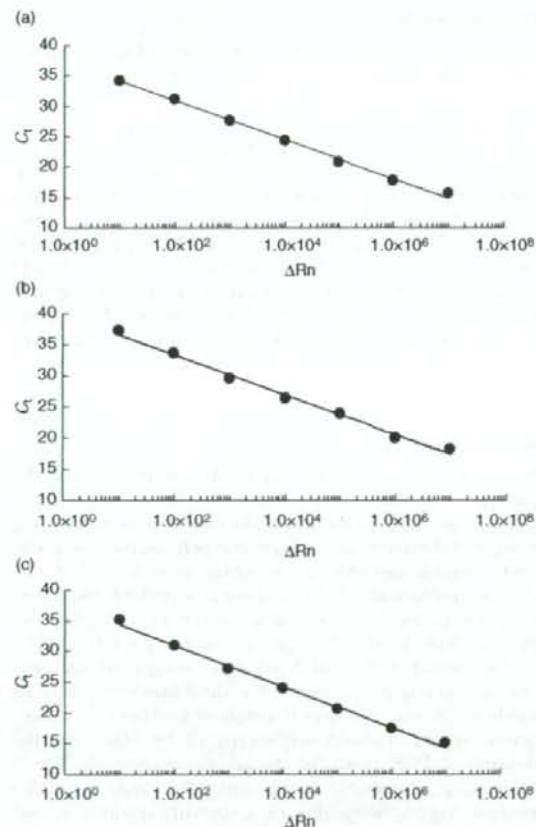


Figure 1 Dilution curves by titration of linearized plasmids. Type-specific TaqMan minor groove binder probe assays using a plasmid corresponding to YMDD motif (a), YIDD (b) and YVDD (c)

containing one type-specific probe, were added with DNA (6.0 log copies) from the YMDD strain, and measurement was conducted as described above. When the combination of probe and HBV DNA type was matched, an increase in delta-normalized reporter (ΔRn) beyond 0.05 was observed. In the case of a mismatched probe, the intensity was below 0.02 (Figure 2). For YIDD and YVDD strains, the same procedures were performed, and comparable results were obtained.

Reproducibility

When HBV DNA quantification was carried out 10 times for the same sample, the coefficients of variation were 1.0% for YMDD, 2.2% for YIDD and 1.9% for YVDD.

Comparison with a commercial kit

The present method was compared with a commercial PCR kit (AMPLICOR™ HBV MONITOR) using serum samples from patients ($n=14$) with chronic hepatitis B who were not treated with LAM. Because all patients had YMDD

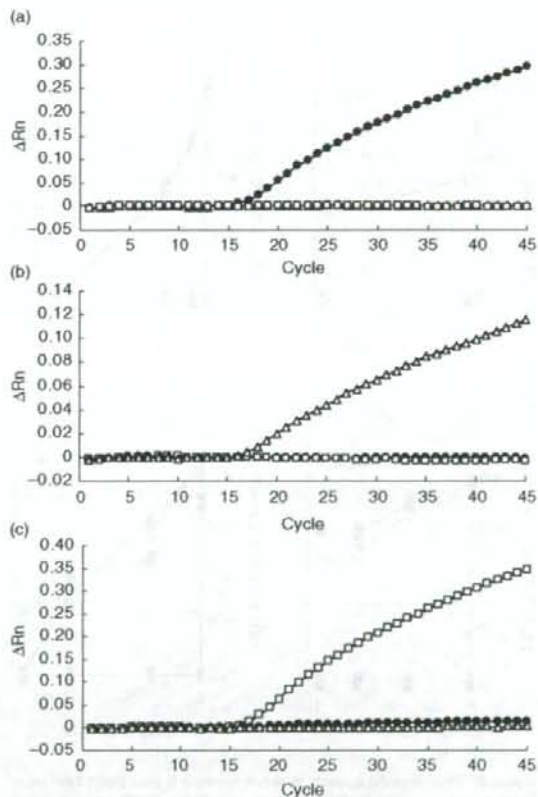


Figure 2 Specificity of YMDD (a), YIDD (b) and YVDD (c) specific TaqMan minor groove binder probe assays. Symbols represent linearized plasmids corresponding to YMDD (●), YIDD (△) and YVDD (□).

Table 1 A comparison of hepatitis B virus mutant types obtained by type-specific TaqMan minor groove binder (MGB) probe assay and direct sequencing

Direct sequencing	TaqMan MGB probe assay					ND
	YMDD	YIDD	YVDD	Y[M/I]DD	Y[M/I/V]DD	
YMDD	39			1		
YIDD		34		1		
YVDD			14			
Y[M/I]DD	1	1		3		
Y[M/I/V]DD		2	2		4	
ND						7

ND, not detected

strains but no YIDD or YVDD strains, only values for the YMDD strain were compared. A strong correlation was found between the two assays ($y = 0.972x + 0.214$, $r = 0.98$, $P < 0.001$).

Sensitivity

Two of the three linearized plasmid solutions, containing sequences corresponding to YMDD, YIDD or YVDD, were

mixed at mixing ratios of 100:100 (7.6 log copies each), 100:10, 100:1, 10:100 and 1:100. The resulting three sets of plasmid mixtures (YMDD vs. YIDD, YMDD vs. YVDD and YIDD vs. YVDD) were then measured. The plasmid corresponding to YMDD (or YIDD) was detectable and measurable down to 1% of YIDD and YVDD (or YMDD and YVDD). The plasmid corresponding to YVDD was detectable to 1% of YMDD and YIDD, but measurable only at 10%.

Comparison with conventional direct sequencing

Both the MGB probe assay and direct sequencing were performed for 109 chronic hepatitis B patients on LAM therapy (Table 1). HBV DNA was detected in 102 (93.6%) of the samples, and identical results were obtained for 90 (88.2%) patients with both methods. In the other 12 samples, direct sequencing resulted in overestimation in 10 cases (9.8%) and underestimation in two (2.0%), in comparison with the type-specific MGB probe assay.

Clinical course

The HBV load was measured after combined therapy with LAM and ADV in the four patients who had LAM-resistant mutant HBV(s) (Figure 3). In three (cases 1-3), a single mutant strain was detected by direct sequencing, and the same type was detected and quantified by type-specific MGB probe assay. In the other case (case 4), suggested by direct sequencing to have multiple mutants, both YIDD and YVDD were individually detected and successfully quantified by the type-specific MGB probe assays. At the beginning of the combination therapy, YVDD mutants were found by this method to be predominant, but YIDD mutants had become more common by day 91. In all cases, the wild-type HBV remained below the detection limit at all time points during the study.

Discussion

Natsuizaka *et al.*¹⁶ earlier reported that monitoring the pattern of YMDD motif mutations is useful because changes, such as an accumulation of a specific strain or a change of dominant strain type, can help predict the prognosis. Several methods for detecting mutant HBV strains that are resistant to LAM have been reported. Of the different possibilities, the PCR-restriction fragment length polymorphism method,¹⁷ line probe assay,¹⁸ peptide nucleic acid-mediated PCR¹⁹ and direct sequencing assay are used only for qualitative purposes. The dominant strain may be predicted by reading the peak height or peak area of an electropherogram of direct sequencing or by observing the density of PCR products on gel electrophoresis. Direct sequencing, however, cannot quantify mutant strains because electropherograms are essentially qualitative, and also because no standard method is available for the evaluation of mixed bases. Amino acid sequences cannot be identified when mixed bases are observed in the same codon.

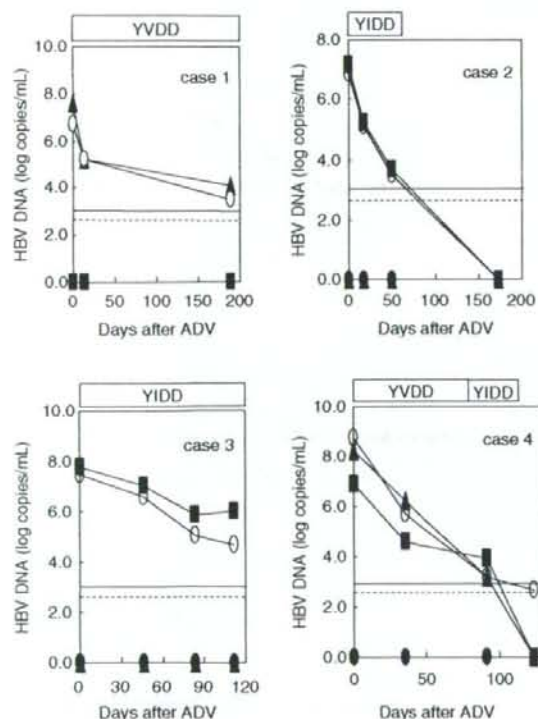


Figure 3 Change in the quantity of serum hepatitis B virus (HBV) DNA monitored by type-specific TaqMan minor groove binder (MGB) probe assay in patients treated with adefovir dipivoxil. Horizontal lines represent the detection limits of type-specific TaqMan MGB probe assay (---) and Amplicor HBV Monitor (—). Symbols represent YMDD DNA (*), YIDD DNA (■), YVDD (▲) and Amplicor HBV Monitor (○)

In our present study, quantification of each strain of HBV DNA proved possible with realtime PCR using a unique TaqMan MGB probe for each mutant strain. TaqMan MGB probe was constructed with a fluorescent reporter dye at the 5' end and with a non-fluorescent quencher and MGB at the 3' end. A non-fluorescent quencher is thought to contribute to lower noise in comparison with a fluorescent quencher. The MGB in the probe, on the other hand, elevates the melting temperature (T_m) through binding to the double-stranded DNA composed of the probe oligonucleotide and the single-stranded target DNA. For this reason, the MGB probe gives a significant change in T_m even when only a single mismatch exists in the target, and thus can be used for single nucleotide polymorphism analysis.²⁰ As the YIDD and YVDD motifs were both generated from the YMDD motif by single base mutations (M204I: ATG→ATT, M204V: ATG→GTG), this property of the MGB probe was advantageous for our assay. Actually, when the TaqMan MGB probe was changed from a regular one in our experiment, we confirmed that the T_m value was elevated from 40.4–46.2°C to 63.1–65.3°C using the MGB probe. The latter temperature zone meets the requirement of realtime PCR.

Punia et al.²¹ reported a method for quantification of LAM-resistant HBV DNA by realtime amplification refractory mutation system PCR. In comparison with their method, our approach provides a better absolute detection limit: 3 vs. 4 log copies/mL of serum. However, regarding relative detection limits, they reported 0.01% of total HBV for YIDD, while ours were 1.0% for YMDD and YIDD, and 10% for YVDD. A possible explanation for the poor relative detection limit of our method is that the specific binding of the probe to the target strain suffers from competition by other strains that are inferior in affinity for the probe but present at a larger copy number than the target. Another realtime PCR assay based on melting curve analysis using fluorescent biprobe hybridization has been reported.²² This assay gives the ratio of copy numbers of HBV mutants to the total HBV, but not the concentration of HBV mutants. As T_m is influenced by any type of mismatch under the probe, a mismatch adjacent to the YMDD sequence can affect the measurement.

Using conventional sequencing, we overestimated the number of strains in 9.8% of the studied samples and underestimated in 2.0%, when compared with our proposed method. The overestimated samples possessed mixed bases within a codon, presumably due to the presence of multiple mutants or to a simple drift of the baseline in electropherograms. The underestimation with our sequencing method might possibly be due to its low sensitivity relative to our proposed method.

When we applied our method to patients with chronic hepatitis B who received additional ADV after the emergence of LAM-resistant mutants, we could successfully quantify the mutant types in cases 1–3 in good accordance with the results of AMPLICOR™ HBV MONITOR and direct sequencing. The merit of our method, however, was confirmed best in case 4, whose dominant HBV was determined as a YVDD strain by direct sequencing at the start of ADV administration; but was found by our method to

shift to YIDD and YVDD strains in variable proportions during the course of treatment. Briefly, the YVDD was about 1 log larger than the YIDD at the beginning of ADV administration; while on day 90, the YIDD was about 1 log larger than the YVDD. This change in the strain type during the treatment is of interest because it is reported that tolerance to LAM differs depending on the mutant type.²³ If YVDD were more susceptible to ADV than YIDD, the observed change in the strain type in case 4 would be well explained. A previous report using molecular modelling which provided evidence that the mutant type is more susceptible to ADV than the wild type supports this possibility.²⁴

In conclusion, the present method can provide type-specific and quantitative information on multiple HBV strains quickly and reliably. Because drug resistance is a major hazard in anti-HBV therapy, this method might be useful for clinical purposes to monitor change in HBV mutant type in patients treated with anti-HBV drugs.

REFERENCES

- Zoulim F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *J Clin Virol* 2001;21:243–53
- Papatheodoridis CV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1618–28
- Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000;33:469–75
- Akuta N, Tsubota A, Suzuki E, et al. Long-term prognosis by lamivudine monotherapy for severe acute exacerbation in chronic hepatitis B infection: emergence of YMDD motif mutant and risk of breakthrough hepatitis – an open-cohort study. *J Hepatol* 2003;38:91–7
- Maynard M, Parvaz P, Durantel S, et al. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J Hepatol* 2005;42:279–81
- Westland CE, Yang H, Delaney WE, et al. Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients. *J Viral Hepat* 2005;12:67–73
- Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* 2000;32:129–34
- Barcena Marugan R, Cid Gomez L, Lopez Serrano P. Use of adefovir in the treatment of the chronic hepatitis B virus infection with resistance to lamivudine. *Transplant Proc* 2003;35:1841–3
- Qaish RB, Mattes KA, Ritchie DJ. Adefovir dipivoxil: a new antiviral agent for the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Ther* 2003;25:3084–99
- Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004;64:1–15
- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Lamivudine Clinical Investigation Group. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistance to lamivudine. *Hepatology* 1998;27:1670–7
- Fu L, Liu S-H, Cheng Y-C. Sensitivity of L-(-)-2',3'-dideoxythiacytidine resistant hepatitis B virus to other antiviral nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1351–9
- Kobayashi S, Shimada K, Suzuki H, Tanikawa K, Sata M. Development of a new method for detecting a mutation in the gene encoding hepatitis B virus reverse transcriptase active site (YMDD motif). *Hepatol Res* (the official journal of the Japan Society of Hepatology) 2000;17:31–42
- Yuen M-F, Kato T, Mizokami M, et al. Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. *J Hepatol* 2003;39:850–5

- 15 Yoshida S, Yamada Y, Fujisawa S, *et al.* Dilution-PCR method for wide-range quantitation of HBV DNA. *Acta Hepatologica Japonica* 2002;43:482-6
- 16 Natsuizaka M, Hige S, Ono Y, *et al.* Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepat* 2005;12:154-9
- 17 Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, *et al.* Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999;83:181-7
- 18 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, *et al.* Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-7
- 19 Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, *et al.* Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002;37:259-65
- 20 Kutuyav IV, Afonina IA, Mills A, *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000;28:655-61
- 21 Punia P, Cane P, Teo C-G, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* 2004;40:986-92
- 22 Umeoka F, Iwasaki Y, Matsumura M, *et al.* Early detection and quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by fluorescent biprobe hybridization assay in lamivudine-treated patients. *J Gastroenterol* 2006;41:693-701
- 23 Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, *et al.* YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999;29:939-45
- 24 Yadav V, Chu CK. Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study. *Bioorg Mol Chem Lett* 2004;14:4313-17

(Accepted 12 April 2007)