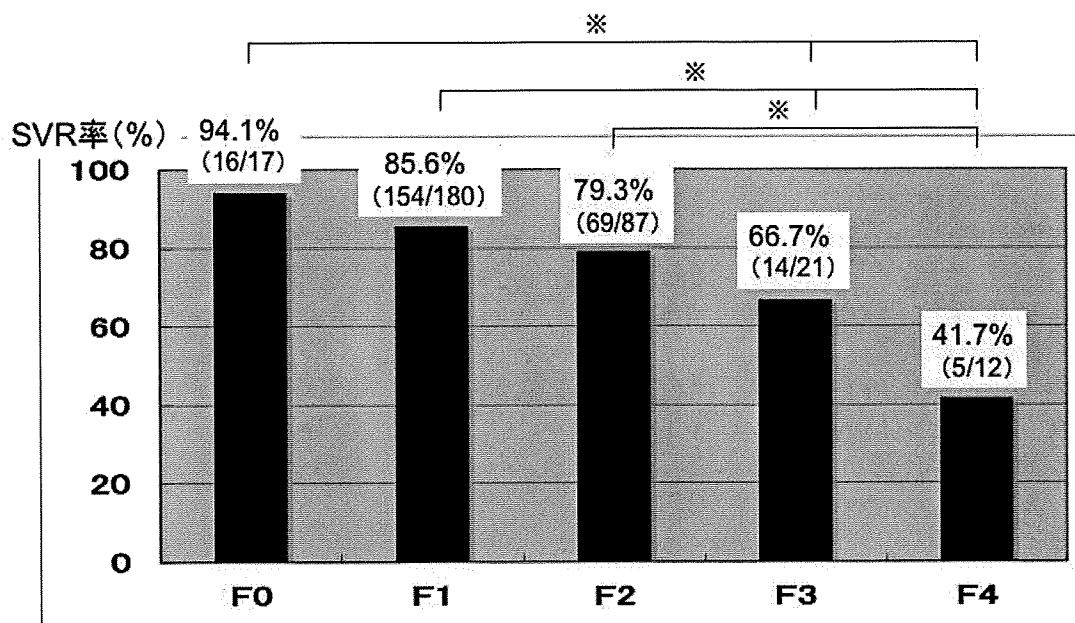
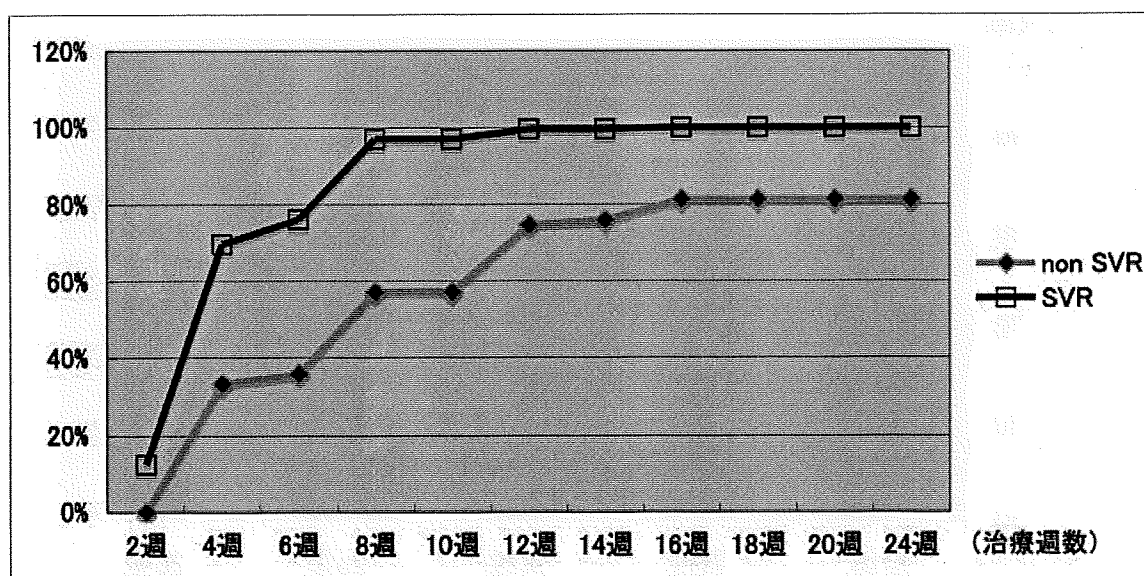


図 2
 ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン +
 リバビリン併用療法における、肝線維化別の治療効果 (n=396)



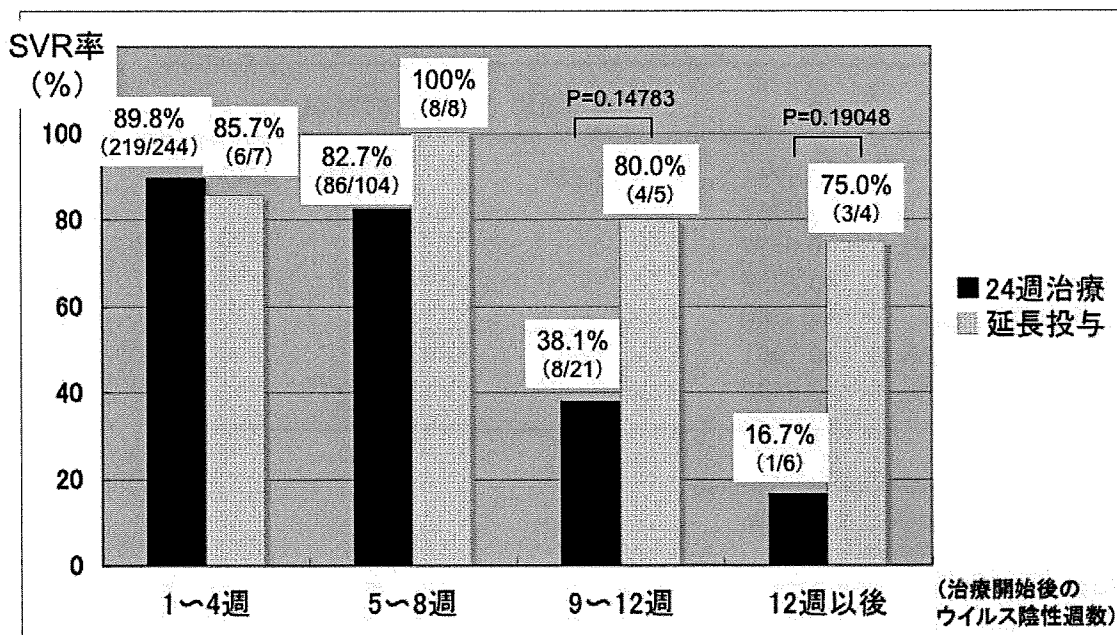
※ p<0.05
 SVR: sustained virological response

図 3
 ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン +
 リバビリン併用療法における、SVR症例と non SVR症例のウイルス消失率
 (n=396)



SVR: sustained virological response

図 4
 ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン + リバビリン併用療法における、ウイルス陰性化時期別のSVR率
 24週標準治療群と延長投与群の比較



SVR: sustained virological response

表 2
 ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン + リバビリン併用療法のSVRに寄与する因子 (n=396)

	SVR	non SVR	p
慢性肝炎：肝硬変	290:9	62:8	0.00654
IFN治療歴 (+) : (-)	46:272	24:51	0.00072
年齢 (歳)	50.0±13.3	56.3±9.7	0.00019
血小板数 (x10 ⁴ /mm ³)	18.5±5.5	16.2±5.5	0.00026
ALT (IU/l)	93.1±85.4	66.3±89.9	0.02058
アルブミン (g/dl)	4.1±0.4	4.0±0.4	0.01229
HCV RNA量 (logIU/ml) (Taq Man)	6.1±0.6	6.4±0.5	0.00504
RBV adherence (%)	92.6±15.0	87.3±20.1	0.03922
RVR	219/321 (68.2%)	25/75 (33.3%)	0.0000

RBV : ribavirin

RVR : rapid virological response

表 3

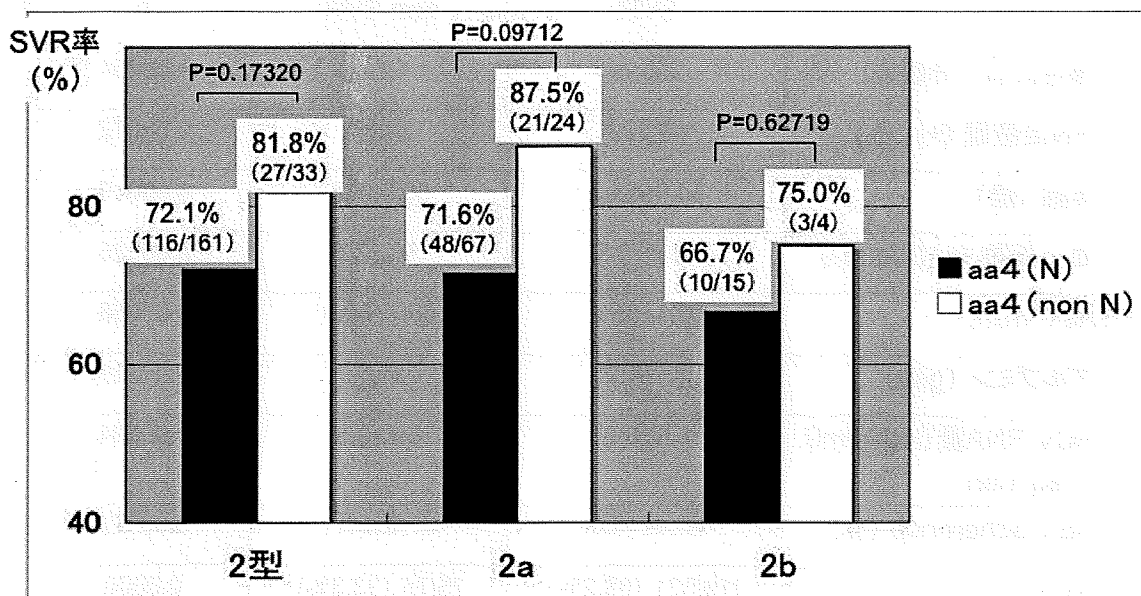
ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン + リバビリン併用療法。多重ロジスティック回帰分析によるSVRに寄与する因子 (n=396)

	p	オッズ比	95%CI
RVR	0.0151	3.224	1.279 - 8.600
年齢 (歳)	0.8331		
血小板数 (x10 ⁴ /mm ³)	0.0577		
ALT (IU/l)	0.1857		
アルブミン値 (g/dl)	0.4031		
HCV RNA量 (TaqMan)	0.1661		
RBV adherence (%)	0.9182		

SVR : sustained virological response
 RVR : rapid virological response
 CI : confidence interval
 RBV : ribavirin

図 5

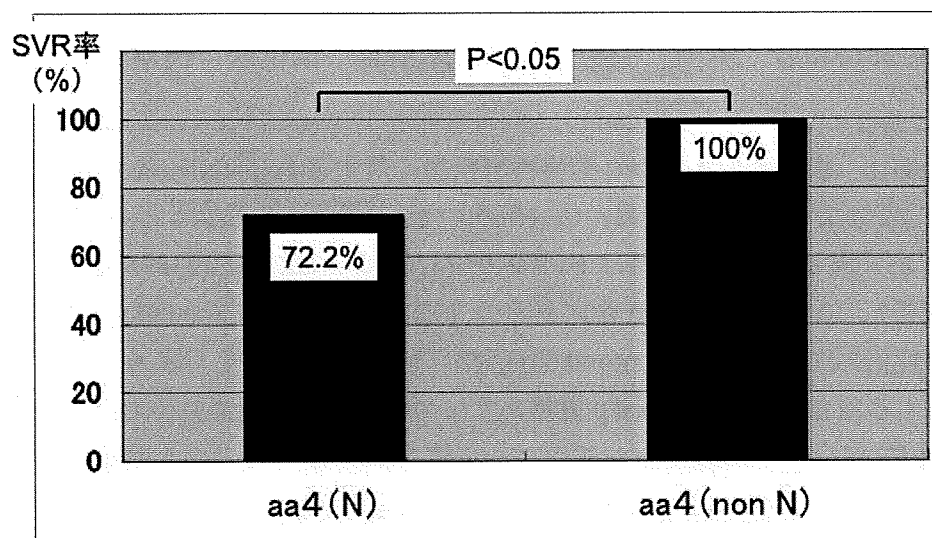
HCVコア領域アミノ酸4番測定症例194例 (2a=91、2b=19)における、ペグインターフェロン + リバビリン併用療法の治療効果とアミノ酸変異の関係



SVR : sustained virological response
 aa4 : HCVコア領域アミノ酸4番
 N : アスパラギン

図 6

ジェノタイプ2a、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法RVR症例における、SVRとHCVコア領域アミノ酸4番変異の関係



RVR : rapid virological response
 SVR : sustained virological response
 aa4 : HCVコア領域アミノ酸4番
 N : アスパラギン

表 4

ジェノタイプ2型、高ウイルス量のC型肝炎に対する、ペグインターフェロン + リバビリン併用療法 (n=396)
 多重ロジスティック回帰分析によるRVRに寄与する因子

	p	オッズ比	95%CI
aa4 non N	0.0309	3.362	1.109 - 10.357
年齢 (歳)	0.5768		
血小板数 (x10 ⁴ /mm ³)	0.9784		
ALT (IU/l)	0.0542		

RVR : rapid virological response
 CI : confidence interval
 aa4 : HCVコア領域アミノ酸4番
 N : アスパラギン

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

共同研究報告書

ISDR の変異・Core(aa70、aa91)置換からみた 1b、高ウイルス量の治療効果

研究分担者 茶山 一彰 広島大学病院 消化器・代謝内科

研究要旨：Genotype 1b、高ウイルス量の C 型慢性肝疾患に対する Peginterferon α 2b/Ribavirin(PEG-IFN α 2b/RBV)併用の治療効果を ISDR の変異・Core(aa70、aa91)置換から検討する多施設共同の観察研究を行った。対象は 853 例で、全体の成績は SVR49.9%(426 人)、TR27.9%(238 人)、NVR22.2%(189 人)であった (ITT 解析)。SVR に寄与する独立要因は ISDR 変異数(≥ 2)($p < 0.001$)、Core aa70 置換なし($p < 0.001$)、性別(男性)($p < 0.001$)、年齢(若い)($p < 0.001$)、総コレステロール値 (高い) ($p = 0.002$)の 5 因子であり、NVR に寄与する独立要因は Core aa70 置換あり($p < 0.001$)、ISDR 変異数(0,1)($p = 0.015$)、 γ GTP 高い($p < 0.001$)、血小板数 (低値) ($p = 0.032$)、総コレステロール値 (高い) ($p = 0.002$)の 5 因子であった。Core aa70 置換、ISDR 変異数 SVR および NVR における有力な予測因子であった。また、Core aa70 と γ GTP、代謝性因子は関連しあっており、これらを総合的に判断し治療を行うことが必要である。

A. 研究目的

Genotype 1b、高ウイルス量の C 型慢性肝疾患に対する Peginterferon α 2b/Ribavirin (PEG-IFN α 2b/RBV)併用の治療効果を ISDR の変異・Core(aa70、aa91)置換から検討した。

B. 研究方法

多施設共同の観察研究として行った。各施設において C 型慢性肝疾患 (肝硬変を含む) に対し PEG-IFN α 2b/RBV 併用が施行された 1177 例が登録された。その内、ISDR/Core(aa70、aa91)の測定結果、効果判定および治療内容が揃った 853 例を解析対象とした。

【検討 1】

HCV-RNA 量、ISDR 変異数および Core(aa70、aa91)の関係を比較 (Chi-squared test) し、さらに ISDR/ Core における年齢/性別の分布を観察した。Core region と NS5A-ISDR はダイレクトシーケンス法でアミノ酸配列を決定した。HCV-RNA 量は従来型の HCV Amplicor 定量法にて行った。

【検討 2】

治療前要因 (性、年齢、体重、BMI、*合併症 (高血圧、糖尿病)、*肝組織像、白血球数、Hb 値、血小板数、AST 値、ALT 値、 γ GTP 値、Alb 値、総コレステロール値、空腹時血糖、HCV-RNA 量、ISDR 変異数、Core(aa70、aa91)置換の有無、PegIFN 量、リバビリン量、スタチン併用の有無) を用いて多変量解析(Logistic

regression analysis)を行い Sustained virological response(SVR)、Non virological response(NVR) に寄与する独立要因を検討した。

治療効果判定は治療終了後 24 週経過で HCV RNA 陰性が持続している症例を SVR、治療終了時 HCV RNA 陰性であるもその後陽転化した症例を TVR、投与中一度も HCV RNA 陰性とならなかった症例を NVR と定義した。

*注合併症と肝組織像はデータが不十分のため参考値とした。

【検討 3】

Core aa70 置換と肝組織像、血小板数、ALT 値、 γ GTP 値、総コレステロール値、LDL コレステロール値の関係を比較 (Chi-squared test) した。

【検討 4】

HCV RNA 陰性化時期と ISDR の変異・Core aa70 置換の関係を検討した (Mann-Whitney U test with Bonferroni correction)。

HCV RNA 陰性化時期は、治療開始後 4 週以内で HCV RNA 陰性(HCV Amplicor 定性法)した症例を RVR、12 週以内で HCV RNA 陰性した症例を EVR と定義した。

(倫理面への配慮)

データ収集は連結不可能匿名化において行うことにより被験者の個人情報漏洩がないよう配慮した。

C. 研究結果

【検討1】

Core aa70 と aa91($p=1 \times 10^{-7}$) (図 1)、Core aa70 と ISDR 変異数($p=0.011$) (図 2)、HCV-RNA 量と ISDR 変異数($p<0.001$) (図 3) に相関関係を認めた。一方、Core aa70/aa91 と HCV-RNA 量には相関を認めなかった (図 4)。ISDR/ Core における年齢/性別の分布では、55 歳以上の女性において ISDR 変異 0,1/ Core aa70 置換ありが多くを占めていた (図 5)。また、この分布は IFN 治療歴と初回治療に分けて検討しても同様であった (図 6)。

【検討2】全体の成績は SVR49.9%(426 人)、TR27.9%(238 人)、NVR22.2%(189 人)であった (ITT 解析)。SVR に寄与する独立要因は ISDR 変異数(≥ 2)($p<0.001$)、Core aa70 置換なし($p<0.001$)、性別(男性)($p<0.001$)、年齢(若い)($p<0.001$)、総コレステロール値(高い)($p=0.002$)の 5 因子であった(表 1)。特に、ISDR 変異数、Core aa70 置換、性別は有力な SVR 予測因子であった。NVR に寄与する独立要因は Core aa70 置換あり($p<0.001$)、ISDR 変異数(0,1)($p=0.015$)、 γ GTP 高い($p<0.001$)、血小板数(低値)($p=0.032$)、総コレステロール値(高い)($p=0.002$)の 5 因子であった(表 2)。特に、Core aa70 置換、ISDR 変異数は有力な NVR 予測因子であった。

【検討3】

Core aa70 と fibrosis(F0,1/F2-4)($p<0.007$) (図 7)、Core aa70 と activity(A0-2/A3)($p=5.6 \times 10^{-5}$) (図 8)、Core aa70 と γ GTP ($p=0.001$) (図 9)、Core aa70 と ALT 値($p=0.024$) (図 10)、Core aa70 と血小板数($p=0.004$) (図 11)、Core aa70 と総コレステロール値($p=0.022$) (図 12)、Core aa70 と LDL コレステロール値($p=0.001$) (図 13) に関連を認めた。

【検討4】

RVR の割合は、ISDR 変異 0,1/ Core aa70 置換あり 4.7% (13/275 人)、ISDR 変異 0,1/ Core aa70 置換なし 5.2% (23/444 人)、ISDR 変異 ≥ 2 / Core aa70 置換あり 19% (13/67 人)、ISDR 変異 ≥ 2 / Core aa70 置換ありなし 19% (13/67 人)であった(図 14)。EVR の割合は、ISDR 変異 0,1/ Core aa70 置換あり 29% (81/275 人)、ISDR 変異 0,1/ Core aa70 置換なし 48% (215/444 人)、ISDR 変異 ≥ 2 / Core aa70 置換あり 64% (43/67 人)、ISDR 変異 ≥ 2 / Core aa70 置換ありなし 61% (41/67 人)であった (図 14)。

D. 考察

【検討1】ISDR 変異数、Core aa70、Core aa91 の間には関連がみられた。Core aa70 置換のある症例は Core aa91 にも置換のある症例が多く、また ISDR 変異が少ない(0 あるいは 1) 症例が多かった。

【検討2】ISDR 変異数、Core aa70 置換は独立に治療効果に寄与していた。ISDR 変異数は HCV-RNA 量とよく相関している (図 3) ことを考慮すれば、ISDR 変異数、Core aa70、Core aa91 の中では、Core aa70 を追加検査することが、日常診療において役立つ可能性が示唆された。

【検討3】fibrosis、 γ GTP、LDL コレステロール値などは Core aa70 置換との関連がみられた。Core aa70 のウイルス因子と宿主因子である代謝性因子との間に関連があることから、代謝性因子に対する治療介入がウイルス排除を増強する可能性が示唆された。

【検討4】

ISDR の変異が 2 以上の場合、0、1 の場合に比べ有意に RVR、EVR 率が高い。これは ISDR の変異数が多い症例は HCV-RNA 量が低値であることと関係している可能性がある (図 3)。ISDR の変異 0、1 においては、Core aa70 置換ありとなしの場合に RVR 率は同等であるが、EVR 率は Core aa70 置換なしが高かった。Core aa70 置換ない症例は、PEG-IFN α 2b/RBV 併用で SVR となる可能性がある。

E. 結論

治療効果に寄与する要因 (core aa、ISDR、 γ GTP、代謝性因子) は様々に関連しあっており、これらを総合的に理解し PEG-IFN α 2b/RBV 治療にあたる必要性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noda I, Kitamoto M, Nakahara H, Hayashi R, Okimoto T, Monzen Y, Yamada H, Imagawa M, Hiraga N, Tanaka J, Chayama K. Regular surveillance by imaging for early detection and better prognosis of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2009.45:105-112
- 2) Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 2009.51(6):1046-54
- 3) Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and

- humanized mice. *J Clin Invest* 2009.119(11):3226-35
- 4) Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hatakeyama T, Tsuge M, Kitamura S, Kimura T, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Fujimoto Y, Takahashi S, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009.39(12):1159-68
- 5) Shindo M, Chayama K, Mochida S, Toyota J, Tomita E, Kumada H, Yokosuka O, Sata M, Hayashi N, Suzuki K, Okanoue T, Tsubouchi H, Ishikawa H, Seriu T, Omata M. Antiviral activity, dose-response relationship, and safety of entecavir following 24-week oral dosing in nucleoside-naive Japanese adult patients with chronic hepatitis B: a randomized, double-blind, phase II clinical trial. *Hepatology* 2009.3:445-52
- 6) Kodama H, Aikata H, Takaki S, Azakami T, Katamura Y, Kawaoka T, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Evaluation of portosystemic collaterals by MDCT-MPR imaging for management of hemorrhagic esophageal varices. *Eur J Radiol* 2009. In press.
- 7) Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol* 2009.44(9):952-63
- 8) Tahara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Ide K, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Banshodani M, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T, Imamura M, Takahashi S, Chayama K, Ohdan H. Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int*. 2009.22(8):805-13.
- 9) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatology* 2009.39(7):657-63
- 10) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S, Hieda M, Toyota N, Ito K, Chayama K. Transarterial infusion chemotherapy using cisplatin-lipiodol suspension with or without embolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2009.32(4):687-94
- 11) Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis* 2009.1;199(11):1599-607
- 12) Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol*. 2009.50(6):1226-35.
- 13) Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA Polymers Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Blocking Viral Entry. *Gastroenterology* 2009.137(2):673-81
- 14) Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009.41(5):591-5.
- 15) Katamura Y, Aikata H, Takaki S, Azakami T, Kawaoka T, Waki K, Hiramatsu A, Kawakami Y, Takahashi S, Kenjo M, Toyota N, Ito K, Chayama K. Intra-arterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy for advanced hepatocellular carcinoma with or without three-dimensional conformal radiotherapy for portal vein tumor thrombosis. *J Gastroenterol*. 2009.44(5):492-502
- 16) Mitsui F, Aikata H, Azakami T, Katamura Y, Kimura T, Kawaoka T, Saneto H, Takaki S, Hiraga N, Tsuge M, Waki K, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K. The first Japanese case of COACH syndrome. *Hepatology* 2009.39(3):318-23.
- 17) Tsuji K, Kawakami Y, Aimitsu S, Kohno H, Aisaka Y, Kimura S, Nagata S, Ohgoshi H, Kitamoto M, Hidaka T, Kawakami H, Nakanishi T, Chayama K. Predicting the response to 48-week combination therapy with peginterferon alpha-2b plus ribavirin from the estimated HCV RNA load index after negative serum change in genotype 1b hepatitis C patients. *Hepatology* 2009.39(6):531-8

- 18) Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the core/NS5A region and virological response to interferon therapy. *J Med Virol.* 2009.81(4):640-9.
- 19) Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K, the Hiroshima Liver Study Group, and Toranomom Hospital. A Polymorphism in MAPKAPK3 Affects Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology.* 2009.136(5):1796-805
- 20) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Uka K, Azakami T, Saneto H, Jeong SC, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Hirokawa Y, Chayama K. FDG positron emission tomography/computed tomography for the detection of extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2009.39(2):134-42.
- 21) Katamura Y, Aikata H, Kimura Y, Azakami T, Kawaoka T, Takaki S, Waki K, Hiramatsu A, Kawakami Y, Takahashi S, Chayama K. Successful treatment of pulmonary metastases associated with advanced hepatocellular carcinoma by systemic 5-fluorouracil combined with interferon-alpha in a hemodialysis patient. *Hepatol Res.* 2009.39(4):415-20.
- 22) Ohira M, Ishifuro M, Ide K, Irei T, Tashiro H, Itamoto T, Ito K, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: a concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transpl.* 2009.15(2):208-15.
- 23) Kodama H, Aikata H, Takaki S, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Evaluation of patients with esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy using multiplanar reconstruction MDCT images. *AJR Am J Roentgenol.* 2009.192(1):122-30.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

共同研究報告書

肝硬変からの発癌率に及ぼすインターフェロン、SNMC、UDCA、BCAAの影響

研究分担者 森脇久隆 岐阜大学大学院医学研究科 消化器病態学

研究要旨：C型肝硬変からの発癌率に及ぼす各種薬剤（インターフェロン、SNMC、UDCA、BCAA）の影響について、班員所属施設による共同研究を行なった。集積された症例はIFN+RBV併用 257例、IFN単独 232例、肝庇護療法（SNMC、UDCA、BCAA）243例であった。各種背景因子に3群間で有意の差は見られなかった。Kaplan-Meier法で算出した肝発癌率はIFN治療（RBV併用、単独）SVR例、同NR例、肝庇護療法群の順に低値であった（ $p < 0.001$ ）。肝庇護療法の各薬剤に関する単変量解析ではBCAAに有意の肝発癌抑制効果が観察されたが、（ $p < 0.048$ ）、多変量解析では血小板数のみが有意であった（ $p = 0.031$ ）。慢性肝炎において報告されている結果とほぼ同様に、肝硬変からの発癌に対してもインターフェロンは有効な予防効果を示した。肝庇護療法については一層の検討が必要であろう。

共同研究者

永木正仁 岐阜大学消化器病態学 臨床教授

内木隆文 岐阜大学消化器病態学 助教

A. 研究目的

C型慢性肝疾患の診療上、肝硬変からの発癌予防はきわめて重要な課題である。慢性肝疾患の治療に繁用されるインターフェロン（IFN）、強力ネオミノファーゲンC（SNMC）、ウルソデオキシコール酸（UDCA）、分岐鎖アミノ酸顆粒（BCAA）などについて、慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展予防効果はほぼ確立されたといえるが、肝硬変からの発癌に及ぼす影響は、未だ十分解明されたとはいえない。この問題について班員所属施設による共同研究を行なった。

B. 研究方法

(1) 班員所属施設においてインターフェロン単独あるいはリバビリン（RBV）併用、肝庇護療法（SNMC、UDCA、BCAA）による治療を受け、明確なエンドポイント（発癌の有無）が得られるC型肝硬変についてデータの提供を受け、レトロスペクティブに各薬剤が肝硬変からの発癌に及ぼす影響を解析した。

(2) 累積発癌曲線をKaplan-Meier法で作成し、有意差検定はlog-rank法で行なった。

（倫理面への配慮）

臨床データは全て連結不能匿名化されたものである。

C. 研究結果

(1) IFN+RBV併用群 257例、IFN単独群 243例、肝庇護療法群 243例が集積された。性別、年齢、ウイルスタイプ、ウイルス量、総ビリルビン、AST・ALT値、アルブミン（それぞれ中央値が3.7g/dl, 3.7g/dl, 3.3g/dl）、血小板数、AFPに各群間で有意差はみられなかった。

(2) 肝庇護療法の内訳はSNMC 115例、UDCA 117例、BCAA 153例であった（重複を含む）。

(3) IFN+RBV併用群のSVR率は35.4%（ウイルスタイプ1、高ウイルス量では30.2%）、IFN単独群は26.9%（10.0%）であった。

(4) IFN+RBV併用群、IFN単独群の間に発癌率の差は認められなかった。両群をあわせると肝庇護療法群に比べ有意に発癌が抑制された（ $p < 0.001$ ）。またSVR、NRの順で肝庇護療法に比べ有意の発癌抑制効果を示した（図1、 $p < 0.001$ ）。

(5) 肝庇護療法の各種薬剤に関する単変量解析では、BCAAに有意の発癌抑制作用が見られた（図2、 $p = 0.018$ ）。多変量解析では血小板数、BCAA、UDCA、身長が $p_{\text{overall}} < 0.05$ の段階で残り、うち血小板数のみが $p = 0.031$ と有意の発癌抑制因子であった。

D. 考察・まとめ

(1) 従来、慢性肝炎において指摘されたと同様、肝硬変においてもIFN治療によるSVRは有意の肝発癌抑制効果を有し、NRであっても肝庇護療法群に比べ発癌率は有意に低値であった。ただしRBV併用の

有無でSVR率に差が見られたものの、発癌率の差は有意には至らず、今後一層の症例集積が必要である。
 (2) 肝庇護療法のうち、単変量解析ではBCAAが有意の肝発癌抑制効果を示したが、多変量解析では何れの治療も N.S.となった。今後さらに検討を進める必要がある。

図(上) 基線(X軸)側から順にSVR例、NR例、肝庇護療法群の累積発癌曲線を示す(p<0.001)。
 (下) 基線(X軸)側から順にBCAA群、BCAA非投与群の累積発癌曲線を示す(p<0.001)。

E. 結論

肝硬変からの発癌予防にIFNは有効であり、IFN単独・RBV併用を問わずSVRを得ることが望ましい

F. 健康危険情報

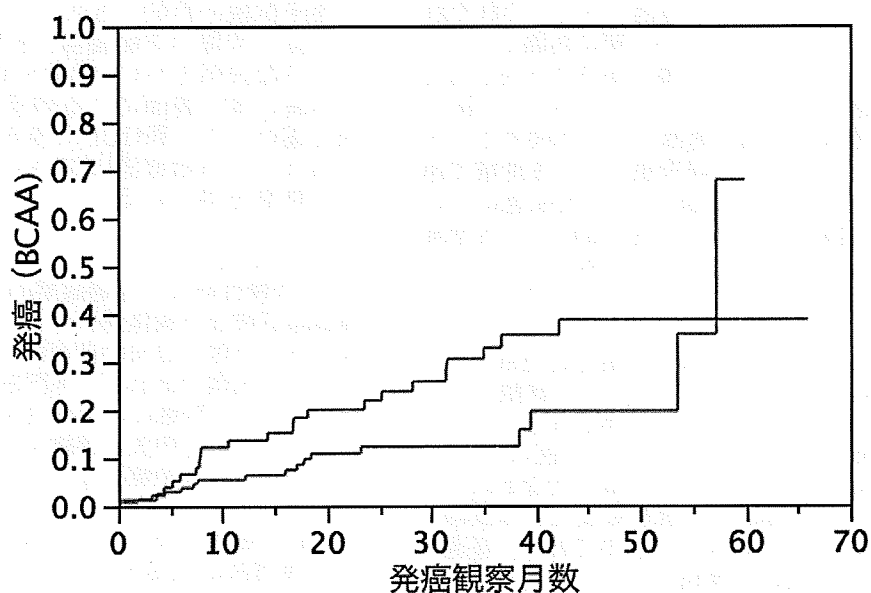
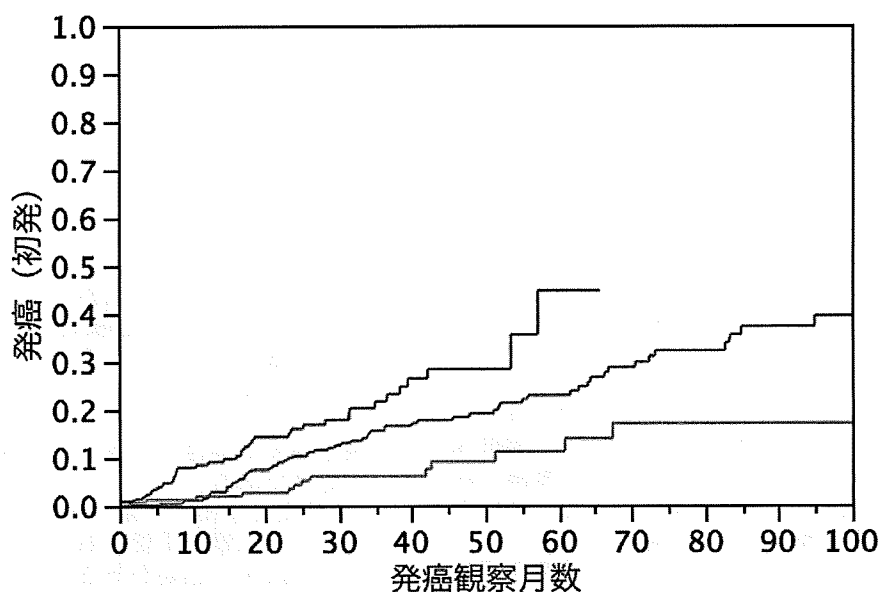
特記すべきことなし。

G. 研究発表

- 1. 論文発表
- 別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし



厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

共同研究報告書

肝疾患に対する地域医療連携パスの作成

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器科部長

研究要旨：肝疾患はB型C型慢性肝炎から肝硬変、肝癌へ進展する一連の疾患である。通院は長期にわたるが、いろいろなガイドラインが整備されて専門医とかかりつけ医がいっしょに患者の治療にあたるシステム作りが必要である。一方かかりつけ医では、いろいろな病院から異なる連携パスを持ってこられると混乱の原因となる。そこで、地域で共通の連携パスを作りこんでいくことが重要である。研究班で連携パスの案を示した方がよいであろうとのことで、慢性肝炎経過観察のためのパス、B型慢性肝炎治療の連携パス、難治性C型慢性肝炎治療の連携パス、インターフェロン単独治療のパス、肝硬変にたいする連携パス、肝癌治療後の再発早期発見のパスを作成した。実際には各地域で話し合っ、連携パスを実情にあうように作りこみ、協議会で運用していくことが必要であろう。

共同研究者

黒崎雅之 武蔵野赤十字病院消化器科副部長
朝比奈靖浩 武蔵野赤十字病院消化器科部長

A. 研究目的

ウイルス性肝疾患はB型およびC型慢性肝炎から肝硬変や肝癌にいたる一連の流れをたどる。通院は長期にわたるが、さまざまなガイドラインが整備されている。また、地域においては専門医が不足しているところがあり、医療連携によって診療を行なうことにより、専門医とかかりつけ医がいっしょに診療を行なう体制作りが必要である。しそこで連携パスが重要な役割を担うことになる。しかし、連携パスは、それぞれの地域で専門医とかかりつけ医と一緒に討議して、九通の認識を作り上げることが必要であることや、病院ごとに異なる連携パスが存在すると、かかりつけ医が混乱するため、地域で共通の連携パスを作成することが需要である。そこで、この研究班では、各地域で連携パスが作成されることを前提として、肝疾患についての連携パスの案を作成することを目的とし、各地域での運用が行ないやすくすることを目的とした。

B. 研究方法

- (1) B型慢性肝炎については、厚生労働省研究班のガイドラインに順じて、インターフェロンと核酸アナログ内服の療法のものを作成する必要がある。
- (2) C型慢性肝炎については、かかりつけ医のもとで経過観察や肝庇護を中心とした治療が行なわれていることが多く、定期的な腹部超音波など画像診断をうけるようなシステム作りが必要である。経過観察では主として定期的な腫瘍マーカー測定や画像診断によって肝癌の早期発見を目的としたものを作成した。
- (3) 難治性C型慢性肝炎においては、ペグインターフェロン注射とリバビリン内服併用療法が主とし

て行なわれている。そこで、専門医とかかりつけ医が協力してこの併用治療が行なえるような連携パスを作成することが重要と思われる。治療の導入は専門医で行い、通院加療はかかりつけ医が行なうような連携パスを作成する。

(4) 肝硬変に関しては、インターフェロンが適応になる場合もあり、さらに腹水や食道静脈瘤などの治療を要する場合があるため、多様な連携パスの作成が必要である。

(5) 肝癌治療後は再発を早期発見したり、再発抑止のための対策が重要である。これらを盛り込んだパスを作成する必要がある。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報・守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

- (1) C型慢性肝炎の経過観察のための連携パスは、腹部超音波など画像診断を含んだものを作成した。かかりつけ医は自分の診療所で腹部超音波を行なうことが困難であれば、専門医と連携して画像診断をおこない、肝癌の早期発見を目的とする検査をいれた。また、専門医と連携することで、必要時にインターフェロン治療をすすめられる体制作りをめざした。
- (2) B型慢性肝炎では、治療適応や治療方法については専門医が決定することが多いと考え、治療開始後の連携パスを作成した。インターフェロンによる治療と、核酸アナログ内服によるものを作成した。定期的にHBVDNA量を測定し、耐性変異の出現のチェックと、自己中断を防ぐことを盛り込んだ。

(3) 難治性 C 型慢性肝炎ではペグインターフェロンとリバビリン併用治療が第一選択であるため、投与量の選択や採血検査の項目、副作用の早期発見と対処方法について連携パスに入れ込むことをめざした。

(4) 肝硬変では、ウイルス型や量によってインターフェロンが適応となるため、インターフェロンを含むパスを作成した。また、アルブミン低下による腹水貯留や、黄疸、食道静脈瘤の出現などが懸念されるため、これら合併症の定期的チェックを盛り込んだ。

(5) 肝癌ではラジオ波焼灼術や切除によって根治ができた場合でも、再発の頻度が高い。再発を早期に発見するための画像診断や、再発抑制のための治療を含んだ連携パスを作成した。

D. 考察

(1) C 型慢性肝炎に対してインターフェロンの医療費助成が開始されたが、助成をうける症例が十分ではない。これはかかりつけ医に対する情報提供が不十分である可能性があり、専門医との連携を蜜にする必要がある。連携パスはすでに他疾患で導入されているが、肝疾患は専門医とかかりつけ医が連携して治療にあたるのに相応しい疾患である。

(2) B 型慢性肝炎については治療適応の決定や治療法の選択は専門医が行なうことを想定して、インターフェロンと核酸アナログ内服による治療を連携で行なうようにパスを作成した。

(3) C 型慢性肝炎に対しては、経過観察で画像診断を入れて肝癌早期発見を主眼とした連携パスを作成した。その中で、専門医がインターフェロン治療適応例を見出して、治療を勧めていくことが可能と考えられる。

(4) 難治症例に対してペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行なう場合には、患者の利便性と専門医の判断を両立させるために、連携パスが有効と考えられる。連携パスの導入によって治療をうける患者数が増加することを期待する。

E. 結論

肝疾患は連携パスに向けた疾患であり、専門医とかかりつけ医が共同で治療にあたるシステム作りに貢献し、肝癌撲滅の一助となると期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

(1) 板倉潤、朝比奈靖浩、玉城信治、平山慈子、田中智大、安井豊佐藤光明、細川貴範、上田研、池田裕喜、

土谷薫、中西裕之、黒崎雅之、榎本信幸、泉並木. HCV 治療早期ダイナミクスからの治療効果予測を根拠とした治療戦略 第 45 回日本肝臓学会総会一般演題 2009.

(2) 平山慈子、朝比奈靖浩、玉城信治、佐藤光明、田中智大、安井豊、細川田貴範、池田裕喜、上田研、土谷薫、中西裕之、板倉潤、高橋有香、黒崎雅之、泉並木. C 型慢性肝炎への PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因・再燃寄与因子とその対策. 第 45 回日本肝臓学会総会一般演題 2009.(3) 朝比奈靖弘、黒崎雅之、泉並木. C 型肝炎治療：ペグインターフェロン・リバビリン併用療法 第 45 回日本肝臓学会総会コンセンサスミーティング 2009.

1. 論文発表

1) Izumi N, Nishiguchi, Hino K, Suzuki F, Kumada K, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of Hepatitis C: Consensus of Japan Society of Hepatology 2009 Hep Res in press.

2) Kuroski M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N. A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. Hep Res in press.3) Itakura J, Kuroski M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems 2009 12. 4) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kuroski M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology. 2008;134:1396-405.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

B 型肝炎における線維化進展度と治療効果の評価のための肝硬度測定の有用性について

研究分担者 吉岡健太郎 藤田保健衛生大学 肝胆膵内科 教授

研究要旨：B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療による肝線維化の改善を非侵襲的に評価するため、核酸アナログ治療開始後の肝硬度の変化を Fibroscan により検討した。核酸アナログ治療により治療前に比較して治療終了後に肝硬度が有意に低下していた。核酸アナログ未治療例では肝硬度が上昇する傾向がみられた。Fibroscan による肝硬度の測定は、核酸アナログ治療による肝線維化改善や自然経過における肝線維化の進展の評価に有用であることが示された。

A. 研究目的

Fibroscan により非侵襲的に測定される肝硬度は、肝線維化進展度 (stage) と相関することが報告されている。また、B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療により肝線維化が改善することが報告されている。しかし、治療開始後に繰り返し肝生検をすることは困難である。そこで核酸アナログ治療による肝線維化の改善を非侵襲的に評価するため、核酸アナログ治療開始後の肝硬度の変化を Fibroscan により検討した。また核酸アナログによる治療を行っていない患者において自然経過における肝硬度の変化を検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

2004 年 11 月から 2009 年 10 月までに当大学病院にて肝硬度測定を行った B 型慢性肝炎患者 270 例 (男性 181 例、女性 89 例、年齢 49.7 ± 13.8 歳) を対象とした。なお、肝生検施行例は 43 例である。また、そのうち肝硬度を 2 回以上測定できた 80 例 (核酸アナログによる治療群：28 例、未治療群：52 例) では、肝硬度の変化を検討した。

(2) 方法

Echosens 社製 Fibroscan を用い、被検者の右肋間にて肝硬度 (kPa) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では医療保険の適応が認められている範囲で治療が行われた。Fibroscan は非侵襲的に肝硬度を測定でき、患者に苦痛や健康被害をきたすものではない。また患者の個人情報の守秘については十分な注意を払った。

C. 研究結果

肝硬度は、ヒアルロン酸、AST、ALT、 γ -Glb は正相関を示し、PT、血小板、Alb は負の相関を示した ($p < 0.0001$)。

各肝線維化 stage 間の肝硬度を比較すると、F4 の肝硬度は F1、F2、F3 に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$)。また、肝硬度と肝線維化 stage は有

意な正の相関を示した ($r = 0.666$, $p < 0.0001$)。

ROC 解析により、各肝線維化 stage のカットオフ値は F4：16.0kPa 以上、F3：10.7kPa 以上、F2：6.7kPa 以上と設定された。

肝硬度の変化の検討では、核酸アナログ治療群の初回時の肝硬度は 13.9 ± 7.8 kPa であったのに対し、最終検査時には 7.9 ± 5.1 kPa と有意に低下した ($p < 0.0001$)。一方、未治療群では、初回時の肝硬度は 6.8 ± 4.3 kPa、最終検査時は 7.8 ± 5.1 kPa であり、有意差は認められなかったものの上昇する傾向であった ($p = 0.0682$)。さらに、両群の変化率をみると、治療群：38.1 \pm 22.1%、未治療群：-25.3 \pm 67.% であり、両者の間に有意差を認めた ($p < 0.0001$)。

各肝線維化 stage のカットオフ値をもとに肝硬度から肝線維化 stage 推定し (推定 stage)、その変化を検討した。核酸アナログ治療群 28 例のうち推定 stage 低下 16 例 (57.1%)、変化なし 12 例 (42.9%) であったのに対し、未治療群 52 例では、推定 stage 低下 8 例 (15.3%)、変化なし 33 例 (63.5%)、上昇 11 例 (21.2%) であった。さらに 2stage 以上の変化は、核酸アナログ治療群では低下 10 例であり、未治療群では低下 1 例、上昇 3 例であった。

D. 考察

肝硬度は、血液線維化マーカーや肝生検による肝線維化 stage と有意な相関関係を示し、B 型慢性肝炎の肝線維化 stage の評価に有用と考えられた。また、治療による変化を検討すると核酸アナログ治療群では肝硬度は有意に低下し、未治療群では上昇する傾向であった。これらの結果より、肝硬度測定は治療効果の評価や自然経過における肝線維化の進展の評価においても有用であることが示唆された。

E. 結論

肝硬度の測定により B 型慢性肝炎の肝線維化

stage を非侵襲的に評価することができることが示された。肝硬度を経時的に測定することにより、核酸アナログ治療による肝線維化の改善や自然経過における肝線維化の進展を非侵襲的に評価することができる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawabe N, Hashimoto S, Harata M, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Arima Y, Komura N, Kobayashi K, Yoshioka K. The loss of HBeAg without precore mutation results in lower HBV DNA levels and ALT levels in chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* 2009;44:751-6.
2. Nitta Y, Kawabe N, Hashimoto S, Harata M, Komura N, Kobayashi K, Arima Y, Shimazaki H, Nakano T, Murao M, Ichino N, Osakabe K, Aoki H, Hosoe Y, Sugiyama H, Nishikawa T, Yoshioka K. Liver stiffness measured by transient elastography correlates with fibrosis area in liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2009;39:675-84.
3. Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol* 2009;44:952-63.
4. Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus genotype 2a correlate with response to pegylated-interferon-alpha 2a monotherapy. *J Med Virol* 2009;81:459-66.

2. 学会発表

1. 石渡朝子、成田若香菜、池夏希、伊藤広子、花下順子、池田綾子、原田雅生、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎. C型肝硬変患者に対するBCAA製剤によるLESを含む栄養管理. 第12回日本病態栄養学会年次学術集会 2009年1月、京都、日本病態栄養学雑誌 2008;11(suppl):A167.
 2. 嶋崎宏明、川部直人、吉岡健太郎、刑部恵介、西川徹、橋本千樹、市野直浩、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、有馬裕子、小村成臣、小林恭子、生野浩和. B型慢性肝炎におけるフィブrosキャンによる肝硬度測定. 第95回日本消化器病学会総会 2009年5月、札幌. 日本消化器病学会雑誌 2009;106(suppl):A199.
 3. 村尾道人、吉岡健太郎、橋本千樹、川部直人、原田雅生、新田佳史、中野卓二、嶋崎宏明、有馬裕子、小村成臣. 治療開始13週以降のHCVRNA陰性化症例に対するインターフェロン・リバビリン併用療法延長の治療効果. 第45回日本肝臓学会総会 2009年6月、神戸. 肝臓 2009;50(suppl):A239.
 4. 川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎. 慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果の評価におけるFibroscanの有用性. 第51回日本消化器病学会退会パネルディスカッション 2009年10月、京都. 日本消化器病学会雑誌 2009;106(suppl):A619.
 5. 有馬裕子、川部直人、吉岡健太郎. C型慢性肝炎に対するIFN治療におけるFibroscanによる肝線維化の非侵襲的評価. 第38回日本肝臓学会西部会主題ポスター 2009年12月、米子. 肝臓 2009;50(suppl):A667.
 6. 嶋崎宏明、川部直人、吉岡健太郎. NAFLDにおける肝硬度測定の有用性の検討. 第38回日本肝臓学会西部会シンポジウム 2009年12月、米子. 肝臓 2009;50(suppl):A601.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

B型非代償性肝硬変に対する抗ウイルス療法の有用性

研究分担者 森脇久隆 岐阜大学大学院医学研究科 消化器病態学

研究要旨：B型非代償性肝硬変に対し抗ウイルス療法を施行し、その安全性と有効性を検討した。当院において11例の非代償性肝硬変に投与し、平均使用期間は28ヶ月（4-62ヶ月）であった。開始時に全例中等度以上の腹水があり、肝性脳症の合併例は1例に認め、肝癌合併は5例認めている。経過は6例の生存と5例の死亡（癌死および門脈血栓症）であった。使用中に明らかな副作用は認めず、安全性は確認された。ウイルスはほぼ基準以下まで減少し、抗ウイルス効果も十分であると考えられた。開始時のChild-Pughスコアリングでは平均10.8点（10-13点）であり、投与後は平均7.8点まで改善を認めている。症例数が少ない検討ではあるが、抗ウイルス療法の有効性に関する因子を検討すると、肝細胞癌の合併が有効性および予後も下げる結果であった。また、有意差は無いものの開始時に高ウイルス量である症例が予後が良い傾向であると考えられた。

共同研究者

永木正仁 岐阜大学消化器病態学 臨床教授
内木隆文 岐阜大学消化器病態学 助教

A. 研究目的

近年、ラミブジンおよびエンテカビルを初めとした核酸アナログ製剤によりB型肝炎キャリアのHBV量をコントロールすることが可能になってきている。慢性B型肝炎や肝細胞癌の予防においてはその有効性が明らかにされつつあるが、慢性肝不全、特に非代償性肝硬変においては有効性が必ずしも明らかではない。本研究により抗ウイルス療法が非代償性肝硬変の状態においても有効であり、さらにその予後の改善や肝再生の有無を検証する。

B. 研究方法

(1) すでに当院ならびに当科関連施設にて、非代償性肝硬変において抗ウイルス療法を施行された症例においてレトロスペクティブに解析しその有効例と、無効例の治療効果の差異を検討する。

(2) 当院ならびに当科関連施設においてB型非代償性肝硬変症例（目標20-30症例）に対し、文書による同意を取得した上で、下記の諸検査を施行し、抗ウイルス療法内服治療を開始する（エンテカビル）。ただ

し、原疾患が生命的に危機的な状態と考えられるため、今回の検討ではRCTによる対照群は設定できず、過去における症例の検討をもって対照とする。

投与方法は腎障害度に応じて検討されるが、通常はエンテカビル0.5mg/dにて連日投与を基本とする。耐性ウイルスにより治療効果不十分である症例は、さらに抗ウイルス薬（阿德ホビル）の追加を原則とする。

【検討項目】非代償性肝硬変（黄疸・腹水・肝性脳症のいずれかを認める症例）における抗ウイルス療法の検討

○抗ウイルス療法の安全性と効果

○開始前の下記項目の評価

・生化学的マーカー

・ウイルスマーカー

・線維化マーカー

・生検（可能例）

・画像診断（肝の容量）

・栄養学的評価（筋肉量、脂肪量、その他）

○有効性および安全性を1ヶ月単位で検討する。

○有効性の総合評価を6ヶ月経過した時点で初期検討とする。

○有効例と無効例の治療効果の差異を検討する

(倫理面への配慮)

臨床研究の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、書面による同意を得たうえで臨床研究を遂行する。

C. 研究結果

現時点においてはレトロスペクティブな検討により非代償性肝硬変における抗ウイルス療法の有効性を検討した。平成16年から21年まで当院にて加療したB型非代償性肝硬変症例11例(男性8例,女性3例,平均年齢 53.4 ± 8.8 歳)。抗ウイルス剤はラミブジン4例,エンテカビル7例を使用し,2例は経過中のbreak through hepatitisのためアデホビルを併用した。経過中ラミブジンから移行した1症例がエンテカビルに耐性と思われたが,門脈血栓による度重なる静脈瘤の破裂のため抗ウイルス療法が不十分であることも一因であると考えられた。この症例は早期に失っている。慢性肝炎急性増悪による肝不全は今回の検討では除外している。今回の平均使用期間は28ヶ月(4-62ヶ月)である。開始時に全例中等度以上の腹水があり,肝性脳症の併発は1例に認めた。投与時において肝癌合併は5例認めている。投与開始時(平均)はAlb 2.8g/dl, PT 49%, T.Bili 5.5mg/dl, AST 268.0IU/dl, ALT 273.0IU/dl, plt 5.1万/ul, HBV-DNA 6.0Log copy/ml, HBe抗原陽性例は4例, HBe抗体陽性例5例であり, genotype Cを5例に認めた。肝予備能の評価としては全例Child-Pugh C,平均10.8点(10-13点)であった。投与開始6ヶ月後を効果判定とし,検討すると,1例の死亡(門脈血栓合併の肝不全死)を認めているが,投与6ヶ月での治療効果(平均)はAlb 3.1g/dl, PT 58.0%, T.Bili 3.2mg/dl, AST 53.3IU/dl, ALT 35.9IU/dl, plt 6.6万/ul, HBV-DNA 3.7Log copy/ml, Child-Pughスコアは平均7.8点へと改善を認めている。Child-Pughスコアの改善はおもに腹水の消失と,黄疸の改善が寄与していると考えられた。その他のデータでは有意差は得られなかった平成20年12月までの最終転帰の検討では6例生存し,5例の死亡を認めている。そのうち4例はコントロール不良の肝癌死であった。生存例のうち腹水は7例で消失し1例は投与1年以上にもかかわらず現在も残存している。予後に影響を与える因子を解析すると開始時の肝細胞癌の合併が予後を悪くすると言え,開始時のウイルス量が高値であることが,有意差は得られないものの予後改善に影響がある可能性が示唆された。

D. 考察

(1) 今回までに集積されている症例においては,抗ウイルス療法による副作用を初めとした問題は認められず,非代償性肝硬変症例においても安全に投与できることが確認された。

(2) すべての投与症例においてウイルスは基準以下まで改善しており,抗ウイルス効果は慢性肝炎と比し遜色はなかった。

(3) 今回の検討では6例の生存例のうち5例に改善を認めたものの,1例が無効であった。現時点では症例の蓄積が少ないために有効性の差異の検討は難しいと考えられたが,ヒアルロン酸など若干高値であり肝硬変の組織的進行度が一つの因子と考えられた。

E. 結論

症例数が少ない検討ではあるが,非代償性肝硬変においても抗ウイルス療法は安全かつ有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

Lamivudine 耐性 B 型肝炎患者に対する adefovir 併用療法の長期成績 および耐性メカニズムの解析

研究分担者 上野義之 東北大学大学院医学系研究科消化器病態学 准教授

研究要旨：Lamivudine 耐性患者における adefovir の併用療法の長期的な効果を検討するため、当院における 28 例（観察期間中央値 47 ヶ月）を解析した。12,24,36,48 ヶ月における HBV DNA 陰性化（2.6 log copies/ml 未満）は 56, 80, 86, 92%であった。17 例の HBeAg 陽性例において、HBeAg 消失は 12 ヶ月で 24%、24 ヶ月で 25%、36 ヶ月で 62%、48 ヶ月で 88%であった。HBV の genotype を比較すると、genotype C と比較して genotype B において有意に早期に HBV DNA 陰性化が得られた（ $P=0.0496$ ）。1 例で adefovir 投与 54 ヶ月後に virological breakthrough を認めたため、この患者の HBV の塩基配列の変化を解析したところ、lamivudine 耐性変異である rtL180M+M204V に加えて rtA200V が major clone として認められた。Adefovir 耐性変異である rtN236T は 25%の clone にのみ認められた。In vitro の解析により、rtA200V は rtL180M+M204V によって低下した HBV 複製能を回復させ、adefovir に対する耐性の程度が増加していた。さらに、entecavir 耐性変異として知られている rtT184S と rtS202C が rtA200V や rtN236T のない clone に認められた。結論：lamivudine+adefovir 併用療法はほとんどの lamivudine 耐性患者に有効であり、特に genotype B に有効であったが、長期投与に伴う多剤耐性株の出現のリスクも考慮すべきと考えられた。rtA200V は rtL180M+M204V とともに出現すると lamivudine+adefovir 療法に対する耐性の原因になりうると考えられた。

A. 研究目的

Lamivudine 耐性 B 型慢性肝炎に対する adefovir 併用療法の有効性は報告されているものの、その長期的効果は不明である。また、稀に耐性が出現することも報告されているが症例が少なく不明な点が多い。今回、lamivudine 耐性患者に対する adefovir の長期成績を検討することを目的とし、また耐性が出現した患者の HBV のウイルス学的特徴を検討した。

B. 研究方法

対象患者：2003 年 6 月から 2009 年 8 月までに東北大学病院において lamivudine+adefovir 投与を行った 28 例の B 型慢性肝炎患者を対象とした。全て lamivudine 単剤投与中に virological breakthrough (HBV DNA の 1 log copies/ml 以上の増加)を生じた後に adefovir を併用して投与した。全て HCV は陰性で、その他の肝疾患の既往はなかった。これらの患者につい

て、HBV DNA 陰性化 (2.6 log copies/ml 未満)、ALT 正常化 (35 IU/l 以下)、HBeAg 消失、virological breakthrough について検討した。

投与薬剤：Adefovir は 1 例を除いて 10mg/day を lamivudine 100mg/day に加えて投与した。1 例で eGFR の低下があったため、adefovir を隔日投与、lamivudine は半量投与とした。Adefovir 投与中に eGFR の低下が認められた場合、adefovir は 10mg を隔日投与とした。

HBV genotype の決定：患者血清 50 μ l から DNA を抽出し、HBV の S 領域 396 塩基を nested PCR にて増幅した。Direct sequence 法にて塩基配列を決定し、分子系統樹解析により genotype を決定した。

HBV RT 領域の塩基配列の解析：患者血清から抽出した DNA を用いて、HBV ポリメラーゼ内の RT 領域を含む 1148 塩基を増幅した。Direct sequence 法、あるいは cloning した後に塩基配列を決定した。

Plasmid の構築：HBV genome の 1.3 倍長を

含む plasmid (pBFH2) の RT 領域を含む配列 (nt 179-1068) を adefovir 耐性患者血清から増幅した同配列と入れ替えた。さらに、site-directed mutagenesis 法によりこの患者に認められた変異である rtL180M, rtT184S, rtA200V, rtS202C, rtM204V, rtN236T を種々の組み合わせで野生型塩基あるいは別の塩基に置換した。

細胞培養：ヒト肝癌細胞株である HepG2 を 24 well plate に 1.25×10^5 cells/well の濃度で撒き、375 ng の plasmid DNA を transfection した。4 時間後、PBS で 2 回洗い、500 μ l の medium と種々の濃度の adefovir を加え、4 日後の培養上清を回収した。

Real-time PCR：Adefovir の IC₅₀ 濃度を決定するため、real-time PCR を行った。5 μ l の培養上清を 5 unit の DNase I と 2 時間反応させて plasmid DNA を消化し、EDTA で反応を停止させた。DNA を抽出し、200 μ l の DNA 溶液中の 10 μ l を LightCycler system を用いた real-time PCR により HBV DNA を定量した。

C. 研究結果

患者背景：男性 20 例、女性 8 例、年齢の中央値は 53.5 歳。HBV の genotype は A が 1 例 (4%)、B が 7 例 (25%)、C が 19 例 (68%) であり、8 例 (29%) が肝硬変、7 例 (25%) が肝細胞癌、17 例 (61%) が HBeAg 陽性であった。HBV の RT 領域の YMDD モチーフをダイレクトシーケンシング法にて決定すると、YIDD が 14 例 (50%)、YVDD が 11 例 (39%)、YIDD+YVDD が 2 例 (7%) であり、1 例は YMDD モチーフの変異を認めなかった。Genotype B と C の患者の背景には有意差を認めなかった。

Lamivudine、adefovir 併用療法の効果：Lamivudine 耐性患者に対して adefovir 併用療法を行った (観察期間中央値 47 ヶ月)。全ての患者が virological breakthrough を起こすまで治療が継続された。HBV DNA 陰性化 (2.6 log copies/ml 未満) 率は 6, 12, 24, 36, 48 ヶ月でそれぞれ 36, 63, 80, 86, 92% であった (表 1)。ALT の正常化率は 6 ヶ月で 57%、12 ヶ月で 70%、24 ヶ月で 84%、36 ヶ月で 82%、48 ヶ月で 77% であった。Genotype B と C で比較すると、genotype B において HBV DNA 正常化、ALT 正常化ともに良好な傾向が得られた (図 1)。累積 HBV DNA 陰性化は genotype B で有意に高かった ($P=0.0496$) が、ALT 正常化については有意差は認められなかった。HBeAg の有無の影響については HBeAg 陰性例で良好である傾向は認めるものの、有意差には至らなかった。17 例の HBeAg 陽性患者において、HBeAg 消失は 6, 12, 24, 36, 48 ヶ月で 6, 24, 25, 62, 88% に認められた。HBsAg の消失が得られた例はなかった。

36 ヶ月以上併用療法を受けた 22 症例のうち、3 例は HBV DNA の陰性化が得られな

かった。うち 1 例は 54 ヶ月後に virological breakthrough を生じた。いずれも biochemical breakthrough は起こさなかった。

Lamivudine+adefovir 耐性患者の臨床経過：53 歳男性、2002 年 4 月に HBeAg 陽性 B 型肝炎硬変に対して lamivudine 投与が開始された。HBV の genotype は C であった。2003 年 3 月には breakthrough hepatitis (HBV DNA >7.6 log copies/ml、ALT 236 IU/l) を生じ、6 月より adefovir の併用投与が開始された。その後 HBV DNA は徐々に低下し、3 年後には 2.6 log copies/ml 未満となった。しかしながら、4 年後 (2007 年 12 月) に virological breakthrough (HBV DNA 4.3 log copies/ml) を生じた。肝硬変であったため、ALT の上昇が認められる前に tenofovir を lamivudine と併用して投与した。2 ヶ月後には HBV DNA は陰性化し、20 ヶ月後の現在まで virological breakthrough は認められていない。

Lamivudine+adefovir 耐性患者に認められた RT 領域の変異：Adefovir 投与開始前、adefovir 投与開始 30 ヶ月後、viral breakthrough 時 (adefovir 投与開始 54 ヶ月後) の 3 ポイントの血清を用いて HBV の RT 領域の塩基配列を direct sequence 法にて決定した。Lamivudine 耐性変異である rtM204I が adefovir 投与後に rtM204V に変化し、rtL180L/M の混合型変異が rtL180M に変化していた。Adefovir 耐性変異として知られている rtN236T は viral breakthrough 後に混合型変異 (rtN236N/T) として出現していた。注目すべきこととして、これまで adefovir 耐性変異としては報告のない rtA200V という変異も breakthrough 後に混合型変異 (rtA200V/A) として出現していた。PCR 産物をクローニングすると (表 2)、rtA200V の変異は 63% に認められたが、rtN236T は 25% にすぎなかった。さらに、rtT184S や S202C といった entecavir 耐性変異として知られているものが少数のクローンに認められた。これらの変異の組み合わせを検討すると (図 2)、adefovir 投与 30 ヶ月後には 100% のクローンが rtL180M+M204V であったが、breakthrough 後にはこれらの変異に加えて rtT184S, A200V, S202C, N236T が出現していた。

HBV 変異の複製効率に与える影響：今回の耐性患者に認められた変異の組み合わせのある HBV の複製効率を検討した (表 3)。既報の通り、lamivudine 耐性変異である rtM204I や rtL180M+M204V は複製効率を有意に低下させた。rtL180M+M204V に加わった変異としては rtA200V のみが複製効率が回復した。rtN236T はさらに複製効率を低下させたが、その低下を rtA200V は回復させることはできなかった。次に、変異の組み合わせと adefovir に対する感受性について、IC₅₀ を計算して検討した。Lamivudine 耐性変異である rtM204I や rtL180M+M204V は adefovir

に対しても弱い耐性を示した。rtL180M+M204V に比べると、さらに rtA200V や S202C が存在すると有意に高い耐性を示した。患者血清のクローン解析と合わせて考慮すると、rtA200V は rtL180M+M204V とともに存在すると lamivudine+adefovir 併用療法への耐性の原因となりうると考えられた。

D. 考察

Lamivudine の効果と HBV の genotype の関係については報告があるが、adefovir と genotype の関係についてはまだ報告がなかった。本研究では lamivudine+adefovir 併用療法において genotype C よりも genotype B でより早期のウイルス学的反応を示した。また、治療開始時の HBeAg の有無が lamivudine+adefovir 併用の効果に影響するとの報告があるが、本研究では傾向はあるものの有意差には至らなかった。

Lamivudine+adefovir 併用における耐性の出現は稀であることが報告されているが、本研究では 1 例が adefovir 開始 4 年半後に virological breakthrough を生じた。この患者の HBV には RT 領域に rtA200V という特徴的な変異が認められた。この変異の薬剤耐性に対する影響は、lamivudine 耐性変異が lamivudine に対して 1000 倍以上の耐性を示すような大きなものではなかったが、adefovir は腎毒性のために臨床用量が低く設定されており、変異の耐性度が低くても臨床的に大きな影響を与える可能性はあったと考えられた。

本研究の lamivudine+adefovir 耐性患者では lamivudine+tenofovir の併用を行ったところ HBV DNA は速やかに抑制された。In vitro の研究で tenofovir は adefovir と交差耐性を示すとの報告もあるが、adefovir 耐性患者に対して tenofovir が有効であったとの報告が散見されている。本患者の経過もそれらの報告の結果を支持しているが、本邦では tenofovir は保険適応となっておらず、このような症例に対する治療法の選択は今後の課題である。

E. 結論

本研究では lamivudine 耐性患者に対する adefovir 併用療法はほとんどの患者に 4 年間は有効であることが示され、特に genotype B

で有効であった。しかしながら、4 年以上の経過で 1 例の耐性患者が見られ、既報の lamivudine 耐性変異に加えて rtA200V という変異が出現していた。さらに entecavir 耐性変異のあるクローンも少数ながら出現しており、特に HBV DNA が十分に抑制できていない患者では長期治療に伴う多剤耐性株の出現リスクを考慮する必要があると考えられた。そのような症例では多剤耐性株の出現を防ぐためにより強力な薬剤が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: Influence of hepatitis B virus genotype and resistant mutation pattern. *J Viral Hepat.* 2010 (in press).

2) Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, Kondo Y, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology.* 2009;395:202-9.

3) Inoue J. Factors involved in the development of fulminant hepatitis B: Are the mutations of hepatitis B virus implicated? *Hepatol Res.* 2009;39:1053-5.

4) Ueno Y, Sollano JD, Farrell GC. Prevention of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:531-6.

5) Amarapurkar D, Han KH, Chan HL, Ueno Y. Application of surveillance programs for hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:955-61.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。