

2009 33025A

# 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

B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と  
治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究  
(H21-肝炎-一般-001)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田 中 榮 司

平成22(2010)年5月

## 目次

### I. 総括研究報告

- B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を  
目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究 . . . . . 1  
(信州大学 田中榮司)

### II. 分担研究報告

1. B型肝炎に対する核酸アナログ中止例の予後解析 . . . . . 11  
(虎の門病院 鈴木義之)
2. 高感度 HBV DNA定量法によるラミブジン中止症例の再検討  
. . . . . 13  
(名古屋市立大学 新海登)
3. B型慢性肝炎に対する Lamivudine から Entecavir への切替例に  
おける Entecavir 耐性変異について . . . . . 15  
(大阪大学 平松直樹)
4. 核酸アナログ治療時のHBV DNA, HBsAg およびHBcrAg の  
変動の検討 . . . . . 19  
(札幌厚生病院 豊田成司)
5. HBV RNAと核酸アナログ治療効果 . . . . . 21  
(広島大学 柘植雅貴)
6. 核酸アナログ製剤中止例の長期経過の検討 . . . . . 24  
(千葉大学 今関文夫)
7. 核酸アナログ製剤中止後の肝炎再燃予測における  
HBcr 抗原測定の意義 . . . . . 27  
(北海道大学病院 髭修平)
8. B型慢性肝炎疾患に対する核酸アナログ投与中止例の検討  
. . . . . 30  
(長崎医療センター 八橋弘)
9. HBs 関連抗原、HBs 抗原定量による核酸アナログ中止基準の検討  
. . . . . 32  
(兵庫医科大学 齋藤正紀)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 37

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 55

# I. 総括研究報告書

# 厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 総括研究報告書

B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究（H21－肝炎－一般－001）

研究代表者 田中榮司 信州大学医学部内科学第二講座 教授

### 研究要旨：

B型肝炎の核酸アナログ薬治療において、同薬の中止基準が明確でないことが問題点の一つとして残されている。今回、より効率的な核酸アナログ薬中止基準を作成することを目的に、HBe 抗原、HBV DNA 量に加え、肝細胞中 cccDNA 量を反映する HB コア関連抗原量や HBs 抗原量などの指標について、その有用性を検討した。研究分担者および協力者から登録された核酸アナログ薬中止例 136 例中、中止時 HBV DNA 陰性で中止後少なくとも 6 ヶ月以上経過観察可能であった 112 例を対象とした。この 112 例中、中止時 HBe 抗原陽性の 9 例では中止後高率に肝炎が再燃しており、中止の対象外症例と判断した。このため、中止時 HBe 抗原陰性の 103 例を対象に中止基準を検討した。治療中止後の平均 ALT 値が 30 IU/L 以下、かつ平均 HBV DNA が 4.0 log copy/ml 以下を非再燃群とし治療中止成功例と仮定した。しかし、平均値ではリアルタイムな診療には対応できないので、それぞれの最高値との関連を検討した。この結果、ALT の平均値と最高値は強い相関 ( $r=0.870$ ,  $P<0.001$ ) を示し、平均値 30 IU/L は最高値 79 IU/L と対応した。同様に、HBV DNA の平均値と最高値は強い相関 ( $r=0.917$ ,  $P<0.001$ ) を示し、平均値 4.0 IU/L は最高値 5.7 IU/L と対応した。これらの結果より、治療中止後 ALT 値が 79 IU/L 以下、かつ HBV DNA 値が 5.7 log copy/ml 以下の症例を非再燃群とした。

治療中止時 HBe 抗原陰性の 103 例中、非再燃群が 47 例、再燃群が 56 例であった。両群間で背景を比較すると、治療期間は非再燃群で有意に長く、中止時の HB コア関連抗原量と HBs 抗原量は非再燃群で有意に低い傾向がみられた。ROC 解析の結果より、治療期間の cut-off 値を 1.8 年、HB コア関連抗原量の cut-off 値を 3.0 と 4.0 IU/ml、HBs 抗原量の cut-off 値を 100 と 1000 IU/ml とした。また、中止時の年齢との関連では、37 歳以上の症例で HB コア関連抗原量と HBs 抗原量の有用性が高いことが明らかとなった。このため、37 歳以上の中止例を対象に、以下の 3 群に分けて治療中止後の肝炎の非再燃を予測した。その結果、各群の非再燃率は、I 群 (HBs 抗原  $\leq 100$  IU/ml and HB コア関連抗原  $\leq 3.0$ ) が 88%、II 群 (I 群と III 群以外) が 60%、III 群 (HBs 抗原  $> 1000$  IU/ml or HB コア関連抗原  $> 4.0$ ) が 12% であった。

以上の検討より、B型肝炎の核酸アナログ治療において、HBe 抗原陽性例および、HBe 抗原陰性でも HBs 抗原量または HB コア関連抗原量が高値の症例では単純な治療の中止はすべきでないと考えられた。HBs 抗原量または HB コア関連抗原量が低値の症例では治療を中止しても良い症例が多い可能性が示唆された。今後の検討課題として、高感度 HBV DNA 測定などの新しい因子を加えてさらに精度の高い中止基準を検討する必要がある。

### 《研究分担者》

鈴木 義之  
虎の門病院肝臓センター 医長  
新海 登  
名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床研修医  
平松 直樹  
大阪大学大学院医学研究科 講師  
豊田 成司  
JA 北海道厚生連札幌厚生病院 院長  
柘植 雅貴  
広島大学自然科学研究支援開発センター 助教  
今関 文夫  
千葉大学医学部 准教授

### 髭 修平

北海道大学病院 講師  
八橋 弘  
国立病院機構長崎医療センター 部長  
齋藤 正紀  
兵庫医科大学 講師

### 《研究協力者》

藤原 圭  
名古屋第二赤十字病院 医師  
鳥居 信之  
東京女子医科大学 講師  
松本晶博  
信州大学医学部 委嘱講師

## A. 研究目的

核酸アナログ薬による治療は、安定した効果が得られること、経口薬で副作用が少ないことなどから B 型慢性肝炎治療の中心となっている。しかし、耐性株出現や治療中止後の肝炎再燃が問題点として残されている。核酸アナログ薬の治療効果は、通常、血中 B 型肝炎ウイルス (HBV) DNA 量によりモニターされているが、これが陰性で持続しても治療を中止すると肝炎は高率に再燃する。これは、核酸アナログ薬によって血中の HBV DNA 量が速やかに低下しても肝細胞中の HBV cccDNA 量は低下しないことが一つの原因である。この cccDNA は HBV 複製の起点であり、この量が低下することが治療中止の必要条件と考えられる。

今回の研究ではより効率的な核酸アナログ薬中止基準を作成することを第一の目的とした。この目的を達成するためには血中 HBV DNA 量のモニターだけでは不十分であり、異なる性格のマーカーを組み合わせる必要がある。その候補としては、肝細胞中 cccDNA 量を反映する HB コア関連抗原量や HBV RNA 量、HBsAg 量、高感度 HBV DNA 測定法などを考えている。さらに、HBV 遺伝子の変異も重要な検討項目と考えられる。

核酸アナログ薬中止基準検討の難しさは、実際の中止例が少ないことも要因の一つである。平成 21 年度は、研究分担者および協力者の各施設から中止例を登録してもらい中止基準の検討を行った。まだ十分な解析とは言えないが、これまでにない多数例での解析であり、信頼性が増したと考えられる。

## B. 研究方法

### I. 統一研究

今回の研究では、治療中止時 HBV DNA 陰性で中止後少なくとも 6 ヶ月以上経過観察可能であった 112 例を対象とした。血中 HBV DNA の測定は、基本的に AMPLICOR 法 (陰性:  $< 2.6 \log \text{ copy/ml}$ ) で行った。対象とした 112 例中、中止時 HBe 抗原陽性が 9 例、陰性が 103 例であった。今回登録された核酸アナログ薬中止例 121 例の詳細を HBe 抗原陰性群と陽性群に分けて表 1 に記載した。治療開始時の年齢中央値はそれぞれ 49 歳と 42 歳であった。性別では両群とも男性が多くみられた。遺伝子型は C が圧倒的に多く、日本での一般的な比率と一致した。治療薬はラミブジン (LAM) 単独例が多数を占めた。

### II. 個別研究

各施設で、核酸アナログ薬中止に関係する独自の研究も行われた。中止基準の可能性がある項目として、HB コア関連抗原と HBs 抗原に加え、HBV RNA 量、Pre-C/CP 変異、高感度 HBV DNA などが検討さ

れた。HB コア関連抗原と HBs 抗原については、治療開始前から治療中の推移も検討され、その意義が別の観点から検討された。また、治療中止を促進する方法としてインターフェロン併用についても検討が開始された。

### (倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部倫理委員会および各分担研究者および協力者の施設の倫理委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### I. 統一研究

核酸アナログ薬中止後の ALT 値と HBV DNA 値の評価については、それぞれ  $30 \text{ IU/L}$  と  $4.0 \log \text{ copy/ml}$  を一つの基準とした。これらの値は、厚生労働省班研究による B 型肝炎の治療ガイドラインで治療開始基準として使用されているものである。ただし、治療中止後の経過の良い症例でも、一時的に ALT 値や HBV DNA 量が上昇する症例が多いことから、中止後の平均値および最高値で評価することが必要と考えられた。図 1 は中止後の HBV DNA 平均値と最高値の相関を示すが、両者は強い相関を示した ( $r=0.917$ ,  $P<0.001$ )。また、ROC 解析 (図 2) にて HBV DNA 平均値  $4.0 \log \text{ copy/ml}$  は最高値  $5.7 \log \text{ copy/ml}$  に相当した。同様に、図 3 に中止後の ALT 平均値と最高値の相関を示すが、両者は強い相関を示した ( $r=0.870$ ,  $P<0.001$ )。ROC 解析 (図 4) では平均値  $30 \text{ IU/L}$  は最高値  $79 \text{ IU/L}$  と対応した。これらの結果より、治療中止後の ALT 値が  $79 \text{ IU/L}$  以下、かつ HBV DNA 値が  $5.70 \log \text{ copy/ml}$  以下で経過した症例を非再燃例とし、これ以外を再燃例とした。

図 5 は、核酸アナログ薬中止後の無再燃率の推移を示す。中止時 HBe 抗原陽性例の無再燃率は治療中止直後から急激に低下し、1 年で約 20%、2 年で約 10%と低率となった。これに対し、HBe 抗原陰性例では、中止後 1 年で約 50%まで低下したが、その後の低下は緩徐となり、4 年以上の長期でも 30~40%の無再燃率を維持した。このため、HBe 抗原陽性例では単純な中止は困難と考え、中止基準の検討は中止時 HBe 抗原陰性であった 103 例を対象に行った。

治療中止時 HBe 抗原陰性の 103 例中、非再燃群が 47 例、再燃群が 56 例であった。両群間で背景を比較すると (表 2)、性別、遺伝子型に有意の差はなかった。治療開始時の因子では、年齢、HBe 抗原陽性率、ALT 値、HBV DNA 量、HB コア関連抗原量に差はなかったが、HBs 抗原量は非再燃群でやや低い傾向がみられた。治療中止時の因子では、治療期間は非再燃群で有意に長く、HB コア関連抗原量と HBs 抗原量は非再燃群で有意に低い傾向がみられた。多

変量解析では、治療期間 ( $P = 0.075$ ) と中止時の HB コア関連抗原量 ( $P = 0.001$ ) が差のある因子として算出された。ROC 解析の結果より、再燃群と非再燃群を分ける cut-off 値を、治療期間では 1.8 年 (図 6)、HB コア関連抗原量では 3.0 と 4.0 IU/ml (図 7)、HBs 抗原量では 100 と 1000 U/ml とした (図 8)。図 9 は、中止時の年齢と HB コア関連量からみた中止後の肝炎の再燃状況である。同様に、図 10 は、中止時の年齢と HBs 関連量からみたものである。HB コア関連抗原量も HBs 抗原量も、共に 36 または 37 歳以上で中止後の肝炎再燃と強く関連していた。中止時の年齢について ROC 解析を行うと、37 歳以上で HB コア関連抗原量と HBs 抗原量の有用性が認められた。

図 13 は 37 歳以上の中止例を対象に、以下の 3 群に分けて治療中止後の肝炎の非再燃を予測した。その結果、各群の非再燃率は、I 群 (HBs 抗原  $\leq 100$  IU/ml and HB コア関連抗原  $\leq 3.0$ ) が 88%、II 群 (I 群と III 群以外) が 60%、III 群 (HBs 抗原  $> 1000$  IU/ml or HB コア関連抗原  $> 4.0$ ) が 12%であった。図 13 は、中止からの期間と再燃との関連を I ~ III 群で比較検討したものである。いずれの群も初期に再燃が多く、その後安定する傾向がみられた。

## II. 個別研究

柘植らは HBV RNA 量を HBV DNA と同時に測定する方法を用いて、HBV RNA の有用性を検討した。この結果、HBV DNA 量および HBV DNA+RNA 量は、治療中止後の ALT や HBV DNA の再上昇に関与し、ALT 非再上昇群、HBV 非再上昇群において有意に低値であったことから、治療中の HBV DNA および HBV DNA+RNA 量の推移を観察することにより、治療中止後の臨床経過を予測できる可能性を示唆した。

髭らは、治療開始時 HBe 抗原陰性例に対する核酸アナログ薬中止後のウイルス学的再燃の予測には、中止時の HB コア関連抗原、HBs 抗原、HBV DNA 量に加え治療開始時の Pre-C/CP 変異パターンの複合的評価が有効である事を報告した。

新海らは、高感度の HBV DNA 測定系について検討し、DNA 量が 2.1 log copy/ml 未満の条件のみで中止をすることは困難であり、高感度 HBV 測定系にて”検出せず”が継続してから HB コア関連抗原を確認するのが良いと報告した。

斉藤らは、HB コア関連抗原は核酸アナログ投与期間や HBe 抗原陽性を、HBs 抗原は年齢や肝線維化と関連していることを示唆し、両者を組み合わせた中止基準の設定は、より有用な基準となることが期待されると報告した。

八橋らは、HB コア関連抗原と HBs 抗原を中止との関連で独自にも検討し、HBV コア関連抗原が

4.0 logU/ml 以下、HBs 抗原が 3.0 logIU/ml 以下を満たすことなどが必要であると報告した。

豊田らは、HBs 抗原と HB コア関連抗原は共に HBV の増殖と cccDNA 転写/mRNA 翻訳を反映するタンパクであるが、核酸アナログ投与前には良好な相関を示したが、エンテカビル投与 2 年目には有意な相関を示さず、この二つの HB 関連タンパクの核酸アナログ投与時の変動は乖離するとの結果を得た。これを踏まえ、今後はこの 2 つ HB マーカーの組み合わせから、核酸アナログ治療中止の decision level の設定が望まれると報告した。

鈴木らは、積極的に中止していく方法として新たにインターフェロンのシークエンシャル治療を開始し、その途中経過を報告した。

今関らは、核酸アナログ薬中止例の長期経過について報告し、長期中止可能例の特徴を報告した。

平松らは、核酸アナログ薬のラミブジンからエンテカビルへの切り替えを検討し、耐性株出現と中止や切り替えとの関連を検討した。

## D. 考察

核酸アナログ薬中止後の ALT 値と HBV DNA 値の評価についての統一された見解はない。そこで、今回の検討では、厚生労働省班研究による B 型肝炎の治療ガイドラインの治療開始基準である「ALT  $> 30$  IU/L、HBV DNA  $> 4.0$  log copy/ml」を参考とした。ただし、治療中止後の経過が良い症例でも、一時的に ALT 値や HBV DNA 量の上昇がみられる症例が多いことから、中止後の平均値と最高値で評価することとした。中止後の HBV DNA 平均値と最高値は強い相関を示し、平均値 4.0 log copy/ml は最高値 5.7 log copy/ml と対応した。同様に、ALT の平均値と最高値は強い相関を示し、平均値 30 IU/L は最高値 79 IU/L と対応した。これらの結果より、治療中止後の平均値でも最高値でも解析可能であることが明らかになった。しかし、平均値ではリアルタイムな診療には対応できないので、それぞれの最高値と中止後の再燃との関連を検討した。すなわち、今回の検討では、ALT 値が 79 IU/L 以下、かつ HBV DNA 値が 5.7 log copy/ml 以下の症例を非再燃群とした。

統一研究では、核酸アナログ薬の治療期間、および中止時の HB コア関連抗原量と HBs 抗原量がその後の肝炎再燃と関連する有意な因子であった。治療期間については、1.8 年以内の治療では有意に再燃率が高く、中止を考える場合の最低治療期間を検討する必要があると考えられた。

中止例での検討では、中止時の HB コア関連抗原量と HBs 抗原量はゆるい相関がみられた、しかし、豊田らの検討では、核酸アナログ薬投与例で、投与開始前には両者の相関がみられるが、投与 2 年する

と相関がみられなくなると報告した。これらの観点から、中止基準として HB コア関連抗原量と HBs 抗原量の両方を用いることが良いと考えられた。この点は、他の分担研究者の個別検討でも同様の結果が得られている。

HB コア関連抗原量と HBs 抗原量はそれぞれ中止後の再燃と有意に関連したが、年齢による影響を検討したところ、両者とも 37 歳以下では関連性が低下する傾向がみられた。この成績より、HB コア関連抗原量と HBs 抗原量による基準は 37 歳以上で適応するのが良いと考えられた。幸い、核酸アナログ薬治療が第一選択として推奨されているのは 35 歳以上であり、37 歳以上の症例での適応でも大きな問題はないと考えられた。

中止基準を作る際の cut-off 値は ROC 解析により算出し、HB コア関連抗原量は 3.0 と 4.0 IU/ml、HBs 抗原量は 100 と 1000 U/ml となった。37 歳以上の中止例を対象に、以下の 3 群に分けて治療中止後の肝炎の非再燃を予測した結果、各群の非再燃率は、I 群 (HBs 抗原  $\leq$  100 IU/ml and HB コア関連抗原  $\leq$  3.0) が 88%、II 群 (I 群と III 群以外) が 60%、III 群 (HBs 抗原  $>$  1000 IU/ml or HB コア関連抗原  $>$  4.0) が 12%であった。このことから、HBe 抗原陰性で HBV DNA が陰性であっても、HBs 抗原量または HBcr 抗原量が高値症例では核酸アナログ薬治療中止はせずに継続することが推奨される。また、両項目が共に低値の場合は中止しても肝炎が再燃しない可能性が高く、中止が推奨される集団になる可能性が示唆された。中間群に関しては、さらに精度を上げるための検討が必要である。

核酸アナログ薬の中止基準を一つの項目で判断するのは精度が低く、複数項目の組み合わせによる検討が良いと考えられる。今回は、主に年齢、HB コア関連抗原量、HBs 抗原量から中止基準を検討したが、今後は高感度 HBV DNA、HBV RNA、ウイルス遺伝子変異についてさらに検討し、新しい条件設定の可能性を模索する必要がある。また、インターフェロンのシークエンシャル治療など、中止を促進する治療についても検討が必要である。

## E. 結論

核酸アナログ薬中止基準を、同中止例を対象に後ろ向き検討を行った結果以下の結論を得た。

1. HBe 抗原陽性例では HBV DNA が陰性化しても治療を継続すべきと考えられた。
2. 治療中止後に ALT 値が 80 IU/L 以上、または HBV DNA 値が 5.8 log copy/ml 以上となる場合は再治療を考慮すべきである。
3. 中止時に HBe 抗原陰性かつ HBV DNA 陰性の症例

では、治療期間、HB コア関連抗原量、HBs 抗原量が治療中止後の再燃と有意に関連していた。

4. 中止を考える場合の最低必要治療期間の検討が今後必要である。
5. HBe 抗原陰性かつ HBV DNA 陰性の条件を満たしても HB コア関連抗原または HBs 抗原が高値の場合は治療を継続すべきと考えられた (37 歳以上)。
6. HBe 抗原陰性かつ HBV DNA 陰性の条件を満たし、さらに HB コア関連抗原と HBs 抗原が十分低値の場合は比較的効率的に治療を中止できる可能性が示唆された (37 歳以上)。
7. HBe 抗原陰性かつ HBV DNA 陰性の条件を満たし、さらに HB コア関連抗原と HBs 抗原が中間値の場合は中止可能な症例が半数程度存在した。この群では、今後さらに中止の条件を検討すべきと考えられた (37 歳以上)。

## F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kusakabe A., Tanaka Y., Mochida S., Nakayama N., Inoue K., Sata M., Isoda N., Kang J. H., Sumino Y., Yatsushashi H., Takikawa Y., Kaneko S., Yamada G., Karino Y., Tanaka E., Kato J., Sakaida I., Izumi N., Sugauchi F., Nojiri S., Joh T., Miyakawa Y., Mizokami M. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatol Res* 2009; 39(7): 648-656.
- 2) Matsuura K., Tanaka Y., Hige S., Yamada G., Murawaki Y., Komatsu M., Kuramitsu T., Kawata S., Tanaka E., Izumi N., Okuse C., Kakumu S., Okanoue T., Hino K., Hiasa Y., Sata M., Maeshiro T., Sugauchi F., Nojiri S., Joh T., Miyakawa Y., Mizokami M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009; 47(5): 1476-1483.

### 2. 学会発表

松本晶博、槇昇、田中榮司。B 型慢性肝炎の核酸アナログ薬治療中止例の検討 (シンポジウム 10: B 型慢性肝炎難治例への対策)。第 13 回日本肝臓学会大会

## 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なし。

表1：対象症例の背景因子

|                          |       |            |
|--------------------------|-------|------------|
| 治療中止時HBe抗原陰性例 (n=103)    |       |            |
| 性別 (男：女)                 | n=103 | 60 : 43    |
| 年齢 (歳)                   | n=103 | 49 (17-74) |
| 遺伝子型 (B : C)             | n= 82 | 7 : 75     |
| 治療 (LAM:LAM+ADV:ETV:ADV) | n=100 | 88:2:9:1   |
| 治療中止時HBe抗原陽性例 (n=9)      |       |            |
| 性別 (男：女)                 | n= 9  | 6 : 3      |
| 年齢 (歳)                   | n= 9  | 42 (30-53) |
| 遺伝子型 (B : C)             | n= 7  | 0 : 7      |
| 治療 (LAM:LAM+ADV:ETV:ADV) | n= 9  | 8:0:1:0    |

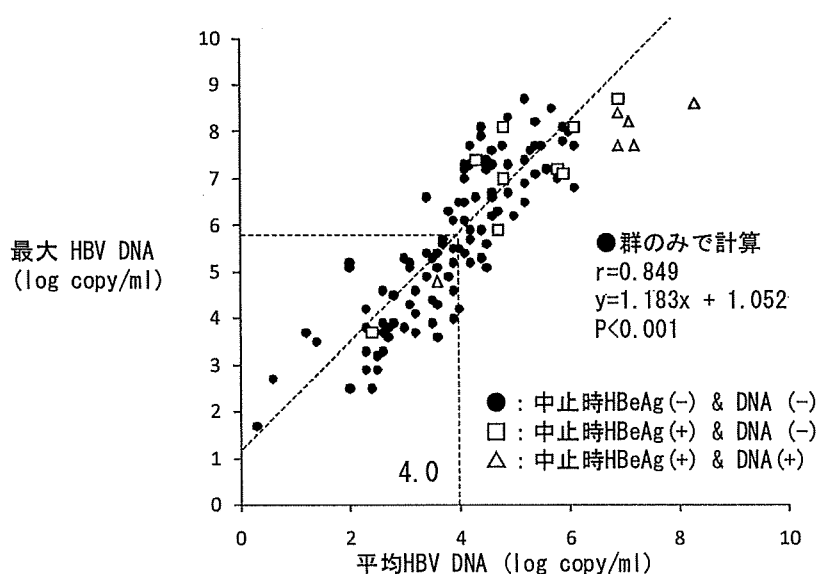


図1：治療中止後のHBV DNA平均値と最大値の相関

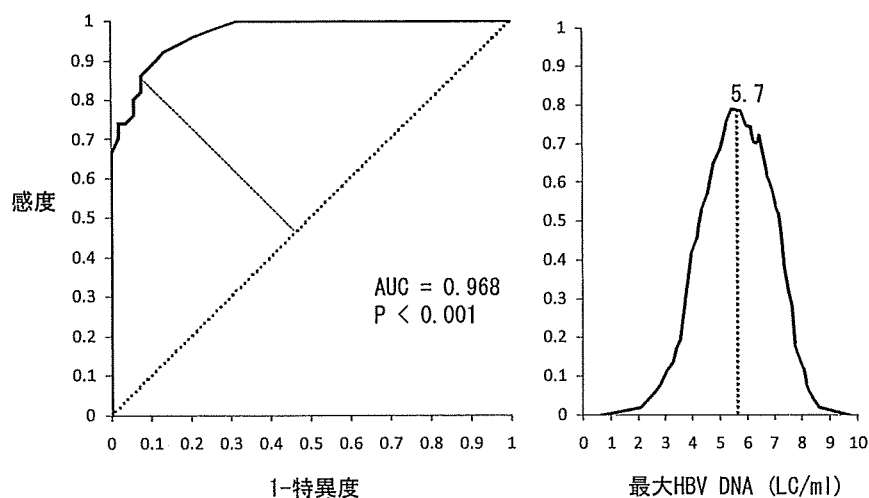


図2：HBV DNA平均値 4.0 log copy/ml と対応する最大値に関するROC解析

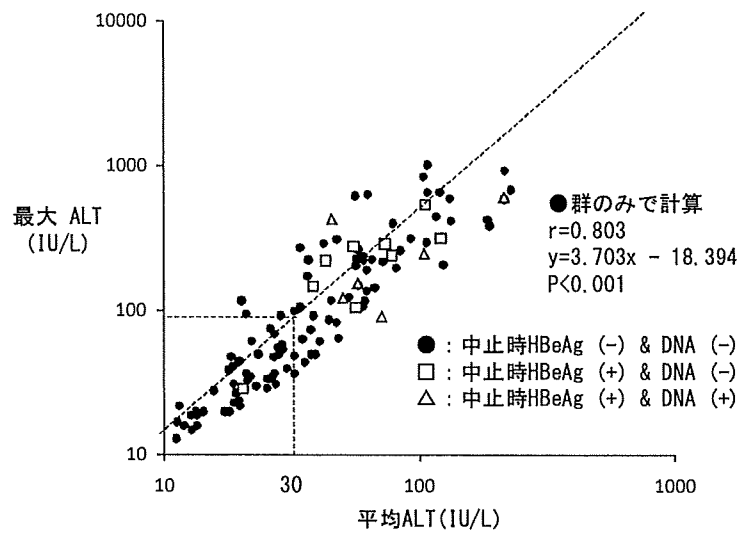


図3：治療中止後のALT平均値と最大値の相関

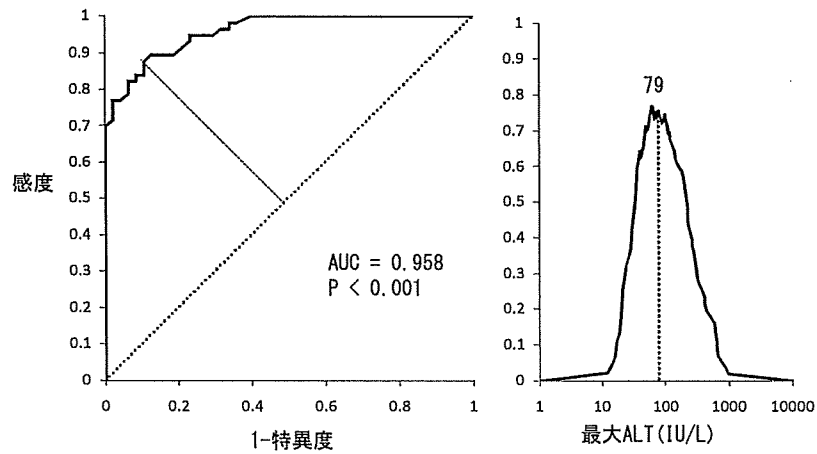


図4：ALT平均値 30 IU/mlと対応する最大値に関するROC解析

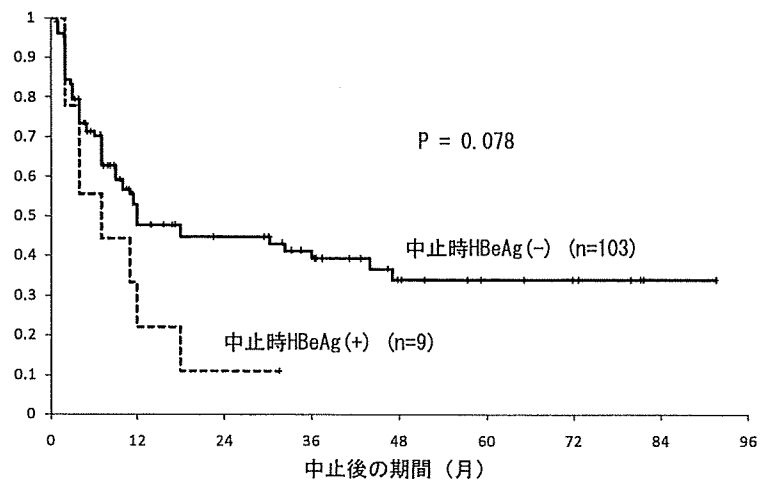


図5：無再燃率の推移 (ALT最大値<79 U/L & DNA最大値<5.7 log copy/ml)

表2：非再燃群と再燃群の背景因子の比較（中止時HBe抗原（-）& HBV DNA（-）の103例）

|                            | n  | 非再燃群 |               | 再燃群 |      |               | P      |
|----------------------------|----|------|---------------|-----|------|---------------|--------|
| 背景                         |    |      |               |     |      |               |        |
| 性別(男:女)                    | 47 | 28   | : 19          | 56  | 32   | : 24          | 0.803  |
| Genotype (B:C)             | 33 | 3    | : 30          | 49  | 4    | : 45          | 1.000  |
| 治療(LAM, LAM+ADV, ETV, ADV) | 46 | 38   | : 2 : 6 : 0   | 54  | 50   | : 0 : 3 : 1   | 0.170  |
| 再治療 n (%)                  | 47 | 8    | ( 17% )       | 56  | 42   | ( 75% )       | <0.001 |
| 治療開始時                      |    |      |               |     |      |               |        |
| 年齢(歳)                      | 47 | 53   | ( 17- 74)     | 56  | 47   | ( 26- 74)     | 0.089  |
| HBeAg(+) n (%)             | 44 | 10   | ( 23% )       | 55  | 18   | ( 33% )       | 0.370  |
| HBeAb(+) n (%)             | 44 | 37   | ( 84% )       | 55  | 42   | ( 76% )       | 0.452  |
| ALT (IU/L)                 | 46 | 201  | ( 15- 847)    | 56  | 184  | ( 20- 2052)   | 0.874  |
| DNA (LC/ml)                | 44 | 6.6  | ( <2.6- 8.7)  | 56  | 6.9  | ( 3.6- 8.9)   | 0.422  |
| HBcrAg (LU/ml)             | 16 | 5.5  | ( <3.0- 7.6)  | 24  | 5.5  | ( <3.0- 8.4)  | 0.481  |
| HBsAg (LU/ml)              | 22 | 821  | ( 25- 19007)  | 23  | 2000 | ( 38- 8560)   | 0.041  |
| 治療中止時                      |    |      |               |     |      |               |        |
| 治療期間(年)                    | 47 | 2.0  | ( 0.5- 7.8)   | 56  | 1.1  | ( 0.5- 5.1)   | 0.001  |
| 年齢(歳)                      | 47 | 54   | ( 21- 78)     | 56  | 49   | ( 27- 79)     | 0.035  |
| ALT (IU/L)                 | 47 | 20   | ( 10- 46)     | 56  | 19   | ( 9- 67)      | 0.645  |
| DNA (LC/ml)                | 47 | <2.6 | ( <2.6- Neg.) | 56  | <2.6 | ( <2.6- Neg.) | 1.000  |
| HBcrAg (LU/ml)             | 28 | <3.0 | ( <3.0- 4.9)  | 40  | 4.3  | ( <3.0- 7.7)  | <0.001 |
| HBsAg (LU/ml)              | 27 | 92   | ( Neg.- 8657) | 36  | 1495 | ( 4- 9210)    | <0.001 |
| 治療中止後                      |    |      |               |     |      |               |        |
| 中止後の観察期間(年)                | 47 | 29.4 | ( 0.9- 91.5)  | 56  | 11.5 | ( 0.9- 96.1)  | 0.025  |
| 平均ALT (IU/L)               | 47 | 21   | ( 10- 48)     | 56  | 60   | ( 16- 228)    | <0.001 |
| 最大ALT (IU/L)               | 47 | 34   | ( 11- 75)     | 56  | 222  | ( 28- 1019)   | <0.001 |
| 平均DNA (LC/ml)              | 47 | 3.2  | ( <2.6- 4.5)  | 56  | 4.6  | ( 2.6- 6.1)   | <0.001 |
| 最大DNA (LC/ml)              | 47 | 4.2  | ( <2.6- 5.7)  | 56  | 7.0  | ( 3.3- 8.7)   | <0.001 |

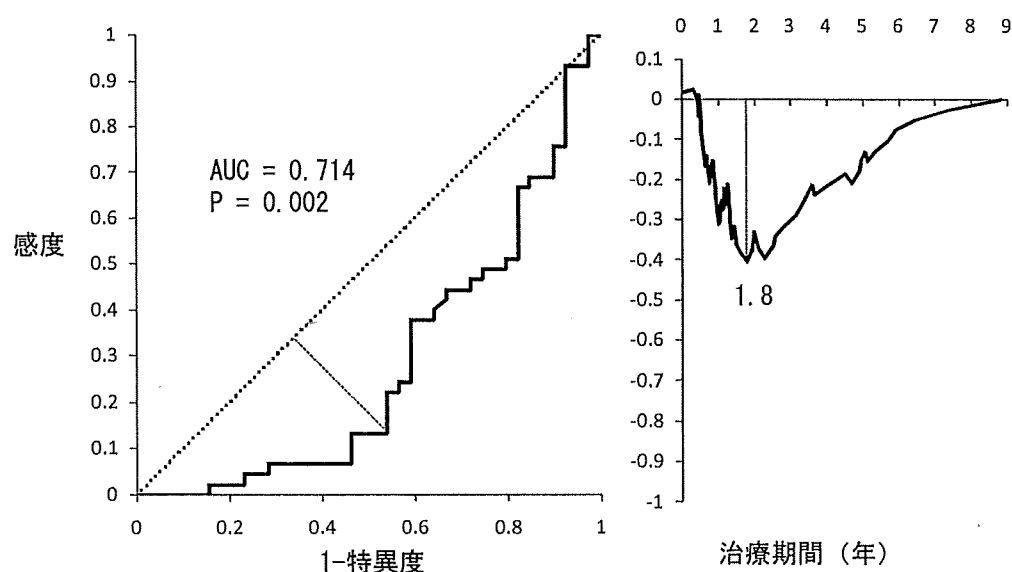


図6：治療期間と再燃についてのROC解析（37歳以上）

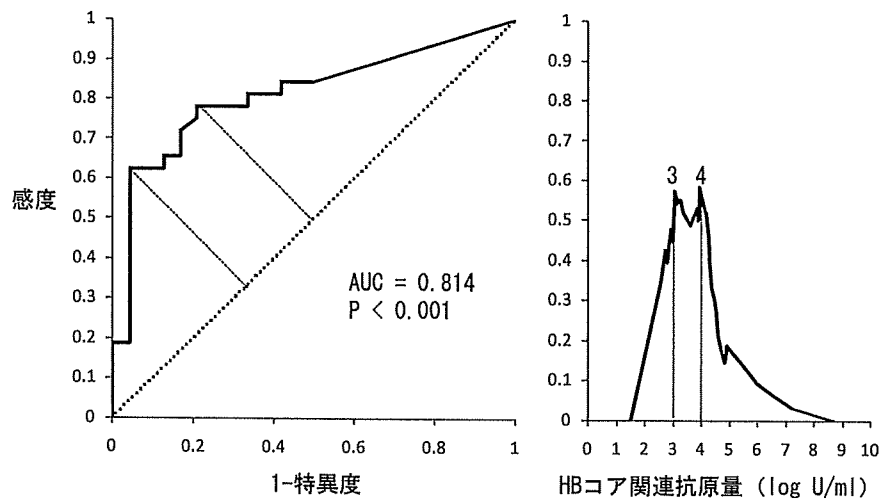


図7：中止時HBコア関連抗原量と再燃についてのROC解析（37歳以上）

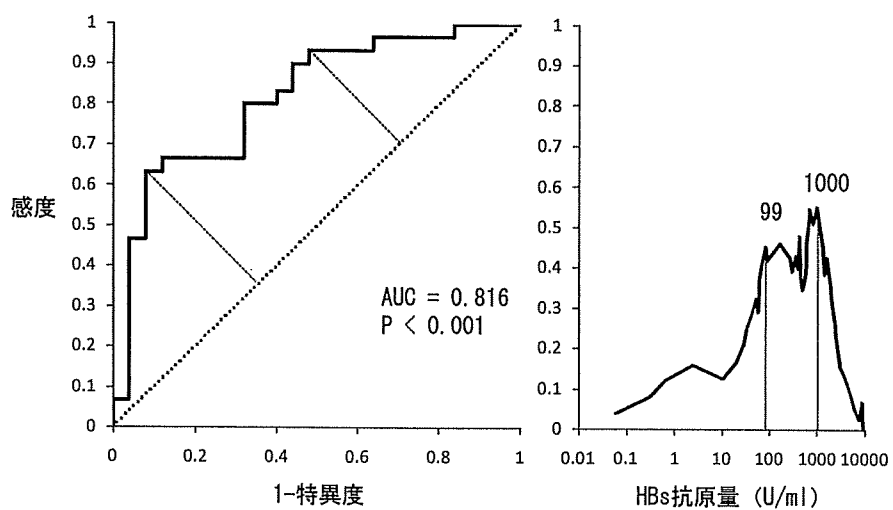


図8：中止時HBs抗原量と再燃についてのROC解析（37歳以上）

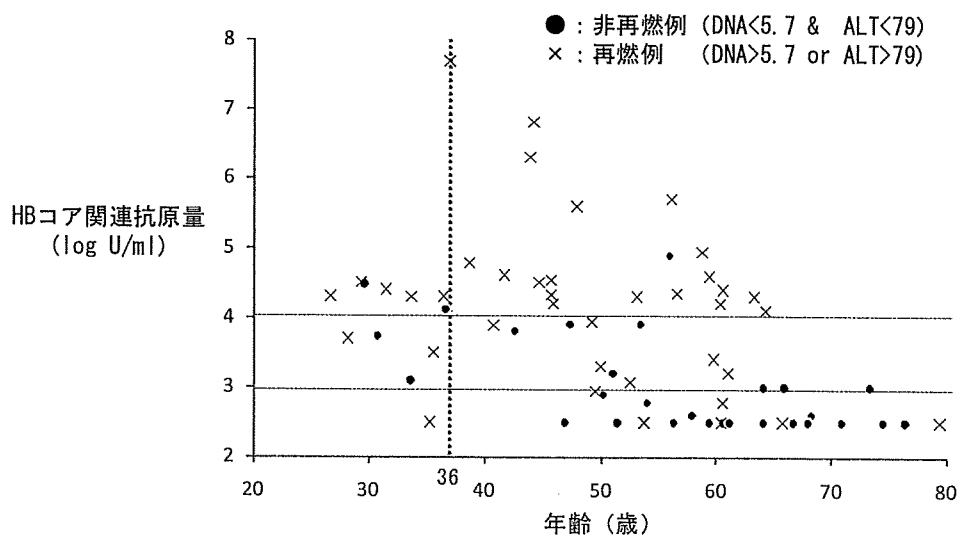


図9：中止時の年齢別にみたHBコア関連抗原量と再燃との関係

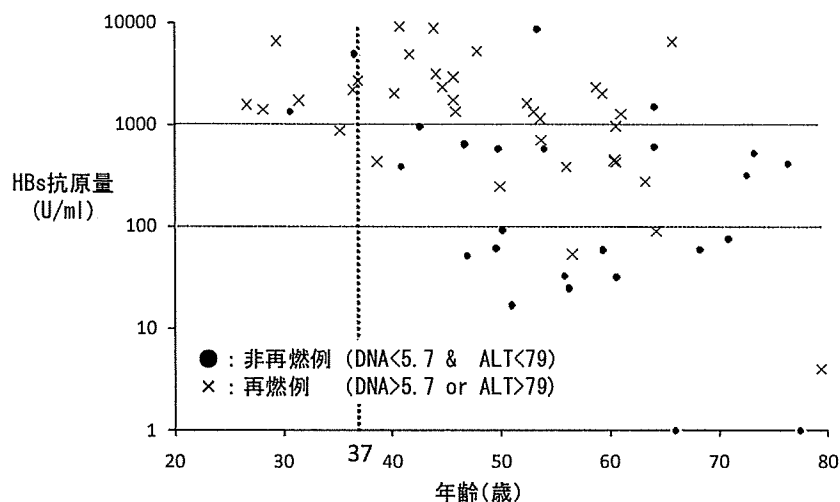


図10：中止時の年齢別にみたHBs抗原量と再燃との関係

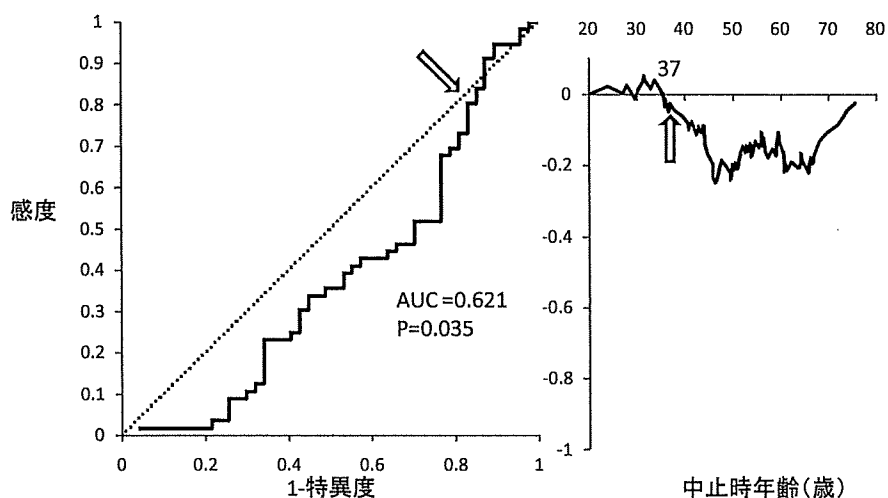


図11：非再燃の予測に関して、年齢因子についてのROC解析

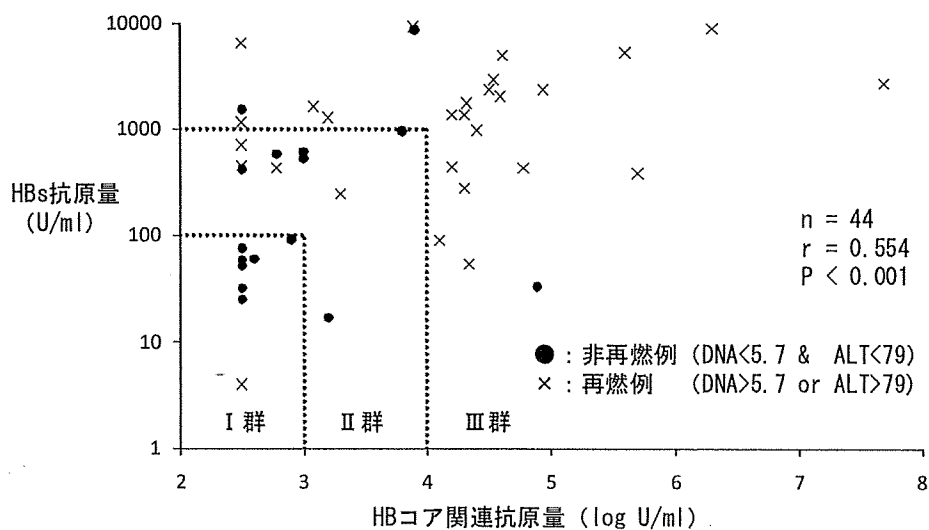


図12：中止時のHBs抗原量とHBコア関連抗原量からみた非再燃例の予測

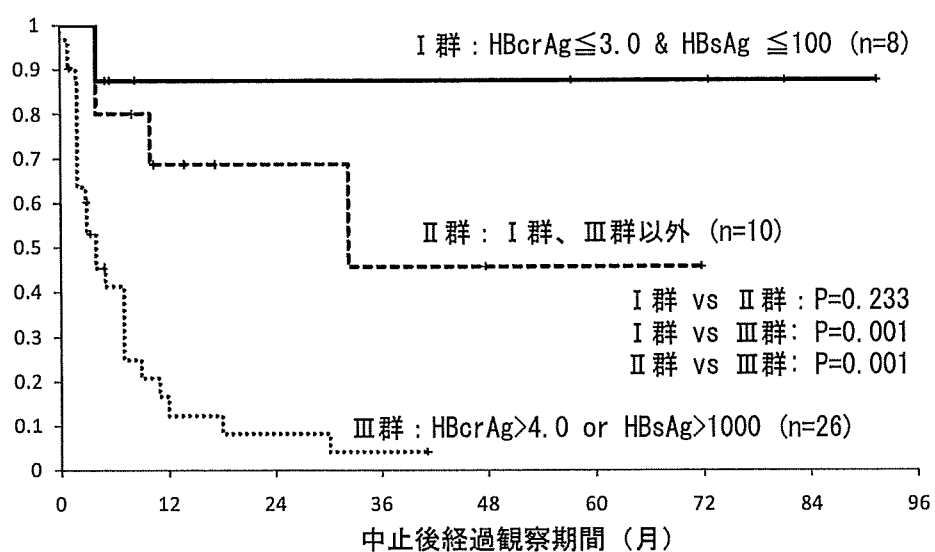


図13 : 中止時のHBs抗原量とHBコア関連抗原量からみた非再燃率の推移

## Ⅱ. 分担研究報告書

# 厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 分担研究報告書

### B 型肝炎に対する核酸アナログ中止例の予後解析

研究分担者 鈴木義之 虎の門病院肝臓センター 医長

研究要旨：核酸アナログ製剤により B 型慢性肝疾患患者の治療は一変し、予後の向上に多大な貢献をしたことは事実である。現在本邦では三種類の核酸アナログ製剤が使用可能であるが、強い抗ウイルス効果の反面、中止後の肝炎の増悪や mutant の出現といった多くの問題を抱えている。本研究班では、核酸アナログの中止を目指した取り組みを行っているが、今年度は当院で過去に核酸アナログを中止した症例の解析を行い、中止可能症例の特徴およびその指標となる検査について検討を行った。また、積極的に中止していく方法として新たにインターフェロン (IFN) sequential 治療を開始しているのでその途中経過につき報告する。

#### A. 研究目的

核酸アナログ製剤により B 型慢性肝疾患患者の治療は大きな変貌を遂げ、予後の向上に多大な貢献をしたことは事実である。しかしながら長期投与が原則である本薬剤を中止する手段や指標となる検査で確立されたものは未だ見出せていない。我々も中止を目指した取り組みとして過去の症例の検討を行い、中止基準となる因子を見いだすことを目的とする。

#### B. 研究方法

当科において 2008 年 11 月までに核酸アナログを開始し 1 年以上の経過観察を行っている症例は延べ数にしてラミブジン (LMV) 1137 例、アデフォビル (ADV) 352 例、エンテカビル (ETV) 358 例である。このうち、何らかの理由により核酸アナログ治療を中止した症例は、LMV 62 例、ADV 3 例、ETV 12 例であった。今年度は LMV 中止例につき検討を行っており、その症例の中止理由、背景因子、その後の経過につき検討した。また、中止予測因子として HBcrAg とリアルタイム PCR 法による HBV-DNA の測定を行った。(検討(1))。さらにこのうち HBV-DNA 陰性化を維持している症例 (2.1log copy 以下) に対して sequential therapy を導入し治療を行った例の HBV-DNA および ALT の維持率を検討した (検討(2))。

(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の守秘義務、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上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。本研究の遂行にあたっては、必要な申請を行い当院の倫理規定を遵守した。

#### C. 研究結果

検討(1) LMV62 例中、再燃が認められた症例は 40 例あり、その内訳は HBe 抗原陽性例 28/36 (78%)、HBe 抗原陰性 12/26 (46%) であった。いずれの群からでも HBs 抗原の消失により中止した症例は 2 例ずつ存在し経過良好である。再燃を予測する因子としては HBcrAg とリアルタイム PCR 法による HBV-DNA を比較した。中止後の再燃無しと有りでは中止時の HBcrAg では、中央値で 4.2 vs. 5.3、HBV-DNA では、2.84 vs. 3.70 となりいずれも有意差が認められた。しかしながら、それぞれの陰性群で比較してみると HBcrAg からは、2 例の再燃が認められ感度の点では HBV-DNA の法が優れている可能性が示唆された。検討(2) sequential therapy は LMV5 例、ETV3 例に施行されており、IFN 開始時の背景因子は全例 HBe 抗体陽性であり、ALT は 20 (中央値 13~26)、HBV-DNA は 2.1 以下、HBcrAg 3.6 (3~5.1) であった。全例 4 週間併用の後、核酸アナログを中止し得ており、現在治療中の症例も含め肝炎の再燃は認められていない。

#### D. 考察

HBV-DNA の陰性化が得られても核酸アナログ中止により肝炎が再燃し再投与を行わざるを得ない症例が多く存在することが明らかとなった。指標と

なる検査については、感度の点からも今後更なる検討が必要であると考えられる。sequential therapy は短期の経過では抗ウイルス効果は十分とはいえないもののALT正常化率は高く、特にHBe抗体陽性症例において良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。

#### E. 結論

核酸アナログ中止可能症例の選別には今後も更なる検討が必要である。sequential therapy は今後の経過を十分に検討する必要があるが本疾患に対する核酸アナログ中止を目指した治療の選択枝となりえることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

なし

##### 2. 論文発表

1) Suzuki Y et al : Efficacy of entecavir treatment for lamivudine-resistant hepatitis B over 3 years: Histological improvement or entecavir resistance? Journal of Gastroenterology and Hepatology 2009 ;24: 429-435

2) Hashimoto Y, et al : Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy Journal of Medical Virology 2009 in press

3) Suzuki F et al : The efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2009 in press

4) 保坂哲也 他：核酸アナログ療法中のB型関連肝癌に対する肝癌再発予測マーカーとしてHBコア関連抗原の有用性 肝臓 2009;50(10): 588-589

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 分担研究報告書

### 高感度 HBV DNA 定量法によるラミブジン中止症例の再検討

研究分担者 新海登 名古屋市立大学医学研究科 臨床研究医  
研究協力者 田中靖人 名古屋市立大学医学研究科 教授

#### 研究要旨：

以前に B 型慢性肝炎患者での安全に Lamivudine (以下 Lam) を中止出来るかを検討したときに HBV DNA を TMA 法にて測定していたが、今回、ロシユの高感度 HBV DNA 測定系 (TaqMan PCR) にて再検討した。結果：1) 高感度 HBV 測定系の” <2.1 (+)” のみでは安全に Lam 中止を試みることは困難と思われた。2) . 高感度 HBV 測定系にて” 検出せず” が継続してから HBcrAg を確認するのが良いと思われる。3) HBV DNA と HBcrAg の使い分けに関しては検討の検討課題である。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) のモニタリングには HBV DNA, HB コア関連抗原 (HBcrAg), HBs 抗原定量等の様々な検査系が用いられている。現在 B 型慢性肝炎患者における治療薬に核酸アナログがあり日本では Lam, Entecavir 等が使われている。核酸アナログは高値であり、患者の状態から投与が必要なければ、中止できるのが望ましい。しかし投与中止における肝炎再燃が懸念される。そのため、上記の検査系を使用して安全な中止基準を検討した。以前の検討 (Shinkai et. al, Hepatol Res 2006) では Lam 中止基準を HBV DNA TMA 法で陰性かつ HBeAg 陰性が 6 ヶ月続いた症例で、中止時 HBcrAg が 3.4 logU/ml 以下のものが肝炎再燃を起こさなかった。しかし今現在 HBV DNA は TMA 法からより感度の高い Taqman PCR 法に代わっており、TaqManPCR での評価をする必要があった。

#### B. 研究方法

以前の論文でエントリーしていた患者 (Lam 中止後肝炎再燃例 (以下、再燃例 10 例) Lam 中止後肝炎非再燃例 (以下、非再燃例) 8 例) に対して当院の同意書に基づき採取されていた、保存血清を用いてレトロスペクティブに Lam 投与中止時とその 6 ヶ月前の時点での HBsAg 定量、HBcrAg、高感度 HBV DNA をそれぞれ測定した。

(倫理面への配慮)

患者からは書面上で同意書を取得している。

#### C. 研究結果

再燃例、非再燃例ともに HBV DNA は 2.1 log

copies /ml 未満が多かった。再燃例の中には中止時 3.1 log copies/ml と高いものも存在した。

再燃例では 6 ヶ月、中止時ともに継続して検出感度以下であった例はなかった (0/8 例)。非再燃例では 2 例において 6 ヶ月、中止時ともに継続して検出感度以下であった (2/5 例)。非再燃例の中に 6 ヶ月前検出感度以下、中止時 2.1 log copies/ml の例があった。HBV DNA が同じ” 検出せず” や” 2.1 log copies/ml 未満” であっても、HBcrAg は非再燃例が、再燃例に比べて低い値を示していた。非再燃例の HBcrAg 高値のものも Lam 中止後 TMA 法で HBV DNA 3.7 未満がおおく、HBcrAg も 3-4 を推移していた。再燃例にも HBsAg 低値なものは存在するが HBcrAg が高値だった。

#### D. 考察

HBV DNA が TMA 法から検出感度の高い TaqMan PCR に代わることで、以前の検討での中止の前提となる HBV DNA に差がみられる可能性があったが、実際には多くの症例では 2.1 log copies/ml 未満で差はみられなかった。高感度 HBV 測定系の” <2.1 (+)” のみでは安全に Lam 中止を試みることは困難と思われた。しかしながら再燃例では中止時と中止 6 ヶ月前の 2 ポイントでともに高感度 HBV 測定系にて” 検出せず” のものはないことより、継続して HBV DNA が TaqMan PCR で” 検出せず” になるのが安全に核酸アナログ投与中止をするひとつの目安になると思われる。さらに、同じ” 検出せず” であっても HBcrAg には再燃例と非再燃例では非再燃例で低値であることから、HBcrAg の併用は必要と思われる。また現在 HBcrAg と HBV DNA

は保険上同時測定できないため、どこまで HBV DNA でフォローするかについては検討の余地がある。

#### E. 結論

HBV DNA TaqMan PCR は TMA 法に比べて HBV のモニタリングには、より有用ではあるが、TaqMan PCR のみでは安全な Lam 中止基準を設定することは出来ず、HBcrAg や HBsAg などの他の検査系の併用が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

2009 年西部肝臓

B 型肝炎に対する Entecavir の治療成績と各種血清マーカーの推移

##### 2. 論文発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

# 厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 分担研究報告書

### B 型慢性肝炎に対する Lamivudine から Entecavir への切替例における Entecavir 耐性変異について

研究分担者 平松直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：近年、Entecavir (ETV) の導入により、B 型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法の治療成績が向上し、Lamivudine (LAM) から ETV への切替投与が行われる症例が少なくない。今回、こうした切替例における治療効果および ETV 耐性出現について検討した。この結果、ETV 開始時 HBV DNA 量  $< 2.6$  logcopies/ml、および  $2.6 - < 4.0$  logcopies/ml であった症例では、切替後の抗ウイルス効果は良好であった。また、HBV DNA 量  $\geq 4.0$  logcopies/ml の 6 例中 1 例から ETV 耐性ウイルスを検出した。B 型慢性肝疾患における、LAM から ETV への切替治療では、YMDD 変異が未検出であっても、LAM 不応 (HBV DNA  $\geq 4$  logcopies/ml) 例では、ETV 耐性を獲得する可能性があるため、注意を要する。

#### A. 研究目的

ETV 導入により、B 型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法の治療成績は向上している。また、LAM 投与中の症例においては、その後の高率な LAM 耐性ウイルス出現を懸念して、ETV への切替投与が行われる症例が少なくない。一方、ETV 耐性ウイルスは、初回投与例よりも LAM 耐性例において出現率が高いと報告されている。今回、LAM 耐性を認めない B 型慢性肝疾患における LAM から ETV への切替投与例の治療効果および ETV 耐性出現について検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 対象

対象は、LAM を 6 ヶ月以上投与した後、ETV に切替えた、LAM 耐性を認めていない B 型慢性肝炎 44 例である。男性 28 例/女性 16 例、年齢中央値は 59 歳 (33-79 歳)、HBeAg 陽性 17 例/HBeAg 陰性 27 例で、LAM 投与期間は 14 ヶ月、ETV 投与期間は 19 ヶ月 (10-30 ヶ月) であった (表 1)。

##### 2. 方法

対象を ETV 開始時の HBV DNA 量により、3 群 ( $< 2.6$ ,  $2.6 - < 4.0$ ,  $4.0 \leq$  logcopies/ml) に分類し、ETV の治療効果を検討した。LAM 耐性ウイルス変異は、34 例は PCR-ELMA 法にて rtM204V/I を確認し、11 例は LAM 投与中に nadir から 1 logcopies/ml 以上の viral rebound にて判定した。また、nadir から 1 logcopies/ml 以上の viral rebound を認めた場合

には、PCR-direct sequence により ETV 耐性ウイルスの出現を検討した。

#### C. 研究結果

ETV 切替時のウイルス量別の群分けでは、LAM 著効と考えられる  $2.6$  logcopies/ml 未満が 31 例、 $2.6 - 4.0$  logcopies/ml が 7 例、 $4.0$  logcopies/ml 以上が 6 例であった (表 1)。 $4.0$  logcopies/ml 以上の群で、eAg 陽性例の比率が高い以外、各群の背景因子には有意な差はなかった。 $2.6$  logcopies/ml 未満での切替例では、全例で経過観察中に viral rebound は認めなかった (図 1)。また、ETV 開始時  $2.6 - 4.0$  logcopies/ml であった 7 例についても、全例が最終観察時に  $2.6$  logcopies/ml 未満となった。一方、ETV 開始時に  $4.0$  logcopies/ml 以上であった 6 例では、5 例で  $3.0$  logcopies/ml 未満、うち 3 例で  $2.6$  logcopies/ml 未満となったが、1 例で viral rebound を認め、この症例では、PCR-direct sequence 法にて、204、180 の LAM 耐性変異に加え、202 の ETV 耐性変異を検出した。

ETV 耐性変異出現例の臨床経過を示す (図 2)。症例は 52 歳男性で、ETV 治療開始時、eAg 陽性、HBV DNA 量は  $7.6$  logcopies/ml 以上であった。ETV 切替まで LAM を 2 年間投与されていたが、PCR-ELMA 法による 4 回の検査では YMDD 変異は検出されていなかった。ETV に切替後、一旦ウイルスの低下は認めしたが、ETV 増量にもかかわらず ETV 耐性変異の出現を認めた。次に、本症例の①～⑤ (図 2) の保存血清を

用いて、direct sequence 解析を行った。その結果、②の ETV 切替直前の血清では、A181T 変異を認め、LAM 不応の原因であると考えられた。また、ETV 切替後の③では、LAM 耐性である 204、180 の変異を検出し、さらに④では ETV 耐性変異である S202G が検出された。その後、LAM/ADV 併用療法を開始し、一旦ウイルスは 5.6 log copies/ml まで低下したが、②で出現していた 181 変異ウイルスが再出現し、LAM/ADV 併用療法にも不応となったため、この後、ETV/ADV 併用療法に変更し、現在ウイルス量の低下を認めている。

本症例では、②と⑤の 181 に変異のあるタイプのウイルスと、③と④の 204、180、202 に変異があるタイプの 2 系統のウイルスが、投与薬剤に応じ、交互に優位に出現した稀な症例と考えられる。Direct sequence による RT region の薬剤耐性に関与するアミノ酸変異 (180、181、202、204) を含む全アミノ酸配列の検討でも、②と⑤、③と④がそれぞれ同系統のウイルスであることが確認された (図 3)。

#### D. 考察

LAM 耐性を認めない症例における、LAM から ETV の切替治療において、ETV 開始時 HBV DNA < 2.6 logcopies/ml、および 2.6-4.0 logcopies /ml である症例では、切替後の抗ウイルス効果は良好であった。また、HBV DNA  $\geq$  4.0 log copies/ml 症例より ETV 耐性ウイルスが検出され、LAM/ETV 耐性 (M204V+L180M+S202G) ならびに LAM/ADV 耐性 (A181T) の 2 系統の耐性ウイルスが混在していると推測された。

#### E. 結論

B 型慢性肝疾患における、LAM から ETV への切替治療では、YMDD 変異が未検出であっても、LAM 不応 (HBV DNA  $\geq$  4 logcopies/ml) 例では、ETV 耐性を獲得する可能性があるため、注意を要すると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表:

- 1) 倉繁奈緒、平松直樹、林 紀夫. “B 型慢性肝疾患に対するエンテカビルの治療成績—OLF 多施設共同研究” パネルディスカッション「B 型肝炎治療の最前線」第 95 回日本消化器病学会総会. 日本消化器病学会雑誌. 2009;106:A77.

誌. 2009;106:A77.

- 2) 倉繁奈緒、平松直樹、林紀夫. “ラミブジンからエンテカビルへの切替症例におけるラミブジン非耐性 B 型慢性肝疾患の治療成績” ワークショップ「B 型肝炎の基礎と臨床」第 45 回日本肝臓学会総会. 肝臓. 2009;50:A75.

##### 2. 論文発表:

- 1) Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Yakushijin T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Nagase T, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Kashiwara T, Hayashi N. Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Gastroenterol.* 2009;44(6):601-7.
- 2) Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oze T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Fukuda K, Oshita M, Mita E, Fukui H, Nagase T, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Kashiwara T, Hayashi N. Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol.* 2009;44(8):864-70.
- 3) Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir. *Antivir Ther.* 2009;14(6):873-7.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし