

表1. ETV切替治療開始時患者背景

	all (n = 44)	ETV切替時 HBV DNA (LC/ml)		
		< 2.6 (n = 31)	2.6-< 4.0 (n = 7)	≥ 4.0 (n = 6)
Gender (male/female)	28 (64%)/16	19/12	5/2	4/2
Age (years)	59 (33-79)	60 (35-79)	65 (41-89)	55 (33-85)
HBeAg (positive/negative)	17/27	9/22	3/4	5/1
HBV DNA (logcopies/ml)	<2.6 (<2.6-5.2)	< 2.6	3.1 (2.6-3.6)	4.6 (4.0-5.2)
rtM204V/I mutation (absence/NT)	27/17	18/13	4/3	5/1
ALT (IU/l)	26 (11-78)	25 (11-64)	31 (13-46)	20 (17-78)
Chronic hepatitis/cirrhosis/HCC	27/11/6	19/7/5	4/2/1	4/2/0
Duration of prior LAM treatment (y)	14 (6-73)	15 (6-73)	10 (7-42)	9 (8-32)
Duration of ETV treatment (M)	19 (10-23)	19 (10-23)	19 (10-22)	20 (16-22)

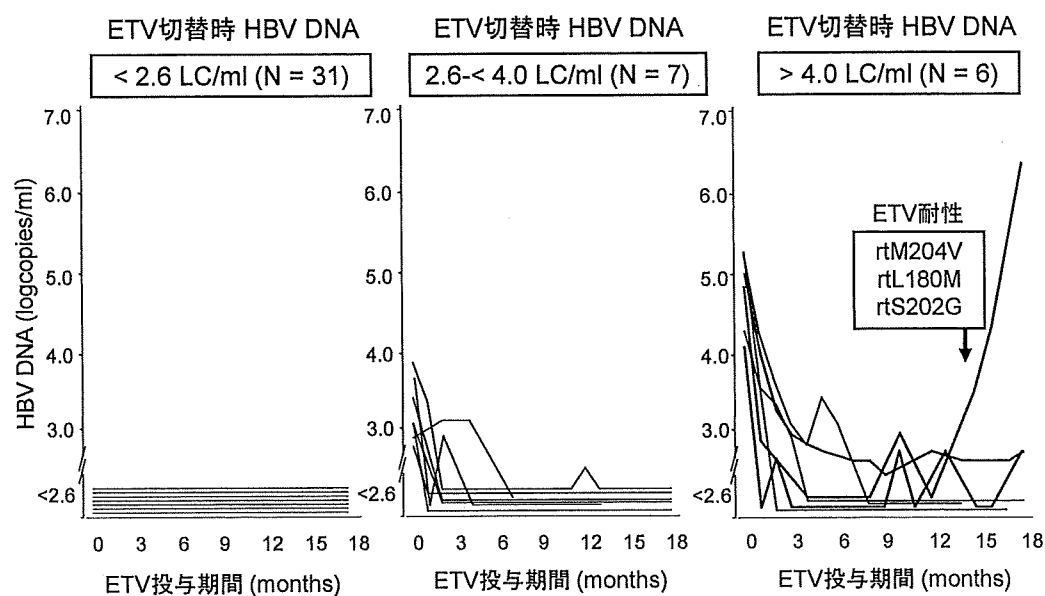


図1. LAM 耐性未出現例における ETV 切替後の HBV DNA 量推移

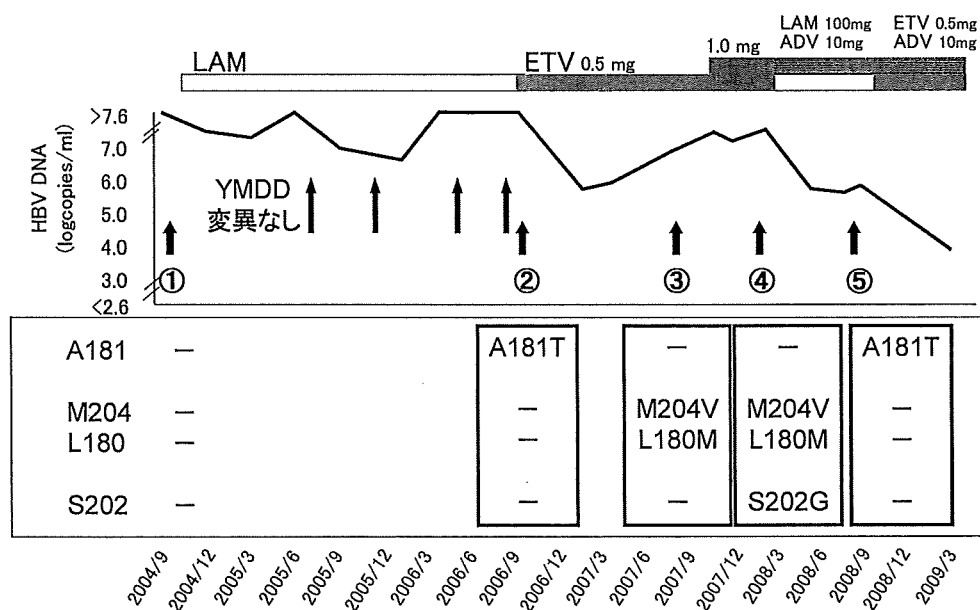


図 2. LAM から ETV に切替後 ETV 耐性ウイルスが検出された症例の臨床経過

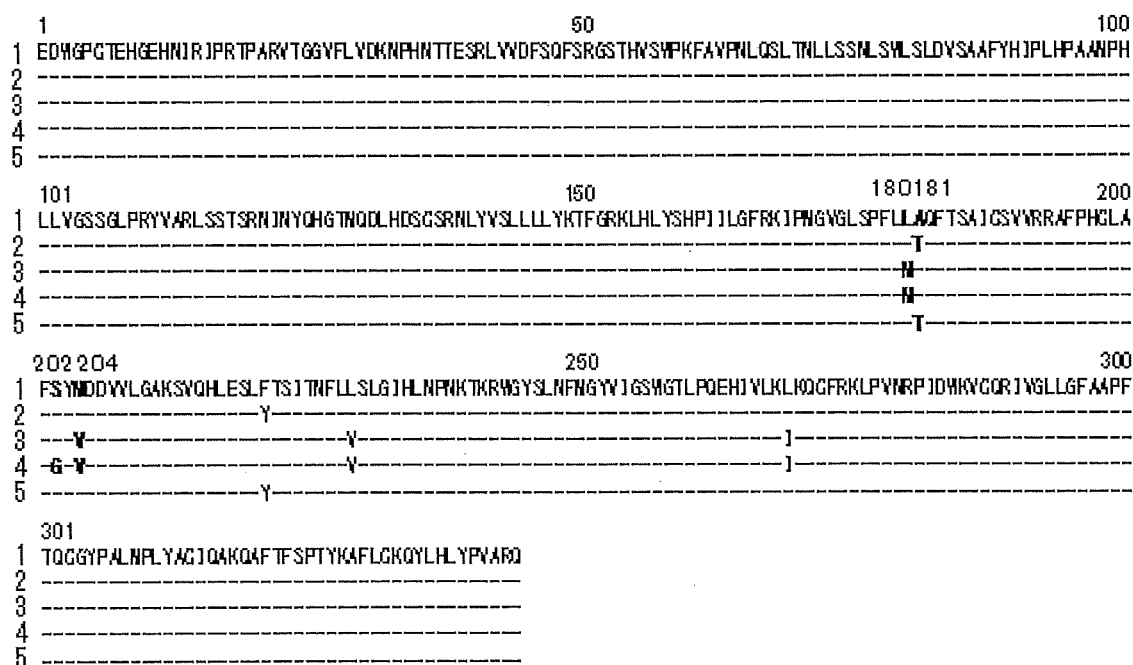


図 3. RT regionのアミノ酸配列

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

核酸アナログ治療時の HBV DNA、HBsAg および HBcrAg の変動の検討

研究分担者 豊田成司 札幌厚生病院 病院長
研究協力者 狩野吉康 札幌厚生病院 副院長
小関至 札幌厚生病院 第三消化器科 医長

研究要旨：B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を評価し、治療中止の指標とするためには HBV マーカーの経時的な測定が必須である。核酸アナログ治療中止指標の候補と考えられる HBV DNA、HBs 抗原、HB コア関連抗原の自然経過および核酸アナログ投与時の変動を検討した。HBV DNA は Virion に由来し HBV の増殖を反映すると考えられ、HBs 抗原は Viriion と不完全粒子、HB コア関連抗原はコア抗原、HBe 抗原、中空粒子に由来し共に HBV の増殖と cccDNA 転写/mRNA 翻訳を反映すると考えられている。HBV DNA は核酸アナログを投与した際には、現在の測定系では、測定感度以下まで低下する症例が多く、治療中止の指標とはなり得ない。HB s 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ことが明らかになった。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。

A. 研究目的

B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を評価するためには HBV マーカーの経時的な測定が必須である。今回、核酸アナログ治療中止の HBV マーカーの候補と考えられる HBV DNA、HBs 抗原、HB コア関連抗原の自然経過および核酸アナログ（エンテカビル）投与時の関連を検討した。

B. 研究方法

対象は核酸アナログ治療を施行した B 型慢性肝疾患 117 例（慢性肝炎 94 例、肝硬変 23 例）である。保存血清あるいは通常診療時の採血にて上記の 3 種類の HBV マーカーを定量測定した。HBV DNA は Amplicor Monitor あるいは TaqMan HBV にて、HB コア関連抗原はルミパルス®HBcrAg にて測定し、HBs 抗原はアーキテクト HBs・QT にて測定し、測定値が 250IU/ml 以上の検体は添付の希釈液を用い適宜希釈して定量測定した。またエンテカビルを投与した 40 例を対象に、投与前、投与 2 年目の 3 種類の HBV マーカーの関連を検討した。

（倫理面への配慮）

日常の診療時に行った測定に関しては、通常の診療の一部であり、倫理的な問題は発生しない。保存血清に関しては、当院の倫理委員会の承認を受けた血清保存の同意説明文書を用いて血清保存の目的と個人情報保護の保護について説明の上、文書にて同意を取得している。

C. 研究結果

自然経過（核酸アナログ投与前）の 3 種類の HBV

マーカーは HBV DNA と HBs 抗原が $r=0.4896$ 、HBV DNA レベルと HB コア関連抗原が $r=0.4498$ 、HBs 抗原と HB コア関連抗原が $r=0.4294$ （いずれも $p<0.001$ ）と良好な相関を示した。HB コア関連抗原には HBe 抗原が含まれるため、HBe 抗原の有無別に HBs 抗原と HB コア関連抗原を検討したが HBe 抗原陽性では $r=0.3512$ ($p<0.05$)、HBe 抗原陰性では $r=0.4498$ ($p<0.001$) と共に良好な相関を示した。エンテカビルを投与した 40 例中 39 例で HBV DNA は 2.1log copies/ml 未満（定量感度以下）に低下していた。HBs 抗原はエンテカビル投与前平均 3.00 log copies/ml、2 年後平均 2.76 log copies/ml と僅かな減少にとどまったのに対し、HB コア関連抗原はエンテカビル投与前平均 5.36 log IU/ml、2 年後平均 3.78 log copies/ml と約 2log の低下を認めた。エンテカビル投与 2 年後の HBs 抗原と HB コア関連抗原は $r=0.3058$ ($p=0.0551$) と有意な相関を示さなかった。

D. 考察

HBV DNA は Virion に由来し HBV の増殖を反映すると考えられ、HBs 抗原は Viriion と不完全粒子、HB コア関連抗原はコア抗原、HBe 抗原、中空粒子に由来し共に HBV の増殖と cccDNA 転写/mRNA 翻訳を反映すると考えられている。HBV DNA は逆転写を阻害する核酸アナログを投与した際には、現在の測定系では、測定感度以下まで低下する症例が多く、治療効果の指標とはなり得ても、治療中止の指標とはなり得ない。HB s 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なかった。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ことが明らかになった。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。

E. 結論

3 つの HBV マーカー、HBV DNA、HBs 抗原、HB コア関連抗原は核酸アナログ未投与では良好な相関を示した。核酸アナログ（エンテカビル）投与により、HBV DNA は大部分の症例で定量感度以下まで低下し核酸アナログ治療中止の指標としては不適であった。HB s 抗原、HB コア関連抗原の核酸アナログ投与下の変動は乖離を認め、今後はこの 2 つのマーカーの組み合わせから核酸アナログ治療中止の指標を検討すべきと考えられる。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 学会発表
未発表
2. 論文発表
未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

研究テーマ名 HBV RNA と核酸アナログ治療効果

研究分担者 柘植雅貴 広島大学自然科学研究支援開発センター 助教授
研究協力者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 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伴い、血中の HBV DNA が低下する一方で、血中に HBV RNA を保有するウイルスが出現し、そのウイルス量が核酸アナログ耐性ウイルスの出現に関与していることを示してきた。本研究では、核酸アナログ治療中止後の B 型慢性肝炎の臨床経過を予測し、治療中止可能な症例を選択することを目的とし、治療中の HBV RNA 量の変化と治療中止後の臨床経過との関連性について検討した。対象は、当院にて核酸アナログ治療を中止された 25 症例。治療前、治療中、治療後の保存血清を用いて、HBV DNA 量、HBV DNA+RNA 量を測定し、患者の臨床背景や臨床経過との関連性について検討を行った。その結果、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だった。このことから、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が示された。

A. 研究目的

核酸アナログ治療は、B 型慢性肝炎に対する中心的治療として大きな役割を担っている。しかしながら、耐性株出現や治療中止が困難等の大きな問題がある。核酸アナログ治療では強力な抗ウイルス効果により、ほとんどの症例で血中の B 型肝炎ウイルス (HBV) DNA が著明に低下するが、その一方で、細胞内での逆転写反応が行われず、RNA 粒子の状態で血中に放出された HBV RNA 粒子が存在することが分かり、その血清の HBV RNA 量が耐性株出現に強く関与していることを示してきた (Hatakeyama et al., *Hepatology* 2007)。

本研究では、核酸アナログ治療前、治療中、治療後の患者血清中の HBV RNA 量、HBV DNA 量を測定することにより、HBV RNA 量、HBV DNA 量の変化が核酸アナログ治療中止後の臨床経過にどのように関与するかを検討するとともに、HBV RNA が核酸アナログ治療中止可能症例の選択の指標となるかについて検討を行った。

B. 研究方法

対象：2009 年 12 月までに当院にて B 型慢性肝炎に対して核酸アナログ治療を受けた 424 症例のうち、核酸アナログ治療を中止した 25 症例。

核酸アナログ投与前、投与 1～6 ヶ月、中止時、中止後 1 ヶ月の保存血清 100 μ l より、スマイテスト R&D を用いて核酸を抽出。既報 (Hatakeyama et al., *Hepatology* 2007) と同様に、逆転写反応を行ったサンプルと行わなかったサンプルを準備した後、リアルタイム PCR にて HBV RNA、HBV DNA

を測定。HBV RNA 量、HBV DNA 量と患者背景、臨床経過との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

患者血清保存ならびに B 型肝炎ウイルス関連マーカーの測定に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。

C. 研究結果

解析対象 25 症例の患者背景は、男女比=17:8、年齢の中央値が 40 歳。治療開始時の血液検査所見：血小板 (Plt) 15.6 万/ μ l (9.6 万～28.0 万)、ALT141IU/L (22～1277)、HBV DNA7.2LGE/ml (4.1～8.7)、HBe 抗原陽性 12 例。核酸アナログ治療：治療薬 LMV 19 例、LMV+ADV 2 例、ADV 1 例、ETV 3 例。治療期間は 106 週間。観察期間は 343 週間だった。

検討 1：核酸アナログ治療中止後の HBV DNA の再上昇についての検討

対象 25 症例を核酸アナログ治療中止後 24 週以内に血清 HBV DNA 量が再上昇した群 (HBV 再上昇群 n=15) と上昇しなかった群 (HBV 非上昇群 n=10) に分け、患者背景、治療前、治療中、治療後の HBV DNA および HBV DNA+RNA 量について比較検討した。

治療前の患者背景では、HBV DNA 量が HBV 再上昇群で有意に高かった (P=0.012) ほかは、男女比、治療開始年齢、Plt、ALT、治療期間に有意な差は認められなかった。一方、治療後の HBV DNA およ

びHBV DNA+RNA 量の変化と治療中止後の経過についての検討したところ、治療前、治療開始 1、3、6 ヶ月後のHBV DNA+RNA 量は、HBV 再上昇群で有意に高く ($P=0.011, 0.042, 0.003, 0.030$)、また、治療前、治療開始 1、3 ヶ月後のHBV DNA 量も、HBV 再上昇群で有意に高かった ($P=0.003, 0.024, 0.022$)。

さらに、HBV 再上昇群では、治療開始 2、3 ヶ月後よりHBV DNA+RNA 量がHBV DNA 量よりも高値であったのに対し、非再上昇群では両者はほぼ同程度で変化し、HBV DNA+RNA 量がHBV DNA 量よりも高値を示すことはなかった。

検討 2：核酸アナログ治療中止後のALTの再上昇についての検討

対象 25 症例を核酸アナログ治療中止後 24 週以内にALT値が再上昇した群 (ALT 再上昇群 $n=8$) と上昇しなかった群 (ALT 非上昇群 $n=17$) に分け、検討 1 と同様の検討を行った。治療前の患者背景においては、男女比、治療開始年齢、Plt、ALT、HBV DNA 量、治療期間に有意な差は認められなかった。HBV DNA およびHBV DNA+RNA 量と治療中止後の経過についての検討では、治療開始 3、6 ヶ月後のHBV DNA+RNA 量は、ALT 再上昇群で有意に高く ($P=0.013, 0.048$)、また、治療開始 1 ヶ月後のHBV DNA 量も、ALT 再上昇群で有意に高かった ($P=0.048$)。

さらに、HBV DNA およびHBV DNA+RNA 量の経過を比較したところ、検討 1 ほど顕著ではなかったものの、ALT 再上昇群では、治療開始 2、3 ヶ月後よりHBV DNA+RNA 量がHBV DNA 量よりも高値であったのに対し、非再上昇群では両者はほぼ同程度で変化した。

D. 考察

核酸アナログ治療は、副作用がほとんどなく、抗ウイルス効果も強力であることから、B 型慢性肝炎治療の中心となった。HBV 感染では、cccDNA と呼ばれるウイルスゲノムがHBV 感染肝細胞の核内に存在すること、ウイルスゲノムの一部がヒトの染色体内にインテグレーションされることが知られており、その結果、核酸アナログ治療を継続してもHBVの完全排除は非常に稀である。さらに、核酸アナログ治療を中止した際には急速なウイルスの増殖とともに肝炎が増悪する可能性が高く、一旦、治療を開始すると継続的に治療を行わざるを得ない。現在、若年症例などでは投与期間が非常に長期に及ぶことになることから、インターフェロンを併用しながら、核酸アナログを中止する sequential 療法も試みられている。今回の検討では、13 例の症例で、sequential 療法が試みられて

いたが、治療中止後 6 ヶ月以上HBV DNAの再上昇を来たさなかった症例は 7 症例 (53.8%) やALTの再上昇を来たさなかった症例は 11 症例 (84.6%) といずれもインターフェロンを併用しない群 (それぞれ 33.3%、58.3%) に比べ、良好であったが、症例数が少ないため、有意差は認められなかった。

次に、本研究では、治療中のHBV DNAとHBV RNAの変化を観察することにより、中止後の臨床経過を予測することを考えた。これまでの当院の研究成果から、HBV DNA+RNA とHBV DNAとの乖離が核酸アナログに対する耐性株の出現に関与することを示してきた (Hatakeyama et al., *Hepatology* 2007) が、この結果は、HBVの複製能力に関連し、複製能力の高いウイルス株ほどHBV DNAとDNA+RNAの乖離が大きいと考えられる。そのため、核酸アナログ中止後の経過においてもALT再上昇群やHBV再上昇群では、ウイルス側の要因としてHBVの複製能力が高く、治療による抑制が解除されると速やかにHBV増殖が活性化し、HBV DNAおよびALTの上昇を惹起すると予測された。本研究の結果は、症例数が少ないもののその予想を裏付ける結果であると考えられ、ALT再上昇群やHBV再上昇群ではHBV DNAとDNA+RNAの乖離が大きく、中止後の経過が良好な症例では、HBV DNAとHBV DNA+RNAの乖離がほとんど認められなかった。

臨床の現場において、HBV DNA量が必ずしもウイルスの増殖能力を反映しているとは言えないため、治療開始の経過だけでは、ウイルスの複製能力を判断することは困難である。しかしながら、本研究のようにHBV DNAだけでなく、HBV DNA+RNAを定量し、経過を追うことにより、感染しているHBVの複製能力を予測することが可能であり、複製能の弱いHBVに感染した症例を中心に他の予後因子を検討することで、より効率的に核酸アナログ治療中止対象が選択できると考えられた。

E. 結論

いずれの解析も少数例であったため、解析対象症例を増やして検討する必要があるが、核酸アナログ治療中のHBV DNAおよびHBV DNA+RNAの変化をみることで中止後の臨床経過を予測できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「*in vitro*、*in vivo*モデルを用いた核酸アナログに対するHBVの抗ウイルス効果の検討」第95回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション

2. 阿部弘美、越智秀典、前川敏郎、藤本佳史、柘植雅貴、今村道雄、平賀伸彦、高橋祥一、茶山一彰「APOBEC3B 遺伝子の欠失多型がB型肝炎ウイルスの持続感染と病態に及ぼす影響」第45回日本肝臓学会総会 ワークショップ

3. 柘植雅貴、高橋祥一、高木慎太郎、木村友希、片村嘉男、阿座上隆広、河岡友和、實藤宏美、光井富貴子、平賀伸彦、平松憲、脇浩司、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方浩、茶山一彰「HBs抗体に対する escape mutant の出現とその解析」第45回日本肝臓学会総会 ワークショップ

4. 光井富貴子、柘植雅貴、河岡友和、実藤宏美、畠山剛、北村正輔、平賀伸彦、今村道雄、川上由育、相方浩、高橋祥一、茶山一彰「B型慢性肝疾患における Lamivudine、Adefovir 併用療法の治療効果と薬剤血中濃度との関連性の検討」第45回日本肝臓学会総会 ポスター

5. 柘植雅貴、光井富貴子、茶山一彰「*in vitro*、*in vivo*における核酸アナログ耐性HBVの検討とその対策」第13回日本肝臓学会大会 シンポジウム

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. 199(11):1599-607, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 論文発表

1. 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. 51(6):1046-54, 2009.

2. 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. Hepatol Res. 39(12):1159-68, 2009.

3. 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

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

核酸アナログ製剤中止例の長期経過の検討

研究分担者 今関文夫 千葉大学大学院腫瘍内科学 准教授
研究協力者 横須賀収 千葉大学大学院腫瘍内科学 教授

研究要旨：B型慢性肝炎で核酸アナログ製剤治療後に中止した症例の長期経過を検討した。千葉大学医学部消化器内科で核酸アナログ製剤を投与したB型慢性肝炎173例のうち、核酸アナログ製剤を1年以上投与して中止した17例（HBeAg陽性13例、陰性4例）のGPT、HBV-DNAの経過、再治療の有無を検討した。また、HBeAg陽性例で5年以上核酸アナログ製剤が投与されている30例のHBV-DNA経過別のHBsAg量の推移を検討した。核酸アナログ製剤を1年以上投与後に中止したB型慢性肝炎例の検討では、HBeAg陽性13例のうち6例で再治療が行われていた。再治療なしの7例中2例で最終観察時にHBV-DNA <4 log copies/ml、4例でALT <40 であった。HBeAg陰性4例では3例が再治療されており、再治療なしの1例はコントロール不良であった。HBeAg陽性例で核酸アナログ製剤が5年以上投与され、最終観察時にHBV-DNA <2.6 log copies/mlの症例の中にはHBsAgが100 IU/ml以下に低下している症例が3/27（11%）認められた。既存の核酸アナログ製剤中止基準（6か月以上HBV-DNA <2.6 log copies/mlを持続）およびそれを満たさないで中止した症例では高率に再燃が見られた。長期投与例でHBV-DNA測定感度以下持続例の中にはHBsAg量も低下し、中止後再燃の可能性の低い症例も存在すると考えられ、その基準設定が望まれる。

A. 研究目的

B型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤投与は効果、安全性から極めて有効な治療法であるが、中止後の再燃が問題であり、長期に投与される症例が多い。そこで、核酸アナログ製剤中止症例の長期経過を検討した。

B. 研究方法

千葉大学医学部消化器内科で核酸アナログ製剤を投与したB型慢性肝炎173例（平均年齢 47 ± 12 歳、男：女=126：47、HBeAg陽性100例、陰性73例）のうち、核酸アナログ製剤を1年以上投与して中止した17例（HBeAg陽性13例、陰性4例）のGPT、HBV-DNAの経過、再治療の有無を検討した。また、HBeAg陽性例で5年以上核酸アナログ製剤が投与されている30例のHBV-DNA経過別のHBsAg量の推移を検討した。HBsAg定量はSysmex社の化学蛍光酵素免疫法を用いた。本研究は後向き臨床研究であり、倫理的な問題はないと考える。

C. 研究結果

核酸アナログ製剤を1年以上投与後に中止したB型慢性肝炎例の検討では、HBeAg陽性13例（平均年齢 33 ± 13 歳、男：女=10：3、ALT 268 ± 299 IU/l、T-Bil 0.9 ± 0.5 mg/dl、PLT $17.9 \pm 5.8 \times 10^4/\mu$ l）のうち6例で再治療が行われていた。最終観察時に再治療例は全例がALT <40 になっていたが、再治療なしの7例中2例で最終観察時にHBV-DNA <4

logcopies (LC)/ml、4例でALT <40 であった。HBeAb陽性4例（平均年齢 34 ± 6 歳、男：女=3：1、ALT 260 ± 318 IU/l、T-Bil 2.7 ± 4.0 mg/dl、PLT $13.7 \pm 5.4 \times 10^4/\mu$ l）では3例が再治療されており、全例ALT <40 になっていたが、再治療なしの1例はコントロール不良であった。これら薬剤中止17例のうち投与中止時に6か月以上HBV-DNA <2.6 LC/mlを持続していた症例はHBeAg陽性例の2例、HBeAb陽性例の3例であった。HBeAg陽性例で核酸アナログ製剤が5年以上投与された30例のうち、最終観察時にHBV-DNA <2.6 LC/mlの23例（平均年齢 42 ± 9 歳、男：女=19：4、ALT 212 ± 186 IU/l、PLT $17.7 \pm 5.8 \times 10^4/\mu$ l、HBV-DNA 7.0 ± 1.4 LC/ml、HBsAg 40318 ± 61606 IU/ml）とHBV-DNA <2.6 LC/mlの7例（平均年齢 45 ± 10 歳、男：女=5：2、ALT 204 ± 18 IU/l、PLT $18.6 \pm 5.7 \times 10^4/\mu$ l、HBV-DNA 7.2 ± 0.1 LC/ml、HBsAg 57503 ± 13155 IU/ml）は投与開始時の背景に有意差はなかったが、HBV-DNA <2.6 LC/mlを持続している症例の中にはHBsAgが100 IU/ml以下に低下している症例が3/27（11%）認められた。

D. 考察

既存の核酸アナログ製剤中止基準（6か月以上HBV-DNA <2.6 LC/mlを持続していた症例）およびそれを満たさないで中止した症例では高率に再燃が見られた。一方、長期投与例でHBV-DNA <2.6 LC/ml持続例の中にはHBsAg量も低下し、中止後再燃の

可能性の低い症例も存在すると考えられた。

E. 結論

核酸アナログ製剤長期投与症例の一部には投与中止が可能な症例も存在すると考えられ、新たな基準設定が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 中本晋吾、今関文夫、深井健一、藤原慶一、新井誠人、米満裕、神田達郎、横須賀收. HCV コア aa70、91 変異に関する臨床背景の検討. 第45回日本肝臓学会総会 神戸(2009/6/4). 肝臓 50 巻 A70, 2009 年
2. 今関文夫、深井健一、横須賀 收. HBV 変異と病態. 第45回日本肝臓学会総会 神戸(2009/6/4). 肝臓 50 巻 A37, 2009 年
3. 今関文夫、中本晋吾、横須賀收. PEG-IFN、RBV 併用治療無効例の背景と対策. 第13回日本肝臓学会大会 京都(2009/10/14). 肝臓 50 巻 A452, 2009 年
4. 中本晋吾、今関文夫、米満裕、新井誠、神田達郎、藤原慶一、深井健一、金井文彦、横須賀收. HCV コア変異の IFN シグナルに与える影響に関する解析. 第13回日本肝臓学会大会 京都(2009/10/14). 肝臓 50 巻 A516, 2009 年
5. 中本晋吾、今関文夫、米満裕、新井誠、神田達郎、藤原慶一、深井健一、金井文彦、横須賀收. HCV コア変異と肝発癌との関連に関する解析. 第13回日本肝臓学会大会 京都(2009/10/14). 肝臓 50 巻 A559, 2009 年
6. 神田達郎、今関文夫、横須賀收. C 型肝炎ウイルス NS5A によるインターフェロンガンマ産生抑制の検討. 第51回日本消化器病学会大会 京都(2009/10/14) 日本消化器病学会雑誌 106 巻、A555, 2009 年
7. 今関文夫、中本晋吾、横須賀收. PEG-IFN、RBV 併用治療無効例の背景と対策. 第51回日本消化器病学会大会 京都(2009/10/14) 日本消化器病学会雑誌 106 巻、A629, 2009 年
8. Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Kanai F, Yokosuka O. Association of hepatitis C virus core mutation with hepatocarcinogenesis. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Washington DC. (2009/3/24).

9. Shuang W, Tatsuo Kanda T, Arai M, Imazeki F, Yokosuka O. Effects of hepatitis B virus precore or envelope antigen on Toll-like receptors signaling pathway in human hepatoma cell lines. 60th AASLD, Boston, 2009. Oct 30, 870A

2. 論文発表

1. Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. J Hepatol. 2009 Oct 23.
2. Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. J Viral Hepat. 2009 Nov 2.
3. Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 2009 Sep;40(9):1304-11.
4. Fujiwara K, Kojima H, Yonemitsu Y, Yasui S, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Sakaida I, Okita K, Tanaka E, Omata M, Yokosuka O. Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in sera from patients with hepatitis A of various severities. Liver Int. 2009 Jul;29(6):838-45.
5. Kobashi H, Takaguchi K, Ikeda H, Yokosuka O, Moriyama M, Imazeki F, Kage M, Seriu T, Omata M, Sakaguchi K, Shiratori Y. Efficacy and safety of entecavir in nucleoside-naïve, chronic hepatitis B patients: phase II clinical study in Japan. J Gastroenterol Hepatol. 2009 Feb;24(2):255-61.
6. Nakamoto S, Kanda T, Yonemitsu Y, Arai M, Fujiwara K, Fukai K, Kanai F, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis C amino acid substitutions 70 and 91 in the core coding region by real-time amplification refractory mutation system reverse transcription-polymerase chain

reaction. Scand J Gastroenterol.
2009;44(7):872-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

核酸アナログ製剤中止後の肝炎再燃予測における HBcr 抗原測定の意味

研究分担者 髭修平 北海道大学病院第三内科 講師

研究要旨：

核酸アナログ製剤投与例の治療中止後肝炎再燃の可能性を検討するために、核酸アナログ投与下における HBV 自体の活動性についての評価が望まれる。HBcr 抗原は、肝組織内の HBV cccDNA レベルを反映するものと推測されるマーカーであり、核酸アナログ製剤投与に拘らず HBV 活動性の指標になるうる。

本研究では、肝内 HBV cccDNA と HBcr 抗原を含めた血液中 HBV マーカーとの関連を検討し、核酸アナログ製剤中止後の再燃予測における HBV マーカーの有用性を検討した。

その結果、治療開始時 HBe 抗原陰性例に対する核酸アナログ製剤中止後のウイルス学的再燃の予測には、中止時の HBcr 抗原、HBs 抗原、HBV DNA 量、治療開始時の HBVprecore / core promoter 領域変異パターンの複合的評価が有効である事が示された。

A. 研究目的

- 1) 肝組織内の HBV cccDNA 量と血液中の HBV マーカーとの関連性を検討する。
- 2) 肝組織中 cccDNA 量と相関関係があると考えられる、血液中 HBcr 抗原と他の血中 HBV マーカーとの相関を検討する。
- 3) 核酸アナログ製剤中止例における、中止時点のウイルス学的データと中止後再燃の有無を retrospective に解析し、再燃予測性に検討する。

B. 研究方法

- 1) 肝組織中 HBV cccDNA を測定可能であった B 型慢性肝疾患症例 26 例（HBe 抗原陽性 23 例、陰性 3 例）について、肝生検と同時期の血液中の HBV マーカー（HBs 抗原、HBcr 抗原、HBV DNA 量）を測定した。
- 2) 血液中 HBcr 抗原を測定した B 型慢性肝疾患症例において、同時期の HBV マーカー（HBs 抗原、HBcr 抗原、HBV DNA 量）を測定する。
- 3) 核酸アナログ中止例の検討に関しては、原則として、以下の条件により核酸アナログ製剤（ラミブジンあるいはエンテカビル）投与を中止した例を対象とした。
 - i) 投与開始時 HBe 抗原陽性例：HBe 抗原/e 抗体の seroconversion (SC) 後、約 6 ヶ月以上、SC が維持されている例。
 - ii) 投与開始時 HBe 抗原陰性例：HBV DNA が測定感度以下に減少後、約 6～12 ヶ月以上、HBV DNA が同レベルを維持している例。
 - iii) 上記 i および ii に合致する対象症例は、

治療開始時 HBe 抗原陽性例 9 例、HBe 抗原陰性例 21 例、の合計 30 例であった。

- 4) 中止の検討例においては、中止時点の HBV マーカー（HBs 抗原、HBcr 抗原、HBV DNA 量）と、中止以前に測定した HBV precore /core promoter 領域変異の結果を解析に用いた。
- 5) 本研究における中止後の再燃は、以下のよう
に定義した。
 - i) ウイルス学的再燃：終了後 1 年以内に HBV DNA 量が 5.0 (log copies/ml) 以上に上昇したもの。
 - ii) 生化学的再燃：終了後 1 年以内の血清 ALT ピーク値が 40 (IU/l) を超えたもの。
- 6) 測定方法
 - i) HBs 抗原、HBe 抗原、HBe 抗体；CLIA 法 (Chemiluminescent immunoassay)
 - ii) HBcr 抗原；CLEIA 法 (Chemiluminescent enzyme immunoassay)なお、原血清での測定上限 (7.0 logU/ml) を超えた症例では、10 倍の段階希釈で測定し、換算値で表示した。(肝生検組織検討例)
 - iii) HBV DNA 量；real time PCR 法（一部の検体は TMA 法で測定）
 - iv) HBV precore/core promoter 変異
precore 変異 (nt1896) 測定は enzyme linked mini-sequence assay (ELMA 法) で、core promoter 変異測定は enzyme linked specific probe assay (ELSPA 法) で測定した。
 - v) 肝組織中 HBV cccDNA 量；real time PCR 法
- 7) 対象症例の肝組織 HBV cccDNA、血清中 HBcr

抗原用採血などに関しては、同意を取得し、解析結果の公表に際して個人の特定がなされないよう配慮した。

C. 研究結果

1) 肝組織中 HBV cccDNA 量と血清 HBcr 抗原量との関連性

高値例には 10 倍段階希釈して測定した血液中 HBcr 抗原と肝組織中 HBV cccDNA 量には、有意な相関を認めた。(r=0.85, p<0.01)

また、肝組織中 HBV cccDNA と血清中 HBV DNA 量 (r=0.77, p<0.01)、あるいは血清中 HBs 抗原 (r=0.53, p<0.01) ととも相関が認められた。

2) 血清中 HBcr 抗原量と HBV DNA 量との関連性 (無治療例)

i) HBe 抗原陽性例

HBe 抗原陽性例では HBcr 抗原高値例が多く、測定範囲上限を超える例を多数認めた。高値例に対して段階希釈にて定量測定を行うと、両者に有意な相関性を認めた。(r=0.88, p<0.01)

ii) HBe 抗原陰性例

HBcr 抗原と HBV DNA がともに定量測定可能な症例においては、両者に有意な相関性を認めた。(r=0.75, p<0.01) しかし、HBcr 抗原が測定感度以下で、かつ、HBV DNA が定量可能な症例の HBV DNA 量は 2.1~4.9(log copies/ml) の分布を認めた。

iii) HBV precore 変異と HBcr 抗原/HBV DNA

HBV precore 領域において、precore 野生株の比率 (%) と HBcr 抗原/HBV DNA 量比に相関性を認め (r=0.63, p<0.01)、precore 野生株の比率が高いほど、HBV DNA 量に対する HBcr 抗原量の比率が高めの傾向を示した。

3) 核酸アナログ投与例における、HBe 抗原/e 抗体と HBcr 抗原量の関連

核酸アナログ製剤投与中で HBV DNA 量が測定感度以下に減少した例における HBcr 抗原量を、HBe 抗原陽性/陰性別に関連を検討し、HBe 抗原陰性例は HBe 抗体価レベル別に検討した。HBcr 抗原量は、HBe 抗原陽性例では 4~6 (IU/ml) に分布していた。HBe 抗原陰性例の HBcr 抗原量は、HBe 抗体価 70%未満症例では 3~5 (IU/ml) で、70%以上の症例に測定感度以下 (3.0 IU/ml 未満) 症例が含まれた。

4) 核酸アナログ中止後の再燃について

i) 再燃率: Kaplan-Meier 法による治療終了後 6 ヶ月後、12 ヶ月後の累積再燃率は、ウイルス学的には 62.5%、75.0%、生化学的

には 58.3%、72.2%であった。

ii) HBe 抗原陽性例の治療終了時の HBV マーカーと再燃

SC 後に中止した例の再燃の有無別には、治療終了時の HBs 抗原価、HBcr 抗原量に有意差は認めなかった。

iii) HBe 抗原陰性例の HBV マーカーと再燃

治療終了時の HBs 抗原価、HBcr 抗原量は、再燃例と比較して、安定例で低値の傾向を認めるが、単独の指標ではオーバーラップする範囲が大きかった。

治療開始時の precore 領域が野生型優位 3 例は全例再燃を認め、precore/core promoter 領域が両者変異型パターンであった 13 例中 6 例 (46.2%) が非再燃であった。

iv) 治療開始前 HBe 抗原陰性例における、HBV マーカーと中止後 HBV DNA 非再燃率

HBV マーカーの条件として

① HBs 抗原: 500 (IU/ml) 以下

② HBcr 抗原: 4.0 (logU/ml) 以下

③ HBV DNA 量: 2.6 (log copies /ml) 未満

④ 治療開始時 precore/core promoter 変異パターン: 両者変異型

の 4 項目における、各症例の合致数と、終了後 1 年以内の HBV DNA 非再上昇 (安定) 率は、合致数 1 項目症例で 0/2 (0%)、2 項目合致で 1/9 (9.1%)、3 項目合致で 2/5 (40%)、4 項目合致で 4/5 (80%) であった。

D. 考察

核酸アナログ製剤投与例において、耐性株出現を認めない多くの症例では、治療中は HBV DNA 量が測定感度以下の状態を持続する。しかし、治療中に中止後再燃の予測をすることは困難である。従来、治療後 HBV DNA 量が測定感度以下に低下して中止をした例の多くが治療中止後早期に再燃を認め、本研究でも 1 年以内のウイルス学的、生化学的の累積再燃率は 70%以上であった。

肝炎再燃の可能性を検討する場合には、核酸アナログ投与下における HBV 自体の活動性についての評価が望まれるが、これまでに臨床的な判断は HBV DNA 量低値のみが根拠とされてきた。核酸アナログ製剤の主作用は HBV 増幅の抑制にあり、HBV 増殖の初期段階である核内 HBV cccDNA に対しては効果を持たない。さらに、核酸アナログ投与中の肝組織内 cccDNA を反映する血液中 HBV マーカーは、これまでに臨床で測定可能な検査がなかった。

HBcr 抗原は、HBV の core mRNA、precore mRNA から転写・翻訳される蛋白 (HBc 抗原、HBe 抗原、p22cr) を同時に測定するもので、2008 年から臨床に導入された。HBcr 抗原は、肝組織内の HBV cccDNA と密接に関連することが推測されるが、今回の研究においても、肝組織内 HBV cccDNA と血液中 HBcr 抗原に高い相関性を認め、血液中で肝内のウイルス増殖の程度を推測する指標として有用であることが示された。

核酸アナログ製剤投与中止後のウイルス学的・生化学的再燃に関して、血液中 HBcr 抗原が予測因子として有用である事が期待されたが、低値例からの再燃もあり、再燃/安定を判別可能な cut-off 値の設定は困難であった。HBcr 抗原低値であることは、非再燃における必要条件であると考えられた。今回の研究では、HBcr 抗原の他に、HBs 抗原、HBV DNA 量、precore / core promoter 領域変異パターンの因子を合わせて検討したところ、治療開始時 HBe 抗原陰性例においては、これらの複合的条件が合致する例で高い非再燃を予測する事が可能であった。HBe 抗原陽性例 (SC 後中止例) においては、HBcr 抗原も低値例は認めず、上記の要因を含めても、非再燃を予測可能とする基準は得られなかった。

核酸アナログ製剤投与が必要と判断された例の中で、肝硬変や肝癌合併例では、長期的に治療を継続することが望ましく、治療を中断すべきでないと考えられるが、慢性肝炎例で年齢や病期によっては、治療の終了が可能な例も含まれると思われる、安全な中止予測の基準を総合的指標で画定することは有意義である。

E. 結論

肝組織内 HBV cccDNA に関して、血液中の HBcr 抗原、HBs 抗原、HBV DNA 量は相関性の高いマーカーであることが示された。核酸アナログ投与中止後の再燃予測に関しては、血液中 HBV マーカーの複合評価が有用であった。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) Hepatitis B virus core-related antigen as a useful marker for the comprehension of HBV status in hepatocytes.

Hige S, Chuma M, Kobayashi T, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Asaka M.

60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.

November 2, 2009

Boston, USA

2) Clinical usefulness of hepatitis B core-related antigen for patients underwent nucleoside analogue administration.

Hige S, Kobayashi T, Sho T, Nakanishi M, Chuma M, Asaka M.

8th JSH Single Topic Conference

November 21, 2009

Tokyo, Japan

3) The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma.

Chuma M, Hige S, Meguro T, Nagasaka A, Nakanishi K, Yamamoto Y, Nakanishi M, Sho T, Kobayashi T, Asaka M.

8th JSH Single Topic Conference

November 21, 2009

Tokyo, Japan

2. 論文発表

1) The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma.

Chuma M, Hige S, Kamiyama T, Meguro T, Nagasaka A, Nakanishi K, Yamamoto Y, Nakanishi M, Kohara T, Sho T, Yamamoto K, Horimoto H, Kobayashi T, Yokoo H, Matsushita M, Todo S, Asaka M.

Journal of Gastroenterology 44; 991-999, 2009

2) Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A.

Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi I, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M.

J Clinical Microbiology 47; 1476-1483, 2009

G. 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 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ投与中止例の検討

研究分担者 八橋弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 部長

研究協力者 長岡進矢 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科 医師

研究要旨：核酸アナログ投与の中止条件を見出す目的で、ラミブジン(LMV)導入後 5 年以上経過を観察した B 型慢性肝疾患 72 例のうち投与を中止した 10 例について臨床的検討をおこなった。中止後肝炎再燃の基準は ALT：40IU/L 以上かつ HBV-DNA 量：5logcopies/ml 以上とした。中止時、全例で HBV-DNA は PCR 法で感度以下、HBe 抗原陽性例は HBe 抗原陰性化、あるいはセロコンバージョンを示していた。10 例中 2 例に肝炎の再燃を認めたが、1 例にエンテカビルを開始し、1 例は経過観察のみで再燃は鎮静化した。7 年以上 LMV を投与した 4 例では再燃を認めなかった。中止時の HBV コア関連抗原量が 4.1logU/ml 以下の症例では 88.8%の非再燃率(8/9 例)、中止時の HBs 抗原量が 3.1logU/ml 以下の症例では 87.5%の非再燃率(7/8 例)であった。10 例中 9 例で drug free の状態が持続した。LMV 中止可能な条件は HBV-DNA が PCR 法で感度以下、HBe 抗原陽性例は HBe 抗原消失またはセロコンバージョンを認め、HBV コア関連抗原が 4logU/ml 以下、HBs 抗原が 3logIU/ml 以下を満たすことなどが必要と考えられた。

A. 研究目的

当院における LMV 中止例の臨床背景、中止後の経過を検討することで、LMV 中止時の HBV コア関連抗原量、HBs 抗原量の定量をおこない、治療中止可能な条件を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

対象：当院にて 1999 年から 2004 年に LMV を導入後 5 年以上経過観察した B 型慢性肝疾患症例は 72 例（男性:51 例、女性:21 例）、HBeAg 陽性症例:52 例、年齢（中央値）：50 歳、慢性肝炎：40 例、肝硬変：29 例、肝細胞癌合併：3 例。このうち LMV 投与を中止した 10 例を対象とした。方法：1) LMV 治療前の臨床背景(年齢、性別、HBe 抗原、ALT 値、HBV-DNA 量、肝線維化ステージ、HBs 抗原量)について検討した。2) LMV 中止時の臨床データ(投与期間、HBe 抗原/抗体、ALT 値、HBV-DNA 量、HBV コア関連抗原量、HBs 抗原量)について検討した。3) LMV 中止後の経過について検討した。4) LMV 中止時の HBs 抗原量、HBV コア関連抗原量の分布について検討した。5) 年齢と HBs 抗原量の分布について検討した。肝炎の再燃の基準は ALT：40IU/L 以上かつ HBV-DNA 量：5logcopies/ml 以上とした。

（倫理面への配慮）

患者に対しては血液検体の保存、研究使用に関する説明をおこない、紙面にて同意を取得した。

C. 研究結果

結果は以下の表、図に示す。

検討 1)

表1. LMV中止例の治療前背景因子 (n=10)

	年齢 (歳)	性別	HBe抗原	ALT (IU/L)	HBV-DNA量 (logcopies/mL)	Fステージ	HBs抗原量 (IU/mL)
1	22	M	陽性	187	8.2	F2	19007
2	28	M	陽性	574	7.4	F3	1089
3	38	F	陽性	713	7.2	F2	7775
4	38	M	陽性	205	7.0	F2	1096
5	43	M	陽性	439	8.4	F4	5649
6	46	F	陽性	178	7.0	F2	1330
7	53	M	陽性	217	8.0	F3	7805
8	61	F	陽性	212	7.9	F4	7018
9	71	F	陽性	452	7.4	F4	603
10	74	M	陽性	205	7.2	F4	26

検討 2)

表2. LMV中止例の治療中止時のデータ (n=10)

	投与期間	HBeAg/Ab	ALT (IU/L)	HBV-DNA量 (logcopies/mL)	HBVcrAg (logU/mL)	HBs抗原量(IU/mL)
1	4年2ヶ月	-/+	25	<2.6	4.0	14719
2	3年0ヶ月	-/+	9	<2.6	3.7	1080
3	8年4ヶ月	-/-	14	検出せず	3.2	59.5
4	5年0ヶ月	-/+	22	<2.6	3.0	420
5	7年11ヶ月	-/-	21	検出せず	4.1	16.23
6	1年5ヶ月	-/+	17	<2.6	3.5	1219
7	2年4ヶ月	-/+	21	<2.6	4.8	6220
8	7年8ヶ月	-/-	10	<2.6	3.4	0.01
9	7年0ヶ月	-/+	13	<2.6	3.1	0.54
10	5年0ヶ月	-/+	14	検出せず	<3.0	4.3

検討 3)

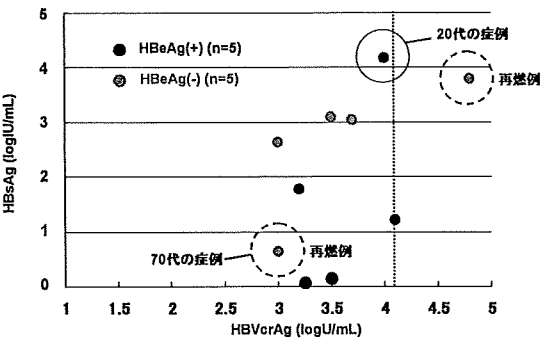
表3. LMV中止後の経過 (n=10)

	中止後観察期間 (ヶ月)	ALT異常 の有無	ALT最高値 (IU/L)	再治療 の有無	最終ALT値 (IU/L)	最終HBV-DNA量 (logcopies/mL)
1	58	無	-	-	26	4.1
2	42	無	-	-	11	2.6
3	8	無	-	-	15	2.8
4	38	無	-	-	20	3.0
5	16	無	-	-	25	2.3
6	86	無	-	-	15	2.3
7	14	有	106	-	27	4.4
8	28	無	-	-	9	検出せず
9	24	無	-	-	15	<2.1
10	5	有	74	ETV*	29	2.7

*:Entecavir

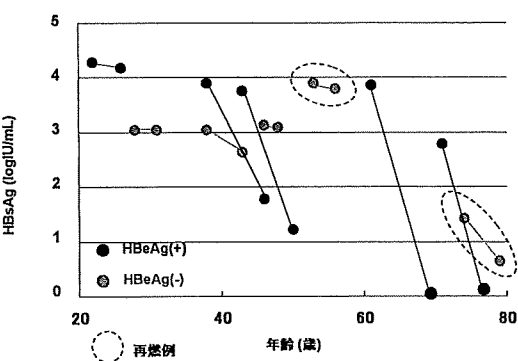
検討 4)

図1. LMV中止時のHBsAg量とHBVcrAg量の分布 (n=10)



検討 5)

図2. 年齢とHBsAg量の分布 (LMV開始時-中止時) (n=10)



D. 考察

10 例中 6 例は 5 年以上 LMV を投与され、HBe 抗原陽性例 5 例は HBe セロコンバージョンあるいは、HBe 抗原消失が得られていた (表 2)。また、中止時全例 HBV-DNA (アンプリコア法または、リアルタイム法) で感度以下であった (表 2)。7 年以上 LMV を投与された 4 例は中止後肝炎の再燃を認めていない (表 2)。HBV コア関連抗原量は

10 例中 9 例で 4.1logU/ml 以下に低下しており、88.8%の非再燃率 (8/9 例) であった (表 2、3、図 1)。HBs 抗原量に関しては中止時 3.1logU/ml 以下の症例では 87.5%の非再燃率 (7/8 例) であった (表 2、3、図 1)。HBe 抗原陰性の症例 2、6 において、治療前後で HBs 抗原量はほぼ不変であり (表 1、2、図 2)、中止の判断にはコア関連抗原量を組み合わせる必要があると考えられた。症例 10 (中止時 79 歳) は HBsAg 量 : 4.3IU/mL、HBVcrAg 量 : <3.0logU/mL で中止するも再燃しており、例外的な症例と考えられた (表 2、図 1、2)。再燃した 2 例のうち症例 7 は一時的な肝機能上昇があったが薬剤の再投与を行わず安定した経過であり、症例 10 は ETV の投与により速やかにトランスアミナーゼは正常化した (表 3)。

E. 結論

1. LMV 中止例 10 例中 9 例が drug free の状態が持続した。
2. LMV 中止可能な条件としては HBV-DNA が PCR 法で感度以下を持続、HBe 抗原陽性例は HBe 抗原消失またはセロコンバージョンを認める、HBV コア関連抗原が 4logU/ml 以下、HBs 抗原が 3logIU/ml 以下を満たすことなどが必要と考えられた。

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
なし

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

HBc 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

研究分担者 齋藤正紀 兵庫医科大学 内科学 肝胆膵科 講師

研究協力者 西口修平 兵庫医科大学 内科学 肝胆膵科 教授

研究要旨： 【目的】 B型慢性肝炎に対する核酸アナログ療法は抗ウイルス効果が高く有用であるが長期投与が必要である。しかし長期投与による耐性株の出現や経済的負担が問題となるが、治療中止に伴う肝炎の再燃などのリスクが存在し、その中止基準の作成が求められている。血中 HBV DNA 測定はウイルス量を表す指標として広く用いられているが、核酸アナログ投与時は血中と肝細胞中のウイルス量が乖離することがあり中止基準の適切な指標とならない。最近、HBV の新たな指標として HBc 関連抗原（HBcrAg）と HBs 抗原高感度測定法（HBsAg 定量）が開発された。今回我々は、核酸アナログ中止基準の作成のために、これらの有用性を検討した。

【方法】 当院受診の B 型慢性肝炎患者 274 名を対象に、HBcrAg と HBsAg 定量を測定。両者の相関関係、核酸アナログ治療時の推移、および核酸アナログ中止症例における推移を後ろ向きに検討した。

【結果】 HBcrAg と HBsAg 定量はどちらも血中 HBV DNA と強い相関を示したが、HBcrAg と HBsAg 定量間では乖離例が存在し、HBsAg 定量は若年で有意に高く、年齢の影響を受けることが示唆された。また、核酸アナログ治療の前後では、血中 HBV DNA が 2Log 以上低下している症例中、HBcrAg と HBsAg 定量を 1Log 以上の低下例と 1Log 未満の低下例の 2 群に分別し群間比較を行った。有意差を認めたのは HBcrAg では核酸アナログの投与期間と HBeAg 陽性であり、HBsAg 定量では肝線維化（F 因子）であった。核酸アナログ投与中止症例の推移では、いずれの症例も投与中止直後より血中 HBV DNA 量の増加を認めたが、必ずしも ALT 値が上昇するわけではなく、上昇しても収束に向かう例も存在した。

【考察】 HBcrAg と HBsAg 定量はいずれも血中 HBV DNA 量と相関し、より高感度な測定が可能であるため核酸アナログによる治療効果判定の指標として有用であると考えられる。HBcrAg は核酸アナログ投与期間や HBe 抗原陽性を、HBsAg は年齢や肝線維化と相関していることが示唆され、両者を組み合わせ

A. 研究目的

現在、日本で認可されている B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤にはラミブジン（Lamivudine; LAM）、アデフォビル（Adefovir; ADV）、エンテカビル（Entecavir; ETV）である。これらは抗ウイルス作用により血中 HBV DNA 量を減少させ多くの症例で肝炎を沈静化させることができる。また、組織学的に肝線維化の改善症例などの報告もあり、その治療目的、適応は拡大されつつある。平成 20 年に厚生労働省科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業の研究班（熊田班）からウイルス性肝硬変に対する包括的治療のガイドラインが示された。その中

で原因ウイルスの駆除及びウイルスの減少により ALT 値の正常化を目指す、という項目において、B 型肝硬変に対してエンテカビル（Entecavir）で HBV DNA の陰性化を持続させ ALT の正常化をめざすと盛り込まれた。

その一方で核酸アナログの長期投与は耐性ウイルス株の出現を認め、また経済的、財務的理由より核酸アナログ療法中止の必要性が問われている。しかし、投薬中止に伴う肝炎再燃などの問題点があり、核酸アナログ中止基準には未だ明確なものがない。核酸アナログ製剤の中止に関与する因子には数多くの報告がある（表 1）。宿主側の因子としては年齢や肝組織の

線維化（F 因子）が、核酸アナログ製剤の関連として、その投与期間や中止方法、核酸アナログ単独中止か、インターフェロン（IFN）併用中止（Sequential therapy）などがある。ウイルス関連因子には、genotype、HBe 抗原、precore、corepromoter 領域の変異、血中 HBV DNA 量などがある。このような様々な因子が関連しており、明確な中止基準を定めることは困難である。

表1 核酸アナログ中止関連因子

年齢
F因子
投与期間
中止方法
genotype
HBeAg
HBV DNA
precore、core promoter領域の変異
新たな指標HBc関連抗原、HBs抗原定量

一般に HBV の活動性を最もよく反映する指標として血中 HBV DNA 量が用いられるが、核酸アナログ製剤による治療中は血中の HBV DNA 量と肝細胞中の HBV cccDNA 量が乖離し、その効果判定に支障をきたす。最近、HBV の新たな指標として HBc 関連抗原（HBcrAg）と HBs 抗原高感度測定（HBsAg 定量）が開発された。HBcrAg は HBc 抗原、HBe 抗原、HBV プレコア蛋白質の総称であり、肝細胞中 HBV cccDNA 量を反映するため核酸アナログ治療時の効果判定に有用であると報告されている。HBs 抗原は小型粒子や桿状粒子として完全粒子（Dane 粒子）より大量に血液中に循環しているが、これらを測定したのが HBs 抗原高感度測定であり、血中 HBV DNA より高感度な測定が可能といわれている。

今回我々は、これらのマーカーを用いて、核酸アナログ中止基準の作成のためにその有用性を検討した。

B. 研究方法

対象は平成 18 年 4 月から平成 21 年 11 月の間に当院および当院関連施設を受診した HBV 陽性慢性肝炎と肝硬変患者 274 名である。急性肝炎、無症候性キャリアは除外した。核酸アナログ投与者は LAM 投与者が 102 名、ADV 投与者が 32 名、ETV 投与者は 57 名であった。これらの対象者に対して HBcrAg と HBsAg 定量を測定。両者の相関

関係、核酸アナログ治療による推移、および核酸アナログ中止症例における推移を後ろ向きに検討した。

HBcrAg の測定は、全自動化学発光酵素免疫測定法を用いたルミパルス HBcrAg（富士レビオ社）で、特異モノクローल抗体により HBe 抗原および HBc 抗原に共通エпитープをもつ HBcrAg を定量する。測定範囲は 3.0 から 7.0 LogIU/ml である。

HBsAg 定量は、全自動免疫測定装置 HISCL-2000i とその専用試薬 HISCL HBsAg 試薬（HISCL；sysmex 社）を用いた。最小検出感度は 0.03 IU/ml である。

（倫理面への配慮）

本研究は疾患の特殊性と将来の探索的研究を踏まえて連結可能匿名化・データ分割管理とし、個人同定情報（対応表）は各共同研究施設の研究分担者が保管する。

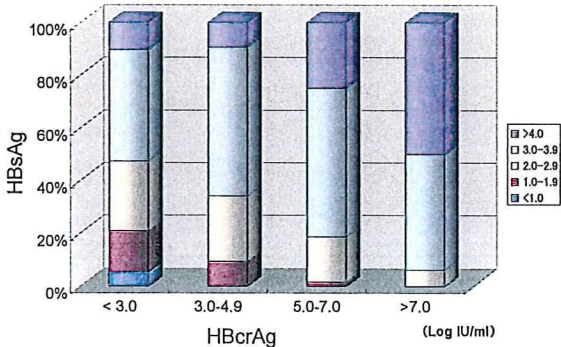
本研究の遂行にあたっては平成 21 年 11 月に当研究施設の倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 血中 HBV DNA 量と HBcrAg、HBsAg 定量の相関性の検討

核酸アナログ製剤投与前における血中 HBV DNA 量と HBcrAg、血中 HBV DNA 量と HBsAg 定量、HBcrAg と HBsAg 定量の間に有意な相関関係を認めた。さらに HBcrAg と HBsAg 定量間において、HBcrAg を<3.0、3.0-4.9、5.0-7.0、>7.0 の 4 群に、HBsAg 定量を<1.0、1.0-1.9、2.0-2.9、3.0-3.9、>4.0 の 5 群に分け、両者の関係を検討した（図 1）。

図1 HBcrAg各群におけるHBsAgの比率



その結果HBcrAgが3.0LogIU/ml未満の症例中、10%はHBsAg定量が4.0LogIU/ml以上であり、反対にHBcrAgが7.0LogIU/ml以上の症例中、5%のHBsAg定量が1.0LogIU/ml未満で乖離症例が存在した。次に、HBcrAgが3.0LogIU/ml未満の低値例においてHBsAg定量を3.0LogIU/ml未満と3.0LogIU/ml以上に分けて群間比較を行った(表2)。その結果、両群間において有意差を認める因子は年齢のみであった。

表2 HBcrAg低値症例(<3.0)におけるHBsAg定量値による比較

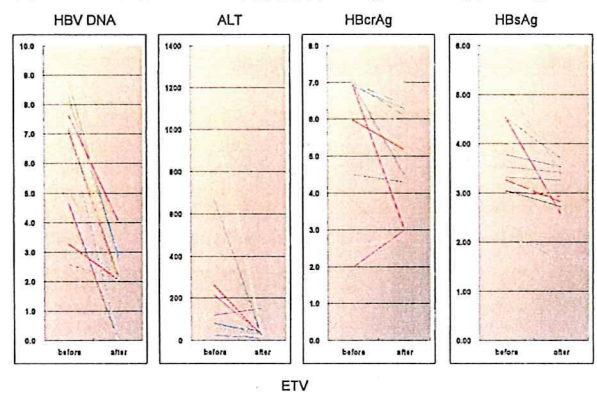
	HBsAg		p
	< 3.0 (n=11)	≥ 3.0 (n=14)	
年齢	57.6±7.0	43.9±16.4	p < 0.05
性別	7 : 4	9 : 5	ns
ALT	40.1±22.6	40.8±19.1	ns
HBeAg (+)	0 / 11	0 / 14	ns
HBV DNA	3.07±0.7	3.06±0.6	ns

2. 核酸アナログ治療前後におけるHBcrAgとHBsAg定量の推移と関連因子の検討

核酸アナログ治療前後におけるHBcrAgとHBsAg定量の推移を検討するため、LAM、ETVの投与後、血中HBV DNA量が2Log以上低下した症例についてHbcrAgとHBsAg定量の関係を検討した(図2)。LAM、ETVのいずれにおいても血清ALT値は低下していたが、ETVの方がより低下傾向は強く、ほぼ全例で血清ALT値は正常化していた。

HBcrAgとHBsAg定量は、どちらも血中HBV DNA量の低下に比して低下傾向は弱く、低下しない例も存在した。

図2 ETVによるHBV DNA改善症例(>2Log)とHBcrAg、HBsAg



血中HBV DNA量が2Log以上低下したETV投与症例中で、HBcrAgとHBsAg定量が1Log以上の低下例と1Log未満の低下例で比較検討を

行った(表3A、表3B)。

HBcrAgにおいて有意差を認めたのは、核酸アナログの投与期間とHBeAg陽性であった。HBcrAgが1Log以上低下した核酸アナログの平均投与期間は62.1±39.6週間で、1Log未満は46.7±36.8週間であった。また、HBcrAgの低下が1Log未満の症例はHBeAg陽性症例で有意に多かった。

HBsAgで有意差を認めたのは、F因子のみであった。HBsAgが1Log以上低下した例では線維化の進行したF3/F4症例が多く、1Log未満は反対にF1/F2症例を多く認めた。年齢は1Log未満低下例は平均41.2±33.3歳、1Log以上の低下例の68.2±42.8と比して、有意差はなかったが年齢が低い傾向を認めた。

表3A ETV治療改善症例におけるHBcrAgの改善例と非改善例の比較

	HBcrAg		p
	≥1Log (n=18)	<1Log (n=20)	
年齢	47.4±14.2	43.9±14.5	ns
性別	14 : 4	16 : 4	ns
投与期間(week)	68.2±42.8	41.2±33.3	p < 0.05
HBeAg (+)	8 / 18	16 / 20	p < 0.05
F (1/2/3/4)	5 / 4 / 6 / 2	5 / 7 / 6 / 0	ns
genotype (A/B/C)	1 / 1 / 8	2 / 2 / 9	ns

表3B ETV治療改善症例におけるHBsAgの改善例と非改善例の比較

	HBsAg		p
	≥1Log (n=15)	<1Log (n=27)	
年齢	50.0±13.4	42.8±13.8	ns
性別	12 : 3	22 : 5	ns
投与期間(week)	62.1±39.6	46.7±36.8	ns
HBeAg (+)	8 / 15	20 / 27	ns
F (1/2/3/4)	1 / 3 / 8 / 2	10 / 9 / 6 / 0	p < 0.05
genotype (A/B/C)	2 / 1 / 5	1 / 2 / 15	ns

3. 核酸アナログ中止症例におけるHBcrAgとHBsAgの推移

当施設で核酸アナログ治療を中止した6症例についてHBcrAgとHBsAg定量の推移を検討した。

1. 血中HBV DNAが2.1 LogIU/ml未満(TMP)長期持続

2. ALT正常化長期持続

3. HBcrAg 3.0 Log IU/ml未満

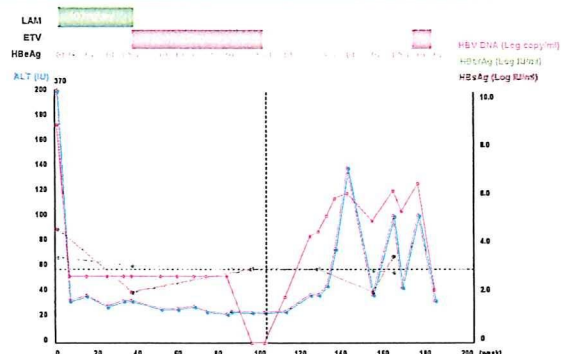
以上、3つの基準を満たし、患者本人のインフォームドコンセントが得られた症例において中止を試みている。ここでは4症例について報告する。

症例1は53歳の男性。治療前HBe抗原陰性、genotype B、肝生検による組織像はA2F3(図

3 Case1)。LAM と ETV を約 100 週間継続施行されており、血中 HBV DNA は陰性化、HBcrAg、HBsAg 定量はともに 3.0Log IU/ml 未満であった。投与中止直後より血中 HBV DNA 量は増加を認め、ALT 値は中止後 36 週目より上昇を認めた。その後 HBV DNA と ALT はともに増減を繰り返し、収束しないため 72 週目に ETV の再投与が行われ肝炎は現在収束している。

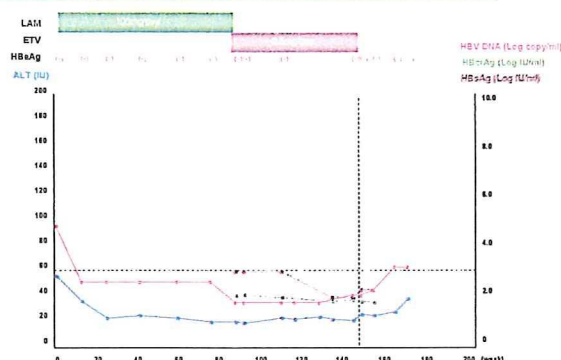
図3 核酸アナログ中止症例におけるHBcrAgとHBsAgの推移

Case 1 : 53 M HBeAg (-) genotype: B A2F3



症例 2 は 60 歳の男性。治療前 HBe 抗原陰性、組織像は A2F3 (図 3 Case2)。LAM と ETV の治療を約 148 週間継続施行されており、血中 HBV DNA 陰性化、HBcrAg、HBsAg 定量はともに 3.0Log IU/ml 未満であった。HBV DNA 量は増加傾向であるが、ALT 値の上昇は認めず現在経過観察中である。

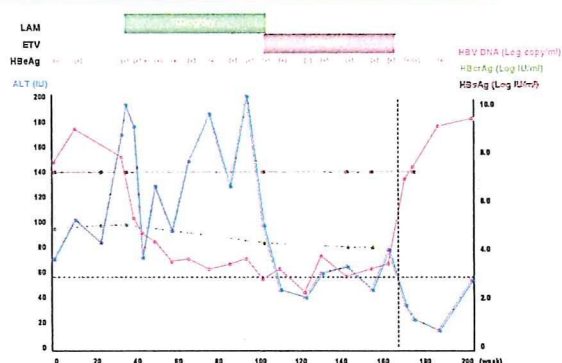
Case 2 : 60 M HBeAg (-) A2F3



症例 3 は 23 歳の女性。治療前 HBe 抗原陽性、genotype C、組織像は A1F0 (図 3 Case3)。LAM 治療では肝炎は収束せず、YMDD 変異を伴わないため ETV 治療へ変更。以降、肝炎は収束したが血中 HBV DNA 陰性化には至ってなかった。今回

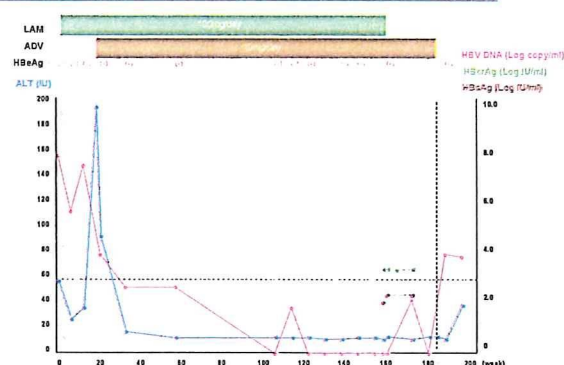
出産を希望され ETV の中断となった。HBcrAg、HBsAg 定量はともに 3.0 Log IU/ml 以上であるが、HBsAg 定量は HBcrAg より高値で乖離例である。投与中止直後より血中 HBV DNA 量は上昇しているが、ALT 値の上昇は認めず現在、経過観察中である。

Case 3 : 23 F HBeAg (+) genotype: C A1F0



症例 4 は 51 歳の女性。治療前 HBe 抗原陰性、組織像は A2F2 (図 3 Case4)。LAM 治療で耐性株が出現し ADV の追加投与となった。ADV 投与後は肝炎収束、160 週間の併用期間後中止となる。HBsAg は 3.0 Log IU/ml 以下で、HBcrAg は 3.3Log IU/ml であった。投与中止後血中 HBV DNA 量は上昇してきたが、ALT 値の上昇は認めず現在、経過観察中である。

Case 4 : 51 F HBeAg (-) A2F2



D. 考察

核酸アナログ製剤投与前の血中 HBV DNA 量と HBcrAg、HBsAg 定量間には有意な相関関係を認め、HBcrAg と HBsAg 定量は血中 HBV DNA 量を強く反映しているものと考えられる。しかし、HBcrAg と HBsAg 定量間には乖離症例が認められた (図 1)。これは血中 HBV DNA 量以外の因

子を反映している可能性が考えられ、各因子の関連性を検討したところ（表 2）、有意差を認めたのは年齢で、HBsAg 定量は若年層では高値を示し、年齢という因子の影響を受けている可能性が示唆された。

核酸アナログ治療時の HBcrAg と HBsAg 定量の検討では、両者は血中 HBV DNA 量に比べて低下傾向は緩やかで、非改善症例も存在した。これは HBcrAg と HBsAg 定量の変動には血中 HBV DNA より長期間を要し、非改善例はさらに別の因子が関与している可能性が考えられた。HBcrAg と HBsAg 定量の改善例と非改善例（表 3A、B）の比較では、HBcrAg において有意差を認めたのは核酸アナログの投与期間と HBeAg 陽性で、HBsAg 定量は F 因子のみであった。HBcrAg を 1Log 以上低下させるには 1 年以上の核酸アナログの投与期間が必要であり、HBe 抗原陽性では HBcrAg 非改善例が多いと示唆される。また、肝組織の線維化は年齢と相関するため、HBsAg 定量は若年の初期の肝炎患者では高く、高齢で線維化のすすんだ肝炎症例では反対に低下する。

当施設での核酸アナログ中止例では中止直後より血中 HBV DNA は上昇するが、必ずしも ALT 値が上昇するわけではなく、上昇しても収束に向かう例もある。投与中止後の観察期間がまだ十分ではなく今後の推移を観察する必要性と、HBcrAg や HBsAg 定量が肝炎再燃の予測因子となるか検討する必要もある。

E. 結論

血中 HBV DNA 量では核酸アナログ治療時の正確な治療効果判定は困難である。HBcrAg と HBsAg はいずれも HBV DNA 量とよく相関し、より高感度な測定が可能であるため治療効果判定の指標として有用であると考えられる。HBcrAg は肝組織中の HBV cccDNA を反映し、血中 HBV DNA 量より正確な効果判定が可能である。しかし一部に乖離症例が存在し、単独では必ずしも有用ではない。今回の検討では、HBcrAg は核酸アナログ投与期間や HBe 抗原陽性を、HBsAg は年齢や肝繊維化（F 因子）と相関していることが示唆され、反映する因子が異なる 2 つのマーカーを組み合わせて作成し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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし