

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

新しい高感度 HBs 抗原定量系の臨床的意義
～アーキテクト HBsAg-QT 陰性例への応用～

研究分担者 新海 登 名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床研究医
研究協力者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨:松原らにより HBV-DNA 定量に匹敵する感度を有する新しい高感度 HBs 抗原定量が報告された (Transfusion, 2009)。最近、松原の測定法を自動化した検査系 (prototype) が開発され、その基礎的検討を行った (臨床病理 2010)。今回我々は、アーキテクト HBsAg-QT にて HBs 抗原が経過観察中に陰性化した症例に対して prototype で測定したところ、アーキテクト HBsAg-QT にて検出感度以下となった症例でも長期にわたり prototype にて HBs 抗原を検出可能であった。また、核酸アナログによる治療介入例においても、HBs 抗原の動態をより低値まで検出可能であり、アーキテクト HBsAg-QT では観察できなかった測定域の検出が可能となった。

A. 研究目的

最近、新しい超高感度 HB 抗原定量系が開発され、今回臨床検体を検討する機会を得た。これは従来の測定系とよく相関し、その感度はアーキテクト HBsAg-QT (アーキテクト) の 10 倍の 5mIU/ml まで測定できる。

今回我々は、核酸アナログ中止後に HBs 抗原がアーキテクトにて消失した症例を含めて、HBs 抗原消失 HBV キャリアーにこの検査系を臨床応用した。

B. 研究方法

1. 対象 B 型慢性肝炎でアーキテクト

HBsAg-QT にて HBs 抗原が経過観察中に陰性化した症例 16 例、内訳は自然 HBs 抗原消失 (ASC group) 8 例、ラミブジン (LVD) 投与中止後 HBsA 抗原消失 (LVD group) 4 例、エンテカビル (ETV) 投与中 HBs 抗原消失 (ETV group) 4 例

2. 方法 以上の症例に対してアーキテクト

HBsAg-QT と prototype にて経時的に測定し、両者を比較した。Prototype の測定方法は変性剤を主成分とする検体処理液で検体を前処理することで、検体中の HBV エンベロープを破壊し、HBs 抗体が存在する場合には HBs 抗原/HBs 抗体

複合体を乖離させることにより HBs 抗原を遊離させる。遊離した HBs 抗原の立体構造は変性によりリニアエピトープ化され、これらを特異的に捕捉するモノクローナル抗体を用いて高感度に定量する 2 ステップサンドイッチ法を原理としている。

(倫理面への配慮)

なお、検体は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た上で患者の同意のもと採取した。

C. 研究結果

ETV group は ASC group, LVD group に対して初診時もしくは核酸アナログ投与開始時において HBe 抗原は全例陽性 (4/4 vs. 0/8, 0/4)、HBV DNA は高値 (7.7 (4.9~8.7) vs. 3.1 (<2.1~>8.8), 6 (4.9~7.4)、アーキテクト HBs-QT にて HBs 抗原は高値であった (66823 (43970~89679) vs. 158 (0.05~25300), 202 (58~2719)) (Table 1)。

ETV group はウイルスの活動性が高い状態にもかかわらず、HBs 抗原の陽性観察期間は ASC group、LVD group に対して少なくとも同程度の期間であった。

16 例中 14 例においてアーキテクトによる

HBs 抗原の陰性化後も prototype において HBs 抗原を検出することが可能であった。アーキテクトと prototype の HBs 抗原陽性期間の差は中間値で 4.5 ヶ月、最長 150 ヶ月以上であった。Prototype の最終検出時点において HBV DNA は殆どの症例がケンシュツセズないシグナル陽性であった (Table 2)。さらに、1 例においてはアーキテクトと prototype の両者にて HBs 抗原陰性化後も HBV DNA が定量し得たため、S 抗原のアミノ酸配列を確認したところ、報告はされていないが S 抗原のイソロイシンからプロリンに変異していた。また ETV 投与した一例においては一度 Prototype においても陰性化した後に、1 年後にまた Prototype で陽性が確認された。その間アーキテクトや HBV DNA は持続陰性であった。

D. 考察

ETV group 群においてウイルス活動性が高いにもかかわらず HBs 抗原の陽性観察期間が ASC group, LVD group と同等であったということは、ETV の投与により LVD を投与するよりも核酸アナログの中止基準に到達しやすい可能性が示唆された。また、HBV DNA が検出限界以下となっても Prototype にて測定出来る場合があり、潜在性 HBV 感染や HBV 再活性化の経過観察への応用が期待される。

E. 結論

Prototype は HBV の活動性を観察するのに有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 新しい超高感度 HBs 抗原定量試薬の基礎的・臨床的有用性 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 可児里美, 長沼初江, 溝上雅史臨床病理 2010, 58;1078-84

2. 学会発表

- 1) Evaluation and application of a newly developed highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for Chronic hepatitis B patients with HBs Ag seroconversion Noboru Shinkai, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Fuminaka Sugauch, Shunsuke Nojiri, Takashi Joh, and Masashi Mizokami; AASLD, Boston, MA 2010
- 2) B型慢性肝炎のHBs抗原陰性化例における超高感度HBs抗原定量試薬「CL HBsAg-HQ」の臨床応用, 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 千田勝博, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, 溝上雅史; 第15回日本肝臓学会大会, 横浜, 2010
- 3) 新しい検査系である高感度HBs抗原定量試薬の評価とその臨床応用, 新海登, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 可児里美, 長沼初江, 五藤孝秋, 高木和美, 平松久美子, 脇本幸夫, 菅内文中, 田中靖人; 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 東京, 2010
- 4) 新しい検査系である高感度HBs抗原定量試薬「CL HBsAg-HQ」の評価, 新海登, 松浦健太郎, 田中靖人, 可児里美, 溝上雅史; 第46回肝臓学会総会, 山形, 2010

H. 知的財産権の出願・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

Table 1. アーキテクトHBs抗原陰性例の初診時/NA投与時のデータ

groups	自然消失例 (ASC group) (n=8)	LVD中止後 (LVD group) (n=4)	ETV投与中 (ETV group)(n=4)
初診時/NA投与開始時年齢	45.9 ± 11.3	51.0 ± 6.3	40.1 ± 7.7
性別 (男/女)	5/3	3/1	4/0
感染経路 (垂直/水平)	8/0	4/0	2/2
ジェノタイプ(A/ B/ C/ undecidable)	0/0/5/3	0/1(Bj)/3/0	1/1(Ba)/2/0
HBeAg (+/-)	0/8	0/4	4/0
HBV DNA (copies/ml)	3.1 (<2.1~>8.8)	6 (4.9~7.4)	7.7 (4.9~8.7)
HBcrAg (Log IU/ml)	3.3 (3.2~8)	4.3 (4.2~6.6)	8.6
アーキテクトHBsAg-QT (IU/ml)	158 (0.05~25300)	202 (58~2719)	66823 (43970~89679)

Table 2. アーキテクトHBsAg陰性化時点のデータ

	ASC group	LVD group	ETV group
アーキテクトHBs陰性化までの NA投与期間 (月)		投与期間 13 (10~16) トータル 19 (10~32)	33 (23~40)
アーキテクトHBs抗原陽性 期間 (月)	34 (0~99)	40 (33~56)	29 (19~37)
prototype HBs抗原陽性 期間 (月)	61 (18~184) ※2>90, 181, 184	45 (33~59)	31 (23~46)
アーキテクトとprototypeの 陽性期間の差 (月)	13 (1~150) ※2>11, 83, 150	3 (0~6)	4 (0~9)

※ 現在も陽性持続

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 Entecavir 治療中止例の検討

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： Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下の状態が 2 年以上継続した後に Entecavir を中止した 18 例において、治療後観察期間 (8.4±6.7 ヶ月) 内に HBV DNA 再燃例を 33%(6/18)、ALT 上昇を 17%(3/18) に認め、22%(4/18) に Entecavir が再投与された。また、“核酸アナログ治療後の中止目標を達成せず、再投与を考慮する基準(案)” では HBV DNA 値 5.8 log copy/ml 以上とされているが、今回の 18 症例における経時的な HBV DNA 量の推移においても、HBV DNA 値 5.8 log copy/ml までの HBV DNA 増加であれば、HBV DNA 上昇後に低下する傾向を認めた。抗ウイルス効果の高い Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下が持続した症例においても、その中止後には注意深い観察が必要であると考え

A. 研究目的

Entecavir 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、Entecavir は核酸アナログ療法の第 1 選択剤となっているが、Entecavir 投与終了後のまとまった報告はない。今回、Entecavir 投与終了後の HBV DNA 再燃について検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は、Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下の状態が 2 年以上継続した後に Entecavir を中止した 18 例である。男性 13 例(平均年齢 52.3 歳)/女性 5 例(平均年齢 53.2 歳)、Entecavir 開始時 HBeAg 陽性 3 例/HBeAg 陰性 15 例で、Lamivudine からの切替例が 9 例、Lamivudine 終了後の再燃例が 4 例、核酸アナログ新規症例が 5 例であった。ETV 投与期間は 28.6±10.2 ヶ月で、ETV 治療終了時点では全例が HBeAg 陰性であった。Entecavir 治療後の平均観察期間は 8.4±6.7 (1-26) ヶ月であった。

2. 方法

Entecavir 治療後、経時的に HBV DNA 量を測定し、5logcopies/ml 以上の HBV 増加を認めた症例

を HBV DNA 再燃とした。

C. 研究結果

Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下の状態が 2 年以上継続した後に Entecavir を中止した 18 例において、Entecavir 治療後観察期間 (8.4±6.7 ヶ月) 内に HBV DNA 再燃例を 33%(6/18)、ALT 上昇を 17%(3/18) に認め(表 1)、22%(4/18) に Entecavir が再投与された。また、当班で作成された核酸アナログ中止基準(案)における“核酸アナログ治療後の中止目標を達成せず、再投与を考慮する基準”では“HBV DNA 値 5.8 log copy/ml 以上”と設定されているが、今回の 18 症例における経時的な HBV DNA 量の推移の検討においても、HBV DNA 値 5.8 log copy/ml までの HBV DNA 増加であれば、HBV DNA 上昇後に低下する傾向を認めた(図 1)。

D. 考察

Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下の状態が 2 年以上継続した後に ETV を中止した症例においても、HBV DNA 再燃例を 33%、ALT 上昇を 17% に認め、22%(4/18) に Entecavir 再投与が必要であった。今後、HBcrAg ならびに HBsAg titer を用いた再燃予測を検討する必要があるも

のと考えられた。また、HBV DNA 値 5.8 log copy/ml 未満であれば経過観察しうる可能性が示唆された。

E. 結論

抗ウイルス効果の高い Entecavir 治療により HBV DNA 量検出感度以下が持続した症例においても、その中止後には注意深い観察が必要であった。

G. 研究発表

1. 学会発表：

- 1) 宋 昌浩、平松直樹、小瀬嗣子、他. “慢性肝疾患における ARFI を用いた肝線維化の非侵襲的評価” 一般演題 第 46 回日本肝臓学会総会 2010
- 2) 宋 昌浩、平松直樹、井上裕子、他. “新たな線維化マーカー Vs/plt の有用性について” 一般演題 第 14 回日本肝臓学会大会 2010

2. 論文発表：

1) Uemura A, Takehara T, Miyagi T, et al. Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. Cancer Immunol

Immunother. 2010 ;59(3):453-463.

2) Miyagi T, Takehara T, Uemura A, et al. Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. J Gastroenterol. 2010;45(12):1247-54.

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

	ETV期間	ASTALT	HBc-Ag	S/NHBc-Ab	INH	HBV-PCR	HBV	BT*ALT	BT*ETV再投与	
1	55M LAM切替	28M	34 36	-	0.1 ±	62	<1.8(-)	○4M	-	○
2	51M LAM切替	31M	32 42	-	0.1 +	100	<2.1(+)	○4M	○5M	○
3	65M LAM切替			-	+		<2.1	○6M	○7M	○
4	34M LAM切替	24M	18 14	-	0.2 +	99	<1.8(+)	(13M)	-	-
5	42F LAM切替	20M	18 13	-	0.3 +	82	<2.6	(20M)	-	-
6	58M LAM切替	29M	27 33	-	0.1 +	100	<2.1(-)	(5M)	-	-
7	62M LAM切替	24M	28 21	-	0.4 +	82	<2.1(-)	(5M)	-	-
8	52M LAM切替		30 18	-	+		<2.1	(5M)	-	-
9	66M LAM切替	24M	24 17	-	0.3 +	99	<2.6	(26M)	-	-
10	52F LAM終了後再開	26M	22 20	-	0.4 +	100	<1.8(-)	○11M	○13M	○
11	48M LAM終了後再開	27M	20 14	-	0.1 -	49	<1.8(-)	○8M	-	-
12	68F LAM終了後再開	27M	21 13	-	0.2 +	100	<2.1(-)	(4M)	-	-
13	61F LAM終了後再開	25M	60 76	-	0.3 +	91	<1.8(+)	(14M)	-	-
14	55M NA-naive	26M	17 28	-	0.1 +	100	<1.8(+)	○5M	-	-
15	40M NA-naive	26M	23 20	-	0.1 +	100	<2.1(-)	(4M)	-	-
16	50M NA-naive	58M	17 8	-	0.3 -	36	<1.8(-)	(14M)	-	-
17	43F NA-naive	26M	20 17	-	0.3 +	88	<2.1(-)	(2M)	-	-
18	44M NA-naive	46M	17 11	-	0.3 ±	50	<2.1(+)	(1M)	-	-

表 1. Entecavir 治療終了時データならびに治療後再燃

*BT, breakthrough.

(HBV BT ならびに ALT BT の○は再燃例を示す。数字は Entecavir 治療後期間。)

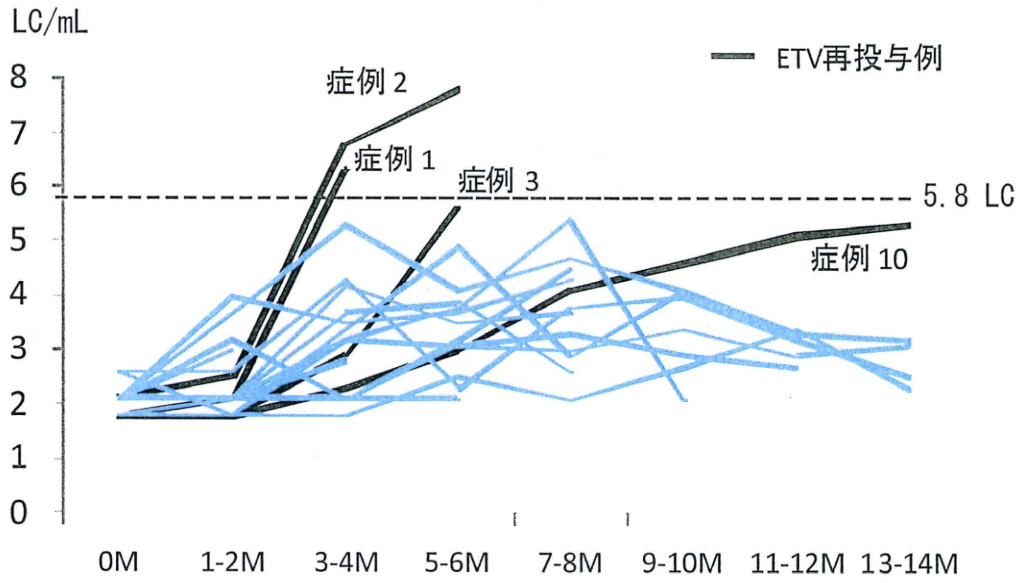


図1. ETV 治療終了後の HBV DNA 量の推移

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型慢性肝疾患における核酸アナログ投与例のHBs抗原量の推移

研究分担者 狩野吉康 札幌厚生病院第三消化器科 副院長
研究協力者 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投与時のHBs抗原量の変動を検討した。

3年後のHBs抗原量は、Lamivudine+Adefovir群、Lamivudine→Entecavir Switch群、Entecavir群で各々3.3log IU/ml、3.0log IU/ml、2.8 log IU/mlと投与薬剤による有意な差を認めなかった。コア関連抗原との比較では、NA投与後の低下はe抗原陽性例、陰性例共に軽度であった。NA投与中にHBs抗原陰性化を認めた5例では、NA投与前のHBs抗原量、コア関連抗原量、HBV DNA量が高値で、ALTも高値の傾向があり、これらの症例では肝炎の活動性が高い可能性が示唆され、免疫の賦活+NA投与がHBs抗原陰性化に繋がった可能性も考えられる。大部分の症例ではNA投与3年でのHBs抗原の低下は十分ではなく、NA中止に際してはより長期間の投与が必要と考えられた。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ（NA）長期投与により、肝硬変の進展・肝癌の抑制が得られることが明らかとされている。

一方でHBVキャリア例では自然経過で沈静化する症例が多く存在する、長期投与では薬剤耐性が出現する可能性がある、生殖年齢の世代に対する安全性が未確立であるなどの理由によりNA中止を考慮したい症例が存在する。NA中止の指標として、HBs抗原やコア関連抗原が用いられているが、本邦で多数を占める遺伝子型B型とC型の症例におけるNA投与後のHBs抗原量の推移についてのまとまった成績はなく、その長期経過は不明である。B型慢性肝疾患を有するNA投与例におけるHBs抗原量の推移を検証し、HBV DNA、コア関連抗原量と対比することで、その臨床意義を検討した。

B. 研究方法

3年以上NA継続投与が可能であった205例を対象とした。NA開始時にALT 1000 IU/L以上を示した急性増悪例、Adefovir dipivoxil (ADV)あるいはEntecavir (ETV)に対する耐性を獲得した症例、C型肝炎ウイルス重感染例は除外した。Lamivudine (LAM)投与中、ウイルス学的ブレイクスルーを発症してADVの併用投与を行った58例（以下、L+A群）、LAM投与中にETVに切り替えた86例（以下、L→E群）、ETV初回投与例61例（以下、E群）の計205例である（表1）。L+A群で

はADV併用開始時にHBs抗原量が最も高値を示し、以後緩徐に低下したため、この群ではADV併用開始時をBaseline (BL)とした。コア関連抗原はCLEIA法、HBV DNAはAmplicor法またはTaqMan-PCR法を用い、HBV DNA量が $10^{2.6}$ copies/ml未満を陰性と定義した。HBs抗原はCLIA法を用い、測定結果は対数表示とした。

表1. 対象の内訳

	L+A	L→E	ETV	Total NAs
Number of patients	58	86	61	205
Age, years	56 (30-70)	57 (31-78)	54 (29-77)	56 (29-78)
Treatment duration, months	61 (39-97)	67 (36-123)	44 (36-54)	56 (36-123)
HBsAg-positive	39 (47%)	21 (24%)	22 (34%)	82 (40%)
Male, sex	41 (71%)	40 (70%)	40 (66%)	141 (69%)
Cirrhosis	32 (55%)	25 (29%)	18 (30%)	75 (37%)
HBsAg, log IU/ml	3.4 (1.5-4.8)	3.1 (0.7-4.7)	3.1 (0.5-4.6)	3.2 (0.5-4.8)
eAg, log U/ml	6.1 (3.0-6.8)	5.5 (3.0-6.8)	5.5 (3.0-6.8)	5.7 (3.0-6.8)
HBV DNA, log copies/ml	7.2 (2.6-7.4)	6.4 (2.6-7.9)	6.7 (2.6-7.6)	6.6 (2.6-7.9)
ALT, IU/L	93 (12-1627)	97 (15-2007)	75 (18-774)	93 (12-774)
Genotype, C	55 (95%)	70 (81%)	46 (77%)	171 (84%)

LAM: Lamivudine ADV: Adefovir dipivoxil ETV: Entecavir

（倫理面への配慮）

血清保存に際しては当院書式の血清保存の同意書に署名をいただいた。

C. 研究結果

1) 3群におけるHBs抗原量とHBV DNAの推移

HBs抗原量は、L+A群で、BL、1年、2年、3年時で、3.3 log IU/ml（以下単位略）、3.1、2.9、2.8、L→E群では同様に、3.1、3.2、3.1、3.0、E群では、3.1、3.0、2.9、2.8であった（図1）。

3 群間の HBs 抗原の低下量に統計学的な差異を認めないことから、少なくとも 3 年という観察期間では HBs 抗原の減少量は NA 治療別に差がないことが示された。



図1 アナログ別のHBs抗原量の推移

HBV DNA 陰性化率は、1 年、2 年、3 年時で L+A 群で 38%、73%、82%、L→E 群で 91%、97%、94%、E 群で 95%、98%、100%と L+A 群で低率であった。(図 2)

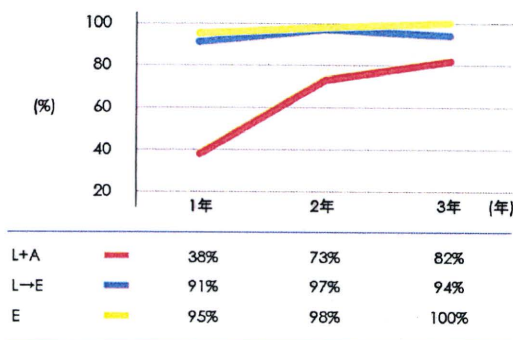


図2. HBV DNA陰性化

2) e 抗原別の HBs 抗原量とコア関連抗原量の推移

コア関連抗原量は、e 抗原陽性例で、BL、1 年、2 年、3 年時で、6.8 log U/ml (以下単位略)、5.5、5.1、4.8、陰性例で、同様に、4.9、3.6、3.3、3.1 であった。HBs 抗原量は e 抗原陽性例で、BL、1 年、2 年、3 年時で、3.4、3.2、3.1、3.0、陰性例で、3.1、3.0、2.9、2.9 であった (図 3)。BL 値で、コア関連抗原では e 抗原陽性例で 6.8、陰性例で 4.9 と約 2log の差があるのに対して、HBs 抗原では e 抗原陽性例で 3.4、陰性例で 3.1

とその差は僅かであった。また、HBs 抗原の NA 投与後の低下量はコア関連抗原と比較すると、e 抗原陽性例、陰性例共に緩徐であった。

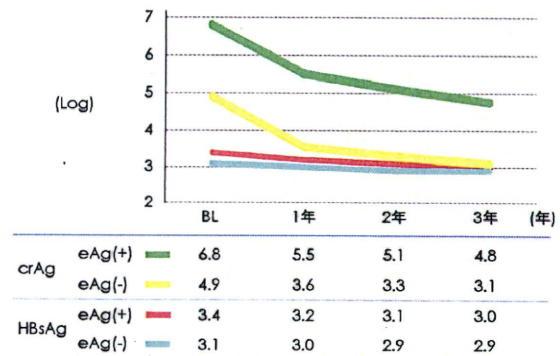


図3. e抗原別のHBs抗原とコア関連抗原量の推移

3) NA 投与により HBs 抗原が陰性化した 5 例と非陰性化 200 例の比較

経過中 HBs 抗原が陰性化した症例は、205 例中 5 例であった。HBs 抗原陰性化 5 例を、非陰性化 200 例と比較すると HBs 抗原陰性化例では、BL の HBs 抗原量、コア関連抗原量、HBV DNA 量、ALT 量が高い傾向を示した。また、陰性化 5 例中 e 抗原陽性を示した 3 例は全例で e 抗原のセロコンバージョンを認めた (表 2)。

陰性化例と非陰性化例の HBs 抗原量の推移を比較すると陰性化例では 5 例中 4 例で NA 開始 1 年の時点で 2~5 log 程度の HBs 抗原の低下を認めた (図 3)。

表2. HBs抗原陰性例と非陰性例の比較

	HBs Ag loss	
	Yes	No
Number of patients	5	142
Age, years	60 (41-67)	56 (29-78)
HBeAg-positive	3 (60%)	40 (28%)
eAgSC	3 (100%)	18 (23%)
Treatment duration, months	48 (44-95)	56 (36-123)
Male, sex	3 (60%)	97 (68%)
Cirrhosis	2 (40%)	41 (29%)
HBsAg, log IU/ml	4.6 (2.9-5.0)	3.2 (0.5-4.8)
crAg, log U/ml	6.0 (4.2-6.8)	5.6 (3.0-6.8)
HBV DNA, log copies/ml	7.3 (5.0-7.6)	6.6 (2.6-7.9)
ALT, IU/l	174 (68-400)	90 (12-1627)
Genotype, C	5 (100%)	111 (78%)

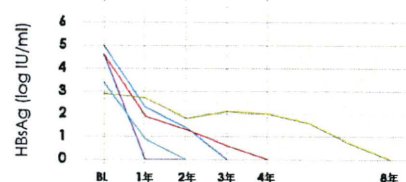


図4. HBs抗原陰性化例のHBs抗原量の推移

D. 考察

NA 製剤別の抗ウイルス効果は既存の報告と同様に L+A 群で HBV DNA 陰性化率は低率であった。一方でこの抗ウイルス効果と HBs 抗原量の推移に一定の関連を認めず、NA 投与後 HBs 抗原は一樣に緩徐に低下を示した。

e 抗原の有無別の検討では、コア関連抗原では BL で陽性例と陰性例で 2log 弱の乖離が認められたが、HBs 抗原量ではその差はわずか 0.3log であり、NA 投与後の HBs 量の低下は e 抗原の陽性・陰性別にかかわらずほぼ同様であった。

HBs 抗原の陰性例は 205 例中わずか 5 名であった。症例数が少なく、陰性例と非陰性例の比較は困難であるが、陰性例では BL の HBs 抗原量、コア関連抗原量、HBV DNA 量、ALT 量が多いなど、肝炎の活動性が高い可能性が示唆された。これら早期の HBs 抗原消失例では、NA 投与後早い段階で HBs 抗原の著明な低下が認められ、免疫の賦活と NA 投与の相加的な効果が示唆された。

E. 結論

NA 投与時の HBs 抗原量の変動は緩徐であり、充分量の低下には長期の投与が必要と考えられる。陰性化例の検討から、免疫賦活の必要性も示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 核酸アナログ投与中 HBsAg が陰性化した 4 例の検討 中島知明, 木村睦海, 荒川智宏, 桑田靖昭, 赤池淳, 小関至, 大村卓味, 佐藤隆啓, 狩野吉康, 豊田成司, 日本肝臓学会大会 (横浜) 2010 年
 - 2) Entecavir による抗ウイルス療法-HBV DNA に HBs 抗原, コア関連抗原を加えたウイルス動態の検討- 小関至, 狩野吉康, 豊田成司, 日本肝臓学会大会 (横浜) 2010 年

G. 知的財産権の出願・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

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

核酸アナログ中止例における HBV RNA と中止後経過

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
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：本研究では、B型慢性肝炎における核酸アナログ治療中止後の臨床経過と治療中、治療中止時の臨床背景を比較し、治療中止可能な症例を抽出することを目的とした検討である。当研究室では、核酸アナログ治療により、血清中に放出されたHBV RNAを含むHBV粒子が、治療中止後の臨床経過と相関すると考え、検討を行った。当院および関連施設にてB型慢性肝炎に対する核酸アナログ療法を中止した36症例の保存血清を用いて、HBV DNA量、HBV DNA+RNA量を初めとしたウイルス関連マーカーを測定し、患者の臨床背景や臨床経過について検討を行った。その結果、治療中止時のHBV DNA+RNA量は、核酸アナログ治療中止後のALTやHBV DNA再上昇のいずれにも強く関与していることが示された一方で、治療中止時のHBs抗原量、HBcr抗原量に相関は認められなかった。このことから、核酸アナログ治療中の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

当研究室では、B型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療に伴い、血清中に逆転写の行われなかったHBV RNAを含むHBV粒子が存在すること、またHBV RNAを含むHBV粒子の量と核酸アナログ耐性株出現との間に相関あることを示してきた。(Hatakeyama et al., *Hepatology* 2007)。本研究では、HBV RNAが核酸アナログ中止後の臨床経過にどのように関与しているかについて、昨年度よりも対象症例を追加し検討を行った。

B. 研究方法

対象：2010年9月までに、当院および関連施設にてB型慢性肝炎に対して核酸アナログ療法を施行され症例のうち、核酸アナログ治療を中止した46例。本解析では、46症例のうち、HBV RNAなどの解析が可能であった36症例を対象とした。

核酸アナログ投与前、投与1～6ヶ月、中止時、中止後1ヶ月の患者保存血清より、スマイテストR&Dを用いて核酸を抽出。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 DNA+RNA量、HBV DNA量を測定した。HBV DNA+RNA量、HBV DNA量と臨床経過との相関を検討した。また、同保存血清を用いて、HBs抗原量、HBcr抗原量、HBV DNA (TaqMan法)の測定も行い、これらの因子が核酸アナログ治療中止の予測因子となり得るかについても併せて検討を行った。

尚、HBV DNAの再上昇、ALTの再上昇に関する評価基準は以下のように設定した。

HBV DNA再上昇：核酸アナログ中止時、HBV DNA陰性の場合、HBV DNA 4.0Log copies/ml以上となった時点を、HBV DNA陽性の場合、HBV DNAが1.0Log copies/ml以上上昇した時点を、「HBV DNA再上昇」とした。

ALT再上昇：核酸アナログ中止時、ALT正常の場合、ALT>50 IU/Lとなった時点を、核酸アナログ中止時、ALT>35 IU/Lの場合、ALT>正常上限の2倍以上となった時点をALT再上昇とした。

(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

解析に用いた 36 症例の患者背景は、男女比 = 23 : 13、年齢の中央値が 41 歳、核酸アナログ治療期間は 30 週間 (19~304 週間)、観察期間は 270 週間 (73~490 週間) だった。

【検討 1】核酸アナログ中止後の HBV DNA 再上昇に関与する因子の検討

対象 36 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=22) と上昇しなかった群 (HBV 非上昇群 n=14) に分類し、患者背景、治療前、治療中、治療後の各種ウイルスマーカーについて比較検討した。

核酸アナログ治療開始前の患者背景では、HBV DNA 再上昇群において、ALT 値が有意に高く ($P=0.050$)、HBV DNA 量が有意に高値であった ($P=0.029$)。一方、核酸アナログ治療中止時の HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV DNA (TaqMan 法)、Sequential therapy の有無、治療期間には、有意な差が認められなかった。そこで、治療中の HBV DNA 量、HBV DNA+RNA 量の推移を検討したところ、HBV 非上昇群では、HBV DNA 量と HBV DNA+RNA 量はほぼ並行して低下したのに対し、HBV 再上昇群では、治療中止時まで HBV DNA 量に比べ、HBV DNA+RNA 量が有意に高値であった ($P=0.012$)。さらに、治療中止時の HBV DNA+RNA 量と HBV DNA 量の比 (RNA+DNA/DNA 比) にも有意差を認めた。

【検討 2】核酸アナログ中止後の ALT 再上昇に関与する因子の検討

対象 36 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=15) と上昇しなかった群 (ALT 非上昇群 n=21) に群別し、検討 1 と同様の検討を行った。その結果、治療中止時に HBe 抗原が陰性であること、HBV DNA+RNA 量が少ないことが、ALT 非再上昇に関与していることが示唆された。一方、検討 1 と同様、核酸アナログ治療中止時の HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV DNA (TaqMan 法)、Sequential therapy の有無、治療期間には、有意な差が認められなかった。

D. 考察

B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療は、強力な抗ウイルス効果があり、肝予備能を劇的に改善する症例も散見されることから、必要不可欠な治療法となっている。しかしながら、核酸アナログ治療の長期継続は、薬剤耐性ウイルスの出現をもたらす可能性があることから、可能な限り、Drug free を目指すことが、ガイドラインに示されている。そのため、今後、核酸アナログ治療の安全な中止を目指す必要があるが、同治療法は、ウイルスの肝細胞からの完全排除を目的とした治療ではないことから、治療中止後に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い。そこで、本研究では、核酸アナログ治療の安全な中止が可能と考えられる症例の抽出を目的として、HBs 抗原量、HBcr 抗原量に加え、HBV DNA 量と HBV DNA+RNA 量の測定を行った。その結果、HBV DNA+RNA 量は、治療中止後 24 週以内の HBV DNA 再上昇および ALT 再上昇を予測する上で、有効な指標となりうることを示された。この結果は、肝細胞内における HBV の複製能を反映しているものと考えられる。高い複製能をもつウイルスでは、核酸アナログ治療中の HBV DNA+RNA 量は HBV DNA 量と大きく乖離し、治療中止により、これまで HBV RNA を含むウイルス粒子として放出されていたものが、HBV DNA を含む完全粒子として放出されるようになり、その結果、早期の HBV DNA 再

上昇をもたらし、一部で肝炎の再燃を惹起すると考えられる。そのため、今後、HBV DNA+RNA の定量は治療中止後の短期的な予後予測として有用である可能性が強く示唆される。しかしながら、現在、HBV DNA+RNA の定量は一般施設では不可能であり、研究室レベルでの検討にとどめられる。今後、一般診療において、HBV DNA+RNA が定量可能となり、症例を積み重ねることで、より正確な予後予測に応用可能であると考えられた。

E. 結論

本研究は、対象となりうる症例が限られており、少数例での検討となっているが、核酸アナログ治療中のHBV DNA およびHBV DNA+RNA の変化は、治療中止後の短期的な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) 第52回日本消化器病学会大会 ブレックファーストセミナー13 「B型肝炎治療における最新の話題」
- 2) 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション14 「B型慢性肝炎における核酸アナログ中止例の検討」

2. 論文発表

- 1) Huang YW, Chayama K, Tsuge M, Takahashi S, Hatakeyama T, Abe H, Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen DS, Yang SS, Kao JH. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*;15:177-84, 2010.
- 2) Mitsui F, Tsuge M, Kimura T, Kitamura S, Abe H, Saneto H, Kawaoka T, Miki D, Hatakeyama T, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Hayes CN, Igarashi H, Morimoto

K, Shimizu M, Chayama K. Importance of serum concentration of adefovir for Lamivudine-adeфовir combination therapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*;54:3205-11, 2010.

- 3) Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*;91:1854-64, 2010.

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

Sequential 療法を行った B 型慢性肝炎患者の検討

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：Sequential 療法を行った B 型慢性肝炎患者を検討し、Sequential 療法のより良い適応を模索した。千葉大学医学部附属病院消化器内科で Sequential 療法を行った B 型慢性肝炎患者 8 例（男 6、女 2；31～37 歳；HBe 抗原陽性 6 例、HBe 抗体陽性 2 例）を対象とし、核酸アナログ製剤（NA）中止時を起点として、HBV DNA 量、ALT 値、HBe 抗原、HBcr 抗原、HBs 抗原量の推移を解析した。インターフェロン（IFN）は NA 中止 4 週間より開始し、週 3 回、6 か月間投与を行った。中止後 12 か月の時点で、HBV DNA < 5 log copies/ml かつ ALT < 40 IU/L を有効とした。HBe 抗原陽性 6 例中、NA 終了時に HBe 抗原のセロコンバージョン（SC）は 3 例に、HBV DNA 陰性化は 5 例に認められたが、投与 1 年後に有効と判定されたのは 1 例のみであった。HBe 抗体陽性 2 例は、NA 終了時に HBV DNA 陰性化は得られたが、有効は 1 例であった。HBcr 抗原は、有効となった HBe 抗原 1 例のみが NA 終了時、IFN 終了時において 5.0 未満の値であったが、非有効例は全例 5.0 以上で推移した。HBs 抗原量には一定の傾向はなかった。HBe 抗原陽性慢性肝炎では、NA 治療により HBV DNA 陰性かつ HBe 抗原 SC が得られた症例のうち HBcrAg < 5.0 log IU/ml の条件を満たしていれば Sequential 療法により肝炎の鎮静化が得られる可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎の治療において、作用機序の異なる核酸アナログ製剤（NA）とインターフェロン（IFN）を組み合わせた Sequential 療法の有効性が報告されているが、有効な症例と無効な症例の背景因子の違いに関しては不明な点も多い。今回、Sequential 療法を行った B 型慢性肝炎患者を検討し、Sequential 療法のより良い適応を模索した。

B. 研究方法

千葉大学医学部附属病院消化器内科で 2005 年～2010 年に Sequential 療法を行った B 型慢性肝炎患者 8 例（男 6、女 2；31～37 歳；HBe 抗原陽性 6 例、HBe 抗体陽性 2 例；肝組織 F1/F2/F3/ND=4/1/0/3）を対象とした。NA 投与期間は 6～60 ヶ月（中央値 9 ヶ月）で、IFN は NA 中止 4 週間より開始し、週 3 回、6 か月間投与を行った。NA 中止時を起点として、HBV DNA 量、ALT

値、HBe 抗原、HBcr 抗原、HBs 抗原量の推移を解析した。NA 投与終了後 12 か月の時点で、HBV DNA < 5 log copies/ml かつ ALT < 40 IU/L を有効と判定した。患者より検査の同意は得ており倫理的に問題はないと考える。

C. 研究結果

HBe 抗原陽性 6 例中、NA 投与終了時に HBV DNA 陰性化（2.6 log copy/ml 未満）は 5 例に認められ、そのうち HBe 抗原のセロコンバージョン（SC）は 3 例に認められた。投与終了 1 年後に有効と判定されたのは 1 例のみであった。一方、HBe 抗体陽性 2 例は、NA 終了時に HBV DNA 陰性化は得られたが有効は 1 例であった。HBcr 抗原は、有効となった HBe 抗原 1 例のみが NA 終了時、IFN 終了時において 5.0 未満の値であったが、非有効例は全例 5.0 以上で推移した。HBs 抗原量と治療効果には一定の傾向はなかった。HBe 抗体陽性例では、HBcr

抗原、HBs 抗原量の推移と治療効果に関連はなかった。

D. 考察

今回の検討では、HBe 抗原陽性例においては NA 投与により HBe 抗原 SC と HBV DNA 陰性化が得られた症例のうち NA 終了時に HBcr 抗原 <5.0 logIU/ml の症例のみが有効となった。

現在、当科で NA 投与中（平均投与期間 39 ± 29 ヶ月）の HBe 抗原陽性症例で最終観察日に近い HBcr 抗原を測定した 48 例のうち、HBcr 抗原 <5.0 を満たすのは 16 例（34%）であり、このような症例は Sequential 療法を行うことにより NA を中止できる可能性があり、さらに症例を増やして検討する必要がある。一方、HBe 抗体陽性例では治療効果を予測する因子は認められなかった。

E. 結論

HBeAg 陽性慢性肝炎では、NA 治療により HBV DNA 陰性かつ HBe 抗原 SC が得られた症例のうち HBcrAg <5.0 logIU/ml の条件を満たしていれば Sequential 療法により肝炎の鎮静化が得られる可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Bekku D, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Long-term follow-up of patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. J Gastroenterol Hepatol. 2011

Jan;26(1):122-8.

2) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. J Hepatol. 2011 Jan;54(1):19-25.

3) Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Initial Virological Response and Viral Mutation with Adefovir Dipivoxil Added to Ongoing Lamivudine Therapy in Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B. Dig Dis Sci. 2010 Oct 7.

4) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Arai M, Yonemitsu Y, Nakamoto S, Fujiwara K, Fukai K, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen downregulates cytokine production in human hepatoma cell lines. Viral Immunol. 2010 Oct;23(5):467-76.

5) Imazeki F, Yokosuka O, Omata M. Impact of IL-28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome-wide association study. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 May;8(5):497-9.

6) Karino Y, Toyota J, Kumada H, Katano Y, Izumi N, Kobashi H, Sata M, Moriyama M, Imazeki F, Kage M, Ishikawa H, Masaki N, Seriu T, Omata M. Efficacy and resistance of entecavir following 3 years of treatment of Japanese patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B. Hepatol Int. 2010 Feb 6;4(1):414-22.

7) Ito K, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Bekku D, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. Scand J Gastroenterol. 2010;45(2):243-9.

1. 学会発表

1) 神田達郎、呉霜、今関文夫。B 型肝炎ウイルス HBe 抗原は肝細胞からのサイトカイン産生を抑制する。第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、2010 年。

2) 亀崎秀宏、神田達郎、今関文夫。B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤の選択-耐性ウ

イルスの検討から- 第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、2010 年。

3) 新井誠人、今関文夫、横須賀收。HBe 抗体陽性 HBV キャリアにおける発癌スクリーニング。第 14 回日本肝臓学会大会 横浜、2010 年。

4) 新井誠人、今関文夫、横須賀收。高精度 HBs 抗原定量検査は、B 型肝炎ウイルスキャリアの治療戦略を変えるか。第 14 回日本肝臓学会大会横浜、2010 年。

5) 亀崎秀宏、神田達郎、東郷聖子、呉霜、田村玲、沖津恒一郎、米満裕、新井誠人、藤原慶一、深井健一、今関文夫、横須賀收。エンテカビル耐性ウイルスの解析から見た B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤の選択。第 14 回日本肝臓学会大会 横浜、2010 年。

6) 呉霜、神田達郎、今関文夫、新井誠人、米満裕、中本晋吾、藤原慶一、深井健一、野村文夫、横須賀收。B 型肝炎ウイルスプレコア変異はインターフェロン、サイトカイン産生を増強する。第 46 回日本肝臓学会総会 山形、2010 年

7) 東郷聖子、新井誠人、沖津恒一郎、米満裕、千葉哲博、神田達郎、藤原慶一、金井文彦、深井健一、今関文夫、横須賀收。高感度 HBs 抗原定量と臨床的背景および発癌との関連の検討。第 46 回日本肝臓学会総会 山形、2010 年

8) 東郷聖子、新井誠人、沖津恒一郎、米満裕、千葉哲博、神田達郎、藤原慶一、金井文彦、深井健一、今関文夫、横須賀收。HBs 抗原量に着目した HBe 抗原陽性慢性 HBV キャリアの長期フォローアップ検討。第 46 回日本肝臓学会総会 山形、2010 年。

H. 知的財産権の出願・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

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非再燃予測因子と無治療例の B 型肝炎活動性評価

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：B型肝炎に対する核酸アナログ製剤中止後の再燃予測に関して retrospective に解析し、その条件をもとに prospective に投与中止を行った症例について再燃に関連する要因を解析した。その結果から、中止後再燃の予測には、HBV-DNA 量、HBs 抗原、HBcr 抗原、PC/CP 変異パターンなどの複合的判定が有用であることが示された。

上記の検討は、核酸アナログ製剤投与中止が可能となる対象の抽出に有用であるのみならず、中止困難例の条件も示すことが可能であり、臨床的意義が大きいと考えられた。

さらに、上記で示されたウイルス学的条件は、無治療経過観察例における肝炎の活動性評価にも応用できると考えられた。

A. 研究目的

1. 核酸アナログ製剤投与中の B 型慢性肝炎/肝硬変における治療中止後再燃に関連する要因を retrospective に解析した結果をもとに中止後の再燃を prospective に検討する。
2. 無治療時のウイルスレベルと ALT 変動の関連性について解析し、核酸アナログ治療中止後再燃に関連する要因が無治療時の肝炎活動性の評価に有用か検討する。

B. 研究方法

1. 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。

2. 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 (LC)/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。

3. 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 log U/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 (PC/CP) 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。

4. 上記の retrospective な検討結果をもとに、一定の条件を満たし、同意の得られた HBe 抗体陽性症例 9 例に対して核酸アナログ製剤の投与を中止し、再燃の有無について検討した。

5. retrospective、または、prospective に核酸アナログ投与を中止した HBe 抗体陽性症例 30 例の再燃率を、治療終了時の HBs 抗原、および、HBcr 抗原量の組み合わせから検討した。さらに、PC/CP 変異パターンとの関連を検討した。

6. HBe 抗原陰性、genotype C の HBs 抗原陽性者 105 例（無治療経過観察例 38 例、抗 HBV 治療開始前症例 67 例）の HBV マーカーと ALT 値との関連を検討した。無治療例は、肝硬変、肝癌合併例を除き、脂肪肝、アルコール性など他の肝障害も認めない症例とし、2008 年から 2010 年までの経過観察期間中の、HBV-DNA 量と ALT 値の平均値および最高値を採用した。

C. 研究結果

1. 核酸アナログ中止後の非再燃予測因子として、HBe 抗原陰性例の場合に、① HBcr 抗原 4.0logU/ml 以下、② HBs 抗原 500 IU/ml 以下、③ precore/core promoter 変異パターンが両者変異型、④ HBV-DNA 量 2.6logcopies/ml 未満、の 4 項目中、全項目合致 5 例中 4 例 (80%)、3 項目合致 5 例中 2 例 (40%)、2 項目以下合致 11 例中 1 例 (9.1%) で HBV-DNA 再上昇 (5.0LC/ml 以上) を認めなかった。

2. 2009 年 1 月から 2010 年 6 月までに、上記 1) の条件 4 項目のうち 3 項目以上該当した HBe 抗体陽性、かつ、核酸アナログ製剤投与中の 9 例に対して、prospective にアナログ製剤の投与中止を行った。中止後観察期間は、中央値で 18 ヶ月 (8-23 ヶ月) であった。

全体では 3 例 (33.3%) にウイルス学的再燃を認めたが、4 項目合致例 5 例からの再燃は認めず、3 項目合致例では 4 例中 3 例 (75.0%) が再燃した。

3. retrospective、または、prospective に核酸アナログ投与を中止した HBe 抗体陽性症例 30 例を、終了時 HBs 抗原 100 IU/ml 未満、かつ、HBcr 抗原 3.0logU/ml 未満の I 群、HBs 抗原 1000 IU/ml 以上、または、HBcr 抗原 4.0logU/ml 以上の III 群、I 群・III 群の中間の II 群、の 3 群に分けた場合、治療終了後のウイルス学的再燃率は、I 群 2 例中 0 例 (0%)、II 群 18 例中 9 例 (50%)、III 群 10 例中 8 例 (80%) であった。

4. 上記の II 群 18 例において、核酸アナログ治療開始前の PC/CP 変異パターンによる治療終了後のウイルス学的再燃率を検討した。PC/CP パターンが両者変異型の 11 例中 2 例 (18.2%) と、それ以外の 7 例全例 (100%) に再燃を認めた。

5. 無治療経過観察 (HBe 抗体陽性、genotype C) 38 例を、上記 3) で示した HBs 抗原/HBcr 抗原による 3 群に分類した場合の、PC/CP 両者変異型の症例、および、HBV-DNA 量最大値が 5.0LC/ml 以上の症例は、I 群では 12 例 (100%)、3 例 (25%)、II 群では 3 例 (30%)、2 例 (20%)、III 群では 11 例 (69%)、8 例 (50%) であった。

6. 無治療経過観察例と抗 HBV 治療開始前の症例 105 例における、同一 HBV-DNA 量レベル内の、上記 3) で示した HBs 抗原/HBcr 抗原による群別の ALT 昇 (ALT 値あるいは観察中 ALT 最高値 60IU/l 以上) 率は、HBV-DNA 量 4.0LC/ml 未満では、I 群 0/11 (0%)、II 群 2/10 (20%)、III 群 3/7 (42.9%) であった。HBV-DNA 量 4.0~6.0LC/ml では、I 群 0/4 (0%)、II 群 4/8 (50%)、III 群 13/29 (44.8%)、HBV-DNA 量 6.0LC/ml 以上では、II 群 2/2 (100%)、III 群 29/34 (85.3%) であった。

D. 考察

核酸アナログ製剤投与中止後の再燃に関して自施設の検討を行った。これまでの retrospective な検討から、HBe 抗体陽性例において中止後再燃が低率である要因は、中止時の

HBV-DNA 量、HBs 抗原、HBcr 抗原の低値、および、治療開始時の PC/CP 両者変異型で、これらの指標の組み合わせが再燃予測に有用であると考えられた。

次に、上記の指標を参考にして、prospective な検討を行った。上記 4 指標のうち 3 項目以上合致した症例に関して、核酸アナログ製剤の投与を中止して経過を観察したところ、9 例中 3 例に再燃を認めた。再燃した 3 例は、いずれも、4 指標中 3 項目の合致例で、4 項目合致の 5 例からは再燃は認めなかった。初期の retrospective な検討も含め、予測指標の複合的な判定は再燃予測精度を高めると思われる。

これまでの retrospective、prospective な中止例の検討対象から、HBe 抗体陽性例のみを対象として、中止時の HBs 抗原、HBcr 抗原レベルによる再燃につき検討を加えると、終了時 HBs 抗原 100 IU/ml 未満、かつ、HBcr 抗原 3.0logU/ml 未満の I 群、HBs 抗原 1000 IU/ml 以上、または、HBcr 抗原 4.0logU/ml 以上の III 群、I 群・III 群の中間の II 群、の 3 群に分けた場合、3 群間の再燃率の差が明らかであった。すなわち、I 群では低率、III 群では高率な再燃が予想されることから、中止検討の可能性（あるいは継続の必要性）を示すことができる。一方で、II 群に関しては、中止後再燃率が約 50% であり、全例を対象に中止の判断を行うのは困難と思われる。

II 群症例の中止後再燃に関して、治療開始前の PC/CP 変異パターンを用いて判定したところ、PC/CP 両者変異型であった 11 例では 2 例（18.2%）のみに、それ以外のパターンを示した 7 例では全例に再燃を認めた。したがって、HBs 抗原、HBcr 抗原以外に、PC/CP 変異も再燃判定に有用と考えられた。ただし、これらの PC/CP 変異は、治療中は測定感度以下となり経時的変化の有無について確認は困難であるため、治療開始前の測定結果を利用している。

ただし、本研究における再燃の定義は、方法に示したように、ウイルス学的再燃は、終了後 1 年以内に HBV DNA 量が 5.0 [log copies (LC)/ml] 以上に上昇したものの、生化学的再燃は、終了後 1 年以内の血清 ALT ピーク値が 40 (IU/l) を超えたものとしている。定義により再燃率が異なる結果を示すため、判定の際に注意が望まれる。

核酸アナログ製剤投与中止後の再燃予測因子は、中止可否を検討可能な症例 (I 群)、中止後高率に再燃する症例 (III 群) を抽出することが可能であり、臨床的に有用であると考えられる。これらの条件は、核酸アナログ製剤の継続により HBV 活動性抑制が維持されているのか、HBV 活動性自体が低下し核酸アナログ製剤非投与下でも安定する状態まで変化したかの指標でもあると思われる。したがって、核酸アナログ製剤中止後再燃の予測要因は、無治療での肝炎安定度の指標にも応用できる可能性がある。実臨床では、同じ HBV-DNA 量でも ALT が上昇する症例と安定している症例があり、単純にウイルス量のみでは肝炎の活動性を予想できないことが多々みられる。今回、無治療例および治療開始前の症例における、HBV-DNA 量、HBs 抗原、HBcr 抗原と ALT 値との関連を検討したところ、HBV-DNA レベルに HBs 抗原/HBcr 抗原を組み合わせにより ALT 値上昇の確率は大きく異なっていた。したがって、無治療で経過観察をする症例においても、HBs 抗原/HBcr 抗原のレベル評価が、肝炎活動性予測の参考になることが示された。

E. 結論

核酸アナログ製剤の中止後再燃予測のための指標は、中止可能例の抽出のみならず、治療継続必要例の設定にも有用である。さらに、これらの条件は、無治療経過観察症例における肝炎の活動性評価にも応用できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 髭修平、中馬誠、中井正人、小林智絵、荘拓也、中西満、浅香正博 B型肝炎に対するIFN/核酸アナログ製剤の有効性 消化器内科

2011; 52: 108-114

2) Hige S, Yamamoto Y, Yoshida S, Kobayashi T, Horimoto H, Yamamoto K, Sho T, Natsuzaka M, Nakanishi M, Chuma M, Asaka M. Sensitive assay for the quantification of hepatitis B virus mutants by a minor groove binder probe and peptide nucleic acids. J Clinical Microbiology 2010; 48: 4487-4494

2. 学会発表

1) 中井正人、髭修平、小林智絵、荘拓也、中西満、中馬誠、浅香正博 HBe抗体陽性B型肝炎に対する核酸アナログ中止条件の検討 第38回日本肝臓学会東部会 パネルディスカッション東京都 2010年12月2日

2) 中馬誠、髭修平、永坂敦 肝細胞癌根治後の再発に関するHBV-DNA量、抗ウイルス薬の関与 第38回日本肝臓学会東部会 シンポジウム東京都 2010年12月2日

3) 中井正人、髭修平、小林智絵、荘拓也、中西満、中馬誠、浅香正博 B型慢性肝炎に対する核酸アナログ中止条件の検討 第107回日本消化器病学会北海道支部例会 札幌市 2010年9月11日

4) 松浦健太郎、田中靖人、大野智義、平野克治、野村秀幸、日野啓輔、小松眞史、小橋春彦、倉光智之、髭修平、日浅陽一、井上淳、菅内文中、野尻俊輔、城卓志、溝上雅史 ラミブジン投与例におけるエンテカビル切り替え無作為割り付け試験 第46回日本肝臓学会総会 ワークショップ 山形市 2010年5月28日

5) 髭修平、中馬誠、浅香正博 B型肝炎に対す

るIFN/核酸アナログ製剤の有効性 第96回日本消化器病学会総会 シンポジウム 新潟市 2010年4月22日

6) Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Hige S, Asahina Y, Ito K, Sagauchi F, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B. 45th EASL Annual Meeting Vienna, Austria April 14, 2010

7) Hige S, Nakanishi M, Kobayashi T, Sho T, Chuma M, Asaka M. Hepatitis B core-related antigen in association with hepatocellular carcinoma. 20th APASL Annual Meeting Beijing, China March 25, 2010

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 臨床研究センター 室長

研究要旨：肝炎の再燃なく、核酸アナログの中止が可能となる症例を見出す目的で、本研究班の核酸アナログ中止ガイドライン案（I, II, III群）に添って当院の核酸アナログ治療例を検討した。当院のII群に属する症例は肝炎再燃を認めず、III群においても4/6例で再燃を認めなかった（非再燃率66.7%）。当院の核酸アナログ継続投与例（ラミブジン投与5年、エンテカビル投与3年）での中止ガイドラインの条件を満たす症例の割合は、I群は全体の1.4～2.5%、II群は20.2%であった。

核酸アナログ中止例被再燃例の臨床経過は、II群は治療開始後数ヶ月でHBe抗原が陰性化し、その後5～7年核酸アナログが投与されていた。III群は若年（年齢中央値：41.5歳）で、HBe抗原陰性化には1年程度要していた。投与期間が短く（1～2年）、HBコア関連抗原が高値の症例（4.8 logU/ml）が再燃した。中止時HBコア関連抗原量が4.1 logU/ml以下の症例は9/10例 90%の非再燃率であった。HBe抗原消失後の核酸アナログの投与期間（中央値）は非再燃例5.0年、再燃例2.3年（ $p=0.19$ ）で有意差はみられなかったが、非再燃例で長期投与されていた。

HBe抗原陰性化後の核酸アナログの長期投与（5年以上）により治療中止後の肝炎再燃が少なくなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝炎の再燃なく、核酸アナログの中止が可能となる症例を見出す目的で、本研究班の核酸アナログ中止ガイドライン案（2011暫定中止基準、I, II, III群）に添って当院の核酸アナログ治療例を検討した。

B. 研究方法

対象：1999年11月から2011年1月に当院で核酸アナログを導入した症例は445例（ラミブジン：254例、エンテカビル：195例）である。核酸アナログ投与を中止したのは15例。そのうち中止時HBe抗原が陰性化しており、中止後1年以上経過観察し得た12例を対象とした。内訳：男性：8例、女性：4例、年齢（中央値）：46.7歳、治療前HBe抗原陽性：6例、ALT値：283 IU/L、HBV-DNA量：7.4 logcopies/ml、HBs抗

原量：5869 IU/ml。肝炎再燃の基準は、斑の基準である、治療中止後HBV-DNA量 ≥ 5.8 logcopies/mlまたはALT値 ≥ 80 IU/Lとした。

また投与継続中の症例で中止ガイドラインを満たす症例の割合をラミブジン5年以上投与例119例、エンテカビル3年以上継続投与例75例を対象として検討した。

方法：①当院の核酸アナログ中止症例と中止ガイドラインとの比較を行う。②核酸アナログ継続例（ラミブジン投与5年、エンテカビル投与3年）で中止基準を満たす症例の割合を検討する。③中止症例の臨床経過を検討する。

（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。