

firmed. Moreover, the resistance rate becomes higher for patients with a lamivudine-resistant mutant, as high as 20% within 1 year for adefovir and 51% after 5 years for entecavir.

It is important to detect and quantify these mutant strains, and various methods have been developed for such measurements. The most common method for the detection of mutant viruses is direct sequencing after PCR amplification. However, the detection limit of a minor strain in the heterogeneous virus population is about 20%. Recently, a new method called ultradeep pyrosequencing has been developed (26, 36). This sequencing relies on the detection of DNA polymerase activity by measuring the pyrophosphate (PP<sub>i</sub>) released by the addition of a deoxyribonucleoside monophosphate (dNMP) to the 3' end of a primer. The detection limit decreased to 1% by this technique.

There are several methods for hybridization-based genotyping: the line probe assay (LiPA) (12, 22, 37), mixed hybridization-sequencing-PCR (minisequencing) (15), and the oligonucleotide tip assay (13). The sensitivity of the LiPA is 5 to 10%, and that of the minisequencing assay is 2 to 10%. The sensitivity of the high-density DNA chip reported by Tran et al. was 30 to 50%, but it was able to detect 245 mutations, 20 deletions, and 2 insertions at 151 positions (39). Hong et al. reported that mass spectrometry is another method for the detection of mutants. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) had a detection limit of 100 copies/ml and a sensitivity of 1% (10).

Some modified real-time PCR methods have been developed for the quantification of mutant viruses: PCR with molecular beacons (32), PCR with a minor groove binder (MGB), PCR with a locked nucleic acid (LNA)-mediated probe (3, 19, 38), and amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) (33).

An MGB can fit snugly into the minor groove, which is the deep narrow space between the two phosphate-sugar backbones of a double-stranded DNA helix.

Afonina et al. reported that a DNA probe with a tripeptide {1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indole-7-carboxylate} (GDPI<sub>3</sub>), which is conjugated to the 5' ends of short oligodeoxynucleotides (ODNs), formed unusually stable hybrids with cDNA and can be used as a PCR primer (1). This MGB probe has a higher melting temperature ( $T_m$ ) and greater specificity than ordinary DNA probes, especially when a mismatch is in the MGB region of the duplex (7, 16). Zhao et al. reported a real-time PCR method using a TaqMan-MGB probe for the measurement of total amounts of HBV DNA (41), and we have reported the quantification of lamivudine-resistant mutants by the type-specific TaqMan MGB probe assay (40).

Several authors have reported a similar sensitivity of 10% for the detection of minor variants (9, 11, 25). Intraexperimental variability was reported to be 4.9% by Lole and Arankalle (24) and 1.0 to 2.2%, depending on the type of mutant, by our own evaluation (40).

However, our study revealed that the accuracy of quantification was reduced in the case of measurements of minor strains in a mixed population. Therefore, we introduced PNAs to be used in combination with the MGB probes.

PNAs are DNA mimics in which the deoxyribose phosphate backbone of DNA has been replaced by *N*-(2-aminoethyl)gly-

cine linkages (30). They recognize and bind to their complementary nucleic acid sequences with high thermal stability and specificity (31). PNAs cannot function as primers for DNA polymerase and can be used to block a PCR amplification process in a sequence-specific manner. This PCR clamping allows for direct analysis of single-base mutations by PCR.

Kirishima et al. (14) reported a sensitive method for the detection of a lamivudine-resistant mutant by PNA-mediated PCR clamping with restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, and Mori et al. performed semiquantitative measurements of mutants using PNA (28).

Under the real-time PCR conditions used in our assay, one reaction cycle started at 95°C for denaturation and finished at 60°C for extension. The  $T_m$  of PNA was designed to be 3°C higher than that of an MGB probe. Because of this difference in temperature, PNA is expected to clamp a noncomplementary strain first, and then an MGB probe will hybridize to the target strand. As a result, the assay was able to achieve a significant reduction in mismatches. However, an amplification delay was observed with an excessive amount of noncomplementary PNA. No matter how well an assay is constructed, mismatches cannot be completely avoided as long as the reaction includes a matching process. However, it is thought that the actual measurement can be performed correctly by setting the appropriate concentration of the reaction mixture. As for the limit of detection, we showed that a level of the minority strain equivalent to 0.01% of the predominant strain could be measured by our assay. However, more-robust analysis is required to determine the true analytical sensitivity of the assay by measuring a number of clinical samples.

This requires a precise knowledge of the sequence of the mutants prior to determination by this assay; as such, this assay cannot be construed as a general method for the study of viral quasispecies where mutants and emerging mutants will have an unknown sequence. However, it seems ideally suited for the approach of measuring a known mutant virus, such as HBV mutants resistant to nucleoside/nucleotide analogues.

Although the risk of breakthrough hepatitis is thought to correlate with the duration of infection with mutant viruses (23), not only the duration but also the change in the mutant strains is important for the occurrence of hepatitis. We reported that the patterns of the YMDD and LLAQ motifs often changed from YMDD and LLAQ to YIDD and LLAQ, YIDD and LMAQ, and YVDD and LMAQ, in that order, and that the degree of liver damage increased as the mutations accumulated (29). As demonstrated by the case presented in this report, breakthrough hepatitis seems to have a relationship with the specific types of mutants and the length of time from the emergence of a new mutant. The degree of increase in the viral load after the emergence of dual mutations was smaller than that after the emergence of the first mutation, despite the fact that the level of liver dysfunction was higher with the dual mutations. This result suggested that breakthrough hepatitis correlated closely with changes in viral characteristics. Das et al. (5) reported differences in inhibitory effects on HBV DNA polymerase between different lamivudine-resistant mutants. The inhibitory effects were measured by recombinant HBV DNA polymerase expressed in a baculovirus transfer vector. The fold changes in inhibition of the DNA polymerase were 8.0 for the M204I mutation, 15.2 for the L180M and M204I

mutations, and 25.2 for the L180M and M204V mutations, compared to the wild type. The results for our clinical case showed a tendency similar to that reported in the evaluations of Das et al. and similar to the results of a recent molecular modeling study. Sharon and Chu demonstrated that binding energy for mutant HBV polymerases was significantly different between dCTP and 3TC and that 3TC lost binding affinity with the mutants in comparison to the natural substrate dCTP (34). L180 residues did not interact directly with 3TC, but the M180 mutant caused loosening of the hydrophobic pocket formed by the residues A87, F88, P177, L180, and M204. Consequently, dual mutations (L180M plus M204I or L180M plus M204V) were more likely to show a steric clash between I204 or V204 and 3TC.

Despite the high risk of multidrug resistance evoked by lamivudine, it has been widely used, mainly due to its low cost. Substitution of any of the residues T184, S202, and M250, in addition to the M204V and L180M mutations, is necessary for the emergence of an entecavir-resistant mutant. Therefore, it is important to observe the change in the L180 substitution prior to M204V emergence, even for cases where a drug other than lamivudine has been administered.

In conclusion, we have developed a new method for the accurate quantification of lamivudine-resistant strains in a mixed virus population. This is the first report of the combined use of an MGB probe and PNAs for the quantification of viruses using real-time PCR. This methodology should prove immensely useful for better understanding of the dynamics of the emergence of HBV-resistant mutants. Moreover, this assay has the versatility to be applied as a sensitive method for the quantification of a single-nucleotide mutation in a heterogeneous population not only of viruses but also of other nucleic acids.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Japan Society for the Promotion of Science (20590753).

#### REFERENCES

- Afonina, I., M. Zivarts, I. Kutyavin, E. Lukhtanov, H. Gamper, and R. B. Meyer. 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657-2660.
- Chen, C. J., H. I. Yang, J. Su, C. L. Jen, S. L. You, S. N. Lu, G. T. Huang, U. H. Hooje, and R.-H. S. Grp. 2006. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 295:65-73.
- Chieochansin, T., S. Chutinimitkul, S. Payungporn, A. Theamboonlers, P. Tangkijvanich, P. Komolmit, and Y. Poovorawan. 2006. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods. *Tohoku J. Exp. Med.* 210:67-78.
- Chuma, M., S. Hige, T. Kamiyama, T. Meguro, A. Nagasaka, K. Nakanishi, Y. Yamamoto, M. Nakanishi, T. Kohara, T. Sho, K. Yamamoto, E. Horimoto, T. Kobayashi, H. Yokoo, M. Matsushita, S. Todo, and M. Asaka. 2009. The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 44:991-999.
- Das, K., X. F. Xiong, H. L. Yang, C. E. Westland, C. S. Gibbs, S. G. Sarafian, and E. Arnold. 2001. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J. Virol.* 75:4771-4779.
- de Franchis, R., G. Meucci, M. Vecchi, M. Tatarella, M. Colombo, E. Delnino, M. G. Rumi, M. F. Donato, and G. Ronchi. 1993. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann. Intern. Med.* 118:191-194.
- de Kok, J. B., E. T. G. Wiegierinck, B. A. J. Giesendorf, and D. W. Swinkels. 2002. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum. Mutat.* 19:554-559.
- Dienstag, J. L., E. R. Schiff, T. L. Wright, R. P. Perrillo, H. W. L. Hann, Z. Goodman, L. Crowther, L. D. Condrey, M. Woessner, M. Rubin, and N. A. Brown for the U.S. Lamivudine Investigator Group. 1999. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N. Engl. J. Med.* 341:1256-1263.
- Geng, H. F., B. Hua, H. Wang, Y. H. Cao, Y. Sun, and A. R. Yu. 2006. Dual-probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 132:25-31.
- Hong, S. P., N. K. Kim, S. G. Hwang, H. J. Chung, S. Kim, J. H. Han, H. T. Kim, K. S. Rim, M. S. Kang, W. Yoo, and S. O. Kim. 2004. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J. Hepatol.* 40:837-844.
- Hua, R., Y. Tanaka, K. Fukai, M. Tada, M. Seto, Y. Asaoka, M. Ohta, T. Goto, F. Kanai, N. Kato, H. Yoshida, T. Kawabe, O. Yokosuka, and M. Omata. 2008. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes. *Clin. Chim. Acta* 395:151-154.
- Hussain, M., S. Fung, E. Libbrecht, E. Sablon, C. Cursaro, P. Andreone, and A. S. F. Lok. 2006. Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir. *J. Clin. Microbiol.* 44:1094-1097.
- Jang, H., M. Cho, J. Heo, H. Kim, H. Jun, W. Shin, B. Cho, H. Park, and C. Kim. 2004. Oligonucleotide chip for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.* 42:4181-4188.
- Kirishima, T., T. Okanoue, Y. Daimon, Y. Itoh, H. Nakamura, A. Morita, T. Toyama, and M. Minami. 2002. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J. Hepatol.* 37:259-265.
- Kobayashi, S., K. Shimada, H. Suzuki, K. Tanikawa, and M. Sata. 2000. Development of a new method for detecting a mutation in the gene encoding hepatitis B virus reverse transcriptase active site (YMDD motif). *Hepatol. Res.* 17:31-42.
- Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lohov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, and J. Hedgpeth. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28:655-661.
- Lai, C. L., R. N. Chien, N. W. Y. Leung, T. T. Chang, R. Guan, D. I. Tai, K. Y. Ng, P. C. Wu, J. C. Dent, J. Barber, S. L. Stephenson, D. F. Gray, and the Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. 1998. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 339:61-68.
- Lai, C. L., J. Dienstag, E. Schiff, N. W. Y. Leung, M. Atkins, C. Hunt, N. Brown, M. Woessner, R. Boehme, and L. Condrey. 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin. Infect. Dis.* 36:687-696.
- Latorra, D., K. Campbell, A. Wolter, and J. M. Hurley. 2003. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* 22:79-85.
- Liaw, Y. F., J. J. Y. Sung, W. C. Chow, G. Farrell, C. Z. Lee, H. Yuen, T. Tanwandee, Q. M. Tao, K. Shue, O. N. Keene, J. S. Dixon, D. F. Gray, and J. Sabbat, for the Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. 2004. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Engl. J. Med.* 351:1521-1531.
- Liaw, Y. F., D. I. Tai, C. M. Chu, and T. J. Chen. 1988. The development of cirrhosis patients with chronic type B hepatitis—a prospective study. *Hepatology* 8:493-496.
- Libbrecht, E., J. Doutreloigne, H. Van De Velde, M. F. Yuen, C. L. Lai, F. Shapiro, and E. Sablon. 2007. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 45:3935-3941.
- Lok, A. S. F., C. L. Lai, N. Leung, G. B. Yao, Z. Y. Cui, E. R. Schiff, J. L. Dienstag, E. J. Heathcote, N. R. Little, D. A. Griffiths, S. D. Gardner, and M. Castiglia. 2003. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 125:1714-1722.
- Lole, K. S., and V. A. Arankalle. 2006. Quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using internal amplification control and dual TaqMan MGB probes. *J. Virol. Methods* 135:83-90.
- Malmstrom, S., C. Hannoun, and M. Lindh. 2007. Mutation analysis of lamivudine resistant hepatitis B virus strains by TaqMan PCR. *J. Virol. Methods* 143:147-152.
- Margeridon-Thermet, S., N. S. Shulman, A. Ahmed, R. Shahriar, T. Liu, C. L. Wang, S. P. Holmes, F. Babrzadeh, B. Gharizadeh, B. Hanczaruk, B. B. Simen, M. Egholm, and R. W. Shafer. 2009. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naive patients. *J. Infect. Dis.* 199:1275-1285.
- Matsumoto, A., E. Tanaka, A. Rokuhara, K. Kiyosawa, H. Kumada, M. Omata, K. Okita, N. Hayashi, T. Okanoue, S. Iino, K. Tanikawa, and the Inuyama Hepatitis Study Group. 2005. Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: a multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatol. Res.* 32:173-184.
- Mori, K., M. Minami, T. Kirishima, K. Kunimoto, M. Okita, M. Nakayama,

- A. Makiyama, J. Yamaoka, T. Nakajima, K. Yasui, Y. Itoh, and T. Okanoue. 2006. Prediction of breakthrough hepatitis due to lamivudine-resistant hepatitis B virus by a sensitive semiquantitative assay using peptide nucleic acids. *Intervirology*. 49:274-280.
29. Natsuizaka, M., S. Hige, Y. Ono, K. Ogawa, M. Nakanishi, M. Chuma, S. Yoshida, and M. Asaka. 2005. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J. Viral Hepat.* 12:154-159.
30. Ohishi, W., H. Shirakawa, Y. Kawakami, S. Kimura, M. Kamiyasu, S. Tazuma, T. Nakanishi, and K. Chayama. 2004. Identification of rare polymerase variants of hepatitis B virus using a two-stage PCR with peptide nucleic acid clamping. *J. Med. Virol.* 72:558-565.
31. Ørum, H., P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, and C. Stanley. 1993. Single-base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 21:5332-5336.
32. Pas, S. D., S. Noppornpanth, A. A. van der Eijk, R. A. de Man, and H. G. M. Niesters. 2005. Quantification of the newly detected lamivudine resistant YSDD variants of hepatitis B virus using molecular beacons. *J. Clin. Virol.* 32:166-172.
33. Punia, P., P. Cane, C. G. Te, and N. Saunders. 2004. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J. Hepatol.* 40:986-992.
34. Sharon, A., and C. K. Chu. 2008. Understanding the molecular basis of HBV drug resistance by molecular modeling. *Antivir. Res.* 80:339-353.
35. Shaw, T., A. Bartholomeusz, and S. Locarnini. 2006. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.* 44:593-606.
36. Solmone, M., D. Vincenti, M. C. F. Prosperi, A. Bruselles, G. Ippolito, and M. R. Capobianchi. 2009. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J. Virol.* 83:1718-1726.
37. Stuyver, L., C. Van Geyt, S. De Gendt, G. Van Reybroeck, F. Zoulim, G. Leroux-Roels, and R. Rossau. 2000. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:702-707.
38. Sun, Z., L. F. Zhou, H. Y. Zeng, Z. Chen, and H. H. Zhu. 2007. Multiplex locked nucleic acid probes for analysis of hepatitis B virus mutants using real-time PCR. *Genomics* 89:151-159.
39. Tran, N., R. Berne, R. Chann, M. Gauthier, D. Martin, M. A. Armand, A. Ollivet, C. G. Teo, S. Ijaz, D. Flichman, M. Brunetto, K. P. Bielawski, C. Pichoud, F. Zoulim, and G. Vernet. 2006. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 44:2792-2800.
40. Yoshida, S., S. Hige, M. Yoshida, N. Yamashita, S. I. Fujisawa, K. Sato, T. Kitamura, M. Nishimura, M. Chuma, M. Asaka, and H. Chiba. 2008. Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B. *Ann. Clin. Biochem.* 45:59-64.
41. Zhao, J. R., Y. J. Bai, Q. H. Zhang, Y. Wan, D. Li, and X. J. Yan. 2005. Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World J. Gastroenterol.* 11:508-510.
42. Zoulim, F., and S. Locarnini. 2009. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137:1593-1608.

## 特集Ⅱ B型肝炎治療の最新戦略

# B型肝炎に対するIFN/核酸アナログ製剤の有効性\*

髭 修平\*\*  
 中馬 誠\*\*  
 中井 正人\*\*  
 小林 智絵\*\*  
 荘 拓也\*\*  
 中西 満\*\*  
 浅香 正博\*\*

**Key Words :** hepatitis B, interferon, nucleot(s)ide analogues, combination therapy

### はじめに

B型慢性肝炎に対して、わが国でインターフェロン(IFN)治療が導入されて20年以上、核酸アナログ製剤導入からも10年が経過した。この間、病態、検査方法などに関する多くの知見が蓄積され、治療効果も向上したものの、決定的な治療方法は見出されていない。これは、B型肝炎ウイルス(HBV)が体内から排除されることの困難性、病態・病期により治療目標や治療効果が異なることなど、さまざまな要因が関連するB型肝炎の特徴によるものである。

現在の抗HBV治療の選択肢は、IFNと核酸アナログ製剤に大別されるが、わが国の保険適用上は、IFN製剤はHBe抗原陽性症例への使用が基本であるため、HBe抗原陽性例に対する併用治療を中心に、われわれの治療成績を含めて概説する。

### B型肝炎の経過と治療目標

B型肝炎の自然経過は、免疫寛容期、肝炎活動期、非活動性キャリア期に大別され<sup>1)</sup>、近年は、

一部でHBs抗体陽性期からの再活性化が注目されている。genotype BあるいはC型が大多数を占めるわが国では、HBs抗原の陰性化は一部のみであり、多くの症例は、生涯HBs抗原陽性のままで経過する。良好な経過を示すHBVキャリアでは、若年時に一過性の肝障害とともにHBe抗原の陰性化、HBe抗体の陽転を示し(通常は、これをseroconversion: SCと称している)、HBV-DNA量の低下、alanine aminotransferase (ALT)の低値が持続する。

一方、活動性B型肝炎症例では、上述のようなスムーズなSCが得られず、肝障害が持続する。これらは、HBe抗原陽性期とHBe抗体陽性期に大別されるが、前者のHBe抗原陽性期には比較的高度の肝障害を認め、HBe抗体陽性期には、HBV-DNA量と連動するALTの消長が持続的にみられることが多い。最終的には、両者の総和として肝病変の進展度が規定される(図1)。したがって、現実的な治療の目標は、HBe抗原の状態に合わせて設定することが重要である。HBe抗原陽性例においては、HBe抗原陰性化とHBV-DNAも含めた再燃のない安定化、すなわち「良質なSC」を目標とし、HBe抗体陽性例では、HBV-DNAと連動するALTの低値維持が現実的目標となる。

わが国では、厚生労働省の「肝硬変を含めたウ

\* The efficacy of the combination therapy with interferon and nucleotide/nucleoside analogues for chronic hepatitis B.

\*\* Shuhei HIGE, M.D., Makoto CHUMA, M.D., Masato NAKAI, Tomoe KOBAYASHI, Takuya SHO, M.D., Mitsuru NAKANISHI, M.D. & Masahiro ASAKA, M.D.: 北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学[〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目]; Department of Internal Medicine, Gastroenterology Section, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, JAPAN

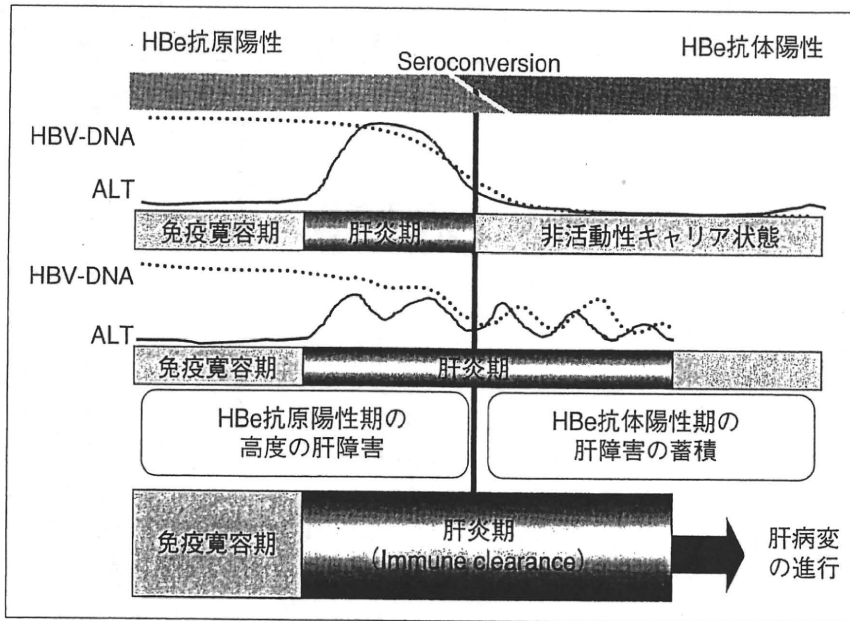


図1 B型肝炎の経過図

ウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班によりB型肝炎の治療ガイドラインが策定され、毎年、更新されている<sup>2)</sup>。

### B型肝炎に対する治療薬

現在、わが国で使用可能な抗HBV作用薬は、大別して以下の2種類である。

#### 1. IFN製剤

わが国では、1986年にβ型、1988年にα型のIFNが、HBe抗原陽性慢性活動性肝炎に対しての承認を獲得した。当初は投与期間が4週間であり、有効性は限定的であった。2002年から、24週間投与が可能となって現在に至っている。今後、徐放型IFNであるペグ・インターフェロン(PEG-IFN)の導入が期待されている。

#### 2. 核酸アナログ製剤

わが国では、2000年にラミブジン(LAM)が慢性肝炎に(2005年から肝硬変へも拡大)、2006年からエンテカビル(ETV)が肝炎・肝硬変症例に投与可能となった。また、アデホビル(ADV)は、2004年にLAM耐性例に対して追加併用が可能となり、さらに、2008年に単独投与の承認を得ている。

IFN製剤は、副作用、1回分の費用、投与可能期間などの点で核酸アナログ製剤に比べて負担が大きく、核酸アナログ製剤が導入された2000

年以降は、核酸アナログ製剤投与例が多数を占める現状にある。

両者の作用機序には違いがあり、核酸アナログ製剤は、主にHBV逆転写の段階に作用し、増幅を抑制しているが、IFNは、この作用に加え免疫賦活作用を有しており、感染肝細胞自体を排除する効果を有する。この特徴を十分に理解し治療法を選択する必要がある。

### IFNと核酸アナログ製剤の短期併用による抗HBV効果の評価

当科で行った、HBe抗原陽性例に対するIFNβの1日2分割投与(4週間)、LAM単剤投与、および、両者の併用(4週間、以後はLAMのみ継続)の検討について成績を示す。

対象は合計36例で、IFNβの1日2分割投与例をIFN2分割群、ラミブジン単剤投与例をLAM群、両者併用例を併用群と表すと、IFN2分割群18例、LAM群12例、併用群6例である。さらに、従来型のIFN1日1回4週間投与例85例をIFN従来群として比較した(表1)。

治療開始4週間でのHBV-DNA低下量は、IFNβ2分割群とLAM投与群で大きかった。また、HBV-DNAの減少は、開始後数日間の比較的急峻な低下と、それ以降の緩徐な低下に分けられる例が多く；これを、第1相、第2相と表して、減少

表 1 HBe抗原陽性例の短期治療(4週間)検討対象

	IFN2分割群	LAM群	併用群	IFN従来群
症例数	18	12	6	85
男女比	12/6	10/2	3/3	56/29
平均年齢 (歳)	32.6±2.3	37.5±11.1	25.0±3.7	32.5±7.5
治療開始前	P<0.05			
ALT値 (IU/l)	176.7±157.1	465.9±491.0	263.5±290.4	205±188.3
HBe抗原 (CI)	136.1±94.9	121.8±64.4	99.0±66.4	124.9±78.4
HBV-DNA量 (LGE/ml)	8.0±0.7	7.8±0.8	7.5±0.8	7.8±0.8
開始後4週間				
HBV-DNA低下量 (LGE/ml)	2.4±1.3	3.2±1.4	3.3±1.2	1.4±1.0
HBe抗原低下率 (%)	50.7±62.7	60.3±46.0	57.9±41.1	20.9±34.0

(平均±標準偏差)

表 2 短期治療例における治療早期のHBV-DNA減少速度

	第1相 (LGE/ml/日)	第2相 (LGE/ml/日)
IFN2分割群	0.23±0.12	0.08±0.05
LAM群	0.34±0.22	0.09±0.08
併用群	0.44±0.15	0.07±0.03

速度を算出した。併用群で、第1相での減少速度が大きい傾向を認めた(表2)。

これらの成績は、IFNと核酸アナログ製剤の併用により、抗ウイルス効果を増強させる可能性を示している。

### 当科におけるB型肝炎に対する併用療法

当科では、HBe抗原陽性慢性肝炎患者を対象として、IFN-βの24週間投与と核酸アナログ製剤16週間の同時投与を行ってきた。これは、現在、保険治療が可能なIFNの用法用量に核酸アナログ製剤を併用し、段階的に投薬を終了する形でプロトコールを作成している(図2)。

当科の同時併用治療の特徴は、

①2剤同時使用により、抗ウイルス効果および免疫賦活効果を増強させた。

②タイミングを考慮した上で、初期に強力な抑制効果を期待する。

③治療中止後の強いリバウンドによる肝不全の出現を回避する。

④核酸アナログ投与の短期化による耐性出現を抑制する。

などで、結果的に、若年層へも期間限定的な核酸アナログを用いた抗HBV治療を可能とさせている。

### IFN(24週)+核酸アナログ製剤 同時併用療法の成績

当科における、HBe抗原陽性慢性肝炎患者に対して、表1で示したプロトコールで、IFNβ24週間と核酸アナログ製剤16週間の同時併用治療を行った成績を示す。対象は49例で、IFNβ1日300万単位を、初期4週間は週に5~6回、以後20週間は週3回投与とし、核酸アナログ製剤は、16週間、連日内服して終了とした。投与した核

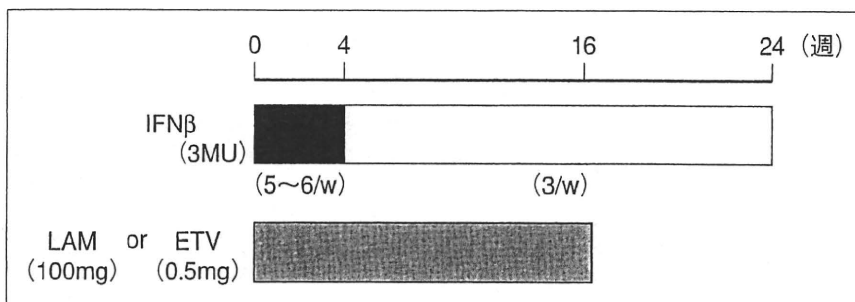


図2 当科のIFN+核酸アナログ併用方法

表 3 核酸アナログ製剤およびIFN(24週間)併用のHBe抗原陽性症例

	NA単独群 (Lam or ETV)	併用群 (IFNβ+Lam or ETV)
症例数	75	49
男/女	54/21	25/24
年齢 (歳)	40.9±13.4	38.7±12.8
開始時ALT値 (IU/l)	277.7±319.1	182.7±168.1
HBV-DNA量 (LC/ml)	7.4±1.2	7.4±1.0
Precore変異 : wild優位/その他	34/12	32/13
CP変異 : wild優位/その他	4/42	8/37
genotype : B/C	1/33	1/35
F score : 0/1/2/3/4	5/10/11/10/7	2/10/18/9/3
A score : 0/1/2/3	0/16/20/1	1/11/15/4
観察期間 (月)	17.2±10.2	19.9±17.2

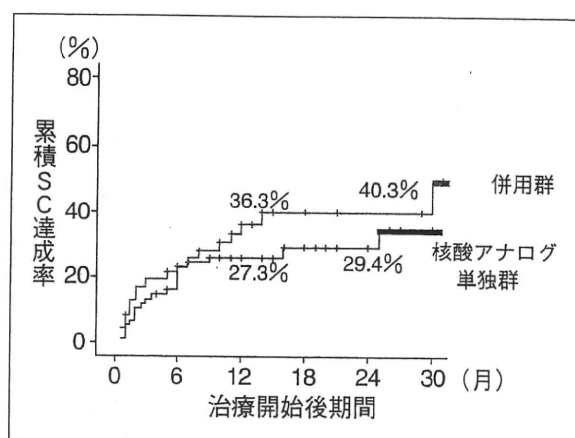


図 3 治療法別の累積SC達成率

酸アナログは、LAMが23例、ETVが26例であった。対象として、同時期に核酸アナログ製剤を単独投与したHBe抗原陽性例75例(LAM 37例、ETV38例)の効果と比較した(表 3)。両群の背景では、単独群の治療開始時ALT値が高値、併用群の女性比率が高率の傾向があった。単独投与群では、投与期間に制限は設けず、SC達成後、少なくとも1年以上の継続投与後に投与中止とし、それ以外は継続中である。

Kaplan-Meier法による累積SC達成率として2群を比較した場合、12か月後、24か月後のSC達成率は、核酸アナログ単剤群の27.3%、29.4%に対して、併用群では、36.3%、40.3%と高率の傾向を示したが、統計学的には有意な差には至らなかった( $P=0.15$ ) (図 3)。

治療開始1年以内のSC達成例の割合は、単独投与の19例(25.3%)と比較して、併用群では19例(38.8%)と高率であった。治療開始3年以内ま

表 4 治療開始後のHBe抗原/抗体の変化(開始後3年以内)

	SC達成例		HBe reversion (3年以内)
	1年以内	1~3年後	
単独群 (n=75)			
(LAM37 ETV38)	19 (25.3%)	2 (2.3%)	1 (1.3%)
併用群 (n=49)			
IFNβ+(LAM23 ETV26)	19 (38.8%)	3 (6.1%)	5 (10.2%)

表 5 治療開始後の経過(開始後3年以内)

	再治療 (3年以内)	耐性株出現	
		SC	LAM ETV
単独群 (n=75)			
(LAM37 ETV38)	2 (2.3%)	0 (0%)	16/37 0/38 (43.2%) (0%)
併用群 (n=49)			
IFNβ+(LAM23 ETV26)	14 (28.6%)	4 (8.2%)	1*/23 0/26 (4.3%) (0%)

\* 再治療にてLAM単独投与。

でのSC例は、単独群は21例(27.6%)、併用群では22例(44.9%)となり、併用群で高率の傾向を認めた( $P=0.06$ )。一方、SC後3年以内にHBe抗原が再陽転する症例は、単独群では1例のみであるが、併用群では5例に認めた。しかし、この結果は、単独群と併用群とで、継続する治療期間が異なることに起因すると考えられる(表 4)。併用群では、初回治療開始後3年以内に再治療を行う例が14例(28.6%)であり、その中からSCを達成する症例もあり、結果的には、3年間の経過の中では、一定のSC達成を維持していた(表 5)。

一方、核酸アナログ製剤に対する耐性変異株

の出現については、LAMの単独投与群では高率に認め、37例中16例(43.2%)に耐性株を認めた。ETVに関しては、現時点では耐性変異の出現例は認めていない。

検討対象の背景を限定して、投与方法別の有効性をKaplan-Meier法による累積SC達成率で評価すると、性別では男性、年齢では30歳以上の併用群で有効性が向上する傾向を認めた(図4, 5)。

B型肝炎治療でHBe抗原の陰性化が得られやすい要因として、治療前ALT値、年齢、性別などがあげられるが、今回の併用治療は、難治が予想される条件において有効率を向上させる可能性を示している。

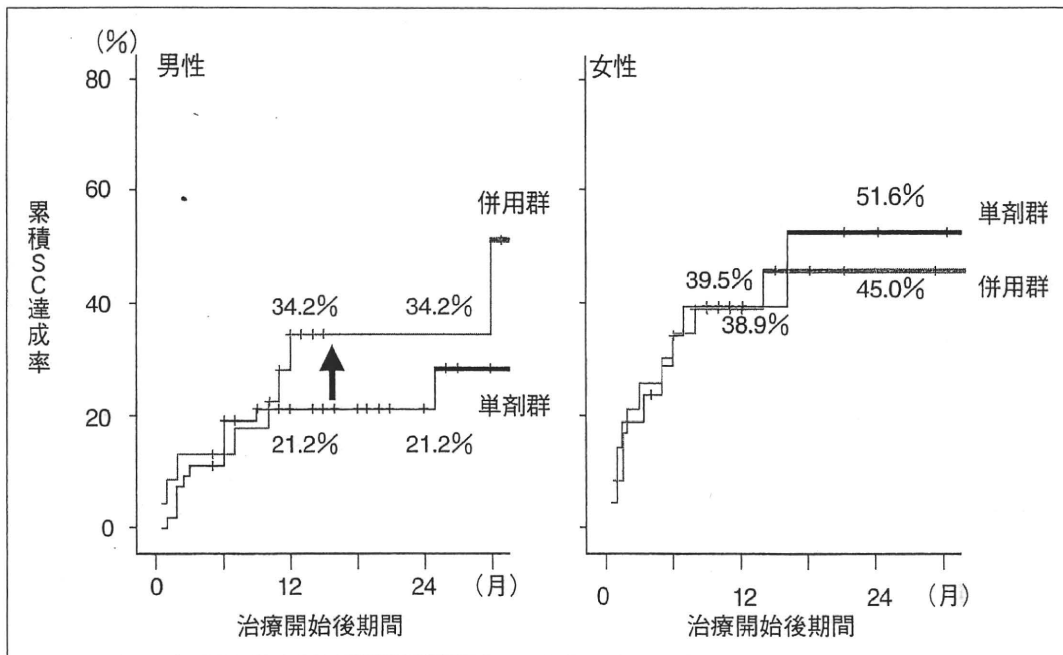


図4 性別および治療法別の累積SC達成率

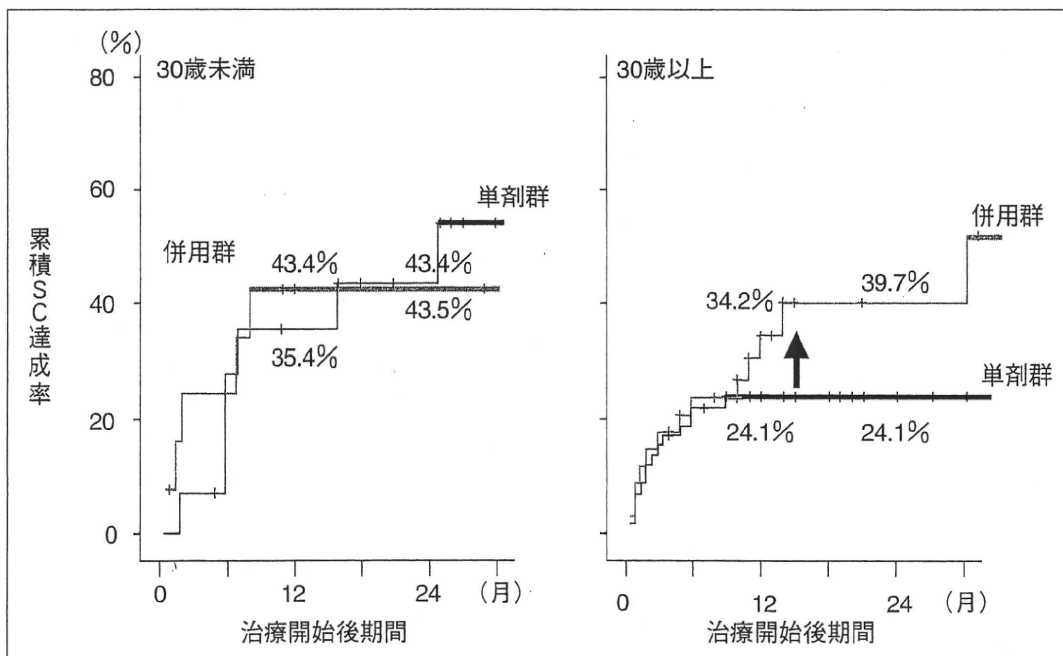


図5 年齢および治療法別の累積SC達成率



## 海外におけるIFN製剤＋ 核酸アナログ製剤併用の治療成績

従来型のIFN製剤と核酸アナログ製剤の単独・併用投与に関して、Schalmら<sup>3)</sup>が無作為比較試験(RCT)の成績を報告している。230例のHBe抗原陽性者を、IFN $\alpha$ -2b(1,000万単位、週3回、16週間)、LAM(100mg、連日、52週間)、両者併用(8週間のLAM先行投与後、16週間の併用)、の3群で治療し、52週後のSC率は、それぞれ、19%、18%、29%で、特に、治療開始時ALT値が正常上限2倍以上の併用群で約40%と高率のSCを達成している。

2000年代前半の試験では、HBV genotype別の検討は行われておらず、また、併用治療とLAM単独投与での解析が多かったが<sup>4)5)</sup>、海外では、PEG-IFN製剤の導入後、B型肝炎治療ガイドラインも、IFN製剤はPEG-IFN $\alpha$ が中心となってきている<sup>6)~8)</sup>。

近年、PEG-IFN $\alpha$ 製剤と核酸アナログ製剤の併用に関する比較的大規模なRCTの結果が報告されてきている。HBe抗原陽性例に対して、Lauら<sup>9)</sup>は、LAM単独、PEG-IFN $\alpha$ -2a単独、両剤併用の3群814例による48週のRCTを行った。また、Janssenら<sup>10)</sup>は、PEG-IFN $\alpha$ -2b単独群とLAM＋PEG-IFN $\alpha$ -2b併用群の2群307例で行った52週間のRCTを行っている。後者の試験は、70%以上が白人、genotypeはAまたはDの対象であった。前者は、85%強がアジア人を対象としているが、genotype別には、B型が約30%、C型が約60%と、日本国内での分布とやや異なる。いずれの試験においても、PEG-IFN $\alpha$ 製剤と核酸アナログ製剤を同時併用した場合の最終観察時期のHBe抗原陰性化は、PEG-IFN $\alpha$ 単独治療時とほぼ同等であり、併用治療の上乗せ効果は認めなかった。これらは多数例のRCTによる信頼性の高い結果であるが、わが国での治療対象と異なる要因もあり、今後、PEG-IFN導入後に国内での評価が必要である。

2つのRCTに共通しているのは、治療期間中のHBV-DNA量は、PEG-IFN単独投与群に比べ併用群で有意に減少するものの、終了後には併用群の再上昇幅が大きく、結果的に両群のHBV-DNA

レベルが同等である点である。これは、HBe抗原陰性症例を対象としたRCTでも同様の傾向を示している<sup>11)12)</sup>。

Wooら<sup>13)</sup>は、B型肝炎治療薬剤の効果を、ベイズ法にてメタ解析を行い、PEG-IFN＋LAM併用群のPEG-IFN単独投与群に対する有効性は、オッズ比として、HBV-DNA陰性化は5.75、ALT正常化は1.83、HBe抗原からのSCは0.99、HBe抗原陰性化は1.26、HBs抗原陰性化は1.40、組織学的改善は0.82と報告している。さらに、種々の治療選択肢の中で有効性が高いと評価される順位でも、PEG-IFN＋LAM併用療法は、HBV-DNA陰性化、HBe抗原陰性化、HBs抗原陰性化において、PEG-IFN単独よりも上位に位置づけられている。

## 併用療法の評価

前述のRCTにおける治療終了後の抗HBV効果は、PEG-IFN投与の有無が最も大きな規定要因となっており、長期効果に関するIFNの意義が示されている。すなわち、核酸アナログ製剤の主作用であるHBV増幅抑制効果よりも、IFNの免疫賦活による感染肝細胞排除の方が、長期的な有効性には強く作用し、海外のRCTでは、PEG-IFN単剤に対する併用療法の優位性は示されない結果となった。

一方で、治療中のHBV-DNA減少効果は、IFNと核酸アナログの併用が単剤投与に比較して明らかに強いことが示され、われわれの検討でも同様の結果が示されている。また、海外でのRCT検討対象はすべてPEG-IFN治療例であるが、われわれが行っている従来型IFN投与方法は、初期4週間の頻回投与(週5~6回)であり、PEG-IFNとは違う評価が必要と思われる。

B型肝炎治療の評価は、症例により大きく結果が異なる。特に、HBe抗原陽性者では治療開始時の背景要因の影響を受け、ALT値の変動を加味したタイミングの判断が最終結果にも影響する。今後は、このような併用時の増強効果が最終の有効性に寄与する要因を解析し、症例の選択を行っていく必要があると思われる。

## まとめ

IFN製剤と核酸アナログ製剤の併用により、治

療期間中のHBV-DNA低下作用は明らかに増強されるが、HBe抗原陽性例のSC達成率に関しては、PEG-IFN単独投与に対する核酸アナログ製剤併用の上乗せ効果が明確にはなっていない。今後、わが国と海外の症例の比較、IFN製剤・投与法の比較、有効性に関連する要因などの解析を進める必要があると思われる。

#### 文 献

- 1) Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection : what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2005 ; 43 : S173.
- 2) Kumada H, Okanoue T, Onji M, et al. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatology Res* 2010 ; 40 : 1.
- 3) Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, et al. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection : a randomised trial. *Gut* 2000 ; 46 : 562.
- 4) Barbaro G, Zechini F, Pellicelli AM, et al. Long-term efficacy of interferon alpha-2b and lamivudine in combination compared to lamivudine monotherapy in patients with chronic hepatitis B. An Italian multicenter, randomized trial. *J Hepatol* 2001 ; 35 : 406.
- 5) Santantonio T, Niro GA, Sinisi E, et al. Lamivudine/interferon combination therapy in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients : a controlled pilot study. *J Hepatol* 2002 ; 36 : 799.
- 6) Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007 ; 45 : 507.
- 7) European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines : management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009 ; 50 : 227.
- 8) Liaw YF, Leung NW, Kao JH, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B : a 2008 update. *Hepatology Int* 2008 ; 2 : 263.
- 9) Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon alpha-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2682.
- 10) Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alpha-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B : a randomised trial. *Lancet* 2005 ; 365 : 123.
- 11) Marcellin P, Lau GK, Bonino F, et al. Peginterferon alpha-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 1206.
- 12) Kaymakoglu S, Oguz D, Gur G, et al. Pegylated interferon alpha-2b monotherapy and pegylated interferon alpha-2b plus lamivudine combination therapy for patients with hepatitis B virus e antigen-negative chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51 : 3020.
- 13) Woo G, Tomlinson G, Nishikawa Y, et al. Tenofovir and entecavir are the most effective antiviral agents for chronic hepatitis B : a systematic review and Bayesian meta-analyses. *Gastroenterology* 2010 ; 139 : 1218.

\* \* \*

