

表1 核酸アナログ製剤と治療効果

HBcrAg / HBsAg		Lamivudine* (n=26)		Entecavir* (n=33)	
Group	Score	治療前	治療後	治療前	治療後
低リスク群	0	1/26 (4%) 0/6 (0%)	2/26 (8%) 0/6 (0%)	1/33 (3%) 0/10 (0%)	3/33 (9%) 0/10 (0%)
中リスク群	1-2	3/26 (12%) 0/6 (0%)	6/26 (23%) 0/6 (0%)	9/33 (27%) 1/10 (10%)	16/33 (49%) 3/10 (30%)
高リスク群	3-4	22/26 (84%) 6/6 (100%)	18/26 (69%) 6/6 (100%)	23/33 (70%) 9/10 (90%)	14/33 (42%) 7/10 (70%)

全年齢  
37歳未満

\* 投与開始から6ヶ月以上の治療継続症例

## B. 研究方法

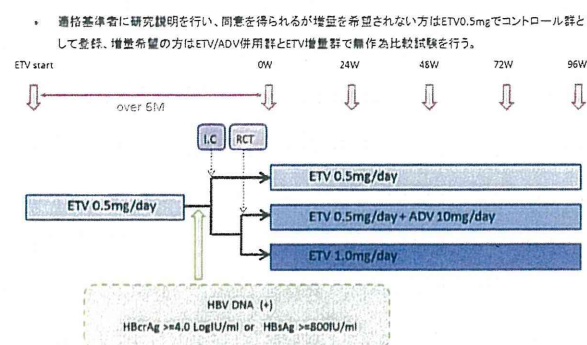
本研究はB型慢性肝炎の核酸アナログ製剤治療に抵抗する患者に対してADV / ETV併用療法とETV増量療法を無作為比較試験によりその有効性を検討するものである(図2)。対象患者の適格基準はETV(バラクルード錠0.5mg)1日1錠経口投与され6ヶ月以上経た時点で血中HBV DNA量が陰性化せず、HBcrAgが $\geq 4.0 \text{ LogIU/ml}$ 、またはHBsAg $\geq 800 \text{ IU/ml}$ の患者(Ⅲ群:総スコア3 or 4)である。また妊娠や妊娠の可能性のある方、腎機能障害のある方、非代償性肝硬変の方などは除外した。

担当医師より文書および口頭による十分な説明を行い、患者さんの自由意志による同意を文書で得る。核酸アナログ製剤の増量を希望される方に対しては無作為割付けを行い、ETV0.5mg1日1錠にADV10mg1日1錠の追加投与群、もしくはバラクルード錠0.5mg1日2錠投与群に振り分ける。研究の主旨に同意を得られるが核酸アナログ製剤の増量を希望されない場合にはバラクルード錠0.5mg1日1錠投与をそのまま継続投与しコントロール群とする。試験開始時、開始後24週、48週、72週、96週目に血中ALT値、HBV DNA量、HBcrAg、HBsAg定量を測定する。

試験期間中、中止基準を満たしたときは患者の同意のもと核酸アナログ中止の検討を行い、耐性株が出現した時は試験をただちに中止し、ガイドラインに基づいた治療へ変更する。試験期間終了後、核酸アナログ併用群、増量群で抗ウイルス効

果が十分に得られていないと判断する症例は、バラクルード0.5mg錠1日1錠へ減量することも検討する。

図2 研究デザイン



主要評価項目は中止基準をみだす症例を増加させることを目的に、各核酸アナログ製剤の併用療法や増量療法による抗ウイルス効果としてHBcrAgおよびHBsAg定量値を評価した。

副次評価項目は各群治療の生化学的反応(Biochemical response; BR)とウイルス学的反応(Virologic response; VR)、および年齢、性別、肝線維化などの因子との関連、そして副作用等安全性の検討とした。

登録期間は2010年6月1日から2012年5月31日、研究期間は2010年6月1日から2014年5月31日で、目標症例数は各群15例、合計45症例である。

### (倫理面への配慮)

本試験はGCPを準用するものとする。また、ヘルシンキ宣言(2000年改定)を遵守して実施する。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22年6月1日兵庫医科大学倫理審査委員会の承認を得ており、大学病院医療情報ネットワーク(University Hospital Medical Information Network; UMIN)

へ登録している。

### C. 研究結果

平成 24 年 1 月 23 日時点における登録症例数は合計 26 症例で ETV/ADV 併用群が 13 症例、ETV 増量群が 13 症例である。観察期間は最短 1 ヶ月、最長 21 ヶ月、平均 11.1 ヶ月である。ETV/ADV 併用群で 1 症例、ETV 増量群で 2 症例の計 3 症例の脱落を認めており、脱落理由は転院 2 症例、他の治療への変更 1 症例であった。

両群の背景因子は、年齢 40 歳前半の男性で HBeAg 陽性例が多く、検索できた症例の遺伝子型は全例 C 型であった。試験開始前の ETV (0.5mg/日) 投与期間は ETV/ADV 併用群 26.4 ヶ月、ETV 増量群 17.9 ヶ月であったが有意差はなかった。血中 ALT 値、HBV DNA 量、HBsAg 定量値、HBcrAg に有意差は認めなかった (表 2)。

表2 登録患者の背景(OM)

	ETV0.5mg + ADV10mg/day (n=13)	ETV1.0mg/day (n=13)	p
Age	45.5±9.6	42.9±9.6	p=0.501379
Gender (M/F)	12/1	10/3	p=0.295684
HBeAg (+/-)	10/3	8/5	p=0.415784
Genotype (A/B/C)	0/0/6	0/0/9	
Fibrosis (1/2/3/4)	3/2/1/0	4/1/3/0	p=0.746885
Duration of ETV (M)	26.4±15.8	17.9±13.2	p=0.081679
ALT (U/l)	30.7±33.2	38.7±36.8	p=0.716753
HBV DNA (LogU/ml)	2.40±1.39	2.82±1.05	p=0.800919
HBcrAg (LogU/ml)	5.63±0.93	5.25±1.18	p=0.200996
HBsAg (IU/ml)	1255.8±5.9	10542.4±2.2	p=0.991176

#### 1. 血中 ALT 値と HBV DNA 量の推移

横軸を月数、縦軸を血中 ALT 値、HBV DNA 値とし両治療群の推移を検討した。血中 ALT 値は、両群とも試験開始前の ETV (0.5mg/日) 投与では ALT が収束せず肝炎が持続する症例が存在したが、試験開始後 ETV/ADV 群 (0.5mg+10mg/日) ではほぼ全例 30U/I 未満に収束した。ETV 増量群 (1.0mg/日) も多くの症例で 30U/I 未満に収束したが、ETV (0.5mg/日) 投与で収束しなかった症例は増量により一時的な改善傾向を認めるが収束することなく肝炎が持続した。

血中 HBV DNA 量は、ETV/ADV 群全例で 2.1Logcopy/ml 以下に至るのに対して ETV 増量群は 2.1Logcopy/ml 以下に至る症例は限定された。しかし多くは低値で維持され、ALT 値が収束しない肝炎持続症例も HBV DNA 量が高値になることはなかった。(図 3A, 3B)。

両群の治療効果を試験開始 6 ヶ月後と 12 ヶ月後の BR と VR で検討した。BR は ETV/ADV 群は 6 ヶ月後 72.7%、12 ヶ月後 88.0%、ETV 増量群は 6 ヶ月後 72.7%、12 ヶ月後 71.4%と有意差は認めなかったが、VR は ETV/ADV 群は 6 ヶ月後 54.5%、12 ヶ月後 63.0%と高率であるのに対して ETV 増量群は 6 ヶ月後 27.3%、12 ヶ月後 28.6%と低く有意差を認めた (図 4)。また ETV/ADV 群は 6 ヶ月後より 12 ヶ月後で BR、VR の増加を示したが ETV 増量群は増加を認めなかった。

図3A ALTの推移

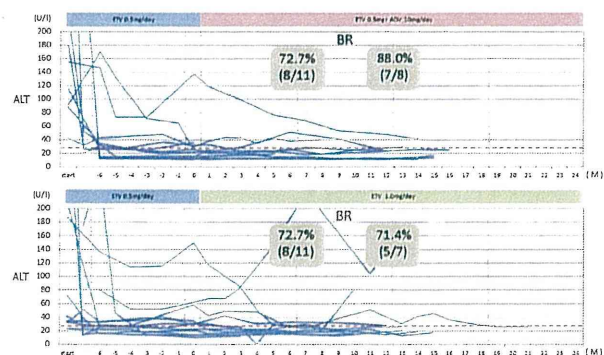


図3B HBV DNAの推移

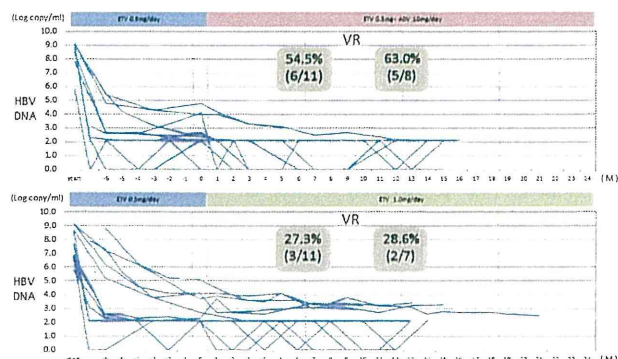
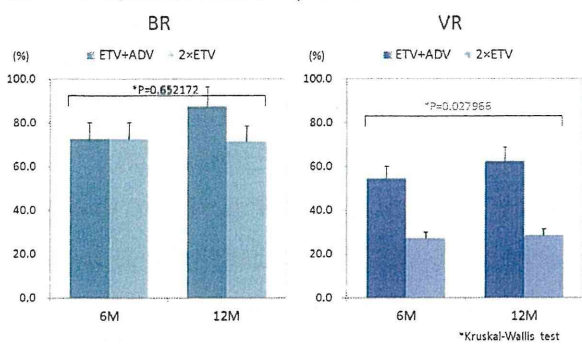




図4 治療効果判定(BR, VR)



## 2. HBsAg 定量、HBcrAg の推移

HBcrAg と HBsAg 定量の推移は平均 11.1 ヶ月という今回の観察期間において、血中 ALT 値や HBV DNA 量のような大きな変動は認めることはなかった。しかし HBcrAg は観察期間中、両治療群とも緩やかな低下を認め、ETV/ADV 群は ETV 増量群に比べ低下する症例が多く存在した。HBsAg 定量は両治療群とも低下する症例と、反対に緩やかに上昇してくる症例が存在した (図 5A, 5B)。

図5A HBcrAg の推移

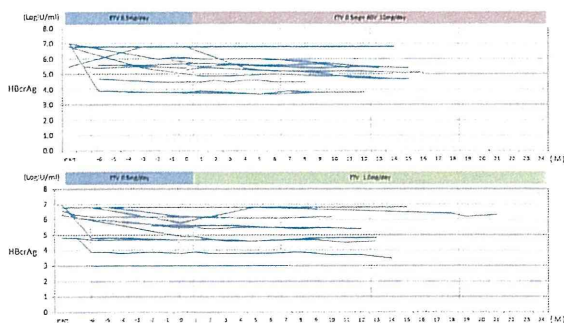
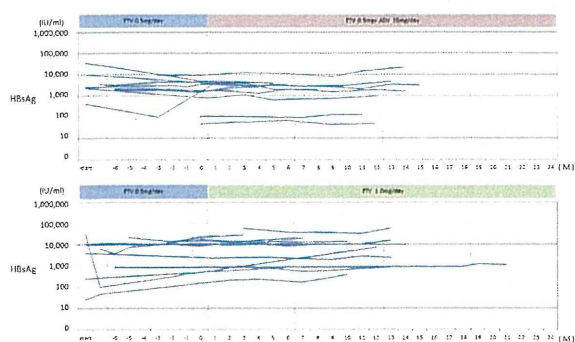


図5B HBsAg の推移

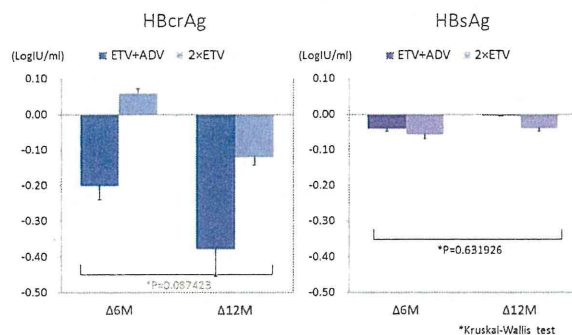


HBcrAg と HBsAg 定量の 6 ヶ月間 (Δ6M) と 12

ヶ月間 (Δ12M) の変動を調べ、その抗ウイルス効果について検討した。HBcrAg は ETV/ADV 群において Δ6M -0.2LogIU/ml、Δ12M -0.38LogIU/ml、ETV 増量群において Δ6M 0.06LogIU/ml、Δ12M -0.12LogIU/ml であった。Δ6M、Δ12M 共に ETV/ADV 群は ETV 増量群に比べ変動率が大きく有意差が認められた。

一方 HBsAg 定量は HBcrAg と比べ Δ6M、Δ12M ともにその変動率は小さく、さらに ETV/ADV 群、ETV 増量群ともに Δ6M より Δ12M の方が変動率は低い事が示された (図 6)。

図6 HBcrAgとHBsAgの変動(Δ6M, Δ12M)



## D. 考察

血中 HBV DNA 量の測定は、核酸アナログ投与時に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。本研究班において新たな指標として開発された HBcrAg と HBsAg 定量を用いた新しい中止基準は、中止後の肝炎の増悪を予測する上で非常に有用である。しかし、我々の検討では中止基準を満たす症例として、I 群のみでは全体の 10%未満で、II 群を加味しても半数には至らず該当する症例が少ないことが明らかとなった。また年齢構成を検討すると、中止基準を満たす症例の多くが高齢者であり、本来のドラッグフリーをめざすべき対象の若年層は少ない。さらに高齢者は線維化の進行した肝炎症例が多く、特に肝硬変症例では中止基準を満たしても肝炎再燃や発癌抑制の観点から核酸アナログの中止は適切ではない。このように現在

の核酸アナログ製剤治療では中止可能対象者が限定されているので、中止後の再燃率を低下させる工夫や中止基準を満たす症例数を増加させる方法が求められる。

中止後の再燃率を低下させる工夫として、インターフェロンを併用した Sequential therapy が多くの施設で検討されているが、その効果についてまだ十分なエビデンスが得られていない。しかしインターフェロンは若年層で有効性が高く、PEGインターフェロンが保険収載され、適応拡大が認められたことから HBsAg の陰性化までを視野に入れた新たなコンセプトの sequential therapy が考えられる。

それに対して本研究は抗ウイルス効果を高め中止基準を満たす症例数を増加させる方法として企画した。ETV0.5mg/日では十分な治療効果が得られていない治療抵抗例を対象として ETV/ADV 併用療法と ETV 増量療法の有効性について比較するものである。ETV/ADV 併用療法と ETV 増量療法は ETV0.5mg/日投与より高い抗ウイルス効果が期待され、その評価に HBcrAg 値と HBsAg 定量値を指標として用いることでより詳細な抗ウイルス効果の検討を行った。

先ず ETV/ADV 併用療法と ETV 増量療法の有効性評価として血中 ALT 値と HBV DNA 量の推移を検討した。血中 ALT 値に関しては、ETV/ADV 群 (0.5mg+10mg/日) はほぼ全例 30U/I 未満に収束したが、ETV 増量群 (1.0mg/日) では ETV (0.5mg/日) 投与で収束しなかった症例は増量により一時的な改善傾向を認めるがそのまま収束することなく肝炎が持続する症例が存在した。これらの症例では ETV に対する耐性が考えられたが、ETV の耐性検査 (イノリパ法) では耐性は認められなかった。耐性以外の何らかの要因が抗ウイルス効果を減弱させていると考えられた。血中 HBV DNA 量は、ETV/ADV 群全例で 2.1Logcopy/ml 以下に至るのに対して、ETV 増量群では 2.1Logcopy/ml 以下に至る症例は限定され、VR に関して ETV/ADV 群は 12ヶ月後の 63.0% に対して ETV 増量群は 28.6% と明

らかな有意差を認めた。以上の結果より、ETV/ADV 群は ETV 増量群より抗ウイルスが高く、ETV 不応例に対して ETV の増量療法では抗ウイルス効果に限界があり、多剤併用療法の方がより高い抗ウイルス効果が期待できることが示された。

核酸アナログ製剤の中止基準の指標である HBcrAg と HBsAg 定量による抗ウイルス効果は平均 11.1 ヶ月という観察期間において血中 ALT 値や HBV DNA 量のような変動は認められず評価は困難であった。HBcrAg は全体的に緩やかな低下を示す症例が多いが、ETV/ADV 群は  $\Delta 6M$ 、 $\Delta 12M$  共に ETV 増量群に比べ低下を認め、年間で ETV/ADV 群 0.38LogIU/ml、ETV 増量群 0.12LogIU/ml と有意差を認めた。HBcrAg による評価でもより強い ETV/ADV 併用療法の抗ウイルス効果が示された。

HBsAg 定量は低下する症例と反対に緩やかに上昇してくる症例が混在し、 $\Delta 6M$  と  $\Delta 12M$  の抗ウイルス効果についての検討では、低下率を評価することはできなかった。今後、どのような因子が HBsAg 定量の推移と関連するか検討する必要性があり、ETV/ADV 併用療法は HBsAg 消失に向けた選択肢の 1 つとなる可能性が考えられた。

## E. 結論

ETV/ADV 併用療法は ETV 単剤治療より VR 率が高く、HBcrAg に関して年 0.38LogIU/ml の低下を認め高い抗ウイルス効果が示され、核酸アナログ製剤多剤併用療法の高い抗ウイルス効果は、中止基準スコア評価の向上に有用であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimomura S, Ikeda N, Saito M, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Yoshikawa S, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H, Imanishi H, Yamamoto T, Jomura H, Nakamura H, Iijima H, Nishiguchi S. Long-term interferon

therapy after radiofrequency ablation is effective in treating patients with HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2011; 5:559-66.

- 2) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2011;22:1872-034.
- 3) Tanaka H, Iijima H, Nouse K, Aoki N, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Nishiguchi S. Cost-effectiveness analysis on the surveillance for hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis patients using contrast-enhanced ultrasonography. *Hepatol Res.* 2012;3. [Epub ahead of print]
- 4) Enomoto H, Inoue SI, Matsuhisa A, Aizawa N, Imanishi H, Saito M, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Sakai Y, Takashima T, Shimomura S, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S. Development of a new in situ hybridization method for the detection of global bacterial DNA to provide early evidence of a bacterial infection in spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 2011 Aug 9.

## 2. 学会発表

- 1) Tanaka H, Iijima H, Yoshida M, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Shimomura S, Imanishi H, Nishigami T, Fujimoto J, Hirota S,

Nishiguchi S. Usefulness of VTTQ (Virtual Touch Tissue Quantification) to diagnose fibrosis stage and liver tumors. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2011) 2011. 3 Berlin

- 2) Tanaka H, Iijima H, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Shimomura S, Iimuro Y, Fujimoto J, Hirota S, Nishiguchi S. Malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the contrast enhanced agent for ultrasonography "Sonazoid". 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2011) 2011. 3 Berlin
- 3) Aizawa N, Enomoto H, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the insulin resistance. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011. 11 San Francisco
- 4) Aizawa N, Enomoto H, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. Sustained pathological alterations in the liver after hepatitis C virus eradication. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011. 11 San Francisco
- 5) Enomoto H, Nakamura H, Imanishi H, Iwai T, Takashima T, Aizawa N, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Iijima H, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor as a potential target molecule for

- the treatment of hepatocellular carcinoma. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011.11 San Francisco
- 6) Kuga C, Matsuda F, Torii Y, Enomoto H, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Nakamura H, Tsutsui H, Iijima H, Tanaka Y, Nishiguchi S. Interferon- $\beta$  treatment is effective for chronic hepatitis C patients with anti-interferon- $\alpha$  neutralizing antibodies. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011.11 San Francisco
- 7) Tanaka H, Iijima H, Shibata Y, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Ikeda N, Iwata K, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. Early response monitoring of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma patients using contrast enhanced ultrasonography. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011.11 San Francisco
- 8) Iijima H, Tanaka H, Yoshida M, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. VTTQ(Virtual Touch Tissue Quantification)for evaluation of liver tumors. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011.11 San Francisco
- 9) Enomoto H, Inoue S, Matsuhisa A, Aizawa N, Imanishi H, Saito M, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Iwata K, Sakai Y, Takashima T, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S. A novel approach by the in-situ hybridization method to provide early evidence of a bacterial infection in patients with spontaneous bacterial peritonitis. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011.11 San Francisco
- 10) 西口修平, 會澤信弘, 齋藤正紀. Peg-IFN/RBV 療法無効C型慢性肝炎に対する原因別対策. (シンポジウム). 第97回日本消化器病学会総会 2011.5 東京
- 11) 會澤信弘, 森脇英一朗, 岩井孝史, 高嶋智之, 坂井良行, 池田直人, 田中弘教, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 藤元治朗, 西口修平. 慢性肝疾患組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と肝発癌. (ミニシンポジウム). 第97回日本消化器病学会総会 2011.5 東京
- 12) 齋藤正紀, 森脇英一朗, 岩井孝史, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 池田直人, 岩田恵典, 田中弘教, 榎本平之, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. BCAA 製剤の1日容量に加えたBCAA食品加摂取の有用性の検討. (ミニシンポジウム). 第97回日本消化器病学会総会 2011.5 東京
- 13) 坂井良行, 岩田恵典, 齋藤正紀, 森脇英一朗, 岩井孝史, 高嶋智之, 會澤信弘, 池田直人, 田中弘教, 榎本平之, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. 食道静脈瘤治療前後の栄養状態に関する肝機能別検討. (ミニシンポジウム). 第97回日本消化器病学会総会 2011.5 東京
- 14) 松田二子, 榎本平之, 會澤信弘, 坂井良行, 池田直人, 田中弘教, 岩田恵典, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. C型慢性肝炎におけるPeg-IFN/RBV療法無効の原因とその対策についての検討. (ポスターセッション). 第47回日本肝臓学会総会 2011.6 東京
- 15) 齋藤正紀, 森脇英一朗, 岩井孝史, 高嶋智之,

- 坂井良行, 會澤信弘, 池田直人, 田中弘教, 岩田恵典, 榎本平之, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. 間接カロリー計を用いた非蛋白呼吸症による慢性肝疾患の病態栄養評価. (ポスターセッション). 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6 東京
- 16) 高嶋智之, 會澤信弘, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 金守良, 井本勉, 城村尚登, 奥新浩晃, 菅野雅彦, 二宮俊明, 大岡照二, 瀬戸靖, 廣田誠一, 西口修平. Peg-IFN+RBV 併用療法後の天然型 IFN $\alpha$  少量長期投与による HCV 再燃と肝発癌の抑制効果に関する検討. (ポスターセッション). 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6 東京
- 17) 會澤信弘, 森脇英一朗, 岩井孝史, 高嶋智之, 坂井良行, 池田直人, 田中弘教, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 飯島尋子, 飯室勇二, 藤元治朗, 西口修平. C 型慢性肝炎組織におけるミトコンドリア遺伝子異常とインスリン抵抗性についての検討. (ポスターセッション). 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6 東京
- 18) 池田直人, 今西宏安, 會澤信弘, 岩田恵典, 田中弘教, 榎本平之, 齋藤正紀, 飯島尋子, 西口修平. インターフェロン (IFN) 治療目的に行なわれる部分脾動脈塞栓術 (PSE) や脾摘術の実態調査. 第 19 回日本門脈圧亢進症学会総会 2011.9 福岡
- 19) 坂井良行, 齋藤正紀, 西口修平. 食道静脈瘤に対する内視鏡下治療時の栄養療法の意義. 第 53 回日本消化器病学会大会 (JDDW2011) 2011.10 福岡
- 20) 齋藤正紀, 森脇英一朗, 西口修平. 慢性肝疾患における間接熱量計による安静時エネルギー代謝量と呼吸商の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会 (JDDW2011) 2011.10 福岡
- 21) 岩井孝史, 高田亮, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 池田直人, 岩田恵典, 田中弘教, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 飯島尋子, 西口修平. C 型慢性肝炎のインターフェロン治療における抑うつ症状の評価. 第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011) 2011.10 福岡
- 22) 榎本平之, 辻村亨, 今西宏安, 齋藤正紀, 田中弘教, 池田直人, 岩井孝史, 森脇英一朗, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 岩田恵典, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. インターフェロン併用による Sorafenib の抗腫瘍効果増強作用. 第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011) 2011.10 福岡
- 23) 坂井良行, 齋藤正紀, 西口修平. 肝予備能低下患者に対する内視鏡的食道静脈瘤治療時の栄養療法. 第 39 回日本肝臓学会西部会 2011.12 岡山
- 24) 齋藤正紀, 西口修平. 当施設における間接カロリー計を用いた慢性肝疾患の病態栄養評価. 厚生労働科学研究補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業) 「ウイルス性肝疾患患者の食事・運動療法とアウトカム評価に関する研究」森脇班平成 23 年度第 1 回班会議. 2011.8 名古屋

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(※予定を含む)

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Matsumoto A, <u>Tanaka E</u> , Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S.	Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection.	J Gastroenterol			in press
<u>田中榮司</u> 、 <u>松本晶博</u> 、 <u>鈴木義之</u> 、 <u>小林万利子</u> 、 <u>田中靖人</u> 、 <u>新海登</u> 、 <u>髭修平</u> 、 <u>八橋弘</u> 、 <u>長岡進矢</u> 、 <u>茶山一彰</u> 、 <u>柘植雅貴</u> 、 <u>横須賀收</u> 、 <u>今関文夫</u> 、 <u>西口修平</u> 、 <u>齋藤正紀</u> 、 <u>藤原圭</u> 、 <u>鳥居信之</u> 、 <u>平松直樹</u> 、 <u>狩野吉康</u>	核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012 - 厚生労働省「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」の報告 -	肝臓			印刷中
Matsumoto A, <u>Tanaka E</u> , <u>Suzuki Y</u> , Kobayashi M, Tanaka Y, <u>Shinkai N</u> , <u>Hige S</u> , <u>Yatsushashi H</u> , Nagaoka S, Chayama K, <u>Tsuge M</u> , Yokosuka O, <u>Imazeki F</u> , Nishiguchi S, <u>Saito M</u> , Fujiwara K, Torii N, <u>Hiramatsu N</u> , <u>Karino Y</u> , Kumada H.	Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res	42(2)	139-149	2012
<u>Tanaka E</u> , Urata Y.	Risk of hepatitis B reactivation in patients treated with tumor necrosis factor-alpha inhibitors.	Hepatol Res	42(4)	333-339	2012
Umemura T, Joshita S, Yoneda S, Katsuyama Y, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, <u>Tanaka E</u> .	Serum interleukin (IL)-10 and IL-12 levels and IL28B gene polymorphisms: pretreatment prediction of treatment failure in chronic hepatitis C.	Antivir Ther	16(7)	1073-1080	2011

Ichikawa-Yamada Y, Joshita S, Tsukahara Y, Kimura T, Morita S, Kamijo A, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, <u>Tanaka E.</u>	Early detection of interstitial pneumonia by monitoring KL-6 in a chronic hepatitis C patient undergoing pegylated interferon and ribavirin therapy.	Hepatol Res	41(9)	904-909	2011
Yokosuka O, Kurosaki M, <u>Imazeki F</u> , Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, <u>Tanaka E</u> , Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M.	Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009.	Hepatol Res	41(1)	1-21	2011
Yoneda S, Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, <u>Tanaka E.</u>	Serum chemokine levels are associated with the outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C.	Hepatol Res	41(6)	587-593	2011
Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, <u>Yatsuhashi H</u> , Nishiguchi S, Hino K, <u>Hige S</u> , Itoh Y, <u>Tanaka E</u> , Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M.	Genome-wide association study identified ITPA/DDR1GK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Hum Mol Genet	20(17)	3507-3516	2011
Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, <u>Tanaka E.</u>	Association of Serum Cytokine Levels with Treatment Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients.	J Infect Dis	203(8)	1087-1095	2011

Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, <u>Hige S</u> , Itoh Y, <u>Tanaka E</u> , Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M.	Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b.	J Med Virol	83(5)	871-878	2011
<u>田中榮司</u>	透析患者における B 型肝炎ウイルスマーカー測定の意味	日本透析医学会雑誌	26(1)	55-61	2011
Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, <u>Suzuki Y</u> , Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H.	Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy.	Intervirolgy	55(3)	231-241	2012
Suzuki F, <u>Suzuki Y</u> , Akuta N, Sezaki H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K, Kumada H.	Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir.	Hepatology	53(2)	415-21	2011
Arase Y, <u>Suzuki Y</u> , Suzuki F, Matsumoto N, Akuta N, Imai N, Seko Y, Sezaki H, Kawamura Y, Kobayashi M, Hosaka T, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H.	Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients.	Internal Medicine	50	2083-2088	2011

Arase Y, Suzuki F, Kawamura Y, <u>Suzuki Y</u> , Kobayashi M, Matsumoto N, Akuta N, Sezaki H, Hosaka T, Ogawa K, Imai N, Seko Y, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H.	Development rate of chronic kidney disease in hepatitis C virus patients with advanced fibrosis after interferon therapy.	Hepatol Res.	41(10)	946-54	2011
Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, <u>Suzuki Y</u> , Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H.	Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy.	J Med Virol	83(6)	1016-22	2011
Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, <u>Suzuki Y</u> , Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H.	Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near the IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment.	Intervirol	Epub ahead of print		2011
鈴木義之、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木文孝、今井則博、平川美晴、川村祐介、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光	NS5A 阻害剤と NS3 プロテアーゼ阻害剤併用投与における早期抗ウイルス効果	肝臓	52(2)	147-9	2011
保坂哲也、鈴木文孝、小林正宏、瀬古裕也、今井則博、平川美晴、川村祐介、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、 <u>鈴木義之</u> 、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光	B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ療法による HBs 抗原消失とその関連因子の検討	肝臓	52(4)	255-7	2011
小林万利子、鈴木文孝、 <u>鈴木義之</u> 、芥田憲夫、瀬崎ひとみ、川村祐介、瀬古裕也、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光	コバス TaqManHBV「オート」v2.0 における同一時の血清検体と血漿検体の HBVDNA 検出率の検討	肝臓	52(11)	756-7	2011



Wai-Kay Seto, Yasuhito Tanaka, Danny Ka-Ho Wong, Ching-Lung Lai, Noboru Shinkai, John Chi-Hang Yuen, Teresa Tong, James Fung, Ivan Fan-Ngai Hung, Man-Fung Yuen	Evidence of serologic activity in chronic hepatitis B after surface antigen (HBsAg) seroclearance documented by conventional HBsAg assay	Hepatology Internationa l			in press
新海登、田中靖人	HBV 遺伝子型と臨床 像	日本臨床	69	422~427	2011
中村恵利那, 角田浩 一, 松浦健太郎, 菅 内文中, 新海登, 田 中靖人	HBs 抗原定量値の臨 床的有用性の検討	臨床病理	59(9)	838 -843	2011
Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Kiso S, Tatsumi T, Kanto T, Kasahara A, Iio S, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Mochizuki K, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Hayashi N, Takehara T.	Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus.	J Gastroenterol			in press
Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N.	Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon fas activation in bak/bax-deficient mice.	Hepatology.	54(1)	240-51	2011

Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, <u>Hiramatsu N</u> , Yin XM, Hayashi N.	BH3-only Activator Proteins Bid and Bim Are Dispensable for Bak/Bax-dependent Thrombocyte Apoptosis Induced by Bcl-xL Deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets.	J Biol Chem.	22;286(16)	13905-13	2011
狩野吉康、小関至、豊田成司	ウイルス肝炎 どのように実際の治療をすすめるか B型肝炎 B型肝炎の抗ウイルス療法の実際	Med Pract	28(28)	1425-1429	2011
小関至、 <u>狩野吉康</u> 、豊田成司	B型肝炎に対する新治療戦略 Entecavirによる抗ウイルス療法	月刊消化器内科	53(3)	283-287	2011
<u>Tsuge M</u> , Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K.	Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice.	J Infect Dis	204	224-8	2011
Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, <u>Tsuge M</u> , Chayama K.	Impact of radiation and hepatitis virus infection on risk of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	53	1237-45	2011
Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, <u>Tsuge M</u> , Imamura M.	Animal model for study of human hepatitis viruses.	J Gastroenterol Hepatol	26	13-8	2011
Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, <u>Imazeki F</u> , Yokosuka O.	Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B.	Int J Med Sci.	9(1)	27-32	2012
Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, <u>Imazeki F</u> , Yokosuka O.	Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B.	J Viral Hepat	18(10)	e508-515	2011

Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, <u>Imazeki E</u> , Yokosuka O.	Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naive Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication.	Scand J Gastroenterol	46(9)	1111-1117	2011
Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, <u>Hige S</u> , Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M.	Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial.	Hepatol Res	41 (6)	505-511	2011
中西満、中馬誠、 <u>髭修平</u> 、小林智絵、中井正人、荘拓也、浅香正博	HBV関連肝細胞癌サーベイランスにおけるHBコア関連抗原の有用性	肝臓	52 (6)	387-389	2011
<u>髭修平</u> 、荘拓也、中西満、中馬誠.	B型慢性肝炎に対するインターフェロン療法.	日本臨床	69 (4)	481-485	2011
<u>髭修平</u> 、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	52 (1)	108-114	2011
Tamada Y, <u>Yatsuhashi H</u> , Masaki N, Nakamuta M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Muro T, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H.	Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B.	Gut.			2011 (in press)

Enomoto H, Inoue SI, Matsuhisa A, Aizawa N, Imanishi H, <u>Saito M</u> , Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Sakai Y, Takashima T, Shimomura S, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S	Development of a new in situ hybridization method for the detection of global bacterial DNA to provide early evidence of a bacterial infection in spontaneous bacterial peritonitis	J Hepatol.	Aug	9	2011
Shimomura S, Ikeda N, <u>Saito M</u> , Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Yoshikawa S, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H, Imanishi H, Yamamoto T, Jomura H, Nakamura H, Iijima H, Nishiguchi S.	Long-term interferon therapy after radiofrequency ablation is effective in treating patients with HCV-associated hepatocellular carcinoma.	Hepatol Int	5	559-66	2011
Liu W, Nakamura H, Deng H, Enomoto H, Yamamoto T, Iwata Y, Koh N, <u>Saito M</u> , Imanisi H, Shimomura S, Nishigushi S.	A higher expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma cells and more tumor growth in vivo.	Trends in Cancer Research	5	29-36	2010
Yoshikawa S, Iijima H, <u>Saito M</u> , Tanaka H, Imanishi H, Yoshimoto N, Yoshimoto T, Futatsugi-Yumikura S, Nakanishi K, Tsujimura T, Nishigami T, Kudo A, Arii S, Nishiguchi S.	Crucial role of impaired Kupffer cell phagocytosis on the decreased Sonazoid-enhanced echogenicity in a liver of a nonalcoholic steatohepatitis rat model.	Hepatol Res.	40	823-31	2010



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection

Akihiro Matsumoto · Eiji Tanaka · Susumu Morita ·  
Kaname Yoshizawa · Takeji Umemura ·  
Satoru Joshita

Received: 13 October 2011 / Accepted: 30 January 2012  
© Springer 2012

### Abstract

**Background** Despite its status as a potential biomarker of hepatitis B virus (HBV) response to interferon treatment, the changes in hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels over the natural course of HBV carriers have not been analyzed sufficiently.

**Methods** A total of 101 HBV carriers were followed prospectively from 1999 to 2009. HBsAg level was measured yearly during the followed period.

**Results** HBsAg levels at baseline ranged from  $-1.4$  to  $5.32$  log IU/ml, with a median value of  $3.2$  log IU/ml. Lower HBsAg levels were significantly associated with higher age and lower HBV replication status. The rate of change of HBsAg levels showed two peaks, with a cut-off value of  $-0.4$  log IU/year. Based on this, patients were tentatively classified into rapid decrease (rate of change  $<-0.4$  log IU/year) and non-rapid decrease groups. All baseline levels of HBsAg, HB core-related Ag, and HBV DNA were lower in the rapid decrease group than in the non-rapid decrease group. Patients with persistently positive HBeAg were all classified into the non-rapid decrease group. In patients with persistently negative HBeAg, HBV DNA levels were significantly ( $P = 0.028$ ) lower in the rapid decrease group than in the non-rapid decrease group.

**Conclusions** Lower baseline HBsAg levels were significantly associated with older age and lower viral activity. Both a loss of HBeAg detection as well as inactive replication of HBV are suggested to be fundamental factors contributing to a rapid decrease in HBsAg over the natural course of HBV infection.

**Keywords** Hepatitis B virus · Hepatitis B surface antigen · Hepatitis B core-related antigen · Serum level · Natural course

### Abbreviations

HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV	Hepatitis B virus
IU	International unit
HBcrAg	Hepatitis B virus core-related antigen
HCC	Hepatocellular carcinoma
NA	Nucleos(t)ide analogue
HBeAg	Hepatitis B e antigen
CLEIA	Chemiluminescent enzyme immunoassay
Da	Dalton
HR	Hazard ratio
cccDNA	Covalently closed circular DNA

### Introduction

With an estimated 350–400 million cases of chronic infection, hepatitis B virus (HBV) infection is a major worldwide health problem [1]. Chronic infection of HBV often leads to chronic hepatitis and eventually to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2, 3]. During infection, hepatitis B surface antigen (HBsAg), which is a component of the virion envelope, is secreted into the

A. Matsumoto · E. Tanaka (✉) · S. Morita · K. Yoshizawa ·  
T. Umemura · S. Joshita  
Department of Medicine, Shinshu University School  
of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan  
e-mail: etanaka@shinshu-u.ac.jp

K. Yoshizawa  
Department of Gastroenterology, National Hospital Organization  
Shinshu Ueda Medical Center, 1-27-21 Midorigaoka,  
Ueda 386-8610, Japan

bloodstream in large amounts as subviral particles. Thus, serum HBsAg is routinely used as a marker for detection of HBV infection.

Recently, several groups have reported that HBsAg levels can be used as an indicator of the response to peg-interferon in chronic hepatitis B similarly to the conventional markers of HBV DNA level and hepatitis B (HB) e antigen/antibody status [4, 5]. Since HBV carriers who clear HBsAg usually have a better prognosis than those who do not [6–8], it may be worthwhile to monitor HBsAg levels in the natural disease course of HBV infection. However, such changes need to be clarified more thoroughly to validate their clinical significance. In the present study, we analyzed the changes in HBsAg levels in a cohort of HBV carriers who were followed prospectively and compared them with those of HBV DNA and HB core-related antigens (HBcrAg) levels.

## Patients and methods

### Patients

A total of 101 HBV carriers were followed prospectively from 1999 to 2009. Patients were selected consecutively between 1997 and 1999 and met the following conditions: (1) HBsAg was positive in at least two examinations performed over 1 year apart; (2) no complications of hepatocellular carcinoma (HCC) or signs of hepatic dysfunction, such as jaundice or ascites, were observed; (3) nucleos(t)ide analogues (NAs) were not administered at the start of follow-up; and (4) patients were negative for hepatitis C and human immunodeficiency virus antibodies. The clinical and virological characteristics of our cohort are shown in Table 1.

The 101 patients consisted of 57 men and 44 women with a median age of 50 years (range 15–83 years). Hepatitis B e antigen (HBeAg) was positive in 38 (38%) patients and negative in 63 (63%). Of the 38 patients with HBeAg, 15 remained positive and 23 became negative during the follow-up period. Alanine aminotransferase (ALT) level flares of over 1,000 IU/L were observed in four (17%) of the 23 patients with HBeAg loss, but in none of the 15 patients with persistent HBeAg ( $P = 0.138$ ). HBV genotype distribution was A in three (3%) patients, B in nine (9%), C in 87 (86%), and undetermined in two (2%). All patients were seen at Shinshu University Hospital or one of its affiliated hospitals. Our cohort tended to have a higher prevalence of cirrhosis (19%) and HCC (14%). These tendencies may be attributed to the higher age distribution in our cohort than that in other cohorts of HBsAg studies [6, 9, 10].

Patients were seen at least once a year during the 10 years of follow-up. The presence of cirrhosis was judged by histological findings and/or typical findings seen in cirrhosis, such as esophageal varices and splenomegaly. Screening for HCC was done using ultrasonography (US), computed tomography (CT), and/or magnetic resonance (MR) imaging at least once a year. The presence of complicating HCC was judged by evidence of characteristic hepatic masses on liver CT, MRI, and/or hepatic angiography. Serum samples were collected on a yearly basis and immediately stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below until assayed. This study was approved by the Ethics Committee of Shinshu University.

### Hepatitis B viral markers

Serological markers for HBV, including HBsAg, HBeAg, and HBe antibody, were tested using commercially

**Table 1** Clinical and virological characteristics of patients with respect to HBeAg status

Characteristic	Overall ( $n = 101$ )	HBeAg-positive ( $n = 38$ )	HBeAg-negative ( $n = 63$ )	<i>P</i>
At baseline				
Age (years) <sup>a</sup>	50 (15 to 83)	42 (15 to 72)	53 (25 to 83)	<0.001
Male <sup>b</sup>	57 (56%)	22 (58%)	35 (56%)	>0.2
With cirrhosis <sup>b</sup>	19 (19%)	10 (26%)	9 (14%)	0.188
ALT (IU/L) <sup>a</sup>	31 (10 to 447)	47 (13 to 447)	29 (10 to 81)	0.002
HBV genotype (A:B:C:UD)	3:9:87:2	1:0:36:1	2:9:51:1	0.144
HBsAg (log IU/ml) <sup>a</sup>	3.2 (−1.4 to 5.3)	3.7 (1.6 to 5.3)	2.9 (−1.4 to 4.3)	<0.001
HBcrAg (log U/ml) <sup>a</sup>	3.8 (<3.0 to >6.8)	6.8 (<3.0 to >6.8)	3.1 (<3.0 to >6.8)	<0.001
HBV DNA (log copies/ml) <sup>a</sup>	4.7 (neg. to >9.5)	7.4 (2.4 to >9.5)	3.6 (neg. to 8.3)	<0.001
During follow-up				
Followed period (years) <sup>a</sup>	5 (1 to 10)	6 (1 to 10)	5 (1 to 10)	>0.2
Clearance of HBsAg <sup>b</sup>	20 (20%)	3 (8%)	17 (27%)	0.022
Complication of HCC <sup>b</sup>	14 (14%)	8 (21%)	6 (10%)	0.139
Introduction of NAs <sup>b</sup>	23 (23%)	11 (29%)	12 (19%)	>0.2

UD undetermined

<sup>a</sup> Data are expressed as median (range)

<sup>b</sup> Data are expressed as positive number (%)

available enzyme immunoassay kits (Abbott Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan). Quantitative measurement of HBsAg was done using an HISCL<sup>®</sup> HBsAg assay based on the chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) (Sysmex Co. Ltd., Kobe, Japan), which had a quantitative range from  $-1.5$  to  $3.3$  log IU/ml. End titer was determined by diluting samples with normal human serum when initial results exceeded the upper limit of the assay range. Changes in HBsAg levels during the natural course of HBV infection were calculated as: difference in HBsAg level at baseline and at last visit (not undergoing NA treatment) divided by the corresponding follow-up time. Results were expressed as log change per year. Points when patients were negative for HBsAg were omitted in calculations; thus, three patients who had cleared HBsAg by the first follow-up were excluded from the study. Changes in HBsAg levels during NA treatment were calculated similarly using the differences in HBsAg levels between the start and either the end of NA treatment or the last visit.

Serum HBcrAg levels were measured using a CLEIA-based HBcrAg assay kit with a fully automated Lumipulse System analyzer (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan) as described previously [11]. Briefly,  $150\ \mu\text{l}$  of serum was incubated with  $150\ \mu\text{l}$  of pretreatment solution containing 15% sodium dodecyl sulphate at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min. After heat treatment,  $120\ \mu\text{l}$  of pretreated specimen was added to a ferrite microparticle suspension in an assay cartridge. Ferrite particles were coated with a monoclonal antibody mixture (HB44, HB61, and HB114) against denatured HBcAg, HBeAg, and the 22 kDa precore protein. [12] After 10 min of incubation at  $37^\circ\text{C}$  and washing, further incubation was carried out for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  with alkaline phosphatase conjugated with two kinds of monoclonal antibodies (HB91 and HB110) against denatured HBcAg, HBeAg, and the 22 kDa precore protein. After washing,  $200\ \mu\text{l}$  of substrate solution was added to the test cartridge, which was then incubated for 5 min at  $37^\circ\text{C}$ . The relative chemiluminescence intensity was measured, and HBcrAg concentration was calculated by a standard curve generated using recombinant pro-HBeAg (amino acids  $-10$  to 183 of the precore/core gene product). The immunoreactivity of pro-HBeAg at  $10\ \text{fg/ml}$  was defined as 1 U/ml. HBcrAg was expressed in terms of log U/ml, and the quantitative range was set at  $3.0$ – $6.8$  log U/ml.

Serum concentration of HBV DNA was determined using an AccuGene m-HBV kit (Abbott Japan Co., Ltd.) with a quantitative range of  $1.7$ – $9.5$  log copies/ml when tested in a sample volume of  $0.2\ \text{ml}$ . Six HBV genotypes (A–F) were evaluated according to the restriction patterns of DNA fragments from the method reported by Mizokami et al. [13].

## Statistical analyses

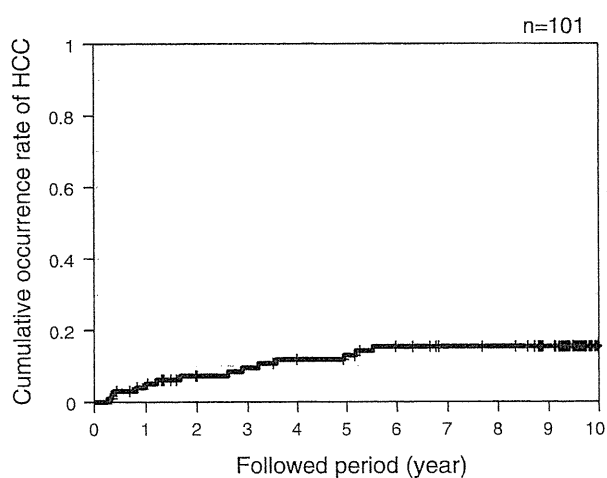
Correlations between variables were calculated using the Spearman correlation coefficient test. The Fisher's exact and Pearson's Chi-square tests were adopted to test for differences between subgroups of patients. To compare continuous data, the Mann–Whitney  $U$  test was employed. To compare paired continuous data, the Wilcoxon signed-rank test for matched pairs was used. The Kaplan–Meier method was used to estimate positive rates of HBsAg and the occurrence rate of HCC. Multivariate analyses were performed using the Cox regression model. Variables associated with a  $P$  value of  $<0.2$  in univariate analyses were included in a stepwise Cox regression analysis to identify independent factors associated with clearance of HBsAg. All tests were performed using the IBM SPSS Statistics Desktop for Japan ver. 19.0 (IBM Japan Inc., Tokyo, Japan).  $P$  values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### Follow-up of patients

Twenty three (23%) of the 101 patients enrolled dropped out of the study for reasons of changing addresses (11 patients) or halting hospital visits (12 patients). Among the remaining 78 patients, six died (four from HCC, one from hepatic failure, and one from old age) and one underwent liver transplantation due to hepatic failure. Thus, 71 patients completed the full follow-up period of 10 years.

Long term treatment with NAs, such lamivudine, was introduced in 23 patients (23%) during the study period.



**Fig. 1** Changes in the cumulative occurrence rate of HCC during the follow-up period