

クロマト法では、メンブランフィルター上で結合した検体中 HBs 抗原と抗 HBs 抗体結合金コロイドの複合体から生じるバンドにより判定する。EIA 法では、抗 HBs 抗体との結合で生じる複合体に酵素標識抗体を結合、発色させ、その吸光度により判定する。化学発光基質を用いる場合、CLEIA 法と呼ぶ。CLIA 法では、固相化した抗 HBs 抗体に検体中 HBs 抗原を結合させた後、化学発光物質(アクリジニウム標識誘導体など)を加え、発光量を測定する。

RIA 法は、高価検体の定量性や、放射性同位元素の使用などの点で制限があり、EIA 法では、HBs 抗原量が少ない症例では検査結果が陰性になる場合がある<sup>3)</sup>。測定感度は、一般的には、凝集法、イムノクロマト法、EIA 法、CLIA/CLEIA 法の順に上昇してきている。

## II. HBs 抗原と他の HBV マーカーとの関連

### 1. HBs 抗原量と肝内 cccDNA 量の相関性

HBV が肝細胞内に侵入した後は、不完全二本鎖 DNA から完全二本鎖となり、さらに閉環二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) となる。この cccDNA を鋳型にして、ウイルスの増幅や翻訳が行われ、HBV 増殖が進む。その際に、2.4 kb の mRNA から pre-S1 mRNA、2.1 kb の mRNA から pre-S2 mRNA と SmRNA が、それぞれ転写され、HBs 抗原蛋白産生に作用する。

われわれは、25 例の B 型肝炎患者の肝内 cccDNA 量と血清中 HBs 抗原量の関連を検討し、両者に有意な相関を認めた(図 1)。

### 2. 血清中の HBs 抗原量と HB コア関連抗原量、HBV-DNA 量との相関

HB コア関連抗原(HBcr 抗原)は、HBV の

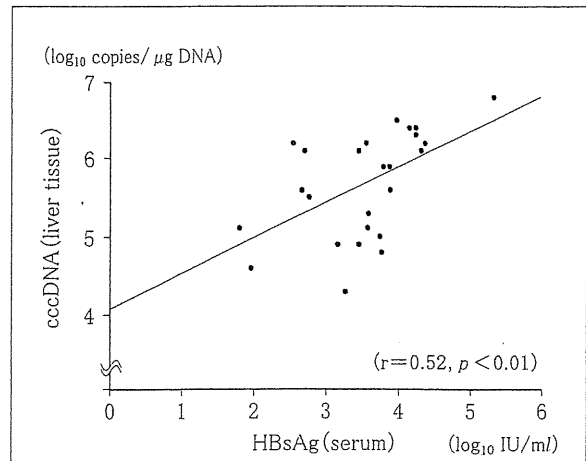


図 1 B 型肝炎患者の肝内 cccDNA 量と血清中 HBs 抗原量

core, precore mRNA から転写・翻訳される蛋白(HBc 抗原, HBe 抗原, p 22cr)を同時に測定したものである。HBcr 抗原も肝内 cccDNA を鋳型に産生されることから、両者に相関を認めている<sup>4)</sup>。

われわれが検討した、未治療 B 型慢性肝疾患症例 86 例(HBe 抗原陽性 39 例、陰性 47 例)の HBV マーカーの相関性を図 2 に示す。HBs 抗原量と、HBcr 抗原および HBV-DNA 量との相関は統計学的に有意ではあるが、HBs 抗原と HBcr 抗原の間の相関係数は 0.33 であった。どちらも肝内 cccDNA を鋳型にして産生される蛋白であるが、両者の相関性は強くはなかった。HBs 抗原と HBcr 抗原は、どちらも、HBV の翻訳産物であり、基本的には、HBV-DNA 量と HBs 抗原、HBcr 抗原量は相関するはずであるが、われわれの検討では、HBcr 抗原量のほうが肝内 cccDNA や血清中 HBV-DNA 量をよく反映していた。この結果は、HBs 抗原蛋白と HBcr 抗原蛋白の半減期の違い、small HBs sequence の frequent mutation<sup>5)</sup>などが関係している可能性が考えられた。

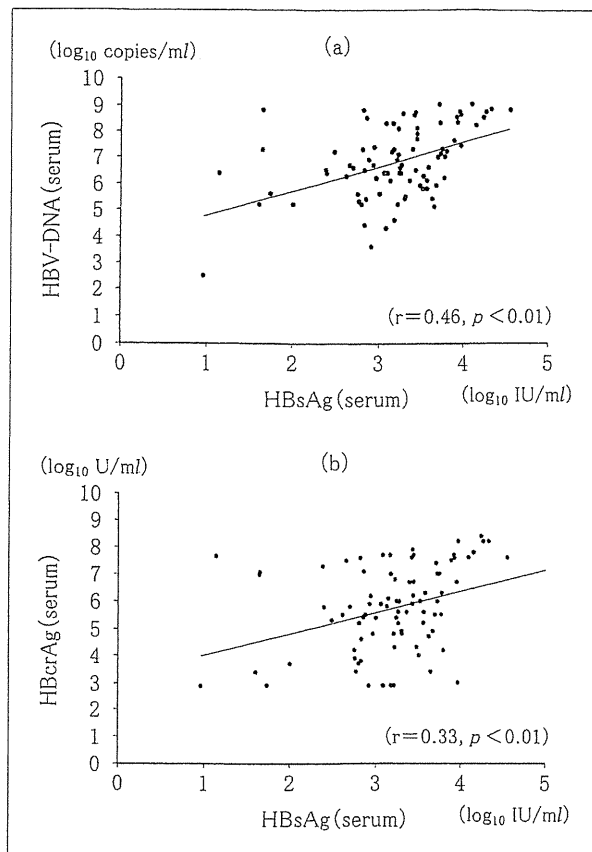


図2 血清中のHBs抗原量と、(a)HBV-DNA量、(b)HBコア関連抗原(HBcr抗原)量との相関性

### 3. HBs抗原測定におけるHBV遺伝子型の影響

現在、HBVには8種類のgenotypeが存在することが報告されている。わが国のHBV感染者は、genotype Aが3.5%、Bが14.1%、Cが82.3%と報告されている<sup>6)</sup>。これらのHBV genotypeの違いがHBs抗原測定に影響するかについて、Mizuochiらは、現在わが国で使用されているHBs抗原検出キットにおいて、少なくともEIA、CLIA、CLEIA法などの高感度キットでは、すべてのgenotype由来のHBs抗原を検出可能であることを確認し報告している<sup>7)</sup>。

4. HBs抗原測定へのHBs抗原変異の影響  
 出口らは、HBs抗原変異株パネルを用いて、9種類のリコンビナント抗原に対する検出能を検討したところ、7試薬中5試薬で、少なくとも1種類以上の偽陰性を示すことを報告した<sup>8)</sup>。検討に用いたHBs抗原測定キットと変異株検出結果の検討から、試薬中の固相および標識HBs抗体が1種類のモノクローナル抗体の場合には、変異株の検出が不良であった。

### III. 核酸アナログ薬の投与中止後再燃の可能性評価とHBs抗原

核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針を、厚生労働省の研究班(班長：信州大学 田中榮司教授)で作成中であるが<sup>3)</sup>、治療中止時のHBs抗原とHBcr抗原のレベルをスコア化し、両者の組み合わせにより中止後の再燃リスクを評価できることを明らかにした<sup>9)</sup>。

中止時点のHBs抗原量(log<sub>10</sub> IU/ml)が1.9未満、1.9~2.8、2.8以上、HBcr抗原量(log<sub>10</sub> U/ml)が3.0未満、3.0~4.0、4.0以上の、それぞれ3群に群別して、0、1、2点を配点后、両者の合計点により、0点、1~2点、3~4点の3群を、グループ1、2、3とした。治療中止後、ALT値が30 (IU/l)以下、HBV-DNA量が4.0 (log<sub>10</sub> copies/ml)以下に維持されるものを非再燃とすると、治療中止後の非再燃率は、グループ3では10%と低率であったが、グループ1では90%と高率であった。

これらの基準により、核酸アナログ薬治療に関して、中止検討可能な対象と、継続が望ましい対象を区別することが可能になるとと思われる。

当科における核酸アナログ薬中止例においては、上記の基準とやや異なる検討をした結果を紹介する(図3)。

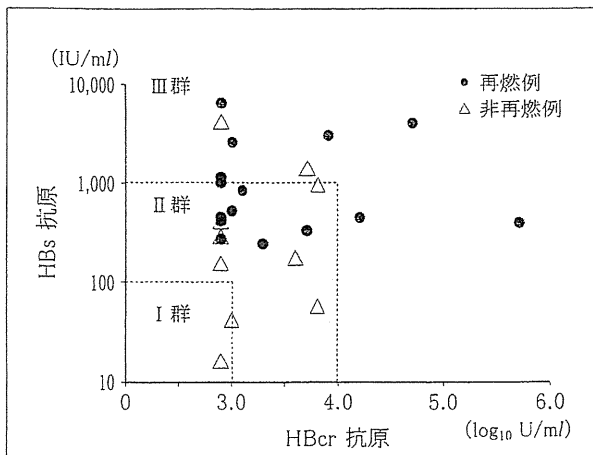


図3 核酸アナログ薬中止時のHBs抗原およびHBコア関連抗原(HBcr抗原)レベルと中止後再燃

終了後、HBV-DNA量 $5.0 \log_{10}$  copies/ml以上への上昇例を再燃例(●), それ以外を非再燃例(△)とした。

核酸アナログ薬を中止したHBe抗原陰性例26例において、治療中止時のHBs抗原量(100,あるいは, 1,000 IU/mlで3段階に群別), HBcr抗原量(3.0,あるいは,  $4.0 \log_{10}$  U/mlで3段階に群別)のレベルにより、両者低値のI群から、いずれかが高値のIII群に群別し、終了後のHBV-DNA量が $5.0 \log_{10}$  copies/ml以上への上昇を再燃と定義した。非再燃率は、I群100% (2/2), II群50% (7/14), III群20% (2/10)で、3群で再燃確率が分けされた。

#### IV. 抗HBV治療の効果予測におけるHBs抗原評価の有用性

B型肝炎に対するペグインターフェロン製剤(PEG-IFN $\alpha$ -2a)の使用について、わが国では、平成23年9月に適応拡大が承認された。

欧米からは、PEG-IFN, 核酸アナログ薬,あるいは、両者の併用治療の有効性評価に際して、定量性を有するHBs抗原測定系を用いた検討が行われている。

Moucariら<sup>10)</sup>は、HBe抗原陰性例に対する、PEG-IFN, ラミブジン,あるいは併用治療における治療開始後HBs抗原減少量( $\log_{10}$  IU/ml)が、12週後に0.5,あるいは、24週後に1.0以上の場合には、sustained virological response (SVR)確率が非常に高い(陽性的中率が、それぞれ、89%, 92%)ことを示している。

また、Brunettoら<sup>11)</sup>は、HBe抗原陰性例へのPEG-IFN $\alpha$ -2a投与後3年間のHBs抗原消失に関して、治療終了時のHBs抗原量が10 (IU/ml)未滿,治療中のHBs抗原低下量が1.0 ( $\log_{10}$  IU/ml)以上,が関連していると報告している。

わが国においても、PEG-IFN導入後に、HBs抗原量の変化を指標とした効果の評価や、治療計画の判断について、日本人を対象とした検討が必要である。

#### V. B型肝炎の経過とHBs抗原の消失

##### 1. B型慢性肝炎の長期経過とHBs抗原消失

HBVキャリアの長期経過観察例のなかからHBs抗原の陰性化がみられることが報告されてきた<sup>1)</sup>。Simonettiらは、HBV陽性のアラスカ先住民1,271名を平均19.6年間、プロスペクティブに経過観察した結果、158例(年率0.7%)にHBs抗原の自然消失を認めた<sup>12)</sup>。ほかの報告と比較して、彼らの観察集団の特徴は、対象症例に多種類のHBV genotype (A, B, C, D, Fなど)の症例が含まれていることである。HBs抗原消失の年率にgenotype間の有意差は認めていないが、genotype BやCが約0.3%/yearであるのに対して、genotype DやFは約0.6%/year前後であり、わが国で多数を占めるgenotype B, Cは比較的低率であった。その一方で、HBs抗原の自然消失後に肝癌を発症す

る例があることにも注意を喚起している。

## 2. 核酸アナログ製剤投与例における

### HBs 抗原消失

保坂らは、ラミブジン単独投与例の、治療開始後の CLIA 法 (ARCHITECT®HBsAg QT) による HBs 抗原消失例を報告している<sup>13)</sup>。投与開始 796 例を対象とした検討では 33 例に HBs 抗原消失を認め、全体での累積 HBs 抗原消失率は、5 年で 1.8%、10 年では 7.3% であった。ただし、HBV genotype A の HBs 抗原消失率が 25% であるのに対して、それ以外の genotype 症例では 2.6% であり、わが国の B 型慢性肝炎の多数を占める genotype B, C の症例においては、HBs 抗原の陰性化は、必ずしも高率ではないと思われる。

### おわりに

HBs 抗原検査は、B 型肝炎診断において、もっとも基本的な検査として使用されてきた。近年、HBs 抗原は定量的測定が可能となり、B 型肝炎の新たな評価が可能となった。さらに、B 型肝炎の病態理解や治療法などにも新しい視点が広がってきており、B 型肝炎見直しのよい機会であると思われる。

### 文 献

- 1) McMahon, B. J. : Hepatitis B surface antigen (HBsAg) : a 40-year-old hepatitis B virus seromarker gets new life. *Gastroenterology* 139 ; 380-382, 2010
- 2) Thompson, A. J. V., Nguyen, T., Iser, D., et al. : Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers : disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* 51 ; 1933-1944, 2010
- 3) 大黒 学 : B 型肝炎ウイルスマーカー (HBs 抗原・抗体, HBe 抗原・抗体, HBc 抗体). *日本臨牀* 63 (増刊号 7) ; 404-407, 2005
- 4) 髭 修平, 堀本啓大, 小原俊央, 他 ; 新しい B 型肝炎ウイルスのマーカー : HB コア関連抗原. *臨牀消化器内科* 24 ; 609-614, 2009
- 5) Schüttler, C. G., Wend, U. C., Faupel, F. M., et al. : Antigenic and physicochemical characterization of the 2nd International Standard for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *J. Clin. Virol.* 47 ; 238-242, 2010
- 6) Matsuura, K., Tanaka, Y., Hige, S., et al. : Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J. Clin. Microbiol.* 47 ; 1476-1483, 2009
- 7) Mizuochi, T., Okada, Y., Umemori, K., et al. : Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *J. Virol. Methods* 136 ; 254-256, 2006
- 8) 出口松夫, 鍵田正智, 浅利誠志, 他 : HBs 抗原検出感度と変異株検出能における 7 種類の免疫学的測定試薬の評価. *感染症学雑誌* 79 ; 138-142, 2005
- 9) Matsumoto, A., Tanaka, E., Suzuki, Y., et al. : Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol. Res.* (in press)
- 10) Moucari, R., Mackiewicz, V., Lada, O., et al. : Early serum HBsAg drop : A strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 49 ; 1151-1157, 2009
- 11) Brunetto, M. R., Moriconi, F., Bonino, F., et al. : Hepatitis B virus surface antigen levels : A guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 49 ; 1141-1150, 2009
- 12) Simonetti, J., Bulkow, L., McMahon, B. J., et al. : Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology* 51 ; 1531-1537, 2010
- 13) 保坂哲也, 鈴木文孝, 小林正宏, 他 : B 型慢性肝炎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 ; 255-257, 2011

**Original Article**

# Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial

Kentaro Matsuura,<sup>1,2</sup> Yasuhito Tanaka,<sup>1</sup> Atsunori Kusakabe,<sup>2</sup> Shuhei Hige,<sup>5</sup> Jun Inoue,<sup>6</sup> Masashi Komatsu,<sup>7</sup> Tomoyuki Kuramitsu,<sup>8</sup> Katsuharu Hirano,<sup>9</sup> Tomoyoshi Ohno,<sup>3</sup> Izumi Hasegawa,<sup>3</sup> Haruhiko Kobashi,<sup>10</sup> Keisuke Hino,<sup>11</sup> Yoichi Hiasa,<sup>12</sup> Hideyuki Nomura,<sup>13</sup> Fuminaka Sugauchi,<sup>4</sup> Shunsuke Nojiri,<sup>2</sup> Takashi Joh<sup>2</sup> and Masashi Mizokami<sup>14</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, <sup>2</sup>Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, <sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Social Insurance Chukyo Hospital, <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Nagoya Koseiin Medical Welfare Center, Nagoya, <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, <sup>6</sup>Department of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, <sup>7</sup>Department of Gastroenterology, Akita City Hospital, <sup>8</sup>Kuramitsu Clinic, Akita, <sup>9</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Juntendo University Shizuoka Hospital, Izunokuni, <sup>10</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, <sup>11</sup>Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical University, Okayama, <sup>12</sup>Department of Gastroenterology and Metabolism, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, <sup>13</sup>The Center for Liver Diseases, Shin-Kokura Hospital, Kitakyushu, and <sup>14</sup>The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Japan

**Aim:** In the 2007–2008 guidelines of the study group (Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan), lamivudine (LAM)-continuous treatment was recommended in patients treated with LAM for more than 3 years who maintained hepatitis B virus (HBV) DNA less than 2.6 log copies/mL, because in these patients LAM resistance might exist and switching treatment to entecavir (ETV) might cause ETV resistance. However, there was no evidence on whether switching treatment to ETV- or LAM-continuous treatment was better in those patients. In the present study, we performed a randomized controlled trial of LAM-to-ETV switching treatment.

**Methods:** Twenty-seven patients treated with LAM for more than 3 years whose HBV DNA levels were less than 2.6 log copies/mL were enrolled and randomly divided into two groups, LAM-continued group or switching to ETV group. Then, we examined incidence of virological breakthrough (VBT) and breakthrough hepatitis (BTH) in each group.

**Results:** There was no BTH in any of the patients. VBT was observed in six patients of the LAM group (6/15, 40%), and no patient of the ETV group (0/11, 0%) ( $P = 0.02$ ). The differences of the proportion of cumulated VBT using a log-rank test with Kaplan–Meier analysis were significant between the LAM and ETV groups ( $P = 0.025$ ).

**Conclusion:** In patients treated with LAM for more than 3 years maintaining HBV DNA less than 2.6 log copies/mL, switching treatment to ETV is recommended at least during the 2 years' follow-up period.

**Key words:** chronic hepatitis B, entecavir, lamivudine, lamivudine resistance, randomized controlled trial, switching treatment

Correspondence: Dr Yasuhito Tanaka, Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi, Mizuho, Nagoya 467-8601, Japan. Email: [ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp](mailto:ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp)

Received 22 January 2011; revision 5 March 2011; accepted 21 March 2011.

## INTRODUCTION

OVER THE PAST two decades, treatment of chronic hepatitis B (CHB) has greatly improved with the availability of nucleos(t)ide analogs (NA), including lamivudine (LAM), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudine, clevudine and tenofovir. NA target

the reverse transcriptase of hepatitis B virus (HBV), and are highly effective in suppressing HBV replication and clinical progression to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in CHB patients.<sup>1–4</sup>

Lamivudine, ADV and ETV are commonly available in Japan. LAM, the first approved NA, has been shown to provide benefit for CHB patients with respect to the reduction of HBV DNA, normalization of alanine aminotransferase (ALT) and improvement of liver histology.<sup>5,6</sup> However, a serious problem of LAM is the high incidence of drug resistance during long-term treatment. The detection rate of LAM resistance has been reported to be 24% at 1 year and 70% after 5 years of treatment.<sup>7–10</sup> Even when the HBV DNA level was maintained at less than 2.6 log copies/mL, the accumulated incidence of LAM resistance reached 65% in patients treated with LAM for a long period (3 to ~10 years).<sup>11</sup> LAM resistance is caused by amino acid substitution(s) at rtM204V/I within the reverse transcriptase domain of the HBV polymerase gene.<sup>12–14</sup> The emergence of a LAM-resistant strain leads to virological breakthrough (VBT) and breakthrough hepatitis (BTH).

Recently, ETV has been demonstrated to exert antiviral efficacy in both NA-naïve and LAM-resistant CHB patients.<sup>15–17</sup> The frequency of ETV resistance has been reported to be 1.2% after 5 years of treatment in NA-naïve CHB patients.<sup>18,19</sup> On the other hand, in switching treatment to ETV for LAM-resistant CHB patients, the cumulative probability of ETV resistance increases.<sup>17,20</sup> After 5 years of treatment, 51% of LAM-refractory patients treated with ETV showed genotypic ETV resistance.<sup>21</sup>

The 2007–2008 guidelines of the study group (Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan) for patients on LAM therapy are summarized in Table 1.<sup>22</sup> Regardless of duration of LAM administration, in cases where HBV DNA is more than 2.6 log copies/mL with BTH, ADV add-on treatment was recommended. In patients treated with LAM for less than 3 years who maintained HBV

DNA of less than 2.6 log copies/mL or HBV DNA of 2.6 log copies/mL or more without BTH, switching to ETV was recommended. On the other hand, in patients treated with LAM for more than 3 years who maintained HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL or HBV DNA of 2.6 log copies/mL or more without BTH, LAM-continuous treatment was recommended because in these patients LAM resistance might exist, and switching treatment to ETV might cause ETV resistance. However, there is insufficient evidence on whether switching treatment to ETV- or LAM-continuous treatment is better for CHB patients treated with LAM for more than 3 years with HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL.

In the present study, we performed a randomized controlled trial of LAM-to-ETV switching treatment in CHB patients treated with LAM for more than 3 years who maintained HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL.

## METHODS

### Patients

A TOTAL OF 27 CHB patients (mean age  $55 \pm 9$  years, 17 men) from 11 institutions all over Japan (Hokkaido University Hospital, Tohoku University Hospital, Akita City Hospital, Kuramitsu Clinic, Juntendo University Hospital, Chukyo Hospital, Nagoya City University Hospital, Okayama University Hospital, Kawasaki Medical University Hospital, Ehime University Hospital, Shin-Kokura Hospital) were enrolled from April 2008. All the patients were followed at least 6 months after they were diagnosed with CHB. Their characteristics are shown in Table 2. They were treated with LAM (100 mg/day) for more than 3 years (median 50 months, range 36–106 months). Before starting LAM administration, all patients were positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) in serum, abnormal for ALT, detectable for HBV DNA, and were not

**Table 1** 2007–2008 guidelines of the study group (Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan) for patients on lamivudine treatment

Duration of lamivudine treatment	HBV DNA	<3 years	≥3 years
<2.6 log copies/mL, persistently		May be switched to ETV 0.5 mg/day	LAM 100 mg/day
≥2.6 log copies/mL	No BTH†	May be switched to ETV 0.5 mg/day	LAM 100 mg/day
	With BTH	Add on ADV 10 mg/day	Add on ADV 10 mg/day

†After checking for absence of LAM resistance.

ADV, adefovir; BTH, breakthrough hepatitis; ETV, entecavir; HBV, hepatitis B virus; LAM, lamivudine.

**Table 2** Characteristics of LAM continuous group and ETV switch group at baseline

	LAM (n = 15)	ETV (n = 11)	P-value
Male	10	6	NS
Age	53 ± 7	57 ± 7	NS
Duration of LAM administration (month)	59 ± 23	55 ± 18	NS
ALT (IU/L)	33 ± 29	28 ± 22	NS
HbeAg positive	1	1	NS

ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; HBeAg, hepatitis B e-antigen; LAM, lamivudine; NS, not significant.

infected with hepatitis C virus and HIV. Patients diagnosed with alcoholism, primary biliary cirrhosis or autoimmune hepatitis were excluded.

### Study design

The overview of this study design is shown in Figure 1. Twenty-seven patients treated with LAM for more than 3 years were enrolled, who showed HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL at entry. They were randomly divided into two groups by each institution, the LAM-continued group (LAM group) or switching to the ETV group (ETV group). The primary end-points were the incidences of VBT and BTH in each group. VBT was defined as having more than 1 log copies/mL increase of

HBV DNA level from the nadir on at least two occasions after initial virological response. BTH was defined as showing abnormal ALT level due to LAM or ETV resistance. All subjects were monitored at least every 3-month intervals. At every visit, routine examination with biochemical (ALT, bilirubin, albumin) and virological (HBV DNA level, hepatitis B e-antigen [HBeAg], anti-HBe) assessments took place. The mean follow-up period was 24 ± 3 months.

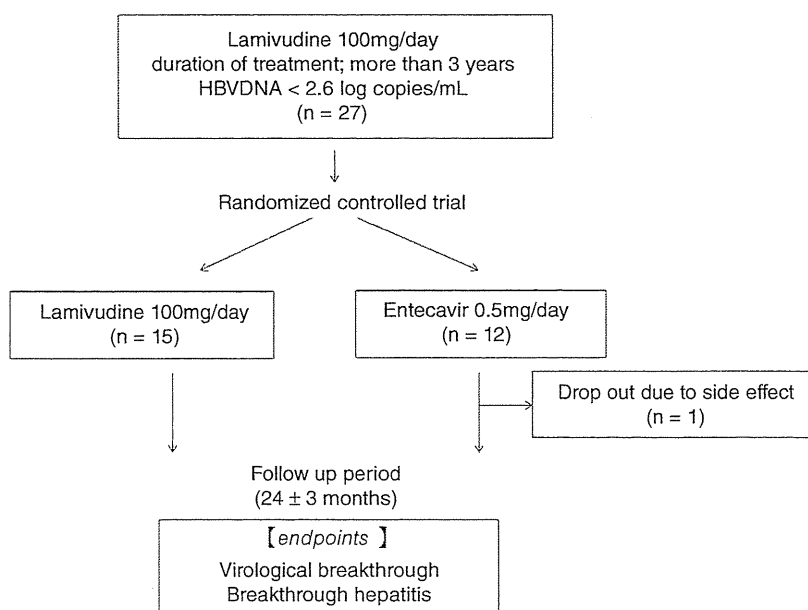
This study was registered in the University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry (UMIN-CTR) on 4 April 2008 as "A randomized trial of lamivudine continuous therapy and entecavir switching therapy for chronic hepatitis B patients treated with lamivudine monotherapy" (no. UMIN000001120).

The study protocol conformed to the Declaration of Helsinki, and was approved by the Committee for Ethics of Medical Experiments on Human Subjects of all the institutions, and written informed consent was obtained from every participant.

### Serological and virological markers of HBV

Hepatitis B surface antigen, antibody against HBsAg (anti-HBs), HBeAg and antibody against HBeAg (anti-HBe) were determined using commercially available enzyme immunoassays. HBV DNA was determined by an Amplicor HBV Monitor (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA; detection limit 2.6 log copies/mL)

**Figure 1** Overview of this study design. Twenty-seven patients treated with lamivudine for more than 3 years whose hepatitis B virus (HBV) DNA was maintained at <2.6 log copies/mL were enrolled. They were randomly divided into two groups by each institution, lamivudine-continued group or switching to entecavir group. We examined the incidence of virological breakthrough and breakthrough hepatitis in each group.



or COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test (Roche Molecular Systems; detection limit 2.1 log copies/mL). Positive results (signals) below the quantitative HBV DNA concentrations are referred to as “detected” and negative signals are “not detected” when registered by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test. The presence of LAM-resistant rtM204V/I and rtL180M substitutions was analyzed by direct sequencing of the HBV DNA polymerase reverse transcriptase site.

### Retrospective analysis

Using a conserved serum sample, we examined the existence of LAM-resistant rtM204V/I or rtL180M at baseline in patients with VBT. We also measured HBV DNA by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test, and we evaluated the subsequent occurrence of VBT according to the DNA level (not detected/detected/2.1 to <2.6 log copies/mL).

### Statistical analysis

Categorical variables were compared between groups by the  $\chi^2$ -test or Fisher’s exact test, and non-categorical variables by Mann–Whitney’s *U*-test. The cumulated VBT rate was compared between each group using a log-rank test with Kaplan–Meier analysis. All data were analyzed using SPSS ver. 15.0J software.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

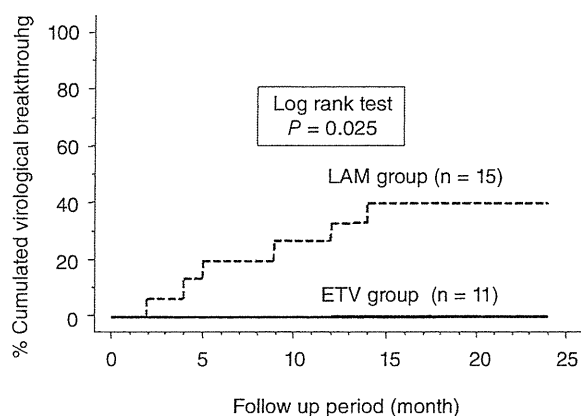
## RESULTS

### Baseline characteristics of the patients

BASED ON THIS randomized controlled trial, 12 patients were placed in an ETV group and 15 in a LAM group. One patient in the ETV group dropped out because of skin rash by ETV. The baseline characteristics of the patients are described in Table 2. At the entry, one patient was positive for HBeAg in each group. There was no difference in sex, age, duration of LAM administration and ALT level between the two groups.

### Incidence of VBT and BTH

There was no BTH in any of the patients. The incidence of VBT was six patients out of 15 (40%) in the LAM group, and no patient in the ETV group ( $P = 0.02$ ). The Kaplan–Meier curve for the proportion of cumulated VBT is shown in Figure 2. The differences in the rates of VBT were significant between the LAM and ETV groups (log-rank test  $P = 0.025$ ).



**Figure 2** Proportion of cumulated virological breakthrough in lamivudine (LAM) and entecavir (ETV) group. The cumulated rate of virological breakthrough was higher in patients treated with LAM than those with ETV (40% vs 0%,  $P = 0.025$  by log-rank test).

### Characteristics of patients with VBT in LAM group

Details of the six VBT cases in the LAM group are described in Table 3. Assessment of LAM-resistant mutations at the time of VBT showed that both rtM204V and rtL180M were observed in all cases. For five of the six cases, HBV DNA was detected by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test at baseline, although the HBV DNA level was very low. With respect to LAM-resistant mutation at baseline, rtM204V and rtL180M were observed in one of six cases. In contrast, no LAM-resistant mutations were observed in 20 non-VBT cases at baseline.

### Incidence of VBT based on the HBV DNA level by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test

Incidence of VBT based on the HBV DNA level according to COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test at baseline is shown in Figure 3. HBV DNA levels were less than 2.6 log copies/mL by Amplicor HBV Monitor in all cases. However, HBV DNA levels in the LAM group were “not detected” in five cases, “detected” in eight cases and 2.1 log copies/mL or more in two cases by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test. VBT was observed in five of the 10 cases whose results were either “detected” or 2.1 log copies/mL or more and in one of the five “not detected” cases. On the other hand, although HBV DNA levels in the ETV group were



Table 3 Characteristics of patients with virological breakthrough in LAM group

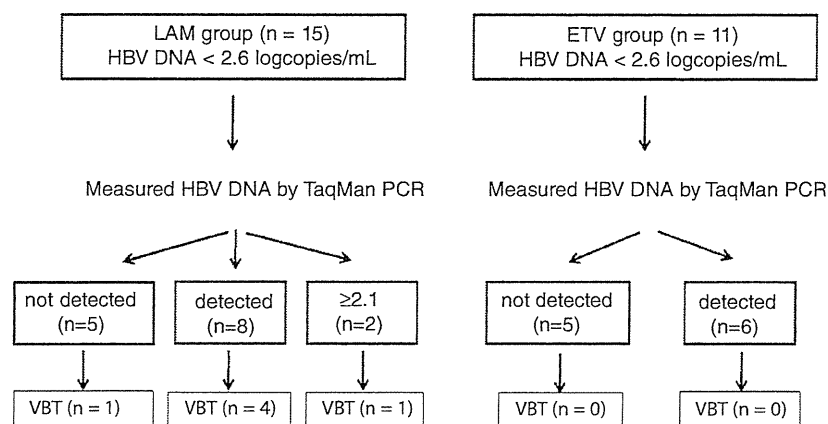
Age	Sex	Duration of LAM administration (month)	At baseline			At virological breakthrough		
			HBeAg	HBV DNA by TaqMan HBV (log copies/mL)	Mutant of LAM resistance	Period of VBT (months)	HBV DNA (log copies/mL)	Mutant of LAM resistance
49	M	37	Negative	Detected	None	14	4.9	L180M/M204V
54	F	106	Negative	Detected	None	5	2.8	L180M/M204V
63	F	81	Negative	Not detected	None	9	4.5	L180M/M204V
57	F	43	Negative	Detected	None	10	3	L180M/M204V
55	M	84	Negative	Detected	None	12	2.8	L180M/M204V
57	M	36	Negative	2.3	L180M/M204V	2	4	L180M/M204V

ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; HBeAg, hepatitis B e-antigen; HBV, hepatitis B virus; LAM, lamivudine; VBT, virological breakthrough.

“detected” in six cases by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test, there was no incidence of VBT: HBV DNA levels of five patients were undetectable and that of one patient was “detected” at the last follow-up point after switching to ETV.

### DISCUSSION

AT PRESENT, LAM, ADV and ETV are only approved for treatment of CHB patients in Japan. ETV has become the first-line treatment for NA-naïve patients, because the ETV resistance is much less frequent than LAM-resistance.<sup>8,23,24</sup> On the other hand, in switching treatment to ETV for LAM-resistant CHB patients, the frequency of ETV resistance was increased.<sup>17,20,25–27</sup> It has also been reported that ADV add-on treatment suppressed HBV replication more effectively than ETV or ADV monotherapy in patients with LAM-resistant CHB.<sup>25,28</sup> Therefore, it is desirable to examine LAM-resistant mutants before switching to ETV in patients treated with LAM. However, as the assay for the LAM-resistant mutants is not covered by the Japanese health insurance system at present, the Japanese guidelines for CHB management after LAM therapy were based on HBV DNA, duration of LAM administration and incidence of BTH (Table 1).<sup>22</sup> In patients treated with LAM for more than 3 years, maintaining HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL or more without BTH, LAM-continuous treatment was recommended because in these patients, LAM-resistance might exist, and switching treatment to ETV might cause ETV-resistance. It was reported that although LAM-resistant strains were detected in 34% cases treated with LAM for more than 3 years and whose HBV DNA level was suppressed to less than 2.6 log copies/mL, switching to ETV maintained undetectable HBV DNA level over 2 years.<sup>29</sup> In addition, Kurashige *et al.* reported that LAM-to-ETV switching treatment maintained an undetectable HBV DNA level in patients with baseline HBV DNA of less than 2.6 and 2.6 to less than 4.0 log copies/mL for a period of ETV treatment ranging 10–23 (median 20) months.<sup>30</sup> In the present study, randomized controlled trial evidenced that switching treatment to ETV or LAM-continuous treatment would be recommended in CHB patients treated with LAM for more than 3 years and maintained HBV DNA of less than 2.6 log copies/mL. Interestingly, even though HBV DNA had been suppressed to less than 2.6 log copies/mL, a high rate of VBT was observed in the LAM group, whereas no VBT over 24 months was observed in the ETV group. Of the six patients with VBT,



**Figure 3** Incidence of virological breakthrough (VBT) based on the hepatitis B virus (HBV) DNA level at baseline by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test (TaqMan PCR). The subsequent occurrence of VBT according to the DNA level by TaqMan PCR (not detected/detected/2.1 to <2.6 log copies/mL) was evaluated. In the lamivudine (LAM) group, VBT was observed in five of the 10 cases in which the results were either “detected” or  $\geq 2.1$  log copies/mL and in one of the five “not detected” cases. On the other hand, HBV DNA levels in the entecavir (ETV) group were “detected” in six, but there was no incidence of VBT.

five had no LAM resistance at baseline. However, the LAM resistance of rtM204V and rtL180M were found in all the patients with VBT in the LAM group. Moreover, a retrospective assessment by COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV test showed that HBV DNA was detectable in 10 patients in the LAM group and six patients in the ETV group. Only five of the 10 patients in the LAM group had VBT, but none in the ETV group. In addition, one patient had VBT in the LAM group even though DNA was not detected by the TaqMan test, suggesting that switching to ETV was preferable. Hence, our data supported the 2010 Japanese guidelines which recommend switching to ETV in patients whose HBV DNA levels are less than 2.1 log copies/mL by TaqMan PCR.

A potential limitation of the present study is that the number of the cases was small. Nevertheless, our randomized controlled trial indicated significant difference in the incidence of VBT between the LAM and ETV groups. Therefore, this study is valuable for the purpose of verifying the 2007–2008 guidelines in Japan. In the present study, although no LAM-resistant mutant was observed in the ETV group at baseline, a very low level of LAM-resistant mutants may derive ETV resistance for long-term therapy. The results of switching to ETV in the present study were favorable during the 24-month observation period, but we have to be careful of possible emergence of ETV-resistant mutants in long-term follow up.

In conclusion, in patients treated with LAM for more than 3 years maintaining HBV DNA of less than 2.6 log

copies/mL, switching treatment to ETV is recommended in at least a 2-year follow-up period.

## ACKNOWLEDGMENTS

WE WOULD LIKE to thank Yoshiyuki Ueno (Tohoku University), Takafumi Ichida (Juntendo University), Dr Moriichi Onji (Ehime University), Dr Kazuhide Yamamoto (Okayama University) and Dr Masaaki Korenaga (Kawasaki Medical School) for their advice throughout the study. The study was supported in part by a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

## REFERENCES

- Liaw YF, Sung JJ, Chow WC *et al.* Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521–31.
- Liaw YF. Hepatitis B virus replication and liver disease progression: the impact of antiviral therapy. *Antivir Ther* 2006; 11: 669–79.
- Di Marco V, Marzano A, Lampertico P *et al.* Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine. *Hepatology* 2004; 40: 883–91.
- Papatheodoridis GV, Dimou E, Dimakopoulos K *et al.* Outcome of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analog therapy starting with lamivudine. *Hepatology* 2005; 42: 121–9.

- 5 Lai CL, Chien RN, Leung NW *et al.* A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61–8.
- 6 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL *et al.* Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 21 (341): 1256–63.
- 7 Lai CL, Dienstag J, Schiff E *et al.* Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687–96.
- 8 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 661–2.
- 9 Lok AS, Lai CL, Leung N *et al.* Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714–22.
- 10 Chang TT, Lai CL, Chien RN *et al.* Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1276–82.
- 11 Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N *et al.* Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatol Res* 2010; 40: 125–34.
- 12 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW *et al.* Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670–7.
- 13 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567–72.
- 14 Westland CE, Yang H, Delaney W *et al.* Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients. *J Viral Hepat* 2005; 12: 67–73.
- 15 Chang TT, Gish RG, de Man R *et al.* A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001–10.
- 16 Lai CL, Shouval D, Lok AS *et al.* Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1011–20.
- 17 Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J *et al.* Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2006; 130: 2039–49.
- 18 Colonna RJ, Rose R, Baldick CJ *et al.* Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 1656–65.
- 19 Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ *et al.* Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 2009; 49: 1503–14.
- 20 Sherman M, Yurdaydin C, Simsek H *et al.* Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through 96 weeks. *Hepatology* 2008; 48: 99–108.
- 21 Tenney DJ, Pokornowski K, Rose RE *et al.* Entecavir at five years shows long-term maintenance of high genetic barrier to hepatitis B virus resistance. *Hepatol Int* 2008; 2: S302–3.
- 22 Kumada H, Okanou 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. *Hepatol Res* 2010; 40: 1–7.
- 23 Liaw YF, Leung N, Kao JH *et al.* Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008; 2: 263–83.
- 24 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227–42.
- 25 Reijnders JG, Deterding K, Petersen J *et al.* Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues. *J Hepatol* 2010; 52: 493–500.
- 26 Suzuki Y, Suzuki F, Kawamura Y *et al.* Efficacy of entecavir treatment for lamivudine-resistant hepatitis B over 3 years: histological improvement or entecavir resistance? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 429–35.
- 27 Mukaide M, Tanaka Y, Shin IT *et al.* Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 882–9.
- 28 Kim HJ, Park JH, Park DI *et al.* Rescue therapy for lamivudine-resistant chronic hepatitis B: comparison between entecavir 1.0 mg monotherapy, adefovir monotherapy and adefovir add-on lamivudine combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1374–80.
- 29 Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y *et al.* Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 892–8.
- 30 Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N *et al.* Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol* 2009; 44: 864–70.

<速 報>

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

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

緒言：HB コア関連抗原 (HBcrAg) は肝細胞内の cccDNA 量と相関することが知られ、核酸アナログ製剤 (NA) の中止基準設定等に有用である可能性が報告されている<sup>1)2)</sup>。また近年、NA 内服時の肝細胞癌発症あるいは再発予測における有用性も報告されている<sup>3)4)</sup>。今回、初回発症予測因子としての HBcrAg の有用性を検討した。

対象と方法：当科に通院中の HBs 抗原陽性者のうち 3 年以上の経過観察後に発症した症例を HCC 群 (HCC) (n=50, 平均観察期間 5.3 年) とし、3 年以上の経過観察を行い発症しなかった症例のうち、年齢・性別を HCC 群にマッチさせて抽出した症例を非 HCC 群 (non-HCC) (n=100, 平均観察期間 7.7 年) とした。この 2 群を NA 内服、非内服例にわけて肝細胞癌初発に寄与する因子について単変量解析で  $P < 0.05$  であった項目に関してロジスティック回帰を用いた多変量解析で検討した。HBcrAg は NA 内服・非内服例ともに全体の中央値であった  $3.8 \log U/ml$  (CLEIA 法)、HBV-DNA は両者全体の中央値近傍である  $5 LC/ml$  (real-time PCR 法) をカットオフ値として検討した。

成績：NA 非内服例 (HCC : n=39, non-HCC : n=67) の検討では多変量解析で HBV-DNA  $5 LC/ml$  以上、HBcrAg 量  $3.8 \log U/ml$  以上が発症寄与因子として抽出された。NA 内服例 (HCC : n=11, non-HCC : n=33) の検討では多変量解析で HBcrAg 量  $3.8 \log U/ml$  以上のみが発症寄与因子として抽出された (Table)。また、NA 非内服例では HBV-DNA 量と HBcrAg 量は相関するが ( $r = 0.7169, P < 0.01$ )、HBV-DNA 低値例で乖離を認める症例も存在し、HBV-DNA 量  $5 LC/ml$  未満の場合、NA 非内服例の HCC 群で HBcrAg 量  $4 \log U/ml$  以上の症例が 66.7% (6/9 例) であるのに対し、非 HCC

群は 1.9% (1/54) であった ( $P < 0.01$ )。

考察：HBcrAg 量の測定は既報の如く<sup>3)NA</sup> 内服例の肝発症予測に有用であり、さらに今回の検討から NA 非内服例における有用性も示唆された。特に HBV-DNA 量低値例における肝細胞癌のサーベイランスに補完的な役割が期待されるものと考えられた。

索引用語：HB コア関連抗原、肝細胞癌、サーベイランス

文献：1) Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. J Med Virol 2009; 81: 27—33 2) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, et al. Hepatol res 2007; 37: 661—666 3) 辻 邦彦, 西森博幸, 松居剛史, 他. 肝臓 2009; 50 : 166—167 4) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Liver Int 2010; 30: 1461—1470

北海道大学医学部医学研究科消化器内科

\*Corresponding author: mnaka@med.hokudai.ac.jp

<受付日2011年4月11日><採択日2011年5月1日>

**Table** Logistic regression analysis of significant predictive factors for incidence of HCC associate with HBV with or without nucleotide analogue administration from univariate and multivariate analysis

	HCC Median (range)	non-HCC Median (range)	Category	Univariate analysis P
NA (-) n=106	n=39	n=67		
Age (years)	56 (32-72)	55 (30-83)	≥55/55<	0.844
Sex (M : F)	26 : 13	44 : 23	M/F	0.972
ALT (IU/ml)	27 (13-79)	23 (8-75)	≥31/31<	0.914
Serum bilirubin (mg/dl) *	1.1 (0.4-3.7)	0.8 (0.4-3.5)	≥1.5/1.5<	0.050
Serum Albumin (g/dl) *	3.8 (2.4-5.2)	4.2 (2.9-5.1)	<3.5/≥3.5	0.042
Prothrombin time (%) *	84 (57-119)	94 (75-120)	<80/≥80	0.018
Platelet counts (×10 <sup>4</sup> /μl) *	10.6 (4.9-30.1)	18.6 (3.7-28.5)	<10 <sup>5</sup> /≥10 <sup>5</sup>	0.001
HBe antigen (+ : -)	12 : 27	2 : 65	+ / -	<0.0001
HBs antigen (S/N) *	781 (4-3650)	219 (2-30281)	≥500/500<	0.012
HBV-DNA (LC/ml)	6.1 (<2.1-8.2)	4.4 (<2.1-7.3)	≥4/<4	0.078
			≥5/<5	<0.0001
HBcrAg (log U/ml) *	5.9 (<3.0-6.8≥)	3.7 (<3.0-6.3)	≥3.8/3.8<	<0.0001
Mutation of PC* (+ : -)	20 : 5	44 : 12	+ / -	0.884
Mutation of BCP* (+ : -)	22 : 3	36 : 19	+ / -	0.049
				Multivariate analysis
				Odds ratio (95%CI) P
HBV-DNA (LC/ml)			≥5/<5	4.746 (1.089-10.038) 0.035
HBcrAg (log U/ml) *			≥3.8/3.8<	6.133 (2.171-17.330) 0.001
	HCC Median (range)	non-HCC Median (range)	Category	Univariate analysis P
NA (+) n=44	n=11	n=33		
Age	55 (41-71)	52 (31-79)	≥55/55<	0.301
Sex (M : F)	8 : 3	22 : 11	M/F	0.709
ALT (IU/ml)	27 (11-79)	27 (14-79)	≥31/31<	0.472
Serum bilirubin (mg/dl)	1.0 (0.5-2.3)	0.9 (0.5-2.6)	≥1.5/1.5<	0.049
Serum Albumin (g/dl)	4.0 (3.0-4.9)	4.2 (3.0-4.9)	<3.5/≥3.5	0.426
Prothrombin time (%) *	84 (61-114)	96 (80-115)	<80/≥80	0.500
Platelet counts (×10 <sup>4</sup> /μl)	9.8 (5.9-21.0)	16.5 (6.5-28.7)	<10 <sup>5</sup> /≥10 <sup>5</sup>	<0.005
HBe antigen (+ : -)	5 : 6	7 : 26	+ / -	0.127
HBs antigen (S/N) *	655 (10-16500)	461 (3-34318)	≥500/500<	0.111
HBV-DNA (LC/ml)	<2.1 (<2.1-8.7)	<2.1 (<2.1-8.8)	≥4/<4	0.616
			≥5/<5	0.426
HBcrAg (log U/ml) *	5.7 (<3.0- ≥6.8)	3.3 (<3.0- ≥6.8)	≥3.8/3.8<	<0.005
Mutation of PC* (+ : -)	5 : 4	16 : 14		0.841
Mutation of BCP* (+ : -)	5 : 1	23 : 5		0.976
				Multivariate analysis
				Odds ratio (95%CI) P
HBcrAg (log U/ml) *			≥3.8/3.8<	5.895 (1.013-34.299) 0.048

*Abbreviation:* NA, nucleotide analogue; ALT, alaine aminotransferase; PC, precore regions; BCP, basal core promoter; HBcrAg, hepatitis B virus core-related antigen

\*Data not available for all cases

## 英文要旨

The role of hepatitis B virus core-related antigen  
for predicting the incidence of HCC

Mitsuru Nakanishi\*, Makoto Chuma, Shuhei Hige,  
Tomoe Kobayashi, Masato Nakai,  
Takuya Shou, Masahiro Asaka

The usefulness of HB core-related antigen (HBcrAg) for the surveillance of hepatocellular carcinoma (HCC) has not been fully elucidated. We analyzed factors associated with the occurrence of HCC. High HBcrAg level for patients with nucleotide analogue (NA) administration, and high HBV-DNA level and high HBcrAg level for those without NA were revealed to be the significant factors for HCC occurrence by multivariate analysis. These data suggested that HBcrAg is the predictive factor for HCC occurrence regardless of NA administration. In conclusion, HBcrAg is a useful marker for the HCC surveillance.

**Key words:** hepatitis B virus core-related antigen,  
hepatocellular carcinoma, surveillance

\_\_\_\_\_ *Kanzo* 2011; 52: 387—389

Department of Gastroenterology and Hematology,  
Hokkaido University Graduate School of Medicine

\*Corresponding author: mnaka@med.hokudai.ac.jp

### III. B 型肝炎

#### B 型慢性肝炎に対する治療学の進歩

## B 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法

Interferon therapy for chronic hepatitis B

髭 修平 庄 拓也 中西 満 中馬 誠

**Key Words** : B 型慢性肝炎, インターフェロン, ペグ・インターフェロン, HB コア関連抗原

III

B  
型  
肝  
炎

#### はじめに

B 型肝炎に対する抗ウイルス治療薬は、インターフェロン (IFN) と核酸アナログ製剤に大別され、IFN の導入から 20 年以上が経過した。当初は治療期間が短く、効果は限定的であったが、その後 24 週間投与が可能となり、有効性の向上がみられている。一方、2000 年以降、核酸アナログ (NA) 製剤が登場し、副作用の少ない長期治療を広範な病態に対して施行可能となったが、両製剤の治療効果や薬剤反応性の比較から、IFN の作用機序や有用性がクローズアップされてきている。

本稿では、当科の成績を含めて IFN 治療について概説する。

#### 1. IFN の作用機序

IFN は、B 型肝炎や C 型肝炎の治療に使用されている IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$  などを含む I 型 IFN のほか、II 型 (IFN $\gamma$ )、III 型 (IFN $\lambda$ ) に大別される。IFN には様々な作用が知られているが、代表的な細胞内シグナルは JAK-STAT 系を介した経路で作用を発現する。細胞内で IFN-stimulated response element (ISRE) を介し、protein kinase R (PKR)、2'5'-oligoadenylate synthetase (OAS)、Mx、IFN-stimulated gene (ISG) 15 などの発現を増強させ、抗ウイルス効果を高める。

また、アポトーシスに關与する procaspase の誘導、細胞内 microRNA (miRNA) の誘導、細胞分裂 G1/S 移行期での増殖抑制など、多様な作用を示す<sup>1)</sup>。

もう一つの IFN 作用は、免疫調節作用である。細胞内では、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子発現や抗原提示能を誘導する。更に、樹状細胞成熟、NK 細胞活性化、CD8<sup>+</sup>T 細胞、IL-15 合成などを介して、種々の免疫学的作用を発現する。

もう一方の抗 HBV 薬である NA 製剤の主な作用は、逆転写酵素阻害によるウイルスの増幅抑制であり、上述の IFN の作用機序と大きく異なることを理解して治療計画を立てることが必要となる。

#### 2. B 型肝炎に対する IFN 治療法の変遷

我が国では、1986 年に IFN $\beta$  が、1988 年に IFN $\alpha$  が、HBe 抗原陽性慢性活動性肝炎に対する治療薬として承認された。投与期間は、当初、4 週間が目安とされていたが、2002 年からは 24 週間投与が可能となった。また、IFN $\alpha$  については、2008 年から自己注射も可能となっている。

現在、我が国の B 型肝炎治療については、厚

Shuhei Hige, Takuya Sho, Mitsuru Nakanishi, Makoto Chuma: Department of Internal Medicine, Gastroenterology Section, Hokkaido University Graduate School of Medicine 北海道大学大学院医学研究科 消化器内科学

0047-1852/11/¥60/頁/JCOPY

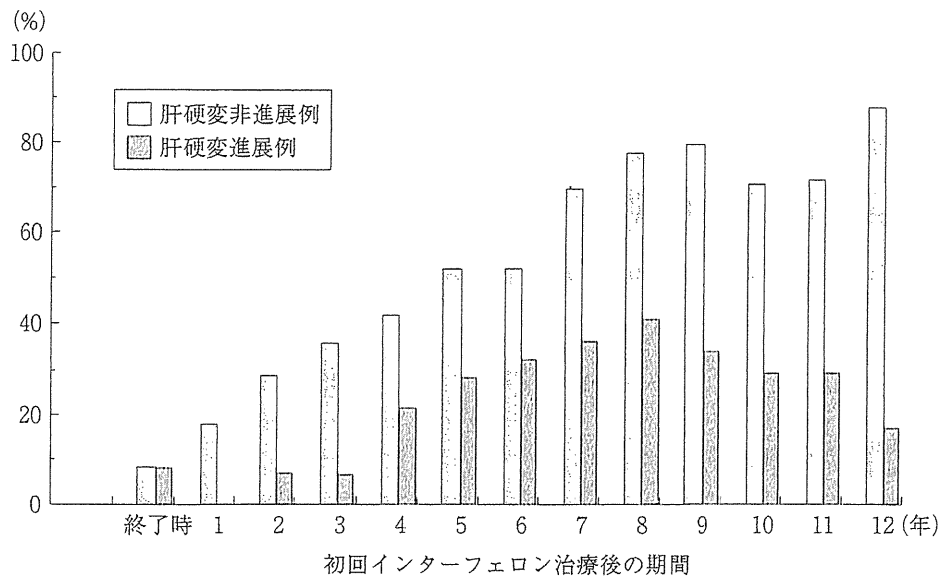


図1 IFN治療後のSCと肝硬変への進展

生労働省の‘肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究’班によるガイドラインが策定され、毎年、更新されている<sup>2)</sup>。その中でのIFN製剤は、35歳未満のHBe抗原陽性症例、35歳以上でHBV DNA量が7log copies/mL未満の症例などでの選択が考慮されている。ガイドライン上は、HBe抗体陽性例への投与や48週間投与などの選択肢も記載されているが、現行の保険適用とは異なる点に注意を要する。

C型肝炎では世界の標準薬であるペグ・インターフェロン(PEG-IFN)は、2005年にB型肝炎に対する治療薬として米国、EUなどで承認され、現在は90カ国以上に普及している。我が国では、現在、PEG-IFN $\alpha$ -2aについて治験中である。

### 3. 4週間投与によるIFN治療成績と長期予後

当科で1998年までにIFN治療を行ったHBe抗原陽性159例(計302回、主に4週間投与)について、結果を示す<sup>3)</sup>。HBe抗原陰性化かつHBe抗体陽転を示すseroconversion(SC)達成を指標とすると、IFN初回治療後、SC持続が30例(18.9%)、SC後再燃が25例(15.7%)であった。複数回治療後にSCが持続する例は、2回

目治療で76例中9例(11.8%)、3回目治療で38例中3例(7.9%)に認めた。

対象症例の初回IFN治療後の年次別SC率を図1に示す。IFN治療後に肝硬変へ進行する症例は、非進行例と比べて長期的にSC率は低率であった。IFN治療10年後の肝硬変への累積進展率を、SCの有無別にKaplan-Meier法で示すと、SC群17.0%、非SC群44.0%、10年後の累積発癌率では、SC群で8.0%、非SC群で14.4%であった。SCの有無、SCの時期、再燃の有無により検討すると、SCまでの時期が遅めであっても、その後に再燃を認めない症例で予後は良好であった。このように、HBe抗原陽性症例の持続的SCの維持は、長期予後にとっても重要である。

### 4. IFN長期投与(24週間)と核酸アナログ製剤の併用

著者らは、HBe抗原陽性慢性肝炎に対して、IFN $\beta$ とNA製剤の併用治療を行っており、その治療成績から、IFN投与の意義を検討した。投与法は、IFN $\beta$ 1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(ラミブジン(LAM)またはエンテカビル(ETV))は、16週間の連日内服後に終了とした。対象は合計50例で、同時期に核



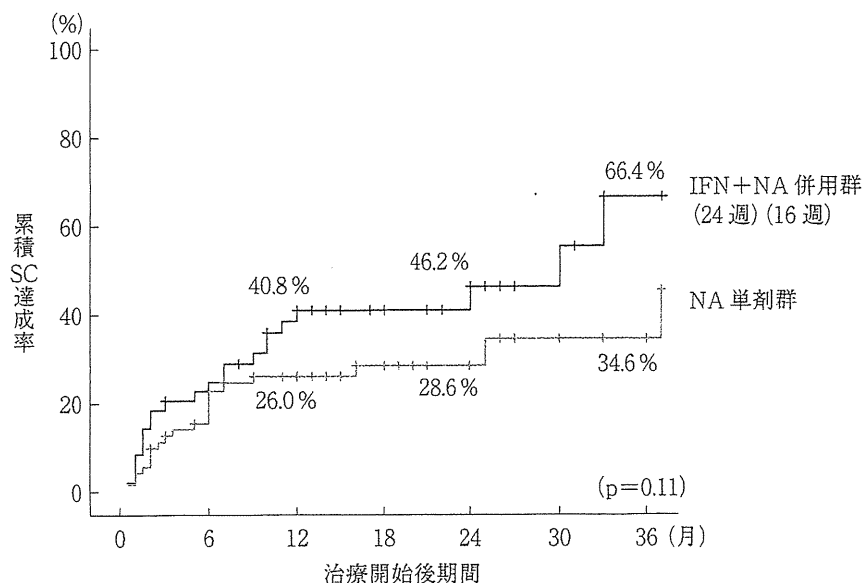


図2 IFN/NA 併用群と NA 単剤投与群の累積 SC 達成率

酸アナログ製剤を単独投与した HBe 抗原陽性例 75 例を対照として SC 率を比較した。Kaplan-Meier 法による累積 SC 達成率は、12 カ月後、24 カ月後、36 カ月後の SC 達成率は、NA 単剤群が 26.0%、28.6%、34.6% であるのに対して、併用群では 40.8%、46.2%、66.4% と高率の傾向を示した(図 2)。併用群、NA 単剤群を合わせた HBe 抗原陽性に対する治療において、最終的に SC に寄与する因子は、多重ロジスティック解析の結果、年齢(30 歳未満)と治療開始時 ALT 値(100 IU/L 以上)が有意であった。

最近、HBV 関連の新しいマーカーとして HB コア関連抗原(HBcr 抗原)の測定が可能となった<sup>4)</sup>。これは、HBV の core, precore mRNA から転写・翻訳されるタンパク(HBc 抗原、HBe 抗原、p22cr)全体を測定するもので、肝組織内の閉環二本鎖 DNA(covalently closed circular DNA: cccDNA)と相関があると考えられている<sup>5)</sup>。

著者らの検討症例における治療経過中の HBV DNA および HBcr 抗原の減少量を、投与方法別に比較した(図 3)。HBV DNA 量は、両群ともに治療開始早期に減少したが、HBcr 抗原量については、NA 単剤群での減少が緩徐であり、併用群の減少度が大きい傾向を示した。こ

の検討においては、NA 単剤群に対する併用群の測定値の差が、IFN の単独作用の評価に反映する部分と考えられ、IFN 投与例では、HBV 増幅抑制のほかに、感染肝細胞の排除も増強されている可能性を示している。

## 5. PEG-IFN による海外の成績

海外では、B 型肝炎に対しても、PEG-IFN による長期投与が可能となり、NA 製剤、あるいは PEG-IFN と NA 製剤との併用の有効性について、比較的大規模な無作為比較試験(RCT)が報告されている。

HBe 抗原陽性例に対して、Lau ら<sup>6)</sup>は、LAM 単独、PEG-IFN $\alpha$ -2a 単独、両剤併用の 3 群による 48 週間治療の RCT を行った。また、Janssen ら<sup>7)</sup>は、PEG-IFN $\alpha$ -2b 単独群と LAM+PEG-IFN $\alpha$ -2b 併用群の 2 群で 52 週間治療の RCT を行った。前者は 85% 強が genotype B あるいは C 型のアジア人、後者は 70% 以上が genotype A あるいは D 型の白人で、対象集団は異なるが、示された結果は類似していた。すなわち、治療期間中の HBV DNA 量は、PEG-IFN 単独投与群に比べ LAM 使用(単独または併用)群で有意に減少するものの、終了後には LAM 使用(単独または併用)例での再上昇幅が大きく、結果

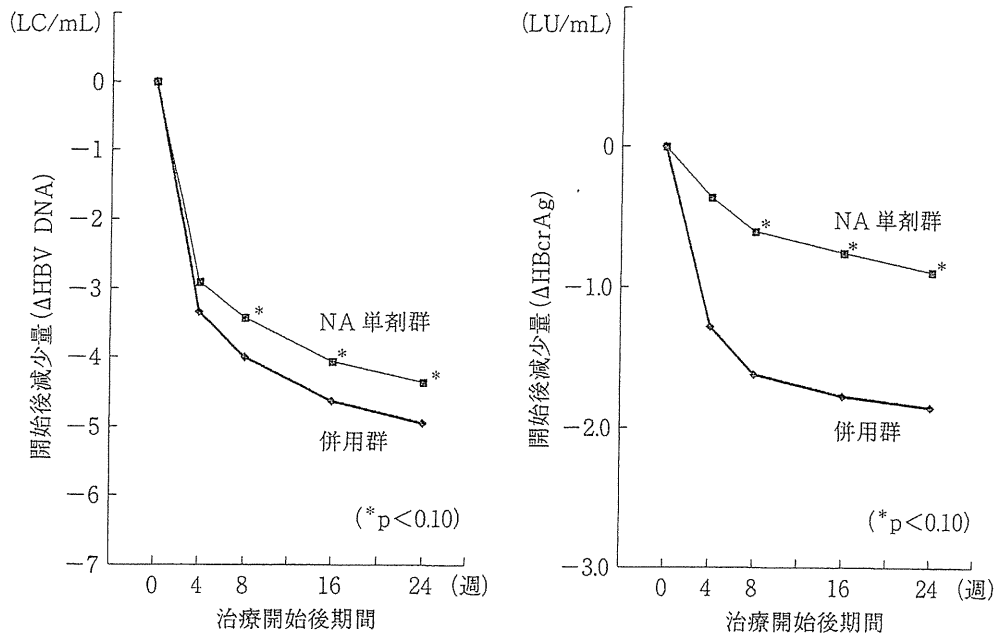


図3 治療開始後のHBV DNA量およびHBcr抗原量の減少量

的には、LAM併用の有無にかかわらず、PEG-IFN製剤使用例のHBV DNAレベルは治療終了後では同等で、かつ、LAM単独投与群のHBV DNAレベルよりも低く維持された。SC率も、LAM単独群よりもPEG-IFN製剤使用群の方が高率であった。

HBe抗原陰性症例を対象としたRCTにおいても、HBe抗原陽性例と同様のパターンが示され、PEG-IFN製剤使用例では、LAM単独投与に比べ治療終了後のHBV DNA低値維持においてより有効であった<sup>8,9)</sup>。

これらの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、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、長期的な有効性に強く作用していることが示唆された。

2000年にSchalmら<sup>10)</sup>により報告された、IFN $\alpha$ -2b(週3回、16週間)、LAM(52週間)、両者併用(8週間のLAM先行投与後、16週間併用)の3群によるHBe抗原陽性例に対するRCTでは、SC率は、それぞれ、19%、18%、29%と、併用群で高いSC率を示し、PEG-IFNによる前述のRCTとは異なる結果であった。この差は、

IFN製剤の違い以外に、投与期間が異なるため生じた可能性があり、IFN長期投与により、NA製剤併用の意義は薄れる可能性が考えられた。実際、最近のメタ解析は、PEG-IFNによる長期間(48-52週)投与群により検討が行われ、従来型のIFNは検討対象から除外されている<sup>11)</sup>。

## 6. IFN製剤の免疫賦活作用を考慮した治療方針

肝細胞内のHBV DNA量を減少させるには、NA製剤は、減少効果の強さ、副作用・患者負担の低さの両面で優れた薬剤である。特に、長期にHBV DNAを低レベルに抑制する必要がある病態(肝硬変、肝癌合併、HBe抗体陽性慢性肝炎)で高い有用性が示される。

しかし、感染肝細胞を排除するには、最終的には免疫学的機序が必要であり、免疫賦活作用を有するIFNの使用は合理的である。また、C型肝炎と異なりウイルスの完全排除が不可能なHBV感染においては、治療期間を限定し、drug freeで長期間の生活が可能状態を考慮することは重要である。

B型肝炎の自然経過において、肝炎活動期には免疫学的反応は強く、トランスアミナーゼも

上昇する。HBV 増殖抑制が主作用の NA 製剤においても、治療開始時の ALT 高値が高 SC 率と関連することは広く認識されているが<sup>12)</sup>、免疫調節作用を期待する IFN 製剤投与においては、治療開始のタイミングは更に重要な要素である。現在の我が国の治療ガイドラインでは、治療対象者を ALT 31 (IU/L) 以上としているが、SC を治療目標とした HBe 抗原陽性症例の場合には、治療効果が期待できる ALT 高値のタイミングを考慮することも必要である。

また、2010 年に我が国のガイドラインで補足された 'sequential 療法' とは、NA 投与で HBe 抗原が陰性化した症例 (または当初から陰性の症例) に対して、IFN を治療の最終 6 カ月間 (1 カ月のみ NA 製剤と併用) に投与して終了する

治療法とされており、免疫学的作用が作動しにくい環境での投与となっている。HBV DNA が既に低値安定化した段階での IFN 投与が、sequential 療法なしで終了した症例と比較して、どの程度の上乗せ効果が得られるかについて、今後の症例集積が望まれる。

### おわりに

IFN 製剤の有する免疫賦活作用は、NA 製剤には認められず、B 型肝炎治療には重要な作用である。IFN の作用機序、治療対象の病態、タイミングなどを考慮した治療により、期間限定的治療で drug free を目指せる可能性がある。我が国では、PEG-IFN 製剤の B 型肝炎への臨床応用が待たれる。



B  
型  
肝  
炎

### 文献

- 1) Randall RE, Goodbourn S: Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89: 1-47, 2008.
- 2) Kumada H, et al: Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol Res* 40: 1-7, 2010.
- 3) 髭 修平ほか: B 型慢性肝炎のインターフェロン治療例における長期予後. *臨床消化器内科* 14: 1405-1410, 1999.
- 4) 髭 修平ほか: 新しい B 型肝炎ウイルスのマーカー: HB コア関連抗原. *臨床消化器内科* 24: 609-614, 2009.
- 5) Suzuki F, et al: Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 81: 27-33, 2009.
- 6) Lau GK, et al: Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 352: 2682-2695, 2005.
- 7) Janssen HL, et al: Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 365: 123-129, 2005.
- 8) Marcellin P, et al: Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 351: 1206-1217, 2004.
- 9) Kaymakoglu S, et al: Pegylated interferon alfa-2b monotherapy and pegylated interferon alfa-2b plus lamivudine combination therapy for patients with hepatitis B virus e antigen-negative chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3020-3022, 2007.
- 10) Schalm SW, et al: Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 46: 562-568, 2000.
- 11) Woo G, et al: Tenofovir and entecavir are the most effective antiviral agents for chronic hepatitis B: a systematic review and Bayesian meta-analyses. *Gastroenterology* 139: 1218-1229, 2010.
- 12) Liaw YF, et al: Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 119: 172-180, 2000.

## 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