

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型肝炎からの肝発癌リスク因子の解析に関する研究

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長 消化器科部長

研究要旨; C型慢性肝炎や肝硬変から高率に肝発癌がみられるが、このリスク因子を解析し発癌防止につなげていくことが重要な課題である。当院でインターフェロン治療を行なった症例を長期経過観察し、肝発癌に関わるリスク因子を解析した。肝生検によって診断されたC型慢性肝炎と肝硬変2,168例を集計した。インターフェロン単独で治療を受けた例が758例、インターフェロンとリバビリン併用による24週間の治療が275例、ペグインターフェロン単独で治療されたのが307例、ペグインターフェロンとリバビリン併用治療を受けた例が828例である。ウイルス排除(sustained virological response; SVR)が得られたのが1,049例、得られなかったのが1,119例であり、0.51~19.0年(平均6.9年)経過観察を行なった。肝発癌はSVRから30例、非SVRから137例みられた。肝発癌に関与する因子について単変量解析を行ったところ、年齢が10歳きざみに高齢になること、肝生検の炎症活動性と線維化、ALT値が40 IU/L以上、血清AFP値が6.5 ng/mL以上であることが有意であり、HCVRNAは有意とはならなかった。ALTとAFPについて、肝発癌に関与する値のROC曲線で解析すると、ALT 40 IU/L以上とAFP 6.5 ng/mL以上が最も判別効率が高かった。インターフェロンを行ってALT値が40 IU/L未満に低下した例では、肝発癌率が低下していたが、正常値からインターフェロン治療後に40 IU/L以上に上昇した例では、もともと40 IU/L以上の例と同じ程度に肝発癌がみられた。また、AFP値がインターフェロン治療後に6.5 ng/mL未満に低下した場合には、肝発癌率が低かったが、インターフェロン後に6.5 ng/mL以上に上昇した場合には、肝発癌率が高かった。宿主遺伝子のIL28BのSNP別に、肝発癌率を解析すると、SVRが得られた例ではIL28Bがminor alleleであっても肝発癌率が低かったが、SVRが得られなかった場合には、major alleleの症例よりもminor alleleの方が肝発癌率が高かった。以上より、インターフェロン投与によってSVRが得られなかった場合には、ALTを40 IU/L未満とAFPを6.5 ng/mL未満に低下させることが、肝発癌防止につながると考えられた。

研究協力者

武蔵野赤十字病院消化器科

朝比奈靖浩部長、黒崎雅之部長

型肝炎に感染している場合に効果的な肝癌の予防策をたてるために、肝発癌リスクを明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

C型慢性肝炎や肝硬変では、高率に肝癌を発症し、肝癌で死亡する患者数が年間3万人に達する。肝癌になりやすいリスク因子を解析し、適切に対処法をたて、肝癌による死亡者数を減少させる対策が重要な課題となっている。最近、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の効果に宿主遺伝子のIL28Bの遺伝子多型(SNP)が重要であることが報告された。しかし、IL28BとSNPと肝発癌の関連については十分あきらかにされていない。また、抗ウイルス薬の開発がめざましく、難治例であってもウイルス排除が得られる率が向上している。そこで、C

B. 研究方法

1992年より当院でC型慢性肝炎や肝硬変で、肝生検を受け、インターフェロンを中心とした抗ウイルス療法を受け、経過観察が行えている2,168例を対象とした。インターフェロン単独で治療を受けた例が758例、インターフェロンとリバビリン併用による24週間の治療が275例、ペグインターフェロン単独で治療されたのが307例、ペグインターフェロンとリバビリン併用治療を受けた例が828例である。治療後にウイルス排除(Sustained virological response; SVR)が得られた例が、1,049例(48.3%)であり、

SVR が得られなかった 1,119 例(51.6%)であった。これらの症例を、0.51 年から 19.0 年、平均 6.9 年経過観察し、肝発癌に關与する因子を解析した。SVR の 1,049 例中 30 例(2.9%)に肝発癌がみられた。一方、非 SVR の 1,119 例のうち、肝発癌がみられたのは 137 例(12.2%)であった。この症例について、性、年齢、BMI、肝生検の活動性(activity; A1, A2, A3)と線維化(F1, F2, F3 F4)、治療前 ALT 値、 γ GTP 値、AFP 値、C 型肝炎ウイルス(HCV)遺伝子型、HCVRNA 量について、肝発癌リスクとして解析した。これらを単変量で Kaplan-Meier 法で表示し Logrank test で検討した。また、有意な因子を解析するため、Cox 比例ハザードモデルによって多変量解析を行った。さらに、経過中の因子が重要と考えられるため、インターフェロン終了後の血中 ALT 値、AFP 値と HCVRNA 量について解析した。経過中の肝発癌を予測する目的で、ALT 値と AFP 値について、ROC 曲線を解析し、最も発癌を予測する確率が高い数値を求めた。

IL28B の遺伝子多型を rs8099917 について解析し、TT の例を major allele, TG または GG を minor allele として肝発癌との関連を解析した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

C 型慢性肝炎の肝発癌リスク因子

C 型慢性肝炎と肝硬変の症例では、単変量解析で年齢が 10 歳きざみで上昇すること、肝生検による炎症の活動性が A3 であることと肝線維化が F3/F4 に進展していることが有意な因子であった。多変量解析を行うと年齢が高齢であることと、肝線維化が進展していることが有意な因子として抽出された。さらに、経過観察中の因子を加えると、血清 ALT 値が、40 IU/L 以上であることと、AFP 値が 10 ng / mL 以上であることが独立で有意な因子として抽出された。

経過中の ALT 値と AFP 値の肝発癌を予測するのに重要なカットオフ値を解析すると、ALT 値が 40 IU/L 以上と AFP 値が 6.5 ng/mL 以上が ROC 曲線で最も有意であり、それぞれ negative predictive value が 0.967 と 0.963 と判別効率がよいことが判明した。経過中 ALT 値が 40 IU/L が持続した症例が肝発癌が低く、40 IU/L 以上が持続した例が肝発癌が高率にみられた。しかし、インターフェロン治療によって ALT 値が 40 IU/L 以上から 40 IU/L 未満に低下すると、もともと 40 IU/L 未満であった例と同程度に肝発癌率が低下したのに対し、ALT 値が 40 IU/L 未満であったのにインターフェロン治療後に 40 IU/L 以上に上昇すると、40 IU/L が持続した症例と同程度に肝発癌が高率にみられた。また、血清 AFP 値が 6.5 ng/mL が持続した症例では、肝発癌が低かったのに対して、6.5 ng/mL 以上が持続していた場合に肝発癌率が高かった。一方、AFP 値が 6.5 ng/mL 未満であった例がインターフェロン治療後に 6.5 ng/mL 以上に上昇した場合には、AFP 値が 6.5 ng/mL 以上が持続した症例と同じくらいに肝発癌が高率にみられたが、6.5 mg/mL 以上から 6.5 ng/mL 未満に低下した場合に肝発癌率が低下していた。

C 型慢性肝炎例で IL 28B の SNP と肝発癌率の関連

IL28B の SNP を解析できた症例について、肝発癌率との関連を解析した。IL 28B が TT の major allele の 574 例と minor allele の 199 例について、経過中の肝発癌率を解析した。10 年間の観察で、minor allele の例が、major allele の例に比較して有意に肝発癌が高率に認められた。そこで、SVR が得られたか否かを分けて解析した。SVR 381 例の中で、minor allele が 53 例みられたが、この症例では 1 例も経過中に肝発癌はみられなかった。しかし、major allele の 338 例では 5 年間で 4.1%に発癌がみられた。また、非 SVR 例では、IL 28B が major allele 236 例の経過観察を行い、5 年間で 8.6%の発癌率であったが、minor allele の 146 例では 5 年間に 12.1%と高率に発癌が認められた。非 SVR 例では、IL 28B が minor allele の例で、major allele に比較して有意に肝発癌が高率にみられた。

D. 考察

C 型慢性肝炎と肝硬変では、SVR を得ることによって肝発癌率が低下することが認められている。今回の解析では、年齢が高齢になることと肝線維化が進展することが、肝発癌の有意な因子であり、従来の報告と合致する成績であった。さらに、経過中の因子を含めると、血中 ALT 値が 40 IU/L 以上になることと、AFP 値が 6.5 ng/mL 以上の場合に肝発癌が高いことが認められた。インターフェロン治療によって、ALT 値が 40 IU/L 未満になった場合や AFP 値が 6.5 ng/mL 未満になった場合には、肝発癌が低下していたが、逆に正常であった例でも上昇した症例では、もともと高値であった例と同じくらいの肝発癌率になっていた。したがって、ALT 値 40 IU/L と AFP 値 6.5 ng/mL が肝発癌の予測に重要であることが確認された。また、ALT 値と AFP 値を低下させることが、肝発癌を防止するために重要であると考えられる。

IL 28B の SNP と肝発癌の関連を解析したところ、全体では IL 28B が minor allele の例で肝癌が高率にみられた。しかし、minor allele の例では SVR 率が低いことが関与している可能性があるため、SVR と非 SVR 例に分けて肝発癌を解析した。SVR 例では、IL 28B が minor allele の例での発癌がみられなかったが、これは minor allele の症例は、肝線維化が軽度であり脂肪化が軽度であることや、若年者が多いという背景が関与していると考えられた。しかし、非 SVR 例に限ると、IL 28B が minor allele の例のほうが肝発癌が高いという結果であった。これは、minor allele の例ではインターフェロンが奏功しにくいことが関与していると思われるが、minor allele であることが肝発癌に関与するか否かについてインターフェロンの影響を除いて詳細に解析する必要があると考えられた。

E. 結論

C 型慢性肝炎と肝硬変症例で経過中に肝発癌するリスク因子を解析すると、年齢が高齢になることと肝線維化が進展することがリスク因子であった。さらに、経過中に ALT 値が 40 IU/L 以上と AFP 値が 6.5 ng/mL 以上が高率に発癌する予測になると考えられた。IL 28B の SNP と発癌を解析すると、非 SVR の症例では、IL 28B の minor allele の例の方が肝発癌率が高かった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 中西裕之他：肝硬変も含めた C 型肝炎の包括的ガイドラインの有用性の検討 第96回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション6 新潟 2010.4
- 2) 泉並木、C 型肝炎個別化医療のための宿主因子・ウイルス因子 第15回日本肝臓学会大会シンポジウム2 特別発言 東京 2011.
- 3) 泉並木、山田剛太郎、熊田博光. C 型肝炎症例における PEG-IFN α 2a 少量長期投与による肝発癌抑止効果の検討：全国多施設共同研究 第15回日本肝臓学会大会シンポジウム10. C 型肝炎治療の新たな展開 S10-9 東京 2011.
- 4) 黒崎雅之、泉並木. C 型肝炎個別化医療のための宿主因子・ウイルス因子 データマイニング解析に基づく C 型肝炎の個別化医療 第15回日本肝臓学会大会シンポジウム2 東京 2011.

2. 論文発表

- (1) Asahina Y, Izumi N, et al. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. Hepatology 2011 in press.
- (2) Kuroski M, Izumi N, et al. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphate gene and anemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. Antivir Ther 2011;16:685-94.
- (3) Izumi N, Asahina Y, Kuroski M. Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. Hepat Res Treat 2010;2010:703602.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

DFPP 併用治療が免疫細胞に与える影響に関する研究

研究分担者 上野義之 国立大学法人山形大学医学部内科学第二講座 教授

研究要旨；

慢性 C 型肝炎のうち、ゲノタイプ 1 型高ウイル量のいわゆる難治性の症例に対しては、これまでの標準治療である PEG インターフェロンとリバビリンによる持続的なウイルス除去率は 40～55%程度にとどまっている。一方、この標準治療の効果を高めるために、治療導入早期に二重膜からなる濾過療法 (double filtration plasmapheresis、以下 DFPP) が使用されているが、その作用機序についてはまだ不明な点が多い。したがって、その治療効果改善に関わる機序を明らかにすることは、今後の難治例の治療効果を改善することにも貢献することが予想されるために、主に免疫学的機序についてその影響を検討した。12 人の DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を行った患者で免疫学的パラメーターとウイルス、宿主因子との関係を検討した。IL28B の T/T アレルの 4 人の患者は全て早期のウイルス学的反応 (cEVR) を達成した。末梢血中の HCV コア抗原の量は、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を併用され EVR を達成した患者では、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を行い晚期ウイルス学的反応 (LVR) を達成した患者もしくは PEG インターフェロン・リバビリン療法で EVR を達成した患者より低値となっていた。

末梢血より産生されるインターフェロン γ (IFN γ) の量は徐々に増加した。一方 EVR 患者ではインターロイキン (IL) 10 の産生は徐々に低下した。DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法により EVR を達成した患者では HCV コアたんぱく結合 CD3 陽性 T リンパ球の頻度は急激に低下した。さらに、CD4 陽性および CD8 陽性の活性化 T 細胞、CD16-CD56 強陽性の NK 細胞の分布は DFPP 施行前後で有意に変化した。

以上より、HCV 抗原の急速な減少やリンパ球のプロファイルの変化は、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン併用療法における免疫学的なパラメーターの改善に寄与していると考えられた。

A. 研究目的

平成 22 年度は、慢性 C 型肝炎のうち、特に難治と考えられるゲノタイプ 1 型高ウイル量の治療における免疫学的パラメーターを解析することにより、将来の治療効果の改善に役立つメカニズムの解明を、主に二重膜からなる濾過療法 (double filtration plasmapheresis、以下 DFPP) と標準治療である PEG インターフェロン・リバビリン療法の併用療法を行った患者の末梢血を用いて解析した。

B. 研究方法

12 例のゲノタイプ 1 型高ウイルス量の患者で DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を施行されたものを

対象とし、通常の PEG インターフェロン・リバビリン療法のみを施行された患者 12 名を対照とした。本研究の実施にあたり、東北大学医学部倫理委員会の審査を受け手承認され (承認番号 2009-166)、参加した全ての患者から書面で同意を取得した。

解析は、治療の前後に採血を行い、主に末梢血単核球の CD マーカー染色、サイトカイン産生能 (IFN γ 、IL-10)、IL28B および ITPA 遺伝子多型の検討を行った。宿主遺伝子の解析は、東北大学医学部倫理委員会の審査を経て承認され (承認番号 2010-323)、参加患者からの書面による同意を取得した。

C. 研究結果

- ① IL28B の T/T アレルの 4 人の患者は全て早期のウイルス学的反応(cEVR)を達成した。末梢血中の HCV コア抗原の量は、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を併用され EVR を達成した患者では、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法を行い晩期ウイルス学的反応(LVR)を達成した患者もしくは PEG インターフェロン・リバビリン療法で EVR を達成した患者より低値となっていた。
- ② 末梢血より産生されるインターフェロン γ (IFN γ)の量は徐々に増加した。一方 EVR 患者ではインターロイキン(IL)10 の産生は徐々に低下した。DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン療法により EVR を達成した患者では HCV コアたんぱく結合 CD3 陽性 Tリンパ球の頻度は急激に低下した。さらに、CD4 陽性および CD8 陽性の活性化 T 細胞、CD16-CD56 強陽性の NK 細胞の分布は DFPP 施行前後で有意に変化した。

D. 考察

HCV 抗原の急速な減少やリンパ球のプロファイルの変化は、DFPP と PEG インターフェロン・リバビリン併用療法における免疫学的なパラメーターの改善に寄与していると考えられた。今後 HCV 特異的な創薬が進み治療法が進化していくことが予想されるが、依然糟公立 100%に至るまでは難治例に対する、いわゆる難治性獲得のメカニズムの解明が望まれる。宿主の免疫学的解析は、これまで病態形成にいかに関わるか不明の点が多かったが、宿主の IL28B の多型など、近年は治療効果に大きく影響することが報告されており、この点の解明も急がれる。本研究は、治療効果に影響する免疫学的パラメーターを幾つか拾い上げてその解析が有効である点を示しており、今後新規の治療で同様の解析が可能かについてさらに検討が必要である。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

- 1) Kondo, Y., Ueno, Y., Machida, K., Kimura, O., Kakazu, E., Inoue, J. & Shimosegawa, T. (2011) Hcv-Core Protein Could Induce Th17 Commitment by Enhancing the Stat-3 Signaling. AASLD Liver Meeting 2011, San Francisco, CA, USA, November 4-8, 2011
- 2) 近藤泰輝, 上野義之, 涌井祐太, 二宮匡史, 嘉数英二, 井上淳, 下瀬川徹 Vitamin D または DFPP 併用 Peg-IFN/RBV 治療は免疫細胞活性化を介して抗ウイルス効果を増強する. 第 15 回肝臓学会大会 福岡 10 月 21-22 日 2011 年

2. 論文発表

- 1) Kondo Y, Ueno Y, Wakui Y, Ninomiya M, Kakazu E, Inoue J, Kobayashi K, Obara N, Shimosegawa T. Rapid reduction of hepatitis C virus-Core protein in the peripheral blood improve the immunological response in chronic hepatitis C patients. Hepatology Research. 2011;41:1153-68..
- 2) Kondo Y, Ueno Y, Kakazu E, Kobayashi K, Shiina M, Tamai K, Machida K, Inoue J, Wakui Y, Fukushima K, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naive CD4+ cells and affect their proliferation and IFN-gamma secretion activity. Journal of gastroenterology. 2011;46:232-41.
- 3) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern. Journal of viral hepatitis. 2011;18:206-15.
- 4) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. The Journal of infectious diseases. 2011;204:1017-25.

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎におけるARFIによる非侵襲的肝線維化評価に関する研究

研究分担者 吉岡健太郎 藤田保健衛生大学 肝胆膵内科 教授

研究要旨：C型慢性肝炎の肝線維化 stage 診断におけるARFIの有用性を明らかにするために、ARFIと肝組織線維化面積、肝線維化 Stage との関係を検討し、ARFIのstage診断能を各種肝線維化インデックスと比較検討した。ARFIの測定値は、肝線維化面積比と正の相関関係があり、肝の線維化を定量的に反映しているものと推察された。ARFIは肝線維化 Stage とも有意な正の相関関係が認められた。治療適応の基準であるF2以上の診断能については、従来から用いられている肝線維化の指標よりARFIが優れていた。F3以上とF4の診断能についてもARFIは高いAUROCを示した。以上よりARFIは、肝線維化 stage 診断に有用であることが示された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎の治療の標準化において肝線維化進展度評価は重要である。治療開始の目安は肝線維化 stage F2とされている。また肝硬変では慢性肝炎と異なる治療法が選択される。肝線維化進展度は血液検査、画像検査、肝生検により、評価されているが、最近肝硬度を測定することにより肝線維化進展度を評価する装置としてフィブロスキャンが保険適応となった。

フィブロスキャンと同様に肝硬度から肝線維化を非侵襲的に評価する装置としてARFI (Acoustic Radiation Force Impulse)がある。ARFIは超音波診断装置(ACUSON S2000)を用い、収束超音波パルスによって生じたせん断弾性波の伝播速度(m/sec)を測定し肝硬度を評価する。本研究ではC型慢性肝炎の肝線維化 stage 診断におけるARFIの有用性を明らかにするために、ARFIと肝線維化面積比、肝線維化 Stage との関係を検討した。またARFIのstage診断能を各種肝線維化インデックスと比較検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

2009年10月より2011年1月までに藤田保健衛生大学病院にて肝生検を施行したC型慢性肝炎患者49例を対象とした。男23例、女26例で、年齢は 57.5 ± 11.9 歳であった。

(2) 方法

ACUSON S2000を使用し、Bモード画像上でROIを設定し、収束超音波パルスを照射し、肝内に発生したせん断弾性波を探索パルスで追跡し伝播速度を計測した。ARFIの測定は、計14回行い、中央値を測定値とした。

肝生検標本(Azan染色)をKEYENCE社製BZ-9000を用いてデジタル画像化し、画像解析ソフト(Image-Pro plus)を用いて線維化面積/組織面積(肝線維化面積比)を算出した。

(倫理面への配慮)

ACUSON S2000は非侵襲的に肝硬度を測定でき、患者に苦痛や健康被害をきたすものではない。肝生検は治療上必要な場合のみ施行した。また患者の個人情報の守秘については十分な注意を払った。

C. 研究結果

肝線維化面積比はARFIと正の相関関係

($r=0.73$ 、 $P<0.0001$)を認めた。ARFI と肝線維化 Stage との関係について検討すると、F0($n=6$)の $1.15+0.13\text{m/s}$ 、F1($n=10$)では $1.13+0.16\text{m/s}$ 、F2($n=14$)では $1.37+0.25\text{m/s}$ 、F3($n=13$)では $1.73+0.41\text{m/s}$ 、F4($n=6$)では $2.25+0.26\text{m/s}$ であり、F2 と F3、F3 と F4 の間に有意な差($P<0.05$)が認められた。血液生化学検査データを基にした肝線維化の指標である APRI、Forns index、FibroIndex および FIB-4 と ARFI について、F2 以上の診断能につき ROC 解析を用いて検討した。ARFI の曲線下面積 (AUROC) は 0.891、カットオフ値は 1.23m/s であった。APRI、Forns Index、Fibro Index および FIB-4 の AUROC はそれぞれ 0.877、0.807、0.885、0.844 であり、ARFI の診断能が最も優れていた。F3 以上および F4 の診断能については AUROC はそれぞれ 0.904 と 0.957 であり、カットオフ値は 1.46m/s と 1.93m/s であった。

D. 考察

ARFI の測定値は、肝線維化面積比と正の相関関係があり、肝の線維化を定量的に反映しているものと推察された。

ARFI は肝線維化 Stage とも有意な正の相関関係が認められた。

治療開始の基準である F2 以上の診断能については、従来から用いられている肝線維化の指標より ARFI が優れていた。

F3 以上と F4 の診断能についても ARFI は高い AUROC を示した。

E. 結論

ARFI は、C 型慢性肝炎において肝線維化 stage 診断に有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 嶋崎宏明・橋本千樹・川部直人・原田雅生・新田佳史・村尾道人・中野卓二・有馬裕子・刑部恵介・市野直浩・西川徹・青山和佳奈・吉岡健太郎：NAFLD における Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) の有用性の検討 第 97 回日本消化器病学会総会・ミニシンポジウム 2011.5.13~15 東京
2. 川部直人・橋本千樹・西川徹・刑部恵介・市野直浩・嶋崎宏明・中野卓二・原田雅生・吉岡健太郎：Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) による非侵襲的肝線維化評価と肝発癌予測 JSUM2011 日本超音波医学会第 84 回学術集会・特別演題企画 2011.5.27~29 東京
3. 西川徹・吉岡健太郎・橋本千樹・川部直人・原田雅生・市野直浩・刑部恵介・杉山博子・青山和佳奈：肝臓における Virtual Touch Tissue Quantification のせん断波計測の検討 JSUM2011 日本超音波医学会第 84 回学術集会・一般口演 2011.5.27~29 東京
4. 村尾道人・橋本千樹・吉岡健太郎：C 型慢性肝炎に対する治療効果と IL28B・ITPA 遺伝子多型が及ぼす影響 第 47 回日本肝臓学会総会・ポスターセッション 2011.6.2~3 東京
5. 新田佳史・橋本千樹・川部直人・原田雅生・村尾道人・中野卓二・有馬裕子・嶋崎宏明・吉岡健太郎：自己免疫性肝炎における肝硬度測定 第 47 回日本肝臓学会総会・ポスターセッション 2011.6.2~3 東京
6. 川部直人・橋本千樹・西川徹・原田雅生・新田佳史・村尾道人・中野卓二・嶋崎宏明・有馬裕子・吉岡健太郎：肝がん検診における ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) 導入の有用性 第 53 回日本消化器病学会大会 (JDDW2011) 2011.10.20~23 福岡
7. 村尾道人・有馬裕子・嶋崎宏明・中野卓二・新田佳史・原田雅生・川部直人・橋本

千樹・吉岡健太郎：C型慢性肝炎に対する ISDR・コア領域の変異・IL28B 遺伝子多型と治療効果について 第 15 回日本肝臓学会大会(JDDW2011) 2011.10.20~23 福岡

8. Murao M, Yoshioka K, Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Nakano T, Arima Y, Shimazaki H, Ichino N, Osakabe K. IL28B SNP, ITPA SNP and mutation of core region and interferon sensitivity determining region of HCV: their effects on the response to PEG-IFN/RBV therapy in patients with chronic HCV genotype 1 infection. The 62nd Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases 2011.11.4-8 San Francisco.

9. Yoshioka K, Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Arima Y, Shimazaki H, Ichino N, Osakabe K. Acoustic radiation force impulse elastography for evaluation of fibrosis stage and prediction of hepatocellular carcinoma in chronic HCV infection. The 62nd Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases 2011.11.4-8 San Francisco.

2. 論文発表

(1) Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. J Med Virol. 2012;84(3):438-44

(2) Yoshioka K, Hashimoto S. Can non-invasive assessment of liver fibrosis replace liver biopsy? Hepatol Res 2011 (in press)

(3) Osakabe K, Ichino N, Nishikawa T, Sugiyama H, Kato M, Kitahara S, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Arima Y, Suzuki K, Yoshioka K. Reduction of liver stiffness by antiviral therapy in chronic hepatitis B. J Gastroenterol 2011; 46(11): 1324-34.

(4) Chayama K, Hayes CN, Yoshioka K, Moriwaki H, Okanoue T, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Toyota J, Izumi N, Hiasa Y, Matsumoto A, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Yotsuyanagi H, Kumada H. Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C. J Gastroenterol 2011; 46(4): 545-555.

(5) Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b and correlation with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. J Viral Hepat 2011; 18(4): 280-286.

(6) Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. Liver Int 2011;31(9): 1359-65.

(7) Harata M, Hashimoto S, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Arima Y, Shimazaki H,

Ishikawa T, Okumura A, Ichino N, Osakabe K, Nishikawa T, Yoshioka K. Liver stiffness in extrahepatic cholestasis correlates positively with bilirubin and negatively with alanine aminotransferase. *Hepatol Res* 2011; 41(5): 423-429.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

B型慢性肝炎のインターフェロン治療効果とウイルス因子に関する研究

研究分担者 四柳 宏 東京大学医学部大学院生体防御感染症学 准教授

研究要旨； 現在遺伝子型BのB型慢性肝炎に対する治療としては、インターフェロン治療が推奨されている。しかしながらインターフェロン治療により、寛解に持ち込むことのできない症例も存在する。今回こうした“インターフェロン治療で寛解に持ち込めない”遺伝子型BのB型慢性肝炎の特徴を明らかにすることを目的に解析を行った。

自然経過で肝炎の沈静化が見られた症例2例ではプレコア遺伝子 1896 番、1899 番は共に変異していた。また、コアアミノ酸置換が5箇所認められた。また、インターフェロン治療で肝炎が緩解した2例中1例でもプレコア遺伝子 1896 番、1899 番は共に変異していた。コアアミノ酸の置換は1箇所に認めるのみであった。コアプロモーター領域の変異は検討した5症例中1例に認めるのみであった。

遺伝子型BのB型慢性肝炎において自然緩解するためにはプレコア遺伝子 1896 番の変異に加えてコアアミノ酸の置換が多く箇所にあることが重要である可能性が示唆された。また、こうした条件はそろわない場合にはインターフェロン治療が必要だが、その場合でも変異があることが治療効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在遺伝子型BのB型慢性肝炎に対する治療としては、インターフェロン治療が推奨されている。これは遺伝子型Cの症例に比べて遺伝子型Bの症例は自然に緩解する場合が多く、インターフェロン治療効果も高いことが理由と考えられる。しかしながらインターフェロン治療を行っても寛解に持ち込むことのできない症例も存在する。

遺伝子型Cの症例を対象にした我々のこれまでの検討では、プレコア遺伝子 1896 番の変異に加えてコア領域のアミノ酸置換が認められる症例が多い。また、インターフェロン療法が効果的な症例にはコアプロモーター領域に1762番、1764番の置換の他に変異が多く入っている傾向が認められる。

今回遺伝子型Cの症例で観察されたのと同様の現象が遺伝子型Bの症例でも観察されるかということを含め、検討を行った。

B. 研究方法

自然経過で HBe 抗体陽性、ALT 持続正常となった2症例、24 週間の α インターフェロン製剤による治療を行った3症例の計5症例の解析を行った。コアプロモーター領域からコア領域まで(nt. 1606 - nt. 2488)を2箇所に分けて PCR を行い、コアプロモーター及びプレコア領域はコンセンサス配列かたの塩基置換を、コア領域はコンセンサス配列からのアミノ酸置換を調べた。

C. 研究結果

自然経過例の結果を(表1)に示す。

(表1) 自然経過例の結果

1 49y male		ALT	HBeAg	HBV DNA	BCP			PreC	
nt.					1753	1762	1764	1896	1899
					T→C	A→T	G→A	G→A	G→A
2005	230	neg	6.8	Wild	Mutant	Mutant	Mutant	Mutant	
2006	35	neg	3.8	Wild	Mutant	Mutant	Mutant	Mutant	

2 53y male		ALT	HBeAg	HBV DNA	BCP			PreC	
nt.					1753	1762	1764	1896	1899
					T→C	A→T	G→A	G→A	G→A
2006	30	neg	4.4	Wild	Wild	Wild	Mutant	Mutant	
2011	19	neg	2.8	Wild	Wild	Wild	Mutant	Mutant	

2例とも35歳以上の男性で既にHBe抗原は陰性化していた。プレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 は共に変異型となっていた。コアプロモーター領域の nt. 1762, nt. 1764 は症例1のみで変異型となっていた。症例1ではコアプロモーター領域の nt. 1775 も変異していた。症例2ではコア領域のアミノ酸配列の検討が可能であったが、aa55, aa70, aa74, aa77, aa87, aa113 の5箇所にアミノ酸置換が認められた。

インターフェロン投与例の結果を(表2)に示す。

(表2) インターフェロン投与例の結果

3 30y female		Core AA27 に置換							
	ALT	HBeAg	HBV DNA	BCP			PreC		
nt.				1753	1762	1764	1896	1899	
				T→C	A→T	G→A	G→A	G→A	
pre	250	pos	8.6	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	
post	20	neg	4.4	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	

4 42y male		Core AA113 に置換							
	ALT	HBeAg	HBV DNA	BCP			PreC		
nt.				1753	1762	1764	1896	1899	
				T→C	A→T	G→A	G→A	G→A	
pre	90	neg	7.8	Wild	Wild	Wild	Mutant	Mutant	
post	24	neg	3.4	Wild	Wild	Wild	Mutant	Mutant	

5 42y female		Core AA174 に置換							
	ALT	HBeAg	HBV DNA	BCP			PreC		
nt.				1753	1762	1764	1896	1899	
				T→C	A→T	G→A	G→A	G→A	
pre	55	pos	8.8	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	
post	45	pos	8.9	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	

症例3、4は緩解例、症例5は無効例である。自然緩解例に比べるとコアプロモーター、プレコア領域の塩基置換、コア領域のアミノ酸置換が少ない。コアプロモーター、プレコア領域の塩基置換がなかった2症例のうち、肝炎の活動性の高い時期に治療を開始した“症例3”では緩解に持ち込むことができたが、肝炎の活動性の低い時期に治療を開始した“症例5”では無反応に近い状態であった。

D. 考察

本邦の遺伝子型B(亜遺伝子型 Bj)のB型慢性肝炎は早期に自然緩解しやすいことが知られている。このような症例ではプレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 が早期に変異を獲得し、HBe抗原陰性となる。HBe抗原量の低下と共に免疫応答が賦活化され、ウイルス増殖が抑えられ、緩解に至りやすいと考えられる。症例1、2は両者ともプレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 は変異型であり、この仮

説を指示する結果であった。

遺伝子型Bのかなりの症例がプレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 が変異を獲得した後もコアプロモーター領域の nt. 1762, nt. 1764 が野生型のままである。この場合、ウイルスの増殖力が強くなり、さらに緩解に入りやすい。症例2はこのような症例である。53 歳という年齢でありながら緩解に至った要因であると考えられる。プレコア変異型、コアプロモーター野生型の遺伝子型Bの症例は経過観察だけで肝炎が緩解に至ることが期待できると考えられる。

症例4はこうした症例であるが、インターフェロンの投与が行われた。症例2よりも若年であり、経過観察により緩解に至った可能性もある。このような症例はインターフェロンの治療効果も良好であった。

症例3、5はプレコア野生型、コアプロモーター野生型であるが症例3のみが緩解に至った。症例3は肝炎の急性増悪の時期にインターフェロンを開始したため、より強い免疫応答を引き起こすことができ、緩解に至った可能性がある。若年女性であることも大きな要因であったと思われる。

遺伝子型Cの症例で緩解に至った症例ではコア領域のアミノ酸置換数が多いということをこれまで報告してきた。症例2はこの結果に合致している。今後症例を増やして検討していきたいと考えている。

E. 結論

遺伝子型BのB型慢性肝炎の症例はプレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 が変異型、コアプロモーター領域の nt. 1762, nt. 1764 が野生型の場合、自然緩解することが期待でき、インターフェロン治療効果も良好であると思われる。一方、プレコア領域の nt. 1896, nt. 1899 が野生型の場合、免疫応答の賦活化された時期を狙ってインターフェロン治療を開始することが必要と考えられた。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

1) 山田典栄, 四柳宏他:B 型肝炎ウイルス遺伝子変異

の病態・治療に及ぼす影響 ウイルスゲノム中の欠失はB型慢性肝疾患の経過に大きな影響を及ぼす 第36回日本肝臓学会総会 パネルディスカッション 山形 2010.6

2) 山田典栄, 四柳宏他:B型急性肝炎におけるHBs抗原持続期間とHBs抗体出現頻度 第15回日本肝臓学会総会 福岡 2011.10

2. 論文発表

(1) Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Okuse C, Moriya K, Suzuki M, Kato T, Iino S, Koike K, Itoh F. Nucleic acid substitutions and response to interferon in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with genotype C HBV infection. J St. Marianna Univ. 2, 31-38, 2011.

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

ADV および ETV に対する耐性出現とその後の治療効果に関する研究

研究分担者 豊田成司 北海道厚生連 札幌厚生病院 院長

〔要旨〕

核酸アナログを投与した B 型慢性肝疾患 446 例を対象として ADV および ETV に対する耐性出現について検索し、耐性出現後の核酸アナログの抗ウイルス効果を検討した。ADV 耐性を 6 例、ETV 耐性を 12 例認め、両剤耐性例も 1 例認められた。耐性出現後の抗ウイルス効果は、ADV 耐性出現例には LAM/ADV 併用から ETV/ADV 併用へ変更することで良好な抗ウイルス効果が得られていた。一方、ETV 耐性例では LAM あるいは ETV と ADV の併用療法では抗ウイルス効果が不十分な例が多く、今後 TDF など従来の核酸アナログとは耐性部位が異なった薬剤を導入する必要性が示唆された。

A. 研究目的

HBV に対する核酸アナログの抗ウイルス効果は極めて強力であるが、その一方でそれぞれの薬剤に一定の割合で耐性変異が出現することが知られている。現在、Lamivudine(LAM),Entecavir(ETV),Adefovir dipivoxil(ADV)の三種の核酸アナログが使用されているが、投与期間が長期に渡る症例が増加しており今後多剤耐性が増加すると予想される。

そこで、当科の核酸アナログ投与例における ADV および ETV に対する耐性出現の現状および耐性出現後の抗ウイルス効果について検討した。

B. 研究方法

一年以上核酸アナログを投与した B 型慢性肝疾患 446 例を対象として ADV および ETV に対する耐性出現例について耐性出現時の投与薬剤および出現頻度について解析し、耐性出現後の治療薬剤の抗ウイルス効果について検討した。

なお、耐性部位の検出には INNO-LiPA 法を用いておこなった。

C. 研究結果

446 例中 19 例(4.3%)で ADV および ETV に対する耐性出現を認めたが 1 例を除いて二種類以上の核酸アナログ投与歴を有していた(表—1)。

LAM 耐性出現により ADV を併用投与した 122 例からは ADV 耐性を 6 例、ETV 耐性を 2 例認めたほか三剤耐性出現例も 1 例認めた。LAM/ADV 併用療法中に ADV 耐性が出現した 6 例は全例 Genotype C であり、うち 4 例は HBe-Ag 陽性、アナログの投与期間は 20～93 ヶ月であった。また、耐性変異部位は rt181 が 5 例、rt236 が 1 例であったがこのうち 1 例は rt181 の変異を認めた時点で LAM 耐性変異を INNO-LiPA 法では検出出来なかった(表—2)。残りの 5 例について多剤耐性出現後の治療に対する抗ウイルス効果をみると、LAM から ETV に切り替えて ADV を併用した 4 例ではいずれも HBV DNA の陰性化(2.1 log 未満を含む)が得られていたが、LAM/ADV 併用療法を継続した 1 例では経過観察中に DNA の陰性化は認められなかった(表—3)。

ETV 投与後に ETV 耐性となった症例は 10 例でありうち 9 例は LAM から ETV への切り

替え例であったが、このうち 7 例は LAM 耐性出現が確認されたのちに切り替えられており、ETV 初回投与例 204 例からの耐性出現例はわずか 1 例のみであった。この 10 例に LAM/ADV 投与で ETV 耐性となった 2 例を加えた 12 例の ETV 耐性例の背景因子では、Genotype Bj 2 例、C 10 例であり HBe 抗原は半数の 6 例が陽性であった。耐性出現後の治療は、9 例が ETV/ADV で 3 例が LAM/ADV で経過観察されたが、HBV DNA の陰性化が得られたのは ETV/ADV で 4 例、LAM/ADV で 1 例の 5 例と半数以下の症例にしか陰性化が得られなかった（表—4）。

D. 考察

核酸アナログの投与が長期となるにしたがって、今後多剤耐性例が増加してくると予想され、そのなかには対処に難渋する症例も少なくないと思われる。

今回当科における ADV および ETV に対する耐性出現例について検討したが、ADV は LAM 耐性例に追加投与され、また ETV 耐性変異は LAM 耐性変異を伴っていることから、今回の検討例は即ち多剤耐性例と考えられる。ADV 耐性は、LAM/ADV 併用例から 6 例認められたが、これらに対する ETV/ADV 併用療法の抗ウイルス効果は良好であり ADV 耐性出現時には試みるべき治療法と考えられる。

ETV 耐性は 12 例で観察されたが、そのうち 2 例は LAM/ADV 併用例であった。しかし、この 2 例はその後の解析で LAM 耐性出現時には既に 1 例が rt202、もう 1 例も rt184 の ETV 耐性変異を獲得していたことが判明し、追加投与された ADV の ETV 耐性株に対する抗ウイルス効果が十分でなかったと推察される。また ETV 耐性例のうちもっとも多かったのが LAM から ETV への切り替え例（9 例）であった。このうち 7 例は LAM 耐性例に対する ETV の効果を検証する臨床試験に参加した 13 例から出現しており、耐性出現率は 53.8% と高率であった。他の 2 例は LAM から

ETV への切り替え後に ETV 耐性を認めたが、当科における LAM から ETV への切り替え例は 107 例であり薬剤変更時 HBV DNA が 4 log 未満であった 84 例からは 1 例も ETV 耐性が出現していない。しかし、この 2 例はいずれも 20 ヶ月以上の LAM 投与期間があったにもかかわらず薬剤変更時に 4 log 以上のウイルス量と抗ウイルス効果が不良の症例でありその後の追加検討から ETV への変更時既に LAM 耐性を獲得していたことが判明したことから、LAM から ETV への変更に際して抗ウイルス効果が不十分な症例については耐性変異の確認が必要と考えられた。初回投与の 204 例から ETV 耐性出現したのはわずか 1 例のみであったが、本症例は二度 ETV 投与を中断するなど特殊な症例であり ETV 初回投与例からの耐性出現は極めて低率と考えられた。

この ETV 耐性出現例 12 例は耐性出現後 LAM/ADV 併用 3 例、ETV/ADV 併用 9 例で経過観察されたが、その後の HBV DNA 陰性化率は 42% と十分な抗ウイルス効果とはいええず、ETV の耐性出現時には Tenofovir (TDF) のような従来の薬剤とは異なった耐性部位を持つ薬剤の導入が必要と考えられた。

D. 結論

B 型肝炎治療に核酸アナログが導入されて 10 年以上が経過し長期投与例が増加しており、今後これらの中から多剤耐性例が出現してくることが予想される。この多剤耐性例の治療に際し従来の核酸アナログだけではその対処に苦慮することも予想され、今後 TDF など従来の核酸アナログとは耐性部位が異なった薬剤の必要性が増してくるものと推察された。

E. 研究発表

1. 小関 至、木村睦海、荒川智宏、中島知明、桑田靖昭、赤池 淳、大村卓味、佐藤隆啓、狩野吉康、豊田成司. ラミブジンとアデホビル併用不応例に対するアデホビルとエンテカビル併用療法. 日消

誌 108 : 202-209、2011

2. 小関 至、狩野吉康、豊田成司.

Entecavir による抗ウイルス療法.

消化器内科 53 : 283-287、2011

3. 小関 至、木村睦海、荒川智宏、中島知明、桑田靖昭、赤池 淳、大村卓味、佐藤隆啓、狩野吉康、豊田成司. 当院における核酸アナログ多剤耐性例の頻度・特徴と治療内容の検討. 第 47 回肝臓学会総会

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

B 型肝炎の自然経過例における HBs 抗原消失の予測に関する研究

研究分担者 田中榮司 信州大学医学部消化器内科 教授
研究協力者 松本晶博 信州大学医学部消化器内科 講師

研究要旨：

【目的】 B 型慢性肝炎の治療では HBs 抗原消失が最終的な目標となるが、HBs 抗原は自然経過で消失する症例もあり、HBs 抗原の低下・消失に関する抗ウイルス薬の効果の評価にはまず自然経過での変化を知る必要がある。今回我々は、自然経過例における HBs 抗原消失予測モデルを作成し、HBs 抗原の自然消失が予測可能かどうかを検討した。

【方法】 抗ウイルス薬の投与なしに 10 年間経過観察した HBV キャリアの 74 例を対象に、HBs 抗原量変化の近似曲線を作成し、HBs 抗原の消失予測年齢を求めた。次に、HBs 抗原消失予測年齢が 90 歳以上と未満の群に分け、HBs 抗原の消失予測モデルをロジスティックモデルを用いて構築した。予測モデルによって予測された結果と、消失予測年齢を比較し、HBs 抗原の自然消失予測が各測定点において可能かどうか検討した。

【成績】 HBsAg 量変化の近似曲線を用いると、90 歳以前に HBsAg が消失または消失が予測されたのは 74 例中 38 例 (51%) であった。ロジスティックモデルにて HBs 抗原非消失予測モデルを作成し、自然経過観察中の各測定時点 (平均 7 時点) で HBs 抗原消失予測を行うと、HBe 抗原陰性時点では 70% が予測可能 (PPV 70%、NPV 93%、確診率 82%) であり、HBe 抗原陽性時点では 88% が予測可能 (PPV 88%、NPV 39%、確診率 62%) であった。

【結語】 年齢と HBsAg 量の変化から約 70% の精度で将来の HBsAg の消失を予測可能であった。今後、核酸アナログ治療群の治療前と治療開始後の消失予測確率の変化を解析し、核酸アナログ薬の HBs 抗原量減少効果について検討する予定である。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎の治療では HBs 抗原消失が最終的な目標となる。しかし、自然経過で消失する症例もあり、治療薬の効果か否かの判断は容易ではない。今回我々は、自然経過例における HBs 抗原消失予測モデルを作成し、HBs 抗原の自然消失が予測可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

前向きに自然経過を 10 年間経過観察した HBV キャリア 74 例 (男性 39 例、年齢中央値 53 歳) を対象として HBs 抗原量の変化の特徴を検討した。HBs 抗原量は保存血清を用い、経過観察中年 1 回測定した。測定は Sysmex 社 (神戸) 製キット HISCL (0.03~2,000 IU/ml) を用い、必要な場合は倦怠を希釈し end titer まで測定した。

HBs 抗原の変化を、[HBs 抗原量] = c-10

a(年齢+b) という曲線にて近似し、HBs 抗原の消失予測年齢を求めた。HBs 抗原消失予測年齢が 90 歳未満の群を HBs 抗原消失群、それ以上の群を HBs 抗原非消失群とした。次に各測定点における HBs 抗原の年間変化量を求め、各種臨床 DATA を併せて HBs 抗原の消失予測モデルをロジスティックモデルを用いて構築した。予測モデルによって予測された結果と、消失予測年齢を比較し、HBs 抗原の自然消失予測が各測定点において可能かどうかを検討した。

C. 研究結果

HBsAg 量変化の近似曲線を用いると、90 歳以前に HBsAg が消失または消失が予測されるのは 38 例 (51%) であった。ロジスティックモデルにて HBsAg 非消失予測のモデルを作成すると、HBsAg 非消失予測確率 = $1 / (1 + \exp(-1.8 * [\text{HBsAg (LIU/ml)}] - 0.2 * [\text{年齢}] + 4.5 * [\text{年齢} > 35 \text{ 歳}] + 3.5 * [\text{HBsAg 変化速度 (LIU/ml/年)}] - 1.3 * [\text{HBsAg 変化速度 (LIU/ml/年)}] + 8.7))$ が得られた。HBe 抗原陰性時では、このモデルにおける非消失予測確率が 9%未満を予測消失群、HBe 抗原陽性時点では非予測消失確率が 25%未満を予測消失群とした。予測消失群以外で予測消失確率が 40%以上である場合を予測非消失とし、それ以外を判定保留とした。平均 7 ポイント測定した自然経過群における HBs 抗原非消失予測では HBe 抗原陰性時点では、PPV (非消失予測) 96.3%、NPV (消失予測) 91.3%、確診率 88.1%であり、HBe 抗原陽性時点では、PPV 93.3%、NPV 55.6%、確診率 76.0%であり、HBe 抗原陽性時点の消失予測がやや悪いものの良好な結果を得た。また、

各測定点における HBs 抗原消失予測では、HBe 抗原陰性時点では予測が可能であったのは 70%であり、その予測率は PPV 70%、NPV 93%、確診率 82%であり、HBe 抗原陽性時点では、予測可能であったのは 88%であり、その予測率は PPV 88%、NPV 39%、確診率 62%と、HBe 抗原陽性時点での NPV が低値であるがそれ以外では良好な結果であった。

D. 考察

B 型慢性肝炎の治療目標の一つである HBs 抗原の消失は、自然経過による消失と治療による消失を分けて評価することが重要である。今回の成績では、自然経過における HBs 抗原の消失について、HBs 抗原量、その年変化および年齢により HBe 抗原陰性例では 80%以上の確診率でこれを予測することが可能であった。治療介入前に HBs 抗原の将来の消失を予測することにより、治療介入による変化を定量的に比較検討することが可能であり、HBs 抗原量低下についての治療効果判定に役立つ可能性がある。

E. 結論

年齢と HBsAg 量の変化から約 70%の精度で将来の HBsAg の消失を予測可能であった。今後、核酸アナログ治療群の治療前と治療開始後の消失予測確率の変化を解析し、核酸アナログ薬の HBs 抗原量を減少させる実際の効果について検討していく予定である。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Matsumoto A, Tanaka E, 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 2012 (in press)

(2) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsunami 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 2012; 42: 139-149.

2. 学会発表

1) 松本晶博、吉澤要、田中榮司：B型慢性肝炎核酸アナログ薬治療における中止基準についての検討。第15回日本肝臓学会大会、福岡、2011.10

2) 松本晶博、森田進、田中榮司：B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療時の耐性株出現および治療中止後の各種マーカーの推移とその臨床的意義。第108回日本内科学会総会、東京、2011.4

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

HBV, 潜在性 HBV, HCV の相互影響の検討に関する研究

研究分担者 向坂彰太郎 福岡大学医学部消化器内科学講座 教授

研究要旨:

HBV と HCV の共感染における相互の影響に着目し、増殖抑制や変異の条件を解析することで将来的な抗ウイルス療法の一助とするために検討を行った。ウイルスの量や遺伝子配列、抗原と抗体の産生には差異がみられ、相互に影響を与えている可能性が示唆された。特に HCV は HBV 増殖を抑制、HBV は HCV 変異に影響している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）とC型肝炎ウイルス（HCV）の活動の機序、特に増殖抑制や変異の条件が明らかとなれば、治療法の選択や抗ウイルス薬の開発に有用である。

一方、自然界の病原微生物がある環境下で複数存在する場合の相互影響は知られており、一部はペニシリンなどの形で治療にも応用されている。肝炎ウイルスは以前から議論が行われているが一定の見解がない。

我々は HBV と HCV の共感染に着目し検討を行った。

B. 研究方法

福岡大学病院臨床研究指針に基づき研究を行った。

当科に 2002～2009 年に入院した症例、また 2004 年と 2007 年に外来定期調査を行った症例で、HBs 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体の測定を行った 1840 例のうち、いずれかのマーカーが陽性であった 1403 例を対象とした。急性肝炎、自己免疫性疾患、代謝性疾患、先天性疾患、ワクチン接種例、移植例は除外した。

マーカーの結果から HBs 抗原陽性・HBc 抗体陽性を HBV 感染、HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性を潜在性 HBV 感染（以下、潜在 B）、HCV 抗体陽性を HCV 感染として定義し、以下の 5 群に分類した。

HBV 単独：356 例（25.1%）

HBV+HCV：14 例（1.0%）

潜在 B 単独：186 例（13.1%）

潜在 B+HCV：393 例（27.7%）

HCV 単独：471 例（33.2%）

5 群間で以下の背景因子を比較した。

(1) 宿主因子：年齢、性別。(2) HBV 因子：Genotype、プレコア変異、コアプロモーター変異、DNA 定量、HBV コア関連抗原、HBs 抗体、HBe 抗原/抗体、HBc 抗体 200 倍希釈。(3) HCV 因子：Genotype、遺伝子配列（コア領域、ISDR 領域）、RNA 定量、コア抗原量、コア抗体価、HCV 抗体価

統計は χ^2 検定、Fisher 検定、Student t 検定、Mann-Whitney U 検定、Logistic 回帰分析を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

(1) HBV に影響する HCV 因子の検討

全 HCV 感染 878 例の中で潜在 B との共感染は 393 例存在するにもかかわらず HBV との共感染は 14 例しかみられなかった。

HBV-DNA の検出率 (≥ 2.6 Log/ml を陽性) は、HBV 単独 90.4% > HBV+HCV 36.4% ($P < 0.001$)、潜在 B 単独 5.9% > 潜在 B+HCV 1.3% ($P < 0.05$) であった。同様に HBs 抗原陽性率も HBV 単独 53.7% > HBV+HCV 0% ($P < 0.001$) であった。HBe 抗体陽性率は HBV 単独 70.1% < HBV+HCV 100% であった ($P < 0.005$)。

HBs 抗体陽性率については、潜在 B 単独 61.2% > 潜在 B+HCV 44.6% ($P < 0.05$) であった。Genotype 別では 1b (45.1%) と 2a (44.2%) よりも 2b (67.6%) で有意に高かった ($P < 0.05$)。コア領域の配列では aa110 が野生型 (49.1%) よりも変異型 (81.3%) で有意に高かった ($P < 0.05$)。

(2) HCV に影響する HBV 因子の検討

HBV+HCV、潜在 B+HCV、HCV 単独の比較では、HCV-RNA 定量などに有意差はなかった。コア領域の配列の変異は、HBV+HCV (7.1 ± 3.3 個) が潜在 B+HCV (3.6 ± 3.1 個) や HCV 単独 (3.3 ± 2.6 個) よりも有意に多かった ($P < 0.01$)。Genotype 1b に限れば aa70 の変異率は潜在 B+HCV 43.4% > HCV 単独 25.4% であった ($P < 0.05$)。

D. 考察

HCV 共感染の症例では HBV-DNA、HBs 抗原および HBe 抗原が陰性、また HBe 抗体が陽性であることが多かったため、HBV が抑制されている可能性が示唆された。このなかで潜在 B 症例では逆に HBs 抗体が陰

性であることが多かった。しかしこの状態で HBV-DNA 検出率が上昇するわけではなかったため、増殖抑制の結果として抗体産生が低下したとも考えられる。他に HCV の Genotype やコア領域の変異でも HBs 抗体が左右されたことから、いずれにしても HCV 共感染の影響が示唆された。

HCV コア領域は、HBV が共感染した症例で変異が多く、また潜在 B が共感染した症例で aa70 の変異が多かった。この結果からは共感染と HCV 変異の関連性が示唆された。

E. 結論

HBV と HCV は相互に影響を与えている可能性が示唆された。特に HCV は HBV 増殖を抑制、HBV は HCV 変異に影響している可能性がある。今後はこの結果をもとにこれらの現象の本体、免疫の変化や受容体の競合などを究明する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 松本照雄、早田哲郎、西澤新也、森原大輔、田中 崇、上田秀一、阿南 章、竹山康章、入江 真、岩田 郁、釈迦堂敏、向坂彰太郎、慢性肝疾患における肝線維化の非侵襲的評価 -FibroScanの使用経験から-、福岡大医紀、2011、38(1)、1-6

(2) 森原大輔、西澤新也、福永篤志、四本かおる、久能志津香、櫻井邦俊、平野玄竜、岩下英之、上田秀一、横山圭二、坂本雅晴、阿南 章、竹山康章、入江 真、岩田 郁、