

14. Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandao-Mello CE, et al. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: A randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:528-540.
15. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417-2428.
16. Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2009;48:313-320.
17. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, et al. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 2011;54:872-878.
18. Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): A randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2010;376:1467-1475.
19. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010;465:96-100.
20. McPhee F, Levesque PC, Li D, Zhu J, Friborg J, Sheaffer A, et al. Identification and preclinical profile of the novel HCV NS3 protease inhibitor BMS-650032 [abstract]. *J Hepatol* 2010;52(suppl 1):S296.

21. Bifano M, Sevinsky H, Bedford BR, Coumbis J, Eley T, Huang SP, et al. Coadministration of BMS-790052 and BMS-650032 does not result in a clinically meaningful pharmacokinetic interaction in healthy subjects [Abstract]. *Hepatology* 2010;52(Suppl):719A.
22. Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3641-3650.
23. Lok A, Gardiner D, Lawitz E, Martorell C, Everson G, Ghalib R, et al. Quadruple therapy with BMS-790052, BMS-650032 and peg-IFN/RBV for 24 weeks results in 100% SVR12 in HCV genotype 1 null responders [Abstract]. *J Hepatol* 2011;54:S536.
24. Bronowicki JP, Pol S, Thuluvath PJ, Larrey D, Martorell CT, Rustgi VK, et al. BMS-650032, an NS3 inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype 1 chronic hepatitis C infection [Abstract]. *J Hepatol* 2011;54:S472.
25. Romano KP, Ali A, Royer WE, Schiffer CA. Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:20986-20991.
26. Zeuzem S, Foster GR, Fried MW, Hezode C, Hirschfeld GM, Nikitin I, et al. The ASPIRE trial: TMC435 in treatment-experienced patients with genotype-1 HCV infection who have failed previous pegIFN/RBV treatment [Abstract]. *J Hepatol* 2011;54:S546.

27. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;139:120-129.
28. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: A randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
29. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 2007;132:1767-1777.
30. Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U, et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2009;50:1709-1718.
31. AstraZeneca. Merrem (meropenem) IV prescribing information. 2010.  
<http://www1.astrazeneca-us.com/pi/MerremIV.pdf>. Accessed 29 June 2011.
32. Imada A, Hirai S. Cefotiam hexetil. *Int J Antimicrob Agents* 1995;5:85-99.

### Figure Legends

#### Figure 1: ALT levels – individual patients

Serum ALT levels are shown for the nine patients who completed 24 weeks of treatment; the patient who discontinued at week 2 is not presented. Shaded area indicates the treatment period; arrows indicate the points at which the dose of BMS-650032 was reduced from 600 mg twice daily to 200 mg twice daily. Arrow and line colors are the same for each patient. ALT=alanine aminotransferase.

#### Figure 2: HCV RNA levels – individual patients

Individual patient plasma HCV RNA levels during 24 weeks of treatment and through 24 weeks post-treatment (week 48) are shown. Lower limit of quantitation (LLOQ)=15 IU/mL.

HCV=hepatitis C virus.

#### Figure 3: HCV RNA endpoints

Categorical HCV RNA endpoints are indicated for the 10 study patients. One patient discontinued at week 2 and was counted as a treatment failure at the time points shown.

However, HCV RNA was undetectable in this patient at 2, 3, 13, and 24 weeks post-treatment.

HCV=hepatitis C virus. LOQ=limit of quantitation. RVR=rapid virologic response.

cEVR=complete extended virologic response. EOTR=end of treatment response. SVR<sub>12</sub> and

SVR<sub>24</sub>=sustained virologic response 12 and 24 weeks post-treatment, respectively.

Table 1: Baseline demographic and disease characteristics

Parameter	Value
N	10
Age, median years (range)	62 (52–70)
Male sex, n (%)	4 (40)
Japanese race, n (%)	10 (100)
Host <i>IL28B</i> genotype, <sup>a</sup> n (%)	
CC	2 (20)
CT	8 (80)
HCV genotype 1b, n (%)	10 (100)
HCV RNA, mean log <sub>10</sub> IU/mL (SD)	6.8 (0.61)
ALT, mean U/L (SD)	60.6 (32.9)
Platelets x 10 <sup>9</sup> cells/mL, median (min, max)	150.5 (84.0, 166.0)
Total bilirubin, median mg/dL (min, max)	0.8 (0.6, 1.2)
Albumin, median g/dL (min, max)	3.9 (3.1, 4.2)
INR, median (min, max)	1.0 (1.0, 1.1)

<sup>a</sup> SNP rs12979860

INR=international normalized ratio

Table 2: On-treatment adverse events occurring in  $\geq 2$  patients

Event	Patients, n (%)
Diarrhea	7 (70)
Headache	4 (40)
ALT increased	3 (30)
AST increased	3 (30)
Lymphopenia	2 (20)
Abdominal discomfort	2 (20)
Malaise	2 (20)
Pyrexia	2 (20)
Nasopharyngitis	2 (20)
Lipase increased	2 (20)
Back pain	2 (20)

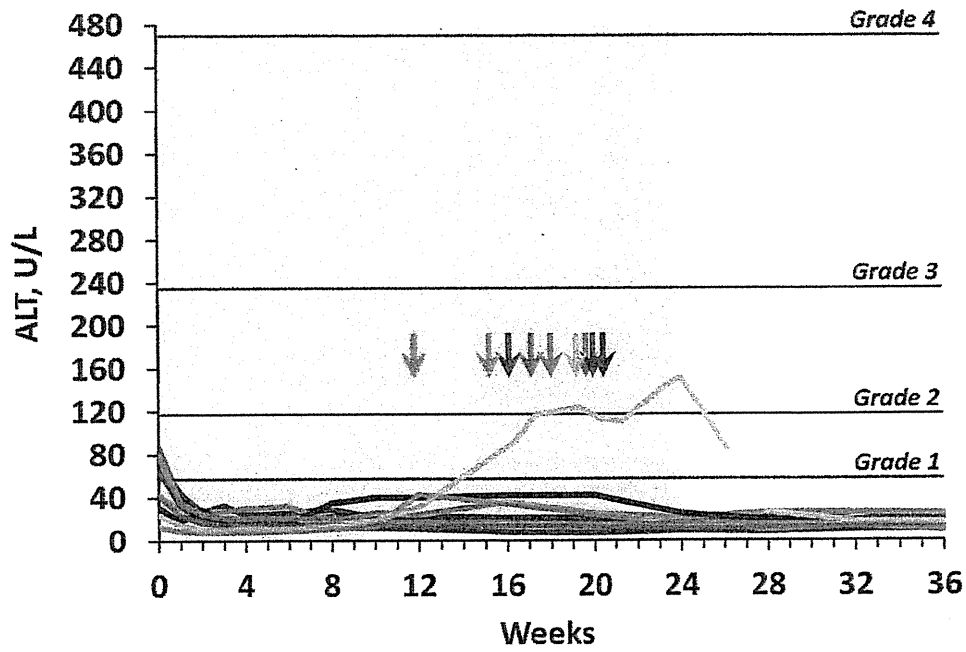


Figure 1  
105x72mm (300 x 300 DPI)

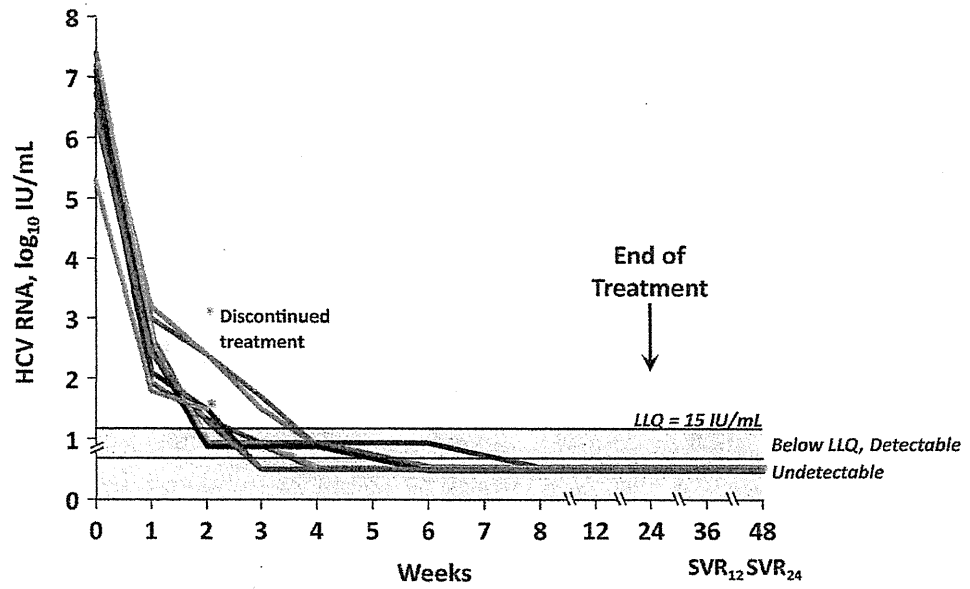


Figure 2  
122x75mm (300 x 300 DPI)

Accepted



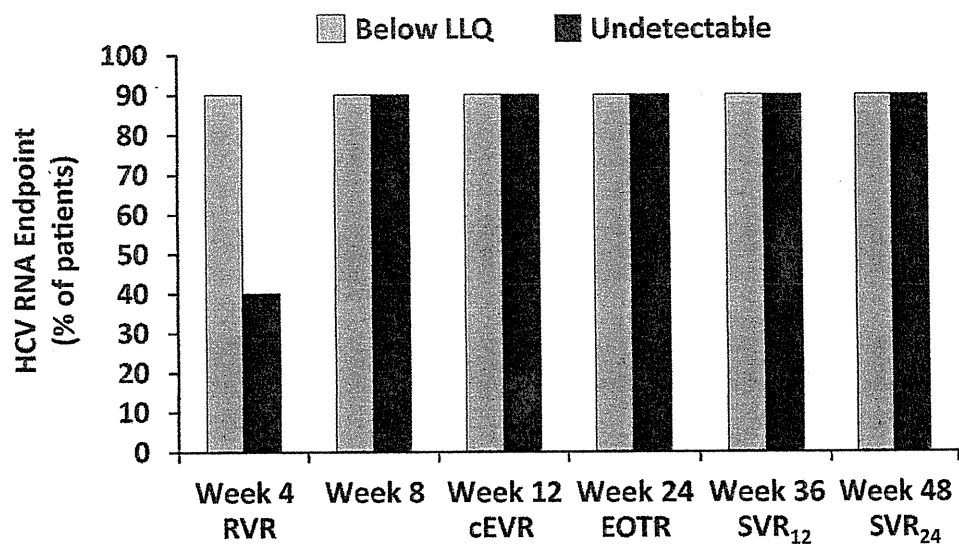


Figure 3  
111x63mm (300 x 300 DPI)

Accepted

<短 報>

## NS5A 阻害剤と NS3 プロテアーゼ阻害剤併用投与における 早期の抗ウイルス効果

鈴木 義之<sup>1)\*</sup> 瀬崎ひとみ<sup>1)</sup> 芥田 憲夫<sup>1)</sup> 鈴木 文孝<sup>1)</sup> 瀬古 裕也<sup>1)</sup>  
 今井 則博<sup>1)</sup> 平川 美晴<sup>1)</sup> 川村 祐介<sup>1)</sup> 保坂 哲也<sup>1)</sup> 小林 正宏<sup>1)</sup>  
 斎藤 聡<sup>1)</sup> 荒瀬 康司<sup>1)</sup> 池田 健次<sup>1)</sup> 小林万利子<sup>2)</sup> 熊田 博光<sup>1)</sup>

緒言：C型慢性肝炎に対する現在の標準治療はペグインターフェロン (PEG-IFN) 製剤とリバビリン (Riba) の併用投与が基本であるが、最近では、効果の向上と治療期間の短縮を目的に新たな蛋白合成阻害剤の併用試験が行われ良好な結果が得られることが報告されている。芥田らの報告によれば PEG-IFN + Riba に蛋白合成阻害剤である telaprevir を加えた三剤併用投与では、24 週間の投与で 60% 以上の完全著効がえられており、今後の治療の主流をなしていくと思われる<sup>1)</sup>。今回我々は更なる治療効果の向上を目指して NS5A 阻害剤と NS3 阻害剤の併用投与を行い、治療早期の抗ウイルス効果につき検討を行ったので報告する。

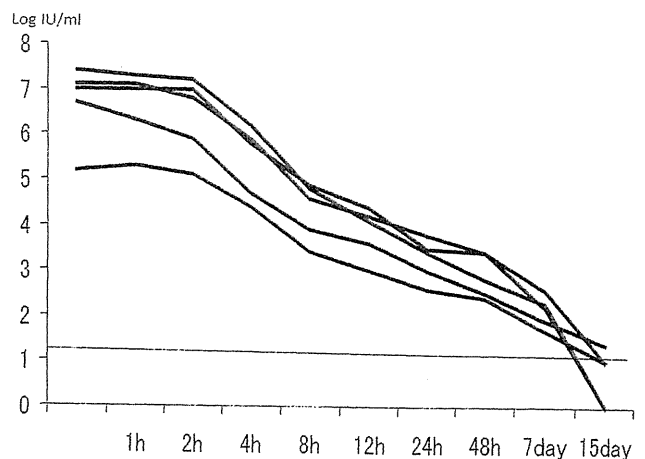


Fig. 1 Changes in hepatitis C (HCV) RNA concentration over duration of study treatment

対象と方法：標準治療である PEG + Riba 併用療法を 24 週以上行いながらも、開始前のウイルス量から 2 log IU/ml 以上の低下が認められなかった HCV-1b 高ウイルス量の null-responder の 5 例を対象とした。2 種類の NS5A と NS3 に対する阻害剤を経口で連日 24 週間投与するという治療計画であり、NS5A 阻害剤は 60 mg を 1 日 1 回、NS3 阻害剤は 600 mg を 1 日 2 回いずれも食後に併用投与した。投与初日は、1, 2, 4, 8, 12 時間後に、また、24, 48 時間後とさらに 7, 15 日目に HCV-RNA 量を経時的に測定し、投与早期の抗ウイルス効果を解析した。HCV-RNA の測定は Taqman PCR 法を用いて行い、1.2 log IU/ml 未満でかつシグナルが検出されなくなった時点で陰性化したと判定した。

結果：投与 5 症例の背景を示すと、男性 2 例 (40%)、年齢の中央値は 60 歳 (53-69 歳)、IL-28B の SNP (rs8099917) は、TT 2 例、TG 3 例であった。また、ウイルス側の要因である core の変異は 70, 91 においては、1 例が double wild, 1 例が 70 mutant, 91 wild で、3 例が double mutant であり、ISDR 変異は、0 が 1 例、1 が 4 例であった。開始前の ALT 値は中央値で 70 IU/l (範囲 13~114)、HCV-RNA 量は中央値 7.0 log IU/mL (範囲 5.2~7.4) であった。投与後の経時的ウイルス量の変化を Fig 1 に示すが、2 log IU/mL 低下までにかかった時間はそれぞれ、4, 8, 8, 8, 12 時間と短時間で急激なウイルス量の減少が認められた。ウイルス低下速度と IL-28B 等の予測因子との関係の詳細を示すと、4 時間で 2 log IU/mL 低下した症例は、TT で core は 70 mutant, 91 wild であり、同様に 8 時間の 3 例は TT かつ double wild が 1 例、TG かつ double mutant が 2 例であった。12 時間かかった症例は TG かつ double mutant であった。また、15 日までに 2 例が陰性化、2

1) 虎の門病院肝臓内科

2) 虎の門病院肝臓研究室

\*Corresponding author: suzunari@interlink.or.jp

\$ 利益相反申告：熊田博光 Bristol-Myers Squibb

<受付日2010年11月18日><採択日2010年12月8日>

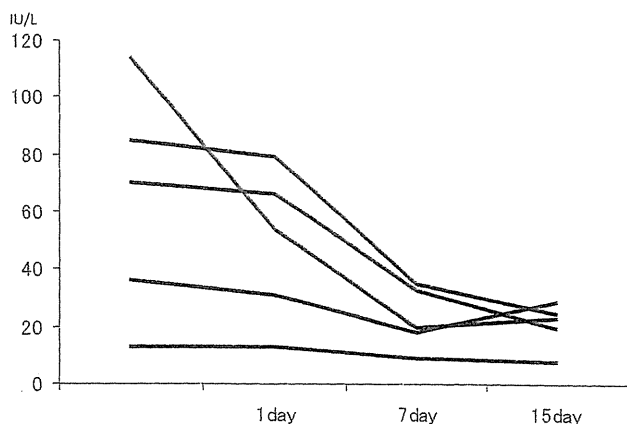


Fig. 2 Changes in ALT over duration of study treatment

例が測定感度以下に低下している。次に Fig. 2 に示すように ALT 値は 7 日で全例正常化し、途中中止の 1 例を除きその後も正常域を維持している。

投与中止例となった症例は 60 歳の女性で、開始 7 日目には AST/ALT とも正常化し、10 日目までは副反応もなく、ウイルス量も 5.2 から 1.7 と良好な減少を示した。開始 10 日目に高脂肪食を摂取後より軟便、下痢をきたし発熱と共に炎症所見の上昇が認められた。これに対して抗生剤の投与を開始ししだいに解熱傾向となった。肝胆道系酵素の上昇は当初認められず、ビリルビン値のみが上昇、16 日目に 6.5 mg/dl まで上昇したため服用を中止した。20 日目より AST 優位の肝酵素の上昇が認められ投与 30 日目に 432/315 IU/l とピークを迎えその後低下した。この間、胆道系酵素の上昇は一度も認められておらず、ビリルビン値も薬剤中止後速やかに低下している。ウイルスは 15 日目に 1.2 log IU/mL > 陽性であったが、中止 2 週後に陰性化し、その後投与終了 24 週まで陰性を持続している。本症例のウイルス消失については、肝炎の再燃に伴いウイルス排除が起こった可能性も否定できないが肝酵素上昇のピークよりも前にすでにウイルスは消失しており、本治療薬による効果の可能性が高いと判断している。

考察：新たな C 型慢性肝炎治療薬である NS5A 阻害剤と NS3 阻害剤の併用投与における早期の抗ウイルス効果につき報告した。NS5A は多機能性蛋白質であり、in vitro および in vivo における HCV の複製に必要であり、ヒトでの相同体が知られていないことから HCV 治療の標的として期待されている。また、非構造蛋白質 (NS)3 の N 末端はセリンプロテアーゼ (NS3 プロテ

アーゼ) であり、NS4A と協力して蛋白質分解活性を有する複合体を形成する。NS3/4A プロテアーゼ複合体の活性は、in vitro でのウイルス複製に非常に重要な役割を果たしており、今回の薬剤は NS3 プロテアーゼに特異的な阻害活性を有している。

少数例の検討ではあるものの早期の抗ウイルス効果はこれまでに類を見ないくらい良好であり、15 日目には 40% の症例に陰性化が得られたということは対象が PEG+Riba の null responder ということをお断すれば十分すぎる効果といえる。特に IL-28B が TG であり、core が double mutant で、前回の PEG+Riba 治療が null responder というような最難治例において、現状の治療では SVR の望みがほとんどないような症例が 3 例とも投与開始後 12 時間以内にウイルスの十分な低下が得られていることは特筆すべきものがある。これまで 1b 型高ウイルス量症例に対する標準的治療では、約 50% の SVR がえられるものの、その治療効果の向上のためには投与期間の延長や他の薬剤の併用などといった更なる負担が課せられてきた。今回の経口剤投与のみの治療においては、IFN に伴うような感冒様症状、食欲不振、貧血などの副反応は認められていない。我々はこれまでにテラプレビル単剤投与にて SVR を獲得した症例の報告をしてきた<sup>2)</sup>。本症例は 1b 型で低ウイルス量であるものの副反応の出現もなく 24 週間の経口剤のみの投与で完全著効がえられた。また、最近では polymerase inhibitor (RG7128) と danoprevir の組み合わせで早期に抗ウイルス効果が認められるという報告や<sup>3)</sup>、danoprevir 単剤投与は早期に抗ウイルス効果を発揮すると共に HOMA-IR を改善するといった報告<sup>4)</sup>もあり、IFN を使用しない治療法が盛んに試されまた治療効果に期待がもたれている。今回の症例が今後どのような経過をとるのかは投与予定期間の 24 週が終了してみなければ断定できないが、現時点ではこれまでの中で最も抗ウイルス効果の高い治療に無反応であった症例全てにおいてウイルスが陰性化したということは評価できることと考える。今後さらに経過を観察すると共に、副反応の出現にも注意を怠らないことが肝要であると思われる。

索引用語：C 型肝炎ウイルス、NS5A 阻害剤、プロテアーゼ阻害剤

文献：1) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. Hepatology 2010; 52 (2): 421—429 2) Suzuki F,

Suzuki Y, Akuta N, et al. J Clin Virol 2010; 47 (1): 76—78  
3) Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, et al. Lancet 2010; 376 (9751): 1467—1475  
4) Moucari R, Forestier N, Larrey D, et al. Gut 2010; 59 (12): 1694—1698

#### 英文要旨

#### Effect of early antiviral agent therapy (NS3 and NS5A inhibitors) in chronic hepatitis C null responders

Yoshiyuki Suzuki<sup>1)\*</sup>, Hitomi Sezaki<sup>1)</sup>,  
Norio Akuta<sup>1)</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>1)</sup>,  
Hiroya Seko<sup>1)</sup>, Norihiro Imai<sup>1)</sup>,  
Miharu Hirakawa<sup>1)</sup>, Yuusuke Kawamura<sup>1)</sup>,  
Tetsuya Hosaka<sup>1)</sup>, Masahiro Kobayashi<sup>1)</sup>,  
Satoshi Saitoh<sup>1)</sup>, Yasuji Arase<sup>1)</sup>,  
Kenji Ikeda<sup>1)</sup>, Mariko Kobayashi<sup>2)</sup>,  
Hiromitsu Kumada<sup>1)</sup>

To further improve therapeutic effect on chronic hepatitis C, we have administered NS3 inhibitor and NS5A inhibitor together, and examined effects of early antiviral agent therapy. The subjects were five cases where interferon is ineffective (null responders). The NS5A and NS3 inhibitors are oral drugs and were daily administered for 24 weeks. Figure 1 shows time-dependent change of the number of viruses after the therapy started, and rapid decrease of viruses is recognized. Within 12 hours, HCV-RNA decreased by more than 2 log IU/ml in every patient. Two patients became negative for the virus by the 15th day after the therapy started. Furthermore, 80% of cases by the 28th day and all the cases by the 56th day became negative. The new therapy has manifested excellent early antiviral effect.

**Key words:** hepatitis C virus, NS5A inhibitor, protease inhibitor

*Kanzo* 2011; 52: 147—149

1) Department of Hepatology, Toranomon Hospital

2) Liver Research Laboratory, Toranomon Hospital

\*Corresponding author: [suzunari@interlink.or.jp](mailto:suzunari@interlink.or.jp)

<速報>

## 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

保坂 哲也<sup>1)\*</sup> 鈴木 文孝<sup>1)</sup> 小林 正宏<sup>1)</sup> 瀬古 裕也<sup>1)</sup> 今井 則博<sup>1)</sup>  
 平川 美晴<sup>1)</sup> 川村 祐介<sup>1)</sup> 瀬崎ひとみ<sup>1)</sup> 芥田 憲夫<sup>1)</sup> 鈴木 義之<sup>1)</sup>  
 斎藤 聡<sup>1)</sup> 荒瀬 康司<sup>1)</sup> 池田 健次<sup>1)</sup> 小林万利子<sup>2)</sup> 熊田 博光<sup>1)</sup>

緒言：B型肝炎に対する核酸アナログ療法の有効性は広く知られており、経過観察期間が長くなるにつれ、B型肝炎治療の最終目標であるHBs抗原(HBsAg)消失を得られる症例も散見されている。本邦及び海外からいくつかの報告もあるが<sup>1)~4)</sup>、いまだ長期に渡る核酸アナログ使用例での報告はない。今回我々は長期間の核酸アナログ治療によるHBsAg消失とその関連因子について検討した。

肝疾患に対して、ラミブジン単独投与を開始した769例を対象とした。これら全ての症例で6カ月以上のHBV持続感染を確認した。核酸アナログ投与内容の内訳はラミブジン単独投与継続306例、ラミブジン投与開始後耐性ウイルス出現に対してラミブジン+阿德フォビル併用を行った症例297例、ラミブジン→エンテカビルへの切り替え症例166例であった。これらの症例のうち、何らかの理由で投与中止した症例は46例存在し、それ以外の症例はすべて継続投与を行った。HBsAg測定はCLIA法(ARCHITECT®HBsAgQT)を用いた。

対象と方法：1995年～2006年までに当院でB型慢性

Table Factors associated with HBsAg clearance by univariate and multivariate analysis.

factors	Univariate		Multivariate	
	Hazard Ratio (95%CI)	P	Hazard Ratio (95%CI)	P
Age (≥50yr)	0.94 (0.48-1.89)	0.865		
Gender (F)	0.59 (0.21-1.68)	0.323		
Family history of HBV infection	<b>0.43 (0.22-0.84)</b>	<b>0.014</b>		
Presence of cirrhosis	0.79 (0.56-1.12)	0.192		
Previous IFN therapy	<b>2.70 (1.31-5.59)</b>	<b>0.007</b>	<b>2.96 (1.34-6.54)</b>	<b>0.008</b>
HBV genotype (A)	<b>3.39 (2.27-5.08)</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>3.64 (2.40-5.52)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
HBeAg (positive)	1.23 (0.61-2.48)	0.563		
HBV DNA (≥6.0 logcopies/mL)	1.20 (0.52-2.78)	0.674		
HBsAg (<2000 IU/mL)	1.40 (0.70-2.80)	0.346		
ALT (≥300 IU/L)	<b>1.47 (1.02-2.11)</b>	<b>0.040</b>		
Platelets count (<1.2×10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.91 (0.34-2.43)	0.123		
<i>Treatment response at 6 months</i>				
HBeAg positive → clearance	<b>3.15 (1.49-6.66)</b>	<b>0.003</b>	<b>2.22 (1.01-4.88)</b>	<b>0.046</b>
HBV DNA (<2.6 logcopies/mL)	<b>3.56 (1.22-10.4)</b>	<b>0.021</b>	<b>4.07 (1.36-12.2)</b>	<b>0.012</b>

The bolded numbers: statically significant.

Abbreviation: HBsAg, Hepatitis B surface antigen; IFN, interferon; HBeAg: Hepatitis B envelope antigen

1) 虎の門病院肝臓センター

2) 虎の門病院肝臓研究室

\*Corresponding author: hosa-p@toranomcn.gr.jp

<受付日2011年2月1日><採択日2011年3月2日>

ラミブジン開始後の HBsAg 消失に寄与する因子について Cox 比例ハザードモデルを用いて、単変量及び多変量解析を行い検討した。

結果：ラミブジン投与開始からの観察期間の中央値は 6.3 年 (0.7-13.5 年) であった。ラミブジン投与前に IFN 治療歴を有する症例が 297 例 (39%) 存在した (投与期間の中央値は 27 週 (2-575 週))。HBV 感染の家族歴を有する症例が 538 例 (70%) 存在した。ラミブジン投与開始後の HBsAg 消失は 33 例で認められた (内訳は投与中消失 31 例、投与終了後消失 2 例)。全体での累積 HBsAg 消失率は 5 年 : 1.8%、10 年 : 7.3% であった。HBsAg 消失に寄与する因子について単変量解析を行ったところ、抽出された因子は、家族歴あり (48% vs. 74%)、IFN 治療歴あり (64% vs. 37%)、genotype A (25% vs. 2.6%)、開始時 ALT 高値 (300 IU/L 以上) (33% vs. 20%)、治療開始 6 カ月以内の HBe 抗原消失 (30% vs. 12% : HBeAg 持続陽性例や持続陰性例に比して)、治療開始後 6 カ月時点での HBVDNA 陰性化 (<2.6 log copies/ml) (85% vs. 67%) の 6 因子が抽出された (Table)。また治療法別で検討すると、ラミブジン単独またはエンテカビル切り替え症例では、ラミブジン+阿德フォビル併用療法症例に比して HBsAg 消失率が高率であった (P=0.014)。

上記の因子を用いて、HBsAg 消失に寄与する因子について多変量解析を行ったところ、独立因子として genotype A、IFN 治療歴、治療開始 6 カ月時点で HBeAg 陽性→陰性化、治療開始後 6 カ月時点での HBVDNA 陰性化の 4 因子が抽出された (Table)。

考察：今回の検討では核酸アナログ投与後の HBsAg 消失には HBV genotype が強く関わっている事が分かった。これまでテルビブジンや PegIFN での報告のように<sup>4)5)</sup>、genotype A では HBsAg 量の低下が、他の genotype より起こりやすいため、HBsAg 消失が起こりやすいと考えられる。また IFN 治療歴や核酸アナログ治療早期の反応性などが HBsAg 消失に寄与し、治療開始時 ALT の上昇が強い症例でも HBsAg が消失しやすい傾向にあったことから、核酸アナログ治療により HBsAg を消失させるためには、核酸アナログ自体の抗ウイルス作用だけでなく、宿主の免疫反応が必要と推察される。今後 HBsAg 消失を目指した、核酸アナログ治療法の工夫が望まれる。この研究はラミブジン投与症例での検討であるが、今後は現在の標準治療であり、薬剤

耐性出現が極めて低率のエンテカビル投与症例での検討も必要と思われる。

索引用語：HBsAg、核酸アナログ、IFN

文献：1) Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al. J Med Virol 2007; 79: 1472—1477 2) Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, et al. Antiviral Ther 2007; 12: 73—82 3) Gish RG, Chang TT, Lai CL, et al. J Viral Hepat 2010; 17: 16—22 4) Wursthorn K, Jung M, Riva A, et al. Hepatology 2010; 52: 1612—1620 5) Moucari R, Martinot-Peignoux M, Mackiewicz V, et al. Antivir Ther 2009; 14: 1183—1188

## 英文要旨

Clearance of hepatitis B surface antigen during  
long-term nucleot(s)ide analogues treatment  
in chronic hepatitis B

Tetsuya Hosaka<sup>1\*</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>1)</sup>,  
Masahiro Kobayashi<sup>1)</sup>, Yuya Seko<sup>1)</sup>, Norihiro Imai<sup>1)</sup>,  
Miharu Hirakawa<sup>1)</sup>, Yusuke Kawamura<sup>1)</sup>,  
Hitomi Sezaki<sup>1)</sup>, Norio Akuta<sup>1)</sup>, Yoshiyuki Suzuki<sup>1)</sup>,  
Satoshi Saitoh<sup>1)</sup>, Yasuji Arase<sup>1)</sup>, Kenji Ikeda<sup>1)</sup>,  
Mariko Kobayashi<sup>2)</sup>, Hiromitsu Kumada<sup>1)</sup>

Clearance of HBsAg is considered the ultimate goal in the treatment for chronic hepatitis B. We analyzed clinical factors associated with HBsAg clearance during long-term nucleot(s)ide analogue treatment. By univariate analysis, HBV genotype, family history of HBV infection, previous IFN therapy, HBeAg clearance at 6 months, and undetectable HBV DNA at 6 months were significant predictive factors. By multivariate analysis, HBV genotype, previous IFN therapy, HBeAg clearance at 6 months, and undetectable HBV DNA at 6 months were independent and significant predictive factors of HBsAg clearance. We conclude that patients with genotype A have high probability of HBsAg clearance, and it seems that not only the antiviral potential of nucleot(s)ide analogue but host immune response is needed to achieve HBsAg clearance.

**Key words:** hepatitis B surface antigen,  
nucleot(s)ide analogues, interferon

*Kanzo* 2011; 52: 255—257

- 1) Department of Hepatology, Toranomon Hospital,  
Tokyo
- 2) Department of Research Institute for Hepatology,  
Toranomon Branch Hospital, Kawasaki

\*Corresponding author: hosa-p@toranomon.gr.jp

## &lt;短 報&gt;

コバス TaqMan HBV 「オート」 v2.0 における同一時の  
血清検体と血漿検体の HBV DNA 検出率の検討

小林万利子<sup>1)\*</sup> 鈴木 文孝<sup>2)</sup> 鈴木 義之<sup>2)</sup> 芥田 憲夫<sup>2)</sup> 瀬崎ひとみ<sup>2)</sup>  
 川村 祐介<sup>2)</sup> 瀬古 裕也<sup>2)</sup> 保坂 哲也<sup>2)</sup> 小林 正宏<sup>2)</sup> 斉藤 聡<sup>2)</sup>  
 荒瀬 康司<sup>2)</sup> 池田 健次<sup>2)</sup> 熊田 博光<sup>2)</sup>

緒言：HBV DNA の測定は、1996 年に分岐 HBV DNA プローブ法が臨床応用されてから、検査技術の進歩に伴い TMA (transcription-mediated amplification) 法や PCR 法などの高感度な測定法の開発が進んできた。現在、日常の臨床で使用されている real-time PCR 法は、HBV DNA 量が 1.5~2.0 Log copies/mL 程度まで検出可能となった。今回我々は、TaqMan HBV v2.0 法(コバス TaqMan HBV「オート」v2.0<sup>1)</sup>；ロシュ・ダイアグノスティックス、東京)を用い、血清と血漿の同時採血を行い、各検体の有用性について検討を行ったので報告する。

対象と方法：対象は、B 型慢性肝炎および肝硬変の成人で Entecavir 投与 1 年以上経過し ALT (alanine aminotransferase) 値が 30 IU/l 以下を継続している 52 症例 (104 検体) とした。内訳は、男性 29 例 (55.8%)、年齢 52 歳：中央値 (27~81 歳) であった。HBV genotype は genotype A：2 例、genotype B：5 例、genotype C：44 例、typing 不能：1 例であった。52 症例に対し治療効果の均一化を計るため同一検体で 2 回の採血を実施し HBV DNA を測定した。2 回目のポイントの採血は、1 回目の採血後、8 週±2 週の間実施した。血清用採血管で全血 5 mL と血漿用採血管 (EDTA-2K) で全血 8 mL を採血、速やかに遠心分離後、TaqMan HBV v2.0 法 (最小検出感度は、血清検体：2.0 Log copies/mL、血漿検体：1.7 Log copies/mL) にて測定を行った。統計解析は、統計解析ソフトウェア STAT Flex ver. 5.0 を用い、P<0.05 で有意とした。本試験は、当院の倫理

審査委員会の承認を受け、実施についてのインフォームド・コンセントを行った。

結果：血清・血漿ペア検体 104 例のうち、血清と血漿の両方で HBV DNA を検出したのは、25 例 (24.0%)、両者ともに検出不能は、41 例 (39.4%) であったが、血清で検出したが血漿では検出不能であったのは、6 例 (5.8%) であり、血漿で検出したが血清では検出不能であったのは、32 例 (30.8%) で、血漿での検出率は、血清より有意 (P<0.001 [McNemar 検定]) に高率であった (Table 1)。

考察：核酸アナログ製剤を長期に投与することによりその耐性株の出現および肝炎の悪化が認められることから、特に若年者においては核酸アナログ製剤を中止することも考え、HBV DNA 量をはじめ、HBs 抗原、HB コア関連抗原などの種々の HBV マーカーについて検討が行われている<sup>2)</sup>。Drug free が可能な症例選定の必要条件の一つは HBV DNA の持続陰性化であり<sup>3)</sup>。投与中止後 ALT 値の再上昇による重症化・劇症化が懸念されることより、高感度に HBV DNA を検出することが重要である可能性がある。

そこで今回、我々は臨床検体を用い TaqMan HBV

Table 1 Detail correlation between plasma specimen (EDTA-2K) and serum specimen

		Serum	
		detected	not detected
plasma (EDTA-2K)	detected	25 (24.0%)	32* (30.8%)
	not detected	6* (5.8%)	41 (39.4%)

\*: P<0.001 [McNemar 検定]

1) 虎の門病院肝臓研究室

2) 虎の門病院肝臓センター

\*Corresponding author: vj7m-kbys@asahi-net.or.jp

<受付日 2011 年 8 月 19 日> <採択日 2011 年 9 月 2 日>



v2.0の血清検体と血漿検体の有用性の検討を行った。対象の104検体のうち血清または血漿のいずれかでHBV DNAを検出したのは、血清は5.8%に対し血漿では30.8%と血漿でのHBV DNAの検出率は統計学的有意差( $P < 0.001$ )をもって高率であった。一方、血清でHBV DNAを検出したが血漿では検出不能であった検体も5.7%存在したが、年齢、性別、genotypeなどに一定の偏りは無く、この現象は、最小検出感度未満の極めて低濃度の検体で発生するバラツキに起因する確率論的な現象と考えられた。

以上から、血漿検体を用いることにより血清検体より高感度にHBV DNAを測定することが可能となった。今後より高感度な測定が必要な分野での臨床応用が期待される。

索引用語：B型肝炎ウイルス、  
TaqMan PCR法、高感度

文献：1) Goedel S, Rullkoetter M, Weisshaar S, et al. *Journal of Clinical Virology* 2009; 45: 232—236  
2) Matsumoto A, Tanaka E, Minami N, et al. *Hepatology Research* 2007; 37: 661—666  
3) 田中榮司. 厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)総括研究報告書, 2010, H21-肝炎一般-001

### 英文要旨

The evaluation of the sensitivity between serum and plasma specimen for COBAS TaqMan HBV v2.0

Mariko Kobayashi<sup>1)\*</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>2)</sup>,  
Yoshiyuki Suzuki<sup>2)</sup>, Norio Akuta<sup>2)</sup>, Hitomi Sezaki<sup>2)</sup>,  
Yusuke Kawamura<sup>2)</sup>, Yuya Seko<sup>2)</sup>, Tetsuya Hosaka<sup>2)</sup>,  
Masahiro Kobayashi<sup>2)</sup>, Satoshi Saitoh<sup>2)</sup>, Yasuji Arase<sup>2)</sup>,  
Kenji Ikeda<sup>2)</sup>, Hiromitsu Kumada<sup>2)</sup>

The sensitivity in serum and plasma for HBV DNA was evaluated by using 104 clinical specimens from 52 patients who were treated with entecavir for  $\geq 1$  year and continued ALT levels  $\leq 30$  IU/l. The measurement employed the COBAS TaqMan HBV v2.0. Twenty-five specimens (24.0%) were detected from both serum and plasma, and 41 specimens (39.4%) were not detected from both. On the other hand, there were 32 specimens (30.8%) with detectable from plasma but undetectable from serum, and only 6 specimens (5.8%) with detectable from serum but undetectable from plasma. This result suggested the sensitivity of HBV DNA using plasma specimen is more sensitive than that of serum specimen with statistical significance ( $p < 0.001$ ).

**Key words:** hepatitis B virus, TaqMan,  
high sensitivity

*Kanzo* 2011; 52: 756—757

- 1) Research Institute for Hepatology, Toranomon Hospital
  - 2) Department of Hepatology, Toranomon Hospital
- \*Corresponding author: vj7m-kbys@asahi-net.or.jp

## REVIEW

## Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan

Takeshi Okanoue,<sup>\*,†</sup> Atsushi Umemura,<sup>\*</sup> Kohichiroh Yasui<sup>†</sup> and Yoshito Itoh<sup>†</sup>

<sup>\*</sup>Center of Gastroenterology and Hepatology, Saiseikai Suita Hospital, Osaka and <sup>†</sup>Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

### Key words

diabetes mellitus, obesity, metabolic syndrome.

### Correspondence

Dr. Takeshi Okanoue, Center of Gastroenterology and Hepatology, Saiseikai Suita Hospital, 1-2 Kawazono-cho Suita, Osaka 564-0013, Japan. Email: okanoue@suita.saiseikai.or.jp

### Conflict of interest

The authors do not have any conflicts of interest to disclose.

### Abstract

During the past 20 to 30 years, the frequency of patients presenting with nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD) has increased gradually in Japan in proportion to the increase in the population with life-style related diseases. We describe here the current status of the clinical and basic aspects of research into NAFLD in Japan.

The increase in the incidence of life-style-related diseases has resulted in an increase in NAFLD throughout the past 20 to 30 years. The rate of obesity in the population is not high compared to western countries but the incidence of NAFLD is similar to those countries. In 2008 we started a nationwide study of NAFLD which has been supported by the Ministry of Labor and Welfare Japan. In this project, we planned to investigate the epidemiology, genetic backgrounds and biochemical markers, and liver injury in patients with diabetes mellitus (DM) and hepatocellular carcinoma in NASH, and treatment of NASH. Approximately 20 to 25% of DM patients showed NAFLD in which the prevalence of NASH might be more than 30 to 40%. Fortunately, we have been able to obtain very interesting results from our group studies, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) which will be published in the near future.

### Introduction

In 1980, Ludwig *et al.* proposed a new disease concept called nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a condition which may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). In Japan, much attention has been paid over the past few decades to patients infected with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), because the rates of carriage of these viruses are high and most cases of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) in Japan are associated with persistent HBV and HCV infection. In recent years, however, with the westernization of the Japanese lifestyle, public interest in lifestyle-related diseases has increased rapidly metabolic syndrome has attracted attention for its association with underlying insulin resistance, and the risk of dyslipidemia, and hypertension even in non-obese Japanese. In 2007, the Japan Society of Diabetes Mellitus reported that, among the causes of death for 18 385 individuals with diabetes, liver cancer was the leading cause (8.6%), while death from liver cirrhosis also was very common (4.7%). Altogether, 13.3% of death among diabetes patients were attributable to liver disease (Fig. 1);<sup>1</sup> however, the prevalence of hepatitis virus infections and heavy alcohol drinking were not analyzed in that paper.

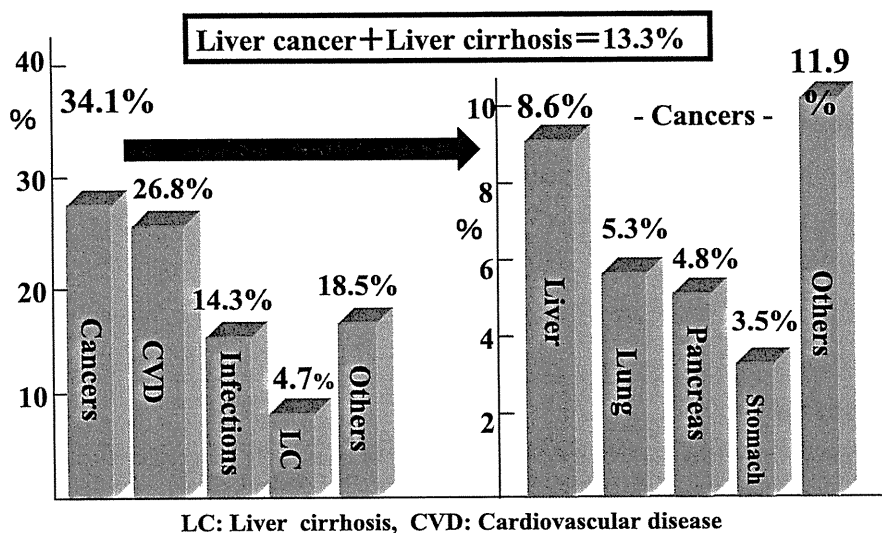
Seventy to seventy-five percent of HCC in Japan is associated with HCV infection, approximately 15% of patients are positive

for hepatitis B surface B antigen (HBsAg), and the remaining 10–15% are so-called non-B non-C HCC. The proportion of non-B non-C HCC increased from 6.8% in 1992 to almost twice that during the subsequent ten years. Total alcohol consumption in Japan has not increased in the past 15 years, the possibility arises that NASH is responsible for this apparent increase in non-B non-C HCC (Fig. 2).

Most Japanese are not obese but nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is becoming more common. At present, NASH is one of the most important liver diseases in Japan. In 2008, the Japan NASH Study Group (of which Takeshi Okanoue is a member) was founded, supported by the Ministry of Labor and Welfare, Japan. The purpose was to elucidate the epidemiology, pathophysiology, genetic backgrounds and long-term prognosis of NAFLD. Other objectives are to establish biochemical markers for differential diagnosis between simple steatosis (SS) and NASH, and devise treatment guidelines based on the individual pathophysiology of NASH.

### Epidemiology

In the last two decades, patients diagnosed with fatty liver by image analysis and with elevated serum alanine aminotransferase (ALT) increased in number in proportion to the increase in



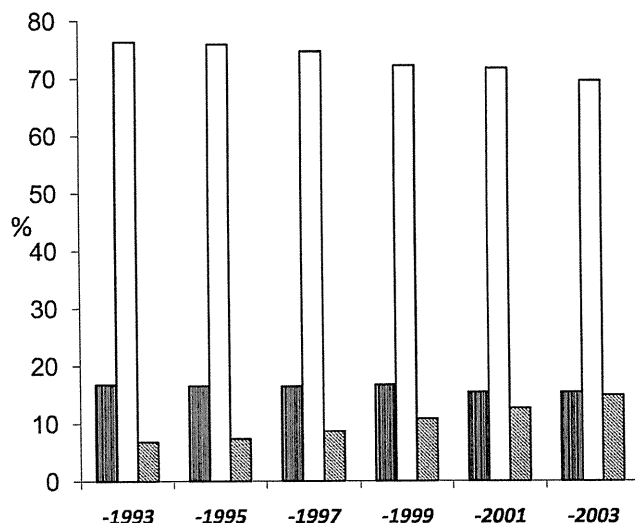
**Figure 1** Cause of death in diabetes mellitus patients in Japan. The leading cause of death in 18 385 diabetes mellitus patients, who died from 1991 to 2000, was cancer, the second was cardiovascular diseases, the third was infection and the fourth was liver cirrhosis. Among the cancer deaths, the highest rate was of hepatocellular carcinoma (8.6%; males: 10.5% and females: 5.2%). In the general Japanese population, the primary cause of cancer death is lung cancer, the next is gastric cancer, the third is colon cancer and the fourth is HCC in males.

lifestyle-related diseases, such as obesity, diabetes and dyslipidemia. The Japan Society of Ningen Dock (health check-up organization) reported in 2008<sup>2</sup> that the prevalence of liver dysfunction, including fatty liver, was 31.9% in men and 17.1% in women, based on a study carried out on 1 814 864 adult men and 1 136 903 adult women. The prevalence of obesity, liver dysfunction, and high levels of cholesterol and triglyceride showed no significant differences in distribution with age in men, but the prevalence increased with age in women; for those in their 60s, it reached a high level comparable to that in men. Glucose intolerance and high blood pressure increased with age in both men and women (Fig. 3a/3b). A comparison of annual variations showed increase of all these factors, but the increase was especially marked in the incidence of liver dysfunction, obesity, and hypercholesteremia, and these became prominent in the late 1990s (Fig. 4).

Kojima *et al.* reported that the prevalence of fatty liver detected by medical health checks increased year after year, from 12.6% in 1989 to 30.3% in 1998.<sup>3</sup> According to the report by the Japan Society of Ningen Dock in 2008, 26.2% of subjects who underwent health check-ups showed fatty liver by abdominal ultrasonography.<sup>2</sup>

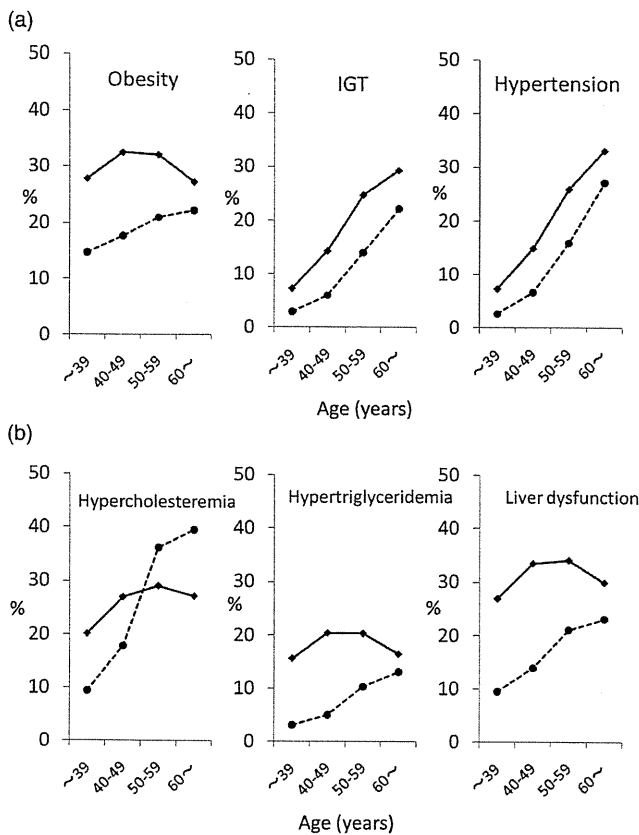
The majority of fatty liver disease comprises alcoholic fatty liver and NAFLD, including NASH. Tanaka *et al.* reported that approximately 25% of the health check-up examinees had fatty liver.<sup>4</sup> Hamaguchi *et al.* reported that the prevalence of NAFLD was 23.3% in Japanese adults.<sup>5</sup> There is a gender difference in the incidence of NAFLD; men are more likely to develop fatty liver. There is also a gender difference in the age distribution; in men, the incidence of fatty liver is about 25% and remains unchanged from the 30s to the 60s, whereas in women, the prevalence of fatty liver increases gradually with age and, in the 60s and beyond, reaches nearly the same level as in men. According to previous reports, the number of NAFLD patients is estimated to be 10 million (the population in Japan is around 130 million), and, from recent studies around 2% of them are considered to have NASH.

In 2008, a fact-finding survey was conducted on the causes of cirrhosis at the 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Hepa-



**Figure 2** Change of the etiology of hepatocellular carcinoma (HCC) in Japan from 1993 to 2003. Among the causes of HCC, the HCV infection rate was decreasing gradually and HBV infection showed no significant change; however, the prevalence of non B, non C HCC has doubled over the past 10 years. HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NBNC, non B, non C. ■, HBV; □, HCV; ▨, NBNC.

tology; 33 379 cirrhotic patients were enrolled in 58 hospitals, and 2.1% were diagnosed with NASH-induced cirrhosis (Fig. 5). According to that survey, the proportion of NASH cirrhosis is 1.4% in males and 3.4% in females, and there is a significant gender difference ( $P < 0.005$ ). In that study, obese subjects were few and, at that time, the concept of NASH was not yet commonly accepted by many Japanese doctors. Furthermore, many cases of advanced stage NASH show no fatty deposit, so-called “burn-out NASH”, resulting in the diagnosis of cryptogenic liver cirrhosis. Therefore, the actual incidence of NASH-related cirrhosis might be higher than was reported.

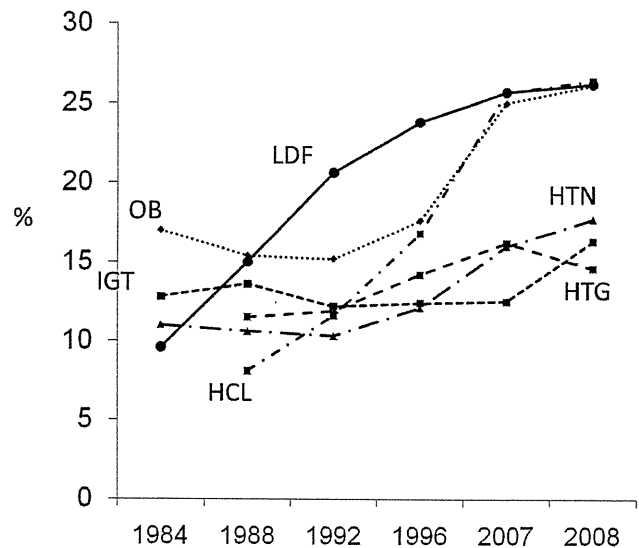


**Figure 3a/3b** The complication rates of life-style related diseases in the general population receiving health check-ups in 2008. In women, the prevalence of obesity, hypercholesteremia, hypertriglyceridemia, and liver dysfunction increased with age and, for women in their 60s, these reached a high level comparable to those in men. Glucose intolerance and high blood pressure increased with age in both sexes. IGT, impaired glucose tolerance. —●—, Male; - -■-, Female.

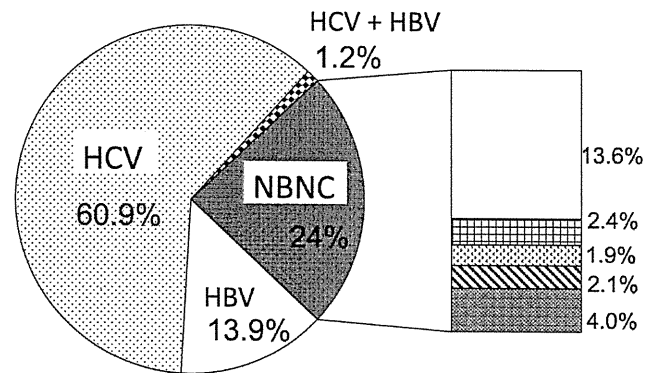
**Metabolic syndrome**

Patients with metabolic syndrome are increasing in number in Japan (Figs. 4,6). Visceral fat accumulation and insulin resistance are usual in these patients. The enhanced insulin resistance caused by the excessive accumulation of body fat (especially visceral fat) is considered to be important in the pathogenesis of fatty liver.

The diagnostic criteria for metabolic syndrome established by the Japanese Society of Internal Medicine are as follows:<sup>6</sup> an umbilical abdominal circumference (men: 85 cm or more; women: 90 cm or more) which reflects visceral fat accumulation (a visceral fat area of 100 cm<sup>2</sup> or more), and any two of the following four criteria: (i) elevated serum triglyceride level; (ii) reduced HDL cholesterol; (iii) elevated blood pressure; and (iv) elevated fasting plasma glucose. According to the National Health and Nutrition Examination Survey conducted in Japan in 2008, the prevalence of patients afflicted by metabolic syndrome was 25.3% among men and 10.6% among women, whereas patients with pre-metabolic syndrome (patients with an abdominal circumference of ≥85 cm in men and 90 cm in women, and who fulfill one other criterion) accounted for 21.9% of the men and 8.3% of the women. There-



**Figure 4** Annual variation of life-style related diseases in the general population. During the past 20 years all diseases significantly increased year by year. ....◆..., Obesity(OB); - -■-, Impaired Glucose Tolerance (IGT); —▲-, Hypertension(HTN); —■-, Hypercholesteremia(HCL); - -●-, Hypertriglyceridemia(HTG); —●-, Liver dysfunction(LDF).



**Figure 5** Etiology of liver cirrhosis in Japan. A nationwide survey was carried out in 2008 at the 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology. The non B, non C group occupied 24%, of which 2.1% were diagnosed as definite NASH. HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NBNC, non B, non C; PBC, primary biliary cirrhosis; AIH, autoimmune hepatitis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis. □, Alcohol; ▨, PBC; ▩, AIH; ▪, NASH; ■, Others.

fore, approximately half of Japanese men and about 20% of Japanese women might have metabolic syndrome or be predisposed to metabolic syndrome.<sup>7</sup>

The criteria for metabolic syndrome are useful for the screening of NAFLD. The previous report by Ishibashi *et al.* stated that abdominal circumference was well correlated with NAFLD in men, but not in women.<sup>8</sup> Waist circumference has been reported to be smaller in men than women and there has been considerable debate regarding whether this criterion is appropriate or not.<sup>9</sup> There is the possibility that the amount of visceral fat might be underestimated and that the estimate may detect fewer than the actual number of