

分担研究者：柘植 雅貴 広島大学自然科学研究支援開発センター 助教

研究要旨：B 型慢性肝疾患に対して長期間の核酸アナログ治療を行うことによって、薬剤耐性株の出現が問題となっている。本研究では、新規抗ウイルス薬であるテノホビルの有効性を検証するため、各種核酸アナログ耐性株を発現する HBV 発現プラスミドを作製し、これらのウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果について、検討を行った。その結果、*in vitro* の検討において、ラミブジン・アデホビル耐性株（rtA181T/N236T 株）において、野生株に比べてテノホビルに対する感受性が低下していることが示された。さらに、*in vivo* の検討においても、テノホビルを 2 週間経口投与することにより、野生株では 3.6 Log の低下が認められたのに対し、rtA181T/N236T 株では 2.3 Log の低下に止まり、感受性の低下が示唆された。さらに、追加実験により、この感受性の低下は、A181T 変異に伴うものではなく、N236T 変異に伴うものであることが示された。以上の結果から、ラミブジンやアデホビル耐性ウイルスは、テノホビルに対する感受性が低下しており、十分な抗ウイルス効果が得られない可能性が示された。

A. 研究目的

B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の使用が保険適応となって以降、治療成績は飛躍的に向上した。一方で、同治療は HBV の複製過程を阻害することにより、HBV の増殖を抑制するものであることから、肝細胞からの HBV 完全排除は困難であり、長期的な治療継続が不可欠と言える。そのため、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性ウイルスの出現が大きな問題となっており、特に近年では、複数の核酸アナログ製剤併用に伴う多剤耐性ウイルスの出現が増加している。

本研究では、新たな核酸アナログ治療薬として治験中であるテノホビルの薬剤耐性ウイルスに対する抗ウイルス効果について、*in vitro*、*in vivo* HBV 複製モデルを用いて検討を行った。また、HBV genotype による抗ウイルス効果の違いについても合わせて検討した。

B. 研究方法（含、倫理面への配慮）

当研究室では、HBV 複製培養肝癌細胞株を用いた *in vitro* モデルおよび HBV 持続感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* マウスモデルを作製し、これらのモデルが HBV に対する抗ウイルス薬の薬効評価系として有用であることを報告してきた。本研究では、これらのモデルを用いて、薬剤耐性株に対するテノホビルの抗ウイルス効果について検討を行った。

1) 薬剤耐性変を有する HBV 発現プラスミドの作製

これまでに、当研究室では、B 型慢性肝炎患者の保存血清より、DNA を抽出し、HBV ゲノムを増幅し、1.4 倍長の HBV ゲノム (genotype A および C) を組み込んだ HBV 発現プラスミドの作製に成功している。この HBV 発現プラスミドの HBV ゲノムにある RT 領域に薬剤耐性変異を導入し、薬剤耐性 HBV を発現するプラスミドを作製した。

2) *In vitro*におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討

1) で作製した各種 HBV 発現プラスミドを HepG2 細胞にトランスフェクションした後、培養上清中に核酸アナログを添加。72 時間後に細胞を回収し、細胞内複製中間体をリアルタイム PCR にて定量し、各種 HBV 株におけるテノホビルに対する感受性を検討。

3) *In vivo*におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討

HBV 発現プラスミドの HepG2 細胞へのトランスフェクションにより産生された HBV 粒子を、ヒト肝細胞キメラマウスに接種。HBV 感染が成立したマウスに対し、核酸アナログを経口投与し、マウス血清中の HBV-DNA の変化を検討。

C. 研究結果

昨年までの研究結果から、HBV 野生型並びにラミブジン耐性株 (rtL180M/M204V 株) では、TDF に対する感受性は良好であることが確認された。そこで、本年度の研究では、近年、問題となりつつあるラミブジン・アデホビル両剤耐性株である rtA181T/N236T 変異株に対するテノホビルの抗ウイルス効果について追加検討を行った。その結果、*in vitro*の検討により同 HBV 株は野生株と比較し、TDF の感受性が低下していることが確認され、IC50 は野生株で 0.55 μ M であったのに対し、rtA181T/N236T 変異株では 7.00 μ M と著明に低下した (図 1)。

図1. 各種薬剤耐性株におけるTDF感受性の検討 (*in vitro*)

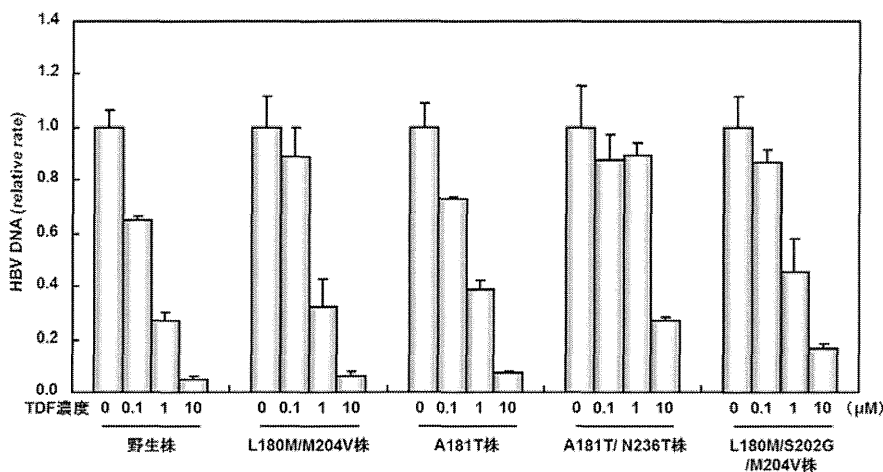
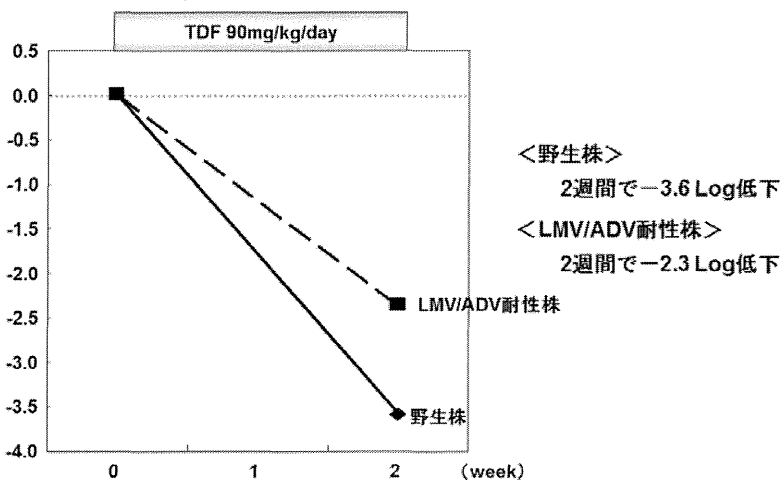


図2. LMV/ADV耐性株 (A181T/N236T) と野生株のTDF感受性の比較 (*in vivo*)



さらに、*in vivo*の検討においても、テノホビルを2週間投与することにより、マウス血清中の HBV DNA は野生株では約 3.6Log copies/ml 低下したのに対し、rtA181T/N236T 変異株では 2.3Log copies/ml の低下にとどまった (図 2)。

D. 考察

現在、核酸アナログ製剤は B 型慢性肝疾患治療薬として不可欠な存在となっている。しかしながら、HCV 感染と異なり、HBV 感染ではウイルスの完全排除が困難であることから、長期投与による肝炎の鎮静化並びに HBV 増殖抑制による発癌予防が主体となっている。エンテカビルの登場により、長期投与に伴う薬剤耐性株の出現例は減少しているものの、少数例存在し、現在、保険適応となっている

ずれの核酸アナログ製剤にも耐性や効果不良を呈する症例

も散見されるようになってきている。そのため、新規抗ウイルス薬の開発は不可欠であり、耐性ウイルスに対する対策の確立も急務となっている。

そこで、本研究では、ラミブジン・アデホビル耐性株として報告されている rtA181T/N236T 株を中心にテノホビルの有効性について検討を行った。図 1、図 2 で示すように、*in vitro*、*in vivo* いずれの検討においても、野生株ではテノホビルに対する感受性は良好であった。一方で、rtA181T/N236T 株では、*in vitro* での検討において、テノホビルを高濃度で添加すると抗ウイルス効果が認められたものの、野生株に比べ、IC50 が約 13 倍上昇していた (図 1)。同様に *in vivo* においても、テノホビル投与による HBV DNA 量の低下は -2.3Log (2 週間投与、野生株: -3.6Log) にとどまり、両結果を考慮すると、臨床的には十分な抗ウイルス効果が得られない可能性が示唆された。

これまで、テノホビルは薬剤耐性変異の少ない核酸アナログ製剤とされ、ラミブジン、アデホビル、エンテカビルのいずれにも耐性を示すような多剤耐性変異株にも効果が期待され、国内の治験も進められているが、本研究で示したように、アデホビル耐性変異である rtN236T 変異を有する株には抗ウイルス効果が乏しいことが予測される。一方で、アデホビル投与例の中には、薬剤の血中濃度が十分に上昇しないために十分な抗ウイルス効果が得られない症例も存在する。そのため、臨床においては、十分な耐性変異の診断を行った上で、テノホビル投与を検討することが重要と考えられる。

テノホビルの保険適応による治療選択の拡大が期待される一方で、さらなる多剤耐性ウイルスの出現も予測され、多剤耐性ウイルスの出現を回避することは、今後の大きな課題と言える。

E. 結論

In vitro、*in vivo* の HBV 複製・感染モデル

を用いた検討の結果、ラミブジン・アデホビル耐性株 (rtA181T/N236T 株) は、テノホビルによる抗ウイルス効果が十分に得られない可能性があり、使用前には十分な耐性変異の検索を行った上で、使用を検討すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K.

Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.

PLoS One. 7(10): e47490, 2012.

- 2) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K.

Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.

Hepatology 56(2): 555-66, 2012.

- 3) 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰.
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 薬剤感受性評価と臨床への応用
肝胆膵 65(4): 591-600, 2012
- 4) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰.
HBV RT 領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討

- 消化器内科 54(5): 575-581, 2012
- 5) 柘植雅貴、茶山一彰.
B型肝炎の抗ウイルス療法 ③核酸アナログ (ラミブジン/アデホビル/エンテカビル/テノフォビル)
インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝炎ウイルス - B型・C型 38-43, 2012
 2. 学会発表
 - 1) Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama.
The effects on gene expression profiles in human hepatocytes by HBV and HCV infection.
22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター
 - 2) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama.
Evaluation of antiviral effects of nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus using in vitro and in vivo models.
22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター
 - 3) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰.
血液悪性腫瘍に対する化学療法施行例における HBV 再活性化と核酸アナログ製剤による再活性化予防効果の解析
第 16 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 1
 - 4) 小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰.
当院における B 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果の検討
第 54 回日本消化器病学会大会 ポスター
 - 5) 柘植雅貴.
薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログの抗ウイルス効果
Hepatology Meeting in Japan 2012 一般演題
 - 6) 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰.
HBV 薬剤耐性変異株に対するテノホビルの抗ウイルス効果
第 48 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 5
 - 7) 村上英介、柘植雅貴、今村道雄、小林知樹、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平賀伸彦、平松 憲、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰.
HBV 既往感染者に対する血液悪性疾患化学療法時の核酸アナログ製剤による HBV 再活性化予防についての検討
第 48 回日本肝臓学会総会 一般演題
 - 8) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰、川上広育.
B 型慢性肝炎に対する Lamivudine, interferon- α による Sequential therapy における治療効果と Th1/Th2 バランスの検討
広島・山口肝疾患研究会
 - 9) 小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰.
当院における B 型慢性肝炎 7 例に対するペグインターフェロン (PEG-IFN) α -2a の治療成績
第 98 回消化器病学会中国地方会 一般演題
 - 10) Masataka Tsuge, Tomohiko Kohno, Nobuhiko Hiraga, Hiromi Abe, Daiki Miki, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama.
Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication

with targeting to HB core region.
63rd Annual Meeting of the American
Association for the Study of Liver
Diseases (AASLD) ポスター

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究者：今井康陽 市立池田病院 副院長

研究協力者：澤井良之 市立池田病院 消化器内科 副部長

水本 壘 市立池田病院 消化器内科

研究要旨：B型慢性肝疾患の治療において、ラミブジン（LAM）に対する薬剤耐性に対する治療法としてアデホビル（ADV）の併用投与が行われているが、ウイルス量の低下に乏しい症例が散見される。そこで我々は、LAM+ADV併用療法の有効性、すなわち、HBV-DNA陰性化に関する因子について検討した。当院でLAM+ADV投与を行ったB型慢性肝疾患22例を対象とした。LAM+ADV併用投与1、2、3年後のKaplan-Meier法によるHBV-DNA累積陰性化率は67.2%、73.5%、82.4%であった。HBV-DNA陰性化に関する因子の検討のためCox比例ハザードモデルを用いた単変量解析を行ったところ、ADV投与開始時のHBe抗原の有無、ADV投与開始時のHBV-DNA量、ADV投与後IVRの有無がHBV-DNA陰性化に関与する因子として選択された。多変量解析ではADV投与後IVRの有無が有意な因子であった。LAM+ADV投与中の累積HBV-DNA陰性化率はADV投与後IVR(+)症例、HBV-DNA<6 log copy/mlの症例にて高率であった。またLAM+ADV療法不応例に対しADVよりTenofovirへの切り替えを1例行ったが、投与開始12wにて陰性化を認めた。LAM+ADV併用療法において、HBV-DNA陰性化にはADV投与開始前のHBV-DNA量が低値であること、ADV投与後IVRの有無が関与している可能性が示唆された。LAM+ADV併用療法において、HBV-DNAが陰性化に至らない症例も存在し、HBV-DNA非陰性化例に対する対策が必要と考えられた。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患の治療において、ラミブジン（LAM）に対する薬剤耐性に対する治療法としてアデホビル（ADV）の併用投与が行われているが、ウイルス量の低下に乏しい症例が散見される。そこで我々は、LAM+ADV併用療法の有効性を規定する因子について検討した。

B. 研究方法（含、倫理面への配慮）

当院で2003年6月より2010年1月までにLAM+ADV投与を行ったB型慢性肝疾患22例を対象とした。男性11例、女性11例、年齢62.1±10.4歳（40～74歳）、慢性肝炎9例、肝硬変13例、ADV投与時HBe抗原陽性例8例、

YIDD変異17例、YVDD変異2例、YIDD+YVDD変異2例、変異不明例1例、LAM単独投与期間33.6±16.2ヶ月（10～60ヶ月）、LAM+ADV併用投与期間は48.3±19.4ヶ月（12～89ヶ月）であった。LAMは100mg/day、ADVは10mg/day投与を行った。

HBV-DNA 2.6 log copy/ml未満（PCR法）または検出感度以下（リアルタイムPCR法）を陰性化群とし、陰性化に関する因子を検討した。年齢、性別、硬変変化の有無、YMDD変異株の種類、ADV投与開始時のHBe抗原の有無、ALT、Plt、Alb、ADV投与開始時のHBV-DNA量、投与開始6ヶ月以内にDNA量が4 log copy/ml以下に低下（IVR；initial viral

response) について Cox 比例ハザードモデルを用い、解析を行った。

(倫理面への配慮)

後ろ向き調査から得られた内容については、どの患者か特定できないように匿名化を行った上で解析を行った。

C. 研究結果

1) LAM+ADV 併用投与 1、2、3 年後の Kaplan-Meier 法による HBV-DNA 累積陰性化率は 67.2%、73.5%、82.4%であった。

2) HBV-DNA 陰性化に関する因子の検討のため、年齢、性別、硬変変化の有無、ADV 投与開始時の HBe 抗原の有無、HBVDNA 量、投与開始 6 ヶ月以内に DNA 量 4 log copy/ml 以下に低下 (IVR) の有無、YMDD 変異株の種類、ALT、Plt、Alb 値について Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析を行ったところ、ADV 投与開始時の HBe 抗原の有無 ($P=0.017$) ADV 投与開始時の HBV-DNA 量 ($P<0.0001$)、ADV 投与後 IVR の有無 ($P<0.0001$) が HBV-DNA 陰性化に関与する因子として選択された。多変量解析では ADV 投与後 IVR の有無 ($p=0.048$ 、 $OR=87.8$) が有意な因子であった。

3) そこで LAM+ADV 投与中の累積 HBV-DNA 陰性化率を ADV 投与後 IVR(+)症例と IVR(-)症例間で比較すると、有意差をもって ADV 投与後 IVR(+)症例の HBV-DNA 陰性化率が高率であった (Log-lank、 $P<0.0001$)。同様に HBV-DNA <6 log copy/ml の症例と HBV-DNA ≥ 6 log copy/ml 症例間で比較すると、有意差をもって HBV-DNA <6 log copy/ml の症例の HBV-DNA 陰性化率が高率であった (Log-lank、 $P=0.0004$)。

5) また、当院において LAM+ADV 療法不応例に対し (図 1)、ADV より Tenofovir への切り替えを 1 例行ったが、Tenofovir 切り替え後 4w にて HBV-DNA 量が 1.4 log copy/ml 減少し、12w で陰性化を認めた (図 2)。

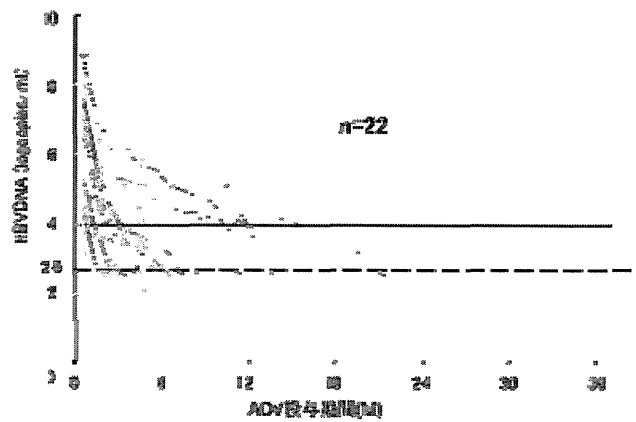


図 1. ADV 投与後の HBV-DNA の推移

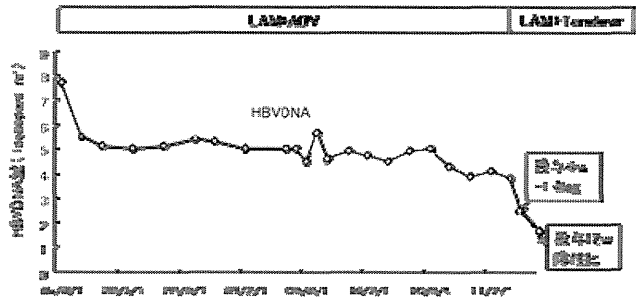


図 2. LAM+ADV 療法不応例に対する Tenofovir への切替

D. 考察

LAM 耐性が出現し、ADV を併用する際には HBV-DNA 量が高値、ADV 投与開始 6 ヶ月以内に DNA 量 4 log copy/ml 以下に低下しない症例については長期投与にても陰性化に至らない可能性があり、早期に ADV より Tenofovir への切り替えも考慮すべきであると考えられる。

E. 結論

LAM+ADV 併用療法において、HBV-DNA 陰性化には ADV 投与開始前の HBV-DNA 量が低値であること、ADV 投与後 IVR の有無が関与している可能性が示唆された。LAM+ADV 併用療法中に HBV-DNA 陰性化に至らない症例が認められ、HBV-DNA 非陰性化例に対する対策が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Iio S, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Mochizuki K, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Hayashi N, Takehara T. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol.* 2012;47(5):577-85.
- 2) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Nagase T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. The efficacy of extended treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients with HCV genotype 1 and slow virologic response in Japan. *J Gastroenterol.* 2011;46(7):944-52.
- 3) Hiramatsu N, Inoue Y, Oze T, Kurashige N, Yakushijin T, Mochizuki K, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi N. Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study. *J Gastroenterol.* 2011(11);46:1335-43.
- 4) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol.* 2011;46(8):1031-7.
- 5) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Fukuda K, Mita E, Haruna Y, Inoue A, Imai Y, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol.* 2011;83(3):419-27.
- 6) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Kaytayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol.* 2011;54(4):604-11.
- 7) 入潮佳子、今井康陽、三田英治、外山隆、葛下典由、永瀬寿彦、土井喜宣、山田晃、加藤道夫、福田和人、井倉技、澤井良之、小来田幸世、平松直樹、竹原徹郎、林紀夫. 1型高ウイルス量以外のC型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2aの単独療法の有効性に

- 関する検討
肝臓 2011;52:236-243
- 8) 今井康陽.
C型肝炎に対する抗ウイルス療法による発癌予防
総合臨牀、永井書店 第60巻1号;76-80.
2. 学会発表
- 1) 入潮佳子、今井康陽、井倉技、澤井良之、小来田幸世、福田和人、牧野祐紀、大濱日出子、松本康史、中原征則、厨子慎一郎、黒川正典、田中靖人、小瀬嗣子、平松直樹、林紀夫.
IL28B major allele 症例におけるC型肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法のSVRおよびNVRを規定する因子について
第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 2) 小瀬嗣子、平松直樹、宋昌浩、由雄祥代、薬師神崇行、望月圭、萩原秀紀、春名能道、三田英治、今井康陽、法水淳、宮城琢也、吉田雄一、巽智秀、木曾真一、考藤達哉、笠原彰紀、竹原徹郎、林紀夫.
難治性C型肝炎に対するPeg-IFN/RBV併用療法の治療効果とIL28B遺伝子多型との関係について—多施設(OLF)共同研究—
第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 3) 澤井良之、今井康陽、井倉技、福田和人、小来田幸世、大濱日出子、牧野祐紀、土本雄亮、松本康史、中原征則、厨子慎一郎、黒川正典、入潮佳子、田中靖人、小瀬嗣子、平松直樹、林紀夫.
Genotype1型のC型慢性肝疾患におけるHCCの発現とHCVのCore70,91アミノ酸変異、ISDR変異とIL28B遺伝子多型の関係について
第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 4) 小瀬嗣子、平松直樹、宋昌浩、薬師神崇行、望月圭、飯尾禎元、山田晃、萩原秀紀、三田英治、伊藤敏文、稲田正巳、吉原治正、井上敦雄、今井康陽、林英二郎、加藤道夫、吉田雄一、巽智秀、木曾真一、考藤達哉、笠原彰紀、竹原徹郎、林紀夫.
Peg-IFN/RBV/VitaminD併用療法の有用性について—多施設(OLF)共同研究—
第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 5) 水本壘、澤井良之、今井康陽、井倉技、小来田幸世、福田和人、大濱日出子、牧野祐紀、土本雄亮、宇都宮大輔、岩崎哲也、中松大、松本康史、中原征則、厨子慎一郎、黒川正典.
B型慢性肝疾患に対するラミブジン+アデフォビル治療の有効性を規定する因子の検討
第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 6) 水本壘、澤井良之、卜部彩子、大西孝典、倉橋知英、牧野祐紀、宇都宮大輔、大濱日出子、小来田幸世、松本康史、中原征則、井倉技、厨子慎一郎、福田和人、今井康陽、黒川正典、三田英治.
B型慢性肝疾患に対するラミブジン+アデホビルの治療の有効性を規定する因子の検討
日本消化器病学会近畿支部第95回例会
Young Investigator Session: 肝2
2011.8.20 大阪
- 7) 菅理恵、井倉技、今井康陽、福田和人、澤井良之、小来田幸世、土本雄亮、大濱日出子、牧野祐紀、藤井真由子、入潮佳子、森本修邦、黒川正典.
PSEおよび脾摘後のC型肝炎硬変症例におけるペグインターフェロン・リバビリン併用療法の有効性に関する検討
第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21 福岡
- 8) 入潮佳子、今井康陽、小瀬嗣子、平松直樹、三田英治、外山隆、葛下典由、永瀬寿彦、土井喜宣、山田晃、加藤道夫、福田和人、井倉技、竹原徹郎、林紀夫.
C型慢性肝炎におけるセロタイプ2型に対するPEG-IFN α -2a単独療法の有効性に関する検討
第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21 福岡
- 9) 今井康陽、井倉技、福田和人.
C型肝炎高ウイルス量症例に対するPEG-

IFN/RBV 併用療法およびPEG-IFN 単独療
法の治療成績に基づいた治療戦略

第 39 回日本肝臓学会西部会シンポジウム 1
：テーラーメイド医療時代の C 型肝炎治療
戦略 2011.12.9-10 岡山

10) 福田和人、井倉技、今井康陽。

当科における急性肝炎・肝障害の検討

第 39 回日本肝臓学会西部会 主題ポスター
(口演)：急性肝炎の実態 2011.12.9-10

岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
三田英治 (三田)	B 型肝炎ウイルスの基礎知識	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	124-8
三田英治 (三田)	診断の第1歩とHBVマーカーでのフォローの基本	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	129-30
三田英治、他。(三田、加藤)	B 型慢性肝疾患患者の自然経過	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	135-7
坂根貞嗣、他。(三田)	B 型慢性肝疾患の治療指針	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	138-41
三田英治、他。(三田、加藤)	核酸アナログ	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	147-54
三田英治 (三田)	HIV 感染者の B 型肝炎	三田英治、平松直樹	必ず役立つ肝炎診療バイブル改訂2版	メディカ出版	大阪	2012	181-3

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oze T, et al. (三田)	A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	Hepatol Res.	43	35-43	2013
Higashitani K, et al. (三田、今井)	Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.	J Gastroenterol.		in press	2012
Harada N, Et al. (三田、	Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels	J Gastroenterol.		in press	2012

今井)	categorized by Japanese treatment guidelines.				
Nishida N, Et al. (三田)	Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean.	PLoS One.	7	e39175	2012
Sawai H, Et al. (三田)	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet.	13	47	2012
Toyama T, et al. (三田、八橋、中牟田、島田、太田、加藤、肱岡)	Long-term outcomes of add-on adefovir dipivoxil therapy to ongoing lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B.	Hepatol Res.	42	1168-74	2012
Kurokawa M, et al. (三田、今井)	Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol.	47	577-85	2012
Oze T, et al. (三田、今井、加藤、肱岡)	Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin.	J Gastroenterol.	47	334-42	2012
Tamada Y, et al. (三田、八橋、中牟田、島田、太田、肱岡)	Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B.	Gut.	61	765-73	2012
Kanto T, et al. (三田)	Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol.	47	169-78	2012
外山隆、他. (三田)	ラミブジン耐性 B 型慢性肝疾患に対するアデホビル併用療法の長期成績と問題点	消化器内科	5	593-6	2012
Bae SK, et al. (八橋)	Prediction of early HBeAg seroconversion by decreased titers of HBeAg in the serum combined with	Med Sci Monit.	18	CR698-705	2012

	increased grades of lobular inflammation in the liver.				
Migita K, et al. (八橋)	HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population.	Transl Res.	160	443 -4	2012
Seko Y, et al. (鈴木)	Antitumor efficacy of transcatheter arterial chemoembolization with warmed miriplatin in hepatocellular carcinoma	Hepatol Res		in press	2012
Akuta N, et al. (鈴木)	Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near the IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment	Intervirolgy	55	417 -25	2012
Akuta N, et al. (鈴木)	Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy	Intervirolgy	55 (3)	231 -41	2012
Akuta N, et al. (鈴木)	Complicated Relationships of Amino Acid Substitution in Hepatitis C Virus Core Region and IL28B Genotype Influencing Hepatocarcinogenesis	Hepatology	56	2134 -41	2012
Suzuki F, et al. (鈴木)	Long-term efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection in Japan	J Gastroenterol	47	814 -22	2012
Suzuki F, et al. (鈴木)	Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b	J ClinVirol	54	352 -4	2012
Ono A, et al. (鈴木)	Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients	J Hepatol	57	508 -14	2012
Mori N, et al. (鈴木)	Determinants of the clinical outcome of patients with severe acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection	J Gastroenterol	47	1022 -9	2012
Arase Y, et al. (鈴木)	Efficacy of reduction therapy of natural human β -interferon and ribavirin in elderly patients with chronic hepatitis	Hepatol Res	42	949 -57	2012

	C, genotype 1b and high viral load				
Matsumoto A, et al. (鈴木、八橋)	Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B	Hepatol Res	42	139 -49	2012
Akuta N, et al. (鈴木)	Association of IL28B Genotype and Viral Response of Hepatitis C Virus Genotype 2 to Interferon Plus Ribavirin Combination Therapy	J Med Virol	84	1593 -9	2012
Takeyasu M, et al. (鈴木)	Long-term interferon monotherapy reduces the risk of HCV-associated hepatocellular carcinoma	J Med Virol	84	1199 -207	2012
Akuta N, et al. (鈴木)	Determinants of response to triple therapy of telaprevir, peginterferon, and ribavirin in previous non-responders infected with HCV genotype 1	J Med Virol	84	1097 -105	2012
Matsumoto N, et al. (鈴木)	Prevalence and predictive factors of diabetes in hepatitis virus positive liver cirrhosis with fasting plasma glucose level of < 126 mg/dl	Hepatol Res	42	558 -63	2012
Imai N, et al. (鈴木)	Transcatheter arterial chemotherapy using miriplatin-lipiodol suspension with or without embolization for unresectable hepatocellular carcinoma	Japanese Journal of Clinic	42	175 -82	2012
Arase Y, , et al. (鈴木)	Difference in malignancies of chronic liver disease due to non-alcoholic fatty liver disease or hepatitis C in Japanese elderly patients	Hepatol Res	42	264 -72	2012
Suzuki Y, et al. (鈴木)	Dual Oral Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir for Patients with HCV Genotype 1b Infection and Limited Treatment Options	J Hepatol		in press	2012
Hosaka T, et al. (鈴木)	Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection	Hepatology		in press	2012
Suzuki F, et al. (鈴木)	Exploratory study on telaprevir given every 8 h at 500 mg or 750 mg with peginterferon-alpha-2b and ribavirin in	Hepatol Res		in press	2012

	hepatitis C patients				
Hosaka T, et al. (鈴木)	Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study	J Gastroenterol		in press	2012
Arase Y, et al. (鈴木)	Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies included hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C	Hepatology		in press	2012
田中榮司、他. (鈴木、柘植、八橋)	核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012 厚生労働省「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」の報告	肝臓	53	237-42	2012
今井則博、他. (鈴木)	ミリプラチン動注化学療法を併用したラジオ波凝固療法	肝臓	53	351-4	2012
原祐、他. (鈴木)	高齢者 C 型慢性肝炎に対するテラプレビル 1500mg 減量投与のパイロット・スタディ	肝臓	53	624-6	2012
Hayes CN, et al. (柘植)	Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.	PLoS One.	7	e47490	2012
Okazaki A, et al. (柘植)	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse.	Hepatology	56	555-55	2012
柘植雅貴、他. (柘植)	HBV RT 領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討	消化器内科	54	575-81	2012
Makino Y, et al. (今井)	Usefulness of the multimodality fusion imaging for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.	Dig Dis	30	580-7	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

1 B型肝炎ウイルスの基礎知識

国立病院機構大阪医療センター 消化器科 科長 三田英治

- 要点** **レベルA** B型肝炎は血液を介して感染します。
- レベルA** B型慢性肝炎の多くは、母親からの垂直感染が原因です。
- レベルA** 一般的に成人期にHBVに感染してもキャリア化することはまれでしたが、最近、欧米型のゲノタイプAに感染したのち慢性化する成人期感染例が増えつつあります。
- レベルB** プレコア変異とはHBe抗原が産生できなくなるアミノ酸変異を指します。
- レベルB** コアプロモーター変異はHBe抗原をコードするmRNAの転写活性を低下させる変異です。

1 B型肝炎ウイルスとは **レベルA**

B型肝炎ウイルス (HBV ; hepatitis B virus) とは、血液を介してヒトからヒトへ感染する肝炎ウイルスで、C型肝炎ウイルス (HCV) とともに血清肝炎と呼ばれてきました。

日本のB型慢性肝炎患者の多くは、免疫が未熟な新生児期～幼少期 (2～3歳くらいまで) に感染し、免疫寛容によってキャリア化したもので、主に母子感染が原因です。日本の大多数を占めるゲノタイプCとBは成人期に感染してもキャリア化することはまれでしたが、最近欧米型のゲノタイプAが性的接触によって成人間に伝播し、急性感染者の一部がキャリア化しています (ゲノタイプに関しては後述)。

ウイルス粒子は、不完全2本鎖のウイルスDNAとポリメラーゼ蛋白をスクレオカプシド蛋白 (HBVの場合、hepatitis B core = HBc抗原と呼びます) が内包し、この外側を、分子量が異なる三種類のエンベロープ蛋白が覆うというウイル

スの基本構造をとっています (図1)。エンベロープを形成する三種類の蛋白のなかで割合の最も高いmajor S (図1の□) は、ウイルス粒子の表面を覆う蛋白という意味からHBs (hepatitis B surface) 抗原と命名されています。

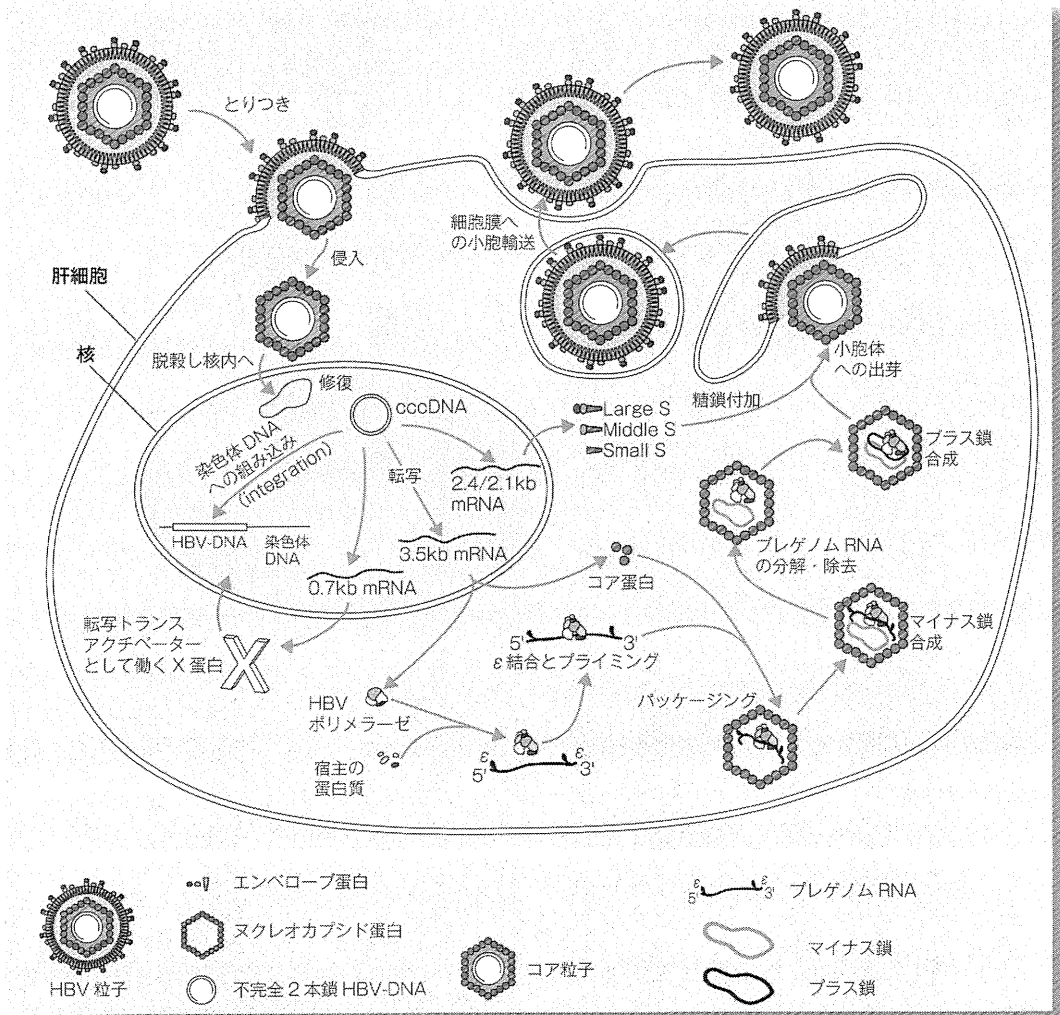
豆知識

HBe抗原の「e」の意味

HBs抗原・抗体の「s」、HBc抗原・抗体の「c」は、それぞれsurface、coreの頭文字をとっています。では、HBe抗原・抗体の「e」の意味は何でしょうか？ envelopeの「e」は不正解です。envelope蛋白はHBs抗原ですから……。

HBe抗原はAustralia抗原の発見から約10年後の1972年に、Magnius博士 (弟子) とEspmark博士 (師匠) によって報告されました。当時の様子をご存じの先生方によると、Magnius博士が師匠に敬意を表し、Espmark博士の頭文字「e」をとって、発見した蛋白をHBe抗原と名付けたというのが隠された真相のようです。

レベルC 図1… HBVのライフサイクル



文献1, 2改変

4

B型肝炎の診断と治療

1

B型肝炎ウイルスの基礎知識

2 HBVのライフサイクル(図1)

レベルC

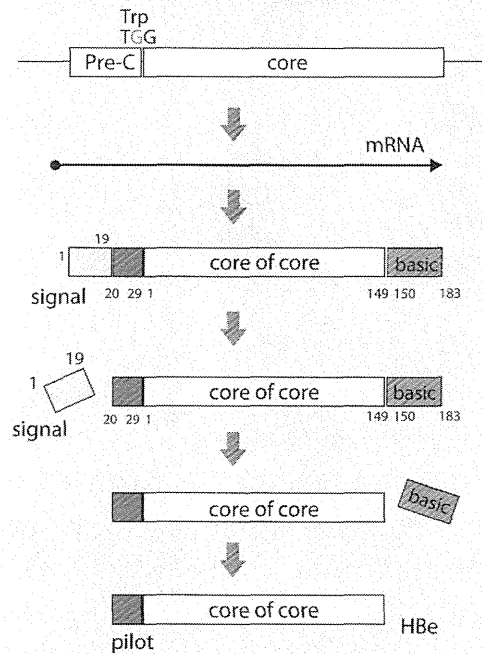
血液中を流れてきたHBV粒子はまず肝細胞にとりつきます。HBV粒子は肝細胞に取り込まれ、HBs抗原などのエンベロープ蛋白が剥がれていきます。細胞内にはコア粒子の形で侵入し、次にコア抗原が剥がされ(=脱殻)、不完全2本鎖のHBV-DNAが核内に入ります。その後、HBV-DNAは完全2本鎖に補修され(閉環2本鎖DNA

= covalently closed circular DNA ; cccDNA という形をとります)、そのプラス鎖からmRNAが転写され、各蛋白質(HBs抗原、HBc抗原など)が翻訳されていきます。

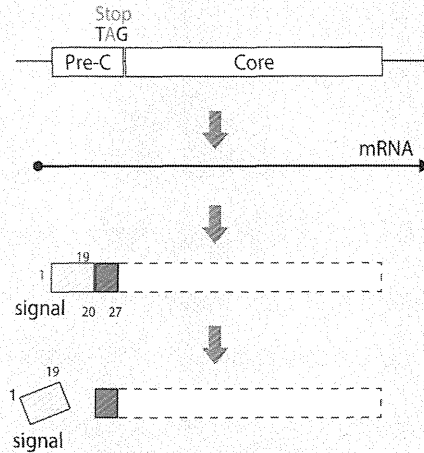
またHBVはDNAウイルスでありながら、複製の様式は、いったんプレゲノムRNAというRNAに転写された後、これを鋳型にしてDNAが逆転写されるという複雑な過程をとります。この過程はまず、HBc抗原がプレゲノムRNAの「ε」(イプシロン)という二次構造を認識し、ポリメラーゼ

図 2…「プレコア+コア」蛋白の翻訳後修飾

a. HBe抗原を産生できるプレコア野生株



b. HBe抗原を産生できないプレコア変異株

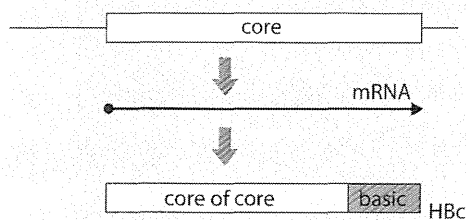


a. プレコア野生株は翻訳後修飾の後HBe抗原を産生します。

b. プレコア変異株では「プレコア+コア」蛋白のmRNAから27アミノ酸しか翻訳されないため、HBe抗原は産生されません。

図 3… コア蛋白

プレコア野生株・変異株ともに HBc 抗原を産生できます



プレコア変異は「コア蛋白mRNA」の開始コドンの上流の変異なので、プレコア野生株・変異株ともにコア蛋白は正常に産生されます。

蛋白とともに内包し、コア粒子を形成することから始まります。コア粒子の中で、プレゲノムRNAからマイナス鎖DNAが合成され、その後プラス鎖DNAが合成されます。このコア粒子をHBs抗原など三種類のエンベロープ蛋白が囲い込み、完成されたHBV粒子は細胞外に旅立っていきます。

HBV-DNAはときにヒト染色体DNAに組み込

まれ、発癌の一因になると考えられています。一方、HBVがコードするX蛋白は、発癌に関与する遺伝子群のプロモーター活性を上げることによって肝発癌の一因となっている可能性が示されています。