

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）

分担研究報告書

シーケンシャル療法 of 長期予後解析

研究分担者 鈴木義之 虎の門病院 肝臓科 医長

研究要旨：B型慢性肝疾患に対する治療の第一選択は核酸アナログ製剤であり、現在最も使用されている。これまでの数多くの検討から中止を考慮すべき症例の抽出が行われたが未だ決め手となる方法もまた指標も明らかとなっていない。現時点では厚生労働省の研究班の中止指針に従って中止を試みるのが現在頼るべき方法であると考えられ、昨年度までに積極的に中止していく方法として新たにインターフェロン(IFN)をしばらく併用した後に漸次投薬を中止していく sequential 治療につき報告してきた。今年度も引き続き、当院でも中止を目指した取り組みとして sequential therapy を導入した症例の検討を行い、当初開始した14例全例が drug free となり多くの症例で4年を経過した。その症例の予後と中止しえた症例の特徴をまとめ、治療中止に関わる因子(特に免疫応答に関与する因子)を検討したので報告する。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患に対する治療はIFNと核酸アナログ製剤であり、臨床の間ではその状況に応じて選択を行い、時によっては繰り返し治療が行われている。核酸アナログ製剤はB型慢性肝疾患に対する治療を大きく変え、予後の向上に多大な貢献をしたことはだれもが認める事実である。厚生労働省班会議におけるガイドラインでもB型慢性肝疾患患者の治療において核酸アナログ製剤は35歳以上の症例では第一選択の座を維持し続け、現在最も使用されている薬剤といえる。しかしながら長期投与が原則であり、一生飲み続ける可能性がある本薬剤を中止する手段や指標となる検査で確立されたものは未だ見出せていない。このため長期化する核酸アナログ治療をいかに安全かつ効率よく、中止するかを目標に班研究がなされ新たな指針が策定されてきた。

そのような中で班員として研究にも参画し、中止を目標としたIFNを用いたSequential治療が試み、その成果を昨年度までに報告してきた。しかしながら、一部に再燃をきたし、再治療を余儀なくされる症例が存在することも事実である。今年度はSequentialを行った症例の長期の経過を検討することで、より安全に中止し得る

症例を見出すことを目標とした。

B. 研究方法

当院では2009年7月より核酸アナログ製剤の中止を目的としてsequential therapyを導入している。既報の如く核酸アナログ投与中の患者に対して1ヶ月間IFNを併用後、核酸アナログを中止し、その後IFN単独投与を5か月継続しすべての薬剤を中止する。本療法導入の条件は核酸アナログ投与中、HBe抗原は陰性で、肝酵素の正常化を維持し、HBV-DNAが感度以下(2.1log copy/ml未満)もしくはHBcrAgが感度以下(3.0log U/ml未満)を達成している患者とした。これまでに14症例に導入し、全例がIFN投与を終了し経過観察期間(drug free)に入っている。本研究班の指針に従い再燃と判断された場合は同意を得た上で速やかに再治療を導入している。また、今年度は保存血清を用いて経過中のサイトカイン、HBs抗原、HBcr抗原を測定し宿主およびウイルス側の両面からその因子について検討した。

(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の守秘義務、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上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。本研究の遂行にあたっては、必要な申請を行い当院の倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

Sequential 治療導入症例の背景は表1に示した。男性12例(86%)、sequential therapy 導入のためのIFN開始時年齢43.5歳(34歳~60歳)、使用していた核酸アナログは

lamivudine(LMV)10例、entecavir(ETV)4例、投与期間は77.5か月(20~123)、genotypeはBが2例でCが12例であった。治療終了後のdrug free 期間は中央値42か月(36~48)である。経過中のALTは治療終了後に一過性に上昇する症例も認められるもののその後は沈静化するケースがほとんどであったが、その後の再燃で再治療を導入した症例が3例認められた。図1および2にIFN終了後からdrug free 45か月までのHBV-DNAとALTの経過を示した。図1に示すようにALTはIFN開始後12か月目をピークにやや変動が認められる症例があるものの、再治療に至らなかった症例では約3年後には100%安定という数字であった。一方DNAは感度以下を維持できている症例は少なく治療域には至らないものの2.1から4.0の範囲内で変動している症例が50%近く認められている。再治療となった3例の要因を解析するため経過中のHBcrAgの経過を示したのが図3である。IFN終了直後は不安定であるが再治療に至らなかった症例は1例を除きすべて3以下まで低下し安定している。一方再治療を余儀なくされた3症例はいずれもHBcrAgが高いままで再治療を導入され2例は依然として高値を持続している。これをまとめると経過中HBcrAgが3.6以下の症例からは1例の再燃があったものの再治療にはいたらず、再治療となった3例はHBcrAgが5.9が1例と6.8<が2例であった。また、図4にTNF- α の推移を測定した結果を示す。実線の3例が再治療となった症例であり、点線で示す11例がdrug free

を獲得した11例である。再治療となった症例はIFN終了時よりTNF- α の上昇が認められており宿主の免疫賦活が生じていることが分かる。核酸アナログやIFNによる抗ウイルス療法が途切れた途端に宿主の免疫応答にswitchが入り、HBVに対する攻撃が始まっている可能性が示唆される結果である。以上を踏まえ再治療となった3例の背景要因(表2)を提示する。この3例は核酸アナログ治療期間が31, 38, 55か月と他の症例に比して短い傾向が認められ、また3例中2例はgenotypeBであった。

	核酸アナログ開始時	IFN開始時
年齢(歳)	36.5(25-57)	43.5(34-60)
性別	男:女 12(85.7%):2(14.3%)	
AST(IU/L)	97.5(29-1356)	19.5(15-26)
ALT(IU/L)	192(32-2412)	16.5(12-26)
HBs抗原陽性	3例(21.4%)	0例(0%)
HBV DNA(log copy/ml)	7.4(3.0-8.1)	2.1>(検出せず-2.9)
HBV genotype	B; 2例(14.3%), C; 12例(85.7%)	
核酸アナログの種類	Lamivudine: 10例	Entecavir: 4例

表1. IFN sequential療法 14症例の背景

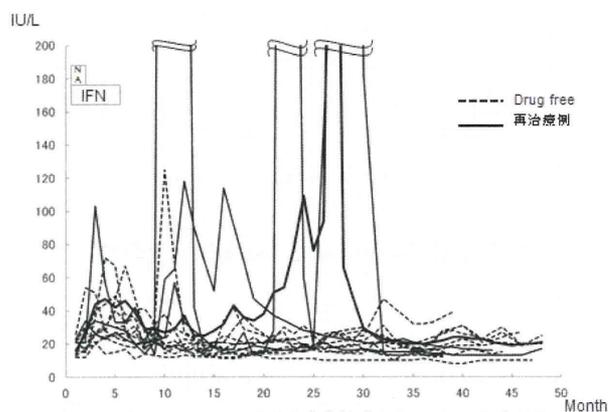


図1. IFN sequential療法中のALTの経過

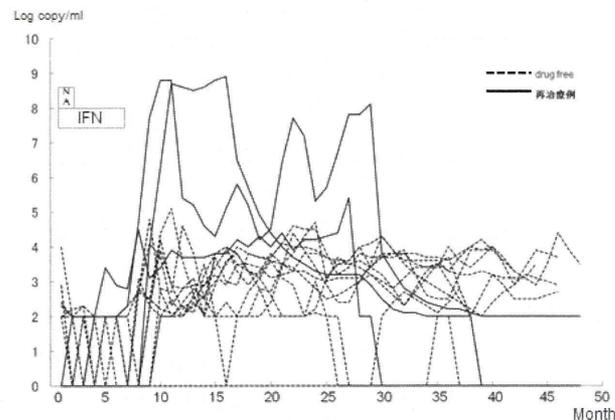


図2. IFN sequential療法中のHBV-DNAの推移

表2.再治療に至った3例の要因

	年齢	性	NA	前治療	NA投与期間	NA開始時ALT	Drug free後のALTのピーク	休薬期間
1	37	M	ETV	CS	31M	394	1332	20M
2	59	F	ETV	無	38M	157	118	8M
3	60	M	LMV	サレソ	55M	105	528	19M
11例の中央値	43 (34~60)	M 10 F 1	L 9 E 2	IFN 9 無 2	94M (20~123)	194 (32~2412)	28 (14~125)	27M (21~33)

また、本療法導入後に HBs 抗原の消失が認められ、治療終了後も HBs 抗体の titer は上昇している一例を経験した。症例は 53 歳の男性、lamivudine 開始時の肝生検では F3/A2、AST/ALT は 191/254 と高値を示し、HBV-DNA も 7.5log copy/ml と高ウイルス量を示していた。投与 123 か月目に sequential therapy を開始したが、開始時の HBV-DNA は 2.9log copy/ml、HBcrAg は 3.0log U/ml 未満であり、12 週目に HBs 抗原が消失し、16 週目には HBs 抗体が出現した。

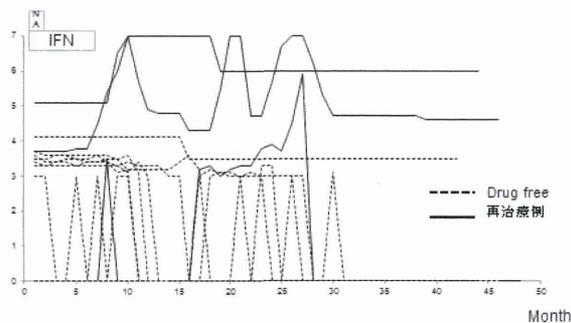


図3. IFN sequential 療法中の HBcrAg の推移

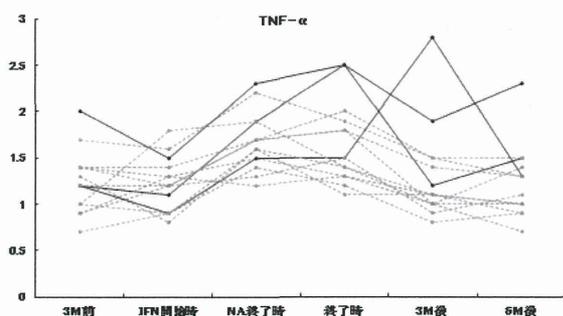


図4. IFN sequential 療法中の TNF-α の変化

D. 考察

従来の IFN 治療にとって代わるべく治療薬として登場した LMV は確かに画期的な治療薬であ

ったが、耐性ウイルスの出現率が高く現在では第一選択の座を ETV にゆずり、実臨床ではあまり処方されなくなっているのが現状である。我々は、かつて LMV 投与において経年的に肝生検を行いその組織学的改善度につき報告してきた。その中でも述べたように、抗ウイルス剤投与により肝炎の鎮静化を持続することができれば、肝臓の線維化についても改善が認められることを示した。

また耐性ウイルスについての問題であるが、長期化する核酸アナログ投与においては特に第一世代の LMV ではその頻度は高く年とともに増加している。このような耐性ウイルスの出現を来さないためにも核酸アナログを中止する方法が期待される場所である。また、現在の第一選択である ETV も耐性ウイルスの出現率こそ低く抑えられてはいるが、HBs 抗原の陰性化率は低く、今後さらに治療が長期化していくことが懸念される。長期化すれば耐性ウイルスの問題だけではなく腎障害などの副作用も必ずや増えていくと考えられ、そのためにも本薬剤を中止する基準は是非とも必要と考える。これまでに我々は、過去に中止した症例の予後の検討を行い報告してきた。その結果、HBV-DNA の陰性化が得られても核酸アナログ中止により肝炎が再燃し再投与を行わざるを得ない症例が多く存在することが明らかとなった。そのため積極的な試みとして当科では、sequential therapy を開始しているが、治療終了後 4 年の経過では抗ウイルス効果の持続は十分とはいえないものの ALT 正常化率は高く、特に IFN 開始時の HBcrAg が低値であり genotypeB 以外の症例においては良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。特に核酸アナログ長期投与症例においては良好な結果が得られ、drug free を獲得するための有用な治療法であることが示された。

また耐性ウイルスについての問題であるが、Tenney らは LMV 耐性ウイルス出現例に対する ETV 投与中に ETV 耐性ウイルスによる virologic breakthrough を起こした 2 症例を報告し解析している。当院でも鈴木らが、パターンは違うものの同じ場所に変異をきたし breakthrough

hepatitis を起こした症例から、新たな ETV 耐性ウイルスを検出し報告している。今後は LMV 耐性ウイルスに対する ETV 投与といったケースは増加することはないと思われるが、長期化する ETV 投与において更なる問題が出ないとは限らず見逃すことのできない点と思われる。

また、このような耐性ウイルスの出現を来さないためにも核酸アナログを中止する方法が期待される場所である。単純に中止した場合は核酸アナログ中止により肝炎が再燃し再投与を行わざるを得ない症例が多く存在することが明らかとなっており、指標となる検査についても、感度の点からも今後更なる検討が必要であると考えられる。

以上のような観点から当科で取り組んでいる drug free を目指した積極的な試みである sequential therapy の成績を検討してきた。療終了後 4 年の経過で、症例数が少ないもののサイトカインや HBs 抗原も一つの指標になることが示され、アナログ投与長期の症例、IFN 開始時の HBcrAg が低値の症例において良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。また、経過中の TNF- α の上昇により宿主免疫が賦活されている症例においては再投与をせざるをえなかった状況に陥っており、この 3 例につきさらに検討し、より有効な選択基準の策定と治療法を模索していく予定である。

E. 結論

当科で取り組んでいる drug free を目指した積極的な試みである sequential therapy の成績をまとめると、治療終了後 4 年の経過では抗ウイルス効果の持続は十分とはいえないものの ALT 正常化率は高く、特に核酸アナログ投与長期の症例、IFN 開始時の HBcrAg が低値の症例において良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。また、経過中の TNF- α の上昇により宿主免疫が賦活されている症例においては再投与をせざるをえなかった状況に陥っており、この 3 例につきさらに検討しより有効な選択基準の策定と治療法を模索していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki F et al : The efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2010;25(5):892-8
- 2) Hosaka T, et al.: HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. Liver Int. 2010;30(10):1461-70.
- 3) Hashimoto Y, et al : Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy Journal of Medical Virology 2010; 82(4): 684-91

2. 学会発表

- 1) パネルディスカッション 6: ウイルス性肝疾患治療ガイドラインの妥当性 第 96 会日本消化器病学会総会 新潟 2010. 4. 23
- 2) B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療中止の検討 第 46 回日本肝臓学会総会 山形 2010. 5. 27
- 3) 核酸アナログ治療中止を目指した sequential therapy の有用性 第 47 回日本肝臓学会総会 東京 2011. 6. 2
- 4) 核酸アナログ治療における drug free 獲得因子の検討 第 48 回日本肝臓学会総会 金沢 2012. 6. 8

H. 知的財産権の出願・登録状況

(※予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）

分担研究報告書

当院における B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン単独治療例の検討

研究分担者 八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長
研究協力者 長岡進矢 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター室長

研究要旨：当院における B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン単独治療例の治療効果、および効果予測因子の検討をおこなった。当院にてペグインターフェロン α 2a 治療を受けた B 型慢性肝炎症例 14 例。方法 1. 治療効果の検討をおこなった。2. 治療終了 24 週時点で responder、non-responder に分類し背景因子の比較をおこなった。結果 1. 治療終了後 24 週での responder は 4/14 例 (29%) であった。治療終了後 144 週以上経過観察可能であった 10 例において、48 週以降は 5/10 例 (50%) が responder の判定となり以後状態継続、4 例が核酸アナログ投与へ移行した。2. 治療終了後 24 週時点での responder 4 例と non-responder 10 例の治療前臨床背景の比較では、年齢 (26.8 vs 36.6 歳, $p=0.01$) で有意差を認め、治療前 IP-10 値 (751 vs 327 pg/ml, $p=0.05$) が有意な傾向がみられた。B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン治療により 50% の症例が drug free となった。B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンの治療効果予測に治療前 IP-10 値の測定が有用である可能性がある。

A. 研究目的

当院における B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン単独治療例の治療効果、および効果予測因子の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

患者に対しては血液検体の保存、研究使用に関する説明をおこない、紙面にて同意を取得した。

B. 研究方法

対象は当院にてペグインターフェロン α 2a 治療を受けた B 型慢性肝炎症例 14 例。1. 治療効果の検討をおこなった。効果判定基準は治療前 HBe 抗原陽性例：治療終了 24 週以降で①ALT 値 <40 IU/L、②HBe セロコンバージョン (SC)、③HBV-DNA 量 <5.0 logcopies/ml。治療前 HBe 抗原陰性例：①ALT 値 <40 IU/L、②HBV-DNA 量 <4.3 logcopies/ml を満たした症例を Responder と定義した。2. 治療終了 24 週時点で responder、non-responder に分類し背景因子の比較をおこなった。

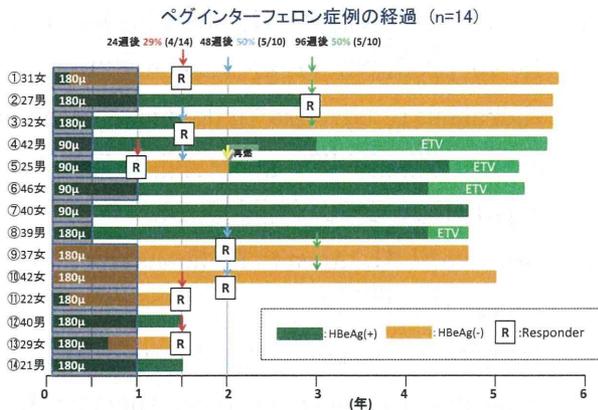
C. 結果

対象の臨床背景を表に示す (表 1)。

ペグインターフェロン治療例の臨床背景 (n=14)

年齢(歳)	35 (21-46)
男性 (%)	6 (43%)
HBeAg陽性(%)	12 (86%)
HBV genotype C/B	13/1
治療前ALT値, IU/L	96 (27-235)
HBV-DNA量, LC/mL	7.6 (5.4-9.0)
HBsAg量, LogIU/mL	4.0 (2.8-4.9)
治療前IP-10値, pg/mL	375 (130-1040)
Pre-C変異(%)	6 (43%)
Core-P変異(%)	11 (79%)
F stage(F1/F2/F3)	(7例/5例/2例)

1. 治療終了後 24 週での responder は 4/14 例 (29%) であった。治療終了後 144 週 (3 年) 以上経過観察可能であった 10 例では、48 週後 5/10 例 (50%) が responder の判定、96 週以降も 5/10 例 (50%) であり、4 例が核酸アナログ投与へ移行した (図)。



2. 治療終了後 24 週時点での responder 4 例と non-responder 10 例の治療前臨床背景の比較では、年齢 (26.8 vs 36.6 歳, $p=0.01$) が有意差を認め、治療前 IP-10 値 (751 vs 327 pg/ml, $p=0.05$) が有意な傾向がみられた (表 2)。

ペグインターフェロン終了後24週の治療反応性での背景比較 (n=14)

	Responder(n=4)	Non-Responder(n=10)	p値
年齢(歳)	26.8 (22-31)	36.6 (21-46)	0.01
男性 (%)	1 (25)	5 (50)	0.58
HBeAg力価, S/CO	387 (3.32-901)	882 (40.0-2166)	0.24
治療前ALT値, IU/L	160 (86-218)	95 (27-235)	0.10
HBV-DNA量, LC/mL	6.6 (3.3-7.8)	7.7 (5.6-9.0)	0.18
HBsAg量, LogIU/mL	3.6 (3.2-4.0)	4.0 (2.8-4.9)	0.26
治療前IP-10値, pg/mL	751 (452-1040)	327 (129-677)	0.05
Pre-C変異(%)	1 (25)	5 (50)	0.58
Core-P変異(%)	4 (100)	7 (70)	0.47

D. 考察

治療終了 24 週時点では response rate 約 30% と、これまで報告されていた効果とほぼ同等であった。治療前 HBeAg 陰性の症例は治療後 24 週から 48 週の間 HBV-DNA 量が低下し、responder の判定

となった。96 週以降は効果が持続している。Responder と non-responder の間の背景因子の比較では、若年であることで有意差がみられ、治療前 IP-10 値が高値であることも有意な傾向がみられた。インターフェロンへの反応良好の予測因子として以前から、若年、ALT 高値、HBV-DNA 量低値 があげられている。IP-10 に関しては、C 型肝炎のインターフェロン治療では治療前低値が反応良好の因子として報告されているが¹⁾、B 型肝炎のペグインターフェロン治療に関しては C 型とは逆に高値である方が反応良好であるとの報告がある²⁾。IP-10 は宿主の免疫反応が活発であることを反映するマーカーと考えられており、今後、より多数例での検討が望まれる。

E. 結論

1. B 型肝炎に対するペグインターフェロン治療により 50% の症例が drug free となった。
2. B 型肝炎に対するペグインターフェロンの治療効果予測に治療前 IP-10 値の測定が有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bae SK, Yatsushashi H, Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H. Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club. *Hepatol Res.* 2013 Sep 6.
- 2) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K,

Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2014 Jan 59(1):89-97.

3) 長岡進矢, 八橋 弘. インターフェロン治療, -III. 治療編, 2. 抗ウイルス薬による治療-. HEPATOLOGY PRACTICE 1 B型肝炎の診療を極める -基本から最前線まで. 田中榮司他, 文光堂, 東京, pp.97-103, 2013.10.11, 216 頁

4) 八橋 弘. I. HBV とその感染症の基礎, 4. HBV 感染の診断法. de novo B型肝炎 -HBV 再活性化予防のための基礎知識-, 持田智編集, 医薬ジャーナル社, 大阪, pp.55-67, 2013.9.20, 175 頁

5) 八橋 弘. PegIFN と HBs 抗原量. 別冊・医学のあゆみ B型肝炎 -最新治療コンセンサス, 溝上雅史編集, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp.63-68, 2013.7.15, 133 頁

6) 八橋 弘. VI 肝疾患 急性肝炎 (B 型). 治療過程で一目でわかる 消化器薬物療法 STEP 1・2・3. 一瀬雅夫, 岡 政志, 持田 智編集, メジカルビュー社, 東京, pp.154-158, 2013.4.1, 303 頁

7) 八橋 弘. ウイルス肝炎と肝癌の撲滅を目指した実地診療のすすめかた, B型肝炎の自然経過と治療の進歩 -実地医家はどのように対処すればよいか-. *Medical Practice* 30(2):186-193, 2013.2.1.

2. 学会発表
なし。

G. 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

<参考文献>

1. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617-25.
2. Sonneveld MJ, Arends P, Boonstra A, et al. Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2013;58:898-903.

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）

分担研究報告書

B 型慢性肝炎における核酸アナログ中止時の PEG-IFN α 2a 投与に関する有効性の検討

研究分担者 西口修平 兵庫医科大学 内科学 肝胆膵科 教授
研究協力者 齋藤正紀 兵庫医科大学 内科学 肝胆膵科 講師

研究要旨：【目的】B 型慢性肝炎の治療は核酸アナログ製剤による HBV DNA の持続的低値と肝機能の安定化であったが、近年 HBs 抗原定量と HB コア関連抗原測定法の進歩により核酸アナログ製剤の中止と HBs 抗原の陰性化を目指す治療指針へと変化し、厚生労働省班研究により核酸アナログ製剤の中止基準が示された。しかし中止基準を満たす症例は一部に限られており、HBs 抗原の陰性化につながる治療は未だ確立されていない。田中班の共同研究として Drug free を目指した核酸アナログ製剤中止後の PEG-IFN α 2a 療法の前向き研究が企画され施行されているが、今回、当施設登録症例においてその有用性を検討した。【方法】当施設の核酸アナログ長期投与患者中、同意が得られた 51 症例に対して核酸アナログ製剤を中止し PEG-IFN α 2a 180 μ g 週 1 回投与に切り替えた。主要評価項目は治療終了後の臨床的安定化 (Drug free) で、副次評価項目は HBs 抗原定量と HB コア関連抗原量の推移である。【成績】登録 51 症例の PEG-IFN α 2a 投与前の背景は HBV DNA は中央値 2.1 log copy/ml (最小-最大; 0-4.8)、HBs 抗原量 1613.3 IU/ml (40.0-22031.0)、HB コア関連抗原 4.9 log IU/ml (3.0-6.8) で、中止基準の再燃リスク評価は中リスク群 11 例、高リスク群 40 例であった。核酸アナログ投与中、HB コア関連抗原と HBs 抗原定量はともに緩徐な低下を認めるのみであったが、PEG-IFN α 2a 切替え後 HBs 抗原定量は急速に低下し、年間の低下率は 1.04 log IU/ml を示し、1 症例は HBs 抗原定量が陰性化した。PEG-IFN α 2a 投与終了症例は 26 症例であり、24 週の Drug free 達成率は 46.7%、36 週は 44.4%であった。また、PEG-IFN α 2a 投与終了後に HBs 抗原定量が陰性化した症例を 1 例認めた。

【考案】自然経過や核酸アナログ製剤投与時、HBs 抗原の低下率は年間 0.1 log IU/ml 未満であるが、PEG-IFN α 2a は HBs 抗原量を減少させるより有効な手段となると考えられ、HBs 抗原の消失を目指す治療の可能性が示唆された。また核酸アナログ中止基準による評価は、核酸アナログ中止時点で Drug free 達成予測率は 18.8%に過ぎなかったが、PEG-IFN α 2a 投与終了時には 36.2%にまで向上した。PEG-IFN α 2a は Drug free を達成する非常に有効な手段となることが示唆され、また同時に HBs 抗原と HB コア関連抗原を指標とした核酸アナログ製剤中止基準は治療効果の予測指標となると考えられた。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の目的は、B 型肝炎ウイルス (HBV DNA) の持続的抑制を図ることにより肝炎の鎮静化を図り、肝不全や肝発癌を予防することにある。抗ウイルス薬として、わが国ではインターフェロンと核酸アナログ製剤 (ラミブジン、アデホビル、エンテカビル) が認可されている。インターフェロンは抗ウイルス作用以外に免疫調整作用を併せ持

ち、効果が得られた場合は投与終了後もその効果が持続することが多いが有効率は低い。一方、核酸アナログ製剤は多くの症例で投与期間中 HBV DNA の低下と ALT 値の正常化をもたらすことが可能で、肝炎進展抑制や発癌抑制を目的として、核酸アナログ製剤による治療が中心であり、インターフェロン治療は 35 歳未満の限定された若年者に使用されるにとどまっている。しかし核酸アナログ製剤による治療は、投与中止

によって多くは再燃し、長期投与により薬剤耐性変異の出現が問題となる。

近年HBs抗原定量とHBコア関連抗原の測定法の進歩により、B型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の目的は核酸アナログ製剤の中止とHBs抗原の陰性化を目指す治療指針へと変化し、一昨年、厚生労働省田中班の班研究により核酸アナログ製剤の中止基準が示された。核酸アナログ製剤投与開始後2年以上経過し、血中HBeAg陰性かつ血中HBV DNA量が陰性(3.0 log copies/ml未満)であることを中止の必要条件として、HBsAg定量とHBコア関連抗原のスコアリングにより、合計スコアから3群に分類した。

I群 (スコア 0) : 中止成功率は90%で中止可能群。

II群 (スコア 1 or 2) : 中止成功率は約50%で中止考慮群。

III群 (スコア 3 or 4) : 中止成功率は約10%で治療の継続推奨群。

しかし当施設の6ヶ月以上の核酸アナログ製剤治療を行ったB型慢性肝炎患者274名を対象とした検討で、投与期間中のHBs抗原定量とHBコア関連抗原は、ともに低下傾向を示したが非常に緩やかであり、中止基準I群に至る症例は10%と僅かで、II群を含めても約50%程度であった。またHBs抗原は長期の自然経過において年率3%程度で陰性化することが報告されているが、HBs抗原の陰性化につながる積極的な治療は未だ確立されていない。

田中班の多施設共同研究として、B型慢性肝炎のDrug freeを目指した核酸アナログ製剤中止時に、PEG-IFN α 2a療法を行うことの有効性と安全性について前向き研究(RESET STUDY)が企画された。今回、当施設では2年以上の核酸アナログ製剤治療からPEG-IFN α 2a療法への切り替え群(A群)に関して、当施設登録症例についてPEG-IFN α 2a療法の有用性を検討した。

B. 研究方法

B型慢性活動性肝炎の核酸アナログ治療症例で、同薬の中止を考慮している患者のうち、以

下の基準を満たし、かつ除外基準に該当しないものを対象として、核酸アナログ中止条件の低リスク群、中リスク群、高リスク群を評価した上でエントリーを行った。

1. 対象

適格基準

- 1) 核酸アナログ薬投与開始後2年以上経過している。
- 2) 血中HBe抗原陰性かつ血中HBV DNA量が3.0 log copies/ml未満(リアルタイムPCR法でHBV DNA陰性が望ましい)である。
- 3) 肝線維化が軽度で肝予備能が良好であり、肝炎が再燃した場合でも重症化しにくい症例である。(F2まで)
- 4) 中止による肝炎再燃の危険性を患者またはその家族が十分理解しており、さらに、中止後の経過観察が可能である。
- 5) 本試験の参加にあたり、十分な説明を受けた後、十分な理解の上、文書による患者本人の自由意思による同意が得られた患者である。

核酸アナログの中止条件

核酸アナログ中止時に測定したHBs抗原定量とHBコア関連抗原をスコア化し、合計スコアが0点を低リスク群、1~2点を中リスク群、3~4点を高リスク群として分類した。

除外基準

- ① 重篤な肝障害(総ビリルビン \geq 2.0mg/dL、プロトロンビン時間 $<$ 60%、アルブミン $<$ 3.6g/dLのうち、2項目以上に抵触する)患者
- ② 自己免疫性肝炎、アルコール性肝炎等その他の慢性肝疾患患者、肝硬変または肝不全を伴う患者
- ③ 重篤な合併症を有する患者、特に骨髄機能、腎機能、心機能、呼吸機能が十分に保たれていない患者
- ④ 妊娠している可能性のある女性、妊婦、授乳婦。
- ⑤ 間質性肺炎の既往歴のある患者
- ⑥ ペグインターフェロン α -2aまたは他のイ

ンターフェロン製剤に対し過敏症の既往歴のある患者

- ⑦ 重度のうつ病、自殺念慮または自殺企図等の重度の精神病状態にある患者又はその既往歴のある患者
- ⑧ その他、試験担当医師が本試験への参加が不適当と判断した患者

2. 研究デザイン

田中班の多施設共同研究は、A群とB群が存在するが、本報告はA群のみを対象とした(図1)。同意が得られた核酸アナログ長期投与患者に対して、核酸アナログ製剤を中止しPEG-IFN α 2a 180 μ g 週1回48週間投与に切り替え、投与終了後Drug freeの観察期間は48週間である。期間中HBV DNA量が5.8 log copies/ml以上もしくはALTが80 IU/L以上に上昇する場合は再燃と定義し、核酸アナログによる治療を再開した。

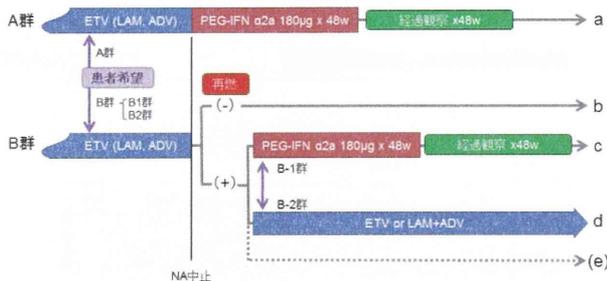


図1 研究デザイン：RESET STUDY(田中班)

3. 評価項目と研究期間

主要評価項目：治療終了後の臨床的安定化率 (Drug free)

- i 著効：一過性のHBV DNAやALT値の上昇にかかわらず、治療終了後24週または48週で、HBV DNA $<$ 4.0 log copies/mlかつALT $<$ 30 IU/Lとなり臨床的に安定化する症例
- ii 有効：一過性のHBV DNAやALT値の上昇にかかわらず、治療終了後48週で核酸アナログ薬の再投与を必要としない症例。

副次的評価項目：臨床的安定化と関連する因子

- i HBs抗原量
- ii HBcr抗原量

- iii HBe抗原/HBe抗体
- iv HBV genotype
- v PC/CP変異
- vi IL-28B SNP
- vii IP10
- viii 臨床的背景因子、その他

研究予定期間

症例集積期間：2012年3月～2015年4月
症例追跡期間：2012年3月～2016年11月

(倫理面への配慮)

本試験はGCPを準用するものとする。また、ヘルシンキ宣言(2000年改定)を遵守して実施する。疾患の特殊性と将来の探索的研究を踏まえて連結可能匿名化・データ分割管理とし、個人同意情報(対応表)は各共同研究施設の研究分担者が保管する。

本研究の遂行にあたっては、兵庫医科大学倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

平成25年12月11日時点で田中班の多施設共同研究の登録症例は145症例であり、その中で当院登録症例は58症例(A群51症例、B群7症例)である。今回は当院登録症例のA群51症例の核酸アナログ中止時のPEG-IFN α 2a投与の有効性について検討した。現在PEG-IFN α 2a投与48週投与終了症例は26症例、最長観察期間はPEG-IFN α 2a投与終了後36週であり、今回の報告ではPEG-IFN α 2a投与後24週目と36週目を評価時期とした(図2)。

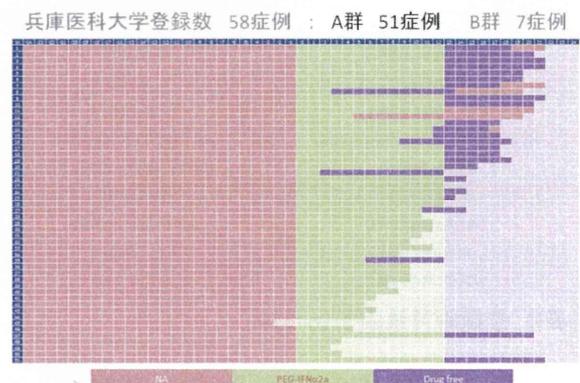


図2 進捗状況(2013/12/11)

安全性評価としてPEG-IFN α 2a投与51症例中8症例で投与中止となった。重篤な副作用は2症例で肝炎の急性増悪が1症例と脳出血が1症例あった。肝炎の急性増悪は肝機能の著明な増悪とPTの低下を認めたが、ETVの再投与により回復した。脳出血症例は生命の危機に及ぶ程ではなかったが軽度の麻痺が残り、現在はDrug freeとして観察している。他にはHCCの発症を認め加療目的でETVが再開され、他は必ずしもPEG-IFN α 2aの中断を必要とするものではなかったが、患者自身の希望により中止となり、Drug freeとなった。(表1)。

登録番号	IFN投与期間(W)	中止理由	対応
10	8W	てんかん発作	Drug free
15	40W	HCC	NA(ETV)再開
16	16W	急性増悪	NA(ETV)再開
26	36W	慢性甲状腺炎増悪	Drug free
27	28W	脳出血	Drug free
42	4W	抑うつ状態	Drug free
56	40W	眼底出血	Drug free
80	16W	眼底出血	Drug free

表1 PEG-IFN α 2a投与中止症例(8症例)

PEG-IFN α 2a投与直前の登録時の背景は、年齢43歳(中央値;最大-最小26-74)、核酸アナログ投与期間4.29年(1.13-11.3)、HBe抗原(陽性/陰性)20/31、病理組織(F0/F1/F2/F3)1/25/15/8、HBV DNA(陰性/<2.1/>=2.1)24/16/11、HBs抗原量1613.3 IU/ml(40.0-22031.0)、HBコア関連抗原4.9 logIU/ml(3.0-6.8)で、中止基準の再燃リスク評価は中リスク群11例、高リスク群40例で低リスク群は存在しなかった(表1)。

	実数・中央値(最小-最大)
年齢	43(26-74)
性別(M/F)	36/15
NA投与期間(Y)	4.29(1.13-11.3)
Genotype(A/B/C)	4/1/46
HBeAg(+/-)	20/31
組織(F0/F1/F2/F3)	1/25/15/8
HBV DNA(ケンジュセス/<2.1/>=2.1)	24/16/11(2.1-4.8)
HBsAg(IU/ml)	1613.3(40.0-22031.0)
Score(0/1/2)	5/11/35
HBcrAg(logIU/ml)	4.9(<3.0->=6.8)
Score(0/1/2)	2/13/36
リスク(低/中/高)	0/11/40

表2 登録時背景因子(n=51)

まず、最初にPEG-IFN α 2a投与期間中、および投与終了後のトランスアミナーゼとHBV DNA

の推移と評価を行った。2年以上の長期にわたる核酸アナログ製剤の投与は多くの症例でHBV DNAを陰性、もしくは2.1 log copies/ml未満に減量させ、それに伴いALT値も30 U/I未満に収束した。一部の収束していない症例ではHBe抗原陽性症例が多かった。

PEG-IFN α 2a投与開始後、多くの症例でHBV DNAは上昇し、それに追従してALTの上昇を認めたが、HBV DNAがPEG-IFN α 2a投与24週以内の一過性の上昇だけで、24週以降48週にかけて再び収束する群と、収束を認めずPEG-IFN α 2a投与終了時までHBV DNAの高値が持続する群が観察された。しかしALT値は一部を除きPEG-IFN α 2a投与中は再燃基準以内であった。

PEG-IFN α 2a投与終了後Drug freeとしての観察期間中、再びHBV DNAとALTは上昇した。いずれもPEG-IFN α 2a投与中と比べ上昇率は高く、ALT値が再燃基準を超えて核酸アナログ再投与が必要となった症例が4症例存在した(図3A、B)。

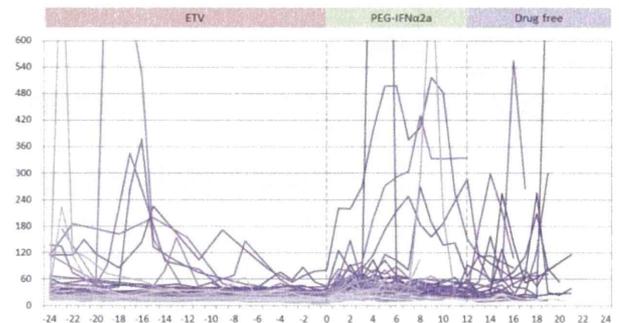


図3A ALTの推移

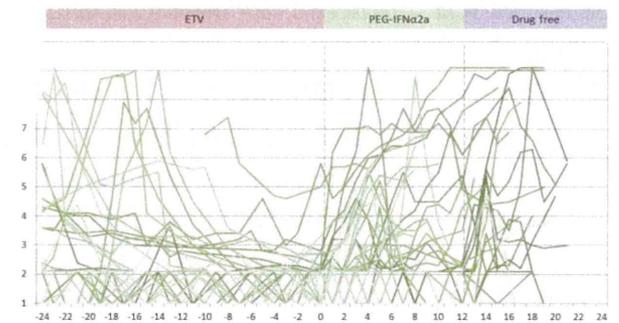


図3B HBV DNAの推移

PEG-IFN α 2a投与期間中のALTとHBV DNAの評価は、HBV DNAは投与前と投与終了時では明らかな上昇があり有意差が認められたが、ALT

値では有意差は認められなかった (図 4)。

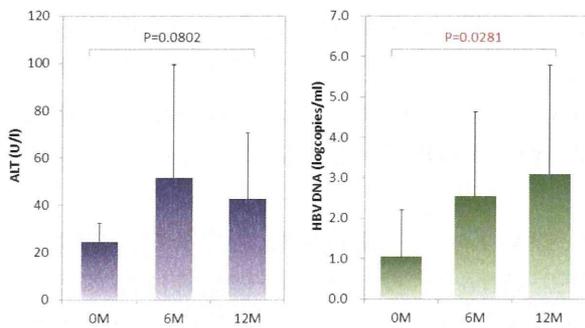


図4 PEG-IFN α 2a投与期間中のALTとHBV DNAの評価

次いで、HB コア関連抗原と HBs 抗原定量による PEG-IFN α 2a 投与の有効性の評価を行った。核酸アナログ製剤投与中、HB コア関連抗原は緩やかな低下を認めたが、PEG-IFN α 2a 投与開始後もその低下率は大きな変化は見られなかった。対して HBs 抗原定量値は核酸アナログ製剤投与中僅かな低下しか認めなかったが PEG-IFN α 2a 投与開始後多くの症例で著明な低下を示した。約半数で 1 log IU/ml 以上の低下を認め、その中の 1 症例は HBs 抗原が陰性化した。

PEG-IFN α 2a 投与中は HBV DNA や ALT が一過性に上昇しても HB コア関連抗原や HBs 抗原定量がその影響を受けることは少なかったが、PEG-IFN α 2a 投与終了後は、HBV DNA が高値持続し ALT 値が再燃基準をこえるような症例では HB コア関連抗原も HBs 抗原定量どちらも再上昇をきたした。一方で HBV DNA と ALT 値が再燃しなかった症例では HB コア関連抗原と HBs 抗原定量は安定化しており、PEG-IFN α 2a 投与終了後に HBs 抗原定量が陰性化した症例が 1 症例出現した (図 3C、D)。

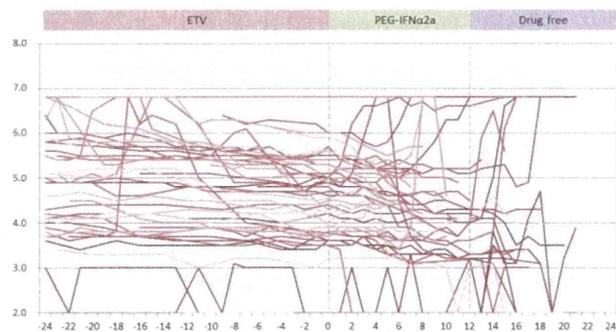


図3C HBcrAgの推移

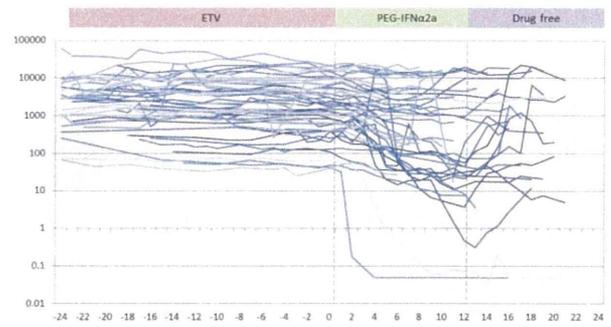


図3D HBsAgの推移

さらに治療期別に HB コア関連抗原と HBs 抗原定量を評価したが、HBs 抗原定量は PEG-IFN α 2a 投与期間中に有意差をもって低下を認め、年間の低下率は 1.04 log IU/ml であった。一方で PEG-IFN α 2a 投与終了後の HBs 抗原定量値は PEG-IFN α 2a 投与中のような著明な低下症例は見られず有意差は認めなかった (図 5B、C)。

また、HB コア関連抗原は治療期別にはその低下率に有意差は見られなかったが、PEG-IFN α 2a 投与終了後の Drug free 期間で大きく低下する症例が認められた (図 5A)。

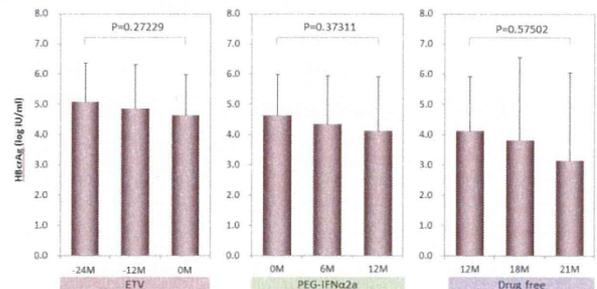


図5A 治療期別のHBcrAgの推移

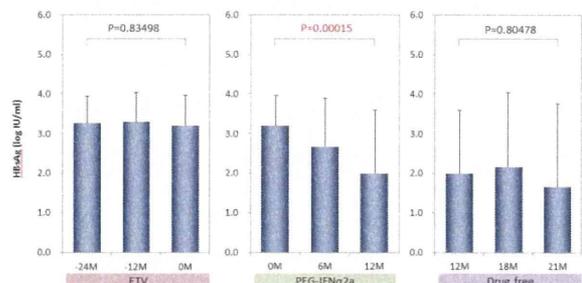


図5B 治療期別のHBsAgの推移

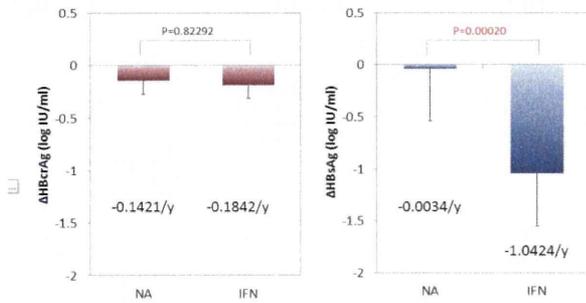


図5C NA製剤とPEG-IFN α 2a(48W)投与期間中のHBcrAgとHBsAgの変動率

次いで、PEG-IFN α 2a 投与期間中の HBs 抗原定量の変動に影響を与える因子が何であるか検討を行った。PEG-IFN α 2a 投与期間中の HBs 抗原定量の年間低下率は 1.04 log IU/ml であるので、1 log 以上の低下と 1 log 未満の低下に群別し、関連因子を単変量解析した。その結果、有意差を認めたのは年齢や登録時の ALT の値ではなく肝臓の組織学的線維化 (F 因子) のみであった (表 3)。そこで、F 因子ごとの HBs 抗原定量の年間低下率を検討すると p=0.05076 であった (図 7)。

OM	≥ 1 log (n=8)	< 1 log (n=11)	p
Gender (M/F)	6/2	8/3	0.91752
Age	49.5 \pm 10.6	52.4 \pm 13.2	0.61885
NA (years)	7.08 \pm 2.64	4.83 \pm 3.32	0.13346
F (F1/F2/F3)	0/5/3	9/1/1	0.00190
HBeAg (+/-)	2/6	3/8	0.91752
ALT (OM)	27.0 \pm 9.3	25.4 \pm 18.8	0.82437
HBV DNA (log copies/ml)	2.1 \pm 0.2	3.3 \pm 1.7	0.86309
HBcrAg (log IU/ml)	4.35 \pm 0.73	4.34 \pm 1.92	0.98506
HBsAg (log IU/ml)	2.79 \pm 0.72	2.97 \pm 0.71	0.59669
Total score (0/1/2/3/4)	0/1/1/3/3	0/0/3/5/3	0.59132

表3 PEG-IFN α 2a 投与期間中のHBsAgの変動に関与する因子の検討(単変量解析)

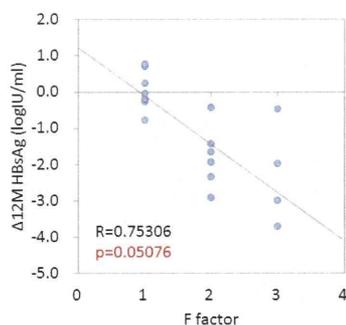


図7 PEG-IFN α 2a 投与期間中の HBsAg の変動と F 因子の相関

現報告時点での PEG-IFN α 2a 投与終了症例は 26 症例であり、投与終了後 24 週観察可能症例が 15 症例、36 週観察可能症例は 9 症例である。それらの症例による PEG-IFN α 2a 投与終了後の Drug free 評価は、24 週の Drug free 達成と再燃症例が同数で 46.7%、36 週も 44.4%であった。

核酸アナログ製剤の中止基準による評価では、PEG-IFN α 2a 投与直前の登録時は高リスク群が 40 症例、中リスク群が 11 症例と中止可能症例は明らかに少なかったが、PEG-IFN α 2a 投与終了時点では高リスク群が 10 症例、中リスク群が 15 症例と改善し、低リスク群 1 症例を認めるようになった。投与終了後 24 週ではさらに低リスクへの移行が認められた (図 6A)。

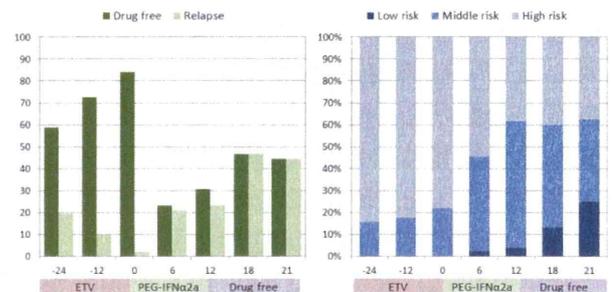
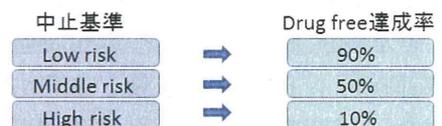


図6A Drug freeと中止基準による評価



	0M	12M	18M
Low risk	0/50	1/26	
Middle risk	11/50	15/26	44.4%
High risk	39/50	10/26	
Drug free	18.8%	36.2%	

図6B Drug freeと中止基準による予測

PEG-IFN α 2a 投与終了後 24 週の Drug free 達成と再燃症例が同数であったことから、それらの間の関連因子を単変量解析で検討した。その結果、有意差を認めたのは HBe 抗原の有無、登録時の ALT の値、そして核酸アナログ製剤の中止基準の score であった。その中で最も強く影響を及ぼしていたのは HBe 抗原の有無であり、

HBe 抗原の有無別に HBV DNA と ALT、さらに HB コア関連抗原と HBs 抗原定量の推移を見てみると、HBV DNA と ALT は核酸アナログ治療期は差はないが、PEG-IFN α 2a 投与期では HBe 抗原陽性症例は HBV DNA が陰性症例より高くなり、PEG-IFN α 2a 投与終了後は再燃症例が多くなっていった。また、HB コア関連抗原は明らかに HBe 抗原陽性で高く、HBs 抗原定量は核酸アナログ治療期と PEG-IFN α 2a 投与期では全く差を認めないが PEG-IFN α 2a 投与終了後 24 週では差が生じた (表 4、図 8A、B)。

	Drug free (18M) n=7	Relapse (18M) n=8	P
Gender (M/F)	4/3	7/1	0.211467
Age	55.1 \pm 11.8	53.1 \pm 12.1	0.750916
NA (Y)	5.44 \pm 3.17	7.19 \pm 3.94	0.36436
Genotype (A/B/C)	0/0/6	0/0/8	
F (F1/F2/F3)	2/3/2	3/4/1	0.535839
IL28B (TT/nonTT)	4/1	6/2	0.851389
IP10	176.1 \pm 106.5	215.6 \pm 65.2	0.394890
HBeAg (+/-)	0/7	6/2	0.000919
ALT (12M)	24.8 \pm 15.5	49.0 \pm 23.0	0.035866
HBV DNA (12M)	1.67 \pm 1.95	3.50 \pm 2.63	0.155930
HBcrAg (12M)	3.01 \pm 1.41	4.67 \pm 2.39	0.133327
HBsAg (12M)	1.20 \pm 2.11	1.92 \pm 1.37	0.440287
Total score (0/1/2/3/4)	2/2/3/0/0	0/1/1/2/4	0.002539
Δ HBcrAg (IFN)	-0.27 \pm 0.26	-0.11 \pm 0.91	0.664961
Δ HBsAg (IFN)	-1.72 \pm 1.20	-0.98 \pm 1.29	0.280660

表4 Drug freeに関連する因子の検討(単変量解析)

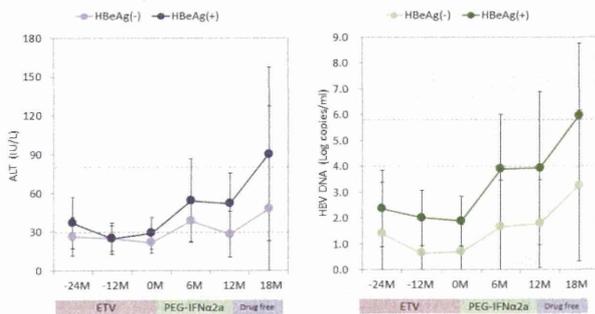


図8A HBeAg陽性/陰性別のALTとHBV DNAの推移

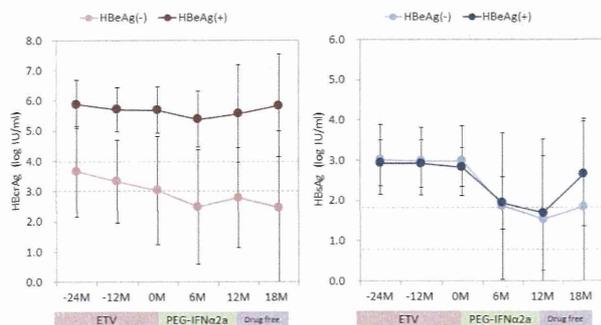


図8B HBeAg陽性/陰性別のHBcrAgとHBsAgの推移

D. 考察

核酸アナログ製剤とインターフェロン治療の併用療法である Sequential 療法は今まで数多くの報告があるが、未だ明らかなエビデンスはなくコンセンサスが得られているとは言い難い。今回、田中班の多施設共同研究として行われている核酸アナログ治療と PEG-IFN α 2a の併用療法は、従来の Sequential 療法とは概念が大きく異なり、新たな成果が期待される。まずその目的であるが、従来の Sequential 療法の多くがインターフェロンの効果を高めるための核酸アナログ治療の併用であり、対象者はインターフェロン効果が期待される若年者を中心とし、インターフェロン前に投与される核酸アナログ製剤の種類やインターフェロンとの併用期間など投与方法が重要視されてきた。それに対して今回の班研究は、長期の核酸アナログ治療を行っている患者を対象とした核酸アナログ製剤の中止、つまり Drug free を目的としたインターフェロン治療の有効性の検討である。そのため対象者は核酸アナログ製剤を少なくとも 2 年以上服用している患者であり、年齢は若年者だけでなく 35 歳以上も含む。また核酸アナログ製剤の種類や投与方法は問わず、PEG-IFN α 2a 投与前の HB コア関連抗原や HBs 抗原定量による中止基準のスコアリング評価を指標とした。そして最終評価項目は BR や VR などの従来の評価項目と異なり Drug free 達成率である。副次項目として肝細胞内の cccDNA を反映する HB コア関連抗原や HBs 抗原定量の陰性化、もしくは減少を目指す。さらに核酸アナログ製剤からインターフェロンへの移行も、重複することに明らかなエビデンスが得られていないことから併用期間を設けず切替えとした。核酸アナログ治療を単独で中止した時、多くの症例で一過性に HBV DNA と ALT が上昇し免疫賦活状態となることが明らかであり、その時点でインターフェロンを開始し、より有効性を高める目的をもつ。また PEG-IFN α 2a の国内臨床試験において有効性を認めたのは投与量と投与期間であったことから、インターフェロンの投与期間を最大限延長するため併用期間をなくした。このように本研究は従来の Sequential 療法とは異なる観点から企画され

た。

現在、PEG-IFN α 2a を 48 週投与終了した症例は 26 症例、最長観察期間は PEG-IFN α 2a 投与終了後 36 週であった。今回の報告では PEG-IFN α 2a 投与後 24 週目と 36 週目での評価を行った。

ALT と HBV DNA はどちらも核酸アナログ製剤治療中止後、多くが一過性の上昇を認めた。これは核酸アナログ製剤治療終了時にインターフェロン治療を重複せずに移行させた影響と考え、インターフェロン治療効果を高める当初の目的に一致する結果となった。また PEG-IFN α 2a 投与中は HBV DNA が高値となっても ALT は正常、もしくは軽度上昇を維持する症例が多く、急性増悪で PEG-IFN α 2a を中断したのは、1 症例のみであった。HB コア関連抗原と HBs 抗原定量の推移に関しては、HB コア関連抗原は核酸アナログ製剤投与中も PEG-IFN α 2a 投与中も大きな変化はなく緩やかな低下が持続した。一方、HBs 抗原定量値は核酸アナログ製剤投与中、僅かな低下しか認めなかったが、PEG-IFN α 2a 投与開始後多くの症例で著明な低下を認め、約半数で 1 log IU/ml 以上の低下を示し、その中の 1 症例は HBs 抗原が陰性化した。HBs 抗原は、自然経過でも年率 3%程度は陰性化すると言われているが、その減少率は非常に低く、陰性化を認める多くは高齢者である。核酸アナログ製剤使用時も HBs 抗原の低下率は自然経過とほとんど変わらず年間 0.1 log IU/ml 未満である。PEG-IFN α 2a は HBs 抗原を減少させるより有効な手段となり、若年者でも HBs 抗原の消失を目指すことの可能性が示唆された。

また主要評価項目である Drug free を目指すうえで有効であったのは、PEG-IFN α 2a 投与による核酸アナログ中止基準評価の改善である。核酸アナログ中止時点では中止基準は高リスク群と中リスク群のみで、予測の Drug free 達成率は 18.8%に過ぎなかったが、PEG-IFN α 2a 投与終了時には中止基準リスクが軽減され、高リスク群が減り低リスク群の出現を認め、Drug free 達成率は 36.2%にまで向上していた。多くは PEG-IFN α 2a 投与による HBs 抗原の低下による中止基準スコアの改善であり、PEG-IFN α 2a 投与終了 24 週、もしくは 36 週時点での Drug free

達成率は症例数がまだ限定されているが、44.4%に達していた。PEG-IFN α 2a は Drug free を達成する非常に有効な手段となることが示唆され、また同時に HBs 抗原と HB コア関連抗原を指標とした核酸アナログ製剤中止基準は治療効果の予測指標となることが考えられた。

E. 結論

B 型慢性肝炎における今後の治療目標は、自然経過を抗ウイルス剤によって修飾し、早期に HBs 抗原の陰性化をもたらし、肝不全化や肝発がんを回避する治療法を確立することである。しかし現時点で HBV に対する免疫反応や増殖形態が臨床的にはほとんど把握できていないため、病態別の適正な治療の選択や治療効果の正確な予測は困難である。今回の核酸アナログ製剤長期投与例に対する中止後の PEG-IFN α 2a 併用療法は、多くの症例で HBs 抗原の低下を認め、良好な経過を示す症例が多数存在し、中止対象の拡大、drug free を目指す治療として有用である可能性が示唆された。今後はどのような症例で HBs 抗原を減少させることができるのか、あるいは消失させられるのか検討を重ね、基準を設定することが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enomoto H, Nishiguchi S et al. Molecular detection of intra-peritoneal bacterial infection in cirrhotic ascites. *RM curr. Res. in Gastroenterology and Hepatology* 7, 2013(1-8)
- 2) Enomoto M, Nishiguchi S, Saito M, et al. Entecavir and interferon- α sequential therapy in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Journal of Gastroenterology* 2013 Mar;48(3): 397-404
- 3) Nishiguchi S, Osaki Y, Kudo M. et al. Relevance of the Core 70 and IL-28B

polymorphism and response-guided therapy of peginterferon alfa-2a ± ribavirin for chronic hepatitis C of Genotype 1b: a multicenter randomized trial, ReGIT-J study.

J Gastroenterol. 2013 Mar 30.

- 4) Takashima T, Saito M, Nishiguchi S. et al. Hepatitis C virus relapse was suppressed by long-term self-injection of low-dose interferon in patients with chronic hepatitis C after pegylated interferon plus ribavirin treatment. Hepatol Res. 2013 May 2
 - 5) Tanaka H, Saito M, Nishiguchi S. et al. New malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the Sonazoid contrast agent for ultrasonography. J Gastroenterol. 2013 May 30
 - 6) Ikeda N, Saito M, Nishiguchi S. et al. Nationwide survey in Japan regarding splenectomy/partial splenic embolization for interferon treatment targeting hepatitis C virus-related chronic liver disease in patients with low platelet count. Hepatol Res 2013 Jun 14.
 - 7) Enomoto H, Saito M, Nishiguchi S. et al. Association of amino acid imbalance with the severity of liver fibrosis and esophageal varices. Ann Hepatol. 2013 May-Jun;12(3):471-8.
 - 8) Aizawa N, Saito M, Nishiguchi S. et al. Thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. J Gastroenterol. 2013 Sep 25. [Epub ahead of print]
2. 学会発表
- 1) Donald M. Jensen Tarik Asselah, Douglas T. Dieterich, Shuhei Nishiguchi, et al. A pooled analysis of two randomized, double-blind placebo-controlled Phase III trials (STARTVersol&2) of faldaprevir plus pegylated interferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C genotype-1 infection. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) 2013.11 Washington
 - 2) Hironori Tanaka, Masaki Saito, Shuhei Nishiguchi et al. Usefulness and challenges associated with the spleen stiffness via Virtual Touch Quantification for the prediction of liver fibrosis. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington
 - 3) Tomoko Aoki, Masaki Saito, Shuhei Nishiguchi. et al. Analysis of risk factors for aiming at early detection of hepatocellular carcinoma. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington
 - 4) Hironori Tanaka, Masaki Saito, Shuhei Nishiguchi. et al. Spleen stiffness accurately predicts esophageal varices in patients with chronic liver disease regardless of the presence of portosystemic collaterals. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington
 - 5) Hirayuki Enomoto, Masaki Saito, Shuhei Nishiguchi. et al. HDGF (hepatoma-derived growth factor)-silencing inhibits the proliferation of hepatoma cells through asorafenib-independent pathway. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington
 - 6) Nobuhiro Aizawa, Masaki Saito, Shuhei Nishiguchi. et al. The mitochondrial gene abnormalities and sustained pathological alterations in the liver after hepatitis

C virus eradication. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington

- 7) Koichi Ohashi, Tomohiro Yoshimoto, Shuhei Nishiguchi. et al. Hepatocyte producing plasminogen activator-1 (PAI-1) regulates adhesion formation after hepatectomy in a murine model and in patients undergoing hepatectomy. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington

[国内学会]

- 1) 田守昭博, 河田則文, 西口修平. 全数調査から見た輸血後 B 型肝炎ウイルス陽転例の解析-HBV 再活性化の可能性-. (シンポジウム). 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.6. 東京
- 2) 西口修平. C 型肝炎治療の今後の展望と課題. (ランチョンセミナー) 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.6. 東京
- 3) 西口修平. 肝硬変のトータルマネジメント. 第 17 回日本肝臓学会大会. (ランチョンセミナー) (JDDW2013)2013.10 東京
- 4) 齋藤正紀, 榎本平之, 西口修平. Drug free を目指した核酸アナログ製剤中止後の PEG-IFNa2a 療法の検討. (パネルディスカッション). 第 17 回日本肝臓学会大会. (JDDW2013)2013.10 東京
- 5) 西口修平, 八橋弘, 久保木真, 田中靖人, 富田栄一, 加藤道夫, 岩渕省吾, 坂井義法, 辻邦彦, 宣保行雄, 横須賀收, 森山光彦, 井出達也, J Scherer, Y Datsenko, 富森裕規, A-M. Quinson, 小俣政男. 未治療 C 型慢性肝炎患者に対する Faldaprevir + PegIFN + Ribavirin 併用療法による第 3 相試験 (STARTVer-sol) . (ポスターセッション). 第 17 回日本肝臓学会大会 (JDDW2013)2013.10 東京
- 6) 齋藤正紀, 榎本平之, 西口修平. Drug free を目指した核酸アナログ製剤中止後の

PEG-IFN2a 療法の検討. (パネルディスカッション). 第 55 回日本消化器病学会大会 (JDDW2013)2013.10. 東京

- 7) 西口修平. 肝硬変の栄養療法. 平成 25 年度日本肝臓学会後期教育講演会. 2013.12 岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(※予定を含む)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

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）

分担研究報告書

HBV 感染者に対するインターフェロンの効果

研究分担者 柘植雅貴 広島大学自然科学研究支援開発センター 助教
研究協力者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：B型慢性肝疾患に対してインターフェロン（IFN）治療が行われているが、その治療効果には個人差があり、効果は十分とは言えない。また、核酸アナログ治療例に対し、sequential therapy が試みられているが、核酸アナログ製剤先行投与の有用性に関しても不明である。本研究では、B型慢性肝疾患において、核酸アナログ投与の有無による IFN 反応性の違いを明らかにすることを目的とした。30例の IFN 投与例を単独投与例と sequential therapy 例に分け、治療中・治療後の HBs 抗原量の推移を観察した結果、sequential therapy において、HBs 抗原低下例が多く認められ、核酸アナログ治療が IFN 反応性に影響しているものと考えられた。そのため、HBV 発現培養細胞株を用いて、細胞内の IFN 反応性を検討した結果、核酸アナログ添加により、IFN 添加後の細胞内の IFN 誘導遺伝子発現は増強しており、核酸アナログによる HBV 抑制が肝細胞内の IFN 反応性を改善している可能性が示唆された。以上の結果から、核酸アナログと IFN を工夫して用いることで、治療介入による抗ウイルス効果の向上（HBs 抗原の低下・消失）が期待できるものと考えられた。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患に対してペグインターフェロン治療が保険適応となり、HBs 抗原の低下・消失例の報告されるようになり、治療効果の向上が期待される一方で、治療終了後に再燃する症例も散見され、インターフェロン（IFN）による治療効果向上が期待されている。

一方、近年では、drug free を目指し、核酸アナログ治療例に対し、sequential therapy などの IFN を併用した治療が試みられている。しかしながら、核酸アナログ製剤を先行投与することによる IFN 治療への影響については不明な点が多い。

本研究では、B型慢性肝疾患において、核酸アナログ投与の有無による宿主の IFN に対する反応性の変化について検討した。

B. 研究方法

検討 1: B 型慢性肝疾患症例における IFN 治療効果の比較

対象は、当院および関連施設にて IFN 治療を行った 30 例について、治療終了時および終了後

の HBV 関連マーカーの推移について検討した。解析対象は、全例 HBV genotype C 感染例とし、IFN 治療開始時の ALT 値を 100IU/L 未満とした。IFN 単独投与症例が 11 例、核酸アナログ治療を先行した sequential therapy 症例が 19 例。HBs 抗原の測定は、ARCHITECT（Abbott、CLIA 法）を用い、HBV DNA の定量にはアキュジーン m-HBV（Abbott、0.2ml 法）を用いた。

検討 2: in vitro における細胞内 IFN 誘導遺伝子発現の変化

HepG2 細胞に HBV 発現プラスミドを stable transfection して作成した HBV 発現細胞株を用いて、細胞内の IFN 誘導遺伝子（ISGs）誘導について検討した。HepG2 細胞および HBV 発現細胞の培養上清中に核酸アナログ（エンテカビル：ETV）および IFN を添加し、IFN 添加 24 時間後の細胞内の ISGs 発現をリアルタイム PCR にて検討した。

（倫理面への配慮）

患者血清保存ならびに B 型肝炎ウイルス関

連マーカーの測定に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。

C. 研究結果

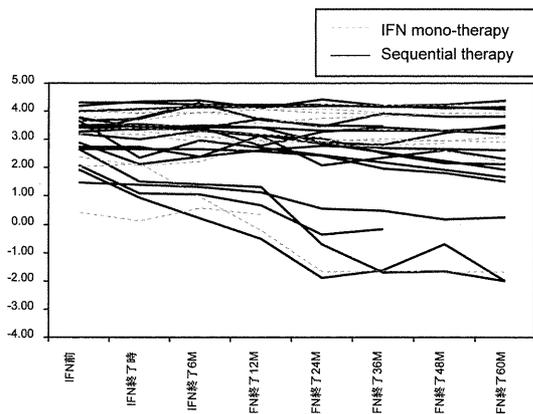
検討1: B型慢性肝疾患症例におけるIFN治療効果の比較

まず、IFN単独投与症例(N=11)とsequential therapy症例(N=19)の臨床背景を比較したところ、sequential therapy症例では、核酸アナログ製剤を先行投与されていることから、IFN治療開始時のALT値が有意に低く(P=0.016)、HBV DNA量も有意に低値だった(P=0.001)。一方、年齢やIL28B遺伝型、HBeAg陽性率には有意な差は認めなかった。

これらの30症例におけるIFN治療中のHBs抗原量の推移を検討したところ、図1に示すように、Sequential therapy症例において、IFN治療中、治療後にHBs抗原量の低下する症例が多く認められた。

そこで、IFN治療終了5年以内にHBs抗原量が1Log IU/ml以上低下した症例と低下しなかった症例に分けて、HBs抗原低下に寄与する因子を検討した結果、IFN治療前のHBs抗原量が低値であること、HBeAgが陰性であること、sequential therapy症例であることがHBs抗原低下に寄与する因子として抽出された(P=0.004、P=0.065、P=0.065)。

図1. IFN治療によるHBsAgの変化

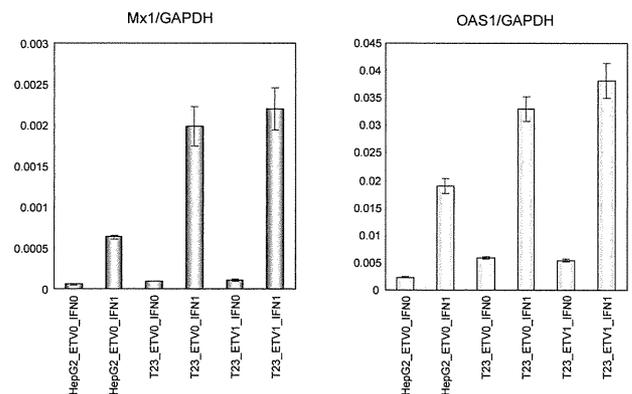


検討2: in vitroにおける細胞内IFN誘導遺伝子発現の変化

前述の臨床データの結果から、核酸アナログ治療に伴い、細胞内のIFN反応性が改善することが考えられたため、培養細胞を用いてさらなる検討を行った。

以前、当研究室では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV感染に伴うヒト肝細胞内の遺伝子発現変化について報告した(Tsuge M, et al. Journal of Infectious Diseases, 2011)。その際、interferon signalingをはじめとした免疫応答に関与する遺伝子群において、HBV感染に伴いIFNに対する反応性が低下することが同定された。そのため、本検討では、HBV感染に伴いIFN反応性が低下すると考えられるinterferon signalingについて、核酸アナログ製剤であるETVの使用により、どのようにIFNによる誘導が変化するかを検討した。その結果、HBV非発現細胞株では、IFN誘導遺伝子MxA、OAS1の発現は亢進しており、ETV添加により、HBV非発現細胞株(HepG2細胞)とほぼ同等まで改善した(図2)。さらに、IFNを培養上清に添加した際には、ETVで処理した細胞において、MxA、OAS1の発現上昇率の向上が観察され、ETVによるIFN反応性の改善が示された(図2)。

図2. エンテカビル投与によるIFN反応性の回復



D. 考察

本研究では、B型慢性肝疾患症例に対し、IFN単独投与を行った場合と核酸アナログ療法を先行して行った場合(Sequential therapy)におけるIFN投与中および投与終了後のHBs抗原量の推移について検討した。少数例での解析であ

ったため、十分な有意差は認められなかったものの、Sequential therapy 症例において、HBs 抗原が 1 Log IU/ml 以上低下する症例が多く認められた (P=0.065)。また、HBs 抗原量の低下には、治療前の HBs 抗原量、HBeAg の有無も関与していることが示唆され、IFN 治療前に HBe セロコンバージョンを誘導し、ウイルス増殖を抑制することが、IFN 反応性を向上させるために重要であると考えられた。

一方、臨床データを裏付ける目的で、培養細胞株を用いて HBV 増殖に伴う IFN 反応性の変化および核酸アナログ製剤 (ETV) 添加による IFN 反応性への影響について検討した。培養細胞株においても、HBV 増殖に伴い、IFN 反応性は低下し、IFN 添加時の MxA、OAS1 誘導は抑制された。しかしながら、ETV にて HBV 増殖を抑制した上で、IFN 添加を行ったところ、IFN 誘導遺伝子誘導の改善が認められた (図 2)。つまり、HBV は細胞内で増殖するとともに、肝細胞内のインターフェロンシグナルを抑制し、IFN 誘導遺伝子産生を阻害している可能性が考えられる。実際、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討においても、interferon signaling をはじめとした免疫応答に関与する遺伝子群において、HBV 感染に伴い IFN に対する反応性が低下することが示されており、HBV が生体からのウイルス排除機構から回避し、持続感染を成立させるためのメカニズムが存在するものと考えられた。また、これらのメカニズムを検討することで、より効果的なウイルス排除方法の構築が期待できるものとする。

E. 結論

B 型慢性肝疾患に対する従来型インターフェロンを用いた抗ウイルス療法において、IFN 開始前の HBs 抗原量が低値であること、核酸アナログ先行投与 (Sequential therapy) が治療後の HBs 抗原の低下に有意に関連した。以前の HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた解析により、ヒト肝細胞内の IFN 反応性は、HBV 感染に伴い低下することが示唆されており、ETV などの核酸アナログ製剤を用いて、細胞内のウイルス増殖を抑制することで、細胞内の IFN 反応性

が改善する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清およびマウス、培養細胞株を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masaki K., Takaki S., Hyogo H., Kobayashi T., Fukuhara T., Naeshiro N., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Nagaoki Y., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Aikata H., Ochi H., Takahashi S., Arihiro K. and Chayama K., Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases. *Hepatol Res*, 2013.
- 2) Tsuge M., Murakami E., Imamura M., Abe H., Miki D., Hiraga N., Takahashi S., Ochi H., Nelson Hayes C., Ginba H., Matsuyama K., Kawakami H. and Chayama K., Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*, 2013. 48(10): p. 1188-204.
- 3) Tsuge M. and Chayama K., Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*, 2013. 48(6): p. 779-80.
- 4) Naeshiro N., Kakizawa H., Aikata H., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., Kobayashi T., Honda Y., Miyaki D., Kawaoka T., Tsuge M., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Ishikawa M., Awai K. and Chayama K., Percutaneous transvenous embolization for portosystemic shunts associated with encephalopathy: Long-term outcomes in 14 patients. *Hepatol Res*, 2013.
- 5) Ohishi W., Cologne J.B., Fujiwara S., Suzuki G., Hayashi T., Niwa Y., Akahoshi M., Ueda K., Tsuge M. and Chayama K., Serum interleukin-6 associated with