

厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服実用化研究事業 (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型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療例に対して行われる sequential 療法における IFN 治療効果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 IFN 反応性の違いを明らかにすることを目的とした。37 例の IFN 投与例を単独投与例と sequential 療法例に分け、治療中・治療後の HBs 抗原量の推移を観察した結果、sequential 療法例において、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。メカニズムを解明するため、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。さらに、細胞内の IFN 反応性には、Large-HBs 蛋白や HBc 蛋白の発現が関与している可能性が示唆された。以上の結果から、核酸アナログ治療を先行し、HBV 増殖を抑制することで、IFN による抗ウイルス効果が向上する可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、B型慢性肝疾患に対するインターフェロン (IFN) 治療において、HBs 抗原の低下や陰性化が得られた症例の報告が散見されるようになり、IFN による HBsAg 低下作用が期待されているものの、そのような効果が得られる症例は限定的であり、多くの症例は、十分な抗ウイルス効果が得られていないのが、現状である。

その原因の一つとして、B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染に伴う肝組織内の IFN 反応性低下が考えられる (Tsuge M *et al.* *J Infect Dis*, 2011)。

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 37 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 感染例とした。IFN 単独投与症例が 17 例、核酸アナログ治療を先行した sequential therapy 症例が 20 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 ならびにテノホビル: TDF) および IFN を添加し、IFN 添加 6 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。また、ISGs の代表的遺伝子である Mx1 のプロモーター領域をクローニングしたプラスミドを用いて、Mx1 の転写活性と HBV 関連蛋白発現との関連性をレポーターアッセイやリアルタイム 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 (疫-726)。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。また、本研究では、遺伝子組換え生物等を使用しているが、これらの使用に関しては、広島大学ならびに文部科学省より承認を受けて行っている (26-20 [26 受文科振第 464 号]、26-223)。

## C. 研究結果

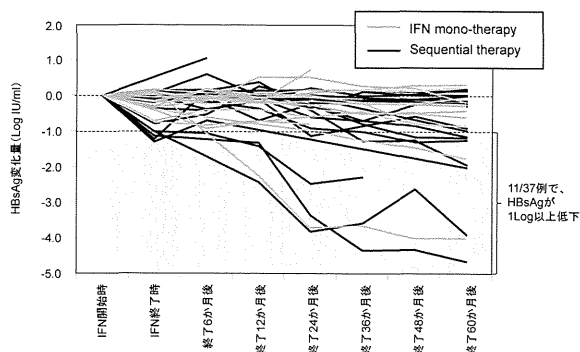
### 検討 1: B 型慢性肝疾患症例における IFN 治療効果の比較

まず、IFN 単独投与症例 (N=17) と sequential therapy 症例 (N=20) 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 ( $P=0.002$ )、HBV DNA 量も有意に低値だった ( $P<0.001$ )。一方、年齢や HBeAg 陽性率には有意な差は認めなかった。

これらの 37 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。

図1. インターフェロン治療中および治療後のHBsAg変化量の推移



そこで、IFN 治療終了 5 年以内の HBs 抗原 1Log IU/ml 以上低下に寄与する因子を解析したところ、男性であること、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 症例であることが有意な因子として抽出された ( $P=0.007$ ,  $P=0.027$ ,  $P=0.031$ ,  $P=0.036$ )。

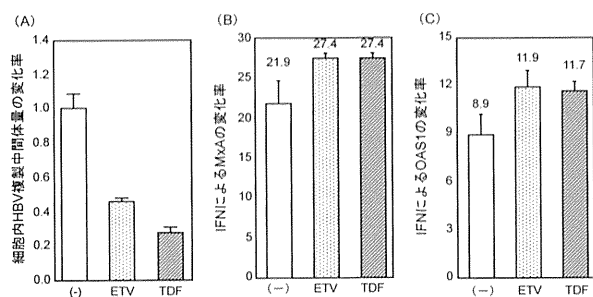
### 検討 2: in vitro における細胞内 IFN 誘導遺伝子発現の変化

臨床データの結果から、核酸アナログ治療を先行し、ウイルス増殖をあらかじめ抑制した上で、IFN 治療を行うことで、IFN に対する反応性が改善する可能性が考えられたため、培養細胞を用いてさらなる検討を行った。尚、培養細胞は、HepG2 細胞に加え、HepG2 細胞に HBV 発現プラスミドを stable transfection し作製した HBV 持続発現細胞株を用いた。

HBV 増殖を抑制することで、IFN 反応性が如何に変化するかと検討するため、HBV 持続発現細胞株に核酸アナログ製剤 (エンテカビル: ETV、テノホビル: TDF) を添加し、6 日間培養した細胞に対し、IFN を添加。添加 6 時間後の IFN 誘導遺伝子発現の変化を検討した。まず、核酸アナログ製剤添加により、HBV 増殖が十分抑制されているかを確認するため、細胞内複製中間体

量を確認したところ、両核酸アナログ製剤をすることにより、50%以下まで低下した (図 2A)。そこで、同細胞において IFN 添加による ISGs 発現誘導を確認したところ、核酸アナログを添

図2. 核酸アナログによるIFN反応性の回復

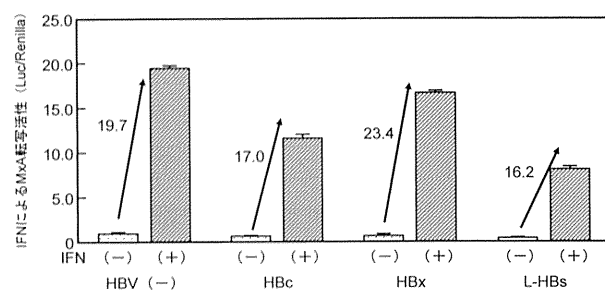


加していない HBV 持続発現細胞と比して、核酸アナログで HBV 増殖を抑制した細胞では、IFN 誘導遺伝子である MxA や OAS1 の誘導が増強しており、核酸アナログ製剤により IFN 反応性が回復したことが示唆された (図 2B、2C)。

以上の結果から、HBV 持続発現細胞株では、細胞内 IFN 反応性が低下しており、核酸アナログ製剤で細胞内の HBV 増殖を抑制することにより、IFN 反応性 (細胞内の ISGs 誘導) が改善することが示された。

IFN 反応性低下には、HBV 関連蛋白が関与する可能性が考えられたため、Mx1 プロモーターを導入したレポータープラスミドを作製し、IFN 添加による Mx1 転写活性と HBV 関連蛋白との関連性について検討した。HepG2 細胞に Mx1 レポータープラスミドと HBV 関連蛋白発現プラスミドを co-transfection 後、IFN を添加し、Mx1 転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、HBc 蛋白、HBs 蛋白を発現することで、Mx1 転写誘導が減弱することが示された (図 3)。

図3. MxA発現変化率とHBV関連蛋白の関連



#### 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。37 例と少数例での解析であるが、Sequential therapy 症例において、1 Log IU/ml 以上 HBs 抗原の低下する症例が多く認められた (P=0.036)。さらに、治療前の HBs 抗原量や HBe 抗原の有無も HBs 抗原低下に関与していることが示唆されており (P=0.027、P=0.031)、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しておくことが、IFN 反応性を向上させる上で重要であると考えられた。

一方、臨床結果に見られたような IFN 反応性が HBV 増殖の影響を受けているか否かを検討するとともに IFN 反応性メカニズムを解明する目的で、基礎的な研究を行った。HBV 持続発現細胞株を用いて、HBV 増殖と細胞内の IFN 反応性との関連性について検討を行った。HBV 持続発現細胞に対し、ETV、TDF といった核酸アナログ製剤を添加し、細胞内の IFN 反応性を解析すると、MxA、OAS1 といった ISGs の誘導は核酸アナログ非添加時に比べ、増強した (図 2)。つまり、細胞内の HBV 増殖を抑制することで肝細胞内のインターフェロンシグナル経路の抑制が解除され、IFN 誘導遺伝子産生が改善したものと考えられた。さらに、図 3 で示したように、HBV 感

染により細胞内で産生される HBV 関連蛋白のうち、HBc 蛋白や Large HBs 蛋白が IFN 反応性を阻害している可能性が示唆された。今後、HBV 関連蛋白が IFN 反応性低下惹起するメカニズムを解析することで、B 型慢性肝疾患に対する IFN 治療における抗ウイルス効果の向上につながる事が期待され、Sequential therapy 中の HBV DNA 再上昇や肝炎再燃の予防にも応用が期待できる。

## E. 結論

核酸アナログ治療中の B 型慢性肝疾患患者に対して Drug free を目的とした Sequential therapy が行われている。本研究結果をもとに考えると、核酸アナログ治療により、十分な HBV 増殖が得られた症例では、IFN に対する反応性が改善している可能性があり、HBe 抗原、HBs 抗原の状態を十分に把握した上で、IFN 治療導入を検討していくことが重要と考えられる。今後、HBV 関連蛋白のインターフェロンシグナル経路への関連メカニズムが解明できれば、IFN による抗ウイルス効果を向上できる可能性がある。

## 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) Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- $\alpha$  sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic

hepatitis B. *Hepatol Res*, 2015, in press.

- 2) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect*, 2014, in press.
- 3) Fujino H., Kimura T., Aikata H., Miyaki D., Kawaoka T., Kan H., Fukuhara T., Kobayashi T., Naeshiro N., Honda Y., Tsuge M., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Takahashi S., Yoshimatsu R., Yamagami T., Kenjo M., Nagata Y., Awai K. and Chayama K., Role of 3-D conformal radiotherapy for major portal vein tumor thrombosis combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2014, in press.
- 4) Naeshiro N., Aikata H., Kakizawa H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Ohno A., Miyaki D., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Takahashi S., Awai K. and Chayama K., Long-term outcome of patients with gastric varices treated by balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol Hepatol* 29(5): 1035-42, 2014.
- 5) Kohno T., Tsuge M., Murakami E., Hiraga N., Abe H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K., Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat*, 2014 in press.
- 6) Huang Y.W., Takahashi S., Tsuge M., Chen C.L., Wang T.C., Abe H., Hu J.T., Chen D.S., Yang S.S., Chayama K. and Kao J.H., On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*, 2014, in press.
- 7) Naeshiro N., Aikata H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D.,

Murakami E., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Ochi H. and Chayama K., Efficacy and safety of the anticoagulant drug, danaparoid sodium, in the treatment of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*, 2014, in press.

- 8) Honda Y., Takahashi S., Zhang Y., Ono A., Murakami E., Shi N., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M., Hiraga N., Abe H., Ochi H., Imamura M., Aikata H. and Chayama K., The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, in press.
- 9) 柘植雅貴、茶山一彰「B型肝炎に対する抗ウイルス療法」*Annual Review 消化器* 2014、中外医学社、104-111、2014
- 10) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」*消化器内科* 58(2)、科学評論社、231-238、2014
- 11) 柘植雅貴、茶山一彰「テノホビル治療 (naïve 例と核酸アナログ治療抵抗例に対する成績)」*医学と薬学* vol. 71、自然科学社、1185-1190、2014
- 12) 柘植雅貴、茶山一彰「差分解説・B型慢性肝炎診療におけるHBs抗原測定」*日本医事新報* No. 4703、日本医事新報社、58、2014

## 2. 学会発表

- 1) 柘植雅貴、村上英介、平賀伸彦、三木大樹、今村道雄、越智秀典、茶山一彰「HBV薬剤耐性変異株に対する核酸アナログの抗ウイルス効果」第51回日本臨床分子医学会 ポスター
- 2) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰「核酸アナログ投与症例におけるHBsAg低下に寄与する因子の検討」第100回日本消化器病学会総会ワークショップ
- 3) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「核酸アナログ投与によるHBV感染ヒト肝細胞内の免疫応答の変化」第50回日本肝臓学会総会シンポジウム
- 4) 村上英介、柘植雅貴、藤野初江、菅宏美、福原崇之、小林知樹、本田洋士、中原隆志、

苗代典昭、大野敦司、宮木大輔、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方浩、茶山一彰「当院におけるHBs抗原陰性化例の解析」第50回日本肝臓学会総会 一般演題

- 5) 村上英介、柘植雅貴、茶山一彰「B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療成績と肝発癌に関する検討」第18回日本肝臓学会大会シンポジウム
- 6) 榎木慶一、柘植雅貴、菅宏美、藤野初江、小林知樹、福原崇之、苗代典昭、本田洋士、宮木大輔、村上英介、河岡友和、平松憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方浩、茶山一彰「HBV genotype CにおけるHBsAg陰性化に関する検討」第18回日本肝臓学会大会ポスター
- 7) Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「Nucleotide analogue improves interferon responsiveness in HBV-infected human hepatocytes」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 8) Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takuro Uchida, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 9) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Satoshi Yoshimi, Eisuke Murakami, Takashi Nakahara, Atsushi Ono, Tomokazu Kawaoka, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama, 「A novel humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of HBV and HCV infections」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 10) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise

- Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decreases with cell density in primary cultured hepatocytes」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 11) Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ono, Sakura Akamatsu, Takashi, Nakahara, Noriaki Seki, Eisuke Murakami, Yizhou Zhang, Takuro, Uchida, Yohji Honda, Keiichi Masaki, Hiromi Kan, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Michiaki Kubo, Kazuaki Chayama 「Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 12) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama 「Establishment of a mouse model of acute hepatitis B by activation of human cytotoxic T lymphocytes」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 13) Hiromi Abe, Tetsushi Sakuma, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Takashi Yamamoto, Kazuaki Chayama 「Analysis of the effect on HBV life cycle by HBV genome editing using TALEN and CRISPR/Cas9 systems」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 14) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama 「Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients.」 The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference ポスター
- 15) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Kei Morio, Masahiro Hatooka, Keiichi Masaki, Takayuki Fukuhara, Tomoki Kobayashi, Noriaki Naeshiro, Yoji Honda, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Akira Hiramatsu, Michio Imamura, Hiroshi Aikata and Kazuaki Chayama 「Analysis of clinical factors relating to the seroclearance of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B virus infection」 The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference ポスター
- 16) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection leads to activation of interferon-stimulated genes in primary cultured human hepatocytes, but infection efficiency decreases monotonically with decreasing cell density」 The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference ポスター

#### 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

厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))

分担研究報告書

B型肝炎に対するペグインターフェロンによる核酸アナログ薬中止の検討

研究分担者 神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 講師  
研究協力者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 教授  
今関 文夫 千葉大学総合安全衛生管理機構 機構長 教授  
新井 誠人 千葉大学医学部附属病院 消化器内科 講師

研究要旨：B型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤中止時のリスクスコア低リスクの症例では肝炎再燃のリスクが比較的低いことが報告されている。今回リスクスコア中・高リスク症例に対してペグインターフェロンを使用し核酸アナログ製剤を中止・検討することを目的とした。当科にて核酸アナログ製剤を安全に中止するためにペグインターフェロン  $\alpha$ -2a を使用した症例を対象とし、経過を詳細に比較検討した。ペグインターフェロンの使用中は全ての症例で HBs 抗原が低下した。ペグインターフェロン開始時 HBe 抗体陽性症例では HBV DNA のコントロールが良好であった。ペグインターフェロンの使用によりリスクスコア中・高リスク症例でも安全に核酸アナログ中止が可能な症例が存在したが、ペグインターフェロンを用いても核酸アナログ中止が困難と予想される症例も存在した。今後更なる多数例での検討、および中止例における今後長期間の経過観察が重要であると考えられた。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤中止時のリスクスコア (Tanaka and Matsumoto, Hepatol Res. 2014;44:1-8) 低リスクの症例では肝炎再燃のリスクが比較的低いことが報告されている。今回リスクスコア中・高リスク症例に対してペグインターフェロンを使用し核酸アナログ製剤を安全に中止可能か否かを検討した。

B. 研究方法

対象は当科にて核酸アナログ製剤を安全に中止するためにペグインターフェロン  $\alpha$ -2a を使用した 5 症例 (平均年齢 59 歳; 男性 3 例, 女性 2 例; HBe 抗原は 1 例で陽性, HBe 抗体は 3 例で陽性; 全例 HBV ゲノタイプ C) であり, 核酸アナログ製剤中止時のリスクスコアは中リスク 1 例, 高リスク 4 例であった。核酸アナログ製剤中止

時からペグインターフェロン  $\alpha$ -2a を 4 例および 1 例に対しそれぞれ 1 年間および半年間使用しその後経過観察を行い, 肝機能およびウイルス学的効果を比較検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に関しては千葉大学医学部生命倫理委員会に申請し承認されている (No. 379)。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し, 提供試料, 個人情報厳格に管理保存した。また, 一般論として弱者, 女性, 少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮した。

C. 研究結果

1) 対象症例での核酸アナログ製剤内服はいずれも長期に及んでおり, 中止時の使用核酸アナログ製剤はエンテカビル単独 2 例, ラミブジ

ン・アデホビル併用2例，エンテカビル・アデホビル併用1例であった。

2) ペグインターフェロン  $\alpha$ -2a 180  $\mu$ g 週1回投与を1年間継続可能であった4例の検討では，核酸アナログ製剤中止時にHBe抗体陽性であった3例ではペグインターフェロン  $\alpha$ -2a中止後48週の時点でいずれもHBV DNAは5logIU/mL未満で推移し，肝機能も正常範囲内であり，核酸アナログ製剤は中止継続している。HBe抗原陽性の1例ではラミブジン，アデホビルおよびエンテカビルに対する3剤耐性HBVを保有していたが，ペグインターフェロン  $\alpha$ -2a投与中は核酸アナログ製剤中止が可能であったが，ペグインターフェロン  $\alpha$ -2a中止後肝機能が悪化しており，今後注意深い経過観察および対応が必要と考えている。この4症例のHBs抗原量を検討すると，核酸アナログ製剤中止時と比較しペグインターフェロン  $\alpha$ -2a中止時のHBs抗原量はいずれも低下しており注目すべきであると考えられた。

3) ペグインターフェロン  $\alpha$ -2a投与を半年間施行した1例は肝線維化進展例であった。核酸アナログ製剤による副作用と思われるFanconi症候群・骨軟化症による肋骨骨折を併発していた。ペグインターフェロン  $\alpha$ -2a開始後骨痛は改善した。核酸アナログ製剤中止時と比較しペグインターフェロン  $\alpha$ -2a中止時のHBs抗原量は低下した。患者の希望もありペグインターフェロン  $\alpha$ -2a投与は半年間で中止，現在経過観察中である。

#### D. まとめ

- 1) ペグインターフェロンの使用中は全ての症例でHBs抗原量が低下した。
- 2) ペグインターフェロン開始時HBe抗体陽性症例ではHBV DNAのコントロールが良好であった。
- 3) ペグインターフェロンの使用によりリスク

スコア中・高リスク症例でも安全に核酸アナログ製剤中止が可能な症例が存在した。

4) ペグインターフェロンを用いても核酸アナログ製剤中止が困難と予想される症例もある。

#### E. 結論

ペグインターフェロンの使用によりリスクスコア中・高リスク症例でも安全に核酸アナログ製剤中止が可能な症例が存在したが，今後更なる検討が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O. Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance. *Hepatology*. 2015 [Epub ahead of print]
- 2) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2015;22(2):94-102
- 3) Sarkar N, Panigrahi R, Pal A, Biswas A, Singh SP, Kar SK, Bandopadhyay M, Das D, Saha D, Kanda T, Sugiyama M, Chakrabarti S, Banerjee A, Chakravarty R. *J Viral Hepat*. 2015 [Epub ahead of print]
- 4) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K,



Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):21455-67

5) Kanda T, Jiang X, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9229-36

6) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7197-206

厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))

分担研究報告書

RESET study 登録症例における HBs 抗原量の推移について

研究分担者 姜 貞憲 手稲溪仁会病院 消化器病センター 主任医長

研究要旨: B型慢性肝炎(CHB)に対する核酸アナログ(NUC)長期投与を安全に終了することが可能な症例は多いとは言えない。そこで NUC 投与中の CHB に対し、NUC を PegIFN に切り替える臨床試験(RESET Study) が進行している。当施設の RESET Study 参加 10 例における PegIFN 投与切り替え時臨床像と PegIFN 投与 48 週間における HBV 感染指標を観察した。対象における HBV 感染指標のうち HBV DNA、HBcrAg 量の変化は僅かに留まった。しかし、HBsAg 量は症例毎の変動に差があるものの、切り替え前 24 週間に対し切り替え後 48 週時では低下を示し、HBsAg 変化量の検討では切り替え後 24 週間における減衰量が切り替え前 24 週間に比して有意に大きかった。本 RESET Study における PegIFN 治療終了後観察期間における臨床効果と治療期間における HBsAg 量減衰の関連性は今後の検討課題である。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎(CHB)に対する核酸アナログ(NUC)治療が普及した結果、今や、肝における HBV 増殖が効果的に抑制され、肝炎活動性が制御された症例は多数存在する。しかしこれら症例の多くでは、NUC 中止後の肝炎再燃リスクが存在し、当該リスクの低い症例はごく限られている。そこで、本班研究では CHB における NUC の安全な中止を目指し PegIFN への切り替え試験(RESET Study) が試みられている。分担研究者所属施設の RESET Study 自験例では PegIFN 投与 48 週が終了し、その後の HBV 感染病態の帰趨が注目されるが、治療終了 48 週以上経過した症例がまだ多いとは言えず、NUC 中止後の評価は未了である。この度の報告では RESET Study 自験例における PegIFN 投与 48 週間における HBV 動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

CHB と診断され NUC 投与後 HBeAg 陰性持続を

確認し PegIFN 投与切り替えを行った 10 症例を対象とした。切り替え時に肝組織学的検討を行い組織中の ccc DNA 量を定量した。治療切り替え前 24 週、切り替え時及び PegIFN 投与中は 4 週毎に血液生化学検査、血中 HBV 感染指標(HBsAg, HB core related [cr] Ag, HBV DNA) を測定した。

(倫理面への配慮)

RESET Study で定められた文書を用いて対象患者に対する臨床試験内容と治療計画について説明、臨床試験参加に対する承諾書に署名を得た。患者に投与された薬剤(NUC, PegIFN  $\alpha$  2a)は既に保険収載され一般臨床で使用されており、投与量及び期間は規定が遵守された。

C. 研究結果

対象は 10 例(男性 7、女性 3 例、58 歳)で、中央値(以下同様) 7.9 (2.4-10.4) 年間 NUC が投与されその後 PegIFN の切り替え投与が行われた。PegIFN 切り替え投与開始時 HBeAg は全

例陰性、HBsAg  $2.4 \pm 1.6 \log \text{ IU/ml}$ , HBV DNA  $2.1 \pm 0.4 \log \text{ Cp/ml}$ , HBcrAg  $3.0 \pm 0.3 \log \text{ U/ml}$ , HBCccc DNA  $2.60 \pm 0.97 \log \text{ Cp/mg}$  であり、肝組織では F stage 0, 1, 2, 3-4 の順に 2, 5, 3, 0 例であった (表 1)。

これら 10 症例に対する PegIFN 投与期間における AST, ALT 値は概ね安定的に推移したが、3 例では正常上限の 2 倍を超える一過性上昇を認めた (図 1)。

NUC 投与の切り替え前 24 週時、治療切り替え時及びその後の PegIFN 投与 48 週間における HBsAg, HBV DNA, HBcrAg の定量結果を検討した (図 2)。HBV DNA 量の推移は、2 例で  $3 \log \text{ Cp/ml}$  前後の変動を認める以外は概ね PegIFN 切り替え前後から測定限界に近似した。また、HBcrAg 量も PegIFN 投与中に測定限界である  $2.9 \log \text{ U/ml}$  以上を示した例は 2 例に留まり、他は定量限界以下であった。しかし、HBsAg は切り替え時定量値の幅が大きく投与期間中漸減した。47 歳男性 (Lamivudine 39 ヶ月先行投与、肝組織ccc DNA  $2.2 \log \text{ Cp/ml}$ ) は切り替え直前に HBsAg 量が  $0.1 \text{ IU/ml}$  未満となり PegIFN 治療中は更に低下した。また、59 歳男性 (Lamivudine 108 ヶ月、 $1.7 \log \text{ Cp/ml}$ ) では PegIFN 切り替え時 HBsAg  $1.0 \text{ IU/ml}$  前後と低下していたが PegIFN 開始 24 週から 48 週時にかけて  $3 \log \text{ IU/ml}$  の減衰を示し治療終了時  $0.0 \text{ IU/ml}$  前後を示した。

HBsAg 量の変化量を PegIFN 切り替え 24 前 NUC 治療期間から切り替え後 48 週間で検討した (図 3)。PegIFN 切り替え後 24, 48 週時での HBsAg 量は切り替え時に比べ中央値で 0.32, 0.31  $\log \text{ IU/ml}$  減衰していた。HBsAg 量は、PegIFN 切り替え直前の NUC 投与 24 週間の減衰 ( $0.07 \log \text{ IU/ml}$ ) に比べ切り替え後 24 週において有意に減衰が大きかった。しかし PegIFN 切り替え後 24 週時と 48 週時の間では差を認めなかった。

#### D. 考察

RESET Study10 例の PegIFN 切り替え投与前臨床像では、NUC 投与期間が 7.9 年と長く肝炎が制御された状態が持続し、HBV 感染指標では HBV 増殖が抑制されていた。NUC 投与では HBV DNA, HBcrAg 量が低値ないし測定限界以下を示すため、PegIFN 切り替え前後で HBV 感染動態の観察には主に HBsAg 量が用いられる。本研究では切り替え前に肝組織中の HBV ccc DNA 量を定量した。HBV ccc DNA 量は血液指標とは異なり随時観察に用いることが出来ないものの、肝組織中の HBV 存在様式の一部を定量することとなる為、肝機能検査値や HBsAg 等他の HBV 感染指標動態との関連性を検討することによりその臨床的意義が示される可能性がある。

RESET Study10 例において、PegIFN 切り替え時肝組織では A0 1 例、A1 9 例と肝炎活動性が低く、線維化 Stage も F0 2, F1 5, F2 3 例と良好であった。NUC 投与前に比して組織学的改善を示す症例が本研究の対象となっていることが示された。図 1 で示されるように、PegIFN 投与中及び投与終了後には肝障害が生じ得るが、そのような ALT 上昇に対しても認容性が担保された対象であると考えられる。

HBsAg 量は PegIFN 切り替え投与前後 24 週で有意に減衰した。PegIFN 投与効果の発現が HBsAg 量の低下で示されたと推測されるため、本治療終了後観察期間における HBV DNA 動態追跡における HBsAg 定量結果の検討が求められる。RESET Study における HBsAg 変化量が、PegIFN 投与終了後臨床経過の推移にどの様に関連するかは今後観察を要するが、切り替え時の HBV ccc DNA 量との関連を含め、HBV 指標間の関連性に対する考察も必要と思われる。

#### E. 結論

RESET Study10 例に対する限定的検討から、PegIFN 切り替え後 24 週で HBsAg 量は減衰を示

した。PegIFN 治療終了後観察期間における臨床効果と治療期間における HBsAg 量減衰の関連性は今後の検討課題と言える。

## F. 健康危険情報

当研究において観察し得る限り対象症例における健康危険情報は認めない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 松居剛志、姜貞憲、田中靖人 治療前 HBV ccc DNA とペグインターフェロン  $\alpha$  2a における治療早期 HBV マーカーとの関連性 Panel Discussion 2 第 40 回日本肝臓学会東部会 2014 年 11 月 27 日東京
- 2) Jong-Hon Kang, Takeshi Matsui, Kazumasa Nagai, Akiko Tomonari, Kazunari Tanaka, Kunihiro Tsuji, Yoshihisa Kodama, Yasuo Sakurai, and Hiroyuki Maguchi Kinetics of infection Markers in the Patients with Chronic Hepatitis B Undergoing Conversion of Long-standing Nucleot(s)ide Analogs into Peg-Interferon. 11<sup>th</sup> Single Topic Conference of the Japan Society of Hepatology 2014 年 11 月 20 日 Hiroshima
- 3) Takeshi Matsui, Jong-Hon Kang, Kazunari Tanaka, Kazumasa Nagai, Akiko Tomonari, Kunihiro Tsuji, Hiroyuki Maguchi Quantified HBV ccc DNA in liver predicts changes in HBV markers during pegylated interferon  $\alpha$  2a treatment for chronic hepatitis B 11<sup>th</sup> Single Topic Conference of the Japan Society of Hepatology 2014 年 11 月 20 日 Hiroshima
- 4) 松居剛志、姜貞憲、永井一正、辻邦彦、真

口宏介、新海登、藤原圭、野尻俊輔、田中靖人 B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法の治療終了時 HBV DNA 量と治療早期 IP10 との関連性 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月 23 日 神戸

- 5) 姜貞憲、松居剛志、永井一正、田中一成、友成暁子、辻邦彦、児玉芳尚、桜井康雄、真口宏介 核酸アナログ長期投与を PegIFN 治療に切り替えた B 型慢性肝炎における初期的 HBV 感染動態 第 115 回日本消化器病学会北海道支部例会 2014 年 9 月 6 日 札幌
- 6) 松居剛志、姜貞憲、田中一成、永井一正、山崎大、友成暁子、辻邦彦、真口宏介、小室智子、工藤まゆみ、樫村暢一 「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドライン」に基づいた HBV スクリーニングの現状第 115 回日本消化器病学会北海道支部例会 2014 年 9 月 6 日 札幌
- 7) 松居剛志、姜貞憲、田中一成、永井一正、友成暁子、辻邦彦、真口宏介 HBV cccDNA と B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン  $\alpha$  2a における治療早期 HBV マーカーとの関連性 第 115 回日本消化器病学会北海道支部例会シンポジウム 2014 年 9 月 6 日 札幌
- 8) 松居剛志、姜貞憲、永井一正、山崎大、児玉芳尚、桜井康雄、辻邦彦、真口宏介 HBV キャリアにおける急性増悪例の検討 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日東京
- 9) 松居剛志、姜貞憲、田中靖人 B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法の治療効果に関連する遺伝要因第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 26 日東京
- 10) 松居剛志、姜貞憲、山崎大、永井一正、辻邦彦、真口宏介 HBV 再活性化関連肝炎の検討 第 114 回日本消化器病学会北海道支部例会 2014 年 3 月 1 日 札幌

表1. NUCからPegINFへ治療切り替えが行われた10例におけるPegINF投与開始時の臨床像

	NUC開始時	PegINF切り替え時
性, M/F, n		7 / 3
年齢 *	50 (39-58)	58 (45-66)
NUC投与期間*、年		7.9 (2.4-10.4)
ALT <sup>§</sup> , U/L	295.6 ± 418.9	20.4 ± 8.9
Plt <sup>§</sup> , 10 <sup>4</sup> /ml	15.2 ± 7.0	17.8 ± 5.0
HBsAg <sup>§</sup> log IU/ml	3.7 ± 0.5	2.4 ± 1.6
HBeAg + / -, n	4/ 6	0/ 10
HBcrAg <sup>§</sup> , log U/ml	5.8 ± 2.2	3.0 ± 0.3
HBV DNA <sup>§</sup> , log Cp/ml	6.9 ± 0.7	2.1 ± 0.4
HBV genotypes, B <sub>j</sub> /C, n		2 / 8
肝 CCC DNA <sup>§</sup> , log Cp/mg		2.60 ± 0.97
肝組織、F 0/1/2/3-4, n	0/7/2/1	2/5/3/0
A 0/1/2/3, n	0/3/7/0	1/9/0/0
NUC中止後再燃 risk score 0 / 1-2 / 3-4		2 / 6 / 2

\* ; median (range), §; mean ± STD

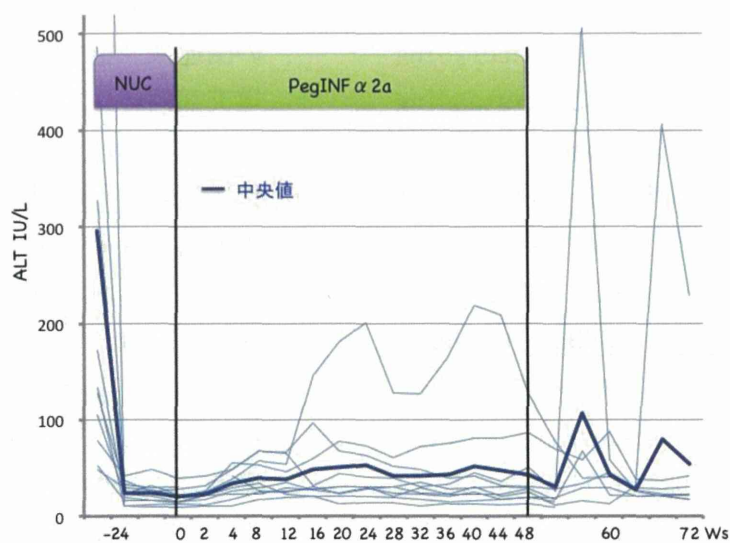


図1. RESET Study 10症例 におけるALTの推移

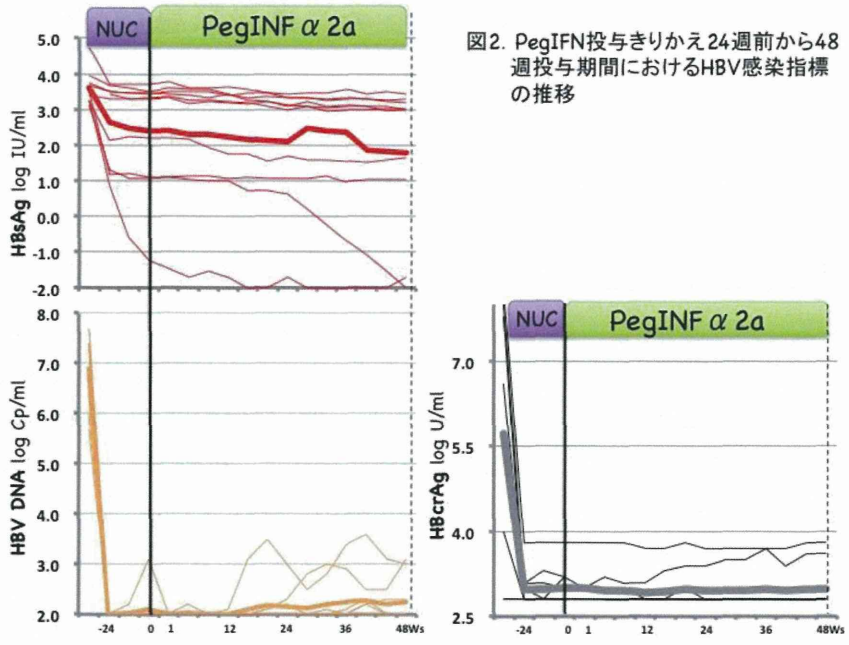


図2. PegIFN投与切り替え24週前から48週投与期間におけるHBV感染指標の推移

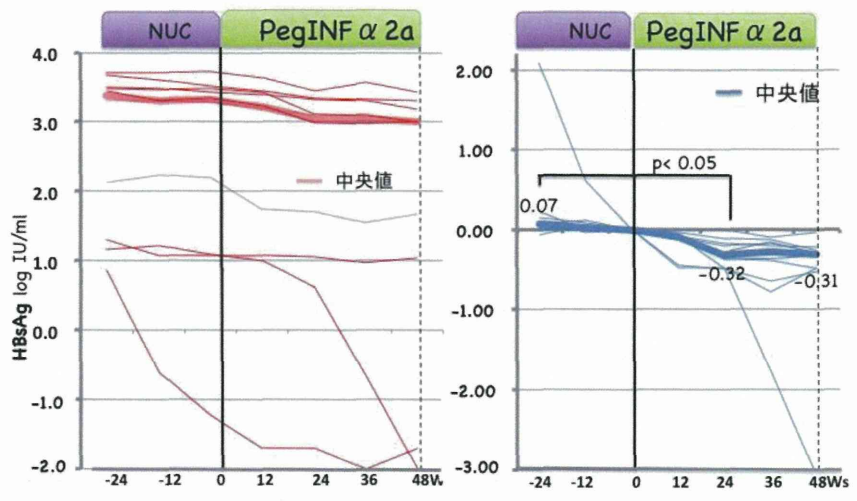


図3. PegIFN投与切り替え24週前から48週投与期間におけるHBsAg量と減衰量の推移  
検定はMann-Whitney's U-testを用いた。

厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))

分担研究報告書

Peg-interferon Sequential 治療の効果

研究分担者 黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

研究要旨：核酸アナログ治療中に Peg-interferon を Sequential に投与する意義を検討した。HBe 抗原陽性例の 56%で HBe 抗原が陰性化した。年齢、Genotype、HBs 抗原量は HBe 抗原の陰性化と関連しなかった。HBs 抗原量は 91%で減少し、9.5%で検出感度未満になった。核酸アナログ治療時の HBs 抗原の減少速度が-0.18 Log/ year に対して、Sequential 療法治療中では-1.2 Log/ year であった。Sequential 療法終了時に再燃リスク群分類は、12%が低リスク、36%が中リスクとなった。治療終了後 44%の症例で Drug free かつ AST <30 IU/L、HBV-DNA <4.0 LogCopy/mL を維持した。核酸アナログ長期継続治療により持続的に HBV DNA が陰性化している症例に Peg-interferon を Sequential に投与することで、HBs 抗原の減少が得られ、核酸アナログ中止時の再燃リスク群分類を低～中リスクに誘導することが可能となる。

A. 研究目的

核酸アナログ治療においては、長期継続することで HBs 抗原の陰性化を目指すことが推奨されているが、Peg-interferon を Sequential に投与することで、核酸アナログ治療から離脱し、Drug free が達成できる可能性があり、さらに HBs 抗原の減少を促進する可能性も注目されている。

本研究では、核酸アナログ長期継続治療により持続的に HBV DNA が陰性化している症例を対象として Peg-interferon を Sequential に投与することで、治療効果の向上が得られるかを検討した。

B. 研究方法

核酸アナログの長期継続治療を行った症例のうち、Peg-interferon- alpha2a を 4 週間併用投与した後に核酸アナログを中止し、以後は Peg-interferon- alpha2a を 48 週間投与する Sequential 療法を施行した 26 症例を対象として、経時的に生化学データ、HBV DNA、HBs 抗原

量、HBe 抗原を測定し、治療効果をモニターした。

(倫理面への配慮)

治療導入に当たっては、治療の目的、予想されるメリット、デメリットについて文書で説明し、十分なインフォームドコンセントのもとに書面による同意を取得した。本研究については、当院の臨床研究委員会により倫理的妥当性を検討し、承認を得ている。

C. 研究結果

Sequential 療法の対象症例の平均年齢は 43 歳、62%が HBe 抗原陰性、先行する核酸アナログは 77%がエンテカビルで、23%がラミブジン・阿德フォビル併用療法であった。核酸アナログの平均投与期間は 4.1 年であった。

HBe 抗原陽性 9 例のうち、Sequential 療法終了時に 4 例、治療終了後 6 カ月時点に 5 例 56%で HBe 抗原が陰性化した。この 5 例は全例が Genotype C で、年齢は全例が 35 歳以上(35-46

歳)であった。HBs 抗原量は 3 例が 1000 以上、2 例は 10000 以上 (243-26100) であり、年齢、Genotype、HBs 抗原量は HBe 抗原の陰性化と関連しなかった。一方、HBe 抗原の COI は 1.11-14 と低値であった。HBe 抗原陰性例では、治療経過中全例で陰性が維持された。

HBs 抗原量は 91%で減少し、0~1.0Log の減少が 43%、1.0Log 以上の減少は 48%、2.0Log 以上の減少は 24%であった。HBs 抗原が検出感度未満になったのは 9.5%であった。Sequential 療法導入前の核酸アナログ治療時の HBs 抗原の減少速度が-0.18 Log/ year に対して、Sequential 療法治療中では-1.2 Log/ year であった。

再燃リスク群分類は、Sequential 療法導入前は低リスク 0%、中リスク 6%、高リスク 94%であったが、終了時には低リスク 12%、中リスク 36%、高リスク 53%となった。治療終了後 44%の症例で Drug free かつ AST <30 IU/L、HBV-DNA <4.0 LogCopy/mL を維持した。

#### D. 考察

核酸アナログの長期投与後に Sequential に Peg-interferon を投与することで、HBs 抗原の減少が得られ、核酸アナログ中止時の再燃リスク群分類を低~中リスクに誘導することが可能となる。

#### E. 結論

核酸アナログの長期継続治療後の Peg-interferon Sequential 療法は、HBs 抗原減少効果がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 2014; 59:89-97.

2) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9:e86449.

3) Orito E, Hasebe C, Kurosaki M, Osaki Y, Jyoko K, Watanabe H, Kimura H, Nishijima N, Kusakabe A, Izumi N. Risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic HBV patients during nucleot(s)ide analogues therapy. *HepatoI Res* in press



2. 学会発表

玉城信治、黒崎雅之、泉並木 B 型慢性肝炎に対する PEG-IFN Sequential 療法の治療効果 第 50 回日本肝臓学会総会シンポジウム

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  
(肝炎等克服実用化研究事業 (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症例の検討

研究分担者 峯 徹哉 東海大学医学部内科学系消化器内科 教授  
研究協力者 加川建弘 東海大学医学部内科学系消化器内科 准教授

研究要旨：核酸アナログ製剤を投与された B 型慢性肝炎患者 94 例の長期経過を観察するとともに、核酸アナログが中止可能となる因子について検討した。その結果、1) 約 9 年間の経過観察で、drug-free になる症例の割合は HBeAg 陰性例で 44%、陽性例で 15%であった。2) NA 投与開始時 HBV-DNA 量低値例で核酸アナログ中止可能となる症例が多かった。3) NA 投与開始時 ALT 高値例で核酸アナログ中止後の再燃が少なかった。4) HBsAg 陰性化を年率 0.8%、発癌を年率 0.6%で認めた。以上から、核酸アナログ開始時に HBeAg 陰性、HBV-DNA 量低値例では drug-free を達成できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

核酸アナログ製剤 (nucleos(t)ide analogue, NA) の登場により、B 型慢性肝炎の予後は改善し、コントロールも可能となってきた。しかしながら、NA の抗ウイルス効果は一時的であり、NA 中止後の再燃は多くの症例で認められる。NA 中止後、20%弱の症例で ALT が基準値の 10 倍以上の flare を起こすことが報告されている。さらに 2-5%の症例ではビリルビンが 2 mg/dl 以上に上昇する。したがって、NA を中止するときは慎重にならざるを得ない。

松本らは中止時の HBsAg 量、HBcrAg 量から中止後の再燃の有無が予想できることを報告した。すなわち HBsAg 量、HBcrAg 量から中止後の再燃リスクを低リスク群、中リスク群、高リスク群に分類し、低リスク群 (HBsAg 80 IU/ml 未満かつ HBcrAg 3 log U/ml 未満) の場合は中止を考慮しても良いとしている。しかしながら、日本肝臓学会の B 型肝炎治療ガイドラインにおいても NA は原則として中止しないよう推奨されているため、実際に NA を中止する症例は少なく、どのような経過をたどるかは不明な点が多い。

中には NA を中止し、drug-free にすることが可能な症例も存在すると考えられる。どの程度の症例が drug-free になるのかを明らかにすることは、患者の経済的肉体的負担の軽減、並びに医療経済学的にも有用と考えられる。

本研究では独自に NA 中止基準を設け、基準を満たす症例において、患者と相談の上、治療を中止し、その後の再燃の有無と再燃に関する因子を検討した。また、HBsAg 陰性化、発癌についても解析した。

B. 研究方法

対象は 1999 年 12 月～2010 年 6 月に東海大学病院で NA が投与された B 型慢性肝炎患者 94 例で、少なくとも 2 回以上、ALT 上昇と血清 HBV-DNA 陽性が確認された症例である。C 型肝炎、HIV 抗体陽性者、ならびに既に肝硬変あるいは肝癌を発症している症例は除いた。NA 開始後、以下に述べる NA 中止可能基準を満たした症例については患者と相談の上、同意が得られた場合に NA を中止することとした。NA 中止後 1 年間は 2-4 週毎に経過観察をおこなった。

「NA 中止可能基準」は HBeAg 陰性者では、「6 カ月以上、HBV-DNA が 2.6 Log copy/mL 未満が持続した場合」、HBeAg 陽性者では、「6 カ月以上、seroconversion と HBV-DNA が 2.6 Log copy/mL 未満が持続した場合」とした。NA 中止後の「再燃」は、「ALT が正常の 2 倍以上、あるいは、HBV-DNA が 5 Log copy/mL 以上が少なくとも 2 回以上持続」とした。

### C. 研究結果

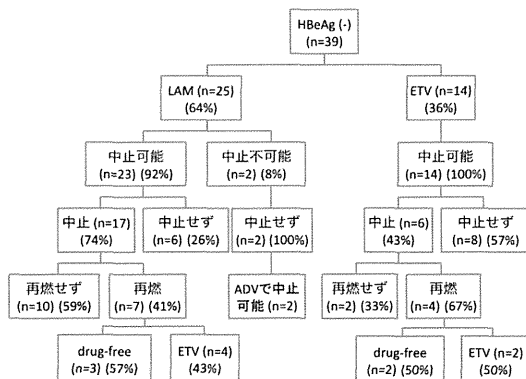
#### 1. 患者背景

症例の内訳は HBeAg 陰性 39 例、陽性 55 例の計 94 例である。年齢は陰性群 50.0 ± 11.8 (mean ± SD) 歳、陽性群 44.3 ± 14.5 歳であり、陰性群が有意に高齢であった。血中 HBV-DNA 量は 6 未満/6~7.6/7.6 超 Log copy/mL が陰性群では 28/56/15% であるのに対し、陽性群では 7/36/56% であり、陽性群でウイルス量が多かった。コア関連抗原は 1000 未満/1000~10000/10000 超 IU/mL が陰性群では 48/30/22%、陽性群では 0/20/80% であり、陽性群で有意に高かった。

経過観察は陰性群で 108 ± 42 (mean ± SD) カ月、陽性群で 111 ± 42 カ月であった。

#### 2. 症例の経過

##### (1) HBeAg 陰性症例



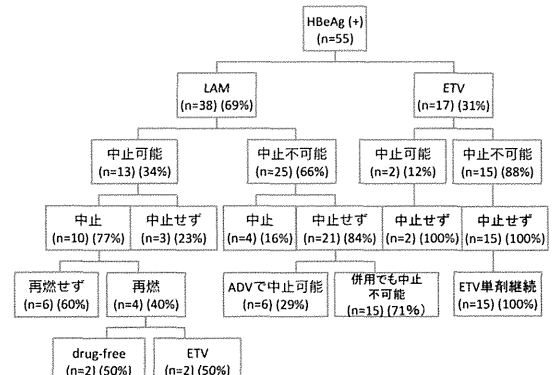
ラミブジン投与症例が 25 例 (64%)、エンテ

カビル投与症例が 14 例 (36%) であった。ラミブジン投与群のほとんどは中止可能基準を満たし (92%)、中止可能基準を満たさなかった症例は 2 例 (8%) であった。中止可能基準を満たした 23 例のうち、実際に投与中止した症例は 17 例 (74%) で、他の 6 例 (26%) は継続治療となった。中止した 16 例のうち、再燃しなかった症例は 10 例 (59%) で、他の 7 例 (41%) は中止後再燃したが、そのうち 3 例 (57%) はその後沈静化し drug-free となった。他の 4 例 (43%) はエンテカビルに変更して投与を継続している。ラミブジンで治療し、中止可能基準を満たさなかった 2 例は、アデホビル併用により中止可能基準を満たした。

エンテカビル投与群は全例 (100%) が中止可能基準を満たし、うち 6 例 (43%) は実際に中止、他の 8 例 (57%) は継続治療とされた。中止 6 例のうち 2 例 (33%) は再燃せず、他の 4 例 (67%) は再燃したが、そのうち 2 例 (50%) はその後沈静化し drug-free となった。他の 2 例 (67%) はエンテカビルを再開している。

すなわち、HBeAg 陰性例のうち、ラミブジン投与群 (25 例) では中止後再燃しなかった 10 例、再燃後沈静化し drug-free になった 3 例、エンテカビル投与群 (14 例) では中止後再燃しなかった 2 例、再燃後沈静化し drug-free になった 2 例の計 17 例 (44%) が drug-free となった。

##### (2) HBeAg 陽性群症例



ラミブジン投与症例が 38 例 (69%)、エンテカビル投与症例が 17 例 (31%) であった。ラミブジン投与群のうち、中止可能基準を満たしたのは 13 例 (34%)、満たさなかったのは 25 例 (66%) であった。基準を満たした 13 例中 10 例 (77%) は実際に中止し、他の 3 例 (23%) は継続治療となった。中止 10 例中 6 例 (60%) は再燃せず、4 例 (40%) は再燃したが、うち 2 例 (50%) はその後沈静化して drug-free となった。中止可能基準を満たさなかった 25 例中、患者の強い希望により中止した例が 4 例 (16%) あったが、4 例ともが増悪し、薬物治療を再開している。一方、中止可能基準を満たさず、治療を継続した 21 例 (84%) は、アデホビルを併用し、6 例 (29%) は中止可能基準を満たしたが、15 例 (71%) はアデホビル併用でも中止可能基準を満たさなかった。

エンテカビル投与群で中止可能基準を満たしたのは 2 例 (12%) にとどまり、他の 15 例 (88%) は中止可能基準を満たさなかった。中止可能基準を満たした 2 例 (100%) とも中止をせずに治療を継続している。中止可能基準を満たさなかった 15 例 (100%) もエンテカビル投与を継続している。

HBeAg 陽性患者でラミブジンを投与した 38 例中、中止可能基準を満たし、実際に中止して再燃しなかった 6 例、再燃後沈静化し drug-free になった 2 例の計 8 例が drug-free となった。一方、エンテカビル投与 17 例では、中止可能基準を満たした 2 例が投与を中止しなかったことから、drug-free となった症例は 0 例であった。

3) NA 投与後、drug-free となった症例の割合  
NA 投与後約 9 年間の経過で drug-free となった症例の割合は、HBeAg 陰性例で 39 例中 17 例 (44%)、陽性例で 55 例中 8 例 (15%) であった。

### 3. 中止可能となる症例の解析

HBeAg 陽性群に比べ、HBeAg 陰性群で有意に中止可能基準を満たす症例が多く認められた ( $P < 0.001$ )。最終的に中止可能基準を満たした症例の割合は陰性群 37/39 (95%)、陽性群 15/55 (27%) であった。

HBeAg 陽性群で中止可能基準を満たした症例の背景を検討すると、有意差があったのは NA 投与前 HBV-DNA 量だけであった。HBV-DNA 量を 7.6 Log copy/mL 以下と 7.6 Log copy/mL 超の 2 群に分けると、中止可能症例 (15 例) では 67% vs 33%、中止可能基準を満たさなかった症例 (40 例) では 35% vs 65% であり、ウイルス量が少ない症例で中止可能になる症例が有意に多かった ( $P = 0.015$ )。

### 4. 再燃症例の解析

HBeAg 陰性で NA を中止した 23 例、HBeAg 陽性で NA を中止した 10 例の計 33 例のうち、再燃しなかったのは 18 例 (55%)、再燃したのは 15 例 (45%) であった。非再燃例の背景を解析したところ、有意差がみられたのは ALT 値だけであった。ALT 値が 100 IU/L 未満/100~199 IU/L/200 IU/L 以上の 3 群に分けると、非再燃例 18 例においては、それぞれ 11/22/67% であるのに対し、再燃例 15 例では 13/67/20% と、ALT 値が 200 IU/L 以上の症例では再燃しない症例が有意に多いことが示された ( $P = 0.02$ )。

再燃例 15 例のうちシューブを起こした症例は 4 例 (27%) 存在した。いずれも ALT 値が 500 IU/L 以上まで上昇したが、ビリルビンの上昇や肝不全発症例はなかった。

### 5. HBsAg 陰性となる症例の解析

HBsAg が陰性化した割合は 94 例中 7 例 (7.4% ; 年率 0.8%) で、HBeAg 陰性 39 例中 5 例 (12.8% ; 年率 1.4%)、HBeAg 陽性 55 例中 2 例 (3.6% ; 年率 0.4%) であった。

HBsAg が陰性化する背景を解析すると、有意