

B型肝炎ウイルスe抗体陽性無症候性キャリアの長期予後に関する検討

研究代表者：横須賀 収 千葉大学

研究要旨：本研究では、HBeAb陽性かつ肝機能正常のキャリアの予後を中心に検討した。(1)前向き研究として、日本肝臓学会ガイドラインの非活動性キャリアの診断基準を満たした358例を前向き研究の対象とした。平均観察期間1,025日において、死亡、発癌、核酸アナログの使用はいずれも0例(0%)であった。ALT基準逸脱35例(9.8%)、HBV DNA基準逸脱34例(9.5%)、両方の基準を逸脱する例は1例(0.3%)のみであった。(2)肝疾患診療拠点連携病院のようなHigh Volume Centerと地域基幹病院に通院中の肝機能正常HBeAb陽性キャリアを比較検討したところ(それぞれ314、165症例)基幹病院症例の方が、拠点病院症例より、Genotype Cが有意に少なく、また有意にHBsAg量が少ないことが示された。(3)初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用していた例を除いた発癌症例78例の内、20例(25.6%)で、ALT、HBVDNA正常であった。この20例の多くは、肝線維化進行例であり、また、HBVキャリアとしてフォローされていない症例が37%にみられた。

A. 研究目的

2013年に日本肝臓学会は、HBeAg陰性の非活動キャリア(IC)の定義を新たに提唱した。また、HBVキャリアの長期的な治療目標を、HBs抗原の消失とした。非活動性キャリアは、以前は臨床的治癒とも考えられていた。しかし、発癌のリスクや肝炎の再燃のリスクがあることから、実際の臨床の現場では、非活動性キャリアであっても、定期的な血液検査や画像検査を行っていることが多く、これらの患者のフォローアップの方法に対しての明確な指標はない。欧米と本邦では、人種的な差異、HBV Genotypeの差、肥満症例数など、同じHBVキャリアといえども、その背景因子は大きく異なり、本邦における予後調査は必要なものであるが、これまで、非活動性キャリアに対する全国的な大規模な検討はなされたことはなく、本邦における調査が必要であり、研究目的とする。また、安定したと考えられる非活動性キャリアからの肝炎の再燃のメカニズムを明らかにするため、HBVと宿主との関係性を示す基礎研究の推進も目的とする。

B. 研究方法

本研究の目的達成のために、臨床研究と基礎研究を行った。本年度は、特に前向き研究を集中的に解析した。

(1)全国14施設および千葉大学関連施設に現在通院中のHBeAb陽性HBVキャリアのうち、2011年の時点で2年連続してALT 30 IU/L以下の症例は880例登録されている。このうち、日本肝臓学会ガイドラインのICの診断基準(HBe抗原陰性の非活動キャリアは、1年以上の観察期間うち3回以上の血液検査において、HBe抗原陰性、ALT値30 IU/L以下、HBV DNA 4 log copies/ml未満の3条件すべてを満たす症例)を満たした358例を前向き研究の対象とした。主解析項目は、ALT、HBVDNA値の基準逸脱とした。副評価項目を、死亡、発癌、核酸アナログの使用の有無とした。

(2)肝疾患診療連携拠点病院が指定され、肝疾患の診療レベルの向上を図り、患者側にも大きなメリットが得られる制度の策定がなされている。本研究班に参加している施設のほとんどはこの肝疾患診療連携拠点病

院（以下、拠点病院）である。一方で、これら拠点病院にて診療を受けるHBVキャリアは、特殊な病態を呈しているために拠点病院に通院している可能性がある。そこで、千葉大学関連施設である地域医療の基幹病院と拠点病院におけるHBVキャリアに差異があるかについて比較検討した。

(3)HBeAb 陽性かつ肝機能正常例では、一般的にはその予後は良好とされている。一方で、肝細胞癌がみられた症例では、その背景肝機能は様々である。2000-2014年にかけて千葉大学附属病院で初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用例を除いたHBV関連発癌症例78例の背景肝機能とその特徴について明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究は、千葉大学大学院医学研究院生命倫理委員会で研究内容の審査を受け、研究の施行について、承認を受けている。臨床研究の登録を行った（UMIN000009185）。

C. 研究結果

研究代表者（横須賀 収）

前向き研究：日本肝臓学会ガイドラインのICの診断基準を満たした358例を前向き研究の対象とした。主解析項目は、ALT、HBVDNA値の基準逸脱とした。副評価項目を、死亡、発癌、核酸アナログの使用の有無とした。平均観察期間 1,025 ± 235 日、平均年齢 57.1 ± 13.3 歳。死亡、発癌、核酸アナログの使用はいずれも0例（0%）であった。ALT 基準逸脱 35 例（9.8%）、HBV DNA 基準逸脱 34 例（9.5%）、両方の基準を逸脱する例は1例（0.3%）のみであった。ALT 基準逸脱、HBV DNA 基準逸脱、いずれかの基準逸脱の累積を示す（図1a 1b 1c）。平均観察期間 1000 日間で、約20%が基準逸脱がみられた。ALT、HBVDNA値の推移を図2a 2bに示す。ALT値は基準逸脱例は多くみられるが、その変動は限定的である。

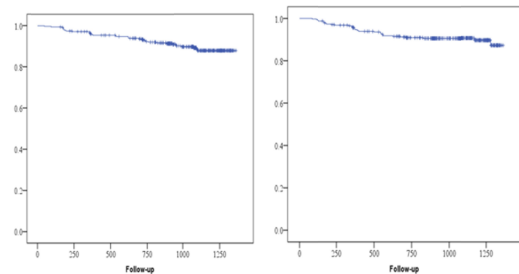


図 1 (a) ALT30IU/L 以下 (b) HBV DNA 4LC/ml 未満

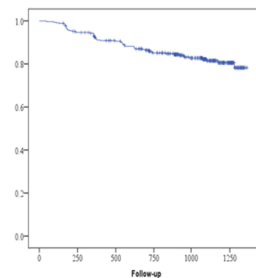


図 1 (c) ALT30IU/L 以下かつ HBV DNA 4LC/ml 未満

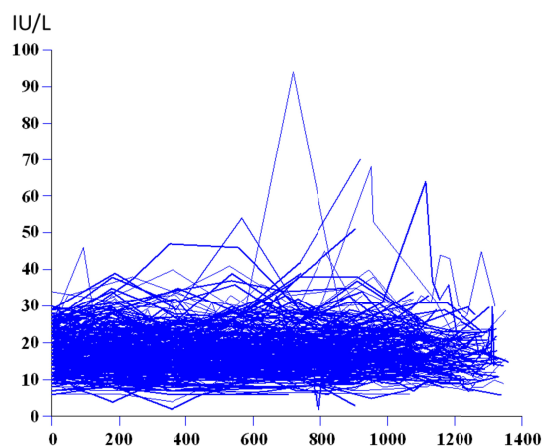


図 2 (a) IC 症例における ALT の推移

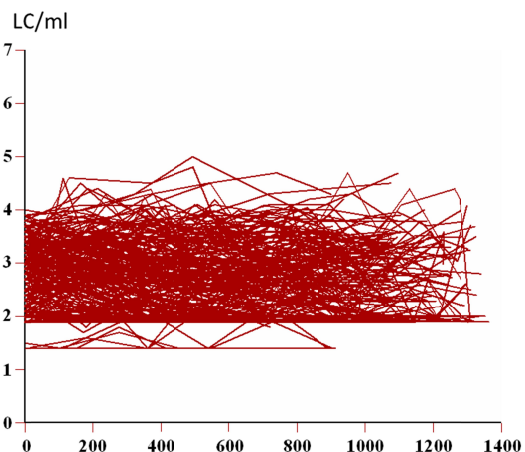


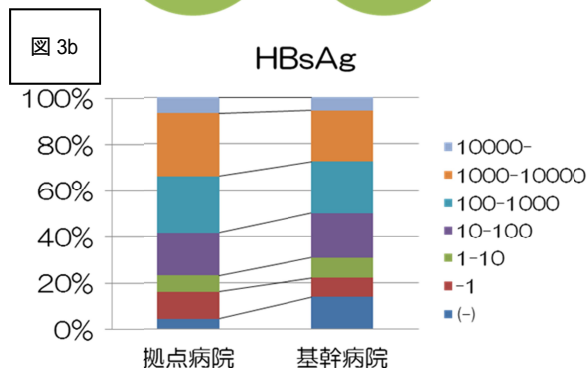
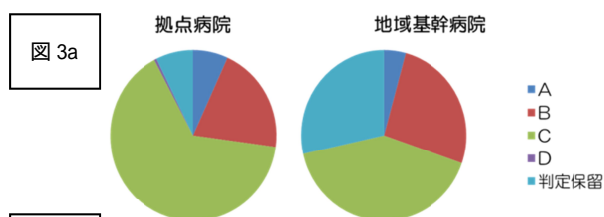
図 2 (b) IC 症例における HBVDNA の推移

いずれかの基準逸脱が起こる予測因子について、COXの比例ハザードモデルによる解析を行った(表1)

	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Hazard Ratio (95%CI)	p	Hazard Ratio (95%CI)	p
Age	0.98 (0.96-0.99)	0.008	0.98 (0.95-1.00)	0.088
Sex Female	0.89 (0.53-1.48)	n.s.		
BMI	1.05 (0.98-1.12)	n.s.		
HBV-DNA	1.61(1.21-2.14)	0.001	1.90 (1.18-3.07)	0.009
AST	1.00 (0.95-1.05)	n.s.		
ALT	1.10 (1.06-1.15)	<0.001	1.11 (1.05-1.18)	<0.001
ALP	1.00 (1.00-1.00)	n.s.		
G-GTP	1.01 (1.00-1.02)	0.015	1.01 (1.00-1.02)	0.019
PLT	0.99 (0.94-1.03)	n.s.		
Genotype C	1.30 (0.69-2.45)	n.s.		
AFP	0.96 (0.84-1.10)	n.s.		
HBsAg (log)	1.34 (1.12-1.60)	0.001	1.22 (0.92-1.62)	0.171

多変量解析では、ALT値、HBV DNA値、g-GTP値がその予測因子として挙げられた。単変量解析で因子としてあがった、HBsAg量はLog rank検定で有意差を示した。

HBeAb陽性肝機能正常例を対象とし、本研究班に参加した分担研究者のなかで関東、東海地区の4施設に通院中の症例と、同じく関東、東海地区の地域基幹病院に通院中の症例について、その背景について比較検討した。肝疾患診療拠点連携病院症例314例(4施設、平均年齢54.6歳)、基幹病院症例165症例(8施設、59.7歳)。結果として、基幹病院での症例は、Genotype Bが有意に多くみられた(図3a)。



また、HBsAg量についても、基幹病院症例

の方が、拠点病院症例より、有意にHBsAg量が少ないことが示された(図3b)。

2000-2014年 千葉大学附属病院で初めて治療を受け、かつ発癌時に核酸アナログ使用していた例を除いた発癌症例78例の内、20例(25.6%)で、ALT、HBVDNA正常であった。この20例の半数以上は、血小板数が15万/μLであることから、その多くは、肝線維化進行例であった。また、HBVキャリアとしてフォローされていない症例が37%にみられた。

分担研究者(髭 修平)

HBe抗原陰性、HBV DNA量低値、ALT持続正常を示す非活動性キャリアにおける症例のHBV DNA再上昇と関連するHBVマーカーの特徴につき検討した。HBs抗原、HBcr抗原が高値の例、HBs抗原/HBV DNA比が高値の例では再燃の可能性が高い傾向を示し、これら血清HBVマーカーの再燃予測に関する有用性が示された。

分担研究者(上野義之)

HBe抗原陰性化と糖鎖マーカーM2BPGiについて着目し、HBV genotypeとの関連も含め検討した。(1)ジェノタイプB型高浸淫地域におけるHBe抗体陽性キャリアのHBs抗原陰性化率は、全体で11%(平均観察期間7.2年)であった。(2)HBs抗原陰性化は、初診時高齢、HBV genotype、初診時HBs抗原量が関連していた。(3)M2BPGiはe抗体陽性キャリアにおいてFIB-4とよく関連した。

分担研究者(田中榮司)

肝生検が施行されたB型肝炎患者54例を対象として、肝生検F値とM2BPGi値の関連を検討した。

M2BPGi値は、肝生検F値、FIB4値、血小板値と相関がみられたが、その相関は弱かった。M2BPGi値は、同じF値でも男性で女性に比較して低く出る傾向がみられた。このため、男性のM2BPGi値を1.8倍して補正し、この補正M2BPGi値とF値間ではより良好な相関がみられた。

分担研究者（新海 登）

HBe 抗体陽性無症候性キャリアでの発癌率 (1/198 0.5%) は HBe 抗体陽性慢性肝炎 (7/123 5.7%)、HBe 抗体陽性肝硬変 (19/42 45%) に比べて、低率であった。肝癌のリスク因子においては Kaplan-Meier 解析では、男性、年齢 47 才以上、LC、Plt 15.2 万以下、HBV DNA 5.8 log copies/ml 以上、AFP 8ng/ml 以上、Fib-4 index 1.5 以上の群で肝発癌が有意に高かった。

分担研究者（柘植 雅貴）

HBV genotype C 持続感染 667 例について、経過中の HBsAg 陰性化と臨床的背景との相関について解析した。経過中の HBsAg 陰性化を 29 例 (4.3%) に認めた。HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な HBsAg 陰性化に寄与する因子として抽出されたが (P=0.005、P=0.018)、治療因子は抽出されなかった。治療介入例のみで解析したところ、インターフェロン療法を行った症例において HBsAg 累積陰性化率が高い傾向を認めた。

分担研究者（吉岡健太郎）

HBe 抗体陽性無症候性キャリアの肝硬度について検討した報告はない。本研究では HBe 抗体陽性の無症候性キャリア 108 例について、HBs 抗原陰性化と肝発癌に関与する因子を検討した。HBs 抗原陰性化には、ヒアルロン酸高値、男性、 γ -GTP 高値が関与しており、肝発癌には白血球数低値が関与していることが明らかとなった。肝線維化の非侵襲的評価法である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) は単変量解析では、肝発癌との関係が示されたが、多変量解析では選択されなかった。

分担研究者（八橋 弘）

2012 年 4 月～2013 年 7 月に当科を受診した HBV 持続感染例 312 例において血中 HBsAg 量に寄与する有意因子を重回帰分析 stepwise selection により最終モデルを算

出、血中 HBVDNA 量 ($\beta = -0.852$, $p < 0.001$)、HBeAg (negative=0, positive=1) ($\beta = -0.357$, $p < 0.001$)、年齢 ($\beta = -0.164$, $p < 0.001$)、血小板数 (/103) ($\beta = 0.104$, $p < 0.001$) であった (調整済 $R^2 = 0.53$)。HBe seroconversion 後の B 型肝炎において HBs 抗原量は、加齢とともに低下するが、線維化進展例はより低値を示すと考えられた。

分担研究者（井戸章雄）

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性キャリア症例 290 例で、経過観察期間中に 7 例 (2.4%) が死亡し、うち 4 例 (1.4%) が肝疾患関連死であった。13 例 (4.2%) に肝細胞癌が発生し、累積発癌率は 5 年で 2.9%、10 年で 6.9% であった。発癌に関わる因子は、経過観察開始時に年齢 55 歳以上 ($p = 0.018$, HR 7.818, 95%CI 1.426-42.876)、AFP 5.0 ng/mL 以上 ($p = 0.044$, HR 20.564, 95%CI 1.081-391.286) であった。

分担研究者（阿部雅則）

1970 年代に愛媛県で流行した HBV genotype D の持続感染者の現状について調査した。HBV genotype D 持続感染者 44 名。このうち約 7 割は HBe 抗体陽性非活動性キャリア、約 3 割が慢性肝炎であった。今後、感染期間の長期化、高齢化による肝硬変への進展と肝細胞癌発生を含めて長期的に経過をみていく必要がある。

分担研究者（佐田通夫）

2000 年から 2012 年に当院で初回治療を行った HBV 関連肝癌患者 156 名を対象とし、後ろ向きにデータを収集した。HBV 関連肝癌患者数は減少していないが ($P = 0.9921$)、NA 内服例からの発癌が増加していた ($P < 0.05$)。NA 内服例の肝発癌に寄与する因子は NA 開始時に線維化進展例であり、血小板数が 12.7 万未満の症例に有意に多く肝発癌を認めた。NA 非内服例では肝硬変患者の割合は有意に減少したが ($P < 0.05$)、65 歳以上の高齢者が増加 ($P = 0.0468$) していた。

分担研究者（中本安成）

R-CHOP・CHOP療法が施行された血液悪性疾患症例における治療前後の免疫抑制状況を、健常症例と比較した。寛解時のIL-17、IL-1、G-CSF、IFN- γ の有意な抑制が認められたため、HBV再活性化にはCD4+T細胞の関与が示唆された。また、HBV既往感染症例からHBV再活性化群と非再活性化群を抽出し、HLA class II領域の複数のSNPに対するgenotype assayにより両群を比較・検討し、rs9277535がHBV再活性化の宿主因子である可能性が示された。

分担研究者（西口修平）

HBe抗体陽性かつHBV-DNA低値例を対象にALT上昇例と正常例とで肝組織所見および各種臨床データの比較を行った。ALT上昇例には、組織学的に肝組織の脂肪化とそれに関連する検査値（BMI・HOMA-R・フェリチン）の異常が認められた。HBV-DNA低値のHBe抗体陽性者でALT上昇を来している例では、線維化を生じる脂肪性肝炎を合併して自然経過に影響する可能性があると考えられた。

分担研究者（泉 並木）

対象は2008年4月から2013年9月までに当院を受診したHBe抗原陰性、かつ初回ALT施設基準値内の4~43 IU/Lの155例、自然経過でのALT上昇とHBs抗原陰性化を検討した。経過中のALT上昇は26例、HBs抗原陰性化は14例(9%)にみられた。ALT上昇に關与する因子はALT 30 IU/L以下とHBs抗原量が100 IU/ml以上が有意であった。HBs抗原陰性化は、50歳以上、HBs抗原100 IU/ml未滿、非活動性キャリアで高率に達成されていた。HBs抗原陰性化には1年間のHBs抗原減少速度が0.19 log/年の場合に感度94%、特異度93%であった。

分担研究者（今関文夫）

HBe抗体陽性キャリア198例を觀察開始1年間のHBV DNA量、ALT値によりA群

(N=68): HBV DNA<4 log copies (LC)/ml、ALT \leq 30 IU/l、B群(N=31): HBV DNA<4 LC/ml、ALT>30 IU/l、C群(N=35): HBV DNA \geq 4 LC/ml、ALT \leq 30 IU/l、D群(N=64): HBV DNA \geq 4 LC/ml、ALT>30 IU/lの4群に分け中央値7.6年(1.2~9.1年)後向きに調査した。肝発癌はA群から1例、C群から2例、D群から6例で、C群とD群の各1例を除いてすべて肝硬変であった。死亡例9はB群1例(肝硬変症例)、D群1例(肝癌症例)で、死因は各々消化管出血と癌死であった。

分担研究者（白澤 浩）

HBV増殖メカニズムに関するin vitroの検討として、エピジェネティック修飾因子阻害剤のウイルス増殖に与える影響について、キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞単層培養系を用いてHBVを感染、エピジェネティック標的薬剤のスクリーニングを行った。薬剤のHBV産生に対する影響を解析し候補薬剤を得た。

分担研究者（岡本宏明）

HBVのクローンの増殖能を、1.3倍ゲノム長のHBV constructを作製し、肝癌由来樹立細胞株にトランスフェクトして、ELISA, real-time PCR, Southern blotting, Northern blotting等により解析した。無症候性キャリア由来のHBV株のin vitroでの増殖能は劇症肝炎由来の株より低いことが確かめられた。これには、無症候性キャリア由来株では同じprecore変異株でありながら、劇症肝炎株に比べpregenome RNAを含む3.5 kb mRNAの転写量が少ないこと、さらにcore promoterやprecore以外のゲノム領域の変異が寄与していることが示唆された。

D. 考察

昨年、日本肝臓学会は、HBV診療ガイドラインにおいて、HBeAb陽性で肝機能が正常の症例を、“非活動性キャリア”とし、その診断基準を提唱した。この基準は、欧米からの報告を基に定義されたものと考え

られ、国内における有用性などの検討はなされていない。本研究では、この肝臓学会の定義に基づいて、ICを定義し、その予後を検討した。358 症例で、平均観察期間は約 1000 日程度とやや短期間の検討ではあるが、一例も死亡例、発癌例、核酸アナログ開始例はみられなかった。多くの症例は、良好な予後であったと言える。一方、ALT(30 IU/L 以下)とHBV DNA(4.0LC/ml 未満)の基準を逸脱する例は、それぞれ10%程度、いずれかの基準逸脱例は20%程度となり、ICの基準を満たし続けることはやや困難であると考えられた。ALT、HBV DNA 両者の基準を逸脱する例は1例のみであり、いわゆる肝炎の再燃は、あまりみられないことが示された。ALT基準逸脱例も、全例100IU/L以下であり、重篤な肝障害とはいえない状態であった。基準逸脱の予測因子としては、当然ではあるが、ALT値、HBV DNA量が挙げられた。またG-GTP値も予測因子として指摘されており、その理由については今後の検討課題としたい。

肝疾患診療連携拠点病院が全国に整備され、国内のHBV研究報告は、これら拠点病院からの報告が多い。一方、これら拠点病院は、過去に重篤な肝炎を起こした既往がある症例や家族内に肝細胞癌が多くみられる症例など、特殊なHBVキャリアが集積されている可能性があった。本研究では、HBV関連マーカーを中心に、拠点病院といわゆる地域の基幹病院での比較検討を行った。結果として、地域の拠点病院では、Genotype Cが少なく、HBsAg量が低値の症例が有意に多くみられた。このことは、いわゆるHigh Volume Centerである拠点病院に通院中のHBVキャリアは、他の一般病院と比べて、治療抵抗性といわれるGenotype Cが多く、最終的な治療目標であるHBsAgの消失はまだ望めない症例が多数をしめるのが現状といえる。わが国のHBVキャリアに対する施策は、これらHigh Volume Centerからの研究報告を基に策定されてきており、今後、これら病院間の差を認識した上で、HBVキャリアの臨

床経過についての理解を進めなければならない。一方、発がんについては、ALT値、HBV DNA量上は正常と考えられるキャリアからも発がんがみられた。しかし、その多くは肝線維化が進行した例であり、肝線維化の評価もHBVキャリアの予後の判断には重要と考えられた。

E. 結論

肝臓学会が定めるHBeAg陰性非活動性キャリアの予後は概ね良好であった。しかし、観察期間が平均1000日程度と短いため、さらなる長期的な評価が必要と考えられる。また、これまで国内のHBVキャリア診療の中心を担ってきた肝疾患診療連携拠点病院と地域の基幹病院に通院中のHBVキャリアでは、HBVマーカーの観点から有意な差を認めた。今回は検討しなかったが、さらに中小の医療機関では、その差異は大きくなると思われる。発がんについては、肝線維化に留意した評価が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 15: 21455-21467, 2014.
2. 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* 20(23):7197-7206, 2014.
3. 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 (in press).

4. 新井誠人、神田達郎、今関文夫、横須賀收(2014) 本邦における HBe 抗体陽性無症候性キャリアの実態 消化器内科 58(2):207-212.
5. 新井誠人、横須賀收(2015)【B型肝炎】核酸アナログ製剤の効果と実際の臨床 18(1):33-37.

2. 学会発表

- (1)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) HBe 抗原陰性非活動性キャリアにおける、HBs 抗原消失を目指した治療適応 第 50 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 肝臓 55 巻 Suppl.(1) A42
- (2)神田達郎、島田紀朋、厚川正則、篠崎正美、三上繁、中本晋吾、新井誠人、今関文夫、坪田昭人、横須賀收(2014) B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法 開始直前 HBe 抗原からみた治療効果の検討 第 50 回日本肝臓学会総会 肝臓 55 巻 Suppl.(1) A247
- (3)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) HBV 関連発癌の現状と効率的な発癌サーベイランスの検討 第 18 回日本肝臓学会大会 肝臓 55 巻 Suppl.(2) A509
- (4)太和田暁之、千葉哲博、横須賀收(2014) 核酸アナログ製剤投与中の慢性 B 型肝炎疾患症例における発癌予測スコアリングシステムの有用性の検証 第 40 回日本肝臓学会東部会 肝臓 55 巻 Suppl.(3) A726
- (5)新井誠人、神田達郎、横須賀收(2014) 当院における多剤耐性 HBV キャリアの検討 肝臓 55 巻 Suppl.(2) A730
- (6)Y. Haga, T. Kanda, R. Sasaki, M.

Nakamura, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. mRNAs expression profiles of MAPKs and their related genes in human hepatoma cell lines with integrated HBV DNA fragments. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-13

- (7)M. Nakamura, T. Kanda, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. MicroRNA-122 negatively regulates the production of inflammatory cytokines and chemokines in human hepatic stellate cells. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-16
- (8)R. Sasaki, S. Nakamoto, T. Kanda, Y. Haga, X. Jiang, M. Nakamura, O. Yokosuka. Analysis of epigenetic control of HBV replication by epigenetics compound library. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-18
- (9)T. Kanda, S. Wu, S. Nakamoto, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, M. Nakamura, O. Yokosuka. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B 2014.11.20. P-19
- (10) Arai M, Kanda T, Imazeki F, Yokosuka O. Different Dynamics of HBV Related Antigen during Entecavir Treatment. APASL(2015)

G. 知的所得権の出願・登録状況

発明の名称：肝がん肝細胞阻害剤
出願日：平成24年10月10日
出願番号：特願2012-224722