

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：髭 修平・札幌厚生病院第 3 消化器内科・主任部長

分担研究課題：非活動性キャリア判定における線維化評価の重要性

研究要旨： わが国のガイドラインでは、HBe 抗原陰性非活動性キャリアは、1 年以上の経過観察における HBe 抗原、ALT 値、HBV DNA 量により、HBV 持続感染者のウイルス学的、生化学的安定度により定義されている。多くのキャリアは、安定した経過を辿ると考えられているが、一部の例で肝炎再燃や肝発癌をきたすことがある。本研究では、これらのリスク要因につき検討した。HBV DNA 再上昇は、HBs 抗原や HB コア関連抗原の高値例に多い傾向を認め、安定度予測時にこれらの血清 HBV マーカーの同時評価は有用である。また、肝発癌においては肝線維化進展例に高率であり、血液生化学検査、画像検査などにより線維化の評価を定期的実施することが重要であると考えられた。

非活動性キャリアの判定はウイルス学的、生化学的基準から実施されており、対象内に線維化進展例や肝発癌リスクが高い例が含まれていることを明確にし、継続した経過観察を行うことが临床上重要である。

A. 研究目的

HBV 持続感染者の自然経過において、HBe 抗体陽性期は、HBe 抗原陽性期の強い免疫反応が終息し、免疫監視が強まる低増殖期と考えられている。この時期に HBV DNA 量低値で ALT 正常が継続する例が非活動性キャリアとされている。このような症例群における臨床的問題点として、肝炎活動性再燃の可能性、肝発癌リスクの評価、などが挙げられる。しかし、継続的に経過観察を受けずに医療機関を受診し評価を受ける例も少なくはないため、単回の検査や血液検査だけの判定には限界がある。なかでも HBV 由来の肝線維化進展例では、血液生化学的検査成績と合致しない例もあり、さらに、発癌のリスクも高い症例が含まれる可能性がある。

本研究では、HBe 抗体陰性非活動性キャリアのウイルス生化学的安定度、および、肝線維化指標評価の重要性について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 非活動性キャリアのウイルス学的、生化学的安定度

HBe 抗原陰性症例のうち、抗 HBV 未施行で、2 年以上連続して ALT 30 IU/L である症例 85 例を対象として、経過観察中の ALT/HBV DNA の再上昇率を検討する。なお、血清 ALT は年 3 回以上、HBV DNA 量は年 2 回以上の測定例とした。観察開始のポイントは、HBs 抗原、HB コア関連 (HBcr) 抗原を測定可能であった時点とした。また、観察開始時の HBs 抗原と HBcr 抗原レベル

により以下の HBV マーカーのスコア化を行った。HBs 抗原 (\log_{10} IU/mL): 1.9 未満; スコア 0、1.9-2.8: 1、2.9 以上: 2、HBcr 抗原 (\log_{10} U/mL): 3.0 未満; スコア 0、3.0-3.9: 1、4.0 以上: 2 として、両者の総和を合計スコアとした。観察開始後の HBV DNA 上昇、ALT 上昇については Kaplan-Meier 法で解析した。

(II) 肝線維化指標と HBs 抗原量による肝発癌リスクの評価

HBe 抗原陰性、HBV DNA 量 < 4.0、HBV genotype C の無治療例で、HBs 抗原と FIB-4 index を同時測定した 235 例を対象として、肝癌の既往や経過観察中の肝発癌につき検討する。FIB-4 index は以下の計算式から算出した。

$$\text{FIB-4 index} = \text{AST (IU/L)} \times \text{年齢 (歳)} / \text{血小板 (} 10^9/\text{L)} \times (\text{ALT})^{1/2} \text{ (IU/L)}$$

なお、今回の解析においては、個人が特定できないよう配慮した。

C. 研究結果

(I) HBe 抗体陽性 ALT 持続正常例の経過中 ALT/HBV DNA の上昇

対象症例 85 例の観察開始時の HBV DNA 量 (LC/mL) の分布は、2.1 未満: 16.5%、2.1-2.9: 20.0%、3.0-3.9: 29.4%、4.0-4.9: 23.5%、5.0-5.9: 8.2%、6.0 以上: 2.4%であった。非活動性キャリアと判定される HBV DNA 量 4.0 未満の症例は全体の 65.9%であった。

観察開始時の HBV DNA 量が 4.0 未満の非活動性キャリアの経過観察 5 年間における HBV DNA 4.0 への上昇例は 24%、ALT > 30 への上昇は 47%に認められた。

観察開始 3 年後の HBV DNA 上昇率を HBs 抗原/HBcr 抗原の合計スコア別に示すと、総スコア 0 群で 7.9%、総スコア 1-2 点群で 33.7%、総

スコア 3-4 点群で 42.9%と、合計スコア上昇と HBV DNA 再上昇が関連する傾向を認め、特にスコア 0 の症例では再燃は低率であった。(log-rank test $p=0.09$)

観察開始時の HBV DNA 量 4.0 未満、ALT30 以下の非活動性キャリアの、経過観察開始後 3 年/5 年の ALT > 30 への上昇率は、総スコア 0 点群で 19.4/33.8%、総スコア 1-2 点群で 13.2/59.5%、総スコア 3-4 点群で 12.5/12.5%の結果で、スコアと ALT 上昇には関連性を認めなかった。

(II) HBs 抗原レベルと FIB-4 index レベル別の肝発癌

HBe 抗原陰性かつ HBV DNA 量 < 4.0 の 235 例を、log HBsAg を 2.00 で、FIB-4 index を 2.00 でそれぞれ低値/高値に 2 分した場合の対象症例からの肝発癌(有発癌歴症例と経過中発癌例を含む)は、低 HBsAg/低 FIB-4 群からは 22.2% (4/18)、高 HBsAg/低 FIB-4 群からは 6.8% (8/118)、低 HBsAg/高 FIB-4 群からは 38.7% (12/31)、高 HBsAg/高 FIB-4 群からは 38.2% (26/68) に認められた。

D. 考察

HBV 持続感染者のなかで HBe 抗体陽性で持続的に HBV DNA 量低値、ALT 正常の症例は非活動性キャリアとされる。この段階はウイルスの低増殖期と考えられウイルス学的、生化学的に安定している症例も多いが、肝炎活動性再燃や肝発癌の可能性に関する継続的な経過観察が十分実施されない例が多数存在する事が臨床的な問題点として指摘されている。

これらの症例の経過観察において、多くの症例はウイルス学的に安定した状態を維持したが、HBs 抗原や HBcr 抗原の高値例では、HBV DNA

の再上昇をきたすものも認める。単回の検査で HBV 活動性を判定することは困難であり、経過観察の後に現状評価やその後の検査間隔などを判断すべきであるが、上記の HBs 抗原、HBcr 抗原などの血清 HBV マーカーが低値の症例からの再燃は低率であり、予測のための参考情報となる。

これまでに、HBV DNA 量高値、あるいは、HBs 抗原高値例で、その後の肝発癌が高率であるとの報告があり、これらの HBV マーカー低値例では発癌リスクが低下すると考えられがちである。しかし、肝線維化が進展した状態では、HBV マーカー低値であっても肝発癌リスクは高いことに注意が必要である。本研究では、肝線維化を FIB-4 index を指標として評価解析したが、FIB-4 index が 2.0 以上の例では、HBV DNA 量の高低に関わらず約 38% の肝発癌を認めた。HBs 抗原は加齢とともに低下することも知られており、線維化が進んだ症例で HBs 抗原が低下することは、逆に発癌リスクが高い状態になる可能性も考えられる。

現在のわが国のガイドラインでは、HBe 抗原陰性の非活動性キャリアは、1 年以上の経過観察における HBe 抗原、ALT 値、HBV DNA 量により判定されている。この定義は、HBV 持続感染者のウイルス学的、生化学的安定度の判定として妥当な条件と考えられる。一方、HBV 持続感染者の病型進行の可能性や発癌のリスクも考慮して判定する場合には、肝線維化の要因を含める必要がある。したがって、非活動性キャリアの判定はあくまでウイルス学的、生化学的観点からの判定基準である事を示し、線維化進展例や肝発癌リスクが高い例が含まれていることを明確にすることが重要であると考えられる。

E. 結論

HBe 抗原陰性、ALT 持続正常、HBV DNA 低値 (<4.0 LC/mL) の非活動性キャリアの多くは、安定した経過を示すが、HBs 抗原や HBcr 抗原の高値は、HBV DNA 再上昇の可能性予測に有用な指標となる。また、経過中の肝発癌リスクは、HBs 抗原低値であっても線維化進展例では高率であり、注意を要する。

したがって、非活動性キャリアに対しては、血液生化学、ウイルス学的検査に加え、線維化評価、画像評価も合わせて、定期的に観察を継続することが必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet* 2012; 13: 47
- 2) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in

Japanese and Korean. PLoS One 2012; 7(6): e39175

- 3) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. J Infect Chemother 2012; 18(6): 883-890
 - 4) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. Sci Rep 2013; 3: 1065
 - 5) 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(2): e86449
 - 6) 髭 修平. HBV コア関連抗原を用いた肝内 cccDNA レベル評価: 抗ウイルス治療評価の新たな指標. 肝胆膵 2012; 65(4): 643-649
 - 7) 髭 修平, 小関 至, 桑田靖昭, 佐藤隆啓, 狩野吉康, 豊田成司. ALT 正常 HBe 抗体陽性症例の検討. 臨床消化器内科 2013; 28(9): 1301-1306
 - 8) 髭修平, 中島知明, 小関至, 狩野吉康, 豊田成司. 核酸アナログ治療の最前線と今後の展望. 内科 2014; 113(4): 689-692
 - 9) 髭修平, 小関至, 狩野吉康, 豊田成司. ラミブジン、アデホビル治療の成績と多剤耐性ウイルス. 医学と薬学 2014; 71(7): 1171-1178
- ## 2. 2. 学会発表
- 1) 髭 修平, 小関 至, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 佐藤隆啓, 大村卓味, 狩野吉康, 豊田成司. ラミブジン耐性アデホビル併用 B 型肝炎に対する耐性出現の検討. 第 39 回日本肝臓学会東部会 東京 2012
 - 2) S. Hige, I. Ozeki, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Evaluation of liver fibrosis and prediction of hepatic carcinogenesis for patients with chronic hepatitis B by a unique glycoprotein: Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP). The Liver Meeting[®] 2014, Boston, 2014.
 - 3) S. Hige, I. Ozeki, M. Yamaguchi, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Risk of hepatocellular carcinoma for hepatitis B patients with nucleoside analogues by the estimation of fibrosis index at the start of the treatment. The 11th JSH single topic conference, Hiroshima, 2014.
 - 4) I. Ozeki, T. Nakajima, S. Hige, Y. Karino, J. Toyota. Analysis of hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels using the Lumipulse HBsAg-HQ assay in hepatitis B virus carriers with HBsAg seroclearance according to the Abbott ARCHITECT assay. The Liver Meeting[®] 2014, Boston, 2014.
 - 5) S. Hige, I. Ozeki, M. Kimura, T. Arakawa, T. Nakajima, Y. Kuwata, T. Sato, T. Ohmura, Y. Karino, J. Toyota. Estimation of hepatocellular carcinoma for patients with HBV infection by HBs antigen and FIB-4 index. The 4th International Kyoto Liver Symposium, Kyoto, 2014.
 - 6) 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. 新規糖鎖マーカーM2BPによる慢性肝疾患の線維化評価の有用性. 第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.
 - 7) 髭修平, 小関至, 狩野吉康. 核酸アナログ投与例における線維化と肝発癌. JDDW 2014、神戸、2014.
 - 8) 小関至, 山口将功, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 大村卓味, 佐藤隆啓, 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. アーキテクトで HBs 抗原陰性に至った HBV 症例のルミパルス HBs-HQ を用いた解析. JDDW 2014、神戸、2014.
 - 9) 髭修平, 小関至, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 佐藤隆啓, 大村卓味, 狩野吉康, 豊田成司. FIB-4 index および HBs 抗原による

HBV 陽性例の肝発癌評価. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.

- 10) 小関至、中島知明、髭修平、木村睦海、荒川智宏、桑田靖昭、大村卓味、佐藤隆啓、狩野吉康、豊田成司. 高ウイルス量 B 型慢性肝炎に対する治療前の薬剤耐性の有無別 Entecavir の治療成績. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.
- 11) 中島知明、山口将功、木村睦海、荒川智宏、桑田靖昭、小関至、佐藤隆啓、大村卓味、髭修平、狩野吉康、豊田成司. 肝硬変の成因別実態 -最近 10 年間における変化-. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.

H. 知的所得権の出願・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

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者： 上野 義之（山形大学医学部内科学第二講座 教授）

分担研究課題：ゲノタイプ B 浸淫地域での HBe 抗体陽性患者の長期予後

研究要旨：

(1) ジェノタイプが測定可能であった349名とし、2000年を境に、前後10年に分け、各ジェノタイプ別感染頻度の変遷を比較すると、キャリア全体におけるジェノタイプの感染割合は過去と現在で大きな変化は見られなかった。
(2) 次に肝病態とジェノタイプの関連では、HBe抗体陽性例では、ジェノタイプB例がジェノタイプC例に比べ無症候性キャリアの頻度が有意に高かったが、進行した肝病変はジェノタイプC例において多くみられた。
(3) HBe抗原陽性例においても傾向は同様であり、ジェノタイプB例において有意に無症候性キャリアの頻度が高く、反対にジェノタイプC例はジェノタイプB例に比べ、慢性肝疾患の頻度が高かった。
(4) さらにジェノタイプB型が多数を占める山形県のキャリアについて、臨床パラメーターについて検討したところ、HBe抗体陽性キャリアにおける肝線維化進展、HBs抗原自然陰性化などの肝病態とジェノタイプとの関連が示唆された。
(5) これまで一般的に予後が比較的良好とされたジェノタイプBでも高齢者の場合発癌例を認める例が増加することより、年齢などを考慮した発癌リスクの検討が必要と考えられた。
以上より、HBVキャリアの長期成績については以前の研究に比して、より観察期間が長期化しており、その結果これまでの一般的なキャリアの長期予後と相違を生じている可能性もある。

A. 研究目的

当班研究において HBe 抗体陽性無症候性キャリアの長期予後を検討するために、平成 24 年度は本学附属病院通院中の HBs 抗原患者のデータベース作成を行った。これまでの後ろ向きコホート研究から、当地域が全国有数の HBV ジェノタイプ B の高感染地域であることを報告してきたが、今回は過去 20 年の B 型慢性肝疾患におけるジェノタイプの感染頻度の変遷を比較検討し、さらに HBe 抗体陽性慢性肝疾患例について、

ジェノタイプからみた肝病態の特徴を、HBe 抗原陽性例と比較して明らかにすることを目的とした。

平成 25 年度の分担研究では、B 型肝炎ジェノタイプ B 高浸淫地域である当院の B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ（NA）治療の現状を分析した。

しかし、ジェノタイプによる B 型肝炎の自然経過に及ぼす影響（ALT 値、HBV 関連マーカーなど）の違いが明らかでなかったことから、本年度は、無治療の非活動性キャリ

ア例（HBe 抗体陽性）を対象に、自然経過とジェノタイプとの関連を検討した。

さらに H26 年度は HBe 抗体陽性無症候性キャリア例における臨床予後について臨床的なパラメーターのうち 2 点（HBs 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。

B. 研究方法

1987 年から 2011 年まで、HBs 抗原陽性 B 型肝炎ウイルスキャリアは 645 名（平均年齢 61.0 歳、男性 / 女性 = 420 / 225）であった。これらの症例について 2011 年を起点とし、臨床診断、HBV 関連マーカー、肝機能検査値、抗ウイルス治療状況、肝発癌実態を調査し、データベース化作業を行った。

次に核酸アナログ製剤が保険適用となった 2000 年を境に、前後 10 年に分け、ジェノタイプが測定可能であった症例について、HBs 抗原陽性 B 型肝炎患者における各ジェノタイプ別感染頻度の変遷を比較した。さらに HBe 抗体陽性例について、ジェノタイプと肝病態との関連を HBe 抗原陽性例と比較検討した。

さらに山形大学医学部附属病院消化器内科外来で長期に経過観察し得た HBe 抗体陽性慢性肝疾患無治療例 111 例において、初診時からの (1) ALT、(2) ウイルスマーカー、(3) 線維化マーカー (FIB-4 index) の推移を調べた。また、(4) HBs 抗原陰性化例について、その背景因子を解析した。

（倫理面への配慮）

本厚生労働省班研究の分担研究については、山形大学医学部倫理委員会からの承認を得て行った。

C. 研究結果

HBs 抗原陽性 645 名中、急性肝疾患例を除き、経過追跡可能かつジェノタイプが測定可能であった B 型肝炎患者 349 名のジェノタイプの内訳は、ジェノタイプ A : B : C : D = 11 例 (3.1%) : 194 例 (54.0%) : 150 例 (41.8%) : 4 例 (1.1%) であった。2000 年を境に、前後 10 年に分け、各ジェノタイプ別感染頻度の変遷を比較すると、1990 年 - 1999 年に受診した 237 例ではジェノタイプ A : B : C : D = 6 例 (2.5%) : 128 例 (54%) : 100 例 (42.2%) : 3 例 (1.3%) であり、2000 年 - 2011 年の 122 例ではジェノタイプ A : B : C : D = 5 例 (4.1%) : 66 例 (54.1%) : 50 例 (41.0%) : 1 例 (0.8%) と、キャリア全体におけるジェノタイプの感染割合は過去と現在で大きな変化は見られなかった。HBe 抗原・抗体別に検討すると、HBe 抗原陽性例は 79 例 (23%)、HBe 抗体陽性例は 269 例 (77%) であった。それぞれのジェノタイプの内訳をみると、HBe 抗原陽性例ではジェノタイプ B : C = 21 例 (27%) : 58 例 (73%)、一方 HBe 抗体陽性例ではジェノタイプ B : C = 187 例 (70%) : 82 例 (30%) とジェノタイプの頻度に差を認めた ($P < 0.01$)。ジェノタイプ別に抗ウイルス治療（インターフェロン、核酸アナログ製剤）導入率を比較したところ、ジェノタイプ B 症例では 48/208 (23.1%) であったのに対し、ジェノタイプ C 症例では 51/140 (36.4%) と、ジェノタイプ C 例で抗ウイルス治療導入率が

有意に高かった ($P < 0.01$)。次に肝病態とジェノタイプに関連をみると、無症候性キャリア 117 例、慢性肝炎 183 例、肝硬変 22 例、肝細胞癌 34 例であり、このうちジェノタイプ A は無症候性キャリア 5 例、慢性肝炎 3 例のみで、肝硬変や肝細胞癌といった進展した肝病変は見られなかった。さらに HBe 抗原・抗体別に分けると、HBe 抗原陽性例では肝硬変 5 例中 4 例 (80%)、肝細胞癌 6 例全例 (100%) がジェノタイプ C であった。またジェノタイプ B 例がジェノタイプ C 例に比べ無症候性キャリアの頻度が有意に高く ($B : C = 8/21$ (38%) : $3/58$ (5.2%)、 $P < 0.01$)、反対にジェノタイプ C 例はジェノタイプ B 例に比べ、慢性肝炎の頻度が高かった ($B : C = 12/21$ (57%) : $45/58$ (77.6%)、 $P < 0.05$)。HBe 抗体陽性例においても傾向は同様であり、ジェノタイプ B 例において有意に無症候性キャリアの頻度が高かった ($B : C = 80/187$ (42.8%) : $21/82$ (25.6%)、 $P < 0.01$)。HBe 抗体陽性肝細胞癌の頻度はジェノタイプ C 例において有意に高かった ($B : C = 14/187$ (7.5%) : $14/82$ (17.1%)、 $P < 0.05$)。近年、ジェノタイプ A の急性感染による慢性化が本邦で問題となっているが、経過観察可能であったジェノタイプ A による慢性肝疾患症例 8 例を対象に臨床背景をみると、男性が 6 例 (75%)、年齢分布は 27 歳から 60 歳と他のジェノタイプに比べ若年の傾向を認めた。背景肝疾患は無症候性キャリアが 5 例 (62%)、慢性肝炎が 3 例 (38%) であり、慢性肝炎の一例を除き、初診時すでに HBe 抗体は陽性であった。肝機能は落ち着いている例が多かったが、経過中、急

性肝炎からの慢性化した一例では、核酸アナログ治療を導入し現在も投与継続中である。

また H25 年度の研究では、当科の 645 人の HBs 抗原陽性例のうち、全体の 65% が無治療であり、NA 投与例は 20%、IFN 投与例は 15% であった。長期に経過観察し得た HBe 抗体陽性慢性肝疾患患者は 111 例、そのうちジェノタイプが判明したのは 94 例であった (ジェノタイプ A : 2 例、ジェノタイプ B : 72 例、ジェノタイプ C : 20 例)。初診時のデータでは、ジェノタイプ C はジェノタイプ B よりも若年であり (ジェノタイプ B vs. ジェノタイプ C ; 45.7 歳 vs. 55.3 歳、 $P < 0.01$)、HBV DNA 3.7 未満の症例が多かった (ジェノタイプ B vs. ジェノタイプ C ; 49% vs. 75%、 $P < 0.05$)。

1. ALT の変化

初診時の ALT 値異常例の割合は 32% で、ジェノタイプ B 24 例 (34%)、ジェノタイプ C 8 例 (40%) で差はなかった。初診時 ALT 値正常例の中で、経過中 ALT 値が持続正常だったのは、ジェノタイプ B 34/47 例、ジェノタイプ C 7/11 例であり、経過中に異常値を呈したものはジェノタイプ B 13/47 例、ジェノタイプ C 4/11 例であった。10 年間の累積 ALT 値異常化率はジェノタイプ B 28%、ジェノタイプ C 28% で差はなかった。

2. ウイルスマーカーの変化

HB コア関連抗原や HBV DNA 量は、ALT 値に関わらず低い症例が多かった。ジェノタイプ別のウイルス抗原量の推移については後述する。

3. 線維化マーカー (FIB-4 index) の推移

FIB-4 index は経過中に軽度上昇する例が

多かった。FIB-4 index 3.25 以上到達率は、ジェノタイプ B で高い傾向があったが、有意差はみられなかった。FIB-4 index の年上昇度はジェノタイプ B がジェノタイプ C に比し高かった（ジェノタイプ B vs. ジェノタイプ C ; 0.03/年 vs. 0.01/年）。

4. HBs 抗原陰性化例

経過中に HBs 抗原が陰性化した症例は、ジェノタイプ B (3/73 例) よりジェノタイプ C (7/20 例) に多かった ($P < 0.01$)。初診時から陰性化までの期間の中央値はジェノタイプ B が 397 か月、ジェノタイプ C が 309 か月であった。HBs 抗原が陰性化した症例は、2 例を除いて初診時すでに HB コア関連抗原量が 3 LogU/mL 未満、HBV DNA 量が 3.7 Log 未満の症例であった。

さらに H26 年度の検討より

HBs 抗原陰性化を検討できた e 抗体陽性無症候性患者 (ASC) 患者は 106 例であり、うち 11 例で陰性化を認めた。全体 106 例のうちジェノタイプ B は 67 例であり残り 19 例がジェノタイプ C であった。ジェノタイプ別に陰性化率を検討するとジェノタイプ B では 3%、ジェノタイプ C では 37% に陰性化を認めた。ただし、ジェノタイプ B では 52% が HBs 抗原の値が低下しつつあり今後さらに低下して陰性化する例が増える可能性があった。

(ジェノタイプ C では 21%)

HBs 抗原の累積陰性化率は観察 99 例で (平均観察期間 7.7 年) 陰性化までの期間は平均 11.5 年であった。初診時年齢、性別、肝機能値、初診時 HBs 抗原、HB コア関連抗原、HBV-DNA、さらに初診時 FIB-4 index など多変量解析を行なったが、初診時 HBs 抗原のみが統計学的に有意な因子とし

て検出された。

D. 考察

HBV ジェノタイプ B の高感染地域において過去 20 年の B 型慢性肝疾患におけるジェノタイプの感染頻度の変遷を比較検討したところ、感染実態に大きな変化は見られなかった。しかし当地域においても、慢性肝疾患患者の中にジェノタイプ A 感染がすでに検出されており、今後その臨床的特徴を詳細に解析することが本邦の B 型肝炎対策を考える上で大切と思われた。

また HBe 抗体陽性慢性肝疾患例においては、HBe 抗原陽性例と比較し、ジェノタイプ B による感染が有意に多くみられた。肝病態の進展はジェノタイプと関連しており、ジェノタイプ B 症例では無症候性キャリアの頻度が高く、一方、進行した肝病態はジェノタイプ C 症例に多くみられたことから、HBe 抗体陽性無症候性キャリアの自然予後の解析には、ジェノタイプを含めた長期的な検討が欠かせないと考えられた。

ジェノタイプ B 高浸淫地域において、HBe 抗体陽性非活動性キャリア例における HBV 関連マーカーの自然経過とジェノタイプとの関連を検討した。また NA 内服例の治療効果に及ぼすジェノタイプの影響についても比較検討した。

非活動性キャリア例においては、ALT 値の変動、HBV DNA 量の経年的変化は、ジェノタイプ間で差が見られなかった。HBs 抗原陰性化はジェノタイプ C 例で多くみられ、FIB-4 index はジェノタイプ B で年上昇率が高い傾向であったが、両群間で初診時年齢に差があり、解析にあたってのバイアス

も影響していると考えられる。今後、年齢をマッチさせた多数例での検討とともに、自然経過に影響を及ぼす宿主の遺伝的背景も含めて解析する必要があると思われる。

E. 結論

HBV ジェノタイプ B の高感染地域における、B 型慢性肝疾患のジェノタイプ感染実態には大きな変化が見られなかったが、ジェノタイプは HBe 抗原陽性例、HBe 抗体陽性例どちらにおいても、肝病変の進行と密接に関連している可能性が示唆された。HBe 抗体陽性キャリアの自然予後は、ジェノタイプも含めた前向き研究が欠かせないと考えられた。

これまでキャリアの長期予後については一般的にゲノタイプ B が予後が良いと一般的に考えられていた。しかし、本検討では観察期間が長期化するにつれてゲノタイプ C でも HBs 抗原の陰性化例を認めており、また前年度までの検討で観察期間が長期化する例で肝細胞癌の発症をゲノタイプ B でも認めていたことより既存の概念が正しいかもう一度検証する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Inoue J, Ueno Y, Kawamura K, Yamamoto T, Mano Y, Miura M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Kimura O, Obara N, Kawagishi N, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Association between S21

substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis. J Clinical Virol 2012;55(2):147-52.

(2) 渡辺久剛、上野義之：B 型肝炎の自然予後（無治療住民検診での長期予後）肝胆膵疾患；「予後」の変遷．肝胆膵 66(3)：399-407，2013．

(3) Ninomiya M., Ueno Y., Shimosegawa T. Application of deep sequence technology in hepatology. Hepatol Res, 2014;44(2):141-8.

(3) 渡辺 久剛，佐藤 智佳子，奥本 和夫，西瀬 雄子，斎藤 貴史，河田 純男，上野 義之．B 型肝炎ウイルスジェノタイプ B 高感染地域における感染実態の変遷と核酸アナログ治療例におけるジェノタイプの臨床的意義．消化器内科，58：213-9，2014．

2. 学会発表

(1) Watanabe H, Saito T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Ueno Y and Kawata S. Transition in hepatitis B virus genotypes responsible for acute hepatitis B in a hyperendemic area for genotype B infection - 20 years follow-up study in Japan. DDW2012, San Diego, USA, May 20, 2012

(2) Watanabe H, Saito C, Mizuno K, Katsumi T, Tomita K, Okumoto K, Nishise Y, Saito T, and Ueno Y. Predictive Value of hepatitis B Virus Genotypes on the Responses to Long-term Nucleoside Analogue Therapy in Patients with Chronic Hepatitis B. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 2013.

(3) 西瀬雄子、奥本和夫、富田恭子、勝見智大、佐藤智佳子、阿藤里佳、渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：ゲノタイプ B 高浸淫地区における免疫抑制・化学療法を受けた HBV 既往感染者の HBV 再活性化の検討．第 17 回日本肝臓学会大会、東京；2013 年 10

月.

(4) 渡辺久剛、佐藤智佳子、上野義之：ジェノタイプの感染実態の変遷とB型肝炎キャリアおよび急性肝炎例におけるジェノタイプの臨床的意義(シンポジウム4「B型肝炎 - 概念の変遷とその臨床的意義」) 第49回日本肝臓学会総会、東京；2013年6月.

(5) 佐藤智佳子、渡辺久剛、勝見智大、富田恭子、石井里佳、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：HBV 遺伝子型からみたB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療反応性とウイルス抗原量スコア化による中止可能性の検討 第49回日本肝臓学会総会、東京；2013年6月.

(6) 渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：HBV ジェノタイプB型高浸淫地域における、ジェノタイプの感染実態の変遷および臨床経過との関連(ワークショップ2「HBV ジェノタイプとB型肝炎の病態」) 第99回日本消化器病学会総会、鹿児島；2013年3月.

(7) 三浦 雅人，上野 義之，下瀬川 徹.

HBe 抗体陽性無症候性キャリアの自然経過に関する検討.日本肝臓学会第50回総会 東京、H26年5月29-30日

(8) 渡辺 久剛，佐藤 智佳子，上野 義之. HBV 遺伝子型からみた自然経過観察例および核酸アナログ治療例のHBs 抗原陰性化と肝発癌予後. 日本肝臓学会第50回総会 東京、H26年5月29-30日

(9) 渡辺 久剛，斎藤 貴史，上野 義之. 肝疾患診療における医療連携の在り方 本県における肝炎対策の現状と課題をふまえた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築と肝疾患診療連携体制. 日本肝臓学会第50回総会 東京、H26年5月29-30日

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

研究分担者 田中榮司 信州大学医学部内科学第二教室 教授
研究協力者 松本晶博 信州大学医学部附属病院肝疾患相談センター 特任准教授
梅村武司 信州大学医学部内科学第二教室 准教授
上條のぞみ 信州大学医学部内科学第二教室 大学院生
山田 雪 信州大学医学部内科学第二教室 大学院生

分担研究課題：HBe 抗体陽性 B 型肝炎ウイルスキャリアの病態と予後

研究要旨：

HBe 抗体陽性 B 型肝炎ウイルスキャリアの病態と予後を検討するため、3 年間の研究期間で以下の 3 つの研究を行った。研究 1：HBe 抗体陽性キャリアの ALT 異常と関連する因子の解明。研究 2：HBe 抗原セロコンバージョン（SC）前後での pre-C/ BCP 変異と HBV 活動性との関連。研究 3：B 型肝炎症例における新規線維化マーカー M2BPGi の意義。この結果、以下の結論を得た。研究 1 の結論：HBeAb 陽性患者の ALT 値と HBcrAg 量との間に強い相関がみられ、HBV DNA 量や HBs 抗原量に比較して予後予測に優れたマーカーである。研究 2 の結論：Pre-C・BCP 変異の観点から HBe 抗原の SC をみると、Pre-C 変異が mutant となる場合と wild のままである場合の 2 種類の SC があつた。Pre-C 変異が mutant となる SC はウイルスの活動性が十分低下しない傾向にあり、HBe 抗原陰性慢性肝炎を発症する危険性があることが予測された。研究 3 の結論：M2BPGi 値は B 型肝炎の線維化マーカーとして有用であるが、男性での値は 1.8 倍する補正が必要である。これらの成績は、B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの病態を明らかにし、長期予後を予測することに有用であると考えられた。

A. 研究目的

研究 1 の目的は、非活動性キャリアの中で肝炎が完全に鎮静化しない症例の特徴を明らかにすることである。

研究 2 の目的は、pre-core 遺伝子の G1896A の stop codon 変異（Pre-C 変異）および basal core promoter の A1762T と G1764A のダブル変異（BCP 変異）と HBe 抗原のセロコンバージョン（SC）や HBV 活動性との関連を検討することである。

研究 3 の目的は、新規肝線維化マーカーである M2BPGi と B 型肝炎の肝線維化との関連を検討することである。

B. 研究方法

研究 1 では、長期間経過観察可能であった HBe 抗体陽性 HBV キャリア 21 例を対象とした（表 1-1）。経過観察期間の中央値は 22 年と長く、各症例について複数ポイントを選択し各種ウイルスマーカーの測定を行った。経過中に起こったイベントでは、ALT 値が 30 IU/L となった症例が 14 例みとめられ、核酸アナログの治療を必要としたのは 7 例であった。

研究 2 の対象は、2 年以上経過観察可能であつ

た B 型肝炎 86 例で、その HBe 抗原・抗体の推移により以下の 3 群に分けて検討した：HBe 抗原持続陽性群 18 例、HBe 抗原 SC 群 25 例、HBe 抗体持続陽性群 43 例。3 群の背景因子の比較は表 2-1 に示した。年齢は SC 群が最も若く、HBe 抗体持続陽性群が最も高かった。性別には有意差はなかった。HBe 抗原の SC や HBe 抗原非産生変異の出現は遺伝子型により大きく異なるため、今回の検討では遺伝子型 C の症例のみを対象とした。

研究 3 の対象は、肝生検が施行された B 型肝炎患者 54 例であり、臨床的背景は表 3-1 に示した。また、肝生検所見の grade と stage の分布を表 3-2 に示した。M2BPGi はシスメックス社製キットで測定し、測定結果は COI で表示した。

（倫理面への配慮）

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

研究 1 の結果は下記の如くであった。各測定ポイントの ALT 値と HBV DNA 量、HBcr 抗原量、HBs 抗原量との相関を検討した。この結果、HBV DNA

量およびHBs抗原量はALT値と有意の相関はなかった。これに対しHBcr抗原量はALT値と有意の相関がみられた(図1-1)。ROC解析では、ALT値が31IU/L以上となることとHBcr抗原量とはAUC 0.841と高い値で有意の関連がみられた(表1-2)。HBcr抗原量のカットオフ値を3.7 log U/mlに設定すると、これ以上では75%程度の症例でALT値が31IU/L以上になったのに対し、これ以下では10%弱であった(図1-2)。

研究2の結果は下記の如くであった。対象とした3群のpre-C変異の推移を図2-1に示した。HBe抗原持続陽性群では、観察開始時にほとんどの症例でPre-C変異はwildであり、その傾向は観察終了時点も同様であった。SC群は、観察開始時wild優位であったが終了時にmutant優位に変化した。HBe抗体持続陽性群では、観察開始時mutant優位であり、その傾向は観察終了時も同様であった。しかし、観察開始時wildの症例は経過観察終了時もwildである傾向がみられた。また、観察開始時mutantの症例の一部がwildにもどる変化もみられた。

対象とした3群のBCP変異の推移を図2-2に示した。3群とも観察開始時よりBCP変異がmutantである症例が多数を占めた。ただし、その程度はHBe抗原持続陽性群でやや弱かった。観察開始時BCP変異がwildの症例は、観察終了時mutantに変化する症例がどの群でも1/3~1/2にみとめられた。これに対し、観察開始時mutantの症例はそのままmutantである傾向が強かった。

HBe抗原陽性期とHBe抗体陽性期に分けて、Pre-C/BCP変異のパターン別のHBV DNA量を比較した(図2-3)。HBe抗原陽性期ではPre-C/BCP変異が共にwild症例でHBV DNA量が有意に高い傾向がみられたが、HBe抗体陽性期ではBCP変異の有無にかかわらず、Pre-C変異がmutant症例でwild症例に比較しHBV DNA量が有意に高い傾向がみられた。

同様にHBs抗原量を比較した成績を図2-4に示す。HBe抗原陽性期ではPre-C/BCP変異が共にwild症例でHBs抗原量が有意に高い傾向がみられたが、HBe抗体陽性期ではBCP変異の有無にかかわらず、Pre-C変異mutant症例でwild症例に比較しHBs抗原量が有意に高い傾向がみられた。

同様にHBcr抗原量を比較した成績を図2-5に示す。HBe抗原陽性期ではPre-C/BCP変異が共にwild症例でHBcr抗原量が有意に高い傾向がみられたが、HBe抗体陽性期では変異の有無

にかかわらず全て低値を呈した。

研究3の結果は下記の如くであった。図3-1に線維化ステージ別にみたM2BPGi値の分布を示す。F値が高くなるにつれM2BPGi値が高くなる傾向があるが、C型肝炎での成績に比較するとその傾向は明らかに弱い。これを、さらに男女別に比較したのが図3-2であるが、F値とM2BPGi値の相関は女性で強く男性で弱い傾向がみられた。

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倍して補正を行った。この補正M2BPGi値とF値との相関を男女別にみたのが図3-3であり、男女とも線維化進行に伴い補正M2BPGi値は上昇する傾向がみられた。さらに、これを男女一緒にして表示したのが図3-4であり、F値と補正M2BPGi値は補正前に比較してさらに良好な相関がみられた。表3-3は補正したM2BPGi値と他の線維化マーカーとの相関を検討した成績であるが、いずれも補正前に比較し相関はより良好であった。

D. 考察

研究1では、HBe抗原陰性慢性肝炎発症と関連する因子を明らかにするため、HBe抗体陽性のHBVキャリアを対象としてALT値の異常と関連する因子を検討した。通常、HBV DNA量がALT値と関連すると考えられているが、1ポイントの検討では両者の間に有意の関連は得られなかった。これに対し、HBcr抗原量がALT値と強い相関を示したことは興味深い。基本的に抗原量はその変化速度が遅いため、ALT値のような変動しやすい値を総合的に評価することが可能である。HBcr抗原にはHBe抗原の他にHbc抗原とp22cr抗原が含まれており、HBe抗原が陰性化した後もプレコア・コア遺伝子で作られる抗原を測定することが可能であり、これが、HBe抗原がSCした後に残存するHBVの活動性を評価するのに役立つと考えられる。

研究2では、長期経過観察したB型慢性肝炎例を対象に、Pre-C・BCP変異の推移をHBe抗原・抗体の推移との関連で検討した。さらに、これらの変異と病態との関連も解析した。

Pre-C変異とBCP変異は共にHBe抗原の産生を低下させるが、その動態は大きく異なっていた。すなわち、BCP変異はHBe抗原陽性期から高率にmutantとなり、HBe抗体陽性期になっても高率のままであった。これに対し、Pre-C変異はHBe抗原のSCと有意の関連があり、HBe抗原陽性期には低率であったものがHBe抗体陽性期には高率となった。しかし、HBe抗体陽性期になってもPre-C

変異が wild の症例が少なからず存在した点は興味深く、SC が Pre-C 変異の有無で 2 種類に分けられる可能性が示唆された。

Pre-C・BCP 変異の有無と HBV DNA 量との関連は興味深い結果であった。すなわち、HBe 抗原陽性期では、両変異とも wild の症例で、少なくともどちらか mutant の症例に比較して HBV DNA 量は有意に高い傾向がみられた。これに対し HBe 抗体陽性期では、BCP 変異の有無にかかわらず Pre-C 変異が mutant の症例で wild の症例に比較し HBV DNA 量が有意に高い傾向がみられた。同様の傾向は HBs 抗原量でも観察されており、HBV DNA での結果を裏付けるものであった。

HBe 抗原陽性期では、宿主免疫の圧力を回避するため Pre-C・BCP 変異が出現すると考えられており、強い圧力の結果、Pre-C・BCP 変異が陽性の症例でウイルス量がより低下していたと考えられた。これに対し HBe 抗体陽性期では、強い宿主免疫の圧力により、Pre-C・BCP 変異の有無にかかわらずウイルスの増殖が抑えられた中で、Pre-C 変異が mutant の症例は宿主の免疫を回避して増殖力を維持していると考えられた。この様に、HBe 抗体陽性期では Pre-C 変異の有無により病態が異なっており、この点からも Pre-C 変異の有無により SC を 2 種類に分けられることが示唆された。

研究 3 で検討した M2BPGi は糖鎖構造変化を反映するマーカーであり、肝線維化マーカーとしてはこれまでにないユニークなものである。これまで、M2BPGi の有用性は主に C 型肝炎で検討され、極めて有用であることが報告されているが、B 型肝炎での報告は少ないため今回の検討を行った。

今回、F 値と M2BPGi 値の相関は、B 型肝炎では C 型肝炎に比較して明らかに弱いことが明らかになった。この原因について解析したところ、M2BPGi の値に性差あることが明らかになった。すなわち、男性は女性に比較して M2BPGi 値が低く出る傾向がみられた。そこで、この差 (1.8 倍) を補正した補正 M2BPGi 値で検討したところ、F 値との間でさらに良い相関がみられた。

今回の検討から、B 型肝炎で M2BPGi 値を線維化マーカーとして使用する場合、性別による補正が必要であることが明らかになった。今後、補正 M2BPGi 値と予後との関連を検討することが必要である。

E. 結論

1. 研究 1 の結論

- HBeAb 陽性患者の ALT 値と HBeCrAg 量との間に強い相関がみられ、HBV DNA 量や HBs 抗原量に比較して予後予測に優れたマーカーであった。

2. 研究 2 の結論

- Pre-C・BCP 変異の観点から HBe 抗原の SC をみると、Per-C 変異が mutant となる場合と wild のままである場合の 2 種類の SC があった。
- Per-C 変異が mutant となる SC はウイルスの活動性が十分低下しない傾向にあり、HBe 抗原陰性慢性肝炎を発症する危険性があることが予測された。

3. 研究 3 の結論

- M2BPGi 値は B 型肝炎の線維化マーカーとして有用であるが、男性での値は 1.8 倍する補正が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto A, Yatsunami 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-sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res* (in press)
2. Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, Komatsu M, Tanaka E: Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion. *World J Gastroenterol* (in press)
3. Tanaka E, Matsumoto A: Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleoside/nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res* 2014; 44 (1) 1-8.
4. Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E: Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. *Hepatology Res* 2014; 44 (10) E172-180.
5. Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E: Characteristics and prediction of

hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res 44 (10) E45-53, 2014

6. Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H: Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. Hepatol Res 2013; 43: 596-604.
7. Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S. Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. J Gastroenterol 2012;47: 1006-1013.
8. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. 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 2012;42(2):139-149.

2. 学会発表

- 1) 森田進、他：HBe 抗原が陰性である慢性 B 型肝炎の発症の因子についての検討。第 48 回日本肝臓学会総会 オープンワーク ショップ 36 金沢市 2012.6
- 2) 梅村武司、他：B 型慢性肝炎患者における 血中サイトカインの網羅的検討。第 16 回 日本肝臓学会大会 神戸市 2012.10
- 3) 松本晶博、森田進、田中榮司。高感度 HBV RNA 定量系による B 型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析 (シンポジウム 4)。第 49 回日本肝臓学会総会 (東京都) 2013

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

研究1の図表

表1-1 対象としたHBe抗体陽性HBVキャリア21例の背景

年齢中央値(範囲)	67歳(44-78歳)
男性:女性	8:13例
経過観察期間中央値(範囲)	22年(15-23年)
経過中のイベント	
核酸アナログ薬投与症例	LMV: 6例、LMV+ADV: 1例
ALT >30 IU/Lとなった症例数(%)	14例(67%)
HBV DNA >4.0 log C/mlとなった症例数(%)	6例(29%)
HBcr抗原 >4.0 log U/mlとなった症例数(%)	3例(15%)
HBs抗原 > 2.9 log IU/mlとなった症例数(%)	9例(43%)
肝細胞癌発症例	1例

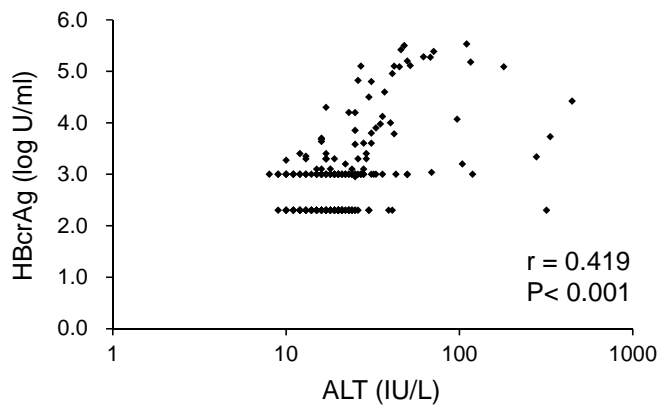


図1-1 HBeAb陽性時のALT値とHBcrAg量との相関

表1-2 ALT値が31 IU/L以上となることと関連する因子

因子	AUC	P
HBV DNA量	0.638	0.641
HBcrAg量	0.841	< 0.001
HBsAg量	0.578	0.155

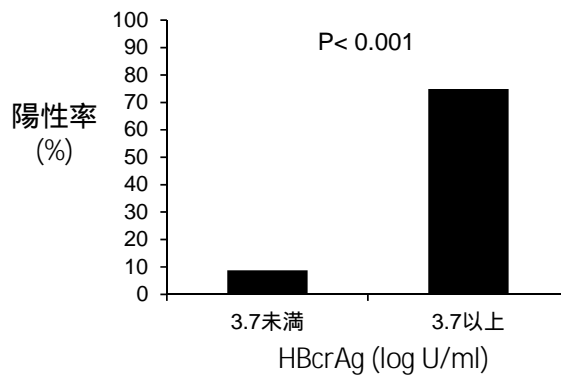


図1-2 ALT値が31 IU/L以上となる率の比較

研究2の図表

表2-1 対象とした3群の背景因子の比較

背景因子	HBe抗原 / HBe抗体 の変化			P
	HBe抗原持続陽性 (n = 18)	SC (n = 25)	HBe抗体持続陽性 (n = 43)	
年齢 (年)	44 (24 - 63)	37 (18 - 53)	51 (25 - 77)	< 0.001
性別 (男 : 女)	11 : 7	14 : 11	24 : 19	> 0.2
観察期間 (年)	6.3 (2.1 - 14.6)	10.8 (2.0 - 23.7)	8.5 (2.2 - 16.6)	0.006
遺伝子型 C	18 (100%)	25 (100%)	48 (100%)	1

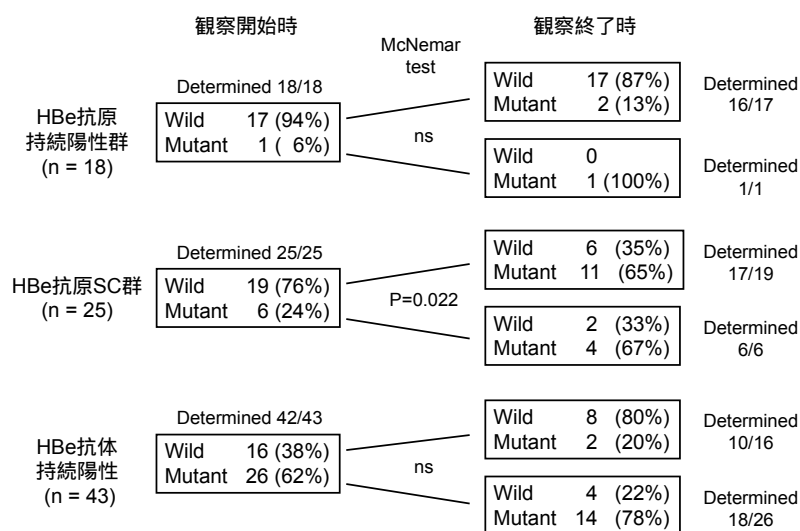


図2-1 対象とした3群におけるPre-C変異の推移

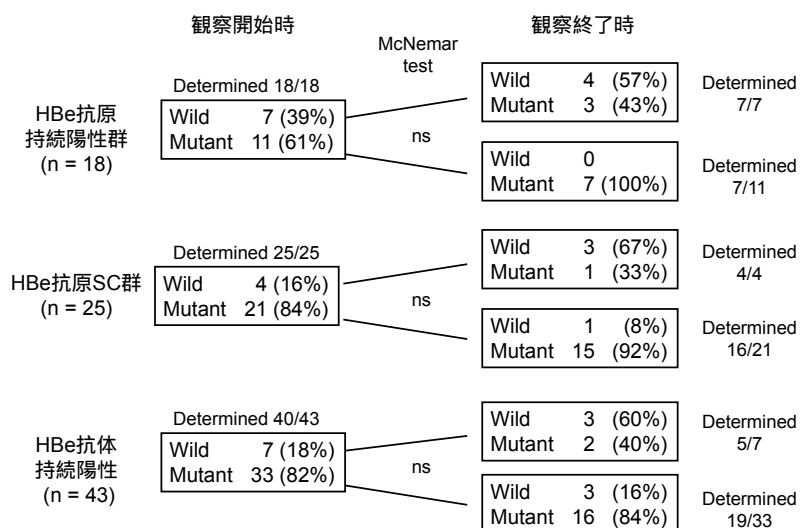


図2-2 対象とした3群におけるBCP変異の推移

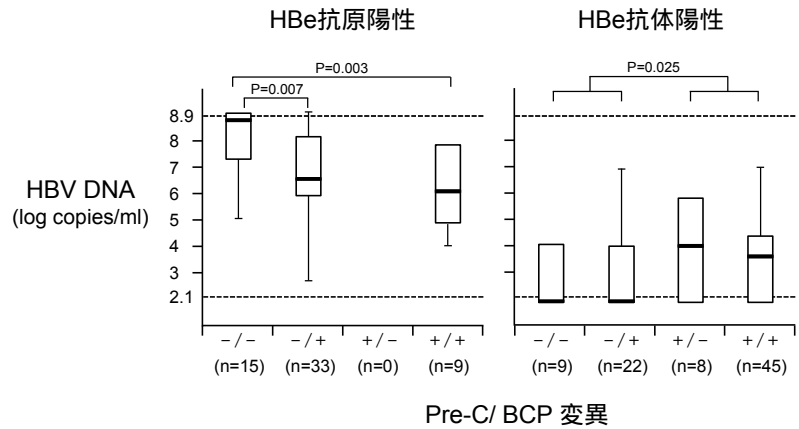


図2-3 HBe抗原、抗体別にみたPre-C/BCP変異とHBV DNA量との関連

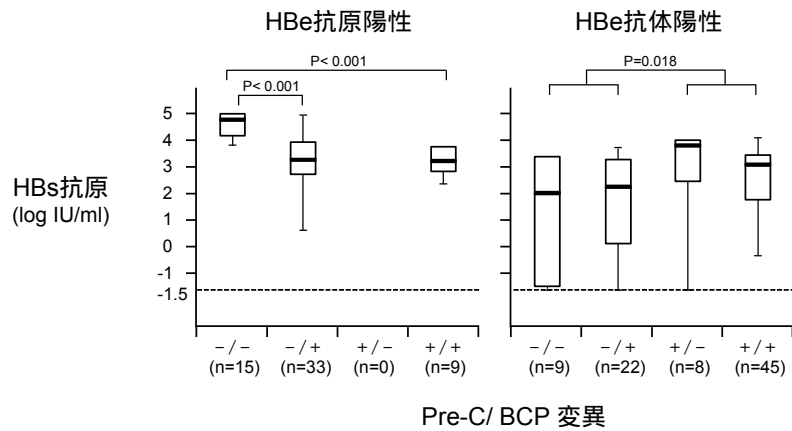


図2-4 HBe抗原、抗体別にみたPre-C/BCP変異とHBs抗原量との関連

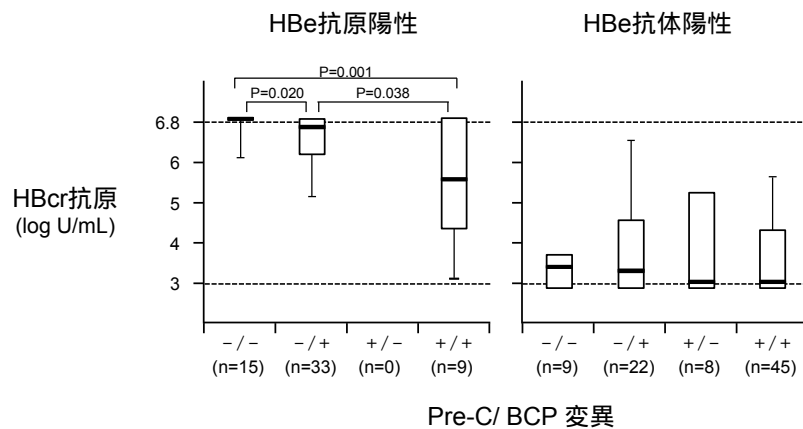


図2-5 HBe抗原、抗体別にみたPre-C/BCP変異とHBcr抗原量との関連

研究3の図表

表3-1 対象症例の背景 (n=54)

年齢 (歳) *	49 (24 - 77)
性別 (男 : 女)	29 : 25
AST (IU/L) *	39 (1 - 332)
ALT (IU/L) *	48 (5 - 610)
-GTP (IU/L) *	33 (12 - 172)
Plt (万/ μ l) *	16.0 (8.0 - 40.7)
APRI *	0.85 (0.20 - 7.05)
FIB4 *	1.5 (0.1 - 5.2)
M2BPGi (COI) *	1.12 (0.38 - 5.34)

* 中央値 (範囲)

表3-2 対象症例の肝生検所見 (n=54)

Grade		
A 0	11	(20%)
A 1	18	(33%)
A 2	23	(43%)
A 3	2	(4%)
Stage		
F 0	3	(6%)
F 1	19	(35%)
F 2	17	(31%)
F 3	10	(19%)
F 4	5	(9%)

データは症例数 (%)

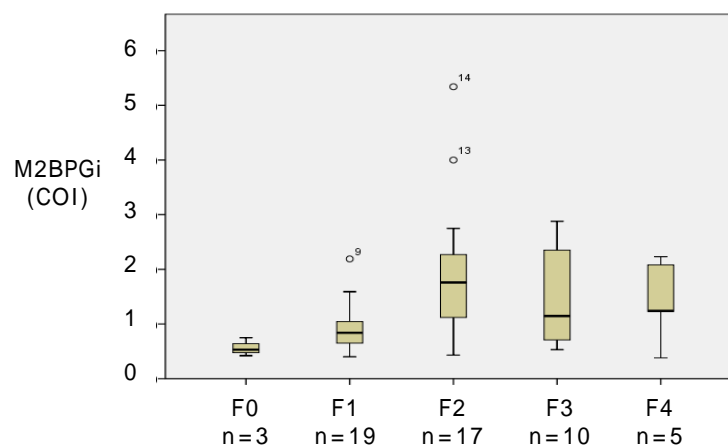


図3-1 線維化ステージ別にみたM2BPGi値の分布 (n=54)

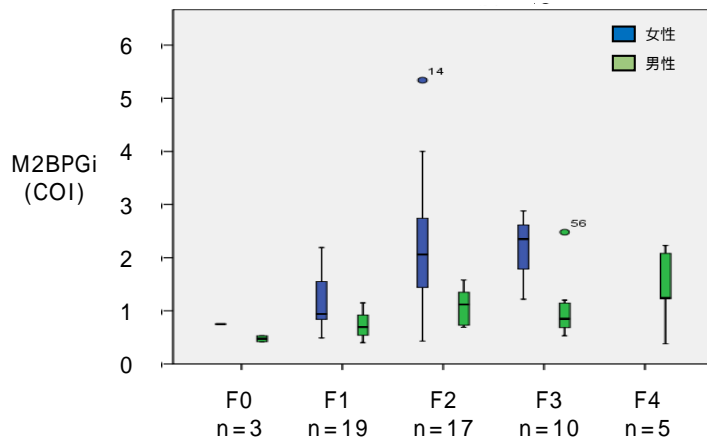


図3-2 性別、線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布 (n=54)

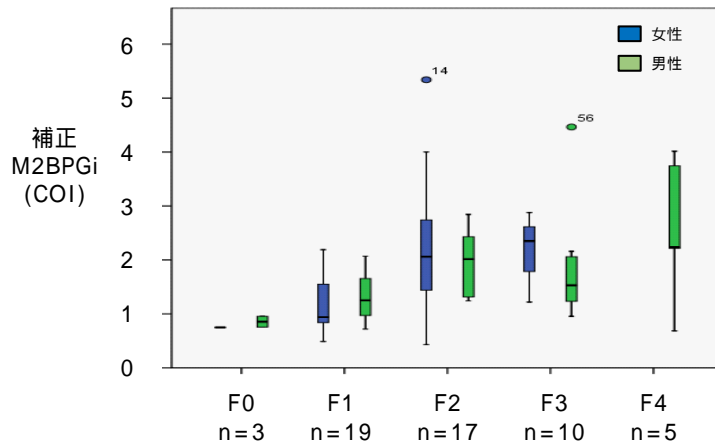


図3-3 性別、線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布。男性においてM2BPGi値を補正 (x1.8) した場合の成績 (n=54)

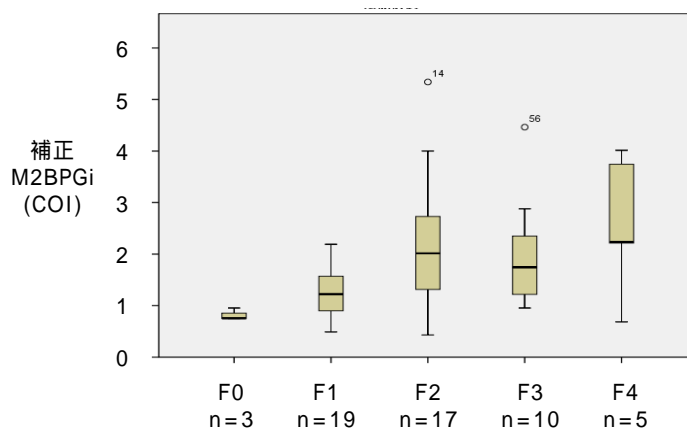


図3-4 線維化ステージ別に見たM2BPGi値の分布。男性においてM2BPGi値を補正 (x1.8) した場合の成績 (n=54)

表3-3 男性で補正したM2BPGi値と各種線維化マーカーとの相関
(n=54)

		M2BPGi	F	g-GTP	Plt	APRI	FIB4
補正M2BPGi	r	<u>0.876</u>	<u>0.440</u>	0.074	<u>-0.301</u>	<u>0.285</u>	0.259
	p	<u><0.001</u>	<u>0.001</u>	0.596	<u>0.027</u>	<u>0.037</u>	0.059

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：（お名前・ご所属・ご職名）

田中靖人 名古屋市立大学 病態医科学 教授
新海登 名古屋市立大学 消化器代謝内科学 臨床研究医

分担研究課題：HBe 抗体陽性キャリアの長期予後と HBV 関連マーカーの有用性

研究要旨：

1 年目 研究分担者(田中靖人)

1. HBeAb 陽性無症候性キャリアの実態把握のために、当院の症例を 57 例登録した
2. 肝炎データベース：HBV 配列の総エントリー数は 28,303 で、現在全長配列が 3,846 本登録されており、配列情報、付帯情報の入手が可能である。また、データベース上で BLAST search、系統樹作成も可能である。

総エントリー数 28,303		
	核酸	アミノ酸
P	3,948	3,435
PreS1	4,475	3,302
PreS2	5,754	4,565
S	10,767	7,822
PreC	4,959	2,761
C	5,509	4,548
X	4,463	3,976
ゲノム全長	3,846	

2～3 年目研究分担者（名古屋市立大学 新海登）

1. 従来法の 10 倍の感度である超高感度 HBs 抗原定量系（ルミパルス HBsAg-HQ）を臨床応用した。自然経過における従来型 HBs 抗原定量系での自然消失例において、従来の HBs 抗原定量系で測定感度未満になって以後も 1 年近く HBsAg-HQ にて HBs 抗原の検出が可能であった。
2. HBe 抗体陽性無症候性キャリアを長期に観察した。46 例の症例のうち 2 例に一過性の肝炎が観察された。観察期間中に定期的にウイルスのパラメーターとして、

観察開始時のHBコア関連抗原値 3log U/ml 未満が観察中の肝炎の予測に有用であった。

3. HBe 抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクを検討した。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%)にくらべて、低率であった。

A. 研究目的

以下の3つの検討をした。

1年目: HBe 抗原陰性症例において HBs 抗原陰性化症例の新規検査系での検討

2年目: HBe 抗原陰性症例のなかの無症候性キャリアにおける肝炎の予測

3年目: HBe 抗原陰性キャリアにおける発癌リスクの検討

B. 研究方法

1981年7月から2014年9月までに当院を受診したB型慢性肝疾患患者1057人のうちHCV, HIV, HDVの共感染と化学療法例を除き、1年以上観察し得たHBe抗原陰性患者は363人(M/F 192/171, 年齢 49.1 ± 13.1, Genotype: A/B/C/E/undetermined/NT 12/40/210/1/1/18/43, ALT 29 (4-273) U/L, Plt 18.8 ± 6.1 × 10⁴/μL, HBV DNA 4.3 ± 1.7 log copies/ml, HBcrAg 4.3 ± 1.4 log U copies/ml, HBsAg 1357.9 IU/ml (<0.05-85475), 従来型 IFN 治療歴 (+/-) 37/326, 糖尿病の合併 (+/-) 22/341, アルコール多飲 (+/-) 16/347, NA 投与 (+/-) 83/280)

このなかから本班会議に当院の症例を57例登録し、一部は肝炎データベース登録した。当院にする該当患者のデータと患者の保存血清により測定したHBcrAgや新規HBs抗原定量系(ルミパルス HBsAg-HQ)を用いて検討した。

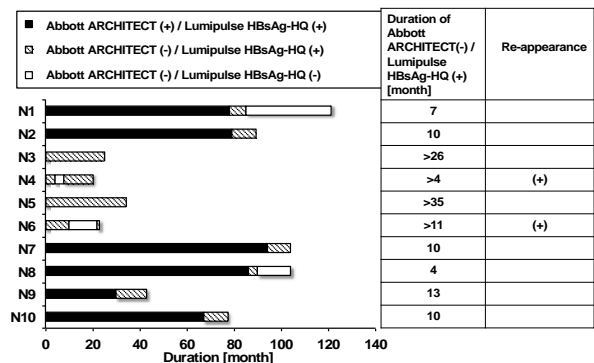
(倫理面への配慮)

名古屋市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た上で患者の同意のもと検体採取した。

C. 研究結果

1年目

従来のHBsAg定量系(当院ではアーキテクト HBsAg・HQ(以下アーキテクト))によるHBs抗原陰性化症例10例のアーキテクトとルミパルスHBsAg-HQのHBs抗原の経過を示す。



アーキテクトとルミパルス HBsAg-HQ で陽性の状態からルミパルス HBsAg-HQ のみ検出可能になり、最終的には両者とも検出感度未満となった。

アーキテクト陰性かつルミパルス HBsAg-HQ 検出可能な期間を表に示した。最低4ヶ月以上、最長で35ヶ月以上であった(中間値10ヶ月)。症例N4とN6はルミパルス HBsAg-HQ 陰性後に再出現を確認した。

ルミパルス HBsAg-HQ 最終陽性時のデータを示す。HBV DNA 検出感度未満、HBcrAg 3log IU/mL 未満 HBs 抗原 0.05mIU/ml 未満だが、ルミパルス HBsAg-HQ で測定できたものが3/10でみとめられた。1例でHBs抗体陽性かつアーキテクト陽性であった症例はSaa131Pの変異を認めた。

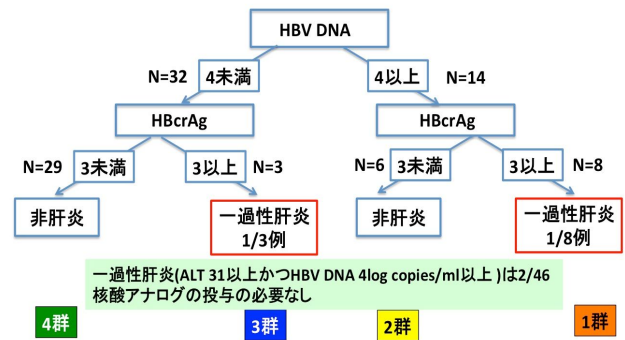
Clinical data of spontaneous HBsAg loss patients at the last time point at which HBsAg was detectable by Lumipulse HBsAg-HQ

Group	Spontaneous HBsAg loss group									
	N1	N2	N3*	N4*	N5*	N6*	N7	N8	N9	N10
Patients	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nucleotide Analogue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Age	61	54**	91**	50**	76**	63**	71**	62	62**	65**
HBsAg (+/-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abbott ARCHITECT HBsAg-QT (IU/ml)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Lumipulse HBsAg-HQ (mIU/ml)	8.0	51.0	12.0	8.9	10.4	5	5.8	20.4	11.7	30.3
HBV DNA (copies/ml)	not detected	not detected	<2.1	<2.1	2.9	2.6	<2.1	not detected	2.7	not detected
HBcrAg (Log IU/ml)	<3	3	<3	<3	3.2	<3	<3	<3	<3	<3
Anti-HBs (mIU/ml)	<10	973.8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

* Abbott ARCHITECT HBsAg-QT (IU/ml) has been already negative at first visit.

** Lumipulse HBsAg-HQ still detected values above background at the last observation time.

図2. 観察開始時のHBV, HBcrAgで4群に分けて検討



一過性肝炎(ALT 31以上かつHBV DNA 4log copies/ml以上)は2/46
核酸アナログの投与の必要なし

HBsAg 陰性化
2/30

HBsAg 陰性化
2/6

2 年目

HBe 抗体陽性無症候性キャリアは 46 人であった。46 例中 32 例が女性であった (図 1)

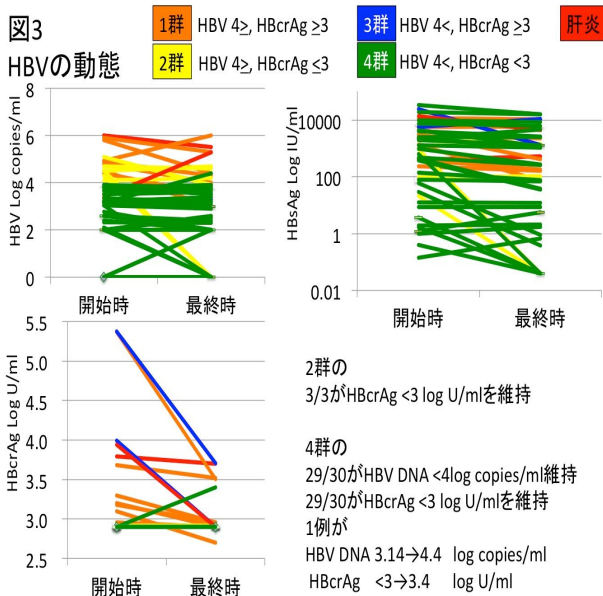
図1. 登録した当院のHBe抗体陽性無症候性キャリア

	N=46
年齢	50.9±13.8
性別 (M/F)	14/32
Genotype (A/B/C/Undetermined)	4/7/29/6
AST (U/L)	20.5±4.9
ALT (U/L)	19.0±8.1
LDH (U/L)	187±41
ALP (U/L)	196±68
γ-GTP (U/L)	18±8
WBC (/μL)	5270±1716
Hb (g/dL)	13.6±1.3
Plt (× 10 ⁴ /μL)	25±36
HBVDNA (log copies/ml)	3.4 (not detected~6)
HBcrAg (Log U/ml)	<3 (<3~5.4)
HBsAg (IU/ml)	936 (0.14~33446)
AFP (ng/ml)	3.6±3.8
観察期間(月) (肝炎が起きたら終了)	52 (7~221)

観察開始時の HBVDNA と HB コア関連抗原を測定し、それぞれの値から 4 群(1 群: HBV DNA 4 log copies/ml 以上かつ HBcrAg 3 log U/ml 以上, 2 群: HBV DNA 4 log copies/ml 以上かつ HBcrAg 3 log U/ml 未満, 3 群: HBV DNA 4 log copies /ml 未満かつ HBcrAg 3 log U/ml 以上, 4 群: HBV DNA 4 log copies/ml 未満かつ HBcrAg 3 log U/ml 未満)に分け、その後の肝炎の有無を観察した。(図 2)

46 例の経過観察期間は中間値 52 ヶ月 (7~221 ヶ月)であった。肝炎(ALT 31IU/L 以上かつ HBV DNA 4 log copies/ml 以上)は 2 例に観察された。核酸アナログやインターフェロン治療は必要なく、一過性であった。

観察開始時に HB コア関連抗原が 3 log U/ml 以上であった 1 群と 3 群に関してはそれぞれ 1/8、1/3 例で一過性の肝炎を観察した。観察開始時に HB コア関連抗原が 3 log U/ml 未満であった 2 群と 4 群に関しては肝炎を観察しなかった。またそれぞれ 2/6、2/30 例で HBs 抗原がアーキテクト HBsAg・QT にて検出感度未満になり、極めて良好な経過を示した (図 2)。また、4 群の観察開始時と観察最終時の HBV DNA、HB コア関連抗原、HBs 抗原を観察したところ、観察時 HB コア関連抗原が 3 log U/ml 未満の症例 35 例中 1 例を除いて観察時 HB コア関連抗原が 3 log U/ml 未満のままであった。この例外の 1 例は 4 群で HBV DNA も 4log copies/ml 以上に上昇していた。(図 3)。



3年目

先述した当院のHBe抗原陰性患者は363人
観察期間46(12-248)ヶ月で27例に肝発
癌がみられた。

ASC(無症候性キャリア)、CH(慢性肝炎)、
LC(肝硬変)の3群に分けて発癌率をみると、
ASCは138例中1例に肝発癌が見られたが、
CH(123例中7例)、肝硬変(42例中19例)
に比べて優位に発癌率は低かった。

また、LCでは核酸アナログ(NA)を内服して
いる症例においても肝発癌が観察された。

(図1)

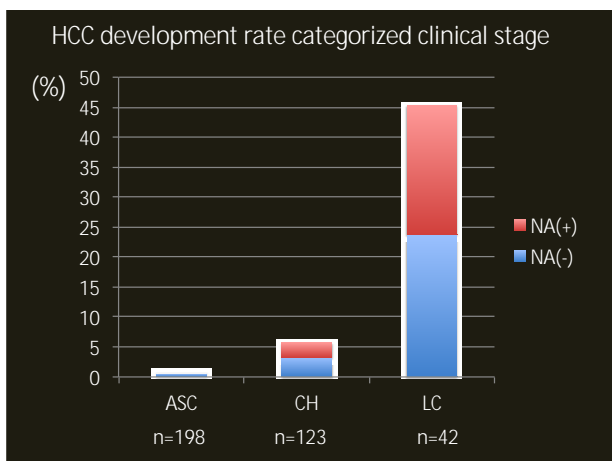


図1 臨床病期別の発癌率

肝癌群(n=27)と非肝癌群(n=336)の2群間

における、年齢、ALT、性別、Genotype、ALT、
病態、Pit、HBsAg、HBcrAg、AFP、アルコー
ル多飲、糖尿病の合併、従来型インターフ
ェロン投与歴、Fib-4 index について比較し
た結果、肝癌群では有意に男性が多く(81%
vs. 51%, $p=0.0020$)、高齢(56.7 ± 10.6 vs.
 48.4 ± 13.1 , $p=0.0012$)、LCが多く(70.3%
vs. 6.8%, $p < .0001$)、Pit 低値(12.8 ± 6.2
vs. $19.3 \pm 5.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $p < .0001$)、HBV
DNA 高値(5.8 ± 1.5 vs. 4.2 ± 1.6 log
copies/ml, $p < .0001$)、AFP 高値(24.5 vs.
 3.2 ng/ml, $p < .0001$)、Fib-4 index 高値
(5.6 ± 5.5 vs. 1.9 ± 1.8 , $p < .0001$)であっ
た。有意差はないがHBcrAgは肝癌群に高い
傾向があった(5.3 ± 2.1 vs. 4.2 ± 1.2 log
U/ml, $p=0.1343$)。Kaplan-Meier 解析では、
男性、年齢47才以上、LC、Pit 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。(図2,3,4)

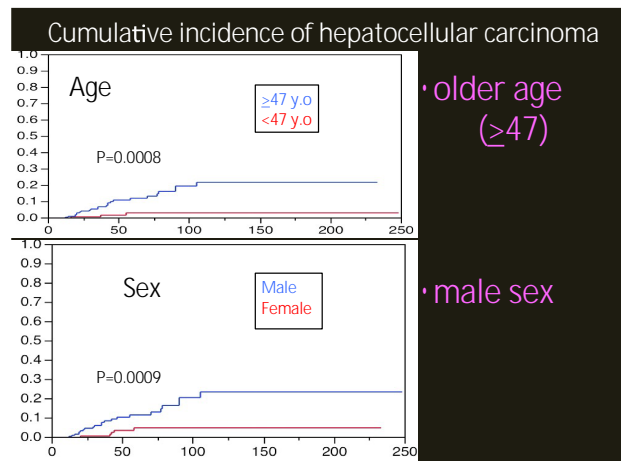


図2

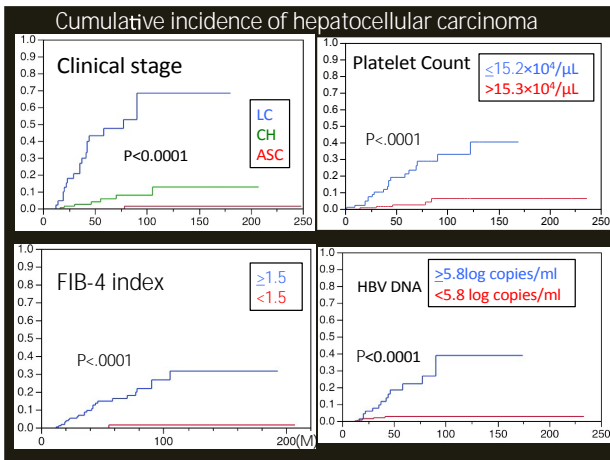


図 3

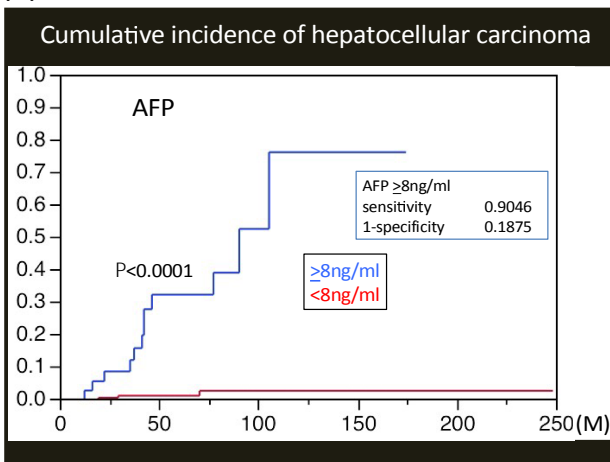


図 4

次にNA内服をしているHBe抗原陰性の慢性肝炎、肝硬変症例に限定して肝発癌リスクを検討した。対象は83例で、12例がNA内服中に肝発癌を認めた。

NA内服肝癌群(n=12)とNA内服非肝癌群(n=71)の2群を比較した結果、NA内服肝癌群では有意に男性が多く(83% vs. 52%, $p=0.0436$)、高齢(53.6 ± 6.9 vs. 48.6 ± 10.3 , $p=0.0803$)、LCが多く(75% vs. 7%, $p < .0001$)、Plt低値(10.4 ± 5.1 vs. $17.3 \pm 6.1 \times 10^4/\mu\text{L}$, $p=0.0021$)、AFP高値(24.6 vs. 4 ng/ml $p=0.0005$)、NA内服後1年後のAFP高値(7 vs. 3.2ng/ml, $p=0.0003$)、Fib-4 index高値(7.3 ± 5.5 vs. 2.7 ± 2.4 , $p=0.0002$)であった。Kaplan-Meier解析では、男性、年齢47才以上、LC、AFP 11ng/ml以上の群で、肝発癌が有意に高かった。(図

5,6)

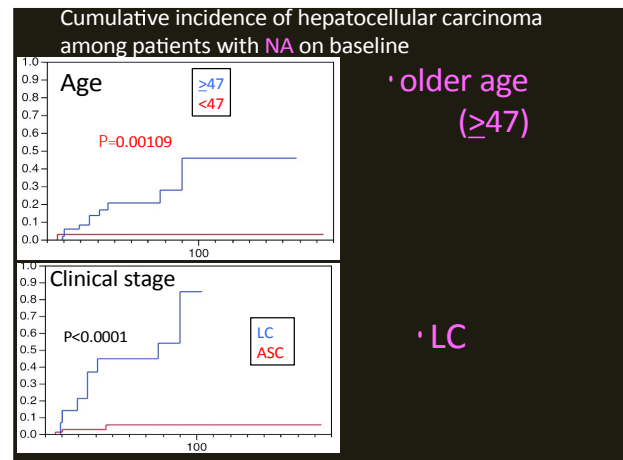


図 5

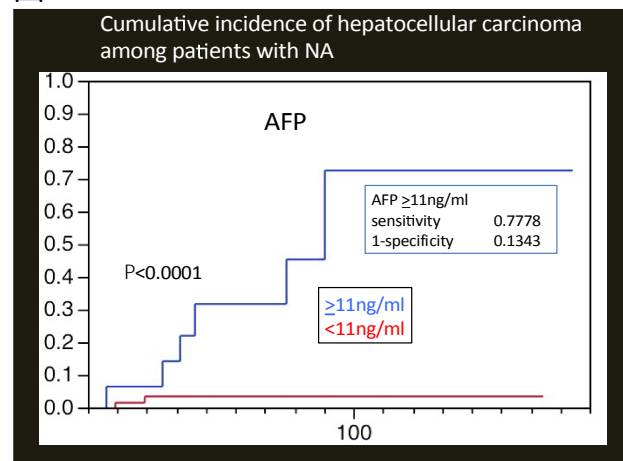


図 6

D. 考察

1年目

ルミパルス HBsAg-HQ にてアーキテクトよりも長くHBs抗原の陽性期間の観察が可能で、HBs抗原の再出現も観察できた。これは現在、社会問題となっているHBVの再活性化を観察する上で有用である可能性が示唆された。

2年目

HBV DNAは経過中に大きく変動するが、肝内のcccDNAと関連しているHBコア関連抗原(HBcrAg)に関してはその変動はHBV DNAほど大きくない。たとえHBV DNA 4 log copies/ml以上の症例であってもHBコア関連抗原が低いものは肝炎を起こす可能性は低いと思われるが、多数例において再検討を要する。

3年目

ASC の症例からは肝発癌は極めて希であった。ASC からの 1 例の発癌症例に関しては特異的なデータはなかったが、ASC からの発癌は低頻度なため、複数の施設で症例を集め検討する必要があると思われた。

E. 結論

1年目

ルミパルス HBsAg-HQ にてアーキテクトよりも長期間 HBs 抗原の陽性期間の観察が可能であった。HBV DNA 検出感度未満、HBcrAg <3、アーキテクト陰性のポイントでもルミパルス HBsAg-HQ で HBs 抗原を測定し得た。

2年目

HBcrAg が観察開始時に 3log IU/ml 未満の HBe 抗原陰性無症候性キャリアは肝炎を起こすリスクが 3log IU/ml 以上者に比べて低い可能性が有る。

3年目

肝硬変や慢性肝炎の症例から殆ど肝癌が出現していた。NA 投与においても発癌が見られるため、特に高齢男性、肝硬変、Plt 低値、AFP 高値、Fib-4 index 高値の症例を中心に慎重な観察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) Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, Mizokami M, Hou J. Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China. PLoS One. 7(6):e38241, 2012.

2) Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. J Gastroenterol.

47(12):1323-35, 2012.

3) Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 142(7):1468-75, 2012.

4) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. J Med Virol. 84(4):587-95, 2012.

5) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. Sci Rep. 3:1065, 2013.

Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, 6) Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 23(2):503-6, 2013.

7) 渡邊綱正, 菅内文中, 楠本茂, 新海登, 飯尾悦子, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 宮木知克, 野尻俊輔, 田中靖人. 多剤耐性変異を認めた悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対しテノフォビルが著効した一例. 肝臓. 2012; 53(1): 35-41.

Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg

chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3484-91.

8) Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. J Viral Hepat. 2013;20(4):e27-36.

2. 学会発表

1) Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept.22-25,2012. Oxford.

2) Iio E, Watanabe T, Tanaka Y, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.9-13,2012. Boston.

3) 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 溝上雅史. B 型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討～中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて～. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月 7 日～8 日. 石川.

4) 飯尾悦子, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸.

5) 杉山真也, 田中靖人, 中西真, 溝上雅史.

HBV 遺伝子型 D1 型に特異的なコアプロモーター変異 (G1757A/G1764T/C1766G) の機能解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 24 年 11 月 13 日～15 日. 大阪.

6) Shinkai N, Iio E, Watanabe T, Matsuura K, Endo M, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a newly - developed high sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.

7) 新海登, 松浦健太郎, 田中靖人. 当院における B 型肝炎ウイルス感染患者の HBV ジェノタイプと病態について. 第 99 回日本消化器病学会総会. 平成 25 年 3 月 21 日～23 日. 鹿児島.

8) 新海登, 松浦健太郎, 田中靖人. B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ著効例における肝発癌リスクの検討 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 30 日 東京

9) 新海登 飯尾悦子 田中靖人 HBe 抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討 第 18 回肝臓学会大会 2014 年 10 月 23 日

10) High alpha-fetoprotein is risk factor of hepatocellular carcinoma in hepatitis B patients with good efficacy of nucleoside analogues therapy. Noboru Shinkai, Etsuko Iio, Tsunamasa Watanabe, Kentaro Matsuura, Kei Fujiwara, Shunsuke Nojiri, Yasuhito Tanaka. AASLD 2014 Boston, MA 2014.11.11

H. 知的所得権の出願・登録状況

なし

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：氏名 柘植雅貴 所属 広島大学自然科学研究支援開発センター・助教

分担研究課題：当院における HBsAg 消失例の検討

研究要旨：HBV無症候性キャリアの中には、自然経過もしくは治療中にHBs抗原が消失する症例が散見されるものの、その臨床的な特徴については明らかとなっていない。本研究では、当院通院中のHBVキャリア1,746例を対象に、HBs抗原消失例の臨床的特徴について検討した。解析対象症例におけるHBs抗原累積陰性化率は5年 2.2%、10年 6.2%、15年 9.6%だった。HBs抗原消失に寄与する因子を多変量解析にて検討したところ、HBV genotype A感染が有意な因子として抽出された（ $P=0.001$ 、HR 3.731 (1.655 - 8.405)）。近年、HBV genotype A感染例は増加傾向にあるが、国内におけるHBVキャリアの大部分はHBV genotype C感染例であることを考慮し、genotype C感染例に絞り、解析した。HBV genotype C持続感染667例について、HBsAg陰性化に寄与する因子を多変量解析した結果、HBeAg陰性、HCC非合併が有意な因子として抽出された（ $P=0.005$ 、 $P=0.018$ ）。さらに、治療介入例のみで解析したところ、インターフェロン単独療法例においてHBsAg累積陰性化率が高い傾向を認めた。B型慢性肝疾患のコントロールは改善しているものの、治療介入による十分なHBsAg陰性化率向上には至っておらず、より効果的な治療法の構築が期待される。

A. 研究目的

HBV 無症候性キャリアの中には、経過中に肝炎を発症し、治療介入が必要となる症例も散見される。しかしながら、治療介入が必要となる症例を早期に見出すための指標は確立されておらず、B 型慢性肝疾患診療における課題の一つである。また、このような無症候性キャリアの中には、長期的な経過観察中もしくは治療中にHBs抗原が自然消失する症例も散見される。

近年、日本肝臓学会より推奨されているB 型肝炎治療ガイドラインにおいてもHBs抗原陰性化は治療の最終目標とされ、核酸アナログ製剤やインターフェロン製剤を用いて、いかに早期にHBs抗原の消失を誘導するかについての議論がなされている。

このような背景から、本研究では、当院通院中のHBVキャリアのうち、経過中にHBs抗原が自然消失した症例を解析し、

HBV キャリアの中から、将来的に、治療介入の必要性が低く、発癌や肝炎発症の可能性が低い患者群を抽出可能か否かについて検討した。

B. 研究方法

対象は、当院に通院中のHBVキャリア1,746例。観察期間の中央値は18か月。HBs抗原消失をエンドポイントとし、解析可能症例について、HBs抗原陰性化と臨床背景との関連性を解析した。

（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（第疫-726号）。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

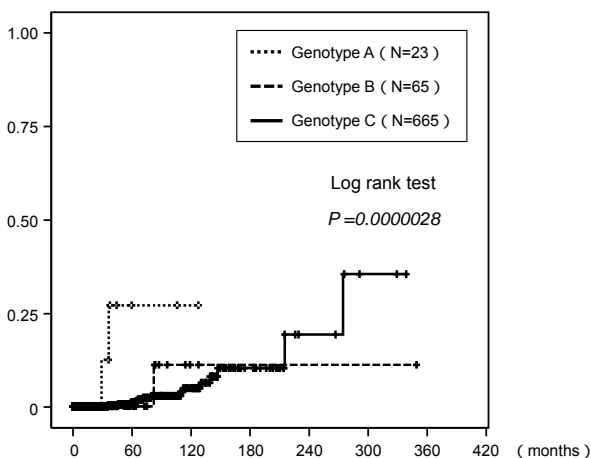
検討 1. HBs 抗原陰性化に寄与する因子の解析

解析対象全症例を対象に、HBs 抗原陰性化に寄与する因子を解析した。解析対象 1,746 例中、解析時に HBs 抗原陰性化が確認できた症例は 32 例。そのうち、HBs 抗原の変化が解析可能であった 25 症例について、臨床背景および特徴を解析した。HBs 抗原消失 25 例の臨床背景は、年齢の中央値が 43 歳 (24 - 68 歳) で、男女比が 18 : 7。25 例中自然経過において HBs 抗原の消失が認められたのは、7 例だった。HBs 抗原の累積消失率を検討した結果、5 年 2.2%、10 年 6.2%、15 年 9.6%であった。HBs 抗原消失に寄与する因子について検討を行った結果、HBe 抗原、HBV genotype が有意な因子として抽出され、多変量解析では、HBV genotype が独立因子として抽出された (P=0.001、HR=3.731) (表 1)。

表 1. HBsAg消失に関する因子の検討

Factors	単変量	多変量	
	P value	P value	HR (95% CI)
年齢 (50歳未満 vs 50歳以上)	0.925		
HCC (無 vs 有)	0.112		
HBV DNA (5.0 Log未満 vs 5.0 Log以上)	0.349		
HBeAg (無 vs 有)	0.040		
HBV genotype (A vs non-A)	0.009	0.001	3.731 (1.655 - 8.405)
LC (無 vs 有)	0.951		
核酸アナログ治療歴 (無 vs 有)	0.542		
NAs治療歴 (無 vs 有)	0.276		

図 1. HBV genotypeによるHBsAgの累積陰性化率の比較 (N=753)



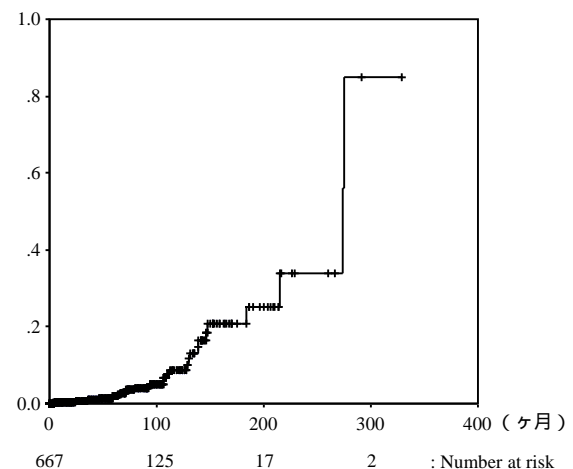
そこで、HBV genotype ごとの HBs 抗原の累積陰性化率を比較したところ、HBV genotype A において、累積陰性化率が有意に高い結果となった (図 1)。

検討 2. HBV genotype C 持続感染例における HBs 抗原陰性化に寄与する因子の検討

検討 1 から、HBV genotype が HBs 抗原の累積陰性化に強く関与していることが示されたが、本邦の HBV 持続感染例の多くは HBV genotype C 感染例であることを考慮し、HBV genotype C 感染 667 例を抽出し、臨床データを再収集した後、解析を行った。

経過中に HBs 抗原陰性化を 29 例に認め、HBs 抗原陰性化時の年齢は中央値で 54 歳だった。HBs 抗原の累積陰性化率は、5 年 1.8%、10 年 8.4%、15 年 18.9%であり、年率 0.8 ~ 1.2% だった (図 2)。

図 2. HBsAgの累積陰性化率 (N=667)



臨床背景を元に、HBsAg 陰性化に寄与する因子について、統計学的解析を行った。単変量解析では、年齢、AST 値、HBeAg 陰性、肝硬変非合併、肝癌非合併が有意な因子として抽出され、多変量解析の結果、HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な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 (表 2)。

治療介入による因子が抽出されなかった理由として、治療介入例と非介入例における臨床背景が異なる可能性が考えられた。そこで、治療介入例・非介入例に分けて解析を行った。治療非介入 218 例では、いず

れの臨床背景においても有意な差が認めら

表2. HBsAg消失に關する因子の検討

Factors	多変量	
	P value	HR (95% CI)
性別 (男 vs 女)	0.9398	
年齢 (55歳未満 vs 55歳以上)	0.0475	
AST (40未満 vs 40以上)	0.0442	
ALT (42未満 vs 42以上)	0.2831	
PLT (18万未満 vs 18万以上)	0.1637	
HBV DNA (5.0 Log未満 vs 5.0 Log以上)	0.4903	
HBeAg (無 vs 有)	0.0022	0.005 0.241 (0.090-0.649)
LC (無 vs 有)	0.0287	
HCC (無 vs 有)	0.0012	0.018 0.161 (0.036-0.730)
線維化別 (F1,2 vs F3,4)	0.8060	
Treatment (none/NA/IFN/NA+IFN)	0.3695	

れず、自然経過における HBsAg 陰性化の予測因子は抽出できなかった。

一方、治療介入 449 例における解析では、HBeAg 陰性であること、インターフェロン単独療法歴があることが、有意な因子として抽出され (表 3) 実際に各因子別の累積陰性化率を比較すると、HBeAg 陰性で有意に高率であり、インターフェロン単独療法歴がある症例においても高い傾向が認められた (図 3)。

D. 考察

核酸アナログやインターフェロンなどの抗ウイルス薬の進歩に伴い、B 型慢性肝炎のコントロールは改善している。さらに、近年、インターフェロン治療による HBs 抗原の低下・陰性化例の報告が散見されることから、治療介入による HBs 抗原消失率の向上が期待された。しかしながら、本研究結果では、HBs 抗原累積消失率は、全症例を対象とした解析で、5 年 2.2%、10 年

持続感染例に限っても、5 年 1.8%、10 年 8.4%、15 年 18.9%という結果であり、いずれの解析においても HBsAg 陰性化は年率 0.6~1.2%となり、Chu らによる報告 (JAMA, 2007) とほぼ同程度の結果となった。これらの結果は、インターフェロン治療例の多くが、従来型のインターフェロンを使用されていること、ペグインターフェロン治療後の観察期間が短いことも影響していると考えられるが、いずれにしても、現行の抗ウイルス療法が、強力にウイルス増殖を抑制する一方で、感染肝細胞内の cccDNA 等への影響は不十分であることを示唆しているものと考えられる。つまり、現在の B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法では、根治的な作用は期待し難く、今後は、肝細胞内に存在する cccDNA の減少をターゲットとした治療法の開発が必要と考えられた。

HBV genotype 別に HBs 抗原の陰性化率を検討した場合、最も感染者の多い HBV genotype C 感染例において HBs 抗原消失率は最も低い結果となった (P=0.0000028)。つまり、感染している HBV の genotype が HBs 抗原消失には強く関連している結果であり、検討 1 の結果では、本邦において B 型慢性肝疾患例の 90%以上を占める HBV genotype C 症例における HBs 抗原陰性化を予測することは困難と考えられた。そこで、検討 2 では、HBV genotype C 感染例に限定し、HBs 抗原陰性化に關する因子の抽出を試みた。その結果、HBeAg 陰性、HCC 非合併が有意な因子として抽出されたものの (P=0.005、P=0.018) 臨床検査値や治療因子は有意な因子として抽出されなかった (表 2)。

本検討では、初診時もしくは経過中の検査結果から、HBs 抗原の将来的な陰性化を予測する目的で行ったが、B 型慢性肝疾患の臨床経過は多彩であり、経過中のある時点のみを解析するだけでは、予後を予測することは困難であった。今後は、各症例の臨床経過を踏まえた上で、HBs 抗原低下・陰性化を予測していくことが HBs 抗原陰性化の臨床マーカーを探索する上で重要であ

図3. 治療介入群における各因子別のHBsAgの累積陰性化率の比較 (HBV genotype C, N=449)

Factors	Category	HBs抗原陰性化例 (n=19)	HBs抗原非陰性化例 (n=430)	P value
観察開始時の年齢 (歳)	60未満 / 以上	14 / 5	282 / 148	0.777
性別	男性 / 女性	13 / 6	295 / 135	1.00
HBe抗原	陽性 / 陰性	5 / 14	182 / 221	0.018
HBV DNA (Log/ml)	5未満 / 5以上	7 / 12	147 / 260	1.00
AST (IU/L)	33未満 / 以上	11 / 8	168 / 247	0.201
ALT (IU/L)	42未満 / 以上	9 / 10	160 / 255	0.476
Platelet (x10 ⁴ / μl)	18未満 / 以上	9 / 10	273 / 141	0.137
肝硬変	無 / 有	17 / 1	289 / 120	0.030
肝細胞癌	無 / 有	17 / 1	270 / 159	0.003
核酸アナログ治療	単独治療 / その他	7 / 12	252 / 178	0.094
インターフェロン治療	単独治療 / その他	7 / 12	56 / 374	0.010

6.2%、15 年 9.6%であり、HBV genotype C

ると考えられる。

E. 結論

当院通院中の HBV キャリアにおける HBs 抗原の累積陰性化率を検討した。HBs 抗原陰性化には、HBV genotype が大きく影響しており、日本において大部分を占める HBV genotype C 持続感染例では他の genotype に比して、陰性化率は低かった。また、HBV genotype C 持続感染例における検討では、HBs 抗原陰性化に HBe 抗原陰性であることとともにインターフェロン治療歴の関連性が示唆されたが、十分な陰性化率向上は認められず、今後、治療介入による HBs 抗原陰性化率向上に向けた工夫が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清および臨床検査成績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, Yatsunashi 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- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*, *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*, *in press*.
- 3) 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*, 21(9), e89-97, 2014.
- 4) 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*, *in press*.
- 5) Kosaka K., Hiraga N., Imamura M., Yoshimi S., Murakami E., Nakahara T., Honda Y., Ono A., Kawaoka T., Tsuge M., Abe H., Hayes C.N., Miki D., Aikata H., Ochi H., Ishida Y., Tateno C., Yoshizato K., Sasaki T. and Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*, 441(1), 230-5, 2013.
 - 6) 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 hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study. *Int J Cancer*, 134(1), 154-63, 2013.
 - 7) Tsuge M. and Chayama K. Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*, 48(6), 779-80, 2013.
 - 8) Arataki K., Hayes C.N., Akamatsu S., Akiyama R., Abe H., Tsuge M., Miki D., Ochi H., Hiraga N., Imamura M., Takahashi S., Aikata H., Kawaoka T., Kawakami H., Ohishi W. and Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 85(5), 789-98, 2013.
 - 9) 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*, 48(10), 1188-204, 2013.
 - 10) 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.

- 11) 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. *Hepatology*, 56(2), 555-66, 2012.
- 12) 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 2014 消化器, 中外医学社, 104-111, 2014.
- 13) 柘植雅貴, 茶山一彰, 「HBVの感染実験系」, *Hepatology Practice* 第1巻 B型肝炎の診療を極める, 文光堂, 185-192, 2013.
- 14) 柘植雅貴, 茶山一彰, 「B型肝炎、D型肝炎」, カラー版 消化器病学, 西村書店, 1150-1155, 2013.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) 回日本肝臓学会大会 シンポジウム
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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroku 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 11th JSH Single Topic Conference ポスター
- 9) 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 11th JSH Single Topic Conference ポスター
- 10) 村上英介、柘植雅貴、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果と Genotype による相違の検討」第 99 回日本消化器病学会総会、一般演題
- 11) 柘植雅貴、高橋祥一、茶山一彰「HBV 感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」第 49 回日本肝臓学会総会 シンポジウム
- 12) 村上英介、柘植雅貴、平賀伸彦、阿部弘美、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果の検討」第 49 回日本肝臓学会総会 一般演題
- 13) 柘植 雅貴、村上英介、平賀 伸彦、阿部弘美、今村 道雄、茶山 一彰「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討と genotype による相違」第 9 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
- 14) 柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、越智秀典、高橋祥一、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV・HCV 感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子発現変化の解析」第 50 回日本臨床分子医学会 ポスター
- 15) 柘植 雅貴、村上英介、茶山一彰「薬剤耐性 HBV に対するテノホビルの抗ウイルス効果と genotype による相違」第 17 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション
- 16) 村上英介、柘植雅貴、菅 宏美、藤野初江、小林知樹、福原崇之、柁木慶一、大野敦司、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、占部綾子、横山聡栄、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における核酸アナログ製剤の治療効果の解析」第 17 回日本肝臓学会大会 ポスター
- 17) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroyuki Ginba, Kazuhiro Matsuyama, 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. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 18) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ohno, Takashi Nakahara, Daiki Miki, Hiromi Abe, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama. Antiviral effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones and different susceptibility between HBV genotype A and C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 19) Nami Mori, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Th1/2 ratio was associated with anti-viral effects of sequential therapy with lamivudine and interferon- α in HBe antigen-positive chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 20) 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, Taipei
- 21) 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), Taipei, ポスター
- 22) 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、東京、2012
- 23) 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、金沢、2012
- 24) 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、広島、2012
- 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)
平成 24～26 年度分担研究報告書
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

研究分担者: 吉岡健太郎・藤田保健衛生大学 肝胆膵内科・教授

分担研究課題: e抗体陽性無症候性キャリアの s 抗原陰性化と肝発癌に關与する因子の検討

研究要旨: HBe 抗体陽性の無症候性 B 型肝炎ウイルス(HBV)キャリアの大部分は治療を受けず、経過観察もされず放置されているが、少数ながらも発癌する症例がある。HBe 抗体陽性無症候性キャリアからの肝発癌リスク因子を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關与する因子を肝硬度を含めて検討した。HBs 抗原陰性化には、ヒアルロン酸高値、男性、 γ -GTP 高値が關与しており、肝発癌には白血球数低値が關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肝硬度測定法である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)は単変量解析では、肝発癌との關係が示されたが、多変量解析では選択されなかった。症例数が少ないので、今後症例を増やして検討する必要がある。

A. 研究目的

HBe 抗体陽性の無症候性 B 型肝炎ウイルス(HBV)キャリアの大部分は治療を受けず、経過観察もされず放置されている。

しかし Liaw らは、HBV キャリアからの肝癌の発症の 64%が HBe 抗体陽性患者から起こることを報告している(Liaw YF, et.al. J Med Virol 1984;13:385)。また HBe 抗体陽性の無症候性キャリアからも少数ではあるが肝癌を発症する。

HBV キャリアからの肝発癌の予測因子として、Lee らは年齢、性別、genotype、HBe 抗原の状態、ALT 値、HBs 抗原量、HBVDNA 量が重要であることを報告している(Lee MH, et al. Hepatology 2013;58:546)。HBe 抗体陽性無症候性キャリアからの肝発癌のリスク因子を検討した報告はない。

Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)を用いた肝硬度測定は、超音波により直接肝臓

の硬さを評価する技術であり、肝線維化 stage の評価に有用な方法として確立されつつある。HBe 抗体陽性の無症候性キャリアにおいて、侵襲的な肝生検により肝線維化 stage 評価を行うことは困難であるが、ARFI を用いて肝硬度を測定することにより、非侵襲的に肝線維化 stage 評価を行うことは可能である。

本研究では HBe 抗体陽性の無症候性キャリアの HBs 抗原陰性化と肝発癌に關与する因子を肝硬度を含めて検討した。

B. 研究方法

(1)対象及び方法

藤田保健衛生大学病院肝胆膵内科に 2008 年 1 月から 2012 年 12 月までに通院している HBe 抗体陽性無症候性キャリア 108 例を対象とした。HBs 抗原陰性化、肝発癌に肝硬度を含めた各種検査成績が關連するかどうかを検討した。

ARFI の測定は、シーメンス・ジャパン株式会社製超音波診断装置 ACUSON S2000 を用いて行った。右肋間走査にて計 10 回行い、中央値を測定値 (Vs; m/sec) として用いた。

(倫理面への配慮)

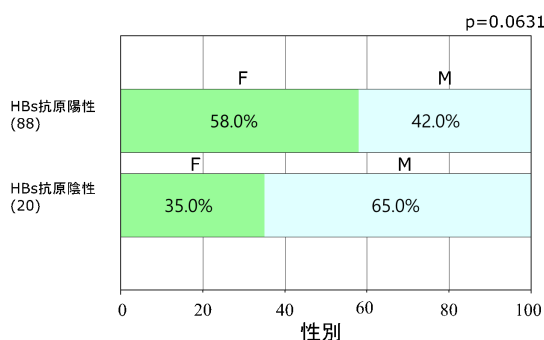
本研究では医療保険の適応が認められている範囲で治療が行われた。ARFI は非侵襲的に肝硬度を測定でき、患者に苦痛や健康被害をきたすものではない。また患者の個人情報の守秘については十分な注意を払った。

C. 研究結果

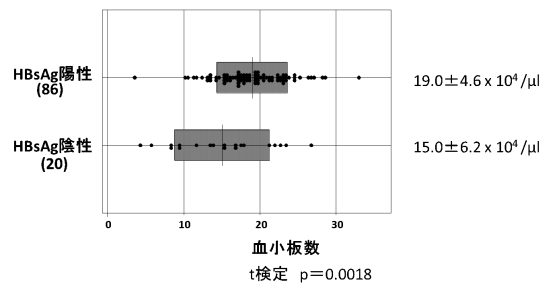
(1) HBs 抗原陰性化に關与する因子

HBs 抗原陰性化した 20 例は、陰性化していない 88 例に比較して、単変量解析にて HBs 抗原陰性化には、性別、年齢、US での肝硬変の有無、 γ -GTP 値、ALP 値、血小板数、ヒアルロン酸値が関連していた。肝硬度は HBs 抗原陰性化と関連していなかった。性別、年齢、US での肝硬変の有無、 γ -GTP 値、ALP 値、血小板数、ヒアルロン酸値について多変量解析をするとヒアルロン酸値 ($p=0.0041$)、性別 ($p=0.0442$)、 γ -GTP 値 ($p=0.0986$) が選択された。

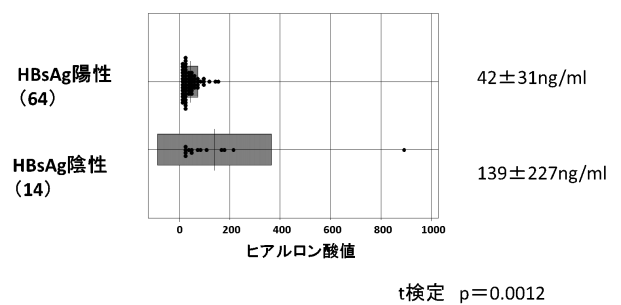
HBs 抗原陰性化と性別との関係



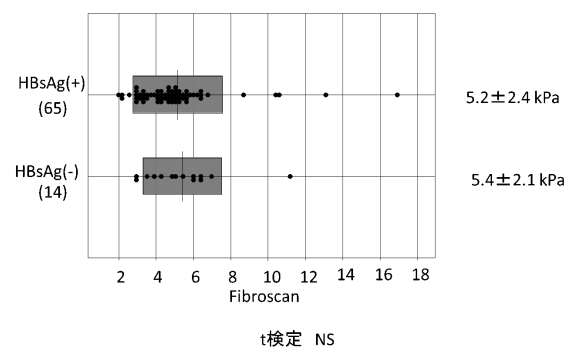
HBs 抗原陰性化と血小板数との関係



HBs 抗原陰性化とヒアルロン酸との関係



HBs 抗原陰性化と肝硬度との関係



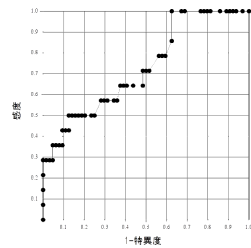
HBs 抗原陰性化と関連する因子の多変量解析

性別、年齢、USでの肝硬変の有無、 γ -GTP値、ALP値、血小板数、ヒアルロン酸値について検討した。

	P	Odds ratio	95% CI
ヒアルロン酸	0.0041	1.02	1.01 ~ 1.04
性別 (男)	0.0442	4.50	1.04 ~ 19.50
γ -GTP	0.0986	0.98	0.96 ~ 1.00

HBs抗原陰性化とヒアルロン酸との関係 ROC解析

HBsAg陽性
Cutoff値 76ng/ml
AUROC 0.730
Sensitivity 0.500
Specificity 0.875
Positive predictive value 0.467
Negative predictive value 0.889
Likelihood ratio 4.0
Odds ratio 7.0

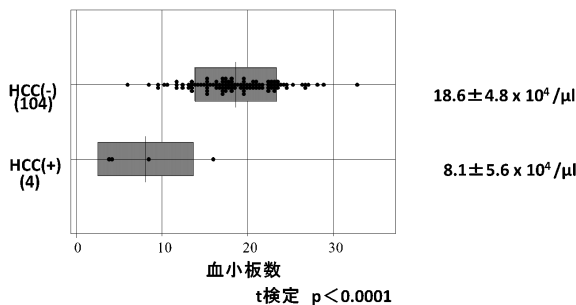


HBs抗原陰性化に関するヒアルロン酸のカットオフ値は 76ng/mL であった。

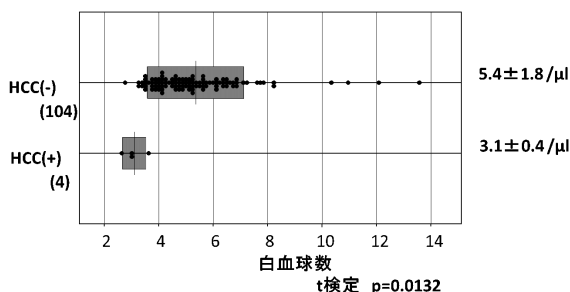
(2)肝発癌に關与する因子

肝発癌した症例は 4 例しかなかった。単変量解析にて ARFI、US での肝硬変の有無、ALP 値、白血球数、血小板数、HBV コア関連抗原、HBe 抗体が関連していた。多変量解析をすると白血球数のみが選択された(p=0.0112)。

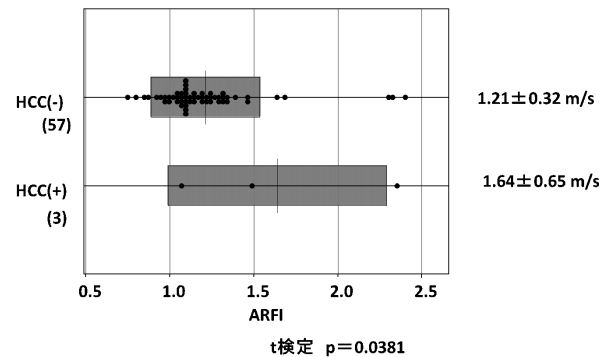
肝癌と血小板数との関係



肝癌と白血球数との関係



肝癌と肝硬度との関係



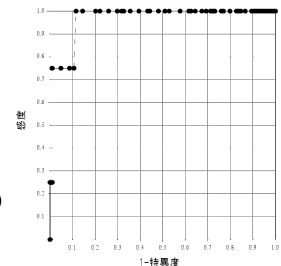
肝癌と関連する因子の多変量解析

ARFI、USでの肝硬変の有無、ALP値、白血球数、血小板数、HBVコア関連抗原、Hbe抗体について検討した。

	P	Odds ratio	95% CI
白血球数	0.0124	0.0112	0.0003 ~ 0.3781

肝癌の有無とWBCとの関係 ROC解析

肝癌あり
Cutoff値 3800/μl
AUROC 0.968
Sensitivity 1.000
Specificity 0.885
Positive predictive value 0.250
Negative predictive value 1.000
Likelihood ratio 8.7



肝発癌に關する白血球数のカットオフ値は 3800/μL であった。

D. 考察

108 例の HBe 抗体陽性無症候性キャリアの検討において、単変量解析にて HBs 抗原陰性化には、性別、年齢、US での肝硬変の有無、γ-GTP 値、ALP 値、血小板数、ヒアルロン酸値が関連しており、多変量解析ではヒアルロン酸

値、性別、 γ -GTP 値が選択された。男性や線維化が進行した症例において HBs 抗原が陰性化しやすいと考えられた。

肝発癌した症例は 4 例しかなかったので、十分な解析は困難であった。しかしその中での検討では、肝発癌には単変量解析にて ARFI、US での肝硬変の有無、ALP 値、白血球数、血小板数、HBV コア関連抗原、HBe 抗体が関連しており、多変量解析では白血球数のみが選択された。

ARFI は BMI と、Fibroscan は身長と GTP と関連していたが、両者とも他の線維化マーカーと有意な相関は示さなかった。

ヒアルロン酸も白血球数とともに肝線維化と関係している因子であるが、肝線維化と関係していると考えられる肝硬度は肝発癌とのみ関係していた。

E. 結論

HBe 抗体陽性の無症候性キャリアでは、男性、ヒアルロン酸高値例で HBs 抗原陰性化が期待できるが、白血球数が少ないほど肝発癌のリスクが高いので注意深い経過観察が必要である。

発癌症例が少ないので、今後症例を増やして検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakaoka K, Hashimoto S, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Takagawa Y, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Nishikawa T, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K.

PNPLA3 I148M associations with liver carcinogenesis in Japanese chronic hepatitis C patients. SpringerPlus. 2015;4(1):83

2. Yoshioka K, Hashimoto S, Kawabe N. Measurement of liver stiffness as a non-invasive method for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2015;45(2):142-51
3. Ichino N, Osakabe K, Sugimoto K, Suzuki K, Yamada H, Takai H, Sugiyama H, Yukitake J, Inoue T, Ohashi K, Hata H, Hamajima N, Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Yoshioka K. The NAFLD Index: A Simple and Accurate Screening Tool for the Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Rinsho Byori. 2015;63(1):32-43
4. Honda T, Ishigami M, Masuda H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Katano Y, Goto H. Effect of peginterferon alfa-2b and ribavirin on hepatocellular carcinoma prevention in older patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(2):321-8
5. Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B polymorphism and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with interferon responsiveness. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(1):178-83

6. Shakado S, Sakisaka S, Okanou T, Chayama K, Izumi N, Toyoda J, Tanaka E, Ido A, Takehara T, Yoshioka K, Hiasa Y, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Kumada H. Interleukin 28B polymorphism predicts interferon plus ribavirin treatment outcome in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis: A multicenter retrospective study in Japan. *Hepatol Res.* 2014;44(9):983-92
7. Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Muraio M, Nakano T, Mizuno Y, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Takagawa Y, Ohki M, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K. Factors correlating with acoustic radiation force impulse elastography in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2014;20(5):1289-97
8. 川部直人、吉岡健太郎. エラストグラフィ. 榎本信幸、竹原徹郎、持田智編、*Hepatology Practice Vol.3 C型肝炎の診療を極める 基本から最前線まで*、文光堂 東京 2014:73-79
9. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、福井愛子、吉岡健太郎. C型肝炎治療困難例に対する瀉血療法、IFN-療法、脾摘/PSE 後の Peg-IFN 療法の検討. *消化器内科* 2014;58(3):405-412
10. 吉岡健太郎. 急性肝炎; *臨床雑誌内科* 6 増大号 2014; 113(6):1074-5
11. 吉岡健太郎. ChallengeQUIZ 貴方も名医; *CLINIC magazine* 2014;540(6):37,68-9
12. 高川友花、川部直人、橋本千樹、原田雅生、村尾道人、新田佳史、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、吉岡健太郎. C型肝炎に合併した多発肝 MALT リンパ腫の1例. *肝臓* 2014;55(5):274-283
13. Yoshioka K. What is the benefit of computer-assisted image analysis of liver fibrosis area? *Journal of gastroenterology* 2013; **48**(8):996-997
14. Yoshioka K. How to adjust the inflammation-induced overestimation of liver fibrosis using transient elastography? *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2013; **43**(2):182-184
15. Hayashi K, Katano Y, Masuda H, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Pegylated interferon monotherapy in patients with chronic hepatitis C with low viremia and its relationship to mutations in the NS5A region and the single nucleotide polymorphism of interleukin-28B. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2013;
16. 中野若香菜、池夏希、石渡朝子、伊藤広子、菱田麻由佳、伊藤志歩、花下順子、池田綾子、原田雅生、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎. C型肝炎患者に対する分岐鎖アミノ酸製剤による late evening snack を含む栄養管理の長期効果. *栄養評価と治療*

2012;29(4):357-363.

17. Yoshioka K, Hashimoto S. Can non-invasive assessment of liver fibrosis replace liver biopsy? *Hepatol Res* 2012;42(3):233-40.
 18. Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami Nakano M, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. *J Med Virol* 2012;84(3):438-44.
2. 学会発表
1. Kawabe N, Osakabe K, Hashimoto S, Murao M, Nitta Y, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Ohki M, Takagawa Y, Kurashita T, Matsuo E, Takamura N, Fukui A, Nshikawa T, Ichino N, Yoshioka K. Effect of antiviral treatment on liver stiffness and its correlation to hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B. *AASLD The Liver Meeting 2014; Boston, MA /Hynes Convention Center 2014 Nov.7-11. Hepatology* 2014; 60(suppl):1112A.
 2. Takagawa Y, Kawabe N, Nitta Y, , Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Nakaoka K, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Osakabe K, Ichino N, Hashimoto S, Yoshioka K. Factors associated with HBsAg clearance in HBeAb-positive patients with persistently normal ALT levels. The 11th JSH Single Topic Conference; HIROSHIMA November 20-21,2014 Program & Abstract Book p94
 3. 福井愛子、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、水野裕子、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、半谷眞七子、亀井浩行、吉岡健太郎 . BCAA 顆粒製剤のみでは効果不十分な肝硬変における肝不全用経口栄養剤の LES 追加投与の有用性 . 第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会 ; 大阪国際会議場 . 2014/1/11-12 日本病態栄養学会会誌 2014;17(suppl):S116
 4. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . 肝細胞癌に対するシスプラチン動注療法を併用した TACE による肝内異所性再発の抑制 ; 第 100 回日本消化器病学会総会 ; 東京国際フォーラム 2014/4/23~26 日本消化器病学会雑誌 2014(suppl):A275
 5. 中岡和徳、高川友花、大城昌史、菅敏樹、水野裕子、嶋崎宏明、中野卓二、新田佳史、村尾道人、原田雅生、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 . C 型慢性肝炎患者における PNPLA3 遺伝子の肝線維化、発癌に対する影響 - ARFI による検討 ; 第 100 回日本消化器病学会総会 ; 東京国際フォーラム 2014/4/23~26 日本消化器病学会雑誌 2014(suppl):A306
 6. 刑部恵介、市野直浩、西川徹、加藤美穂、杉山博子、青山和佳奈、柴田亜委、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 . B 型慢性肝炎の肝硬度に及ぼす抗ウイルス療法の影響と肝発癌との関係についての検討 . JSUM2014 日本超音波医学会第 87 回

学術集会；パシフィコ横浜 2014/5/9~11
Jpn J Med Ultrasonics
2014;41(suppl)S601

7. 川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、福井愛子、吉岡健太郎 . 治療困難なC型肝炎に対するIFN-療法、脾摘後のPEG-IFN療法、瀉血療法の検討；第50回日本肝臓学会総会；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓:2014;55(suppl. 1):A121
8. 嶋崎宏明、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、西川徹、吉岡健太郎 . NAFLDにおけるPNPLA3のSNPとARFIによるVs値との関係；第50回日本肝臓学会総会；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓 :2014;55(suppl. 1):A363
9. 村尾道人、川部直人、吉岡健太郎 , C型肝炎に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法後の発癌に關与する因子の検討；第50回日本肝臓学会総会；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓 :2014;55(suppl. 1):A446
10. 福井愛子、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、水野裕子、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . 非アルコール性脂肪性肝疾患患者におけるビタミンE投与の有用性~肝硬度測定値の改善効果W含めた検討~；第50回日本肝臓学会総会；ホテルニューオータニ 東京 2014/5/29-30 肝臓:2014;55(suppl. 1):A453
11. 川部直人、橋本千樹、刑部恵介、原田雅生、新田佳史、村尾道人、中野卓二、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、倉下貴光、高村知希、松尾恵美、西川徹、市野直浩、吉岡健太郎 .肝硬度測定によるB型慢性肝炎の肝発癌予測と核酸アナログ治療効果の検討；JDDW2014 第18回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓 :2014;55(suppl. 2):A594
12. 村尾道人、川部直人、橋本千樹、原田雅生、新田佳史、中野卓二、嶋崎宏明、菅敏樹、中岡和徳、大城昌史、高川友花、吉岡健太郎 . C型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法後の経過と発癌について；JDDW2014 第18回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓:2014;55(suppl. 2):A652
13. 菅敏樹、斎藤恵美、高村知希、倉下貴光、高川友花、大城昌史、中岡和徳、水野裕子、嶋崎宏明、中野卓二、村尾道人、新田佳史、川部直人、橋本千樹、吉岡健太郎 .当院におけるC型慢性肝炎に対するTelaprevirおよびSimeprevirを用いた3剤併用療法の使用経験；JDDW2014 第18回日本肝臓学会大会；兵庫県・神戸国際展示場 他 2014/10/23-24 肝臓 :2014;55(suppl. 2):A667
14. K. Yoshioka, H. Shimazaki, N. Kawabe, M. Harata, Y. Nitta, M. Murao, T. Nakano, Y. Arima, T. Kan, M. Ohki, K. Nakaoka, T. Yuka, T. Nishikawa, K. Osakabe, N. Ichino, S. Hashimoto. Genetic variant I148M in PNPLA3 is associated with acoustic radiation

force impulse imaging in patients with NAFLD. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washinton 2013.11.2.

15. N. Kawabe, S. Hashimoto, M. Harata, Y. Nitta, M. Murao, T. Nakano, H. Shimazaki, Y. Arima, T. Kan, N. Kazunori, M. Ohki, T. Yuka, T. Nishikawa, K. Osakabe, N. Ichino, K. Yoshioka. Impact of patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) polymorphism on steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon plus ribavirin. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washinton 2013.11.4.
16. T. Kan, K. Osakabe, N. Kawabe, S. Hashimoto, M. Harata, Y. Nitta, M. Murao, T. Nakano, Y. Arima, H. Shimazaki, M. Ohki, K. Nakaoka, T. Yuka, T. Nishikawa, N. Ichino, K. Yoshioka, Acoustic radiation force impulse imaging for evaluation of antiviral treatment response in chronic hepatitis C. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washinton 2013.11.5.
17. 川部直人・橋本千樹・市野直浩・刑部恵介・西川徹・大城昌史・菅敏樹・水野裕子・嶋崎宏明・中野卓二・新田佳史・村尾道人・原田雅生・吉岡健太郎：肝脂肪化と PNPLA3 遺伝子多型の関係 C 型慢性肝炎における検討．第 49 回日本肝臓学会総会 ポスターセッション 東京 2013.6.7
18. 菅敏樹・高川友花・大城昌史・中岡和徳・水野裕子・嶋崎宏明・中野卓二・新田佳史・村尾道人・原田雅生・川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎：当院における C 型慢性肝炎に対する 3 剤併用療法の使用経験．第 49 回日本肝臓学会総会 ポスターセッション 東京 2013.6.7
19. 菅敏樹・高川友花・大城昌史・中岡和徳・水野裕子・嶋崎宏明・中野卓二・新田佳史・村尾道人・原田雅生・川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎：当院における C 型慢性肝炎に対する Telaprevir を含む 3 剤併用療法の使用経験．第 17 回日本肝臓学会大会 ポスターセッション 東京 2013.10.9-10
20. 嶋崎宏明・川部直人・橋本千樹・原田雅生・村尾道人・新田佳史・中野卓二・水野裕子・菅敏樹・中岡和徳・大城昌史・高川友花・青山和佳奈・西川徹・吉岡健太郎：NASH 診断における肝硬度測定の有用性 ARFI による検討．第 17 回日本肝臓学会大会 ポスターセッション 東京 2013.10.9-10
21. 川部直人・橋本千樹・原田雅生・村尾道人・新田佳史・中野卓二・水野裕子・菅敏樹・中岡和徳・大城昌史・高川友花・西川徹・刑部恵介・市野直浩・吉岡健太郎：C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療による肝硬度の変化 ARFI による検討 第 17 回日本肝臓学会大会 ポスターセッション 東京 2013.10.9-10
22. 村尾道人・川部直人・橋本千樹・原田雅生・新田佳史・中野卓二・嶋崎宏明・水野裕子・菅敏樹・中岡和徳・大城昌史・高川友花・吉岡健太郎：C 型肝炎に対するペグインターフェロン+リバビ

- リン併用療法後の発癌についての検討.
第 17 回日本肝臓学会大会 ポスターセッション 東京 2013.10.9-10
23. 兒玉俊彦・高川友花・大城昌史・中岡和徳・水野裕子・嶋崎宏明・中野卓二・新田佳史・村尾道人・原田雅生・川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎: B および C 型肝炎ウイルス検診陽性者に対するアンケート調査. 第 40 回日本肝臓学会西部会一般演題 岐阜 2013.12.6
24. 嶋崎宏明・川部直人・吉岡健太郎: NAFLD における PNPLA3 の SNP と ARFI による Vs 値との関係. 第 40 回日本肝臓学会西部会ワークショップ 岐阜 2013.12.6
25. 菅敏樹・大城昌史・水野裕子・嶋崎宏明・中野卓二・村尾道人・新田佳史・原田雅生・川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎: 当院における C 型慢性肝炎に対する Telaprevir を含む 3 剤併用療法の使用経験. 第 99 回日本消化器病学会総会ポスターセッション 鹿児島 2013.3.21-23
26. 川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎: C 型肝炎治療困難例に対する瀉血、IFN 療法、脾摘/PSE 後の PEG-IFN 療法の検討. 第 99 回日本消化器病学会総会ワークショップ 鹿児島 2013.3.21-23
27. Harata M, Yoshioka K, Kawabe N, Hashimoto S, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Ohki M. Liver stiffness increases with age and correlates with development of hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science” Tokyo 2012.11.21-22.
28. 原田雅生・川部直人・吉岡健太郎: HCV 感染者における ARFI による肝硬度測定の有用性の検討 第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW2012) ワークショップ神戸 2012.10.10~13
29. 川部直人・橋本千樹・原田雅生・新田佳史・村尾道人・中野卓二・嶋崎宏明・有馬裕子・吉岡健太郎: 進行肝細胞癌に対するシスプラチン動注を併用した TACE の有効性と安全性の検討 第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW2012) 神戸 2012.10.10~13
30. 土居崎正雄・片野義明・本田隆・林和彦・石上雅敏・石川哲也・中野功・浦野文博・吉岡健太郎・豊田秀徳・熊田卓・山口丈夫・春田純一・後藤秀実: late responder に対するペグインターフェロン 2b・リバビリン 72 週投与の治療効果と core と ISDR 変異 . IL28B 一塩基多型の関連についての検討 第 48 回日本肝臓学会総会 オープンワークショップ 金沢 2012.6.7-8
31. 川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎: C 型肝炎変性に対するインターフェロン治療の工夫. 第 48 回日本肝臓学会総会ワークショップ 金沢 2012.6.7-8
32. 有馬裕子・橋本千樹・吉岡健太郎・川部直人・原田雅生・新田佳史・村尾道人・中野卓二・嶋崎宏明・市野直浩・刑部恵介・西川徹: 肝硬度による C 型肝炎に対する PEG-IFN・RBV 併用療法の治療効果予測. 第 48 回日本肝臓学会総会ポスターセッション 金沢 2012.6.7-8
33. 西川徹・吉岡健太郎・橋本千樹・川部直人・原田雅生・市野直浩・刑部恵介・加藤美穂・杉山博子・青山和佳奈:

HCV 感染症における VTTQ による肝線維化評価 JSUM2012 日本超音波医学会第 85 回学術集会 一般口演東京 2012.5.25~27

34. 嶋崎宏明・有馬裕子・中野卓二・村尾道人・新田佳史・原田雅生・川部直人・橋本千樹・吉岡健太郎・刑部恵介・市野直浩・西川徹：C 型慢性肝炎における ARFI による肝線維化評価 第 98 回日

本消化器病学会総会 一般演題東京 2012.4.19-21

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得
なし
5. 実用新案登録
なし
6. 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）
平成 24 - 26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：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

分担研究課題：HBs 抗原量と肝病態

研究要旨：HBV 持続感染症例における HBs 抗原量と肝病態について検討した。2012 年 4 月～2013 年 7 月に当科を受診した HBV 持続感染例のうち、肝癌合併と既往がなく、抗ウイルス療法中の症例を除外した 312 例を対象とした。HBsAg 量の測定は CLIA 法を用いた。年齢中央値 54.7 才（15～87 才）男性 151 例（48.4%）、HBsAg 量中央値 1019.9U/mL（～938.24U/mL）、HBVDNA 量中央値 3.0 logcopy/mL（～9.4）、HBe 抗原陽性 39 例（12.5%）、ALT 中央値 20IU/mL（2～533IU/mL）、血小板数中央値 18.9 万（3.1～62.0）。全例 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 $R^2=0.53$ ）。HBsAg / HBVDNA 比を用いて HBeAg(+)期と HBeAg(-)期を比較したところ、HBeAg(+)期は 0.55 ± 0.08 (SD)であり、年齢、血小板数、HBeAg 値に影響されず、ほぼ一定の値を維持した。HBeAg(-)期になると 0.89 ± 0.53 (SD)に有意に上昇（ $p<0.01$ ）した。HBeAg(-)期の HBs 抗原量は、加齢とともに減少するが、血小板値が低値である症例ほどより低値であった。（結論）HBeAg 陽性期では、HBVDNA 量の減衰度に相応しながら HBsAg 量は低値を示す。しかし HBeAg 陰性化すると、HBVDNA 量に相応した HBs 抗原量の低下はみられず、一時下げ止まる。しかし年齢が高いほど、そして血小板数が低いほど HBs 抗原量は低値を示した。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、線維化が進展例はより低値を示すと考えられた。

共同研究者

山崎 一美 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター・肝臓内科

A. 研究目的

B 型肝炎無症候性キャリアにおいて、肝発癌リスクと HBs 抗原量の関連性の検討がされている。われわれは HBs 抗原量とさまざまな肝病態の関連について検討した。

B. 研究方法

2012年4月から2013年3月の期間、国立病院機構長崎医療センター・肝臓内科の受診患者のうち、HBV持続感染例において肝細胞癌の既往がなく、抗ウイルス療法を投与中の症例を除外した312例を対象として検討した。なおHBs抗原量はCLIA法にて測定した。

312例の患者背景。年齢中央値54.7才（15～87

才）男性151例（48.4%）、HBs抗原量中央値1014.44U/mL（～938.24U/mL）、HBVDNA量3.2 logcopy/mL（～9.4）、HBe抗原陰性273例（87.5%）、AST中央値22IU/mL（11～546IU/mL）、ALT中央値20IU/mL（2～533IU/mL）、血小板中央値18.9万（3.1万～62万）、FIB-4 index中央値1.4（0.3～17.6）。他の肝疾患の合併11例（3.5%）、IFN治療歴34例（10.9%）であった。

C. 研究結果

1) HBs 抗原量に寄与する因子（重回帰分析・ステップワイズ法）

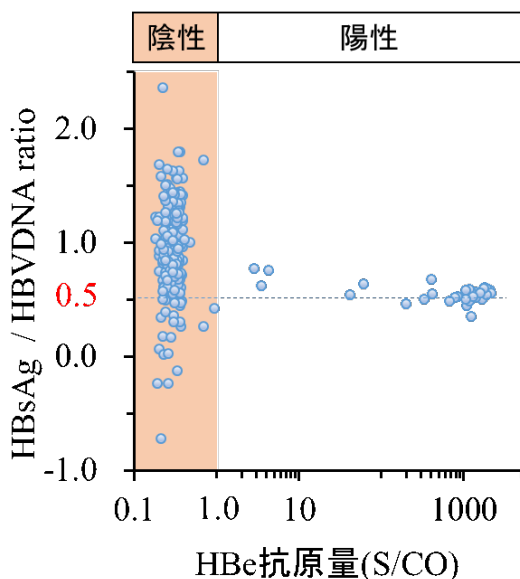
HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した（表 1）、HBs

抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、年齢が高く、HBe 抗原陽性であった。なかでも HBVDNA 量がもっとも影響する因子であった。

(表 1) HBs 抗原量の独立寄与因子 (全例)

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.862	< 0.001
HBeAg (negative: 0, positive: 1)	0.529	- 0.357	< 0.001
age		- 0.164	< 0.001
Plt		0.104	0.010
AST		- 1.944	0.053
ALT		- 1.909	0.057
sex (female: 0, male: 1)		- 1.765	0.079
IFN, BCP, PC, Other liver disease			> 0.1

3) HBe 抗原量と HBs 抗原量対 HBVDNA 量比



(図 1) HBe 抗原量と HBs 抗原量対 HBVDNA 量比の関係

HBe 抗原量が陽性 (1 以上) のとき、HBe 抗原量がどの値においても HBsAg/HBVDNA 量比は 0.5~0.6 の値であった。ところが、HBe 抗原量が 1.0 未満の陰性になると、HBsAg/HBVDNA 量比は 0.0~1.6 の範囲に広く散布するが、主には比は 0.5 より高い値に散布した。

4) HBe 抗原陽性時の HBs 抗原量

HBe 抗原陽性期の HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した (表 2)。HBs 抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、AFP 低値で HBe 抗原低値

であった。HBVDNA 量がもっとも影響する因子であった。

(表 2) HBe 抗原陽性時の HBs 抗原量の独立寄与因子

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.385	0.003
AFP	0.709	- 0.467	< 0.001
HBeAg (continuous variables)		0.327	0.008
AST, ALT, sex, IFN, BCP, PC, Other liver disease			> 0.1

5) HBe 抗原陰性時の HBs 抗原量

HBe 抗原陰性期の HBs 抗原量に寄与する因子について重回帰分析・stepwise selection 法で検討した (表 3)。HBs 抗原量が低い症例は、HBVDNA 量が低く、高齢で血小板数が低値であった。

(表 3) HBe 抗原陰性時の HBs 抗原量の独立寄与因子

Final fitted model	Adjusted R ²	Standardized coefficient β	P value
HBVDNA titer		0.583	< 0.001
age	0.458	- 0.173	< 0.001
Platelet		0.116	0.011
sex (female: 0, male: 1)		- 0.176	0.080
IFN, BCP, PC, AST, ALT, AFP, Other liver disease			> 0.1

D. 考察

HBs 抗原量は、B 型肝炎症例の病態評価のための重要なマーカーである。血中 HBs 抗原量は HBV の増殖状態を反映し、発癌リスクマーカーの可能性が示唆されている。しかし HBs 抗原量の規定因子を検討した解析は少ない。本研究では、核酸アナログを導入していない症例を対象とすることで、自然経過での HBs 抗原量を明らかにすることを目的とした。

HBs 抗原量にもっとも寄与する因子は HBVDNA 量であった。特に HBe 抗原陽性時期における HBs 抗原量は HBVDNA 量でほぼ規定されていた。

一方、HBe 抗原陰性時期においても HBVDNA 量が規定因子の一つになるが、その影響は HBe 抗原陽性の時ほど強くない。HBVDNA に加え

て年齢と血小板数の2因子が寄与する。加齢とともにHBs抗原量は低下し、血小板数が低下するとHBs抗原量は低値を示す。このことは線維化進展によってHBs抗原量が低下することを示唆している。線維化進展のないHBe抗原陰性キャリア（low replicative期）において血中HBs抗原量が多いと発癌リスクを負うことが報告されているが、肝硬変症例においてもHBs抗原量が低下することもあり、基礎肝病態をよく診断したうえで、HBs抗原量を評価しなければならないと考える。

E. 結論

HBs抗原量は、HBVDNA量に最も反映しているが、年齢、肝線維化、HBe抗原にも影響を受けている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bae SK, Yatsuhashi H, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Ito M, Miyakawa Y, Ishibashi H. Prediction of early HBeAg seroconversion by decreased titers of HBeAg in the serum combined with increased grades of lobular inflammation in the liver. *Med Sci Monit.* 2012 Dec 1;18(12):CR698-705.
- 2) Migita K, Abiru S, Ohtani M, Jiuchi Y, Maeda Y, Bae SK, Bekki S, Hashimoto S, Yesmembetov K, Nagaoka S, Nakamura M, Komori A, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Yasunami M. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. *Transl Res.* 2012 Dec;160(6): 443-4.
- 3) Toyama T, Ishida H, Ishibashi H, Yatsuhashi H, Nakamuta M, Shimada M, Ohta H, Satoh T, Kato M, Hijioka T, Takano H, Komeda T, Yagura M, Mano H, Watanabe Y, Kobayashi M, Mita E. Long-term outcomes of add-on adefovir dipivoxil therapy to ongoing lamivudine in patients with

lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Hepatology Res.* 2012 Dec;42(12):1168-1174.

4) Tamada Y, Yatsuhashi H, Masaki N, Nakamuta M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Muro T, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. 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.* 2012 May;61(5):765-73.

5) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. 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. *Hepatology Res.* 2012 Feb;42(2):139-149.

6) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi 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.* 2013 Jul 29.

7) 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

8) 八橋 弘. 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

9) 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

10) 八橋 弘 . 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 STEP1・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

11) 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のか - . Medical Practice 30(2) : 186-193 , 2013.2.1.

12) Bae SK, Yatsuhashi 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. 2014 Oct;44(10):E267-72.

2 . 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容について特にありません。

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)
平成 24 ~ 26 年度分担研究報告書

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

分担研究者: 分担研究者 井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻
人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学 教授

分担研究課題: HBe 抗体陽性キャリアの長期予後に関する検討

研究要旨: HBe 抗体陽性 HBV キャリアの長期予後を明らかにするために、#1. 当科および関連施設における HBe 抗体陽性 B 型肝炎ウイルス(HBV)キャリアの実態とその発癌率、また発癌例の特徴について解析した。#2. 鹿児島県における B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤治療助成申請者の実態について検討した。

#1. 対象は 1988 年から 2013 年までに当院および当科関連施設を受診し、1 年以上経過観察が可能であった、肝細胞癌の既往歴のない、B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性キャリア症例 290 例で、年齢の中央値は 55 歳(4~85)で、男性 143 例(49.3%)、肝細胞癌合併 19 例(6.6%)であった。また、観察期間の中央値は 71.6 ヶ月(12.8~311.0)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。経過観察開始時に肝細胞癌非合併例 284 例中 13 例(4.2%)に肝細胞癌が発生し、発癌までの期間の中央値は 69.4 ヶ月(5-311)で、累積発癌率は 5 年で 2.9%、10 年で 6.9%、15 年で 14.1%であった。発癌に関わる因子について多変量解析を施行(n=225)し、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)が、発癌に関連する有意な因子であった。核酸アナログ非投与 240 例中、ALT<30 IU/L かつ HBV-DNA 4.0 LC/mL からの発癌例はなかった。核酸アナログ投与例 44 例の解析では、12 例(27.3%)が経過中に発癌し、AFP 5.0 ng/mL (p=0.018)、Fib-4 index 2.0 以上(p=0.001)で累積発癌率が高かった。また、経過観察開始時肝細胞癌非合併例 284 例中 23 例(8.3%)において、経過中に HBsAg 陰転化を認めた。

#2. 鹿児島県における B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の治療助成申請者 140 例(平均年齢 57.5 歳、男性 60.7%)のうち、HBe 抗原陽性 42%、HBe 抗体 52%、血中 HBV-DNA 量 6.1 ± 2.1 LC/mL で、70%にエンテカビル、20%にラミブジン + アデフォビルが投与され、更新時には 95%の症例で HBV-DNA 量が減少し、約 70%で HBV-DNA 2.1LC/mL 未満となっていた。また更新時には ALT 値に加えて血清 AFP 値も低下し、肝炎が鎮静化されていることが推測された。申請時と更新時に HBe 抗原/抗体系が測定された 39 例の検討で、20%に HBe 抗原の陰性化、15%に HBe 抗体の陽性化を認めた。核酸アナログが投与された B 型慢性肝炎において血中 HBV DNA が減少し、肝炎が鎮静化されていることが推測された。

HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの発癌は低率で、核酸アナログ製剤は血中 HBV DNA を減少させ、肝炎を鎮静化させていることが推測された。ただ、高齢で AFP 5.0 ng/mL 以上、線維化進展例では、発癌リスクが高く、厳重な経過観察が必要であると考えられた。

共同研究者

馬渡誠一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 助教

森内昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
HGF 組織修復・再生医療学 特任講師

宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 准教授

玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
肝疾患相談センター 特任講師

小田耕平 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

今中 大 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

発癌例の特徴に加え、鹿児島県における核酸アナログ投与例の実態について検討した。

B. 研究方法

#1. 1988年から2013年までに当科を受診し、1年以上経過観察が可能であった、肝細胞癌の既往歴のない、HBe抗体陽性キャリア症例290例について、以下の検討を行った。

1. 患者背景
2. 累積発癌率
3. 肝発癌に関連する因子の検討
4. 核酸アナログ投与例における肝発癌に関連する因子の検討
5. HBe抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌例の検討

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染者(キャリア)では、HBe抗原陽性の無症候性キャリア(免疫寛容期)から、ある時期に一過性の肝炎を発症し、その後、速やかに非活動性キャリア(HBe抗体陽性の無症候性キャリア)に移行する症例が85~90%と多数を占め、このような症例の予後は良好とされている。一方、HBe抗原が抗体にセロコンバージョンしても血中HBV DNA量が十分低下せず慢性肝炎が持続する場合や、いったん非活動性キャリアとなった後に肝炎の再活性化が起こる場合がある。このような肝炎はHBe抗原非産生HBV変異株によって惹起され、肝硬変や肝癌に進行しやすいことが報告されている。近年、核酸アナログ製剤が登場し、HBV-DNAは高率に抑制され、予後の改善が得られ、発癌も抑制されるとの報告が散見される。しかし、HBe抗体陽性HBVキャリアの長期予後や発癌に関連する因子についてその詳細は明らかにされていない。そこで本研究では当院および当科関連施設におけるHBe抗体陽性HBVキャリアの実態とその発癌率、また

統計解析については、二乗検定、マン・ホイットニーのU検定、ログランク検定、cox比例ハザードモデルを用いて行った。

#2. 2010年5月から2012年4月までにB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤治療助成申請を行った1140例のうち新規および更新申請時のHBV-DNA量が確認できた初回治療例140例を対象として、下記の項目について検討した。

1. 対象者の年齢、性別
2. 血液・生化学検査成績の推移
3. 血清HBVマーカー、HBV DNAの推移
4. 治療(核酸アナログ製剤)
5. HBe抗原陽性者の経過

(倫理面への配慮)

当院で定めた倫理規定等を遵守し、個人情報の漏洩防止に関しては、連結可能匿名化を行うとともに個人識別情報を厳重に管理・保管し、被験者のプライバ

シーの保護に関しては万全を期して、研究を行った。

C. 研究結果

#1-1. 患者背景

HBe抗体陽性キャリア症例290例の年齢の中央値は55歳(4~85)で、男性143例(49.3%)、肝細胞癌合併19例(6.6%)で、6例は経過観察開始時に肝細胞癌を認めていた。また、観察期間の中央値は71.6ヶ月(12.8~311.0)で、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。経過観察開始時に肝細胞癌非合併例284例中、核酸アナログ投与例は44例(15.5%)で、経過観察中に12例(27.3%)に肝細胞癌を認めた。一方、核酸アナログ非投与例240例中、経過観察中に肝細胞癌を認めた症例は1例(0.4%)のみであった。

#1-2. 累積発癌率

経過観察開始時に肝細胞癌非合併例284例中13例(4.2%)に肝細胞癌が発生していた。発癌までの期間の中央値は69.4ヶ月(5-311)で、累積発癌率は5年2.9%、10年6.9%、15年14.1%であった。ALT値別の累積発癌率は、ALT<30 IU/Lで5年0%、10年4.5%に対し、ALT≥30 IU/Lでは、5年7.0%、10年11.4%、15年21.7%とALT≥30 IU/L群で有意に高かった(p=0.001)。また、HBV DNA別の累積発癌率は、HBV DNA<4.0 LC/mLで5年、10年、15年いずれも0.7%に対し、HBV DNA≥4.0 LC/mLでは5年5.3%、10年12.5%、15年29.4%とHBV DNA≥4.0 LC/mL有意に高かった(p=0.008)。

#1-3. 肝発癌に関連する因子の検討

Kaplan-Meier法を用いて肝発癌に関連する背景因子を検討した。それぞれの因子のカットオフ値はROC曲線を用いて算出した。HBV-DNA≥4.0 LC/mL(p=0.008)、ALT≥35 IU/L(p<0.001)、血小板<12万/μL(p<0.001)、血清アルブミン値<4.1 g/dL(p=0.027)、

AFP ≥5.0 ng/mL(p<0.001)、核酸アナログ投与歴あり(p<0.001)で有意に累積発癌率が高かった。これらの因子に年齢、性別を加えて、Cox 比例ハザードモデルにて多変量解析を施行し(n=225)、経過観察開始時の年齢 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)が、発癌に関連する有意な因子であった。

#1-4. 核酸アナログ投与例における肝発癌に関連する因子の検討

核酸アナログ投与44例の解析では、経過観察中12例(27.3%)に発癌がみられた。Kaplan meier法による検討で、年齢(55歳)、性、HBV-DNA(4.0 LC/mL)、ALT(30 IU/L)、血小板(12万/μL)、血清アルブミン値(4.1 g/dL)別の累積発癌率に差はなかったが、AFP 5.0 ng/mL(p=0.018)、Fib-4 index 2.0 以上(p=0.001)で有意に累積発癌率が高かった。

#1-5. HBe抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌例の検討

核酸アナログ非投与240例中、ALT<30 IU/LかつHBV-DNA 4.0 LC/mLからの発癌例はなかった。また、経過観察開始時に肝細胞癌を認めた6例中1例が発癌時ALT 16 IU/L、HBV-DNA 3.3 LC/mLの非活動性キャリアの状態であった。

さらに、経過中にHBsAg陰転化を23例(8.1%)に認め、その内訳は核酸アナログ非投与例240例中20例(8.3%)、核酸アナログ投与例44例中3例(6.8%)であった。

#2-1 対象者の年齢、性別

核酸アナログ製剤治療助成申請を行い、新規および更新申請時のHBV-DNA量が確認できた初回治療例140例の申請時の平均年齢57.5歳、男性85例

(60.7%)であった。

#2-2. 血液・生化学検査成績の推移

申請時の AST 112 IU/L (range 10-2129)、ALT 143 IU/L (8-3526)、血小板 $16.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ (4.3-39.8)、AFP 25.3 ng/mL (1.1-385.2) で、更新時は AST 29 IU/L (15-75)、ALT 27 IU/L (10-86)、血小板 $16.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ (3.2-51.0)、AFP 11.5 ng/mL (0.6-273.7) で、AST、ALT のみならず血清 AFP も低下していた。一方、血小板数には変化はみられなかった。

#2-3. 血清 HBV マーカー、HBV DNA の推移

申請時の HBe 抗原陽性/陰性/不明 (%) は 42/49/9 で、更新時は 23/37/40 であった。一方、HBe 抗体陽性/陰性/不明 (%) は申請時 52/37/11 で、更新時は 37/24/39 で、HBe 抗原陽性者が減少し、HBe 抗体陽性者が増加していることが推測されたが、不明例 (未測定者) も多かった。血中 HBV-DNA 量 (LC/mL) は申請時 6.1 ± 2.1 LC/mL で更新時には 1.8 ± 1.4 LC/mL に減少し、血中 HBV-DNA 量 4.0 以上/2.0 ~ 4.0/2.1 未満 (%) は申請時 85/9/6、更新時 5/36/69 であった。

#2-4. 治療 (核酸アナログ製剤)

核酸アナログ製剤は、70% の症例でエンテカビルが投与されており、約 20% の症例ではラミブジン +阿德フォビル併用投与が実施されていた。

#2-5. HBe 抗原陽性者の経過

HBe 抗原陽性例 58 例のうち、申請時と更新時に HBe 抗原/抗体が測定された 39 例の検討では、更新時に 8 例 (20.5%) が HBe 抗原陰性で、うち 6 例 (15.4%) で HBe 抗体が陽性化していた。

D. 考察

当科および関連施設における HBe 抗体陽性 HBV

キャリア 290 例と、鹿児島県の B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤治療助成申請における B 型慢性肝炎 140 例について調査、検討した。肝細胞癌非合併例の検討で、累積発癌率は 5 年 2.9%、10 年 6.9%、15 年 14.1% であった。これまでの報告と同様に、HBV DNA 量が多く、ALT 値の高値例で累積発癌率が高かったが、多変量解析では年齢 55 歳以上、AFP 5.0 ng/mL 以上が発癌に寄与する因子であった。近年、核酸アナログ製剤が登場し、経過中のウイルス量の減少や肝炎の沈静化が得られるようになり、発癌が抑制されたことが、多変量解析で、HBV DNA 量や ALT 値が発癌に寄与する因子として抽出されなかった理由の一つとしてあげられる。実際に、鹿児島県で核酸アナログ製剤が投与された症例においても、HBV DNA 量や ALT 値、AFP 値の低下が確認された。しかし、核酸アナログ投与例の 27.3% が発癌しており、核酸アナログ投与だけでは発癌抑制は困難な可能性がある。特に核酸アナログ投与例で、AFP 5.0 ng/mL ($p=0.018$)、Fib-4 index 2.0 以上 ($p=0.001$) で有意に累積発癌率が高かったことから、線維化進展例は発癌のリスクが高いと思われる。

HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの肝発癌について、今回の長期経過観察例の中には認めなかったが、経過観察開始時に肝細胞癌を認めた 6 例中 1 例に認めており、非活動性キャリアにおいても定期的な経過観察が必要と思われる。また、核酸アナログ投与例において、HBe 抗原の陰性化が 20.5%、HBe 抗体の陽性化が 15.4% でみられており、HBe 抗原陽性から陰性化した症例の長期予後についても、今後の検討課題と思われる。

B 型肝炎治療ガイドラインにおける最終治療目標は HBs 抗原消失と設定されており、今回、経過中に HBs 抗原陰転化を 23 例 (8.1%) に認めた。今後 HBs 抗原陰転化に関わる因子について、更なる解析が必要である。

E. 結論

HBe 抗体陽性非活動性キャリアからの発癌は低率で、核酸アナログ製剤は血中 HBV-DNA、ALT 値を減少させ、肝炎を鎮静化させていることが推測された。ただ、高齢で AFP 5.0ng/mL 以上、線維化進展例では、発癌リスクが高く、嚴重な経過観察が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

(1) Mawatari S, Uto H, Moriuchi A, Tabu K, Muromachi K, Tabu E, Oda K, Imanaka D, Oshige A, Nakazawa J, Kumagai K, Tamai T, Okamoto H, Tsubouchi H, Ido A. Horizontal transmission of de novo hepatitis B between spouses: A case report. *Hepatol Res*. 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12422. [Epub ahead of print]

(2) Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H. Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. *J Med Virol*. 2014 ;86:1877-85.

(3) Mera K, Uto H, Mawatari S, Ido A, Yoshimine Y, Nosaki T, Oda K, Tabu K, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Hidaka M, Eguchi S, Tsubouchi H. Serum levels of apoptosis inhibitor of macrophage are associated with hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:27.

(4) Tokunaga M, Uto H, Oda K, Tokunaga M,

Mawatari S, Kumagai K, Haraguchi K, Oketani M, Ido A, Ohnou N, Utsunomiya A, Tsubouchi H. Influence of human T-lymphotropic virus type 1 coinfection on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol*. 2014;49:1567-77.

(5) Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, Suzuki T, Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, Shoji I, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. *PLoS One*. 2013 12;8:e82094.

(6) Tsubouchi N, Uto H, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Hayashi K, Kusumoto K, Shimoda K, Stuver SO, Tsubouchi H. Impact of antibody to hepatitis B core antigen on the clinical course of hepatitis C virus carriers in a hyperendemic area in Japan: A community-based cohort study. *Hepatol Res*. 2013; 43: 1130-1138.

(7) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Ohnishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res*. 2013; 43: 97-105

(8) Oketani M, Ido A, Uto H, Tsubouchi H. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatol Res* 2012; 42: 627-636.

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の出願・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

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：阿部雅則 愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学 准教授

分担研究課題：愛媛県における HBV genotype D 感染者の臨床像とウイルスマーカーの検討

研究要旨：愛媛県におけるHBV genotype D感染者の現状について検討を行った。
1) HBVキャリア妊婦ではgenotype Dが30%を占めており、全員がHBe抗体陽性非活動性キャリアであった。2) 現在通院中のHBV genotype D感染者ではHBe抗体陽性非活動性キャリアが約70%を占めていた。3) HBe抗体陽性無症候性キャリアにおけるHBsAg量の推移はgenotype Dとgenotype Cでは異なっていた。以上から、genotype Cとgenotype Dの間では臨床像およびvirulenceに差があることが示唆された。

共同研究者
道堯浩二郎 愛媛県立中央病院消化器病センター・センター長
日浅陽一 愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学・教授

A. 研究目的

愛媛県のHBVキャリアでは、日本の他の地域と同様にgenotype Cが最も多いが、genotype Dが存在しているという特徴がある。以前から、genotype DではHBe抗体陽性非活動性キャリアの割合が多いことを報告してきたが、流行から40年経過し、その臨床像が変化している可能性もある。また、本邦におけるgenotype DのHBV-DNAやHBsAgなどのウイルスマーカーについての検討は行われていない。本研究では、愛媛県におけるHBV genotype D持続感染者の現状を明らかにするとともに、ウイルスマーカーの相違について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 2010年に愛媛県立中央病院を受診した妊婦1489例のHBs抗原を測定し、HBV

genotypeと臨床像を検討した。

2) 2013年に愛媛大学医学部附属病院、愛媛県立中央病院で外来通院中のHBV genotype D持続感染者44名の臨床像を解析した。

3) 2012年に愛媛大学医学部附属病院外来に通院しており、HBe抗体陽性かつ2年間連続してALT 30 U/L以下であった無症候性キャリアのうちgenotypeが測定されていた68例を対象とし、genotype別のHBV-DNA量、HBsAg量を解析した。また、プロスペクティブに6カ月毎にHBV-DNA量、HBsAg量の推移を解析した。

C. 研究結果

1) HBVキャリア妊婦の検討

妊婦1489例中HBs抗原陽性は26例(1.7%)、詳細なデータが得られた21例のうち、HBV genotypeはC 14例、D 6例、不明1例であった。

genotype CとDでは、年齢に差はなかった。genotype Cでは4例(29%)、Dでは全例がHBe抗体陽性非活動性キャリアであった。

2) HBV genotype D持続感染者の現状

HBV genotype D 持続感染者の臨床像は、HBe 抗体陽性非活動性キャリアが 29 例 (70.5%) と最も多かった。13 例 (29.5%) は慢性肝炎であり、そのうち 6 例は核酸アナログ製剤による治療を受けていた。肝硬変、肝細胞癌へと進行した症例はみられなかった。

3) HBe 抗体陽性無症候性キャリアにおける HBV ウイルスマーカーの検討

エントリー時の HBV-DNA 量は genotype D が genotype C より低かった。

また、genotype D では HBsAg 量が低く、HBsAg 1000 IU/ml 以上の症例の割合は genotype D が genotype C より低かった。

前向き検討では、HBV-DNA 量の推移は genotype C と genotype D で差がなかった。一方、HBsAg 量の減少率は、genotype D が genotype C より高い傾向があった。

D. 考察

これまでに我々の教室では、愛媛県の HBV キャリアのうち genotype D が 6-7%程度存在していることを報告してきた。今回の検討により、genotype C と D の間では臨床像および virulence に差があることが示唆された。また、母子感染のリスクについても注意する必要があると考えられた。

HBV genotype D 持続感染者では現在でも HBe 抗体陽性非活動性キャリアの割合が最も多い。しかし、今後とも長期間の観察により臨床像およびウイルス学的な解析を行っていく必要がある。

E. 結論

愛媛県の HBV キャリアにおいて、genotype C と D の間では臨床像および virulence に差があることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Michitaka K, Hiraoka A, Imai Y, Utsunomiya H, Tatsukawa H, Shimizu Y,

Ninomiya K, Yamago H, Tanihira T, Hasebe A, Ninomiya T, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M, Abe E, Ochi H. Clinical features and hepatitis B virus (HBV) genotypes in pregnant women chronically infected with HBV. Intern Med 51:3317-3322, 2012.

2) Onji H, Koizumi Y, Hanayama M, Akbar SKF, Hirooka M, Tokumoto Y, Abe M, Hiasa Y, Aoto M, Mitsuda N, Onji M. A case of de novo hepatitis B complicated due to lack of comprehensive interventional approach. Euroasian J Hepato-Gastroenterol 2: 122-125, 2012.

3) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. Antivir Res 96: 59-64, 2012.

4) Shimizu Y, Hiraoka A, Yamago H, Shiraishi A, Imai Y, Tatsukawa H, Tanihira T, Miyata H, Ninomiya T, Tokumoto Y, Abe M, Hiasa Y, Michitaka K. Hypophosphatemia in patients with hepatitis B virus infection undergoing long-term adefovir dipivoxil therapy. Hepatol Res 44: 1081-1087, 2014.

5) Michitaka K, Hiraoka A, Tokumoto Y, Ninomiya K, Ninomiya T, Horiike N, Abe M, Hiasa Y. Clinical features of adult patients with acute hepatitis B virus infection progressing to chronic infection. Int J Hepatol 2014: 358206, 2014.

6) Watanabe T, Tokumoto Y, Hirooka M, Koizumi Y, Tada F, Ochi H, Abe M, Kumagi T, Ikeda Y, Matsuura B, Takada K, Hiasa Y. An HBV-HIV co-infected patient treated with tenofovir-based therapy who achieved HBs antigen/antibody seroconversion. Intern Med 53: 1343-1346, 2014.

2. 学会発表

1) 渡辺崇夫、徳本良雄、多田藤政、越智裕紀、小泉洋平、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一。当院における B 型肝炎に対するエンテカビル長期投与の治療効果 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月、東京

2) 道堯浩二郎、平岡淳、藤方理恵、今井一平、城藤幸一、小黒邦彦、鶴岡隆志、徳本

良雄、阿部雅則、日浅陽一. B型肝炎ウイルス genotype B とヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の分布と共感染に関する検討 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月, 東京

3) 多田藤政、阿部雅則、渡辺崇夫、越智裕紀、小泉洋平、徳本良雄、廣岡昌史、道堯浩二郎、日浅陽一. HBe 抗原陰性 HBV ジェノタイプ D 無症候性キャリアの臨床的特徴について 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月, 神戸

4) 渡辺崇夫、高田清式、徳本良雄、越智裕紀、小泉洋平、多田藤政、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一 当院の HIV 陽性者における HBV 共感染の現状 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月, 神戸

5) Akbar SMF, Abe M, Hiasa Y, Chen S. Myeloid-derived suppressor cells, a new entity, capable of regulating antigen-specific and T-cell based immunity in chronic HBV infection. The 11th JSH Single Topic

Conference 2014 年 11 月, 広島

6) Watanabe T, Takada K, Tada F, Imai Y, Koizumi Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y. Frequent hepatitis B virus infection in HIV patients: the need to examine HBV markers in HIV patients. The 11th JSH Single Topic Conference 2014 年 11 月, 広島

7) Tokumoto Y, Watanabe T, Joko K, Michitaka K, Imai Y, Koizumi Y, Tada F, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y. Treatment effects of long-term entecavir for patients with chronic hepatitis B. The 11th JSH Single Topic Conference 2014 年 11 月, 広島

H. 知的所得権の出願・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

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：久留米大学医学部 内科学講座消化器内科部門 教授 佐田 通夫

分担研究課題：B 型肝炎ウイルス関連肝がんの現状

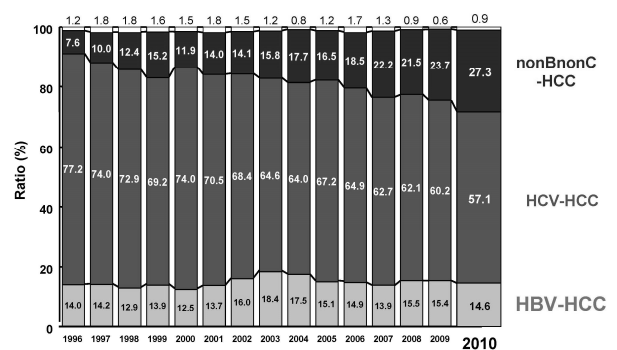
研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、本邦における肝がんの主要な病因である。これまでに感染予防や病期進展抑制を目的に様々な取り組みがなされているが、HBV 関連肝がんは、現在でも全肝がんの約15%を占めており、約20年間前からその割合は変化していない。そこで、本研究の目的は、近年のHBV関連肝がんの臨床的特徴を明らかにすることである。1991年1月～2012年7月の期間に当院に入院したHBV関連肝がん患者を対象とした。肝がんの診断時期により、前期：1991年1月～1997年2月（n = 83） 後期：2003年8月～2012年7月（n = 102）の2群に群分けし、年齢・性別・肝予備能・肝がん進行度・肝がん治療法を比較検討した。年齢は、前期群と後期群の間に有意差を認めなかったが、女性の割合は、後期群で有意に高率であった（14.5% vs. 28.4%, P = 0.02）。また、後期群では、前期群に比較して、Child-Pugh grade Aの割合が有意に高率であった（60.2% vs. 75.2%, P = 0.0280）。肝がんの進行度は両群間で有意差を認めなかったが、後期群では、根治的治療の割合が有意に高率であった（38.5% vs. 72.8%, P < 0.0001）。本研究により、近年のHBV関連肝がん患者の特徴として、女性の割合が増加している、肝予備能が保たれている、根治的治療により加療される割合が増加していることが明らかとなった。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）感染症は本邦の主要な感染症であり、約 150 万人のキャリアと約 2,600 万人感染既往者が存在すると推計されている。また、HBV は C 型肝炎ウイルス（HCV）とともに肝がんの主要な病因であり、これまでに感染予防や病期進展抑制を目的に本邦でも様々な取り組みがなされている。

HBV の垂直感染予防を目的に、1986 年より抗 HBs 人免疫グロブリン（HBIG）および B 型肝炎ワクチン（HB ワクチン）を用いた母子感染事業が開始され、母子感染の減少が報告されている。また、2000 年にはラミブジン、2004 年にはアデホビル、2006 年にはエンテカビルと B 型肝炎ウイルスに対する核酸アナログ製剤が次々と認可され、肝発がんに対する抑制効果も報告されている。感染予防と治療薬の発展、および医療政

策の改善により、HCV 関連肝がんは減少傾向にあるが、HBV 関連肝がんは、現在でも全肝がんの約 15%を占めており、約 20 年間前からその割合は変化していない(図 1)。



Taura N, Yatsuhashi H, Sata M et al. Med Sci Monit. 2011 Feb;17(2):PH7-11. Up-dated in 2011

図 1. 肝がん成因の変化

これまでに様々な対策が行われてきたにも関わらず、HBV 関連肝がんの割合に変化がない原因は未だ不明である。本研究の目

的は、近年の HBV 関連肝がんの臨床的特徴を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象

1991年1月～2012年7月の期間に久留米大学病院 消化器内科病棟に入院した肝がん患者で、HBs 抗原陽性かつ HCV 抗体陰性者を対象とした。

群分け

上記対象者の肝がん診断日より、下記の2群に分類した。

前期：1991年1月～1997年2月(n=83)

後期：2003年8月～2012年7月(n=102)

検討項目

下記の項目につき、診療録よりデータを収集した。

- 1) 年齢、性別
- 2) 肝予備能：Child-Pugh grade
- 3) 肝がん進行度：原発性肝癌取扱い規約に基づき stage I/II/III/IV に分類した。
- 4) 肝がん治療：肝切除、ラジオ波焼却療法、もしくは肝移植を根治的治療とした。

統計

データは実数もしくは平均 ± SD にて記載した。2群間の比較は Mann-Whitney's U test または、カイ二乗検定を用いて検定した。P 値が 0.05 以下の場合を統計学的に有意と判断した。

(倫理面への配慮)

本研究の研究内容はヘルシンキ宣言に準じており、久留米大学倫理委員会にて承認を受けている。本研究は、日常診療の範囲内で得られた情報を集計調査するものであり、同意取得は行わない。ただし、研究の目的を含む研究の実施について当科のホームページにて公開する。また、通常の日常診療における医療従事者が行うべき守秘義務に加え、個人が識別できる情報(I.D., 氏名)は、暗号化し、プライバシーの保護に留意した。本研究により得られたデータは

本試験の目的以外には利用していない。

C. 研究結果

性別と年齢の変化

前期群における女性の割合は 14.5%であり、後期群では 28.4%であった。後期群では、前期群に比較して、女性の割合が有意に高率であった (P = 0.0210)(表 1)。

前期群における年齢は 52.1 ± 11.6 歳、後期群は 55.5 ± 12.1 歳であり、両群間の年齢に有意差は認めなかった (P = 0.1983) (表 1)。

前期群における 70 歳以上の割合は 3.6%、後期群では 10.8%であった。両群間における 70 歳以上の割合に傾向差を認めた (P = 0.0573)(表 1)。

表 1 . 性別と年齢の変化

	前期	後期	P
Female (%) / male	12/71 (14.5%)	29/73 (28.4%)	0.0210
Age	52.1 ± 11.6	55.5 ± 12.1	0.1983
≥70 years old (%) / < 70 years old	3/80 (3.6%)	11/91 (10.8%)	0.0573

肝予備能と肝がん進行度の変化

前期群における Child-Pugh grade A の割合は 60.2%であり、後期群では 75.2%であった。後期群では、前期群に比較して、Child-Pugh grade A の割合が有意に高率であった (P = 0.0280)(表 2)。

前期群における肝がん進行度は I/II/III/IV=18/22/25/17 であり、後期群では 15/33/19/25 であった。前期群と後期群の肝がん進行度に有意差は認めなかった (P = 0.3162)(表 2)。

前期群における根治的治療の割合は 38.5%であり、後期群では 72.8%であった。後期群では、前期群に比較して、根治的治療の割合が有意に高率であった (P < 0.0001)(表 2)。

表 2 . 肝予備能と肝がん進行度の変化

	前期	後期	P
Child-Pugh (A(%)/B&C)	50/33 (60.2%)	79/26 (75.2%)	0.0280
HCC Stage (I/II/III/IV)	18/22/25/17	25/33/19/25	0.3162
Curative Treatment (%)	30/48 (38.5%)	67/25 (72.8%)	< 0.0001

*Curative Treatment: Hepatic Resection, RFA, Liver Transplantation

D. 考察

本研究により、近年の HBV 関連肝がん患者の特徴として、女性の割合が増加している、肝予備能が保たれている、根治的治療により加療される割合が増加していることが明らかとなった。

従来、女性は、HBV 関連肝がんのネガティブリスクファクターとして広く知られていた。しかし、本研究では、HBV 関連肝がんにおいて女性の割合が増加しており、既報とは異なる結果であった。その相違の原因は明らかではないが、加齢の影響が一因と推察される。すなわち、後期群では高齢者の割合が高い傾向にあり、女性ホルモンを介した肝がん抑制能の低下が、性差の変化に関与している可能性がある。

本研究では、HBV 関連肝がんの進行度は変化がないものの、根治的治療により加療される患者の割合が高率になっていることが明らかとなった。その原因として、核酸アナログ製剤の普及が考えられる。これまでに、我々は、ラミブジン投与により、B 型肝硬変患者の肝予備能と食道静脈瘤が改善することを報告している (Koga H, Sata M et al. Hepatol Res. 2007;37:503-9.)。また、近年、テノホビルによる B 型肝硬変の肝線維化改善効果も報告されている (Marcellin P et al. Lancet. 2013 9;381:468-75.)。肝がんの治療法選択には、腫瘍因子とともに肝予備能が重要である。このように、核酸アナログ製剤の普及とともに、肝予備能が改善したことが、近年、根治的治療により加療される患者の割合が増加している原因と考えられる。

E. 結論

本研究により、近年の HBV 関連肝がん患者の特徴として、女性の割合が増加している、肝予備能が保たれている、根治的治療により加療される割合が増加していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tonan T, Fujimoto K, Qayyum A, Kawaguchi T, Kawaguchi A, Nakashima O, Okuda K, Hayabuchi N, Sata M. Quantification of hepatic iron concentration in chronic viral hepatitis: usefulness of T2-weighted single-shot spin-echo echo-planar MR imaging. PLoS One. 2012;7:e33868.

2. 学会発表

- 1) Taniguchi E, Kawaguchi T, Ito M, Oriishi T, Sata M. Bioparameters Associated with the Incidence of Cognitive Dysfunction in Viral Cirrhotic Patients: a Data-mining Analysis. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA, 2012.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：中本 安成 福井大学医学部内科学(2)領域 教授

分担研究課題：B 型肝炎の再活性化と免疫病態に関する臨床的研究

研究要旨：免疫抑制・化学療法施行による B 型肝炎ウイルス（HBV）再活性化に関わる免疫動態の検討を目的として、各種の免疫抑制療法に伴う HBV 再活性化リスクを臨床的に評価し、個々の治療法における免疫抑制状態をサイトカインプロファイルの解析により免疫学的に検討した。また、HLA class II 領域の遺伝子多型と HBV 再活性化との関連を検討した。その結果、HBV 再活性化は R-CHOP・CHOP 療法、高容量ステロイド投与療法でリスクが高いことが示された。これらの治療では CD4⁺T 細胞機能が低下し、HBV 再活性化に関与しうると考えられた。また、HLA class II 遺伝子領域の SNP である rs9277535 が HBV 再活性化の宿主因子として係わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

免疫抑制・化学療法に伴う B 型肝炎ウイルス（HBV）再活性化の機序について、未だ十分に解明されていない点が多い。治療法により HBV 再活性化率が異なると報告されているが、個々の治療レジメンに特徴的な免疫抑制パターンを認識することで、そうした再活性化リスクが異なる原因の解明や、各治療における再活性化時期の特定につながると想定される。また、先天的な免疫応答の相違など、宿主要因が HBV 再活性化に関与する可能性も考えられる。そこで、HBV 再活性化に関わる免疫動態を検討する目的で、各種の免疫抑制・化学療法に伴う HBV 再活性化リスクを臨床的に評価し、個々の治療法における免疫抑制状況をサイトカインプロファイルの解析により免疫学的に検討した。また、宿主の HLA class II 領域の遺伝子多型と HBV 再活性化との関連を検討した。

B. 研究方法

免疫抑制・化学療法（ステロイドパルス療法、R-CHOP 療法、CHOP 療法、リツキシマ

ブ単独療法、メソトレキセート内服療法、インフリキシマブ療法）が施行された 797 例を対象とし、HBV 感染の測定率や感染状況、治療法別の再活性化率を検討した。また、R-CHOP 療法、CHOP 療法、ステロイドパルス療法がそれぞれ開始された 3 症例に対し、Bio-Plex™ Suspension Array System [Bio-Rad 社]により、27 項目のサイトカイン・ケモカインを経時的に測定し、上記の免疫抑制療法に伴う一般的なサイトカインプロファイルを検討した。そして、R-CHOP・CHOP 療法により寛解が得られた悪性リンパ腫症例 5 例についてもサイトカイン・ケモカインを同様に測定し、大腸腺腫に対する内視鏡的切除術が予定されている 20 例の対照と比較・検討した。さらには、免疫抑制・化学療法が施行され、48 週以上の経過観察が可能な HBV 既往感染症例から、HBV 再活性化群（9 例）と非再活性化群（10 例）を抽出し、HLA class II 領域の 24 個の SNPs に対し、GENECUBE® [TOYOBO 社]を用いた genotype assay を施行し、両群の相違を比較・検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分注意した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

1) 治療法別の、HBs 抗原・HBc 抗体の測定率は、CHOP・R-CHOP 療法などの血液疾患に対する治療では比較的高率であったが、その他の治療法での測定率は低くなる傾向がみられ、HBc 抗体の測定率で特に顕著な差が見られた。

2) 治療法別の HBV 感染状況について、HBs 抗原・HBc 抗体測定例のうち、約 20-50%が HBV キャリアまたは既往感染者であった。

3) 治療法別の HBV 再活性化状況において、R-CHOP 療法 2/101 例(2%)、CHOP 療法 2/45 例(4%)で治療開始後の DNA 陽転化を認めたが、その他の治療法では認められなかった。

4) 4 例の HBV 再活性化症例において、DNA 陽転化が確認された翌日から 15 日目に抗ウイルス薬が投与され、全例で HBV-DNA の陰性化が得られた。

5) R-CHOP が施行された悪性リンパ腫の症例において、寛解時(治療開始 29 週間後)に PDGF-BB、IL-1、IL-2、IL-4 の低下が認められた。

6) CHOP が施行された、HBV 感染既往のある悪性リンパ腫の症例において、寛解時(治療開始 18 週間後)に PDGF-BB、IL-1、IL-2、IL-4、IL-13 の低下が認められた。経過中、HBV 再活性化は認められなかった。

7) ステロイドパルス療法と免疫グロブリン投与が施行された、HBV 感染既往のある特発性血小板減少性紫斑病の症例では、HBV 再活性化が確認された治療開始 32 週間後の時点で、PDGF-BB、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8 の低下が認められた。

8) R-CHOP 療法、CHOP 療法、ステロイドパルス療法において、PDGF-BB、IL-2、IL-4 が共通して低下していることが確認された。

9) 化学療法で寛解した悪性リンパ腫 5 例

において、寛解時点での血清 IL-17 / IL-1 / G-CSF / IFN- の平均値はそれぞれ 123.1 / 3.7 / 96.0 / 194.1pg/ml であり、対照群の値 (IL-17 / IL-1 / G-CSF / IFN- =158.2 / 6.8 / 146.2 / 306.5pg/ml) に比べて有意に低値だった ($p < 0.05$)。他のサイトカイン・ケモカインにおいて、治療前後での有意な産生低下や対照群との相違はみられなかった。

10) HBV 再活性化群 (9 例) と非再活性化群 (10 例) の HLA class 領域の SNPs を解析した結果、rs977535 でのアデニン (A) とグアニン (G) の比率は両群で異なり、非再活性化群では有意に A の割合が高かった (再活性化群 14/18 [77.8%] vs. 非再活性化群 7/20 [35.0%], $p=0.42$)。その他の 23 個の SNPs において、両群で有意な差はみられなかった。

11) rs977535 の genotype assay において、HBV 再活性化群は AA genotype (55.6%) が多い一方で、非再活性化群の大部分が GG genotype (55.6%) だった。

D. 考察

本邦では現在、「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 (GL)」により、HBV 再活性化と de-novo 肝炎発症への予防が有効に施行されている。今回、各種の免疫抑制療法に伴う HBV 再活性化の状況を検討し、R-CHOP・CHOP 療法、ステロイドパルス療法でのみ再活性化を認めたことから、再活性化のリスクは治療法により異なる可能性が示された。現行の GL では、すべての免疫抑制・化学療法施行症例において同一のプロトコールが適応されているが、治療法別の対策を考慮する必要性が示唆された。

また、今回の研究で HBV 再活性化のリスクが高いと考えられた R-CHOP 療法、CHOP 療法、高容量ステロイド投与療法におけるサイトカインプロファイルを検討した結果、PDGF-BB、IL-2、IL-4 が共通して低下しており、これらの治療では Th1・Th2 免疫反応が部分的に抑制されている可能性が示唆さ

れた。また、HBV 再活性化が認められた時点においても PDGF-BB、IL-2、IL-4 の抑制が認められたことから、こうしたサイトカインが HBV 再活性化に関与している可能性も示唆された。

HBV 再活性化のリスクが高い、血液悪性疾患に対する R-CHOP・CHOP 療法施行例におけるサイトカインプロファイルを、免疫動態の異常がないと考えられる、大腸ポリープ切除予定の症例と比較・検討した結果、血液悪性疾患では寛解時点で対照群に比べて、血清 IL-17、IL-1、G-CSF、IFN- γ の有意な低下が認められた。これらのサイトカインは、Th1・Th2・Th17 細胞や、また CD4⁺T 細胞への抗原提示能を有するマクロファージから産生されることから、R-CHOP・CHOP 療法における免疫抑制には、Th1・Th2 以外にも CD4⁺T 細胞の全体的な機能低下が係わると考えられた。そのため、今後は血液悪性疾患における HBV 再活性化と CD4⁺T 細胞の関連を解析していく必要がある。

CD4⁺T 細胞が関与する免疫応答の起点となる HLA class II 分子の HBV 再活性化への関与にも注目した。長期間の免疫抑制・化学療法が施行された HBV 再活性化群と非再活性化群における、HLA class II 遺伝子領域の一塩基多型 (SNP) を比較した結果、rs9277535 は再活性化群で AA genotype が非再活性化群より多く、HBV 再活性化への関連が示唆された。

B 型肝炎再活性化の病態解明に対する免疫学的なアプローチにおいて、免疫抑制・化学療法におけるサイトカインプロファイルの長期的な解析の他に、宿主の遺伝子的背景の解析も加えた包括的な検討を継続する必要であると考えられた。

E. 結論

HBV 再活性化は、R-CHOP・CHOP 療法、高容量ステロイド投与療法でリスクが高いことが示された。これらの治療では CD4⁺T 細胞機能が低下し、HBV 再活性化に関与しうると考えられた。また、HLA class II 遺伝子領域の SNP である rs9277535 が HBV 再活

性の宿主因子として係わる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. *Mol. Clin. Oncol.* 2: 1028-1034, 2014 (査読あり)
- 2) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46: 497-504, 2014 (査読あり)
- 3) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 60: 1674-1685, 2014 (査読あり)
- 4) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 347-356, 2014 (査読あり)
- 5) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis

C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 21: 346-353, 2014(査読あり)

- 6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; 57: 1484-1497.
- 7) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013; 62: 1421-1430.
- 8) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the *Helicobacter pylori* dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 2012; 1: 127-135.
- 9) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 10) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3044-3054.
- 11) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 2012; 42: 523-542.
- 12) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and Tumor Lysate

Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One.* 2012; 7: e52926.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.
- 2) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4⁺ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 3) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 4) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.
- 5) Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Clinical evaluation of patency capsule system in high risk patients for video capsule

endoscopy. **Japan Digestive Disease Week 2013 (Tokyo)**; 一般; oral: Oct. 12, 2013.

- 6) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
- 7) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. **第63回 American**

Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.

H. 知的所得権の出願・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。

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)
平成 24 ~ 26 年度分担研究報告書

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

分担研究者:西口修平 兵庫医科大学内科学 肝胆膵科 教授

分担研究課題:非活動性キャリアと肝機能異常症例についての比較

研究要旨:HB_e抗体陽性患者かつ HBV-DNA が低値の場合には、本来無症候性キャリアとして経過するはずであるが、時に ALT 値の異常を示す症例が見受けられる。このような症例では HBV 感染以外の要素による肝障害の可能性が考えられる。今回は HB_e 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。脂肪肝での線維化進展予測の診断スコアである NAFIC score が高値を示す症例が高率であった。したがって HBV-DNA 低値の HB_e 抗体陽性

共同研究者

榎本平之 兵庫医科大学 肝胆膵

科 講師

値(31以上)の症例に関し、肝組織像やHBVマーカーを含めて昨年引き続き比較を行った。

B. 研究方法

兵庫医科大学で 2007 年以降に肝生検を施行した B 型慢性肝炎患者 197 例のうち、核酸アナログ製剤による治療歴のない HB_e 抗体陽性の 72 例をまず選定した。そのうち HBV-DNA が低値の症例 (5 Log copies/mL 以下)について、ALT 値が正常値(30 以下)の群と異常値(31 以上)の群とに分類し、その背景因子を検討した。また脂肪化の程度を含めた組織学的検討を行なった。また進行性の脂肪性肝疾患を診断する指標として報告された NAFIC score についても検討を行った。なお肝生検時に測定されていない項目に関しては保存血液を用いて測定しているが、

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス e 抗体陽性無症候性キャリアの予後は一般に良好と考えられてきたが、近年では HBV-DNA の上昇と肝機能障害を生じ、肝の線維化が進行してゆく症例があることが判明している。一方で e 抗体陽性患者かつ HBV-DNA が低値の場合には、本来無症候性キャリアとして経過するはずであるが、時に ALT 値の異常を示す症例が見受けられる。このような症例では HBV 感染以外の原因に起因する ALT の異常がもたらされている可能性があり、HB_e 抗体陽性無症候性キャリアの自然経過に影響を与えている可能性がある。

今回 HBV-DNA 低値の e 抗体陽性患者のうちで、ALT 値が正常値(30 以下)の症例と異常

本研究は倫理委員会の審査・承認を受けた研究の一環として行われており、全症例から血液および組織の検体の研究利用への同意を得ている。

C. 研究結果

昨年度の報告で示したように、肝生検を行った B 型慢性肝炎患者 197 例のうち、核酸アナログ製剤の治療歴のない HBe 抗体陽性者は 72 例であったが、そのうち HBV-DNA が低値の症例は (5 Log copies/mL 以下) 44 例であり、そのうち ALT 値が正常値 (30 以下) の例は 28 例、異常値 (31 以上) の例は 14 例であった。これらの症例について検討を行った (図 1)。

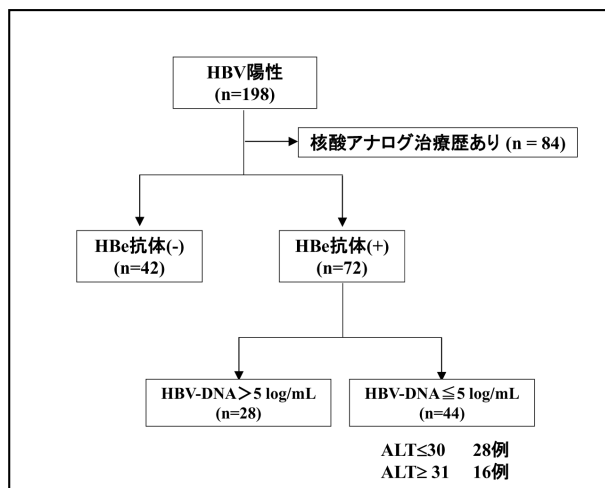


図 1: 肝生検施行 B 型慢性肝炎例

これら 2 群についての比較を示す (表 1)。

	ALT 31以上 (n=16)	ALT 31未満 (n=28)	P-value
年齢	48.4 ± 10.6	50.3 ± 11.2	NS
性別(Male/ Female)	11 / 5	14 / 14	NS
HBV-DNA(Log/mL)	3.18 ± 1.11	3.06 ± 0.91	NS
飲酒歴(なし/機会/常習)	7/ 6/ 3	13/ 5/ 10	NS
HBs抗原量 (IU/mL)	1267 (183-14200)	2991 (6.4- 36575)	NS
HBcr抗原量 (3.0未満/3.0-4.0/4.0以上)	11/ 3/ 1	21/ 4/ 3	NS
AST (IU/L)	36.5 (22-157)	22.5 (15-37)	<0.01
ALT (IU/L)	41.5 (31-251)	21 (8-30)	<0.01
γ-GTP (IU/L)	36 (12-159)	21 (7-73)	<0.05
ALP (IU/L)	178.5 (106-377)	192.5 (71-282)	NS
総ビリルビン (mg/dL)	0.8 (0.2-2.1)	0.75 (0.4-2.2)	NS
アルブミン (g/dL)	4.13 ± 0.45	4.01 ± 0.33	NS
血小板(x10 ⁹ /mm ³)	17.3 ± 3.8	19.7 ± 4.0	NS
Prothrombin time (%)	87.4 ± 10.1	92.1 ± 11.8	NS
F0-1/F2/F3/F4	13/ 1/ 1/ 1	17/ 9/ 2/ 0	NS
A0-1/A2/A3	11/ 5/ 0	27/ 1/ 0	<0.05
脂肪化(なし/軽/中/高)	12/ 3/ 1	26/ 1/ 1	0.09
BMI	24.8 ± 5.3	22.5 ± 3.2	<0.05
HOMA-R	1.75 (0.63-8.78)	1.15 (0.45-2.74)	<0.05
フェリチン	159 (7.3-685.0)	75.4 (2.5-231.0)	<0.01

表 1: HBe 抗体陽性かつ HBV-DNA 低値症例における臨床背景の比較

ALT 値の相違を反映して、AST・ALT・γ-GTP は、ALT 異常値群が有意に高値であった。一方で年齢や性別には 2 群間で有意な差はなく、また肝予備能を反映する総ビリルビン・アルブミン・プロトロンビン時間・血小板数にも有意な差は認められなかった。

組織学的検討では ALT 値の相違を反映して ALT 異常値群で有意に炎症所見である A 因子が高値であったが、HBV 関連マーカーについては HBV-DNA 量以外に HBs 抗原量や HBcr 抗原量にも有意な差はなく、ALT 値の差異に関する原因として HBV 自体の関与は低いと考えられた。

(表 1、図 2・3)。

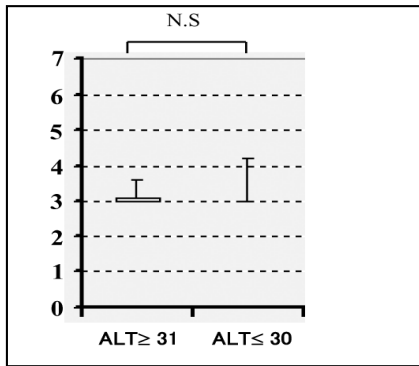


図2: HBe 抗体陽性症例における HBcr 抗原値

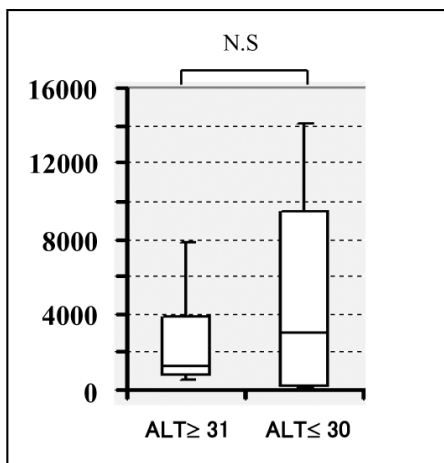


図3: HBe 抗体陽性症例における HBs 抗原値

肝炎ウイルス以外に起因する肝障害で最も頻度の高い疾患は、代謝異常を背景に発症する脂肪肝である。そこで組織学的に肝の脂肪化の程度について頻用される NAS (NAFLD Activity Score) に基づき、Grade 0 (<5%), Grade 1 (5-33%), Grade 2 (>33%-66%), Grade 3 (>66%) に分類して脂肪化の程度を評価したところ、Grade 2 以上の脂肪化を呈する症例の割合は、ALT31 以上の群では、ALT30 以下の群に比して有意に高率であった($P < 0.05$) (図 4)。

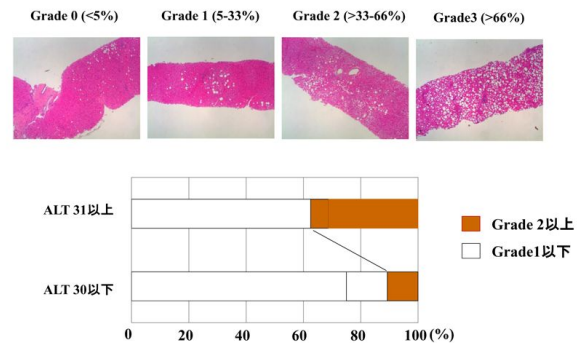


図 4: HBe 抗体陽性症例と肝脂肪化

そこで肝の脂肪化に関連する代謝関連の臨床データについて検討したところ ALT 上昇例では BMI、HOMA-R が有意に高値であり、また血清フェリチン値にも有意な上昇が認められた (図 5)。

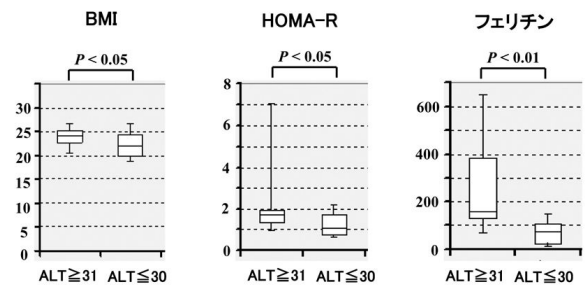


図 5: HBe 抗体陽性症例における肝脂肪化に関連した検査値

これらの結果から HBe 抗体陽性かつ血中 HBV-DNA 量が 5 Log copies/mL 以下にもかかわらず ALT 上昇を来している症例では肥満、インスリン抵抗性、鉄の過剰蓄積といった代謝異常の存在が疑われた。

脂肪肝には線維化が進行して予後に影響するタイプと、予後への影響の少ないタイプが存在

する。本来これらの鑑別は炎症や線維化の存在などにに基づき組織学的になされるべきであるが、HBV 感染の関与がある場合には容易ではない。そこで日本人の NAFLD を対象にして、代謝異常を指標に進行性の脂肪性肝疾患を診断する指標として報告された NAFIC score を用いて検討した。

NAFIC score は代謝異常(フェリチンが男性で300ng/mL以上、女性で200ng/mL以上の場合1点、IRIが10 IU/mL以上で1点)と肝線維化の存在(型コラーゲン7Sが5ng/mL以上で2点)を指標にするスコアリングである。進行性の経過をとる脂肪肝の診断能について、NAFIC score で Score1 以上では感度 88%、特異度 43%、陽性的中率 66%、陰性的中率 75%、一方で Score 2 以上では感度 67%、特異度 87%、陽性的中率 85%、陰性的中率 64%と報告されている。NAFIC score2 以上の症例の割合は、ALT 31 以上の群では ALT30 以下の群に比して有意に高値を示した(図 6)。

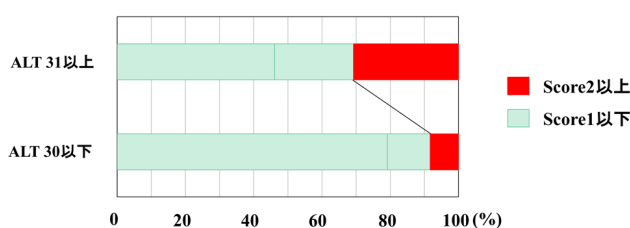


図 6: HBe 抗体陽性症例の NAFIC スコア

しかしながら線維化については HBV の影響があるため、代謝異常であるフェリチンと IRI の 2 項目のみでのスコア計算を行った。すると Score1 以上

(陽性的中率 66%)の症例の割合は、ALT 31 以上の群では ALT30 以下の群に比して高値であった(図 7)。

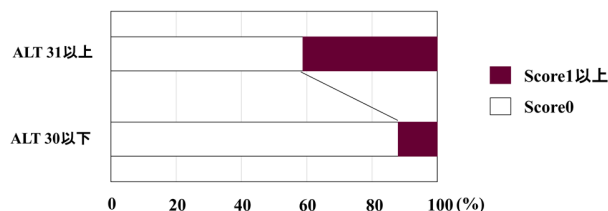


図 7: HBe 抗体陽性症例における NAFIC スコア項目の代謝異常

これらの結果から、HBe 抗体陽性かつ低ウイルス量症例でありながら ALT 上昇を来している症例の一部には、代謝異常に伴う進行性の脂肪肝が併存している可能性があると考えられた。

D. 考察

HBV-DNA 量が低値の HBe 抗体陽性者では通常は ALT 値が低値(30 以下)を示して、HBe 抗体陽性キャリアとなる。しかしながら実際には HBV-DNA が低値でありながら ALT 値が異常値(31 以上)を示す例がしばしば見受けられる。このような症例では、HBV 感染以外の要因による肝障害によって HBe抗体陽性無症候性キャリアの自然経過が影響される可能性があると思われる。そこでわれわれは HBV-DNA 低値の HBe 抗体陽性患者のうちで、ALT 値が正常値(30 以下)の症例と異常値(31 以上)の症例に関し、肝組織像や HBV マーカーを含めて比較を行った。

HBV 関連マーカーについては HBV-DNA 量以外に HBs 抗原量や HBcr 抗原量にも差がなく、ALT 値の差異に関する原因として HBV 自体の直接的関与は低いと考えられた。

一方今回の肝組織検体を用いた検討では、脂肪化の程度が強い(Grade2 以上)症例が、ALT 異常例では有意に高い頻度で認められた。さらに肝組織の脂肪化との関連が報告されているような代謝関連因子についての比較では BMI、HOMA-R に有意な差を認め、また血清フェリチン値にも有意な差が認められた。これらの結果から、HBe 抗体陽性症例のうち、HBV-DNA 低値にもかかわらず ALT 異常を来している症例では、肝の脂肪化とそれに伴うインスリン抵抗性や鉄の蓄積といった代謝異常が影響している可能性が考えられた。

肝組織の脂肪化と代謝異常については、これまでにも非アルコール性脂肪性肝炎や HCV 感染者で良く知られている。しかしながら HBV 感染者においては肝組織の脂肪化についての検討は少ない。最近 HBV 感染者における ALT 上昇の一因として脂肪肝の関与が報告された。しかしながら HBV 感染が存在するため、肝線維化進展における脂肪化の寄与の程度を確定することは困難である。今回の検討からは、ALT 上昇例では組織学的な脂肪化の存在と、組織に依存しない非侵襲的な診断スコアである NAFIC score 高値を示す症例が高率であった。したがって HBV-DNA 低値の HBe 抗体陽性者において、ALT 上昇例では進行性の経過

をとる脂肪肝の合併が自然経過に影響する可能性があると考えられた。

E. 結論

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検査値の比較を行った。ALT 上昇例には、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、進行性の脂肪肝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。HBV 感染者における肝脂肪化やそれに付随した代謝異常の検討や報告は少ないため、今後さらに臨床的な意義付けを行っていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Nishikawa H, Enomoto H, Saito M, Aizawa N, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, Kim SR, Hongo Y, Jyomura H, Nishida N, Kudo M, Osaki Y, Nishiguchi S. Treatment Response and Tolerability in Elderly Patients with Chronic Hepatitis C: Subgroup Analysis in ReGIT-J Study. J Virol Antivir Res 2014,3:2
2. Aizawa N, Enomoto H, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Thrombocytopenia in pegylated interferon

- and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2014; 49:1253-63.
3. Ikeda N, Imanishi H, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Yamamoto S, Hirota S, Kudo M, Arii S, Nishiguchi S. 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.* 2014; 44:829-36.
 4. Enomoto H, Inoue S, Matsuhisa A, Nishiguchi S. Dignosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis and an In Situ Hybridization Approach to Detect an “Unidentified“ Pathogen. *Int J Hepatol.* 2014; 2014: 634617
 5. Takashima T, Enomoto H, Ninomiya T, Kim SR, Okushin H, Sugano M, Imoto S, Yano Y, Ooka T, Seo Y, Kasugai H, Muramatsu A, Jomura H, Shimomura S, Shindo M, Nakamura H, Aizawa N, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. 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.* 2014; 44: 597-607.
 6. Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Hirota S, Fujimoto J, Nishiguchi S. New malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the Sonazoid contrast agent for ultrasonography. *J Gastroenterol.* 2014; 49:755-63.
 7. Enomoto H, Aizawa N, Nakamura H, Sakai Y, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Aoki T, Yuri Y, Yoh K, Hasahimoto K, Ishii A, Takashima T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, and Nishiguchi S. An Increased Ratio of Glycated Albumin to HbA1c Is Associated with the Degree of Liver Fibrosis in Hepatitis B Virus-Positive Patients. 2014; 2014: 351396.
 8. Nishiguchi S, Sakai Y, Kuboki M, Tsunematsu S, Urano Y, Sakamoto W, Tsuda Y, Steinmann G, Omata M. Safety and efficacy of faldaprevir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin in Japanese patients with chronic genotype-1 hepatitis C infection. *Liver Int.* 2014; 34:78-88.
 9. Iwata Y, Enomoto H, Sakai Y, Aizawa N, Tanaka H, Ikeda N, Takashima T, Ishii A, Hasegawa K, Yuri Y, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Elevation of the AST to ALT ratio in association with the severity of esophageal varices in patients with HCV-related compensated liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 60:149-52, 2013.
 10. Enomoto H, Sakai Y, Aizawa N, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Hasegawa K, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Association of amino acid imbalance with the severity of liver fibrosis and esophageal

- varices. *Ann Hepatol.* 12: 471-478, 2013.
11. Nishiguchi S, Enomoto H, Aizawa N, Nishikawa H, Osaki Y, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, Kim SR, Hongo Y, Jyomura H, Nishida N, Kudo M. 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; 48: 397-404.
 12. Kato J, Okamoto T, Motoyama H, Uchiyama R, Kirchhofer D, Van Rooijen N, Enomoto H, Nishiguchi S, Kawada N, Fujimoto J, Tsutsui H. Interferon-mediated tissue factor expression contributes to T cell-mediated hepatitis via induction of hypercoagulation in mice. *Hepatology.* 57: 362-72, 2013.
 13. Enomoto M., Nishiguchi S., Tamori A., Kobayashi S., Sakaguchi H., Shiomi S., Kim SR., Enomoto H., Saito M., Imanishi H., Kawada N. Entecavir and interferon- α sequential therapy in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol.*, 48:397-404, 2013
 14. Tani Y, Aso H, Matsukura H, Tadokoro K, Tamori A, Nishiguchi S, Yoshizawa H, Shibata H. Significant background rates of HBV and HCV infections in patient and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-HBc titres with high anti-HBs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections. *Vox Sang.* 102:285-93, 2012.
 15. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsunami H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. 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.* 42:139-149, 2012.
 16. Matsuda F, Torii Y, Enomoto H, Kuga C, Aizawa N, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Nakamura H, Tanaka H, Iijima H, Tsutsui H, Tanaka Y, Nishiguchi S. Anti-interferon- α neutralizing antibody is associated with nonresponse to pegylated interferon- α plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 19: 694-703, 2012.
 17. Tanaka H, Iijima H, Nouse K, Aoki N, Iwai T, Takashima T, Sakai Y., Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Nishiguchi S. Cost-effectiveness analysis on the surveillance for hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis patients using contrast-enhanced ultrasonography. *Hepatol Res.*, 42: 376-84, 2012.
 18. Aizawa N, Enomoto H, Imanishi H, Saito M, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Sakai Y, Takashima T, Iwai T, Moriwaki E,

Shimomura S, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S. Elevation of the glycosylated albumin to glycosylated hemoglobin ratio during the progression of hepatitis C virus related liver fibrosis. *World J Hepatol.*, 4: 11-7, 2012.

19. Sakai Y, Enomoto H, Aizawa N, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Takashima T, Takata R, Iwai T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S. Relationship between elevation of glycosylated albumin to glycosylated hemoglobin ratio in patients with a high bleeding risk of esophageal varices. *Hepatogastroenterology*. 59: 2280–4, 2012.

20. Bando Y, Kanehara H, Aoki K, Toya D, Notsumata K, Tanaka N, Enomoto H, Nishiguchi S, Nakasho K, Nakamura H, Kasayama S, Koga M. The glycosylated albumin to glycosylated haemoglobin ratio increases along with the fibrosis stage in non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Biochem.*, 49: 387–90, 2012.

学会発表

1. Enomoto H., Tsujimura T., Honda M., Nakano C., Hasegawa K., Takata R., Aoki T. Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Sakai Y., Aizawa N., Ikeda N., Iwata Y., Tanaka H., Saito M., Kaneko S., Iijima H., Nishiguchi S. The pivotal role of anti-angiogenic activity in the in vivo antitumor effects of type I interferon. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

2. Aizawa N., Nakano C., Hasegawa K., Takata R., Aoki T., Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Sakai Y., Ikeda N., Tanaka H., Iwata Y., Enomoto H., Saito M., Iijima H., Iimuro Y., Fujimoto J., Nishiguchi S. Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the hepatocarcinogenesis. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

3. Aoki T., Nishiguchi S., Nakano C., Hashimoto K., Ishii A., Takashima T., Aizawa N., Sakai Y., Ikeda N., Tanaka H., Iwata Y., Enomoto H., Saito M., Fujimoto J., Hirota S., Iijima H. Retrospective Cohort study for liver carcinogenesis prediction using VF map score: Virtual Touch Quantification (VTQ), Fasting blood glucose (FBG), male, age, platelet. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

4. Nakano C., Iijima H., Aoki T., Hashimoto K., Yoshida M, Ishii A, Takashima T., Aizawa N., Ikeda N., Tanaka H., Enomoto H., Saito M., Hirota S., Nishiguchi S. Factors influencing liver stiffness in chronic liver disease. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014) Boston, USA, 2014

5. Aizawa N, Enomoto H, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N,

Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Iijima H, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. The mitochondrial gene abnormalities and sustained pathological alterations in the liver after hepatitis C virus eradication. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington

6. Tanaka H, Iijima H, Yoshida M, Nakano C, Hashimoto K, Ishii N, Aoki T, Yuri Y, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Nishiguchi S, Nakano M. Usefulness and challenges associated with the spleen stiffness via Virtual Touch Quantification for the prediction of liver fibrosis. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington
7. Tanaka H, Iijima H, Nishimura J, Nakano C, Hashimoto K, Ishii N, Yuri Y, Aoki T, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Nishiguchi S. Spleen stiffness accurately predicts esophageal varices in patients with chronic liver disease regardless of the presence of portosystemic collaterals. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD2013) 2013.11 Washington.
8. Enomoto M, Tamori A., Kobayashi S, Sakaguchi H, Kawada N, Nishiguchi S, Enomoto H, Saito M, Imanishi H. Entecavir versus lamivudine in sequential

therapy followed by interferon in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD2012) 2012.11 Boston

9. Tamori A, Kawada N, Tani Y, Aso H, Matsukura H, Fujino K, Nishiguchi S. Prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections; JRC NAT Screening Research. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2012) 2012.11 Boston
10. Okamoto T, Fujimoto J, Okamoto T, Kato J, Tsutsui H, Nishiguchi S. Interferon γ -mediated tissue factor expression contributes to T cell-mediated hepatitis via induction of hypercoagulation in mice. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2012) 2012.11 Boston
11. 石井昭生、榎本平之、高嶋智之、西口修平、ペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬の三剤併用療法の治療効果と抗インターフェロン中和抗体の影響に関する検討(シンポジウム 2:ウイルス性肝炎治療の実際と工夫)日本消化器病学会近畿支部第 101 回例会、大阪、2014
12. 高嶋智之、榎本平之、西口修平、ペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法の成績と抗 IFN 中和抗体の効果に関する検討(パネルディスカッ

- ション 1:C 型肝炎治療の新展開と到達点)、第 18 回日本肝臓学会大会(JDDW2013)、神戸、2014
13. 榎本平之、齋藤正紀、西口修平、HBV 陽性者における肝脂肪化と代謝マーカーの検討における肝脂肪化と代謝マーカーの検討(ワークショップ 8:生活習慣と肝病態の変遷:明日の肝臓病学に向けて)、第 18 回日本肝臓学会大会(JDDW2014)、神戸、2014
 14. 會澤信弘、榎本平之、西口修平。血小板低値・C 型慢性肝疾患の IFN 療法における脾摘・PSE の適応。第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3. 鹿児島
 15. 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-。第 49 回 日本肝臓学会総会 2013.6. 東京
 16. 榎本平之、坂井良行、西口修平。PEG-IFN- α ・リバビリン・テラプレビル の 3 剤併用療法における抗インターフェロン抗体測定の意味。第 49 回日本肝臓学会総会 2013.6 東京
 17. 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-IFN 2a 療法の検討。第 17 回日本肝臓学会大会。(JDDW2013)2013.10 東京
 18. 岸野恭平、高嶋智之、石井紀子、中野智景、由利幸久、青木智子、楊和典、石井昭生、橋本健二、坂井良行、會澤信弘、岩田一也、池田直人、田中弘教、岩田恵典、榎本平之、齋藤正紀、飯島尋子、西口修平。短期間のステロイド投与により HBV 再活性化をきたした一例。第 40 回日本肝臓学会西部会。2013.12 岐阜
 19. 榎本平之、松田二子、西口修平。インターフェロン治療の難知性に関する宿主因子の検討:抗インターフェロン抗体について。第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4 東京
 20. 榎本大、西口修平、田守昭博、小林佐和子、坂口浩樹、塩見進、金守良、榎本平之、齋藤正紀、今西宏安、河田則文。HBeAg 陽性 B 型肝炎に対する IFN sequential 療法中の HBcrAg、HBsAg の変化と核酸アナログ中止の可能性。第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸
 21. 岡本共弘、内山良介、西口修平、筒井ひろ子。Concanavalin A 重症肝炎の責任病態である肝局所 DIC における、IFN /STAT1 に依存した組織因子発現誘導の重要性。第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸
 22. 久家千沙、松田二子、榎本平之、由利幸久、長谷川国大、岩井孝史、石井昭生、高嶋智之、坂井良行、會澤信弘、岩田一也、池田直人、田中弘教、岩田恵典、齋藤正紀、今西宏安、飯島尋子、西口修平。C 型肝炎における IFN- α 中和抗体発現と IFN- α 有用性の検討。第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸

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

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長・消化器科部長

分担研究課題：ALT 正常 HBe 抗原陰性例の長期予後と肝発癌

研究要旨：わが国では過去40年間にB型肝炎由来の肝細胞癌による死亡者数は減少していない。HBe抗原陰性例の核酸アナログによる治療適応が不十分であった可能性があり、HBe抗原陰性例の経過を把握することは重要な課題である。当院におけるHBe抗原陰性慢性肝炎症例からの肝発癌を後ろ向きに解析した。全体では5年6.2%、10年12.6%の肝発癌がみられた。ALTで層別解析をすると40 IU/L以上の場合に有意に発癌率が高かった。HBVDNA量が多いほどALT値が上昇しやすく、とくにHBVDNAが4.0 log copies/ml以上でALTの上昇がみられた。逆に治療を必要としないキャリアを見分けることも必要であり、一般検査によって非活動性キャリアと判断できる判別方法を検討した。ALT 31 IU/L未満で、肝生検を施行した48例では、F2～F4が18例でF0,F1は30例であり、inactive carrierと考えられる例が86.3%であった。AFP 4.0ng/ml未満で血小板数16.5万/μl以上の64例(55%)が全例inactive carrierであった。当科を初診したALT 31IU/L未満例の自然経過での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上昇しないことに関与する因子はALT 30IU/L以下とHBs抗原量が100 IU/ml未満が有意であった。HBs抗原100 IU/ml未満かつALT 30IU/L以下が1年持続すれば、ALT上昇は極めてまれで、これに合致する例が全体の25%であった。HBs抗原陰性化は5年 5.1%、10年 18.7%にみられた。HBs抗原陰性化にはHBVDNA 4.0 log copies/ml未満でALT値が持続的に30 IU/L以下の場合には有意に高率であった。HBs抗原陰性化は初回HBs抗原 100 IU/mLの例で13.6%にみられ有意に高率であった。HBs抗原陰性化は、HBe抗原陰性例では50歳以上、HBs抗原100 IU/mL未満、非活動性キャリアで高率に達成されていた。

A. 研究目的

HBe 抗原陰性例での発癌リスクを解析して、有効な肝癌防止対策を講じる必要がある。前向き検討が研究班全体で行われているが、当院においてHBe 抗原陰性症例を後ろ向きに解析して、肝発癌に関与する因子を検討した。また、初診時HBe 抗原陰性のB型肝炎キャリアのうち経過観察してもよい症例と肝硬変や肝癌に進行する症例があり、肝生検を行わないでこれを判別できることが重要である。初診時にALTが正常である症例について、自然経過でALT値が上昇する症例の特徴とHBs抗原が陰性化する例の特徴を解析した。また、経過観察してHBs抗原の低下速度を検討し、治療介入が必要でないHBe抗原陰性例の特徴について解析した。

B. 研究方法

当院に通院して経過観察が行われているHBe抗原陰性のHBキャリアを集計して、肝発癌リスクの解析を行った。さらに、ALT値が上昇しやすい症例の特徴を明らかにするため、HBVDNA量、コ

ア関連抗原量、HBs抗原量と肝発癌の関連性を解析した。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ALT43 IU/L以下の155例で、抗ウイルス療法を施行していない例を対象とした。経過観察中ALTが43 IU/Lの異常値に上昇した例は26例(16%)にみられ、HBs抗原陰性化は14例(9%)にみられた。また、自然経過でのHBs抗原陰性化に関与する因子を解析した。年齢、HBVDNA量とHBs抗原の観察時と経過中の低下率について解析した。これらの解析から、初診時の簡便な検査によって治療介入が必要でない症例の特徴を把握することを目的とした。

（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うえで臨床試験を

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。

C. 研究結果

当院で経過観察を受けている406例のHBe抗原陰性のB型肝炎キャリアを経過観察したところ、3年発癌率は4.6%、5年が6.2%、10年で12.6%であった。これを平均ALTで層別解析すると、ALT値が40 IU/Lを超える場合に肝発癌率が高かった。しかし、40 IU/L以下の症例を、平均ALT値30 IU/Lに分けて解析すると、30 IU/L未満の例で発癌率が低かった。HBVDNA量が4.0 log copies/ml以上の症例で解析すると、HBs抗原が100 IU/ml未満の例がALT上昇が少なく、1000 IU/ml以上の場合にALT値の上昇例が多かった。

肝生検を施行した48例では、F2~F4が18例でF0,F1は30例であった(図1左)。これに、1年以上経過観察して3回以上ALT値が持続して30 IU/L以下の症例をinactive carrierとすると、86.3%になった。(図1右)

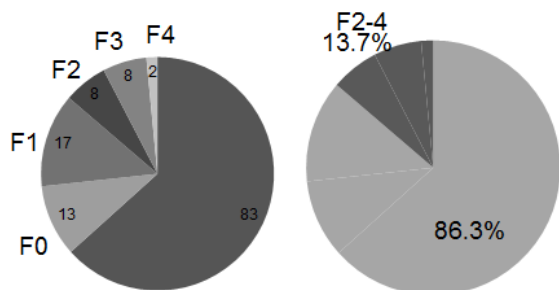


図1. HBe抗原陰性例で初診時ALTが30 IU/L以下の症例で肝生検を施行した症例の分布(左)とF2~F4以外の症例の比率(右)

そこでF2~F4の18例と、F0,F1およびALT持続正常のinactive carrier 113例の臨床背景を比較した。有意差がみられたのはAST, ALT値と血小板数、FIB-4 index、APRIスコア、フェトプロテイン(AFP)値であった。

観察開始時のALT値が30 IU/L以下であった場合にはALT上昇は少なく、また1年間の経過観察でALT

30 IU/Lが持続した場合には、その後ALTが上昇する例は7.5%で有意差がみられた(表1)。

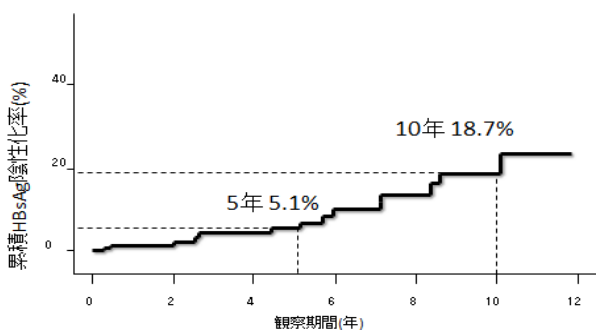
表1. 観察開始時のALT値と経過中のALT上昇

観察開始時ALT値	ALT上昇頻度	P value
Baseline ≤ 30 vs 31-43	13.6% vs 46.7% (19/140) (7/15)	0.001
Baseline~1年間 ≤ 30 vs 31-43	7.5% vs 47.2% (9/119) (17/36)	<0.0001

これにHBs抗原量を加えて解析すると、ALT 30 IU/L以下でHBs抗原が100 IU/mLの場合には、ALT上昇する例は2.5%であった。そこで、観察開始時から1年間のALT 30 IU/L以下かつHBs抗原100 IU/mL未満の例では、それ以外の例に比較して有意にALTの上昇の頻度が低かった(表2)。

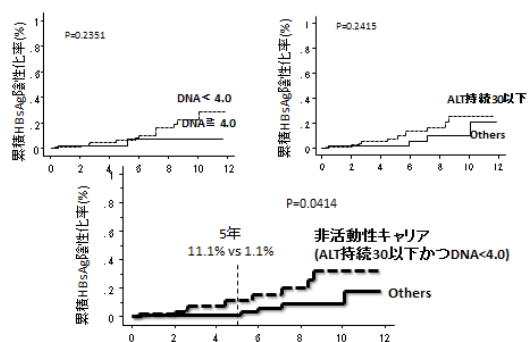
Baseline ALT & HBs抗原量	ALT上昇頻度	
Baseline~1年間ALT ≤ 30 & HBsAg < 100	2.5% (1/39)	p=0.005
Others	21.5% (25/116)	

次に初診時ALTが基準値内のHBe抗原陰性例について、累積HBs抗原陰性化について解析した。累積HBs抗原陰性化は、5年5.1%、10年18.7%にみられた(図2)。



た(図2)。

さらにHBVDNA量別ではHBVDNAが4.0 log copies/ml未満の例でHBs抗原が陰性化しやすく、ALTが持続30 IU/L以下の例でHBs抗原が陰性化しやすかった。そこでALTが持続30 IU/LかつHBVDNA 4.0 log copies/ml未満の例と、それ以外を比較すると前者で5年のHBs抗原陰性化が11.1%であったのに対して、それ以外では1.1%で、有意差がみられた(図3)。



D. 考察

HBe抗原陰性例の経過観察を行い、平均ALT値とALT最高値の両者が肝発癌に関連していることが判明した。HBVDNA量が低い場合に、経過中ALT値が上昇する因子を解析したところ、HBs抗原量とコア関連抗原量のいずれもが関係していた。

HBe抗原陰性で初診時に血清ALTが31 ng/mlの症例では、経過中にHBVの増殖がおこり肝炎が再燃して慢性肝炎が進行し、肝硬変や肝癌を発症する症例がある。そのため、適応がある場合には肝生検を行って肝癌への進行を防止するための

治療が必要になる症例がある。初診時ALT値が正常であった場合に、予後を予測し肝生検が必要な症例を見極めることが必要である。一方、進行するリスクが少ない症例では、肝生検を行わずに経過観察をしていく例もある。そこで、積極的介入が必要ではない症例を、一般検査で判別できる方法について解析した。初診時HBe抗原陰性で、ALT値が正常の例ではAFP値が4.0ng/ml未満、かつ血小板数16.5万/μl以上の場合には慢性肝炎である率が極めて低く、経過観察してもよいと考えられる。

しかし、どちらか1つを満たさない場合には肝生検を行うか、慎重な経過観察が必要であると考えられる。

E. 結論

HBe抗原陰性のB型肝炎では、ALT値が低い場合に肝発癌率が低かった。HBs抗原量の低値を維持することが、肝機能安定化と肝発癌の抑制に役立つと考えられた。

初診時ALT 31 IU/L未満のHBe抗原陰性のHBVキャリアでは、血清AFP 4.0 ng/L未満かつ血小板数16.5万/μl以上の場合には、肝生検を行わずに経過観察して可と考えられる。AFP値と血小板数が判別に有用である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2013;43:596-604.

(2) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56:602-8.

(3) Kurosaki M, Tsuchiya K, Nakanishi H,

Itakura J, Izumi N. Serum HBV RNA as a possible marker of HBV replication in the liver during nucleot(s)ide analogue therapy. J Gastroenterol 2013;48:777-8.

(4) 泉並木. ウイルス性肝炎の治療の進歩 日本内科学会雑誌 2012;101:2681-2689.

(5) 泉並木 新しい B 型肝炎の治療 NHK テレビテキスト きょうの健康 2013.9 P34 ~ 38 NHK 出版 2013/8/21

2. 学会発表

1) 泉並木: 未治療および前治療無効の C 型慢性肝炎患者における Daclatasvir と Peginterferon Alfa-2b/Ribavirin または Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin との併用 第 48 回日本肝臓学

会総会 シンポジウム 2 金沢 2012.6

2) 泉並木: 肝細胞癌に対する内科的局所治療の進歩 第 48 回日本肝臓学会総会シンポジウム 3 金沢 2012.

3) 黒崎雅之, 泉並木 臨床背景の評価に基づく C 型肝炎の治療選択 第 48 回日本肝臓学会総会ワークショップ 7. C 型肝炎治療の新たな展開 S10-9 東京 2011.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

特記すべきことなし。

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：今関文夫・千葉大学総合安全衛生管理機構・教授

分担研究課題：HBe 抗体陽性キャリアの長期経過

研究要旨：HBe抗体陽性キャリアの長期経過をHBV DNA量、ALT値別に検討した。2002年から2005年に当院消化器内科を受診し、1年超経過観察可能であったHBe抗体陽性キャリア198例を観察開始1年間のHBV DNA量、ALT値によりA群（N=68）：HBV DNA<4 log copies (LC)/ml、ALT≤30 IU/l、B群（N=31）：HBV DNA<4 LC/ml、ALT>30 IU/l、C群（N=35）：HBV DNA≥4 LC/ml、ALT≤30 IU/l、D群（N=64）：HBV DNA≥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。HBs抗原陰性化は、A群16例（24%）、B群6例（19%）、C群4例（11%）、D群2例（3%）で、観察開始時のHBs抗原量、HBV DNA量低値が有意な因子であった。核酸アナログ投与例は、A群0例、B群0例、C群7例、D群16例であった。ALT>80 IU/lかつHBV DNA≥4 LC/mlのALT再燃と考えられた症例は、A群0例、B群0例、C群5例（14%）、D群33例（52%）であった。B群はA群と比べ観察開始時のBMIが有意に高値であり、肥満に関連した脂肪肝の関与が推察された。A群68例の1年以後の経過を見るとHBV DNA<4 LC/mlかつALT≤30 IU/lを持続したのは35例（51%）で、HBV DNA≥4 LC/mlに変動した17例（25%）は観察開始時のHBV DNA量が有意に高値であった。非活動性キャリアと考えられたA群症例の予後は良好であるが、肝硬変症例を確実に鑑別する必要がある。

A. 研究目的

HBe 抗原陰性非活動性キャリアは、1 年以上の観察期間のうち3回以上の血液検査において、HBe 抗原陰性、ALT≤30 U/l、HBV DNA<4 log copies/ml の3条件すべてを満たす症例と日本肝臓学会のガイドラインで定められている。今回、無治療のHBe抗体陽性キャリアの長期経過を後向きに検討し、特にガイドラインで定義されている非活動性キャリアと考えられる症例の生命予後、肝発癌、肝炎増悪の有無を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2002年から2005年に千葉大学医学部附属病院消化器内科を受診したHBe抗体陽性キャリアのうち1年超経過観察可能であった198例を対象とした。観察開始1年間のHBV DNA量、ALT値によりA群（N=68）：HBV DNA<4 log copies (LC)/ml、ALT≤30 IU/l、B群（N=31）：HBV DNA<4 LC/ml、ALT>30 IU/l、C群（N=35）：HBV DNA≥4 LC/ml、ALT≤30 IU/l、D群（N=64）：HBV DNA≥4 LC/ml、ALT>30 IU/lの4群に分けた。中央値

7.6年間（1.2～9.1年）後ろ向きに調査し、生命予後、肝発癌、肝炎増悪の有無、核酸アナログ治療の有無、HBs抗原陰性化に関して検討した。HBV DNA 定量はアンプリコア法（log copies/ml）、HBsAg 定量はCLIA法（IU/ml；Sysmex社）、HBcrAgはCLEIA法（LogU/ml；富士レビオ社）にて行った。本研究は後ろ向き観察研究で対象患者に不利益、危険性はなく、千葉大学医学部倫理委員会の承認も得ており、倫理的に問題はない。

C. 研究結果

死亡例は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。A群、B群に死亡例は見られなかった。

肝発癌9例の内訳は、A群1例、B群0例、C群2例、D群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。発癌に寄与する有意な因子は、肝硬変（リスク比 39.019、 $p=0.0058$ ）、AFP値（リスク比 1.046、 $p=0.0322$ ）であった。

経過中にALT>80 IU/lかつHBV DNA≥4 LC/ml

の ALT 増悪と考えられた症例は、A 群 0 例、B 群 0 例、C 群 5 例 (14%)、D 群 33 例 (52%) で A 群には見られなかったが、観察開始時に HBV DNA<4 LC/ml かつ ALT≤30 IU/l の 93 例では、その後の経過中に上記 ALT 増悪を 3 例 (3%) に認めた。

核酸アナログ投与例は、A 群 0 例、B 群 0 例、C 群 7 例、D 群 17 例であった。

HBs 抗原陰性化は、A 群 16 例 (24%)、B 群 6 例 (19%)、C 群 4 例 (11%)、D 群 2 例 (3%) に認められ、観察開始時の HBs 抗原量、HBV DNA 量低値が有意な因子であった。

B 群は A 群と比べ観察開始時の HBV DNA 量に差はなく、AST 値、ALT 値以外に BMI (24.4 vs 21.4, $p=0.02$)、G-GTP 値 (32 vs 16, $p<0.0001$) が有意に高値であり、腹部超音波検査施行例では B 群が A 群に比べ脂肪肝の割合が有意に高く (45% vs 17%, $p=0.0093$)、肥満に関連した脂肪肝の関与が推察された。

A 群 68 例の 1 年以後の経過を見ると HBV DNA<4 LC/ml かつ ALT≤30 IU/l を持続したのは 35 例 (51%) で、HBV DNA≥4 LC/ml に変動した 17 例 (25%) は観察開始時の HBV DNA 量が有意に高値であった (2.6 vs 3.1, $p=0.0008$)。

D. 考察

千葉大学医学部附属病院消化器内科における HBe 抗体陽性キャリアの長期予後を検討したところ、日本肝臓学会のガイドラインで定められている HBe 抗原陰性非活動性キャリアの定義を満たすと考えられた A 群 68 例に死亡例はなく、肝発癌が 1 例認められたが肝硬変の症例であった。肝発癌 9 例中 2 例を除いて背景肝は肝硬変であり、非活動性キャリアの診断には肝線維化の評価が非常に重要であると考えられた。ALT>80 IU/l かつ HBV DNA≥4 LC/ml の ALT 増悪症例は、A 群には認められなかったが、観察開始時のワンポイントで HBV DNA<4 LC/ml かつ ALT≤30 IU/l の 93 例では、その後の経過中に上記 ALT 増悪を 3 例 (3%) に認めたことから、HBe 抗原陰性非活動性キャリアを 1 年間の経過で判定する日本肝臓学会のガイドラインは妥当と考えられた。

HBV DNA<4 LC/ml かつ ALT>30 IU/l の B 群症例の多くは脂肪肝が原因と考えられ、今後増加する可能性があり注意が必要である。また、この群にも肝硬変が含まれており消化管出血で死亡していることから肝硬変の鑑別は重要である。

E. 結論

日本肝臓学会のガイドラインに基づき HBe 抗体陽性非活動性キャリアの予後は良好であるが、肝硬変症例を確実に鑑別する必要がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 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*. 2014;15:21455-21467.
- 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: 92-100.
- 3) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir against virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. *Int J Med Sci*. 2013; 10: 647-652.

- 4) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci.* 2013; 10: 567-574.
- 5) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 2012; 206: 415-20.
- 6) Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 24: 414-418.
- 7) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci.* 2012; 9: 27-32.
2. 学会発表
- 1) 今関文夫、新井誠人、神田達郎、藤原慶一、太和田暁之、横須賀収。HBe 抗原陰性非活動性キャリアの長期経過。第 100 回日本消化器病学会総会（2014 年東京）A338
- 2) 今関文夫、新井誠人、神田達郎、藤原慶一、太和田暁之、横須賀収。HBe 抗体陽性無症候性キャリアを診断する予測因子の検討。第 49 回日本肝臓学会総会（2013 年、東京）A214
- H. 知的所得権の出願・登録状況
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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

分担研究者：白澤浩 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学 教授

分担研究課題：HBV 増殖メカニズムに関する検討

研究要旨：

- (1) 肝炎ウイルス増殖機構を解析するための in vitro 実験系を構築した。
- (2) 免疫抑制薬に対する HBV 再活性化について解析した。
- (3) エピジェネティック標的薬剤のスクリーニングにより HBV 産生に対する影響を解析し、候補薬剤を得た。
- (4) HBV 増殖がエピジェネティックな制御を受けていることを支持する結果を得た。
- (5) 肝炎ウイルスにおける塩基多様性について Ultra Deep Sequence(UDS)を用いた塩基配列解析法を構築した。
- (6) UDS 法では Sanger 法で検出困難な Minor 変異を定量的に確認できた。また塩基多様性について詳細な検討が可能であった。
- (7) UDS 法により核酸アナログ製剤使用の HBV 慢性持続感染者において通常の耐性変異の他にも、これまでに耐性との関連が明らかにされていない Minor 変異が存在することを確認した。
- (8) 核酸アナログ製剤治療期間中に塩基多様性の変化が認められ、治療経過や耐性変異出現との関連が示唆された。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎においては、無症候性キャリアの経過中特発的に、あるいは免疫抑制剤などの使用によりウイルスの再活性化が起こることが問題となっている。HBV は肝細胞核内において supercoil 構造の cccDNA として存在しておりここからのウイルス複製は epigenetic な制御を受けている可能性がある。本研究ではこの観点から in vitro の実験系においてウイルス増殖の制御機構について検討を行うこととした。

B. 研究方法

1) HBV 増殖メカニズムに関する in vitro の検討として epigenetic な制御機構に関する基礎的な検討を行った。

2) B 型肝炎キャリアのウイルス遺伝子の特徴を明らかにし、病態との関連について解析、核酸アナログ製剤反応不良例におけるウイルス遺伝子の特徴について検討した。

3) 凍結保存ヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植したヒト肝細胞キメラマウス (Tateno et al 2004) より、肝細胞を分離、単層培養した新鮮ヒト肝細胞 (PXB cell) を用いて HBV を感染後薬剤処理し 1 週、2 週およびそれ以降の培養上清中 HBV DNA を測定 (Taqman qPCR)、Control 処理と比較した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の使用については当施設倫理委員会の承認および患者の承諾を得て研究を行っている。実験動物は使用していない。

C. 研究結果

HepG2.2.15 細胞や初代培養細胞等を用いた *in vitro* 実験系が HBV 感染のモデルとして機能することを確認し、この系を用いてヒストンアセチル化阻害薬などの epigenetic 関連薬剤が HBV 複製および細胞に与える影響について基礎的結果を得た。HBV 塩基多様性について Ultra Deep Sequence(UDS)を用いた塩基配列解析法を構築した。UDS 法では Sanger 法で検出困難な Minor 変異を定量的に確認でき、また塩基多様性について詳細な検討が可能であった。UDS 法により核酸アナログ製剤使用の HBV 慢性持続感染者において通常の耐性変異の他にも、これまでに耐性との関連が明らかにされていない Minor 変異が存在することを確認した。核酸アナログ製剤治療期間中に塩基多様性の変化が認められ、治療経過や耐性変異出現との関連が示唆された。キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系において核酸アナログ製剤、インターフェロン製剤に対する感受性を確認しおよそ 50 種の阻害剤のスクリーニングを行った。そのうちヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が HBV 増殖に影響する薬剤候補として選択された。ウイルスの増殖や蛋白量に与える影響を評価した。ある種の HDAC 阻害剤では核酸アナログ投与下においても HBV 増殖抑制効果を示した。薬剤の細胞障害性を解析し適切な濃度を検討した。

D. 考察

UDS はウイルス遺伝子の解析において有用な方法と考えられた。キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞単層培養系は感染効率、再現性が高く HBV 感染に対する多数の薬剤の影響を評価する方法として有用と考えられた。HBV 増殖におけるエピジェネティックな制

御機構の存在が示唆され今後詳細な機序の解明が必要と考えられる。

E. 結論

HBV 増殖はエピジェネティックな制御をうけている可能性が示唆され、治療標的としての可能性について今後更なる検討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. Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 206:415-420, 2012.

2. Mori K, Hayashi Y, Akiba T, Nagano M, Tanaka T, Hosaka M, Nakama A, Kai A, Saito K, Shirasawa H, Multiplex real-time PCR assays for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 2012

3. 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 Nov 21;15(11):21455-67. doi:

10.3390/ijms151121455.

4. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, Shirasawa H, Kiyohara T, Ishii K, Wakita T, Okamoto H, Yokosuka O. Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus. *PLoS One.* 2014 Jul 7;9(7):e101993. doi:

10.1371/journal.pone.0101993.

5. Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 21;20(11):2902-12.

2. 学会発表

1. 齋藤 謙悟、蟻 瑞栄、趙莎莎、椎葉正史、鵜澤一弘、丹澤秀樹、白澤 浩 (2012) シスプラチン体制障害剤含有腫瘍標的リポソームの効果、第71回日本癌学会学術総会.

2. 趙莎莎、元 清華、蟻瑞栄、齋藤謙悟、白澤 浩 (2012) シンドピス・レプリコン 3' -UTR の腫瘍融解活性への関与、第71回日本癌学会学術総会.

3. 中本晋吾、呉霜、神田達郎、姜霞、宮村達雄、新井誠人、藤原慶一、今関文夫、齋藤謙悟、白澤浩、横須賀收 (2012) HCV G1 症例におけるウイルス特異的障害剤耐性変異に関する検討 第 16 回日本肝臓学会大会

4. Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Makoto Arai, Keiichi Fujiwara, Kengo Saito, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Osamu

Yokosuka. The association between DEPDC5 polymorphism and the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2012, Nov 9-13, Boston, MA, USA

(7) 齋藤謙悟、蟻瑞栄、趙莎莎、椎葉正史、鵜澤一弘、丹澤秀樹、白澤浩 (2013) PDE 障害剤含有腫瘍標的リポソームの効果、第72回日本癌学会学術総会.

(8) 菅波晃子、柴田さやか、齋藤謙悟、岩立康男、佐伯直勝、白澤浩、田村裕 (2013) リポソーム化したリン脂質修飾型インドシアニングリートの作製と物質特性、第72回日本癌学会学術総会.

(9). 蟻瑞栄、趙莎莎、齋藤謙悟、中本晋吾、白澤浩 (2013) シンドピスウイルスの複製と細胞周期、第 61 回日本ウイルス学会学術集会.

(10) 中本晋吾、呉霜、神田達郎、姜霞、宮村達雄、新井誠人、藤原慶一、今関文夫、齋藤謙悟、白澤浩、横須賀收 (2013) B 型慢性肝炎核酸アナログ製剤反応不良例に対する Ultra Deep Sequence の解析、第 49 回日本肝臓学会総会

(11) Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Makoto Arai, Keiichi Fujiwara, Kengo Saito, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Osamu Yokosuka. Prevalence of resistance mutations against NS5A inhibitors in DAA-treatment-naïve patients infected with HCV G1 in Japan. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Liver Week 2013

(12) Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang

Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Chiaki Nakaseko, Osamu Yokosuka. Reactivation of hepatitis B after hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy. The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2013)

(13) Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Masato Nakamura Tatsuo Miyamura, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa,

Chiaki Nakaseko, Osamu Yokosuka. Hepatitis B reactivation after hematopoietic stem cell transplantation for hematologic diseases. 23rd Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver (2014)

H. 知的所得権の出願・登録状況

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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

研究協力者：西澤 勉 自治医科大学 感染・免疫学講座 ウイルス学部門・非常勤講師
研究分担者：岡本宏明 自治医科大学 感染・免疫学講座 ウイルス学部門・教授

分担研究課題：e 抗体陽性無症候性キャリアに於ける HBV ゲノム解析

研究要旨：e 抗体陽性無症候性キャリアの病態はよく分かっていない。ウイルス側からの解明を目的として、症例毎に10個ずつの全長HBVゲノムクローンの塩基配列を決定し、それらの *in vitro*での増殖能を劇症肝炎症例由来のものと比較することによって解析した。まず、クローン毎に全長塩基配列を決定するために、inverted long-distance PCRによりHBV ゲノムのほぼ全長を効率よく増幅し、クローン化して塩基配列を決定する系とPrimers 領域を補完する系と合わせて完全長のHBVゲノムの塩基配列を決定できる系を確立した。e 抗体陽性無症候性キャリア症例を用いた解析結果では、P遺伝子やpreS1/preS2/S遺伝子領域を中心に各種点変異や挿入・欠失変異が多数検出され、劇症肝炎症例由来のHBVに比べ多様性に富んでいることを確認した。次に、得られた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、肝癌由来の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。その結果、無症候性キャリア由来のHBV株の *in vitro*での増殖能は、予測通り、劇症肝炎由来の株より低いことを明らかにすることができた。これには、同じprecore変異株(G1896A)であっても、無症候性キャリア由来株ではpregenome RNAを含む3.5 kb mRNAの転写レベルが劇症肝炎由来株に比べて低いこと、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。

A. 研究目的

e 抗体陽性無症候性キャリア由来の HBV では挿入や欠失、フレームシフト変異、点変異等による様々な変異株が存在するのに対して、同じ e 抗体陽性でも活動性の場合の HBV は defective な変異が少ないことを報告してきた (Horikita et al. J Med Virol, 44: 96-103, 1994)。しかし、このデータは HBV ゲノムをいくつかの断片に分けて塩基配列を解析することによって得られたものであった。

そこで本研究では、HBV の全長ゲノムクローンの解析を簡便に行うことができる系と増殖能を比較できる *in vitro*の実験系を確立し、e 抗体陽性無症候性キャリア症例と、対照として劇症肝炎から 10 クローンの全長配列を決定し、増殖能を比較することによって、e 抗体陽性無症候性キャリアの病態をウイルス側から解明することを最終目的とした。

B. 研究方法

本研究で用いた検体は、e 抗体陽性の無症候性キャリア症例に由来する 4 検体 (ASC1, ASC2, ASC3, ASC4) で、解析に用いた時点での HBV DNA タイターはそれぞれ 5.4×10^3 、 5.7×10^3 、 3.1×10^5 および 6.5×10^2 copies/ml であった。一方、対照検体として用いた劇症肝炎症例 (FH) のタイターは 1.10×10^{11} copies/ml であった。すべて genotype/subgenotype は C/C2 であった。

HBV ゲノムのほぼ全長を増幅するための inverted long-distance PCR 系 (near-full PCR) は、Günther らの方法 (J Virol 69(9): 5437-5444, 1995) に、Primers の配列、PCR polymerase および PCR 条件等に改良を加えた。

Near-full PCR 産物のクローニングは、制限酵素で消化後、プラスミドベクター pBluescript II SK に連結し、*E. coli* DH5 にトランスフォーム

して行った。症例ごと、10個のHBVクローンの塩基配列を決定した。本法によって、全長3,215塩基長のうち98%に相当する連続した3,154塩基長の配列情報を得ることができる。また、Primers領域を補完するPCR産物(両末端のprimer配列を除いて756塩基長)については、Taq Polymerase (TaKaRa Bio) で3'末端にAを付加後、pMD20 T-vector (TaKaRa Bio) に連結、クローン化後、塩基配列を決定した。両PCR産物のオーバーラップ部位が100%一致することを確認し、3,215塩基からなる完全長のHBVゲノム配列とした。

本増幅系の信頼性は、検体FHからクローン化したゲノム(プラスミドDNA: 10^2 copies相当)を鋳型として上述の解析を2回行った結果、99.99%であり、極めて高いことが判明した。

in vitro 増殖能を解析するために、HBVの1.3倍長ゲノム(nt 1073-3215/1-2067)の構築は、HuJLら(J Virol Methods 161(1):63-9, 2009)とGüntherらの方法(J Virol 69(9): 5437-5444, 1995)を改良して行い、プラスミドベクターpBluescript II SKの制限酵素認識部位KpnIとNotIの間に挿入し作製した。Hepatoma cell line, HepG2/C3A細胞(ATCC CRL-10741)へのトランスフェクションは2.5 µgのDNAをTransIT-LT1試薬(Mirus)を用いて行った。トランスフェクション後、2日後に洗浄、4日目に培地の半量を交換し、6日目に培養上清全量採取、RNA抽出、そして細胞内HBV複製中間体解析のための細胞の回収を行った。

細胞上清中のHBV DNA量は、50 µlの上清を5 unitsのDNase I (TaKaRa Bio) で処理後、核酸抽出キット(SMITEST EX-R&D; G&G Science)で得たDNAをreal-time PCR (Hepatology Res 24: 8-7, 2002)に供して決定した。HBVの細胞内複製中間体の検出は、Inoueらの方法(Virology, 395:202-209, 2009)にしたがって調製した細胞内のHBV DNAをSouthern blotで行った。HBV mRNAの検出は、TRIzol (Life Technologies)を用いて細胞から調製したtotal RNA (1 µg)をNorthern blottingで行った。

(倫理面への配慮)

HBVが由来する検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. e抗体陽性無症候性キャリアおよび劇症

肝炎より分離されたHBV各10クローンの解析

e抗体陽性無症候性キャリア症例ASC2から得られた10クローンには種々の点変異、欠失、挿入等があり、すべてdefective mutantであった。

e抗体陽性無症候性キャリア症例ASC1、ASC3、ASC4、そして劇症肝炎症例FHから分離された各HBVの10クローン間の全長塩基配列とP、preS1/preS2/S、preC/CおよびX遺伝子の塩基配列の相同性(%)を比較した結果、e抗体陽性無症候性キャリア症例由来のHBVのクローン間の塩基配列の相同性は、劇症肝炎症例のHBVより低く、バラツキも大きいことから、劇症肝炎のようなHBVが活発に増殖をしているような場合に比し、HBVのクローン間の多様性が大きいことを確認した。

2. HBVクローンの*in vitro*増殖能

*in vitro*での増殖能を解析するために用いたASC1およびASC3症例から各3クローン、ASC4症例から2クローンと、対照とする劇症肝炎症例から1クローンは全てPC mutant (G1896A)であった。劇症肝炎症例から単離されたHBVはcore promoter mutant (A1762G/G1764A)であり、かつprecore mutant (G1896A)であったが(これをm/mと表記)、これを鋳型にして3種類の変異クローン[FH(m/w), FH(w/m), FH(w/w)]を作製した。各クローンの1.3倍長のHBVゲノムをHepG2/C3A細胞にトランスフェクトし、4日と6日目の培養上清中に産生されたHBV DNA量を調べた。m/m型のASC3由来の3クローンおよびASC4由来の2クローンのHBV産生量は対照とする劇症肝炎株FH(m/m)よりも低く、w/m型のASC1由来の3クローンのHBV産生量は対照のFH(w/m)クローンよりも著しく低かった。

3. Northern blottingによるHBV mRNAの検出

HBVから転写されるmRNAを解析するためにトランスフェクション後6日目の細胞からtotal RNAを抽出し、Northern blot解析を行った。3.5 kb, 2.5 kb, 2.1 kbおよび0.7 kbの4種類のHBV mRNAが検出された。pregenome RNA (pgRNA)を含む3.5 kb mRNAの量は、ASC由来株では何れも劇症肝炎FH(m/m)株よりも低かった。ASC1由来のクローンでは3.5 kb mRNA量は、ASC3やASC4由来のクローンに比べ大きな差はないが、培養上清中に産生されるHBV DNA量は顕著に低かった。

4. Southern blottingによるHBV複製中間体の検出

トランスフェクション後、6日目の細胞内core particle-associated HBV DNAをSouthern blotting法で検出した。細胞内HBV DNAの複製中

間体、relaxed circular (RC)、double-stranded linear (DL)、そして single-stranded (SS) DNA が明瞭に検出された。ASC3 と ASC4 由来のクローンの細胞内 HBV DNA の総量は対照とする FH(m/m) より低かった。ASC1 由来の 3 クローンではいずれも対照より低く、特に 2 クローンでは検出限界以下であった。

D. 考察

本研究において、これまで低タイターであるために全長ゲノムのクローン化が困難とされてきた e 抗体陽性無症候性キャリアから HBV 全長クローンを単離する系を確立し、1.3 倍長の HBV クローンの *in vitro* での増殖能の検討を可能にすることが出来た。その結果、e 抗体陽性無症候性キャリア 4 症例の 10 個ずつの HBV クローンは、対照とした劇症肝炎株より多様性に富んでいることを明らかにすることが出来た。その変異のパターンは deletion や insertion によりゲノム長に多様性が認められる症例と、ゲノム長は 3,215 塩基長と同じでありながら配列に多様性が認められる症例に分けられた。そして、e 抗体陽性無症候性キャリア症例から単離された HBV クローンの HepG2/C3A での増殖能は、予想通り対照とする劇症肝炎由来株よりも低いことが判明した。e 抗体陽性無症候性キャリア由来の HBV 株では pgRNA を含む 3.5 kb mRNA の転写量が低いこと、そして、core promoter や precore 以外のゲノム領域の変異が e 抗体陽性無症候性キャリアでの低ウイルス増殖能に寄与していると考えられた。様々な変異が関わっている可能性が想定されるが、その同定が e 抗体陽性無症候性キャリアの病態をウイルス側から追及するうえで今後の課題として重要である。

E. 結論

本研究によって、e 抗体陽性無症候性キャリア由来の HBV ゲノムは、劇症肝炎由来の HBV ゲノムよりも多様性に富むことを確認した。また、*in vitro* での増殖能は同じ precore 変異株(G1896A)でありながら、劇症肝炎株よりも低いことが確かめられた。これには、e 抗体陽性無症候性キャリア由来の株では劇症肝炎株に比べ pgRNA を含む 3.5 kb mRNA の転写レベルが低いこと、そして core promoter や precore 以外のゲノム領域の様々な変異が寄与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Kamitsukasa H, Iri M, Tanaka A, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Spontaneous reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in patients with resolved or occult HBV infection. J Med Virol 87:589-600,2015
- (2) Mawatari S, Uto H, Moriuchi A, Tabu K, Muromachi K, Tabu E, Oda K, Imanaka D, Oshige A, Nakazawa J, Kumagai K, Tamai T, Okamoto H, Tsubouchi H, Ido A. Horizontal transmission of de novo hepatitis B between spouses: A case report. Hepatol Res oi: 10.1111/hepr.12422. [Epub ahead of print].
- (3) Okamoto D, Nakayama H, Ikeda T, Ikeya S, Nagashima S, Takahashi M, Sugai Y, Okamoto H. Molecular analysis of the interspousal transmission of hepatitis B virus in two Japanese patients who acquired fulminant hepatitis B after 50 and 49 years of marriage. J Med Virol 86:1851-60, 2014
- (4) 相川達也、杉山弘明、添田敦子、池澤和人、佐藤力、津田文男、上野ちさと、岡本宏明. 水戸地域における B 型肝炎ウイルスの遺伝子型分布の変遷(2001 ~ 2013 年). 肝臓 55(10):626-9, 2014
- (5) Takagi H, Hoshino T, Naganuma A, Koitabashi E, Uehara S, Sakamoto N, Kudo T, Ryusaki K, Kakizaki S, Okamoto H. Drug induced hypersensitivity syndrome by triple therapy of peginterferon alpha2b, ribavirin and telaprevir in patient with double positive for HBV and HCV. Hepato-gastroenterology 60:1557-60, 2013
- (6) Minekawa T, Takehara S, Takahashi M, Okamoto H. Development of a highly sensitive bioluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B virus surface antigen capable of detecting divergent mutants. Clin Vaccine Immunol 20(8):1255-65, 2013
- (7) 相川達也、津田文男、上野ちさと、間宮 孝、杉山弘明、添田敦子、池澤和人、長嶋茂雄、高橋雅春、岡本宏明. 配偶者間及び同性愛者間で認められた B 型肝炎ウイルス A2 型株感染. 肝臓 54(6):373-80, 2013

H. 知的所得権の出願・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