

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

B 型肝炎の核酸アナログ薬治療における drug free を目指した

インターフェロン治療の有用性に関する研究

(H24-肝炎-一般-003)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中榮司

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

・ 総括研究報告	
B 型肝炎の核酸アナログ薬治療における drug free を目指した インターフェロン治療の有用性に関する研究 (信州大学 田中 榮司)	1
・ 分担研究報告	
1 . B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン単独療法の有用性 (名古屋市立大学 新海 登)	14
2 . エンテカビル投与継続症例における肝発癌抑制効果 (大阪大学 平松直樹)	18
3 . 核酸アナログ中止を目指した sequential 療法後の再燃例の検討 (虎の門病院 鈴木 義之)	20
4 . 核酸アナログ治療例における肝発癌に関わる因子の検討 (長崎医療センター 八橋 弘)	25
5 . B 型慢性肝炎治療における核酸アナログ中止時の PEG-IFN 2a 投与による drug free と HBs 抗原量の検討 (兵庫医科大学 西口 修平)	28
6 . HBV 感染者に対するインターフェロンの効果 (広島大学 柘植 雅貴)	37
7 . B 型肝炎に対するペグインターフェロンによる核酸アナログ薬中止の検討 (千葉大学 神田 達郎)	43
8 . RESET study 登録症例における HBs 抗原量の推移について (手稲溪仁会病院 姜 貞憲)	46
9 . Peg-interferon Sequential 治療の効果 (武蔵野赤十字病院 黒崎 雅之)	51
10 . B 型慢性肝炎における核酸アナログ中止症例の検討 (東海大学 峯 徹哉)	54
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	59
・ 研究成果の刊行物・別刷	64

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

総括研究報告書

B型肝炎の核酸アナログ薬治療における drug free を目指した
インターフェロン治療の有用性に関する研究 (H24-肝炎-一般-003)

研究代表者 田中榮司 信州大学医学部内科学第二 教授

研究要旨：本研究班では、NUC 中止に際し IFN または Peg-IFN をシークエンシャルに併用することの有
用性およびその効果予測因子を後向きおよび前向きに検討することを目的とする。2014 年度は、後向
き研究の成績をまとめるとともに、前向き研究では Peg-IFN 投与終了時点までのデータで中間解析を行
った。

NUC/IFN シークエンシャル治療の後向き研究では、NUC 終了時に通常型 IFN を 4 週間併用し、さらに
20 週間 IFN 単独で投与した。効果判定は IFN 投与終了後 24 ヶ月の時点で行い、HBV DNA <4.0 log
copies/ml、ALT <30 IU/L、HBeAg 陰性 3 条件を満たすものを著効とした。対象とした 50 例の背景では、
年齢の中央値は 35 歳と比較的若く、男性が 3/4 を占めた。NUC の投与期間中央値は 6 ヶ月と比較的短
く、IFN へ切替時の NUC は LVD が 80%を占めた。著効と関連する因子の多変量解析では、IFN 開始時の
HBs 抗原量 <3.0 log IU/ml (OR = 17.7、P = 0.002) と HBcr 抗原量 <4.5 log U/ml (OR = 15.0、P =
0.003) の二つが有意の因子として抽出された。IFN 投与終了後の経過観察期間において、ALT と HBV DNA
の最高値が 24 ヶ月著効と有意に関連していた。すなわち、ALT 値は 128 IU/l 以上となることが非著効
を予測する有意な因子 (AUC = 0.839、P < 0.001) であり、HBV DNA 量は 4.5 log copies/ml 以上にな
ることが非著効を予測する有意な因子 (AUC = 0.868、P < 0.001) であった。ALT 値が 128 IU/l 以上にな
った時点を再燃とすると、IFN 終了後 6 ヶ月までは再燃が高頻度であり、その後は比較的低頻度とな
った。以上のことから、NUC/IFN シークエンシャル治療において、IFN へ切替時の HBs 抗原量と HBcr
抗原量はシークエンシャル治療の導入を判断する指標になる可能性が示唆された。また、同治療の効果
判定は、治療終了後の少なくとも 6 ヶ月以降に行うべきである。

NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療の前向き研究のプロトコールは大きく A 群と B 群に分かれ、A 群
では NUC 中止直後に Peg-IFN を投与し、B 群では中止後肝炎が再燃した時点で Peg-IFN の投与 (B-1)
か NUC 薬の再投与 (B-2) を行う。全例 Peg-IFN 2a を使用し、基本的に 180 µg/日で 48 週間投与とし
た。登録期間内に合計 146 例が登録され、A 群が 104 例、B 群が 42 例であった。2014 年度は、10 月の
時点で Peg-IFN の 48 週投与が終了した A 群の 83 例を対象に、NUC から Peg-IFN 投与へ切り替えた後、
Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量の低下速度に関連する因子を検討した。対象とした 83 例の背景因子では、
年齢中央値は 44 歳と後向き研究に比較して 9 歳高齢であるが、性別は同様に男性が多かった。NUC 投
与期間の中央値は 5.6 年と長く、使用 NUC も LVD 単独は少なく、LVD+ADV、ETV 単独、ETV+ADV が主であ
った。Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量の推移は、切替時の HBs 抗原量が 3.6 log IU/ml 以上の症例では経
過中ほとんど変化しなかったのに対し、3.6 log IU/ml 未満の症例では比較的急速に低下する症例が少
なからずみられた。HBs 抗原量が Peg-IFN 投与終了時に 2.0 log IU/ml になる低下速度を ROC 解析した
結果より、HBs 抗原量が年間 0.56 log IU/ml 以上低下する症例を急速低下例と定義した。この急速低
下例の予測因子の多変量解析では、Peg-IFN へ切替時の Factor X 量 ≥ 15.0 pg/ml (OR = 8.6、P = 0.005)
と HBs 抗原量 <3.0 log IU/ml (OR = 6.4、P = 0.006) が有意の因子として算出された。Peg-IFN へ切
替時の HBs 抗原量が高値例 (≥ 3.6 log IU/ml) では、Factor X の低値例、高値例とも急速低下例はな
かったのに対し、HBs 抗原の非高値例 (<3.6 log IU/ml) では、Factor X の高値例 (57%、8/14) で低
値例 (18%、7/40) に比較して有意 (P = 0.012) に HBs 抗原急速低下例が多い傾向がみられた。Peg-IFN
へ切替時の Factor X 量の分布をみると、Cut-off 値として用いた 15.0 pg/ml を境に 2 峰性の分布を示
した。また、使用する核酸アナログの種類により Factor X 量が明らかに異なっていた。以上のことよ
り、NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療において、Peg-IFN へ切替時の HBs 抗原量低値と Factor X 量高
値が Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量急速低下を予測する有意の因子であり、HBs 抗原消失を目指す治療の
指標となる可能性が示唆された。Peg-IFN の安全性評価では、副作用による中止が解析可能であった
100 例中 7 例にみられた。副作用の内容はこれまでの報告と明らかな差はなかった。

《研究分担者》

新海 登

名古屋市立大学病院 臨床研究医

平松 直樹

大阪大学大学院医学系研究科 講師

鈴木 義之

虎の門病院肝臓センター 医長

八橋 弘

長崎医療センター臨床研究センター センター長

西口 修平

兵庫医科大学 教授

柘植 雅貴

広島大学自然科学研究支援開発センター 助教

神田 達郎

千葉大学大学院医学研究院 講師

姜 貞憲

手稲溪仁会病院消化器病センター 主任医長

黒崎 雅之

武蔵野赤十字病院 部長

峯 徹哉

東海大学医学部 教授

《研究協力者》

松本 晶博

信州大学医学部附属病院 准教授

向坂 彰太郎

福岡大学医学部 教授

奥瀬 千晃

聖マリアンナ医科大学 病院教授

榎本 大

大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

津田 泰宏

大阪医科大学 講師

山本 和秀

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

日野 啓輔

川崎医科大学 教授

上野 義之

山形大学医学部 教授

齊藤 聡

横浜市立大学附属病院 准教授

宮瀬 志保

くまもと森都総合病院 医長

佐々木 裕

熊本大学大学院 教授

榎本 信幸

山梨大学医学部 教授

高口 浩一

香川県立中央病院 診療科長

A. 研究目的

核酸アナログ(NUC)は抗ウイルス効果に優れ、B型慢性肝炎の治療に広く用いられているが、B型肝炎ウイルス(HBV)を完全に駆除することはできない。このため、同薬を安易に中止すると肝炎が再燃する。一方、インターフェロン(IFN)治療ではdrug freeとなることが期待されるが、著効例が少ないことが問題である。我々はこれまでNUCを単純に中止することのリスクを検討してきたが、単純中止できる症例の比率は低く、効率的な中止には積極的な治療介入が必要と考えられた。本研究班ではNUCの中止に際しIFNまたはPeg-IFNをシークエンシャルに併用することの有効性、およびその効果予測因子を後向きおよび前向きに検討することを目的とする。最終年度となる2014年度は、後向き研究はその成績をまとめるとともに、前向き研究ではPeg-IFN投与終了時点までのデータで中間解析を行った。H26年度中に最終効果判定はできなかったが、中間解析でHBs抗原量低下と関連する新規因子を明らかにした。

B. 研究方法

1) NUC/IFN シークエンシャル治療の後向き研究

シークエンシャル治療の後向き研究では、NUC終了時に通常型IFNを4週間併用し、さらに20週間IFN単独で投与した(図1)。効果判定はIFN投与終了後24ヶ月の時点で行い、図1に示す3条件を満たすものを著効とした。また、効果判定までにNUCの再投与を必要とした症例は非著効とした。

2) NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療の前向き研究

シークエンシャル治療の前向き研究(RESET研究)では、プロトコルを2012年1月10日にUMIN登録し、2012年2月1日から2013年12

月 31 日まで症例登録を行った(図 2)。プロトコール(図 3)は大きく A 群と B 群に分かれ、A 群では NUC 中止直後に Peg-IFN を投与し、B 群では中止後肝炎が再燃した時点で Peg-IFN の投与(B-1)か NUC 薬の再投与(B-2)を行う。全例 Peg-IFN 2a を使用し、基本的に 180 µg/日で 48 週間投与とした。登録期間内に合計 146 例が登録され、A 群が 104 例、B 群が 42 例であった。2014 年度は、10 月の時点で Peg-IFN の 48 週投与が終了した A 群の 83 例を対象に、特に HBs 抗原量の推移に注目して中間解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部倫理委員会および当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1) NUC/IFN シークエンシャル治療の後向き研究

対象とした 50 例の背景を表 1 に示した。年齢の中央値は 35 歳と比較的若く、男性が 3/4 を占めた。NUC の投与期間中央値は 6 ヶ月と比較的短く、切替時の NUC は LVD が 80%を占めた。

24 ヶ月著効例と非著効例の背景因子を表 2 に比較した。NUC 投与期間は著効例で長い傾向がみられた。IFN 投与終了後の観察期間が非著効例で短いのは、NUC が再投与された時点で観察を打ち切ったためである。24 ヶ月効果判定前の NUC 再投与は、非著効例で約半数にみられた。24 ヶ月効果判定後の NUC 再投与は、著効例で 1 例のみであり極めて低率であった。ALT 値および HBV マーカーの比較では(表 3)、HBe 抗原は NUC 開始時、IFN 開始時、IFN 終了時とも著効例で有意に陽性率が低かった。HBV DNA 量は IFN 終了時のみが有意であり、HBs 抗原量と HBcr 抗原量は IFN 開始時と終了時に有意の差がみられた。多変量解析(表 4)では IFN 開始時 HBs 抗

原量 $<3.0 \log \text{ IU/ml}$ (OR = 17.7, P = 0.002) と IFN 開始時 HBcr 抗原量 $<4.5 \log \text{ U/ml}$ (OR = 15.0, P = 0.003) の二つが有意の因子として抽出された。IFN 開始時の HBs 抗原量と HBcr 抗原量が両者とも基準値以上の 23 例では著効となる症例はなかったが、どちらか一方が基準値以下となる 27 例では 18 例(67%)が著効であった。また、両者とも基準値以下の症例は、今回は含まれていなかった。

IFN 投与終了後の経過観察期間中において、ALT と HBV DNA の最高値が 24 ヶ月著効と有意に関連していた(図 4)。すなわち、ALT 値は 128 IU/l 以上となることが非著効を予測する有意な因子(AUC = 0.839, P < 0.001)であり、HBV DNA 量は 4.5 log copies/ml 以上になることが非著効を予測する有意な因子(AUC = 0.868, P < 0.001)であった。図 5 は ALT 値が 128 IU/l 以上になった時点を再燃と判定した場合の非再燃率の推移を示したものである。IFN 終了後 6 ヶ月までは再燃が高頻度で有り、その後は比較的低頻度となった。

2) NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療の前向き研究

RESET 前向き研究の中間解析では、NUC から Peg-IFN 投与へ切り替えた後、Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量の低下速度に関連する因子を検討した。対象とした 83 例の背景因子を表 5 に示した。年齢中央値は 44 歳と後向き研究に比較して 9 歳高齢であるが、性別は同様に男性が多い。NUC 投与期間の中央値は 5.6 年と長く、使用 NUC も LVD 単独は少なく、LVD+ADV、ETV 単独、ETV+ADV が主であった。

Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量の推移を NUC から Peg-IFN へ切替時の HBs 抗原量別にみると(図 6)、切替時の HBs 抗原量が 3.6 log IU/ml 以上の症例では経過中ほとんど変化しなかったのに対し、3.6 log IU/ml 未満の症例では比較的急

速に低下する症例が少なからずみられた。HBs 抗原量が Peg-IFN 投与終了時に 2.0 log IU/ml になる低下速度を ROC 解析した結果より、HBs 抗原量が年間 0.56 log IU/ml 以上低下する症例を急速低下例と定義した。この急速低下例の予測因子の多変量解析では、Peg-IFN へ切替時の Factor X 量 ≥ 15.0 pg/ml (OR = 8.6、P = 0.005) と HBs 抗原量 < 3.0 log IU/ml (OR = 6.4、P = 0.006) が有意の因子として算出された(表 6)。Peg-IFN へ切替時の HBs 抗原量が高値例 (≥ 3.6 log IU/ml) では、Factor X の低値例、高値例とも急速低下例はなかったのに対し、HBs 抗原の非高値例 (< 3.6 log IU/ml) では、Factor X の高値例 (57%、8/14) で低値例 (18%、7/40) に比較して有意 (P = 0.012) に HBs 抗原急速低下例が多い傾向がみられた(図 7)。Peg-IFN へ切替時の Factor X 量の分布を図 8 に示した。Cut-off 値として用いた 15.0 pg/ml を境に 2 峰性の分布を示した。また、使用する核酸アナログの種類により Factor X 量が明らかに異なっていた。

Peg-IFN の安全性評価では、副作用による中止が解析可能であった 100 例中 7 例にみられた(表 7)。副作用の内容はこれまでの報告と明らかかな差はなかった(表 8)。Peg-IFN の減量は好中球減症と血小板減少によるものであった。

D. 考察

NUC 治療の単純中止においては、HBe 抗原陰性かつ血中 HBV DNA が陰性であることが必要条件で、さらに HBs 抗原量と HBcr 抗原量が低値であると中止後の再燃が少ないことが知られている。今回、NUC/IFN シークエンシャル治療の後向き検討でも同様の成績であり、効果予測に HBs 抗原量と HBcr 抗原量の測定が有用であることが明らかになった。両抗原量とも基準値以下の症例はなかったが、少なくとも一方が基準値以下の症例では 67%が著効となっており、IFN をシー

クエンシャルに併用することの有用性が示唆された。今後、IFN または Peg-IFN 併用の効果は前向き試験でさらに確認する必要はあるが、今回の後向き検討の結果は一つの指標になると考えられた。

NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療の前向き RESET 研究は、治療終了後 48 週の結果が出るまで後 1 年を要するため、今回は A 群の症例を対象に、HBs 抗原の動きに注目して中間解析を行った。この結果、Peg-IFN 投与中の HBs 抗原量急速低下例を予測する因子として Peg-IFN へ切替時の HBs 抗原量と Factor X 量が重要であることが明らかになった。HBs 抗原量はこれが高値のうちは低下しにくく、今回の検討では 3.6 log IU/ml 以上の症例に急速低下例はなかった。Factor X は既知のサイトカインの一種であるが、現在、特許申請中のためこの様に呼称している。微量に存在する物質であり、CLEIA 法で測定し単位は pg/ml で表示する。大変興味ある点は、投与する NUC の種類により反応性が異なることであり、この理由については今後の重要な検討課題である。結果によっては、シークエンシャル治療を行う前に NUC の種類を考慮することも考慮する必要が生ずる。いずれにしろ、今後、B 型肝炎のシークエンシャル治療を考える上で Factor X は重要な指標になる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療において、中等症以上の副作用の出現は 10%程度で、全てこれまで報告されたものであることから、安全性に大きな問題は無いと考えられた。

E. 結論

1. NUC/IFN シークエンシャル治療において、IFN へ切替時の HBs 抗原量と HBcr 抗原量が著効を予測する有意の因子であり、両抗原量はシークエンシャル治療の導入を判断する根拠になる可能性が示唆された。

2. NUC/IFN シークエンシャル治療において、治療終了後の少なくとも6ヶ月以降に効果判定を行う必要がある。
3. NUC/Peg-IFN シークエンシャル治療において、Peg-IFNへ切替時のHBs抗原量低値とFactor X量高値がPeg-IFN投与中のHBs抗原量急速低下を予測する有意の因子であり、HBs抗原消失を目指す治療の指標となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 松本晶博、西口修平、田中榮司：B型慢性肝炎の核酸アナログ/Peg-IFN シークエンシャル治療における短期効果の検討(シンポジウム1)。第18回日本肝臓学会大会、神戸市、2014
- 2) 松本晶博、梅村武司、田中榮司：B型慢性肝炎の核酸アナログ中止におけるPeg-IFNシークエンシャル投与の安全性と効果(シンポジウム2)。第50回日本肝臓学会総会、東京、2014

2. 論文発表

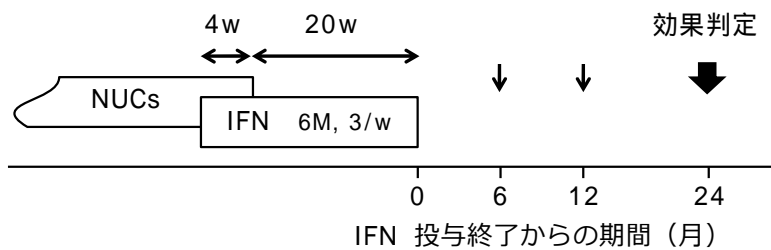
1. Matsumoto A, Yatsunashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E: Factors associated with the effect of interferon-sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol 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* 2015; 21: 541-548.
3. Tanaka E, Matsumoto A: Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleoside/nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2014; 44: 1-8.
4. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M: New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449.
5. 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. *Hepatol Res* 2014; 44: E172-180.
6. 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 2014; 44: E45-53, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究班からの出願・登録はない。



著効例の定義

1. HBV DNA < 4.0 log copies/ml
2. ALT < 30 IU/L
3. HBeAg 陰性

図1 研究のデザイン (後向き研究)

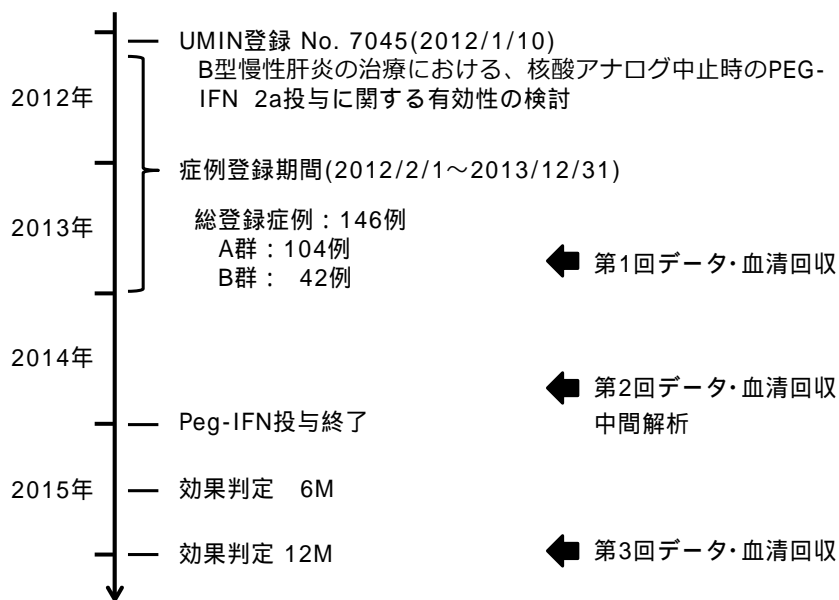
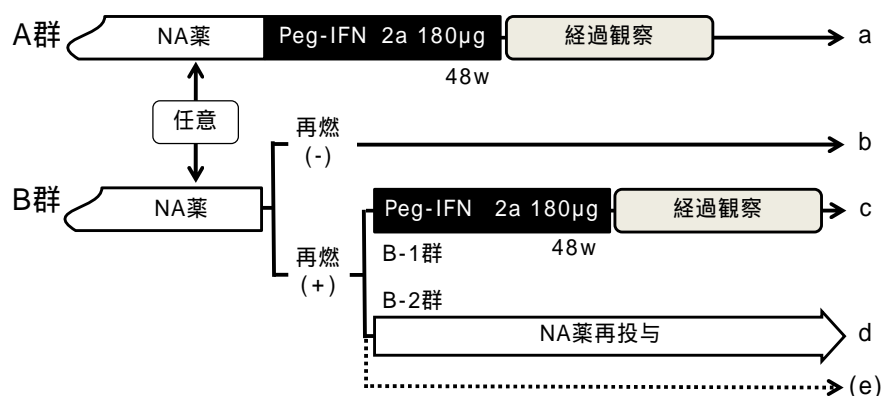


図2 進捗状況 (RESET前向き研究)



《検討項目》
 HBV DNA量、HBe抗原・抗体、HBs抗原量、HBcr抗原量、HBV RNA量、
 HBV cccDNA量、HBV遺伝子型、遺伝子変異、GWAS、等

図3 研究デザイン (RESET前向き研究)

表1 対象の背景 (後向き研究)

背景因子	値
総数	50
NUC開始時年齢 (年) *	34 (21 - 57)
NUC終了時年齢 (年) *	35 (22 - 62)
性別 (男 : 女)	38 : 12
Genotype (B : C : UD)	3 : 36 : 11
開始時NUC (LVD : ETV)	43 : 7
終了時NUC (LVD : ETV : LAM+ADV : ETV+ADV)	40 : 8 : 1 : 1
NUC投与期間 (月) *	6 (4 - 121)
NUC開始時のHBe抗原陽性率 **	70% (35/50)
NUC終了時のHBe抗原陽性率 **	42% (21/50)
IFN投与終了後の観察期間 (月) *	28 (2 - 102)
NUC再投与症例 **	50% (25/50)
HCC合併症例 **	0% (0/50)

* 中央値 (範囲) ** 陽性率 (陽性数 / 総数)

表2 単変量解析による著効例と非著効例の背景因子の比較（後向き研究）

背景因子	24ヶ月著効 (n = 18)	24ヶ月非著効 (n = 32)	P
NUC投与開始年齢 (年) *	36 (21 - 56)	34 (21 - 57)	0.486
性別 (男 : 女)	15 : 3	23 : 9	0.497
Genotype (B : C : UD)	1 : 16 : 1	2 : 20 : 10	0.101
開始時NUC (LVD : ETV)	16 : 2	27 : 5	1.000
終了時NUC (LVD : ETV : LAM+ADV : ETV+ADV)	16 : 2 : 0 : 0	24 : 6 : 1 : 1	0.610
NUC投与期間 (月) *	51 (5 - 121)	5 (4 - 72)	0.001
IFN投与終了後の観察期間 (月) *	30 (23 - 102)	22 (2 - 81)	0.014
NUC再投与・24ヶ月効果判定前 **	0% (0/18)	53% (17/32)	< 0.001
NUC再投与・24ヶ月効果判定後 **	6% (1/18)	47% (7/15)	0.012

* 中央値 (範囲) ** 陽性率 (陽性数 / 総数)

表3 単変量解析による著効例と非著効例のALT値とHBVマーカーの比較（後向き研究）

ALT値/HBVマーカー	24ヶ月著効 (n = 18)	24ヶ月非著効 (n = 32)	P
NUC開始時			
ALT (IU/L) *	242 (32 - 2274)	281 (22 - 1044)	0.872
HBeAg **	44% (8/18)	84% (27/32)	0.008
HBV DNA (log copies/ml) *	8.0 (<2.1 - >9.0)	7.8 (<2.1 - >9.0)	0.866
HBsAg (log IU/ml) *	3.5 (1.8 - 4.9)	3.5 (2.5 - 4.4)	1.000
HBcrAg (log U/ml) *	>6.8 (3.7 - >6.8)	>6.8 (<3.0 - >6.8)	0.121
IFN開始時			
ALT (IU/L) *	29 (12 - 103)	29 (12 - 111)	0.779
HBeAg **	11% (2/18)	59% (19/32)	0.001
HBV DNA (log copies/ml) *	<2.1 (neg. - 3.9)	<2.1 (neg. - 4.8)	0.142
HBsAg (log IU/ml) *	2.9 (1.5 - 4.1)	3.7 (2.5 - 4.3)	0.028
HBcrAg (log U/ml) *	3.6 (<3.0 - 5.9)	5.6 (<3.0 - >6.8)	0.002
IFN終了時			
ALT (IU/L) *	25 (10 - 48)	28 (12 - 134)	0.384
HBeAg **	6% (1/18)	59% (19/32)	<0.001
HBV DNA (log copies/ml) *	<2.1 (neg. - 4.1)	4.6 (<2.1 - >9.0)	<0.001
HBsAg (log IU/ml) *	2.8 (1.9 - 4.0)	3.6 (2.6 - 4.7)	0.007
HBcrAg (log U/ml) *	3.4 (<3.0 - 5.5)	5.5 (<3.0 - >6.8)	0.017

* 中央値 (範囲) ** 陽性率 (陽性数 / 総数)

表4 多変量解析による24ヶ月非著効と関連する因子（後向き研究）

関連因子	OR	95%CI	P
IFN開始時HBsAg ≥ 3.0 log IU/ml	17.7	2.9 - 108.2	0.002
IFN開始時HBcrAg ≥ 4.5 log U/ml	15.0	2.5 - 88.6	0.003

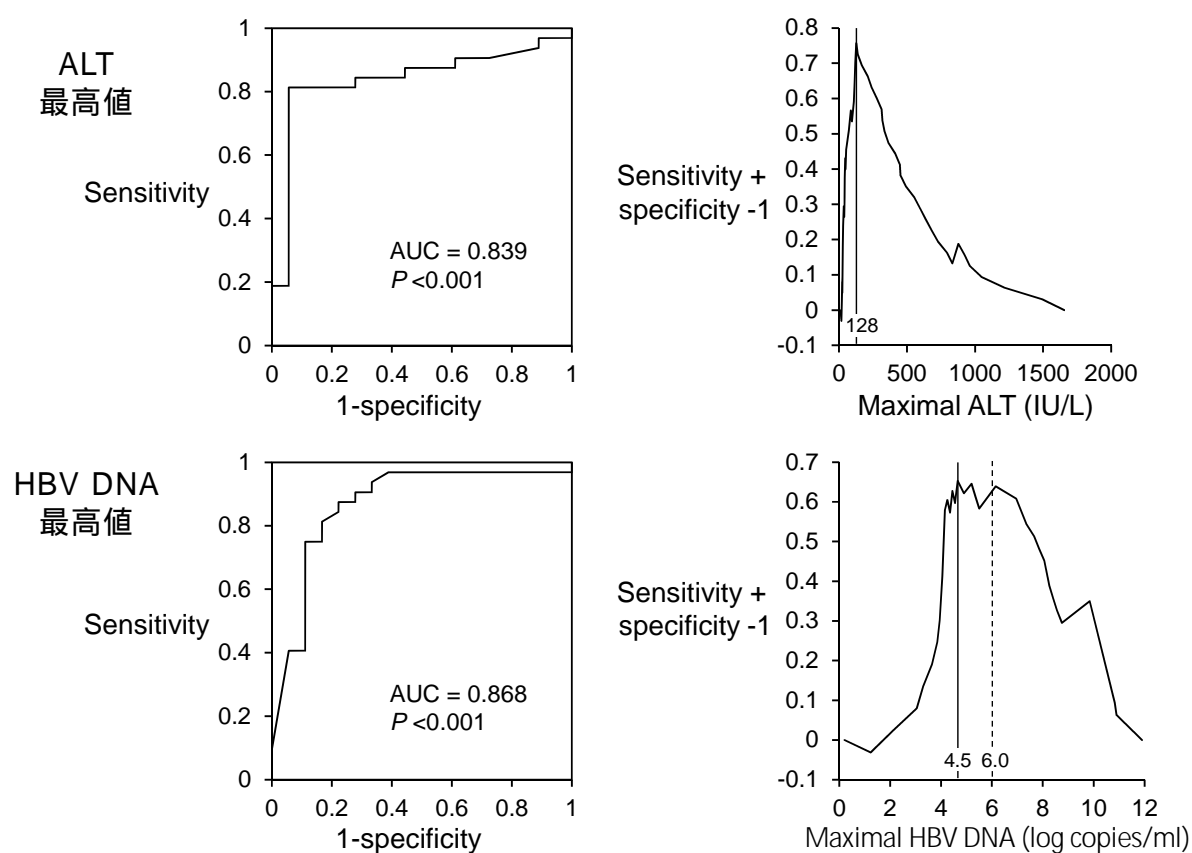


図4 IFN投与終了後の経過観察期間における、ALTおよびHBV DNAの最高値による治療効果予測（後向き研究）

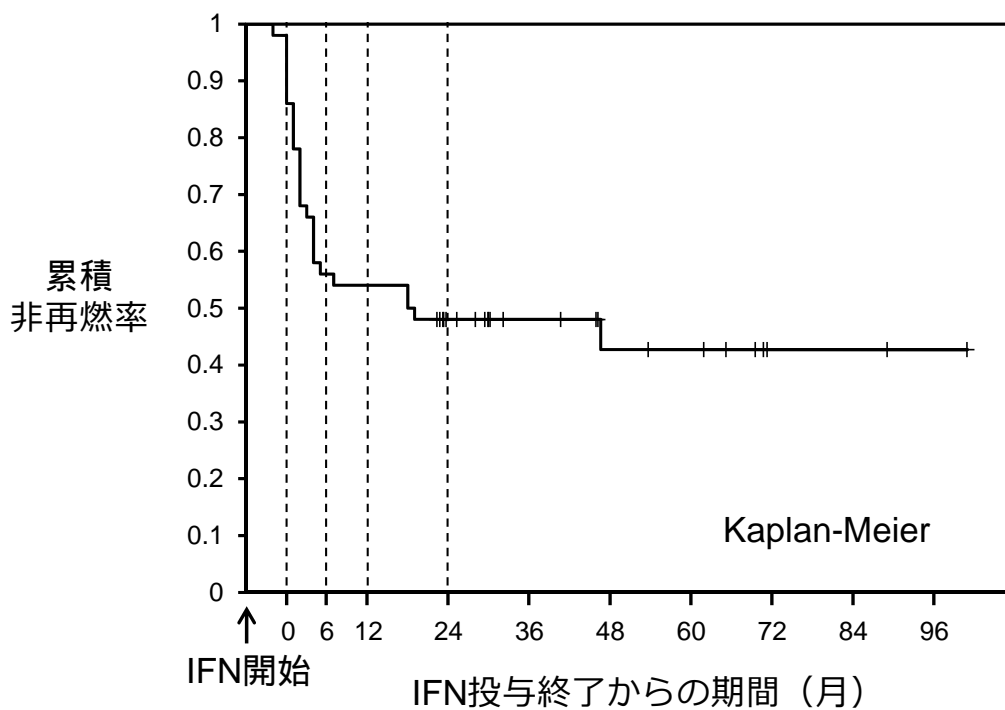


図5 IFN投与終了後の経過観察期間中において、ALT値 ≥ 128 IU/Iを再燃と定義した場合の非再燃率の推移（後向き研究）

表5 対象の背景（RESET前向き研究）

対象	83
年齢（歳）*	44 (27 - 87)
性別（男：女）	54 : 29
遺伝子型（A : B : C : 他 : UD）	5 : 3 : 68 : 3 : 4
NUC投与期間（年）*	5.6 (1.6 - 114)
最終投与NUC（LVD : LVD+ADV : ETV : ETV+ADV）	1 : 20 : 52 : 10
Peg-IFN開始時のHBVマーカー	
HBeAg陽性	28 (34%)
HBV DNA量 (log copies/ml) *	<2.1 (neg. - 5.7)
HBsAg量 (log IU/ml) *	3.3 (-1.3 - 4.4)
HBcrAg量 (log U/ml) *	4.2 (<3.0 - >6.8)

* 中央値（範囲）

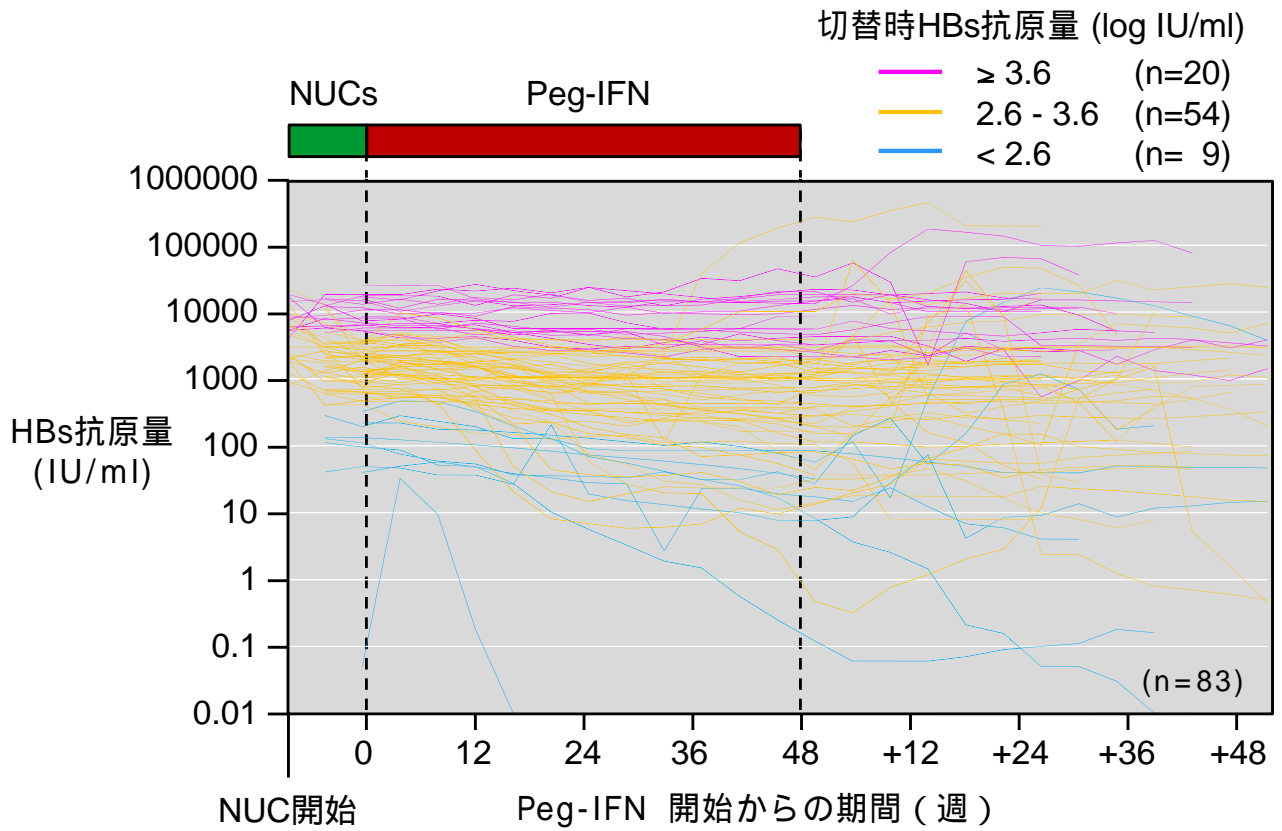


図6 NUC/Peg-IFN切替時のHBs抗原量別に見たHBs抗原量の推移 (RESET前向き研究)

表6 HBs抗原量急速低下症例を予測する因子の多変量解析 (RESET前向き研究)

関連因子	OR	95%CI	P
Peg-IFN開始時Factor X \geq 15.0 pg/ml	8.6	1.9 - 38.6	0.005
Peg-IFN開始時HBsAg $<$ 3.0 log IU/ml	6.4	1.7 - 23.8	0.006

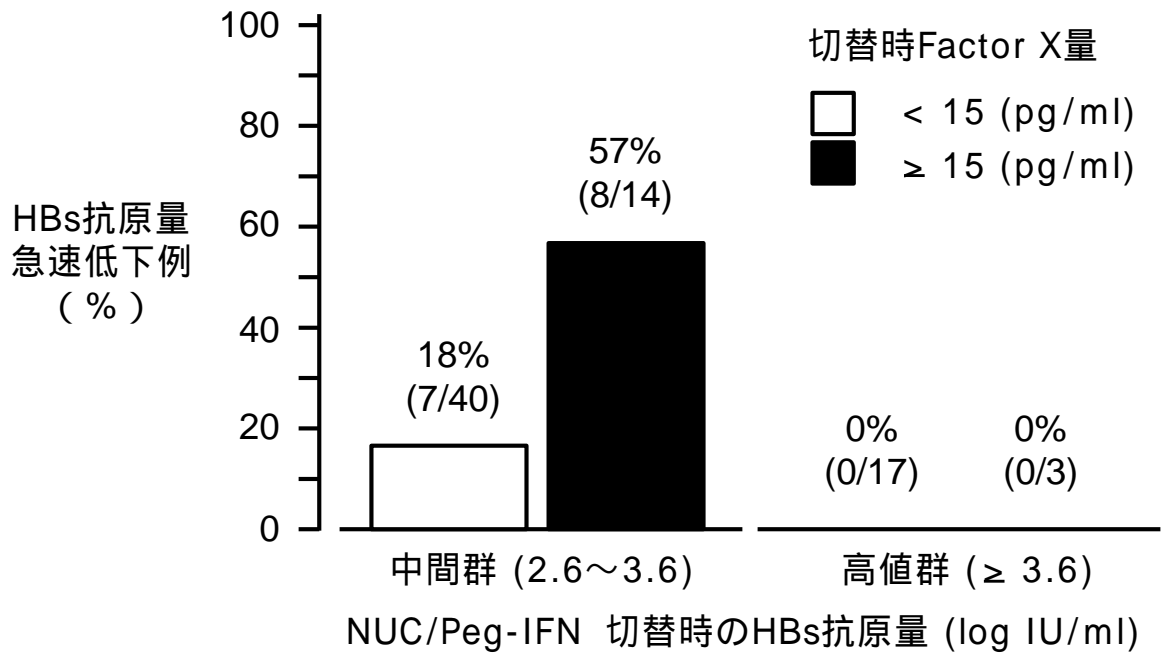


図7 NUC/Peg-IFN切替時のHBs抗原・Factor X量からみたHBs抗原量急速低下例の頻度（急速低下例：HBs抗原 > 0.56 log IU/ml/年）

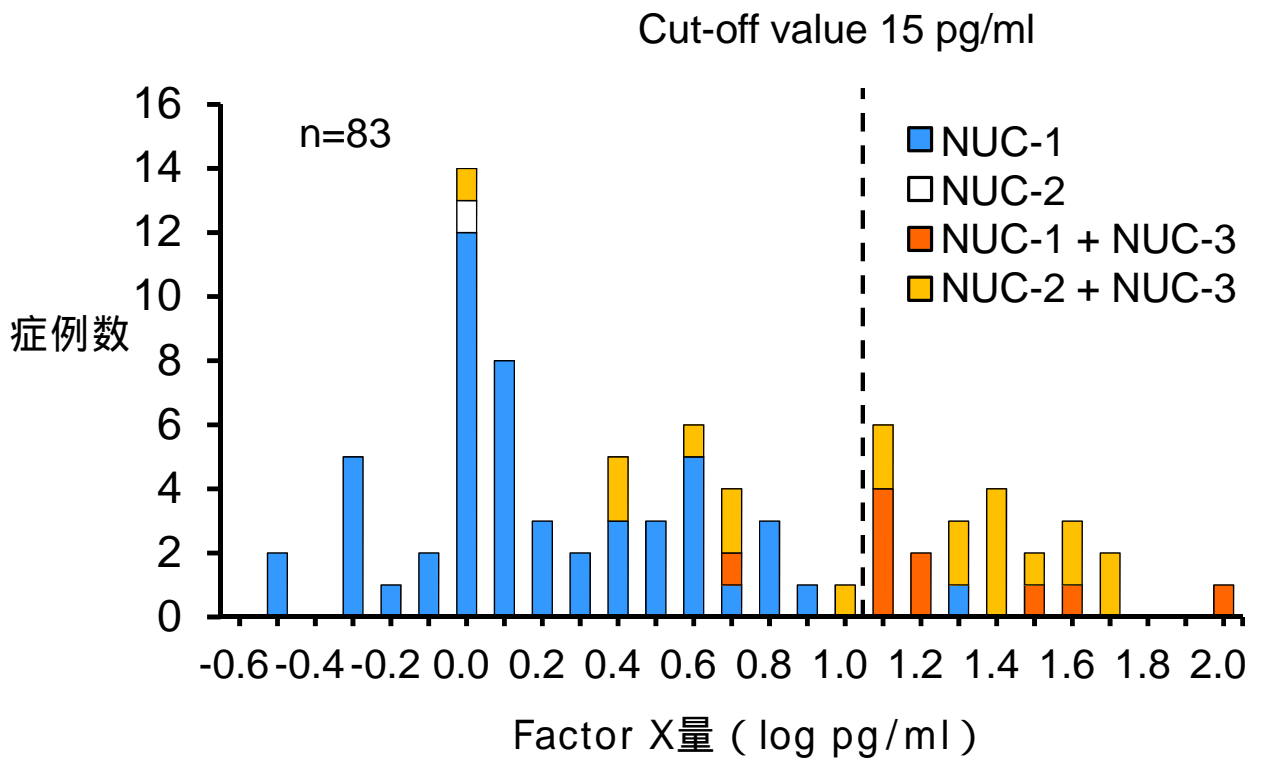


図8 NUC/Peg-IFN 切替時のFactor X量の分布

表7 Peg-IFNの副作用による中止・減量
とNUC再投与

総解析例	100例
Peg-IFN中止	7例
Peg-IFN減量	11例
好中球減少	(7例)
血小板減少	(4例)
NUC再投与	
Peg-IFN投与中	1例
Peg-IFN投与終了後	19例

表8 副作用による中止例

副作用	年齢	性別	Peg-IFN中止時期	転帰
抑うつ状態	43	男	4w	回復
眼底出血	64	男	12w	眼底所見軽快
眼底出血	87	女	41w	眼底所見軽快
てんかん発作	63	男	15w	発作消失
間質性肺炎	57	女	20w	PSL治療で軽快
右脳出血	53	男	30w	右上肢不全麻痺
橋本病	30	女	41w	精査中

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

B 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン単独療法の有用性

研究分担者 新海 登 名古屋市立大学病院消化器代謝内科学 臨床研究医
研究協力者 田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授
研究協力者 松居剛志 手稲溪仁会病院 消化器病センター 主任医長

研究要旨：核酸アナログを投与していない B 型慢性肝炎患者におけるペグインターフェロン (Peg-IFN) 単独療法の有用性を検討した。本研究班の多施設共同研究として現時点で 51 例のエントリーがあった。Peg-IFN 治療 12 週時点での HBV DNA を 4 log copies/ml 未満を治療反応性が良好 (HBV DNA VR) と定義すると HBV DNA VR は治療開始時 HBV DNA が 7 log copies/ml 未満の比較的ウイルス量の少ない症例で観察された。また、HBV DNA が 7 log copies/ml 以上のウイルス量の多い症例における HBV DNA VR 例は HBcrAg が比較的 low 値であった。しかしながら、HBV の活動性は様々であり、症例をさらに蓄積して検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究班において核酸アナログ投与を投与されている B 型慢性肝炎患者が核酸アナログ投与中止後の肝炎の再燃を抑えることを期待して、ペグインターフェロン (Peg-IFN) の投与が試みられている。本研究は研究班のコントロールとして、核酸アナログを投与していない B 型慢性肝炎患者における Peg-IFN 単独療法の有用性を明らかにしたい。

B. 研究方法

全国多施設共同研究として、研究班の施設、班員の施設から B 型慢性肝炎の Peg-IFN 投与症例の登録を募り、2014 年 12 月の時点で合計 51 人が登録された。

エントリー状況

施設名	エントリー数(人)
信州大学附属病院	3
手稲溪仁会病院	9
千葉大学附属病院	6
大阪市立大学附属病院	8
広島大学附属病院	10
当院	15
合計	51

(倫理面への配慮)

データ測定のために患者から書面上で同意書を所得の上、血清サンプルを得て測定した。

また、患者のゲノム検査に関しては、本研究班でも使用している同意書を別に作成し、同意を得ている。

C. 研究結果

患者 51 人の背景は以下の通りであった。

症例の B 型肝炎ウイルス(HBV)の活動性は多様であり、HBe 抗原陽性率は 61% HBV DNA は測定感度未満から>9.1 log copies/ml であった。

背景	
前向き:後向き	4:47
男性:女性	31:20
年齢	36歳(25-66)
HBe抗原+/-	31/20
Genotype A/B/C/UD	5/2/43/1
HBV DNA (log copies/ml)	7.9 (not detected->9.1)
HBsAg (IU/ml)	11340 (0.3-147610)
HBCrAg (LogU/ml)	5.85 (<2.9-9.2)
目標:100症例 14.12.16現在 51症例の登録	

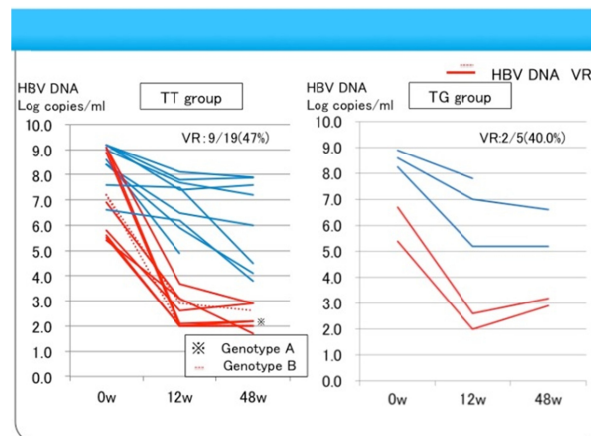
C 型慢性肝炎の患者においては宿主側のゲノム因子 IL28B SNP の多様性により、C 型慢性肝炎の Peg-IFN 治療において SVR 率に差が出ることはよく知られている。そこで今回は B 型肝炎患者 (n=24) においても IL28B 別に検討を試みた。IL28B TT のメジャーホモは 19 人、IL28B TG のヘテロマイナーは 5 人であった。2 群の背景を以下に示す。IL28B TG のヘテロ/マイナーでは ALT が高値で IFN 誘導蛋白である IP-10 は高値であった。

IL28B TT TG別の背景	TT (n=19)	TG (n=5)
Male:Female	10/9	2/3
Age, years	36 (25-63)	36 (33-44)
eAg+/-	14/5	4/1
Genotype A/B/C	1/2/16	0/0/5
PC wild/mutant	10/9	3/2
BCP wild/mutant	7/12	2/3
ALT(IU/L)	97.7(24-551)	180.8(23-562)
PLT (x10 ³ /μl)	219(14.7-54.0)	21.7 (19.0-26.0)
HBV DNA (log copies/mL)	8.7(5.4-9.2)	7.6(5.4-8.9)
HBsAg (log IU/mL)	3.9 (2.1-5.2)	4.0 (3.6-4.5)
HBCrAg (LogU/ml)	5.9(3.6-9.2)	6.5 (2.8-8.3)
IP10 (pg/mL)	196.9 (63.0-462.0)	306.6(117.0-510.0)

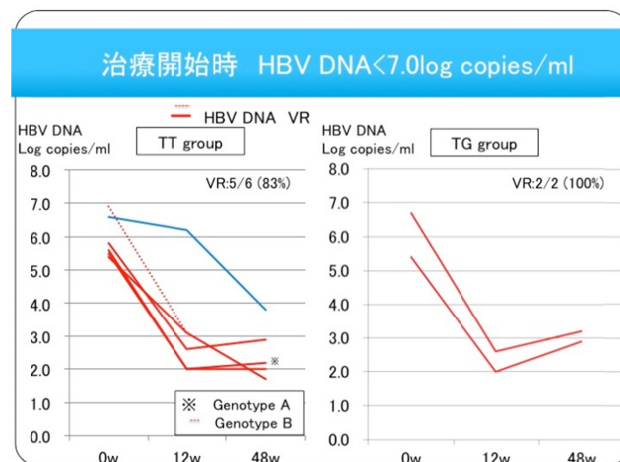
Peg インターフェロン治療 12 週時点での HBV DNA を 4 log copies/ml 未満 を Peg-IFN 治療反応性が良好(HBV DNA VR)と定義し、IL28B の TT 群、TG 群の 2 群に分けて検討した。

HBV genotype A,B の症例は少ないが VR を達成しており genotype C の症例に対して治療反応性が良好であった。治療開始時の HBV DNA が 7 log

copies/ml 未満の症例は VR になりやすかった。また TT 群においては治療開始時に HBV DNA が 7 log copies/ml 以上であっても一部の症例では VR が達成された。

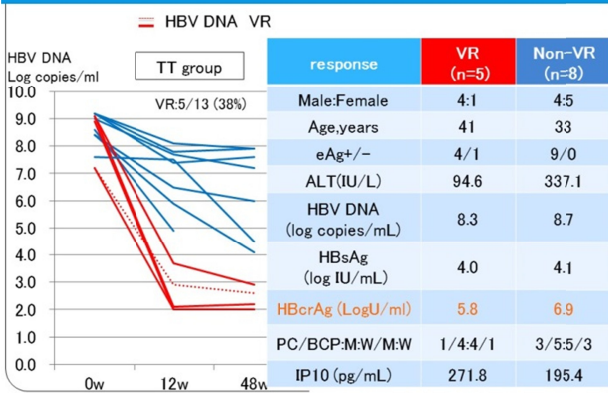


次に HBV DNA が治療開始時に 7 log copies/ml 未満の症例に限定して検討してみた。



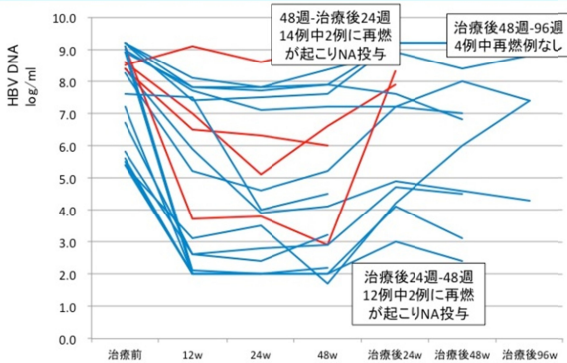
この中で VR を達成し得なかった症例(青線)について検討すると HBe 抗原陽性で BCP 変異を認めた。次に、治療開始時に HBV DNA 7 log copies/ml 以上の TT 群の症例について検討した。

治療開始時 HBV DNA ≥ 7.0 log copies/ml



13 例中 VR は 5 例 VR を達成できなかった non-VR は 8 例であった。HBcrAg は VR 例で低い傾向にあった。次に、Peg-IFN 治療中および治療後の HBV DNA の推移を検討した。Peg-IFN 治療 48 週後まで観察し得た症例のみ以下に示した。再燃を HBV DNA の再上昇や ALT の上昇として登録施設ごとに定義が異なっており、治療(核酸アナログ(NA)投与)の適応やタイミングも異なっているため、解析上困難ではあるが、Peg-IFN 治療 48 週から終了後 24 週までに 14 症例中 2 症例が再燃として NA が投与された。また、Peg-IFN 治療後 24 週から 48 週まで 12 例中 2 例が再燃として NA が投与された。治療後 48 週以降観察できた 4 例は再燃がみられなかった。

48 週以降観察できた症例の HBV DNA 推移



Peg-IFN 48 週治療後の NA 投与率を以下に示す。再燃は 48 週までに起きていたため、Peg-IFN 終了後 1 年は慎重な観察が必要と考えられた。

48 週以降観察できた症例の再燃後の NA 投与率

	治療終了時	終了24週後	終了48週後	終了96週後
NA投与例	0	2 (14%)	4 (29%)	0
観察例	14	14	14	4

再燃は治療終了後48週までに起きている NA 投与されていない 10 症例と NA を投与された 4 例を比較する NA を投与されていない症例では PC や BCP 変異が多い傾向にあった。

	Drug free	NA投与
Male:Female	5:5	2:2
Age,years	31	33
eAg +/-	8/2	4/0
IL28B TT/TG	8/2	3/1
ALT(IU/L)	52	105
HBV DNA (log copies/mL)	8.9	8.6
HBsAg (log IU/mL)	4.3	4.4
HBcrAg (LogU/ml)	5.7	5.3
Genotype A/B/C	1/0/9	1/0/3
PC/BCP M:W/M:W	7:3/4:6	4:0/3:1
IP10 (pg/mL)	139.0	321.0

また、Peg-IFN 投与時の治療反応性が良かった genotype A の症例の 1 例が NA 投与になっているが、NA の投与後に HBs 抗原は陰性化し現時点では NA は中止され、NA 投与中止後の再燃もみられていない。

D. 考察

HBV DNA が多い症例は治療反応性が悪かったが、HBV DNA が比較的低いものは、治療反応性が良かった。VR 例は HBcrAg が低い傾向にあるため、HBe 抗原量が低値あるいは陰性の症例が多く、治療反応性が良いと考えられた。

E. 結論

現時点では症例が十分に蓄積されていないため、検討が十分ではないが、治療開始時に HBV DNA が多いものは治療反応性が悪かった。今後さらに症例を蓄積し検討する必要がある。

F. 健康危険情報

当研究における Peg-IFN による重篤な副作用は無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. PLoS One. 2014;9(1):e86007.

1. 学会発表

1) 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
新海登、松浦健太郎、田中靖人
2014年5月30日 東京

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

3) 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. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究報告書

エンテカビル投与継続症例における肝発癌抑制効果

研究分担者 平松直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：B 型慢性肝炎に対するエンテカビル(ETV)治療中の肝発癌に關与する因子については明らかではない。本研究では、核酸アナログ治療歴がなく、ETV 開始前に肝発癌歴のない B 型慢性肝疾患 496 例を対象として肝発癌抑制効果について検討を行った。発癌解析には、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いた。平均観察期間は 49.9 ± 17.5 カ月(14-109)であった。治療開始 24 週後の AFP は 5.7 ± 7.9 ng/mL で、開始時に比して有意な低下を認めた ($p=0.002$)。肝発癌に關与する因子について多変量解析による検討では、治療前因子として高齢 (55 歳)(Hazard ratio(HR), 2.648 ; $p = 0.028$) 肝硬変 (HR, 5.359 ; $p < 0.001$) が有意な因子であり、治療後因子では治療開始 24 週後の AFP 高値 (10ng/mL)(HR, 2.298 ; $p = 0.043$) が唯一の有意な独立因子であった。

【結語】B 型慢性肝疾患に対する ETV 治療中の発癌には、HBV DNA 陰性化、ALT 正常化は影響せず、24 週時の AFP 値が治療により変動しうる唯一の発癌予測因子であることが示唆された。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対するエンテカビル(ETV)の抗ウイルス効果は明らかにされてきたが、ETV 治療中の肝発癌抑制効果ならびに肝発癌に關与する因子については明らかではない。

B. 研究方法

核酸アナログ治療歴がなく、ETV 開始前に肝発癌歴のない B 型慢性肝疾患 496 例を対象とした。治療開始時平均年齢 : 52.6 ± 12.0 (15-82) 歳、男性 / 女性 : 288 / 208 例、血小板数 : $16.0 \pm 5.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、ALT 値 : 143.7 ± 199.3 IU/L、AFP : 29.0 ± 137.1 ng/mL、HBV-DNA (中央値) : 6.9 log copies/mL (LC/mL)、非肝硬変 / 肝硬変 : 404 / 92 例であった。発癌解析には、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いた。

C. 研究結果

平均観察期間は 49.9 ± 17.5 カ月(14-109)であった。治療開始 24 週後における HBV DNA 陰性化 (< 2.6 LC/mL)率は 68%、ALT 正常化 (30 IU/L)率は 62%であった。治療開始 24 週後の AFP は 5.7 ± 7.9 ng/mL で、開始時の 29.0 ± 137.1 ng/mL に比し、有意な低下を認めた ($p < 0.05$)。観察期間中に肝発癌を 42 例に認め、累積発癌率は 3 年で 6%、5 年で 9.6%、7 年で 17.2%であった。肝発癌に關与する因子についての多変量解析による検討では、治療前因子として高齢 (55 歳)(Hazard ratio(HR), 2.648 ; $p = 0.028$) 肝硬変 (HR, 5.359 ; $p < 0.001$) が有意な因子であり、治療後因子では治療開始 24 週後の AFP 高値 (10ng/mL)(HR, 2.298 ; $p = 0.043$) が唯一の有意な独立因子であった。24 週後の HBV DNA 陰性化ならびに ALT 正常化は発癌に關連しなかった ($p = 0.685$ 、 $p = 0.080$)。

なお、治療後 24 週の AFP 値が肝発癌に及ぼす影響についての時間依存性 ROC 曲線を用いた解析におい

て、発癌予測における 24 週後の AFP 値のカットオフ値が 12.2ng/mL であったため、今回の検討では AFP を 10ng/mL で分けて解析を行った。

D. 考察

本研究では、B 型慢性肝疾患に対する ETV 治療中の肝発癌に関与する因子について検討した。治療前因子では、高齢、肝硬変が肝発癌の有意な高リスク因子であった。高齢者や肝硬変症例では、ETV 治療により ALT 正常化、HBV DNA 陰性化しても肝発癌に注意し、十分なサーベイランスを行う必要があるものと考えられた。

治療開始後因子では、上記 2 因子に加え、24 週後の AFP 高値が肝発癌の高リスクであった。一方、ETV 開始 24 週後の HBV DNA 陰性化の有無は、肝発癌の有意なリスク因子ではなかった。したがって、ETV 投与により HBV DNA 陰性化が得られても、治療後に AFP が十分に低下しない症例では、発癌リスクが高く、十分なサーベイランスを要するものと考えられた。また、ETV 治療開始後も AFP 高値が持続する症例では、Sequential therapy などの IFN 治療の候補となりうるものと考えられた。

E. 結論

B 型慢性肝疾患に対する ETV 治療中の発癌には、HBV DNA 陰性化、ALT 正常化は影響せず、24 週時の AFP 値が治療により変動しうる唯一の発癌予測因子であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Harada N, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Yamada A, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Oshita M, Itoh T, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T,

Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T; the Osaka Liver Forum. Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment of chronic hepatitis B virus infection. J Gastroenterol. in press

2. 学会発表：

1) 山田涼子、平松直樹、竹原徹郎. “エンテカビル投与中の B 型慢性肝疾患症例における治療開始後 AFP 値の肝発癌リスクへの影響 - 多施設共同研究 - ” シンポジウム「肝癌の予防・制御をめざす B 型肝炎の治療戦略」第 18 回日本肝臓学会大会、第 56 回日本消化器病学会大会 2014

H. 知的所有権の出願・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
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))

分担研究報告書

核酸アナログ中止を目指した sequential 療法後の再燃例の検討

研究分担者 鈴木義之 虎の門病院 肝臓内科 医長

研究要旨：B 型慢性肝炎に対する治療薬として核酸アナログ製剤は本邦で広く使用され、B 型慢性肝疾患で悩む患者の長期予後の改善とともに QOL の向上に果たしてきた意義は非常に大きな意味をもっている。しかしながら、2014 年に 4 番目の核酸アナログ製剤が登場しながらも未だ確固たる中止基準は設定されておらず、また治療終了のゴールも明らかではない。このため当院でも中止を目指した取り組みとして、過去の症例の解析とともに sequential therapy を導入した症例の検討を行っているが、初期に導入した症例は 5 年の節目を迎えその長期予後を検討することでこの治療の効果、適応を解析し治療中止に関わる因子を検討したので報告する。

A. 研究目的

B 型慢性肝疾患に対する治療は IFN と核酸アナログ製剤であり、臨床の場ではその状況に応じて選択を行い、時によっては繰り返し治療が行われている。核酸アナログ製剤が B 型慢性肝疾患に対する治療、予後に多大な貢献をしたことは周知の事実である。厚生労働省班会議におけるガイドラインでも B 型慢性肝疾患患者の治療において核酸アナログ製剤は 35 歳以上の症例では第一選択の座を維持し続け、現在最も使用されている薬剤といえる。しかしながら長期投与が原則であり、一生涯飲み続ける可能性がある本薬剤を中止する手段や指標となる検査で確立されたものは未だ見出せておらず、また最終目標として掲げられている HBs 抗原の陰性化についても十分な効果が示されているとは言えない。このため長期化する核酸アナログ治療をいかに安全かつ効率よく、中止するかを目標に我々も IFN を用いた Sequential 治療を試み、その成果を昨年度までに報告してきた。しかしながら、一部に再燃をきたし、再治療を余儀なく

される症例が存在することも事実である。今年度は Sequential を行った症例の 5 年後の長期の経過を検討することで、より安全に中止し得る症例を検討しその因子見出すことを目標とした。

B. 研究方法

2009 年より核酸アナログ製剤の中止を目的として sequential therapy を導入している。本療法導入の条件は核酸アナログ投与中、HBe 抗原は陰性で、肝酵素の正常化を維持し、HBV-DNA が感度以下 (2.1log copy/ml 未満) もしくは HBcrAg が感度以下 (3.0log U/ml 未満) を達成している患者とした。これまでに 14 症例に導入し、全例 IFN 投与を終了し経過観察期間 (drug free) に入っている。それぞれの症例の中止理由、背景因子、その後の経過につき検討した。(検討(1))。さらにこのうち HBs 抗原陰性化症例を解析するとともに、再治療例の HBs 抗原量、サイトカインの動態が治療反応性にどのように関わっているかの要因について検討した(検討(2))。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得た上で臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。本研究の遂行にあたっては、必要な申請を行い当院の倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

Sequential 治療導入症例の背景は表1に示した。男性 12 例(86%)、sequential therapy 導入のための IFN 開始時年齢 43.5 歳(34 歳 ~ 60 歳)、使用していた核酸アナログは lamivudine (LMV) 10 例、entecavir(ETV)4 例、投与期間は 77.5 か月(20 ~ 123)、genotype は B が 2 例で C が 12 例であった。治療終了後の drug free 期間は中

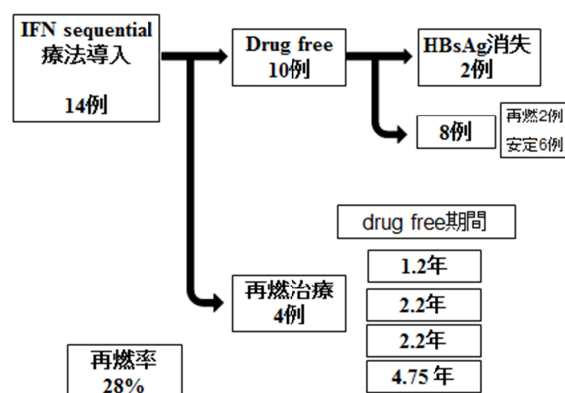
	核酸アナログ開始時	IFN開始時
年齢(歳)	36.5 (25 - 57)	
性別	男:女 12(85.7%):2(14.3%)	43.5(34 - 60)
AST (IU/L)	97.5 (29 - 1356)	19.5 (15 - 26)
ALT (IU/L)	192 (32 - 2412)	16.5 (12 - 26)
HBe抗原陽性	3例(21.4%)	0例(0%)
HBV DNA (log copy/ml)	7.4 (3.0 - 8.1)	2.1> (検出せず - 2.9)
HBV genotype	B; 2例(14.3%), C; 12例(85.7%)	
核酸アナログの種類	Lamivudine: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

表1. IFN sequential療法 14症例の背景

央値 54 か月(48 ~ 60)である。経過中の ALT は治療終了後に一過性に上昇する症例も認められるもののその後は沈静化するケースがほとんどであったが、その後の再燃で再治療を導入した症例が 4 例認められた。図 1 に今回の 14 症例の経過を示した。10 例に drug free を達成しこのうち 2 例は HBs 抗原の消失まで得ることができた。

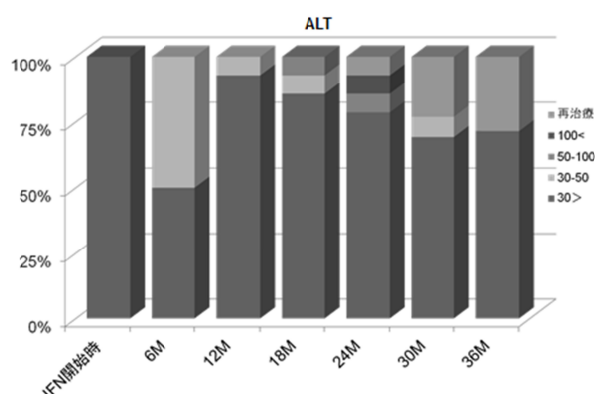
再燃例、再治療例は 4 例存在したが、このうち 3 例は当初の目標である 2 年以上の drug free

図1. IFN sequential療法 14症例の経過



を達成している。単純中止例で当院が報告してきた再燃率 68%に比べ本治療法の再燃率が 28%と有意に低いことが示されている。経過中の HBV-DNA と ALT の正常化率と陰性化率を図 2, 3 に示した。図 2 に示すように ALT は IFN 開始後 12 か月目をピークにやや正常化率は低下するものの再治療に至らなかった症例では約 3 年後には 100%安定という数字であった。一方 DNA は

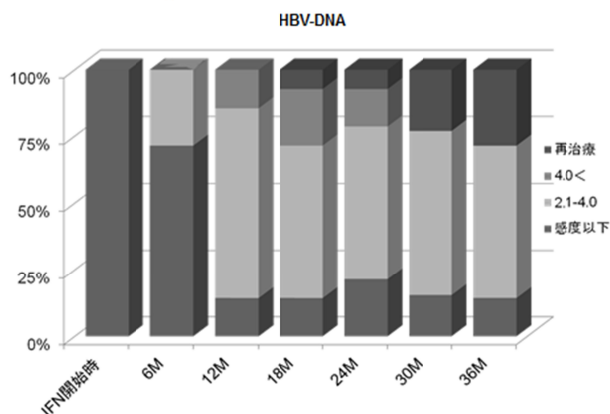
図2. IFN sequential療法中のALTの安定化率



感度以下を維持できている症例は少なく治療域には至らないものの 2.1 から 4.0 の範囲内で変動している症例が 50%近く認められている。再治療となった 4 例の要因を解析するため経過中の HBcrAg の経過を示したのが図 4 である。IFN 終了直後は不安定であるが再治療に至らなかつ

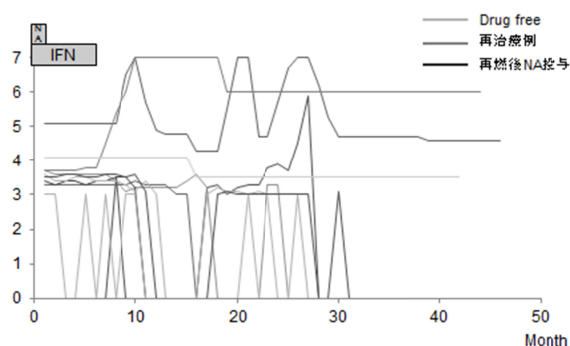
た症例は1例を除きすべて3以下まで低下し安定している。一方再治療を余儀なくされた4症

図3. IFN sequential 療法中の HBV-DNA の安定化率



例はいずれも HBcrAg が高いままで再治療を導入され2例は依然として高値を継続している。これをまとめると経過中HBcrAgが3.6以下の症例からは1例の再燃があり、4年以上経過後に再治療となった。残りの再治療となった3例はHBcrAgが5.9が1例と6.8<が2例であった。また、今回図表としては示さないがTNF- の推移をしてみると再治療となった症例はIFN終了時よりTNF- の上昇が認められており宿主の免疫賦活が生じていることが分かる。核酸アナログやIFNによる抗ウイルス療法が途切れた途端に宿主の免疫応答にswitchが入り、HBVに対する攻撃が始まっている可能性が示唆される結果である。

図4. IFN sequential 療法中の HBcrAg の推移



また今年度は2例目のHBs抗原消失例が認められており、sequential療法開始から約5年後の経過でHBs抗原が消失しており、HLADPA1とHLADPB1はともにGAで消失に関わる要因をもっていたといえる。

D. 考察

核酸アナログ治療が一般的となり10年以上が経過し本邦でのB型肝炎治療は大きく変化してきた。第一世代のLMVは確かに画期的な治療薬であったが、耐性ウイルスの出現率が高く現在では第一選択の座をETVにゆずり、実臨床ではあまり処方されなくなっているのが現状である。我々は、かつてLMV投与において経年的に肝生検を行いその組織学的改善度につき報告してきた。その中でも述べたように、抗ウイルス剤投与により肝炎の鎮静化を継続することができれば、肝臓の線維化についても改善が認められることを示した。

また耐性ウイルスについての問題であるが、長期化する核酸アナログ投与においては特に第一世代のLMVではその頻度は高く年とともに増加している。このような耐性ウイルスの出現を来さないためにも核酸アナログを中止する方法が期待されるところである。また、現在の第一

選択である ETV も耐性ウイルスの出現率こそ低く抑えられてはいるが、HBs 抗原の陰性化率は低く、今後さらに治療が長期化していくことが懸念される。長期化すれば耐性ウイルスの問題だけではなく腎障害などの副反応も必ずや増えていくと考えられ、そのためにも本薬剤を中止する基準は是非とも必要と考える。これまでに我々は、過去に中止した症例の予後の検討を行い報告してきた。その結果、HBV-DNA の陰性化が得られても核酸アナログ中止により肝炎が再燃し再投与を行わざるを得ない症例が多く存在することが明らかとなった。そのため積極的な試みとして当科では、sequential therapy を開始しているが、治療終了後 5 年の経過では抗ウイルス効果の持続は十分とはいえないものの ALT 正常化率は高く、特に IFN 開始時の HBcrAg が低値であり genotypeB 以外の症例においては良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。特に核酸アナログ長期投与症例においては良好な結果が得られ、さらには HBs 抗原の陰性化にも結び付けられる可能性があることを今年度は示すことができた。本治療法を背景因子を検討することでより有効に drug free を獲得し、またウイルス排除にまで目的を広げることができればさらに有用な方法であると考えられる。

以上のような観点から当科で取り組んでいる drug free を目指した積極的な試みである sequential therapy の成績を検討してきた。療終了後 4 年の経過で、症例数が少ないもののサイトカインや HBs 抗原も一つの指標になることが示され、アナログ投与長期の症例、IFN 開始時の HBcrAg が低値の症例において良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。さらには宿主の遺伝子要因を解析することや経過中の TNF- α を調べることでより有効な選択基準の策定と治療法を模索していく予定である。

E. 結論

当科で取り組んでいる drug free を目指した積極的な試みである sequential therapy の長期成績をまとめると、治療終了後 5 年の経過から再燃に寄与する要因、また、HBs 抗原陰性化に寄与する要因が明らかとなってきた。再燃、再治療の 4 例と HBs 抗原消失 2 例を比較検討し、より有効な選択基準の策定と治療法を模索していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 論文発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Correlation between hepatitis B virus surface antigen level and alpha-fetoprotein in patients free of hepatocellular carcinoma or severe hepatitis. *J Med Virol.* 2014;86(1):131-8.
- 2) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol.* 2013 ;48(8):930-41.
- 3) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi

M, Kumada H. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. Hepatology. 2013 Jul;58(1):98-107.

2. 学会発表

- 1) パネルディスカッション6:ウイルス性肝疾患治療ガイドラインの妥当性
第96回日本消化器病学会総会 新潟
2010.4.23
- 2) B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療中止の検討 第46回日本肝臓学会総会
山形 2010.5.27
- 3) 核酸アナログ治療中止を目指した sequential therapy の有用性 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6.2
- 4) 核酸アナログ治療における drug free 獲得因子の検討 第48回日本肝臓学会総会
金沢 2012.6.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究報告書

核酸アナログ治療例における肝発癌に関わる因子の検討

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

研究要旨：核酸アナログ製剤(NUC)を投与された B 型慢性肝疾患症例における発癌に寄与する治療前、治療中の因子の検討をおこなう。対象は当院にて NUC 導入後 1 年以上経過観察された HCC 合併のない 201 例。方法 1. NUC 投与前の肝発癌に寄与する因子の検討をおこなう。2. Kaplan-Meier 法にて累積肝発癌率を検討する。3. 治療開始後の因子を比較し肝発癌寄与因子の検討をおこなう。結果 1. NUC 投与前の肝発癌寄与因子は年齢 (HR : 3.72 , p=.009)、肝硬変合併(HR 3.22, p=0.03)であった。2. NUC 投与例における累積肝発癌率は 5 年 : 7.7%、10 年 : 19.6%であった。3. NUC 治療中の肝発癌に寄与する因子は、年齢 (HR : 2.76, p=0.04)であり、24 週時点の AFP 値 5ng/ml、48 週時点での血小板数<12 万/ μ l も発癌に寄与する傾向がみられた。

A . 研究目的

核酸アナログ製剤(NUC)を投与された B 型慢性肝疾患症例における発癌に寄与する治療前、治療中の因子の検討をおこなう。

B . 研究方法

対象は当院にて 1999 ~ 2012 年の間に NUC 導入後、1 年以上経過観察された HCC 合併のない、B 型慢性肝疾患症例 201 例。方法 1. NUC 投与例における肝発癌に寄与する因子(治療前)に関して、Cox 比例ハザードモデルを用い多変量解析をおこなった。2. Kaplan-Meier 法にて累積発癌率の検討をおこなった。3. NUC 開始後 24、48 週における HBV-DNA 量、Alb 値、ALT 値、血小板数、AFP 値を比較し治療後の発癌寄与因子の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

対象の臨床背景を表に示す(表 1)。発癌例は 201 例中、24 例(11.9%)であった。NUC の内訳は LAM : 45 例、LAM+ADV : 39 例、ETV : 117 例であった。

表1. 臨床背景 (n=201)

	全体	非発癌例 (n=177)	発癌例 (n=24)	p値
初診時年齢: 中央値	50.0	48.0	54.0	<0.001
男性:n(%)	124 (62)	113 (63)	11 (46)	0.09
HBc抗原陽性:n(%)	120 (60)	106 (60)	14 (58)	0.88
肝硬変合併例:n(%)	77 (38)	58 (33)	19 (79)	<0.0001
TBil, m g/dL	0.9	0.9	0.9	0.46
Alb, g/dL	4.1	4.1	3.8	0.03
ALT値, U/L	129	142	63	<0.001
血小板数, 万/ μ L	14.1	14.4	8.5	<0.01
AFP値, ng/ml	11	11	23	<0.01
HBsAg量, logIU/mL	3.5	3.5	3.5	0.94
HBV-DNA量, logcopies/mL	7.2	7.3	6.6	0.02
観察期間, 年	6.4	6.6	4.8	0.05

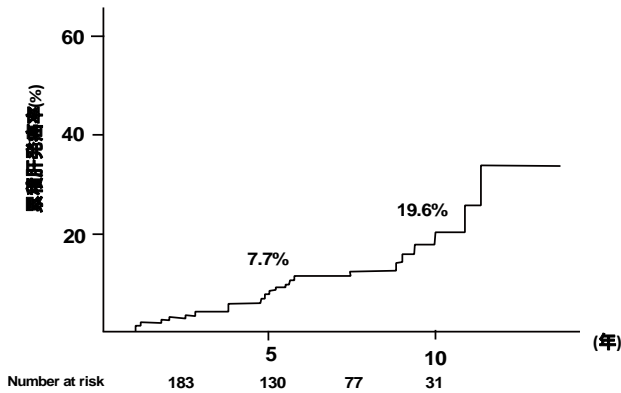
1. NUC 投与例における肝発癌に寄与する治療前因子は単変量解析では年齢、肝硬変合併、ALT 高値であり、多変量解析では年齢、肝硬変合併であった(表 2)。

表2. NUC投与例における肝発癌に寄与する因子の検討 (n=201)

	単変量解析			多変量解析		
	p値	HR	95%CI	p値	HR	95%CI
年齢, 40歳	.001	5.09	2.01-12.9	.009	3.72	1.39-9.92
男性	0.05					
HBe抗原陽性	0.34					
肝硬変あり	<.0001	6.13	2.29-16.4	0.03	3.22	1.13-9.12
T.Bil, 0.8mg/dl	0.83					
Alb, <4.1 g/dL	0.60					
ALT値, 86 IU/L	<.01	0.29	0.13-0.67			
血小板数, <14.8万/ μ L	0.10					
AFP値, 7ng/ml	0.22					
HBsAg量, 3.5 logIU/mL	0.25					
HBV-DNA量, 7.1 LC/mL	0.94					

2. NUC 投与例における累積肝発癌率は 5 年 : 7.7%、10 年 : 19.6%であった(図)。

図 NUC投与例の累積肝発癌率 (n=201)



3. NUC 開始後 24 週における肝発癌に寄与する因子は単変量解析では年齢、肝硬変、Alb 低値、血小板低値、AFP 高値であり、多変量解析では年齢のみが有意な因子であった(表 3)。48 週時点の因子は単変量解析では年齢、肝硬変、HBV-DNA、Alb、血小板、AFP であり、多変量解析では年齢のみが有意な因子であった(表 4)。

表3. NUC開始後24週における肝発癌に寄与する因子の検討 (n=201)

	単変量解析			多変量解析		
	p値	HR	95%CI	p値	HR	95%CI
年齢, 53歳	.001	5.09	2.01-12.9	0.04	2.71	1.03-7.11
男性	0.05					
肝硬変あり	<.0001	6.13	2.29-16.2			
HBV-DNA量, 2.5 LC/mL	0.83					
Alb, <4.3g/dL	.002	4.07	1.68-9.84			
ALT値, 28 IU/L	0.47					
血小板数, <12.7万/ μ L	.003	3.83	1.58-9.25			
AFP値, 5 ng/ml	.001	5.08	2.00-12.9	0.06	2.60	0.96-7.05

表4. NUC開始後48週における肝発癌に寄与する因子の検討 (n=201)

	単変量解析			多変量解析		
	p値	HR	95%CI	p値	HR	95%CI
年齢, 53歳	.001	5.09	2.01-12.9	0.03	3.00	1.14-7.93
男性	0.05					
肝硬変あり	<.0001	6.13	2.29-16.2			
HBV-DNA量, 2.5 LC/mL	0.02	0.30	0.11-0.82			
Alb, <4.4g/dL	.002	3.73	1.59-8.74			
ALT値, 24 IU/L	0.77					
血小板数, <12.0万/ μ L	<.001	6.79	2.69-17.1	0.08	2.79	0.87-9.01
AFP値, 4 ng/ml	0.03	3.21	1.09-9.45			

D. 考察

NUC 投与により B 型慢性肝疾患の予備能、予後は明らかに改善された。しかし、肝発癌の抑止に関しては未だ議論されている。今回の検討では、治療前、治療中ともに年齢、肝硬変合併が多変量解析で有意な因子として抽出され、AFP、血小板数などの肝線維化に関係した因子も有意な傾向がみられた。HBV-DNA 量、HBsAg 量といったウイルス因子は NUC 治療例における発癌寄与因子としては抽出されなかった。サンプルサイズの影響もあるが、年齢、肝線維化が NUC 治療例の発癌にはより強く影響していると考えられた。

E. 結論

1. NUC 開始前の肝発癌に寄与する因子は、年齢 (HR : 3.72 , p=.009)、肝硬変合併 (HR 3.22, p=0.03)であった。
2. NUC 投与例における累積肝発癌率は 5 年 : 7.7%、10 年 : 19.6%であった。
3. NUC 治療中の肝発癌に寄与する因子は、年齢 (HR : 2.76, p=0.04)であり、24 週時点の AFP 値 5ng/ml、48 週時点での血小板数<12 万/ μ l も傾向がみられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Bae SK, Yatsunashi 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. *HepatoI 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

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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

分担研究報告書

B 型慢性肝炎治療における核酸アナログ中止時の
PEG-IFN 2a 投与による drug free と HBs 抗原量の検討

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

研究要旨：【目的】B 型慢性肝炎の治療は核酸アナログ製剤による HBV DNA の持続的低値と肝機能の安定化であったが、HBs 抗原定量と HB コア関連抗原測定法の進歩により核酸アナログ製剤の中止と HBs 抗原の陰性化を目指す治療指針へと転換した。厚生労働省班研究、田中班により核酸アナログ製剤の中止基準が示されたが、中止基準を満たす症例は一部に限られており、HBs 抗原の陰性化につながる治療は未だ確立されていない。田中班の多施設共同研究として Drug free を目指した核酸アナログ製剤中止時の PEG-IFN 2a 療法の前向き研究が企画、実施されているが、今回、当施設登録症例においてその有用性と HBs 抗原定量の相関を検討した。【方法】当施設の核酸アナログ長期投与患者中、同意が得られた 54 症例に対して核酸アナログ製剤を中止し PEG-IFN 2a 180 μ g 週 1 回投与に切り替えた。主要評価項目は治療終了後の臨床的安定化 (Drug free) で、副次評価項目は HBs 抗原定量と HB コア関連抗原量の推移、および Drug free との相関性の検討である。【成績】登録時の背景は、年齢 46.5 歳 (26-74)、核酸アナログ投与期間 4.85 年 (1.13-11.26)、HBs 抗原 1527.6 IU/ml (40.1-22031.0)、HB コア関連抗原 4.8 logIU/ml (3.0-6.8) であった。登録時の drug free 予測達成率は 22.6% であったが、PEG-IFN 2a 治療終了 48W 時点の drug free 維持率は 53.8% で大きく向上した。また、HBs 抗原量も PEG-IFN 2a 治療により、年間平均 -0.577 log IU/ml と著明な低下を認めた。しかし単変量解析では、drug free に強く相関したのは HBe 抗原であり、HBs 抗原の低下は有意差を認めなかった。HBs 抗原の推移を各関連因子で検討すると、HBs 抗原が著明に低下した症例では、PEG-IFN 2a 治療終了時点での HBs 抗原が陰性化するか、十分に低下していれば drug free を達成するが、不十分であれば再燃を起こし核酸アナログの再投与が必要となっていた。しかし、再燃した肝炎に対する核酸アナログの再投与は PEG-IFN 2a 治療による HBcr 抗原や HBs 抗原の低下を維持させた。一方で PEG-IFN 2a で HBs 抗原の低下を認めない症例は肝炎の再燃も認めず、drug free を維持した。【考案】長期核酸アナログ投与の中止時に PEG-IFN 2a の併用療法は、drug free 達成率向上だけでなく、著明な HBs 抗原量の低下を認め、その有用性が示唆された。また、PEG-IFN 2a 治療終了後に肝炎の再燃をおこしても核酸アナログ製剤再投与により HBs 抗原の低下は維持され、HBs 抗原の陰性化を目指す手段となる可能性が考えられた。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の目的は、B 型肝炎ウイルス (HBV DNA) の持続的抑制

により肝炎の鎮静化を図り、肝不全や肝発癌を予防することにある。抗ウイルス薬として、わが国ではインターフェロンと核酸アナログ製剤

(ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビル)が認可されている。核酸アナログ製剤は投与期間中、多くでHBV DNAの低下とALT値の正常化をもたらすが、長期投与により薬剤耐性変異が出現し、投与を中止すると肝炎が再燃する。一方、インターフェロンは抗ウイルス作用以外に免疫調整作用を併せ持ち、効果が得られた場合は投与終了後もその効果が持続してdrug freeとなるが、その有効率は低い。そのため、現在は核酸アナログ製剤による治療が中心で、インターフェロン治療は35歳未満の限定された若年者に使用されるにとどまっている。近年、HBs抗原定量とHBコア関連抗原の測定法の進歩により、新たな治療評価指標が出現し、B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は核酸アナログ製剤の中止とHBs抗原の陰性化を目指す治療指針へと変化した。そして、厚生労働省田中班的班研究により核酸アナログ製剤の中止基準が示された。核酸アナログ製剤投与開始後2年以上経過し、血中HBeAg陰性かつ血中HBV DNA量が陰性(3.0 log copies/ml未満)であることを中止の必要条件として、HBs抗原定量とHBcr抗原のスコアリングにより、合計スコアから3群に分類した。

群(スコア0): 中止成功率は90%で中止可能群。

群(スコア1 or 2): 中止成功率は約50%で中止考慮群。

群(スコア3 or 4): 中止成功率は約10%で治療の継続推奨群である。

しかし、当施設の6ヶ月以上の核酸アナログ製剤治療を行ったB型慢性肝炎患者274名を対象とした検討で、HBs抗原定量とHBコア関連抗原は核酸アナログ投与期間中、ともに低下傾向を示したが非常に緩やかであり、中止基準の1

群に至る症例は10%未満と少数で、群を含めても約50%程度であった。また、HBs抗原は長期の自然経過において年率3%程度で陰性化することが報告されているが、HBs抗原の陰性化につながる積極的な治療は未だ確立されていない。

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

B. 研究方法

B型慢性活動性肝炎の核酸アナログ長期治療症例で、同薬の中止を考慮している患者のうち、以下の基準を満たし、かつ除外基準に該当しないものを対象として、核酸アナログ中止条件の低リスク群、中リスク群、高リスク群を評価した上でエントリーを行う。

1. 対象 適格基準

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

である。

核酸アナログの中止条件

核酸アナログ中止 4 週間前に測定した HBs 抗原量と HBcr 抗原量をスコア化し、合計スコアが 0 点を低リスク群、1~2 点を中リスク群、3~4 点を高リスク群として分類する。

除外基準

重篤な肝障害（総ビリルビン 2.0mg/dL、プロトロンビン時間 < 60 %、アルブミン < 3.6 g/dL のうち、2 項目以上に抵触する）患者

自己免疫性肝炎、アルコール性肝炎等その他の慢性肝疾患患者、肝硬変または肝不全を伴う患者

重篤な合併症を有する患者、特に骨髄機能、腎機能、心機能、呼吸機能が十分に保たれていない患者

妊娠している可能性のある女性、妊婦、授乳婦。

間質性肺炎の既往歴のある患者

ペグインターフェロン 2a または他のインターフェロン製剤に対し過敏症の既往歴のある患者

重度のうつ病、自殺念慮または自殺企図等の重度の精神状態にある患者又はその既往歴のある患者

その他、試験担当医師が本試験への参加が不適当と判断した患者

2 . 研究デザイン

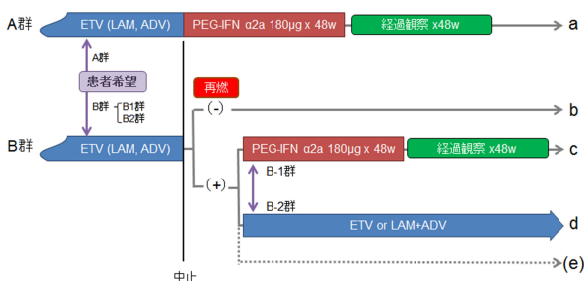


図1 研究デザイン (RESET STUDY: 田中班)

田中班の多施設共同研究では、A 群と B 群が存在するが、本報告は A 群のみを対象としている。同意が得られた核酸アナログ長期投与患者に対して、核酸アナログ製剤を中止し PEG-IFN 2a 180 µg 週 1 回投与に切り替え、48 週間の治療終了後、drug free として経過観察を行う。期間中 HBV DNA 量が 5.8 log copies/ml 以上もしくは ALT が 80 IU/L 以上に上昇する場合は再燃と定義し、持続する場合は核酸アナログによる治療を再開した (図 1)。

3 . 評価項目と研究期間

主要評価項目：治療終了後の臨床的安定化率 (Drug free)

著効：一過性の HBV DNA や ALT 値の上昇にかかわらず、治療終了後 24 週または 48 週で、HBV DNA < 4.0 log copies/ml かつ ALT < 30 IU/L となり臨床的に安定化する症例

有効：一過性の HBV DNA や ALT 値の上昇にかかわらず、治療終了後 48 週で核酸アナログ薬の再投与を必要としない症例。

副次的評価項目：臨床的安定化と関連する因子

HBs 抗原量

HBcr 抗原量

HBe 抗原/HBe 抗体

HBV genotype

PC/CP 変異

IL-28B SNP

IP10

臨床的背景因子、その他

研究予定期間

症例集積期間：2012 年 3 月～2015 年 4 月

症例追跡期間：2012 年 3 月～2016 年 11 月

(倫理面への配慮)

本試験は GCP を準用するものとする。また、

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

本研究の遂行にあたっては、兵庫医科大学倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

平成27年11月31日時点での田中班の多施設共同研究（RESET STUDY）の登録症例は156症例、当院の登録症例はA群55症例、B群7症例の計62症例である。今回は、drop outした1症例を除くA群登録54症例を対象として、核酸アナログ中止時のPEG-IFN 2a投与の有効性、さらにdrug freeとPEG-IFN 2aによるHBs抗原の変動率との相関性について検討した。

登録時の背景は、年齢46.5歳（中央値；最大-最小26-74）、性別（M/F）36/18、核酸アナログ投与期間4.85年（1.13-11.26）、HBe抗原（陽性/陰性）20/34、遺伝子型（A/B/C）4/1/49、病理組織像（F0/F1/F2/F3）1/25/18/8、HBV DNA（陰性/<2.1/>=2.1）27/17/10、HBs抗原1527.6 IU/ml（40.1-22031.0）、HBコア関連抗原4.8 log IU/ml（3.0-6.8）であった。中止基準による再燃リスク評価（低リスク/中リスク/高リスク）は、0/17/37症例と低リスク患者は存在せず、中止基準を満たさない症例が多く、このまま核酸アナログ製剤を中止した場合に予測されるdrug free達成率は22.6%と非常に低い対象群である（表1）。

	実数・中央値(最小-最大)
年齢	46.5 (26-74)
性別(M/F)	36/18
NA投与期間(Y)	4.85 (1.13-11.3)
Genotype (A/B/C)	4/1/49
HBeAg (+/-)	20/34
組織 (F0/F1/F2/F3)	1/25/18/8
HBV DNA (ケンジュツセス / <2.1/>=2.1)	27/17/10 (2.1-5.8)
HBsAg (IU/ml)	1527.6 (40.1-22031.0)
Score (0/1/2)	4/12/38
HBcrAg (logIU/ml)	4.8 (<3.0- >=6.8)
Score (0/1/2)	2/15/37
リスク(低/中/高)	0/17/37

表1 登録時の中止基準による対象者背景 (n=54)

登録54症例中、PEG-IFN 2a投与中が2症例、48週投与終了が52症例である。この52症例は、3ヶ月から24ヶ月間の経過を観察することができた。drug freeはPEG-IFN 2a治療終了後の臨床的安定化であり、24Wもしくは48Wでの著効基準、有効基準を満たした症例であるが、今回は3ヶ月毎に評価を行った。また、経過観察期間中に核酸アナログ製剤が再投与された症例は22症例であった。

PEG-IFN 2a投与終了後、多くの症例で3ヶ月から6ヶ月にかけてHBV DNAやALTの上昇を認めた。その後、一過性に収束してくる群と収束しない群に分かれ、再燃基準を持続して超えた症例では核酸アナログ製剤の再投与が行われた。PEG-IFN 2a療法によるdrug free達成率を3ヶ月毎に示すと、3ヶ月目50/52(96.2%)、6ヶ月目42/50(84.0%)、12ヶ月目21/39(53.8%)、18ヶ月目12/25(48.0%)、24ヶ月目4/10(40.0%)であった。drug free達成率は12ヶ月目までは徐々に低下してくるが、それ以降はほぼ50%前後で維持していた。これらは登録時点での中止達成予測率22.6%を大きく上回っており、長期投与の核酸アナログ製剤中止時におけるPEG-IFN 2a治療の有用性が示された(図2)。

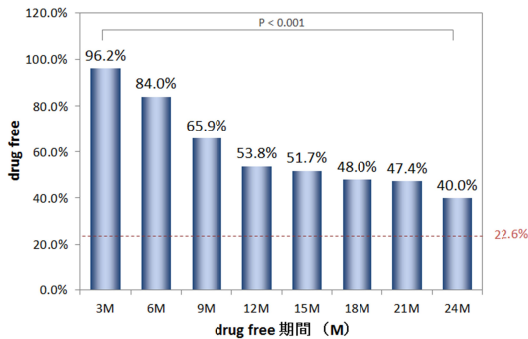


図2A PEG-IFNα2a併用によるdrug free達成率 (drug free : 核酸アナログ非再開率)

また当施設では、本研究においてPEG-IFN 2a 治療により、著明なHBs抗原の低下を認めることを明らかにしてきた。今回の集計結果でも、HBcr抗原の変動は核酸アナログ製剤投与期間中とPEG-IFN 2a 治療期間中で有意差はなく、 $-0.3 \log \text{IU}/\text{年}$ 前後の低下率であったが、HBs抗原は核酸アナログ投与期間とPEG-IFN 2a 治療期間で明らかな有意差を認め、 $-0.577 \log \text{IU}/\text{年}$ の低下率を認めた(図3)。そして、今回の52症例中におけるPEG-IFN 2a 治療によるHBs抗原の陰性化は、治療中に2症例、治療終了後に1症例の計3症例で認め、5.8%の陰性化率であった。このようにPEG-IFN 2a 治療はHBs抗原を低下させる非常に有効な手段となることが示唆された。

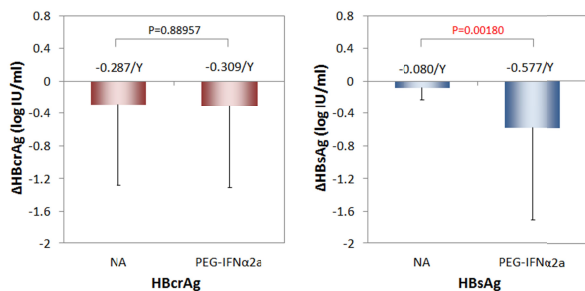


図2B HBcr抗原とHBs抗原の年間変動率

次に drug free 達成にどのような因子が関与しているのか検討を行った。Drug free を維持している26症例と核酸アナログ製剤を再投与

した20症例に群別し、各種関連因子を単変量解析した。有意差を認めたのは、登録時のHBe抗原 ($p=0.00029$)、HBV DNA ($p=0.00206$)、HBcr抗原 ($p=0.03587$)、HBcr抗原の変動率 ($p=0.03230$)、そしてPEG-IFN 2a 開始後のIP10 ($p=0.03587$)の5因子であった(表2A)。この中で最も相関性が高いのはHBe抗原であり、登録時のHBe抗原陽性症例でdrug free を維持しているのはHBe抗原がセロコンバージョンした3症例のみであった。そこで、登録時のHBe抗原陰性の29症例で再度単変量解析を行うと、有意差を認めたのは、PEG-IFN 2a 治療開始後のIP10 ($p=0.02909$)のみとなった(表2B)。しかし、いずれの検討においても、HBs抗原量やHBs抗原量の変動率は有意差を認めず、drug free には関連しないという結果となった。

	Drug free (+) (n=26)	Drug free (-) (n=20)	p
Gender (M/F)	16/10	15/5	$p=0.34530$
Age	44.4 ± 11.0	47.6 ± 12.0	$p=0.35182$
Genotype (A/B/C)	3/1/22	1/0/19	$p=0.32253$
F (F0/F1/F2/F3)	1/11/9/5	0/14/5/1	$p=0.19594$
NA投与期間 (year)	4.62 ± 2.78	5.66 ± 3.41	$p=0.26018$
IL28B (TT/non-TT)	22/4	16/4	$p=0.55120$
HBeAg (登録時) (-/+)	22/4	7/13	$p=0.00029$
ALT (Peg-IFN 48W 終了時)	42.9 ± 52.0	58.7 ± 78.6	$p=0.427334$
HBV DNA (Peg-IFN 48W 終了時)	2.08 ± 1.59	4.49 ± 2.90	$p=0.00206$
HBcrAg (Peg-IFN 48W 終了時)	4.02 ± 1.19	5.09 ± 1.87	$p=0.035879$
HBsAg (Peg-IFN 48W 終了時)	2.60 ± 1.46	2.75 ± 1.46	$p=0.758663$
中止基準 (登録時) (L/M/H)	0/6/20	0/4/16	$p=0.706784$
中止基準 (Peg-IFN 48W 終了時)	1/11/14	0/9/11	$p=0.377273$
Δ HBcrAg (Peg-IFN 48W)	-0.336 ± 0.606	0.076 ± 0.527	$p=0.032302$
Δ HBsAg (Peg-IFN 48W)	-0.682 ± 0.978	-0.388 ± 1.169	$p=0.398575$
IP10 (登録時)	159.3 ± 66.8	197.8 ± 79.1	$p=0.091021$
IP10 (Peg-IFN 48W 終了時)	271.6 ± 101.8	365.1 ± 138.6	$p=0.035879$

表2A Drug free関連因子の検討(単変量解析)

	Drug free (+) (n=22)	Drug free (-) (n=7)	p
Gender (M/F)	8/14	2/7	$p=0.71764$
Age	45.1 ± 11.1	51.0 ± 11.3	$p=0.23370$
Genotype (A/B/C)	3/1/22	1/0/19	$p=0.32253$
F (F0/F1/F2/F3)	1/9/8/4	0/4/1/0	$p=0.19594$
NA投与期間 (year)	4.96 ± 2.86	6.06 ± 3.52	$p=0.41250$
IL28B (TT/non-TT)	15/4	4/1	$p=0.96106$
ALT (Peg-IFN 48W 終了時)	45.7 ± 62.1	79.3 ± 124.9	$p=0.386257$
HBV DNA (Peg-IFN 48W 終了時)	1.78 ± 1.56	2.26 ± 1.34	$p=0.511025$
HBcrAg (Peg-IFN 48W 終了時)	3.85 ± 1.23	3.20 ± 1.65	$p=0.313352$
HBsAg (Peg-IFN 48W 終了時)	2.38 ± 1.50	2.57 ± 1.22	$p=0.783250$
中止基準 (登録時) (L/M/H)	0/6/16	0/4/3	$p=0.164086$
中止基準 (Peg-IFN 48W 終了時)	1/11/10	0/5/2	$p=0.667624$
Δ HBcrAg (Peg-IFN 48W)	-0.306 ± 0.615	-0.133 ± 0.121	$p=0.509235$
Δ HBsAg (Peg-IFN 48W)	-0.775 ± 1.047	-0.346 ± 0.348	$p=0.341628$
IP10 (登録時)	163.0 ± 68.3	221.7 ± 93.4	$p=0.098854$
IP10 (Peg-IFN 48W 終了時)	280.7 ± 101.5	420.7 ± 123.9	$p=0.029096$

表2B Drug free関連因子の検討(HBe抗原陰性症例)

そこで HBs 抗原量の推移を、いくつかの関連因子別に検討した。drug free 維持別に HBs 抗原の推移を見ると、drug free 維持群と核酸アナログ再投与群どちらも HBs 抗原が低下している症例が数多く存在し(図 3A)、核酸アナログ製剤の再投与を必要とする多くの症例で HBs 抗原が低下していることは、PEG-IFN 2a 治療に対して反応性が高い症例で肝炎の再燃が起きていることが示唆された。次いで、登録時の HBe 抗原別の HBs 抗原の推移でも、HBe 抗原の陽性、陰性関係なく両群で HBs 抗原が低下する症例が存在した。HBe 抗原陽性群で、示すセロコンバージョン症例では drug free を維持している(図 3B)。登録時の HBs 抗原量別の推移では、HBs 抗原が著明に低下するのは、登録時の HBs 抗原量が 8,000 IU/ml 以下であった。登録時の HBs 抗原量と HBs 抗原量の変動率の間には相関は認めなかったが、HBs 抗原の消失を認めたのは登録時の HBs 抗原量が低い症例であった。一方、登録時の HBs 抗原量が 8,000 IU/ml 以上の症例では PEG-IFN 2a 治療に対して反応が悪く、HBs 抗原量の変動は少なく、8,000 IU/ml 以下でも変動しない症例が存在した。(図 3C)。

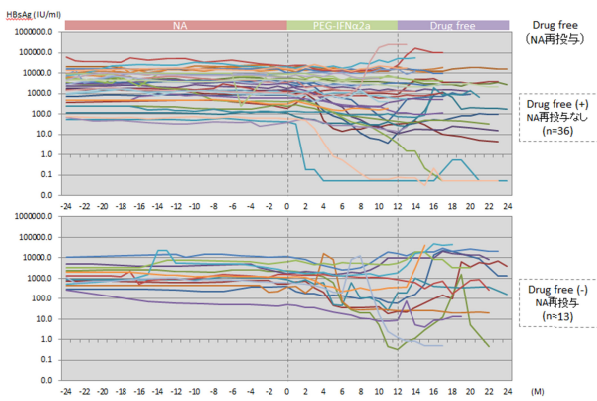


図3A Drug free (NA再開)別のHBs抗原の推移

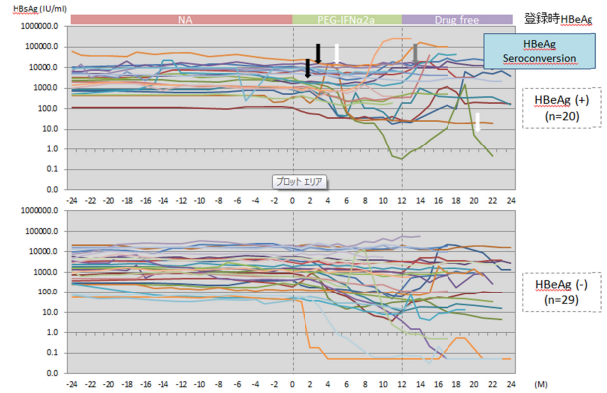


図3B 登録時のHBeAg (+/-)別のHBs抗原の推移

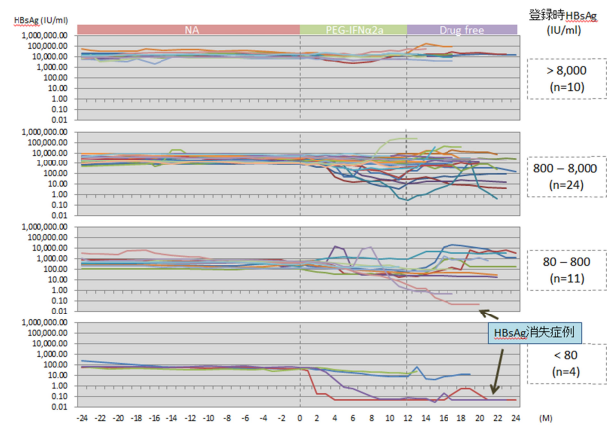


図3C 登録時のHBs抗原値別のHBs抗原の推移

さらに、肝炎が再燃し核酸アナログ製剤が再投与された 22 症例の経過を検討した。再投与された核酸アナログは、多くの症例で中止時と同じものが投与されているが、一部でエンテカビルがテノホビルに、エンテカビル+アデホビルはエンテカビル+テノホビルに変更された。この 22 症例の PEG-IFN 2a 治療開始前の HBcr 抗原、HBs 抗原の変動率は、図 2B で示す全対象症例と同様に低いですが、再投与後の変動率は -1.4 log IU/年以上と著明に低下した(図 4A)。さらに個々の症例の分布を検討すると、核酸アナログ製剤再投与によって PEG-IFN 2a 治療終了時よりさらに低下した症例が、HBcr 抗原で 10/22 症例(45.0%)、HBs 抗原で 13/22 症例(59.1%)存在した(図 4B)。このように今回、肝炎の再燃により drug free を維持できなかった症例に

においても、核酸アナログ製剤再投与によって HBcr 抗原と HBs 抗原量は登録時より低下を認め、PEG-IFN 2a の有効性が示唆された。

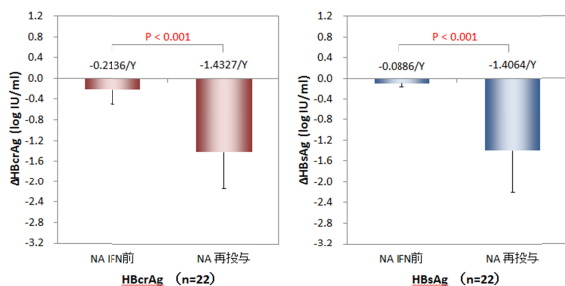


図4A PEG-IFN α 2a投与前後のNA投与時におけるHBcr抗原とHBs抗原の年間変動率

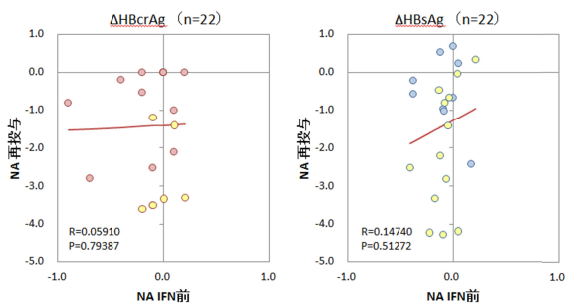


図4B PEG-IFN α 2a投与前後における核酸アナログ投与時の Δ HBcr抗原と Δ HBs抗原の分布

D. 考察

核酸アナログ製剤とインターフェロン治療の併用療法である Sequential 療法は今まで数多くの報告があるが、未だ明らかなエビデンスはなくコンセンサスが得られているとは言い難い。今回、田中班の多施設共同研究として行われている核酸アナログ治療とPEG-IFN 2aの併用療法は、従来の Sequential 療法とは概念と評価方法が大きく異なり、新たな成果が期待される。従来の Sequential 療法の多くはインターフェロンの効果を高めることを目的とした核酸アナログ治療の併用であり、対象者はインターフェロンの効果が期待される若年者を中心として、インターフェロンや核酸アナログ製剤の種類や投

与期間、併用方法などが重要視されてきた。それに対して今回の研究は、長期間の核酸アナログ治療を行っている患者を対象として核酸アナログ製剤の中止、Drug free を目的としたインターフェロン治療の有用性の検討である。そのため対象者は、少なくとも2年以上の核酸アナログ治療者であり、若年者だけでなく、35歳以上も含まれる。主要評価項目はBRやVRではなく、臨床的安定化 (drug free) であり、副次項目として肝細胞内のcccDNAを反映するHBコア関連抗原やHBs抗原量による評価で、その減少や陰性化を目指す。さらに併用期間は、従来の報告で明らかなエビデンスが得られていないことから設定せず、切替えとした。これにより核酸アナログ治療中止時のHBV DNAやALT上昇に伴う肝炎再燃とインターフェロンの免疫賦活効果の相乗効果が期待される。このように本研究は従来とは異なる観点から企画されている。

今回の対象群は年齢が46.5歳と従来の Sequential 療法の報告より高く、核酸アナログ製剤の平均投与期間は4.85年、最長期間は11年と長期間投与が行われていた。多くの症例でALTは30以下、HBV DNAは <2.1 と肝機能は安定化していたが、HBsAgやHBcrAgは必ずしも低下していなかった。中止基準の低リスク群は存在せず、drug free達成予測率も22.6%と非常に低く、核酸アナログ製剤の中止困難症例群と考えられた。

PEG-IFN 2aの48週投与終了後、多くの症例で、HBV DNAやALTの上昇を認めるため、どの時期にdrug freeを評価するか非常に難しい。臨床的安定化として著効、有効基準を設定しているが、今回は3ヶ月毎の評価を行った。その結果、48Wまでは経過時間とともにdrug free維持率は低下してくるが、48W以降で肝機能は安定化し維持率も安定化した。評価時期は、少なくとも48W必要であると考えられた。本研究における48W以降のdrug free維持率は50%前

後であり、登録時の予想達成率 22.6%を大きく上回り、PEG-IFN 2a 治療の有用性が示された。HBV DNA や ALT は登録時より PEG-IFN 2a 治療時点で高値を示す症例が多かったが、核酸アナログ製剤の中止基準スコアは向上していることから、PEG-IFN 2a の効果で HB コア関連抗原や HBs 抗原定量が低下したことが drug free 達成に寄与していると考えられた。

HBs 抗原量の低下は自然経過や核酸アナログ製剤治療においては、 $-0.1 \log \text{ IU/年未満}$ と非常に緩徐であるが、本研究において PEG-IFN 2a 治療により平均で $-0.6 \log \text{ IU/年}$ 低下し、最大で $-3.0 \log \text{ IU/年}$ 以上の低下を認める症例が存在することが明らかとなった。さらに HBs 抗原の陰性化を 3 症例、5.8%に認め、自然消失率は年率 3.0%程度といわれていることから、PEG-IFN 2a 治療はそれを大きく向上させる有効な手段となると考えられた。HBcr 抗原の変動率は、核酸アナログ治療と PEG-IFN 2a 治療で有意差を認めないが、PEG-IFN 2a 治療により、HBe 抗原の陰性化を 5 症例認め、これらの症例では HBcr 抗原が $-1.0 \log \text{ IU/年}$ 以上低下し drug free を達成していた。

しかし、HBs 抗原の低下と Drug free の関連性の検討では、HBs 抗原量、HBs 抗原量の変動率、さらに中止基準も有意差を認めず drug free には寄与しないという結果となった。Drug free 達成に最も強く関連したのは HBe 抗原であり、有意差を認めた HBV DNA や HBcr 抗原、その変動率等は HBe 抗原陰性症例のみでは関連性が消失したことから、HBe 抗原に附随した反応であったと考えられる。drug free 達成が期待できるのは HBe 抗原陰性症例であるが、HBe 抗原陽性でも PEG-IFN 2a 治療により HBe 抗原のセロコンバージョンをおこした症例では肝機能は安定化し drug free を維持している。今後、HBe 抗原のセロコンバージョンはどのような症例で起こりやすいのか検討することが必要である。ま

た、IFN 誘導蛋白である IP10 の変動率が有意差を認めたのは、PEG-IFN 2a に対する反応性を示したものと考えられた。

このような結果に対して、HBs 抗原の推移を各関連因子で比較検討を試みた。その結果、HBs 抗原が著明に低下しても、Drug free が維持できるとは限らず、むしろ PEG-IFN 2a 投与終了後に肝炎が再燃し、核酸アナログ製剤の再投与が必要とされた症例の多くは HBs 抗原が大きく低下した症例であった。(図 3A)。しかし、HBs 抗原の陰性化症例では肝炎の再燃は認めないことから、PEG-IFN 2a 終了時に HBs 抗原量が陰性、もしくは十分に低下していることが drug free には必要であるかもしれない。その時の評価に中止基準は役立つかもしれない。

一方で、PEG-IFN 2a 治療に対して反応性が乏しく、HBs 抗原がほとんど低下しなかった症例は、PEG-IFN 2a 治療後も肝炎の再燃を起さず drug free を維持していた。このような症例では、長期の核酸アナログ投与により HBV に対する免疫能が低下し、非活動性キャリア化していると考えられ、PEG-IFN 2a 治療を行わなくても drug free が達成できる可能性が示唆された。

また、PEG-IFN 2a 治療後の肝炎再燃症例における核酸アナログ再投与時の HBcr 抗原と HBs 抗原量の変動率はどちらも大きく、PEG-IFN 2a 治療終了時の値より低下した症例が存在した。このことから、PEG-IFN 2a 治療による HBs 抗原量の低下は drug free を達成することはできなかったが、HBs 抗原の低下は維持され、HBs 抗原の陰性化を目指す観点から PEG-IFN 2a 治療の有用性が示唆された。PEG-IFN 2a 治療後の有効な核酸アナログ製剤の投与は、これを繰り返すことによって、drug free の達成と HBs 抗原の陰性化を目指す治療法となる可能性が考えられた。

E. 結論

今回の前向き研究において、長期核酸アナログ製剤投与の中止時に PEG-IFN 2a 療法は非常に有効な手段となると考えられ、HBcr 抗原と HBs 抗原量による中止基準の有効性が示唆された。

また、PEG-IFN 2a 療法と核酸アナログ製剤の併用は HBs 抗原陰性化を目指す治療においても有効となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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; 8: 1253-1263
- 2) Nishikawa H, Enomoto H, Saito M, Aizawa N, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, S R Kim, 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 Virology & Antiviral Res. 2014; 3:
- 3) Aizawa N, Enomoto H, Takashima T, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Iijima H, Nishiguchi S. Trombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. J Gastroenterol 49: 1253-1263, 2014
- 4) 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, Nishiguchi S. An Increased Ratio of Glycated Albumin to HbA1c Is Associated with the Degree of Liver Fibrosis in Hepatitis B Virus-Positive Patients. Gastroenterol Res Pract 2014: 351396, 2014

- 5) 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. Hepato gastroenterology 2013; 60: 149-152

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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

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

分担研究報告書

HBV 感染者に対するインターフェロンの効果

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

研究要旨: B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療例に対して行われる sequential 療法における IFN 治療効果については不明な点が多い。本研究では、B 型慢性肝疾患において、核酸アナログ投与の有無による IFN 反応性の違いを明らかにすることを目的とした。37 例の IFN 投与例を単独投与例と sequential 療法例に分け、治療中・治療後の HBs 抗原量の推移を観察した結果、sequential 療法例において、HBs 抗原低下例が多く認められ、核酸アナログ治療が IFN 反応性に影響しているものと考えられた。メカニズムを解明するため、HBV 発現培養細胞株を用いて、細胞内の IFN 反応性を検討した結果、核酸アナログ添加により、IFN 添加後の細胞内の IFN 誘導遺伝子発現は増強しており、核酸アナログによる HBV 抑制が肝細胞内の IFN 反応性を改善している可能性が示唆された。さらに、細胞内の IFN 反応性には、Large-HBs 蛋白や HBc 蛋白の発現が関与している可能性が示唆された。以上の結果から、核酸アナログ治療を先行し、HBV 増殖を抑制することで、IFN による抗ウイルス効果が向上する可能性が示唆された。

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

検討 1: B 型慢性肝疾患症例における IFN 治療効果の比較

対象は、当院および関連施設にて IFN 治療を行った 37 例について、治療終了時および終了後の HBV 関連マーカーの推移について検討した。解析対象は、全例 HBV genotype C 感染例とした。IFN 単独投与症例が 17 例、核酸アナログ治療を先行した sequential therapy 症例が 20 例。HBs 抗原の測定は、ARCHITECT (Abbott、CLIA 法) を用い、HBV DNA の定量にはアキュジーン m-HBV (Abbott、0.2ml 法) を用いた。

検討 2: in vitro における細胞内 IFN 誘導遺伝子発現の変化

HepG2 細胞に HBV 発現プラスミドを stable

transfectionして作成したHBV発現細胞株を用いて、細胞内のIFN誘導遺伝子(ISGs)誘導について検討した。HepG2細胞およびHBV発現細胞の培養上清中に核酸アナログ(エンテカビル:ETVならびにテノホビル:TDF)およびIFNを添加し、IFN添加6時間後の細胞内のISGs発現をリアルタイムPCRにて検討した。また、ISGsの代表的遺伝子であるMx1のプロモーター領域をクローニングしたプラスミドを用いて、Mx1の転写活性とHBV関連蛋白発現との関連性をレポーターアッセイやリアルタイムPCRにて検討した。

(倫理面への配慮)

患者血清保存ならびにB型肝炎ウイルス関連マーカーの測定に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている(疫-726)。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。また、本研究では、遺伝子組換え生物等を使用しているが、これらの使用に関しては、広島大学ならびに文部科学省より承認を受けて行っている(26-20[26受文科振第464号]26-223)。

C. 研究結果

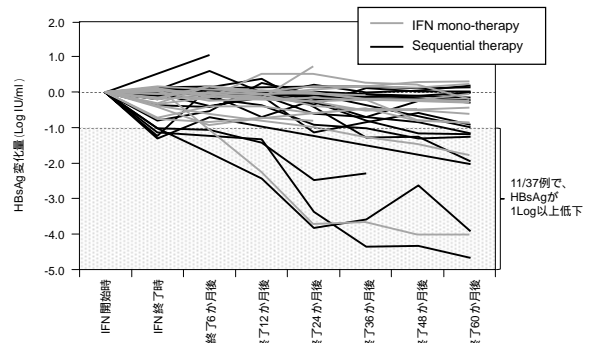
検討1: B型慢性肝疾患症例におけるIFN治療効果の比較

まず、IFN単独投与症例(N=17)とsequential therapy症例(N=20)の臨床背景を比較したところ、sequential therapy症例では、核酸アナログ製剤を先行投与されていることから、IFN治療開始時のALT値が有意に低く(P=0.002)、HBV DNA量も有意に低値だった(P<0.001)。一方、年齢やHBeAg陽性率には有意な差は認めなかった。

これらの37症例におけるIFN治療中のHBs抗原量の推移を検討したところ、図1に示すよ

うに、Sequential therapy症例において、IFN治療中、治療後にHBs抗原量の低下する症例が多く認められた。

図1. インターフェロン治療中および治療後のHBsAg変化量の推移



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

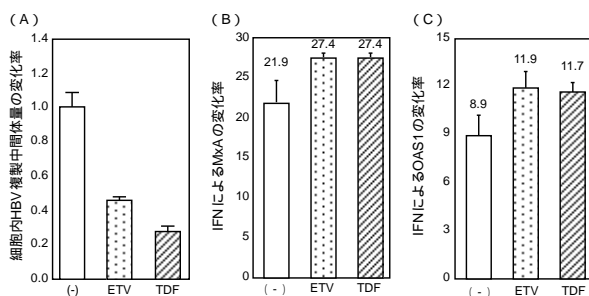
検討2: in vitroにおける細胞内IFN誘導遺伝子発現の変化

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

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

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

図2. 核酸アナログによるIFN反応性の回復

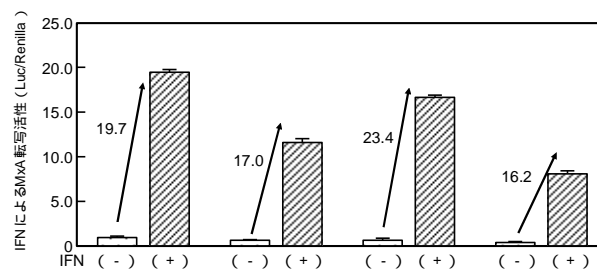


加していないHBV持続発現細胞と比して、核酸アナログでHBV増殖を抑制した細胞では、IFN誘導遺伝子であるMxAやOAS1の誘導が増強しており、核酸アナログ製剤によりIFN反応性が回復したことが示唆された(図 2B、2C)。

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

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

図3. MxA発現変化率とHBV関連蛋白の関連



D. 考察

本研究では、B型慢性肝疾患症例に対し、IFN単独投与を行った場合と核酸アナログ療法を先行して行った場合(Sequential therapy)におけるIFN投与中および投与終了後のHBs抗原量の推移について検討した。37例と少数例での解析であるが、Sequential therapy症例において、1 Log IU/ml以上HBs抗原の低下する症例が多く認められた(P=0.036)。さらに、治療前のHBs抗原量やHBe抗原の有無もHBs抗原低下に関与していることが示唆されており(P=0.027、P=0.031)、IFN治療前にHBeセロコンバージョンを誘導し、ウイルス増殖を抑制しておくことが、IFN反応性を向上させる上で重要であると考えられた。

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

3. 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-sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic

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

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

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

分担研究報告書

B型肝炎に対するペグインターフェロンによる核酸アナログ薬中止の検討

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

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

ン・アデホビル併用2例，エンテカビル・アデホビル併用1例であった。

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

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

D. まとめ

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

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

分担研究報告書

RESET study 登録症例における HBs 抗原量の推移について

研究分担者 姜 貞憲 手稲溪仁会病院 消化器病センター 主任医長

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

CHB と診断され NUC 投与後 HBeAg 陰性持続を

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

当研究において観察し得る限り対象症例における健康危険情報は認めない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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

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

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

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

* ; median (range), §; mean ± STD

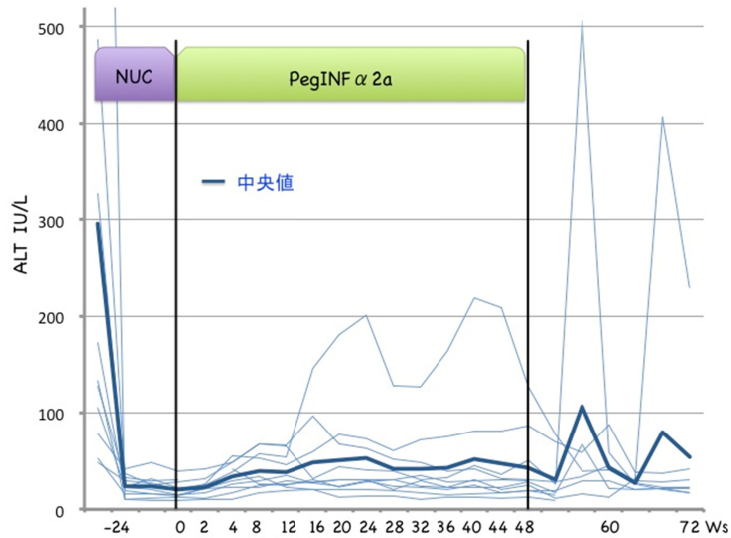


図1. RESET Study 10症例 におけるALTの推移

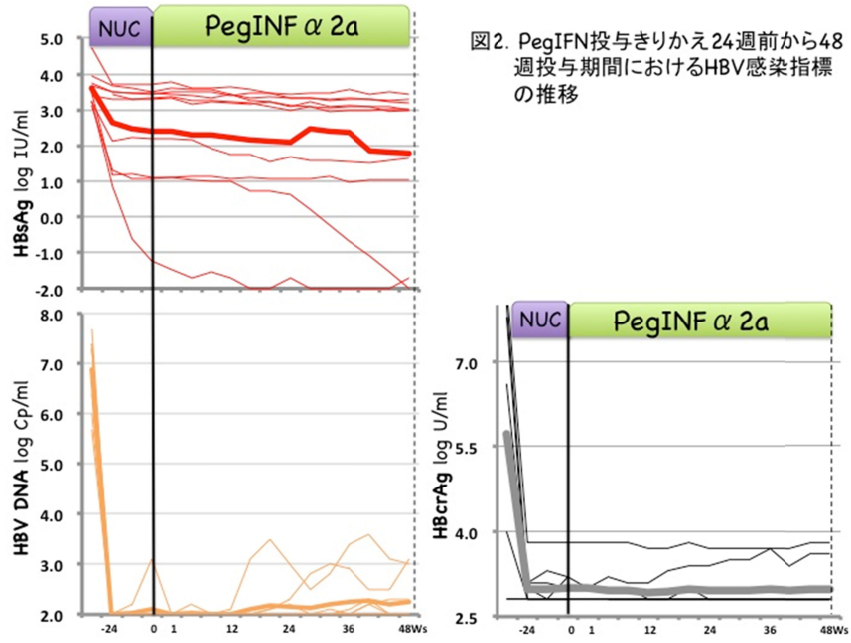


図2. PegIFN投与切り替え24週前から48週投与期間におけるHBV感染指標の推移

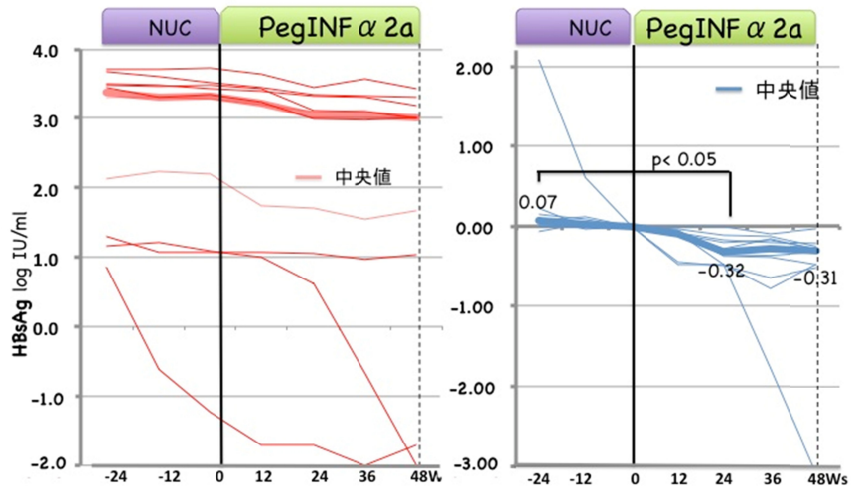


図3. PegIFN投与切り替え24週前から48週投与期間におけるHBsAg量と減衰量の推移
検定はMann-Whitney's U-testを用いた。

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

分担研究報告書

Peg-interferon Sequential 治療の効果

研究分担者 黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

量、HBe 抗原を測定し、治療効果をモニターした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H,

Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 2014; 59:89-97.

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

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

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究報告書

B 型慢性肝炎における核酸アナログ中止症例の検討

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

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

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

C. 研究結果

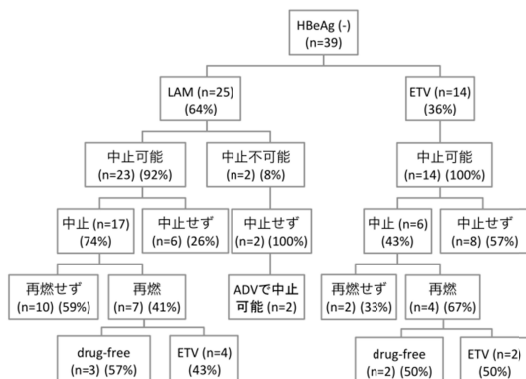
1. 患者背景

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

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

2. 症例の経過

(1) HBeAg 陰性症例



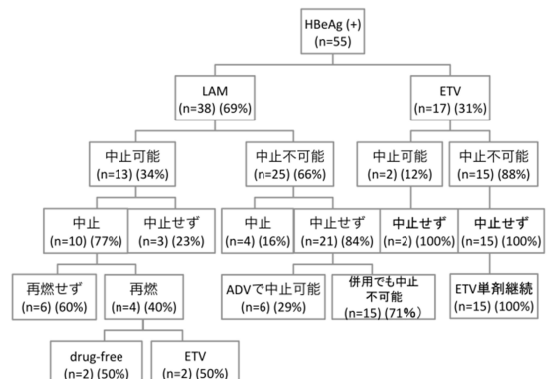
ラミブジン投与症例が 25 例 (64%)、エンテ

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

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

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

(2) HBeAg 陽性群症例



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

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

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

3) NA 投与後、drug-free となった症例の割合

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

3 . 中止可能となる症例の解析

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

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

4 . 再燃症例の解析

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

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

5 . HBsAg 陰性となる症例の解析

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

HBsAg が陰性化する背景を解析すると、有意

差があった因子は HBV-DNA 量だけであった。6 Log copy/mL 未満、6 Log copy/mL 以上の 2 群に分けると、HBsAg 陰性化群では 72% vs 29%、HBsAg 陽性群では 12% vs 89%であり、NA 投与開始時の HBV-DNA 量が少ない症例で有意に HBsAg 陰性化する症例が多いことが示された ($P = 0.001$)。このことは Kaplan-Meier plot による累積 HBsAg 陰性化率でも確認された ($P = 0.015$)。

6. 発癌症例の解析

全 94 例中 5 例 (5.3% ; 年率 0.6%) に発癌を認めた。内訳は HBeAg 陰性 39 例中 2 例 (5.1% ; 年率 0.6%)、HBeAg 陽性例 55 例中 3 例 (5.5% ; 年率 0.6%) であった。発癌例の背景因子を解析すると年齢のみが有意な因子であり、発癌例 5 例中 4 例 (80%) が 60 才以上であり、非発癌例 79 例中 16 例 (18%) に比し、有意に高齢者が多かった ($P = 0.01$)。Kaplan-Meier plot でも同様の結果であった ($P = 0.01$)。

7. 死亡症例の解析

94 例中 4 例 (4.3%) で死亡を認め、4 例全例が HBeAg 陽性患者であった。肝関連死は HCC の 1 例 (1%) のみであり、他 3 例の死因は胃癌、膵癌、原因不明であった。

D. 考察

NA 投与後約 9 年間の経過で drug-free となった症例の割合は、HBeAg 陰性例で 39 例中 17 例 (44%)、陽性例で 55 例中 8 例 (15%) であった。したがって、HBeAg 陰性例の半数以上、HBeAg 陽性例の多くは NA の服用を続けざるを得ない状況にあるといえる。HBeAg 陰性者においては半数弱で drug-free にすることが可能であることが判明した。

HBeAg 陰性症例ではほとんどの症例 (95%) で中止可能基準を満たしたが、HBeAg 陽性症例

で中止可能基準を満たしたのはわずか 27% であった。Ono らは 4 年間の ETV 投与により、HBeAg 陽性患者の 93% で HBV-DNA が陰性化した、seroconversion したのは 38% であったことを報告しており、HBeAg 陽性症例では NA 投与により、seroconversion を達成するのは一部の症例にとどまるようである。HBeAg 陽性症例のうち、中止可能基準を満たすことに関与する因子は NA 投与前の HBV-DNA が少ない症例であった。すなわち、ウイルス量の多い HBeAg 陽性症例に対して NA を投与開始した場合には中止することが困難であると考えられる。

NA 治療開始前の因子では血清 ALT 値が高い症例で再燃が有意に少ないことが判明した。これは NA 開始時に HBV に対する強い免疫応答が惹起されていることを示唆し、免疫応答期 immune clearance phase から低増殖期 low replicative phase に向かっている過程であったのかもしれない。

再燃症例 15 例のうち、27% は ALT 500 IU/L 以上の shub を起こしたが、肝不全とはならなかった。NA 製剤の治験、臨床研究ではある一定の期間 NA 製剤を投与した後、中止しているが、肝不全となった症例はほとんど報告されていない。一方、HBV 再活性化時には致死的な肝不全の発症が多く報告されている。この違いは、リツキサンの化学療法による免疫系の変動が大きく関与していると考えられる。NA 製剤中止後の再燃においては免疫が正常に機能しているため、肝不全に陥ることが少ないのかもしれない。ただ、ガイドラインでも示されているように、F3、肝硬変など肝予備能が低下している場合には注意が必要である。

HBsAg が陰性化した割合は HBeAg 陰性で年率 1.4%、HBeAg 陽性で年率 0.4%、全体で年率 0.8% であった。HBsAg 陰性化に関与する因子は NA 投与前の HBV-DNA が少ない症例であった。NA 投与前の HBsAg 量の少ない症例で HBsAg 陰性化

が高率におこることが予想されるが、本研究では有意差は認められなかった。

発癌は HBeAg 陰性で年率 0.6%、HBeAg 陽性で年率 0.6%、全体で年率 0.6%に認められた。発癌例の背景因子の解析では年齢のみが有意な因子であり、60 才以上で有意に発癌を多かった。これまで報告されている HBV-DNA 量や肝線維化は有意差がなかった。これは発癌症例数が少ないことに起因しているかもしれない。

E. 結論

NA を投与された B 型慢性肝炎患者 94 例について、その長期経過と NA が中止可能となる因子について検討し、以下の成績を得た。

1) 約 9 年間の経過観察で、drug-free になる症例の割合は HBeAg 陰性例で 44%、陽性例で 15%であった。

2) NA 投与開始時 HBV-DNA 量低値例で NA 中止可能となる症例が多く認められた。

3) NA 投与開始時 ALT 値高値例で NA 中止後の再燃が少なかった。

4) HBsAg 陰性化は年率 0.8%、発癌は年率 0.6%で認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kagawa T, Oka A, Kobayashi Y, Hiasa Y, Kitamura T, Sakugawa H, Adachi Y, Anzai K, Tsuruya K, Arase Y, Hirose S, Shiraishi K, Shiina T, Sato T, Ting W, Tanaka M, Hayashi H, Kawabe N, Robinson PN, Zemojtel T, Mine T. Recessive inheritance of population-specific intronic LINE-1 insertion causes a Rotor syndrome phenotype. *Hum Mutat*. 2015; 36(3): 327-32.

2) Shomura M, Kagawa T, Shiraishi K, Hirose S, Arase Y, Koizumi J, Mine T. Skin toxicity predicts efficacy to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2014; 6(9): 670-6.

3) Kagawa T, Orii R, Hirose S, Arase Y, Shiraishi K, Mizutani A, Tsukamoto H, Mine T. Ursodeoxycholic acid stabilizes the bile salt export pump in the apical membrane in MDCK II cells. *J Gastroenterol*. 2014; 49(5): 890-9.

2. 学会発表

1) Kagawa T, Anzai K, Tsuruya K, Arase Y, Hirose S, Shiraishi K, Mine T. Contribution of polymorphic LINE-1 retrotransposon insertion in SLC01B3 gene to susceptibility to drug-induced cholestasis. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, 2014.

2) Tsuruya K, Kamiya A, Chikada H, Anzai K, Arase Y, Hirose S, Kagawa T, Mine T. Characterization and expansion mechanisms of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, 2014.

3) 長田成彦、加川建弘、峯 徹哉 . B 型肝炎の治療-B 型慢性肝炎における核酸アナログ中止症例の検討 . 第 100 回日本消化器病学会総会 . 東京 2014 年

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

平成 26 年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Matsumoto A, <u>Yatsuhashi H</u> , Nagaoka S, <u>Suzuki Y</u> , Hosaka T, <u>Tsuge M</u> , Chayama K, <u>Kanda T</u> , Yokosuka O, <u>Nishiguchi S</u> , Saito M, Miyase S, <u>Kang JH</u> , <u>Shinkai N</u> , Tanaka Y, Umemura T, <u>Tanaka E</u>	Factors associated with the effect of interferon-sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B	Hepatol Res			in press
Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, Komatsu M, <u>Tanaka E</u>	Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion	World J Gastroenterol	21(2)	541-548	2015
<u>Tanaka E</u> , Matsumoto A	Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleoside/nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B	Hepatol Res	44 (1)	1-8	2014
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, <u>Kurosaki M</u> , Asahina Y, Izumi N, <u>Kang JH</u> , 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, <u>Tanaka E</u> , 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	9 (2)	e86449	2014
Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, <u>Tanaka E</u>	Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B.	Hepatol Res	44 (10)	E172-180	2014

Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, <u>Tanaka E</u>	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B.	HepatoI Res	44 (10)	E45-53	2014
Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, <u>Shinkai N</u> , Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y.	Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population.	PLoS One	9(1)	e86007	2014
Yamada R, <u>Hiramatsu N</u> , Oze T, Morishita N, Harada N, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Yamada A, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Oshita M, Itoh T, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T; the Osaka Liver Forum.	Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment of chronic hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol			in press
Suzuki F, Hosaka T, <u>Suzuki Y</u> , Akuta N, Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H	Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine.	J Gastroenterol	49	1094-1104	2014
Hara T, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, <u>Suzuki Y</u> , Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H	Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients.	J Viral Hepat	21	802-808	2014

Suzuki F, Akuta N, <u>Suzuki Y</u> , Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Suzuki Y, Kumada H	Virologic breakthrough in a patient with chronic hepatitis B by combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir.	Drug Des Devel	8	869-873	2014
Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, <u>Suzuki Y</u> , Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H	Correlation Between Hepatitis B Virus Surface Antigen Level and Alpha-Fetoprotein in Patients Free of Hepatocellular Carcinoma or Severe Hepatitis.	J Med Virol	86	131-138	2014
Tanaka M, Suzuki F, Seko Y, Hara T, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, <u>Suzuki Y</u> , Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	Renal dysfunction and hypophosphatemia during long-term lamivudine plus adefovir dipivoxil therapy in patients with chronic hepatitis B.	J Gastroenterol	49	470-480	2014
Kobayashi M, Hosaka T, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, <u>Suzuki Y</u> , Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H	Seroclearance rate of hepatitis B surface antigen in 2,112 patients with chronic hepatitis in Japan during long-term follow-up.	J Gastroenterol	49	538-546	2014
Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, <u>Suzuki Y</u> , Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	HLA-DP genes polymorphisms associate with hepatitis B surface antigen kinetics and seroclearance during nucleoside analogue therapy.	Liver Int		Epub ahead of print	2014
Bae SK, <u>Yatsunami H</u> , 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	44(10)	E267-272	2014
Tsutsui H, <u>Nishiguchi S.</u>	Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice.	Int J Mol Sci	15(5)	7711-30	2014

Enomoto H, Aizawa N, Nakamura H, Sakai Y, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Aoki T, Yuri Y, Yoh K, Hashimoto K, Ishii A, Takashima T, Iwata K, Saito M, Imanishi H, Iijima H, <u>Nishiguchi S.</u>	An Increased Ratio of Glycated Albumin to HbA1c Is Associated with the Degree of Liver Fibrosis in Hepatitis B Virus-Positive Patients.	Gastroenterol Res Pract				2014
Akamatsu S, Hayes CN, <u>Tsuge M</u> , 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
Kohno T, <u>Tsuge M</u> , Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN and Chayama K.	Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA.	J Viral Hepat				in press
Huang YW, Takahashi S, <u>Tsuge M</u> , Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K and Kao JH	On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy.	Antivir Ther				in press
Nakamura M, <u>Kanda T</u> , Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O.	Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance.	Hepatology			Epub ahead of print	2015
Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, <u>Kanda T</u> , 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	22(2)	94-102		2015
Sarkar N, Panigrahi R, Pal A, Biswas A, Singh SP, Kar SK, Bandopadhyay M, Das D, Saha D, <u>Kanda T</u> , Sugiyama M, Chakrabarti S, Banerjee A, Chakravarty R.	Expression of microRNA-155 correlates positively with the expression of Toll-like receptor 7 and modulates hepatitis B virus via C/EBP- in hepatocytes.	J Viral Hepat			Epub ahead of print	2015

Nakamoto S, <u>Kanda T</u> , Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O.	Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment.	Int J Mol Sci	15(11)	21455-67	2014
Jiang X, <u>Kanda T</u> , Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O.	Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity.	World J Gastroenterol	20(23)	7197-206	2014
Orito E, Hasebe C, <u>Kurosaki M</u> , Osaki Y, Jyoko K, Watanabe H, Kimura H, Nishijima N, Kusakabe A, Izumi N.	Risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic HBV patients during nucleot(s)ide analogues therapy.	Hepatol Res			in press
Ito K, Yotsuyanagi H, <u>Yatsunami H</u> , Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, <u>Kurosaki M</u> , Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M.	Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults.	Hepatology	59	89-97	2014