

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590757

研究課題名（和文） B型肝炎の抗ウイルス療法における血中 RNA 遺伝子量測定の意義

研究課題名（英文） Clinical significance of serum HBV RNA in patients with chronic Hepatitis B under anti-viral therapy

研究代表者

田中 榮司（TANAKA EIJI）

信州大学・医学部・教授

研究者番号：50163506

研究成果の概要（和文）：

HBV RNA/DNA量測定系を開発し、その臨床的意義をHBV DNA量、HBcrAgと比較検討した。B型慢性肝炎のラミブジン治療例を対象とし、治療開始6ヶ月目の測定値でその後の耐性株出現を予測した。HBV DNA量は耐性株が出現しやすい症例の予測に、HBcrAgは耐性株が出現しにくい症例の予測に有用であった。HBV RNA/DNA量はHBV DNAに近い性格を示したが、感度に優れ、精度は3者の中で最も高かった。HBV RNA/DNA量測定系は新しいマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Hepatitis B virus (HBV) RNA could be measured simultaneously with HBV DNA (HBV RNA/DNA) using a real-time detection polymerase chain reaction assay with a preceding step of reverse-transcription. The clinical usefulness of HBV RNA/DNA was analyzed and compared to those of HBV DNA and core related antigen (HBcrAg) for predicting the appearance of HBV DNA breakthrough in patients with chronic hepatitis B undergoing lamivudine therapy. The breakthrough was prospected using the three parameters taken 6 months after starting lamivudine therapy. Our findings confirm that HBV DNA is useful for identifying patients who are at high risk for HBV breakthrough. HBcrAg is useful for isolating those who are at low risk, and HBV RNA/DNA showed predictive characteristics similar to HBV DNA with higher sensitivity and highest accuracy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：B型肝炎、RNA 遺伝子、抗ウイルス療法

1. 研究開始当初の背景

B型慢性肝炎は肝炎の重症化や肝細胞癌の合併により死に至る疾患である。C型肝炎と異

なり、インターフェロン治療でもウイルスを排除することはできず難治性の疾患である。近年、ラミブジンなどのB型肝炎ウイルス（H

BV) に対する核酸アナログ薬が臨床使用されるようになり、ウイルス量の低下とこれに伴うALT値の正常化が得られるようになった。しかし、これらの治療も完全なものではなく、いくつかの問題が指摘されている。第一は、これらの治療を行ってもHBVを完全に排除することは困難であり、経過とともに核酸アナログ薬に対する耐性株が出現が出現することである。第二点は治療を中止すると肝炎が再燃することである。

HBVが核酸アナログ薬で排除されない最大の要因は、その増殖過程においてHBV cccDNAの核内にプールを作ることにある。このcccDNAは極めて安定であり、核酸アナログ薬投与しても極めて緩徐にしか減少しない。この結果、血中のHBV DNA量と肝細胞中のHBV DNA量は乖離する。耐性株の出現や治療中止後の肝炎再燃にはこのcccDNAが重要な役割を果たしている。このため、核酸アナログ薬治療では血中のHBV DNA量のみならず肝細胞中のcccDNA量をみるのが有用と報告されている。

肝細胞中のcccDNA量を特異的に測定することは可能であるが、その測定には肝生検を必要とするため臨床応用は制限される。これまで、肝細胞中のcccDNA量を反映する血中マーカーとしてHBコア関連抗原 (HBcrAg) が報告されている。しかし、これを確実にするためには別の観点からの解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

今回の研究では、HBV がその増殖過程において一旦RNAになってからDNAに逆転写されることに着目し、DNAではなくRNAを遺伝子として持つHBVの測定系を検討する。我々は、核酸アナログ薬投与下ではHBV RNAがDNAに比較して有意に血中に検出されることをこれまで報告した。今回の研究では、HBV RNA量の測定系を確立し、HBV DNA量やHBcrAg量と比較することにより、新しいウイルスマーカーとしての意義を検討する。

3. 研究の方法

HBV RNAの測定は大きく分けて二つの方法を検討した。第一は、血清から核酸を抽出後DNAaseによりDNAを消化しHBV RNAのみを測定する方法である。第二は、DNAaseによる前処理を行わずHBV RNAとDNAを同時に測定する方法である。理論的には前者の方がより正確にHBV RNA量を測定することになるが、問題点も多かった。まず、DNAase処理の条件設定である。この処理条件によりRNAまで破壊されてしまうことがあり、測定結果の安定性が低下した。また、測定のステップが一つ余分になるため煩雑が増した。このため、次にDNAase処理なしでHBV RNAとDNAを同時に

測定する方法を検討した。

HBV RNAとDNAを同時に特定するRNA/DNA測定法の原理は、核酸アナログ薬使用時はHBV DNA量は十分低下するので、同時に測定してもRNA量を反映することが可能であることである。実際、RNA/DNA量をDNA量と比較すると核酸アナログ薬投与下では異なった動きを示した。DNAase処理を行う方法よりも安定した測定結果が得られ、さらに簡便であることから臨床応用にも向いていると判断した。よって、HBV RNA/DNA測定法を選択しその後の検討を行った。実際の測定では、血清から核酸を抽出後に逆転写反応を行い、全ての核酸をDNAに変換した。次に、このサンプルについてHBV DNAをリアルタイムPCR法にて定量的に測定した。測定感度は2.6 log copy/mlであった。

HBV RNA/DNA量の臨床的意義については、B型慢性肝炎のラミブジン治療例を対象とし、治療開始6ヶ月目の測定値で耐性株出現を予測することで検討した。

4. 研究成果

ラミブジン治療を行ったB型慢性肝炎患者36例を対象として、ラミブジン耐性株出現予測に関するHBV DNA量、HBcrAg量、HBV RNA/DNA量測定の有用性を比較検討した。対象とした36例中16例で治療中に耐性株が出

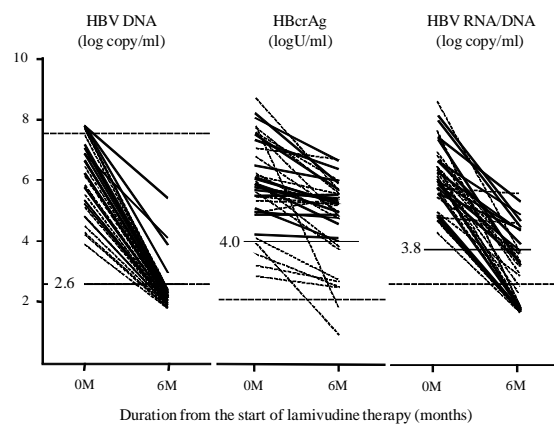


図1: ラミブジン治療開始時から6ヶ月目のHBV DNA量、HBcrAg量、HBV RNA/DNA量の変化。実線はラミブジン耐性出現例、破線は非出現例を示す。

現し、血中HBV DNA量の再上昇がみられた。各測定値の、ラミブジン治療開始時から6ヶ月目までの変化を図1に示した。HBV DNA量は速やかに低下し、89% (32/36) の症例で検出感度未満となった。HBcrAg量の低下速度は最も緩やかで、6ヶ月で検出感度以下になったのは2例のみであった。HBV RNA/DNA量の変化はHBV DNA量とHBcrAg量の間傾向を示した。

ラミブジン治療開始には、HBV RNA/DNA量はHBV DNA量ともHBcrAg量とも有意の正の相関を示した(図2)。これに対し、ラミブジン治療開始6ヶ月目の時点では、HBV RNA/DNA

量は HBcrAg 量と有意の相関を示したが、HBV DNA 量とは相関がなかった (図 3)。これは、ほとんどの症例で HBV DNA が陰性化したためと考えられた。

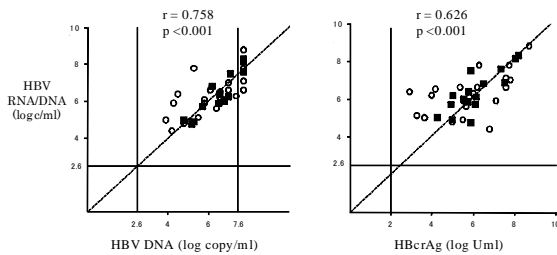


図2: ラミブジン治療開始時における、HBV RNA/DNA量に対するHBV DNA量とHBcrAg量の相関。■は耐性株出現例、○は非出現例を示す。

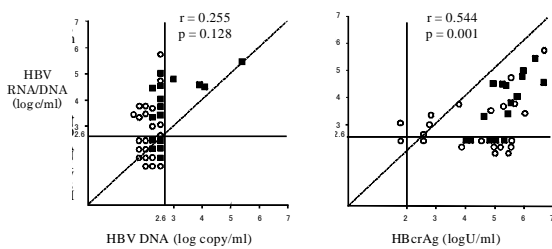


図3: ラミブジン治療開始6ヶ月目における、HBV RNA/DNA量に対するHBV DNA量とHBcrAg量の相関。■は耐性株出現例、○は非出現例を示す。

ラミブジン耐性株出現予測を行う場合の cut-off 値は、治療開始 6 ヶ月目の値を使用し ROC 解析により求めた。各マーカーの cut-off 値は、HBV DNA 量が 2.6 log copy/ml、HBcrAg 量は 4.0 log U/ml、HBV RNA/DNA 量は 3.8 log copy/ml であった。この値で予測した場合の感度、特異度、精度はそれぞれ、HBV DNA 量で 25%、100%、67%、HBcrAg 量で 100%、40%、67%、HBV RNA/DNA 量で 50%、90%、72% であった。図 4 には、各マーカー毎に、それぞれの cut-off 値を基準に予測した耐性株出現状況を示した。治療開始 6 ヶ月の時点で HBV DNA が 2.6 log copy/ml 以上の症例は全例で 2 年以内に耐性株が出現した。これに対し、治療開始 6 ヶ月の時点で HBcrAg 量が 4.0 未満の症例では全例で耐性株の出現はなかった。これらの結果より、HBV DNA 量は耐性株が出現しやすい症例の予測に、また、HBcrAg 量は耐性株が出現しにくい症例の予測に有用であることが示された。HBV RNA/DNA 量は HBV DNA 量と類似した予測能であったが、DNA 量と比較してより感度が高く、精度は 3 者の中で最も優れていた。以上の成績から、HBV RNA/DNA 量の測定は、核酸アナログ薬治療において耐性株出現予測の新しいマーカーとして使用可能であることが示唆された。

今回はラミブジン耐性株の出現予測で HBV RNA/DNA 量の有用性を検討し一定の成果が得られた。しかし、現在は核酸アナログ薬もエ

ンテカビルが主流の時代となり、耐性株出現の危険性も極めて低率となった。今回の研究で明らかになったことは、HBV RNA/DNA が HBV DNA や HBcrAg と異なる特性を示すマーカーであることであり、今後は別の方面での利用を検討する価値がある。特に、核酸アナログ薬中止基準などでの応用が期待される。

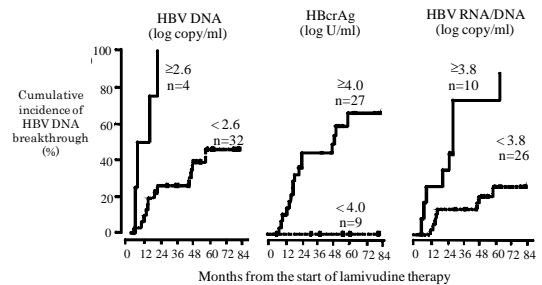


図4: ラミブジン治療開始6ヶ月目のHBV DNA量、HBcrAg量、HBV RNA/DNA量による耐性株出現の予測。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Matsumoto A, Maki N, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S, Tanaka E. Comparison of hepatitis B virus DNA, RNA, and core related antigen as predictors of lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B. *Shinshu Medical Journal*、査読有、(in press).
- ② Kumada H, Okanoue T, Onji M, Moriwaki H, Izumi N, Tanaka E, Chayama K, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Suzuki F, Toyota J, Nomura H, Yoshioka K, Seike M, Yotsuyanagi H, Ueno Y. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol Res*、査読有、40: 1-7, 2010
- ③ Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol*、査読有、47: 1476-1483, 2009

- ④ Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang J. H, Sumino Y, Yatsuhashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatol Res*、査読有、39: 648-656, 2009
- ⑤ 坪内博仁、熊田博光、清澤研道、他（総数32名、6番目）。免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策 厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告 肝臓、査読有、50: 38-42, 2009
- ⑥ 田中榮司。B型肝炎再活性化とその対策。医学のあゆみ、査読無、229; 41-45, 2009
- ⑦ Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa K, Maki N. Hepatitis B core-related antigen assay is useful for monitoring the antiviral effects of nucleoside analogue therapy. *Intervirology*、査読有、51 Suppl 1: 3-6, 2008
- ⑧ Tanaka E, Umemura T. History and prevention of de novo hepatitis B virus-related hepatitis in Japan and the world. *Clinical Journal of Gastroenterology*、査読有、1: 83-86, 2008
- ⑨ Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Kumada H: Mortality secondary to fulminant hepatic failure in patients with prior resolution of hepatitis B virus infection in Japan. *Clin Infect Dis*、査読有、47: e52-56, 2008
- ⑩ 田中榮司。B型肝炎の最新治療。日本医事新報、査読無、05; 69-73, 2008
- ⑪ Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res*、査読有、37: 661-666, 2007

〔学会発表〕（計6件）

- ① 松本晶博、榎昇、田中榮司。B型慢性肝炎の核酸アナログ薬治療中止例の検討。DDW Japan 2009、2009/10/14、京都市
- ② 田中榮司、松本晶博、梅村武司。B型肝炎の発症機序と病態。第45回日本肝臓学会総会、2009/6/4、神戸市
- ③ 松本晶博、榎昇、田中榮司。B型慢性肝炎に対する抗ウイルス剤治療のHBVコア関連抗原測定法によるコントロール。DDW Japan 2008、2008/10/1、東京都
- ④ 松本晶博、榎昇、田中榮司。コア関連抗原によるB型肝炎に対する抗ウイルス療法の選択及び中止基準。第44回日本肝臓学会総会、2008/6/5、松山市
- ⑤ 松本晶博、榎昇、吉澤要、一條哲也、梅村武司、田中直樹、新井薫、小松通治、白川晴章、城下智、田中榮司、清澤研道。B型肝炎に対する核酸アナログ治療中止時のHBコア関連抗原およびHBV RNA量と肝炎再燃との関係。第94回日本消化器病学会総会、2008/5/8、福岡市
- ⑥ 松本晶博、榎昇、田中榮司。B型慢性肝疾患のADVおよびETV治療におけるHBコア関連抗原量測定の有用性。DDW Japan 2007、2007/10/18、札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 榮司 (TANAKA EIJI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：50163506

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

松本 晶博 (MATSUMOTO AKIHIRO)
信州大学・医学部・委嘱講師
研究者番号：なし