

考 案

C型慢性肝炎、肝硬変へのIFN治療が肝癌の発生を有意に抑制するか否かを、多数例での retrospective study で解析した。対象1256例中、F4（肝硬変）はわずか45例である。平均フォロー期間は4年で、病期の進展（線維化の進展）に比例しIFNによる肝発癌抑制効果は有意に低下している。SRはもとより、TRでもNRに比して累積肝発癌発生率は有意に抑制されている。しかし、病期別では、F2よりもF3やF4のTR例での肝発癌抑制効果は低い。線維化が進展すると、IFNで著効にならない限り肝発癌抑制効果はあまり期待出来ないという結果である。

肝癌の発育、成長に関する我々の研究から、1個の肝癌細胞が一定の倍化時間 (doubling time) で増殖し直径1 cmの肝癌になるには少なくとも6年、多くは10年以上要すると想定される。このデータから、今回の74例の肝癌症例は全てIFN投与前から既に微細な肝癌が存在していたと考えるべきである。すなわち、肝癌細胞はF2やF3の時期（F1の可能性もある）に出現し、最初は極めて長い doubling time で増殖し、我々が画像検査で捉えうる直径1 cm前後の肝癌に発育した頃には、多くの症例で基礎疾患もF4まで進展していると考えるのが妥当である。

C型慢性肝炎や肝硬変に対するIFNの肝発癌抑制効果に関しては、慢性肝炎¹⁾はもとより肝硬変²⁾でも肝発癌が有意に抑制されるとの報告が出ている。しかし、今回の成績を加味して考えると、肝硬変へのIFN治療で肝発癌が有意に抑制されるかどうかは議論の余地がある²⁾。何故ならば、我が国のC型肝硬変では、無治療の場合年率約7%の割合で肝癌が発症するが、上記のような肝癌の発育成長時間を考慮すると、C型肝硬変の少なくとも70%の例ではある一定の大きさの肝癌が既に存在し、また、F3でも30-40%の例に肝癌が存在していると推察される。IFNは抗ウイルス効果、抗腫瘍効果、免疫増強効果を有する事から、ごく微細な肝癌はIFNの長期投与で消失する可能性がある。また、IFNでSRになり炎症が無くなり、免疫能も上がれば極く微細な癌は消失する可能性がある。C型での肝発癌を考慮すると、当然の事ながらF2, F3, F4と病期が進展するにつれて微細な肝癌を合併している率は高まり、また、その直径はより大きな可能性が高い。そのような意味から、F4ではIFNで著効率が一定以上なければ、IFN治療が有意に肝発癌を抑制する事にならない。

結 語

IFN治療を受け平均4年間フォローされた1256例のC型慢性肝炎、肝硬変(F1 164例, F2 678例, F3 369例, F4 45例)を解析し、以下の結論を得た。

1) IFN著効率はF1 39%, F2 31%, F3 20%, F4 4%と病期の進

展につれ、著効率は有意に低下した。

2) 74例に肝癌が発見されたが、その内訳はF1から0、F2から14例 (TR 2, NR 12)、F3から49例 (SR 4, TR 8, NR 37) F4から11例 (TR 2, NR 9) であった。NRからの年率発癌率はそれぞれ、0, 0.9%, 3.8%, 5.9%であった。

3) 累積肝発癌発生率をKaplan Meier法で解析すると、SRはもとよりTRもNRに比して有意に肝発癌が抑制されていたが、F3, F4ではTRとNR間に有意差はなかった。

肝癌の発育成長を考慮すると、病期の進展した例においてはIFN治療で著効を得る事が肝発癌抑制に重要と思われた。

参 考 文 献

1. Kasahara A, et al : Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 27:1394-1402, 1998
2. Okanoue T, et al : Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: A retrospective study in 1148 patients. *J Hepatol* (in press)
3. Nishiguchi S, et al : Randomized trial of effects of interferon- α on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis with cirrhosis. *Lancet* 346:1051-1055, 1995

IFN不完全著効例の検討

金沢大学第一内科 小林 健一

目 的

IFN療法後transaminaseの正常化が得られたもののvirus血症が持続する、いわゆる不完全著効例についてはその背景因子、予後など不明な部分が多く、またウイルス学的動態も明らかにされてはいない。本年度はIFN不完全著効例について臨床生化学的背景因子、ウイルス学的動態を完全著効、不変例を対照に検討した。

対照と方法

IFN療法を行い施行前のウイルス量、subtypeが判明している151例について検討すると著効62例（41%）、有効25例（17%）、不変64例（42%）であった。著効例の内、IFN治療効果判定以後にHCV RNAを測定してあった49例について検討すると21例（43%）でHCV RNAが陽性であり、この21例を不完全著効とした。不完全著効例を平均観察期間3.5年間観察し、臨床的生化学所見、HCV RNA量を経時的に測定、完全著効、不変例と比較検討した。

結 果

表1にIFN施行症例の臨床背景を示す。以前よりの報告と同様、投与前のウイルス量は著効例が有効、不変例に比べ有意に低く、serotypeは著効例でtype2が有意に多かった。表2にIFN完全著効と不完全著効について背景因子を示す。投与前ウイルス量とserotypeに有意な差を認め、投与前高ウイルス量症例で著効となった症例の多くは不完全著効であった。平均観察期間3.5年の間に6例（29%）で再発が認められた。表3に不完全著効から肝炎の再発をみた症例の臨床背景を示すが、投与前の背景因子には再発を認めた群と認めない群では有意な差は認めなかった。HCV RNA量を経時的に測定しえた不完全著効例及び不変例6例づつでvirus量の推移を見てみると、図1に示すように不変例では投与後virus量に一定の傾向が認められなかったが、不完全著効例では全例でvirus量は増加していた。図2に不完全著効例の経過を示す。今回不完全著効例とした症例は図のごとくIFN終了後半年以内にGPTが完全に35以下になり、少なくとも1年間はこれを維持した症例である。左の3例はその後肝炎の再燃をみた症例だが、最短でも約2年は完全にGPT正常値を維持していた。再燃直前のウイルス量はGPTが正常を示していた期間と特に変わりなかった。

表1 IFN症例の臨床背景

	著効 (n=62)	有効 (n=25)	不変(n=64)	
年齢	49.8±10.3	51.1±11.0	50.5±10.4	NS
性 (男:女)	39:23	13:12	43:21	NS
輸血歴 (有:無)	28:34	11:14	23:41	NS
ALT (IU/l)	84.4±66.5	83.9±57.8	120.1±69.2	p<0.05
Stage (1/2/3/4)	35/16/10/0	14/5/6/0	29/21/13/1	NS
Grade (1/2/3)	27/33/2	13/11/1	27/30/6	NS
HCV RNA量	≥100	21 (34%)	21 (84%)	P<0.001
	<100	41 (66%)	4 (16%)	
Serotype (1:2)	16:20	19:2	30:0	P<0.001
IFN (α:β)	47:15	19:6	53:11	NS

表2 IFN完全著効と不完全著効症例の臨床背景

	完全著効 (n=28)	不完全著効(n=21)	
年齢	48.0±8.7	51.0±9.4	NS
性 (男:女)	19:9	9:12	NS
輸血歴 (有:無)	11:17	12:9	NS
ALT (IU/l)	91.0±70.1	73.5±65.5	NS
Stage (1/2/3/4)	15/9/4/0	13/4/4/0	NS
Grade (1/2/3)	12/14/2	9/12/0	NS
HCV RNA量 ≥100	3 (11%)	15 (71%)	p<0.001
<100	25 (89%)	6 (29%)	
Serotype (1:2)	4:11	10:4	p<0.05
IFN (α:β)	23:5	17:4	NS

表3 不完全著効からの再発症例の臨床背景

	再発無 (n=15)	再発有(n=6)	
年齢	51.3±8.0	50.0±13.1	NS
性 (男:女)	6:9	3:3	NS
輸血歴 (有:無)	8:7	4:2	NS
ALT (IU/l)	81.3±76.4	53.8±12.7	NS
Stage (1/2/3)	11/3/1	2/1/3	NS
Grade (1/2)	6/9	3/3	NS
HCV RNA量 ≥100	10 (67%)	5 (83%)	NS
<100	5 (33%)	1 (17%)	
Serotype (1:2)	6:4	4:0	NS
IFN (α:β)	11:4	6:0	NS

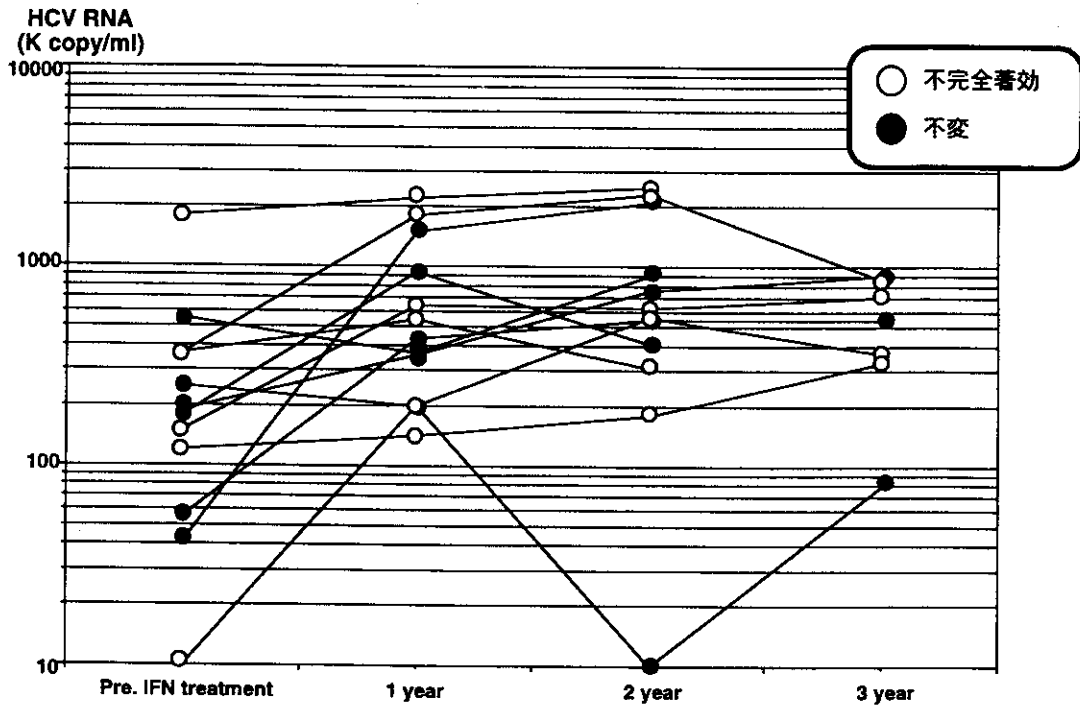


図1 HCV RNA量の経過

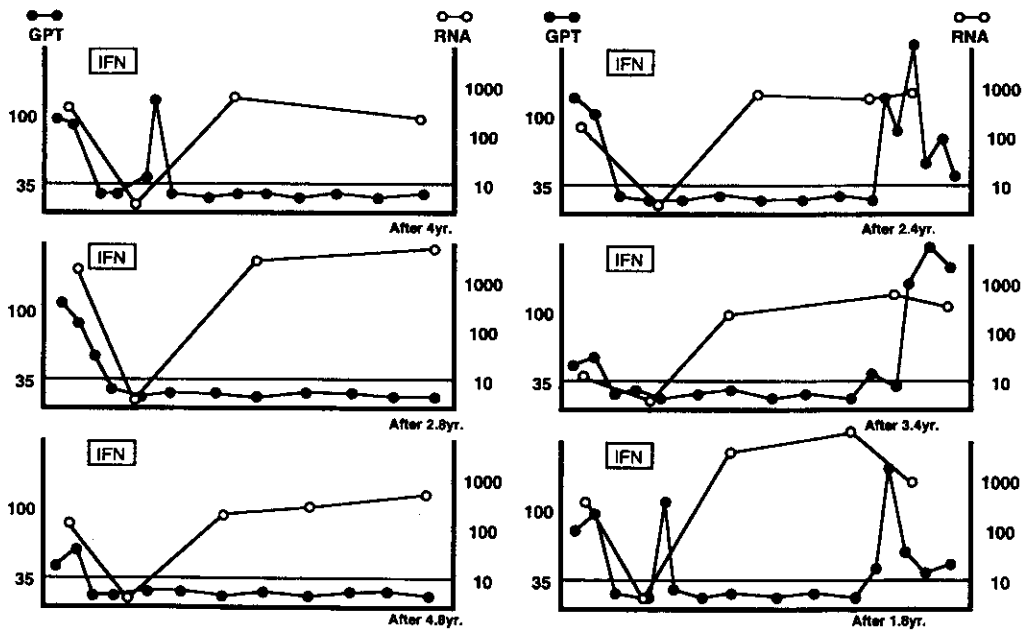


図2 不完全著効例の効果

結 語

不完全著効例のIFN投与前のウイルス量、Serotypeなど臨床的背景因子は不変例と有意な差はなく投与前に予測する事は困難であった。不完全著効例ではIFN療法が終了し、GPTが正常となった時点においてウイルス量は投与

前と比較し増加していた。不完全著効例において再発した症例としなかった症例において臨床的背景に差はなく、経過においてもウイルス量に変化は認められなかった。

HCV,GBV-C NS5領域変異とインターフェロン治療効果との関連

愛媛大学第三内科 恩地 森一
 協同研究者：堀池典生、道堯浩二郎
 藤澤友樹

目的

C型慢性肝炎に対してインターフェロン(IFN)治療が行われている。その際、著効を規定するウイルス側要因として、ウイルス量、亜型及びHCV変異があげられる。最近、HCV NS5A領域の Interferon sensitive determinating region(ISDR)の変異が注目されている¹⁾。我々はRNA dependent RNA polymerase (RdRp)をコードし、ウイルス増殖と関連しているHCV NS5B領域の変異とIFN治療効果の検討を行った。また、GBV-C陽性例において、GBV-Cに対するIFN治療効果とGBV-C NS5A領域の変異との関連も検討した。

対象及び方法

対象-1は、C型慢性肝炎33例である。HCV genotype 1bでIFN著効例7例、無効例12例、2aでIFN著効例8例、無効例6例である。対象-2は、GBV-C陽性のC型慢性肝炎10例である。GBV-CのIFN著効例(IFN投与後GBV-Cが持続陰性)4例、無効例(IFN投与後GBV-Cが陽性)6例である。それぞれ、著効例と無効例間で、性、年齢及びIFN総投与量に差を認めなかった。

末梢血中HCV NS5B (1bはnt 8331-8600、2aはnt 8410-8679)及びGBV-C NS5A (nt 1865-2279)の塩基配列は、direct sequencing法にて決定した²⁾。HCVについては、genotype 1b、2aそれぞれのprototypeにみられるgenotype特異的なアミノ酸配列が、他の型特異的なアミノ酸配列に置換している例を変異例とした。GBV-Cについては、

prototype(D87256)とアミノ酸配列を比較した。HCV-RNA量及びGBV-C-RNA量は、それぞれ competitive RT-PCR法、real time detected PCR法にて測定した。

成績

対象-1において、HCVアミノ酸配列を検討した。RdRpのモチーフであるGly-Asp-Asp (nt 2736-2738)は、全例で保たれていた。HCV genotype 1b例において、変異例を19例中6例(32%)で認めた。変異例に共通したアミノ酸配列あるいは共通した変異部位は認めなかったが、変異6例中3例ではGly-Asp-Aspの直前のAsn (nt 2735)がCysへ置換していた。HCV genotype 2a例において、変異例を14例中9例(64%)で認めた。変異9例では全例nt 2669のHisがArgへ置換していた。

HCV NS5B変異とウイルス量、IFN著効との関連を検討し、図1に示した。HCV genotype 2a例においては、著効を変異例9例中4例、無効をwild type 5例中4例とウイルス変異とIFN著効の間に関連性を認めず、ウイルス量によりIFN効果が規定されていた。一方、HCV genotype 1b例においては、変異例6例中5例においてIFN著効を認め、wild typeの13例中2例に比し、有意に(P<0.05)高い著効率を認めた。ウイルス量との関連では、変異例は、HCV genotype 2a例と同様ウイルス量によりIFN効果が規定されていた。しかし、wild typeでは低ウイルス量例でも、IFN無効であった。

対象-2において、GBV-CのIFN著効例4例のアミノ酸置換数は、2-8、平均5.8±1.6、無効例6例でのアミノ酸置換数は、5-9、平均6.8±1.6であり、差を認めなかった。また、各群に共通したアミノ酸配列あるいは共通した置換部位は認めなかった。GBV-C RNA量(copies/ml)は、著効例で、平均3.3×10⁵、無効例で3.6×10⁵であり、著効例で有意に(P<0.05)ウイルス量を低く認めた(図2)。

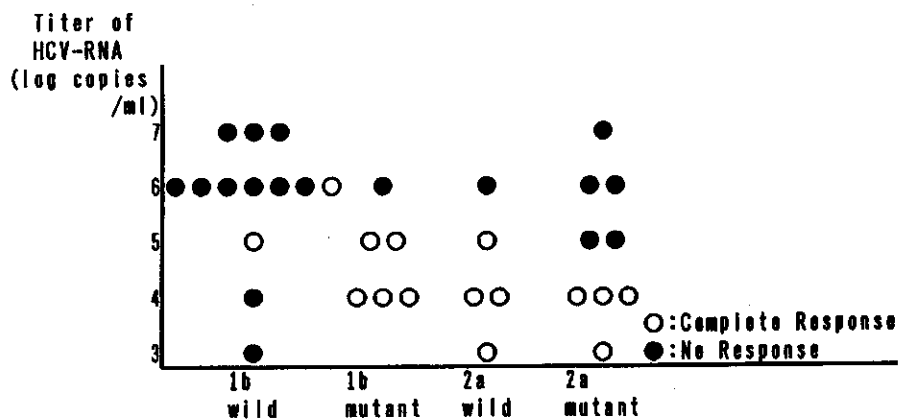


Fig. 1 The relationship between the NS5B mutation and HCV-RNA titer with respect to effect of IFN

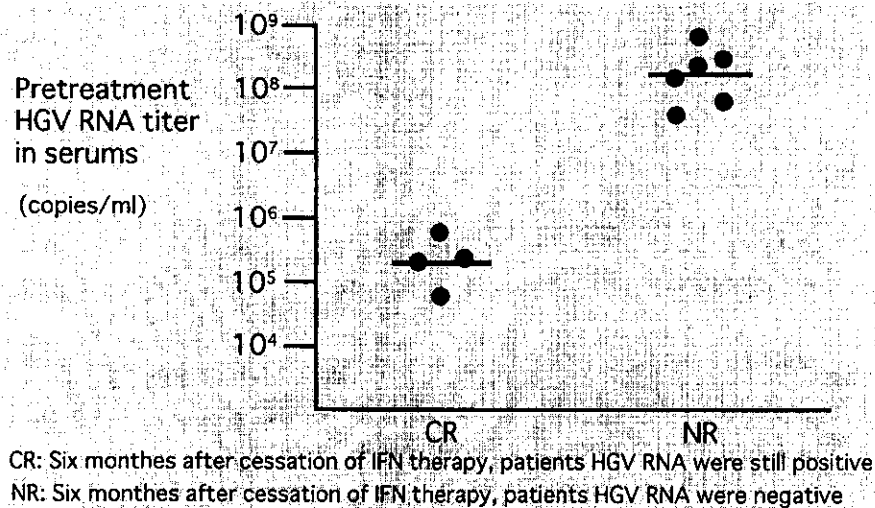


Fig. 2 The relationship between pretreatment HGV RNA titer by real time PCR assay and IFN effectiveness

考 察

HCV genotype 1b例は血中HCV-RNA量が高値で、C型慢性肝炎に対するIFN治療が無効の例が多い。HCV-RNA NS5B領域にはRdRpのモチーフが存在し、最近RdRp活性が報告されている⁹⁾。今回、HCV genotype 1b例において、genotype特異的なアミノ酸配列が、2a型特異的なアミノ酸配列に置換している例ではgenotype 2a例と同様ウイルス量によりIFN効果が規定されていた。しかし、wild typeでは低ウイルス量例でも、IFN無効であった。すなわち、HCV genotype 1b wild typeにおいては、RdRp活性が高く、IFN治療が無効であるが、変異によりRdRp活性が低下しIFN治療効果が上昇する可能性が示唆された。

Enomotoは、HCV NS5A領域のISDRにおける変異とIFN治療との関連性を報告している⁹⁾。その機序として、IFN誘導RNA依存性protein kinase (PKR)の関与が示唆されている⁹⁾。今回、GBV-Cにおいては、NS5A領域変異とIFN治療効果との間に関連は有さず、ウイルス量によりIFN効果が規定されていた。今後、NS5B領域の変異について検討していく予定である。

結 論

HCV及びGBV-C NS5領域変異とインターフェロン治療効果との関連を検討し、以下の成績を得た。

1. HCV NS5B領域の変異とインターフェロン治療効果との関連を認めた。

2. GBV-Cにおいては、NS5A領域変異とインターフェロン治療効果との関連は認めず、治療効果はウイルス量に規定されていた。

文 献

1. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81, 1996
2. Horiike N, Michitaka K, Masumoto T, et al: The relationship between the effect of interferon therapy and the change of hepatitis C virus non structural 5B gene. *J of Gastroenterol and Hepatol* 14:333-339, 1999
3. Beherens SE, Tomei L and Francesco RD: Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15:12-22, 1996
4. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, et al: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230:217-227, 1997

C型慢性肝炎に対するIFN α と γ の併用療法の試み

久留米大学第二内科 佐田 通夫
協同研究者： 佐々木優、井出達也
神代龍吉

研究目的

C型慢性肝炎に対するIFN療法難治例に対する新たな治療法を開発するために、IFN α とIFN γ の併用投与による治療効果を検討した。

対象と方法

初回十分量のIFN投与が実施されたにもかかわらず治療効果が無効と判定され、今回の試験開始前のHCV RNA量が1.0 Meq (b DNA プローブ) 以上、Genotype Ibの症例を対象に検討を行った。IFNの投与方法は、natural IFN α (OPC 18) 5MUを2週間連日投与後、引き続き、同量を週3回22週間投与した。その後さらにnatural IFN γ (OH-6000) 1MUを2週間連日筋肉内に投与した。IFN投与前から一般肝機能、血中HCV RNA量、NK活性、 β_2 ミクログロブリン、ネオプテリンなどの測定を行った。

結 果

19例が本試験にエントリーされたが、1例は途中脱落となり、18例が本試験を完全に終了した。投与終了後6ヶ月目の時点では、3例がHCV RNA持続陰性化を伴う著効 (CR)、1例が有効 (PR)、14例が無効 (NR) と判定された。CRの3例は、IFN α 投与開始直前のHCV RNA量がいずれも1.0 Meq未満となっていた。IFN γ 投与開始後のALT値の推移をみると、CR例はIFN α 投与中ALT値は正常化しており、IFN γ 投与後もALT値は正常値が持続した。PRの1例はIFN γ の投与によりALT値が一過性に500 IU以上に上昇した。NRの14例ではIFN γ 投与によりALT値が軽度から中等度の上昇をみる例が多かった。 β_2 ミクログロブリン、ネオプテリン、NK活性はIFN γ の投与によりいずれも上昇した。血中ネオプテリンの上昇はCR例が最も著明であった。

結 論

我々は今までにB型またC型慢性肝炎に対するIFN γ の投与効果を報告した^{1,2)}。C型慢性肝炎に対する検討ではHCVに対する増殖抑制効果はあっても低く、それに比し、宿主の免疫能の増強効果が強いことが特徴であり、このことがIFN γ を用いての治療においては重要なポイントであろうと考えていた。そこで今回はIFN療法難治のC

型慢性肝炎例を対象にしてIFN α と γ の併用療法を行った。本治療法におけるCR率は16.7% (3/18) で、この率はIFNの再投与を行った場合の率を超えるものではなかった。しかし今回の対象例はいずれも、1回目の治療では効果が得られなかったGenotype Ibの例であること、CRの3例は、いずれも1回目のIFN治療開始前のHCV RNA量も1.0 Meq未満であったことを考えると、IFN γ の併用が著効をもたらしたのかもしれない。

またIFN γ の投与によって起こるALT値の推移や各種免疫パラメーターの推移をみると、C型肝炎の肝細胞障害のメカニズムにおけるIFN γ の重要性を我々に示唆しているように思われた。今後はこの結果を詳細に解析すると共に、IFN γ の投与量、期間、時期などを検討してIFN α と γ の併用療法の有用性をさらに明らかにする必要があると思われた。

引用文献

1. Sata M, et al: Clinical evaluation of intramuscular administration of natural interferon γ in the treatment of chronic hepatitis B. *Kurume Med J* 42: 9-20, 1995
2. Sata M, et al: A pilot study of natural interferon γ therapy for chronic hepatitis C. *Int Hepatol Commun* 6: 264-273, 1997

C型慢性肝炎における肝細胞Fas抗原発現とIFN治療効果

国立長崎中央病院臨床研究部 矢野 右人
協同研究者：八橋 弘、藤野達也、松本武浩
井上長三、古賀満明

目 的

C型慢性肝炎における肝細胞Fas抗原発現レベルとIFN治療効果との関係を明らかにする目的で、免疫組織学的検討をおこなった。

方 法

肝生検標本は、ホルマリン固定標本を用いた。抗Fas抗体（マウスモノクローナル抗体、IgG分画）を用いて、Streptavidin-biotin method(SAB法)にて肝細胞におけるFas抗原発現を同定した。Fas抗原発現の定量化は、Central lobular、Periportalに区分し、それぞれ5箇所単位面積範囲内のFas抗原の染色面積を、コンピューターのNIHシステムを用いて画像処理をおこない、数量化し平均値を算出した。単位面積範囲内全体が強く染色される場合を2.0Uと定義した。

対象は、正常肝（Control:n=8）、A型急性肝炎（AHA:n=12）、IFN治療をおこなったC型慢性肝炎（CHC:n=52）、原発性胆汁性肝硬変（PBC:n=10）、自己免疫性肝炎（AIH:n=8）である。AHAは急性期に肝生検をおこない、CHCではIFN治療前の時期に得られた肝生検標本を用いた。IFN治療効果は、治療後、持続的に血中HCV-RNA陰性例を著効、それ以外を無効と判定した。

結 果

主に肝細胞の細胞質にFas抗原発現が認められた。正常肝においては、Central lobular、Periportal両領域ともFas抗原発現は認められなかった。各種肝疾患におけるFas抗原発現頻度は、Central lobular 領域ではAHA 92%、CHC: 90%、PBC:60%、AIH:38%、Periportal領域では、AHA:75%、CHC:100%、PBC:100%、AIH100%であり、Central lobular、Periportal両領域とも各種肝疾患におけるFas抗原発現頻度は正常肝に比較して有意に高値であった。
($p<0.01$)

CHC IFN 治療例を対象として Periportal 領域でのFas抗原発現レベルを定量化し、治療効果との関係を検討すると、著効例($n=15$) $1.00\pm 0.39U$ 、無効例($n=37$) $0.65\pm 0.40U$ で両群間に有意な差が認められた。 $(p=0.009)$ CHC ($n=52$)を対象として、肝細胞Fas抗原発現レベルと各種因子との関係を検討すると、患者の年齢、性差、ALT値、HCV-

RNA量、HCVserotype、血中内因性IFN α 濃度、肝組織の繊維化の程度（Staging）肝細胞IFNレセプター発現レベルとは相関はみられなかったが、肝細胞Fas抗原発現レベルは、肝組織の炎症の程度（Grading,Activity）($P=0.02$)と、IFN治療効果($P=0.009$)との間には有意な関係が認められた。

考 察

C型慢性肝炎の肝細胞障害機序として、Fasシステムを介したアポトーシスの概念が提唱され、注目を集めている。すでに免疫組織学的検討によりC型慢性肝炎では、肝細胞におけるFas抗原の表出の程度と肝炎の活動性との相関関係があることが報告されている。一方、C型慢性肝炎のIFN治療では、多くの患者においてIFN投与中のウイルス量の減少が認められ、約70%の患者では投与2週目に血液中HCV-RNAは検出されなくなるが、その半数は治療終了後ウイルス血症が再燃する。C型慢性肝炎の治療目標を、治療終了後のウイルス持続排除とするならば、IFNによるウイルス増殖抑制に加えてウイルス排除機構の解明が必要と考える。

最近、Tanakaらは、ウイルス感染細胞にI型IFNが作用することでアポトーシスが誘導され、ウイルス感染細胞が排除されることを報告し注目を集めている。今回の我々の成績では、治療前の肝細胞Fas抗原発現レベルとIFN治療効果の間に密接な関係があることが示された。Fas抗原が発現されている肝細胞にIFNが投与されることで、直接、ウイルス感染細胞がアポトーシスにより排除されると考えられる。難治例に対する新たなIFN治療を考える上で、IFNシステムとFasを介したアポトーシスシステムを関連させて考察することが今後重要と考える。

文 献

1. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, et al : Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 19:1354-1359, 1994
2. Tanaka N, Sato M, Lamphier MS, et al : Type I interferon are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells* 3(1), 1998

インターフェロンレセプターの 定量化とその臨床応用

山口大学第一内科 沖田 極
協同研究者： 日野啓輔

目 的

C型慢性肝炎に対するIFN治療効果予測因子はウイルス側、宿主側の両面から検討され、これまでもウイルス量、遺伝子型、肝線維化の程度などの予測因子が明らかにされている。しかし、例えばgenotype 2aで低ウイルス量であっても必ずしも著効とはならず、更なるIFN治療効果予測因子の同定が必要とされている。この点からわれわれは宿主側因子としてのインターフェロンレセプターに注目し、肝組織のインターフェロンレセプターの定量化を行った。さらに臨床応用の観点から肝組織とともに末梢血単核球(PBMC)のインターフェロンレセプターを測定し、比較検討した。

対象および方法

対象はC型慢性肝炎17症例である。インフォームドコンセントを得た後、診断目的で施行された肝生検より得られた肝組織の一部と、同時に採取されたヘパリン加

血液10ccより分離したPBMCについてインターフェロンレセプター(IFNAR1, IFNAR2)およびβアクチンのmRNA量をcompetitive RT-PCR法で測定した。RNAからのcDNA合成に際してはrandom primerを使用し、PCRのためのプライマーはIFNAR1, IFNAR2ともに細胞外から細胞内に及ぶそれぞれ914bp, 759bpを増幅するように設定した。competiterはPCR産物から約140bpのdeletionを有するように作成した。IFNAR1, IFNAR2のmRNA量は測定値をβアクチンのmRNA10ngあたりに補正して表した。

成 績

IFNAR1は肝組織13例(79%)、PBMC9例(53%)において、IFNAR2は16例(92%)、PBMC12例(71%)において定量可能であった。IFNAR2 mRNAは肝組織とPBMCとの間で有意な相関関係を認めたが(p=0.02, 図1)、IFNAR1では認めなかった。肝組織、PBMCともにIFNAR1, IFNAR2のmRNA量とHCVウイルス量、serotype、ALT値、肝線維化の程度(staging)それぞれの間には有意な関係を認めなかった。

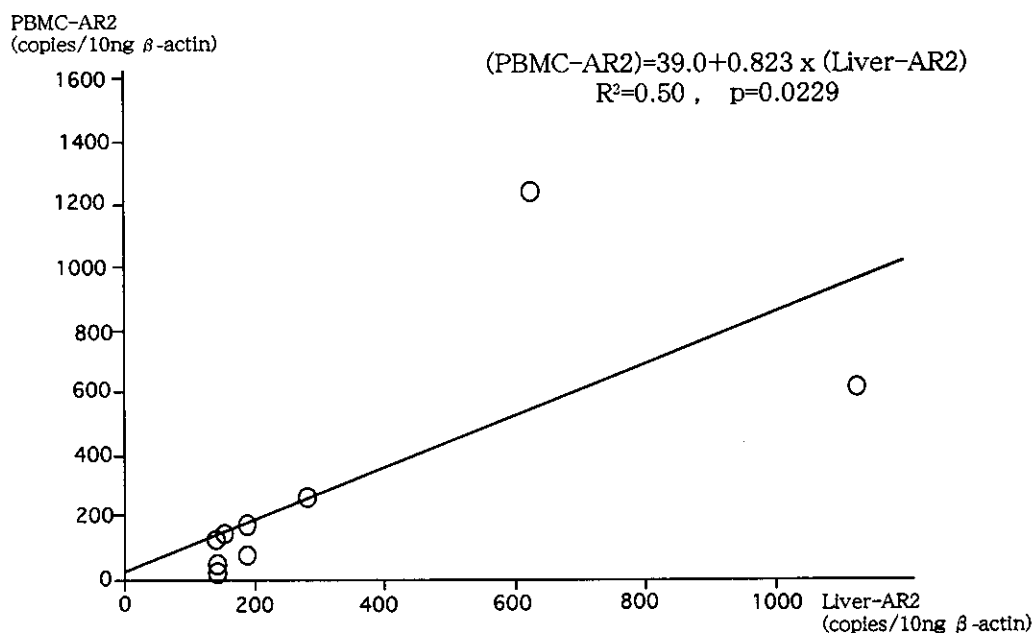


図1 末梢血単核球(PBMC)および肝組織におけるIFNAR2mRNA
発現量の相関関係

考 察

肝生検組織の一部ならびにPBMCからIFNAR1, IFNAR2 mRNA量の定量が可能であった。IFNAR1はIFNAR2に比べて定量可能な症例数が少なかったが、この点についてはIFNAR1の定量系を改良し、更なる検討が必要と考えられた。その上で、C型慢性肝炎に対するIFN治療効果におけるIFNAR1, IFNAR2の意義について検討していく必要があると思われる。IFNAR2の発現量はPBMCのそれと相関したことにより、PBMCを用いてIFN治療中の肝内のIFNAR2の発現を間接的ながら経時的に測定することも可能と考えられ、今後インターフェロンレセプターの動態からみたIFN治療効果についても検討していく。

結 語

C型慢性肝炎患者の肝組織ならびにPBMCでのインターフェロンレセプターmRNA(IFNAR1, IFNAR2)の発現量を定量化した。

文 献

1. Gilles Uze, Georges Lutfalla, Ion Gresser, et al : Genetic Transfer of a Functional Human Interferon α Receptor into Mouse Cells : Cloning and Expression of Its cDNA. Cell 60 : 225-234 , 1990
2. Daniela Novick, Batya Cohen, Menachem Rubinstein, et al : The Human Interferon α/β Receptor : Characterization and Molecular Cloning. Cell 77 : 391-400, 1994
3. Malte Lewerenz, Knud E. Mogensen, Gilles Uze, et al : Shared Receptor Components but Distinct Complexes for α and β Interferons. J. Mol. Biol. 282 : 585-599, 1998

超高感度HCVコア抗原測定系の開発

信州大学第二内科 清澤 研道
 協同研究者： 田中栄司

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス血症の定性的および定量的測定は、C型肝炎の臨床に極めて重要である。現在、RT-PCR法やbDNA法などにより血清中HCV RNAを測定するのが一般的であるが、遺伝子操作を用いない方法としてHCVコア抗原を測定するELISA系も報告されている。今回、これまでのHCVコア抗原測定系をさらに高感度とした、第二世代のコア抗原測定系を開発し、その臨床的有用性を検討した。

対象と方法

対象1は無作為に抽出した慢性肝疾患患者207名で、内訳は、C型慢性肝疾患75名、B型慢性肝疾患58名、非ウイルス性肝疾患24名、健康成人50名である。

対象2は検診等で偶然HCV抗体陽性であることを指摘された167名。対象3はC型慢性肝炎でインターフェロン治療を受けた48名。インターフェロンは、 α 2a型を9MIUで2週間連投後、週3回で22週間投与した。ウイルス血症が消失しALT値が正常化した症例を著効例 (CR) とし、他の症例を非CR例とした。

HCVコア抗原は血清検体0.1mlを用いて測定した。界面活性剤で前処理後、化学発光を用いたELISA系で測定した。また、HCVコア抗原量はfmol/lに換算し表示し、カットオフ値はとりあえず15fmol/lに設定した。血清中HCV RNAはnested RT-PCR法またはAMPLICOR法で測定し、AMPLICO-M法で定量した。

成績

対象1の検討では、HCVコア抗原はC型慢性肝疾患の75例中73例 (97%) に検出されたのに対し、B型慢性肝疾患、非ウイルス性肝疾患、および健康成人では全例陰性であった。

偶然HCV抗体陽性であることを指摘された対象2の167例については、HCVウイルス血症の有無を、コア抗原法、RT-PCR法、およびAMPLICOR法の3法で測定した (図1)。167例中129例 (77%) では、少なくとも一つの方法でウイルス血症が確認された。この129例中、RT-PCR法では129例 (100%)、コア抗原法では126例 (98%)、AMPLICOR法では121例 (94%) が陽性であった。

C型慢性肝炎インターフェロン治療例については、治療開始前の血清を用いてウイルス量をコア抗原法とAMPLICOR-M法で測定した。この2法で測定したコア抗原量とHCV RNA量の相関を図2にしめしたが、両者は有意の正の相関を示した ($r=0.627$, $P<0.001$)。CR群と非CR群での治療開始前のウイルス量の比較では、コア抗原量、HCV RNA量ともにCR群で有意に低値である傾向がみられた (表1)。

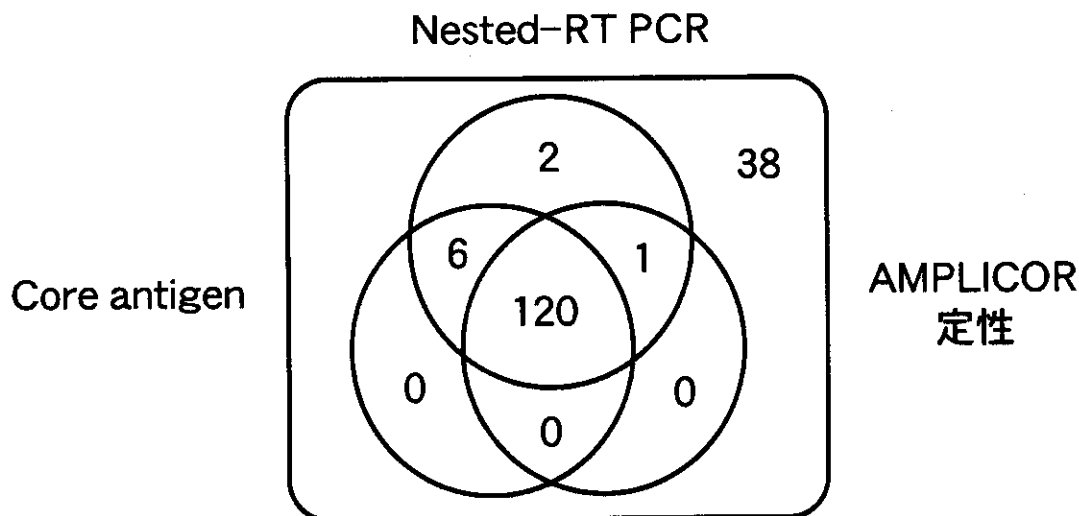


図1 HCVウイルス血症測定系の比較

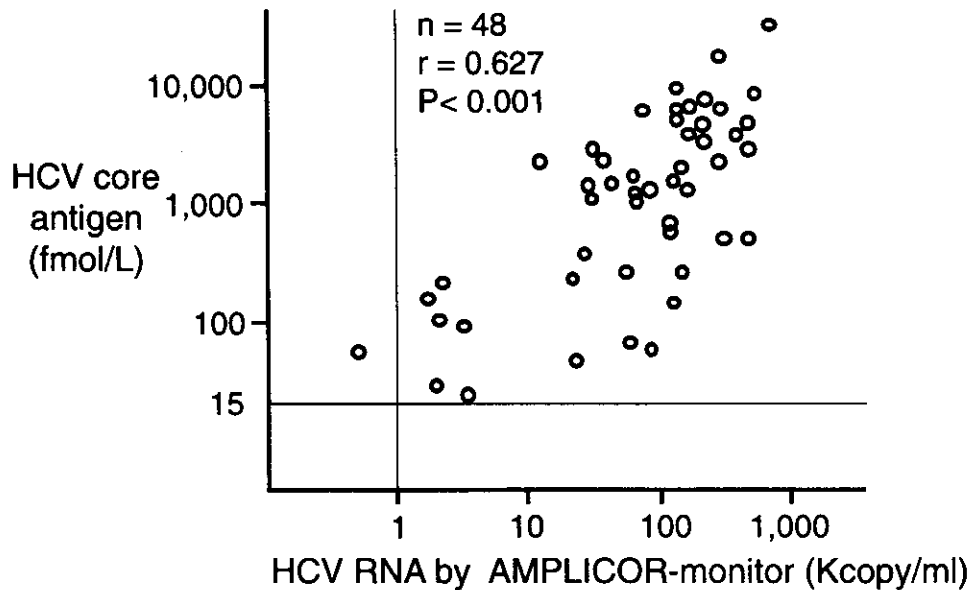


図2 HCVコア抗原量とHCV RNA量の相関

表1 CR例と非CR例でのIFN治療前ウイルス量の比較

測定方法	CR (n=14)	非CR (n=34)	P*
AMPLICOR-M (Kcopy/ml)	24.5 (<1.0 - 140)	145.0 (1.7 - 740)	< 0.001
HCV コア抗原 (fmol/L)	209 (31 - 5,978)	2,352 (62 - 43,062)	< 0.002

データは median (range) で示した。* Mann-Whitney U test

考 案

今回、超高感度に改良されたHCVコア抗原測定系の臨床的有用性について検討した。C型慢性肝疾患でのコア抗原検出率は97%であり、第一世代の測定系に比較し(70-80%)明らかに高感度となった。また、非C型の肝疾患では全例コア抗原陰性であり、特異性にも優れていた。偶然HCV抗体陽性を指摘された人のウイルス血症の検出についても98%の検出率であり、RT-PCR法よりやや劣るものの、AMPLICOR法より高感度であった。これらの成績は本コア抗原測定系がHCVのウイルス血症検出に十分臨床応用可能なことを示す。

コア抗原量はAMPLICOR-M法で測定したHCV RNA量と有意の相関を示すことにより、本測定系は定量性に関しても優れていた。さらに、コア抗原量はC型慢性肝炎のインターフェロン治療の効果予測も可能であり、この点でも臨床的有用性が示された。

コア抗原の測定系は遺伝子操作を含んでいないため、操作が簡便で安価である。さらに、PCR法でみられる偽陽性の危険はない。以上を総合すると、第二世代のHCVコア抗原測定系は、HCVウイルス血症の定性および定量的測定系として臨床的に有用であることが示された。

持続血液透析患者における肝炎ウイルス感染の実態について

愛知医科大学第一内科 各務 伸一
協同研究者： 石川哲也

目 的

血液関連型ウイルス感染のハイリスク群である持続血液透析患者において、HBV、HCV、HGV、TTVなどの肝炎ウイルス感染の実態、及び感染者における肝疾患の有無、程度について解析し、ウイルスの感染経路、各ウイルス間での重複感染の頻度、相互作用、病原としての重要性について検討する。

方 法

持続血液透析患者75例（平均年齢56.8±11.1歳、男：女=51：24、平均透析期間7.6±6.8年）につき、HBs抗原・抗体（ELISA）、第二世代HCV抗体、HCV-RNA（Amplifire法）、HGV E2抗体（ELISA）、HGV-RNA（RT-PCR）、TTV-DNA（nested-PCR）の測定を行い、その陽性率、重複感染率、各の陽性群、陰性群における透析歴など患者背景の差、一般検査値、肝機能検査値の差などを比較検討した。有意差検定は Student's t test、 χ^2 test 等で行った。

結 果

1. 持続透析患者における肝炎ウイルスの感染率について

患者75名中、HBs抗原陽性者2名、HBs抗体陽性者1名、HCV抗体陽性者21名（28%）、HCV-RNA陽性者11名（15%）、HGV E2抗体陽性者8名（11%）、HGV-RNA陽性者9名（12%）、TTV-DNA陽性者26名（35%）であった。全患者中、48名（64%）が何らかの肝炎ウイルスに感染していた（表1）。また、HCV感染群とHGV感染群（HGV E2抗体陽性者+HGV-RNA陽性者、尚、同時陽性者1名）間では有意な重複がみられた（表2）。

2. 肝炎ウイルス感染と透析歴との関係について

HCV抗体陽性群の透析年数（13.6±8.4年）は陰性群のそれ（5.2±4.2年）より有意に長かった（ $p<0.01$ 、表3）。また、HGV-RNA陽性群、陰性群間でも有意差を認めたが（陽性群：陰性群=13.4±7.7年：6.8±6.2年、 $p<0.05$ 、表3）、HCVとの重複感染が多く含まれており、HGV単独感染に限れば有意な差は認められなかった。その他のウイルス感染では、感染歴の有無と透析歴との間に関連を認めなかった。

3. 肝炎ウイルス感染と輸血歴の有無との関係について

全患者中、輸血歴のある者は46名、ない者は20名、不明9名であった。HCV感染（HCV抗体陽性）、HGV感染（HGV E2抗体陽性+HGV-RNA陽性）、TTV感染（TTV-DNA陽性）と輸血歴の有無との関連を解析すると、 χ^2 p値でそれぞれ、0.25、0.26、0.85と有意な関連を認めるものはなかったものの（表4）、HCV感染、HGV感染では透析歴以外に輸血歴の有無が感染成立に関与する可能性が示唆された。

4. 肝炎ウイルス感染と病態との関連について

今回検討した患者中では、ALT値の最高値は46 IU/lであり、明らかな異常値をとる者はなく、今までの持続透析患者における報告と矛盾はなかった。HCV-RNA陽性群、陰性群間でのみALT値に有意な差を認めたが（陽性群：陰性群=16.5±8.0 IU/l：7.7±7.3 IU/l、 $p<0.01$ ）、その他のウイルスマーカー陽性群、陰性群間では有意な差を認めなかった（表3）。

考 察

持続血液透析患者における肝炎ウイルス感染率、特にHCV、HGVの感染率は高く、これらのウイルス感染に対するハイリスク群であることが確認された。HCV、HGV感染とも透析年数の長さが感染の規定因子となっており、透析に伴う何らかの事象、おそらく輸血により感染が媒介された可能性が高いものと思われた。1990年のエリスロポエチン製剤認可による輸血の減少、HCV抗体スクリーニングなどによる輸血後肝炎の減少などにより、以後は透析患者においても肝炎ウイルス感染率は低くなっていることが予想される。年代毎の解析、及び新規透析導入患者の経過観察が必要と思われた。

ALT値などの臨床検査値の解析では、HCVのみが病原性を発現する可能性があることが示唆された（HBVは症例数が少ないため解析の対象外）。HGV、TTVにより肝炎を発症する例があることは広く報告されているが、今回の検討では一般の病原としては重要性は低いことが示唆された。ただし、持続透析患者においては、みかけのALT値は低くなることが知られており、引き続き慎重な経過観察が必要と思われる。

表1
 持続血液透析患者における肝炎ウイルス重複感染の実態 (1)

HCV	+	+	+	+	-	-	-	-
HGV	+	+	-	-	+	+	-	-
TTV	+	-	+	-	+	-	+	-
No.	2	6	3	10	2	6	19	27

14例の患者が複数のウイルスに感染していた (HBV+TTVの1例を含む)。

HCV+: anti-HCV positive

HGV+: anti-HGV E2 positive or HGV-RNA positive

TTV+: TTV-DNA positive

表2
 持続血液透析患者における肝炎ウイルス重複感染の実態 (2)

HCV感染 vs HGV感染*

HCV	+	+	-	-
HGV	+	-	+	-
No.	8	13	8	46

HCV感染 vs TTV感染

HCV	+	+	-	-
TTV	+	-	+	-
No.	5	16	21	33

HGV感染 vs TTV感染

HGV	+	+	-	-
TTV	+	-	+	-
No.	4	12	22	37

HCV感染: HCV Ab+

HGV感染: HGV Ab+ or HGV E2 Ab+

TTV感染: TTV-DNA+

HCV感染者とHGV感染者との間で
 有意なオーバーラップを認めた

* $p < 0.05$ (χ^2 test)

表3

各肝炎ウイルスマーカー陽性者・陰性者間での背景、検査値の比較

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
HCV-RNA (+)	11 (15%)	54.5 ± 8.3	12.7 ± 8.9	16.5 ± 8.0	10.2 ± 0.9
HCV-RNA (-)	64 (85%)	57.2 ± 11.6	6.7 ± 6.0	7.7 ± 7.3	9.9 ± 1.1

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
HCV-Ab (+)	21 (28%)	58.3 ± 9.3	13.6 ± 8.4	11.8 ± 8.1	10.0 ± 0.8
HCV-Ab (-)	54 (72%)	56.2 ± 11.8	5.2 ± 4.2	7.9 ± 7.7	9.9 ± 1.2

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
TTV-DNA (+)	26 (35%)	56.4 ± 9.5	5.8 ± 5.9	9.1 ± 9.0	9.9 ± 1.1
TTV-DNA (-)	49 (65%)	57.0 ± 12.0	8.6 ± 7.1	8.9 ± 7.5	10.0 ± 1.0

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
HGV-RNA (+)	9 (12%)	53.0 ± 8.9	13.4 ± 7.7	11.6 ± 7.7	9.6 ± 1.6
HGV-RNA (-)	66 (88%)	57.5 ± 11.3	6.8 ± 6.2	8.6 ± 8.0	10.0 ± 1.0

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
HGV E2 Ab (+)	8 (11%)	56.1 ± 9.0	13.3 ± 9.0	8.4 ± 4.4	10.1 ± 0.4
HGV E2 Ab (-)	67 (89%)	56.9 ± 11.4	7.3 ± 6.5	9.1 ± 8.3	9.9 ± 1.1

ウイルスマーカー	患者数	年齢 (y)	透析歴 (y)	ALT (IU/l)	Hb (g/dl)
HGV+	16 (21%)	54.3 ± 9.1	11.3 ± 8.1	10.1 ± 6.6	9.9 ± 1.2
HGV-	59 (79%)	57.5 ± 11.5	6.9 ± 6.3	8.7 ± 8.2	10.0 ± 1.0

* p < 0.05
** p < 0.01

HGV+: HGV E2 Ab (+) or HGV-RNA (+)
HGV-: HGV E2 Ab (-) and HGV-RNA (-)

表4 肝炎ウイルス感染と輸血歴との関連

		HCV感染	
		(+)	(-)
輸血歴	有	13	33
	無	3	17

		HGV感染	
		(+)	(-)
輸血歴	有	10	36
	無	2	18

		TTV感染	
		(+)	(-)
輸血歴	有	15	31
	無	7	13

HCV感染と輸血歴: χ^2 p値=0.25

HGV感染と輸血歴: χ^2 p値=0.26

TTV感染と輸血歴: χ^2 p値=0.85

Genotype III/2a型が高頻度を示したHCV高度汚染地域の追加調査

山梨医科大学第一内科 赤羽 賢浩
 協同研究者：
 同 内藤成子、相野田隆雄、宮崎吉規
 山梨県厚生連健康管理センター
 依田芳起、知見貴雄

はじめに

わが国では全国各地に、小規模ながら、HCVの高度汚染地域が散在している。我々も以前よりgenotype III/2a型が比較的高頻度を示すHCV高度汚染地域の実態を調査し報告してきたが¹⁾、今回同地域においてgenotypeによる病態の進展の相違を検討した。

対象並びに成績

山梨県Z村では1988年から1997年にかけて10年間集団検診が行われている。

1992年の集団検診受診者1,456名中HCV抗体陽性者は291名(20%)であり、翌1993年の受診者は1,479名でHCV抗体陽性者は283名(19%)であった。1994年には、1992年と1993年のHCV抗体陽性者のみ280名を再調査し、うち229名(82%)にHCV RNAを検出した。これら229名のHCV genotypeの分布はII/1b型113名(49%)、III/2a型98名(43%)、IV/2b型9名(4%)、mixed type 6名(3%)、型分類不能3名(1%)であり、この村ではIII/2a型が比較的高頻度であることが判明した。

1994年genotypeが判明した時点での、II/1b型とIII/2a型の臨床背景と臨床データの相違を比較した(表1)²⁾。年齢分布に差異を認めなかったが、III/2a型では男性の占める割合が高率であり、AST、ALTの異常率はII/1b型が有意に高率であった。

HCV RNA陽性のgenotype II/1b型94名、III/2a型83名について1988年から1997年の10年間の臨床データの推移を検討した。全例が毎年必ず検診を受けているわけではないので、1988年から1991年を前期、1992年から1994年を中期、1995年から1997年を後期とし、10年間を大きく3期に分けて、その推移を検討した。尚、各期に複数回検診を受診したものは、各測定値の平均値を求め、集計を行った。

図1に示す如く、血小板数は前期、中期、後期と経過とともにその数が減少し、II/1b型、III/2a型とも、前期と後期の差は有意であった。ただしII/1b型とIII/2a型の血小板減少の傾斜には有意差は見られなかった。II/1b型、III/2a型の構成に男女差があることから、各々の型を男性例と女性例に分けて検討すると、II/1b型では男女差は少ないが、III/2a型では女性の血小板減少が比較的穏やかであることが判明した。

ALTの推移を図2に示した。前期と後期を比較すると、II/1b型、III/2a型とも若干上昇しているが有意差ではなかった。II/1b型の男性例のALTが比較的高値で、III/2a型の女性例が比較的低値で推移する傾向を認めた。

ZTTは両型とも、経過とともに有意に上昇したが、両型の間には差異を認めなかった(図3)。

尚、経過観察中の10年間にII/1b型1名、III/2a型2名の肝細胞癌の発生を認めた。

表1 Genotype II/1bとIII/2aの比較 (1994年)

	II/1b (n=113)	III/2b (n=98)	differences
性別 M	35 (31%)	44 (45%)	p<0.05
F	78	54	
年齢	65.6±10.4	63.9±12.7	n.s.
輸血歴	17%	11%	n.s.
AST>30 IU	72%	56%	p<0.05
ALT>30 IU	65%	44%	p<0.01
ZTT>12 KU	81%	85%	n.s.

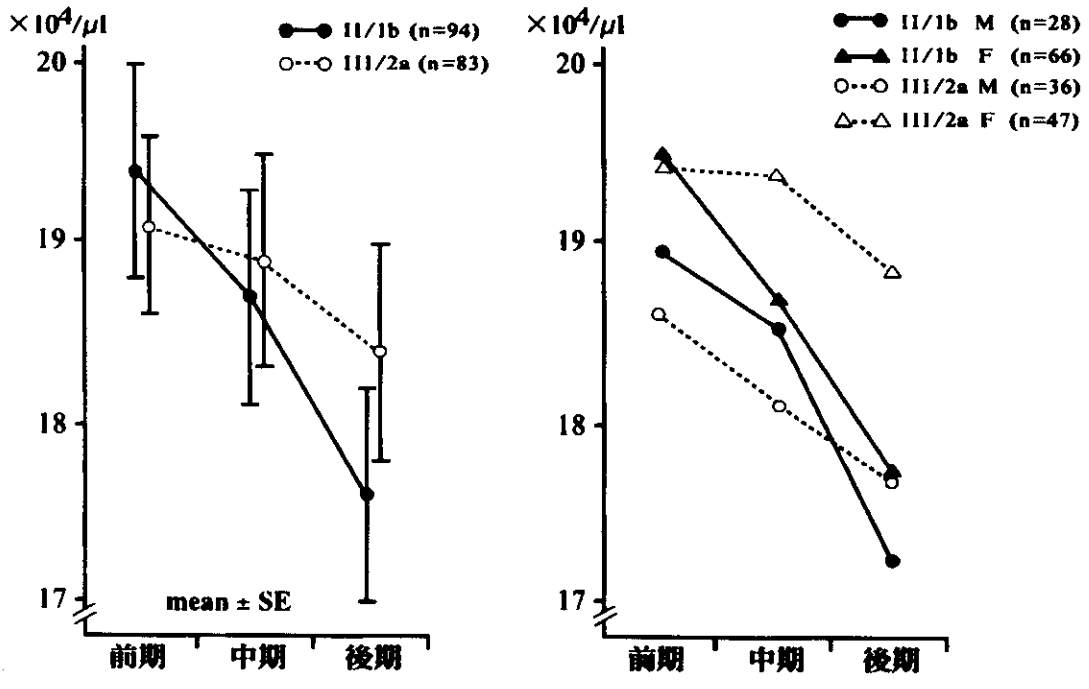


図1 血小板数の推移

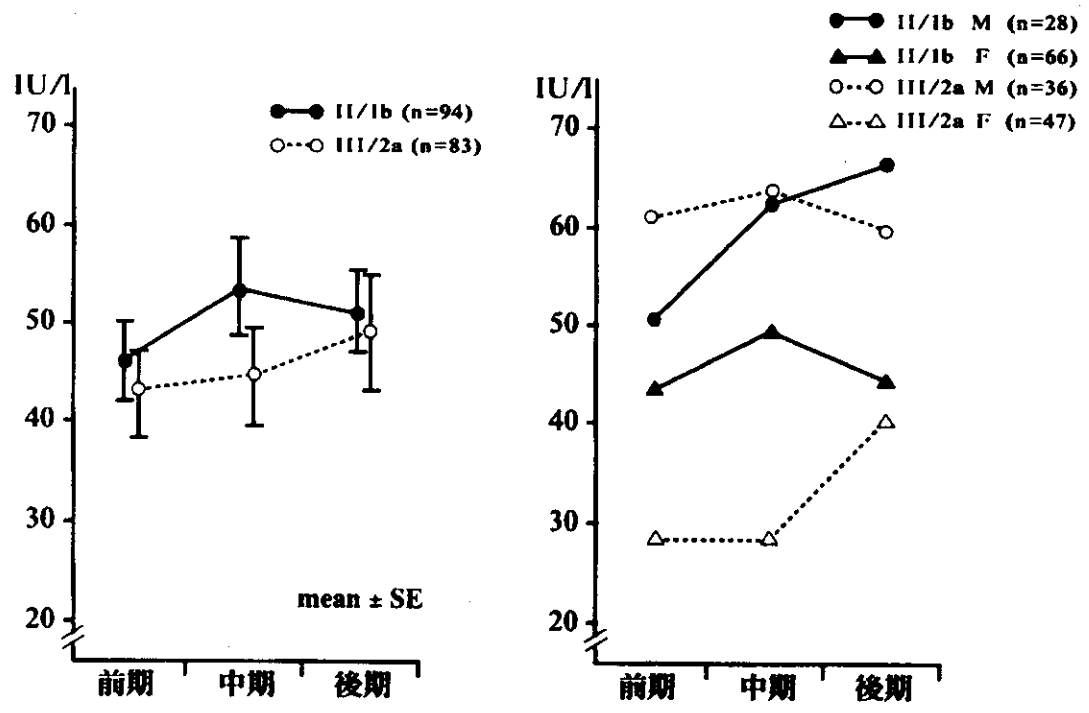


図2 ALTの推移

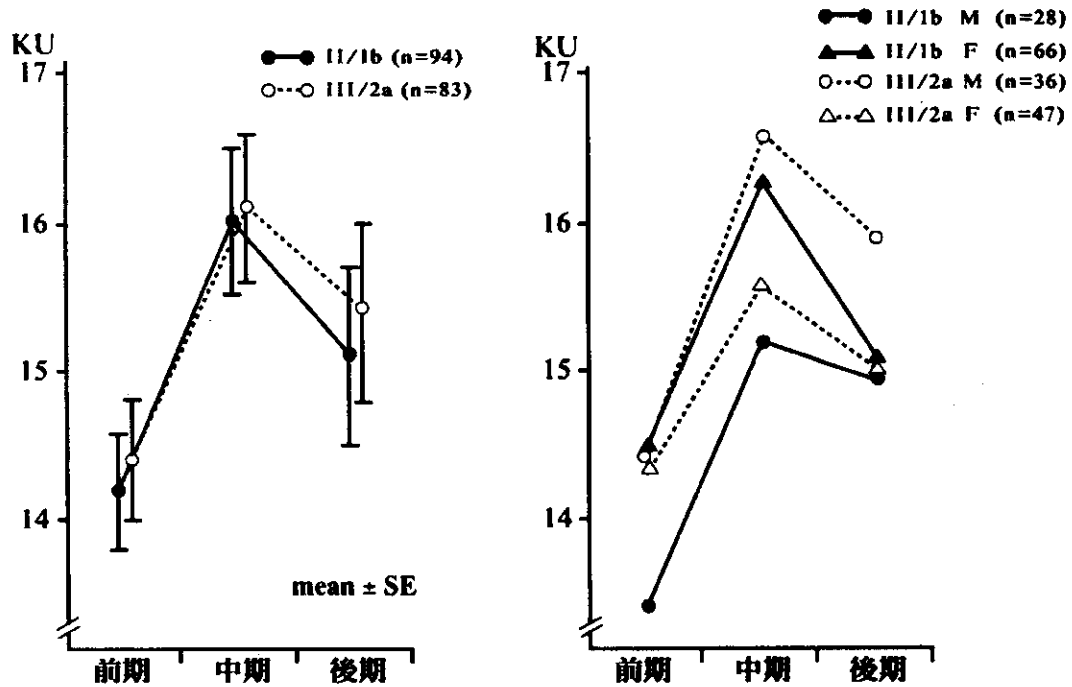


図3 ZTTの推移

結 論

Ⅲ/2a型が比較的高頻度（43%）を示すHCV高度汚染地域の集団検診の臨床成績を検討した。その結果、Ⅱ/1b型はⅢ/2a型に比し、AST、ALTの異常率が高く、10年間の経過観察では前者は、血小板数の減少が急峻で、ALTも高値で推移する傾向を認めた。以上より、C型肝炎ではgenotype Ⅱ/1b型がⅢ/2a型に比し、病態の進展が早い可能性があるものと考えられた。尚、Ⅲ/2a型の女性例は比較的mildに推移するものと考察された。

文 献

1. 赤羽賢浩、内藤成子、宮崎吉規、他：
HCV高度汚染地区の疫学調査—HCV genotype別の検討—
厚生省非A非B型肝炎研究班 平成6年度研究報告書 p82-83.

免疫吸着カラムによるHCV RNAの減少

金沢大学第一内科 小林 健一

目 的

昨年来、我々は免疫吸着カラムによるHCV RNAの減少について検討しており、いくつかのcolumnにて良好なHCV RNAの吸着が得られることを確認した。本年度はさらに臨床に近い形のミニカラム環流法にてHCV RNAの減少を検討し、さらにHCV持続感染動物であるチンパンジーについて実際に、体外循環免疫吸着療法を行いHCVの動態を検討した。

方 法

ミニカラム環流法モデルは37度下においてカラム血清比が24:1となるように吸着体量を調整、2時間で血清がカラムを2回通過するよう速度設定し実際の環流を行い、時間ごとのHCV RNA吸着率を検討した。HCV持続感染チンパンジー体外循環併用免疫吸着療法は三和化学研究所の協力のもと行った。体外循環は大腿動脈を採血路、大腿静脈を返血路とし、採血回路より血漿と血球を分離、血漿を一定速度で免疫吸着処理を行い、血球成分と混合後返血路へ返却した。免疫吸着カラムはProtein-Gと同様なIgGを吸着するものを使用した。循環血漿量の1.5から2倍を目標に体外循環を行い、体外循環前後の及び循環中の臨床生化学的所見、HCV RNA量について検討した。

結 果

図1に示すようにミニカラム環流法モデルにおいてカラム出口では20分後にHCV RNAは環流前量の50%ほどに減少し、その後2時間までほぼ吸着率40%ほどでプラトーに達していた。環流後プール血清では環流前に比べ18% HCV RNAが減少していた。2頭のチンパンジーについて体外循環を行い1例目に関しては主にうまく体外循環できるか、うまく血漿分離できるかを中心に検討し、プロトコルを改良して2例目で免疫吸着療法を施行した。表1に血清生化学所見を示す。体外循環後若干の血腫ができたためHbで1g/dlほど低下、および体外循環中免疫吸着カラムに対する反応と思われる体温上昇、白血球上昇、長時間に及ぶ麻酔の影響と思われる筋原酵素の上昇が認められたが、安全に施行しえた。体外循環前IgG 3540が循環終了時2852と約20%の低下が見られた。図2にHCV RNA量の経過を示す。吸着療法施行直前170Kcopy/mlであったHCV RNA量は総血漿処理量2800mL（おおよそ全血漿を2回カラムを通過処理された）にて、吸着療法終了直後110Kcopy/mlと約35%のHCV RNAを吸着したと考えられた。HCV RNA量はその後4時間で前値に回復、翌日にはさらに上昇、その後施行前と同程度になった。このHCV RNA量の変化を比重1.067g/dlでわけられる比重の軽い、freeのHCV粒子であるTopと、比重の重い、IgGと結合していると考えられるBottomの2つの分画ごとに検討すると、図3に示すように免疫吸着療法後まずtop分画、freeのHCV粒子が4時間後に急速に増えて、その後Topは減少、Bottomが増加し、定常状態になっていた。

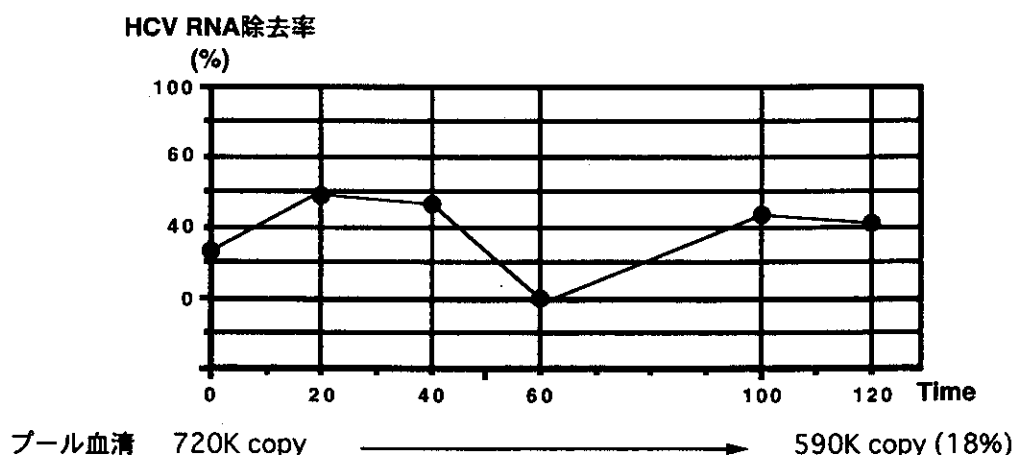


図1 ミニカラム環流法モデルによるHCV RNA除去率