

# C型肝炎、肝臓患者における血清サイトカインの動態の比較

愛知医科大学第一内科 各務 伸一  
協同研究者：石川哲也、伊東正道

## 目的

C型肝炎からの発癌率は高率であり、今後も肝臓患者は増加すると予測されている。C型肝炎慢性肝疾患からの発癌はほとんどが肝臓を介するため、発癌機序に関しては、特定の発癌遺伝子の関与よりも、炎症の持続によるランダムな遺伝子変異の蓄積の結果であるとする考え方がある。実際に肝炎の程度を抑えることにより、肝臓の発癌率が抑えられることが明らかとなっており、炎症、つまり宿主の免疫応答の解析が肝臓の発癌機序を考える上でも、非常に重要と考えられる。本研究では、C型肝炎患者のうち、発癌に至った群とそうでない群との間で、血清サイトカインの動態を比較、解析することにより発癌機序に関する考察を試みた。

## 対象と方法

対象は、C型肝炎と診断された者のうち発癌に至った肝臓患者（HCC群）13名、非肝臓患者（LC群）25名である。各患者群のプロフィールを表1に記す。年齢、ALT値、血小板数等に差は認めなかったが、AFP値のみ両群で差を認めた（LC群：26±45 ng/ml、HCC群：199±345 ng/ml、 $p<0.05$ ）。HCC群に関しては肝臓との診断前、診断時、診断後（治療開始後）のそれぞれ1~2ポイント、LC群に関してはHCC群における観察期間に相当する間隔（6ヶ月~1年間隔）での3ポイントの血清を選択し、それぞれにおけるサイトカイン値を測定した。サイトカインはELISAキットを用いてTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ （以上BioSource）、IL-10、L-12(p40+P70)、L-12 p70（以上Amersham pharmacia）を測定した。トランスアミナーゼ値、血小板数、AFP値、ウイルス量などの臨床データを含め、それぞれの群における各ポイント間での比較、また、control群を含めた3群間での比較を行った。9名の肝疾患の既往のない健康者を

control群とした。有意差検定はStudent's t testにて行った。

## 成績

### 1. 各群内におけるサイトカインの動態の比較

LC群においては、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ において最初の2ポイントに比較し最後のポイントで低くなる傾向を認めたが、有意差は認めなかった（図1）。その他のサイトカイン値、及び臨床データとも、各ポイント間で差を認めるものはなかった。また、HCC群においても、肝臓診断の前後でサイトカイン値で有意差を認めるものはなかった（図2）。HCC群の臨床データでは、血小板値が診断後、診断前値に比べて有意に低下していたのみであった（前：9.9±2.5万/mm<sup>3</sup>、後：7.4±2.5万/mm<sup>3</sup>、 $p<0.05$ ）。各群内でそれぞれのサイトカインは互いに相関して推移する傾向を認めた。図1、2で明らかのようにTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ は、LC群、HCC群間で平均値に差を認める可能性があったため、LC群での中間のポイント、HCC群での診断時のポイントを取り、両群間でのサイトカイン値の比較を試みた。

### 2. 各群間でのサイトカイン値の比較

control群を含めて各群間での比較を行った（表2）。control群と患者群（LC群、HCC群）との比較では、患者群においてIL-12 p70を除く全てのサイトカイン値が高値をとる傾向を認めた。TNF- $\alpha$ はcontrol群、HCC群、LC群の順に高値となり（それぞれ31±15 pg/ml、155±151 pg/ml、382±341 pg/ml）、各群間で有意差を認めた（control群 vs LC群： $p<0.01$ 、control群 vs HCC群： $p<0.05$ 、LC群 vs HCC群： $p<0.05$ ）。IL-1 $\beta$ も同様の傾向を認めたが、各群間で有意差は認めなかった。IL-10はcontrol群に比し、LC群、HCC群でやや高い傾向を認め、control群（4.8±0.6 pg/ml）とHCC群（6.0±1.5 pg/ml）とで有意差を認めた（ $p<0.05$ ）。IL-12（p40+p70）はcontrol群に比較し、LC群、HCC群で高値をとったが、各群間で差を認めなかった。IL-12 p70はHCC群で、control群、LC群に比し低い値を取り、control群（5.1±0.6 pg/ml）とHCC群（4.4±0.6 pg/ml）との間で有意差を認めた（ $p<0.05$ ）。

表1. Patient profile

	年齢	男：女	ALT (IU/l)	Plt (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	AFP (ng/ml)
C型肝炎 (13)	64±7	9:4	89±50	11.4±4.5	26±45
C型肝炎 (25)	63±8	14:11	73±37	9.4±3.1	199±345

Dataはいずれも診断時、他にcontrol（健康者）、9名

\*  $p<0.05$

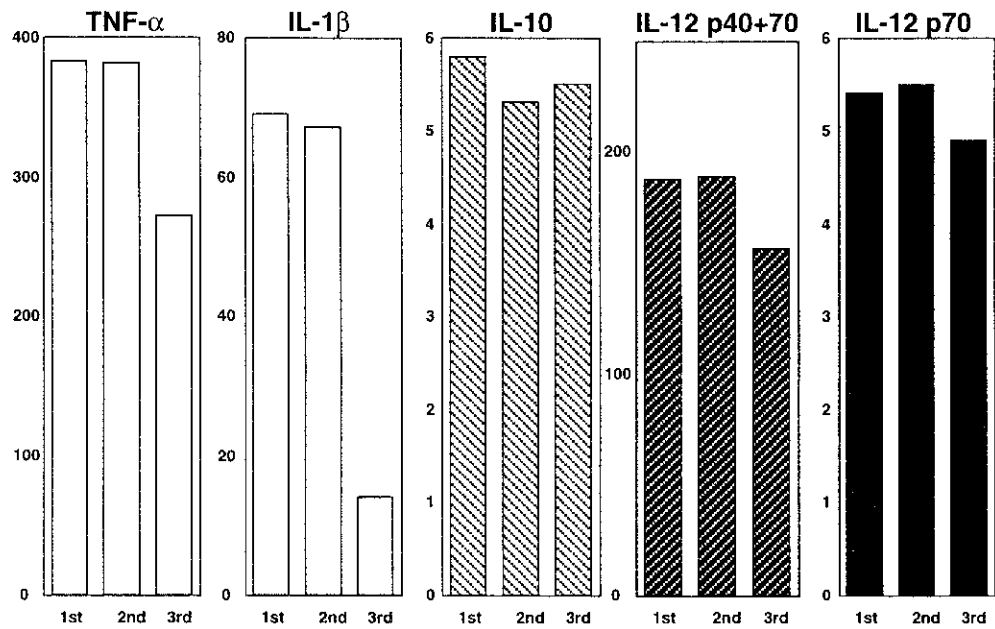


図1. Kinetics of cytokines in LC group

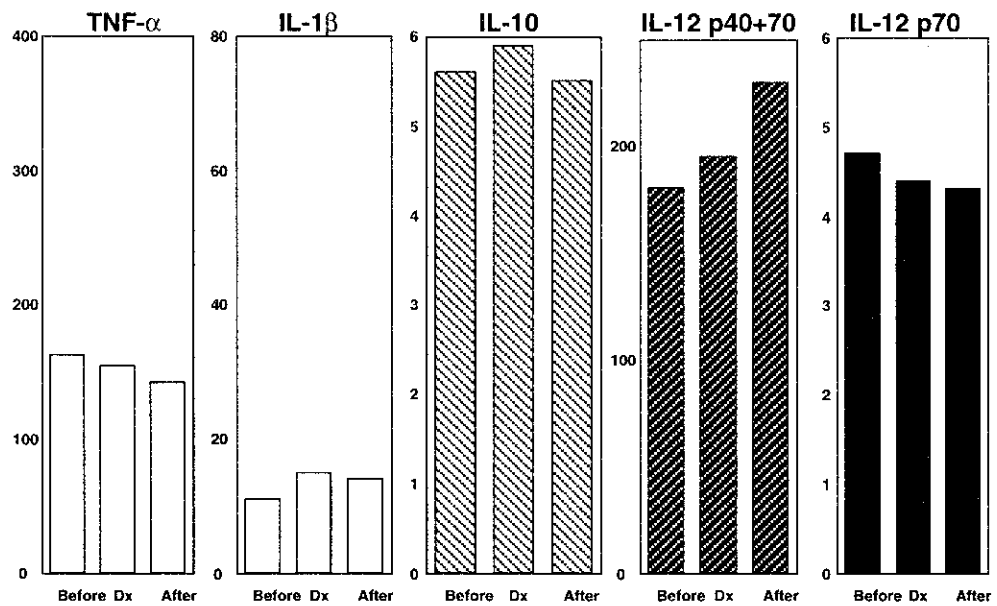


図2. Kinetics of cytokines in HCC group

表2. Cytokine values in patients and controls

	TNF-α	IL-1β	IL-10	IL-12 p40+70	IL-12 p70
Controls	31±15	4.9±0.3	4.8±0.6	64±27	5.1±0.6
LC	382±341	67±267	5.±1.1	190±294	5.5±2.8
HCC	155±151	15±20	6.0±1.5	195±213	4.4±0.6

\* p<0.05, \*\* p<0.01

(HCC群のサイトカイン値は診断時の値、LC群は中間点での値)

## 結論と考察

今回の検討では、HCC群でのサイトカインの動態からは癌化を予測あるいは反映するような変化はみられなかったが、LC群、HCC群間での比較では、サイトカインのプロフィールには明確な差を認めた。即ち、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12 p70はHCC群でより低値をとる傾向にあったが、IL-10は逆にHCC群で高値をとる傾向にあった。腫瘍免疫という観点から考えると、pro-inflammatory cytokineであるTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、immuno-stimulatory cytokineであるIL-12 p70は腫瘍に対して抑制的に、逆にimmuno-suppressive cytokineであるIL-10は腫瘍の進展、増大に関して有利に働く可能性がある。つまり、サイトカインのパターンからみれば、HCC群においては腫瘍の進展、増大に有利な環境となっているものと考えられる。発癌過程のどの時点でサイトカインのパターンに変化が起こるかは問題であるが、これは発癌に何らかの免疫的機序が関わること、あるいは拒癌状態が何らかの免疫学的異常を宿主にもたらすことを示唆している。より長期の観察期間におけるさらに詳細な検討が、個々のサイトカインの発癌において果たす役割を評価する上で重要と思われた。

## 液性免疫からみたC型肝炎ウイルス超可変領域のアミノ酸変異とその意義

山口大学第一内科 沖田 極  
協同研究者：日野啓輔、是永匡紹  
山口裕樹、加藤吉晴

### 目 的

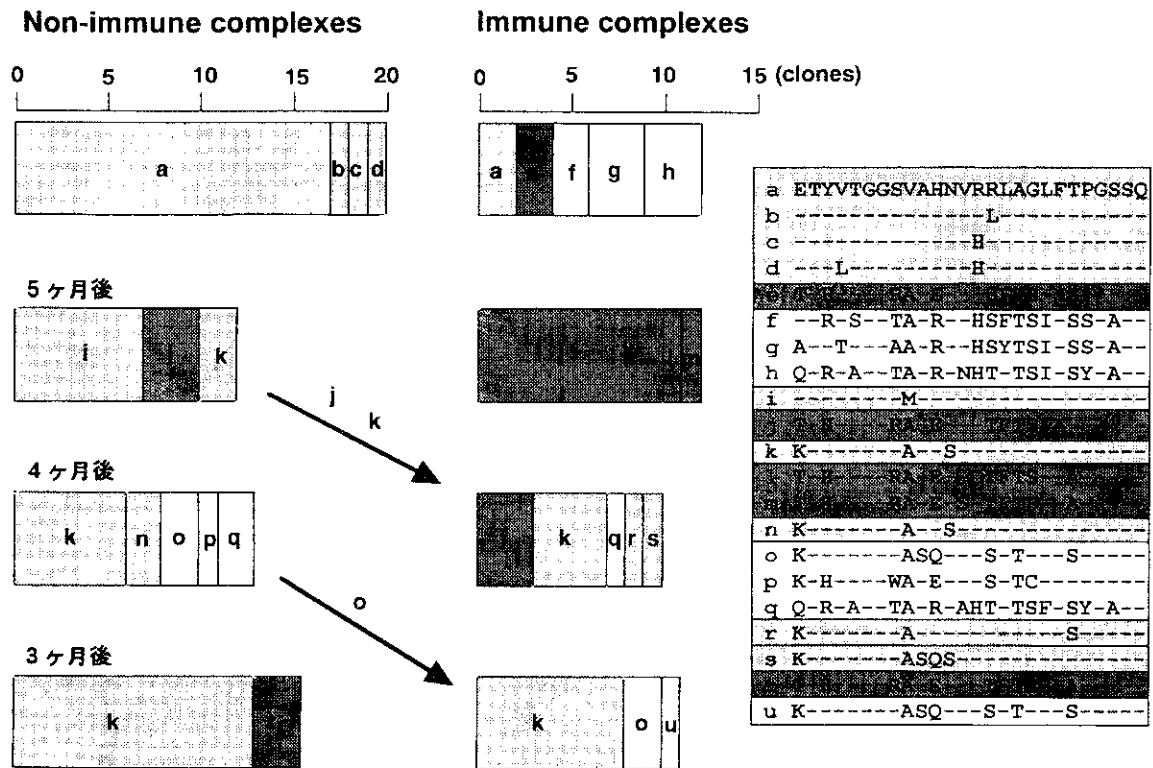
C型肝炎ウイルス(HCV)に対する中和抗体のエピトープの一つと考えられている超可変領域(hypervariable region1, HVR1)は、そのアミノ酸変異により抗HVR1抗体からエスケープすると考えられている。一方、HVR1と言えどもそのアミノ酸変異は任意に起こっているのではなく一定の制約があること、抗HVR1抗体にはcross reactivityがあることなどが報告されている。そこでHCVがどのように抗HVR1抗体からエスケープしていくのかを明らかにする目的で、循環血液中の免疫複合形成HCV粒子および非形成HCV粒子についてHVR1領域のアミノ酸変異を経時的に検討した。

### 対象及び方法

対象はgenotype 1b型HCVに感染し、組織学的に診断されたC型慢性肝炎患者9例である。1~18ヶ月の期間に経時的に採取された血清を免疫複合体と非複合体粒子に分離し、両粒子のHVR1からみたquasispeciesの推移を検討した。免疫複合体は比重遠心法ならびに免疫沈降法により分離し、両粒子のquasispeciesは既報のごとくsubcloningとsequencingにより決定した<sup>1)</sup>。HVR1のアミノ酸変異は著しいため、27アミノ酸のうち互いのアミノ酸変異が3個(11%)以内のクローンを同一グループとして、グループ別にその推移を検討した。一部のクローンはGlutathion S Transferase(GST)との融合蛋白を発現させ、血清中の抗HVR1抗体とwestern blottingを行うことにより、免疫複合体におけるHVR1蛋白と抗HVR1抗体との特異性を検討した。

### 成 績

5例において非複合体粒子中のいくつかのクローンが経時的に抗HVR1抗体と免疫複合体を形成し、その後免疫複合体からも消失するクローンが存在した。HVR1発現蛋白に対する抗体は、1例においてはそのクローンが免疫複合体中に検出されるようになった時期の血清にのみ検出されたが、もう1例においてはそのクローンが免疫複合体に出現する前の血清中にも検出された。最も興味深かった点は、3例において非複合体粒子の中でも抗HVR1抗体に捕捉されて複合体粒子へ移行していくminorなクローンは他のグループと比べてアミノ酸変異の程度が著しかった(図1)。一方で、非複合体粒子のquasispeciesは経時的に変化するものの抗HVR1抗体に捕捉されないクローンの多くは互いにアミノ酸配列が類似している傾向が認められた。



同じ網掛けのアミノ酸配列は互いのアミノ酸変異が3個以内であることを表す

**考 案**

HVR1からみたHCVのquasispecies形成の意義のひとつとして、中和抗体とも考えられている抗HVR1抗体からのエスケープが示唆された。その一機序として、majorなクローンとはアミノ酸配列が大きく異なるminorなクローンが産生され、このクローンに対して特異的な抗HVR1抗体が産生されることにより、多くのクローンは抗HVR1抗体から捕捉されずに存続しうる可能性が推察された。

**文 献**

1. Korenaga M, Hino K, Okita K, et al. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochem Biophys Res Commun* 240:677-82, 1997

# C型慢性肝炎及び肝細胞癌における肝細胞CD81発現の臨床的意義の検討

愛媛大学第三内科 恩地 森一

共同研究者：堀池典生、道発浩二郎、井上 学

## 目 的

CD81は、tetraspanin transmembrane familyに属し、HCVの細胞レセプターの一つと考えられている(1)。CD81は、細胞接着、細胞運動性、細胞増殖に関与するが、C型肝炎患者における肝細胞での発現の検討は少ない。今回、C型肝炎患者及び肝細胞癌における肝細胞CD81発現を検討し、その臨床的意義を解析した。

## 対象及び方法

対象は、C型肝炎13例、肝硬変11例、肝細胞癌21例(癌部、非癌部各29病変)である。B型肝炎3例、肝硬変2例及び正常肝4例を対照とした。

CD81の光顕及び電顕による検討を、生凍結アセトン固定肝組織切片において、CD81細胞外domain (EC2) に対するモノクローナル抗体 (Pharmingen社) 及びstreptavidin-biotin complexを用いた酵素抗体法で行った。肝細胞膜CD81発現の程度を、(-):陰性、(+):90%未満の肝細胞で陽性、(++):90%以上の肝細胞で陽性とした。肝細胞癌例では、共焦点レーザー法にて、癌部及び非癌部におけるCD81発現の程度を比較した。更に、肝細胞癌7例において、癌部及び非癌部の凍結組織よりRNAを抽出し、CD81 nt 243-611部のprimerを用いたCD81 mRNAのnested RT-PCR法及び限界希釈法による半定量を行った。

## 成 績

CD81反応産物は、C型肝炎及び肝硬変全例で肝細胞膜にびまん性に観察された。しかし、対照群でも同様

に認められた。免疫電顕にても、CD81反応産物は肝細胞膜に認められた。C型肝炎例において、肝細胞膜CD81発現の程度(+)及び(++と、肝生検組織像、GPT、血中HCV-RNA量、HCV serotypeの間に関連性を認めなかった(表1)。

肝細胞癌例において、肝細胞におけるCD81発現は、29病変中23病変(79%)が陽性であり、非癌部の肝細胞(29病変全例で陽性)に比し、有意に(P<0.05)陽性率が低かった。共焦点レーザー法にても、癌部におけるCD81発現は非癌部に比し低下していた。CD81 mRNAは、7例中4例は癌部、非癌部いずれも陽性であったが、3例においては癌部で陰性、非癌部で陽性であった。癌の分化度別に検討すると、CD81染色陽性率は、高分化、中分化、低分化でそれぞれ100% (3/3)、95% (17/18)、38% (3/8)であり、低分化癌において有意に(P<0.05)陽性率が低かった。CD81 mRNAでは、低分化2例及び中分化1例は癌部で陰性、非癌部で陽性例であった。中分化残りの4例において、癌部、非癌部での半定量は差を認めなかった。癌部のCD81染色陰性6例は、全例肝細胞癌肉眼的進行程度(stage) 4bであり、癌部のCD81染色陽性肝細胞癌(2/15,13%)に比し、肝外転移を有意に(P<0.05)高率に認めた。

## 考 察

CD81反応産物は、疾患と無関係に肝細胞膜にびまん性に観察され、C型肝炎においても、CD81発現の程度と、病態及びHCV増殖の間に関連性を認めなかった。すなわち、肝細胞CD81はHCVの細胞レセプターの一つではあるが、C型肝炎の臨床像には影響が少ないと思われる。高分化及び中分化肝細胞癌例の肝細胞においても、CD81は発現していた。この成績はHCV性肝細胞癌において、HBVと異なり、癌部でもHCV増殖がみられる所見を説明しうるものである(2)。

Table 1 The relationship between the grade of CD81 expression and clinical profile in chronic hepatitis C

CD81	N	Serum		Histology					
		HCV-RNA titer*	GPT(IU/l)	fibrosis			activit		
				mild	moderate	severe	mild	moderate	severe
+	9	428±288	89±39	4	3	2	3	5	1
++	12	449±357	102±45	3	5	4	4	6	2

+ : less than 90 % of the hepatocyte membrane were positive

++ : more than 90 % of the hepatocyte membrane were positive

\*:K copies/ml

一方、低分化肝細胞癌の肝癌細胞においては、CD81は陰性であり、臨床的に肝外転移を認める進行例であった。食道癌においても、CD81発現の低下と癌細胞の分化レベル低下及び予後不良が関連している (3)。CD81は、細胞接着、細胞運動性等に関与しているため、その発現低下により転移を生じる可能性がある。今後、CD81発現低下の機序の解明が必要である。

## 結 論

1. C型慢性肝炎において、全例で肝細胞膜にCD81発現が認められたが、その程度と、肝炎の活動性、HCV量の間に関連性を認めなかった。
2. 癌細胞がCD81陰性の肝細胞癌例は、癌の分化が低く、肝外転移を認めた。
3. 以上より、癌細胞におけるCD81の発現レベルは癌細胞の分化レベルの指標となることが示唆された。

## 文 献

1. Pieri P, Uematsu Y, Campagnola S, et al: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941,1998
2. Horiike N, Nonaka T, Kumamoto I, et al: Hepatitis C virus plus- and minus strand RNA in hepatocellular carcinoma and adjoining nontumorous liver. *J Med Virology* 41:312-315,1993
3. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al: Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD81 expression inversely correlate with lymphnode metastasis on oesophageal squamous cell carcinoma. *J cancer* 79:1168-1173,1999

## HCVによる樹状細胞抗原提示能異常の検討

愛媛大学第三内科 恩地 森一  
共同研究者：日浅陽一、堀池典生

## 目 的

C型肝炎ウイルス (HCV) による肝障害はHCV抗原に特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) により引き起こされることが報告されている(1)。CTLの活性化に樹状細胞 (DC) は不可欠 (2) であり、DCはC型肝炎の病態に重要な影響を及ぼしている可能性がある。我々はすでにマウス脾臓より単離したDCにアデノウイルスベクターを用いてHCV遺伝子を発現させることにより、DCのT細胞幼若化補助能が低下することを報告した(3)。今年度はHCVトランスジェニックマウス(4)を用いて脾臓より単離したDCにHCV遺伝子を発現させ、HCV発現によるDCの機能変化を検討した。さらにマウス骨髄より未成熟なDCを単離し、HCVを発現させ、DCの成熟に伴う影響についても検討した。

## 方 法

東京都臨床医学総合研究所感染生体防御研究部門 小原道法博士が開発した2系統 (CN2-8, CN2-29) のHCVトランスジェニックマウス(4)を用いて実験を行った。

マウス脾臓よりSteinmanらの方法(5)でDCを単離し、NCre遺伝子を発現するアデノウイルスベクター(AxCANCre)を3時間感染させHCV遺伝子を発現させた。コントロールウイルスとしてAxCANCreよりNCre遺伝子部分を取り除いたアデノウイルスベクター (AxCAw1) を用い、同じ条件で感染させた。各々のDCのT細胞幼若化補助能を異系マウス(C57BL6)より単離したT細胞と混合培養するallogeneic mixed leukocyte reaction (allo MLR) により比較検討した。

また、マウス骨髄幹細胞をサイトカインの刺激によりDCに分化誘導する方法 (6) を用いて未成熟なDCを単離し、未成熟な状態で HCV 遺伝子を発現することを試みた。基礎的な検討としてHCVコア蛋白の免疫染色によりアデノウイルス感染後の DC のコア蛋白発現率を検討した。さらに、至適ウイルス濃度の検討のため各々のウイルス濃度におけるDCのコア蛋白発現量をELISAにて確認した。またアデノウイルスベクター感染後のDCのコア蛋白発現量の経時的変化も検討した。

次にHCVを発現したDCの、成熟に伴う表面マーカー (MHC class I, class II) の経時的変化をフローサイトメトリーにより検討した。さらに各々のDCのT細胞幼若化補助能をallo MLRにより比較検討した。

成 績

HCVトランスジェニックマウス脾臓より単離したDCのallo MLRにおいて、以前の検討(4)と同様に、HCV遺伝子が発現したDCのT細胞幼若化補助能の低下を2系統のマウス共に認めた(図1)。

マウス骨髄より単離した未成熟なDCを用いた検討では、HCVコア蛋白の免疫染色の結果、2系統のマウスともほぼ100%の樹状細胞にAxCANCreによりHCVコア蛋白の発現を認めた。また、アデノウイルスそのものにHCV遺伝子を組み込んでいるベクター(AxCA327)を用いてHCV遺伝子を発現した場合もほぼ100%のDCにHCVコア蛋白の発現を認めた。至適ウイルス濃度の検討ではmultiplicity of infection (moi) 150でHCVコア蛋白の強い発現を認め、

感染後48時間で発現量はほぼプラトーに達した。

HCVを発現したDCの成熟に伴う表面マーカーの発現強度は、感染後48時間のDCにおいて、HCVを発現したDCにのみ明らかなMHC class I(とりわけH-2D)の発現低下を認めた(図2)。この低下は2系統のマウスともに見られ、また、AxCA327によりHCVを発現させた場合にも見られた。コントロールマウスのBALB/cを用いてAxCANCreを感染させた場合にはMHC class Iの発現低下は認めなかった。またI-AについてはHCV発現による発現の変化を認めなかった。

骨髄より単離したDCのallo MLRの結果、AxCANCre, AxCA327によりHCVを発現したDCではT細胞幼若化補助能の低下を2系統のマウスともに認めた(図3)。

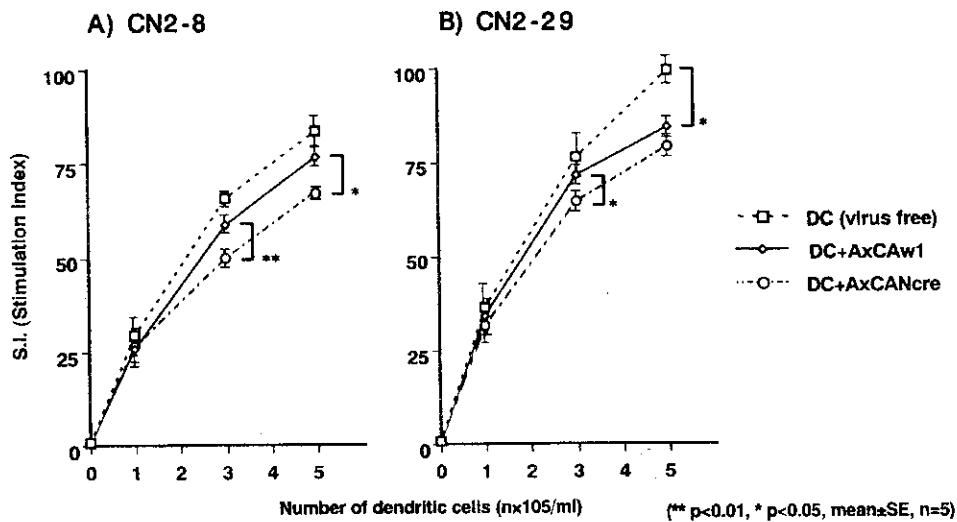


図1 HCVトランスジェニックマウスSpleen DCのallogeneic MLR

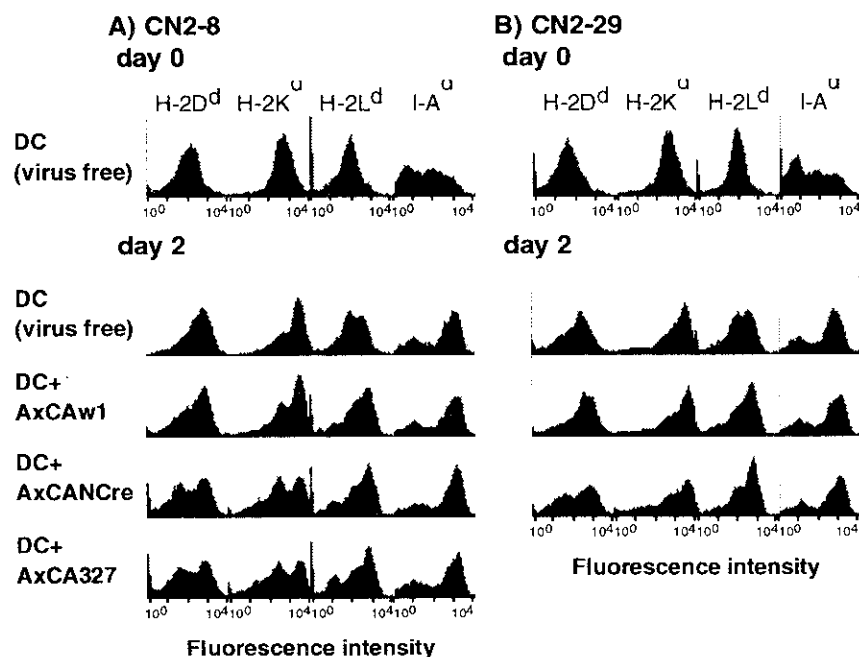


図2 樹状細胞の経時的表面マーカーの変化

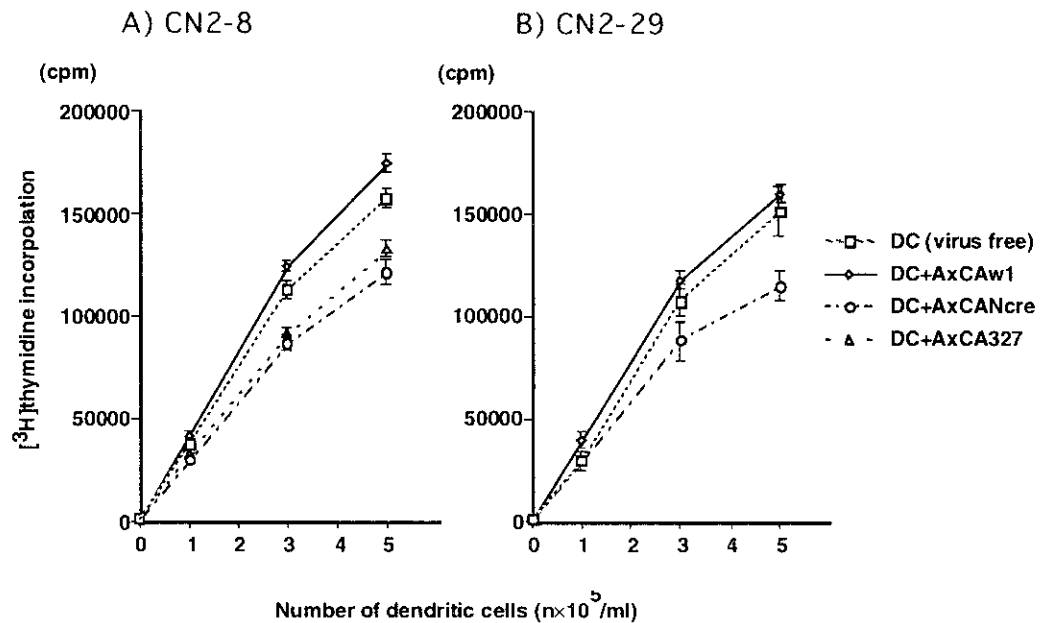


図3 HCVトランスジェニックマウスBone marrow DCのallogeneic MLR

## 考 察

HCVトランスジェニックマウス脾臓より単離したDCを用いてHCV遺伝子を発現させた場合、以前の検討と同様DCのT細胞幼若化補助能が低下することが確認された。しかし、これらのDCはHCVを発現させる時点で成熟なDCとなっている。一方、生体内でDCがHCV特異的な抗原提示をするには未成熟な状態でHCVに感染する必要がある(3)。そのため今回の検討において、骨髄幹細胞よりサイトカインによりDCに分化させる過程で、未成熟なDCを単離し、未成熟な状態でHCVを発現させ、HCVによるDCへの影響を検討した。

その結果HCVを発現した場合にのみMHC class I (とりわけH-2D)の発現低下を認め、このことからHCVによりDCの抗原提示機能が阻害されている可能性が考えられた。また、骨髄由来のDCを用いたallo MLRにおいても、HCVを発現したDCはT細胞幼若化補助能の低下を認めた。この成績はHCVによるDCの機能障害を示唆するものであり、HCVが持続感染する一因の可能性がある。

今後さらに検討をすすめ、HCVがDCのMHC class Iを発現低下させる機序を解明し、HCVに対する免疫療法の開発に結びつけたい。

## 結 論

1. HCVトランスジェニックマウスより単離したDCにHCV遺伝子を発現したところ、100%のDCにコア蛋白の発現がみられた。
  2. HCV遺伝子発現によりDCのMHC class-Iの発現の低下を認めた。
  3. HCV発現DCはallo MLRにおいて、コントロールに比較しT細胞幼若化補助能の低下がみられた。
- 以上よりHCVがDCの抗原提示機能を障害している可能性が示唆された。

## 文 献

1. Cerny A, Chisari FV: Hepatology 30: 595, 1999
2. Banchereau J, Steinman RM: Nature 392: 245, 1998
3. Hiasa Y, Horiike N, Akbar SMF, et al.: Biochem Biophys Res Commun 249: 90, 1998
4. Wakita T, Taya C, Katsume A, et al.: J Biol Chem 273: 9001, 1998
5. Inaba K, Steinman RM: J Exp Med 160: 1717, 1984
6. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al.: J Exp Med 176: 1693, 1992



# C型肝炎におけるHLA関連遺伝子の 遺伝子多型性

大阪大学大学院分子制御治療学 林 紀夫  
共同研究者：葛下典由

## 背 景

C型肝炎のウイルス排除や肝細胞障害機構に、細胞障害性T細胞 (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) 応答が重要な役割をはたしており、これらはウイルスと宿主との相互作用により励起される。CTLはヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) クラス I に提示されたウイルス抗原を認識し、ウイルス感染細胞の排除に働く。一方、ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上のHLAクラスII分子より提示された外来性の抗原を認識し、さまざまなサイトカインを産生し免疫応答の中心的役割を担う。ヒトHLA抗原は、クラスI, クラスIIともに遺伝子多型性に富んでおり、HLAのタイプの違いにより、結合するペプチドが異なると推定される。したがって、個体によってウイルスに対する感受性、免疫応答の程度が異なる可能性がある。さらに近年、HLAクラスII拘束性の抗原提示機構が分子レベルで明らかにされている。ウイルスなどの内在性抗原は、細胞質内のLow molecular mass polypeptide (LMP) によってペプチドに断片化された後、小胞体に運ばれる。Transporter associated with antigen processing (TAP) は、小胞体の膜上に存在しペプチドの小胞体内への選択的輸送を行う。TAPにより小胞体内に運ばれたペプチドはクラスI分子、 $\beta_2$ ミクログロブリンと会合し完全なHLAクラスI分子を形成し、ゴルジ装置を経て細胞膜上に運ばれる。これらHLAクラスI拘束性の抗原提示関連遺伝子は、HLAクラスII領域内DQ遺伝子座のごく近傍に存在する。さらにこれら遺伝子は、他のHLA遺伝子と同様に遺伝子多型性を有している。しかしながら、C型慢性感染患者における肝障害機序、さらにインターフェロン治療効果における、これらHLAおよび抗原提示遺伝子の関与は未だ明らかでない。

## 目 的

本研究では、

- 1) C型慢性感染患者における肝炎発症と抗原提示関連遺伝子多型性との関連について検討する
- 2) C型慢性肝炎患者におけるヒトHLAクラスI遺伝子多型性と、インターフェロン治療効果との関連について検討することを目的とした。

## 方 法

- 1) ALT長期持続正常のC型無症候性キャリア (36例) とC型慢性肝炎患者 (109例) において、LMP2, LMP7, TAP1, TAP2の遺伝子多型性をPCR-RFLP法にて決定し、それらの遺伝子頻度を両群間で比較検討した。
- 2) インターフェロン治療 (天然型 $\alpha$ ) を施行し、治療効果を判定し得たC型慢性肝炎患者185例 (男性：女性=127：58、平均年齢 49 $\pm$ 12歳) を対象とした。HLAクラスI (A, B) 抗原は血清学的タイピングで、それぞれHLA遺伝子を決定した。治療終了後6ヶ月間、肝機能が持続正常の症例を著効群、治療終了後肝機能異常を呈した症例を再燃群、治療効果の認められなかったものを無効群とし、これらインターフェロン治療効果とHLA遺伝子頻度との関連を検討した。

## 結 果

- 1) TAP2\*0103は無症候性キャリアの44%に認められ、慢性肝炎患者群の17%に比し有意に高頻度であった (アレル頻度22% vs. 8%)。TAP2遺伝子の他のアレル (TAP2\*0101, \*0102, \*0201) では遺伝子頻度の差異は認めなかった。また、LMP2, LMP7, TAP1遺伝子座における多型性も検討したが、有意な関連は認めなかった (表1)。我々が既に肝炎発症の抑制に関与していると報告しているHLAクラスII DRB1\*1302-DQB1\*0604は、このTAP2\*0103と強い連鎖不平衡を呈していた。そこでDRB1\*1302-DQB1\*0604を有しない感染患者間でTAP2\*0103の頻度を比較したところ同様に無症候性キャリアで有意に高頻度であった (表2)。
- 2) HCV遺伝子型とインターフェロン治療効果との関連を表3に、HLAクラスI抗原とインターフェロン治療効果との関連を表4示す。A26およびB46を有する患者群で有意に著効例が多かった ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.02$ ,  $pc$  N.S)。反対にB7を有する患者群で有意に著効例が少なかった ( $p < 0.05$ ,  $pc$  N.S)。これらの結果はHCV遺伝子型を1bに限定しても同様であった。

## 結論、考案

慢性C型感染患者の肝炎発症の抑制にTAP2遺伝子の第一義的な関与が示唆された。TAP2\*0103を有するHCV感染患者では、HCV由来の抗原ペプチドをCTLに効率よく提示することができず、肝障害が起こらない可能性がある。

特定のHLAクラスI抗原とインターフェロン治療効果との関連が示唆された。しかし、これらの関与は統計補正をすると有意差が消滅するほど小さく、今後さらに抗原提示関連遺伝子多型性についても検討する必要があると考えられた。

表1 C型慢性感染者における抗原提示関連遺伝子多型性と肝障害

	慢性肝疾患患者 n=109 or 92 218 or 184 alleles	肝機能持続正常者 n=36 72 alleles
TAP1*0101	193 (89%)	64 (89%)
TAP1*0201	24 (11%)	7 (10%)
TAP1*0301	0	1 (1%)
TAP1*0401	1 (0.5%)	0
TAP2*0101	111 (51%)	34 (47%)
TAP2*0102	7 (3%)	2 (3%)
TAP2*0103	18 (8%)	16 (22%)*
TAP2*0201	82 (38%)	20 (28%)
LMP7-K	22 (10%)	10 (14%)
LMP2-H	51 (28%)	24 (33%)

\* p=0.0014, pc<0.01

表2 HCV感染者の肝障害におけるTAP2\*0103とDRB1\*1302-DQB1\*0604との関連

DRB1*1302-DQB10604	TAP2*0103	肝機能持続正常者 (n=36)	慢性肝疾患患者 (n=109)	
有する	有する	7 (19%)	7 (6%)	
有する	有しない	0	0	
有しない	有する	9 (25%)	10 (9%)	p=0.0076
有しない	有しない	20 (56%)	92 (84%)	オッズ比 0.24

表3 HCV遺伝子型とインターフェロン治療効果

Genotype	症例数	著効群	再燃群	無効群
1b	127	31 (24%)	62 (49%)	34 (27%)
2a	39	22 (56%)	10 (26%)	7 (18%)
2b	16	8 (50%)	6 (38%)	2 (13%)
others	3	3		
Total	185	64 (35%)	78 (42%)	43 (23%)

表4 HLAクラスIA26, B7, B46とインターフェロン治療効果

Patients	Rates of sustained responder	
	All patients	1b patients
With A26	54% (14/26)*	44% (8/18)*
Without A26	31% (50/159)	21% (23/109)
With B46	64% (9/14)**	63% (5/8)*
Without B46	32% (55/171)	22% (26/119)
With B7	14% (3/21)*	0% (0/12)*
Without B7	37% (61/164)	27% (31/115)

\*p<0.05, \*\*p<0.02

# 肝細胞IFNレセプター (IFNAR1, IFNAR2)発現とC型慢性肝炎IFN治療効果

国立長崎中央病院臨床研究部 矢野 右人  
共同研究者：八橋 弘、藤野達也

## 目 的

I型IFNレセプターは、少なくともIFN $\alpha$  8にのみ結合するIFNAR1とIFN $\alpha$  2、IFN $\beta$ が結合するIFNAR2の2つのサブユニットから構成され、さらに後者は soluble form (IFNAR-2a)、short form (IFNAR-2b)、long form (IFNAR-2c)の亜種が存在することが確認されている。IFN $\alpha$  2に対するIFNレセプターの結合親和性は、IFNAR1とIFNAR2亜種とに組み合わせにより大きく異なることが報告されている。従来、我々は、肝細胞におけるIFNAR2のmRNA及び蛋白発現レベルがC型慢性肝炎に対するIFN治療効果と密接に関連することを報告してきた。今回新たにIFNAR1に対するモノクローナル抗体を作成し、各種肝疾患におけるIFNAR1発現レベル、IFNAR1とIFNAR2発現の相互関係及びC型慢性肝炎IFN治療効果との関連を検討した。

## 方 法

ホルマリン固定肝生検標本を用いた。IFNAR1及びIFNAR2に対するモノクローナル抗体を用いてSAB法にて免疫組織染色をおこない、画像処理にて、その発現量を定量化 (正常肝1.0 Density Unit:DU)とした。

## 結 果

IFNAR1の発現は、IFNAR2蛋白発現と同様に、肝細胞の細胞膜及び肝細胞質に認められた。各種肝疾患におけるIFNAR1発現量は、正常肝(Control:n=9)1.2 $\pm$ 0.8DU、A型急性肝炎(AHA:n=9)3.9 $\pm$ 1.2DU、C型慢性肝炎(CHC:n=53)2.2 $\pm$ 1.1DU、原発性胆汁性肝硬変 (PBC:n=6)1.5 $\pm$ 1.1DU、自己免疫性肝炎(AIH:n=8)1.0 $\pm$ 0.6DUで、AHA、CHCでは、Control、AIHに比較して有意にIFNAR1発現量は高値であった(p<0.01)。IFNAR1とIFNAR2の発現レベルの間には有意な相関関係が認められた(R=0.486,P<0.0001,n=84、図1)。IFNAR1発現レベルとIFN治療効果との関係では、著効例(n=15)2.7 $\pm$ 1.1DU、無効例(n=38)2.0 $\pm$ 1.0DUで有意な差が認められた(p<0.05)。著効例15例中14例(93%)は、IFNAR1とIFNAR2ともに発現レベルが高値であった (図2)。

## 考 察

IFNAR1の発現動態がIFNAR2と近似していることから、両レセプターがサブユニットとして構成され、その発現制御には共通部分が存在することが示唆された。また、IFNレセプター発現レベルが高い者においてIFN治療効果が良好であることが改めて確認された。IFN $\alpha$  2を用いた治療によりVirological Responseを得る為には、IFNAR1とIFNAR2ともに高発現であることが必要であり、IFNAR1は、IFN $\alpha$  2とIFNAR2との結合親和性を修飾するアクセサリー因子として作用している可能性が考えられた。

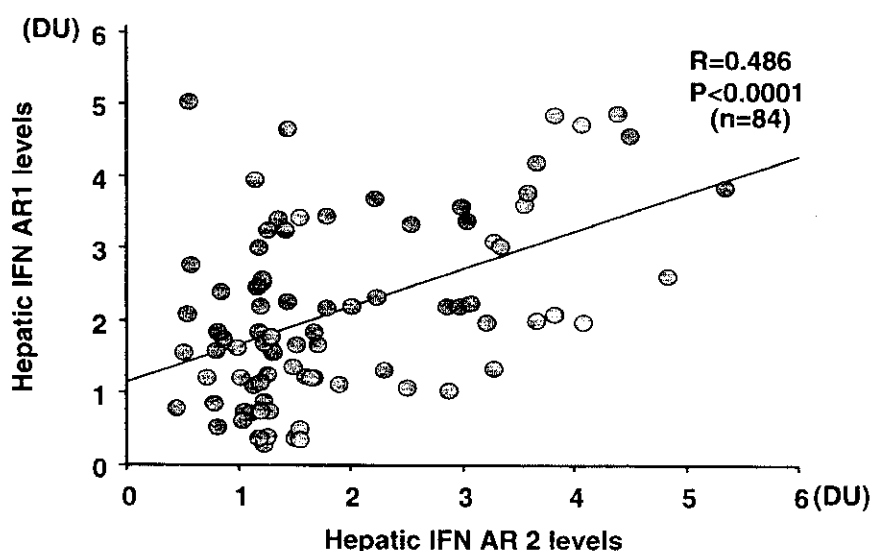


図1. 各種肝疾患患者における肝細胞IFNAR1とIFNAR2発現量との関係 (n=84)

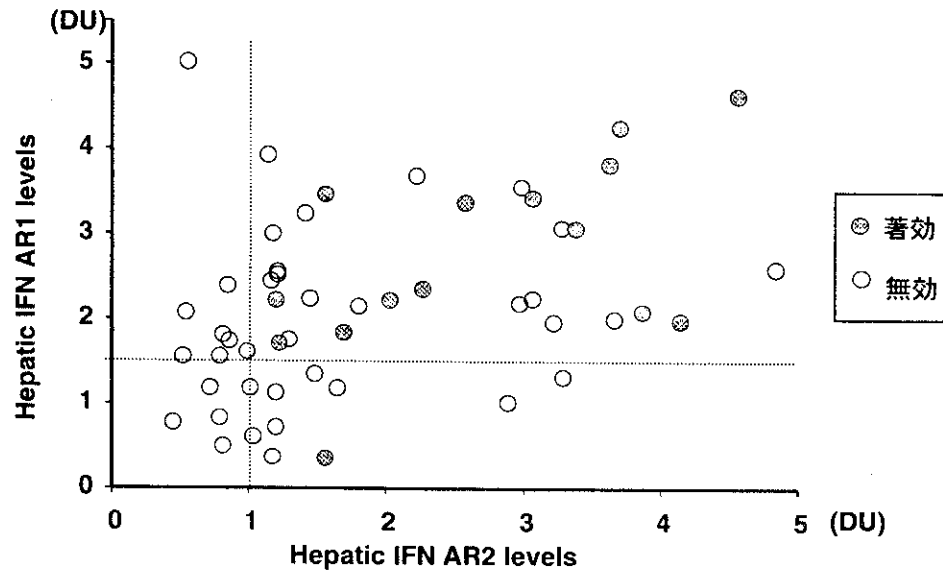


図2. C型慢性肝炎 IFN治療効果と肝細胞 IFNAR1, AR2発現量 (n=53)

文 献

1. Uze G, Lutfalla G, Gresser I: Genetic transfer of a functional human interferon into mouse cell: Cloning and expression of its cDNA. Cell 60:225-234, 1990
2. Novick D, Cohen B, Rubinstein M: The human interferon  $\alpha / \beta$  receptor. Characterization and molecular cloning. Cell 77:391-400, 1994
3. H.Yatsuhashi, K Yamasaki, T Aritomi, MC Parquet, O Inoue, M Koga, M Yano. Quantitative analysis of interferon  $\alpha / \beta$  receptor mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: Correlation with serum hepatitis C virus-RNA levels and response to treatment with interferon. J Gastroenterol Hepatol 12:460-467, 1997
4. H.Yatsuhashi, T.Fujino, T.Matsumoto, O.Inoue, M.Koga and M.Yano. Immunohistochemical analysis of hepatic interferonalpha-beta receptor level: relationship between receptorexpression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 30:995-1003, 1999

# C型慢性肝炎における肝組織および末梢血単核球内のIFNレセプターの検討

山口大学第一内科 沖田 極

協同研究者：日野啓輔、山口裕樹、藤原大輔

## 目 的

C型慢性肝炎に対するIFN治療効果規定因子の一つとして近年IFN $\alpha/\beta$ レセプターの関与が報告されている。我々はこれまで、肝組織及び末梢血単核球内(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)のIFN $\alpha/\beta$ レセプターのmRNA量を測定してきたが、今回、両組織での発現量の比較に加え、肝組織での発現量とIFN治療効果について比較検討した。

## 対象及び方法

対象は肝生検を施行したC型慢性肝炎49例で、うち33例はその後IFN治療を行った。また13例は肝生検日に採取したヘパリン加血液10ccより分離したPBMCについてもIFN $\alpha/\beta$ レセプターのmRNA量を測定した。IFN $\alpha/\beta$ レセプターのサブユニットであるIFNAR1、IFNAR2のmRNAをcompetitive PCR法を用いて定量した。AGPC法でRNAを抽出した後、random primerでcDNAを合成した。同一のcDNAより、IFNAR1、IFNAR2のmRNA、及びinner controlとして $\beta$ -actineのmRNAについて、それぞれcompetitive PCRを行った。IFNAR1、IFNAR2のmRNAは細胞外から細胞内に及ぶ914bp、759bpを増幅した。competitorはPCR産物から約140bpのdeletionを有するように作成

した。測定したIFNAR1、IFNAR2のmRNA量は $\beta$ -actineのmRNA10ngあたりに補正した。

## 成 績

肝臓とPBMCの発現量は、IFNAR1では明らかな相関を認めなかったが、IFNAR2では有意な相関を認めた( $r=0.695$ ,  $p=0.0066$ )。一方IFNAR1とIFNAR2の発現量は、肝臓で明らかな相関を認めなかったが、PBMCでは有意な相関を認めた( $r=0.663$ ,  $p=0.012$ )。肝臓、PBMCにおけるIFNAR1、IFNAR2の発現量はHCVRNA量、HCVセロタイプによる差は認めなかった。IFN治療効果との関係では、著効群(10例)の肝内IFNAR2発現量は非著効群(23例)に比べ有意に高かったが( $p=0.022$ ) (図1)、IFNAR1では差を認めなかった。両群の背景因子は、著効群でHCVRNA量が少ない傾向が認められたが( $p=0.07$ )、HCVセロタイプ、年齢、性別、肝線維化の進展度、IFNの種類、IFN総投与量に差を認めなかった。

## 考 案

肝組織はPBMCと異なり、IFNAR1とIFNAR2の発現量には明らかな相関を認めず、かつIFNAR2と異なりIFNAR1は両組織で相関を認めないことより、肝組織でのIFNAR1の発現様式はIFNAR2と異なる可能性が示唆された。肝内IFN $\alpha/\beta$ レセプター量と治療効果の比較では、IFNAR2のみが著効群で有意に高く、IFN治療効果予測因子となりうることが示唆された。さらに、IFNAR2発現量が肝組織とPBMCで相関したことより、PBMCのIFNAR2発現量がIFN治療効果予測因子として有用である可能性も示唆された。

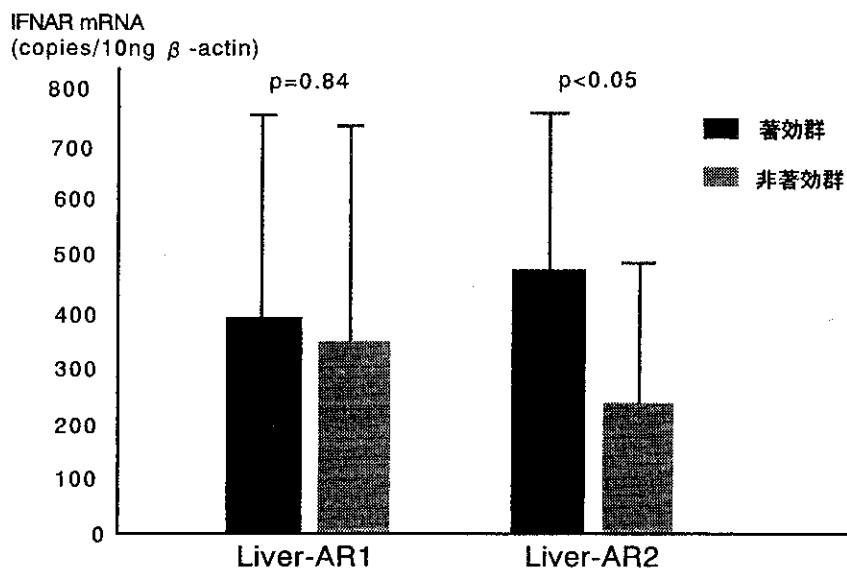


図1

# IFN治療により無症候化したC型慢性肝炎患者における治療前後のHVRの検討

大阪市立大学第三内科 西口 修平  
共同研究者：田中基晴、金城聡司  
武田 正、塩見 進

## はじめに

C型慢性肝炎の多くは、肝硬変・肝細胞癌に進展するため、肝病変の進展阻止は臨床的に重大な問題である。1986年にHoofnagleら<sup>1)</sup>がインターフェロン(IFN)の非A非B型慢性肝炎に対する有効性を報告して以来、C型慢性肝炎に対する治療はIFNを中心に行われてきた。この間、我が国ではIFNの治療法の検討が精力的に行われたが、治療法を工夫してもC型肝炎ウイルス(HCV)を完全排除できるのは、約30%にすぎないことも明らかになった。このため、IFN抵抗性肝炎への治療法の確立は今後の重要な課題である。一方、IFN投与例での肝癌の発生率について多くの施設で検討され<sup>2)</sup>、IFNの肝癌抑制効果が報告されている。さらに、IFN治療後のHCV RNAが陽性にもかかわらず肝機能(ALT)が正常化したbiochemical responder(BR)では、HCVが消失したcomplete responder(CR)とほぼ同等の肝癌抑制効果を示すことが明らかにされた<sup>3)</sup>。すなわち、IFN治療によりHCVが完全に排除できなくとも、ALTを正常化できれば肝病変の進展を防ぐことが可能で、さらには肝細胞癌の発生を抑制する効果が期待できる。

現在、C型慢性肝炎に対するIFNの治療効果を決定する因子として、宿主(免疫側)の反応とウイルス側の反応とが関与すると考えられ、既にCRの予測因子としてHCVのgenotype、血中HCV RNA量、HCVの特定の領域(hyper-variable region(HVR)、NS5Aなど)の変異の有無<sup>4)</sup>などが明らかにされている。しかし、このような予測因子からIFN抵抗性肝炎と推定された症例でも、その約20%にBRが生じ、現時点では治療前にBRを予測することは困難である。また、BR例においてHCVが残存するのにALT値が正常化する機序についても明らかにされていない。今回我々は、BRの予測因子とその病態を解明するために、BR例と無効(NR)例の患者背景を比較するとともに、HVRにおけるquasispeciesの変化をIFN治療直前と治療終了後6ヶ月の2ポイントで比較し、検討を行った。

## 対象と方法

大阪市立大学附属病院においてIFN治療を施行した慢性C型肝炎患者261症例より、HCV genotype 1b型で、治療後

もHCV RNAが陰性化せず、肝機能(ALT)が1年以上持続正常化したBR例と正常化しなかったNR例を対象としてそれぞれ20例抽出し、以下の検討を行った。まず、両グループ間でIFN治療直前の性別や年齢・種々の生化学・ウイルス学検査について比較した。さらに、IFN治療直前と治療終了後6ヶ月の時点での保存血清を用いて蛍光色素でラベルした primer を使って RT-PCR を行い、その PCR product を精製後、シーケンサー (Pharmacima ALF express) と変異解析ソフト (AlleleLinks ver. 1.00) を用いて HVR の quasispecies を SSCP (single strand conformation polymorphism) にて解析した。BR の 1 例については IFN 治療 9 ヶ月前と治療直前、及び治療終了後 6 ヶ月後・5 年後・その後肝機能が上昇した直後の血清を用いて時間経過とともに HVR の変化を SSCP にて比較した。さらに、BR と NR のそれぞれ 3 例については、IFN の投与前後で 40 clone ずつサブクローニングして塩基配列を同定し、SSCP パターンとの比較を行った。

## 成績

我々の施設で IFN 治療を行った 261 症例の治療効果は、genotype 1b 型の 158 症例では、CR が 24 例 (15%)、BR が 20 例 (13%)、NR が 114 例 (72%) であり、genotype 1b 以外の遺伝子型を有する 103 例では、CR が 38 例 (37%)、BR が 15 例 (15%)、NR が 50 例 (48%) であった (Fig. 1)。genotype 1b 型とそれ以外の遺伝子型で CR 率と NR 率には有意差が見られたが、BR 率については差を認めなかった。

今回、HVR を検討した BR 群 20 例と NR 群 20 例について背景因子を比較した。年齢、性別、HCV 量、ウイルスの一過性消失の有無、肝組織の Grade には差を認めなかったが、IFN 治療直前の AST・ALT 値と肝組織の stage は BR 群で有意に低かった (Table 1)。IFN 治療直前の保存血清を用いて HVR のバンド数を比較したところ、BR 群で 5 ± 2 本、NR 群で 6 ± 3 本と両群間で差を認めなかった。また、NS5A 領域は両群とも大部分の症例で wild type を認めた。

IFN 治療前後において、HVR の SSCP パターンの変化を比較したところ、SSCP の波形が治療前後であまり変化のない症例と main peak が消失するなど劇的に変化している症例が存在した。Fig. 2 は BR 例の SSCP パターンを示している。IFN 治療前で認められた複数のピークは消失し、他の部分に新しいピークが生じている。これに対し、NR 例の SSCP パターンでは、ピークの高さは多少異なるものの、IFN 治療前後でパターンはほぼ同一であった (Fig. 3)。このように、IFN 治療直前の main peak が消失もしくは 1/2 以下に減少した症例は、BR 例では消失が 8 例 (40%)、減少が 5 例 (25%) であったが (Fig. 4)、NR 症例では消失例は無く、減少が 4 例 (20%) に認められた (p=

0.0033)。6例でサブクローニングを行い塩基配列を解析した。SSCPのパターンでの main peak の消失は、HCV の major clone の消失を意味しており、サブクローニングを行わなくても、SSCPパターンを比較することで、HVR の quasispecies の検討が可能であることがわかった。

BRの1症例において、IFN 治療をはさむ約6年間のHVRの変化を詳細に解析した。(Data not shown) IFN治

療前の2ポイントでは、SSCPパターンは類似しており、main peakは同一であった。IFN治療によって、main peakは消失し、その後の約5年間の肝機能正常期に変化は見られなかった。しかし、ALTの再上昇後では、新たなmain peak が出現した。この結果より肝機能の推移と HVR の main peak の変化が関連している可能性が示唆された。

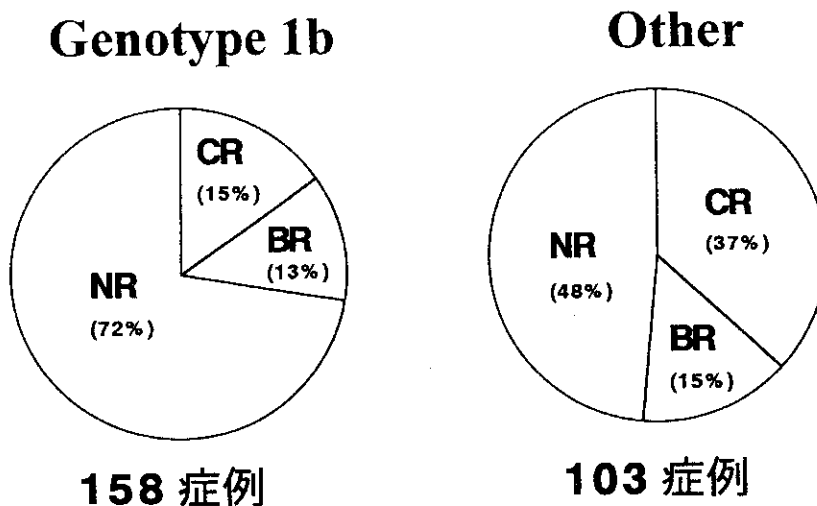


Fig. 1 IFN治療効果

Table 各群の背景因子の比較

	BR	NR	p value
年齢	47.5±10.2	51.8±9.4	0.164
性別(♂/♀)	8/12	10/10	N.S.
ウイルス一過性消失	有 8 無 12	有 4 無 16	0.110
Grade	2.1±0.6	2.5±1.0	0.074
Stage	1.9±0.6	2.5±1.0	0.034
HCV (b DNA)	9.5±5.2	8.4±5.8	0.441
AST	51.9±34.2	87.8±42.3	0.0002
ALT	86.0±73.3	127.5±52.7	0.0007
ALT≥80	5	17	
ALT<80	15	3	0.001
NS5A(wild type)	19	15	N.S.
SSCP band数	5±2	6±3	N.S.

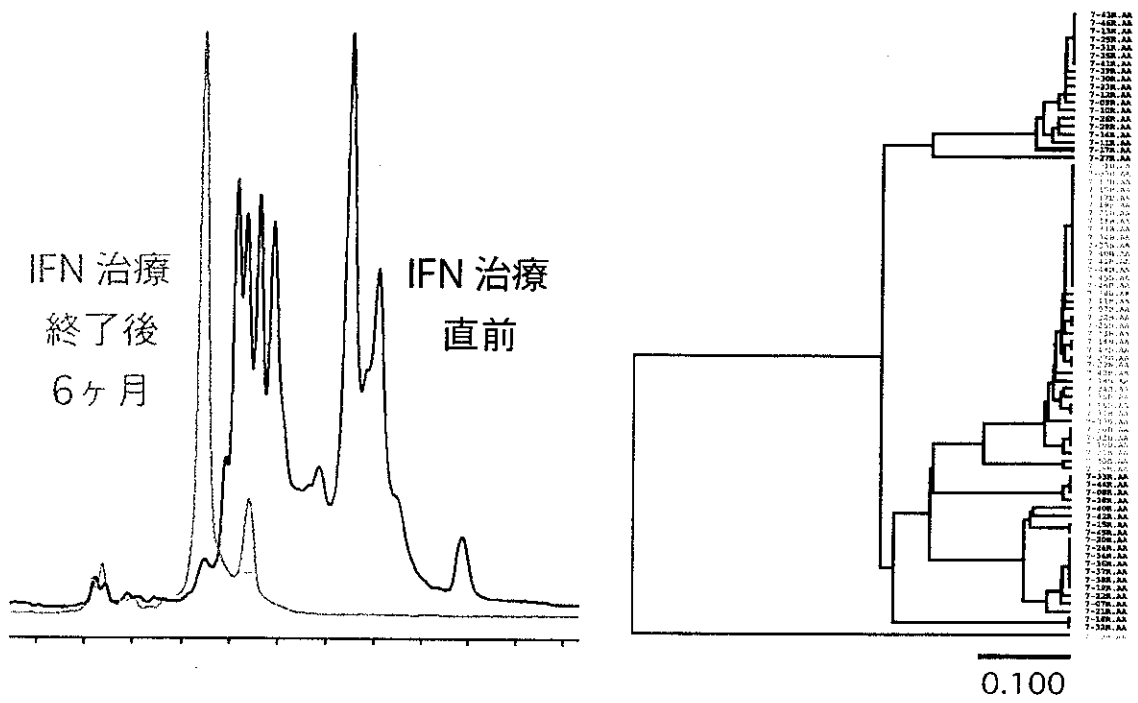


Fig. 2 BR症例のSSCPパターン

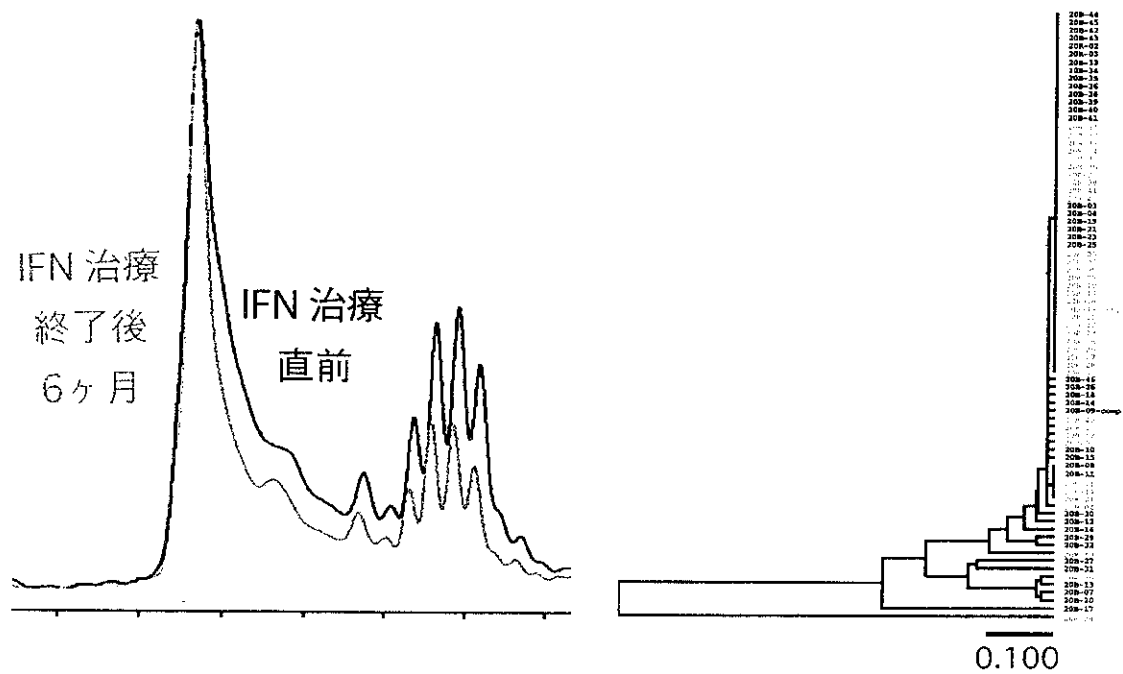


Fig. 3 NR症例のSSCPパターン



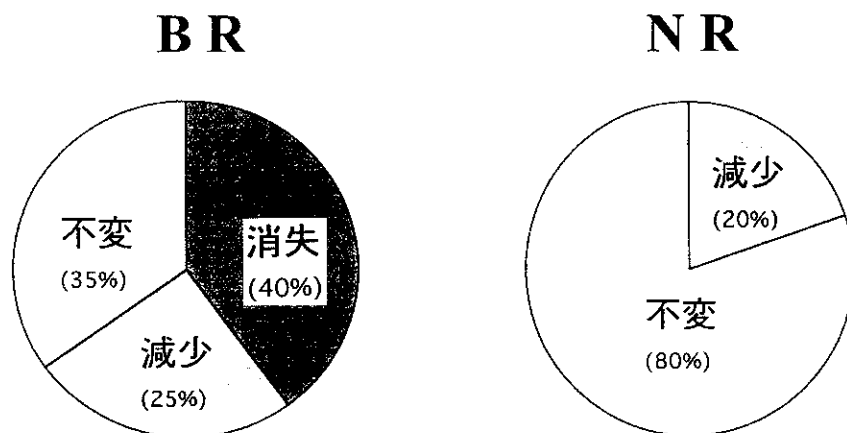


Fig. 4 Hypervariable領域のMain peakの変化

#### 考 察

今回の検討では、BRは直前のALT値が低値で、stageの軽い症例に多いことが明らかにされたが、CRの予測因子ほど明快ではなく、今後生体側の因子解析が必要である。次に、BR化の機序を解析する手がかりとして、我々はBR症例の一部に認められた、HVRのmain peakの消失に注目している。NR群では、このような変化は生じず、HVRのmain peakの消失は肝機能正常化に關与している可能性が推測された。サブクローニング後塩基配列を解析した結果、SSCPでのmain peakの消失は、HCVのHVRにおけるmajor cloneの消失を意味していた。また、1例ではあるが、BR症例でIFN治療前後のHVRの変化を詳細に追跡することにより、肝機能異常にHVRのmain peakの変化が連動していることが示唆された。

HVRはHCVの持続感染に密接に關連する領域である。生体の免疫学的攻撃から逃れるため、この領域がquasi-speciesに到ると考えられている。もともと、HCVの中では最も塩基変異の多い領域であるが、今回の検討した症例ではIFNによって変異が生じたと考えるよりは、特定のcloneが免疫学的なプレッシャーにより消失し、quasispeciesのパターンに影響を与えたと考えられる。肝機能が正常化した症例でより顕著な変化が認められたことから、肝機能異常とHVRの何らかの關連性が示唆された。その機序としては、HVR領域に肝障害をもたらしているCTLのエピトープが存在するとすれば、IFNによるSSCPの変化は肝障害の原因クローンの消失を意味している。しかし、一般的にはHCVのCTLエピトープはHVR以外の領域と考えられている。この場合は、他領域における原因クローンの消失を、HVR領域の大幅なクローンの変化として捉えた可能性も考えられる。今後、IFNによってBRが

生じる免疫学的機序について、より詳細な解析が必要である。

#### 参考文献

1. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminar report. *N Engl J Med* 315: 1501-1506, 1989
2. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, et al. Randomised trial of effects of interferon- $\alpha$  on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 346: 1051-1055, 1995
3. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 131: 174-181, 1999
4. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A Gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81, 1996

# インターフェロン不完全著効例に C型肝炎ウイルスNS5Aの変異動態

金沢大学第一内科 小林 健一

## はじめに

C型慢性肝炎に対するインターフェロン（以下IFN）療法により30~40%の症例において持続性にC型肝炎ウイルス（以下HCV）が排除されトランスアミナーゼの正常化を得られるが、IFN治療施行例の半数以上でIFN治療後もウイルス血症が持続して認められる。一方でIFN治療後もウイルス血症が持続しているにも関わらずトランスアミナーゼの正常化を認める不完全著効例が存在する。この不完全著効例の病態はHCVキャリアー状態と類似し肝癌の発症率が低下することや肝病変の進展が緩徐になるといった報告もなされており、その病態を明かにすることはIFN療法を含めたC型肝炎の治療法の確立に極めて重要と考えられる。しかし、不完全著効例の成立の背景については不明な点が多く、そのウイルス学的動態についても明かにされていない。

HCVのNS5AはRNA依存性RNAポリメラーゼ（以下RdRp）活性を有するNS5Bと結合し、このRdRp活性を増強することを我々は報告した。さらにその結合部位を同定しNS5AはHCVの複製に重要な役割をはたすことも示している。

今回我々は不完全著効例のNS5AのNS5B結合に必順部位の配列変化をIFN前後において検討した。

## 対象と方法

当科で1992年から1996年までにIFN治療を行ったC型肝炎肝炎症例で年齢、性、輸血歴、ALT値、肝組織のstaging

及びgrading、HCV RNA量及びRNAのserotype、IFNの種類に有意差のない完全著効5例、不完全著効5例、不変4例を選択し対象とした(Table 1)。

採血ポイントはIFN治療前およびIFN治療終了後1年と3年後とした。不完全著効例の再発例はIFN治療前およびIFN治療終了後1年に加え再発直前と再発直後を採血ポイントとした。

それぞれの血清よりHCV RNAを分離しNS5AのISDR上流に位置するNS5B binding region を含む領域をnested RT-PCRにて増幅、subcloningを行い、さらに各ポイントより10クローンずつ取りsequenceを行った。

## 結 果

Aポイント：IFN治療前、Bポイント：IFN治療1年後、Cポイント：IFN治療3年後及び再燃直前、Dポイント：再燃直後の4ポイントにおいて同一症例内のHCV RNA NS5A 領域の多様性を示した (FIG.1)。IFN治療前(Aポイント)の同一症例内のNS5A領域の多様性は、不完全著効例群で平均値1.52±0.09%、完全著効例群で平均値2.53±0.13%、不変例群で平均値2.75±0.16%であり不完全著効群は他群と比較し有意に小さかった。

IFN 治療前後において NS5A 領域の多様性を検討すると(FIG.1 A,B)、ウイルスの多様性は増加する傾向にあり、特に不完全著効例においてウイルスの多様性の増加を認めた。また、不完全著効例の再燃を認めた2例(症例No. 1,2)においては再燃直後にさらに多様性の増加が認められた(FIG.1,D)。

HCVのウイルス量の検討では不完全著効例、不変例ともIFN治療前に比較しIFN治療後にウイルス量が増加が認められ、特に不完全著効例ではIFN治療後に、よりウイルス量の増加が認められた (FIG.2)。

Table 1 IFN治療効果別の背景因子の比較

	完全著効(n=5)	不完全著効(n=5)	不変(n=4)	p値
年齢	51.0±2.5	44.2±5.2	51.0±2.9	NS
性(男:女)	3:2	4:1	3:1	NS
輸血歴(有:無)	2:3	2:3	2:2	NS
ALT (IU/l)	82.8±24.1	79.2±22.7	124.5±10.2	NS
Stage (1/2/3/4)	2/3/0/0	3/2/0/0	2/0/2/0	NS
Grade (1/2/3)	2/1/2	4/1/0	2/0/2	NS
HCV RNA量(Kcopy/ml)	38.3±18.0	562.0±314.0	131.5±50.4	NS
Serotype (1:2)	1:4	3:2	6:0	NS
IFN (α:β)	3:2	2:3	3:1	NS

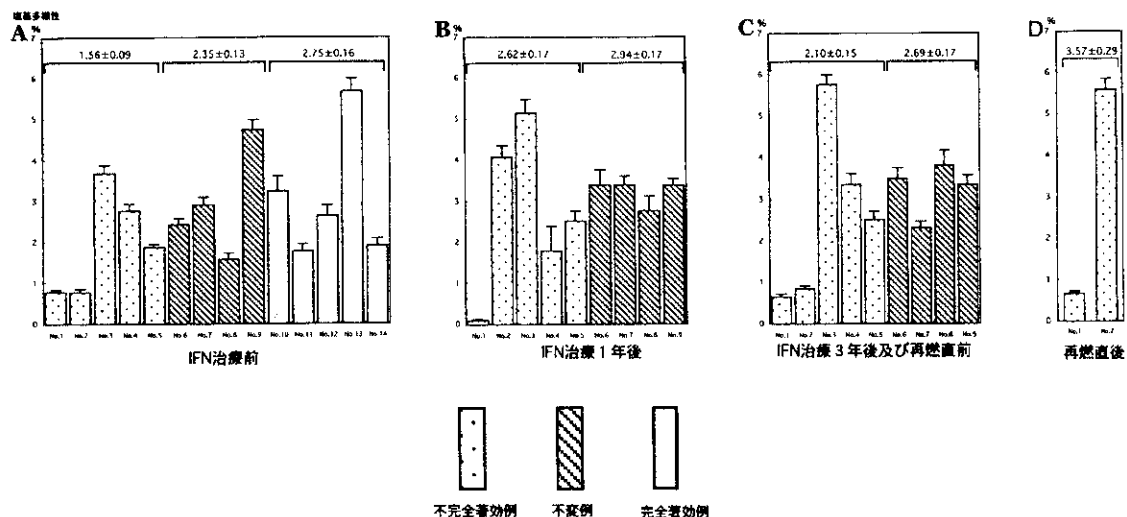


FIG. 1 同一症例におけるNS5A領域の多様性

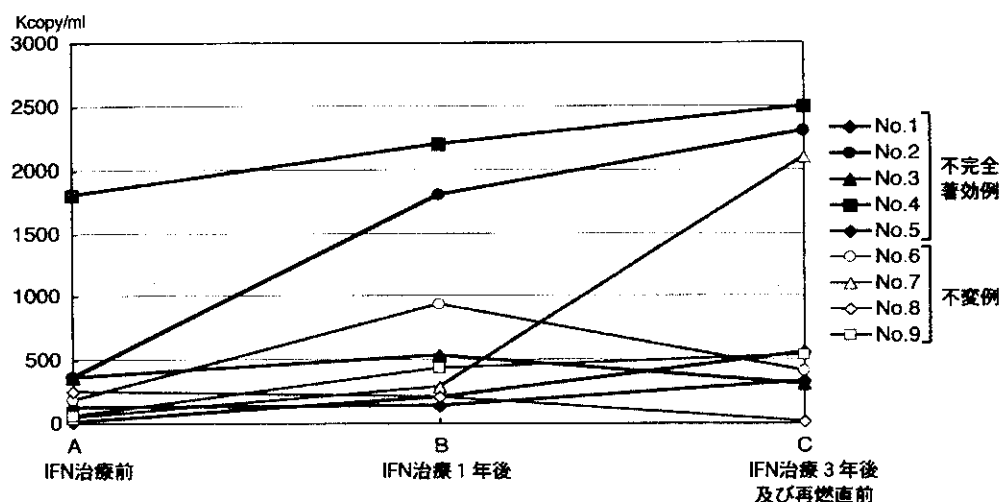


FIG. 2 HCV RNA量の変化

次にNS5A領域の塩基配列の経時的変化をphylogenetic treeを用いて解析した。IFN治療前(Aポイント):赤、IFN治療1年後(Bポイント):青、IFN治療3年後及び再燃直前(Cポイント):黄、再燃直後(Dポイント):緑で表記した(FIG.3)。

不完全著効例(No.1-5)、不変例(No.6-9)とも経時的にウイルスの多様性は増加していく傾向にあった。不完全著効例の再燃例で再燃直後に多様性の大きいウイルス集合体が形成されていた(No.2)。

### 考 察

不完全著効例はIFN治療後のトランスアミナーゼが正常化した後もウイルス血症が持続するが、IFN治療後は治療前に比較し低ウイルス量を示すとの報告と治療前より高ウイルス量を示すとの報告がなされており、不完全著効例におけるIFN治療後のウイルス血症の推移について統一した見解は得られていない。当検討では、IFN治療後に不

完全著効例の全例で血中ウイルス量の増加が認められた。不変例でもIFN治療後はウイルス量は増加していたが不完全著効例でより経時的にウイルス量が増えていた。このことよりトランスアミナーゼの正常化した後もウイルスは複製されており、そのためウイルス量が増加していることが考えられた。さらにHCV RNAのNS5A領域の多様性はIFN治療後の肝炎の鎮静化した状態でも増加し、IFN治療後のウイルス量の増加と一致していた。すなわち不完全著効例においてはトランスアミナーゼの正常化後もHCVの盛んな増殖が行われていることから、不完全著効例においてトランスアミナーゼを正常に維持させる機序としてウイルス側因子以外の免疫応答の変化といった宿主側の因子の関与が推察される。

また一方では不完全著効例の再燃例において再燃前後にウイルスの多様性の増大が認められたことからトランスアミナーゼの正常時にウイルス複製によって生じた変異体の一部が肝炎を惹起された可能性も否定できない。

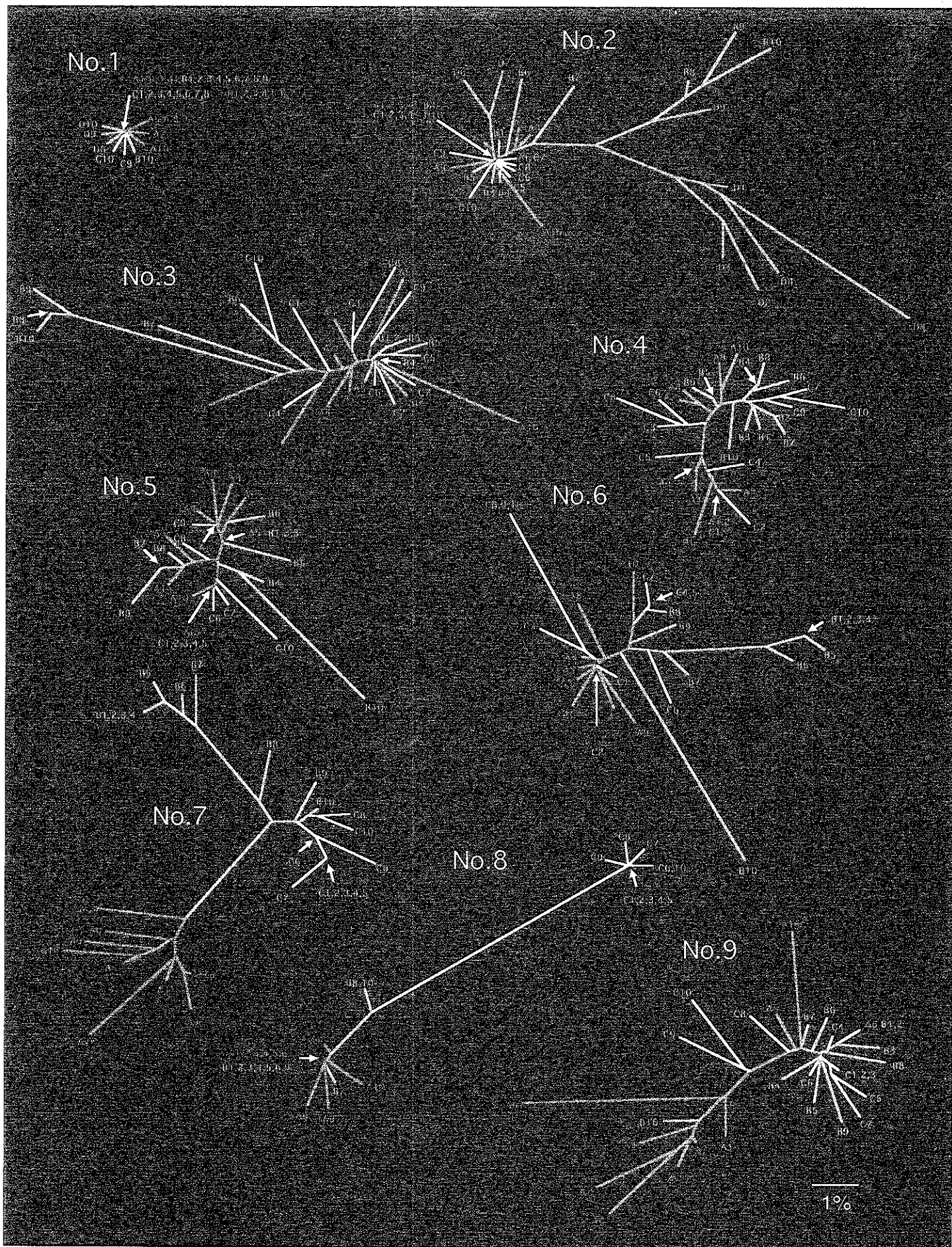


FIG.3 Phylogenetic tree of nucleotide sequences