

図1: CR例と非CRでの HCVコア抗原量の比較 (IFN投与直前)

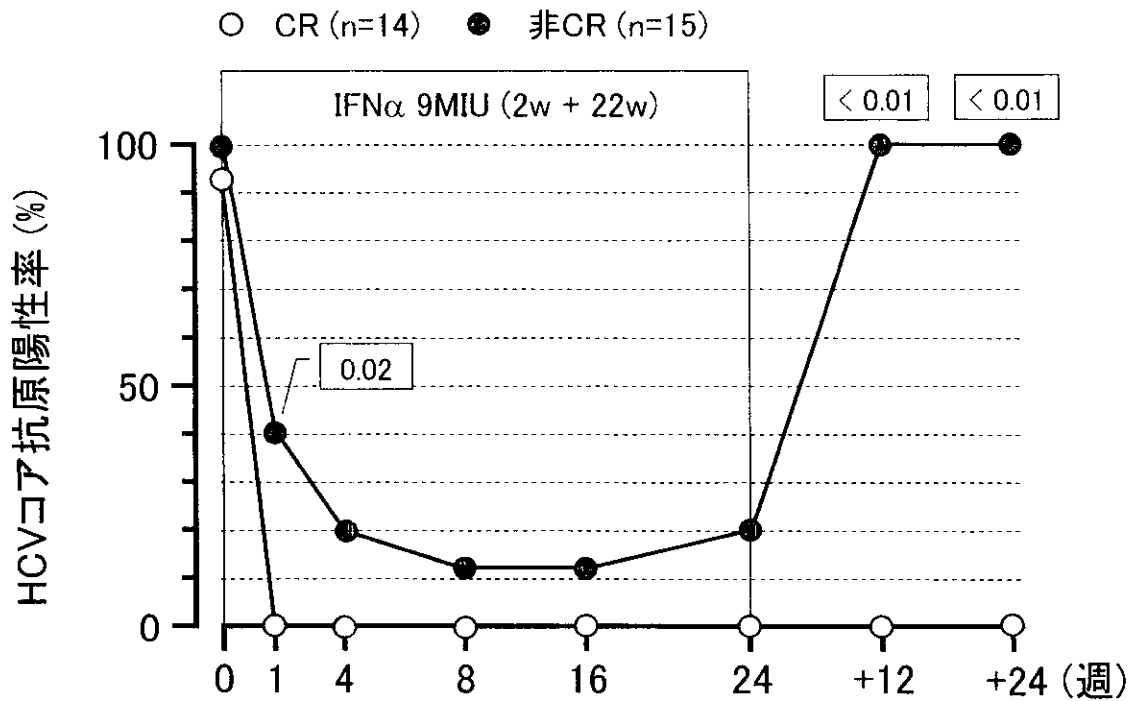


図2: IFN投与直前、投与中、投与終了後のHCVコア抗原陽性率の推移

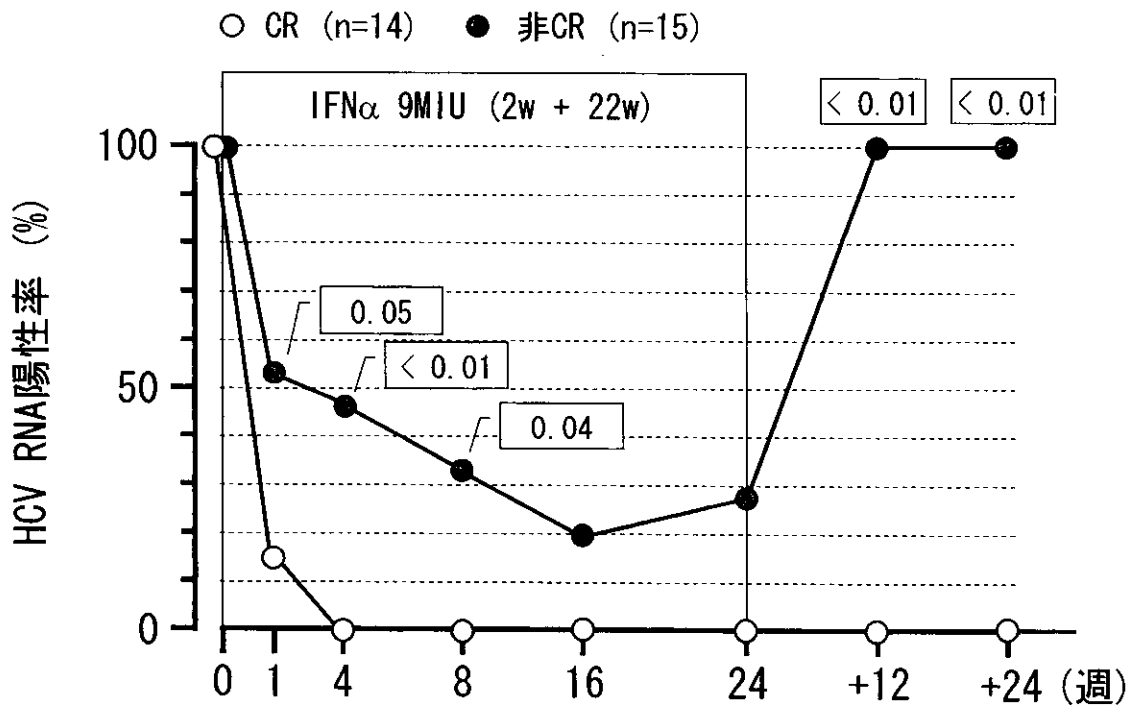


図3: IFN投与直前、投与中、投与終了後のHCV RNA陽性率の推移

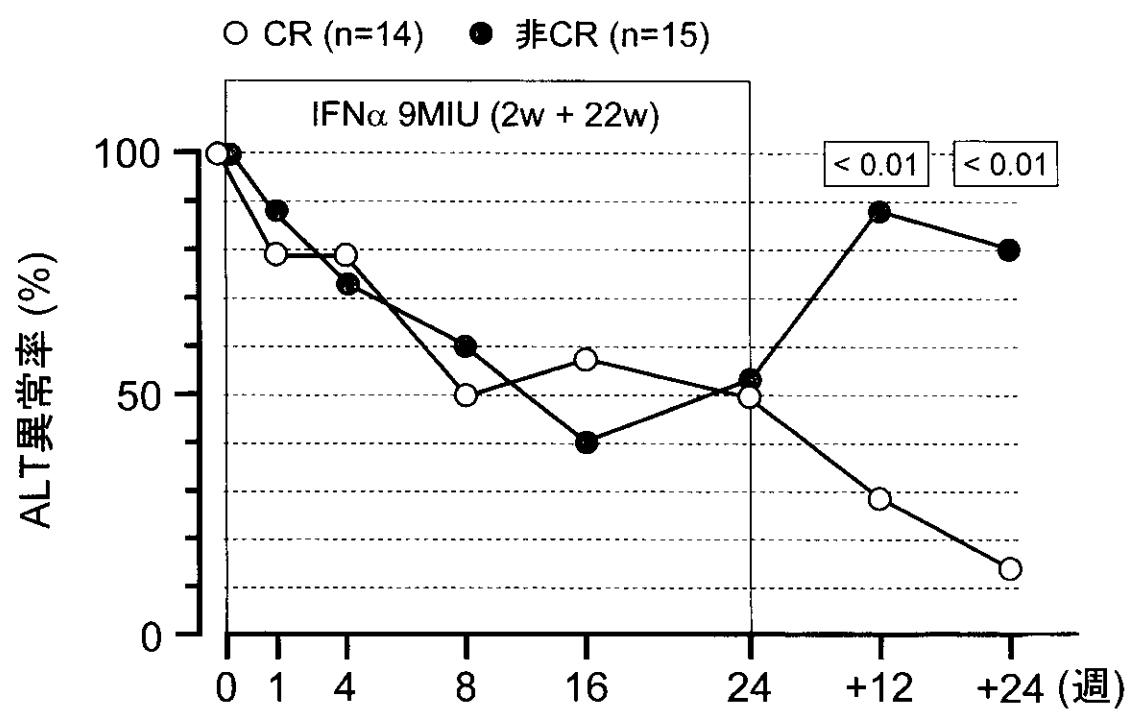


図4: IFN投与直前、投与中、投与終了後のALT異常率の推移

HLA テトラマーを用いた HCV 特異的 CD8⁺T リンパ球に関する研究

分担研究者 小林 健一 金沢大学大学院がん遺伝子治療学教授

研究要旨	HLA-A24 テトラマーを用いて、C型慢性肝炎患者末梢血中にウイルス特異的 HLA-A24 拘束性 CD8 ⁺ T リンパ球を 0.064 - 0.75 % の割合で検出することができた。本法を用いることにより、C 型肝炎の病態に重要な役割を果たしている T リンパ球の詳細な解析が可能であることが明らかになった。
------	---

A. 研究目的

C 型肝炎において、CD8⁺T リンパ球はヒト組織適合抗原（human leucocyte antigen, HLA）により抗原提示されたウイルスのペプチドエピトープを認識することにより活性化し、抗ウイルス免疫によるウイルスの抑制、肝細胞障害による肝炎の増悪という相反する作用を示すことが知られている。しかし、いかなる病態でどのようなバランスでこうした作用が発現しているのか、病態によってこの作用に相違があるのか、などについてはいまだ不明な点が多い。また、欧米では主に HLA-A2 拘束性エピトープが解析されているが、我が国の 70 % に認められる HLA-A24 に関する解析は進んでいないのが現状である。

最近開発された HLA テトラマーは、抗原特異的 T リンパ球の検出感度が良い（1/5,000、CTL アッセイの 10 倍の感度）、*in vitro* の刺激操作なしで解析でき *in vivo* の状態を直接反映する、表面マーカーを用いて抗原特異的 T リンパ球の個々の細胞レベルで免疫学的特徴を解析できる、異なるエピトープに特異的な T リンパ球を同時に解析できる、などの特徴を有している。すでに HIV については、ウイルスの動態とテトラマー陽性細胞数との間に関連性があることが報告されており、各種ウイルス感染症でのリンパ球の解析に有用な方法であると考えられて

いる。そこで今回、HCV に関してウイルス特異的 HLA-A24 拘束性 T リンパ球を検出し、免疫学的特徴や病態との関連を検討した。

B. 研究方法

対象は HCV 抗体陽性かつ HLA-A24 陽性の慢性肝炎 43 例とし、HCV 陽性かつ A24 陰性の 14 例、HCV 陰性かつ A24 陽性の 18 例、計 32 例を対照とした。テトラマーの作成に用いたエピトープペプチドの配列は、HLA-A24 のアンカーとしての position 2, 9 の他に secondary anchor residue への結合係数の高いアミノ酸を含みかつ HCV において高率に保存されている 2 種類と、実際の binding assay で高い結合性が報告されている 3 種類の計 5 種類を使用した。テトラマーによる染色は、40 μ g/ml の濃度で、室温にて 30 分間反応させた。テトラマー陽性細胞の検出、解析は、4 カラーフローサイトメトリーを用い、陽性細胞の割合は 5 回の測定値の平均値とした。テトラマーが、ウイルス特異的 T リンパ球を検出していることを確認し、さらに、陽性細胞の割合と臨床病態との関連性を検討した。またテトラマー陽性細胞のマーカーを検討することにより、細胞の状態を観察した。

C. 研究結果

テトラマー陽性細胞の割合は、対照群にお

ける値の $\text{mean}+2\text{SD}$ をカットオフ値として用いると、C型慢性肝炎症例では0.06-0.75%の割合で認められ (Fig. 1)、テトラマーはウイルス特異的Tリンパ球を検出していることが示された。また、それぞれの症例において、テトラマー陽性細胞がカットオフ値以上の頻度で検出された内訳をみると、5種類のテトラマーのうちすべてが陽性であった症例は1例、4種類は5例、3種類は7例、2種類は7例、1種類のみ検出されたものは13例であった (Table 1)。また、複数検出された症例における陽性反応の組み合わせには多様性が認められた。臨床病態との関連では、テトラマー陽性細胞の割合と肝線維化の程度の間、テトラマー1292において、弱い相関 ($0.01 < P < 0.05$) が認められた (Fig. 2)。また、テトラマー陽性細胞の割合とウイルス量との関連ではテトラマー2841において、弱い相関 ($0.01 < P < 0.05$) が認められた (Fig. 3)。しかしテトラマー陽性細胞の割合とサンプル採取日の血清トランスアミナーゼ値との間に関連性は認められなかった (Fig. 4)。さらに、それぞれのテトラマー陽性細胞に関して、表面マーカー陽性細胞の割合を比較すると、CD27, HLA-DR がテトラマー陽性細胞において増加しており、テトラマー陽性細胞は活性化しているものと考えられた (Fig. 5)。

D. 考察

HCV 陽性かつ A24 陰性例、HCV 陰性かつ A24 陽性例の対照群では、テトラマー陽性細胞の割合が高い症例は存在しなかったことから、テトラマーにより、ウイルス特異的Tリンパ球を検出することが可能であることが示された。ただし、陽性細胞の割合は HIV などと比較して 0.06-0.75%と低率であることが明らかとなり、テトラマーのような感度の高い方法を用いなければ、C型肝炎での T 細胞の検討は難しいものと考えられた。また、テトラマーの種類や症例によりその割合には多様性が認められたが、これは、それぞれのエピトープに対する免

疫反応が独立していることを示していると考えられる。さらに、今回用いたテトラマーでは、全てのテトラマーで陽性細胞の割合が高くない症例も存在したことから、症例毎に違うエピトープが標的となっている可能性があると思われた。

一方、臨床病態との関連では、テトラマー陽性細胞の割合と肝線維化の程度とウイルス量との間に正の相関が認められた。このことから、HLA-A24 拘束性 CD8⁺Tリンパ球は、ウイルスの排除ではなく、肝細胞障害を反映し病態の進展に関与している可能性が考えられたが、一層の検討が必要である。また、表面マーカーの検討によりテトラマー陽性細胞が活性化していることが示された。今後、各種の表面マーカーを追加検討することにより、より詳細に HLA-A24 拘束性 CD8⁺Tリンパ球の解析ができるものと考えられ、テトラマーによるリンパ球の解析は有用であると思われた。

E. 結論

HLA-A24 テトラマーを用いて、C型慢性肝炎患者末梢血中にウイルス特異的 HLA-A24 拘束性CD8⁺Tリンパ球を検出した。5種類のテトラマーを用いて検出されるウイルス特異的 CD8 陽性Tリンパ球の割合は、0.064 - 0.75 % と低値であった。また、テトラマー陽性Tリンパ球数は、5種類のテトラマー間、患者間で多様性を認め、それぞれのエピトープに対する免疫反応が独立していることが示唆された。また、テトラマー陽性Tリンパ球のなかには、ウイルス量または線維化と相関を認めるものがあり、病態の進展に関与している可能性が考えられた。さらに、テトラマーによって検出されるTリンパ球は活性化しており、病態に関連していると考えられた。

今後、テトラマーを用いたHCV特異的Tリンパ球の解析は有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001; 120:955-66.

2. Nakamoto Y, Kaneko S, Kobayashi K. Monocyte-dependent cell death of T lymphocyte subsets in chronic hepatitis C. *Immunol Lett* 2001; 78:169-74.

3. Yamashita T, Kaneko S, Hashimoto S, Sato T, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:647-54.

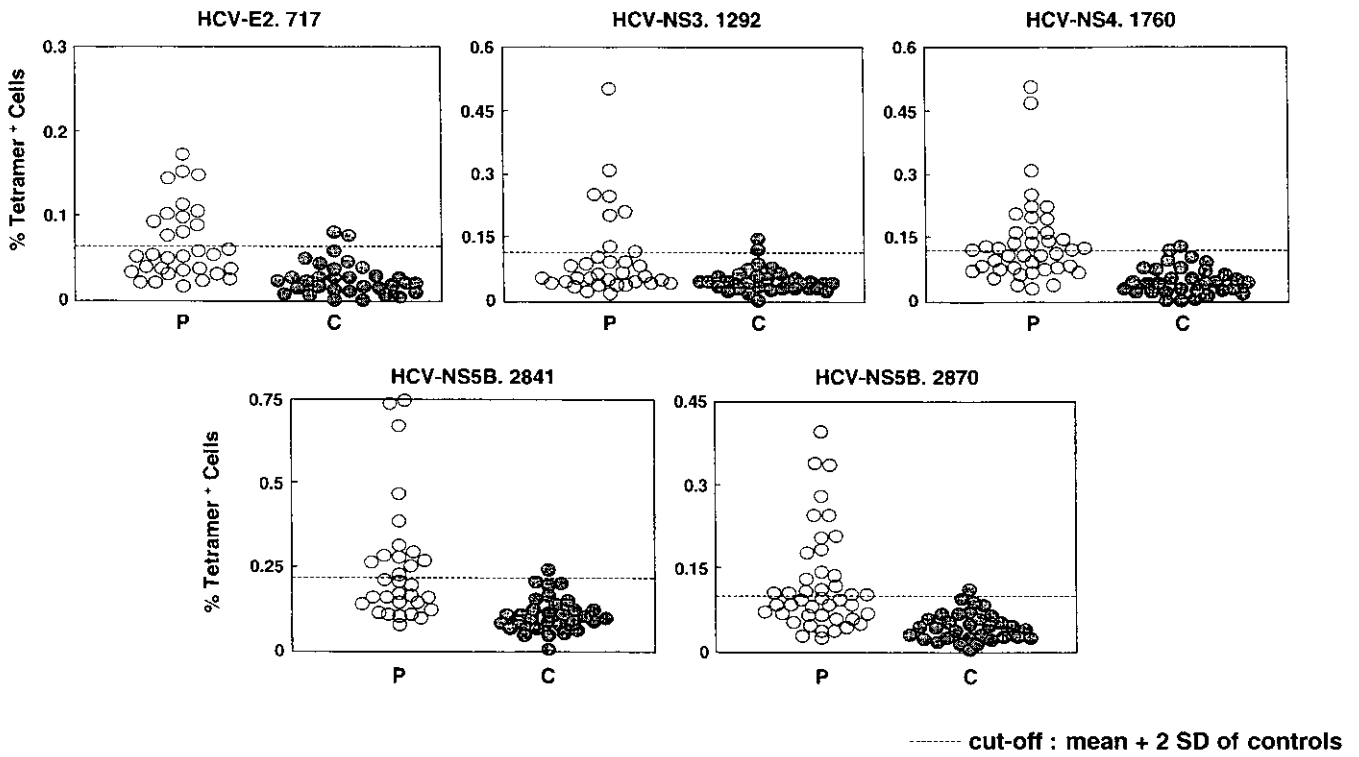
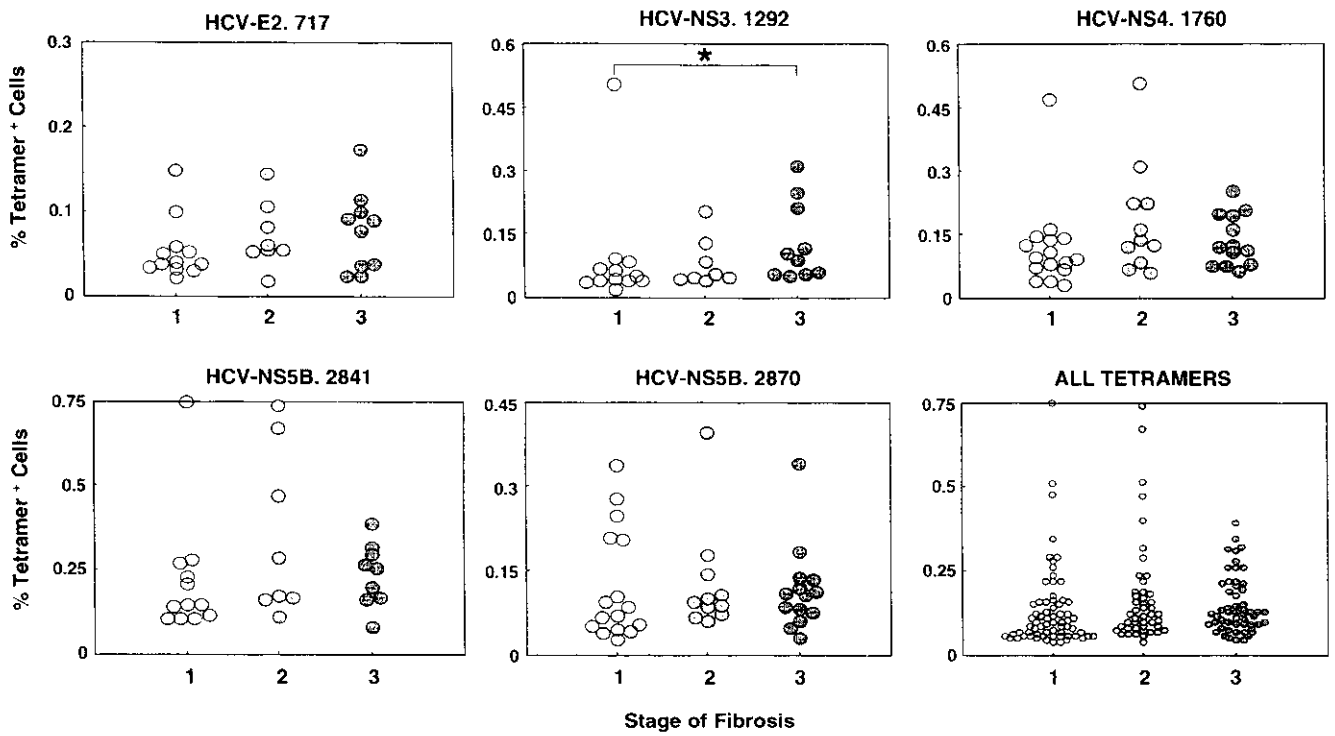


Fig. 1. Frequencies of HLA A*2402-Tetramer⁺ CD8⁺CD4⁻CD14⁻CD19⁻ T Lymphocytes

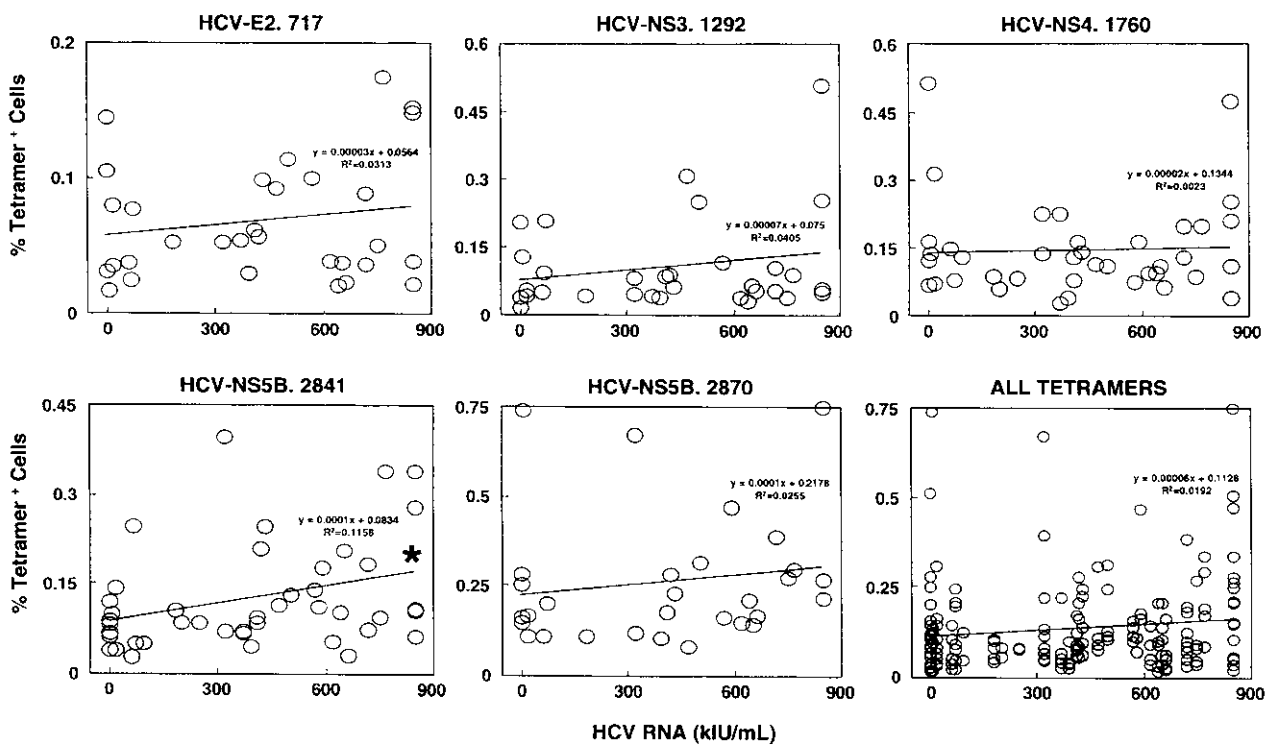
Table 1. Detection of HLA A*2402-Tetramer⁺ T Lymphocytes

Patients	HCV Tetramer ⁺ , CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD14 ⁻ CD19 ⁻ Cell Detection				
	E2, 717	NS3, 1292	NS4, 1760	NS5B, 2841	NS5B, 2870
1	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	-	+	+	+
7	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	-
9	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+
11	-	-	+	+	+
12	-	-	+	+	+
13	-	-	+	+	+
14	+	+	-	-	-
15	+	+	-	-	-
16	+	+	+	-	-
17	+	-	+	-	-
18	-	-	+	-	+
19	-	-	+	-	+
20	-	-	-	+	+
21	-	-	+	-	-
22	-	-	+	-	-
23	-	-	+	-	-
24	-	-	+	-	-
25	-	-	+	-	-
26	-	-	+	-	-
27	-	-	+	-	-
28	-	-	-	+	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	+
32	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-



* $P < 0.05$

Fig. 2. Tetramer+ CD8+ T Lymphocytes Frequencies and Stages of Fibrosis



* $P < 0.05$

Fig. 3. Tetramer+ CD8+ T Lymphocytes Frequencies and Viral Loads

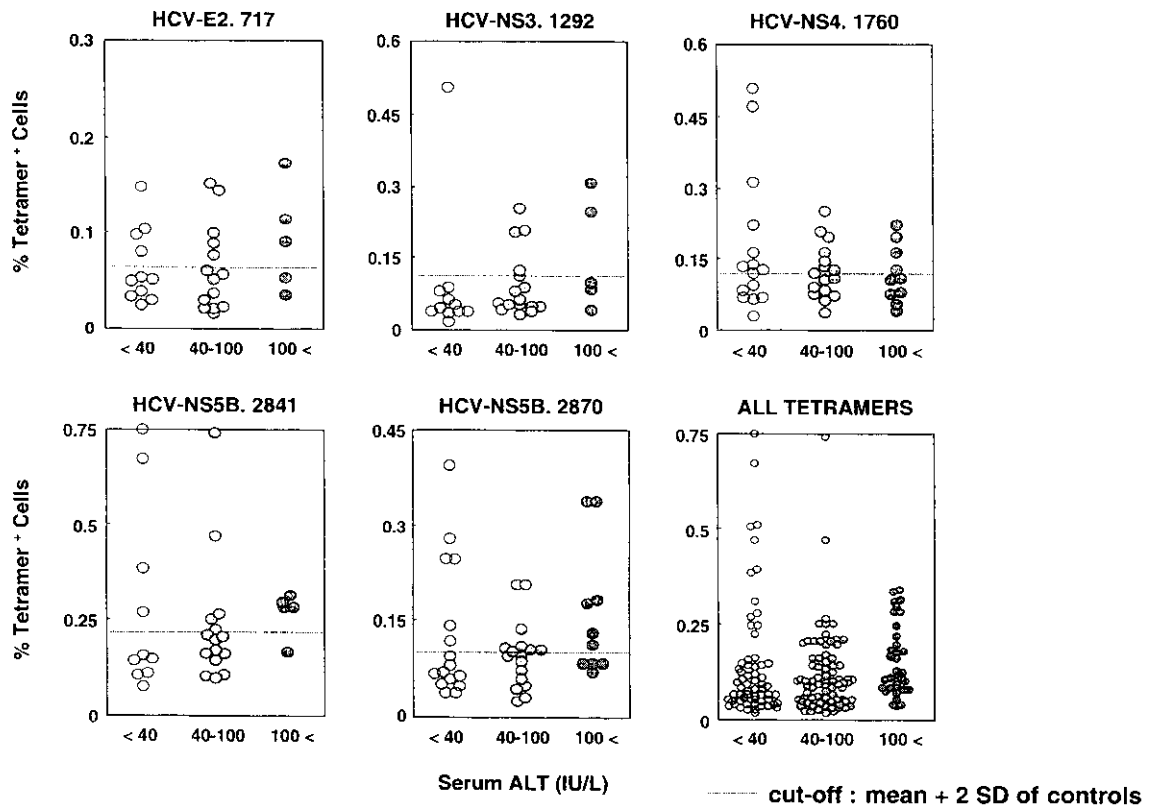


Fig. 4. Tetramer⁺ CD8⁺ T Lymphocytes Frequencies and Disease Activity

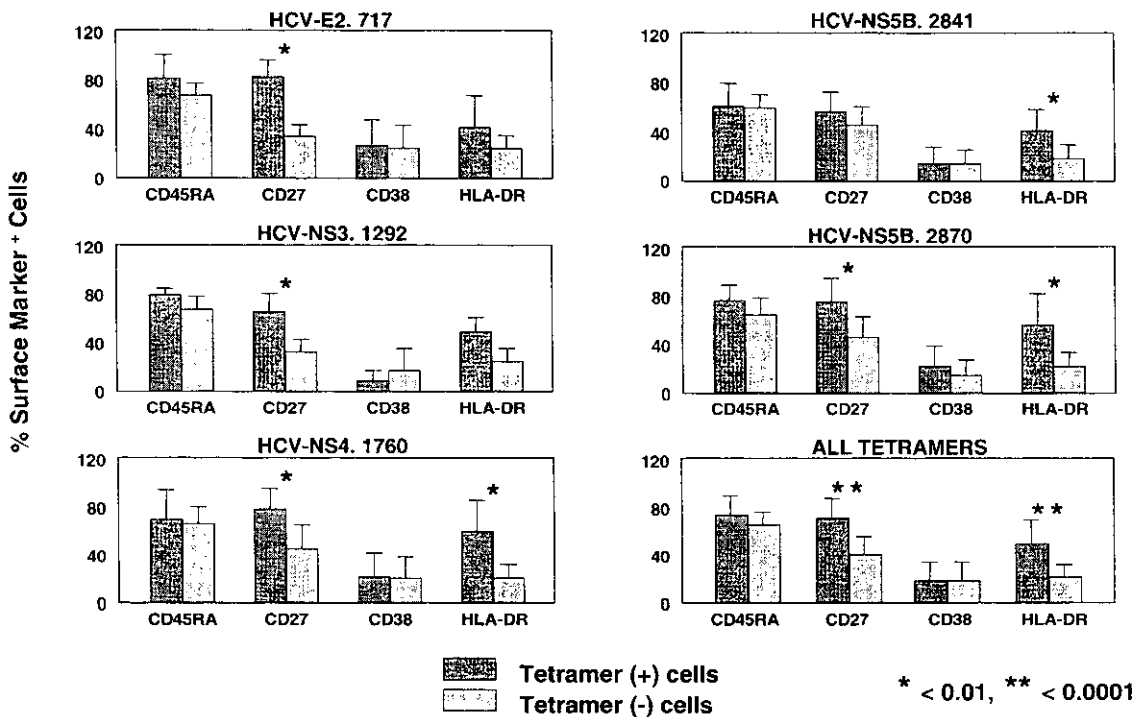


Fig. 5. Surface Expression of CD45RA, CD27, CD38 and HLA-DR on Tetramer⁺ CD8⁺ T Lymphocytes

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書
C型慢性肝炎患者における樹状細胞機能

分担研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨 樹状細胞(DC)は強力な抗原提示細胞である。末梢血より分離した DC の抗原提示能と DC 内のC型肝炎ウイルス (HCV) 性状について検討した。また、DC の内因性 IFN 産生能をみるために IFN 産生細胞 (IPC) を測定した。C型慢性肝炎 (CH-C) 患者および健常者の末梢血より DC を分離し、正常健常人より得られた T細胞と同種混合培養試験(AMLR)を行った。DC 内の HCV-RNA を RT-PCR にて測定し、陽性例に対し定量 (RTD-PCR) 及び E2 領域のシーケンスを行った。DC のうち CD123 強陽性細胞を IPC とし末梢血 $1\mu\text{l}$ あたりの数を測定した。AMLR での stimulation index(SI)は CH-C において有意に低下した($P<0.01$)。DC 内の HCV-RNA は全て陽性であったが、DC 内のウイルス量と SI に関連はみられなかった。DC 内に特定の HCV もなかった。IPC 数は CH-C では健常者に比べ有意に ($P<0.05$) 増加していた。CH-C において DC の抗原提示能は低下し、DC 内への HCV の存在が抗原提示能の低下に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

DC はナイーブ T細胞に抗原を提示する強力な抗原提示細胞であり、B細胞を介した免疫反応や、T細胞の免疫寛容の誘導にも重要な役割を担っている。我々は HCV によってマウス脾臓、骨髄樹状細胞 (DC) の機能が低下すること、さらに CH-C と肝細胞癌 (HCC) でヒト末梢血 DC の機能が低下していることを報告してきた。麻疹ウイルスは DC に存在し、量依存的にその抗原提示機能を低下させている。CH-C において末梢血単核球 (PBMC) への HCV の感染が報告されている。そこで、我々は、末梢血より分離した DC の抗原提示能と DC 内の HCV 感染の関連について検討した。次に、DC の亜群であるインターフェロン産生細胞 (以下 IPC) についての検討をおこなった。CH-C に対するインターフェロン治療は広く普及し、ウイルスの排除および HCC の発生予防に重要である。しかし患者自身が産生す

る内因性インターフェロンに関する研究は少ない。内因性インターフェロンを産生する主要な細胞である IPC を CH-C 患者で検討することは C型肝炎ウイルス排除との関係で重要であると考えられ末梢血における DC と IPC が CH-C の病態に関与しているか否かを検討した。

B. 研究方法

CH-C 患者 10 例 (HCV serotype1 8 例 serotype2 2 例)、健常者群 10 例の末梢血より比重遠心法にて PBMC を分離し Miltenvi Biotec 社の磁気細胞分離システム (MACS) を用いて T細胞、単球及び NK細胞を除去した後に CD4 陽性樹状細胞を分離した。また、正常健常人より PBMC を分離した後に Biotex 社の T cell recovery kit を用いて T細胞を分離した。得られた DC (1.0×10^4 個) に放射線照射を行い T細胞 (2.0×10^5) と AMLR を行い 108 時間培養した後に ^3H -

thymidine を投与し更に12時間培養し、T細胞への³H-thymidineの取り込みを測定した。DC内のHCV感染の有無はHCV-RNAのRT-PCRにて測定した。陽性例に対しRTD-PCRにて定量を行なった。次に分離したPBMCよりDCおよびIPCの割合をフローサイトメトリーで解析した。DCは、白血球マーカー(CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)陰性、CD4陽性細胞群として同定した。DC群のうちCD123強陽性細胞群をIPCとした。白血球数とその分画から単核球細胞の割合を算出し、それにDC、IPCの割合を乗じて、1μlあたりのDC数、IPC数を測定した。

本研究の遂行に当たっては患者さんに研究内容、個人情報保護、研究成果は学術雑誌などで発表されることを説明し同意を得た。

C. 研究成果

AMLRにおけるstimulation index (SI)は健常者 82.8 ± 65.0 、CH-C 8.29 ± 7.58 でありCH-Cにおいて優位に低下していた($P < 0.01$)。また、全例でDC内のHCV-RNAは陽性でありDC内に持続的に存在していることが考えられた。ウイルス量は定量可能(平均 2 ± 2.0 copy/細胞)であった。DC内のウイルス量とSIとに相関はみられなかった。6例でHCVのシーケンシングを行なったが、DC内に感染しているHCVに特徴的な配列は見出せなかった。また、CH-C患者の末梢血単核球数とDC数は健常者と差はなかったが、IPCの割合及び数はCH-C患者で有意に増加していた($p < 0.05$)。

D. 考察

CH-C群においてDCの抗原提示能は低下しておりDC内へHCVが

持続的に存在していることが抗原提示能の低下に関与していることが示唆された。しかし、現在の方法ではHCVがDC内に感染しているのか表面に付着しているのか等、どのような状態で存在しているのかを明らかにすることはできない。DC内のウイルス量とSIとの間に明らかな相関がなく、また、DC内のHCVにも特徴的な配列をみとめず今後、HCVによるDC機能低下機序の解明が必要である。また、末梢血中のIPC数もCH-Cでは増加しており、IPCの増加がCH-Cの病態に関与していることが示唆された。今後IPCの機能面の検討が必要である。

E. 結論

C型慢性肝炎患者の樹状細胞(DC)機能とDC内HCV-RNAを検索し以下の成績を得た。

1. DCのAMLR (stimulation index, SI)は健常者に比べ有意に低下していた($P < 0.01$)。
2. DC内のHCV-RNAは陽性であるが、ウイルス量とSIに関連はみられなかった。
3. DC内に特定のHCVはみられなかった。
4. IPCはCH-Cにおいて健常者に比べ有意に増加していた($P < 0.05$)。C型慢性肝炎患者において、HCVの樹状細胞内への存在が抗原提示能の低下に関与していることが示唆された。

F. 健康保険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

分担研究報告書

GPT 正常C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療についての検討

研究協力者 折戸悦朗 名古屋市立大学第二内科講師

研究要旨

C型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）治療はすでに広く行われているが、GPT 正常症例については、治療の適応や、有効性、副反応の有無についてはまだ十分には検討されていない。少なくとも6ヶ月以上GPT 正常なHCV RNA陽性患者に対し、IFN 治療を行ってその有効性を検討したところ、24%が著効となり、GPT 異常の症例と有意差は見られず、また無効例における治療後のGPT の有害な変動も見られなかった。以上からGPT 正常なHCV RNA 陽性患者に対してのIFN 治療は、有効性が期待される例や、組織が進展した例では治療すべきであると考えられた。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）治療はすでに広く行われており、その有効性、副作用、また治療前ウイルスマーカーとその後の治療効果との関連などについては既にかなり研究されている。しかし、GPT 正常C型肝炎患者についてのIFN 治療については、1997年のNIHのコンセンサスにて、治療すべきではないとの見解が出されて以来何ら検討されていない。実際にこういったGPT 正常C型肝炎患者を無治療で放置しても問題がないのか、またもし敢えて治療を行った場合に何か障害があるのかについては未だに不明である。そこでGPT 正常C型肝炎患者に対し、IFN 治療を行った症例をretrospective に収集して、その有効性、問題点について検討することを目的とした。

B. 研究方法

過去にIFN 治療を行った241症例のうち、治療前6ヶ月以上GPT が正常であった50例と異常値を示した191例を検討した。治療前ウイルス量はprobe法にて、genotype はPCR法にて検討した。さらに治療後のGPT の変動について調査した。

倫理面への配慮として、患者に治療、採血の同意を得た。

C. 研究結果

GPT 正常群でのIFN 治療効果は、24%がウイルス学的著効を示し、GPT 異常群の32.5%と比べても有意差は見られず、良好な有効性を示した。また、genotype と有効性との検討では、1b型に比べ2a型が著効率が高かった。治療前ウイルス量との関連は、GPT 異常群と同様にやはり治療前ウイルス量の低い

の変動について追跡フォローしたが、無効例の半数は GPT 正常に戻り、残り半数は正常の 2 倍以下でその後推移していた。

D. 考案

1997 年に出されたアメリカの NIH のコンセンサスガイドラインでは、GPT 正常慢性肝炎症例は IFN 治療すべきではないとしたが、これにはあまり明確な根拠が見られていない。特にこのコンセンサスが出された根拠になったデータは、当時発表されたいくつかの 10 数例の小規模な研究だけで出されており、当時のデータでは、あまり著効率が良好でなく、かつ治療無効例では、治療後に GPT が上昇してしまい、かえって有害になる可能性が指摘されたため、このようなガイドラインが示された。しかし、今回われわれの、多数例での検討では、治療効果は GPT 異常例と比べても十分遜色なく、また治療効果がたとえ無効であっても、6 ヶ月以上経過を追うと、すべての例が GPT は正常化または正常の 2 倍以下に安定することが確認された。さらに、最近の報告では GPT 正常のキャリアであっても、数年の間に 20%以上の例が GPT が上昇してくること、また肝生検で組織を見ると F3, F4 などにすでに進展した例が混在することが示され、たとえ GPT が正常だからといっても、放置すべきではないことが判明してきた。したがって、今回の検討からも、ウイルス量の低い例、genotype が 2 型の例、肝組織が進展している例では、たとえ GPT が正常であっても患者の理解が得られれば IFN 治療は行うべきでありと考えた。

E. 結論

GPT 正常の HCV RNA 陽性患者においては、ウイルス量、genotype、肝組織などを検討した上で、適応があれば IFN 治療を行うべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Lu L, Nakano T, Orito E, Mizokami M, Robertson BH.

Evaluation of HCV mutation in a chronically infected chimpanzee: comparison of core, E1, HVR1 and NS5b regions. *Journal of Virology* 75:3004-3009, 2001.

Iijima Y, Kato T, Miyakawa H, Ogino M, Mizuno M, Sugihara K, Ando T, Fujiwara K, Orito E, Ueda R, Mizokami M.

Effect of interferon therapy on Japanese chronic hepatitis C virus patients with anti-liver/kidney microsome autoantibody type 1. *J Gastroenterol Hepatol* 16(7):782-8, 2001.

Yoshioka K, Kobayashi M, Orito E, Watanabe K, Yano M, Sameshima Y, Kusakabe A, Hirofuji H, Fuji A, Kuriki J, Arao M, Murase K, Mizokami M.

Biochemical response to interferon therapy correlates with interferon sensitivity-determining region in hepatitis C virus genotype 1b infection.

J Viral Hepatitis 8; 421-429, 2001.

2. 学会発表

Nakano T, Lu L, Robertson BH, Orito E, Mizokami M.

Convergent evolution of hepatitis C virus

observed in hypervariable region 1 among a chronically infected chimpanzee.

The 52nd Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, Dallas, USA, Nov 9-13, 2001.

折戸悦朗

日本の肝炎ウイルス、ウイルス肝炎の治療

肝癌撲滅運動講演会、日本肝臓学会主催、平成 13 年 5 月 26 日、名古屋

服部祐子、折戸悦朗、大野智義、加藤秀

章、上田龍三、溝上雅史

ワークショップ「C 型肝炎の臨床における問題点」

C 型肝炎ウイルス感染経過における妊娠出産のおよぼす影響

第 37 回日本肝臓学会総会、平成 13 年 5 月 17 日～18 日、横浜

大野智義、折戸悦朗、溝上雅史

パネルディスカッション「消化器癌の遺伝子治療研究の現状」

新しい遺伝子デリバリーシステムを用いた遺伝子導入樹状細胞による免疫療法の可能性について

第 87 回日本消化器病学会総会、平成 13 年 4 月 18 日～20 日、東京

分担研究報告書

C 型慢性肝炎に対する IFN responder における、5 年後の肝組織像の改善と
HCV 抗体の推移

分担研究者 赤羽賢浩 山梨医科大学第 1 内科助教授

共同研究者 内藤成子、坂本 穰、岡田俊一 山梨医科大学第 1 内科

研究要旨

C 型慢性肝炎に対して IFN 治療を行い、virological responder (VR) となった症例は組織学的にも、血清学的にも改善するとされているがその詳細は必ずしも明かではない。そこで、VR 症例の 5 年後の肝組織像の改善と HCV 抗体の推移を検討した。IFN 治療終了から 5~9.1 年、平均 6.3 ± 1.3 年経過後に反復肝生検を実施した 22 例を対象とした。その結果、staging (F) は $-1.10/5$ 年、grading (A) は $-1.23/5$ 年の改善がみられた。特に grading の改善は顕著で、全例が A0 ないし A1 まで改善した。HCV genotype 1a の 12 例と non-1a の 10 例に分けて比較したが、両者の改善に有意差は見られなかった。また、この 22 例につき、IFN 治療の non-responder (NR) 10 例を比較対照に、HCV 抗体の推移を検討した。PHA で測定する HCV 抗体は、22 例中少なくとも 18 例で HCV 抗体価の低下が観察されたが、genotype による差異は見られなかった。HCV の recombinant 抗原を固相した ELISA により、HCV 抗体を、core、NS3、NS4、NS5 に対する各抗体に分けて測定すると、VR では core に対する抗体より、NS 領域、特に NS4 に対する抗体価の低下が著しかった。Genotype による抗体価の低下にも有意差はみられなかった。

A 研究目的

最近、C 型慢性肝炎に対する IFN 治療の virological responder における肝組織像の改善の報告が散見される。しかし、これらの報告の多くは IFN 投与後数年の検討であり、5 年以上の中～長期の組織学的検討は少ない。

改善が予測されるが、その詳細は明らかではない。そこで、今回 C 型慢性肝炎に対して IFN 治療を行い、VR となった症例のうち、5 年以上が経過し、かつ十分なインフォームドコンセントの下に反復肝生検が行われた症例につき肝組織像の改善と、HCV

抗体の推移を検討した。

B 対象並びに方法

1991年から1996年の間にC型慢性肝炎に対してIFN治療を行い、その結果VRとなった症例のうち、5年以上が経過し、十分なインフォームドコンセントの下に反復肝生検が行われた22例を対象とした。男性17例、女性5例、年齢分布は23歳から66歳、平均 43.2 ± 12.2 歳。IFN投与前の肝組織像のstagingは、F1 6例、F2 10例、F3 4例、F4 2例であり、gradingは、A1 7例、A2 13例、A3 2例である。またHCV genotypeは1b 12例、2a 3例、2b 6例、mixed 1例である。観察期間はIFN終了後5年から9.1年、平均 6.3 ± 1.3 年である。

血清中のHCV抗体はPHA法で測定した他、HCVの4種類のrecombinant抗原を用いてELISAにより、それぞれcore (c22-3)、NS3 (c33c)、NS4 (c100-3)、NS5 (NS5)に対する抗体を測定した。陰性コントロールの $\text{mean} + 2\text{SD}$ をCOVとし、S/COV ratioを求めた。HCV抗体の測定にあたっては、ほぼ同時期にIFN治療を受け、non-responderであった10例を比較対照とした。

(倫理面への配慮)

VR症例の経過観察にあたっては、VR症例でも少数ながら問題点が残っていることを十分説明し、通院回数も可能な限り少なくするよう配慮した。特に、反復肝生検の実施にあた

っては、十分なインフォームドコンセントを得た上で行った。

C 研究結果

5年以上経過後の肝生検像は顕著に改善が見られた。Stagingに関しては、22例中19例で改善がみられ、平均 $F-1.10/5$ 年と計算された。Fが不変の3例はいずれもF1の症例であった。また、gradingも2例を除き改善がみられ、5年後の肝組織像は22例全例がA1ないしA0を示した。Gradingの改善は平均 $A-1.23/5$ 年と計算された。やはりAが不変の2例はいずれもA1であった。

組織像の改善をgenotype 1b 12例とnon-1b 10例にわけて検討すると、1bでは $F-1.16/5$ 年、non-1bでは $F-1.10/5$ 年、また1bでは $A-1.25/5$ 年、non-1bでは $A-1.20/5$ 年と、いずれも差異を認めなかった(図1)。

図2に、この22例につきPHAで測定したHCV抗体の推移を示した。PHA価 2^{12} 以上は希釈して測定していないため、詳細は不明であるが、22例中少なくとも18例はHCV抗体の低下が観察された。HCV抗体価の低下をgenotype別に検討したが、1bとnon-1bの間に差異は見られなかった。

HCV抗体を、それぞれcore、NS3、NS4、NS5に対する抗体に分けて検討すると、coreに対する抗体に比しNS領域に対する抗体の低下が顕著であった。VRであっても2/3の症例ではcoreに対する抗体は不変である

が、NS 領域に対する抗体は、若干の例外を除きほとんど全て症例で低下が見られ、特に NS4 すなわち c100-3 に対する抗体の低下が顕著であった。Genotype 1b に比し、non-1b の症例では、NS3、NS5 に対する抗体価の低下が目立つが有意差には至らなかった (図 3)。

C 考察並びに結論

C 型慢性肝炎に対する IFN 治療の著効例では、肝機能検査の改善のみならず肝組織像の改善がみられることが報告され、Shiratori らは年率 $F - 0.28 \pm 0.03$ の組織学的進展、即ち組織像の改善が見られることを報告している。しかし、組織像の改善の報告の多くは IFN 治療後数年のものが多く、中～長期の組織像を検索したものは少ない。今回 5 年以上経過した症例の肝組織像を検討した結果、特に grading の改善が顕著で、全例 A0 ないし A1 まで改善していた。また staging にも改善がみられ、F4 の 2 例はともに F3 に改善していた点が注目された。今回、F の改善率は $-1.10 / 5$ 年、A の改善率は $-1.23 / 5$ 年と概算され、これらの改善には HCV genotype による差異はほとんど見られなかったが、明確な結論を出すためには症例数の追加と、baseline を合わせた症例の検討が不可欠であると考えられた。

IFN 治療の VR では、当然 HCV 抗体が低下が見られることが予測されたが、今回の検討では、VR は 5 年

以上経過すれば、少なくとも 8 割以上の症例で PHA 価の低下が見られることが明らかになった。HCV 抗体価の低下は core 領域より、NS 領域に対する抗体価の低下が著しく、特に NS4 領域に対する抗体価の低下が顕著である点が注目された。尚、今回の検討では genotype による差異を明らかにし得なかった。今後更に症例数を追加すれば、genotype による差異が見られる可能性もあるものと考えられた。

5年以上経過後の肝組織像の改善

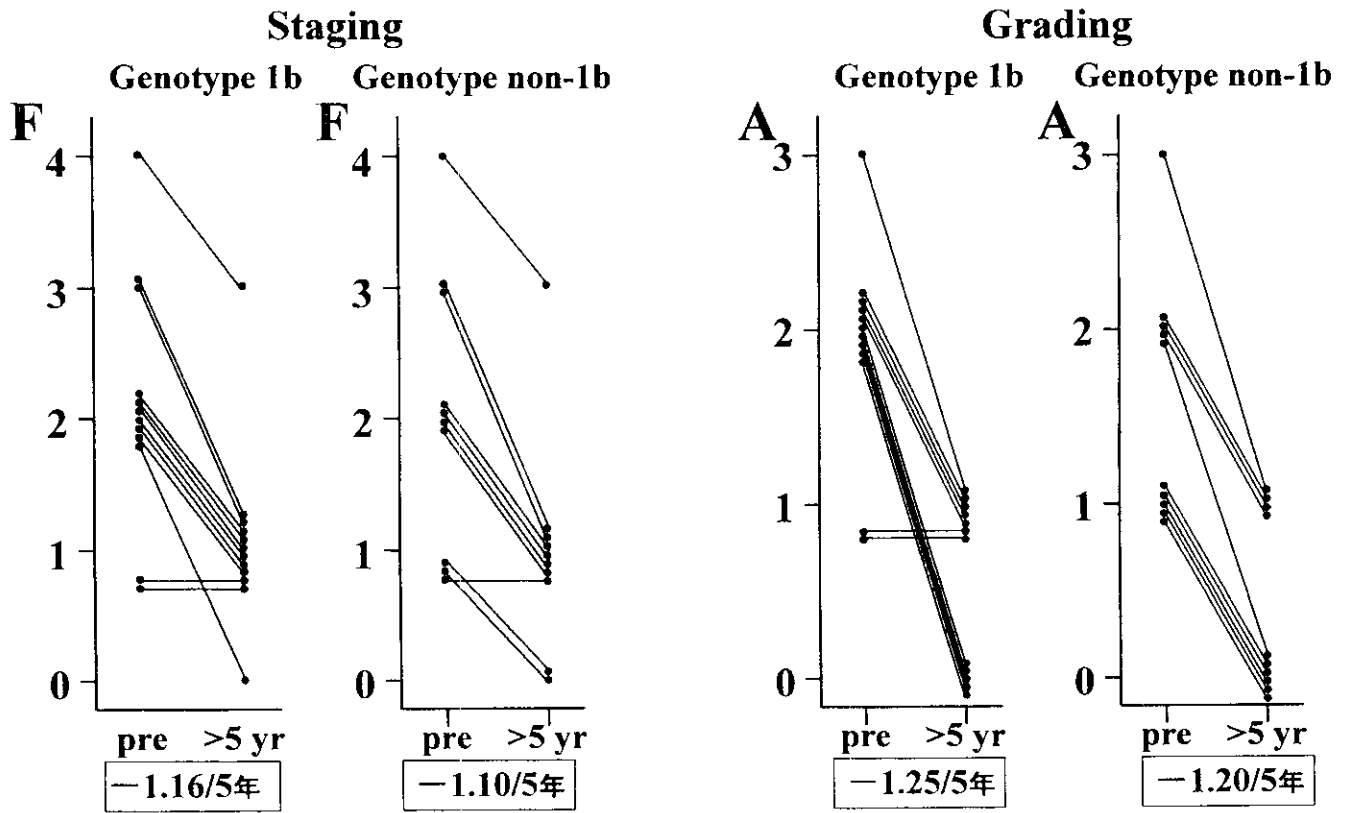


図 1

5年以上経過したVRのanti-HCV(PHA)

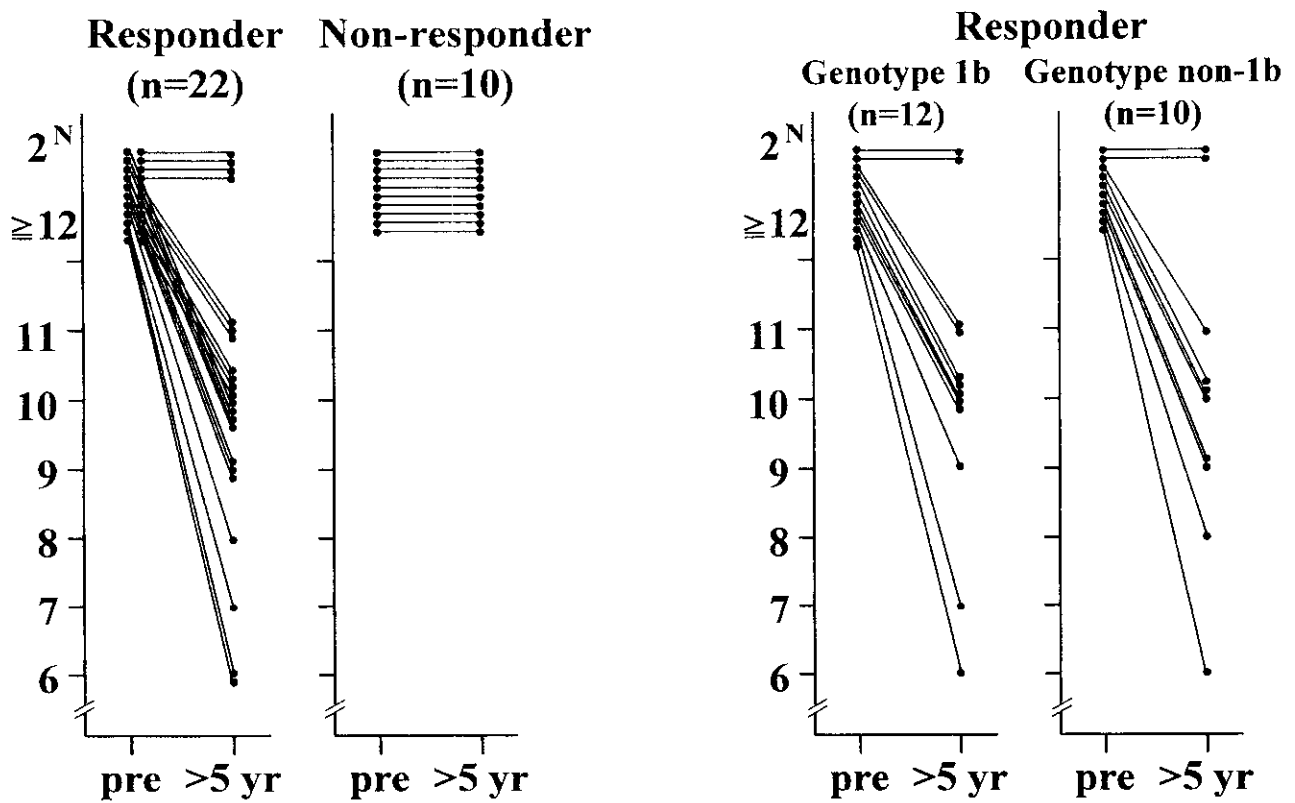


図 2

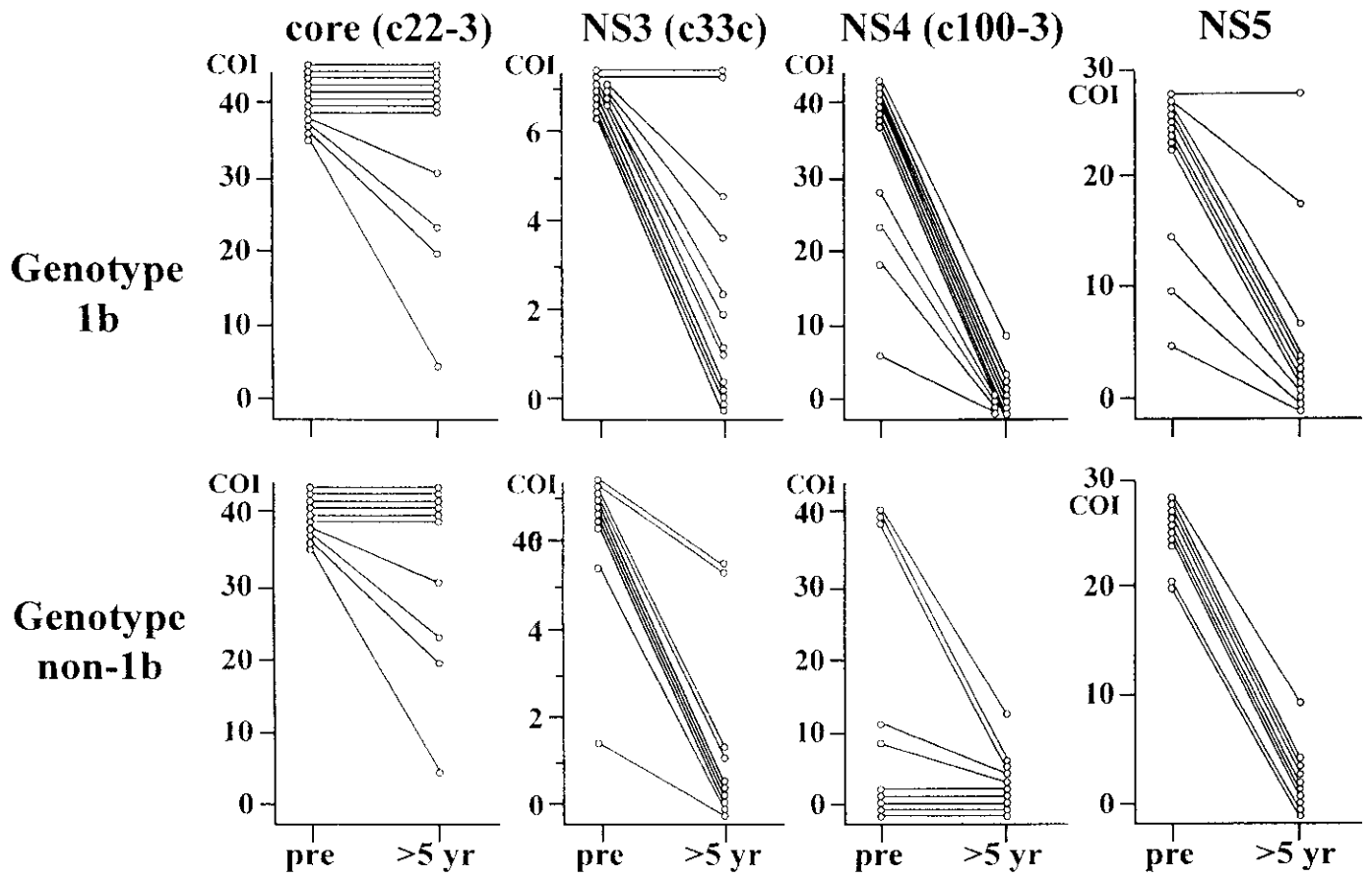


图 3

IFN 治療著効 C 型慢性肝炎からの肝発癌例

研究協力者 岡上 武 京都府立医科大学第三内科学教室 助教授

共同研究者 牧山明子、伊藤義人、盛田篤弘、藤井秀樹
京都府立医科大学第三内科学教室

研究要旨：C 型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）著効例（SR）からの肝発癌例の特徴を明らかにするため、IFN 治療後 1 年以上フォローし得た C 型慢性肝炎 3019 例を対象とし、994 例の SR から発癌した 28 例（治療後 1 年以内の肝発癌例は対象外）について解析した。28 例の肝発癌の内訳は男性 26、女性 2 例で、肝発癌時の年齢は 39-75 歳（平均 66 歳）、うち 9 人は大酒家で、そのうち 5 人は IFN 治療後断酒。治療終了後から肝発癌までの期間は 1 年 7 ヶ月から 7 年 1 ヶ月（平均 4 年 1 ヶ月）。28 例の治療前病期は F1：4、F2：11、F3：9、F4：4 例。肝発癌個数は単発 20（腫瘍径は 12-80mm、平均 31mm）、2 個：6、3 個：1、多発 1 例であった。著効例からの肝発癌例は比較的大きな癌で発見されることが多く、治療前の病期のあまり進展していない例からの発癌例も多かった。この原因に関しては今後詳細な検討を行う予定である。著効例も治療後最低 7 年間は定期的なフォローが必要と考えられた。

A. 研究目的

IFN 治療により肝炎が抑制されると肝組織所見の改善とともに肝発癌（HCC）が抑制されることが知られているが、著効例からの肝発癌例も少数ながら報告されている。IFN 著効例からの発癌に関与する因子として IFN 治療前の肝線維化の進行度が重視され、それ以外に潜在する HBV 感染、鉄の過剰沈着などが報告されている。

今回著効例からの肝発癌例の特徴を明らかにするため、以下の解析を行った。

B. 研究方法

調査対象は当科を含めた多施設にて IFN 治療を受け、終了後 1 年以上

フォローしえた C 型慢性肝炎 3019 例で、治療前肝生検による病期別分類は、F0：20、F1：888、F2：925、F3：1052、F4：134 例であった。IFN 治療により生化学的に著効（SR）を示したものが 994、一過性有効（TR）が 791、無効（NR）が 1234 例であった。

（倫理面への配慮）

本研究においては特に行っていない。

C. 研究結果

SR 後 1 年以内の肝発癌例は対象外としたところ、SR の 994 例中 28 例に肝癌が発見され、男性 26、女性 2 例であった。肝発癌時の平均年齢は 39-75 歳（平均 66 歳）、少なくとも

も 9 人は大酒家で、うち 5 人は治療後断酒していた。SR 後にも日本酒 1 合/日またはビール 2 本/日以上摂取していた 4 例で血小板の改善していなかったものは 2 例であった。HBV 重複感染はなく、既感染は少なくとも 13 例に見られた。血小板数は治療前が $5.0-20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ (平均 $11.7 \times 10^4/\mu\text{l}$) で、肝癌発見時は $6.2-28.7 \times 10^4/\mu\text{l}$ (平均 $16.3 \times 10^4/\mu\text{l}$) であった。治療前の病期は F1: 4、F2: 11、F3: 9、F4: 4 例 (図 1) で、肝癌発見時の非癌部の組織は 19 例中 F0: 2、F1: 4、F2: 8、F3: 3、F4: 2 例 (図 2) であった。治療終了から肝癌発見までの期間は 1 年 7 ヶ月から 7 年 1 ヶ月 (平均 4 年 1 ヶ月) で、肝癌の個数は単発 20 (腫瘍径は 12-80mm、平均 31mm)、2 個: 6、3 個: 1、多発 1 例であった。外科的切除を施行された例は 16 例で、少なくとも 6 例で局所再発を認めた。

D. 考察

著効例からの肝発癌に関与する因子につき検討した。治療前の病期は F1-2 が 28 例中 15 例と 50%以上を占め、HCC 発見時は F0-2 が 19 例中 14 例と病期は全体的に改善していた。これより、治療前の病期が軽度の例からの発癌が多いことになるが、治療前の血小板数が平均 $11.7 \times 10^4/\mu\text{l}$ と比較的少ないことから、針生検によるサンプリングエラーの可能性もあり、ヒアルロン酸値などの線維化マーカーも検討する必要があると考えられた。

SR 後に血小板が改善しなかった例は 4 例で、HCV-RNA 陰性化後も肝機能異常が持続している例が見られ、この原因についても今後検討する予

定である。

肝癌が比較的大きな状態で発見されることが多かったのは、著効となったため経過観察の期間があいている例や、定期的にフォローがなされていない例が存在したためと考えられた。

E. 結論

IFN 著効例も治療後最低 7 年間は定期的な経過観察が必要である。治療前の線維化の程度が比較的軽いものでも肝発癌の危険性があり、今後著効例からの肝発癌の因子の詳細を明らかにする必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 共同研究者と施設

- ・信州大学第二内科 (清澤研道先生ほか)
- ・名古屋大学第三内科 (各務伸一先生 (現愛知医科大学第一内科)、吉岡健太郎先生ほか)
- ・京都府立医科大学第三内科、関連病院
- ・大阪大学第一内科 (分子制御治療学: 林紀夫先生、総合診療部: 笠原彰紀先生ほか)、関連病院
- ・大阪大学第二内科 (河田純男先生 (現山形大学第二内科))
- ・市立池田病院内科 (今井康陽先生)
- ・山口大学第一内科 (沖田極先生、日野啓輔先生ほか)
- ・宮崎医科大学第二内科 (坪内博仁先生ほか)